



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**OBEZİTENİN İNSAN SPERM FOSFOLİPAZ-C ZETA
AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Serpil Sude YERLİKAYA

**Şubat 2024
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OBEZİTENİN İNSAN SPERM FOSFOLİPAZ-C ZETA
AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Serpil Sude YERLİKAYA

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nazlı ÇİL

Denizli, 2024

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Serpil Sude YERLİKAYA

İmza :

ÖZET

OBEZİTENİN İNSAN SPERM FOSFOLİPAZ-C ZETA AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Serpil Sude YERLİKAYA

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Nazlı ÇİL

Şubat 2024, 60 Sayfa

Obezite erkeklerde düşük doğurganlık potansiyeli ile ilişkilidir. Artan visseral yağlanma, steroidogenezi ve spermatogenezi lokal ve periferik etkiler. Ca^{2+} salınımlarının, Fosfolipaz C-Zeta(PLC-Zeta) olarak adlandırılan sperme özgü bir PLC izoformunun oosit sitoplazmasına girişine izin veren, sperm oosit membran füzyonundan sonra tetiklendiği bilinmektedir. Obezite ve sperm parametreleri, obezite ve sperm DNA hasarı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Amacımız obez ve obez olmayan erkeklerde sperm parametreleriyle birlikte sperm PLC-Zeta ekspresyon değişimini incelemektir.

Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Androloji Laboratuvarına başvuran hastalardan onay alındıktan sonra hastaların demografik özellikleri sorgulandı. Çalışmaya dahil edilen hastalar iki gruba ayrıldı: Kontrol grubu: Obez olmayan Vücut Kitle İndeksi (BMI)<30 olan spermogram analizi veren hastalar (n: 49); Obez Grubu: BMI \geq 30 olan spermogram analizi veren hastalar (n=18) olarak belirlendi. Grupların semen analizleri yapıldı. Semen örnekleri, 2021 Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre değerlendirildi. PLC-Zeta ekspresyonu için RT-PCR analizi ve immünohistokimyasal olarak histopatolojik değerlendirme yapıldı.

Kontrol grubunun testosteron düzeyleri obez gruba göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu saptandı (sırasıyla $4,8\pm 1,28$; $3,6 \pm 1,61$) ($p<0,05$). Prolaktin düzeyleri Kontrol grubunda $12,6\pm 7,2$ bulunurken obez grubunda bu değer $17,15\pm 9,28$ olarak yükseldiği görüldü ve istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,031$). Semen analizlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı. PLC-Zeta ekspresyonunun obez hastalarda kontrol grubuna göre 1,69 kat arttığı belirlendi. Bu artışın zıttı olarak immünohistokimyasal boyamada obez hastalarda ekspresyonunun düştüğü görüldü.

Sonuçta çalışmamız obezitenin mRNA ekspresyon düzeyinde değil, protein sentezinde, translasyon aşamasında PLC-Zeta ekspresyonunda bozukluğa neden olabileceğini gösterdi. Fakat net bilgileri elde edebilmek için hasta sayısının artırıldığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi; Fosfolipaz C-Zeta; Obezite; Sperm kalitesi.

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2022SABE020)

ABSTRACT
**EFFECT OF OBESITY ON HUMAN SPERM PHOSPHOLIPASE-C ZETA
ACTIVATION**

YERLİKAYA, Serpil Sude
Master Thesis, Department of Histology and Embryology
Thesis Advisor: Associate Professor Nazlı ÇİL
February 2024, 60 Pages

Obesity is associated with low fertility potential in men. Increased visceral adiposity affects steroidogenesis and spermatogenesis locally and peripherally. Ca²⁺ oscillations are known to be triggered after sperm oocyte membrane fusion, which allows entry of a sperm-specific PLC isoform, termed PLC-Zeta, into the oocyte cytoplasm. Obesity and sperm parameters, and obesity and sperm DNA damage have been shown in previous studies. Our aim was to examine sperm PLC-Zeta expression changes in obese and non-obese men along with sperm parameters.

