TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKIM SİTOMETRİSİ YÖNTEMİNİN İNSAN SPERM HÜCRELERİNDE İ) FOSFOLİPAZ C-ZETA VE IZUMO-1, İİ) DNA'SINDA KIRIK OLAN SPERM HÜCRELERİNİN SAPTANMASI İÇİN OPTİMİZE EDİLMESİ

Zeynep Çakar

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Özgür ÇINAR

ANKARA

2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKIM SİTOMETRİSİ YÖNTEMİNİN İNSAN SPERM HÜCRELERİNDE İ) FOSFOLİPAZ C-ZETA VE IZUMO-1, İİ) DNA'SINDA KIRIK OLAN SPERM HÜCRELERİNİN SAPTANMASI İÇİN OPTİMİZE EDİLMESİ

Zeynep Çakar

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Özgür ÇINAR

ANKARA

2019

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Akım sitometrisi yönteminin insan sperm hücrelerinde i) Fosfolipaz C-zeta ve Izumo-1, ii) DNA'sında kırık olan sperm hücrelerinin saptanması için optimize edilmesi" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.
Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Zeynep Çakar
Tarih: 18 Haziran 2019
İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalında Zeynep ÇAKAR tarafından hazırlanan "Akım sitometrisi yönteminin insan sperm hücrelerinde i) Fosfolipaz C-zeta ve Izumo-1, ii) DNA'sında kırık olan sperm hücrelerinin saptanması için optimize edilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	ix
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1 Genel Kapsam	1
1.2 Testisin Gelişimi ve Histolojisi	3
1.2.1 Gonadlar	3
1.2.2 Testisin Gelişimi	3
1.2.3 Erkek Genital Yollarının Gelişimi	4
1.2.4 Sertoli Hücreleri	4
1.2.5 Spermatojenik Hücreler	5
1.2.6 Leydig Hücreleri	5
1.3 Spermatozoon Yapısı ve Spermatogenez	5
1.3.1 Spermatogomyumlar	6
1.3.2 Spermatosit ve Mayoz	6
1.3.3 Spermatidler ve Spermiyogenez	8
1.3.3.1 Golgi Evresi	8
1.3.3.2 Başlık Evresi	9
1.3.3.3 Akrozom Evresi	9
1.3.3.4 Olgunlaşma Evresi	10
1.3.4 Spermatozoonun İnce Yapısı	10
1.3.4.1 Baş Bölgesi	11
1.3.4.2 Çekirdek	11
1.3.4.3 Akrozom	11
1.3.4.4 Bağlayıcı Parça	12
1.3.4.5 Kuyruk Bölgesi	13
1.3.4.5.1 Aksonem	13
1.3.4.5.2 Orta Parça	13
1.3.4.5.3 Esas Parça	14
1.3.4.5.4 Son Parça	14
1.4 Erkek İnfertilitesinde Tanı Yaklaşımları	14
1.5 Spermatozoon İnceleme Yöntemleri	15
1.6 Akım sitometri yöntemi ve spermatozoon seçiminde kullanımı	18
2. GEREÇ ve YÖNTEM	21
2.1 Çalışma Gruplarının Oluşturulması	21
2.2 Kapılamanın Oluşturulması	22
2.3 Analiz Şablonunun Oluşturulması	23
2.4 Optimizasyon Deneyleri	23
2.4.1 Permeabilizasyon Optimizasyonu	24
2.4.2 Bloklama Optimizasyonu	24
2.4.3 Antikor Dilüsyonlarının Belirlenmesi	24
2.5 Deney Gruplarının Hazırlanması	25

2.5.1 Spermatozoondaki PLC-ζ ve Izumo-1 içeriğinin Accuri C6 akım sitometri kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmesi 25
2.5.2 Spermatozoondaki DNA fragmantasyonunun Accuri C6 akım sitometri kullanılarak kantitatif olarak belirlenmesi 26
2.5.3 Spermatozoondaki PLC-ζ, Izumo-1 içeriğinin ve DNA Fragmantasyonun konfokal mikroskop ile değerlendirilmesi 27
2.6 İstatistiksel Analiz 29
3. BULGULAR 30
3.1 Kapılamanın Oluşturulması 30
3.2 Analiz Şablonunun Oluşturulması 30
3.3 Optimizasyon Deneyleri 32
3.3.1 Permeabilizasyon Optimizasyonu 32
3.3.2 Bloklama Optimizasyonu 32
3.3.3 Antikor Dilüsyonlarının Belirlenmesi 33
3.4 Deney Gruplarının Analizi 34
3.4.1 Spermatozoondaki PLC-ζ ve Izumo-1 içeriğinin Accuri C6 akım sitometri kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmesi 34
3.4.2 Spermatozoondaki DNA fragmantasyonunun Accuri C6 akım sitometri kullanılarak kantitatif olarak belirlenmesi 38
3.4.3 Spermatozoondaki DNA fragmantasyonunun flow sitometri kullanılarak PLC-ζ ile ilişkisinin değerlendirilmesi 38
3.4.4 Spermatozoondaki PLC-ζ ve Izumo-1 içeriğinin ve DNA fragmantasyonun konfokal mikroskop ile değerlendirilmesi 39
4. TARTIŞMA 40
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 45
ÖZET 46
SUMMARY 47
KAYNAKLAR 48
ÖZGEÇMİŞ 51

ÖNSÖZ

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde tamamlamış olduğum 7 yılımın ardından yüksek lisans tezimi bitirmiş olmanın mutluluğunu yaşıyorum. Bu kürsü çatısı altında desteklerini her an hissettiğim, değerli Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmalarını yürüten tüm hocalarıma, asistanlara, personellere ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür etmek isterim. Bu kürsü benim için sadece bir yüksek lisans programına ev sahipliği olmakla kalmadı aynı zamanda gün geldi evim oldu. Sevgimiz paylaştıkça büyüdü, güçlendi ve farklı bağlar kurmamızı sağladı.

- Bu yolculukta beni pamuklara sarıp sarmalayan, şevkatiyle bir babadan farksız değerli Prof. Dr. Alp Can'a,
- Sadece yol göstericim olmayan, hayatla ilgili de paylaştıklarımızdan son derece keyif aldığım, geçirdiğim her anı güzel ve özel hatırladığım, beni sorgulamak, soru sormak için teşvik eden, eleştiren ama hep destekleyen bir danışman olduğu için sevgili Prof. Dr. Özgür Çınar'a,
- Geldiğim noktada kazandığım beceri, bugün sahip olduğum donanım, özgüven, düşünme ve uygulama yetilerimin tamamını kazanmamı sağlayan Yar. Doç. Dr. Duru Aras'a,
- Hayatıma renk kattığını düşündüğüm, her zaman desteğini hissettiğim Doç. Dr. Sinan Özkavukcu'ya,
- Enerjisine ve işine bağlılığına saygı duyduğum, gelişimimde katkısı olduğunu düşündüğüm Prof. Dr. Çiler Çelik Özenci'ye,
- Çalışmalarımız için kullanılan tüm olgu materyallerini titizlik içerisinde bize sağlayan Uzm. Dr. İskender Kaplanoğluna,
- Ben laboratuvarda bu kadar güzel zaman geçirirken, beni gülen gözleri ile hep destekleyen sevgili annem, babam ve ablam Semra, Kenan Sami ve Gökçe Çakar'a, bu yolculukta elimi hiç bırakmadığını düşündüğüm, beni hep izlediğini bildiğim Nezo'ya,
- Benimle her daim gurur duyduğunu bildiğim canım arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum.

Bilimin içi, bilgili insanların ışığı öncülük etmediği takdirde, parayla ve şöhretle doldurulamaz. Etrafımda bana ışığıyla yol gösterebilecek yol hocalarım ve arkadaşlarım oldu, bunun için minnettarım. Bu kadar sanşlı olmasaydım şu an bulunduğum noktada olmazdım. Sevgili Duru bana güvendiğin, hep öğrettiğin, sorumluluk verip yanlış yapmamdan korkmadığın için sonsuz teşekkür ederim.

Ailem de bu yolculuğa çıkan ilk Çakar olmanın mutluğu ve gururu ile, başka yolculuklarda tekrar karşılamak ümidi ile...

Vira vira demir aldı Dünya.!!

SİMGELER VE KISALTMALAR

ζ	Zeta
ABP	Androjenleri bağlayan protein
Ad	Koyu tip A spermatogonyumlar
Ap	Açık tip A spermatogonyumlar
BSA	Bovine Serum Albumin
CASA	Bilgisayar Destekli Sperm Analyzi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FACS	Flüoresan Hücre Ayrıştırma
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
FSH	Follikül stimüle eden hormon
HABA	Hyaluronik Asit'e Bağlanma testi
HE	Hematoksilen Eozin
ICSI	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IMSI	İntrasitoplazmik Morfolojik Sperm Enjeksiyonu
IVF	İn vitro fertilizasyon
MACS	Manyetik Hücre Ayrıştırma
MFI	Mean Flourensence Intensity
MIF	Mullerian Inhibitor Factor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PLC-ζ	Phospholipase C-zeta
PMT	Photomultiplier tube
SCD	Sperm Chromatin Dispersion (Halo) Test
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
SSC	Side Scatter
SRY	Cinsiyeti belirleyici genin
TDF	Testis Determining (Belirleyen) Faktör
TO	Thiazole Orange
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) dUTP Nick End Labelling
7-AAD	7-aminoactinomycin D

ŞEKİLLER

Şekil 2.1 : Deney akışı 22

Şekil 3.1: Laboratuvarımızda kapılama stratejisiyle oluşturmuş olduğumuz bölge 30

Şekil 3.2: Her bir olgu için oluşturulmuş akım sitometrisi analiz şablonu 31

Şekil 3.3: Farklı yoğunluk denemeleri yapılan permeabilizasyon solüsyonunun karşılaştırılması 32

Şekil 3.4: Farklı seyreltmeler yapılan sekonder antikor gruplarının boyanmamış gruba ait örnekler ile karşılaştırılması 34

Şekil 3.5: Spermatozoonun taşıdığı protein miktarlarının, yüzde ve sinyal yoğunluğu ile değerlendirilmesi 35

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1: Spermatozoon seçiminde özel yöntemler 17

Çizelge 2.1: Primer antikor çizelgesi 25

Çizelge 3.1: Toplanan olgularda fertilizasyon oranına göre PLC-ζ ve Izumo-1 değerlendirilmesi 35

Çizelge 3.2: Toplanan olgularda fertilizasyon oranına göre PLC-ζ değerlendirilmesi 37

Çizelge 3.3: Toplanan olgularda fertilizasyon oranına göre Izumo-1 değerlendirilmesi 37

Çizelge 3.4: Spermatozoondaki DNA fragmantasyonunun PLC-ζ ile ilişkisinin değerlendirilmesi 39

1. GİRİŞ

1.1 Genel Kapsam

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ, World Health Organization; WHO) 2010 verilerine göre dünya genelinde infertilite oranı %12-15'tir. Bu oranın yaklaşık %35'i kadın kaynaklı, %30'u erkek kaynaklı, %20'si hem erkek hem kadın kaynaklı, %15'i ise açıklanamayan infertilite olarak sınıflandırılmaktadır (Tocci ve Lucchini, 2010). Erkek infertilitesinde tanıya yönelik ilk basamak ejakülatın (semen) rutin yöntemler olarak adlandırılan temel olarak görünüm ve hareketini temel alan inceleme yöntemleriyle değerlendirilmesidir. DSÖ; rutin semen analizinde normal değerleri; 1ml'de canlılık oranı en az %58, en az %4 normal morfoloji oranı, toplam spermatozoon sayısını 39 milyon ve mililitredeki spermatozoon sayısını 15 milyon olacak şekilde tanımlamaktadır. Bu örnekler için toplam hareketlilik oranının %40 ve üzeri, ileri hareketlilik oranının %32 ve üzeri olmasını esas kabul etmektedir. İnfertilite şikayetiyle kliniğe başvuran erkeklerin %15'inin semen parametreleri normal değer aralığındadır (Sharma ve ark., 2016). Bu nedenle infertilite için incelenecek semen örneklerinde spermatozoonun fiziksel parametrelerinin yanı sıra işlevi de ele alınmalıdır.

Ovulasyon süreciyle mayozun ikinci metafaz aşamasında bekleyen oositin mayozunu tamamlaması için spermatozoon ile fertilize olması gerekmektedir. Oosit mayozunu devam ettiren ve neler olduğu tam olarak bilinemeyen spermatozoon ile oosite aktarılan moleküllere "sperm faktörü" denilmektedir. Fosfolipaz C-zeta (Phospholipase C-zeta; PLC-ζ) fertilizasyon sürecinde oositte hücre içi kalsiyum ossilasyonlarını uyararak oosit mayozununun devamı sağlayan etkilerinden dolayı sperm faktörlerinden birisi olabileceği öne sürülen spermatozoon kaynaklı bir proteindir (Saunders ve ark., 2002, Yoon ve ark., 2008, Heytens ve ark., 2009). Izumo-1 ise spermatozoonun oositte tutunmasında görevli bir proteindir (Inoue ve ark., 2005). Her iki proteinin sunulan etkilerinden dolayı erkek kaynaklı infertiliteyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Androloji laboratuvarlarında akım sitometri yöntemi özellikle spermatozoada DNA kırıklarını saptamak amacıyla günümüzde yavaş yavaş kullanıma girmeye başlamıştır. Bu yöntem sadece DNA kırığı saptamanın yanında fertilizasyon sürecinde önemli rolleri gösterilmiş spermatozoon kaynaklı başka moleküllerin de taranması için bir umut vaadetmektedir. Ancak yukarıda önemleri vurgulanan ve bu tez çalışmasına konu olan bu iki proteinin analiz edilebilmesi için henüz literatürde ayrıntılı olarak tanımlanmış bir yöntem bulunmamaktadır. Ayrıca, her ne kadar bu proteinlerin fertilizasyon için önemli rolleri bilinmekle birlikte; fertilizasyon ile klinik ilişkisini ele alan bir çalışma bugüne kadar henüz yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasının amaçlarından bir tanesi, PLC-ζ ve Izumo-1 proteinlerinin akım sitometrisinde incelenebilmesini sağlamak amacıyla standart bir yöntemin optimize edilmesidir. Tez çalışmasının ikinci amacıysa, yöntem optimizasyonunun ardından, bu proteinlerin fertilizasyon ile ilişkisinin araştırılmasıdır.

Son yıllarda yapılan bir çok çalışmada; spermatozoondaki DNA hasarının, fertilite oranlarının azalmasıyla ilişkili olduğu rapor edilmiş (Aitken ve ark., 2013). Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde, spermatozoaya ait DNA bütünlüğünün belirlenmesinin rutin semen analizine göre daha ayırt edici bir yöntem olabileceği gösterilmiştir (Sedó ve ark., 2017, Schulte ve ark., 2010, Zini ve ark., 2014). Fertil ve infertil olgularda akım sitometri cihazı kullanılarak yapılan çalışmada spermatozoon başına düşen DNA kırığı miktarları saptanmış ve toplam spermatozoa içinde TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) pozitif olanların oranı için %16.8 değeri infertilite teşhisi için eşik değer olarak önerilmiştir (Sharma ve ark., 2016). Ne var ki, literatürde konu ile ilgili pek çok çalışmada elde edilen norm veriler arasındaki tutarsızlık, akım sitometri yönteminde DNA kırığı oranlarını saptamayı hedefleyen çalışmalar içinde bir standardizasyon sağlanmasını gerekli kılmaktadır (Bach ve Schlegel, 2016). Bu çerçevede sunulan tez çalışmasının bir diğer amacı DNA kırıklarının TUNEL yöntemi ile saptanabilmesi için tüm dünyada kullanılabilecek standart bir yöntemin literatüre kazandırılmasıdır. Bu amaçla sunulan

tez çalışması kapsamında yukarıda anılan %16.8 eşik değerini literatüre öneren ve seçkin dergilerde konuyla ilgili çok sayıda yayını bulunan Prof. Ashok Agarwal ve ekibi ile iş birliğine gidilmiştir.

1.2 Testisin Gelişimi ve Histolojisi

1.2.1 Gonadlar

Gonadların gelişmesi sölom epitelinin mezonefrozun kenarında çoğalarak kalınlaşması ile başlar. Gonadal kabartı olarak adlandırılan longitudinal kabartı çifti, dorsal mezenter ve mezonefrozun arasında oluşur. Epiblast kaynaklı primordiyal germ hücreleri primitif çizgi boyunca göç ederler. Primordiyal germ hücrelerinin göçü; stella, fragilis genleri ve BMP-4 tarafından kontrol edilir. 21. günde, primordial germ hücreleri vitellus kesesinin allantoyise yakın kaudal duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşir. 4. haftada bu hücreler, ameboid hareketlerle sonbağırsağın dorsal mezenteri boyunca ilerler ve 5. haftada gonadal kabartıya göç ederek 6. haftada buraya ulaşır. Bu hücreler sayesinde çoğalan gonadal kabartı sölom epiteli, primordiyal germ hücre kordonlarını oluşturur ve bunların içine yerleşir. Bu kordonlar erkek ve dişi embriyolarında yüzey epitelindedir ve bu dönemde erkek ve dişi gonadlar arasında fark yoktur (farklılaşmamış evre) (Sadler, 2011).

