



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**İN FERTİL ERKEKLERDE SPERM HAREKETLİLİĞİ İLE
KİSSPEPTİN İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

Adem KOCAMAN

Danışman
Doç. Dr. Bülent AYAS

SAMSUN
2021

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



İNFERİL ERKEKLERDE SPERM HAREKETLİLİĞİ İLE
KİSSPEPTİN İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Doktora Tezi

Adem KOCAMAN

Danışman

Doç. Dr. Bülent AYAS

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından **PYO.TIP.1904.20.010** proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Adem KOCAMAN tarafından, Doç. Dr. Bülent AYAS danışmanlığında hazırlanan “İnfertil Erkeklerde Sperm Hareketliliği İle Kissseptin İlişkisinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 3.3.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan (Danışman)	Doç. Dr. Bülent AYAS Ondokuz Mayıs Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/>
			Kabul
			<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye	Doç. Dr. Şengül TURAL Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/>
			Kabul
			<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye	Dr. Öğr. Gör. Aysın Pınar TÜRKMEN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/>
			Kabul
			<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye	Doç. Dr. Pınar Naile GÜRGÖR Ordu Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/>
			Kabul
			<input type="checkbox"/>
			Ret
Üye	Doç. Dr. Pervin KARLI Amasya Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/>
			Kabul
			<input type="checkbox"/>
			Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım yüksek lisans/doktora/sanatta yeterlik tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza
15 / 03 / 2021
Adem KOCAMAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: İnfertil Erkeklerde Sperm Hareketliliği İle Kisspeptin İlişkisinin İncelenmesi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 24/01/2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 4

Tek kaynak oranı : % 3 çıkmıştır.

İmza
15/03/2021
Doç. Dr. Bülent AYAS

ÖZET

İNFERTİL ERKEKLERDE SPERM HAREKETLİLİĞİ İLE KISSPEPTİN İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Adem KOCAMAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

Doktora, Mart/2021

Danışman: Doç. Dr. Bülent AYAS

Sperm hareket bozuklukları erkek infertilitesinin en önemli nedenleri arasında yer almaktadır. Sperm hareket kabiliyetine dair mekanizmaların aydınlanmasıyla birlikte, bu problemin üstesinden gelmek için muhtemel tedavi yöntemleri üzerine yapılan araştırmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda, puberteye girişin düzenlenmesinde ve üreme fonksiyonları üzerinde etkinlik gösteren kisspeptin (KISS1) isimli bir peptit keşfedilmiştir. Bu peptidin sperm hareketliliği üzerine etkilerinin olabileceği varsayılmaktadır. Çalışmamızda, sperm hareket bozuklukları görülen erkek infertilitesi alt gruplarında KISS1'in sperm hareketliliği üzerine olası etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma grupları normozoospermi (NZ), astenozoospermi (AZ), oligoastenozoospermi (OAZ) ve oligoastenoteratozoospermi (OATZ) tanılarında birisini alan 25-40 yaşları arasında 40 erkek gönüllünün katılımıyla oluşturuldu. Olgulardan alınan serum ve semen örneklerinde biyokimyasal metotlarla KISS1 konsantrasyon tayini yapıldı. Semen örneklerinde bazal sperm parametreleri tayin edildi. Her olguya ait sperm örneklerinin yarısı kisspeptin-13 (KP-13) ile muamele edilirken diğer yarısına herhangi bir işlem uygulanmadı. Tüm örneklerde *KISS1*, *KISS1R*, *CATSPER1* ve *AKAP4* gen ifade düzeyleri qRT-PCR işlemi ile tespit edildi. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonları floresan spektrofotometre ve floresan ataçmanlı lazer taramalı konfokal mikroskop ile tayin edildi. Tüm veriler istatistiksel olarak analiz edildi. Semen biyokimyasal analizinde, AZ grubunda diğer infertilite gruplarına kıyasla daha yüksek düzeyde KISS1 ifadesi tespit edildi. AZ grubuna ait sperm örneklerinde *KISS1* gen ifadesi diğer infertil gruplara göre daha yüksekti. İnfertil gruplarda *CATSPER1* ve *AKAP4* gen ifade düzeyleri KP-13 uygulaması sonrası belirgin artış gösterdi. *CATSPER1* gen ifadesi açısından en yüksek artış AZ grubunda, *AKAP4* gen ifadesi açısından en yüksek artış OATZ grubunda tespit edildi. KP-13 uygulaması sonrası hücre içi kalsiyum düzeylerindeki artışın sadece AZ grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edildi. Semen KISS1 konsantrasyon sonuçları, *KISS1* gen ifade düzeyi analizleri ile paralellik göstermektedir. KP-13 uygulaması sonrası AZ, OAZ ve OATZ gruplarında, sperm motilitesi ile ilişkili parametrelerde belirgin artış gözlenirken, en belirgin etki AZ grubunda gözlemlendi. KP-13 uygulamasının incelenen sperm motilite parametreleri üzerinde motiliteyi artırıcı yönde etkilerinin olduğu tespit edildi.

Anahtar Sözcükler: erkek infertilitesi, kisspeptinler, sperm hareketliliği, gen ifadesi.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP OF SPERM MOTILITY AND KISSPEPTIN IN INFERTILE MEN

Adem KOCAMAN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Histology and Embryology

Doctorate, March, 2021

Supervisor: Assoc. Prof. Bülent AYAS

Sperm motility problems are among the most important causes of male infertility. In parallel with the enlightenment of the possible mechanisms of sperm motility, the number of researches on possible treatment methods to overcome this problem is increasing day by day. In recent years, a peptide named kisspeptin (KISS1) has been discovered that has an effect on the regulation of puberty and reproductive functions. It is assumed that this peptide may have effects on sperm motility. In our study, we aimed to investigate the possible effects of KISS1 on sperm motility in male subfertility groups with sperm motility disorders. The groups were formed with the participation of 40 male volunteers between the ages of 25-40 who diagnosed with normozoospermia (NZ), asthenozoospermia (AZ), oligoasthenozoospermia (OAZ) or oligoasthenoteratozoospermia (OATZ). KISS1 concentration was determined by ELISA in serum and semen samples. Basal sperm parameters were determined. Half of the sperm samples of each case were treated with kisspeptin-13 (KP-13), while the other half was not treated. *KISS1*, *KISS1R*, *CATSPER1* and *AKAP4* gene expression levels were determined by qRT-PCR. Intracellular calcium concentrations were determined by fluorescence spectrophotometer and laser scanning confocal microscope with fluorescent attachment. All data were analyzed statistically. A higher level of KISS1 expression was detected in the AZ group compared to the other infertility groups in biochemical analysis. *KISS1* gene expression was higher in sperm samples belonging to AZ group compared to other infertile groups. *CATSPER1* and *AKAP4* gene expression levels in subfertile groups increased significantly after KP-13 administration. The highest increase in terms of *CATSPER1* gene expression was found in the AZ group. The highest increase in terms of *AKAP4* gene expression was found in the OATZ group. The increase in intracellular calcium levels after KP-13 administration showed a statistically significant difference only in the AZ group. Semen KISS1 concentration results were in line with *KISS1* gene expression levels. After KP-13 application, significant increase was observed in the parameters related to sperm motility in AZ, OAZ and OATZ groups, while the most significant effect was observed in the AZ group. KP-13 administration had effects on sperm motility parameters.

Keywords: male infertility, kisspeptins, sperm motility, gene expression.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Büyük bir bilinmezliğin ortasındaiken tez danışmanım ile yollarımın kesişmesi akademik gelişimim için büyük bir dönüm noktası oldu. Akademik ahlak, ilkeli olmak, adaletten taviz vermemek, zorluklar karşısında pes etmemek ve hoşgörü dilinin mükemmel örneklerini yaşayarak öğrenme imkanı buldum. Araştırmacı ruhu her zaman desteklemesi, ufuk açıcı ifadeleri ve her zaman hissettirdiği güven duygusu sayesinde çalışma fırsatı buldum. Akademik dünyada ve gerçek hayatta bizler için harika bir örnek olan, tez çalışmamın her aşamasında büyük bir özveri ile bilgisini, değerli vaktini ve rehberliğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli tez danışmanım Doç. Dr. Bülent Ayas'a göstermiş olduğu destekler ve ilgisinden dolayı minnettarım.

Tez çalışmamın başladığı ilk günden itibaren örneklerin toplanmasında ve hazırlanmasında büyük destek sağlayan ve her zaman hoşgörü ile yardımlarını esirgemeyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi çalışanı Biyolog Kübra Toker'e ve Biyolog Mustafa Sözen'e, tüp bebek merkezinde görev yapan tüm hemşire, personel ve sekreteryaya görevlilerine,

Tez izleme komitemde görev alan ve değerli desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Aysin Pınar Türkmen'e ve Doç Dr. Şengül Tural'a,

Tezimde yer alan deneysel analizleri gerçekleştirebilmem için gayretle, nezaketle ve özveriyle yardımlarını esirgemeyen, misafirperverlikle laboratuvarlarının kapılarını sonuna kadar açan ve bilimsel çalışma ortamında güven duygusunun motive edici etkisini iliklerime kadar hissettiren, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanı değerli dostum Öğr. Gör. Tayfun Şengel'e, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanı Öğr. Gör. Dr. Eda Uğurtay'a, Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdür Yardımcısı Dr. Öğretim Üyesi Nihal Şimşek Özek'e, Dr. Öğretim Üyesi Ferhunde Aysin ve Doç. Dr. Mehmet Yılmaz'a, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Bahattin Avcı'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın boyunca desteğini esirgemeyen değerli dostum Uzm. Dr. Recep Bolat'a, doktora eğitimim esnasında güzel anılar biriktirdiğimiz, varlıklarını ve arkadaşlıklarını esirgemeyen MSc. Zeynep Abdik'e, Arş.Gör.Dr. Neslihan Koç'a, Arş.Gör.Dr. Gamze Altun'a ve Arş.Gör.Dr. Erkan Erener'e ve ayrıca anabilim dalımızdaki tüm hocalara ve görevli personellere,

Bu tez çalışmasını, PYO.TIP. 1904.20.010 numaralı proje destekleyen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Bu süreçte, yaşadığım kritik zorlukları aşmamda ve hayat kavrayışımı farklı bir perspektifte değerlendirmemde inanılmaz emekleri olan, zeka pırıltıları ile sorunları çözmemde öngörü sağlayan, her yaprağı paha biçilmez olan sevgili yakınlarıma ve dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayat bir şekilde yaşanılabilir ve sürdürülebilir hale getirilebilir. Fakat, her sabah yaşama azmi ve zorluklarla mücadele hissiyle uyanmayı, kendi ayakları üzerinde nasıl durulması gerektiğini öğrenmeyi, yaşanılabilir bir dünya için başkalarının haklarına saygı duymayı ve onların gözetilmesini kavramayı canım annemden başkası öğretemezdi. Koskoca bir hayatın her köşesini varlığıyla dolduran ve var olmamı sağlayan biricik sevgili anneme sonsuz şükran borçluyum.

Adem KOCAMAN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Üreme Sistemi ve Düzenlenmesi.....	3
2.2. HPG Aksında GnRH'ın Rolü	3
2.3. KISS1/KISS1R Sistemi	5
2.3.1. <i>KISS1</i> Geni ve Ürünleri	6
2.3.1. <i>KISS1R</i> Geni	9
2.3.2. KISS1/KISS1R Sisteminin Hücre İçi Sinyalizasyon Mekanizmaları	12
2.3.3. KISS1/KISS1R Sisteminin Üreme Üzerine Rolünün Keşfi ve Önemi	13
2.3.4. KISS1/KISS1R Sistemi ve Puberte'nin Kontrolü	16
2.3.5. KISS1/KISS1R Sisteminin Gonadlar Üzerine Etkisi	19
2.3.6. KISS1/KISS1R Sisteminin Sperm Fonksiyonları Üzerine Etkisi	22
2.4. Erkek İnfertilitesi.....	26
2.5. Sperm Yapısı ve Semen.....	28
2.5.1. Sperm Başı.....	28
2.5.2. Sperm Kuyruğu.....	29
2.5.3. Semen	30
2.6. Sperm Motilitesi ve Motilite ile İlişkili Genler	30
2.6.1. Sperm Motilitesinin Düzenlenmesinde Rol Alan Faktörler	31
2.6.2. CatSper Kalsiyum Kanalları	32
2.6.3. AKAP4 Etkinliği	33
2.7. Hücre İçi Kalsiyum Oranının Değerlendirilmesi	34
2.8. SYBR Green ile Kantitatif Real-Time PCR.....	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM	37
3.1. Grupların Oluşturulması ve Çalışma Dizaynı	37

3.2. Semen Örneklerinin Analizi	39
3.3. Serum ve Seminal Plazma Örneklerinin Biyokimyasal Analizi.....	40
3.3.1. Reaksiyon Malzemelerinin Hazırlanması.....	40
3.3.2. Reaksiyonun Gerçekleştirilmesi	41
3.4. Sperm Örneklerine KP-13 Uygulanması.....	44
3.5. Sperm Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonunun İncelenmesi.....	44
3.5.1. Floresan Spektrofotometre ile Ca ²⁺ Oranlarının İncelenmesi.....	44
3.5.2. Floresan Ataçmanlı Konfokal Mikroskop ile Ca ²⁺ Oranlarının İncelenmesi	46
3.6. Sperm Motilitesi ile İlişkili Gen İfade Düzeylerinin Analizi	47
3.6.1. Sperm Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu.....	47
3.6.2. Total RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi.....	49
3.6.3. Nükleik Asit Konsantrasyonunun Tayini	51
3.6.4. SYBR Green ile qRT-PCR Gerçekleştirilmesi.....	51
3.7. İstatiksel Analizler.....	56
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	58
4.1. Demografik Verilerin Değerlendirilmesi	58
4.2. Semen Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	58
4.3. Biyokimyasal Analizlerden Elde Edilen Bulgular	59
4.3.1. Semen KISS1 Düzeyinin Değerlendirilmesi	59
4.3.2. Serum KISS1 Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	60
4.4. Hücre İçi Kalsiyum Analizlerinden Elde Edilen Bulgular	61
4.4.1. Spektrofluometre ile Hücre İçi Ca ²⁺ Oranlarının Değerlendirilmesi	61
4.4.2. Floresan Ataçmanlı Konfokal Mikroskop ile Hücre İçi Ca ²⁺ Oranlarının Değerlendirilmesi	62
4.5. Gen İfade Düzeylerinin Analizlerinden Elde Edilen Bulgular.....	63
4.5.1. Total RNA Konsantrasyonları ve Saflık Oranları.....	63
4.5.2. Gen İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi.....	64
4.6. Bulguların Değerlendirilmesi	69
5. SONUÇ	80
KAYNAKLAR.....	81
EKLER.....	96
Ek 1. Etik Kurul Belgesi.....	96
Ek 2. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	97
ÖZ GEÇMİŞ.....	100

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKAP4	: A-kinaz ankor proteini 4
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca²⁺	: Kalsiyum
CatSper	: Sperm katyon kanalı
CATSPER1	: Sperm katyon kanalı 1 proteini
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
cDNA	: Tamamlayıcı deoksiribo nükleik asit
Cq	: Kantifikasyon döngüsü
Ct	: Kantifikasyon döngü eşiği
DAG	: Diaçilgliserol
DK	: Değişim katsayısı
DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
dNTP	: Deoksiribo nükleotit baz
E	: Glutamik asit
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent deney
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
EtBR	: Etidyum bromür
FANTOM5	: Fare/memeli genomunun işlevsel açıklaması 5
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
Fura 2-AM	: Fura-2-asetoksimetil ester
GnRH	: Gonadotropin salgılayan hormon
GPCR	: G proteine bağlı reseptör
GPR54	: G proteine bağlı reseptör 54
GTE_x	: Doku genotip ifadesi
hCG	: İnsan koryonik gonadotropini
HPG	: Hipotalamus-hipofiz-gonadal aks
HRP	: Horseradish peroksidaz
IHH	: İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizme
IP₃	: İnositol-(1,4,5)-trifosfat
KISS1	: Kisspeptin peptiti
KISS1R	: Kisspeptin peptiti reseptörü
KP-54	: Kisspeptin-54
KP-14	: Kisspeptin-14
KP-13	: Kisspeptin-13

KP-10	: Kisspeptin-10
LH	: Luteinleştirici hormon
LHRH	: Luteinize edici hormon salgılayan hormon
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MMP-9	: Matriks metalloproteinaz 9
NF-κB	: Nüklear faktör kappa B
NX	: Konsensüs normalleştirilmiş ifade
P	: Prolin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PEST	: Prolin, glutamik asit, serin, treonin
PIP₂	: Fosfolipid fosfatidil inositol bifosfat
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
PLC-β	: Fosfolipaz C
POA	: Preoptik bölge
pTPM	: Milyon başına protein kodlayıcı transkriptler
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
S	: Serin
sAC	: Adenil siklaz
SD	: Standart sapma
SH	: Standart hata
T	: Treonin
TBE	: Tris, Borate, EDTA
Tm	: Primer bağlanma sıcaklığı
TRPC	: Geçici reseptör potansiyeli kanonik kanal
V	: Volt
VKI	: Vücut kitle indeksi
VOCC	: Voltaja bağlı kalsiyum kanalı
2^{-ΔΔCt}	: Delta-delta Ct metodu formülü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	KISS1 ile ilgili keşiflerin tarihsel aktarımı	6
Şekil 2.2.	<i>KISS1</i> geninin lokasyonu, ifade edilen ekzonları ve protein ürünleri	7
Şekil 2.3.	Consensus Human Brain Data Set verilerine göre <i>KISS1</i> geninin çeşitli beyin bölgelerinde ifade edilmiş düzeyi.....	8
Şekil 2.4.	GTE _x verilerine göre <i>KISS1</i> geninin çeşitli organ ve dokularda ifade edilmiş düzeyi	9
Şekil 2.5.	<i>KISS1R</i> geninin lokasyonu ve ekzonları	10
Şekil 2.6.	Consensus Human Brain Data Set verilerine göre <i>KISS1R</i> geninin çeşitli beyin bölgelerinde ifade edilmiş düzeyi.....	11
Şekil 2.7.	GTE _x dataset verilerine göre <i>KISS1R</i> geninin çeşitli organ ve dokularda ifade edilmiş düzeyi.....	11
Şekil 2.8.	KISS1'in KISS1R ile olası etkileşim mekanizması.	13
Şekil 2.9.	KISS1'in testiste olası etkileşim mekanizması	21
Şekil 2.10.	KP-13 (10 µm) ve progesteronun (1 µm) Fura-2 yüklü insan sperminde hücre içi serbest Ca ²⁺ seviyeleri üzerine etkileri	24
Şekil 3.1.	Çalışma basamaklarının şematize edilmesi.....	38
Şekil 3.2.	Reaksiyonun hazırlanmasında kullanılan protokol	41
Şekil 3.3.	Biyokimyasal analiz aşamaları.....	42
Şekil 3.4.	450 nm'de spektrofotometrik analize hazır mikropilaka ve mikropilaka okuyucu cihazı	43
Şekil 3.5.	Standart örneklerle ait logaritmik standart eğrisi grafiği.....	44
Şekil 3.6.	Floresan spektrofotometrik analizlerin gerçekleştirildiği cihaz	45
Şekil 3.7.	Floresan ataçmanlı lazer taramalı konfokal mikroskop	46
Şekil 3.8.	ZEN 2.3 yazılımı ile görüntülerin analiz edilmesi	47
Şekil 3.9.	Örneklerin izolasyonunda izlenen protokol	48
Şekil 3.10.	cDNA sentez aşamaları	49
Şekil 3.11.	Gerçek zamanlı termal döngüleyici cihazı	55
Şekil 3.12.	Gerçek zamanlı termal döngüleyici cihazı ekranında qRT-PCR esnasında dsDNA'nın yaydığı floresan ışımaya değerlerinin döngü grafiğinin görüntülenmesi.....	55
Şekil 4.1.	Gönüllülere ait yaş dağılımı	58
Şekil 4.2.	Semen KISS1 düzeyinin gruplar arasındaki farkını gösteren grafik.....	59
Şekil 4.3.	Semen KISS1 düzeyinin gruplar arasındaki farkını gösteren grafik.....	60
Şekil 4.4.	KP-13 uygulama öncesi ve sonrası hücre içi kalsiyum yoğunluk farkının floresan spektrofotometre ile analiz sonuçları gösterilmektedir	61
Şekil 4.5.	KP-13 uygulama öncesi ve sonrası hücre içi kalsiyum yoğunluk farkının konfokal mikroskop ile analiz sonuçları gösterilmektedir	62
Şekil 4.6.	<i>GAPDH</i> genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi	64
Şekil 4.7.	<i>KISS1</i> genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi	64
Şekil 4.8.	<i>KISS1R</i> genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi.....	65
Şekil 4.9.	<i>CATSPER1</i> genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi	65
Şekil 4.10.	<i>AKAP4</i> genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi	66
Şekil 4.11.	<i>KISS1</i> gen ifade değişiminin gruplar arası oransal farkının gösterimi....	67
Şekil 4.12.	<i>KISS1R</i> gen ifade değişiminin gruplar arası oransal farkının gösterimi .	67
Şekil 4.13.	<i>CATSPER1</i> gen ifade değişiminin oransal farkının gösterimi	68
Şekil 4.14.	<i>AKAP4</i> gen ifade değişiminin gruplar arası oransal farkının gösterimi..	68

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Normal sperm analizinde kullanılan DSÖ referans ölçütleri tablosu (DSÖ, 2010)	39
Tablo 3.2.	Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu protokolü.....	50
Tablo 3.3.	Reverse transkriptaz reaksiyonu protokolü.....	50
Tablo 3.4.	Reaksiyon döngü koşulları.....	50
Tablo 3.5.	Çalışmada kullanılan primerler, primer dizilimleri, Tm (°C) değerleri ve aplikon uzunlukları	53
Tablo 3.6.	PCR reaksiyon hazırlık protokolü.....	53
Tablo 3.7.	PCR döngü koşulları	53
Tablo 3.8.	qRT-PCR reaksiyon hazırlık protokolü	54
Tablo 3.9.	qRT-PCR döngü koşulları.....	54
Tablo 3.10.	qRT-PCR sonuçlarının $2^{-\Delta\Delta C}$ formülü ile hesaplanması	56
Tablo 4.1.	Gönüllülere ait demografik veriler.....	58
Tablo 4.2.	Semen parametrelerine ait bazal değerler	59
Tablo 4.3.	İzole edilen RNA konsantrasyonları ve saflık oranları (A260/280) ..	63
Tablo 4.4.	Tüm gruptaki gen ifade değişimlerine ait p değerleri tablosu	66

1. GİRİŞ

Çocuk sahibi olmak insanoğlunun arzu ettiği en vazgeçilemez isteklerden birisidir. Çiftlerin çoğu (yaklaşık %85'i), birlikteliklerinin ilk on iki ayında doğal yollarla bu isteklerini gerçekleştirebilmektedir. Ne var ki, kısırlık tanısı alan diğer %15'lik popülasyon ise, çeşitli tedavi yöntemleri ile gebe kalmaya çalışmaktadır (Gnoth, vd., 2005). İnfertilite sorununun temelinde yatan problemlerin aydınlatılması, infertilite gelişim mekanizmalarının açıklanması ve ilgili problemlere çözümler üretilmesi günümüzde üreme alanında en çok çalışma yürütülen konular arasındadır (Lishko, vd., 2011; Strunker, vd., 2011; Visconti, 2009).

Sperm sayısındaki düşüklük, sperm hareketliliğinin zayıflığı ve spermde şekilsel bozuklukların bulunması, doğal yolla gebelik elde edilmesini zorlaştıran faktörler arasındadır (Bhilawadikar, vd., 2013; Freitas, vd., 2017). Hipotalamus-hipofiz-gonadal (HPG) aksın düzgün çalışması sperm oluşumu ve gelişiminde büyük bir öneme sahiptir. Puberte döneminde, hipotalamusun medial preoptik alanındaki nöronlar, ön hipofize ulaştırılmak üzere portal kan sistemine gonadotropin salgılayan hormonun (GnRH) pulsatif salgısını başlatır. Hipofize ulaşan GnRH, luteinleştirici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormonun (FSH) salgılanması için gonadotropik hücreleri uyarır. Salgılanan gonadotropinler, spermatogenez ve oogenezin başlaması ve devamı için gerekli olan gonadal hormonların sentezini uyarmak üzere gonadlara etki ederler (Maeda, vd., 2010). Pubertede GnRH salgısının başlatılmasında anahtar bir role sahip olan kisspeptin peptidi (KISS1) yakın bir dönemde keşfedilmiştir. Etkileşimini G-proteine bağlı reseptör 54 (GPR54) üzerinden göstermektedir. GPR54 reseptörü daha sonra KISS1 reseptörü (KISS1R) olarak ifade edilmiştir. KISS1R'nin beyin bölgelerinde ve ayrıca periferik organlarda (testis, karaciğer, pankreas ve bağırsak) eksprese edildiği ortaya konulmuştur (Lee, vd., 1999).

KISS1/KISS1R sisteminin üreme kontrolüne ilişkin ilk kanıtları, *KISS1R*'deki mutasyonların insanlarda hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkili olduğunu gösteren iki farklı çalışma ile gösterilmiştir. LH ve FSH eksikliği ile karakterize olan hipogonadotropik hipogonadizm neticesinde üreme fonksiyonunun gecikmesiyle kısırlık görülmektedir. *Kiss1/Kiss1r*'nin susturulduğu transgenik farelerde de hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite gözlenmiştir (de Roux, vd., 2003). Bu sebeple, testiste ekspresyonu gerçekleşen KISS1/KISS1R sisteminin, sperm parametreleri üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Günümüzde, infertilite

tanısı alan erkek hastalara ait örneklerde KISS1 düzeyinin sperm motilitesi ile ilişkili parametreleri hangi düzeyde ve nasıl etkilediğini ortaya koyan bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu çalışmada, KISS1'in sperm motilitesi üzerine olası etkilerinin incelenmesi ile literatürdeki bu eksikliğin doldurulmasının yanı sıra, infertil hastalarda sperm motilitesinin iyileştirilmesine yönelik nasıl bir etkisinin olabileceğinin ortaya konulabilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Üreme Sistemi ve Düzenlenmesi

Üreme, canlı türlerin sürekliliği için vazgeçilmez bir işlemdir. Üreme fonksiyonu, kompleks bir düzenleyici faktörler ağının kontrolünde düzenlenmektedir. Bu düzenleyici faktörler, memeli hayvanlarda ve diğer türlerde esas olarak HPG aksı olarak adlandırılır (Brooks, vd., 1996; Smith ve Clarke, 2007; Smith, vd., 2006). Bu aks, sinyallerin ortaya çıktığı hipotalamus ile ön hipofiz bezi ve gonadlar arasındaki dinamik etkileşime dayanmaktadır.

Hipotalamusun medial preoptik alanında (kemirgenlerde ve koyunlarda) veya mediobasal hipotalamusta (insanlarda ve primatlarda) yer alan özelleşmiş nöronlar, GnRH'nin hipofiz-portal dolaşıma pulsatil bir şekilde salınımını gerçekleştirir (Barry, 1979; Rance, vd., 1994). GnRH, hipofiz bezinin yaklaşık %10'luk kısmını oluşturan gonadotrop hücreleri uyararak LH ve FSH'nin sistemik dolaşıma salınımını tetikler (Clarke ve Cummins, 1982; Wildt, vd., 1981). Bu gonadotropinler daha sonra gametogenezi ve gonadal cinsiyet steroidlerinin salınımını uyarmak için gonadlar üzerine etki eder. FSH ağırlıklı olarak gametogenezi uyarmak için salınırken, LH genel olarak cinsiyet steroidlerinin sentezini indükler (Whitlock, vd., 2019).

Erkeklerde LH, Leydig hücreleri üzerindeki reseptörleri aktive ederek başta testosteron olmak üzere androjenlerin sentezini ve salgılanmasını tetikler. Salgılanan testosteron, spermatogenezi ve sekonder erkek cinsiyeti özelliklerinin gelişimini uyarır. Kadınlarda ise, LH yumurtalıkta teka hücrelerindeki reseptörleri aktive ederek androjenlerin salınımını tetikler. Salgılanan androjen daha sonra, teka hücrelerine komşu granüloza hücreleri tarafından aromataz aktivitesiyle östrojenlere dönüştürülür. Bu süreçte FSH, yumurtalık foliküllerinin gelişimini uyarır. Ovulasyon öncesi faz olarak da adlandırılan orta döngüde LH'nin ani yükselişinden sonra yumurtlama gerçekleşir. HPG aksında ortaya çıkan hata, ergenlik dönemine geç girme ve infertilite dahil bir dizi patolojiye yol açabilir (Grumbach, 2002; Parent, vd., 2003; Ojeda, vd., 2010).

2.2. HPG Aksında GnRH'nin Rolü

Nöroendokrin sistemdeki merkezi konumu göz önüne alındığında, GnRH nöronları bu sistemin önemli bir hiyerarşik elemanı olarak kabul edilir. GnRH, HPG

aksındaki yapıların hipotalamik regülasyonu için nihai çıkış sinyali olarak çalışır. Üreme fonksiyonunun uygun şekilde gelişiminin ve sürdürülmesinin anahtarı GnRH'nın pulsatil salgısıdır (Belchetz, vd., 1978; Kelch, vd., 1985). GnRH nöronlarının eşzamanlı salınımı, hipotalamik bir ağ olan GnRH sinyal üreticinin entegre fonksiyonunun bir sonucudur. Bu ağ, GnRH nöronlarının yanı sıra diğer afferentleri de kapsar ve GnRH'nin pulsatil sekresyonunu mümkün kılar (Knobil, 1980). GnRH'nın pulsatil salgılanmasının sadece preoptik bölgede (POA) bulunan GnRH nöronlarının intrinsik aktivitesi tarafından gerçekleşmediği, aynı zamanda ek hipotalamik afferentlerin katkısının da olduğu gösterilmiştir (Maeda, vd., 2010; Terasawa, vd., 2010). GnRH, insanlarda mediobasal hipotalamusta özelleşmiş GnRH nöronları tarafından sentezlenir ve salgılanır. Bu nöronlar, GnRH'nin hipofiz-portal dolaşımına salındığı medyan eminentiaya doğru uzantılara sahiptir (Gore, 2002). Memelilerin büyük bir kısmında yapısal korunma gösterir. Bununla birlikte, yürütülen çalışmalarda GnRH nöronlarının kendi başına pulsatil salgılama kabiliyetine sahip olduğu gösterilmiştir (Maeda, vd., 2010; Terasawa, vd., 2010). Son zamanlarda yapılan nöroanatomik analizler, GnRH salgısının senkronize edilmesine katkıda bulunabilecek dendro-dendritik bağlantıların ve GnRH nöronları arasında paylaşılan sinapsların varlığını da ortaya koymuştur (Campbell, vd., 2009).

GnRH hormonunun salınımı ve sentezi, cinsiyet steroid hormonları da dahil olmak üzere birçok faktör tarafından düzenlenmektedir. Östradiol hormonu, GnRH salınımını hem pozitif hem de negatif olarak modüle ederken (pozitif ve negatif geri besleme), progesteron ise GnRH sekresyonunu negatif olarak modüle eder (negatif geri besleme). GnRH salınımının frekansı ve süresi, insan gelişimi ve adet döngüsü süresince değişkenlik gösterir. Erken gebelik döneminde GnRH'nın pulsatil salgılanmasının olduğu tespit edilmiş ve erkek çocuklarda 6 aya, kız çocuklarında 2 yaşına kadar devam ettiği gösterilmiştir. GnRH yalnızca lokal hipofiz-portal dolaşıma salındığı için ölçümü zordur. Bu nedenle, serumdaki LH, GnRH salınımını temsil eden bir belirteç olarak kullanılmaktadır. LH salınımının frekansı, foliküler fazın sonuna doğru artar ve yumurtlamadan hemen önce pik yapar (Gore, 2002).

GnRH'nın pulsatil salgılanma mekanizması, bir dizi karmaşık yolak üzerinden gerçekleşir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, GnRH salgılanmasının kontrolünden sorumlu nöroendokrin yolların gelişimsel olgunlaşmasına ve ana düzenleyici mekanizmalar hakkındaki bilgilere önemli ölçüde ışık tutmuştur. Bu çalışmalarla,

GnRH nöronlarının trans-sinaptik ve glial girdiler tarafından çeşitli etkileşimlerle kontrol edildiği ortaya konulmuştur (Ojeda, vd., 2006; Ojeda, Lomniczi, vd., 2010; Ojeda, vd., 2008). Glial kaynaklı büyüme faktörleri ve glutamat gibi GnRH salınımını uyarıcı bu tür etkileşimler, ergenliğin ve yetişkin üreme döneminin başlamasını sağlayan kritik sinyalleşmelerin kaynağı olarak kabul edilmektedir (Ojeda, vd., 2006; Ojeda, Lomniczi, vd., 2010). GnRH nöronları doğal olarak nöronal afferentlerle etkileşimi neticesinde pulsatile bir şekilde GnRH salgılamasına rağmen (Funabashi, vd., 2000), bu salgıyı *in vivo* modüle eden bir dizi uyarıcı ve inhibe edici nörotransmitterler de bulunmaktadır. Anjiyotensin II, dopamin, galanin, glutamat, histamin, leptin, nöropeptit Y, nor-adrenalin uyarıcı olarak etki gösterirken, gama-aminobütirik asit ve opioidler ve inhibe edici etki göstermektedir. Asetilkolin, kolesistokinin, dopamin, oksitosin, vazopressin ve serotonin ise hem uyarıcı hem de inhibe edici etki gösterdikleri ortaya konmuştur (Evans, 1999). Stres, beslenme ve cinsiyet steroidlerinin uyarımı da GnRH salgılanmasına etki eden önemli modülatörlerdendir. Bu nedenle, GnRH salınımlarının oluşumu tek bir molekülün izole bir hareketiyle değil, uyarıcı ve inhibe edici sinyaller arasındaki dinamik denge ile yönlendirildiği anlaşılmaktadır (Ojeda, vd., 2006; Ojeda, Lomniczi, vd., 2010). Bu kontrollü mekanizma içerisinde, uyarıcı ve inhibe edici sinyaller önemi farklılıklar gösterebilmektedir. Bu durum, GnRH salgılanmasını yöneten en temel unsurlar olan nöronal afferentlerin daha detaylı bir şekilde ele alınmasını gerektirmiştir.

Yakın zamanda, GnRH salgılanmasını ve dolayısıyla üreme aksının düzenlenmesinde güçlü bir role sahip olan KISS1 ve reseptörü olan KISS1R tespit edilmiştir. Bu bulgu üreme histolojisi, fizyolojisi ve genetiği alanlarında birçok yeni çalışmanın yürütülmesini teşvik etmiştir (d'Anglemont de Tassigny ve Colledge, 2010; Garcia, vd., 2018; Mei, vd., 2013; Patel ve Smith, 2020).

2.3. KISS1/KISS1R Sistemi

Hipotalamik KISS1/KISS1R sistemi ergenlik çağında ve yetişkinlikte HPG aksının düzenlenmesinde önemli bir faktördür. Bu sistem ayrıca, muhtemelen gebelik esnasında trofoblast istilasının düzenlenmesinde ve ayarlanmasında da yer almaktadır. KISS1, melanomlarda ve bazı meme kanserlerinde tümör oluşumunu etkilemeden metastazları baskılayan bir inhibitör proteindir. KISS1R ise, GnRH salgısının kontrolü ve puberteye giriş için gereklidir. Reseptör tarafından aktive edilen transdüksiyon yollarının analizi neticesinde, KISS1R'nin fosfolipaz C'ye bağlanma ve hücre içi

kalsiyum salınımında önemli bir rolünün olduğu tespit edilmiştir (Min, vd., 2014). Bu sistemdeki aksaklıklar, hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkilendirilmiştir. *KISS1* ile ilgili gerçekleşen önemli keşifler, tarihsel olarak Şekil 2.1’de sunulmuştur.

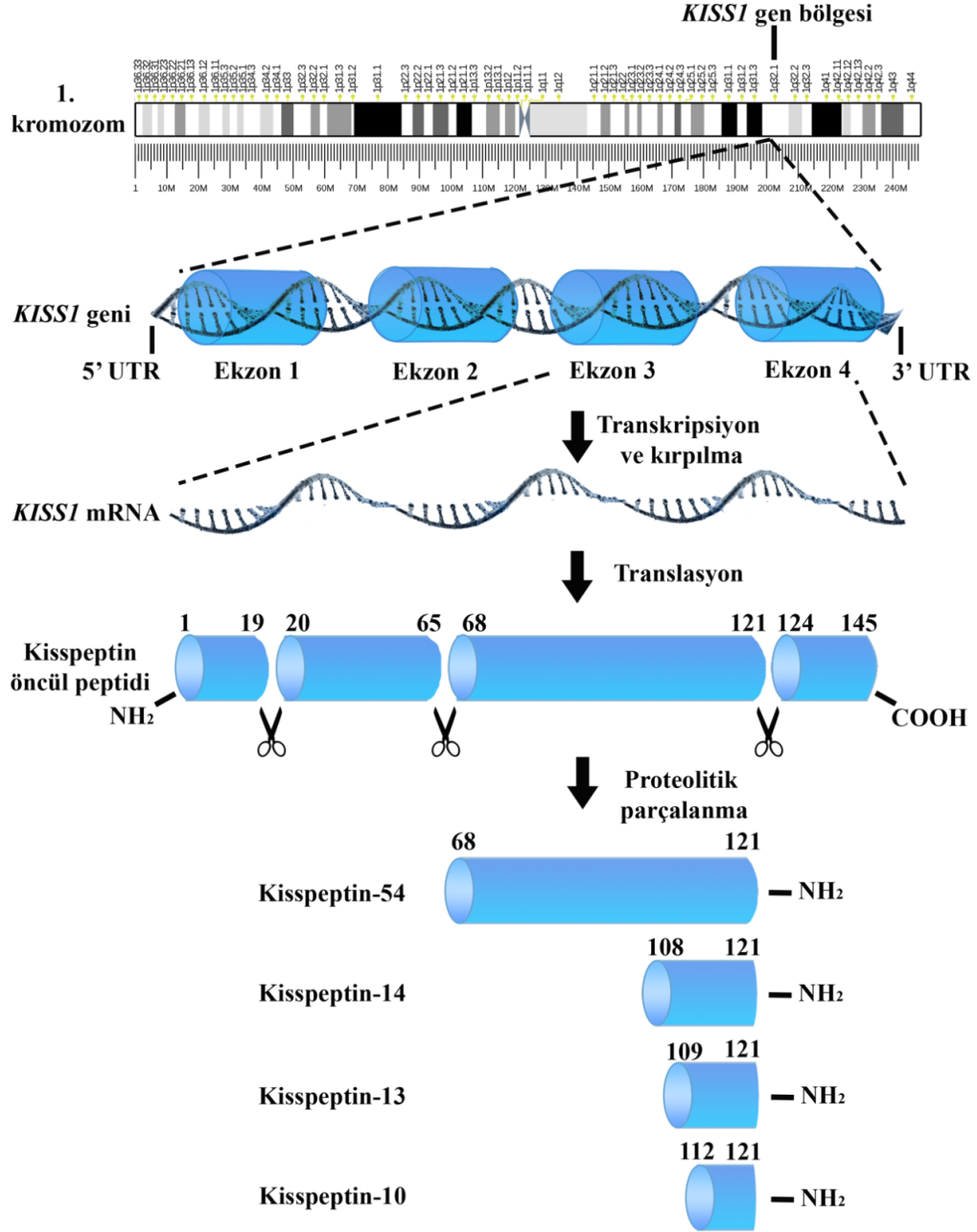


Şekil 2.1. *KISS1* ile ilgili keşiflerin tarihsel aktarımı (Tena-Sempere, (2008)’den uyarlanmıştır)

2.3.1. *KISS1* Geni ve Ürünleri

KISS1 geni ilk olarak, 1996 yılında melanom hücre hatlarında metastaz baskılayıcı bir gen olarak tanımlanmıştır (Lee, vd., 1996). Genin keşfedildiği şehir olan Hershey (Pennsylvania, ABD), Kisses isimli meşhur bir çikolatanın üretim merkezi olduğu için, gen ve gen ürünü olan peptit kisspeptin olarak isimlendirilmiştir. Araştırmacılar, insan melanom hücre hatlarında *KISS1*'in ifade düzeyi ile metastaz arasındaki bağlantıyı göstermeyi amaçlamıştır. Bu doğrultuda, *KISS1* tamamlayıcı deoksiribonükleik asitlerin (cDNA) melanom hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirilmiş ve ifade düzeyiyle orantılı olarak metastazı bastırdığı gösterilmiştir (Lee, vd., 1996). Daha sonra genin kromozomal lokasyonu ve dört ekzona sahip olduğu tespit edilmiştir (West, vd., 1998). Birkaç yıl sonra ise, *KISS1* geninin peptit ürünleri tanımlanmıştır. *KISS1* gen ürünlerinin etkileşim gösterdiği reseptöre ait gen ise *KISS1R* olarak adlandırılmaktadır (Kotani, vd., 2001; Ohtaki, vd., 2001).