After obtaining consent from the patients who came to Pamukkale University Hospital Andrology Laboratory, the demographic characteristics of the patients were questioned. The patients included in the study were divided into two groups: Control group: Non-obese patients (BMI<30) who gave spermogram analysis (n: 49) and the Obese Patient Group (BMI≥30) n=18). Semen analysis of the groups was performed. Semen samples were evaluated according to 2021 World Health Organization (WHO) criteria. rt-PCR analysis for PLC-Zeta expression and histopathologic evaluation by immunohistochemistry were performed.

Testosterone levels in the control group were statistically higher than in the obese group (4.8±1.28; 3.6±1.61, respectively) (p<0.05). Prolactin levels were 12.6±7.2 in the control group and 17.15±9.28 in the obese group, which was statistically significant (p=0.031). No significant difference was detected between the groups in semen analysis. PCR determined that PLC-Zeta expression increased 1.69 times in obese patients compared to the control group. This increase was opposite of our findings by immunohistochemical staining which showed a decrease of PLC-Zeta in obese patients. In conclusion, our study showed that obesity may cause a defect in PLC-Zeta expression at the protein synthesis and translation stage, but not at the mRNA expression level. However, further studies with an increased number of patients are needed to obtain clear information.

Anahtar Kelimeler: Male infertility; Phospholipase C-zeta; Obesity; Sperm quality.

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects
Coordination Unit through Project number 2022SABE020**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini, önerilerini ve değerli tecrübesini benimle paylaşan yalnızca tez danışmanım olarak değil her konuda bana fazlasıyla yardımcı olan ve inanan tez danışmanım Doç. Dr. Nazlı ÇİL'e,

Tez çalışmam süresince yardımını esirgemeyen ve değerli yorumlarıyla tezime katkı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye

Ders dönemim sürecinde destekleri ve emekleri için değerli bölüm hocalarım Prof.Dr. Hülya ÇETİN, Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR, Doç.Dr. Nazan KESKİN, Dr.Öğr. Üyesi Serkant ÜNAL; teşekkür ederim.

Tez çalışmam da bana en çok yardımını dokunan arkadaşlarım Merve ATEŞ, Seyedmahdi TABATABAEİ ve Fatma Betül SİLİNMEZ' e teşekkür ederim.

Tez sürecimde sabır, ilgi ve anlayışlarıyla her ihtiyacım olduğunda yanımda olan Hasan ORMANCI'ya, maddi manevi beni destekleyen babam Çetin YERLİKAYA 'ya ,sabır ve sevgileriyle bugünlere gelmeme yardımcı olan canım annem Fatma Fulden YERLİKAYA ve annannem Serpil AÇIKALIN'a , tüm stresli anlarımda sabırlı olan canım kardeşim Öykü Sare YERLİKAYA 'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xi
SİMGE VE KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Amaç	2
2. KURUMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Testis.....	3
2.1.1. Testis gelişimi.....	3
2.1.2. Testis histolojisi	4
2.1.2.1. Seminifer tubüller	6
2.1.2.2. Spermatogenez.....	6
2.1.2.3. Spermiyogenez.....	7
2.1.2.4. Golgi fazı	9
2.1.2.5. Akrozomal evre.....	8
2.1.2.6. Olgunlaşma evresi	9
2.2. Semen	9
2.3. 2021 Sperm Analizi 2021 WHO Kriterleri	10
2.4. Obezite ve İnfertilite İle İlişkisi	12
2.5. Sperm ve PLC-Zeta	13
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
3.1. Hastalardan Örneklerin Alınması	17
3.2. Semen Analizi	17
3.3. İmmünohistokimyasal Boyama	22
3.4. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu	23
3.5. cDNA Sentezi.....	24
3.6. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT- PCR).....	25
3.7. İstatistiksel Analiz	26
4.BULGULAR	27
4.1.Grupların Demografik Özellikleri	27
4.2.Grupların Kan Hormon Analizi Sonuçları	28
4.3.Grupların Semen Analizi Sonuçları	29
4.4.PLC-Zeta RT- PCR Analiz Sonuçları	31
4.5.İmmünohistokimyasal Değerlendirme (PLC-Zeta)	32
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ	40
7. KAYNAKLAR	41