1.2.2. Testisin Gelişimi

Cinsiyeti belirleyici gene ait (SRY), Y kromozomunun kısa kolu üzerinde TDF (*İng*. Testis Determining Factor; *Tr*. testisi belirleyen faktör) bölgesine yerleşmiş olduğu bildirilmiştir. Bu genin etkisiyle primer germ kordonları (testis kordonları) testis veya medular kordonları oluşturmak için medullanın içine uzanır. Bezin hilusuna doğru uzanan bu kordonlar, rete testis oluşturmak üzere bölünür. 7. haftada tunika albuginea yoğun fibröz bağ dokusundan oluşur. 16. haftada testis kordonları atnalına benzeyen şekli alır ve açık uçlarından rete testis ile devam eder. Puberteyle birlikte

testis kordonları lümenlerinin açılması ile seminifer tübüllere dönüşür. Gestasyonun 8. haftasında testosteron ve androstenedion üretimi başlar. Testisler böylelikle genital kanalın ve dış genital organların cinsiyete bağlı değişimini etkileyecek hale gelir (Sadler, 2011, Pawlina ve Ross, 2018).

1.2.3. Erkek Genital Yollarının Gelişimi

Leydig hücreleri tarafından 8. haftada insan koryonik gonadotropin hormonunun etkisiyle testosteron üretilir. Testosteronun üretimi; mezonefrik (Wolff) kanalların gelişimi ve farklanması ve böylece erkek genital boşaltım yollarının oluşumu için gereklidir. Seminifer tübüllerin duvarında gelişen Sertoli hücreleri 8-9. haftada MIF (*İng*. Mullerian Inhibitor Factor) salgılayarak dişi genital sisteminin temelleri olan Müller kanal sisteminin ileri gelişimini engeller. Mezonefrik kanallar kranial son kısımları hariç devamlılık gösterir. Gerileyen kranialin son kısmı apendiks epididimisi oluşturur. Mezonefroz gerilerken epigenital tübüller rete testis kordonlarıyla ilişki kurarak, duktuli efferentesleri meydana getirir. Ductus deferensi, testisin alt kısmında bulunan mezonefrik kanalın epididimisin distalindeki parçası oluşturur. Bu bölge mezenşimden kökenli bir kas tabakası ile sarılmış durumdadır. Paragenital tübüller ismindeki bu mezonefrik tübüller, rete testis ve mezonefrik kanalla bağlantı yapmayarak paradidimis olarak kalır (Gartner ve Hiatt, 2006, Kierszenbaum ve Tres, 2015).

1.2.4. Sertoli Hücreleri

Destek hücreleri olarak bilinen bu hücreler puberteye kadar çoğalır. Sertoli hücreleri arasında sitoplazmik uzantılarla sağlanan bağlantılar vardır. Bu bağlantıların oluşturduğu ağ yapısı, gelişmekte olan germinal hücreleri sarar ve sıkı bağlantılar oluşturur. Destek görevi dışında, fagositoz ve salgı özellikleri de bulunmaktadır. Gelişmekte olan germinal hücrelere, sitoplazmaları üzerinden ihtiyaç duydukları besinleri ulaştırır ve ortaya çıkan atık maddeleri uzaklaştırır. Sertoli hücreleri erişkin testis dokusunda androjenleri bağlayan protein (ABP) sentezini yapar. Germinal epitel

hücrelerinin ve lümende germ hücrelerinin olgunlaşmasını sağlayan androjeni, seminifer tübüllerinin dışında üretilen testosteron ve hidroksitestosteronu bağlayarak kullanır. ABP için hipofizden salgılanan folikül stimüle eden hormona (FSH) ihtiyaç duyar. Sertoli hücrelerinde bu hormonun reseptörü vardır. Ayrıca hipofizden FSH salınımını inhibe eden inhibin-B hormonu da bu hücrelerden salgılanır (Sadler, 2011).

1.2.5. Spermatojenik Hücreler

Düzenli çoğalan ve sonrasında olgun spermatozoona farklanan öncü hücreler; gelişim sırasında vitellus kesesinin allantoise komşu olan kenarında bulunup, genital kabartılara göç etmekte olan primordiyal germ hücrelerinden köken alır. Spermatogonyumlar immatür hücrelerdir ve bazal lamina üzerinde bulunurlar. Spermatidler matür hücrelerdir ve Sertoli hücrelerinin apikal kısmında yerleşir ve tübüllerin lümenlerinin sınırını oluşturur (Sadler, 2011, Kierszenbaum ve Tres, 2015).

1.2.6. Leydig Hücreleri

Testosteron üreten, büyük, çok yüzlü (poligonal), eozinofilik hücreler olan Leydig hücreleri tipik olarak lipid damlacıkları içerir. Sitoplazmalarında lipazlar, oksidatif enzimler, esterazlar ve steroid dehidrogenazlar bulunur. Hücre içinde, çubuk biçimli sitoplazmik inklüzyonlar olan Reinke kristallerini ve lipofüskin pigmentini barındırır. Leydig hücreleri granülsüz endoplazmik retikulumları gelişmiştir ve testosteron üretimi için gerekli enzimler burada bulunur (Kierszenbaum ve Tres, 2015).

1.3. Spermatozoon Yapısı ve Spermatogenez

Spermatogenez; seminifer tübüllerin bazalinde bulunan spermatogonyumların bölünüp farklılaşmasıyla olgun spermatozoonların ortaya çıkardığı bir süreçtir (Kierszenbaum ve Tres, 2015).

1.3.1. Spermatogonyumlar

Seminifer tübüllerin bazal membranına yakın yerleşir. Çekirdekleri yuvarlak veya hafifçe oval, 6-7 mikrometre (µm) çapında ve genellikle çekirdek zarına yapışık bir çekirdekçikle birliktedir. İnsan spermatogonyumları çekirdek boyanma özelliklerine göre 3 tipe ayrılır.

a) Koyu tip A (Ad) spermatogonyumlar: Çekirdekleri oval yapıdadır, kök hücre olabilecekleri düşünülen hücrelerdir. Bölünmesi sonucunda bir çift Ad spermatogonyum ya da bir çift açık tip A (Ap) spermatogonyum meydana gelir (Kierszenbaum ve Tres, 2015).

b) Açık tip A (Ap) spermatogonyumlar: Hematoksilen Eozin (HE) boyamasında, açık tonda boyanan oval çekirdeğe sahiptir. Farklılanma süreci ve spermatozoon oluşumundan sorumludur. Geçirdikleri mitoz bölünmeler sonucu sayılarını artırır ve tip B spermatogonyumları oluşturur (Kierszenbaum ve Tres, 2015).

c) Tip B spermatogonyumlar: Küre biçimli çekirdekli bu hücrelerde kromatin yapısı çekirdekçik çevresinde yoğunlaşmış olarak bulunur (Kierszenbaum ve Tres, 2015, Junqueira ve ark., 1995).

1.3.2. Spermatositler ve Mayoz

Mayoz bölünme; gamet hücrelerine özgü bir hücre bölünmesi olup kromozom sayısının yarıya düşmesiyle ve genetik çeşitliliğin oluşumuyla karakterizedir (Grudzinskas ve ark., 1995).

Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesiyle preleptoten spermatositler (birincil, primer spermatosit) oluşur. Bu hücreler, tübüllerin kenar kısmında yer alır ve epitelin bazal laminasına yakındır. Preleptoten spermatositlerin oluşumdan kısa süre sonra kromozom sayısını yarıya indirecek olan ilk mayoz bölünme için hazırlanır. DNA sentezi için nükleotid ve diğer maddelerin katılımından sonra preleptoten spermatositler bazal laminadan lümene doğru göç etmeye başlar. Bölünmenin profazı boyunca, kromatin düzenlenmesi değişikliklere uğrar. Hücre leptoten, zigoten, pakiten ve diploten evrelerine girer. Leptoten aşamasında kromozomlar ince, hassas filamanlar şeklinde görülür. Bu evre, homolog kromozomların eşleştiği (sinaps) zigoten evresi ile devam eder. Hücreler pakiten aşamasına gelince kromozomlar daha kısa ve kalın bir hal alır ve her biri bir sentromere tutunmuş iki kromatide ayrılır. Hücre pakiten aşamasında ilerledikçe çekirdek ve hücrenin hacminde belirgin bir artış ortaya çıkar. Homolog kromozomlar arasında genetik materyalin değiş tokuşu da bu evreye rastlar. Sinaps sırasında, homolog kromozomlar eşleştikçe çekirdekte olağan dışı 3 parçalı yapılar göze çarpar. Bu yapılara sinaptonemal kompleks denir. Zigoten ve pakiten evresinde, spermatositlerde tipik olarak görülür. Sinaptonemal kompleks, iki homolog kromozomun bağlanma noktasıdır. Homolog kromozom çiftleri her iki ucundan çekirdek zarına yapışıktır. Homolog kromozom çiftleri, (bivalent) 4 adet kromatid içerir. Buna tetrad adı verilir. Pakiten aşaması çok uzundur ve insanda yaklaşık 16 gün sürer ve tüm profaz evresi toplamda 22 günde tamamlanır. Pakiten aşamasından sonra her çiftin iki kromozomu görünür olarak ayrılır ancak uzun aksları boyunca belirli bazı noktalardan bağlı kalır. Bu bağlantı noktalarının her birine kiazma (çoğulu kiazmata) denir. Mayozun birinci bölünmesinin profazının son aşamasına diyakinezis denir. Diyakinezis sırasında her çiftin kromozomları daha da ayrılır, kalınlaşır ve çok koyu boyanmış olarak görülür. Profazın sonunda, çekirdek zarının çözünmesinden sonra 2 bivalent, (4 kromatid) metafaz-I'de kendilerini ekvatoryal düzlemde hizalar. Anafaz-I'de her homolog kromozomun kardeş kromatidi, birbirlerine sentromer ile bağlı bir şekilde karşı kutuplara doğru hareket eder. Mitozdan farklı olarak, ilk mayoz bölünmede sentromerler bölünmez. Anafaz-I ve telofaz-I aşamalarıysa hızla ilerler ve iki yeni hücre (ikincil, sekonder spermatosit) oluşur. Bu hücreler haploid sayıda kromozom içerir (Grudzinskas ve ark., 1995, Henrikson ve ark., 1997).

Primer spermatositlere göre daha küçük olan sekonder spermatositler DNA'larını eşlemeden, hızlıca, mayozun ikinci aşaması olan olgunluk bölünmesine girer. Metafaz-II sırasında kromozomlar, ekvatoryal düzlemde sıralanırken anafaz-II'de sentromerler bölünür ve her kromatid karşı kutba doğru mitozda görüldüğü şekilde hareket eder. Telofaz-II'den sonra genç spermatidler oluşur ve her biri haploid sayıda kromozom içerir (Grudzinskas ve ark., 1995).

1.3.3. Spermatidler ve Spermiyogenez

Spermiyogenez; oluşan spermatidin lümene verilmesinden önce olgun bir spermatozoona farklaşma sürecidir. Morfolojik yönden 4 evrede sınıflandırılır.

1.3.3.1. Golgi Evresi

Oluşan spermatidler, sekonder spermatositlerle benzer özelliktedir. Spermatidler, jukstanüklear yerleşimli Golgi kompleksi, perinüklear mitokondriyonlar, iki sentriyol, serbest ribozomlar, granülsüz endoplazma retikulumu ve birkaç lipit damlacığı içerir. Proakrozom granüllerinde glikoprotein miktarı fazladır. İlerleyen süreçte etrafı zarla sarılı bir akrozom vezikülüyle kaynaşır. Bu birleşme ile büyük, tek bir granüle sahip akrozom granülü meydana gelir. Akrozom granülü, az yoğunluktaki akrozom vezikülüyle sarılıdır. Akrozom granülü ve vezikülü, çevredeki Golgi ürünlerinin eklenmesi ile büyür. Çekirdeğin üzerinde bulunan akrozom bölgesi, spermatozoonun ön kutbunun belirlenmesini sağlar. Bir çok memeli türünde spermatozoon gelişiminin bu evresinde, mitokondriyonların sitoplazma kenarına doğru göçü ve hücre zarına çok yakın bir şekilde yerleştiği izlenir. Akrozom granülü ve vezikülün oluşumunda birbirlerine dik şekilde yerleşmişolan sentriyol, akrozomun aksi yönünde çekirdeğin arka tarafına doğru geçer. Spermatozoon kuyruğunda karakteristik aksonemin (periferde dokuz çift, merkezde bir çift mikrotübül düzenlenimi sonucu oluşan yapı) oluşumu, distal sentriyolle başlatılır ve sentriyol bu aşamada hücre yüzeyine dik konumdadır. Sentriyoller daha sonra hücrenin uzun aksı boyunca çekirdeğe doğru tekrar göç eder. Proksimal sentriyol kendisini çekirdeğin kaudal kutbuna yapıştırırken,

distal sentriyol flagellum yapımına devam eder (Kierszenbaum ve Tres, 2015).

1.3.3.2. Başlık Evresi

Akrozom başlığı,akrozom granülü ve vezikülünden meydana gelir ve çekirdeğe ait ön bölümün yarısını kaplar. Akrozom vezikülünün zarından yapılan akrozom başlığı, akrozomun tamamını kapsayacak biçimde iç ve dış akrozom zarını oluşturur (Kierszenbaum, 2001).

1.3.3.3. Akrozom Evresi

Bu aşamanın iki ana bileşeni vardır. i) spermatid çekirdeğinin ön kutbu (akrozom bölgesi), seminifer tübüllerin bazal bölümüne bakacak şekilde yerleşir, ii) çekirdek uzayarak ve kromatin yoğunlaşması meydana gelir. Spermatide ait sitoplazma, seminifer tübülün epitelinde lüminal bölgeye doğru hareket eder. Böylece çekirdeğe ait akrozom bölgesi, plazma zarıyla birbirine yaklaşır. Çekirdek zamanla yassılaşarak uzamaya başlar.

Akrozom büyümesini bitirdiğinde, çekirdeğin ön bölümünden sitoplazmanın bol olduğu bölgeye Golgi kompleksi göç etmeye başlar. Aynı süre içerisinde sitoplazmik mikrotübüller toplanır ve silindirik bir kılıf oluşturur. Bu kılıf kendisini akrozom başlığının arka sınırına yakın bir yere, çekirdeğin kaudal kutbuna yapıştırır. Manşet denen bu kılıfın yapısında, delta-tübülin (Smrzka ve ark., 2000) ve keratin 9 (Kierszenbaum, 2001) gibi bir çok protein bulunur. Manşet yapısı; spermiyogenez sırasında geçici olarak yapısal ve sinyal ileten proteinlerin depolanmasında görev alır (Kierszenbaum, 2002). Kuyruğun ileri dönem farklanmasıyla mikrotübüllere bitişik bir şekilde, kamçı boyunca yerleşen 9 adet uzunlamasına kalın mikrotübül oluşur (aksonem). Sentriyollerin yanındaki yüzük şeklinde bir yapı olan annulus, flagellumdan aşağı doğru göç eder. Mitokondriyonlar kuyruğun boyun bölgesinden annulusa kadar sıralanırlar. Kuyruğun bu bölgesi orta parça adını alır. Mitokondriyon

göçü tamamlanınca manşet yok olur. Orta parçanın distalinde, dokuz uzunlamasına yerleşimli kalın mikrotübülü sarmak için fibröz bir kılıf oluşur (Henrikson ve ark., 1997).

1.3.3.4. Olgunlaşma Evresi

Bu evrenin ana bileşenleri; artık (rezidü) spermatid sitoplazmasının atılması ve Sertoli hücrelerince fagosite edilmesidir. Sertoli hücreleri geç spermatidlerin tübül lümenine doğru serbestleştirilmelerinde görev alır (Kierszenbaum ve Tres, 2015).

1.3.4. Spermatozoonun İnce Yapısı

Spermatozoon olarak adlandırılan hücre 3x5 µm uzunluğunda disk biçimli bir baş yapısına sahip olup toplamda 50-60 µm uzunluğundadır. Spermatozoon; erkeğe ait DNA içeriğinin korunması ve oositle gerçekleşecek buluşma için bu içeriğin taşınmasından sorumludur. Servikal kanal civarında başlayan taşınma işlemi, dişideki Fallop tüplerine kadar devam eder (Grudzinskas ve ark., 1995).

Semenin içeriğinde; epididimisten, glandula bulboüretralisten, duktus deferensten, prostattan, vezikula seminalisten gelen salgılar ve testisten gelen spermatozoonlar bulunur. Semenin alkali yapısı üretra ve vajinanın sahip olduğu asidik ortamı sayesinde nötralize edilir. Yapısındaki prostaglandinler, spermatoozonun hareketiyle ilişkilendirilmektedir (Sadler, 2011).

Normal bir bireyde 1 ml semen örneğinde yaklaşık 100 milyon spermatozoon bulunur. Bu hücrelerden sadece %20'si morfolojik açıdan normaldir (Tocci ve Lucchini, 2010).

Spermatozoon 3 bölgeden oluşur;

1.3.4.1. Baş Bölgesi

DNA materyalinin oosite taşınması ve oositle spermatozoonun füzyonu sonrasında, erkeğe ait pronukleusun oluşturulmasından sorumludur. Çekirdek, akrozom ve akrozom sonrası kılıf ana bileşenleridir.

1.3.4.2. Çekirdek

Spermatozoona ait DNA materyali diğer hücrelerden farklı olarak bazik proteinler olan arjinin ve sistein bakımından zengin protaminlerle kompleks oluşturur. Sahip olduğu sistein sayesinde disülfit çapraz bağlarının sayısı fazladır bu sayede spermatozoonun genetik materyali bu yolculuk boyunca daha kompakt bir haldedir ve korunur. Haploid sayıda kromozoma sahiptir, protaminler normal yapılarına dönmeden ve füzyon olmadan genetik materyal aktive olmaz (Grudzinskas ve ark., 1995).