KISS1 geni, insanlarda 1. kromozomun q kolu 32.1. bölgesinde 204,190,341-204,196,491 baz çiftleri arasında yerleşim göstermektedir. Paylaşılan ilk bildirimlerde bu genin, dört ekzon ve üç intron içerdiği, birinci ve ikinci ekzonlardan mRNA ifadesinin gerçekleşmediği, fakat son iki ekzondan 145 amino asitlik öncül bir peptit kodlandığı belirtilmiştir (Şekil 2.2). Daha sonra, insan *KISS1* geninin üç ekzon içerdiğine dair alternatif bir öneri sunulmuştur. Bu öneriye göre, ilk ekzon 111 bazdan oluşmakta olup mRNA düzeyinde ifadesi gerçekleşmezken, 39. konumunda başlangıç kodonuna sahip 2. ekzonun 141 nükleotit içerdiği, 3. ekzonun 322 nükleotidden oluştuğu, ardından mRNA ifadesini durdurma kodonunun ve poliadenilasyon dizisinin bulunduğu sunulmuştur (Tena-Sempere, 2013).



Şekil 2.2. *KISS1* geninin lokasyonu, ifade edilen ekzonları ve protein ürünleri (Hu, vd., (2017)'den uyarlanmıştır)

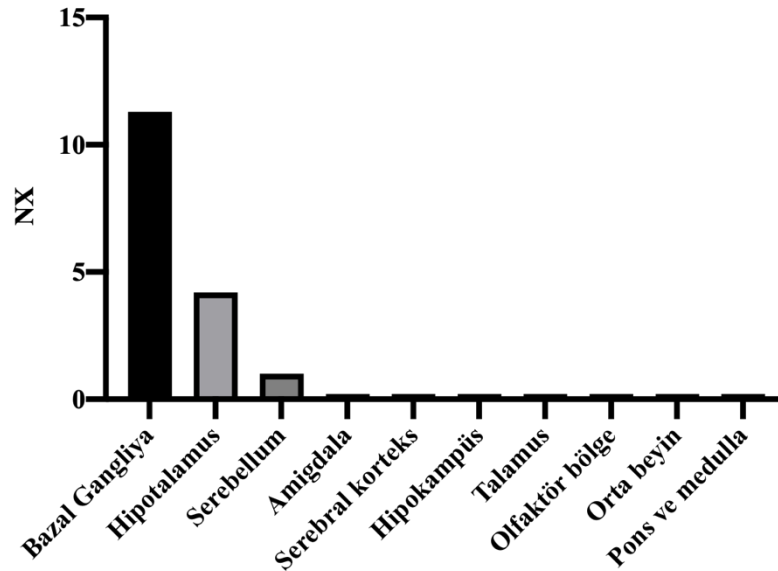
KISS1 geninin öncül ürünü, yaklaşık 145 amino asit büyüklüğünde bir peptittir. Bu öncül peptit post-translasyonel işlemlerden sonra 54 aminoasitlik kisspeptin-54'e (KP-54) ve aynı C-terminal bölge ile benzer fonksiyonel özelliklere sahip daha kısa formlardaki kisspeptin-14 (KP-14), kisspeptin-13 (KP-13) ve kisspeptin-10'a (KP-10) dönüştürülür (Messenger, vd., 2005). Üretilen peptit prolin (P), glutamik asit (E), serin (S) ve treonin (T) açısından zengin bir peptit dizisine (PEST) sahiptir. PEST dizilerinin

hücre içi yarı ömrü kısa olan proteinlerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Üretilen prekürsör nöropeptit kisspeptin-145 kısa bir yarı ömre sahiptir (Tena-Sempere, 2006). Tüm bu alt türevler, COOH-terminalinde Arg-Phe-NH₂ içerir ve RF-amid ailesine aittir (Kirby, vd., 2010).

2.3.1.1. *KISS1* Geninin İfade Edilişi

KISS1 belirgin olarak bazal gangliyada ve hipotalamusta ifade edilmektedir. Hipotalamik *KISS1* mRNA'sı, ağırlıklı olarak infundibular nükleus ve POA'da gözlenirken, hipokampal dentat girus ve beynin diğer bölgelerinde daha düşük seviyelerde gen ifadesi tespit edilmiştir (Arai, 2009; Smith ve Clarke, 2007).

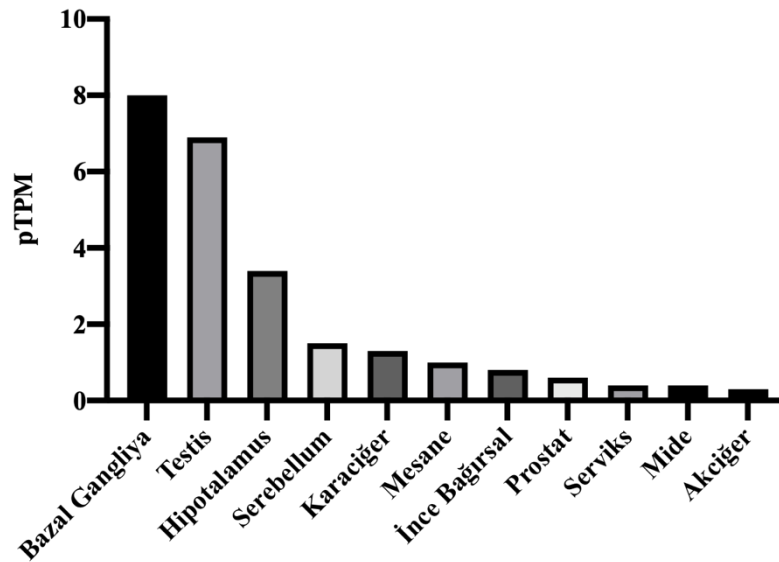
Genotip-doku ifadesi (genotype-tissue expression, GTE_x) ve fare/memeli genomunun işlevsel açıklaması 5 (functional annotation of the mouse/mammalian genome 5, FANTOM5) transkriptomik veri setlerinden elde edilen verilerin birleştirilmesiyle oluşturulan konsensüs insan beyni verilerinde (consensus human brain data set), 10 beyin bölgesi için *KISS1* ifadesine yönelik konsensüs normalleştirilmiş ifade (NX) seviyeleri oluşturulmuştur. En yüksek gen ifadesi 11.3 NX ile bazal gangliada gözlenirken, ikincil olarak 4.3 NX ile hipotalamusta tespit edilmiştir. Diğer bölgelerde ise bu iki bölgeye nispeten çok daha düşük seviyelerde gen ifade düzeyi gözlenmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Consensus Human Brain Data Set verilerine göre *KISS1* geninin çeşitli beyin bölgelerinde ifade edilme düzeyi. NX; Konsensüs tarafından normalleştirilmiş ifade düzeyi (Uhlen, vd., (2015)'ten uyarlanmıştır)

KISS1 gen ifadesi periferik olarak testis, ovaryum, pankreas, karaciğer, mide, ince bağırsak, böbrek ve diğer bazı organlarda tespit edilmiştir (Gaytan, vd., 2009; Muir, vd., 2001; Ohtaki, vd., 2001; Porzionato, vd., 2011; Richard, vd., 2008). Bu bölgelerin dışında, gebeliğin üçüncü trimesterinde insan plasentasında ve maternal plazmada *KISS1* seviyesi, hamilelerde hamile olmayanlara göre 7000 kat daha yüksektir (Horikoshi, vd., 2003). Gebelikte artış gösteren plazma *KISS1* düzeyinin rolü henüz açıklanamamıştır, fakat bu yüksek *KISS1* düzeyinin gebelik sırasında uterusun trofoblastik istilasının düzenlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Plasentaya ait mRNA ifade düzeyleri, diğer organlara ait verilerden yaklaşık olarak 30 kat daha yüksektedir (Uhlen, vd., 2015). GTEx projesi verilerinden elde edilen bilgiler değerlendirildiğinde, bazal gangliadan sonra en fazla *KISS1* gen ifadesinin testiste gerçekleştirildiği dikkatleri çekmektedir (Şekil 2.4).



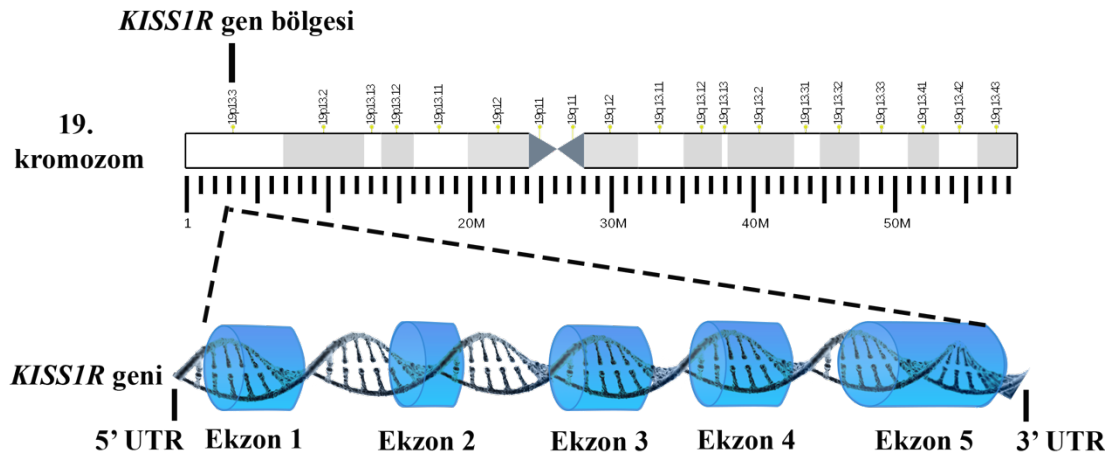
Şekil 2.4. GTEx verilerine göre *KISS1* geninin çeşitli organ ve dokularda ifade edilmiş düzeyi. pTPM; milyon başına protein kodlayıcı transkriptler (Uhlen, vd., (2015)'ten uyarlanmıştır)

2.3.1. *KISS1R* Geni

KISS1 reseptörü (daha önceleri GPR54, AXOR12 veya hOT7T175 olarak biliniyordu), *KISS1R* geninin ürünüdür. *KISS1R*, ilk olarak sıçan beynine ait bir cDNA kütüphanesinden çoklu bağlanma ihtimali bulunan dejenere primer stratejisi kullanımı ile amplifiye edilmiştir. Gen ifadesi sonucu G-proteine bağlı reseptör ailesinin üçüncü ve yedinci transmembran alt birimleri içinde korunmuş dizilere sahip olduğu tespit edilmiştir, fakat asıl fonksiyonu o dönem aydınlatılamamıştır (Lee, vd., 1999). *KISS1*

geninin keşfinden yaklaşık beş yıl sonra üç bağımsız araştırmacı grubu tarafından tanımlanmıştır (Kotani, vd., 2001; Muir, vd., 2001; Ohtaki, vd., 2001).

KISS1R, 19. kromozomda p13.3 bölgesinde lokalizedir (Şekil 2.5). Beş ekzondan oluşur ve 398 amino asitli bir proteini kodlamaktadır (Muir, vd., 2001). Bu protein, transmembran bölgelerdeki yaklaşık %45'lik amino asit özdeşliği oranı ile galanın reseptörleri ile homoloji gösterir fakat, galanın ile fonksiyonel etkileşimi yoktur (Ohtaki, vd., 2001). *KISS1*'in *KISS1R*'ye bağlanması, fosfolipaz C'nin aktivasyonunu sağlar ve bu da fosfatidilinositol 4,5-bifosfat hidrolizine ve ardından inositol-(1,4,5)-trifosfat ile diasilgliserolün birikmesine neden olur. Bu durum kalsiyum iyonunun mobilizasyonu ile sonuçlanır (Constantin, vd., 2009; Liu, vd., 2008; Muir, vd., 2001).

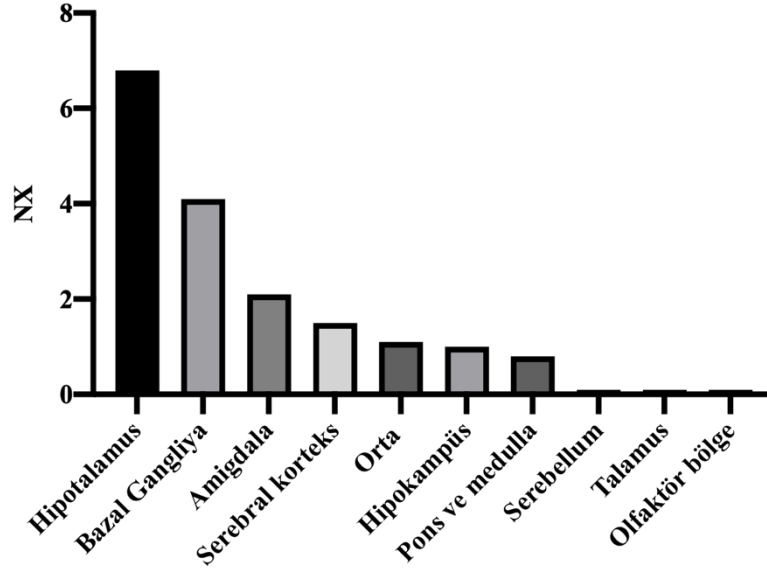


Şekil 2.5. *KISS1R* geninin lokasyonu ve ekzonları (Lee, vd., (1999)'dan uyarlanmıştır)

2.3.1.1. *KISS1R* Geninin İfade Edilişi

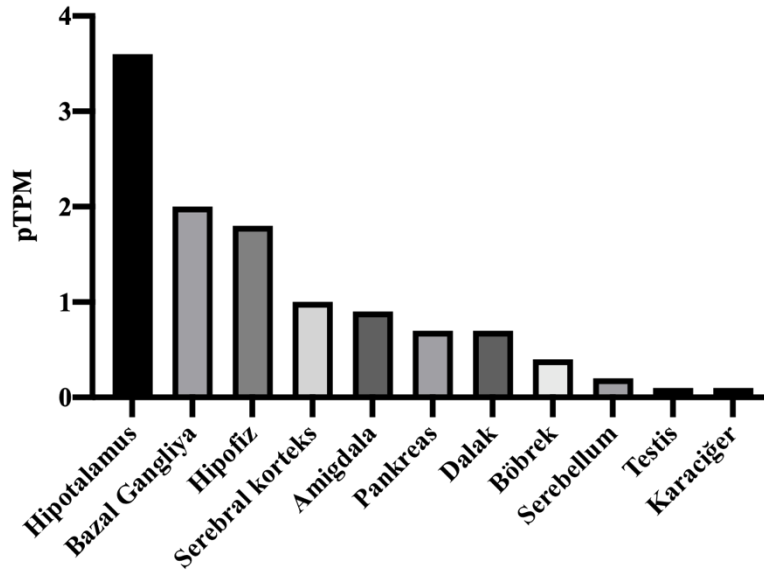
İnsanlarda hipotalamus, bazal gangliya, amigdala, hipofiz, serebral korteks, hipokampus, putamen, singulat girus ve medullada yüksek seviyelerde *KISS1R* mRNA ifadesi tespit edilirken, talamus, pons, kaudat, substantia nigrada da gen ifadesi gözlemlenmiştir (Şekil 2.6) (Clements, vd., 2001; Muir, vd., 2001; Ohtaki, vd., 2001).

KISS1R geninin ifade edildiği doku dağılımı, genin endokrin fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynadığını gösterir ve bu da genin ergenliğin başlangıcında bir rol oynadığı bulgusuyla desteklenir (Seminar, vd., 2003; Kuohung ve Kaiser, 2006; Pineda, vd., 2010).



Şekil 2.6. Gtex verilerine göre *KISS1R* geninin çeşitli beyin bölgelerinde ifade ediliş düzeyi. NX; Konsensus tarafından normalleştirilmiş ifade düzeyi (Uhlen, vd., (2015)'ten yararlanılmıştır)

Genin periferde pankreas ve plasentada yoğun bir şekilde ifade edildiği gözlemlenirken, lökositler, testis, dalak, böbrek, timus, adrenal bezler, karaciğer, lenf nodları ve bazı kan damarlarının düz kas hücrelerinde daha düşük düzeyde ifade edildiği tespit edilmiştir (Şekil 2.7) (Funes, vd., 2003; Mead, vd., 2007; Muir, vd., 2001; Ohtaki, vd., 2001).



Şekil 2.7. GTEX dataset verilerine göre *KISS1R* geninin çeşitli organ ve dokularda ifade ediliş düzeyi. pTPM; milyon başına protein kodlayıcı transkriptler (Uhlen, vd., (2015)'ten yararlanılmıştır)

2.3.2. KISS1/KISS1R Sisteminin Hücre İçi Sinyalizasyon Mekanizmaları

KISS1R'nin karakterizasyonu için yapılan ilk çalışmalar, bu reseptör aracılığı ile aktive edilen hücre içi sinyal yollarının heterolog hücre modellerinde araştırılmasını içeriyordu (Kotani, vd., 2001; Muir, vd., 2001; Ohtaki, vd., 2001). Bilinen en yaygın ikincil habercilerden biri olan sitozolik serbest kalsiyum ($[Ca^{2+}]$), KISS1 öncü peptitinden türetilen farklı peptit ürünlerinin biyolojik aktivitelerini karakterize etmek için araştırmalarda yaygın olarak kullanılmıştır. Bu araştırmalar, tüm KISS1 türevlerinin KISS1R'ye bağlanabildiğini ve bu reseptörü aktifleştirebildiğini göstermiştir. Aynı zamanda, hücre içi depolardan bu mekanizma ile kalsiyum iyonunun salınma mekanizması da aydınlığa kavuşturulmuştur (Castano, vd., 2009).

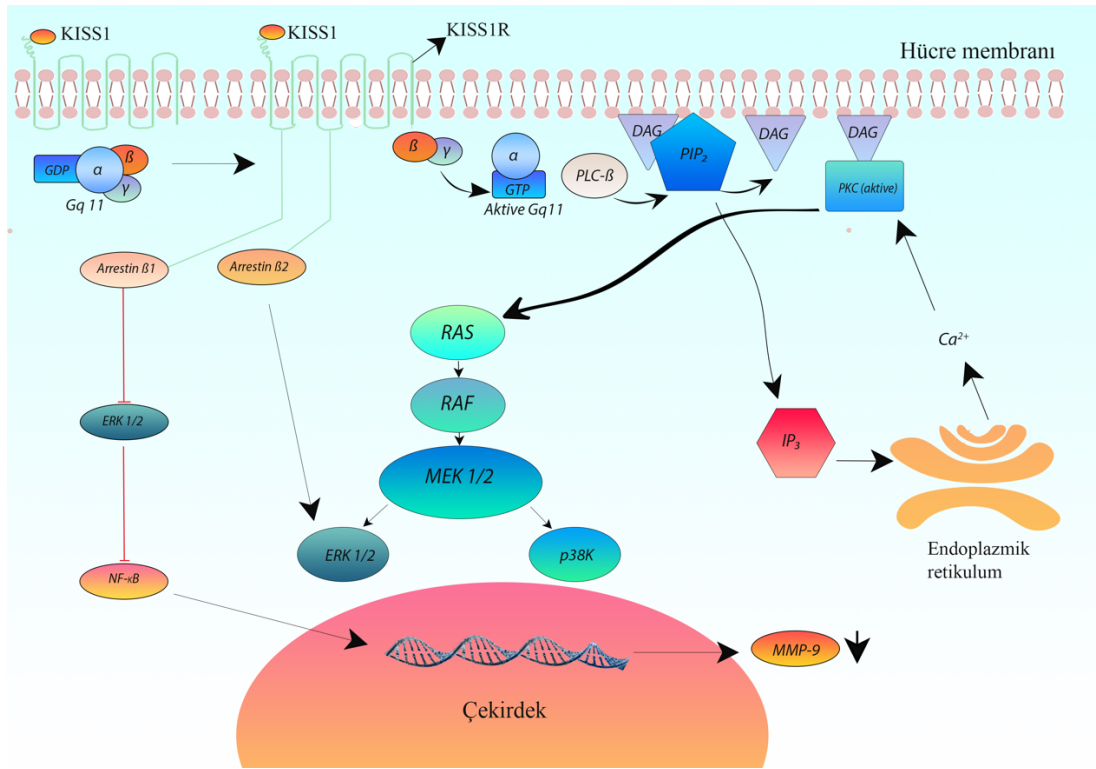
KISS1R, G protein alt birimi olan Gq/11 α 'ya bağlı bir G proteine bağlı reseptördür (GPCR) (Kotani, vd., 2001; Muir, vd., 2001). KISS1, fosfatidil inositol (PI) döngüsünü uyarır (Stafford, vd., 2002). KISS1'in KISS1R'ye bağlanması neticesinde, fosforile olan Gq/11 proteini fosfolipaz C'yi (PLC)- β aktive eder. PLC- β , hücre membranındaki fosfolipid fosfatidil inositol bifosfatın (PIP₂) hidroliz yoluyla inositol-(1,4,5)-trifosfat (IP₃) ve diaçilgliserol (DAG) oluşturmasını sağlar. DAG, daha sonra protein kinaz C (PKC)'yi aktive eder ve IP₃, endoplazmik retikulum zarındaki bir Ca²⁺ kanalı reseptörüne bağlanarak reseptörü etkinleştirir. Sonuç olarak, endoplazmik retikulümdan hücre içine kalsiyum salınır (Kotani, vd., 2001; Muir, vd., 2001; Pampillo, vd., 2009; Ringel, vd., 2002; Stafford, vd., 2002).

Hücre içi kalsiyum sinyal yolağı, gerçekleştiği hücreye bağlı olarak çeşitli farklı işlevleri yerine getirebilen yaygın ve çok yönlü bir ikincil haberci olarak görev yapar. Kalsiyum iyonlarındaki artış, üreme sisteminde hormon salınımını teşvik ederken, kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunun inhibe edilmesine aracılık edebilir (Lamprecht ve Lipkin, 2001; Stafford, vd., 2002).

KISS1, geçici reseptör potansiyeli kanonik (TRPC) benzeri kanalları aktive ederek ve DAG ve/veya Ca²⁺ tarafından aracılık edilen potasyum kanallarının içe doğru akımını inhibe ederek hücre içi kalsiyum seviyesini artırabileceği ve böylece GnRH salgılanmasını uyarabileceği düşünülmektedir (Zhang, vd., 2008).

PLC aktivasyonu ile gerçekleşen kalsiyum sinyal yolağına ek olarak, KISS1R'nin mitojenle aktive olan protein kinazlar (MAPK'lar) yolağı üzerinden de

etkileşim gösterdiği tespit edilmiştir (Tng, 2015). MAPK'lar fosforillenir, böylece β -arrestin ve IP_3 aktive edilir (Oakley, vd., 2009; Tng, 2015). PKC, çeşitli ara ikincil haberciler (Ras, Raf ve MEK1/2 dahil) aracılığıyla hücre dışı sinyal mekanizması ile regüle edilen kinaz (ERK) 1 ve 2'yi fosforile eder. Buna ek olarak KISS1R, β_2 arrestin yoluyla ERK1 ve 2'nin aktivasyonuna neden olabilir. Ayrıca tümör hücrelerinde KISS1R, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve matriks metalloproteinaz 9 (MMP-9)'un inhibisyonuna yol açabilen arrestin β_1 yoluyla ERK1 ve 2'yi inhibe edebilir (Şekil 2.8) (Wahab, vd., 2016).



Şekil 2.8. KISS1'in KISS1R ile olası etkileşim mekanizması (Wahab, vd., (2016)'dan uyarlanmıştır)

2.3.3. KISS1/KISS1R Sisteminin Üreme Üzerine Rolünün Keşfi ve Önemi

KISS1/KISS1R sistemine ait birimler 2001 yılına kadar tanımlanmış olmasına rağmen, üreme sistemine yönelik etkileri 2003 yılının sonuna kadar aydınlatılamamıştı. 2003 yılı içerisinde iki bağımsız araştırmacı grubu, ailesel veya sporadik idiyopatik (veya izole) hipogonadotropik hipogonadizme sahip (IHH), puberte gecikmesi yaşayan, gonadotropin sentezinde problem görülen ve infertilite sorunu yaşayan hasta gruplarında, *KISS1R* gen delesyonlarının ve mutasyonlarının varlığını tespit etmiştir (de Roux, vd., 2003; Seminara, vd., 2003).

Bu çalışmalar, üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde *KISS1* ve *KISS1R* gen ürününün kilit rolüne ışık tutulan ilk çalışmalardır. İnsanlarda tespit edilen bu bulgular üzerine, *KISS1* ve *KISS1R* genlerinin genetik yöntemlerle susturularak oluşturulmuş transgenik hayvan modellerinde daha ileri araştırmalar yürütülmüştür (Colledge, 2009; d'Anglemont de Tassigny, vd., 2007; Garcia-Galiano, vd., 2010). Kısa bir süre içerisinde bu nöroendokrin sistemin moleküler biyolojisi, nöroanatomi, fizyolojisi, farmakolojisi ve patofizyolojisinin temel yönlerinin aydınlatılmasıyla sonuçlanan genetik çalışmalar, *KISS1/KISS1R*'nin üreme fonksiyonları üzerine olan etkisinin altında yatan temel mekanizmaların aydınlatılmasının yolunu açmıştır (Pinilla, vd., 2012).

IHH, otozomal dominant, resesif ve X'e bağlı kalıtım gösterme özellikleriyle genetik olarak heterojen bir karakteristiğe sahiptir. Bu heterojenik özellikler, geçmiş dönemde IHH üzerine yapılacak genetik araştırmalar için zorluklar oluşturmuştur. Deoksiribonükleik asit (DNA) dizileme yöntemleri henüz iyi düzeyde gelişmediği için, hastalığın aktarım mekanizmasının aydınlatılmasında zorluklar yaşanmıştır. Bu güçlüklerin yaşandığı dönemlerde, üç tane birinci dereceden kuzen evliliği bulunan ve beş bireyinde IHH saptanmış olan geniş bir ailenin tespit edilmesi, genom çapında bir taramanın gerçekleştirilmesi ve aktarım modelinin aydınlatılması için araştırmacılara yeterince sağlam bir istatistiksel güç analizi sağlamıştır. 19. Kromozomun p13.3 bölgesinde 1,06-Mb aralıkta, 5,17'lik maksimum iki noktalı olasılık skoru ile aday bağlantı bölgesi tespit edilmiştir (Acierno, vd., 2003).

Aday bölgede, 23 gen ve 49 UniGene kümesi gözlenmiş ve dizi analizi neticesinde o zamanlar çok fazla bilgi sahibi olunmayan *KISS1R* genindeki baz çifti değişiklikleri saptanmıştır. Ekzon 3'teki bir homozigot varyantta (443T → C) 148. pozisyonda (L148S) normalde olması gereken lösin yerine bir serin geçtiği tespit edilmiştir. Bu mutasyon aile içinde mükemmel bir şekilde ayrılmıştır. İlişkili olmayan bir Afro-Amerikan probandında, ekzon 5'in 991. nükleotidinde heterozigot C'den T'ye transisyon [991C → T (R331X)] ve ekzon 5'in 1195. nükleotidinde heterozigot T'den A'ya transversiyon [1195T → A (X399R)] tanımlanmıştır. Bu baz çifti değişiklikleri, tek nükleotid polimorfizm veri tabanlarında veya etnik olarak eşleştirilmiş yüzlerce kontrol veride gözlenmemiştir. Her nükleotid değişikliğini temsil eden mutant yapılar birleştirilmiş ve reseptör fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkileri *in vitro* fonksiyonel deneylerle gösterilmiştir (Seminara, vd., 2003).

KISS1 tümör metastazını inhibe etme kabiliyeti nedeniyle ilk zamanlar metastin olarak adlandırılmıştır. Nicolas de Roux liderliğindeki bir araştırmacı grubu, *KISS1R*'deki büyük bir delesyonu ortaya çıkarmak için kendi içinde melezlenmiş bir ailede aktarım yoluyla bağlantı metodunu kullanmıştır (de Roux, vd., 2003). Eş zamanlı olarak, Paradigm Therapeutics (Cambridge, İngiltere) adlı küçük bir biyoteknoloji şirketi de genetik susturma yöntemleri ile oluşturulmuş *Kiss1r* *-/-* fareler geliştirmiştir. KISS1/KISS1R sisteminin hem farelerde hem de erkeklerde ergenliğin başlangıcında etkin olduğunu tespit etmek için bu iki çalışmanın bulguları beraber değerlendirilmiştir. *Kiss1r* *-/-* farelerde, anormal cinsel olgunlaşma, küçük gonadlar ve IHH gözlenmiştir. Deneklerin fenotiplerinin insan çalışmasıyla benzer fenotipler gösterdiği anlaşılmıştır. Bu farelerin hipotalamuslarında normal özelliklere sahip GnRH nöronların bulunduğu ve *Kiss1r*'deki mutasyonların GnRH nöronal göçünü veya GnRH sentezini etkilemediği, fakat GnRH salınımını etkilediği gösterilmiştir (Seminara ve Crowley, 2008).

2003 sonlarında yayımlanan genetik ve moleküler çalışmalar, üremenin nöroendokrin kontrolünde KISS1R'nin ve bu reseptöre ait ligandlar olan KISS1'in kapsamlı analizinin temelini oluşturmuştur. KISS1/KISS1R ligand ve reseptörleri daha önce tespit edildiği için bu bulguların değerlendirilmesi nispeten kolay olmuş ve böylece bu alanda hızlı bir ilerleme için ihtiyaç duyulacak temel bilgi ve araçlar sağlanmıştır. KISS1/KISS1R sisteminin üreme üzerine rolüne ilişkin ilk çalışmaların hedefleri iki katmanlı olarak belirlenmiştir. Bunlar, *KISS1* geninden ifade edilen peptit ürünlerinin gonadotropin salgılanması üzerindeki etkilerine dair kanıt sağlamak, belirli fizyolojik durumlarda ve deneysel modellerde *KISS1* ve *KISS1R* genlerinin hipotalamik ifade modelini karakterize etmektir. İkinci katmandaki hedefler, her iki genin hipotalamustaki ispatlanmış ifadesine ve *KISS1R* inaktivasyonu ile ilgili insan ve fare modellerinden elde edilen çıkarımsal verilere dayanmaktaydı. 2004 ile 2005'in başları arasında gerçekleştirilen gonadotropin salgılayıcı etkilerle ilgili deneysel hayvanlarda yürütülen çalışmalar, metastin ve KP-10'un LH ve FSH salınımının güçlü birer belirleyicileri olduğunu açıkça göstermiştir (Messenger, vd., 2005). Bu hormonların serbest bırakılmasına yönelik etkiler, peptitlerin hem merkezi (intrasebroventriküler) hem de sistemik (intravenöz, intraperitoneal ve subkutan) uygulamalarından sonra gözlenmiştir (Gottsch, vd., 2004; Irwig, vd., 2004; Matsui, vd., 2004; Navarro, vd., 2004; Shahab, vd., 2005; Thompson, vd., 2004).

Gonadotropik sistemin KISS1'in uyarıcı etkisine duyarlılığı ileri düzeyde hassastır. Sistemik olarak enjekte edilen 0.3 nmol/kg (vücut ağırlığı/kitle indeksine göre 0.1 µg'ye eşdeğer) düzeyinde küçük dozların, sıçanlarda serum LH seviyelerini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Gottsch, vd., 2004; Navarro, vd., 2004; Tovar, vd., 2006). KP-54'ün periferik uygulamasının insanlarda LH sekresyonunu uyardığı kanıtlanmıştır (Dhillon, vd., 2005). KISS1 analiz sonuçlarının meta-analizleri ile glutamat ve galanin benzeri diğer nöropeptitlerin ve nörotransmitterlerin LH salgılama etkinliği üzerine yayımlanmış veriler, KISS1/KISS1R sisteminin GnRH'nin en güçlü uyarıcısı olduğunu göstermektedir (Tena-Sempere, 2006).

2.3.4. KISS1/KISS1R Sistemi ve Puberte'nin Kontrolü

İnsan doğasının ve biyolojisinin en büyük gizemlerinden birisi puberteyi başlatan mekanizmadır. GnRH nöronlarının olgunlaşmasının ve işlev göstermeye başlamasının altında yatan mekanizmalar ile pubertal geçişin temel unsurları olan GnRH sekresyonunun düzenlenmesi hakkında hala çok az şey bilinmektedir. KISS1/KISS1R'nin puberte ve üreme üzerindeki rolünün keşfi, bu protein kompleksinin ele alınmasına yeni bir boyut katmıştır. Pubertenin başlangıcındaki önemli olaylardan birisi, GnRH nöronlarının nörosekretuar aktivitesinin ilerleyen artışıdır. Bu da gonadların gelişimi için GnRH sekresyonunu en yüksek düzeyde uyarır (Ojeda, Lomniczi, vd., 2010; Parent, vd., 2003; Watanabe ve Terasawa, 1989; Wildt, vd., 1980). GnRH salgılama mekanizmasındaki bu tür pubertal değişiklikler, GnRH nöronal ağına trans-sinaptik ve glial girdilerdeki uyumlu değişikliklerin sonucu gelişir (Ojeda, Dubay, vd., 2010; Ojeda, vd., 2008). Bu olgunlaşma olayları esnasında, nöronal iletilicilerdeki GnRH nöronlarına yönelik fonksiyonel ve yapısal değişiklikler, pubertenin nihai tetikleyicileri olarak önem arz etmektedirler. Bu noktada, araştırmalardan elde edilen son bulgular insanlarda pubertenin kontrolünde KISS1'in önemli bir rolünün olduğunu göstermiştir.

Hipotalamik nöronlarda oluşan GnRH, LH ile FSH'ın biyosentezini ve salgılanmasını uyarmak için hipofizeal portal dolaşıma pulsatil bir şekilde salınır (Gharib, vd., 1990). LH ve FSH, gametogenez ve steroid hormon sentezi dahil olmak üzere gonadal fonksiyonları uyarır. Bu nedenle GnRH, üreme olaylarını koordine etmede ana rol oynar. Buna karşılık, GnRH'nin epizodik salınımı, hipotalamus düzeyindeki nörohormonlar ve nörotransmitterler formundaki uyarıcı ve inhibe edici sinyallerle modüle edilir. GnRH salınımı, insanlarda geç fetal ve erken neonatal

gelişim sırasında hipotalamus tarafından gerçekleştirilir. Bu hormonun salınımı, erken çocukluk döneminden puberteye kadar baskılanır. Yeniden aktive olduğu zaman pubertal gelişimi ve üreme organlarının gelişimini başlatır (Grumbach, 2002; Terasawa ve Fernandez, 2001). Pubertenin başlangıcında, GnRH'nin yeniden aktivasyonu için oluşan sinyal kaynağı bilinmemektedir. Hem uyarıcı girdilerin artması hem de inhibe edici sinyallerin azalmasının puberte döneminde meydana geldiği ve bu durumun GnRH nöronlarının yeniden uyarılmasıyla sonuçlandığı varsayılmıştır. KISS1/KISS1R sisteminin, normal pubertal gelişim için gerekli olan önemli bir uyarıcı bileşen olduğu gösterilmiştir. Ancak bu yolağın pubertenin birincil tetikleyicisi olup olmadığı henüz tam olarak bilinmemektedir.

KISS1/KISS1R sisteminin puberte başlangıcının kontrolündeki önemli rolüne dair ilk bulgular, insanlarda ve genetik metotlarla susturulmuş *Kiss1r* $-/-$ genine sahip transgenik farelerle yapılan ilk çalışmalardan elde edilmiştir. Yürütülen ilk araştırmalarda, KISS1/KISS1R sistemindeki bozukluklardan dolayı pubertenin ilerleyişinde problemler ve cinsiyet gelişiminde gözlenen eksiklikler tespit edilmiştir (de Roux, vd., 2003; Seminara, vd., 2003). Genel olarak benzer fenotipik özellikler daha sonra *Kiss1* geninin genetik metotlarda susturulduğu transgenik farelerde de gözlenmiştir (d'Anglemon de Tassigny, vd., 2007). Bu araştırmalar, doğuştan KISS1 veya KISS1R peptitlerinden yoksun hastalarda veya hayvan modellerinde gerçekleştirildiği için, pubertenin tetiklendiği aktivasyon mekanizmalarında KISS1/KISS1R sinyalleşmesinin nasıl rol aldığı kesin olarak aydınlatamamıştır. Çünkü, bu fenotipik özelliklerin *KISS1* veya *KISS1R* genlerinin konjenital inaktivasyonları ile ilişkili olarak daha erken dönemdeki gelişim kusurlarından kaynaklanma ihtimali de bulunmaktadır. Bu sebeple, KISS1/KISS1R'in puberte başlangıcındaki rolünü tam olarak aydınlatmak için daha ileri düzeyde araştırmalara yönelim olmuştur.

KISS1/KISS1R'nin puberte üzerindeki etkisini anlamak için kullanılan KISS1 antagonistleri, muhtemel etki mekanizmalarının incelenmesinde etkili olurken, puberteye geçiş zamanlamasının kontrolünde bu sistemin gerçek fizyolojik etkisini aydınlatmayı mümkün kılmıştır. Bu doğrultuda puberte dönemine yaklaşan dişi sıçanlarda yapılan araştırmalarda, etkili bir KISS1 antagonisti olan peptit-234 puberteden önceki 7 günlük süre boyunca sıçanlara uygulanmış ve sonuç olarak gecikmiş puberte bulgularına ulaşılmıştır (Pineda, vd., 2010). Benzer şekilde

maymunlara uygulanan peptit-234, puberte öncesi ve puberte dönemindeki maymunlarda GnRH salgılanmasını baskılamıştır (Guerriero, vd., 2012). Sıçanlarda peptit-234'ün intraserebral uygulanmasını takiben gözlenen puberte gelişim geriliğine rağmen, LH ve FSH seviyelerinde önemli değişiklikler gözlenmemiştir (Pineda, vd., 2010). Bu bulgu, KISS1/KISS1R sinyalleşmesinin ilk yumurtlamadan önceki pre-pubertal LH mini dalgalanmaları gibi temel uyarıcı olayların oluşumu ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Tüm bu bulgular, KISS1'in pubertal döneme geçişte etkin bir rol oynadığına dair hipotezleri desteklemektedir.

Hayvan çalışmalarından elde edilen bulgulara göre, hipotalamustaki *KISS1* ve *KISS1R* gen ekspresyonu organın gelişim aşamasına göre değişmektedir. Bu sinyalizasyon sistemindeki GnRH nöronlarının pubertal aktivasyonundaki rolünü destekler. Gerçek zamanlı kantitatif polimereaz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) kullanılarak yapılan çalışmalarda, *KISS1* ve *KISS1R* mRNA'larının postnatal gelişim boyunca sıçan hipotalamusunda ifade edildiği tespit edilmiştir. En yüksek ifade düzeyinin hem erkek hem de dişi sıçanlarda puberte döneminde meydana geldiği gösterilmiştir (Navarro, vd., 2004). Bu bulgular, hipotalamustaki KISS1/KISS1R ligand-reseptör sisteminin her iki bileşeninin de puberte döneminde üreme fonksiyonlarının aktivasyonuna ve düzenlenmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Kuohung ve Kaiser, 2006).

KISS1/KISS1R sistemi, pubertal ilerlemeyi indüklemek için manipüle edilebilir. Olgunlaşmamış pre-pubertal dönemdeki dişi sıçanlara KISS1 uygulanması ile erken pubertenin başlatılabilirliği gösterilmiştir (Matsui, vd., 2004; Navarro, vd., 2004). Juvenil dönemdeki rhesus türü maymunlara KISS1 uygulanması, pubertal durumun karakteristik özelliği olan LH salınımını indüklemiş ve daha sonra GnRH antagonisti olan asiklin uygulanması ile bu durum sekteye uğramıştır. Bu bulgular, KISS1'in GnRH salınımını modüle ettiğine dair başka önemli bir bulgudur (Plant, vd., 2006). Bu çalışmaya benzer olarak sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada, KISS1 nöronlarının GnRH nöronlarına doğru aksonal uzantılara sahip olduğu ve puberte başlangıcında GnRH hücre gövdeleriyle yakın konumlanmış olan KISS1 nöronlarının sayısında artış olduğu gösterilmiştir (Clarkson ve Herbison, 2006). İnsanlar üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise, kan dolaşımındaki KISS1 seviyesinin, yetişkinlere kıyasla puberte dönemindeki bireylerde yükseldiği ve en yüksek konsantrasyonun 9 ila 12 yaşları arasında olduğu gözlemlenmiştir (Jayasena, vd., 2014).

Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, KISS1/KISS1R sinyalleşmesindeki artış, pubertal gelişim için tetikleyici bir mekanizmanın önemli bir parçası olabileceğini düşündürmektedir.

2.3.5. KISS1/KISS1R Sisteminin Gonadlar Üzerine Etkisi

KISS1'in gonadlar üzerinde doğrudan etkisi olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Gonadlar üzerinde immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak KISS1R lokalizasyonu gözlemlenmeye çalışılmıştır. Ancak yüksek afiniteye ve özgünlüğe sahip bir antikor ile kesin tespitler hala gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle, KISS1R'nin oldukça spesifik bir antikor ile gonadlar üzerinde immünohistokimyasal lokalizasyonları hakkında doğrulayıcı çalışmalara ihtiyaç vardır. Günümüzde KISS1 ve KISS1R'nin erkek veya kadın cinsel organlarında ifade edilip edilmediğine dair yeterli veri mevcut değildir. KISS1'in kan damarlarında ifade edildiği ve vazokonstriksiyon mekanizmasında bir rolü olduğu bilinmesinden dolayı (Mead, vd., 2007; Sawyer, vd., 2011), penil ereksiyon ve erektil disfonksiyonda muhtemel potansiyel rollerinin hala araştırılmaya ihtiyacı bulunmaktadır.