8. ÖZGEÇMİŞ..... 49**EKLER**

Ek-1. Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma Etik Kurul Onayı

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 2.1. Testis histolojisi genel görünüm	5
Şekil 2.2. Spermatogenezin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3. Spermatogonyum olgunlaşma evresi.....	9
Şekil 2.4. Sperm spesifik PLC-Zeta tarafından tetiklenen yumurta aktivasyonunun şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.5. PLC- Zeta' nın memeli yumurtalarında önerilen hücre içi etki mekanizmasının şematik gösterimi.....	16
Şekil 3.1. Sperm morfolojik değerlendirilmesi.....	19
Şekil 3.2. Sperm morfolojik değerlendirilmesi.....	20
Şekil 3.3. Sperm morfolojik değerlendirilmesi.....	21
Şekil 3.4. Spermatogonyum olgunlaşma evresi.....	21
Şekil 4.1. Kontrol ve obez hasta gruplarında PLC – Zeta aktivasyonu	32
Şekil 4.2. Kontrol ve obez hasta gruplarında PLC– Zeta aktivasyonu	32

TABLolar

	Sayfa
Tablo 2.1. 2010 ve WHO 2021 sperm parametreleri karşılaştırma tablosu.....	10
Tablo 3.1. Genlerin primer dizaynı.....	25
Tablo 4.1. Gruplar demografik özelliklerinin karşılaştırılması	28
Tablo 4.2. Grupların kan hormon analizi sonuçları	29
Tablo 4.3. Grupların semen analizi sonuçları.....	30
Tablo 4.4. Grupların PLC– Zeta PCR sonuçları.....	31

SİMGE VE KISALTMALAR

BMI.....	Vücut Kitle İndeksi
PLC-Zeta.....	Fosfolipaz C-Zeta
IVF.....	Invitro fertilizasyon
ICSI.....	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
WHO.....	Dünya Sağlık Örgütü
TDF.....	Testis belirleyici faktör
µm.....	Mikrometre
PIP2.....	Fosfoinositid 4,5-bisfosfatı
RT-PCR.....	Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MFI.....	Ortalama floresan yoğunluğu
OAD.....	Oosit aktivasyon eksikliği

1. GİRİŞ

İnfertilite, ailelerin %15'ini etkilerken, erkek infertilitesi dünya çapındaki erkeklerin yaklaşık %7'sinde yaygındır ve bu tür vakaların yaklaşık %50'si açıklanamamaktadır. Erkek faktörlü infertilite birçok nedene bağlıdır. Aynı zamanda genetik nedenlere bağlı birçok neden de infertiliteye sebep olabilir (WHO 2000, Jenkins ve ark., 2016, Eisenberg ve ark., 2014, Hakosen ve ark., 2011, Alshahrani ve ark., 2016).

Erkeklerde düşük doğurganlık potansiyeli obezite ilede ilişkilidir. Obezitenin semen parametrelerinde (sperm konsantrasyonu, hareketlilik, canlılık, morfoloji, DNA bütünlüğü ve mitokondriyal fonksiyon dahil), endokrin değişiklikler (hipogonadizm, hiperinsülinemi ve hiperleptinemi dahil) ve sistemik ve üreme sistemi iltihabı ve oksidatif stres yoluyla erkek infertilitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Erkek faktörde intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işlemi sonrasında oosit aktivasyon bozuklukları önemli bir nedendir (Jensen ve ark., 2004, Hammoud ve ark., 2008).