1.3.4.3. Akrozom

Akrozom; spermatozoonun baş bölgesinde, çekirdeğin önünde kalan ve yaklaşık üçte ikisini örten, zarla çevrili bir veziküldür. Plazma zarının altında duran akrozom zarı, arkaya doğru ilerledikten sonra tekrar öne gelir ve bu sırada yaptığı katlantı sonucu akrozom matriksini oluşturur. Bu matriksin içerisinde farklı hidrolitik enzimler bulunmaktadır. Önemli iki temel enzim akrozin ve hyaluronidazdır. Akrozom başlığının arka sınırında diğer enzimlerden yoksun, vimentinden zengin ekvator bölgesi yer alır. Çekirdek ile akrozomu birbirinden ayıran ince tabakaya perinükleer madde (post-akrozomal kılıf) denir. Arka halka ile bazal plaka, kuyruk ile baş bölgesini ayırır. Bu bölgede çekirdek zar yapısı porludur (Kierszenbaum ve Tres,

2015). Ön kısmı kaplayan plazma zarının iki fonksiyonu bulunmaktadır; zona pellüsidaya tutunma ve akrozom reaksiyonunu başlayabilmesi adına dış akrozom zarı ile birleşme.

Zar glikokaliksindeki glikokonjugatlar ve lektinin bağlanmasıyla aracılığıyla zona ile birleşme sağlanmaktadır. Bu kararsız durumdaki hücre zarının altındaki dış akrozom zarıyla bir araya gelmesiyle akrozom reaksiyonu başlar. İki zar arasında akrozomal enzimler olarak adlandırılan hyalüronidaz, akrozin, nöraminidaz ve tripsin benzeri maddeler bulunmaktadır. İn vitro olarak reaksiyonu başlatabilmek için folliküler sıvı, zona proteinleri ve progesteron kullanılmasına rağmen, in vivo mekanizmalar tam olarak hala bilinmemektedir. Spermatozoon ile dış akrozomal membranının bir araya gelmesiyle öncelikli olarak hyalüronidaz dışarı salınır. Reaksiyonla birlikte ortaya çıkan enzimler, kümülüs hücre kompleksini ve zonayı eriterek hiperaktive olmuş spermatozoona yardım etmektedir (Kierszenbaum ve Tres, 2015, Grudzinskas ve ark., 1995).

1.3.4.4. Bağlayıcı Parça

Baş ve kuyruk arasında 0,5 µmlik kısa bir bağlantı sağlar. Ana bileşenleri kapitulum, yoğun kubbe şekilli fibröz yapı ve bölünmüş sütunlardır. Kapitulum, baş kısmındaki bazal plaka ile ince proteinöz filamanlar aracılığıyla bağlantı sağlar. Proksimal bölümde iki çift halindeki sütun, 2 ana ve 2 yan sütun olacak şekilde kapitulumda birleşir. Distal bölümde her bir sütun birbiri üzerine gelerek ve orta parçada bulunan dış yoğun telciklerle birleşir. Kapitulum, proksimal sentriyolün de bulunduğu yerdir ve proksimal sentriyol kuyruğun aksına dik olarak konuşlanmıştır. Distal sentriyol spermiyogenezin ileri safhalarında yok olmaktadır. Sentriyollerin aksonemin inşaası sırasında önemlidir. 9 tane üçlü grup halinde dış mikrotübül içeren proksimal sentriyolün ortasında mikrotübül çifti yoktur (Grudzinskas ve ark., 1995).

1.3.4.5. Kuyruk Bölgesi

Enerji üretimini ve hareket işlevinde görevli gelişmiş bir yapıdır. Spermatozoa ilk olarak boşaltım sonrası tam olarak hareketlilik kazanır ve bu hareketlilik döllenmenin gerçekleşmesi için olmazsa olmaz bir kuraldır. İnsan spermatozoonunun kuyruğu; esas parça, orta parça, son parçadan oluşur.

1.3.4.5.1. Aksonem

Aksiyel filamanlar, tüm kuyruk boyunca uzanır ve kuyruğun motor bölümü gibi görev alır. Aksonem pozisyonu ökaryotik hücrelerde bulunan silia yapısına benzer olarak 9+2 şeklindedir. 9 adet mikrotübül dış yapıyı oluştururken buna ortada bir çift mikrotübül eşlik eder. Dışardaki her çift A ve B alt birimlerinden oluşur. Bu mikrotübüllerin ana yapı taşı, bir çok somatik hücre fonksiyonunda da yer alan tübülin adlı proteindir. Protofilamanları tübülin molekülleri oluşturur. Protofilamanlar bir araya gelerek mikrotübül duvarını meydana getirir. Tübülin α ve β olmak üzere 2 formdan oluşur (Grudzinskas ve ark., 1995).

Her bir A tübülünden yanında bulunan B tübülüne iki adet uzantı oluşur. Uzantıların kökeni bir protein olan Ca^{+2}-Mg^{+2} bağımlı ATPaz izomeri dyneindir. Dynein kolları mikrotübül çiftini, yanında bulunan mikrotübül çiftinin üzerinden kaydırarak kuyruğu hareket ettirir (Grudzinskas ve ark., 1995).

1.3.4.5.2. Orta Parça

3,5 µm uzunluğundaki orta parçanın en belirgin özelliği türe spesifik sayıda mitokondriyonun peşpeşe sıralandığı mitokondriyon kılıfının oluşudur. Bu kılıf aksonemin ertafını sarar. Spermatozoona ait mitokondriyonunun yapısı başka hücrelerdekine benzemekle birlikte, dış zar daha korunaklıdır. İç zarlar enerji üretiminden sorumludur ve özellikle kuyruğun kök kısmını saran mitokondriyonlar,

aksoneme sürekli ATP sağlarlar (Grudzinskas ve ark., 1995).

1.3.4.5.3. Esas Parça

Esas parça; aksonem ve dış yoğun telcikleri saran bir hücre iskeleti elemanı olan fibröz kılıfın varlığıyla birliktedir ve yaklaşık 55 µmdir. Fibröz kılıf sıkıca birleşmiş filamanlardan oluşur ve kuyruk hareketlerinin kontrolünü sağlar. Disülfit bağlarından zengin olan bu kılıf sayesinde dayanıklıdır (Grudzinskas ve ark., 1995).

1.3.4.5.4. Son Parça

Fibröz kılıfın distalinden başlayarak devamlılık gösterir ve 3 µm uzunluğundadır. Bu bölümde aksoneme ait mikrotübüler yapısı sonlanır. Önce dynein kolları, sonrasında merkezde bulunan mikrotübül çiftleri yok olur. Dış tarafta bulunan 9 çiftin ikisi orta alana doğru hareket ederken gerideki yedi çift, diğer çiftlerin etrafını sarar. Bu esnada B tübülleri de yokolur. Kuyruğun uç bölümüne doğru ilerledikçe tüm mikrotübül yapısı biter (Grudzinskas ve ark., 1995).

1.4 Erkek İnfertilitesinde Tanı Yaklaşımları

DSÖ'nün 2010 verilerine göre dünya genelinde infertilite oranı %12-15'tir. Bu yüzdelik dilimin %30'u erkek kaynaklı infertiliteyi oluşturmaktadır (Tocci ve Lucchini, 2010). Erkek infertilitesinin nedeni, çoğu zaman bilinmeyen nedenlere bağlı yani idiopatiktir. Bu oran erkek infertilite vakalarının yaklaşık %15'ini kapsamaktadır (Famurewa ve Ugwuja, 2017). Yapılan araştırmalarda; hormonal değişiklikler, kromozomal anomaliler, Y kromozom delesyonları, gen mutasyonları, tek nükleotid polimorfizmi ve semen parametrelerine göre infertilite sebepleri gruplandırılmıştır. Genetik olarak meydana gelebilecek mutasyonların, çevresel etkenlerle bir araya

geldiğinde; spermatozoon kalitesi, sayısı ve fonksiyonunda değişikliğe yol açtığı ve infertilite riski oluşturduğuna dair bulgular elde edilmiştir (Ferlin ve ark., 2006). Bunun yanı sıra bir erkeğin genel sağlık durumu, yaşam tarzı, sosyal durumu, iş ortamı gibi etkenler de fertilitesi üzerinde yaygın olarak etki göstermektedir (Ferlin ve ark., 2006, Ferlin ve Foresta, 2014, Krausz ve Chianese, 2014, Leaver, 2016). Erkek infertilitesinde; spermatozoa sayısında düşüş (oligozoospermi), azalan motilite bulgusu (astenozoospermi) ve morfolojik incelemede çok sayıda anormal formda spermatozoa (teratozoospermi) izlenebilir. Semen örneğinde spermatoza bulunmaması azoospermi olarak tanımlanır (Tocci ve Lucchini, 2010).

İnfertil erkeklerin %15'inin semen parametreleri normal değer aralığındadır (Sharma ve ark., 2016). Bu nedenle infertilite için incelenecek semen örneklerinde spermatozoonun fiziksel parametrelerinin yanı sıra işlevi de ele alınmalıdır. İnfertilite tanısı için ayrıca görüntüleme sistemlerinden, genetik ve hormon testlerinden yararlanılır.

İdiopatik infertilitenin etiyolojisi tam olarak bilinmiyor olsa da genetik, çevresel ve hormonal faktörlerin birleşerek multifaktöriyel bir etken olduğu düşünülmektedir. Özellikle oksidatif stres ile DNA fragmantasyonu sorumlu tutulmaktadır (Abid ve ark., 2008, Twigg ve ark., 1998, Tremellen, 2008).

1.5. Spermatozoon İnceleme Yöntemleri

Semen incelemesi için verici mastürbasyon yoluyla geniş ağızlı plastik bir kaba semenini boşaltır (Kvist ve Björndahl, 2002). Veziküla seminalisden salgılanan, koagülasyonu sağlayan enzimler (proteazlar) sayesinde ejakülasyondan sonra semen örneği vizkoz halde görülür. Koagüle olan semen örneği oda sıcaklığında ya da 37℃'lik bir inkübatörde bekletilerek 5-30 dakika içinde likefiye olur (incelir) ve

homojen bir görünüm kazanır. Semen örneğinin likefiye olmasıyla değerlendirilen viskozite için damla methodu kullanılır. Bir pipet yardımı ile çekilen semen örneği geri bırakılarak, örneğin viskozitesi kontrol edilir. Likefiye olmuş semen örneği; kırık beyaz, açık gri arası bir renktir. Rengin koyulaşması semen örneğinin, yüksek konsantrasyonu olduğunu, şeffaf ve suya yakın formda görünümü ise düşük konsantrasyonu olduğunu işaret eder. 1.5 ml'nin altında hipospermia olarak kabul edilen semen örnekleri; ejakülasyon sonrasında spermatozoonların servikse ulaşamaması ile sonuçlanmaktadır. 6 ml'den fazla olan ve hiperspermia denilen fizyolojik durumda ejakülasyonla birlikte dilüsyonun artmasına bağlı örneğin konsantrasyonunu azalmaktadır. Spermatozoon canlılığı ve hareketliliği için en uygun pH 7.2 ile 7.8 arasındadır (Tocci ve Lucchini, 2010).

Spermatozoonun mikroskobik değerlendirilmesinde faz-kontrast mikroskobundan yararlanılır. Spermatozoonun konsantrasyonu; 1 ml içinde sahip olduğu spermatozoon miktarının milyon olarak gösterilmesidir. Bu değerin belirlenmesinin ardından, semen örneğinin toplam hacmi ile çarpılması; ejakülat içerisindeki toplam spermatozoon sayısının hesaplanmasını sağlar. Spermatozoon konsantrasyonunun hesaplanması için başlıca gereçlerden biri Makler kamarasıdır. Bu sayım lamı sahip olduğu 10 µm derinlik ile, iyice karıştırılmış örnekten alınan 3-5 µL'lik bir miktarın, dilüsyona gerek kalmadan tek düzlemde x200 büyütme ile kolayca incelenmesini sağlar. Makler sayım lamı 10x10'luk karelerden oluşan bir yüzeye sahiptir. Yapılan hesaplamalar 10 kare içinde sayılan spermatozoon sayısının mililitreki milyon konsantrasyonunu gösterir. DSÖ 2010 kılavuzuna göre; spermatozoonların hareketlilikleri; A grubu: ileri progresyon gösteren motil spermatozoonlar, B grubu: non-progresif motil spermatoozoonlar ve C grubu: non-motil spermatozoonlar şeklinde sınıflandırılmıştır (Tocci ve Lucchini, 2010).

Morfoloji incelemeleri için DSÖ'nin kılavuzu esas alınır. Semen örneği bir lam üzerine yayıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutulup belirlenen özel boyalar yardımıyla boyanır ve 100x objektif büyütmesinde 200 spermatozoon incelenir.

Normal morfolojideki spermatozoon için en düşük referans değer %'4'tür. Eskiden sadece mikroskobik olarak spermatozoonun şekline bakılarak morfoloji tayini yapılmakta iken şimdi; boy/en oranı, akrozomal alan, boyun ve kuyruk defektleri gibi parametrelerde değerlendirilmektedir. Bu kriterler 'strict' kriterleri olarak adlandırılıp in vitro fertilizasyon sonrasında gebelik oranlarını etkileyebilmektedir (Tocci ve Lucchini, 2010).

Genel spermatozoa seçim yöntemlerine ek olarak spermatozoon fonksiyon ve işlevlerini görmek için özel yöntemler de kullanılır. Bu yöntemlerin içerisinde spermatozoon yapısı ve sahip olduğu özellikler değerlendirilir. Ayrıca fertilizasyon sırasındaki bağlanma yeteneği kontrol edilebilir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1: Spermatozoon seçiminde özel yöntemler
Spermatozoonun sadece morfolojik, canlılık ve hareketlilik gibi parametrelerinin incelenmesi, hücrenin içeriği hakkında bize ayrıntılı bilgi vermemektedir. Hücrenin iç yapısının bilinmesi önemlidir, böylelikle spermatozoonun fertilizasyon öncesi ve sonrasındaki basamaklardaki başarısı hakkında bilgi sağlanmış olur. Aşağıda listelenmiş olan testler; rutin spermatozoa seçim yöntemlerinden farklı olarak en iyi spermatozoonu belirlemeyi hedefler. Bu testlerden bazıları sadece bilgi vermekle kalmaz aynı zamanda mevcut seçilmiş spermatozoonun tekrar kullanım olanağını sunar.

İşlem sonrası kullanım	Hareket	Morfoloji	İşlev	Diğer
+	-Swim up -Swim out -Swim down	-IMSI*	H.A.B.A**	-Yoğunluk gradienti
-	-CASA*** -Görüntüleme lamı (MAKLER)	-Fiksasyon-boyama	-Proteinlerin işaretlenmesi	-DNA Analizi

* Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection
** Hyaluronic acid binding assay
***Computer-assisted sperm analysis

1.6. Akım Sitometri Yöntemi ve Spermatozoon Seçiminde Kullanımı

Yaklaşık 70 yılı aşkın süredir kullanılan akım sitometri teknolojisi her geçen gün gelişmeye devam etmektedir. Hücrelerin akar halde iken sayılabiliyor olması fikri, ilk kez 1934 yılında yapılan çalışmada gösterilmiştir (Moldavan, 1934).

1953 yılında 'Coulter Counter' adıyla Dr. Wallece Coulter tarafından alınan patent ile süspanse haldeki hücrelerin, belirli bir aralıktan geçerken gösterdikleri empedansın ölçülebilir olduğu gösterilmiştir (Coulter, 1956). 1953 yılında Crosland-Taylor laminar akım prensibini kullanarak, geliştirdiği oda sisteminde eritrositler üzerinde incelemeler yapmıştır (Crosland-Taylor, 1953). Oluşturduğu sistemde; hızla akan bir sıvı içerisine, eritrosit süspansiyonunun enjekte edilmesi ile bu hücrelerin hizalanmaya başladığını görmüştür. Günümüzde bu teori 'Hidrodinamik Odaklama' olarak tüm akım sitometri cihazlarının çalışma prensibini oluşturmaktadır (Herzenberg ve ark., 2002).

Akım sitometri, süspanse durumdaki hücrelerin; bir kanal yardımıyla tek hücre seviyesinde hizalanarak, lazer önünden geçişleri sırasında yansıyan foton enerjisinin ölçümünü sağlar. Hücrelerin sahip oldukları granül yapılarına, büyüklüklerine ve flüoresan özelliklerine göre kantitatif bulgular elde etmemize yardımcı bir sistemdir.

Yapısal olarak 3 bölümden oluşur.

a. Hidrolik sistem: Akışın gerçekleştiği bölümdür. Hücrelerin lazer önünden geçişini sağlayacak taşıyıcı sistemdir. Geçiş sırasındaki ortam sıvısı, seyreltici bir sıvıdır ve kılıf sıvısı ismini almıştır. Bu sıvı, basınçlı bölgenin merkezindeki cam ve kuartzdan yapılmış odaya "flow cell" doğru ilerlerken, hücrelerde bu sıvı içerisinden

yüksek hızla geçirilerek aynı odaya ulaşır. Bu odanın geometrik yapısı, akış esnasında hücrelerin tek tek ve sıralı biçimde lazer kaynağı önünden geçişini sağlar. Sıvının hızlı şekilde sistemden akışı ile yüksek bir hidrostatik basınç oluşturulmuş olur (Shapiro, 2005).

b. Optik sistem: Optik, lazer ve lensleri içerir. Lensler lazer ışığını odaklamak için kullanılır. Hücreler lazer önünden geçtikten sonra açığa çıkacak olan saçılım birbirine çapraz ve paralel olan filtreler ile toplanarak uygun fotodetektöre aktarılmasında rol oynar. Hücrenin şekli ve hücrenin iç yapısının kompleks oluşu saçılmanın tipini belirler. Forward Scatter (FCS), hücrenin büyüklüğünü ile ilişkilidir. Side Scatter (SSC) ise hücreden yansıyan ışıktır ve hücrenin iç yapısı ile orantılı olarak seyreder (Shapiro, 2005).

c. Elektronik sistem: Alınan optik sinyalin, uygun kanallar aracılığı ile 'Photo Multiplier Tubes' (PMT) adındaki filtrelerden amplifiye edilerek elektriksel sinyale çevriminden sorumludur. Ayrıca bu sinyallerin bilgisayara analiz için aktarılmasında da görev alır (Shapiro, 2005).