2.3.5.1. KISS1/KISS1R Sisteminin Dişi Gonadlar Üzerine Etkisi

Kiss1 gen ifadesi sıçan yumurtalıklarında ve yumurta kanallarında, proestrus ve östrusta tepe seviyelerindeyken, metöstrus ve diöstrusta daha düşük seviyelerle döngüye bağlı değişiklikler gösterir (Castellano, vd., 2006; Gaytan, vd., 2007; Shahed ve Young, 2009). Proestrusta *Kiss1* ifade düzeyindeki artış, luteinize edici hormon salgılayan hormon (LHRH) antagonistlerinin uygulanmasıyla azaltılmış ve sonra insan koryonik gonadotropini (hCG) uygulaması ile normale döndürülmüştür (Castellano, vd., 2006). Sıçanlar üzerinde yürütülen bir araştırmada, ovaryumun teka folikül tabakasında, corpora luteada, interstisyel bölgede ve granüloza kökenli steroidojenik hücrelerin sitoplazmasında KISS1 immünoaktivitesi tanımlanmıştır. Bu da KISS1'in korpora lutea oluşumu ve/veya gerilemesi sırasında dokunun yeniden şekillenmesinde ve steroidojenik luteal hücrelerin hormon sekresyonunda potansiyel rol oynadığını göstermektedir (Castellano, vd., 2006). Bu bulgular, ovulasyonun düzenlenmesinde KISS1'in ovaryum üzerindeki lokal etkilerini göstermektedir. *Kiss1* geni, sıçan tuba uterinasının istmusunda yüksek, proksimal ampullasında orta düzeyde ve infundibulum ile interstisyel kısımda düşük düzeyde ifade edilerek, her bölgede ayrı bir dağılım göstermektedir (Gaytan, vd., 2007). Bu dağılım şekli insanlarla karşılaştırıldığında, sıçanlarda son derece düşük ektopik tubal gebelik sıklığına katkıda

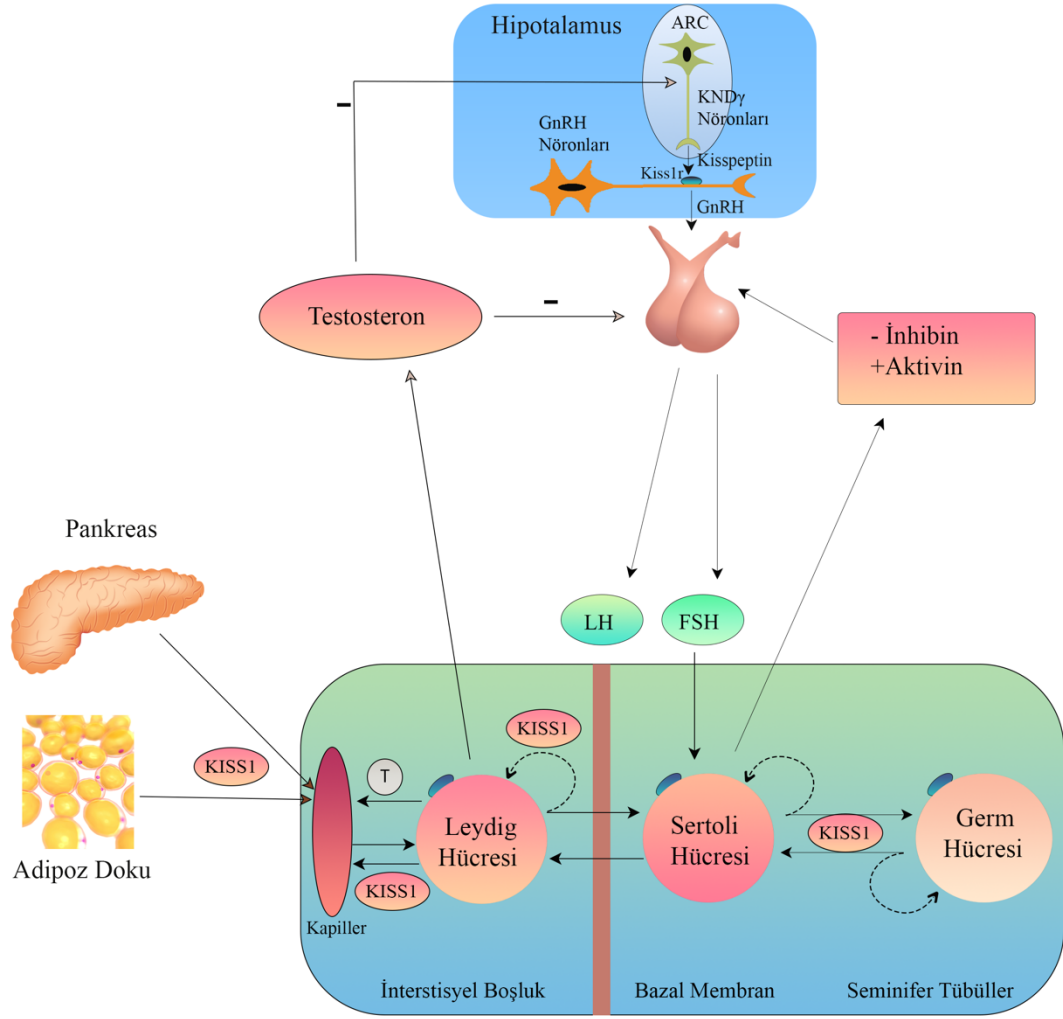
bulunabilecek embriyo-epitel etkileşimlerinin koordinasyonunda KISS1'in potansiyel rolünü göstermektedir (Corpa, 2006).

2.3.5.2. KISS1/KISS1R Sisteminin Erkek Gonadlar Üzerine Etkisi

Testis, spermatogenezin meydana geldiği seminifer tübüllerden ve interstisyel alandan meydana gelmektedir. İnterstisyel bölmede bulunan Leydig hücrelerinin ana fizyolojik işlevi, LH ve hCG tarafından gelen uyarıya yanıt olarak testosteron üretiminin sağlanmasıdır. Yapılan çalışmalar testiste KISS1'in HPG aksının modülasyonu yoluyla sergilediği etkilere ek olarak, gonadlar üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir (Papaoiconomou, vd., 2011). Bununla birlikte testiste KISS1-KISS1R sinyalinin fonksiyonel önemi hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Farklı türlerde yapılan çalışmalarda testiste KISS1-KISS1R sinyalleşmesinin rolü ile ilişkili zıt gözlemler yayımlanmıştır. Yetişkin erkek sıçanlarda KISS1'in subkutan yolla uygulanması, testis ağırlığında önemli bir azalmaya, germ ve Sertoli hücrelerinin kaybı ile seminifer tübüllerin dejenerasyonuna, ayrıca testis kaynaklı inhibin B hormonunun dolaşımdaki seviyesinde önemli bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.9). Bu dejenerasyon, LHRH agonistlerinin (Rajfer, vd., 1984; van Kroonenburgh, vd., 1986) sürekli uygulanmasından sonra gözlemlenen dejenerasyona benzer özellikler göstermiş ve KISS1'in doğrudan testis üzerine etki edebileceğine dair varsayımları desteklemiştir (Thompson, vd., 2006).

Yetişkin erkek rhesus maymununlara eksojen KP-10 uygulamasının, hem testosteron hem de LH salınımını büyük ölçüde uyardığı gözlenmiştir (Shahab, vd., 2005). GnRH reseptör antagonisti olan asilin uygulamasının, KISS1'in testosteron üzerindeki etkisini bloke ettiği ve bu koşullar altında hCG'nin testosteron salgılanmasını uyarmaya devam edebildiği gösterilmiştir. Çalışmada, hCG ve KISS1 uygulanan maymunlarda, hCG ve salin uygulanan maymunlara kıyasla sistemik testosteron konsantrasyonunda %76'lık bir artış gözlenmiştir. KISS1 uygulamasının, sistemik testosteron seviyelerinin LH stimülasyonuna verdiği yanıtın yüksek doz KISS1 (400 µg/d) infüzyonu sırasında sürekli olarak arttığı gösterilmiştir (Irfan, vd., 2014). KISS1R antagonisti olan peptit-234'ün intravenöz enjeksiyonu ise, yetişkin rhesus maymunlarda sistemik testosteron seviyelerini değiştirmemiştir. Bu sonuçlar, KISS1'in testosteron salınımı üzerinde daha spesifik bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir (Huma, vd., 2014).



Şekil 2.9. KISS1'in testiste olası etkileşim mekanizması (Wahab, vd., (2016)'dan uyarlanmıştır)

KISS1R geninin dördüncü eksonunda c.667T> C (C223R) mutasyonuna sahip olan ve fenotipik olarak küçük penisi ve testisleri olan genç bir erkek çocuk üzerinde yapılan bir araştırmada, KISS1/KISS1R sisteminin testis fonksiyonları üzerinde doğrudan etkileri araştırılmıştır. Mutasyon nedeniyle, hCG uygulamasına karşı testosteron seviyesinde azalma gözlenmiş ve testiküler organizasyonda bozukluklar saptanmıştır (Semple, vd., 2005). Bu gözlemler birlikte değerlendirildiğinde, KISS1'in testis içi steroidogenezde işlevsel bir rol oynadığı düşünülmektedir. KISS1 ve KISS1R'nin maymun testisi Sertoli hücrelerinde lokalize olduğu gösterilmiş (Tariq, vd., 2013), fakat Leydig hücrelerinde tanımlanamamıştır (Mei, vd., 2013). Bu nedenle, KISS1'in primatlarda testosteron salgılanmasını uyardığı kesin mekanizma hala belirsizdir. Sertoli-Leydig hücre sinyalizasyonuna katılabilecek potansiyel otokrin-parakrin döngülerinin araştırılması gerekmektedir (Wahab, vd., 2016).

Farelerde yürütülen araştırmalarda ise hem germ hücrelerinde hem de Sertoli hücrelerinde KISS1 ifadesi gözlenmemiş ve testiste *Kiss1* gen ifade seviyesinin göreceli olarak diğer dokulardan daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Farelerde testiküler *Kiss1* mRNA ve peptit seviyelerinin postnatal gelişim sırasında arttığı, puberte başlangıcında zirveye ulaştığı ve Leydig hücrelerinde KISS1 seviyelerinin LH tarafından düzenlendiği gösterilmiştir. Gonadların çıkarılması neticesinde LH'da yükselme ve sistemik KISS1 seviyesinde düşüş gözlenmiştir. Bu durumun testiküler Leydig hücrelerindeki KISS1'in sistemik KISS1 seviyesine katkıda bulunabileceği çıkarımında bulunulmuştur (Salehi, vd., 2015). Benzer şekilde, astenozoospermi, azoospermi, oligozoospermi, normozoospermi, asthenoteratozoospermi, oligoastenozoospermi ve oligoasthenoteratozoospermi kategorilerinde değerlendirilen infertil erkeklerde, normal fertil erkeklere kıyasla plazma KISS1 seviyelerinde ve LH seviyelerinde ciddi bir düşüş tespit edilmiştir (Ramzan, vd., 2015).

2.3.6. KISS1/KISS1R Sisteminin Sperm Fonksiyonları Üzerine Etkisi

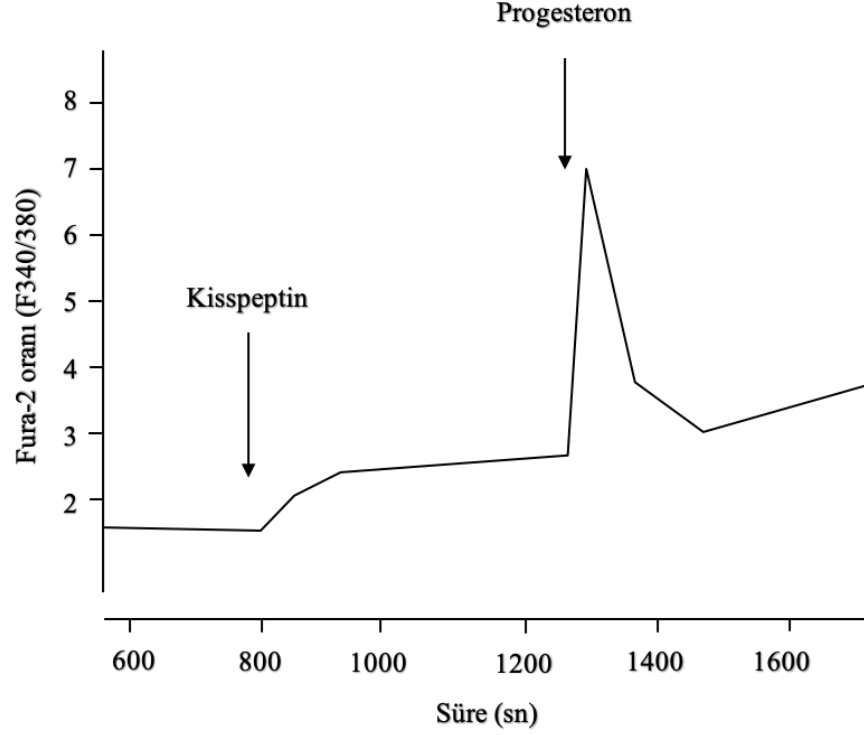
Sperm hareketliliği doğal üreme için gereklidir. Sperm, farklı işlevsel durumlarda farklı hareketlilik modelleri gösterir. Başlangıçta, sperm hücreleri dişi üreme yolu boyunca yüzme ve taşıma için gerekli olan düzenli ve doğrusal yörüngelerle ilerleyen bir hareketlilik geliştirir (Mortimer, 1997; Subiran, vd., 2008; Turner, 2006). Sperm hücreleri yumurta kanalına ulaştığında, oositi bulmak ve onunla kaynaşmak için hiperaktif bir motilite geliştirir (Chang ve Suarez, 2010; Suarez ve Pacey, 2006). Daha önceki çalışmalarda, KISS1'in tuba uterinada bulunduğu ve hücrel lümen yüzeyinde yoğun olduğu gösterilmiştir (Gaytan, vd., 2007). Bu bulgulardan yola çıkılarak, KISS1'in sperm hiperaktivasyonu ve oosit fertilizasyonu gibi tuba uterinada meydana gelen bazı önemli olaylarda etkinlik gösterebileceği öngörülebilir (Chang ve Suarez, 2010; Visconti, 2009)

İnsanlar da dahil olmak üzere birçok türde testisin tübüler bölümünde yerleşim gösteren Sertoli hücrelerinde ve ayrıca spermatositler, spermatidler ve spermiler dahil olmak üzere çeşitli germ hücrelerinde hem KISS1 hem de KISS1R protein ifadesi tespit edilmiştir (Hsu, vd., 2014; Mei, vd., 2013; Pinto, vd., 2012). Bu durum KISS1/KISS1R sisteminin, spermatogenezde doğrudan otokrin veya parakrin rolü olduğunu düşündürmektedir. Sertoli hücre aktivasyonun düzenlenmesi yoluyla KISS1/KISS1R sisteminin spermatogenezde rol oynamasın mümkün olabileceği ileri sürülmüştür (Wahab, vd., 2016). Bu kapsamda yapılan araştırmalarda, KISS1'in

sperm hareketliliği ve fertilizasyon kapasitesinin regülasyonunda etkisi olduğu gösterilmiştir (Pinto, vd., 2012). İnsan sperminde KISS1 karakterizasyonunun yapıldığı çalışmalarda, KISS1 ve KISS1R'nin sperm baş bölgesinde, boyun çevresinde ve kuyruk orta kısmında bulunduğu bildirilmiştir (Pinto, vd., 2012). Sperm hücresi içinde kalsiyum değişimini tespit etmek için yapılan spektrofotometrik analizler ve konfokal mikroskopla görüntülemeler neticesinde, KISS1 uygulamasının hücre içi kalsiyum iyonunu arttırdığı, spermin progresif hareketliliğini tetiklediği ve hipermotil faza geçişte etkili olduğu gösterilmiştir (Pinto, vd., 2012).

KISS1 ve KISS1R'nin olgun insan sperminde spesifik hücresel dağılımının gösterdiği bu çalışmada hem KISS1 hem de KISS1R için en güçlü immünofloresan boyanma, oosit-sperm füzyonunda önemli bir role sahip bir bölge olan ekvatorial segmentte bulunmuştur (Bedford, vd., 1979; Flesch ve Gadella, 2000). Buna ek olarak, flagellar aktivitenin düzenlenmesinde önemli bir rolü olan sperm boyun çevresinde ve enerji gereksiniminin, kalsiyum depolarının ve hareketin kontrolünde önemli rolü olan orta bölgede de KISS1 ve KISS1R'nin lokalize olduğu gösterilmiştir (Bedu-Addo, vd., 2008; Publicover, vd., 2008; Suarez ve Pacey, 2006).

Kalsiyum sinyalleşmesi, birçok farklı sperm fonksiyonunun kontrolünde merkezi bir rol oynar (Darszon, Acevedo, vd., 2006; Publicover, vd., 2008; Rossato, vd., 2001). 1µM-10µM dozunda KP-13, sperm hücre içi kalsiyumunda kademeli bir artışı tetikleyerek 3-6 dakika içinde kalsiyum seviyesini platoya ulaştırmıştır. Bunun sonucu olarak sperm progresif motilitesinin yükselişe geçtiği gözlenmiştir. Aynı çalışmada, örneklere progesteron uygulanması neticesinde sperm hücrelerinin progresif motiliteden hipermotil hale geçtiği gözlenmiştir. Bu bulgu, KISS1 ve progesteronun farklı mekanizmaları tetikleyerek hücre içi kalsiyumu artırdığını göstermektedir (Şekil 2.10). KP-13'ün sperm motilitesi ve hiperaktivasyonu üzerindeki etkileri, KISS1R antagonisti peptit-234 tarafından bloke edilmiş ve sperm motilitesinde düşüş gözlenmiştir. KP-13'ün akrozom reaksiyonu üzerinde hiçbir etkisi gözlenmemiştir (Pinto, vd., 2012). Tüm bu gözlemlerin sadece normozospermik bireylerde yapılmış olması, KISS1'in infertilite problemi yaşayan erkeklerde nasıl bir etki göstereceğine dair soru işaretleri doğurmuştur.



Şekil 2.10. KP-13 (10 μm) ve progesteronun (1 μm) Fura-2 yüklü insan spermünde hücre içi serbest Ca^{2+} seviyeleri üzerine etkileri. X eksenini zamanı saniye cinsinden göstermektedir. Y eksenini, F 340/380 oranı ile ifade edilen Ca^{2+} verilerini gösterir (Grafik Pinto, vd., (2012)'den uyarlanmıştır)

Bugüne dek infertil hastalara ait örneklerde, KISS1'in sperm motilitesi üzerine etkisini hangi yollar üzerinde gösterdiğine dair belirgin bir bulgu literatür ile paylaşılmamıştır. Bir çalışmada, biyokimyasal yöntemler ile seminal plazmadaki KISS1 ifade düzeyi ve kan örneklerindeki total KISS1 seviyesinin, total sperm sayısı, sperm konsantrasyonu ve total motil sperm sayısı ile ilişkili olabileceğine dair bulgular paylaşılmıştır. Bu çalışma, üniversitede öğrenim gören ve henüz evlenmemiş 18-23 yaş arası genç erkek olgulardan alınan örnekler ile gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple, infertilite tanısı konan erkek olgulara ait seminal sıvıda KISS1 düzeyleri hakkında aydınlatıcı bir bulgu sunulamamıştır (Zou, vd., 2019). İnfertil erkek hastalardan oluşan bir başka çalışmada ise gönüllülerden alınan kan örneklerinde serum KISS1 seviyesi araştırılmış ve kontrol grubundaki sağlıklı olguların örneklerine kıyasla infertil gruplarda KISS1 seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olduğu gösterilmiştir (Ramzan, vd., 2015). Bu çalışma, infertilite tanısı konmuş erkek olgularda serum KISS1 seviyesinin, sperm parametrelerinde gözlenen farklılıklar ile ilişkisini biyokimyasal yöntemler ile ortaya çıkaran ilk çalışmadır. Fakat, çalışma bulguları dikkatle analiz edildiği zaman, sağlıklı kontrol grubuna ait paylaşılan serum KISS1 değerlerinin literatürde paylaşılan benzer parametrelerden çok daha yüksek

olduğu gözlenmiştir (Jayasena, vd., 2014; Kavvasoglu, vd., 2012; Kaya, vd., 2015). Bu sonuçlar, infertil gruplarda ölçülen KISS1 değerlerinin tekrar analiz edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır. Bu çalışmalar içerisinde, infertil grupların incelendiği tek çalışma Ramzan, vd., (2015)'te sunulan bulgulardır. Bu çalışmaya ait bulgular dikkatle incelendiğinde, biyokimyasal verilerin diğer çalışmalarda sunulan biyokimyasal verilerden çok büyük farklılıklar gösterdiği gözlenmektedir.

Sperm motilitesini değerlendirebilmenin en önemli parametrelerinden birisi de hücre içi kalsiyum sinyal mekanizmasının/yolaklarının anlaşılabilmesidir. Sperm kapasitasyon aşamasında ve fertilizasyonun başarısında kalsiyum kanallarının etkinliği ile kalsiyum sinyal yolları önemli rol oynar. Spermde, sperm katyon kanalı (CatSper) yoluyla hücre içi kalsiyum miktarının artması neticesinde kapasitasyon, motilitenin hiperaktivasyonu ve akrozom reaksiyonunun tetiklenmesi gerçekleşir (Hildebrand, vd., 2010). KISS1'in *CATSPER1* gen ekspresyonu üzerine olası etkisine dair literatürde herhangi bir bulgu bugüne dek paylaşılmamıştır. A-kinaz ankor proteini (AKAP) ise, sperm hareketinde rol aldığı bilinen sperm fibröz kılıfın ana bileşenlerinden (~%50) birisidir ve spermin hareketliliğine etki eder (Ben-Navi, vd., 2016). AKAP4 yokluğunda, sinyal iletimi gerçekleşmediği ve glikolitik enzimler fibroz kılıf ile etkileşime giremedikleri için sperm motilitesi olumsuz yönde etkilenir (Miki, vd., 2002). Eş zamanlı hücre içi kalsiyum görüntülemesi yapılan GnRH nöronlarında, KISS1'in hücre içi kalsiyum seviyelerinde ~%10 düzeyinde artışa neden olduğu ve sonrasında kalsiyum seviyesinin yavaş yavaş azalarak test öncesi seviyelerine geri döndüğü gösterilmiştir (Liu, vd., 2008).

Yukarıda da bahsedildiği üzere, KISS1'in sperm motilitesi üzerine belirgin etkileri söz konusudur. Fakat bu etkilerin hangi mekanizma veya yolak ile gerçekleştirildiği bilinmemektedir. KISS1'in hipokampal nöronlarda kalsiyum depolarizasyonuna neden olduğu gösterilen çalışma baz alınarak (Liu, vd., 2008) ve Pinto, vd., (2012)'nin verilerinden yola çıkılarak, çalışmamızda KISS1'in sperm motilitesini hangi yollarla/yolaklarla/mekanizmalarla nasıl sağladığı sorusu üzerinde odaklanılmıştır. KISS1-kalsiyum kanalı etkileşimi ya da KISS1-sperm fibröz kılıfı arasındaki olası bir ilişki, KISS1'in motilite üzerindeki etkisini aydınlatmaya yönelik bir bulgunun ortaya konmasını sağlayabilecektir. Literatür taraması neticesinde, bugüne dek yapılan çalışmalarda infertilite tanısı alan erkek hastalara ait örneklerde KISS1'in sperm motilitesi ile ilişkili genler üzerindeki etkisini gösteren bir bulgu

paylaşılmamıştır. KISS1'in sperm motilitesi üzerine olası etkilerinin hangi yollarla gerçekleştiğinin incelenmesi, hem literatürdeki bu eksikliğin doldurulması hem de KISS1'in infertil erkek olgularda tedavi amaçlı kullanımının aydınlatılması açısından önem arz edeceği düşünülmüştür.

Literatürde yer alan çalışmalarda ya sağlıklı erkek olgulara ait örnekler değerlendirilmiş, ya da infertil erkek gruplarında sadece seminal sıvı veya serum örneklerinde KISS1 düzeyinin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar arasında Pinto, vd., (2012)'nin araştırması, KISS1'in sperm motilitesine dönük etkilerini inceleyen tek çalışmadır (Pinto, vd., 2012). Çalışmamızda, KISS1'in motilite üzerine etkisini hangi yollarla gösterdiği aydınlatılmak istenmektedir. Pinto, vd., (2012)'nin çalışması doza yönelik gerçekleştirilmiş bir çalışma olduğu için, bu çalışma verilerinden yola çıkarak optimum dozda KISS1 türevinin kullanılması planlanmıştır. Tüm bu deneysel çalışmalara rağmen, infertil erkek olgulara ait sperm örneklerinde *KISS1* ve *KISS1R* gen ifadelerini ve motilite ile ilişkili gen parametrelerini bütünlük içerisinde analiz eden bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Buna ek olarak, KISS1'in kalsiyum kanalları üzerine olası etkilerinin araştırılması, KISS1 ve motilite ilişkisinin aydınlatılması noktasında önemli bir bulgu sağlayabilir. Dolayısıyla, önemli bir sağlık sorunu ve sosyal bir problem olan erkek infertilitesinde, KISS1'in sperm motilitesi üzerine olası etkilerinin aydınlatılması alternatif infertilite tedavi yaklaşımlarının gelişimine imkân sağlayabilir.

2.4. Erkek İnfertilitesi

Çiftlerin çoğu (yaklaşık %85'i), birlikteliklerinin ilk on iki ayında doğal yollarla büyük ölçüde çocuk sahibi olma isteklerini gerçekleştirebilmektedir. Ne var ki kısırlık tanısı alan diğer %15'lik popülasyon ise, çeşitli tedavi yöntemleri ile gebe kalmaya çalışmaktadır. Sperm sayısındaki düşüklük, sperm hareketliliğinin zayıflığı ve spermde şekilsel bozuklukların bulunması doğal yolla gebelik elde edilmesini zorlaştıran faktörler arasındadır.

Erkek infertilitesi, testislerde spermin hiç bulunmamasından sperm kalitesinde belirgin değişikliklere kadar oldukça heterojen fenotipik özelliklere sahip çok faktörlü bir patolojik durumdur (Tournaye, vd., 2017). Erkek faktörü, çiftlerin % 20-70'inde tamamen veya kısmen infertilitenin nedenidir (Agarwal, vd., 2015). Sperm parametrelerinin analizi, erkeklerin potansiyel doğurganlığını tahmin etmek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), semen analizi yapan

çoğu laboratuvar tarafından kullanılan ve normal doğurganlık için referans değerleri içeren insan semen değerlendirmesine yönelik standart bir yöntem yayımlamıştır (WHO, 2010).

Semen analizi neticesinde, fertilité problemi yaşıyan bir erkekte, oligozoospermi (azalmış sperm sayısı), teratozoospermi (anormal sperm), astenozoospermi (azalmış sperm hareketliliği), oligoteratozoospermi (hem anormal yapıda hem de azalmış sperm sayısı), oligoastenoteratozoospermi (hem anormal yapıda hem de azalmış sperm sayısı hem de azalmış sperm hareketliliği) sendromu adı verilen durumlar ortaya çıkabilir (Ahmed, vd., 2011).

Oligozoospermi erkek kısırlığında yaygın olarak görülen bir bulgudur. Düşük sperm konsantrasyonuna sahip bireylere ait semende, sperm morfolojisi ve sperm hareketliliği (oligoastenoteratozoospermi) gibi önemli anormallikler birlikte gözlenebilir (Grimes ve Lopez, 2007). Uzun yıllar boyunca, 20 milyon sperm/ml'den düşük sperm konsantrasyonları oligozoospermik olarak kabul edilmiştir. Ancak son yıllarda DSÖ tarafından güncellenen sperm kriterlerine göre oligozoospermi için 15 milyon sperm/ml'den düşük olan değerler referans noktası olarak kabul edilmektedir (WHO, 2010). Oligozoospermi genellikle, hafif (10 milyon-15 milyon sperm/mL), orta (5 milyon-10 milyon sperm/mL) ve ciddi (5 milyon sperm/mL) olmak üzere 3 kategoride değerlendirilir (WHO, 2010).

Teratozoospermi, erkeklerde fertilitéyi etkileyen anormal morfolojiye sahip sperm varlığı ile karakterize bir durumdur. Teratozoospermi gelişim nedenleri tam olarak bilinmemektedir. Genetik yatkınlığı olan bazı hastalıklarla beraber, yaşam tarzı ve alışkanlıklar (beslenme, alkol-sigara tüketimi, çalışma koşulları, kimyasal maruziyet) sperm morfolojinin bozulmasına sebep olabilir. Teratozoospermi tanısında bilinen anormallikler, sperm başının büyük, küçük, sivri veya piriform olması ve anormal şekillere sahip kuyrukların gözlenmesidir (Pukazhenti, vd., 2001).

Astenozoospermi terimi, sperm hareketliliğinin azalmasını ifade etmek için kullanılmaktadır. Erkeklerde görülme sıklığı 1/5000'dir (Ortega, vd., 2011). Astenozoospermi oluşum nedenleri arasında metabolik problemler, sperm flagellumundaki yapısal bozukluklar ve nekrozoospermi yer alır (Ortega, vd., 2011). Astenozoospermi, sperm kalitesini büyük ölçüde düşürür ve erkeklerde kısırlığın başlıca nedenleri arasındadır. Bu kategoride yer alan erkeklere ait sperm örneklerinde, sperm DNA fragmantasyon düzeyi oligozoospermi veya teratozoospermili erkeklere

göre daha yüksektir (Belloc, vd., 2014). Şiddetli astenozoospermi, sperm hücresinin oosite ulaşamamasından kaynaklanan erkek kısırlığının nedenlerinden biridir (Chemes ve Sedo, 2012).

2.5. Sperm Yapısı ve Semen

İnsan spermi, baş ve kuyruk olmak üzere iki ana yapıdan oluşur. Baş kısmı, çekirdek ve akrozomdan oluşurken, kuyruk kısmı spermin hareketliliğini sağlayan ve bağlantı parçası, orta parça, ana parça ve uç parça olmak üzere dört ana kısımdan oluşur. Akrozom reaksiyonu neticesinde, sperm baş bölgesinde bulunan akrozom bütünlüğü bozulur ve aktarılabacak genetik materyali içeren sperm çekirdeği içeriği oositin zona pellusidasının sindirilmesini müteakiben yumurta içerisine salınır (Turner, 2006).

2.5.1. Sperm Başı

Genel olarak normal bir insan spermi, pürüzsüz bir şekle, açıkça görülebilen ve iyi tanımlanmış bir akrozoma sahip oval bir baş yapısına sahiptir. Sperm başı yaklaşık olarak 4-5 µm uzunluğunda, eni 2-3 µm aralığında ve 1,5-2 µm kalınlığındadır. Sperm başı akrozomun bulunduğu ön bölge ve akrozom sonrası olan arka bölgeye sahiptir. Ön bölgenin %40-60'ını akrozom kaplar (El-Ghobashy ve West, 2003). Sperm başında bulunan çekirdek çok yoğun bir yapıya sahiptir. Çekirdek, stabiliteyi sağlamak ve DNA hasarına karşı koruma sağlamak için DNA'ya bağlı histonların büyük ölçüde disülfür bağları oluşturan pozitif yüklü protaminlerle değiştirildiği yüksek derecede yoğunlaşmış kromatinden oluşmaktadır (Barratt, vd., 2010).

Akrozom, akrozom reaksiyonuna girecek olan büyük bir anterior akrozom veya ön bölge ve akrozom reaksiyonuna katılmayan posterior akrozom olmak üzere iki ayrı bölmeden oluşmaktadır (Toshimori, 2009). Akrozom, içerisinde füzyon esnasında rol alacak enzimatik etkinliğe sahip birçok proteini içeren Golgi cisimciği'nden türetilmiş başlık benzeri dar kesecik görünümünde bir yapıdır. Plazma membranının hemen altında yer alır ve nükleer çekirdek zarı ile yakın konumdadır. Ekvatorial bölge, fertilizasyon sırasında sperm ile oosit arasında füzyonun başladığı bölge olduğundan, akrozom reaksiyonunun tamamlanmasından sonra bozulmadan kalmaktadır. Akrozom, kapasitasyon sırasında kendisini akrozom reaksiyonuna girmeye hazırlayan değişikliklere uğrar (Yanagimachi, 2011). Post akrozomal kılıf, sperm başının posterior kısmın %35-40'ının çoğunu saran geniş bir kemer benzeri yapıdır. Bu kısım

spermin oolemmaya ilk olarak bağlandığı yer olduğundan, fertilizasyon sırasında oldukça önem taşıyan bir yapıdır (Bearer ve Friend, 1990). Post akrozomal kılıfın arka tarafı, spermi baş ve kuyruk bölmelerine ayıran işlevsel bir bağlantı bölgesi görevi gören arka halka olarak tanımlanır (Gadella, 2008). Bu yapının, sperm hiperaktivasyonu için önemli bir kalsiyum deposu olabileceği öne sürülmüştür (Chang ve Suarez, 2010; Olson, Fauci, vd., 2011; Olson, Suarez, vd., 2011).

2.5.2. Sperm Kuyruğu

Sperm hareketi kuyruk kısmı tarafından sağlanır. Sperm kuyruğu esas olarak dört parçadan meydana gelmektedir ve yaklaşık olarak 40-50 µm uzunluğundadır. Boyun bölgesi olarak adlandırılan bağlantı parçası sperm kuyruğunu sperm başına bağlar ve bazal plaka ile sperm başından ayrılır. Bu bölgede az miktarda mitokondri bulunmaktadır. Orta parça yoğun mitokondri içerir. Ana parça, orta parçadan anulus denilen bir yapı ile ayrılır ve fibröz kılıf ile çevrilidir. Sperm kuyruğunun en uzun bölümünü oluşturur. Ana parça ve uç parça ise sperm hareketliliğini sağlar. Uç parça, plazmalemma ile sarılı olup, aksonemi oluşturan tübüler yapılardan meydana gelmektedir (Mortimer, 2018). Sperm kuyruğunun ana iskeleti aksonemden meydana gelir ve bu yapı spermin mekanik olarak hareketliliğinin sağlanmasını gerçekleştirir (Inaba, 2003).

Normal bir spermde aksonem, birbirlerine neksin bağlantıları ile bağlı dokuz mikrotübül çifti ve radyal uzantılarla bağlandıkları bir merkezi çift olmak üzere 9+2'li silindirik bir yapı oluşturur. Her tübül çifti bir diğerine iç ve dış dynein uzantıları ile bağlanırken, dynein uzantıları bir mikrotübül çiftinin bitişiğindekiyle ilişkili olarak kaymasını teşvik ederek hareketlilik için anahtar bir rol üstlenir. Dynein proteinlerinin senkronik hareketi, spermin flagellar atma modelini oluşturur. Merkezi mikrotübül çifti ise, birbirine çapraz bir şekilde bağlanmış liflerden oluşur. Radyal uzantılarla bağlandıkları dokuz çift mikrotübülün mükemmel bir daire içinde konumlandırılmasını ve aralanmasını sağlar (Inaba, 2003; Turner, 2006). Adenozin trifosfat (ATP) varlığında dynein moleküllerinin hareketleri başlar ve mikrotübül çiftlerini harekete geçirir. Fakat, sperm kuyruğundaki mikrotübüllerin bağlantı parçasına sabitlenmiş olması nedeniyle mikrotübüllerin hareketi dirençle karşılaşır ve bu dirençle kuyruğun bükülmesi gerçekleşir. Dynein moleküllerinin senkronik olarak bağlanıp ayrılmasıyla, sperm kuyruğunda dalga formu hareketi ve dolayısıyla hareketlilik meydana gelir (Lindemann ve Lesich, 2010).

Memeli sperminde, aksonem ve plazma zarı arasında, mitokondriyal kılıf, dış yoğun lifler ve fibröz kılıf gibi birkaç ek yapı bulunmaktadır. Orta parçada, aksonem dış yoğun lifler ve mitokondriyal kılıfla çevriliyken, ana parçada aksonem dış yoğun lifler ve fibröz kılıfla çevrilidir. Uç parçanın aksonem ile plazma zarı arasında hiçbir ek yapı bulunmamaktadır (Inaba, 2003; Turner, 2006). Mitokondriyal kılıf, aksonemin etrafında heliks tarzda dizilmiş 100 kadar mitokondriden oluşur (Fawcett, 1975). Aksonem mikrotübül çiftlerinin üzerinde bulunan dıştaki yoğun lifler, taç yaprağına benzer bir şekle sahiptir ve ana parçanın tabanından uç kısmına doğru çapları azalır (Mortimer, 2018; Pesch ve Bergmann, 2006). Bu lifler, kuyruğun pasif elastik yapısının korunmasından ve dalgalı hareketin sağlanmasından sorumludur (Petersen, vd., 1999). Ana parçada bulunan fibroz kılıf, kuyruk hareketine esneklik, şekil ve düzlem kazandırır (Eddy, vd., 2003). Ayrıca hareketliliği, kapasitasyonu ve hiperaktivasyonu düzenleyen sinyalleşme proteinlerinin konumlandırılmasını ve korunmasını sağlar. Spermin dalgalı hareketini sağlayan sürekli atım mekanizması tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen, pH, ATP yoğunluğu, kalsiyum konsantrasyonu ve sinyalleşme proteinlerinin fosforilasyonundaki değişiklikler aksonemal dinein kollarının aktivitesini ve dolayısıyla sperm hareketliliğini modüle ediyor gibi görünmektedir (Freitas, vd., 2017).

2.5.3. Semen

Semen, ejakülasyon ile dışarı atılan 2-6 ml hacmindeki kompleks bir sıvıdır. Testislerde üretilen ve epididimlerde işlenen spermleri, prostat, seminal veziküller, bulboüretal bezler ve epididimis de dahil olmak üzere erkek yardımcı cinsel organlardan gelen salgılarla karışmış bir içeriğe sahiptir. Bu sıvının %10'luk kısmından azını spermler oluştururken, kalan kısmında proteinler, prostaglandinler, lipidler, bağ dokusu hücreleri ve genital epitelden dökülen hücrelerden oluşan seminal plazma oluşturmaktadır (Sunder ve Leslie, 2020). Semen, toplam sperm sayısı, sıvı hacmi, opaklığı, sperm konsantrasyonu ve spermin doğası, canlılığı, hareketliliği ve şekli gibi çeşitli niteliklere göre değerlendirilebilir. Bu faktörlerin ayrıntılı analizi, erkek kısırlığının nedenini belirlemeye yardımcı olabilecek faktörler arasındadır.

2.6. Sperm Motilitesi ve Motilite ile İlişkili Genler

Spermatogenez sonrası sperm morfolojik olarak olgun hale gelir, fakat işlevsel olarak olgunlaşmamıştır. Ejakülasyon ile testislerden çıkan spermler pasif hareketlidir ve epididimis yolculuğu boyunca hareketlilik kazanırlar. Epididimal olgunlaşma,

spermin epididimal bölgede sentezlenen ve salgılanan proteinlerle etkileşimi ile gerçekleşir (Cornwall, 2009). Epididimiste spermin hareket kabiliyetini nasıl kazandığını açıklayan mekanizma halen tam olarak bilinmemektedir. Korunmasız cinsel ilişki sırasında, milyonlarca sperm dişi üreme yoluna bırakılır ve spermlerin, fallop tüpündeki oosite ulaşana kadar yüzmesi gerekmektedir. Spermler ilk bırakıldığında pasif hareketli olmasına rağmen, dişi üreme sisteminde karşılaşacağı engelleyici faktörlerin üstesinden gelmek için hiperaktif hareketli faza geçmesi gerekmektedir. Sperm hareketliliği, büyük ölçüde çeşitli metabolik yollara ve düzenleyici mekanizmalara bağlıdır. Spermlerin bırakıldığı dişi üreme sistemi, bu yolların aktifleşmesi için ideal şartlara sahiptir (Visconti, vd., 2002). Spesifik gen kusurları ve bu faktörlerin herhangi birisinde gözlenen anormallikler, zayıf sperm hareketliliğine ve dolayısıyla infertilite problemiyle karşı karşıya kalınmasına neden olabilir.

2.6.1. Sperm Motilitesinin Düzenlenmesinde Rol Alan Faktörler

Kalsiyum yolağı ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) bağımlı protein kinaz veya protein kinaz A (PKA) yolağı, sperm hareketliliğinin düzenlenmesinde yer alan iki önemli metabolik yoldur (Darszon, vd., 2001; Darszon, Lopez-Martinez, vd., 2006). Bu yolların işleyişinde, kalsiyum iyonları, çözülebilir adenil siklaz (sAC), bikarbonat iyonları, farklı membran kanalları ve fosforilasyon olayları önemli roller oynar. Fertilizasyon için spermin kapasitasyonundan, hiperaktivitesinden ve akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesinden sorumludurlar.