Embriyo gelişiminin başlamasının ilk adımı olan oosit aktivasyonu hem mayoz bölünmenin tamamlanmasını hem de mitotik döngüye ilerlemeyi içerir. Memelilerde, dölleyici sperm, serbest sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonundaki salınımlardan oluşan aktivasyon sinyalini iletir (Yoon ve ark., 2008). Yapılan çalışmalar, Ca^{2+} salınımlarının oosit aktivasyonunun tetiklenmesinde rol oynayan sperm proteinlerine odaklanmıştır. Fosfolipaz C-zeta (PLC-Zeta) olarak adlandırılan testise özgü PLC izoformu, oosit aktive edici faktör olarak kabul edilir.

PLC-Zeta'nın başarısız ifadesi ile erkek veya idiyopatik infertilite arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Tekrarlayan IVF başarısızlığı durumlarında PLC-Zeta işlevselliği ciddi şekilde etkilenmiş görünmektedir.

1.1.Amaç

Obezite ve sperm parametreleri, obezite ve sperm DNA hasarı daha önceki çalışmalarda incelenmiştir. Yaptığımız bu çalışmadaki amacımız obez ve obez olmayan erkeklerde sperm parametreleriyle birlikte sperm PLC-Zeta ekspresyon değişimini incelemektir.

2. KURUMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Testis

Testis ekzokrin ve endokrin bir organdır. Çift halinde Vücut dışına yerleşmiştir. Skrotum adı verilen bir yapı içerisinde yer alan erkek üreme sistemi organıdır (Ovalle W. K., 2009).

2.1.1. Testis gelişimi

Fertilizasyondan sonra X veya Y kromozomunun varlığına bağlı olarak cinsiyet genetik olarak belirlenir. Testis gelişimi embriyonik hayatın yedinci haftasından sonra başlar (Ross M. H., 2003). Genital sistem her iki cinsiyetteyedinci haftadan önce birbirine benzerdir (Moore K.L., 2016). Farklılaşmamış gonad dokuları üriner sistem ile embriyonik hayatta yakın ilişkili olarak gelişir ve üç embriyonik tabakadan farklanır. Ar Posterior abdominal duvarda ara mezoderm ürogenital kabartılar olarak bilinen çıkıntılar oluşturur. Leydig hücrelerinin ve miyoid hücrelerin kaynağı ara mezodermde yer alan hücrelerdir. Sertoli hücreleri ise mezodermal epitelden köken alır ve bu hücreler ürogenital kabartıları kaplar. Yolk kesesi duvarında gelişen germ hücreleri ürogenital kabartılardan oluşan gonadlara göçerler ve burada bölünerek spermatogonyumlara farklılaşırlar.

Farklılaşmamış gonadlar mezonefrozun mediyalinde, mezotelyal bir kalınlaşma ile birlikte embriyonun 5. haftasında gonadal kabartı olarak ortaya çıkar.

Primordialgerm hücreleri, gonadal kabartılardaki mezodermal hücreleri ve epiteli prolifer ederek primer seks kordonlarının oluşumunu sağlar. Primer seks kordonları, altında bulunan mezenşim içerisine doğru büyürler. Farklanmamışgonadlar, dışta korteks içte de medulla oluşmaktadır. Embriyo eğer XX seks kromozomlarını içeriyorsa korteks gelişir ve gonadlar ovaryumu oluşturur. Embriyo XY seks kromozomlarını içeriyorsa medulla gelişir ve gonadlar testise farklıdır.

Y kromozomu üzerinde yer alan SRY geninden testis belirleyici faktör (TDF) ile testiküler farklılaşma sağlanmaktadır. Oluşan seminifer kordonlar, düz tübüleri, düz tübüllerinastamozu ile de rete testis oluşturur. Semifertübüller, Leyding hücrelerini oluşturan mezenkimden ayrıdır. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri testosteron ve dihidritestosteron salgılanmaya başlar. Testosteron 8 ile 12. Haftalardaki periyotta en yüksek değere ulaşır. Ayrıca seminfertübüllerdekisertoli hücreleri tarafından salgılanan Anti Müllerian Hormonu uterus ve tuba uterus farklılaşmasını baskılar. Bu hormon düzeyi puberteye kadar yüksek seviyede kalırken puberteden sonra seviyesi düşüşe geçer.