Kullanım alanları arasında; hücrelerin yüzey antijenlerinin belirlenmesi, HIV testleri, DNA analizi, lösemi ve lenfoma tiplendirmeleri, nötrofil fonksiyon testleri (fagositoz, kemotaksi ve solunumsal patlama), hücre içi sitokin tayini, kromozom anomalileri, organ nakli uyumluluk testleri yer almaktadır.

Akım sitometri yönteminin spermatoza seçiminde kullanımı ise yakın zamanda artmıştır. Bu tez çalışmasının amaçlarından bir tanesi, PLC-ζ ve Izumo-1 proteinlerinin akım sitometrisinde incelenebilmesini sağlamak amacıyla standart bir yöntemin optimize edilmesidir. Amaçlarımızdan bir diğeri, yöntem optimizasyonunun ardından, bu proteinlerin fertilizasyon ile ilişkisinin araştırılmasıdır. Birkaç yıl

öncesine kadar spermatozoondaki DNA hasarının gösterilmesinde SCSA testi (Sperm Chromatin Structure Assay) altın standart olarak kabul ediliyor (Bungum, 2012) olmasına karşın tek tip protokol ve standardizasyonun eksikliği nedeniyle bu test yerini akım sitometri yöntemine bırakmıştır (Medicine, 2013).

Erkek kaynaklı DNA hasarlarının embriyo gelişimi üzerinde direk etki yaratacak olması, bu alanda yapılan çalışmaların artmasına sebep olmuştur (Aitken ve ark., 2013). Birçok farklı etken spermatozoada DNA hasarına neden olmaktadır. Oksidatif stres (Aitken ve De Iuliis, 2007), endojen endonükleazlar ve kaspaz aktivasyonu (Maione ve ark., 1997), spermiyogenez sırasındaki kromatinlerin şekillenmesi (Carrell ve ark., 2007), mayozun başlangıcında germ hücrelerinin apopitozu (Sakkas ve ark., 2004) iç etkenlere; radyoterapi, kemoterapi ve çevresel faktörler dış etkenlere örnek olarak verilebilir (Sailer ve ark., 1997, Evenson ve Wixon, 2005, Rubes ve ark., 2005, Lewis, 2014). İnfertil erkeklerin spermatozoonlarında, normal erkeklere göre daha yüksek DNA hasarı bulunma ihtimali vardır. ICSI (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) için kullanılacak rutin olarak uygulanan spermatozoon seçim yöntemleri sadece iyi morfoloji ve motiliteye sahip spermatozoonları seçmek için tasarlanmıştır. Çocuk sahibi olmuş bireyler ve infertil bireyler karşılaştırıldığında, DNA kırığı miktarının infertil grupta daha yüksek olduğu görülmüştür (Mahfouz ve ark., 2009, Sedó ve ark., 2017, Schulte ve ark., 2010, Zini ve ark., 2014). Bu nedenle son dönemde yapılan çalışmalar ICSI öncesinde DNA bütünlüğünü koruyan spermatozoonların elde edilmesini akım sitometri kullanımı hedeflenmektedir. Bu çerçevede sunulan tez çalışmasının bir diğer amacı DNA kırıklarının TUNEL yöntemi ile saptanabilmesi için tüm dünyada kullanılabilecek standart bir yöntemin literatüre kazandırılmasıdır.

Akım sitometri yöntemiyle yapılacak olan testler tüm androloji laboratuvarları için standardize edilebilecek niteliktedir (Mahfouz ve ark., 2009).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada; Ankara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 03-103-13 karar numaralı ve 25 Şubat 2013 tarihli 'Fertil ve İnfertil Olguların Spermatozoonlarında Fosfolipaz C-zeta İçeriğinin Karşılaştırmalı Olarak Değerlendirilmesi' başlıklı etik kurul onayı kullanılmıştır. Bu çalışmada değerlendirilecek olan hücreler etik onay kapsamında alınmış ve %3,5 yoğunluktaki Paraformaldehit solüsyonu ile +4ºC'de 15 dakika fikse edilerek saklanmış örneklerdir. Çalışmamızda, Ankara Etlik Zübeyde Hanım Eğitimve Araştırma Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezine başvuran olgulardan alınan örnekler kullanılmıştır.

2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

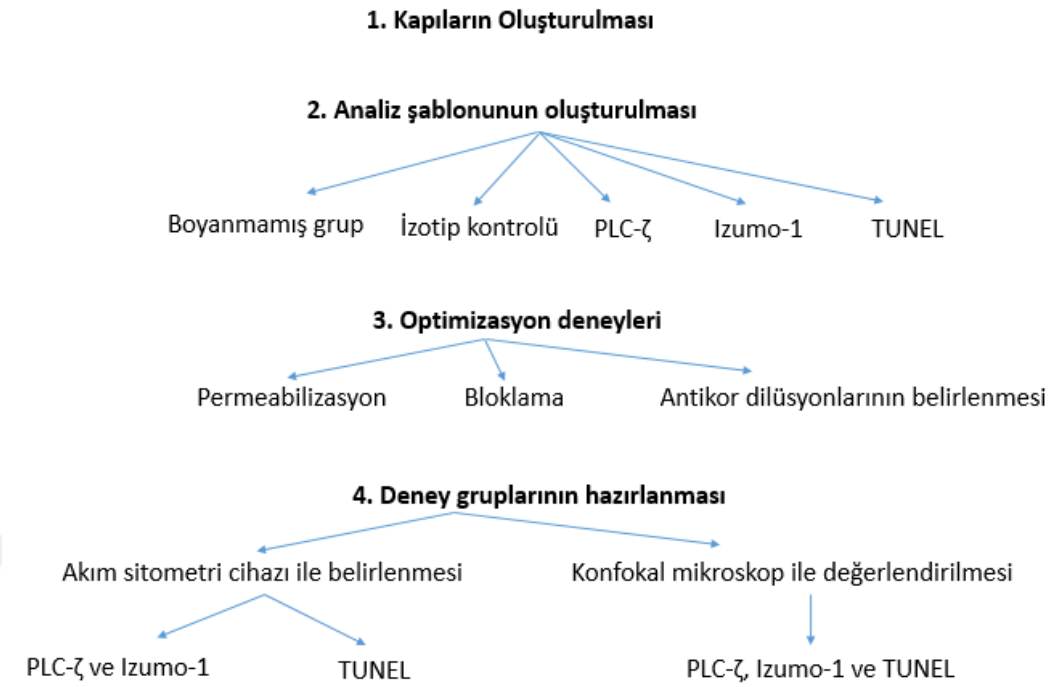
Tez kapsamında çalışmaya alınan olgu seçim kriterleri;

- ≤35 yaşında erkek olgular
- Tubal faktör tanısı alan kadın kaynaklı infertil kadınların eşleri
- Spermatozoon sayısı ≥600.000/ml
- IVF (In vitro fertilizasyon) tedavisinde; kadından ≥6 adet Metafaz II aşamasında oosit toplanan

ICSI sonrası fertilizasyon oranlarına (FO) göre olgular ikiye ayrıldı.

i) FO≥%60'ın üzerinde olan yüksek fertil grubu (n=10),

ii) FO<%60'ın altında olanlar düşük fertil grubu (n=10)



Şekil 2.1 : Deney akışı

2.2 Kapıların oluşturulması

Tüm hücre popülasyonunun içinde ilgilenilen hücre/hücre gruplarının saptanması ve bir çerçeve ile grafik üzerinde belirlenmesine kapılama 'gating' adı verilir. Spermatozoa kullanılarak yapılan çalışmalar referans alınarak yapılan kapılama işlemiyle debris ve spermatozoa olmayan hücreler analiz dışında bırakıldı (39). Kapılama optimizasyonunda, spermatozoonun büyüklük ve granülarite özelliklerinden faydanıldı. Bu kapılamayı doğrulamak adına örnekler DNA bağlama boyası olarak kullanılan DNA-binding dye Thiazole Orange (TO; BD Biosciences, Ann Arbor, MI, USA) ile boyandı. Böylelikle TO pozitif hücrelerin, yapılan kapılama bölgesinin içerisinde olup olmadığı teyit edildi. Oluşturulan kapı ile her olgu verisi değerlendirildi. Sonrasında hücrelerdeki toplam flüoresan ışıma yüzdesi değerlendirilerek kantitatif ve karşılaştırmalı olarak belirlendi. Sonuçlar akım sitometri cihazında analiz edildi (Şekil 2.1).

2.3 Analiz Şablonunun Oluşturulması

Her olguya ait örneklerden ml'de $1x10^6$ hücre olacak şekilde 5 tüp hazırlandı.

a) Boyanmamış grup:

Bu grubu oluşturmamızın sebebi herhangi bir fluorokrom ile işaretlenmemiş olan spermatozoonun yaratabileceği otoflüoresanı saptamaktır.
Örnek hazırlığı sırasında tüpler, antikor eklenmesi haricinde permeabilizasyon, bloklama ve tüm yıkama işlemlerini tabi tutuldu (Şekil 2.1).

b) İzotip kontrol grubu:

Akım sitometri için gerekli olan tüm aşamalara, aynı boyanmamış örnekte olduğu gibi tabi tutuldu ancak sadece son aşamada ilave olarak hücrelere sekonder antikor eklenerek inkübasyona bırakıldı. Böylece sekonder antikorun yaratabileceği olası yalancı bağlanmaların gösterilebilmesi hedeflendi (Şekil 2.1).

c) PLC zeta antikoru ile işaretlenmiş grup – hedeflenen çalışma grubu

d) Izumo1 antikoru ile işaretlenmiş grup – hedeflenen çalışma grubu

e) TUNEL antikoru ile işaretlenmiş grup – hedeflenen çalışma grubu

2.4 Optimizasyon Deneyleri

Optimizasyon deneylerinin amacı; hedeflediğimiz protokol basamakları için en uygun değerleri bulmaktır. Akım sitometrisinde bir optimizasyon sağlamak için ele alınan parametreler şunlardır: sıcaklık koşulları, inkübasyon süreleri ve yoğunluk dereceleri. (Şekil 2.1).

2.4.1. Permeabilizasyon Optimizasyonu

Fikse haldeki spermatozoa, hücre zarı lipidlerinin eritilmesi amacıyla permeabilizasyon işlemi uygulandı. Permeabilizasyon testleri için literatürde daha önceden süre parametresi optimize edilmiş ve 15 dakika olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ise deterjan yoğunlukları şu şekilde test edilmiştir.

- Kullanılan deterjan: Triton X-100; 10 µL alınıp toplam hacim distile suyla 1 ml'ye tamamlandı.

- Denenen deterjan yoğunlukları: %0,5, %0,1 ve %0,01 Triton X-100, distile su içerisinde

2.4.2. Bloklama Optimizasyonu

Permeabilizasyonun ardından spermatozoona, spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla bloklama optimizasyonu yapıldı. Bloklama optimizasyonu için kullanılacak BSA (Bovine serum albumin) yoğunluğu, literatürde önceden optimize edilmiş ve %3 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda bu yoğunluk oranının farklı sürelerdeki işlevi test edilmiştir.

-Kullanılan solüsyon: BSA

-Denenen inkübasyon süreleri: 15 ve 30 dakika, PBS içerisinde

2.4.3 Antikor Dilüsyonlarının Belirlenmesi

Kullanmış olduğumuz primer antikor dilüsyonları, aynı zamanda bu proteinler için laboratuvarımızda optimize etmiş olduğumuz immünoflüoresan boyama

prosedürümüzdeki miktarlar ile aynıdır (Çizelge 2.1). Sekonder antikor dilüsyonları için akım sitometri tekniğinin farklılığından kaynaklı birden fazla dilüsyon ile deneme yapılmıştır.

Çizelge 2.1: Primer antikor çizelgesi

Primer antikor olarak çalışmamızda kullanılan antikorlara ait bilgiler aşağıdaki çizelgede sunulmuştur.

Antikor	**Kaynak**	**Çözücü**	**Yoğunluk**	**Ticari Marka ve ürün kodu**
anti-PLC-ζ	Tavşan	PBS	1:20 (25 μg/ml)	ABCAM ab124446
anti Izumo-1	Tavşan	PBS	1:100	SIGMA HPA038104

Sekonder antikor için; FITC (Fluorescein Isothiocyanate) konjuge keçi anti-tavşan IgG, PBS içinde

i) 1:50
ii) 1:100
iii) 1:250'lik sulandırma oranları belirlendi.

2.5 Deney Gruplarının Hazırlanması

2.5.1. Spermatozoondaki PLC-ζ ve Izumo-1 içeriğinin Accuri C6 akım sitometri kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmesi

Gereç:

- **Fiksasyon:** Paraformaldehit (Sigma)
- 15 ml'lik steril polipropilen konik tüpler (Biochrom)
- 1 ml'lik polipropilen konik tüp (Eppendorf)

- **Permeabilizasyon:** Triton X-100 (Sigma, X100)
- PBS (Sigma)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich)
- **Bloklama:** %3 BSA (Sigma)
- **Antikor:** 25 μg/ml anti-PLC-ζ1 tavşan antikoru (Abcam), anti-Izumo-1 tavşan antikoru (Sigma) ve FITC konjuge keçi anti-tavşan IgG (Sigma)
- Accuri C6 Akım sitometri cihazı (Beckton and Dickinson, USA)

Yöntem:

Paraformaldehit ile fikse halde +4ºC'de bulunan ve konsantrasyonu bilinen spermatozoa ml'de $1x10^6$ hücre olacak şekilde, 1 ml'lik polipropilen tüp içerisine alındı. Permeabilizasyon optimizayonu için örnekler %0,5, %0,1 ve %0,01'lık dilüsyonlar da hazırlanan Triton X-100 içinde 15 dakika karanlıkta, oda sıcaklığında bekletildi. Yıkama için üzerine PBS eklenerek 800*g*'de 10 dakika +4 ºC derecede santrifüj edildi. Bloklama aşamasında PBS içerisinde %3'lük BSA ile 15 ve 30 dakika oda ısında bekletildi. Spermatozoa 25 μg/ml anti-PLC-ζ antikoru ve 1:100 dilüsyon ile hazırlanan anti Izumo-1 antikoru ile 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Yıkama için üzerine PBS eklenerek 800*g'*de 10 dakika +4 ºC derecede santrifüj edildi. Kullanılan sekonder antikor içinse titrasyon yapılarak optimal çalışma dilüsyonu belirlendi. 1:50, 1:100 ve 1:250 dilüsyon ile hazırlanan sekonder antikor 30 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Yıkama için üzerine PBS eklenerek 800*g*'de 10 dakika +4 ºC derecede santrifüj edildi. Pellete PBS eklenerek akım sitometri yöntemi için hazır hale getirildi (Şekil 2.1).

2.5.2. Spermatozoondaki DNA fragmantasyonunun Accuri C6 akım sitometri kullanılarak kantitatif olarak belirlenmesi

Gereç:

- **Fiksasyon:** Paraformaldehit (Sigma)

- 15 ml'lik steril polipropilen konik tüpler (Biochrom)
- 1 ml'lik polipropilen konik tüp (Eppendorf)
- **Permeabilizasyon:** %0,01 Triton (Sigma, X100)
- PBS (Sigma)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich)
- **Bloklama:** %3 BSA (Sigma)
- **Antikor:** In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, 11684795 910)
- Accuri C6 Akım sitometri cihazı (Beckton and Dickinson, USA)

Yöntem:

Spermatozoondaki DNA fragmantasyonun saptanması için TUNEL kiti kullanıldı. % 0,01 Triton ile membran permeabilizasyonunun ardından yıkanan hücreler için 450 µL substrat (flüoresan işaretli nükleotid) çözeltisi, 50 µL enzim (TdT) çözeltisiyle karıştırıldı. Hücre peletinin olduğu tüplere 10 µL gelecek şekilde konulan karışım 60 dakika 37 °C karanlıkta bekletildi. Negatif kontrol için örnekler sadece enzim solüsyonu eklenerek aynı koşullarda bekletildi. Son aşamada yıkama sonrasında elde kalan pellete PBS eklenerek akım sitometri yöntemi için hazır hale getirildi (Şekil 2.1).

2.5.3. Spermatozoondaki PLC-ζ, Izumo-1 içeriğinin ve DNA Fragmantasyonun konfokal mikroskop ile değerlendirilmesi

Gereç:

- **Fiksasyon:** Paraformaldehit (Sigma)
- %0,01 Poli-L-lizin (Sigma)
- 12 mm çaplı yuvarlak cam lamel (Fisher Scientific)
- **Permeabilizasyon:** %0.01 Triton (Sigma, X100)
- PBS (Sigma)
- **Antikor;**

a. 25 µg/ml 1:20 1,25 µg/ml mi yani anti-PLC-ζ1 tavşan primer antikoru (Abcam)
b. 1:100 anti Izumo-1 tavşan antikoru (Sigma)
c. 1:100 FITC konjuge keçi anti-tavşan IgG (Sigma)
d. In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche, 11 684 795 910)
e. 10 µM 7-AAD (7-aminoactinomycin D, Sigma)

- Kapatma çözeltisi: Gliserol (Sigma), 1 µg/ml Hoecsht 33258 (Sigma)
- Lam (Citoglass)
- Lazer taramalı konfokal mikroskop (Carl Zeiss LSM 510)

Yöntem:

Poli-L-lizin kaplı 12 mm yuvarlak lamellere damlatılan örnekler 2 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra boyama işlemlerine başlandı. % 0,01 Triton ile permeabilize edilen örnekler 3 gruba bölündü.