Kalsiyum, fertilizasyondan önceki olaylarda, spermin motilitesinde, kemotaksisinde, hiperkativasyonunda ve akrozom reaksiyonlarında merkezi bir rol oynar. Kalsiyumun insan sperm hareketliliğinde en çok tanımlanan rolü, sAC'nin aktivasyonudur. Kalsiyum sinyal inhibisyonunun erkek subfertilitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Espino, vd., 2009).

İnsan sperminde ortalama bazal Ca^{2+} seviyesi 100–200 nM civarında tutulurken, hücre dışı ortamda Ca^{2+} seviyesi 1 ile 2 mM arasında değişir (Wennemuth, vd., 2000). Kalsiyum konsantrasyonundaki bu farklılık, ATP tüketimi ile çalışan ve Ca^{2+} akışını dışarı doğru düzenleyen bir Ca^{2+} -ATPaz pompası ile gerçekleştirilir (DasGupta, vd., 1994; Miki, vd., 2002). İnsan spermini, epididimis ve vas deferensin kaudal kısmında bazal hareketlilik durumunda tutan mekanizma düşük Ca^{2+} konsantrasyonudur. Düşük hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarında, kuyruk simetrik olarak salınım yapar, ancak aktif

spermde (Ca^{2+} 10-40 nM) Ca^{2+} seviyeleri yükseldiğinde, dalga formu daha asimetrik hale gelir ve sperm hiperaktif hale gelir (Ca^{2+} 100-300 nM) (Suarez, 2008; Suarez, vd., 1993). Dişi üreme yolunda ise, sperm hiperaktif motil faza geçebilmesi için Ca^{2+} konsantrasyonu artar (Kirichok ve Lishko, 2011).

Kalsiyum ayrıca, dynein kaynaklı mikrotübül hareketliliğinin düzenlenmesinde rol oynar (Smith, 2002). Kalmodulin, anahtar aksonemal Ca^{2+} sensörüdür ve kalmodüline bağımlı kinaz bu Ca^{2+} sinyal mekanizmasını düzenleyebilir. Sperm aksoneminde lokalize olan bu kompleksler, merkezi çift kompleksi ve radyal parmaklıklar tarafından düzenlenir. Kalmodulin, protein kinazlar, fosfatazlar, ve sAC ile doğrudan etkileşim yoluyla motiliteyi düzenler (Xie, vd., 2006).

Ca^{2+} 'nın insan spermine transferi birkaç özel mekanizma tarafından desteklenir. Membran geçirgenliğinde artış (Li, vd., 2014), depolarizasyon (Patrat, vd., 2000), Ca^{2+} -ATPaz pompasının inhibisyonu ve voltaja bağlı kalsiyum kanallarının (VOCC'ler) aktivasyonu kalsiyum geçişinin ana düzenleyicileridir.

2.6.2. CatSper Kalsiyum Kanalları

Spermde Ca^{2+} akışı için bilinen ana mekanizma, 2001 yılında Ren ve arkadaşları tarafından tanımlanan CatSper kalsiyum kanallarıdır (Ren, vd., 2001). CatSper kalsiyum kanalları, alkalileştirmeye aktive olan, sperme kalsiyum girişine aracılık eden, sperm hiperaktif edilmiş hareketliliği ve erkek doğurganlığı için gerekli olan sperme özgü bir katyon kanalıdır. Kalsiyum kanallarının araştırıldığı çalışmalarda, sadece testiste ifade edilen bir cDNA tanımlanmıştır. *CATSPER* geni, sperm hücrelerinin kuyruğunda bulunan bir proteini üretmek için talimatlar sağlar ve yalnızca testiste ifade edilen 686 amino asitlik bir proteini kodlar. İmmünofloresan boyaması yapılarak *CATSPER* ifadesinin sperm kuyruğunun ana parçası içinde gerçekleştiği tespit edilmiştir (Qi, vd., 2007; Strunker, vd., 2011). *CATSPER* kompleksi; *CATSPER1*, *CATSPER2*, *CATSPER3* ve *CATSPER4* olmak üzere 4 ana birim ve *CATSPERB* ve *CATSPERG* olmak üzere 2 alt birim içermektedir (Xia ve Ren, 2009). Genomik dizi analizi ile kromozomal lokasyonu 11q13.1 olarak tanımlanmıştır (Avenarius, vd., 2009). *CATSPER1* geni 12 adet kodlama yapan ekzon içermektedir. Sperm hücre zarına gömülü *CATSPER1* proteini, hiperaktif hareketlilik için pozitif yüklü kalsiyum katyonlarının hücreye girmesini sağlar. Bununla birlikte *CATSPER1* proteini, sperm hücrelerinin fertilizasyon sırasında yumurta hücresinin dış zarından geçmesi için de gereklidir.

İnsan CatSper aktivasyonu esas olarak hücre dışı progesteron, prostaglandinler ve alkali bir ortam (artan HCO_3^- konsantrasyonları ile oluşur) tarafından tetiklenir (Lishko, vd., 2011; Strunker, vd., 2011). Fakat bu mekanizma farelerde ve diğer türlerde gözükmez. Bu durum, muhtemelen türler arası fertilizasyonu önlemek için insanlara özgü bir Ca^{2+} transfer mekanizmasının var olduğunu göstermektedir (Lishko, vd., 2011; Strunker, vd., 2011). CatSper, spermin baş bölgesinde yer almamasına rağmen Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak akrozom reaksiyonunda muhtemel bir rol üstleniyor olabilir (Olson, vd., 2010). Ayrıca, dişi üreme sisteminde bulunan bir grup koku molekülünün CatSper'i aktive ettiği ve spermin oosite doğru kemotaksisine neden olduğuna dair bulgular mevcuttur (Brenker, vd., 2012).

2.6.3. AKAP4 Etkinliği

Hiperaktiviteyi kontrol eden, Ca^{2+} ve HCO_3^- konsantrasyonlarına büyük ölçüde bağımlı en iyi bilinen yolak sAC/cAMP/PKA yolağıdır. cAMP'nin hücre içi seviyesi, pirofosfat salımı altında ATP'nin cAMP'ye molekül içi siklizasyonunu katalize eden sAC'ler tarafından kontrol edilir (Suarez, vd., 1993). Sperme özgü sAC, guanozin-5'-trifosfat ile etkileşime girmemekte, aktivasyonu için HCO_3^- ve Ca^{2+} 'ya bağlanmaktadır (Visconti, vd., 2011). Aktive olduktan sonra, adenosin monofosfatı 3'5'-cAMP'ye dönüştürür. cAMP'deki artış, cAMP'ye bağlı bir serin/treonin kinaz olan PKA'yı aktive eder (Signorelli, vd., 2012). PKA'nın inhibisyonu tirozin fosforilasyonundaki bir azalma ile ilişkili olduğundan, PKA'nın tirozin kinazları hedeflediği ve aktive ettiği bilinmektedir (Naz ve Rajesh, 2004).

İnsan sperminde fibroz kılıfta lokalize olan, Ca^{2+} bağlayıcı ve tirozin fosforilasyonu ile düzenlenen AKAP'ler, kapasitasyon sırasında belirgin bir şekilde tirozinle fosforillenir (Ficarro, vd., 2003; Mandal, vd., 1999; Naaby-Hansen, vd., 2002). Tirozin fosforilasyonu gerçekleşmeyen hareketsiz sperm, kapasitasyon yeteneğinden yoksundur. Bu durum, spermin kapasitasyonu indükleyen uyarılara yanıt verme yeteneğini bozar ve değişen sperm membran lipid bileşimi ile ilişkilidir (Buffone, vd., 2005; Yunes, vd., 2003).

Spermde PKA tipik olarak AKAP'lara bağlıdır. Bu durum, PKA'yı spesifik hücre altı bölgelerine hedefler ve substratlarını tanımlamak için bir mekanizma sağlar (Harrison, vd., 2000). AKAP'lar PKA'yı sabitlemesinin yanı sıra, sperm içinde sinyalleşme mekanizmaları için gerekli olan makromoleküler komplekslerden fosfatazları ve diğer kinazları katlayabildiği gösterilmiştir (Harrison, vd., 2000).

cAMP'ye bağımlı yolak, PKA aktivitesinin uyarılmasıyla protein tirozin fosforilasyonunu düzenleyebilir. Çünkü PKA, sperm hareketliliğinde rol oynayan bazı ara tirozin kinazları aktive eder (Bajpai ve Doncel, 2003; Luconi, vd., 2005).

İnsan spermünde bir kinazın (PI₃-kinaz) varlığı ve aktivitesi gösterilmiştir. Bunun inhibisyonunun, hücre içi cAMP seviyelerinde ve AKAP3 proteininin tirozin fosforilasyonunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, PKA'nın motilite için önemli olan AKAP3'e bağlanmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu sonuçlar, AKAP3'ün tirozinin fosforile edilmiş formu ile etkileşim yoluyla PKA'nın sperm kuyruklarına hedeflenebileceğine dair bir doğrulama sağlamaktadır (Luconi, vd., 2004). AKAP iskelet proteinleri, fosforilasyon ve defosforilasyon olaylarını koordine etmek için uygun substratlarla, protein kinazlar ve fosfatazlar gibi enzimleri ayırdıklarından sperm hareketliliğini düzenlemede çok önemlidirler (Luconi, vd., 2011). İnsanlarda AKAP3 ve AKAP4, cAMP'ye bağımlı PKA'yı sabitleyen en bol yapısal fibröz kılıf proteinleridir (Eddy, vd., 2003).

AKAP'lar sperm kuyruğunda belirgin bir role sahiptir. AKAP4 fibröz kılıfın ana bileşenidir. AKAP4 geninin susturulduğu çalışmalarda, sperm sayıları normal olarak gözlenir, fakat sperm progresif hareket kabiliyetine sahip olamaz ve genellikle fibröz kılıfla ilişkili olan PKA gibi proteinlerden yoksundur (Miki, vd., 2002).

2.7. Hücre İçi Kalsiyum Oranının Değerlendirilmesi

Hücre içi serbest Ca²⁺ konsantrasyonu, membranda yer alan reseptör-aracılı veya voltaj bağımlı kanallar aracılığı ile bu iyonun geçişinin kontrolü veya hücre içi depolardan Ca²⁺ salıverilmesi ile kontrol edilir (Clapham, 2007). Kalsiyum kanallarının etkinliğinin ve kalsiyum sinyal mekanizmasının önemli bir rolü sperm kapasitasyon aşamasında ortaya çıkar. Başarılı fertilizasyon için Ca²⁺ sinyal yolları çok önemlidir. Spermdede, CatSper yoluyla hücre içi Ca²⁺ seviyesinin artmasının neticesinde kapasitasyon, motilitenin hiperaktivasyonu ve akrozom reaksiyonunun tetiklenmesi gerçekleşir. Spermlerin aktifleşmesi ve kapasitasyon aşamaları Ca²⁺ bağımlı gelişir (Clapham, 2007).

Floresan belirteçler yardımıyla hücre içi kalsiyum konsantrasyonu spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir (Malone, vd., 2007). Kalsiyum görüntüleme teknikleri, Ca²⁺ iyonlarının bağlanmasına cevap olarak spektral özelliklerini değiştiren kalsiyum göstergelerden yararlanır. Oran-metrik kalsiyum göstergelerinden birisi olan Fura-2-asetoksimetil ester (Fura-2 AM), Fura-

2'nin membrandan geçebilen ve invazif olmayan bir türevidir. Fura-2 AM hücre zarını geçtikten sonra, sitoplazmik bir enzim olan esterazlar asetoksimetil grubunu ayırır ve kalsiyum ile Fura-2'nin bağlanması gerçekleşir. Ca^{2+} ile bağlanan Fura-2 AM maksimum 330 nm'de uyarılırken, Ca^{2+} ile bağlanmayan Fura-2 AM maksimum 370 nm'de uyarılma gösterir. Her iki durumda da emisyon maksimum 520 nm'de gerçekleşir. 330 nm/520 nm ve 370 nm/520 nm oranları, hücre içi Ca^{2+} miktarı ile doğrudan ilişkilidir.

2.8. SYBR Green ile Kantitatif Real-Time PCR

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (kantitatif PCR, qPCR) genellikle gen ifadesini ölçmek için kullanılır. Gen ifadesindeki küçük değişiklikleri tespit etmek için mikrodizileme yönteminden daha hassastır ve küçük gen alt kümelerinin ifade analizleri için çok uygun bir yöntemdir.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ifadesi ilk olarak 1985 yılında DNA'nın yeni bir enzimatik amplifikasyonunu açıklayan bir makalede kullanıldı (Saiki, vd., 1985). Fakat, PCR'nin rutin kullanımını mümkün kılan en önemli yenilik, *Thermus aquaticus*'tan izole edilen termostabil polimerazın kullanılmasıyla gerçekleşti (Saiki, vd., 1988). Primerler, DNA polimeraz, nükleotidler, spesifik iyonlardan oluşan genel PCR protokolü, DNA'nın denatürasyonu, primerlerin bağlanması ve yeni ipliğin uzaması aşamalarını içeren döngülerden oluşur. PCR yöntemi kullanımındaki en önemli dönüm noktalarından birisi, floresan ışımalarının tespiti yoluyla gerçek zamanlı olarak DNA amplifikasyonunun izlenmesi kavramının öne sürülmesi olmuştur (Higuchi, vd., 1992; Holland, vd., 1991). qPCR yönteminde, floresan her döngüden sonra ölçülür ve floresan sinyalin yoğunluğu belirli bir zamanda numunedeki anlık DNA amplikon miktarını yansıtır. İlk döngülerde floresans arka plandan ayırt edilemeyecek kadar düşüktür. Bununla birlikte, floresans yoğunluğu saptanabilir seviyenin üzerine çıktığında, orantılı olarak numunedeki şablon DNA moleküllerinin başlangıç sayısına karşılık gelir. Bu nokta kantifikasyon döngüsü (C_q) veya döngü eşiği (C_t) olarak adlandırılır ve oluşturulan bir kalibrasyon eğrisine göre numunedeki hedef DNA'nın mutlak miktarının belirlenmesine olanak sağlar. Bilinen konsantrasyonlar veya kopya numaraları ile seri olarak seyreltilmiş standart numunelerden (genellikle ondalık dilüsyonlar) oluşturulan bir kalibrasyon eğrisine göre numunedeki hedef DNA'nın mutlak miktarının belirlenmesine olanak sağlar (Bustin, vd., 2009; Kubista, vd., 2006).

qPCR, her numuneyi bilinen bir dalga boyunda bir ışık demeti ile aydınlatma ve uyarılmış florofor tarafından yayılan flüoresanı tespit etme kapasitesine sahip termal döngü cihazında gerçekleştirilir. Termal döngü cihazı, örnekleri hızlı bir şekilde ısıtabilir ve soğutabilir, böylece nükleik asitlerin ve DNA polimerazın fizikokimyasal özelliklerinden faydalanılarak reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanır.

PCR döngüleri, değişken sıcaklıklarda gerçekleşen 35-45 döngüden oluşur. Bu döngüler; 95°C'de nükleik asidin çift zincirinin ayrıldığı denatürasyon aşaması, 50-60°C arasında spesifik bir sıcaklıkta primerlerin DNA şablonu ile bağlandığı bağlanma aşaması ve 68-72°C arasında DNA polimeraz ile yeni iplikçik sentezinin gerçekleştiği uzama aşaması olmak üzere başlıca 3 ana döngüden oluşur. Bu aşamalarda sıcaklığın ve sürenin belirlenmesi, kullanılan enzim, primerlerin bağlanma sıcaklığı (T_m), deoksiribonükleotitlerin (dNTP'ler) konsantrasyonu, iyon konsantrasyonu gibi birçok parametrenin birlikte değerlendirilmesiyle gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında gerçekleştirilir.

SYBR Green, yalnızca çift sarmallı DNA'ya (PCR ürünü) bağlandığında floresan ışınması yapan ve PCR ürün miktarının ölçülmesini sağlayan çift iplikli DNA (dsDNA) bağlayıcı boyadır. Amplifikasyon ilerledikçe, DNA ürününün miktarı artar ve dolayısıyla DNA'ya entegre olan SYBR Green moleküllerin sayısı artar. Floresanstaki artış biriken ürün miktarı ile orantılı olduğundan, SYBR Green qPCR bağımlı DNA ölçümü için kullanılmaktadır. SYBR Green boyasının primer tasarımı esnasında primere dahil edilme mecburiyeti bulunmamaktadır. Bu durum, primer tasarımı basitleştirir ve özellikle bizim çalışmamızda da olduğu gibi, her reaksiyon için farklı bir prob gerektiren birden fazla geni test ederken deneysel maliyetleri azaltır. SYBR Green boyası 494 nm'de absorbe edilir ve 521 nm'de emisyon gerçekleştirir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Grupların Oluşturulması ve Çalışma Dizaynı

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından amaç, gereç, yaklaşım ve yöntem parametreleri açısından incelenmiş, 13/06/2019 tarihli kurul kararı ile gerçekleştirilmesinin uygun olacağına karar verilmiştir (Ek 1). %95 güven aralığı ve %80 güç testi referans alınarak gerçekleştirilen güç analizi neticesinde, çalışmamıza her grupta 10 gönüllü olacak şekilde toplam 40 gönüllü erkek hasta dahil edildi. Çalışma kapsamında, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezine başvuran, daha önce infertil durum ile ilgili tanı almış olan, DSÖ ölçütlerine göre (WHO, 2010) sperm hareketliliğinde azalma sorunu yaşayan (astenozoospermik) 10 olgu, hem sperm sayısında hem de sperm hareketliliğinde azalma sorunu yaşayan (oligoastenozoospermik) 10 olgu, hem sayı, hem hareket, hem de morfolojik yönden normal değerlerin altında spermelere sahip (oligoastenoteratozoospermik) 10 olgu olmak üzere 3 deney grubu ile normal sınırlar içerisinde değerlere sahip (normozoospermik) 10 olgunun dahil olduğu 1 kontrol grubu olmak üzere toplam 40 olgu çalışmaya dahil edildi. Bu olgulardan alınan semen ve kan örnekleri üzerinde araştırma yapıldı. Çalışmaya katılma kriterlerine uygun olan olgularla birebir görüşülerek çalışma hakkında detaylı bilgilendirme yapıldı ve çalışmaya katılmaya kabul eden olgular bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu doldurdu ve imzaladılar (Ek 2). Çalışma dizaynı Şekil 3.1’de şematize edilmektedir.

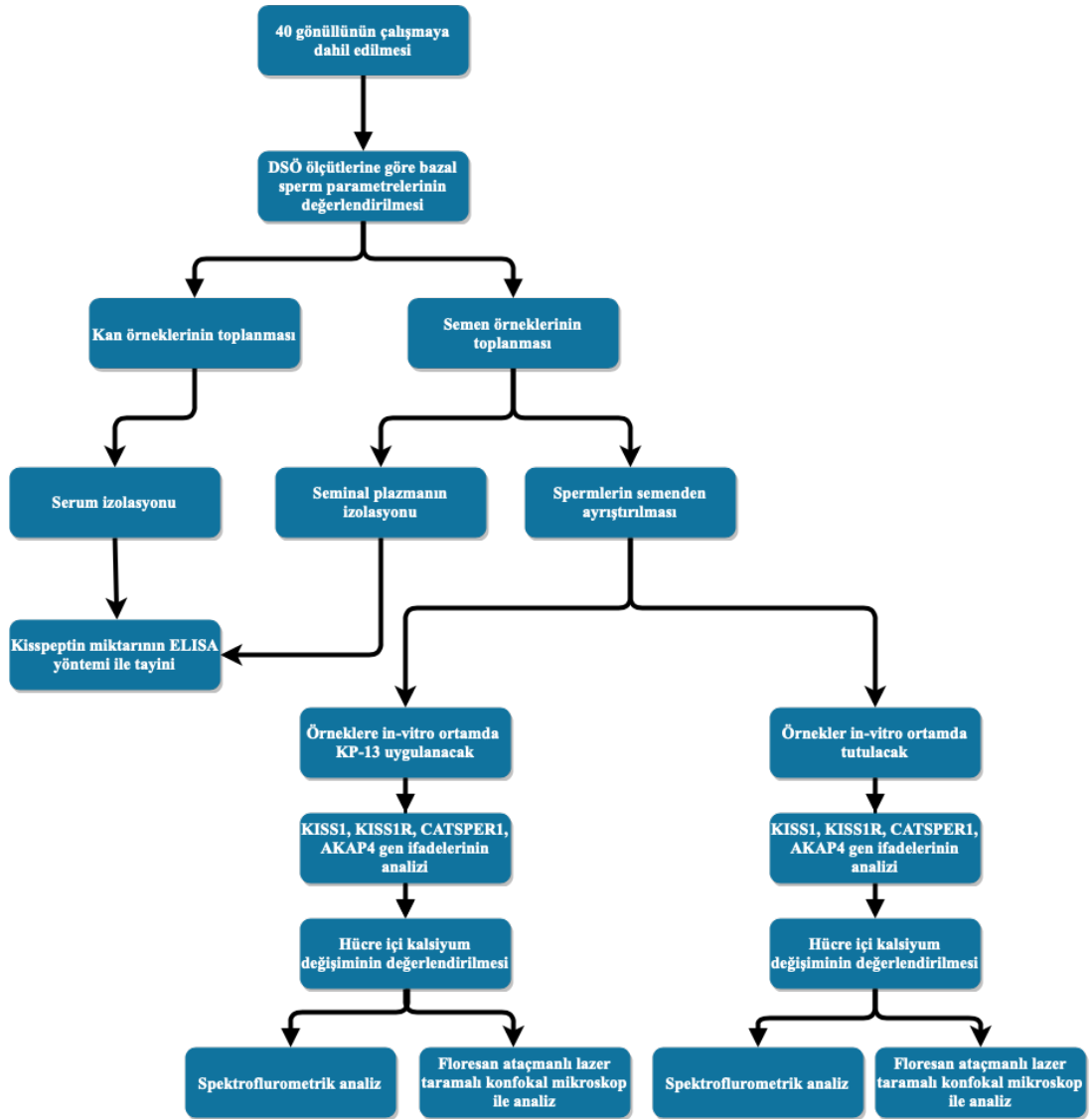
Olguların çalışmaya dahil edilmesinde göz önünde bulundurulmuş kriterler şunlardır;

- En az 12 aylık düzenli korunmasız cinsel ilişki sonucunda gebelik gerçekleştirilemeyen,
- 18-40 yaş arasında olan
- Fertilite yönünden kadın (eş) faktörü olmayan,
- Sperm sayısı 1 milyonun altında olmayan,
- Cinsel perhiz süresi 2 günden az veya 7 günden fazla olmayan,
- Herhangi bir bilinen sağlık sorunu, ürogenital veya genetik hastalığı olmayan,
- Sürekli kullandığı bir ilacı olmayan ve yakın zamanda sperm parametrelerini etkileyebilecek bir ilaç kullanmayan,
- Erkek faktörü nedeniyle geçmişte herhangi bir tedavi almamış veya ameliyat

geçirmemiş olan,

- Kronik olarak sigara, alkol ve bağımlılık yapan madde kullanmayan ve bunlara bağımlılığı olmayan erkekler çalışmaya dahil edilmiştir.

Yukarıdaki ölçütlere uyan ve çalışmaya dahil olan olgulardan mastürbasyon yolu ile semen örnekleri toplandı ve ayrıca her olgudan 1 ml kan örneği alındı. Gruplar, normozoospermik (NZ), astenozoospermik (AZ), oligoastenozoospermik (OAZ), oligoastenoteratozoospermik (OATZ) şeklinde oluşturuldu. KP-13 uygulanan grupların isimlendirmesinde, her grup isminin sonuna K harfi eklenmiştir (NZK, AZK, OAZK, OATZK).



Şekil 3.1. Çalışma basamaklarının şematize edilmesi

3.2. Semen Örneklerinin Analizi

Toplanan semen örnekleri 37°C'deki likefaksiyonun ardından işleme alındı. Tüm örnekler, DSÖ (2010) ölçütleri doğrultusunda rutin spermiyogram analizine tabi tutuldu (Tablo 3.1).

Semen numunesi, spermin süspansiyonda çökmesine fırsat bırakılmadan iyice karıştırılarak cam lam üzerinde 10 µl hacimle yayılarak lamelle kapatıldı. Örneklenen semen lam ve lamel arasında yayıldıktan hemen sonra değerlendirme yapıldı. Faz kontrast mikroskop altında (Olympus, BX-52) x400 büyütmede, sperm agregasyonu, aglütinasyonu ve sperm hücresi haricindeki farklı hücre tiplerinin varlığı gözlemlendi. Her bir numunede, en az 5 alanda ortalama 200 sperm, hareketlilik kabiliyetlerine göre kategorilere ayrılarak değerlendirildi. Doğrusal veya geniş bir daire çizerek hızdan bağımsız sürekli hareket eden spermiler ileri hareketli (progresif motilite), küçük daireler çizerek yalnızca kuyruğun kamçısal hareketin gözlemlendiği spermiler yerinde hareketli (non-progresif motilite) ve hareket gözlenmeyen spermiler hareketsiz (immotil) olarak sınıflandırıldı.

Birim semen hacmindeki sperm sayısını gösteren sperm konsantrasyonundan yola çıkılarak, sperm konsantrasyonunun semen hacmiyle çarpımı sonucu ejakülat içindeki toplam sperm sayısı hesaplandı. Semen örneği, likefaksiyon sonrası semen hemositometre kamarasına konuldu ve her olguya ait semenden alınan iki örnekte en az 400 sperm sayıldı. Mililitredeki sperm konsantrasyonu ve her olguya ait ejakülattaki toplam sperm sayısı hesaplandı.

Bu parametrelerin haricinde, sperm canlılığı, semen rengi ve viskozitesi, sperm morfolojik yapısı ve sperm harici hücre sayısı değerlendirildi. Anormal sperm morfolojisi, baş defektleri, boyun ve orta parça defektleri, ana parça defektleri ve aşırı rezidüel sitoplazma varlığı gözlemlenerek gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Normal sperm analizinde kullanılan DSÖ referans ölçütleri tablosu (DSÖ, 2010)

Semen Özellikleri	DSÖ 2010
Hacim (ml)	≥ 1,5
Sperm sayısı (10 ⁶ /ml)	≥ 15
Total sperm sayısı (10 ⁶)	≥ 39
Total motilite (%)	≥ 40
Progresif motilite (%)	≥ 32 (a+b)
Canlılık (%)	≥ 58
Morfoloji (%)	≥ 4
Lökosit sayısı (10 ⁶ /ml)	<1,0

a: hızlı, progresif motilite

b: yavaş, progresif motilite

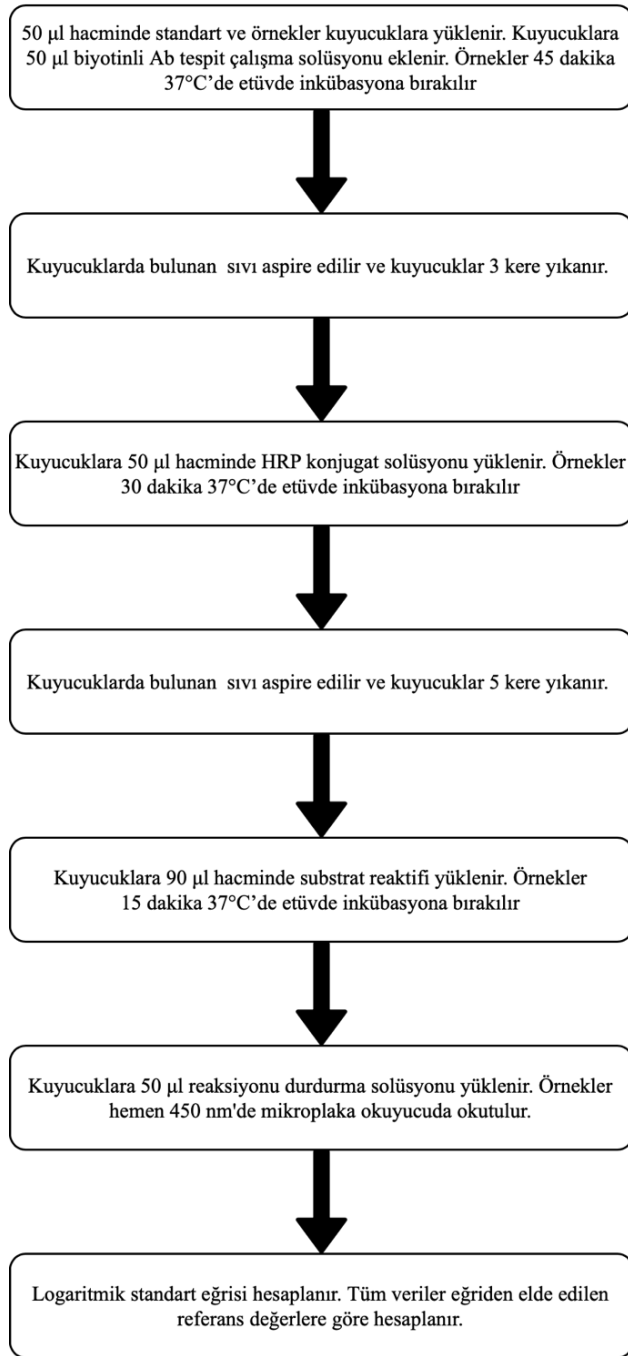
3.3. Serum ve Seminal Plazma Örneklerinin Biyokimyasal Analizi

3.3.1. Reaksiyon Malzemelerinin Hazırlanması

KISS1 konsantrasyon tayini için rekabete dayalı (Makarananda, vd., 1998) enzim bağlı immünosorbent deney (ELISA) prensibi ile tasarlanmış olan insan KISS1 ELISA kiti (Elabscience, USA, lot no: E-EL-H5618) kullanıldı. Kit ile birlikte temin edilen mikropılaka, insan KISS1 proteini ile kaplı olarak gelmiştir. İşlemden 30 dakika önce tüm örnekler -20°C'den çıkarılarak çözdürüldü. Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için gerekli olan solüsyonlar kit ile birlikte gelen protokole uygun olarak oda sıcaklığında hazırlandı (Şekil 3.2).

30 ml konsantre yıkama solüsyonu 720 ml distile su ile karıştırılarak 750 ml'lik yıkama solüsyonu hazırlandı. Standart olarak kullanılması için kimyevi toz halinde gelen KISS1 proteini üzerine 1 ml referans standart çözücüsü eklendi ve yaklaşık 10 dakika kadar tozun çözünmesi beklendi. Süre sonunda hazır hale gelen 4000 pg/ml'lik konsantre standart yedi farklı eppendorf tüpe standart serisi olarak kullanılmak üzere sırasıyla dilüe edildi. İlk olarak 1 ml'lik 4000 pg/ml konsantrasyondaki standart çözeltilisinden 500 µl alınarak boş bir eppendorf tüpe aktarıldı ve bu tüpe 500 µl referans standart çözücüsü eklendi. Böylelikle 2000 pg/ml konsantrasyondaki ikinci standart çözeltisi elde edilmiş oldu. Daha sonra 1 ml'lik 2000 pg/ml konsantrasyondaki standart çözeltilisinden 500 µl alınarak başka bir boş eppendorf tüpe aktarıldı ve bu tüpe 500 µl referans standart çözücüsü eklendi. Böylelikle 1000 pg/ml konsantrasyondaki ikinci standart çözeltisi elde edilmiş oldu. Bu işlem sırasıyla 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml ve KISS1 bulundurmeyen blank çözeltisi hazırlanana kadar aynı şekilde devam etti. 62,5 pg/ml'lik konsantrasyonun bulunduğu tüpten, blank olarak tayin edilen ve içerisinde sadece referans standart çözücüsü bulunan tüpe aktarım yapılmadı.

Standart çözeltilerin hazırlanmasını takiben, reaksiyon esnasında kullanılacak diğer çözeltilerin hazırlıklarına başlandı. Konsantre (x100) biotinli tespit Ab çalışma solüsyonu, bu solüsyona özgü çözdürücü ile her kuyucuğa 50 µl konulacak şekilde, x1 oranında 700 µl toplam hacimde hazırlandı. Konsantre (x100) horseradish peroksidaz (HRP) konjugat çalışma solüsyonu, bu solüsyona özgü çözdürücü ile her kuyucuğa 100 µl konulacak şekilde x1 oranında toplam hacim 1200 µl olacak şekilde hazırlandı.

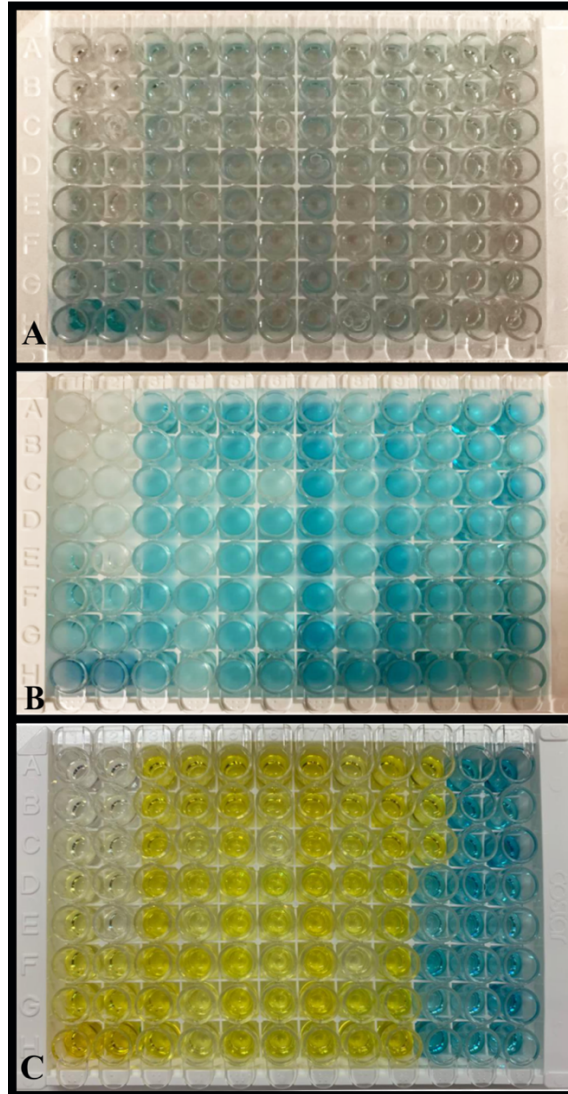


Şekil 3.2. Reaksiyonun hazırlanmasında kullanılan protokol

3.3.2. Reaksiyonun Gerçekleştirilmesi

Standart solüsyonları ve her gruba ait semen ve serum örnekleri duplike olacak şekilde kuyucuklara yerleştirildi. Takiben, bütün kuyucuklara 50 µl biyotinli Ab tespit çalışma solüsyonu aktarıldı. Reaksiyon sırasında, numune veya standarttaki KISS1 proteinleri ve mikropłaka üzerine işlenmiş KISS1 proteinleri, insan KISS1'ine özgü biyotinli Ab tespit solüsyonu ile etkileşime girmek için rekabete girer. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için mikropłaka 45 dakika 37°C'deki etüve kaldırıldı. Süre sonunda

mikroplaka ters çevrilerek içindeki solüsyonlar boşaltıldı. Fazla konjugat ve bağlanmamış numune veya standartlar 350 µl yıkama solüsyonu ile üç kere yıkanarak mikroplakadan uzaklaştırıldı. 100 µl HRP'ye konjuge edilmiş avidin çalışma solüsyonu her kuyucuğa eklenerek 30 dakika 37°C'deki etüvde bekletildi. Takiben mikroplakadaki solüsyonlar boşaltıldı ve beş kere 350 µl yıkama solüsyonu ile kuyucuklar yıkandı. Daha sonra, ışıktan uzak bir ortamda her kuyuya 90 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve ışık geçirmeyen bir pakete yerleştirilerek 15 dakika 37°C'deki etüvde bekletildi. Bu aşamada, enzim-substrat reaksiyonları neticesinde kuyucuklarda meydana gelen renk değişimi gözlenerek, reaksiyon süresinin güncellenmesi noktasında bir öngörü sağlandı (Şekil 3.3).



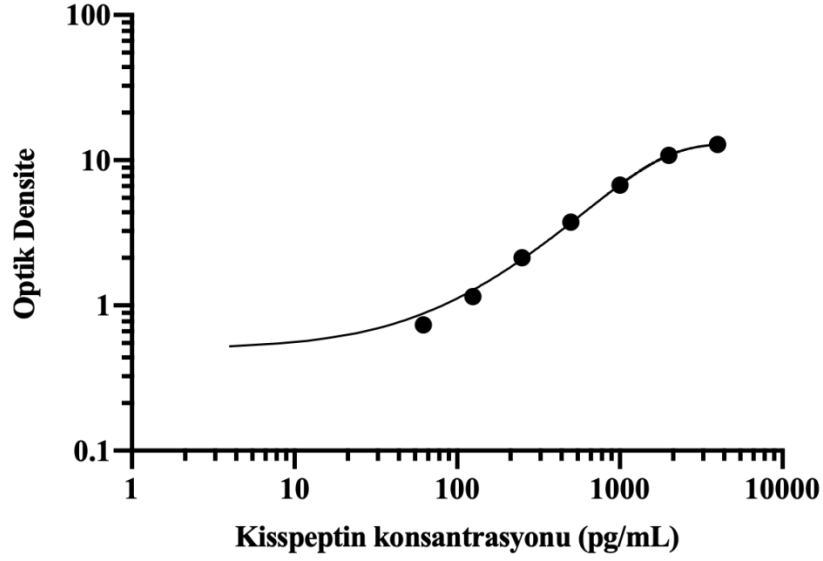
Şekil 3.3. Substrat solüsyonunun eklenmesiyle kuyucuklarda reaksiyon başlar (A). Mikroplaka etüvde 15 dakika inkübe edildikten sonra, KISS1 konsantrasyonlarıyla ters orantılı bir şekilde kuyucuklarda renk değişimi oluşur (B). Durdurma solüsyonu eklenmeden ve eklendikten sonra örneklerde gözlenen renk değişimlerinin gösterimi (C)

Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma solüsyonun eklenmesiyle sona erdirildi. Kuyucuklardaki protein konsantrasyonu spektrofotometrik olarak $450 \text{ nm} \pm 2 \text{ nm}$ dalga boyunda ölçüldü. Ölçüm, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı bünyesinde bulunan mikrolaka absorban okuyucu (Sunrise, Tecan Trading Ag, Mannedorf, Switzerland) kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. 450 nm’de spektrofotometrik analize hazır mikrolaka ve mikrolaka okuyucu cihazı (Sunrise, Tecan Trading Ag, Mannedorf, Switzerland), Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Boş kuyucuğa ait olan değerlerin ortalaması tüm diğer kuyucuklara ait değerlerden çıkartıldı. Bütün veriler, GraphPad Prism programı (Versiyon 8.0.0, Mac, GraphPad Software, San Diego, California ABD) simple logistic regression testi kategorisine aktarıldı. Sigmoidal, 4PL, x (konsantrasyon) parametresi uygulanarak standartların değerlerine göre dört parametrelili lojistik eğri oluşturuldu. Standartların konsantrasyonu ile elde edilen eğri ile numunelerin konsantrasyonu ile karşılaştırılmak üzere kuyucuklarda bulunan örneklerin konsantrasyonu tespit edildi ve veriler istatistiksel olarak analiz edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Standart örneklere ait logaritmik standart eğrisi grafiği

3.4. Sperm Örneklerine KP-13 Uygulanması

Literatürde, KISS1 türevleri olan KP-54, KP-14, KP-13 ve KP-10'un aynı düzeyde etkinlik gösterdiği ifade edilmektedir (Kotani, vd., 2001). Pinto, vd., (2011), çalışmasında sperm hücrelerine KP-13 uygulamış ve optimum etkiyi 10 μ M dozda elde etmiştir (Pinto, vd., 2012). Bu sebeple, ilgili çalışma referans alınarak semenden ayrıştırılan sperm örnekleri dörde bölündü. Her olguya ait örneklerin yarısı hücre içi kalsiyum analizleri için ayrılırken, diğer yarısı gen ifade analizleri için hazırlandı. Gen ifade analizi gerçekleştirilecek örneklerin yarısına 10 μ M KP-13 (sc-15400, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, diluasyon 1:400) uygulanırken, örneklerin diğer yarısına herhangi bir uygulama yapılmadı. Tüm örnekler, 24 saat süreyle 37°C'de etüvde bekletildi.

3.5. Sperm Hücre İçi Kalsiyum Konsantrasyonunun İncelenmesi

Sperm örneklerinde, KP-13 uygulama öncesi ve uygulama sonrası olmak üzere her grupta hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonundaki değişiklikler incelendi. Sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini arttırmak amacıyla iki farklı ölçüm yöntemi kullanıldı ve tüm ölçümler duplike edilerek sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi.

3.5.1. Floresan Spektrofotometre ile Ca^{2+} Oranlarının İncelenmesi

Çalışmamızda, hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunun tespiti Grynkieicz, vd., (1985)'in uyguladığı protokole uygun olarak gerçekleştirildi (Grynkieicz, vd., 1985).