Gruplardan ikisine, 1:20 dilüsyon ile hazırlanan anti-PLC-ζ tavşan primer antikoru ve 1:100 dilüsyon ile hazırlanan anti Izumo-1 tavşan antikoru eklenerek bir gece +4ºC derecede inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda alınan örnekler PBS ile yıkandıktan sonra 1:100 dilüsyon ile hazırlanan flüoresan-konjuge sekonder antikor ile işaretlenerek 2 saat 37ºC derecede inkübe edildi.

TUNEL boyaması için; 450 µL substrat (flüoresan işaretli nükleotid) çözeltisi, 50 µL enzim (TdT) çözeltisiyle karıştırıldı. Ayrılan son gruba ait lamlara 10 µL karıştırılan solüsyon eklenerek 60 dakika 37 °C'de, karanlıkta ve nemli ortamda bekletildi. Negatif kontrol için örnekler sadece enzim solüsyonu eklenerek aynı koşullarda bekletildi.

PBS ile yapılan yıkamanın ardından lameller, hücre çekirdeğinin işaretlenebilmesi için 10 µM 7-AAD'yle nemlendirme kamerası kullanılarak 37 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Lameller PBS'le yıkandı ve lama damlatılan 3 µL kapatma

çözeltisi üzerine kapatıldı. Lamellerin etrafı tırnak cilasıyla çerçevelendi. Preparatlar gözlem yapılıncaya kadar -20 °C'de saklandı ve hücreler lazer taramalı konfokal mikroskopta görüntülendi (Şekil 2.1).

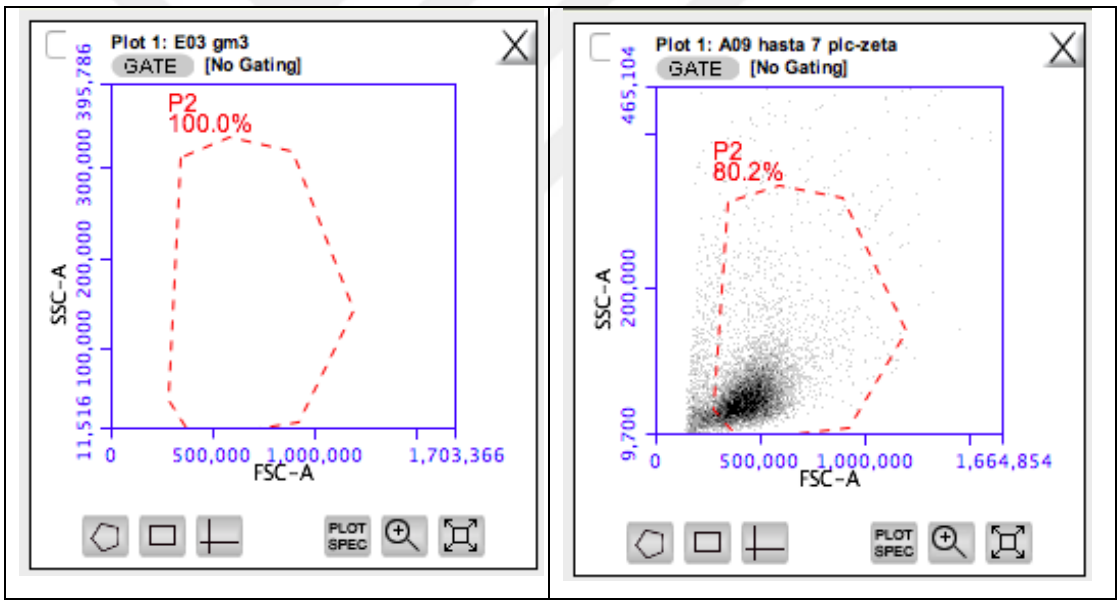
2.6 İstatistiksel Analiz

Akım sitometrisi sonucu elde edilen değerler bilgisayar ortamına alınarak istatistik değerlendirme bir bilgisayar temelli yazılım olan SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, v.15, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. İki grup arasındaki farklılığın, normal dağılıma uyan durumlarda student's t testiyle, uymayan durumlarda ki-kare ya da Mann-Whitney U testiyle; ikiden fazla grubun arasındaki farkın anlamlılığı normal dağılıma uyan durumlarda one-way ANOVA ile, uymayan durumlarda Kruskal-Wallis testiyle; iki grup arasındaki ilişki analizleri korelasyon analizi yöntemiyle yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Kapıların Oluşturulması

Spermatozoa, büyüklükleri ve granülariteleri hesaba katılarak akım sitometri cihazında kapılama işlemi yapıldı. Bu kapılamayı doğrulamak adına spermatozoon, DNA bağlama boyası olarak kullanılan TO ile boyandı. Yapılan kapılama işlemininde, TO pozitif hücrelerden yararlanılarak popülasyonun doğru çevrelendiği teyit edildi. Bu işlemden sonra, hazırladığımız tüpteki debrinin okutulmaması sağlamak amacıyla FSC için eşik değeri 300.000 e ayarlandı. Sonrasında hücrelerdeki toplam flüoresan ışıma yüzdesi değerlendirilerek karşılaştırmalı olarak belirlendi (Şekil 3.1).

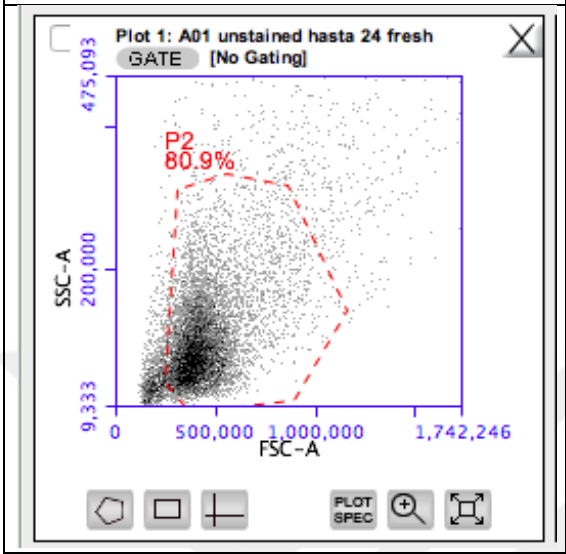
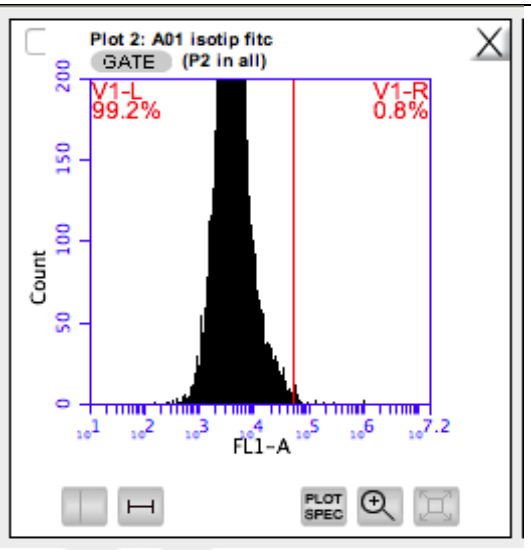
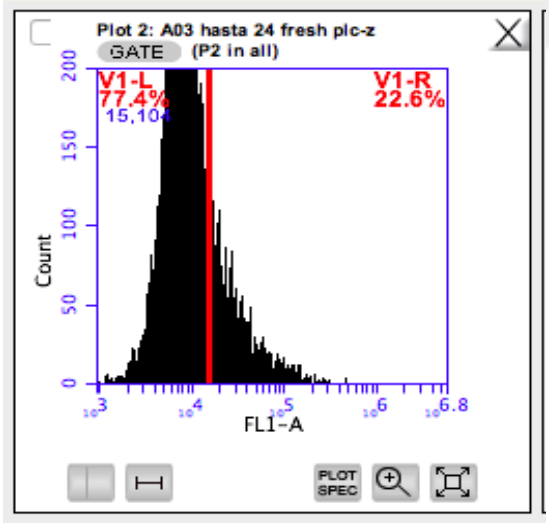
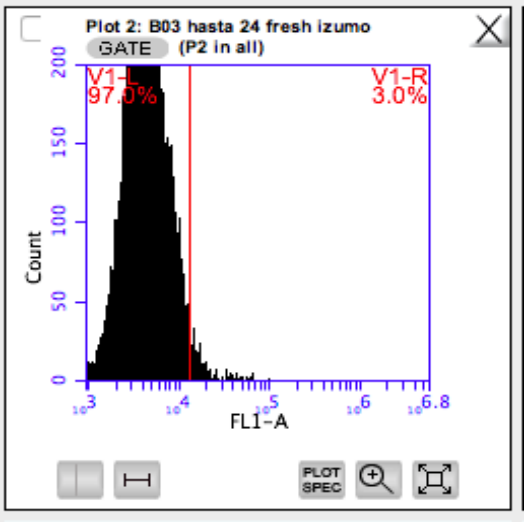


Şekil 3.1: Laboratuvarımızda kapılama stratejisiyle oluşturmuş olduğumuz bölge.

3.2 Analiz Şablonunun Oluşturulması

Kapılamalar oluşturulduktan sonra olgulara ait örneklerin analizi için bir şablon oluşturuldu. İlk olarak izotip kontrol grubunda örneğe ait otofloüresan miktarı analiz edildi. Buna göre kırmızı dikey çizgiler oluşturuldu (Şekil 3.2 b). Ardından hedef

proteinlere ait grafikler aynı kırmızı çizgiyi referans kullanarak açıldı. Böylece ortamda gerçek ışıma yüzdeleri değerlendirildi (Şekil 3.2 c ve d).

<table>
<tr><td>3.2a. Boyanmamış grup</td><td>3.2b. İzotip kontrol</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
<tr><td>3.2c.PLC-ζ antikoru ile işaretlenmiş grup</td><td>3.2d. Izumo-1 antikoru ile işaretlenmiş grup</td></tr>
<tr><td>
</td><td>
</td></tr>
</table>

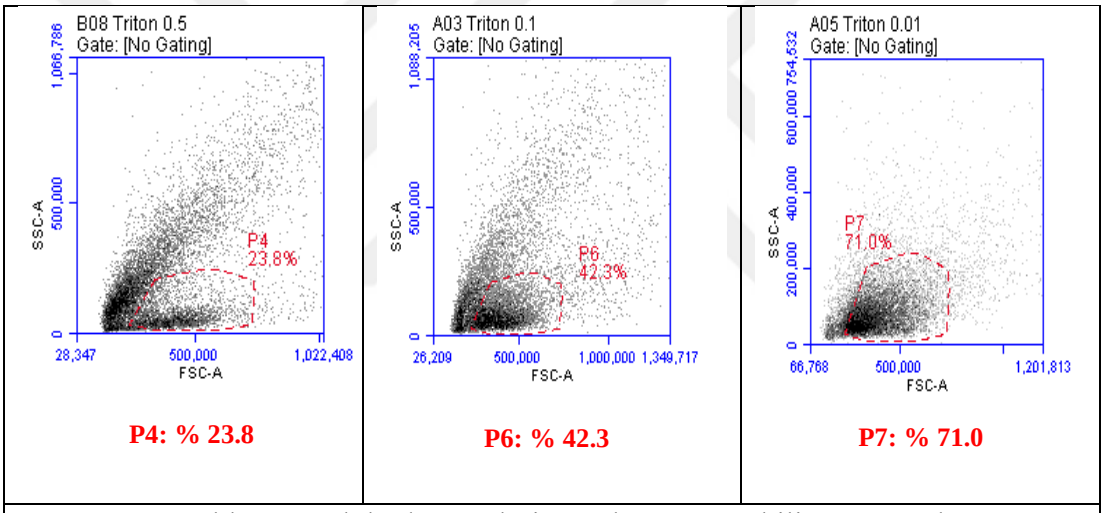
Şekil 3.2: Her bir olgu için oluşturulmuş akım sitometrisi analiz şablonu

P2 kapısı spermatozoa popülasyonunu göstermektedir (Şekil 3.2 a). PLC-ζ ve Izumo-1 oranları, P2 bölgesindeki spermatozoa popülasyonunun verdiği flüoresan ışıma miktarına göre kaydedilmiştir (Şekil 3.2 c ve d).

3.3 Optimizasyon Deneyleri

3.3.1. Permeabilizasyon Optimizasyonu

Uygun Triton X yoğunluğunun belirlenmesi için aynı olguya ait 3 farklı grup oluşturuldu. %0,5 %0,1 ve %0,01'lık dilüsyonlar Triton X-100 ve distile su ile hazırlandı. Deterjan yoğunluğunun fazlalığına bağlı olarak meydana gelen parçalanma sonucu hücrelerin şekilleri bozulduğu, hücre sayısının azaldığı ve boyanma yüzdelerinin etkilendiği görüldü. Bu nedenle en seyrek dilüsyon miktarı optimum olarak kabul edildi (Şekil 3.3).



P4: % 23.8 **P6: % 42.3** **P7: % 71.0**

Şekil 3.3: Farklı yoğunluk denemeleri yapılan permeabilizasyon solüsyonunun karşılaştırılması

Yapılan yoğunluk denemeleri sonucunda; Triton X-100 için kullanmış olduğumuz %0,5 ve %0,1'lik dilüsyon gruplarında hücre popülasyonunun, %0,01'lik dilüsyon uyguladığımız gruba göre %47 azaltığı gözlendi.

3.3.2. Bloklama Optimizasyonu

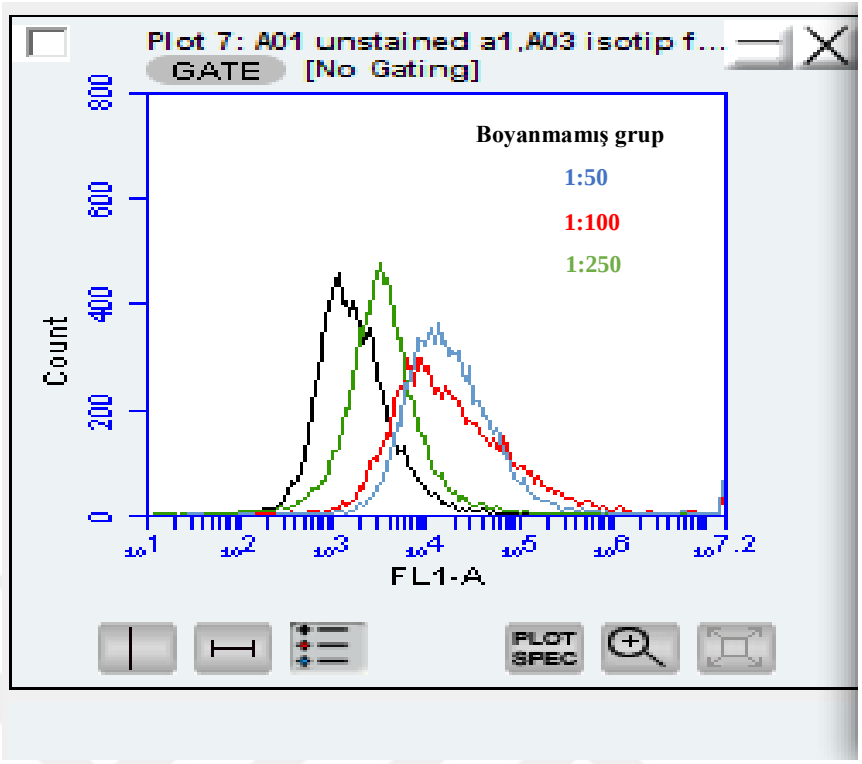
Bloklama işlemi için önerilen BSA dilüsyonu %3 olarak sabit tutulurken, farklı inkübasyon sürelerinin hücrelerde meydana gelebilecek yalancı bağlanmaları nasıl etkilediği gözlemlendi. 15 ve 30 dakikalık inkübasyon süreleri sonucunda hücrelerdeki

otoflüoresan miktarları karşılaştırıldı. Bu deneme için hücreler primer antikor eklenmeden sadece sekonder antikor ile boyandı. %2-4 arasında elde ettiğimiz ışıma pozitiflikleri bu deneyler için normal kabul edildi. %4 ve üzeri ışımalar yalancı pozitiflik olarak belirlendi. 15 dakika inkübasyona bırakılan gruplarda, 30 dakika inkübe edilmiş gruplara göre yalancı bağlanma artışı %4'den yüksek tespit edildi.

3.3.3. Antikor Dilüsyonlarının Belirlenmesi

Yapılan ön hazırlık deneylerinde aldığımız boyanmanın mikroskopta teyit edilmesi için örnekler konfokal mikroskopta incelendi. Yukarıda sunulan şekilde primer antikor uygulamalarını izleyerek sekonder antikorlar için optimizasyon işlemlerine geçildi.

Gruplar; FITC konjuge keçi anti-tavşan IgG, PBS içinde 1:50, 1:100 ve 1:250 seyreltme yapılarak ayarlandı. 1:50 ve 1:100 dilüsyon yapılan gruplarda 1:250 seyreltme yapılan gruba göre non spesifik bağlanmayı düşündürecek şekilde yoğun ışıma görünmesi nedeniyle uygun dilüsyonun 1:250 olmasına karar verildi. (Şekil 3.4).



Şekil 3.4: Farklı seyreltmeler yapılan sekonder antikor gruplarının boyanmamış gruba ait örnekler ile karşılaştırılması

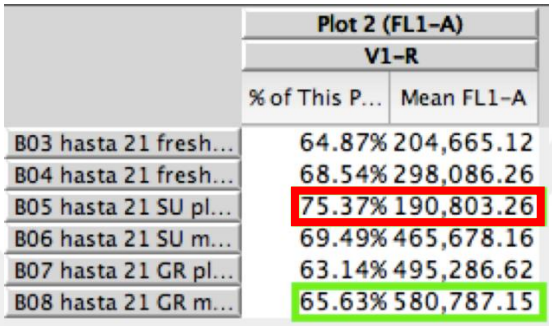
Seçmiş olduğumuz farklı dilüsyon miktarlarını, boyama yapılmamış örnekten aldığımız sinyal ile karşılaştırdığımızda, 1:50 ve 1:100 dilüsyon uyguladığımız gruplarda ışıma yoğunluğunun fazla olduğu gözlenmiştir (Kırmızı ve mavi çizgi sırasıyla, siyah çizgi boya kullanılmamış, yeşil çizgi 1:250).

3.4. Deney Gruplarının Analizi

3.4.1. Spermatozoondaki PLC-ζ ve Izumo-1 içeriğinin Accuri C6 akım sitometri kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmesi

Akım sitometri sonuçlarının analizinde incelenen moleküle sahip pozitif sinyal oranlarının yanı sıra sinyal yoğunluklarını da veren Mean Fluorescence Intensity (MFI) değerlendirmesi, protein miktarı hakkında bilgi vermesi bakımından önemlidir.

Bu çerçevede olgular ele alındığında, her bir olgunun verisi yüzde ve sinyal yoğunluğu olarak değerlendirilmiş ve her iki değer arasında her zaman doğrudan bir korelasyonun olmadığı gözlenmiştir. Şekil 3.5'de izlendiği üzere %75,37 pozitiflik sağlayan örneğin sinyal yoğunluğunu 190,803 iken (kırmızı kutu), %10 oranında daha az pozitiflik gösteren örneğin sinyal yoğunluğu neredeyse 3 kat daha fazla olarak izlenmiştir (yeşil kutu).



Şekil 3.5: Spermatozoonun taşıdığı protein miktarlarının, yüzde ve sinyal yoğunluğu ile değerlendirilmesi.

Spermatozoonun taşıdığı protein miktarlarını yüzde olarak karşılaştırılması iki farklı grupta % 75.37 ve % 65.63'lük pozitiflik izlenmiştir. Yüzdelik değerler birbirine yakın olmasına karşın örnekten alınan sinyal yoğunluğu karşılaştırıldığında düşük pozitif yüzdeye sahip olan grup (yeşil kutucuk) yaklaşık 3 kat daha fazla sinyal yoğunluğuna sahiptir.

Sonraki aşamada olgular fertilizasyon oranlarına göre sınıflandırıldıktan sonra, fertilizasyon oranları ile bu tez çalışmasının amacı olan PLC-ζ ve Izumo-1 proteinleri arasındaki ilişki değerlendirildi. Çizelge 3.1'de olguların ham verileri sunulmuştur.

Çizelge 3.1: Toplanan olgularda fertilizasyon oranına göre PLC-ζ ve Izumo-1 değerlendirilmesi

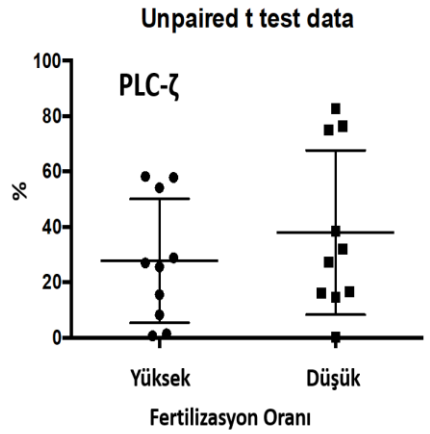
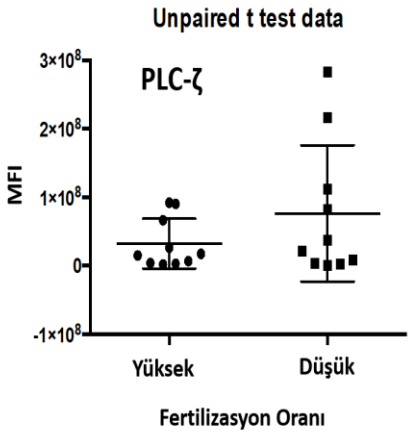
Toplanan örnekler, fertilizasyon oranlarına göre ikiye ayrıldıktan sonra her olgu için elde edilen veriler; hem yüzde değer olarak hem de ışıma yoğunluğu olarak kaydedildi.

Olgu No	Fertilizasyon Oranları %	PLC-ζ %	Sinyal yoğunluğu	Izumo-1 %	Sinyal yoğunluğu
1	85	57,9	2.278.294	11,51	2.376.278
2	80	1,38	90.497.172	0,89	9.351.522
3	63	54,12	6.872.999	20,81	230.815
4	67	8,18	92.122.846	1,73	40.659.028
5	71	15,54	4.047.115	2,03	26.655.702
6	75	28,82	66.365.098	1,53	75.587.975
7	83	25,52	15.119.139	1,6	17.702.300
8	71	26,95	17.622.224	2,15	6.168.156
9	64	58,19	26.354.285	7,32	4.311.142
10	69	0,62	3.255.812	0,51	60.555
11	36	76,4	8.171.808	36,18	893.099
12	44	38,37	3.711.007	6,11	2.513.297
13	36	15,94	111.370.793	2,56	17.077.067
14	25	27,38	282.355.735	0,54	33.706.978
15	40	0,1441	2.637.176	0,0092	2.326.149
16	22	16,59	21.847.811	1,85	4.157.816
17	56	32,04	354.608	2,13	1.757.696
18	44	14,65	216.048.029	2,26	43.669.566
19	13	75,1	37.162.754	8,88	3.836.578
20	43	82,77	82.379.053	4	4.161.236

PLC-ζ‘nın fertilizasyon oranları ile ilişkisi ele alındığında, fertilizasyon oranı yüksek ve düşük grup arasında pozitif sinyal oranları ve sinyal yoğunluğu bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sinyal yoğunlukları incelendiğinde ilginç olarak, fertilizasyon oranı yüksek grupta elde edilen değerlerin birbirine yakın olduğu, öte yandan düşük grupta ise dağınık olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2: Toplanan olgularda fertilizasyon oranına göre PLC-ζ değerlendirilmesi

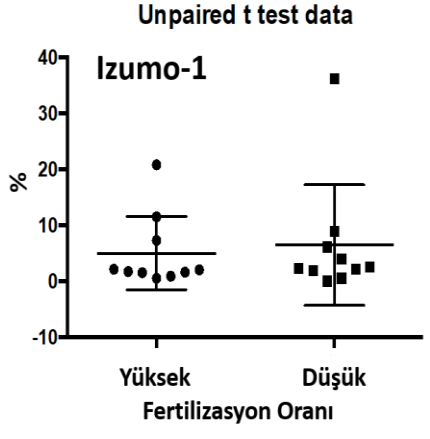
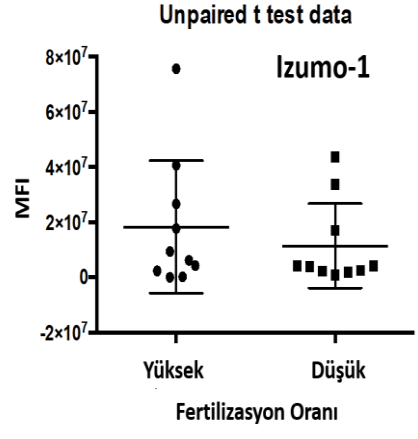
Düşük ve yüksek fertilizasyon oranına sahip örneklerde PLC-ζ sinyal yoğunluğu ve yüzdesi değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

PLC-ζ	
%	Sinyal yoğunluğu
	

Izumo-1'in fertilizasyon oranları ile ilişkisi ele alındığında, fertilizasyon oranı yüksek ve düşük grup arasında pozitif sinyal oranları ve sinyal yoğunlukları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3: Toplanan olgularda fertilizasyon oranına göre Izumo-1 değerlendirilmesi

Toplanan örnekler fertilizasyon oranlarına göre ikiye ayrıldıktan sonra her olgu için elde edilen veriler, hem yüzde değer olarak hem de ışıma yoğunluğu olarak kaydedildi.

Izumo-1	
%	Sinyal yoğunluğu
	

3.4.2. Spermatozoondaki DNA fragmantasyonunun Accuri C6 akım sitometri kullanılarak kantitatif olarak belirlenmesi

Çalışmanın bu basamağı ABD'de Cleveland Klinikte gerçekleştirilmiştir. İsviçre'de bulunan Basel Üniversitesi ve Amerika'da bulunan Cleveland Klinik arasındaki işbirliği ile, DNA kırıklarının saptanması için tüm dünyada kullanılabilecek standart bir yöntemin literatüre kazandırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla sağlıklı ve infertil 21 örnek İsviçre'de, 10 örnekte Amerika'da toplandıktan sonra fikse edilerek transfer için hazırlanmıştır. Transferlerin tamamlanmasının ardından, 31 olguya ait DNA kırığı oranları ve sinyal yoğunlukları laboratuvarlar arasında karşılaştırılmıştır. İki laboratuvar arasında elde edilen DNA kırığı oranları arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğu saptanmıştır (r=0.719) (Ribeiro ve ark., 2017). Ayrıca bu olgulara ait sinyal yoğunluklarının; iki laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında, benzer olduğu görülmüştür. Çalışmamızda sadece DNA kırığı bulguları değil aynı zamanda boyama aşamasında fiksasyon işlemine ek olarak yapılan yıkama basamakları değerlendirilmiş ve iki laboratuvar arasında yüksek korelasyon görülmüştür (r=0.94) (Ribeiro ve ark., 2017).

Tezle ilişkili bu çalışmada; kullanılacak yöntemin standardizasyon basamaklarının nasıl olması gerektiği bilimsel bir soru olarak ele alınarak değerlendirilmiş ve 2017 yılında Andrology dergisinde yayınlanmıştır (Ribeiro ve ark., 2017).

3.4.3. Spermatozoondaki DNA fragmantasyonunun flow sitometri kullanılarak PLC-ζ ile ilişkisinin değerlendirilmesi

Tez önerisinin enstitü tarafından kabulünden sonra yayınlanan 2017 yılında Tavalaee ve ark. tarafından yapılan çalışmada, spermatozoona ait DNA fragmentasyonu ile PLC-ζ oranları arasında negatif bir korelasyon olduğunun

gösterilmesi (Tavalaee ve ark., 2017) nedeniyle bu tez çalışmasında da bu iki parametre arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla olgular içerisinden 6 tanesi rastgele seçilerek bu iki parametrenin birbiri ve fertilizasyon oranları ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Fertilizasyon oranları ile bir ilişki gözlenmezken, yukarıda sunulan çalışmaya benzer şekilde PLC-ζ sinyal yoğunluğu ile TUNEL pozitif (DNA kırığı olan) spermatozoa oranı arasında negatif bir ilişki saptanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4: Spermatozoondaki DNA fragmantasyonunun PLC-ζ ile ilişkisinin değerlendirilmesi

PLC-ζ sinyal yoğunluğu ile DNA kırığı olan spermatozoon oranları arasında güçlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir negatif korelasyon olduğu saptandı (r= -0,759, p=0,048). Bu bulgu apopitotik olmayan hücrelerin PLC-ζ bakımından zengin olduğunu gösterdi.

Fertilizasyon Oranları %	PLC-ζ %	Sinyal yoğunluğu	TUNEL %	Sinyal yoğunluğu
90	13,30	346.630,71	4,52	13.827.371
80	4,90	212.199,09	40,21	4.133.196
50	20,00	349.343,03	6,52	4.594.500
50	9,30	232.883,13	35,81	12.494.175
44	17,40	130.352,42	38,48	1.550.305
43	11,70	505.957,54	13,61	8.996.352

3.4.4. Spermatozoondaki PLC-ζ, ve Izumo-1 içeriğinin ve DNA Fragmantasyonun konfokal mikroskop ile değerlendirilmesi

Yapılan akım sitometrik analizlerin doğruluğunu kontrol etmek amacıyla aynı örnekler immünoflüoresan olarak da işaretlenmiştir. Böylece akım sitometri işaretlermeleri mikroskobik düzeyde de doğrulanmıştır.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Akım sitometri yöntemi; süspansiyon halindeki hücrelerin büyüklük, flüoresan yoğunluk ve granül yapısına göre tek hücre seviyesinde kantitatif ölçüm yapar. Böylece istatistiksel yaklaşımın yanı sıra fiziksel olarak ayırabildiği alt gruplar içinde analiz olanağı sağlar. Ölçüm çeşitliliğinin fazla olması, hassasiyetin yüksekliği, tekrarlanabilirlik ve veri alma hızı ile diğer testlerden daha avantajlı konumdadır (Picot ve ark., 2012).

Örneklerin hazırlanma ve değerlendirme sürecinin kapalı sistem olması, biyogüvenlik açısından bu cihazların öneminin daha fazla artmasını sağlamaktadır. Gelişen teknolojiler ile birlikte firmalar, değişik konfigürasyonlarda ürettikleri farklı cihazlarla bu pazara yön vermeye çalışmaktadırlar (Picot ve ark., 2012). Masa başı akım sitometriler her laboratuarda uygun bütçelerle yer alabilecek cihazlar olduğu için, farklı çalışmaların optimize edilmesine olanak sağlar. Özellikle immünoloji ve hematoloji alanlarında olgu örneklerinin seri bir şekilde ve geniş bir yelpaze ile değerlendiriliyor olması, akım sitometrinin klinik olarak altın standart olmasını sağlamıştır. Kullanılan başka testlerin de benzer bir yaklaşım ile standardize edilmesi mümkündür. Hücre popülasyonunun doğru olarak belirlenmesi, sonrasındaki tüm analiz basamakları için önemlidir. Yapılan kapılama işlemi ile spermatozoa popülasyonunun olduğu alan belirlenmiş ve çekirdek boyamaları ile doğrulaması yapılmıştır. Analizler için kullanılacak olan bu bölge, literatürde yer alan akım sitometri kullanılarak spermatozoa popülasyonunun değerlendirildiği çalışmalardaki kapılama bölgeleri ile uyumlu seyretmektedir (Cakar ve ark., 2016).

Akım sitometri cihazı kullanılarak yapılan çalışmalarda; hücre içi protein işaretlemesine yönelik basamakların eksiklikleri nedeniyle optimizasyon deneylerine ihtiyaç duyulmuştur. Bu nedenle hedeflediğimiz protokol basamakları için en uygun değerlerin bulunması önemlidir. Permeabilizasyon deneyleri için; kullanıma hazır bir kit yerine laboratuvarımızda bulunan deterjan özellikteki Triton X-100'e ait farklı

yoğunluklar denemiştir. Devam basamağı olan BSA ile bloklama işleminde; diğer yöntemlerde bloklama için önerilen 15 dakikalık sürenin üzerine çıkılarak, akım sitometri yönteminde optimal bir süre belirlenmiştir. Amacımız akım sitometri yöntemi kullanılarak yapılacak olan hücre içi çalışmalar için bu basamakların literatüre katkısını sağlamaktır.

Spermatozoon seçimi için önemli olduğu bildirilen PLC-ζ ve Izumo-1 proteinleri hakkında bize daha kapsamlı bilgi sağlayabilmesi amacıyla akım sitometri yöntemi kullanılmıştır. Bu proteinlerin akım sitometri yöntemi ile değerlendirilmesinde mevcut bir yol haritamız olmadığı için laboratuvarımızda önceden optimize edilmiş immünoflüoresan boyama prosedürümüzdeki miktarlar kullanılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

2017 yılında Kashir ve arkadaşları; kendilerinin geliştirdiği antijen maskelenmesini ortadan kaldıran yöntem ile aldehit fiksasyonunun yol açtığı çapraz bağlanmaları engelleyerek, memeli spermatozoonundaki epitoplara erişilebilirliği arttırmışlardır (Kashir ve ark., 2017). Bu çalışma ile PLC-ζ varlığının tespit edilmesinde sadece immünoflüoresan tekniklerin yeterli olmadığı ve alternatif başka testlerin kullanılması gerekliliği vurgulanmıştır (Kashir ve ark., 2017). PLC-ζ proteininin ölçümü ve değerlendirilmesi açısından akım sitometri kullanımı, daha kantitatif sonuçlar alınmasını sağlar. Bu nedenle PLC-ζ'nın akım sitometri yöntemi ile tespitinin standardize edilmesi; bu tekniği alternatif testler arasında bir adım öne taşıyacaktır.

Gruplardan elde edilen verilerin gerek immünoflüoresan işaretlemelerle gerekse mikroskop incelemesiyle bulunan sonuçların birbirleri ile uyumlu olması, bu sürecin infertile gruplarda da denenmesi ve örnek sayısı arttırılarak eşik değeri çalışmalarının devamına işaret etmektedir.