Konsantre toz olarak temin edilen 1 mg Fura-2 AM (CAS 108964-32-5, Santa Cruz, USA), 1 ml dimetil sülfoksit (DMSO; Sigma-Aldrich, Almanya) ile çözdürülerek 1mM'lık konsantrasyonda stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon kademeli olarak dilüe edilerek 20 mM'lık çalışma solüsyonu hazır hale getirildi. Sperm örnekleri ($10^5/ml$) kalsiyum bulundurmeyen medyum (Sigma-Aldrich, Almanya) ile yıkama işlemlerini takiben 37°C'de 30 dakika bekletildi. 100 µl sperm örneği ependorf tüpe aktarıldı ve 10 µl 20 µM Fura-2 AM ile 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Hücre dışı ekstra Fura-2 AM'nin uzaklaştırılması için sperm hücreleri her defasında kalsiyum bulundurmeyen medyum ile yıkanarak 2 defa 200xg'de 10'ar dakika santrifüje edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, örnekler kalsiyum bulundurmeyen medyum ile yavaşça süspansiyon edildi.

Süspansiyon edilen örnekler plakaya yerleştirildi ve floresans spektrofotometresine (Cary Eclipse, Agilent Technologies, Japonya) okuma için yerleştirildi (Şekil 3.6). 370 nm eksitasyon ile 520 nm emisyon ve 330 nm eksitasyon ile 520 nm emisyon olmak üzere, daha önce cihaz yazılımına dalga boylarının kaydedildiği program çerçevesinde örneklerin okunması gerçekleştirildi. Elde edilen veriler excell dosya formatında bilgisayardan alındı ve en iyi eksitasyon ve emisyonun gerçekleştiği dalga boyları tekrar kontrol edildi. Daha sonra 520 nm/330 nm ve 520 nm/380 nm oranları hesaplanarak gruplar arası hücre içi kalsiyum yoğunlukları karşılaştırıldı.



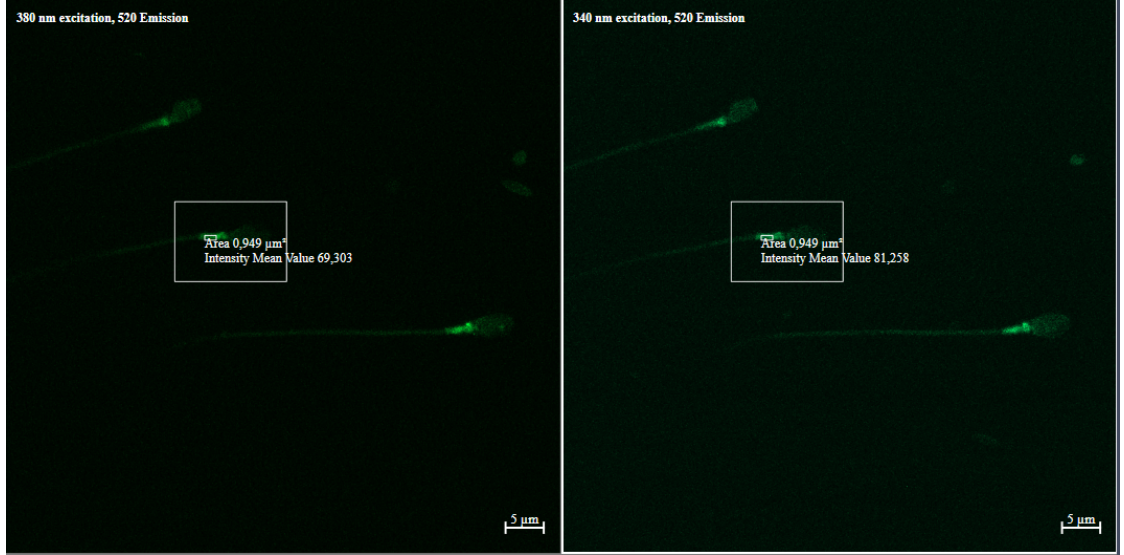
Şekil 3.6. Floresan spektrofotometrik analizlerin gerçekleştirildiği cihaz (Cary Eclipse, Agilent Technologies, Japonya), DAYTAM, Atatürk Üniversitesi, Erzurum

3.5.2. Floresan Ataçmanlı Konfokal Mikroskop ile Ca²⁺ Oranlarının İncelenmesi

Floresan spektrofotometre ile elde edilecek verileri doğrulamak ve tek hücre bazında sonuçlar elde ederek sonuçların güvenilirliğini arttırmak amacıyla, sperm içi kalsiyum oranlarındaki değişim floresan ataçmanlı lazer taramalı konfokal mikroskop yardımı ile tayin edildi (Wood, vd., 2003; Yamazaki, vd., 2016). Örnekler Fura-2 AM ile muamele edildikten sonra 10 µl hacminde örnek bir lam üzerinde yayılarak konfokal mikroskop tablasına yerleştirildi. Floresan spektrofotometre analizinde olduğu gibi uyarım için 330 ve 370 nm’de, emisyon için 520 nm’de floresan ışması ile hücre içi kalsiyum yoğunluğu görüntüledi (Şekil 3.7). Görüntüleme işlemi, Zeiss LSM 800 konfokal lazer taramalı mikroskop (Şekil 3.8) ve ZEN 2.3 yazılımı (Carl Zeiss, Jena, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. Farklı eksitasyonlar sonucu elde edilen görüntülerde, hedef bölgede ölçülen floresan yoğunluğu yazılım programı yardımı ile sayısal veriye dönüştürüldü.



Şekil 3.7. Floresan ataçmanlı lazer taramalı konfokal mikroskop (Zeiss LSM 800, Almanya), ARUMLAB, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir



Şekil 3.8. ZEN 2.3 yazılımı (Carl Zeiss, Jena, Almanya) ile görüntülerin analiz edilmesi

3.6. Sperm Motilitesi ile İlişkili Gen İfade Düzeylerinin Analizi

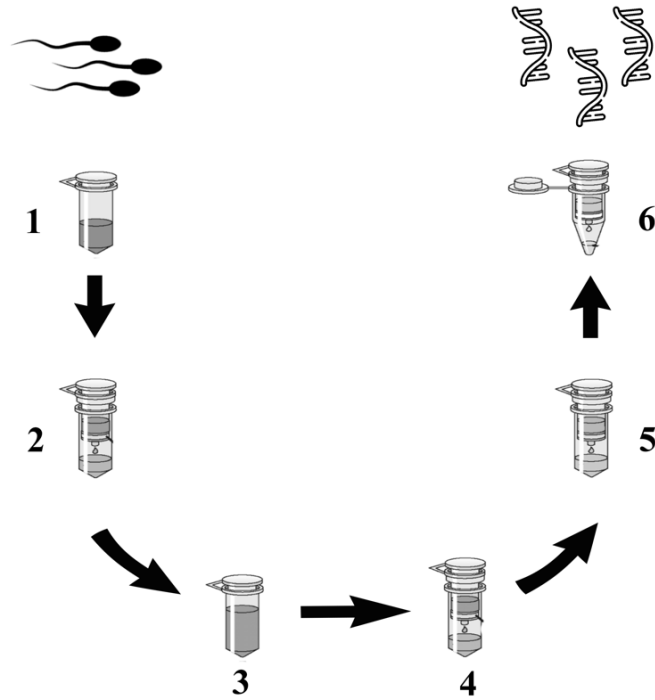
3.6.1. Sperm Hücrelerinden Total RNA İzolasyonu

Total ribonükleik asit (RNA) izolasyonu, düşük seviyelerdeki RNA miktarlarına göre dizayn edilen ve ticari kit olarak satışa sunulan RNeasy Mini Kit kullanılarak gerçekleştirildi (Qiagen, Germany). Her izolasyon işlemi öncesinde, çalışma masaları ve malzemeler RNaz kontaminasyonunu önlemek için temizlendi. Kullanılacak olan kitin RNA bağlama kapasitesini aşmamak için, numunede bulunan hücre sayısının 5×10^6 hücreyi geçmemesine dikkat edildi.

Total RNA izolasyonu, pilot çalışmada tayin edilen modifikasyonlarla kitin önerdiği protokol izlenerek yürütüldü. Çalışmaya katılan tüm olgulardan temin edilen bütün örnekler, dondurma ya da bekletme uygulanmadan KISS1'e maruz bırakıldı ve akabinde tüm örnekler aynı izolasyon protokolü uygulandı. Hücre çekirdeğinde lokalize RNA bileşenlerini açığa çıkarmak ve izole etmek için, hücre zarı, organeller, hücre içi plazma, genomik DNA, proteinler ve diğer bileşenlerin uzaklaştırılması gerekmektedir.

Her olguya ait, KP-13 uygulanan ve uygulanmayan yaklaşık sperm örnekleri 1,5 ml hacmindeki steril eppendorf tüplere aktarıldı. 1 ml Trizol (CBSA, Almanya) eklendi ve güçlü vorteks yapıldı. Tüplere kloroform (Sigma-Aldrich, Almanya) eklendi ve 3 dakika faz oluşmaya başlaması için beklendi. 8000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. En üst katmanda oluşan şeffaf faz alınarak, 2 ml'lik toplama tüpüne

yerleştirilmiş olan gDNA Eliminator spin kolonuna aktarıldı. 8000 x g'de 60 saniye santrifüjlendi. Bu işlem ile, numunenin parçalanmamış kalıntılarının uzaklaştırılması ve lizatın viskozitesinin azaltılması sağlandı. Ardından kolon çıkarıldı ve atıldı. 2 ml'lik toplama tüpüne süzülen sıvıya 450 µl %70'lik etanol eklenerek, uzun RNA parçalarının bir sonraki aşamada kullanılacak olan kolona bağlanma kapasitesi artırıldı. Etanol ve lizat, nazikçe pipetaj yapılarak karıştırıldı. Total sıvı hacminden 700 µl alındı. Toplama tüpüne yerleşik olan RNeasy spin kolonuna boşaltıldı. 8000 x g'de 60 saniye santrifüjlendi. Süzüntü uzaklaştırıldı ve kolon üzerine 700 µl RW1 tamponu eklendi. RW1 tamponu, etanolün yanı sıra bir guanidin tuzu içerir ve silika membrana spesifik olmayan şekilde bağlanan karbonhidratlar, proteinler, yağ asitleri gibi biyomolekülleri verimli bir şekilde uzaklaştıran kuvvetli bir yıkama tamponu olarak kullanılır. Aynı zamanda, büyük RNA moleküllerinin kolona bağlı kalmasını sağlar.



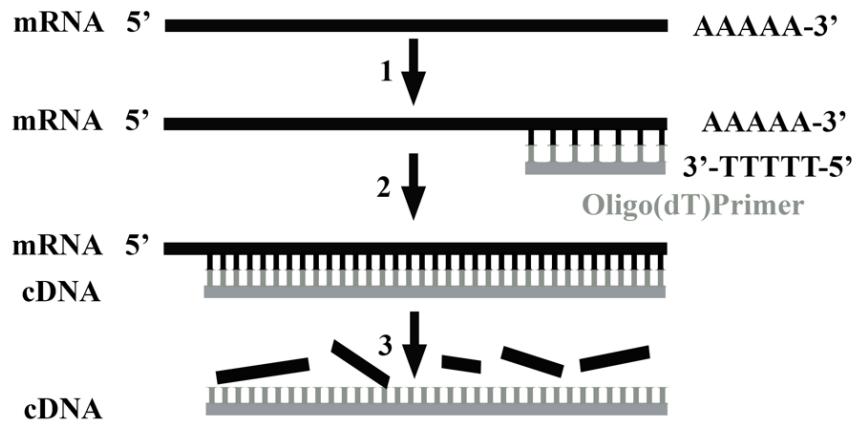
Şekil 3.9. Örneklerin izolasyonunda izlenen protokol. (1) Örnekler parçalanmaya maruz bırakılır. (2) Homojenize lizattan genomik DNA uzaklaştırılır. (3) %70'lik etanol eklenir. (4) RNA'nın kolonlara bağlanması gerçekleştirilir. (5) Kolon yıkama işlemleri gerçekleştirilir. (6) Kolona bağlı kalan RNA su ile çözdürülerek süzülür

Örnekler daha sonra 8000 x g'de 60 saniye santrifüj edildi. Süzüntü uzaklaştırıldı ve kolona 500 µl RPE tamponu eklendi. RPE tamponunun ana işlevi, protokol

uygulanırken kullanılan tamponlar nedeniyle kolonlarda kalan tuz kalıntılarını uzaklaştırmaktır. Daha sonra süzöntü uzaklaştırıldı ve kolon üzerine tekrar 500 µl RPE tamponu aktarıldı. Tüpler, 8000 x g'de 2 dakika santrifüjlendi. 2 ml'lik toplama tüpü uzaklaştırıldı ve kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. RNeasy spin kolonunun iyice kuruması için tüpler 8000 x g'de 1 dakika daha santrifüjlendi. RNeasy spin kolon 2 ml'lik toplama tüpünden çıkarılarak, 1,5 ml'lik steril eppendorf tüpe yerleştirildi. Kolonun merkezi noktası hizalanarak 40 µl RNaz bulundurmeyen su eklendi. Tüp, 8000 x g'de 60 saniye santrifüjlendi. RNA konsantrasyonunu artırmak için süzülen sıvı pipet ile çekilerek tekrar RNeasy spin kolonunun merkezi noktasına bırakıldı ve 8000 x g'de 1 dakika daha santrifüj edildi. RNeasy spin kolon çıkarılarak uzaklaştırıldı (Şekil 3.9). 1,5 ml'lik tüpte izole edilen 40 µl hacmindeki total RNA, ileri analizler için işlem gününe kadar -80°C'lik güç kaynağına bağlı derin dondurucuda saklandı.

3.6.2. Total RNA'nın cDNA'ya Dönüştürülmesi

İzole edilen total RNA'dan cDNA'ya dönüşüm prosedürü reverse transkriptaz prosedürü olarak adlandırılmaktadır. Bu süreç, genomik DNA'nın elimine edilmesi ve revers transkripsiyon aşamalarından oluşur (Şekil 3.10). Bu aşamada, ticari kit olarak satışa sunulan Quantitect Reverse Transcription Kiti kullanılarak tek iplikli RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi (Qiagen, Germany).



Şekil 3.10. cDNA sentez aşamaları. Tek iplikli mRNA'lara primerler bağlanır (1). Reverse transkriptaz enzimi tamamlayıcı ipliği sentezler (2). cDNA tamamlanınca mRNA yıkıma uğratılır (3)

Gerçek zamanlı qRT-PCR’de doğru sonuçların elde edilmesi, genomik DNA’nın saptanmasını ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için tasarlanmış primerlerin veya problemlerin kullanımına bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. RNA örneklerindeki genomik DNA kontaminasyonu mutlaka ortadan kaldırılmalıdır.

Bu sebeple, izole edilen ve -80°C’lik derin dondurucuda muhafaza edilen RNA örnekleri buz üzerinde çözdürüldü. Kontamine edici genomik DNA’yı etkin bir şekilde uzaklaştırmak için, her örneğe ait 10 µl hacmindeki total RNA 0,2 ml’lik ependorf tüpe aktarıldı ve aynı tüp içerisine 2 µl gDNA Wipeout tamponu ve 2 µl RNaz içermeyen su konuldu (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu protokolü

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
gDNA Wipeout tamponu, 7x	2 µl
İzole edilen RNA	10 µl
RNaz/DNaz içermeyen su	2 µl
Toplam hacim	14 µl

Genomik DNA eliminasyonundan sonra 14 µl hacmindeki her RNA örneği için, 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptaz, 4 µl Quantiscript RT tamponu ve 1 µl RT Primer Mix’ten hazırlanan bir ana karışım kullanılarak ters transkripsiyon reaksiyonu buz üzerinde hazırlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Reverse transkriptaz reaksiyonu protokolü

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
Quantiscript Reverse Transkriptaz	1 µl
Quantiscript RT Tamponu	4 µl
RT Primer karışımı	1 µl
gDNA uzaklaştırılmış RNA	14 µl
Toplam hacim	20 µl

Reaksiyon karışımının bulunduğu 0,2 ml’lik ependorf tüpler GenePro termal döngüleyici (Bioer Technology, Çin) cihazına yerleştirildi ve 42°C’de 15 dakika inkübe edildi. Hemen ardından reaksiyonun inaktivasyonu için örnekler 95°C’de 3 dakika inkübe edildi (Tablo 3.4). Örnekler buz üzerine kaldırıldı.

Tablo 3.4. Reaksiyon döngü koşulları

Basamaklar	Süre	Sıcaklık
gDNA eliminasyonu	2 dak.	42°C
Transkriptaz inkübasyonu	15 dak.	42°C
Transkriptaz inaktivasyonu	3 dak.	95°C

3.6.3. Nükleik Asit Konsantrasyonunun Tayini

260 ve 280 nm'deki absorbans oranı (A₂₆₀/A₂₈₀), nükleik asitlerin saflık derecelerini tespit etmek için kullanılır. Yaklaşık olarak ~ 1.8 oranı DNA için saflık parametresi olarak kabul edilirken; ~ 2.0 oranı RNA için saflık değeri olarak kabul görmektedir. Eğer bu oran önemli ölçüde daha düşükse, 280 nm'de veya yakın değerlerde absorbansı etkileyen fenol, protein veya diğer kirletici maddeler bulunuyor olabilir. Bu noktada, ölçümü yapılan örneklerin absorbans oranının kontrol edilmesi, örneğin saflığının tayini açısından önem taşımaktadır. Buna ek olarak, örneklerin RNA konsantrasyonlarının bilinmesi, gen ifadesi analizi hazırlıklarında büyük önem taşımaktadır. Analizi yapılacak numunelerin, reaksiyon esnasında eşit konsantrasyonlara sahip olması beklenmektedir.

İzole edilen ve cDNA'ya dönüştürülen örneklerin konsantrasyonları NanoDrop 2000® (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ile kantitatif veriye dönüştürüldü. Cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar ekranında, NanoDrop™ 2000 yazılımı çalıştırılarak nükleik asit ölçüm seçeneği seçildi. Cihaz pedalı kaldırıldı ve distile su ile kuyucuk ve ölçüm aparatı temizlendi. İlk olarak kuyucuğa 1 µl dH₂O yüklendi ve ölçüm yazılımında referans solüsyon (blank) olarak kaydedildi. Blanktan alınan spektrum, seçilen dalga boyunun ışık yoğunluğu olarak cihaz hafızasında kaydedildi. Ardından kuyucuk ve ölçüm aparatı tekrar temizlenerek kuyucuğa 1 µl hacminde örnek yüklemesi yapıldı. Örnekten alınan spektrum yoğunluğunun blank yoğunluğuna bölünüp logaritmasının alınması ile numunenin absorbansı yazılım üzerinden otomatik olarak hesaplandı. Ölçümün ardından, örnek konsantrasyonu ve ölçüm grafiğinin çıktısı alındı. Aynı işlem sırayla tüm örnekler için gerçekleştirildi. Ölçülen tüm örnekler, uygun değerlerde dilüe edilerek gen ifadesi analizi için tüm örneklerle eş değer konsantrasyona getirildi.

3.6.4. SYBR Green ile qRT-PCR Gerçekleştirilmesi

Çalışmamızda, ticari kit olarak satışa sunulan QuantiTect SYBR Green PCR Kiti (Qiagen, Germany) kullanıldı. Bu kit kapsamında, cDNA'ların son derece spesifik ve hassas gerçek zamanlı kantifikasyonu için optimize edilmiş bir ana karışım bulunmaktadır. 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix olarak isimlendirilen bu ana karışımın bileşenleri arasında, HotStarTaq DNA Polymerase, QuantiTect SYBR Green PCR tamponu, SYBR Green I ve ROX pasif referans boyası bulunmaktadır.

HotStarTaq DNA Polimeraz, orijinal olarak DNA polimerazın değişikliğe

uğrattılmış 94 kDa'lık rekombinant formudur. *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiş ve *E. coli*'ye klonlanmıştır. Oda sıcaklığında enzimatik aktiviteye sahip değildir. Bu özellik, reaksiyonun hazırlanması ve ilk denatürasyon basamağı sırasında yanlış primer eşleşmesini ve primer-dimerlerin oluşumunu önler, yüksek PCR özgülüğü ve doğru miktar tayini sağlar. Reaksiyon başlangıcında 95°C'de 15 dakikalık inkübasyon sırasında enzim aktive edilir. Enzim aktivasyonunun yüksek sıcaklıkta başlama özelliği, reaksiyonların oda sıcaklığında hızlı ve rahat bir şekilde yapılmasını sağlar.

QuantiTect SYBR Green PCR Tamponunda Tris·Cl, KCl ve (NH₄)₂SO₄'ün dengeli bir kombinasyonu bulunmaktadır. Bu karışım, her PCR döngüsünün primer bağlanma aşamasında yüksek oranda spesifik primer bağlanmasını destekler. Bu durum, primerlerin çok sıkı bağlanması için uygun koşulları oluşturur ve PCR reaksiyonunun özgülüğünü artırır. MgCl₂ konsantrasyonu optimizasyona ihtiyaç duyulmayacak düzeyde 5 mM konsantrasyonundadır. SYBR Green I boyası, hedefe özgü prob sentezini gerekli kılmadan birçok farklı hedefin analizini sağlar. Karışımın pH'ı 8,7'dir. Bir diğer bileşen olan dNTP karışımında; dATP, dCTP, dGTP, ve dTTP/dUTP bulunmaktadır. Tamponda ayrıca, kullanacağımız termal döngüleyici cihazında floresan normalizasyonuna olanak sağlayan ROX boyası bulunmaktadır. ROX boyasının varlığı, boya reaksiyona dahil olmadığından ve SYBR Green I'inkinden tamamen farklı bir emisyon spektrumuna sahip olduğundan, qPCR reaksiyonu ile etkileşime girmez. Fakat varlığı floresan saptamada PCR ile ilişkili olmayan varyasyonları kompanse eder. ROX boyasından gelen floresans, qPCR sırasında değişmez, ancak PCR ile ilgili floresan sinyallerin normalleştirildiği stabil bir temel sağlar. Bu nedenle ROX boyası, reaksiyon hacmindeki küçük değişiklikler veya kuyu pozisyonundaki farklılıklar nedeniyle kuyucuklar arasındaki floresan tespitinde farklılıkları kompanse eder.

Çalışma kapsamında kullanılacak olan *GAPDH*, *KISS1*, *KISS1R*, *CATSPER1* ve *AKAP4* genlerine ait primerlerin tasarımı NCBI primer BLAST programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) kullanılarak gerçekleştirildi ve hizmet alımı yoluyla ticari bir firmaya sentez ettirildi. İnternal kontrol geni olarak *GAPDH* (housekeeping gen) kullanıldı. Toz çözelti halindeki primerler, primere özgü çözdürme miktarıyla dH₂O ile çözdürülerek 100 µM'lık stok solüsyon halinde hazırlandı ve stok solüsyon 10 µM'lık olacak şekilde alikotlandı. Kullanılan primerlere ait baz dizisi ve diğer bilgiler Tablo 3.5'te sunulmuştur.

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan primerler, primer dizilimleri, Tm (°C) değerleri ve aplikon uzunlukları

Hedef gen	GenBank erişim kodu	Yön	Primer dizilimi (5'-3')	Tm (°C)	Aplikon uzunluğu
<i>KISS1</i>	NM_002256.4	F	CCACCTCTGGACATTCACC	61	148
		R	GCTGCCAAGAAACCAGTGAG	59	
<i>KISS1R</i>	NM_032551.5	F	CCCCTCTCTCTGAGCGGACC	63	163
		R	CACAACGAAACTGCACCGAAC	60	
<i>CATSPER1</i>	NM_053054.4	F	CAACACGATGAGTCCCAGCA	59	93
		R	TTCATGATGACGGGACCTGC	59	
<i>AKAP4</i>	NM_003886.3	F	CTTGAGGCAGACTGGAAGAGT	60	143
		R	TACCTTGACACACACCCCCTGT	59	
<i>GAPDH</i>	NM_002046.7	F	TCGGAGTCAACGGATTTGGT	57	181
		R	TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC	59	

Gen ifade analizlerine başlamadan önce optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bu kapsamda, primerlerin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için her primer çifti için PCR Master Mix (2X) (K0171, Thermo Scientific™, Almanya) kullanılarak konvansiyonel PCR yöntemi uygulandı. Çalışmamızda, KİTAM, OMÜ bünyesinde bulunan GenePro termal döngüleyici (Bioer Technology, Çin) cihazı kullanıldı. Tablo 3.6 ve Tablo 3.7’de belirtilen reaksiyon koşullarına göre primerler test edildi.

Tablo 3.6. PCR reaksiyon hazırlık protokolü

Reaksiyon bileşenleri	Hacim
PCR master mix (2x)	25 µl
Forward primer (10 µM)	1 µl
Reverse primer (10 µM)	1 µl
cDNA (300 ng)	4 µl
RNaz/DNaz içermeyen su	19 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 3.7. PCR döngü koşulları

Basamaklar	Süre	Sıcaklık	Döngü sayısı
Enzim aktivasyonu	3 dak.	95°C	1
Denatürasyon	30 sn.	94°C	
Primer bağlanması	30 sn.	Tm	40
Uzama	60 sn.	72°C	
Erime eğrisi	15 dk.	72°C	1

100 ml 1x Tris/Borate/EDTA (TBE) tamponu ile 2 gr agaroz (Sigma-Aldrich, Almanya) karışımı mikrodalga cihazında kaynatılarak yürütme jeli hazırlandı. Hazırlanan jelin sıcaklığı 65-70°C arasına gelince, jel içerisine 0,05 µl etidyum bromid (EtBr, 100 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, ABD) eklendi ve yatay elektroforez cihazına yerleştirilmeye uygun olan bir kalıba döküldü. Jel hazır olunca, 1xTBE tamponu bulunan elektroforeze yerleştirildi ve PCR reaksiyonundan elde edilen ürünler kuyucuklara yüklenerek 90 V’ta 90 dakika yürütüldü. Referans standart olarak

GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı. Bantlar, Biorad Chemi-Doc Sistemi (Biorad, Germany) kullanılarak görselleştirildi. İlgili gen bölgelerine ait bantlar, referans bant aralığına göre değerlendirildi ve beklenen ürün uzunluğu ile aynı ölçütlerde olup olmadığı tayin edildi. Primerlere ait bantlar görüntülenene kadar, farklı sıcaklıklarda primerlerin bağlanması test edildi.

Örnek konsantrasyonu ve primer bağlanma sıcaklığına ilişkin optimizasyonların gerçekleştirilmesini takiben kitin önerdiği protokol çerçevesinde reaksiyon buz üzerinde hazırlandı (Tablo 3.8). Gen ifade analizinde kullandığımız kıyaslama yönteminde, reaksiyon başlangıcındaki örnek miktarının her olgu için standardize edilmesi önem göstermektedir. Çalışmamızda, PCR reaksiyonlarında ortalama 300 ng cDNA kullanılması planlandığı için tüm örnekler dilüe edilerek standardize edildi.

Tablo 3.8. qRT-PCR reaksiyon hazırlık protokolü

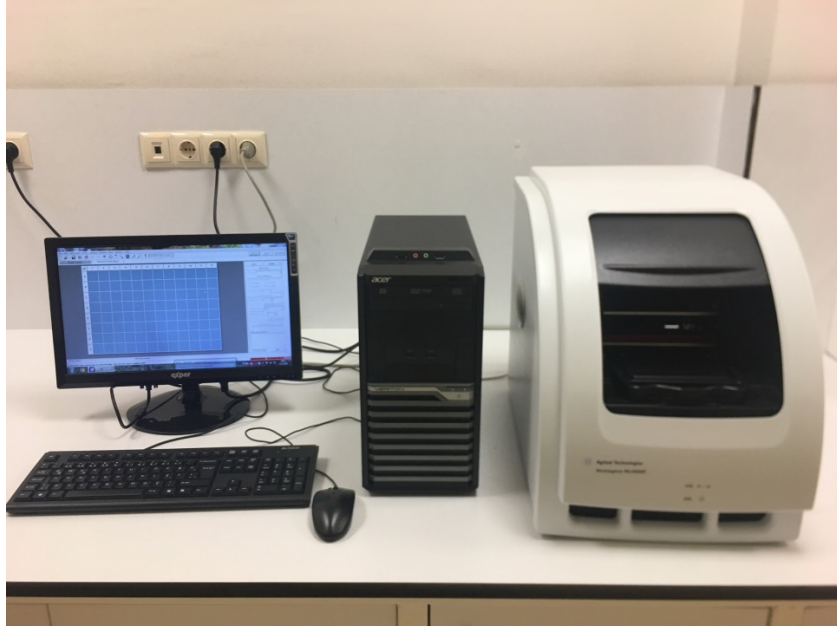
Reaksiyon bileşenleri	Hacim
2xQuantitect SYBR Green PCR Master Mix	25 µl
Forward primer (10 µM)	1,5 µl
Reverse primer (10 µM)	1,5 µl
cDNA (300 ng)	3 µl
RNaz bulunmayan su	19 µl
Toplam hacim	50 µl

Reaksiyon döngü koşulları primerlerin Tm sıcaklıklarının optimizasyonu sonucu düzenlendi. Tablo 3.9’da paylaşılan döngü koşullarına göre reaksiyonlar gerçekleştirildi.

Tablo 3.9. qRT-PCR döngü koşulları

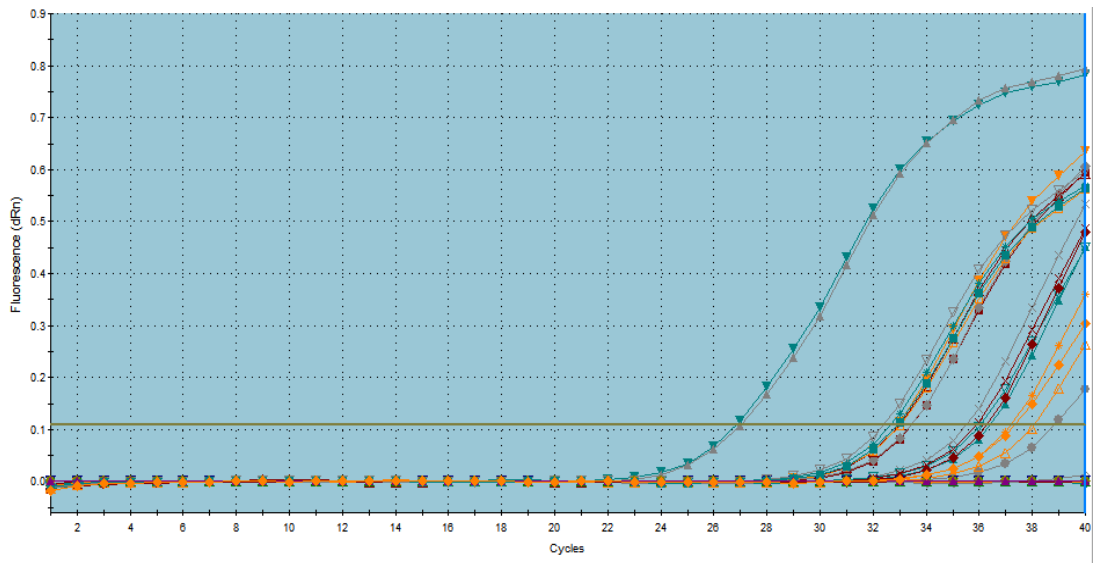
Basamaklar	Süre	Sıcaklık
Enzim aktivasyonu	15 dak.	95°C
Denatürasyon	15 sn.	94°C
Primer bağlanması	30 sn.	60°C
Uzama	30 sn.	72°C
Erime eğrisi	Her derecede 25 ölçüm gerçekleştirilir	65-95°C

Çalışmamızda kullanılan gerçek zamanlı termal döngüleyici cihaz Şekil 3.11’te sunulmuştur. Pilot çalışmada, ışımaya değerlerinin sınırı aşım aşmadığı, farklı örneklerle ait Ct değerleri ve doğru amplikonun amplifiye edildiğinden emin olmak için erime sıcaklıkları dikkatle değerlendirildi. Ardından tüm örnekler sırayla 96’lık mikropalakalarda reaksiyona tabi tutuldu.



Şekil 3.11. Gerçek zamanlı termal döngüleyici cihazı (Agilent Technologies Stratagene Mx3000P, Santa Clara, CA, USA), KİTAM, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Yaklaşık 2 saat süren qRT-PCR reaksiyonunu takiben, tüm gruplardaki genlere ait CT değerleri görüntüledi (Şekil 3.12). qRT-PCR’da PCR ürünündeki anlamlı artışın gözlemlendiği ilk döngü ekspansiyonel fazda görüntülenir ve bu genellikle başlangıç materyalindeki gen ifade düzeyi ile doğru orantılıdır. Bu nedenle, başlangıç materyalinde ifade düzeyi yüksek olan genler ekspansiyonel faza daha erken girecektir. Çalışmamızda da ekspansiyonel fazda görüntülenen Ct değerleri istatistiksel analizler için kaydedildi.



Şekil 3.12. Gerçek zamanlı termal döngüleyici cihazı ekranında qRT-PCR esnasında dsDNA’nın yaydığı floresan ışınma değerlerinin döngü grafiğinin görüntülenmesi

Gen ifade analizinde internal kontrol geni olarak kullanılan *GAPDH* genine ait Ct değerleri referans Ct değeri olarak kabul edildi ve diğer gen ifadelerine ait değerler normalize edildi. Hesaplamalar kıyaslamalı Ct metodu olan delta-delta Ct metodu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) kullanılarak gerçekleştirildi (Livak ve Schmittgen, 2001). Deney ve kontrol grubundaki olgulara ait referans ve hedef genlerin ortalama Ct değerleri hesaplandı (Tablo 3.10). Aşağıdaki, denklem kullanılarak NZ grubunda *KISS1* geni için örnek bir hesaplama gösterilmektedir. Sonuçlar, gen ifade düzeyinin kaç kat değiştiğini göstermektedir.

Tablo 3.10. qRT-PCR sonuçlarının $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile hesaplanması

Genler	NZ	NZK
<i>GAPDH</i> (referans gen)	A	C
<i>KISS1</i>	B	D

Ct değerleri harflerle temsil edilmektedir

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ algoritması ile gen ifadelerinin normalize edildiği denklem;

$$\Delta Ct = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{referans gen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{deney grubu}) - \Delta Ct (\text{kontrol grubu})$$

$$\text{Örneğin } KISS1 \text{ için} = 2^{-(Ct (D) - Ct (C)) - (Ct (B) - Ct (A))}$$

olacak şekilde düzenlenerek ifade edilir.

3.7. İstatiksel Analizler

Çalışmada elde edilen tüm veriler, istatiksel analizlerin gerçekleştirilebilmesi için sayısal veriye dönüştürüldü. Her grupta olgulara ait incelenen tüm parametrelerin, ortalaması, standart sapması, standart hatası ve değişim katsayısı (DK) hesaplandı.

Gruplar arası karşılaştırmaların yapıldığı tablo ve grafiklerde grup ortalamaları, standart hata (SH) ile sunulmuştur. Gruba ait özellikleri ifade eden veriler ise ortalama ve standart sapma (SD) ile birlikte sunulmuştur. İstatiksel değerlendirmeler SPSS programı (SPSS version 25,0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve $p < 0,05$ düzeyindeki farklılıklar istatiksel olarak anlamlı, $p < 0,01$ düzeyindeki farklılıklar istatiksel olarak ileri düzeyde anlamlı ve $p < 0,001$ düzeyindeki farklılıklar istatiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı olarak değerlendirildi.

Biyokimyasal verilerin istatiksel değerlendirilmesinde, standart eğrisi grafiği baz alınarak numune konsantrasyonları hesaplandı ve semen/serum parametreleri

şeklinde sınıflandırıldı. Olgulara ait verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini test etmek için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Her iki kategoride verilerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi ($p>0,05$). Elde edilen sayısal veriler SPSS programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Grupların karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi One-Way ANOVA, Tukey testi kullanıldı.

Hücre içi kalsiyum yoğunluğuna dair verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde, her olguya ait duplike ölçüm sonuçlarının ortalaması alındı. Olgulara ait veriler, KP-13 uygulanan ve uygulanmayan şeklinde her grupta kategorize edildi. Olgulara ait verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini test etmek için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Her iki kategoride verilerin normal dağılım gösterdiği tespit edildi ($p>0,05$). Elde edilen sayısal veriler SPSS programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Grupların karşılaştırılmasında iki yönlü varyans analizi Two-Way ANOVA, Tukey testi kullanıldı.

Gen ifade düzeylerinin normalize edilmesinden sonra elde edilen verilerin normal dağılım gösterip göstermediğini test etmek için Shapiro-Wilk testi uygulandı. Verilerin normal dağılıma uygun olmaması ($p<0,05$) ve her grupta örnek sayısının 30'un altında olması sebebiyle non-parametrik testlerin kullanılmasına karar verildi. İkili karşılaştırmalarda Wilcoxon Signed Rank Testi, ikiden fazla grupların karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis Testi uygulandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Gönüllülerden alınan örneklerin analiz ve değerlendirme bulguları kategorik olarak aşağıda sunulmuştur.

4.1. Demografik Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllü hastaların yaş ve vücut kitle indeksi ortalamaları (VKİ; kg/m²) Tablo 4.1’de sunulmuştur.

Tablo 4.1. Gönüllülere ait demografik veriler

	Yaş*	VKİ* (kg/m ²)
NZ	32,90±3,60	26,93±1,85
AZ	23,80±3,22	25,96±1,47
OAZ	35,10±2,64	27,49±1,85
OATZ	32,40±4,11	26,16±2,36

NZ: Normozoospermi

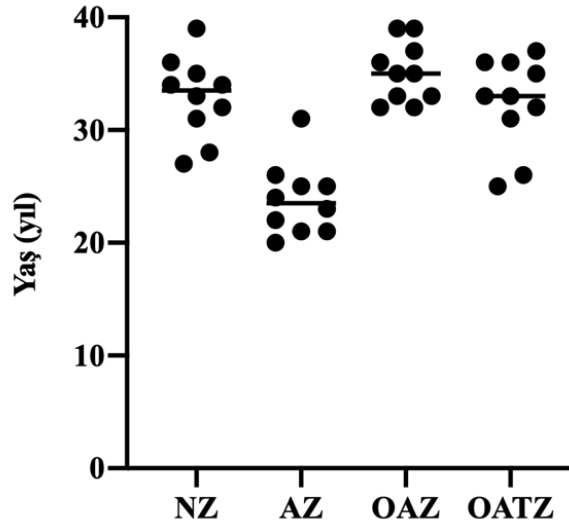
AZ: Astenozoospermi

OAZ: Oligoastenozoospermi

OATZ: Oligoastenoteratozoospermi

* ortalama±SD

Gönüllülere ait yaş dağılım grafikleri ayrıca Şekil 4.1’de paylaşılmıştır. Astenozoospermi tanısı ile çalışmaya katılan olguların yaş ortalamasının, diğer gruplara kıyasla daha küçük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.1. Gönüllülere ait yaş dağılımı

4.2. Semen Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Olgulara ait semen örnekleri DSÖ (2010) kriterlerine göre değerlendirilmiş, tüm gruplara ait veriler Tablo 4.2’de sunulmuştur.

Tablo 4.2. Semen parametrelerine ait bazal değerler

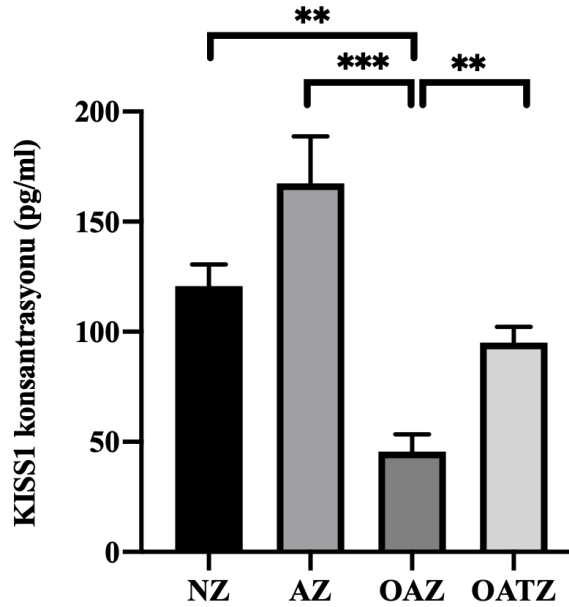
	NZ*	AZ*	OAZ*	OATZ*	
Hacim (ml)	2,5±0,57	2,5±0,41	2,37±0,48	2,25±0,29	
Cinsel perhiz süresi (gün)	3,25±0,5	3,00±0,5	3,50±0,58	3,25±0,5	
Lökosit sayısı (10 ³ /ml)	300±141,4	400±81,65	375±95,74	250±57,74	
Sperm parametreleri	Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	22,00±1,15	16,75±0,96	11,25±1,5	5,62±3,98
	Total sperm sayısı (10 ⁶)	55,00±13,04	25,75±9,95	12,15±5,86	4,25±2,98
	Total progresif motil sperm sayısı (10 ⁶)	20,25±6,85	6,15±2,64	2,85±1,19	1,11±0,88
Motilite parametreleri	İleri hareketli (Progresif) (%)	37,00±5,42	16,75±6,75	10,75±3,59	8,50±2,64
	Yerinde hareketli (%)	6,25±1,26	5,50±1,29	5,50±1,29	9,00±2,95
	Hareketsiz (İmmotil) (%)	56,75±4,50	77,75±6,08	83,75±4,79	82,50±2,89
	Motilite (A+B) (%)	43,25±4,50	22,25±6,08	28,50±4,79	17,50±2,89
Morfoloji parametreleri	Normal (%)	4,75±0,96	4,50±0,58	3,50±1,29	1,75±0,95
	Anormal (%)	95,25±0,95	95,50±0,58	96,50±1,29	98,25±0,95

* ortalama±SD

4.3. Biyokimyasal Analizlerden Elde Edilen Bulgular

4.3.1. Semen KISS1 Düzeyinin Değerlendirilmesi

Semen örneklerinde KISS1 konsantrasyonunun değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler, aşağıdaki grafikte sunulmuştur (şekil 4.2).