PLC-ζ‘nın sinyal yoğunluğunun fertilizasyon oranı yüksek olan grupta birbirine yakın seyirli, düşük grupta ise dağınık olması; fertilizasyon sağlanması için PLC-ζ'nın belli bir yoğunlukta olması gerektiğini, yüksek veya az olmasının fertilizasyon başarısını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Olgu sayısının arttırılarak daha fazla çalışma yapılmasına gereksinim vardır.

Çalışmamız literatürde ilk defa klinik uygulamalarla PLC-ζ ilişkisini göstermesi, PLC-ζ ve Izumo-1 için akım sitometrisi analizi sonucuna göre bir değer verebilmesi bakımından çok önemlidir. Çalışma sonucunda kullanılan protokol basamakları laboratuvarımız için optimize hale getirilmiştir.

Spermatozoon membranında bulunan ve oositteki karşılığı Juno (Bianchi ve ark., 2014) proteini olan Izumo-1 proteininin, akım sitometri kullanılarak miktarının tayin edilmesi ve etkisinin ölçümü gereklidir. Bu sonuçlar, fertilizasyon sürecinde spermatozoon ve oosit membranlarının ilişkisinin gösterilebilmesi açısından önemlidir.

Akım sitometri ile gerçekleştirdiğimiz bu optimizasyon sayesinde erkek infertilitesinde önem taşıyan PLC-ζ ve Izumo-1 proteinlerinin ve başka proteinlerin analizi hem klinik tanıda, hem de tedaviye yardımcı teknikler arasında kendine yer bulacaktır.

Yardımla üreme alanında ve IVF çözümlerinde spermatozoon seçimi ile ilgili sorunlar halen tartışılmaktadır. Bu çalışmada; spermatozoada yapılabilecek makroskopik ve mikroskobik incelemelere ek olarak DNA bütünlüğü ve fertilizasyon için oosite bağlanmasını sağlayacak yardımcı proteinlerin varlığı açısından incelemeler yapılmaktadır. Bu teknikler kullanılarak seçilen spermatozoanın;

döllenme ve embriyo geliştirme oranlarının incelenmesi daha kaliteli spermatozoon seçim prosedürü belirlemek için yardımcı olacaktır.

2013 yılında; ICSI olgularının daha fazla DNA hasarına sahip oldukları gösterilmiş ve spermatozoadaki bu hasar derecesinin doğrudan değerlendirilmesi için kullanılabilecek bir testin olmadığı belirtilmiştir (Sakkas, 2013). Bu eksiklik nedeniyle alternatif olabilecek testler ve analiz yöntemleri üzerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

TUNEL yöntemi hem akım sitometri ile hem de florasan mikroskopisi ile analiz edilebilmektedir. Birkaç yıl öncesine kadar SCSA testi altın standart olarak kabul ediliyor olmasına karşın günümüzde laboratuvarlar, uygulanacak tek tip protokol ve standardizasyonun eksikliğini nedeniyle akım sitometriye yönelmişlerdir (Medicine, 2013). Bu yöntem ile yapılacak olan TUNEL testlerinin daha etkili olacağı ve tüm androloji laboratuvarlarına standardize edilebilecek bir aday olabilmesi önemlidir (Mahfouz ve ark., 2009).

2000 yılında 47 fertil ve 66 infertil olguda akım sitometri yöntemi kullanılarak TUNEL için %20'lik bir eşik değeri rapor edilmiştir(Sergerie ve ark., 2005). Devam eden süreçte hasta sayısının arttırılması hedeflenmiş ve 2016 yılında 95 fertil ve 261 infertil olguda aynı yöntem kullanılarak TUNEL için 16.8'lik eşik değeri bildirilmiştir. (Sharma ve ark., 2016). Ne var ki, literatürde konu ile ilgili pek çok çalışmada elde edilen norm veriler arasındaki tutarsızlık, akım sitometri yönteminde DNA kırığı oranlarını saptamayı hedefleyen çalışmalar içinde bir standardizasyon sağlanmasını gerekli kılmaktadır (Bach ve Schlegel, 2016). Bu aşamadan sonra TUNEL yöntemine ait basamakların standardizasyonu için iki farklı laboratuvarda, aynı olgulara aynı basamaklar uygulanmış ve yöntem sonucunda bulunan yüzdeler arasında pozitik korelasyon olduğu görülmüştür. Bu sonuç TUNEL yönteminin benzer basamakları

izlendiğinde oldukça standardize olduğunu ve yakın zaman içerisinde bütün laboratuvarlarda kullanılabileceğini işaret etmektedir (Ribeiro ve ark., 2017)

Yapılan başka bir çalışmada; spermatozoadaki DNA kırıklarının; embriyo gelişimi ve gebelik oranlarını olumsuz etkilediği, duraklayan embriyo sayısında artışa neden olduğu gösterilmiştir (Sedó ve ark., 2017). Geleneksel semen analizine göre DNA kırığı analizinin üstün olduğu ve semen kalitesinin değerlendirilmesi için spermatozoadaki DNA kırığının değerlendirilmesinin önemi ele alınmıştır (Sedó ve ark., 2017).

Tez kapsamında yürütülen iş birliği ile; aynı olguya ait spermatoza örnekleri iki farklı laboratuvarda aynı protokol uygulanarak çalışılmış ve karşılaştırılmıştır. Standardizasyon için uygun aday olduğunu düşündüğümüz TUNEL testi için, sistemin kişi bağımlı olmadığı gösterilmiş ve izlenen protokolün literatüre katkıda bulunması amaçlanmıştır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yardımla üreme ve IVF alanında spermatozoa seçimi ile ilgili sunulan çözümler halen tartışılmaktadır. Bu çalışmada spermatozoada yapılabilecek makroskopik ve mikroskobik incelemelere ek olarak DNA bütünlüğü ve fertilizasyon için oosite bağlanmasını sağlayacak yardımcı proteinlerin varlığı açısından incelemeler yapılmıştır. Bu teknikler kullanılarak seçilen spermatozoonun; döllenme ve embriyo geliştirme oranlarının incelenmesi daha iyi sperm seçim prosedürü belirlemek için yardımcı olacaktır.

IVF merkezlerinde ya da androloji laboratuvarında baştan sona kadar benzer adımların izlenmesi bu test için altın standart elde etmeyi mümkün kılacaktır.

ÖZET

Akım sitometrisi yönteminin insan sperm hücrelerinde i) fosfolipaz C-zeta ve Izumo-1, ii) DNA'sında kırık olan sperm hücrelerinin saptanması için optimize edilmesi

Döllenme sürecinin tamamlanması ve ardından embriyon gelişimi, dişi ve erkek gametlerin kalitesiyle doğrudan ilişkilidir. Erkek üreme hücresi olan sperm hücrelerinin kalitesi, rutin uygulamalarda hareketlilik ve morfoloji kriterlerine göre belirlenir. Sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneğinin sadece fiziksel parametreleriyle ilişkili kalmayıp fonksiyonel kapasitelerinin de önemli olduğu anlaşılmaktadır. Üreme konusunda pek çok bilinmeyenin yanında fertilizasyon süreci ve süreçte sperm hücresinin oositi nasıl aktive ettiği, üzerinde çalışmaların yürütüldüğü konulardan birisidir. Son yıllarda öne çıkanlar proteinlerden biri PLC-ζ (fosfolipaz C-zeta) proteini olmuştur. Yapılan çalışmalarda, PLC-ζ'nın sperm hücrelerinde varlığı gösterilmiş, mRNA ya da protein düzeyinde oosite verilmesinin oositte kalsiyum ossilasyonlarını uyardığı belirtilmiş ve PLC-ζ düzeylerindeki azlığın infertiliteye neden olabileceği dolaylı yollardan ifade edilmiştir. Öne çıkan proteinlerden bir diğeri ise testise spesifik olan ve olgun sperm hücrelerinde bulunan sperm-oosit füzyon proteini Izumo-1'dir. Yapılan çalışmalarda Izumo-1 knockout farelerde sperm hücrelerinin oosite bağlanabilme yeteneklerinin etkilendiği gösterilmiş ve Izumo-1'in insan gamet füzyonu için gerekliliği vurgulanmıştır. Sperm kalitesinin belirlenmesinde spermatozoonun DNA bütünlüğünün, rutin semen analizine ek olarak iyi bir belirteç olabileceği öngörülmektedir. TUNEL yöntemi kırık DNA uçlarına (3'-OH uçlarına) işaretli nükleotidlerin bir enzim aracılığıyla eklenmesi prensibine dayanarak kırık DNA uçlarını belirler. Akım sitometri yöntemi son yıllarda kullanımı artmış, tanı amaçlı kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin üreme alanında da tanıya yönelik olarak kullanımının arttırılması oldukça önem taşımaktadır. Tüm bu çalışmaların doğrultusunda bu yüksek lisans tezinin amacı, insan sperm hücrelerinde yukarıda belirtilen parametrelerin akım sitometrisi yönteminde doğru olarak saptanabilmesi ve ileride tanı amaçlı klinik kullanıma sokulabilmesi için optimizasyon aşamalarının tanımlanmasıdır. Bu amaç doğrultusunda bu optimizasyon sağlanmış olup bulgular immünoflüoresan boyamalar ile de doğrulanmıştır.

Anahtar sözcükler: akım sitometri, Fosfolipaz C-zeta, Izumo-1, sperm seçimi, TUNEL

SUMMARY

Optimization of flow cytometry application to detect in human spermatozoa with i) fosfolipaz C-zeta and Izumo-1 ii) spermatozoa having DNA

The completion of the fertilization process and embryo development is closely related to the successful fusion of both gametes. In routine applications, the quality of sperm is determined by the tests based on their motility and morphology. Thus, assessing an individual's fertility not only depends on physical parameters of spermatozoa but also on their functional capability. There are many unknowns about reproduction. In recent years, studies have been carried out on how sperm cells activate oocytes during the fertilization process. PLC-ζ (phospholipase C-zeta) protein has been postulated as one of the candidate proteins during last decade. In studies conducted, the presence of PLC-ζ in spermatozoa was demonstrated. PLC-ζ has been shown to stimulate oocyte calcium oscillations at the mRNA or protein level. It has also been expressed indirectly that the low level of PLC-ζ may cause infertility. The other protein studied in the sperm-oocyte fusion is Izumo-1, which is the testis-specific and found in mature sperm. It was shown that Izumo-1 has oocyte-binding ability and it was emphasized that Izumo-1 is necessary for human gamete fusion. Numerous studies have reported that sperm DNA fragmentation is linked with reduced fertility rates. TUNEL assay is used to identify DNA fragmentation that is caused by apoptotic signaling cascades. Mechanism of TUNEL assay depends on the presence of nicks in the DNA that can be recognized by terminal deoxynucleotidyl transferase or TdT, an enzyme will catalyze the addition of dUTPs that are secondarily labeled with a marker. Flow cytometer is a robust and widely used technique to analyze multiple parameters of individual cells within heterogeneous populations. It is very important to increase the use of this method for diagnosis in the reproductive area. The aim of this thesis of master degree is to describe the optimization steps with using flow cytometer to detect these proteins and DNA fragmentation in human sperm. This optimization has been achieved for this purpose and the findings have been confirmed by immünoflüoresanfluoresce staining.

Keywords: flow cytometry, Izumo-1, phospholipase C-zeta, sperm selection, TUNEL

KAYNAKLAR

ABID, S., MAITRA, A., MEHERJI, P., PATEL, Z., KADAM, S., SHAH, J., SHAH, R., KULKARNI, V., BABURAO, V. & GOKRAL, J. 2008. Clinical And Laboratory Evaluation Of Idiopathic Male Infertility In A Secondary Referral Center In India. *Journal of Clinical Laboratory Analysis,* **22,** 29-38.

AITKEN, R., BRONSON, R., SMITH, T. & DE IULIIS, G. 2013. The Source And Significance Of DNA Damage In Human Spermatozoa; A Commentary On Diagnostic Strategies And Straw Man Fallacies. *MHR: Basic science of reproductive medicine,* **19,** 475-485.

AITKEN, R. J. & DE IULIIS, G. N. 2007. Origins And Consequences Of DNA Damage In Male Germ Cells. *Reproductive Biomedicine Online,* **14,** 727-733.

BACH, P. V. & SCHLEGEL, P. N. 2016. Sperm DNA Damage And Its Role In Ivf And Icsi. *Basic Clinical Andrology,* **26,** 15.

BIANCHI, E., DOE, B., GOULDING, D. & WRIGHT, G. J. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature,* **508,** 483-487.

BUNGUM, M. 2012. Sperm DNA Integrity Assessment: A New Tool In Diagnosis And Treatment Of Fertility. *Obstetrics Gynecology International,* **2012**.

CAKAR, Z., CETINKAYA, B., ARAS, D., KOCA, B., OZKAVUKCU, S., KAPLANOGLU, İ., CAN, A. & CINAR, O. 2016. Does Combining Magnetic-Activated Cell Sorting With Density Gradient Or Swim-Up Improve Sperm Selection? *Journal Of Assisted Reproduction Genetics,* **33,** 1059-1065.

CARRELL, D. T., EMERY, B. R. & HAMMOUD, S. 2007. Altered Protamine Expression And Diminished Spermatogenesis: What Is The Link? *Human Reproduction Update,* **13,** 313-327.

COULTER, W. H. High Speed Automatic Blood Cell Counter And Cell Size Analyzer. Proceedings Of The National Electronics Conference, 1956. 1034.

CROSLAND-TAYLOR, P. 1953. A Device For Counting Small Particles Suspended In A Fluid Through A Tube. *Nature,* **171,** 37.

EVENSON, D. P. & WIXON, R. 2005. Environmental Toxicants Cause Sperm DNA Fragmentation As Detected By The Sperm Chromatin Structure Assay (Scsa®). *Toxicology Applied Pharmacology,* **207,** 532-537.

FAMUREWA, A. C. & UGWUJA, E. I. 2017. Association Of Blood And Seminal Plasma Cadmium And Lead Levels With Semen Quality In Non-Occupationally Exposed Infertile Men In Abakaliki, South East Nigeria. *Journal Of Family Reproductive Health,* **11,** 97.

FERLIN, A., ARREDI, B. & FORESTA, C. 2006. Genetic Causes Of Male Infertility. *Reproductive Toxicology,* **22,** 133-141.

FERLIN, A. & FORESTA, C. 2014. New Genetic Markers For Male Infertility. *Current Opinion In Obstetrics Gynecology,* **26,** 193-198.

GARTNER, L. P. & HIATT, J. L. 2006. *Color Textbook Of Histology E-Book, Elsevier Health Sciences*.

GRUDZINSKAS, J. G., GRUDZINSKAS, J. & YOVICH, J. 1995. *Gametes-The Spermatozoon, Cambridge University Press*.

HENRIKSON, R., KAYE, G. & MAZURKIEWICZ, J. 1997. Histology, National Medical Series For Independent Study. *William Wilkins,* 215-220.

HERZENBERG, L. A., PARKS, D., SAHAF, B., PEREZ, O., ROEDERER, M. & HERZENBERG, L. A. 2002. The History And Future Of The Fluorescence Activated Cell Sorter And Flow Cytometry: A View From Stanford. *Clinical Chemistry,* **48,** 1819-1827.

HEYTENS, E., PARRINGTON, J., COWARD, K., YOUNG, C., LAMBRECHT, S., YOON, S.-Y., FISSORE, R., HAMER, R., DEANE, C. & RUAS, M. 2009. Reduced Amounts And Abnormal Forms Of Phospholipase C Zeta (Plcζ) In Spermatozoa From Infertile Men. *Human Reproduction,* **24,** 2417-2428.

INOUE, N., IKAWA, M., ISOTANI, A. & OKABE, M. 2005. The Immunoglobulin Superfamily Protein Izumo Is Required For Sperm To Fuse With Eggs. *Nature,* **434,** 234.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. & KELLEY, R. O. 1995. Basic Histology.