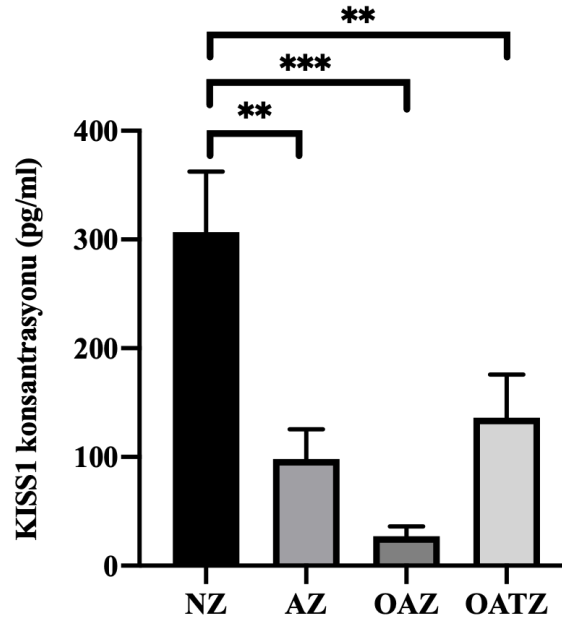


şekil 4.2. Semen KISS1 düzeyinin gruplar arasındaki farkını gösteren grafik (ortalama ±SH)
** p<0,01, *** p<0,001

Semende KISS1 konsantrasyon düzeyinin değerlendirmesi sonucunda, AZ grubunda diğer gruplara oranla belirgin bir artış gözlenmesine rağmen NZ grubu ile aralarında istatikselsel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,1009$). Buna karşın, AZ grubu ile OATZ grubu arasında ileri düzeyde ($p=0,0088$) ve OAZ grubu ile arasında çok ileri düzeyde istatikselsel olarak anlamlı bir fark görölmüştür ($p=0,0001$). En düşük KISS1 düzeyi OAZ grubunda gözlenmiştir. OAZ ile NZ grubu arasında ileri düzeyde anlamlı fark görölmürken ($p=0,0067$), OAZ ile OATZ grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p=0,778$).

4.3.2. Serum KISS1 Düzeyinin Değerlendirilmesi

Serum örneklerinde KISS1 konsantrasyonunun değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler grafikte sunulmuştur (şekil 4.3).



şekil 4.3. Serum KISS1 düzeyinin gruplar arasındaki farkını gösteren grafik (ortalama \pm SH)
** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Serumda KISS1 konsantrasyon düzeyinin değerlendirmesi sonucunda, NZ grubu ile AZ grubu arasında istatikselsel olarak ileri düzeyde ($p=0,0086$), OAZ grubu ile çok ileri düzeyde ($p=0,0009$) ve OATZ grubu arasında ileri düzeyde ($p=0,0305$) istatikselsel farklılık saptanmıştır. Buna karşın, serum örneklerinde de en düşük KISS1 düzeyi OAZ grubunda gözlenmesine rağmen, OAZ grubu ile AZ grubu arasında ($p=0,5488$) ve OAZ grubu ile OATZ grubu arasında ($p=0,2146$) istatikselsel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ek olarak, AZ ve OATZ grupları arasında da istatikselsel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p < 0,05$).

4.4. Hücre İçi Kalsiyum Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

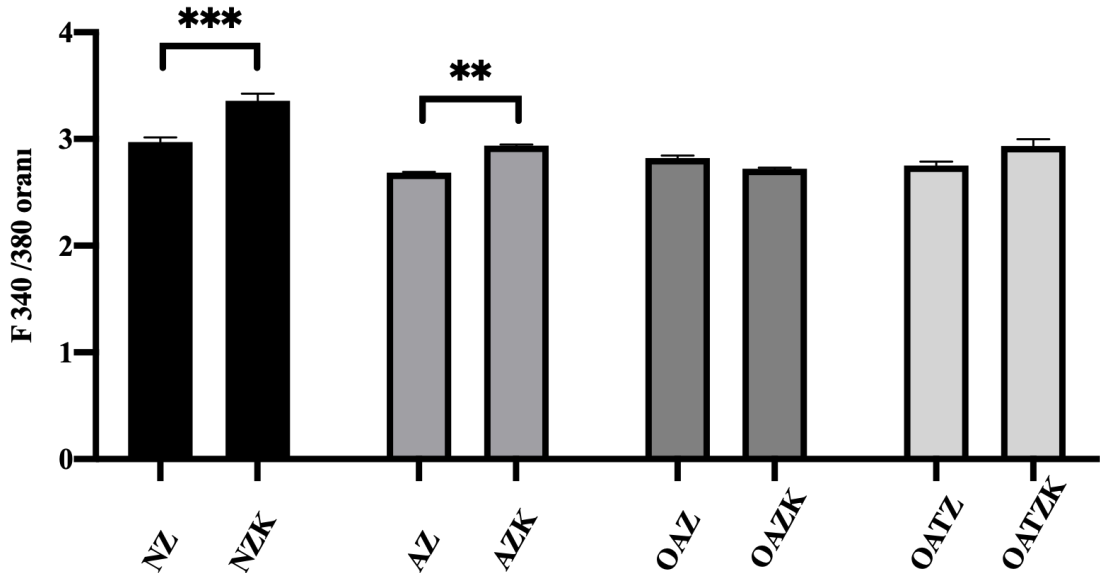
Çalışma kapsamında KP-13 uygulaması sonucu hücre içi kalsiyum konsantrasyonundaki değişim floresan spektrofotometre ve floresan ataçmanlı lazer taramalı konfokal mikroskop ile analiz edilmiştir.

4.4.1. Spektrofluometre ile Hücre İçi Ca²⁺ Oranlarının Değerlendirilmesi

Fura 2-AM yüklenen sperm örneklerinde, hücre içi kalsiyum düzeylerindeki değişimin floresan spektrofotometre ile değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.4'te sunulmuştur.

NZ ve KP-13 uygulanan NZK örnekleri istatistiksel olarak analiz edildiğinde, NZK grubunda artan yönde çok ileri düzeyde anlamlı fark çıkmıştır ($p < 0,0001$). AZ ve AZK arasında anlamlı düzeyde fark görülmüştür ($p = 0,007$). OAZ ve OATZ gruplarında KP-13 uygulaması neticesinde istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamıştır.

Gruplar arası değerlendirme yapıldığında, NZ ve OATZ arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir ($p = 0,0289$). KP-13 uygulaması sonrasında ise, NZK grubu ile AZK, OAZK ve OATZK grupları arasında istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0,0001$). KP-13 uygulanan AZK ve OAZK ile OAZK ve OATZK grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p < 0,05$).



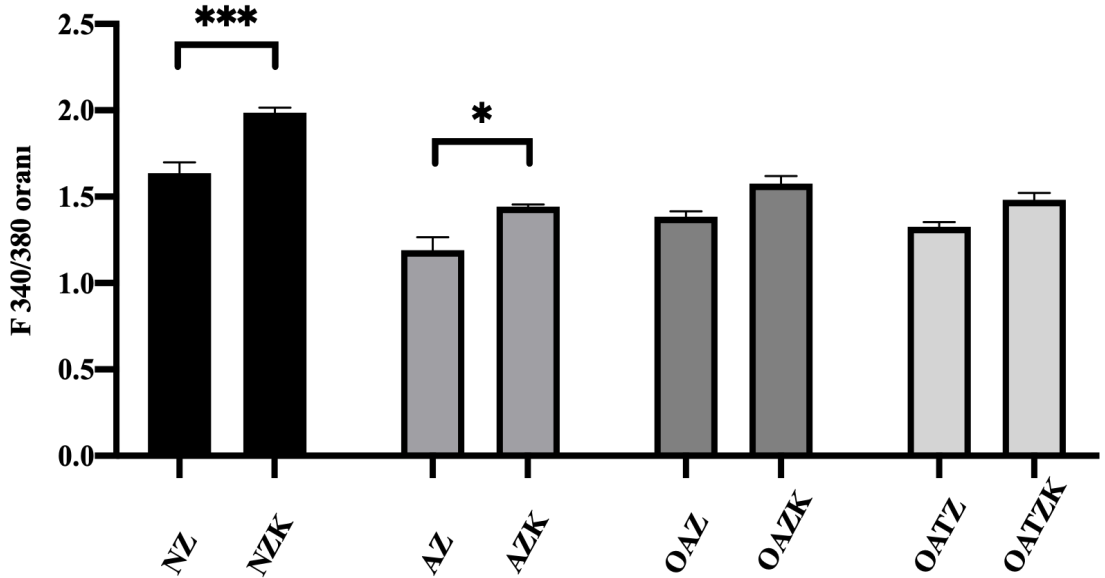
Şekil 4.4. KP-13 uygulama öncesi ve sonrası hücre içi kalsiyum yoğunluk farkının floresan spektrofotometre ile analiz sonuçları (ortalama±SH) gösterilmektedir
** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4.4.2. Floresan Ataçmanlı Konfokal Mikroskop ile Hücre İçi Ca²⁺ Oranlarının Değerlendirilmesi

Fura 2-AM yüklenen sperm örneklerinde, hücre içi kalsiyum düzeylerindeki değişimin floresan ataçmanlı lazer taramalı konfokal mikroskop ile değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler Şekil 4.5'te sunulmuştur.

NZ ve KP-13 uygulanan NZK örnekleri arasında istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p=0,009$). AZ ve AZK arasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,017$). OAZ ve OATZ gruplarında, KP-13 uygulaması neticesinde gruplar içerisinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.

Gruplar arası değerlendirme yapıldığında, NZ ve AZ, OAZ ve OATZ grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0,05$). Gruplara KP-13 uygulaması neticesinde ise, NZK ile AZK, OAZK ve OATZK grupları arasında çok ileri düzeyde istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,0001$). AZK, OAZK ve OATZK grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$).



Şekil 4.5. KP-13 uygulama öncesi ve sonrası hücre içi kalsiyum yoğunluk farkının konfokal mikroskop ile analiz sonuçları (ortalama±SH) gösterilmektedir
* $p<0,05$, *** $p<0,001$

4.5. Gen İfade Düzeylerinin Analizlerinden Elde Edilen Bulgular

4.5.1. Total RNA Konsantrasyonları ve Saflık Oranları

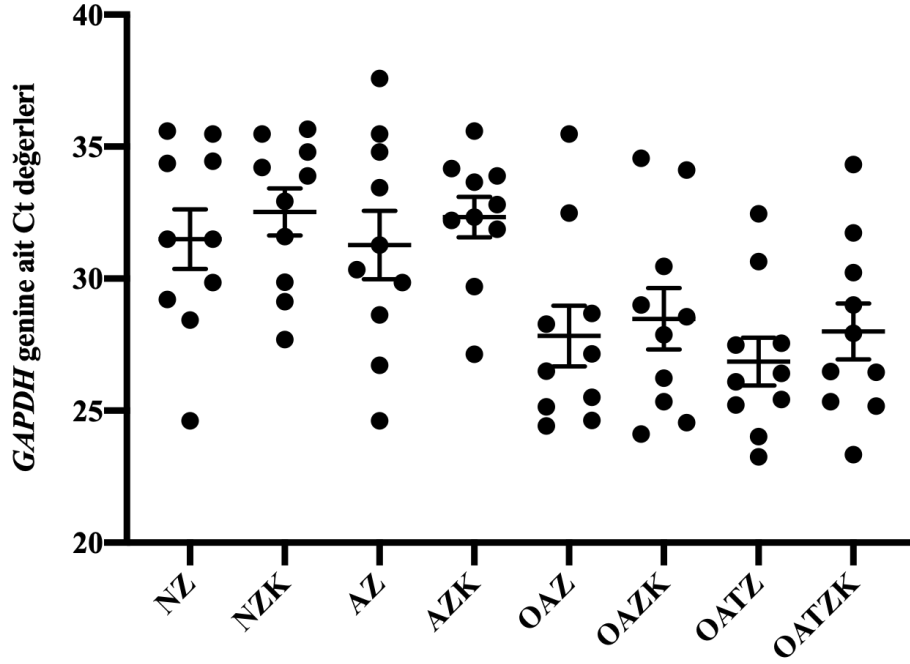
Total RNA izolasyonu sonrası elde edilen örneklere ait konsantrasyonlar ve saflık oranları Tablo 4.3'te sunulmuştur. Olgulara ait RNA örnek konsantrasyonları, ileri analizlerin devamı için yeterli miktarda olduğu görülmüştür.

Tablo 4.3. İzole edilen RNA konsantrasyonları ve saflık oranları (A260/280)

Gruplar	Hasta No	RNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)		A260/280	
		Kontrol	KP-13	Kontrol	KP-13
NZ	1	404,5	560,3	1,82	1,88
	2	469,5	522,6	1,95	1,91
	3	368,8	771,5	1,79	1,86
	4	302,2	1063,2	1,96	1,82
	5	581,5	788,3	1,73	1,72
	6	1035,3	680,1	1,73	1,68
	7	1268,9	780,1	1,79	1,62
	8	820,8	711,2	1,70	1,67
	9	1135,7	758,5	1,68	1,71
	10	159,1	216,7	1,55	1,62
AZ	1	654,3	762,4	1,92	1,98
	2	757,2	655,4	1,68	1,73
	3	873,8	765,3	1,81	1,82
	4	489,1	362,1	1,86	1,81
	5	984,2	918,4	1,93	1,91
	6	755,2	883,2	1,77	1,83
	7	631,5	463,7	1,89	1,74
	8	510,2	831,1	1,69	1,85
	9	735,1	853,2	1,88	1,81
	10	945,7	987,9	1,78	1,72
OAZ	1	769,6	1016,9	1,94	1,98
	2	322,5	572,6	1,75	1,71
	3	352,3	279,9	1,79	1,71
	4	412,6	614,3	1,67	1,74
	5	781,2	380,4	1,77	1,71
	6	248,3	472,2	1,74	1,67
	7	264,6	380,5	1,72	1,69
	8	425,8	618,3	1,80	1,87
	9	239,5	352,7	1,88	1,77
	10	553,3	315,6	1,75	1,67
OATZ	1	381,5	435,2	1,93	1,97
	2	456,3	352,4	1,75	1,81
	3	412,7	361,7	1,82	1,81
	4	352,3	461,4	1,86	1,85
	5	483,5	392,1	1,93	1,92
	6	348,2	430,5	1,74	1,78
	7	713,4	655,3	1,69	1,72
	8	523,2	341,3	1,60	1,57
	9	137,3	235,2	1,78	1,61
	10	254,3	246,3	1,89	1,82

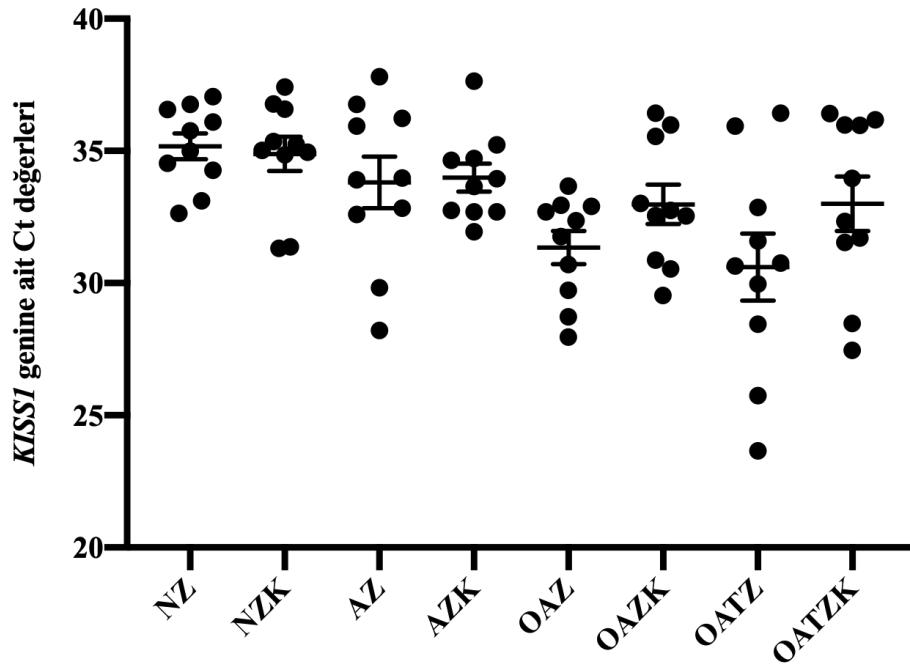
4.5.2. Gen İfade Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Her orguda incelenen *GAPDH*, *KISS1*, *KISS1R*, *CATSPER1* ve *AKAP4* genlerine ait Ct değerlerinin ortalaması alınmış ve normal dağılım göstermedikleri tespit edilmiştir. Gruplara ait *GAPDH* geni ortalama Ct değerleri Şekil 4.6’da sunulmuştur.



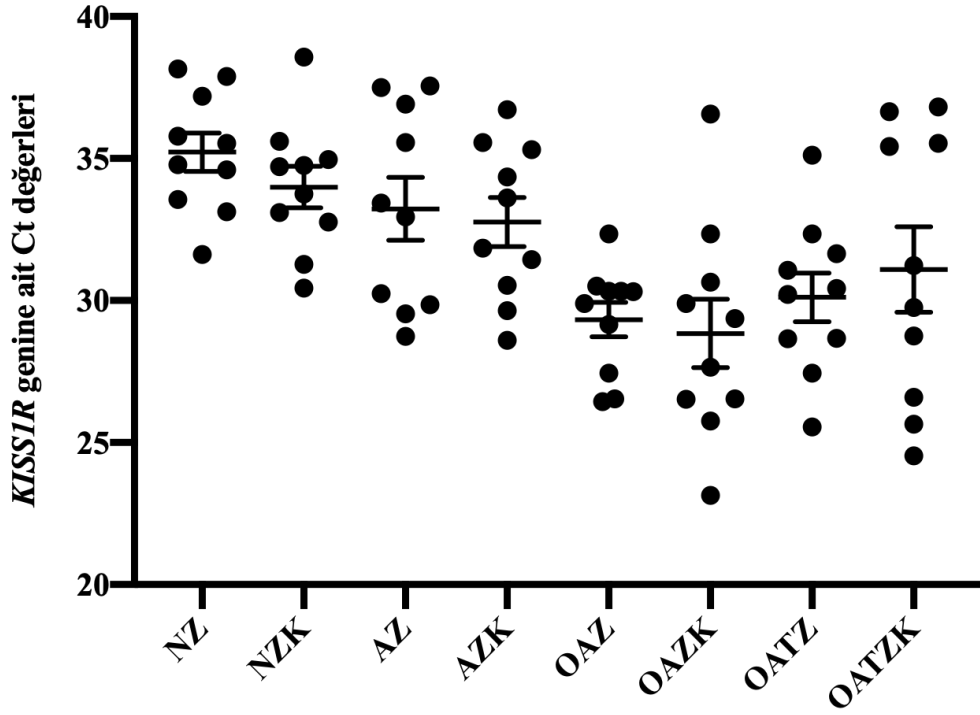
Şekil 4.6. *GAPDH* genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi

Gruplara ait *KISS1* geni ortalama Ct değerleri Şekil 4.7’de sunulmuştur.



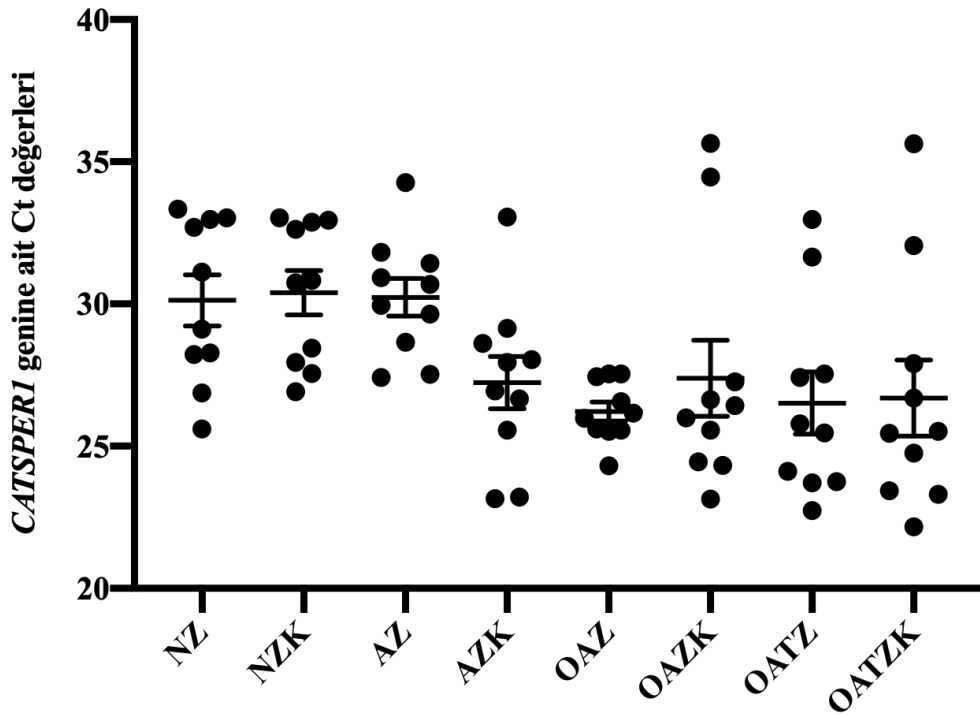
Şekil 4.7. *KISS1* genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi

Gruplara ait *KISS1R* geni ortalama Ct değerleri Şekil 4.8’de sunulmuştur.



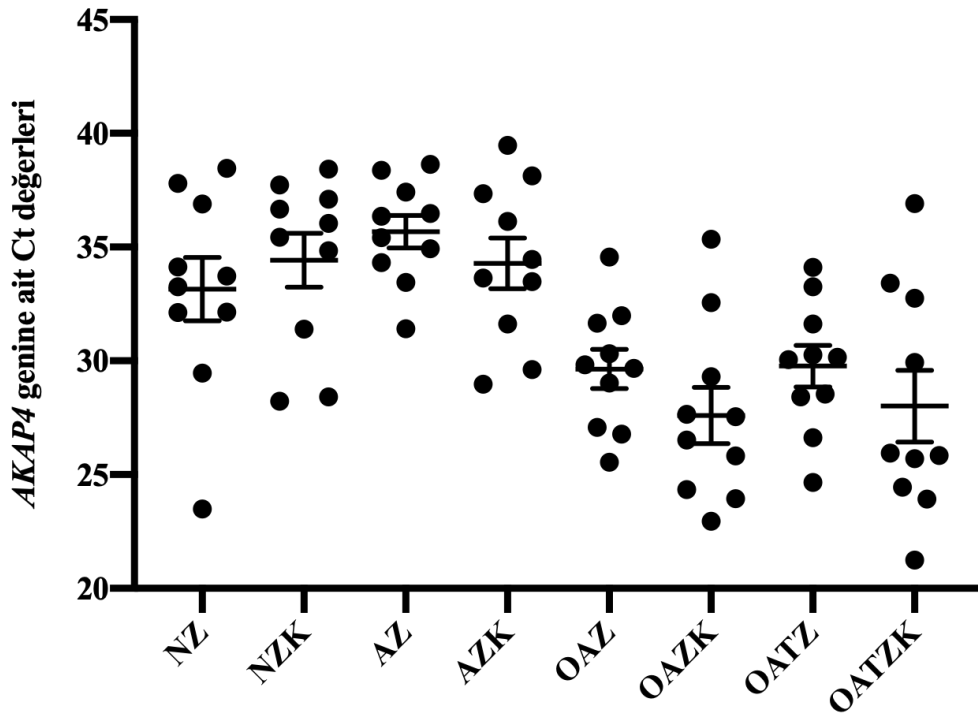
Şekil 4.8. *KISS1R* genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi

Gruplara ait *CATSPER1* geni ortalama Ct değerleri Şekil 4.9’da sunulmuştur.



Şekil 4.9. *CATSPER1* genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi

Gruplara ait *AKAP4* geni ortalama Ct değerleri Şekil 4.10’da sunulmuştur.



Şekil 4.10. *AKAP4* genine ait Ct değerlerinin (ortalama±SH) gösterimi

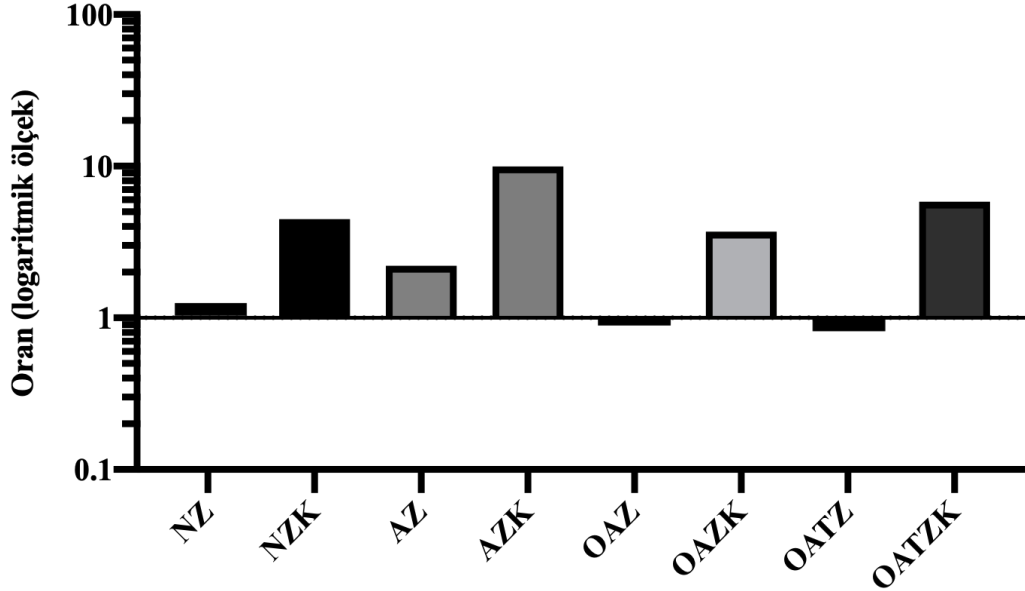
Elde edilen ortalama Ct değerlerinin normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile hesaplanması neticesinde log2 katsayı dönüŐümü yaparak katsal deęiŐimler hesaplanmıŐtır. KP-13 uygulama öncesi ve sonrası grup içi gen ifade düzeylerindeki değişime ait istatikselsel sonuçlar Tablo 4.4’te sunulmuştur. NZ ve NZK grupları arasında *KISS1R* gen ifadesi açısından ileri düzeyde anlamlı fark olduğu görülürken ($p<0,01$), AZ ve AZK grubunda *CATSPER1* gen ifade düzeyinin ($p<0,001$) ve *AKAP4* gen ifade düzeyinin ($p<0,01$) yukarı yönlü anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır. OAZ ve OAZK ile OATZ ve OATZK grupları arasında *AKAP4* gen ifade düzeyinde yukarı yönlü istatikselsel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık gözlenmiştir ($p<0,01$).

Tablo 4.4. Tüm gruplardaki gen ifade değişimlerine ait p değerleri tablosu

	<i>KISS1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CATSPER1</i>	<i>AKAP4</i>
NZ	0,130	0,006**	0,084	0,492
NZK				
AZ	0,105	0,064	0,0009***	0,009**
AZK				
OAZ	0,556	0,105	0,322	0,009**
OAZK				
OATZ	0,193	0,193	0,130	0,009**
OATZK				

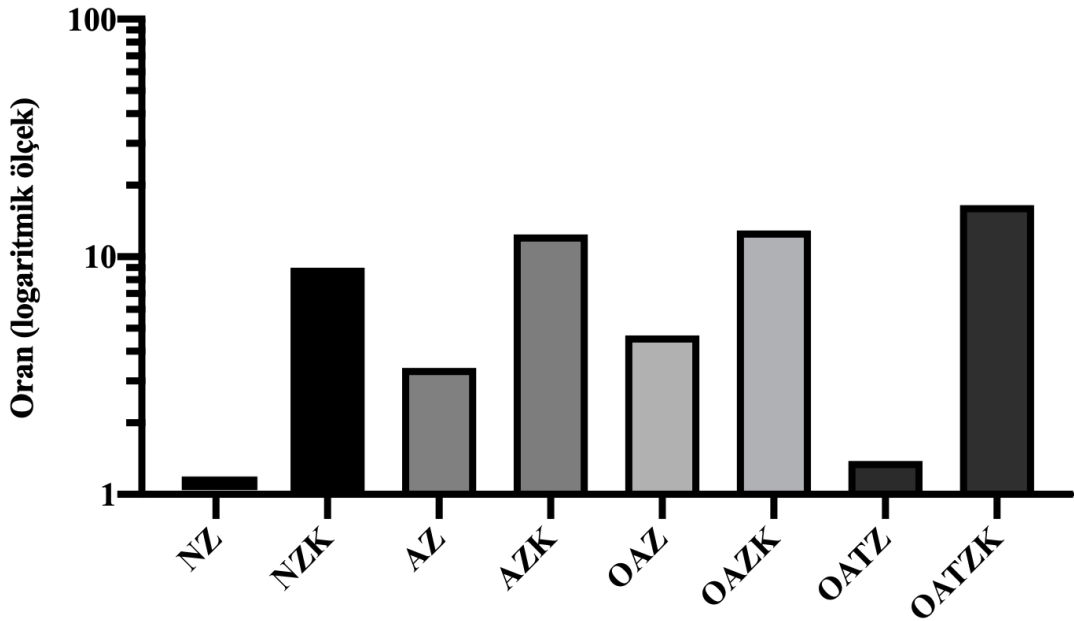
** $p<0,01$; *** $p<0,001$

KP-13 uygulaması öncesi ve sonrası *KISS1* gen ifade oranlarında gözlenen değişim Şekil 4.11’de sunulmuştur. KP-13 uygulanan gruplar arasında *KISS1* gen ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).



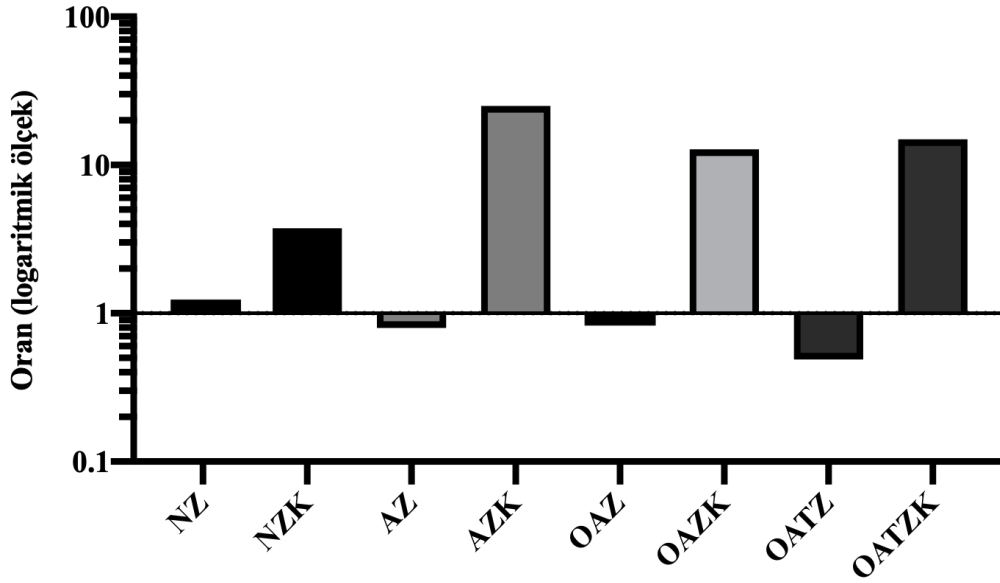
Şekil 4.11. *KISS1* gen ifade değişiminin gruplar arası oransal farkının gösterimi

KP-13 uygulama öncesi ve sonrası *KISS1R* gen ifade oranlarında gözlenen değişim Şekil 4.12’de sunulmuştur. KP-13 uygulanan gruplar arasında *KISS1R* gen ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$).



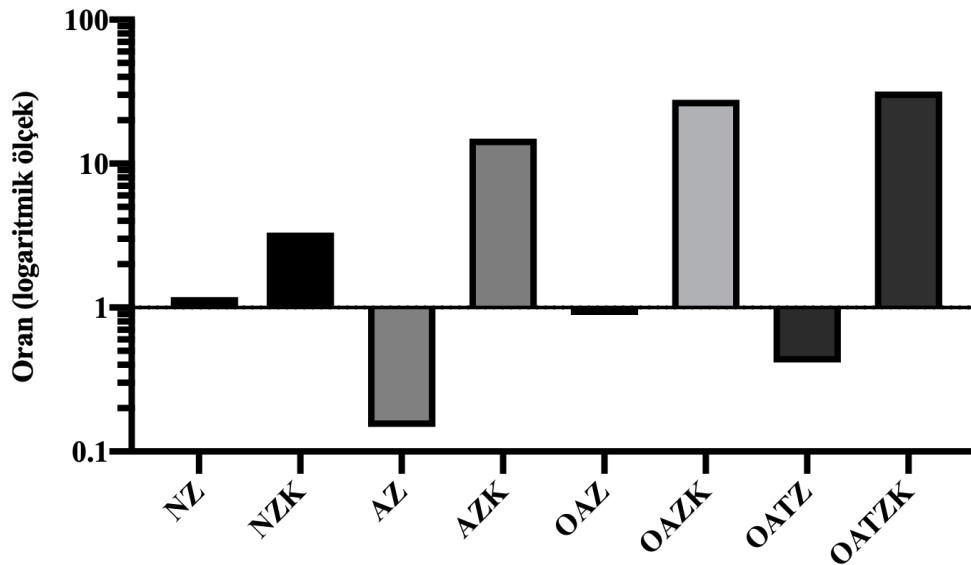
Şekil 4.12. *KISS1R* gen ifade değişiminin gruplar arası oransal farkının gösterimi

KP-13 uygulama öncesi ve sonrası *CATSPER1* gen ifade oranlarında gözlenen değişim Şekil 4.13'te sunulmuştur. KP-13 uygulanan gruplar arasında *CATSPER1* gen ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p < 0,05$). Özellikle NZK ve AZK grupları arasında yukarı yönlü düzenlemenin olduğu istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0,05$).



Şekil 4.13. *CATSPER1* gen ifade değişiminin gruplar arası oransal farkının gösterimi

KP-13 uygulama öncesi ve sonrası *AKAP4* gen ifade oranlarında gözlenen değişim Şekil 4.14'te sunulmuştur. KP-13 uygulanan gruplar arasında *AKAP4* gen ifadesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0,05$). Fakat, NZK ve OATZK grupları arasında yukarı yönlü düzenlemenin olduğu istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0,05$).



Şekil 4.14. *AKAP4* gen ifade değişiminin gruplar arası oransal farkının gösterimi

4.6. Bulguların Değerlendirilmesi

KISS1'in HPG aksını düzenlenmesindeki rolünü belirlemek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar arasında, serum ve seminal plazmada KISS1 konsantrasyon düzeyleri ve diğer hormonal veya sperm parametreleri ile ilişkisi değerlendirilerek KISS1 proteinin erkek üreme sistemi üzerindeki rolü aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bununla birlikte literatürde infertil erkeklerde KISS1 konsantrasyonu ile ilgili bilgiler, aşağıda da açıklandığı üzere, hala eksiklikler içermektedir. Ulaşılan sonuçlar, literatürdeki bilgilerin bir kısmı ile uyuşurken bir kısmı ile uyuşmamakta ve yeni bir bakış açısı doğurmaktadır.

Ramzan, vd., (2015) infertil erkeklerde, fertil erkeklere göre serum KISS1 konsantrasyonlarının azalmış olabileceği varsayımında bulunarak, literatürde ilk kez infertil alt kategorilerindeki erkek olgulara ait serum örneklerinde ELISA yöntemiyle KISS1 konsantrasyonunu tayin etmiştir. Buna göre, normozoospermik olgulara ait serum örneklerinde KISS1 miktarı 6,37 ng/ml olarak tayin edilirken, astenozoospermik olgularda 5,34 ng/ml, oligoastenozoospermik olgularda 4,72 ng/ml ve oligoastenoteratozoospermik olgularda 5,67 ng/ml olarak tespit edilmiştir. İfade edilen gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte, her grupta eşit sayıda olgu yer almayışı ve gruplara ait değerlerin dağılımının yüksek olması bir dezavantaj olarak öne çıkmaktadır. Buna ek olarak, bizim çalışmamız da serum KISS1 düzeyi bu çalışma verilerine oranla yaklaşık olarak 20 kat daha düşük tespit edilmiştir. Çalışmamızda ayrıca, normozoospermik olgulara ait serum KISS1 düzeyi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır. Çalışmamızda kullandığımız ELISA kitinin hassasiyet düzeyinin 37,5 pg/ml olması ve bahse konu olan diğer çalışmada kullanılan kitin hassasiyet düzeyinin 0,12 ng/ml düzeyinde sınırlı olması sonuçları etkileyen bir faktör olarak değerlendirilebilir.

Bu çalışmayı takiben Elmoutaleb, vd., (2017), azoospermik, oligozoospermik ve normozoospermik olgularda serum KISS1 konsantrasyonu düzeyini analiz etmiştir. Bu çalışma ile, Ramzan, vd., (2015) ekibinin çalışmasına yüksek oranda bir benzerlikle, KISS1'in HPG aksındaki etki mekanizması, testis fonksiyonundaki rolü ve KISS1 ile FSH, LH, testosteron hormonları arasındaki korelasyonları aydınlatmaya çalışmıştır. Buna göre normozoospermik olgulara ait veriler diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha yüksek çıkmıştır (Elmoutaleb, vd., 2017). Bu bulgu ile bizim çalışmamızda oligozoospermi karakteristiği gösteren gruplara oranla normozoospermik olgulara ait serum örneklerinde KISS1 miktarının istatistiksel olarak

yüksek çıkması benzerlik göstermektedir. Fakat, bu çalışmada normozoospermik olgulara ait serum örneklerinde KISS1 miktarı 115,3 ng/ml (42,9–451) olarak tayin edilmiş ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerden yaklaşık olarak 400 kat daha yüksek bulunmuştur.

Zou, vd., (2019) ise literatürde ilk kez seminal plazmada KISS1'in varlığını gösterip, seminal plazmandaki KISS1 konsantrasyonunun semen kalitesi ile pozitif korelasyonunu ortaya koymuştur. Bizim çalışmamızdakine benzer şekilde hassasiyet düzeyi yüksek bir ELISA kitinin kullanıldığı bu çalışmada, çalışmaya katılan 626 olguda ortalama serum KISS1 düzeyi 448,9 pg/ml (296,0-668,6) olarak bulunmuştur. Bu bulgu, çalışmamızda normozoospermik olgularda ortaya koyduğumuz 306,835 pg/ml düzeyindeki serum KISS1 konsantrasyonunu destekler niteliktedir. Ayrıca bu çalışmada seminal plazmadaki ortalama KISS1 düzeyi (28×10^6 pg/ml), kan plazmasındakinden 60,000 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu bulgu, semende KISS1 konsantrasyonu açısından çalışmamızla paralellik göstermemektedir. Bu noktada serum ve seminal sıvı analizinde farklı kitlerin ve dolayısıyla farklı standartların ve standart eğri formülünün kullanıldığını göz önünde bulundurmak önemli olabilir. Buna ek olarak, semen analizinde kullanılan kitin hassasiyet düzeyinin serum kitinde kullanılanlardan farklı olarak 0,078 ng/ml düzeyinde sınırlı olması sonuçları etkileyen başka bir faktör olarak değerlendirilebilir. Bu çalışmanın en sınırlayıcı faktörü ise, toplanan örneklerin çalışmanın yürütüldüğü bölgedeki üniversitelerde eğitim gören 20'li yaşlardaki sağlık problemi olmayan erkek öğrencilere ait olmasıdır. Toplanan örneklerde herhangi bir infertilite kategorizasyonu yapılmamıştır. Bu nedenle, infertil alt kategorilerde seminal plazmadaki KISS1 düzeyi bilinmezliğini korumuştur (Zou, vd., 2019).

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, serumda KISS1 düzeyi ve fertilité arasındaki korelasyona veya semendeki KISS1 düzeyi ve semen kalitesi arasındaki ilişkiye dair yapılan önermelerle paralellik arz etmemektedir. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilmemiş olsa da AZ grubunda semen KISS1 düzeyi NZ grubundan daha yüksek görülmüştür. Buna ek olarak, NZ ve AZ grupları ile OAZ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür. OAZ ve OATZ gruplarında semen örneklerindeki KISS1 düzeyinin azlığı, sperm sayısı azlığından dolayı protein ifade düzeyinin nispeten diğer gruplara oranla düşük kaldığı öne sürülebilir. Fakat, AZ grubuna ait semen örneklerinde KISS1 düzeyinin yüksek olması daha kompleks bir mekanizmaya işaret edebilir. Muhtemel sebeplerden bir tanesi, KISS1 proteininin

spermin motilite kabiliyeti kazanması aşamasında fonksiyonel işlev gören bir protein olabileceğidir. AZ grubunda motilite problemi yaşanan spermeler tarafından yüksek miktarda tüketilmediği ve dolayısıyla semende *KISS1* konsantrasyonunun daha yüksek düzeyde kalıyor olabileceği şeklinde öne sürülebilir. Ancak bu öneriyi destekleyebilmek için çok daha geniş popülasyonda ve/veya aynı olgudan birden fazla temin edilebilecek örneklerle analizlerin artırılması gerekebilir. AZ grubuna ait semen örneklerinin proteomik analizinin yürütüldüğü bir çalışmada ise, sperm motilitesini teşvik eden bazı proteinlerin aşırı miktarda üretildiği gözlenmiş ve bu durumun azalmış sperm motilitesini telafi edici bir mekanizma olarak ortaya çıktığı öne sürülmüştür (Cao, vd., 2018). Çalışmamızda biyokimyasal bulguların benzer bir şekilde yorumlanabilmesi mümkündür. Hemostazı korumak amacıyla eksik olanın telafisi için fazla miktarda üretimi yapılan maddeler mevcuttur. AZ grubunda motilite ile ilişkili bir protein olan *KISS1*'in fazla üretimi söz konusu olabilir. Çalışmamızda, AZ grubunda *KISS1*'in daha yüksek ifade düzeyini destekler nitelikte, AZ grubunda NZ grubuna kıyasla daha yüksek düzeyde *KISS1* gen ifadesinin gerçekleştiği gözlenmiştir.

Kalsiyum sinyalizasyonunun, sperm fonksiyonlarının düzenlenmesinde çok önemli roller oynadığı bilinmektedir (Felix, 2005). Hiperaktivasyon ve kemotaksi dahil olmak üzere motilitenin kontrolü, flagellumun ana parçasında ve orta parçada hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonuna bağımlı olarak düzenlenmektedir (Eisenbach ve Giojalas, 2006; Yanagimachi, 1994). Bu nedenle, motilite ile ilgili potansiyel anomaliler anormal derecede düşük sitoplazmik kalsiyum ile ilişkilendirilebilmektedir (Luconi ve Baldi, 2003; Marquez, vd., 2007).

Astenozoospermi, sperm hareketliliğinin azalması veya olmaması ile karakterize olmasına rağmen, çoğu durumda etiolojisi bilinmemektedir. Daha önceki yıllarda yürütülen çalışmalarda, astenozoospermik hastalara ait spermelerin güçlü bir motilite uyarıcısı olan progesterona karşı zayıf yanıt verdiği gösterilmiştir (Espino, vd., 2009). Çalışmamızda hem floresan spektrofotometre hem de konfokal mikroskop analizlerimiz neticesinde, AZ grubundaki olgulara ait spermelerde NZ grubuna oranla daha düşük düzeyde kalsiyum konsantrasyonu saptanmıştır. Bu hasta grubunda spermde bozulmuş kalsiyum mobilizasyonunun daha düşük sperm hareketliliği ve bu hastaların üreme yeteneklerinin azalması ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (Beigi Harchegani, vd., 2019). Sonuçlarımız genel olarak literatürde daha önceden paylaşılan bilgiler ile uyumludur. Kalsiyum homeostazı, sperm hareketliliği ve erkek

kısırlığı arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Aslında, astenozoospermik hastalarda hem kalsiyum/kalmodulin kompleksinde hem de hücre içi kalsiyum seviyelerinde azalma gösterilmiştir (Meseguer, vd., 2004; Reyes, vd., 1987). Normozoospermik olgulardan alınan spermelerde kalsiyum yoğunluğu literatürdeki diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Bedu-Addo, vd., 2007; Blackmore, 1993; Castellano, vd., 2003; Harper, vd., 2005). Ayrıca, KP-13 maruziyeti sonrası NZ ve AZ gruplarında belirgin kalsiyum artışı gözlenmiştir. Bu artış NZ ve NZK arasında çok ileri düzeyde istatistiksel olarak anlamlıyken, AZ ve AZK arasında anlamlı fark olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak, astenozoospermik olgularda kalsiyum akışını düzenleyen sistemlerde bir problem olabileceği ve bu problemin kalsiyum geçişini düzenleyen kalsiyum kanal proteinleri ile ilişkili olabileceği varsayılabilir. Çalışmamızda yapılan gen ifade analizlerinde, kalsiyum kanal proteinlerinin sentezini sağlayan *CATSPER1* geni AZ grubunda belirgin olarak daha az saptanmıştır. Bu bulgu, AZ grubunda göreceli olarak NZ grubundan daha az kalsiyum geçişinin nedenini açıklayabilir. Fakat, AZ grubunun diğer gruplara kıyasla KP-13 uygulamasına olumlu yönde etki gösterdiği dikkatlerden kaçmamaktadır. Kalsiyum konsantrasyonu verilerine paralel olarak KP-13 uygulanan AZ grubunda, *CATSPER1* gen ifade düzeyindeki artış diğer gruplara kıyasla çok daha yüksek seviyededir. Bu sonuçların birlikte değerlendirilmesi, KP-13 uygulamasının astenozoospermik olgularda motilitenin artışı teşvik edebileceği yönünde bulgular sunmaktadır.

Kalsiyum girişine izin veren, sperme özgü bir kalsiyum kanalı olan CatSper kanalı, sperm hareketliliğini, hiperaktivitesini ve erkek doğurganlığını düzenlemede önemli bir rol oynar (Brown, vd., 2019; Ren, vd., 2001). Spermdeki CatSper kanallarının azalması, sperm hareketliliğinin ve hiperaktivitesinin bozulmasına ve nihayetinde erkek infertilitesine neden olabilmektedir (Sun, vd., 2017). CatSper kanallarına ait azalmış gen ifade düzeyinin astenozoospermi patogenezi ile ilişkisi *CatSper1* geni susturulmuş veya *CatSper1* aşırı ekspresyon deney hayvanı modellerinde yapılan deneylerle kanıtlanmıştır (Jin, vd., 2021). Sıçan spermındaki CatSper kanallarının dört α alt biriminden (CatSper1-CatSper4) birindeki azalmanın, sperm hareketliliğini ve işlevlerini bozmaya yeterli olduğu, sonuçta erkek hastaların veya hayvanların doğurganlığına zarar verdiğini öne sürülmüştür. Bu nedenle spermde CatSper kanallarının azalması, astenozoospermi patogenezi için önemli bir parametre olabilir. İnsanlarda da *CATSPER* genlerinin genetik mutasyonları veya delesyonları ve genlerin değişime uğramış ifade düzeyleri klinik olarak astenozoospermi ve erkek

kısırlığı ile ilişkilendirilmiştir (Hildebrand, vd., 2010; Singh ve Rajender, 2015). İnfertil erkeklerde *CATSPER1* ve *CATSPER2* mutasyonlarının astenoteratozoospermi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Avenarius, vd., 2009; Avidan, vd., 2003). Sunulan çalışmamızda da AZ, OAZ ve OATZ gruplarında *CATSPER1* mRNA düzeylerinde belirgin bir düşüş tespit edildi. Gen ifadesindeki bu düşüşle paralel bir şekilde diğer gruplara kıyasla, AZ grubunda hücre içi kalsiyum düzeylerinde belli bir oranda düşüş olduğunu gözlemledik. Çalışmamızda, KP-13 uygulamasının hem hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda hem de *CATSPER1* gen ifadesinin düzenlenmesinde yukarı yönlü regüle edici bir etkisinin olduğu tespit edildi. Bu yukarı yönlü hareket en belirgin olarak AZ grubunda gözlenmiştir. Aynı etki, OAZ ve OATZ gruplarında gözlenememiştir. *CATSPER* genleri susturularak astenozoospermi oluşturulabilecek deney hayvanları modellerinde intratestiküler veya intravenöz KP-13 enjeksiyonları ile KP-13'ün etkinliğinin daha geniş ölçekte test edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Buna ek olarak, KISS1 antagonistlerini kullanılarak KISS1 etkilerinin daha spesifik olarak gözlemlenebileceği çalışmaların tasarlanması faydalı olabilir. Günümüzde CatSper kanalını hedef alan ilaçlar, klinik öncesi araştırma aşamalarındadır. Erkek kontrasepsiyonu için CatSper kanalları üzerine çalışmalar yürütülmektedir. Sperm hareketliliğinin tedavisi için CatSper kanallarının hedef alındığı daha yoğun çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. CatSper kanalına etki eden birtakım ilaçlar bulunmakta ancak etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir.

Bhilawadikar, vd. (2013), normozoospermik kontrollere kıyasla oligoastenozoospermik erkek hastalara ait sperm örneklerinde, *CATSPER* gen ifade düzeyinin ve sperm motilitesinin anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiştir (Bhilawadikar, vd., 2013). Bu bulgulara istinaden, *CATSPER1* gen ifadesinin aşağı regülasyonunun veya anormalliğinin sperm hareketliliğini etkileyebileceği ve böylece idiyopatik oligozoospermi gelişimini tetikleyebileceği öne sürülmüştür (Shu, vd., 2015). Bizim çalışmamızda da NZ grubuna kıyasla OATZ grubunda *CATSPER1* gen ifadesi aşağı yöndedir. Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu analizlerinde de benzer şekilde, NZ ile OAZ ve OATZ grupları arasında ileri düzeyde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, *CATSPER1* mutasyonlarının veya ekspresyonunun klinik tespiti, idiyopatik oligoastenozoospermi teşhisini ve tedavisini kolaylaştırabileceği öne sürülebilir.

Heidary, vd., (2019), literatürde paylaşılan bilgilerin aksine, idiyopatik astenozoospermi tanısı alan 35 olguya ait spermelerde yaptıkları genetik analizlerde,

kontrol ve hasta grup arasında *CATSPER1* gen ifadesi açısından istatistiksel bir fark bulamamışlardır (Heidary, vd., 2019). *CATSPER1* proteininin düşük, eksik veya yanlış lokalize ekspresyonunun, astenozoospermik fenotip ve düşük hiperaktif motilite gelişiminde rol oynayabileceğini belirtmekle beraber, bu sonuçların örneklem büyüklüğü ile ilişkili olma ihtimalini de belirtmişlerdir. Kalsiyum konsantrasyonu açısından NZ ile OAZ ve OATZ grupları arasındaki farkların açıklanmasına dair literatürde farklı yaklaşımlar bulunmaktadır. OAZ ve OATZ gruplarında ileri düzeyde patoloji gösteren sperm hücreleri bulunabilir. Olası patolojik durumlarda, OAZ ve OATZ grubundaki sperm, azalan enerji metabolizmasının bir sonucu olarak kalsiyum birikimini indükleyen ve Ca^{2+} -ATPaz aktivitesini tersine çeviren hücre zarı hasarına uğrayabilir (Sakaida, vd., 1991; Trump ve Berezesky, 1985). Buna ek olarak oligoastenoteratozoospermik olgularda, sperm iyon homeostazını sürdürmek amacıyla ekstraselüler olarak kalsiyum iyonunu salmak için ileri düzeyde fonksiyon göstermiyor olabilir (Lestari, vd., 2018). Bir başka muhtemel neden ise, oligoastenoteratozoospermik olgularda sperm hücrelerinde kalsiyum depolanması yeterince gerçekleşmez ve bu nedenle, sperm hücreleri kalsiyum iyonunun hücre dışı ortama salınması için ileri düzeyde fonksiyonellik gösteremezler. Sperm yapısındaki ve işlevindeki değişiklik, iyon homeostazını kesintiye uğratarak sperm hareketliliğinin bozulmasına ve nihai olarak infertiliteye neden olabilmektedir (Lestari, vd., 2017). Bu bulgular göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamızda OAZ ve OATZ gruplarında göreceli olarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun daha düşük çıkması literatür ile uyum göstermektedir. KP-13 uygulaması sonrasında, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda belli bir oranda artış yaşandığı görülmektedir. Hücre membranındaki olası hasarlar, KP-13'ün bu gruplarda yeterince etkinlik gösterememiş olmasına neden olmuş olabilir.

KP-13'ün etkinliği gözlemlenmenin bir diğer yolu da ilgili gen reseptör ifade düzeylerini değerlendirmek olabilir. KP-13 uygulama öncesinde, AZ ve OAZ gruplarında NZ grubuna kıyasla *KISS1R* gen ifadesinin yaklaşık olarak 2-3 kata daha yüksek olduğu görülmektedir. Fakat OATZ grubunda belirgin bir farklılık görülmemektedir. Bu durumun olası sebeplerinden bir tanesi, AZ ve OAZ olgularına ait sperm hücreleri, motiliteyi artırabilmek ve homeostazı sağlayabilmek için daha fazla *KISS1* ile etkileşime girebilme eğilimi gösteriyor olabilir. Bu nedenle, *KISS1R*'ye ait gen ifadelerindeki bir artış ile motiliteyi tetikleyici mekanizmada var olan eksiklik giderilmeye çalışılıyor olabilir. OATZ grubunda ise, hücre

membranındaki ve yapısındaki olası bozulmalar, KISS1R reseptörünün işlevini yerine getirememesine ve dolayısıyla hücrenin homeostazı sürdürme eğiliminden geri kalmasına neden olmuş olabilir.

Genel olarak gen ifade düzeyinin regülasyonunda hücresel düzeyde pozitif ve negatif geri bildirimlerinin önemli rol oynadığı bilinmektedir (Ceroni, vd., 2018; Ji, vd., 2013; Sheen, 1994). OATZ grubunda *KISS1* gen ifade düzeyinin diğer gruplara göre daha düşük düzeyde olduğu da göz önünde bulundurulursa, muhtemel bir hücresel KISS1 arz-talep dengesizliği nedeniyle reseptör üretimi için pozitif geri bildirim mekanizmaları işlevselliğini yitirmiş ve bu nedenle *KISS1R* gen ifadesi sekteye uğramış olabilir. Bu öneri, KP-13 uygulaması sonrası NZK grubuna kıyasla OATZK grubunda gözlemlenen *KISS1R* gen ifade düzeyindeki belirgin artışla desteklenebilir. Gebelik esnasında da plasentada *KISS1* gen ifadesinin katlanarak arttığı ve dolayısıyla dolaşımdaki KISS1 düzeyinin yüksek düzeyde artmasıyla birlikte *KISS1R* düzeyinde de artış gerçekleştiği bilinmektedir (Hu, vd., 2019; Taylor, vd., 2014). Çalışmamızda, infertil alt gruplara ait sperm hücrelerine KP-13 uygulaması, tüm gruplarda *KISS1R* gen ifade düzeyini yukarı yönlü etkilemiş ve tüm gruplarda belirgin bir artışın gerçekleştiği gözlenmiştir.

Çalışmamızda AZ grubuna ait *KISS1* ve *KISS1R* gen ifade analizleri değerlendirildiğinde, NZ grubuna kıyasla AZ grubunda *KISS1* geninin yaklaşık olarak 2 kat ve *KISS1R* geninin yaklaşık olarak 3 kat daha fazla ifade edildiği görülmektedir. Çalışmamızda, biyokimyasal bulgular ve genetik analiz bulguları birbirini tamamlar niteliktedir. Semen örneklerinin biyokimyasal analizinde, AZ grubunda göreceli olarak KISS1 protein ifadesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. *KISS1* gen ifade düzeyinde gerçekleşen farklılığın protein ifade düzeyine yansımaları beklenen bir sonuç olarak değerlendirilebilir. OAZ ve OATZ gruplarında *KISS1* genine ait ifade düzeyleri, NZ grubuna kıyasla daha düşük düzeydedir. Biyokimyasal analizlerde de benzer bulgular görülmektedir. ELISA yöntemi ile KISS1'in semende ifade düzeyi incelendiğinde, OAZ grubu ile NZ grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark, OATZ grubunda ise NZ grubuna göre göreceli olarak daha az KISS1 tayin edilmiştir. Gen ifadesi analizinde ise, NZ grubuna kıyasla OATZ grubunda 0,95 kat daha az *KISS1* ifadesi tespit edilmiştir. *KISS1* genine ait biyokimyasal ve genetik verilerin paralellik göstermesi, çalışma verilerinin güvenilirliğinin yükselmesi bakımından önem arz etmektedir. Bununla birlikte, AZ grubunda KISS1 protein ve gen ifadelerinin göreceli olarak daha yüksek olmasının sebebi açıklığa kavuşturulmalıdır. Biyokimyasal

analizler neticesinde, semende KISS1'in miktar artışının değerlendirilmesinde, olası mekanizmalar göz önünde bulundurulmaya çalışılmıştır.

AKAP4, fibröz kılıfta en çok bulunan yapısal proteinlerdir. Sperm proteinlerinin tirozin fosforilasyonunu artırır ve flagellar işlevi düzenleyen cAMP bağımlı protein kinaz için bağlayıcı bölgelere sahiptir (Eddy, vd., 2003). Erkek farelerde *Akap4* geninin susturulması fibröz kılıf displazisine neden olmakta, bu durum kusurlu sperm hareketliliğine yol açmaktadır. Ancak sperm sayısı ve morfolojisinde bir değişim gözlenmemektedir (Miki, vd., 2002). AKAP4'ün yokluğu, etkili sperm hareketliliğinin kaybına neden olmaktadır. Bunun nedeni cAMP'ye bağımlı sinyal yollarının fibröz kılıf ile etkileşime girememesidir (Moretti, vd., 2007). Fibröz kılıf sperm olgunlaşmasının, hareketliliğinin ve kapasitesinin düzenlenmesinde rol oynar. Bu nedenle, *AKAP4* gen ifadesinin sperm hareket kabiliyeti üzerinde etkisi olabilir.

Akap3 ve *Akap4* genlerindeki kısmi delesyonların astenozoospermiye neden olduğu daha önce bildirilmiştir (Moretti, vd., 2007). Bu delesyonlar, fibröz kılıf bileşenlerinin kusurlu birleşmesi ve kuyrukta AKAP3 ve AKAP4 proteinlerinin bölümlendirilmesindeki başarısızlıkla ilişkili olabilir. AKAP-3, fibröz kılıfın temel yapısının düzenlenmesinde rol alırken, AKAP4 fibröz kılıf bileşenlerinin bir araya getirilerek tamamlanmasında önemli bir role sahiptir. Bu proteinlerin yokluğu sperm hareketsizliğiyle bağlantılıdır. Çünkü fibröz kılıf herhangi bir sinyal iletim sistemine sahip değildir (Brown, vd., 2003; Miki, vd., 2002). Hatalı şekillendirilmiş fibröz kılıfa sahip ve morfolojik olarak anormal flagella ile karakterize olan fibröz kılıf displazisi, astenozoospermi olgularında sıklıkla gözlenmektedir (Turner, vd., 2001). Çalışmamızda, NZ grubuna kıyasla AZ, OAZ ve OATZ gruplarında *AKAP4* gen ifadesinin belirgin olarak daha az olduğu gösterilmiştir. En büyük fark ise AZ grubunda tespit edilmiştir. Bu bulgu, AKAP4 protein üretimindeki bir eksikliğin fibröz kılıf bileşenlerinde bir hasara ve dolayısıyla tüm alt infertil gruplarda motilite azalmasıyla ilişkili olabileceğine dair yorumlanabilir. Çalışmamızda KP-13 uygulaması tüm gruplarda *AKAP4* gen ifade düzeyini yukarı yönde stimüle etmiştir. Özellikle OATZ ve OAZ gruplarındaki gen ifadelerinde çok belirgin yükselmeler tespit edilmiştir.

Oligoastenoteratozoospermi, erkek infertilitesinde görülen en yaygın fenotiplerinden birisidir. Kalitatif ve kantitatif sperm kusurlarının bir kombinasyonu ile tanımlanır (Jungwirth, vd., 2012). Yüksek fenotipik değişkenlikleri nedeniyle,

OAT'nin arka planında yatan olası genetik nedenler şu ana kadar büyük ölçüde net olarak tanımlanamamıştır. Çalışmamızda KP-13 uygulaması neticesinde *AKAP4* gen ifade oranındaki artış dikkatleri çekmektedir. Literatürde, *AKAP4* geni ile *KISS1* arasındaki muhtemel ilişkiyi açıklayan bir mekanizma bilginiz dahilinde bulunamamıştır. *AKAP4* geninin OAT ile olası ilişkilerinin aydınlatılması için ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat, bu bilgilere ek olarak, *KISS1*'in malign melanomlarda ve bazı meme kanserlerinde metastaz baskılayıcı protein olarak görev yaptığı daha önce ifade edilmiştir. *KISS1R*'nin aktivasyonu, tümör metastazının temel özellikleri olan hücre proliferasyonunu ve hücre göçünü inhibe etmektedir. Bu kapsamda, *KISS1/KISS1R* sistemi hücre-matriks kenetlenme organizasyonunu düzenleyebileceği ve belki de hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde rol alabileceği öne sürülebilir. KP-13 uygulaması sonrası, OATZ grubunda *AKAP4* gen ifadesindeki yukarı yönlü artışın olası bir hücre içi iskeletin yeniden modellenmesi ile ilişkili olabileceği varsayılabilir. Bu noktada, sperm hücre içi iskeletin organizasyonunda görev alan proteinlerin ve genlerin detaylı analizi, olası bir hücre içi iskelet-AKAP4-KISS1/KISS1R düzenleyici mekanizmasının aydınlatılmasını sağlayabilir.

Spermde *KISS1* ve *KISS1R* gen ifade düzeyleri incelendiğinde belirgin bir orantısızlık görülmektedir. *KISS1* geninin beyin bölgelerinden sonra en fazla testiste ifade edildiği gözlemlenirken, *KISS1R*'nin organlar arası ifade düzeyi sıralamasında testisin çok daha gerilerde olduğu görülmektedir (Şekil 2.7). İlgili genlerin protein ifade düzeylerine bakıldığında ise, organlar arası belirgin bir fark görülmemektedir. Bu noktada, *KISS1* geninin yoğun bir şekilde mRNA ifadesi gerçekleştirilirken, proteine translasyonunun eşdeğer bir şekilde belirgin bir yükseklik göstermemesi dikkatleri çekmektedir. Eğer eşdeğer oranda proteine dönüşüm olmuyorsa neden yoğun miktarda *KISS1* mRNA ifadesi gerçekleşiyor sorusuna muhtemel cevaplar aranmaktadır. Bu noktada, lokal bir regülasyon mekanizmasının devreye girme ihtimali olabilir. Yoğun miktarda üretilen *KISS1* mRNA'sı, diğer genlerin baskılanması veya daha fazla ifade edilmesi yönünde genlerin regülasyonunda görev alıyor olabilir. Ya da mikro RNA'ların regüle ettiği bir mekanizma bulunabilir. Bir diğer ihtimal, anti-metastatik özelliği ile bilinen *KISS1*'in spermatogonyumlar üzerinde regüle edici etki gösterebiliyor olmasıdır. Spermatogonyumlar üzerinde regüle edici etki gösterebiliyor olmasıdır. Spermatogonyumlar üzerinde regüle edici etki gösterebiliyor olmasıdır. Spermatogonyumlar üzerinde regüle edici etki gösterebiliyor olmasıdır. Spermatogonyumlar üzerinde regüle edici etki gösterebiliyor olmasıdır. Spermatogonyumlar üzerinde regüle edici etki gösterebiliyor olmasıdır.

edilmesinde *KISS1* mRNA'larının bir rolü olabilir mi sorusu akıllara gelmektedir. Bu noktada literatüre dayalı bilgimiz, *KISS1*'in sperm hücre içi kalsiyum kanalları üzerinde etki göstererek fonksiyonel özelliğini gösterdiği yönündedir. Fakat, fonksiyonel etki gösterecek *KISS1* proteinine *KISS1* geninin ifade edildiği oranda dönüşmediği halde *KISS1* mRNA'sının neden testiste yoğun bir şekilde bulunduğu araştırılmayı bekleyen sorular arasındadır.

Çalışmamızda, *KISS1* gen ifade düzeyindeki değişiklikleri biyokimyasal analizlerle ve *CATSPER1* gen ifadesinin hücresel düzeydeki yansımalarını fluometrik yöntemlerle tayin ederek sonuçlarımızın güvenilirliğini güçlendirebilirken, deneysel yöntem dizaynında ekonomik yük sorunu nedeniyle *KISS1R* ve *AKAP4* protein miktarının biyokimyasal, immünohistokimyasal veya western-blot yöntemi ile tayin edilmemesi sonuçların değerlendirilmesinde bir eksiklik olarak ortaya çıkmaktadır. Bir diğer eksiklik ise, KP-13 maruziyeti sonrası olgulara ait sperm motilite parametrelerini daha detaylı olarak değerlendirilebilmesini sağlayan eğrisel hız, düz çizgi hızı, ortalama yol hızı, doğrusallık, düzlük, yanal başın genliği, yalpalama, çapraz geçiş frekansı parametreleri gibi otomatize sperm analiz sistemleri tarafından özel yazılım programları ile gerçekleştirilebilen değerlendirmelerin yapılamamasıdır. Bunlara ek olarak, olgulara ait testosteron, FSH, LH, prolaktin gibi hormonal parametrelerin değerlendirilebilmesi, olgulara ait daha detaylı analizlerin yapılmasını sağlayabilirdi. Sperm örneklerinin dondurma işlemine tabi tutulmadan eş zamanlı olarak çalışmaya alınması, dondurma işleminin olası etkilerini dışlayarak sonuçların standart bir şekilde değerlendirilebilmesine olanak sağlamıştır.

Tüm bulgular göz önünde bulundurulduğunda, KP-13 uygulamasının sperm motilitesi ile ilişkili parametreler üzerinde genel olarak tüm infertilite alt gruplarında yukarı yönlü etki oluşturduğu görülmektedir. AZ grubundaki bireylerde *KISS1* konsantrasyonunun daha yüksek çıkması sıra dışı bir bilgi olarak karşımıza çıkmaktadır. *KISS1* gen ifadesinin AZ grubunda yüksek çıkması ve KP-13 uygulaması sonrası en yüksek *KISS1* ifadesinin AZ grubunda gözlenmesi bu bulguyu destekler niteliktedir. AZ, OAZ ve OATZ gruplarında sperm hareketliliği ile ilişkili *CATSPER1* ve *AKAP4* gen ifade düzeylerinde NZ'ye kıyasla senkronize düşüş tespit edilmiştir. Gruplar arasındaki bu senkronizasyonu *KISS1* gen ifadesinin OAZ ve OATZ gruplarında NZ'ye kıyasla daha düşük görülürken, AZ grubunda daha yüksek görülmesi bozmuştur. Bu durum, *KISS1* geni ifade düzeyi açısından, oligo ve asteno kavramlarını ayrı ayrı değerlendirmeyi ön plana çıkarmıştır. Gen ifade analizlerinin her olguda eşit

konsantrasyonda RNA kullanılarak yapılmış olması, oligozoospermik gruplarındaki düşük sayıda sperm sayısı sebebiyle bu sonuçlar elde edilmiştir söylemini geçersiz kılmaktadır. OAZ ve OATZ gruplarında, *CATSPER1* ve *AKAP4* genlerinde olduğu gibi *KISS1* gen ifade düzeyinin düşük olması olağan koşullardan kaynaklanıyor olabilir. Eğer bu varsayım kabul edilirse, bu durumda AZ grubunda *KISS1* geninin diğer gruplara kıyasla daha yüksek ifadesinin gerçekleşmesinin olağandışı farklı bir mekanizma ile ilişkili olabileceği ön plana çıkmaktadır. AZ olgularına ait sperm örnekleri ile *KISS1* arasındaki muhtemel ilişkinin aydınlatılabilmesi için daha ileri analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Motilite ile ilişkili muhtemel başka genlerin incelenmesi ve kan dolaşımındaki bağlantılı hormon parametrelerinin değerlendirilmesi bu mekanizmayı aydınlatmaya yardımcı olabilir.

5. SONUÇ

Erkek infertilite tayininde serum KISS1 düzeyi belirteç olarak kullanılabilir.

Rutin semen analizinde KISS1 miktar tayini belirleyici bir faktör olabilir. Daha kesin bulgular için erkek infertilite alt kategorilerinde yüksek örnekleme semende KISS1 analizine ihtiyaç duyulmaktadır.

AZ grubunda KP-13 uygulaması hem hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu hem de kalsiyum geçişinde önemli rolü olan CatSper kalsiyum kanalı genlerini önemli düzeyde artırmıştır. Astenozoospermi tanısı olan bireylere KP-13 uygulanmasının olumlu sonuçlar doğurması beklenebilir.

AZ grubunun biyokimyasal ve genetik analizleri neticesinde, göreceli olarak KISS1 proteini ve istatistiksel olarak *KISS1* gen ifadeleri yüksek bulunmuştur. KISS1 protein ve gen ifade düzeylerinin tespiti astenozoospermi teşhisinde ayırıcı bir parametre olarak değerlendirilebilir. KP-13 uygulaması sonrasında ise infertil alt gruplar arasında AZ grubunda, hücre içi kalsiyum, *KISS1* ve *CATSPER1* genleri senkronize bir şekilde en yüksek oranda artış göstermiştir. Bu sonuçlar, olası bir KP-13 uygulamasının potansiyel etkisine dair öngörülerini güçlendirmektedir.

CATSPER1 mutasyonlarının veya ekspresyonunun klinik tespiti, idiyopatik astenozoospermi, oligoastenozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi teşhisini ve tedavisini kolaylaştırabilir.

Sperm fibröz kılıfı ile ilişkili infertilite kusurlarında, KP-13 uygulaması *AKAP4* geni üzerinde tedavi edici etki oluşturabilir.

Hücre içi iskelet sisteminin organizasyonunda KISS1 ile *AKAP4* arasında muhtemel bir ilişki bulunabilir.

KP-13 uygulamasının hücre içi kalsiyum konsantrasyonu üzerine muhtemel etkileri, kalsiyum sinyalizasyonunun etkin olduğu vazokonstriksiyon ile ilişkili çeşitli mekanizmaların regülasyonunda rol oynayabilir.

KAYNAKLAR

- Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Crowley, W.F., ve Seminara, S.B. (2003). A locus for autosomal recessive idiopathic hypogonadotropic hypogonadism on chromosome 19p13.3. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (6), 2947-2950.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., ve Chyatte, M.R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.* 13, 37.
- Ahmed, S.D., Karira, K.A., Jagdesh, ve Ahsan, S. (2011). Role of L-carnitine in male infertility. *J Pak Med Assoc.* 61 (8), 732-736.
- Arai, A.C. (2009). The role of kisspeptin and GPR54 in the hippocampus. *Peptides.* 30 (1), 16-25.
- Avenarius, M.R., Hildebrand, M.S., Zhang, Y., Meyer, N.C., Smith, L.L., Kahrizi, K., Najmabadi, H., ve Smith, R.J. (2009). Human male infertility caused by mutations in the CATSPER1 channel protein. *Am J Hum Genet.* 84 (4), 505-510.
- Avidan, N., Tamary, H., Dgany, O., Cattan, D., Pariente, A., Thulliez, M., Borot, N., Moati, L., Barthelme, A., Shalmon, L., Krasnov, T., Ben-Asher, E., Olender, T., Khen, M., Yaniv, I., Zaizov, R., Shalev, H., Delaunay, J., Fellous, M., Lancet, D., ve Beckmann, J.S. (2003). CATSPER2, a human autosomal nonsyndromic male infertility gene. *Eur J Hum Genet.* 11 (7), 497-502.
- Bajpai, M., ve Doncel, G.F. (2003). Involvement of tyrosine kinase and cAMP-dependent kinase cross-talk in the regulation of human sperm motility. *Reproduction.* 126 (2), 183-195.
- Barratt, C.L., Aitken, R.J., Bjorndahl, L., Carrell, D.T., de Boer, P., Kvist, U., Lewis, S.E., Perreault, S.D., Perry, M.J., Ramos, L., Robaire, B., Ward, S., ve Zini, A. (2010). Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report. *Hum Reprod.* 25 (4), 824-838.
- Barry, J. (1979). Immunohistochemistry of luteinizing hormone-releasing hormone-producing neurons of the vertebrates. *Int Rev Cytol.* 60, 179-221.
- Bearer, E.L., ve Friend, D.S. (1990). Morphology of mammalian sperm membranes during differentiation, maturation, and capacitation. *J Electron Microscop Tech.* 16 (4), 281-297.
- Bedford, J.M., Moore, H.D., ve Franklin, L.E. (1979). Significance of the equatorial segment of the acrosome of the spermatozoon in eutherian mammals. *Exp Cell Res.* 119 (1), 119-126.
- Bedu-Addo, K., Barratt, C.L., Kirkman-Brown, J.C., ve Publicover, S.J. (2007). Patterns of $[Ca^{2+}]_i$ mobilization and cell response in human spermatozoa exposed to progesterone. *Dev Biol.* 302 (1), 324-332.
- Bedu-Addo, K., Costello, S., Harper, C., Machado-Oliveira, G., Lefievre, L., Ford, C., Barratt, C., ve Publicover, S. (2008). Mobilisation of stored calcium in the neck region of human sperm--a mechanism for regulation of flagellar activity. *Int J Dev Biol.* 52 (5-6), 615-626.
- Beigi Harchegani, A., Irandoost, A., Mirnamniha, M., Rahmani, H., Tahmasbpour, E., ve Shahriary, A. (2019). Possible Mechanisms for The Effects of Calcium Deficiency on Male Infertility. *Int J Fertil Steril.* 12 (4), 267-272.
- Belchetz, P.E., Plant, T.M., Nakai, Y., Keogh, E.J., ve Knobil, E. (1978). Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophthalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science.* 202 (4368), 631-633.

- Belloc, S., Benkhalifa, M., Cohen-Bacrie, M., Dalleac, A., Chahine, H., Amar, E., ve Zini, A. (2014). Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 31 (5), 527-532.
- Ben-Navi, L.R., Almog, T., Yao, Z., Seger, R., ve Naor, Z. (2016). A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. *Scientific Reports*. 6.
- Bhilawadikar, R., Zaveri, K., Mukadam, L., Naik, S., Kamble, K., Modi, D., ve Hinduja, I. (2013). Levels of Tektin 2 and CatSper 2 in normozoospermic and oligoasthenozoospermic men and its association with motility, fertilization rate, embryo quality and pregnancy rate. *J Assist Reprod Genet*. 30 (4), 513-523.
- Blackmore, P.F. (1993). Thapsigargin elevates and potentiates the ability of progesterone to increase intracellular free calcium in human sperm: possible role of perinuclear calcium. *Cell Calcium*. 14 (1), 53-60.
- Brenker, C., Goodwin, N., Weyand, I., Kashikar, N.D., Naruse, M., Krahling, M., Muller, A., Kaupp, U.B., ve Strunker, T. (2012). The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm. *EMBO J*. 31 (7), 1654-1665.
- Brooks, A.N., Hagan, D.M., ve Howe, D.C. (1996). Neuroendocrine regulation of pituitary-adrenal function during fetal life. *Eur J Endocrinol*. 135 (2), 153-165.
- Brown, P.R., Miki, K., Harper, D.B., ve Eddy, E.M. (2003). A-kinase anchoring protein 4 binding proteins in the fibrous sheath of the sperm flagellum. *Biol Reprod*. 68 (6), 2241-2248.
- Brown, S.G., Publicover, S.J., Barratt, C.L.R., ve Martins da Silva, S.J. (2019). Human sperm ion channel (dys)function: implications for fertilization. *Hum Reprod Update*. 25 (6), 758-776.
- Buffone, M.G., Calamera, J.C., Verstraeten, S.V., ve Doncel, G.F. (2005). Capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation and membrane fluidity changes are impaired in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. *Reproduction*. 129 (6), 697-705.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., ve Wittwer, C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 55 (4), 611-622.
- Campbell, R.E., Gaidamaka, G., Han, S.K., ve Herbison, A.E. (2009). Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (26), 10835-10840.
- Cao, X., Cui, Y., Zhang, X., Lou, J., Zhou, J., Bei, H., ve Wei, R. (2018). Proteomic profile of human spermatozoa in healthy and asthenozoospermic individuals. *Reprod Biol Endocrinol*. 16 (1), 16.
- Castano, J.P., Martinez-Fuentes, A.J., Gutierrez-Pascual, E., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., ve Malagon, M.M. (2009). Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides*. 30 (1), 10-15.
- Castellano, J.M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V.M., Bellido, C., Dieguez, C., Aguilar, E., Sanchez-Criado, J.E., Pellicer, A., Pinilla, L., Gaytan, F., ve Tena-Sempere, M. (2006). Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology*. 147 (10), 4852-4862.

- Castellano, L.E., Trevino, C.L., Rodriguez, D., Serrano, C.J., Pacheco, J., Tsutsumi, V., Felix, R., ve Darszon, A. (2003). Transient receptor potential (TRPC) channels in human sperm: expression, cellular localization and involvement in the regulation of flagellar motility. *FEBS Lett.* 541 (1-3), 69-74.
- Ceroni, F., Boo, A., Furini, S., Goroehowski, T.E., Borkowski, O., Ladak, Y.N., Awan, A.R., Gilbert, C., Stan, G.B., ve Ellis, T. (2018). Burden-driven feedback control of gene expression. *Nat Methods.* 15 (5), 387-393.
- Chang, H.X., ve Suarez, S.S. (2010). Rethinking the Relationship Between Hyperactivation and Chemotaxis in Mammalian Sperm. *Biology of Reproduction.* 83 (4), 507-513.
- Chemes, H.E., ve Sedo, C.A. (2012). Tales of the Tail and Sperm Head Aches Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian Journal of Andrology.* 14 (1), 14-23.
- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell.* 131 (6), 1047-1058.
- Clarke, I.J., ve Cummins, J.T. (1982). The Temporal Relationship between Gonadotropin-Releasing Hormone (Gnrh) and Luteinizing-Hormone (Lh) Secretion in Ovariectomized Ewes. *Endocrinology.* 111 (5), 1737-1739.
- Clarkson, J., ve Herbison, A.E. (2006). Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 147 (12), 5817-5825.
- Clements, M.K., McDonald, T.P., Wang, R., Xie, G., O'Dowd, B.F., George, S.R., Austin, C.P., ve Liu, Q. (2001). FMRFamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem Biophys Res Commun.* 284 (5), 1189-1193.
- Colledge, W.H. (2009). Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology. *Peptides.* 30 (1), 34-41.
- Constantin, S., Caligioni, C.S., Stojilkovic, S., ve Wray, S. (2009). Kisspeptin-10 facilitates a plasma membrane-driven calcium oscillator in gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Endocrinology.* 150 (3), 1400-1412.
- Cornwall, G.A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update.* 15 (2), 213-227.
- Corpa, J.M. (2006). Ectopic pregnancy in animals and humans. *Reproduction.* 131 (4), 631-640.
- d'Anglemont de Tassigny, X., ve Colledge, W.H. (2010). The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology (Bethesda).* 25 (4), 207-217.
- d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P.C., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B.L., Aparicio, S.A.J.R., ve Colledge, W.H. (2007). Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 104 (25), 10714-10719.
- Darszon, A., Acevedo, J.J., Galindo, B.E., Hernandez-Gonzalez, E.O., Nishigaki, T., Trevino, C.L., Wood, C., ve Beltran, C. (2006). Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction.* 131 (6), 977-988.
- Darszon, A., Beltran, C., Felix, R., Nishigaki, T., ve Trevino, C.L. (2001). Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol.* 240 (1), 1-14.
- Darszon, A., Lopez-Martinez, P., Acevedo, J.J., Hernandez-Cruz, A., ve Trevino, C.L. (2006). T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium.* 40 (2), 241-252.