KASHIR, J., BUNTWAL, L., NOMIKOS, M., CALVER, B. L., STAMATIADIS, P., ASHLEY, P., VASSILAKOPOULOU, V., SANDERS, D., KNAGGS, P. & LIVANIOU, E. 2017. Antigen

Unmasking Enhances Visualization Efficacy Of The Oocyte Activation Factor, Phospholipase C Zeta, In Mammalian Sperm. *Mhr: Basic Science Of Reproductive Medicine,* **23,** 54-67.
KIERSZENBAUM, A. L. 2001. Spermatid Manchette: Plugging Proteins To Zero Into The Sperm Tail. *Molecular Reproduction Development: Incorporating Gamete Research,* **59,** 347-349.
KIERSZENBAUM, A. L. 2002. Keratins: Unraveling The Coordinated Construction Of Scaffolds In Spermatogenic Cells. *Molecular Reproduction Development,* **61,** 1-2.
KIERSZENBAUM, A. L. & TRES, L. 2015. *Histology And Cell Biology: An Introduction To Pathology E-Book, Elsevier Health Sciences*.
KRAUSZ, C. & CHIANESE, C. 2014. Genetic Testing And Counselling For Male Infertility. *Current Opinion In Endocrinology, Diabetes Obesity,* **21,** 244-250.
KVIST, U. & BJÖRNDAHL, L. 2002. *Manual On Basic Semen Analysis: 2002, Oxford University Press*.
LEAVER, R. B. 2016. Male Infertility: An Overview Of Causes And Treatment Options. *British Journal Of Nursing,* **25,** S35-S40.
LEWIS, S. E. 2014. Sperm DNA Fragmentation And Base Oxidation. *Genetic Damage In Human Spermatozoa. Springer*.
MAHFOUZ, R. Z., SAID, T. M. & AGARWAL, A. 2009. The Diagnostic And Therapeutic Applications Of Flow Cytometry In Male Infertility. *Archives Of Medical Science Special Issues,* **2009,** 108-108.
MAIONE, B., PITTOGGI, C., ACHENE, L., LORENZINI, R. & SPADAFORA, C. 1997. Activation Of Endogenous Nucleases In Mature Sperm Cells Upon Interaction With Exogenous DNA. *DNA Cell Biology,* **16,** 1087-1097.
MEDICINE, P. C. O. T. A. S. F. R. 2013. The Clinical Utility Of Sperm DNA Integrity Testing: A Guideline. *Fertility Sterility,* **99,** 673-677.
MOLDAVAN, A. 1934. Photo-Electric Technique For The Counting Of Microscopical Cells. *Science,* **80,** 188-189.
PAWLINA, W. & ROSS, M. H. 2018. *Histology: A Text And Atlas: With Correlated Cell And Molecular Biology, Lippincott Williams & Wilkins*.
PICOT, J., GUERIN, C. L., LE VAN KIM, C. & BOULANGER, C. M. 2012. Flow Cytometry: Retrospective, Fundamentals And Recent Instrumentation. *Cytotechnology,* **64,** 109-130.
RIBEIRO, S., SHARMA, R., GUPTA, S., CAKAR, Z., DE GEYTER, C. & AGARWAL, A. 2017. Inter-And Intra-Laboratory Standardization Of Tunel Assay For Assessment Of Sperm DNA Fragmentation. *Andrology,* **5,** 477-485.
RUBES, J., SELEVAN, S. G., EVENSON, D. P., ZUDOVA, D., VOZDOVA, M., ZUDOVA, Z., ROBBINS, W. A. & PERREAULT, S. D. 2005. Episodic Air Pollution Is Associated With Increased DNA Fragmentation In Human Sperm Without Other Changes In Semen Quality. *Human Reproduction,* **20,** 2776-2783.
SADLER, T. W. 2011. *Langman's Medical Embryology, Lippincott Williams & Wilkins*.
SAILER, B. L., SARKAR, L. J., BJORDAHL, J. A., JOST, L. K. & EVENSON, D. P. 1997. Effects Of Heat Stress On Mouse Testicular Cells And Sperm Chromatin Structure. *Journal Of Andrology,* **18,** 294-301.
SAKKAS, D. 2013. Novel Technologies For Selecting The Best Sperm For In Vitro Fertilization And Intracytoplasmic Sperm Injection. *Fertility Sterility,* **99,** 1023-1029.
SAKKAS, D., SELI, E., MANICARDI, G. C., NIJS, M., OMBELET, W. & BIZZARO, D. 2004. The Presence Of Abnormal Spermatozoa In The Ejaculate: Did Apoptosis Fail? *Human Fertility,* **7,** 99-103.
SAUNDERS, C. M., LARMAN, M. G., PARRINGTON, J., COX, L. J., ROYSE, J., BLAYNEY, L. M., SWANN, K. & LAI, F. A. 2002. Plcζ: A Sperm-Specific Trigger Of Ca2+ Oscillations In Eggs And Embryo Development. *Development,* **129,** 3533-3544.
SCHULTE, R. T., OHL, D. A., SIGMAN, M. & SMITH, G. D. 2010. Sperm DNA Damage In Male Infertility: Etiologies, Assays, And Outcomes. *Journal Of Assisted Reproduction Genetics,* **27,** 3-12.
SEDÓ, C. A., BILINSKI, M., LORENZI, D., URIONDO, H., NOBLÍA, F., LONGOBUCCO, V., LAGAR, E. V. & NODAR, F. 2017. Effect Of Sperm DNA Fragmentation On Embryo Development: Clinical And Biological Aspects. *Jbra Assisted Reproduction,* **21,** 343.
SERGERIE, M., LAFOREST, G., BUJAN, L., BISSONNETTE, F. & BLEAU, G. 2005. Sperm DNA Fragmentation: Threshold Value In Male Fertility. *Human Reproduction,* **20,** 3446-3451.

SHAPIRO, H. M. 2005. *Practical Flow Cytometry*, *John Wiley & Sons*.
SHARMA, R., AHMAD, G., ESTEVES, S. C. & AGARWAL, A. 2016. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Dutp Nick End Labeling (Tunel) Assay Using Bench Top Flow Cytometer For Evaluation Of Sperm DNA Fragmentation In Fertility Laboratories: Protocol, Reference Values, And Quality Control. *Journal Of Assisted Reproduction Genetics,* **33,** 291-300.
SMRZKA, O. W., DELGEHYR, N. & BORNENS, M. 2000. Tissue-Specific Expression And Subcellular Localisation Of Mammalian Δ-Tubulin. *Current Biology,* **10,** 413-416.
TAVALAEE, M., KIANI-ESFAHANI, A. & NASR-ESFAHANI, M. H. 2017. Relationship Between Phospholipase C-Zeta, Semen Parameters, And Chromatin Status. *Systems Biology In Reproductive Medicine,* **63,** 259-268.
TOCCI, A. & LUCCHINI, C. J. H. R. U. 2010. WHO reference values for human semen. **16,** 559-559.
TREMELLEN, K. 2008. Oxidative Stress And Male Infertility—A Clinical Perspective. *Human Reproduction Update,* **14,** 243-258.
TWIGG, J., IRVINE, D. & AITKEN, R. 1998. Oxidative Damage To DNA In Human Spermatozoa Does Not Preclude Pronucleus Formation At Intracytoplasmic Sperm Injection. *Human Reproduction,* **13,** 1864-1871.
YOON, S.-Y., JELLERETTE, T., SALICIONI, A. M., LEE, H. C., YOO, M.-S., COWARD, K., PARRINGTON, J., GROW, D., CIBELLI, J. B. & VISCONTI, P. E. 2008. Human Sperm Devoid Of Plc, Zeta 1 Fail To Induce Ca 2+ Release And Are Unable To Initiate The First Step Of Embryo Development. *The Journal Of Clinical Investigation,* **118,** 3671-3681.
ZINI, A., ALBERT, O. & ROBAIRE, B. 2014. Assessing Sperm Chromatin And DNA Damage: Clinical Importance And Development Of Standards. *Andrology,* **2,** 322-325.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Zeynep

Soyadı: ÇAKAR

Doğum yeri ve tarihi: Ankara, 1990

Uyruğu:TC

Medeni durumu: Bekar

İletişim adresi ve telefonu: zcakar@beckman.com, znp.ckr@gmail.com

+90 536 0655459

II- Eğitimi

Hamdullah Suphi İlköğretim Okulu	1996-2004
TED Ankara Vakfı Özel Lisesi	2004-2008
Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2008-2012
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	2014-2019

Yabancı dili: İngilizce (İleri), Fransızca (Orta), Lehçe (Başlangıç)

III- Mesleki Deneyimi

Laboratuvar sorumlulukları

- Laboratuvar işleyişinin devamlılığı,
- Günlük, haftalık ve aylık bakımlar
- Laboratuvar tekniklerini ve protokolleri uygulamak ve geliştirmek
- Dahil olunan projelerdeki deneylerin takibi ve dökümante edilmesi
- Stajyerlere ve yeni ekip üyelerine laboratuvar temel eğitimlerinin verilmesi
- Cihaz kalibrasyon ve kontrolleri
- Laboratuvar malzemelerinin ve stok durumunun kontrolü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki sorumluluklar

- Dönem 1 ve Dönem 2 öğrencilerinin Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına ait pratik derslerine asistan olarak girilmesi ve uygulamalar sırasında öğrencilere yardım edilmesi
- Dersler sırasında kullanılacak olan preparatların seçilmesi ve organizasyonu

İleri derecede kullanılabilen cihazlar

- Klinik akım sitometri cihazları (FC500, Gallios, Navios, NaviosEX)
- Araştırma akım sitometri cihazları (Cytoflex, Accuri)
- Manyetik ayrıştırma sistemleri (MACS)
- Mikroskop (ışık, inverted, flüoresan)
- Luminometre
- CASA sistemi
- Hücre canlılık ölçüm sistemi; Vicell, Vicell XR, Vicell BLU
- MiOXSYS
- Metaflex
- Ultra santrifüjler
- Spektrofotometre

Uygulanabilen yöntemler

- Akım sitometrisi hazırlık ve analiz aşamaları
- Hücre dondurma-çözdürme
- Hücre kültürü
- Sperm hazırlama, spermiyogram, boyama
- Hayvan deneyleri
- Oosit, embriyo ve blastosist kültürü, kryoprezervasyon
- İmmünohistokimya
- İmmünoflüoresan boyama teknikleri
- Sperm hücresi DNA hasarı tespit yöntemlerinin uygulanması (TUNEL, SCSA, Halo Test, Comet)
- Sperm hücresinde serbest oksijen radikallerinin ve toplam antioksidan kapasitesinin ölçümü

- Western-Blot uygulaması
- Parafin ve kriyo kesit alma işlemleri

IV- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği

TED Ankara Koleji Mezunlar Derneği

V- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınlar

- A. Ayaz, A. Agarwal, R. Sharma, N. Kothandaraman, **Z. Cakar**, S. Sikka. Proteomic analysis of sperm proteins in infertile men with high levels of reactive oxygen species. Andrology, DOI: 10.1111/and.13015
- Riberio S., Sharma R., Sajal G., **Cakar Z**., de Geyter C., Agarwal A. DeGeyterInter-and intra-laboratory standardization of TUNEL assay for assessment of sperm DNA fragmentation. Andrology. 2017 May;5(3):477-485. doi: 10.1111/andr.12334
- Aras D., **Cakar Z**., Ozkavukcu S., Can A., Cinar O. In vivo akrilamide exposure may cause severe toxicity to mouse oocytes through its metabolite glycidamide. PLoS One. 2017 Feb 9;12(2):e0172026. doi: 10.1371/journal.pone.0172026
- **Cakar Z**, Cetinkaya B, Aras D, Koca B, Ozkavukcu S, Kaplanoglu İ, Can A, Cinar O. Does combining magnetic-activated cell sorting with density gradient or swim-up improve sperm selection? J Assist Reprod Genet. 2016 Aug;33(8):1059-65. doi: 10.1007/s10815-016-0742-0. Epub 2016 May 28.
- Aras D., Cinar O**., Cakar Z**., Ozkavukcu S., Can A. Can dicoumarol be used as a gonad-safe anticancer agent: an *in vitro* and *in vivo* experimental study. Molecular Human Reproduction 2016 Jan;22(1):57-67. doi: 10.1093/molehr/gav065.

Bildiriler

- Ozkavukcu S., Aras D., Cinar., **Cakar Z.**, Can A. Annexin-V kullanılarak manyetik olarak ayrıştırılan spermatozoonlarda DNA fragmantasyon oranları anlamlı biçimde azalmaktadır. IV.Üreme Tıbbı Derneği Kongresi**.** Eylül 2013, Antalya, Turkey

- **Cakar Z**., Cetinkaya B., Aras D., Koca B., Ozkavukcu S., Can A., Cinar. Assessment of Sperm Quality After Magnetic Activated Sperm Cell Separation. 31. ESHRE Toplantısı. Haziran 2015, Lizbon, Portekiz.

- R. Sharma, S. Forte, S. Gupta, **Z. Cakar**, C. DeGeyter, A. Agarwal. Standardization Of The Tunel Protocol For Sperm Dna Fragmentation Between Two Laboratories. 73. ASRM Toplantısı**,** Eylül 2016, Salt Lake, USA

- O. Cinar, **Z. Cakar**, D. Aras, S. Ozkavukcu, A. Can. Effect Of In Vitro And In Vivo Acrylamide Exposure On Mouse Oocyte. 73. ASRM Toplantısı, Eylül 2016, Salt Lake, USA

- Agarwal A, Roychoudhury S, Sharma R, Gupta S, **Cakar Z**, Arafa M, Sabanegh E. Oxidation reduction potential-a novel test for evaluating male infertility. 73. ASRM Toplantısı, Eylül 2016, Salt Lake, USA

- N. Kothandaraman, A. Agarwal, **Z. Cakar**, S. Sikka, E. S. Sabanegh, R. Sharma Differential expression and localization of ace and map3k3 in oxidative stress related male infertility. 74. ASRM Toplantısı, Eylül 2017, San Antonio, Texas, USA

- R. Sharma, A. Agarwal, S. Gupta, **Z. Cakar**, S. Wang, E. S. Sabanegh. Oxidation-reduction potential: a new marker of oxidative stress and sperm quality. 74. ASRM Toplantısı, Eylül 2017, San Antonio, Texas, USA

Kitap Bölümleri

- du Plessis SS, Harlev A, Mohamed MI, Habib E, Kothandaraman N, **Cakar Z**. Physiological Roles of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Reproductive

System. Oxidative Stress in Human Reproduction: Springer, Cham; 2017. p. 47-64.

- Gupta S, du Plessis SS, AlQasem S, Nouh M, **Cakar Z**. Therapeutic Role of Antioxidants (AOX) in the Treatment of Infertility. Oxidative Stress in Human Reproduction: Springer, Cham; 2017. p. 129-50.
- Ahmad G, Almasry M, Dhillon AS, Abuayyash MM, Kothandaraman N, **Cakar Z**. Overview and Sources of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Reproductive System. Oxidative Stress in Human Reproduction: Springer, Cham; 2017. p. 1-16.
- Sharma R, **Cakar Z**, Agarwal A. TUNEL Assay by Benchtop Flow Cytometer in Clinical Laboratories. A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage: Springer, Cham; 2018. p. 103-18.

Sözlü Sunumlar

- Cetinkaya B., Koca B., Aras D., **Cakar Z**., Ozkavukcu S., Can A., Cinar O. Normozoospermi olgularında sağlam DNA'ya sahip hücrelerin seçimi için uygun yöntemin belirlenmesi. 12. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. May 2014, Ankara.

- Aras D., **Cakar Z**., Can A., Ozkavukcu S., Cinar O. Bir mikrotübülüs inhibitörü olan dikumarolün antiproliferatif/proapopitotik etkinliği hücrenin türüne göre değişmektedir. 21. Ulusal Elektron Mikroskobi Kongresi, May 2013, Mersin, Turkey

VI- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

TÜBİTAK Yüksek Lisans Öğrenci Bursu: 'Fertil ve İnfertil Hastaların Spermatozoonlarında Fosfolipaz C-zeta İçeriğinin Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi' SBAG213S019, TUBİTAK **(2014-2016)**

Ödüller

- Cetinkaya B., Koca B., Aras D., **Cakar Z**., Ozkavukcu S., Can A., Cinar O. Normozoospermi olgularında sağlam DNA'ya sahip hücrelerin seçimi için uygun yöntemin belirlenmesi. 12. Ulusal Hstoloji ve Embriyoloji Kongresi. May 2014, Ankara. **Sözlü sunum ikincilik ödülü**
- 9. Yaz Stajı Programı, **Kim Ly Gönüllülük birincilik ödülü**, Cleveland Clinic.

Projeler

Prof. Dr. Ashok Agarwal'ın mentörlüğünde dahil olunan projeler;

- Validation of the MiOXSYS Analyzer as a novel method to measure oxidation-reduction potential in male infertility patients and control groups
- Contribution of oxidative stress associated HSPA2, ACE and RPS27A (UBA) in male infertility and sperm function

Prof. Dr. Özgür Çınar'ın mentörlüğünde görev alınan projeler;

- 'Fertil ve İnfertil Hastaların Spermatozoonlarında Fosfolipaz C-zeta İçeriğinin Karşılaştırılmalı Olarak Değerlendirilmesi' SBAG213S019, TUBİTAK **(2014-2016)**
- 'Akrilamid'in Ovaryum ve Oosit Üzerine Etkilerinin İncelenmesi' 13B3330012, Ankara Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi **(2013-2015)**
- 'Normozoospermik ve Oligozoospermik Hastalarda DNA Kırığının Eliminasyonu İçin Uygun Sperm Seçim Yönteminin Belirlenmesi' 13Ö3330001, Ankara Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi **(2013-2014)**
- 'Ovosit Kriyoprezervasyonunda Mikrotübülüs Stabilizasyonunun Mayoz Mekiği Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması' SBAG109S415, TÜBİTAK **(2012-2013)**

Verdiği konferans ya da seminerler

- Erişkin Akciğerindeki Tip II Alveolar Hücreler Kök Hücre mi?
- Sperm ve Epigenetik Modifikasyonlar
- Proteozom& Peroksizom
- Oosit Kalitesini Etkileyen Faktörler
- Oksitosin
- Ektozomlarve Ekzozomlar

VII- Diğer Bilgiler

Katıldığı eğitim seminerleri

21. Ulusalelektron Mikroskopi Kongresi Mersin, 2013

Biyomalzemelerin Medikal Alanda Kullanımı, ODTÜ 2013

Ulusal Akademik Yayıncılık, TÜBİTAK Ankara, 2013

ODTÜ Biyoenformatik Kursu Ankara, 2014

1. Hacettepe Makale Yazım Kursu, Ankara 2014

Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi Kursu (THED) Ankara, 2014

From Gene to Protein-Sigma Life Science Ankara, 2014

4.Hücresel Tedavi ve Rejeneratif Tıp Kongresi Kapadokya, 2014

12. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi Ankara, 2014

14. GABİMAK Manisa, 2015

1. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Lisansüstü Çalıştayı Ankara, 2015

22. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi İstanbul, 2015

31. ESHRE Toplantısı. Haziran Lizbon, Portekiz, 2015

3.Klinik Embriyoloji Derneği Kongresi Kıbrıs, 2015

TÜBA-Kök Hücre Araştırmaları ve Biyoetik Sempozyumu Ankara,2015