- DasGupta, S., Mills, C.L., ve Fraser, L.R. (1994). A possible role for Ca(2+)-ATPase in human sperm capacitation. *J Reprod Fertil.* 102 (1), 107-116.
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., ve Milgrom, E. (2003). Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 100 (19), 10972-10976.
- Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Patterson, M., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Badman, M.K., McGowan, B.M., Amber, V., Patel, S., Ghatei, M.A., ve Bloom, S.R. (2005). Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (12), 6609-6615.
- Eddy, E.M., Toshimori, K., ve O'Brien, D.A. (2003). Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 61 (1), 103-115.
- Eisenbach, M., ve Giojalas, L.C. (2006). Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7 (4), 276-285.
- El-Ghobashy, A.A., ve West, C.R. (2003). The human sperm head: a key for successful fertilization. *J Androl.* 24 (2), 232-238.
- Elmoutaleb, A.T., Abdelatif, D.M., Rabie, E.M., Gouda, N.M., ve Hashem, O. (2017). Evaluation of serum kisspeptin role in male infertility. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development.* 4, 116-121.
- Espino, J., Mediero, M., Lozano, G.M., Bejarano, I., Ortiz, A., Garcia, J.F., Pariente, J.A., ve Rodriguez, A.B. (2009). Reduced levels of intracellular calcium releasing in spermatozoa from asthenozoospermic patients. *Reprod Biol Endocrinol.* 7, 11.
- Evans, J.J. (1999). Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endocr Rev.* 20 (1), 46-67.
- Fawcett, D.W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev Biol.* 44 (2), 394-436.
- Felix, R. (2005). Molecular physiology and pathology of Ca²⁺-conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm. *Reproduction.* 129 (3), 251-262.
- Ficarro, S., Chertihin, O., Westbrook, V.A., White, F., Jayes, F., Kalab, P., Marto, J.A., Shabanowitz, J., Herr, J.C., Hunt, D.F., ve Visconti, P.E. (2003). Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J Biol Chem.* 278 (13), 11579-11589.
- Flesch, F.M., ve Gadella, B.M. (2000). Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta.* 1469 (3), 197-235.
- Freitas, M.J., Vijayaraghavan, S., ve Fardilha, M. (2017). Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol Reprod.* 96 (1), 2-12.
- Funabashi, T., Daikoku, S., Shinohara, K., ve Kimura, F. (2000). Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion is an inherent function of GnRH neurons, as revealed by the culture of medial olfactory placode obtained from embryonic rats. *Neuroendocrinology.* 71 (2), 138-144.
- Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S.J., Monsma, F.J., ve Gustafson, E.L. (2003). The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 312 (4), 1357-1363.
- Gadella, B.M. (2008). Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci.* 107 (3-4), 229-236.

- Garcia, J.P., Keen, K.L., Kenealy, B.P., Seminara, S.B., ve Terasawa, E. (2018). Role of Kisspeptin and Neurokinin B Signaling in Male Rhesus Monkey Puberty. *Endocrinology*. 159 (8), 3048-3060.
- Garcia-Galiano, D., Navarro, V.M., Roa, J., Ruiz-Pino, F., Sanchez-Garrido, M.A., Pineda, R., Castellano, J.M., Romero, M., Aguilar, E., Gaytan, F., Dieguez, C., Pinilla, L., ve Tena-Sempere, M. (2010). The Anorexigenic Neuropeptide, Nesfatin-1, Is Indispensable for Normal Puberty Onset in the Female Rat. *Journal of Neuroscience*. 30 (23), 7783-7792.
- Gaytan, F., Gaytan, M., Castellano, J.M., Romero, M., Roa, J., Aparicio, B., Garrido, N., Sanchez-Criado, J.E., Millar, R.P., Pellicer, A., Fraser, H.M., ve Tena-Sempere, M. (2009). KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296 (3), E520-531.
- Gaytan, M., Castellano, J.M., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Tena-Sempere, M., ve Gaytan, F. (2007). Expression of KiSS-1 in rat oviduct: possible involvement in prevention of ectopic implantation? *Cell Tissue Res*. 329 (3), 571-579.
- Gharib, S.D., Wierman, M.E., Shupnik, M.A., ve Chin, W.W. (1990). Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev*. 11 (1), 177-199.
- Gnoth, C., Godehardt, E., Frank-Herrmann, P., Friol, K., Tigges, J., ve Freundl, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod*. 20 (5), 1144-1147.
- Gore, A. (2002). *GnRH: The Master Molecule of Reproduction*: Springer US.
- Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., ve Steiner, R.A. (2004). A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 145 (9), 4073-4077.
- Grimes, D.A., ve Lopez, L.M. (2007). "Oligozoospermia," "azoospermia," and other semen-analysis terminology: the need for better science. *Fertil Steril*. 88 (6), 1491-1494.
- Grumbach, M.M. (2002). The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res*. 57 Suppl 2, 2-14.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., ve Tsien, R.Y. (1985). A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *Journal of Biological Chemistry*. 260 (6), 3440-3450.
- Guerriero, K.A., Keen, K.L., Millar, R.P., ve Terasawa, E. (2012). Developmental changes in GnRH release in response to kisspeptin agonist and antagonist in female rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): implication for the mechanism of puberty. *Endocrinology*. 153 (2), 825-836.
- Harper, C., Wootton, L., Michelangeli, F., Lefievre, L., Barratt, C., ve Publicover, S. (2005). Secretory pathway Ca²⁺-ATPase (SPCA1) Ca²⁺ pumps, not SERCAs, regulate complex [Ca²⁺]_i signals in human spermatozoa. *J Cell Sci*. 118 (Pt 8), 1673-1685.
- Harrison, D.A., Carr, D.W., ve Meizel, S. (2000). Involvement of protein kinase A and A kinase anchoring protein in the progesterone-initiated human sperm acrosome reaction. *Biol Reprod*. 62 (3), 811-820.
- Heidary, Z., Zaki-Dizaji, M., Saliminejad, K., ve Khorramkhorshid, H.R. (2019). Expression Analysis of the CRISP2, CATSPER1, PATE1 and SEMG1 in the Sperm of Men with Idiopathic Asthenozoospermia. *J Reprod Infertil*. 20 (2), 70-75.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., ve Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 10 (4), 413-417.

- Hildebrand, M.S., Avenarius, M.R., Fellous, M., Zhang, Y., Meyer, N.C., Auer, J., Serres, C., Kahrizi, K., Najmabadi, H., Beckmann, J.S., ve Smith, R.J. (2010). Genetic male infertility and mutation of CATSPER ion channels. *Eur J Hum Genet.* 18 (11), 1178-1184.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., ve Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (16), 7276-7280.
- Horikoshi, Y., Matsumoto, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Kitada, C., Usuki, S., ve Fujino, M. (2003). Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 88 (2), 914-919.
- Hsu, M.C., Wang, J.Y., Lee, Y.J., Jong, D.S., Tsui, K.H., ve Chiu, C.H. (2014). Kisspeptin modulates fertilization capacity of mouse spermatozoa. *Reproduction.* 147 (6), 835-845.
- Hu, K.L., Chang, H.M., Zhao, H.C., Yu, Y., Li, R., ve Qiao, J. (2019). Potential roles for the kisspeptin/kisspeptin receptor system in implantation and placentation. *Hum Reprod Update.* 25 (3), 326-343.
- Hu, K.L., Zhao, H., Chang, H.M., Yu, Y., ve Qiao, J. (2017). Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in the Ovary. *Front Endocrinol (Lausanne).* 8, 365.
- Huma, T., Ulla, F., Hanif, F., Rizak, J.D., ve Shahab, M. (2014). Peripheral administration of kisspeptin antagonist does not alter basal plasma testosterone but decreases plasma adiponectin levels in adult male rhesus macaques. *Turkish Journal of Biology.* 38 (4), 450-456.
- Inaba, K. (2003). Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci.* 20 (9), 1043-1056.
- Irfan, S., Ehmeke, J., Wahab, F., Shahab, M., ve Schlatt, S. (2014). Intratesticular action of kisspeptin in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Andrologia.* 46 (6), 610-617.
- Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., ve Steiner, R.A. (2004). Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology.* 80 (4), 264-272.
- Jayasena, C.N., Nijher, G.M.K., Narayanaswamy, S., De Silva, A., Abbara, A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Bridges, N., ve Dhillon, W.S. (2014). Age-dependent elevations in plasma kisspeptin are observed in boys and girls when compared with adults. *Annals of Clinical Biochemistry.* 51 (1), 89-96.
- Ji, N., Middelkoop, T.C., Mentink, R.A., Betist, M.C., Tonegawa, S., Mooijman, D., Korswagen, H.C., ve van Oudenaarden, A. (2013). Feedback control of gene expression variability in the *Caenorhabditis elegans* Wnt pathway. *Cell.* 155 (4), 869-880.
- Jin, Z.R., Fang, D., Liu, B.H., Cai, J., Tang, W.H., Jiang, H., ve Xing, G.G. (2021). Roles of CatSper channels in the pathogenesis of asthenozoospermia and the therapeutic effects of acupuncture-like treatment on asthenozoospermia. *Theranostics.* 11 (6), 2822-2844.
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C., ve European Association of Urology Working Group on Male, I. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur Urol.* 62 (2), 324-332.
- Kavvasoglu, S., Ozkan, Z.S., Kumbak, B., Simsek, M., ve Ilhan, N. (2012). Association of kisspeptin-10 levels with abortus imminens: a preliminary study. *Archives of Gynecology and Obstetrics.* 285 (3), 649-653.

- Kaya, A., Orbak, Z., Polat, H., Cayir, A., Erdil, A., ve Doneray, H. (2015). Plasma Kisspeptin Levels in Newborn Infants with Breast Enlargement. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 7 (3), 192-196.
- Kelch, R.P., Hopwood, N.J., Sauder, S., ve Marshall, J.C. (1985). Evidence for decreased secretion of gonadotropin-releasing hormone in pubertal boys during short-term testosterone treatment. *Pediatr Res.* 19 (1), 112-117.
- Kirby, H.R., Maguire, J.J., Colledge, W.H., ve Davenport, A.P. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev.* 62 (4), 565-578.
- Kirichok, Y., ve Lishko, P.V. (2011). Rediscovering sperm ion channels with the patch-clamp technique. *Mol Hum Reprod.* 17 (8), 478-499.
- Knobil, E. (1980). The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res.* 36, 53-88.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandebogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., ve Parmentier, M. (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem.* 276 (37), 34631-34636.
- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjoback, R., Sjogreen, B., Strombom, L., Stahlberg, A., ve Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 27 (2-3), 95-125.
- Kuohung, W., ve Kaiser, U.B. (2006). GPR54 and KiSS-1: role in the regulation of puberty and reproduction. *Rev Endocr Metab Disord.* 7 (4), 257-263.
- Lamprecht, S.A., ve Lipkin, M. (2001). Cellular mechanisms of calcium and vitamin D in the inhibition of colorectal carcinogenesis. *Ann NY Acad Sci.* 952, 73-87.
- Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.T., George, S.R., ve O'Dowd, B.F. (1999). Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 446 (1), 103-107.
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., ve Welch, D.R. (1996). KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst.* 88 (23), 1731-1737.
- Lestari, S.W., Miati, D.N., ve Asmarinah. (2018). Oligoasthenoteratozoospermia and necrozoospermia: A study of sperm Na^+ , K^+ -atpase $\alpha 4$ and plasma membrane Ca^{2+} -atpase 4 regulation. *OnLine Journal of Biological Sciences.* 3 (18), 304-314.
- Lestari, S.W., Miati, D.N., Seoharso, P., Sugiyanto, R., ve Pujianto, D.A. (2017). Sperm Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 4$ and plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) 4 regulation in asthenozoospermia. *Syst Biol Reprod Med.* 63 (5), 294-302.
- Li, L.F., Xiang, C., Zhu, Y.B., ve Qin, K.R. (2014). Modeling of progesterone-induced intracellular calcium signaling in human spermatozoa. *J Theor Biol.* 351, 58-66.
- Lindemann, C.B., ve Lesich, K.A. (2010). Flagellar and ciliary beating: the proven and the possible. *J Cell Sci.* 123 (Pt 4), 519-528.
- Lishko, P.V., Botchkina, I.L., ve Kirichok, Y. (2011). Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm. *Nature.* 471 (7338), 387-391.
- Liu, X., Lee, K., ve Herbison, A.E. (2008). Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology.* 149 (9), 4605-4614.

- Livak, K.J., ve Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*. 25 (4), 402-408.
- Luconi, M., ve Baldi, E. (2003). How do sperm swim? Molecular mechanisms underlying sperm motility. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 49 (3), 357-369.
- Luconi, M., Cantini, G., Baldi, E., ve Forti, G. (2011). Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 16, 1315-1330.
- Luconi, M., Carloni, V., Marra, F., Ferruzzi, P., Forti, G., ve Baldi, E. (2004). Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. *J Cell Sci*. 117 (Pt 7), 1235-1246.
- Luconi, M., Porazzi, I., Ferruzzi, P., Marchiani, S., Forti, G., ve Baldi, E. (2005). Tyrosine phosphorylation of the a kinase anchoring protein 3 (AKAP3) and soluble adenylyate cyclase are involved in the increase of human sperm motility by bicarbonate. *Biol Reprod*. 72 (1), 22-32.
- Maeda, K., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., Oka, Y., Tsukamura, H., ve Okamura, H. (2010). Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res*. 1364, 103-115.
- Makarananda, K., Weir, L.R., ve Neal, G.E. (1998). Competitive ELISA. *Methods Mol Biol*. 80, 155-160.
- Malone, A.M., Batra, N.N., Shivaram, G., Kwon, R.Y., You, L., Kim, C.H., Rodriguez, J., Jair, K., ve Jacobs, C.R. (2007). The role of actin cytoskeleton in oscillatory fluid flow-induced signaling in MC3T3-E1 osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*. 292 (5), C1830-1836.
- Mandal, A., Naaby-Hansen, S., Wolkowicz, M.J., Klotz, K., Shetty, J., Retief, J.D., Coonrod, S.A., Kinter, M., Sherman, N., Cesar, F., Flickinger, C.J., ve Herr, J.C. (1999). FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. *Biol Reprod*. 61 (5), 1184-1197.
- Marquez, B., Ignatz, G., ve Suarez, S.S. (2007). Contributions of extracellular and intracellular Ca^{2+} to regulation of sperm motility: Release of intracellular stores can hyperactivate CatSper1 and CatSper2 null sperm. *Dev Biol*. 303 (1), 214-221.
- Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., ve Ohtaki, T. (2004). Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 320 (2), 383-388.
- Mead, E.J., Maguire, J.J., Kuc, R.E., ve Davenport, A.P. (2007). Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. *Endocrinology*. 148 (1), 140-147.
- Mei, H., Doran, J., Kyle, V., Yeo, S.H., ve Colledge, W.H. (2013). Does Kisspeptin Signaling have a Role in the Testes? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 4, 198.
- Meseguer, M., Garrido, N., Martinez-Conejero, J.A., Simon, C., Pellicer, A., ve Remohi, J. (2004). Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. *J Assist Reprod Genet*. 21 (12), 445-451.
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B., Colledge, W.H., Caraty, A., ve Aparicio, S.A. (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102 (5), 1761-1766.

- Miki, K., Willis, W.D., Brown, P.R., Goulding, E.H., Fulcher, K.D., ve Eddy, E.M. (2002). Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. *Dev Biol.* 248 (2), 331-342.
- Min, L., Soltis, K., Reis, A.C., Xu, S., Kuohung, W., Jain, M., Carroll, R.S., ve Kaiser, U.B. (2014). Dynamic kisspeptin receptor trafficking modulates kisspeptin-mediated calcium signaling. *Mol Endocrinol.* 28 (1), 16-27.
- Moretti, E., Scapigliati, G., Pascarelli, N.A., Baccetti, B., ve Collodel, G. (2007). Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian J Androl.* 9 (5), 641-649.
- Mortimer, D. (2018). The functional anatomy of the human spermatozoon: relating ultrastructure and function. *Mol Hum Reprod.* 24 (12), 567-592.
- Mortimer, S.T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update.* 3 (5), 403-439.
- Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L., ve Harrison, D.C. (2001). AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem.* 276 (31), 28969-28975.
- Naaby-Hansen, S., Mandal, A., Wolkowicz, M.J., Sen, B., Westbrook, V.A., Shetty, J., Coonrod, S.A., Klotz, K.L., Kim, Y.H., Bush, L.A., Flickinger, C.J., ve Herr, J.C. (2002). CABYR, a novel calcium-binding tyrosine phosphorylation-regulated fibrous sheath protein involved in capacitation. *Dev Biol.* 242 (2), 236-254.
- Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., ve Tena-Sempere, M. (2004). Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology.* 145 (10), 4565-4574.
- Naz, R.K., ve Rajesh, P.B. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2, 75.
- Oakley, A.E., Clifton, D.K., ve Steiner, R.A. (2009). Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev.* 30 (6), 713-743.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., ve Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 411 (6837), 613-617.
- Ojeda, S.R., Dubay, C., Lomniczi, A., Kaidar, G., Matagne, V., Sandau, U.S., ve Dissen, G.A. (2010). Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. *Mol Cell Endocrinol.* 324 (1-2), 3-11.
- Ojeda, S.R., Lomniczi, A., Mastronardi, C., Heger, S., Roth, C., Parent, A.S., Matagne, V., ve Mungenast, A.E. (2006). Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology.* 147 (3), 1166-1174.
- Ojeda, S.R., Lomniczi, A., Sandau, U., ve Matagne, V. (2010). New concepts on the control of the onset of puberty. *Endocr Dev.* 17, 44-51.
- Ojeda, S.R., Lomniczi, A., ve Sandau, U.S. (2008). Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol.* 20 (6), 732-742.

- Olson, S.D., Fauci, L.J., ve Suarez, S.S. (2011). Mathematical modeling of calcium signaling during sperm hyperactivation. *Mol Hum Reprod.* 17 (8), 500-510.
- Olson, S.D., Suarez, S.S., ve Fauci, L.J. (2010). A model of CatSper channel mediated calcium dynamics in mammalian spermatozoa. *Bull Math Biol.* 72 (8), 1925-1946.
- Olson, S.D., Suarez, S.S., ve Fauci, L.J. (2011). Coupling biochemistry and hydrodynamics captures hyperactivated sperm motility in a simple flagellar model. *J Theor Biol.* 283 (1), 203-216.
- Ortega, C., Verheyen, G., Raick, D., Camus, M., Devroey, P., ve Tournaye, H. (2011). Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? *Hum Reprod Update.* 17 (5), 684-692.
- Pampillo, M., Camuso, N., Taylor, J.E., Szereszewski, J.M., Ahow, M.R., Zajac, M., Millar, R.P., Bhattacharya, M., ve Babwah, A.V. (2009). Regulation of GPR54 signaling by GRK2 and β -arrestin. *Mol Endocrinol.* 23 (12), 2060-2074.
- Papaoiconomou, E., Msaouel, P., Makri, A., Diamanti-Kandarakis, E., ve Koutsilieris, M. (2011). The role of kisspeptin/GPR54 in the reproductive system. *In Vivo.* 25 (3), 343-354.
- Parent, A.S., Teilmann, G., Juul, A., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., ve Bourguignon, J.P. (2003). The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev.* 24 (5), 668-693.
- Patel, R., ve Smith, J.T. (2020). Novel actions of kisspeptin signaling outside of GnRH-mediated fertility: a potential role in energy balance. *Domest Anim Endocrinol.* 73, 106467.
- Patrat, C., Serres, C., ve Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell.* 92 (3-4), 255-266.
- Pesch, S., ve Bergmann, M. (2006). Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron.* 37 (7), 597-612.
- Petersen, C., Fuzesi, L., ve Hoyer-Fender, S. (1999). Outer dense fibre proteins from human sperm tail: molecular cloning and expression analyses of two cDNA transcripts encoding proteins of approximately 70 kDa. *Mol Hum Reprod.* 5 (7), 627-635.
- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Roseweir, A., Romero, M., Sanchez-Garrido, M.A., Ruiz-Pino, F., Morgan, K., Pinilla, L., Millar, R.P., ve Tena-Sempere, M. (2010). Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology.* 151 (2), 722-730.
- Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R.P., ve Tena-Sempere, M. (2012). Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 92 (3), 1235-1316.
- Pinto, F.M., Cejudo-Roman, A., Ravina, C.G., Fernandez-Sanchez, M., Martin-Lozano, D., Illanes, M., Tena-Sempere, M., ve Cadenas, M.L. (2012). Characterization of the kisspeptin system in human spermatozoa. *Int J Androl.* 35 (1), 63-73.
- Plant, T.M., Ramaswamy, S., ve Dipietro, M.J. (2006). Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology.* 147 (2), 1007-1013.
- Porzionato, A., Fenu, G., Rucinski, M., Macchi, V., Montella, A., Malendowicz, L.K., ve De Caro, R. (2011). KISS1 and KISS1R expression in the human and rat carotid body and superior cervical ganglion. *Eur J Histochem.* 55 (2), e14.

- Publicover, S.J., Giojalas, L.C., Teves, M.E., de Oliveira, G.S., Garcia, A.A., Barratt, C.L., ve Harper, C.V. (2008). Ca²⁺ signalling in the control of motility and guidance in mammalian sperm. *Front Biosci.* 13, 5623-5637.
- Pukazhenthil, B.S., Wildt, D.E., ve Howard, J.G. (2001). The phenomenon and significance of teratospermia in felids. *J Reprod Fertil Suppl.* 57, 423-433.
- Qi, H., Moran, M.M., Navarro, B., Chong, J.A., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Kirichok, Y., Ramsey, I.S., Quill, T.A., ve Clapham, D.E. (2007). All four CatSper ion channel proteins are required for male fertility and sperm cell hyperactivated motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 (4), 1219-1223.
- Rajfer, J., Swerdloff, R.S., ve Heber, D.M. (1984). Testicular histology following chronic gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *Fertil Steril.* 42 (5), 765-771.
- Ramzan, M.H., Ramzan, M., Ramzan, F., Wahab, F., Jelani, M., Khan, M.A., ve Shah, M. (2015). Insight into the serum kisspeptin levels in infertile males. *Arch Iran Med.* 18 (1), 12-17.
- Rance, N.E., Young, W.S., 3rd, ve McMullen, N.T. (1994). Topography of neurons expressing luteinizing hormone-releasing hormone gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. *J Comp Neurol.* 339 (4), 573-586.
- Ren, D., Navarro, B., Perez, G., Jackson, A.C., Hsu, S., Shi, Q., Tilly, J.L., ve Clapham, D.E. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 413 (6856), 603-609.
- Reyes, A., Martinez, R., Luna, M., ve Chavarria, M.E. (1987). Concentrations of calmodulin in sperm in relation to their motility in fertile euspermic and infertile asthenozoospermic men. *Int J Androl.* 10 (3), 507-515.
- Richard, N., Galmiche, G., Corvaisier, S., Caraty, A., ve Kottler, M.L. (2008). KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol.* 20 (3), 381-393.
- Ringel, M.D., Hardy, E., Bernet, V.J., Burch, H.B., Schuppert, F., Burman, K.D., ve Saji, M. (2002). Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 87 (5), 2399.
- Rossato, M., Di Virgilio, F., Rizzuto, R., Galeazzi, C., ve Foresta, C. (2001). Intracellular calcium store depletion and acrosome reaction in human spermatozoa: role of calcium and plasma membrane potential. *Mol Hum Reprod.* 7 (2), 119-128.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., ve Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 239 (4839), 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., ve Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230 (4732), 1350-1354.
- Sakaida, I., Thomas, A.P., ve Farber, J.L. (1991). Increases in cytosolic calcium ion concentration can be dissociated from the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *J Biol Chem.* 266 (2), 717-722.
- Salehi, S., Adeshina, I., Chen, H., Zirkin, B.R., Hussain, M.A., Wondisford, F., Wolfe, A., ve Radovick, S. (2015). Developmental and endocrine regulation of kisspeptin expression in mouse Leydig cells. *Endocrinology.* 156 (4), 1514-1522.
- Sawyer, I., Smillie, S.J., Bodkin, J.V., Fernandes, E., O'Byrne, K.T., ve Brain, S.D. (2011). The vasoactive potential of kisspeptin-10 in the peripheral vasculature. *PLoS One.* 6 (2), e14671.

- Seminara, S.B., ve Crowley, W.F., Jr. (2008). Kisspeptin and GPR54: discovery of a novel pathway in reproduction. *J Neuroendocrinol.* 20 (6), 727-731.
- Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwino, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B.L., Crowley, W.F., Aparicio, S.A.J.R., ve Colledge, W.H. (2003). The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine.* 349 (17), 1614-1618.
- Semple, R.K., Achermann, J.C., Ellery, J., Farooqi, I.S., Karet, F.E., Stanhope, R.G., O'Rahilly, S., ve Aparicio, S.A. (2005). Two novel missense mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 90 (3), 1849-1855.
- Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., ve Plant, T.M. (2005). Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (6), 2129-2134.
- Shahed, A., ve Young, K.A. (2009). Differential ovarian expression of KiSS-1 and GPR-54 during the estrous cycle and photoperiod induced recrudescence in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Mol Reprod Dev.* 76 (5), 444-452.
- Sheen, J. (1994). Feedback control of gene expression. *Photosynth Res.* 39 (3), 427-438.
- Shu, F., Zhou, X., Li, F., Lu, D., Lei, B., Li, Q., Yang, Y., Yang, X., Shi, R., ve Mao, X. (2015). Analysis of the correlation of CATSPER single nucleotide polymorphisms (SNPs) with idiopathic asthenospermia. *J Assist Reprod Genet.* 32 (11), 1643-1649.
- Signorelli, J., Diaz, E.S., ve Morales, P. (2012). Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. *Cell Tissue Res.* 349 (3), 765-782.
- Singh, A.P., ve Rajender, S. (2015). CatSper channel, sperm function and male fertility. *Reprod Biomed Online.* 30 (1), 28-38.
- Smith, E.F. (2002). Regulation of flagellar dynein by calcium and a role for an axonemal calmodulin and calmodulin-dependent kinase. *Mol Biol Cell.* 13 (9), 3303-3313.
- Smith, J.T., ve Clarke, I.J. (2007). Kisspeptin expression in the brain: catalyst for the initiation of puberty. *Rev Endocr Metab Disord.* 8 (1), 1-9.
- Smith, J.T., Clifton, D.K., ve Steiner, R.A. (2006). Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction.* 131 (4), 623-630.
- Stafford, L.J., Xia, C., Ma, W., Cai, Y., ve Liu, M. (2002). Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res.* 62 (19), 5399-5404.
- Strunker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N.D., Weyand, I., Seifert, R., ve Kaupp, U.B. (2011). The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature.* 471 (7338), 382-386.
- Suarez, S.S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Hum Reprod Update.* 14 (6), 647-657.
- Suarez, S.S., ve Pacey, A.A. (2006). Sperm transport in the female reproductive tract. *Hum Reprod Update.* 12 (1), 23-37.
- Suarez, S.S., Varosi, S.M., ve Dai, X. (1993). Intracellular calcium increases with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (10), 4660-4664.
- Subiran, N., Agirregoitia, E., Valdivia, A., Ochoa, C., Casis, L., ve Irazusta, J. (2008). Expression of enkephalin-degrading enzymes in human semen and implications for sperm motility. *Fertil Steril.* 89 (5 Suppl), 1571-1577.


- Sun, X.H., Zhu, Y.Y., Wang, L., Liu, H.L., Ling, Y., Li, Z.L., ve Sun, L.B. (2017). The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol.* 15 (1), 65.
- Sunder, M., ve Leslie, S.W. (2020). Semen Analysis. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Tariq, A.R., Shahab, M., Clarke, I.J., Pereira, A., Smith, J.T., Khan, S.U., Sultan, J., Javed, S., ve Anwar, T. (2013). Kiss1 and Kiss1 receptor expression in the rhesus monkey testis: a possible local regulator of testicular function. *Central European Journal of Biology.* 8 (10), 968-974.
- Taylor, J., Pampillo, M., Bhattacharya, M., ve Babwah, A.V. (2014). Kisspeptin/KISS1R signaling potentiates extravillous trophoblast adhesion to type-I collagen in a PKC- and ERK1/2-dependent manner. *Mol Reprod Dev.* 81 (1), 42-54.
- Tena-Sempere, M. (2006). GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Hum Reprod Update.* 12 (5), 631-639.
- Tena-Sempere, M. (2008). Timeline: the role of kisspeptins in reproductive biology. *Nat Med.* 14 (11), 1196.
- Tena-Sempere, M. (2013). Kisspeptins. In A. J. Kastin (Ed.), *Handbook of Biologically Active Peptides* (pp. 819-827): Academic Press.
- Terasawa, E., ve Fernandez, D.L. (2001). Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev.* 22 (1), 111-151.
- Terasawa, E., Kurian, J.R., Guerriero, K.A., Kenealy, B.P., Hutz, E.D., ve Keen, K.L. (2010). Recent discoveries on the control of gonadotrophin-releasing hormone neurones in nonhuman primates. *J Neuroendocrinol.* 22 (7), 630-638.
- Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Bewick, G.A., Stamp, G.W., Curtis, A.E., Cooke, J.H., Jethwa, P.H., Todd, J.F., Ghatei, M.A., ve Bloom, S.R. (2006). Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291 (5), E1074-1082.
- Thompson, E.L., Patterson, M., Murphy, K.G., Smith, K.L., Dhillon, W.S., Todd, J.F., Ghatei, M.A., ve Bloom, S.R. (2004). Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol.* 16 (10), 850-858.
- Tng, E.L. (2015). Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Med J.* 56 (12), 649-656.
- Toshimori, K. (2009). Dynamics of the mammalian sperm head: modifications and maturation events from spermatogenesis to egg activation. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 204, 5-94.
- Tournaye, H., Krausz, C., ve Oates, R.D. (2017). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 5 (7), 544-553.
- Tovar, S., Vazquez, M.J., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, J.M., Vigo, E., Roa, J., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., ve Tena-Sempere, M. (2006). Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology.* 147 (6), 2696-2704.
- Trump, B.F., ve Berezsky, I.K. (1985). The role of calcium in cell injury and repair: a hypothesis. *Surv Synth Pathol Res.* 4 (3), 248-256.
- Turner, R.M. (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev.* 18 (1-2), 25-38.
- Turner, R.M., Musse, M.P., Mandal, A., Klotz, K., Jayes, F.C., Herr, J.C., Gerton, G.L., Moss, S.B., ve Chemes, H.E. (2001). Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous

- sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J Androl.* 22 (2), 302-315.
- Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C.A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., von Heijne, G., Nielsen, J., ve Ponten, F. (2015). Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 347 (6220), 1260419.
- van Kroonenburgh, M.J., Beck, J.L., Vemer, H.M., Rolland, R., Thomas, C.M., ve Herman, C.J. (1986). Effects of a single injection of a new depot formulation of an LH-releasing hormone agonist on spermatogenesis in adult rats. *J Endocrinol.* 111 (3), 449-454.
- Visconti, P.E. (2009). Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106 (3), 667-668.
- Visconti, P.E., Krapf, D., de la Vega-Beltran, J.L., Acevedo, J.J., ve Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian J Androl.* 13 (3), 395-405.
- Visconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., ve Diekman, A.B. (2002). Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *J Reprod Immunol.* 53 (1-2), 133-150.
- Wahab, F., Atika, B., Shahab, M., ve Behr, R. (2016). Kisspeptin signalling in the physiology and pathophysiology of the urogenital system. *Nat Rev Urol.* 13 (1), 21-32.
- Watanabe, G., ve Terasawa, E. (1989). In vivo release of luteinizing hormone releasing hormone increases with puberty in the female rhesus monkey. *Endocrinology.* 125 (1), 92-99.
- Wennemuth, G., Westenbroek, R.E., Xu, T., Hille, B., ve Babcock, D.F. (2000). CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca²⁺ channels in depolarization-evoked entry of Ca²⁺ into mouse sperm. *J Biol Chem.* 275 (28), 21210-21217.
- West, A., Vojta, P.J., Welch, D.R., ve Weissman, B.E. (1998). Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics.* 54 (1), 145-148.
- Whitlock, K.E., Postlethwait, J., ve Ewer, J. (2019). Neuroendocrinology of reproduction: Is gonadotropin-releasing hormone (GnRH) dispensable? *Front Neuroendocrinol.* 53, 100738.
- WHO. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5th ed.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Wildt, L., Hausler, A., Marshall, G., Hutchison, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E., ve Knobil, E. (1981). Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology.* 109 (2), 376-385.
- Wildt, L., Marshall, G., ve Knobil, E. (1980). Experimental induction of puberty in the infantile female rhesus monkey. *Science.* 207 (4437), 1373-1375.
- Wood, C.D., Darszon, A., ve Whitaker, M. (2003). Speract induces calcium oscillations in the sperm tail. *Journal of Cell Biology.* 161 (1), 89-101.
- Xia, J., ve Ren, D. (2009). The BSA-induced Ca²⁺ influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reprod Biol Endocrinol.* 7, 119.

- Xie, F., Garcia, M.A., Carlson, A.E., Schuh, S.M., Babcock, D.F., Jaiswal, B.S., Gossen, J.A., Esposito, G., van Duin, M., ve Conti, M. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol.* 296 (2), 353-362.
- Yamazaki, D., Funato, Y., Miyata, H., Ikawa, M., ve Miki, H. (2016). Complementary role of CNNM2 in sperm motility and Ca²⁺ influx during capacitation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 474 (3), 441-446.
- Yanagimachi, R. (1994). Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.* 2 (4), 371-372.
- Yanagimachi, R. (2011). Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biol Reprod.* 85 (1), 4-5.
- Yunes, R., Doncel, G.F., ve Acosta, A.A. (2003). Incidence of sperm-tail tyrosine phosphorylation and hyperactivated motility in normozoospermic and asthenozoospermic human sperm samples. *Biocell.* 27 (1), 29-36.
- Zhang, C., Roepke, T.A., Kelly, M.J., ve Ronnekleiv, O.K. (2008). Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. *J Neurosci.* 28 (17), 4423-4434.
- Zou, P., Wang, X.G., Chen, Q., Yang, H., Zhou, N.Y., Sun, L., Chen, H.Q., Liu, J.Y., Ao, L., Cui, Z.H., ve Cao, J. (2019). Kisspeptin Protein in Seminal Plasma Is Positively Associated with Semen Quality: Results from the MARHCS Study in Chongqing, China. *Biomed Research International.*

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Belgesi



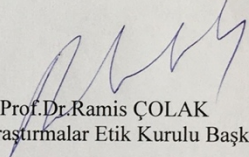
T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/494-570 -927 04.03.2021

Sayın Doç.Dr.Bülent AYAS

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **İnfertil Erkeklerde Sperm Hareketliliği ile Kisspeptin İlişkisinin İncelenmesi** başlıklı OMÜ KAEK 2019/462 Karar nolu Genetik çalışma+ Biyokimya çalışması+ Hücre/Doku kültürü çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları açısından Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş ve etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına, çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 13.06.2019 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.



Prof.Dr.Ramis ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Ondokuz mayis Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Tel:(0362)3121919/2782-4576007 Omutack@gmail.com
Etik Değerlendirme Fakültesi 2.Kat Atakum-SAMSUN

Ek 2. Hasta Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

ARASTIRMANIN ADI:

İnfertil Erkeklerde Sperm Hareketliliği ile Kisspeptin İlişkisinin İncelenmesi

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDA MIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir.

Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz/aile doktorunuz bilgilendirilecektir. Ayrıca destekleyici firma çalışmayı sonlandırmaya karar verirse bu durumda da çalışmadan çıkartılacaksınız.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

18-40 yaş aralığındaki erkek hastalarda, Kisspeptin ve sperm hareketliliğinin araştırılması konulu çalışmamızda;

Bu maddenin üreme sistemi üzerine düzenleyici etkilere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Hem yumurta hem de sperm hücrelerinde tespit edilen bu maddenin, tüp bebek tedavisi alan kadınlara uygulandığında olumlu sonuçlar alındığı gösterilmiştir. Erkeklerde sperm sıvısında da mevcut olan bu maddenin sperm hareketine olumlu etkileri olduğu ileri sürülmüştür.

Dolayısıyla sperm parametreleri kötü olan hastalarda bu maddenin düzeyinin tespiti ve buna yönelik dışarıdan takviye edilmesinin sağlayabileceği olası faydaları gösterebilmek amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Çalışmamızda sizden, Kisspeptin miktar tayini ve sperm hareketliliği analizi için sırasıyla kan örneği ve seminal sıvı örneği alınacaktır. Kan alımı rutin protokoller çerçevesinde kolunuzdan merkezimizde alınacak ve sperm örneği ise mastürbasyon yoluyla temin edilecektir. Örnekler laboratuvar koşullarında çalışıldıktan sonra bilimsel araştırmamız için veri oluşturmaya yönelik kullanılacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Aç veya tok haldeyken 1 ml kan vermeniz ve mastürbasyon yoluyla elde edeceğiniz seminal sıvıdan 1 ml vermeniz yeterli olacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Çalışmaya katılmanız durumunda size uygulanacak olan işlemin size herhangi bir yan etkisi, ağrı oluşturması ve sağlığınıza herhangi bir zararı bulunmamaktadır.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Sperm değerleri açısından sağlıklı olmayan hastalar ile normal sağlıklı bireylerdeki kisseptin düzeyinin karşılaştırılacağı bu çalışma ile bu maddenin sağlıklı olmayan bireylerde fayda sağlayıp sağlayamayacağı değerlendirilecektir. Olumlu bir sonuç çıkması durumunda, bu maddenin olası destekleyici etkisinin ortaya konulmasına katkınız olacaktır.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilirim bilincindeyim.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Araştırmaya katılmanız nedeniyle size para ödenmeyecek ya da sizden para talep edilmeyecektir. Çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyicisi tarafından karşılanacak. Size, bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi (“Çalışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, etnik kökeniniz ayrıca Çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur.

Çalışma için vereceğiniz örnekler size özel bir numara olan bir kod (“Kod”) numarası kullanımıyla korunacaktır. Sizin çalışma verilerinize ulaşmak için gerekli olan kod anahtarı çalışma yürütücüsünün denetimindedir. Çalışmanın yürütülmesi ve yayınlanması aşaması dâhil, hiçbir aşamada sizin isminiz ve kişisel bilgileriniz kullanılmayacaktır. Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayınlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, çalışma yürütücünüz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

BİYOLOJİK MATERYAL İLE YAPILACAK ÇALIŞMALAR

Hastalardan/gönüllülerden herhangi bir çalışma için alınan her türlü “Biyolojik materyal”in (*kan, diğer vücut sıvıları vd.*) başka bir çalışmada kullanılabilmesi için aşağıdaki maddelerin doldurulması gerekmektedir.

Örneklerin gelecekteki kullanımı: *Lütfen işaretleyiniz.*

- İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.
 Sadece bahsi geçen çalışmada kullanılmasına izin veriyorum.

Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum (*Bu kutuyu seçmem durumunda, bu çalışmaya katılmayacağımı anlıyorum*).

Genetik çalışmalarda aşağıda belirtilen şekilde “tabakalandırılmış olur” doldurulmalıdır:

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımını ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (*kimlik bilgileriniz*) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

Tarafımdan alınmış kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı tüm çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

**Kodlanmış örnek*: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Adem Kocaman
Tel:05*****

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:

Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda veya herhangi bir nedenle çalışmadan çıkmak istemeniz halinde ayrılabilirsiniz. Bu tedavi kurumunda göreceğiniz bakım ve tedaviler etkilenmeyecek, herhangi bir aksama olmayacaktır.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen çalışma yürütücüsü tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Sorumlu yürütücü saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

ÖZ GEÇMİŞ

Adem Kocaman, 2008 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden mezun oldu. 2011 yılında İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim dalında Yüksek Lisans programını bitirdi. 2008-2013 yılları arasında özel bir genetik tanı merkezinde prenatal-postnatal sitogenetik ve moleküler genetik alanlarında çalıştı. 2013 yılında Öğretim Görevlisi Yetiştirme Programı kapsamında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve aynı anabilim dalında bilimsel hazırlık eğitimini tamamladıktan sonra Doktora eğitimi aldı. İyi derecede İngilizce bilmektedir.

İletişim Bilgileri

E mail : adem.kocaman@omu.edu.tr, ademkocaman@gmail.com

Yayımlanmış Çalışmalar

1. Ayas B, Kırmızıkan S, **Kocaman A**, Avcı B. The effects of metformin treatment on the ovaries and uterus of offspring, *Gynecological Endocrinology*. 2021; DOI: 10.1080/09513590.2020.1819002
2. Ozdemir AZ, Ayas B, **Kocaman A**, Önal M, Döğenci G, Koçak İ. Does Enoxaparin treatment have any effects on the placenta in women with unexplained histories of habitual abortion? A case control study. *Sao Paulo Medical Journal*. 2020; 138(4), 275-281. Epub June 22, 2020. <https://dx.doi.org/10.1590/1516-3180.2019.0511.r1.16042020>
3. Erdal M, Altunkaynak BZ, **Kocaman A**, Alkan I, Öztas E .The role of HMGB1 in liver inflammation in obese rats, *Biotechnic & Histochemistry*. 2019; 94:6, 449-458, DOI: 10.1080/10520295.2019.1589573
4. **Kocaman A**, Altun G, Kaplan AA, Deniz ÖG, Yurt KK, Kaplan S. Genotoxic and carcinogenic effects of non-ionizing electromagnetic fields. *Enviromental Research*. 2018; <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.01.03>
5. Terzi M, Altun G, Şen S, **Kocaman A**, Kaplan AA, Yurt KK, Kaplan S. The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in neurological diseases. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2017; <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.03.003>.
6. **Kocaman A**, Gül M, Yurt KK, Altun G, Zayman E, Kıvrak EG. Does omega-3 have a protective effect on the rat adrenal gland exposed to 900 MHz electromagnetic fields? *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2017;5: 185-190.
7. Kıvrak EG, Altunkaynak BZ, Alkan I, Yurt KK, **Kocaman A**, Önger ME. Effects of 900-MHz radiation on the hippocampus and cerebellum of adult rats and attenuation of such effects by folic acid and *Boswellia sacra*. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*. 2017;5: 216-224.