Seminifertübüller puberteye kadar solid halde kalır, puberteden sonra lümenli yapı oluşur. Seminfertübüllerde iki tip hücre bulunur. Bunlar sertoli hücresi ve spermatogonyumlardır (Ross. M. H., 2003).

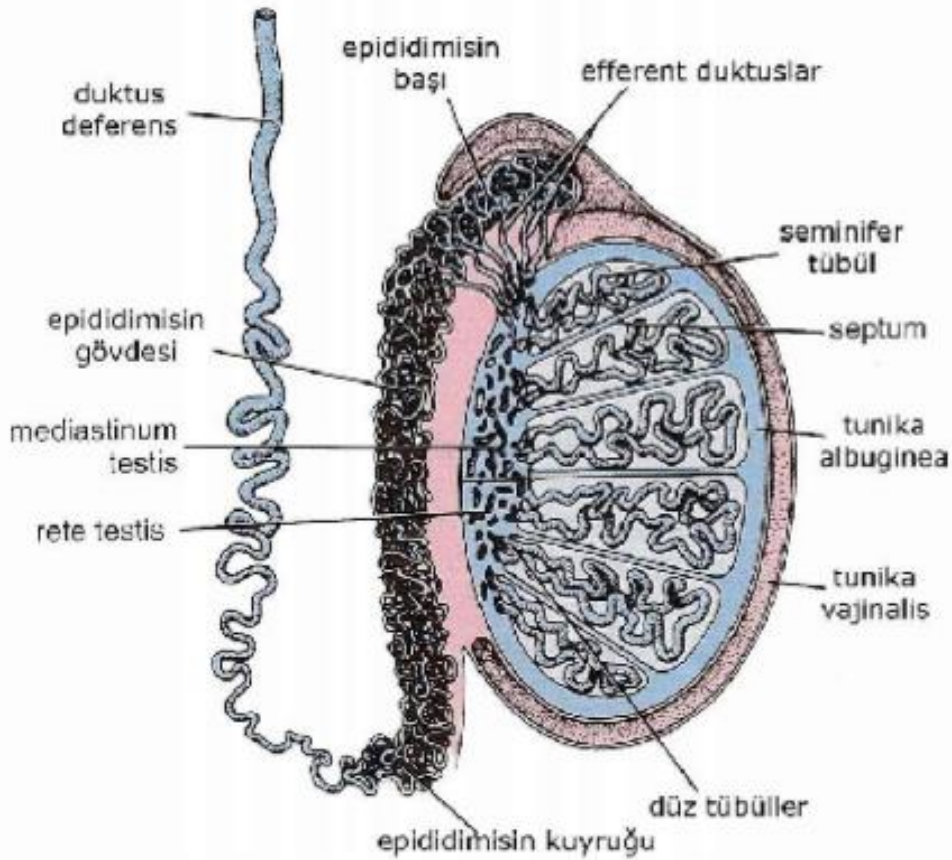
2.1.2. Testis histolojisi

Testisler skrotum içinde, karın boşluğunun dışında yer alan çift organdır. Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2-3°C düşük olmasını sağlar. Normal spermatogenez için ortalama 35°C gereklidir (Keith L. Moore ve ark., 2009). Testis, kapsüllü bir organdır. Tunikaalbuginea olarak adlandırılan bu kapsül sıkı bağ dokusu özelliğindedir. Tunikaalbuginea, kan damarı ve sinirlerin testise giriş ve çıkış bölgesi olan arka yüzde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinumdan testise doğru uzanan fibröz septumlar organı 250 ila 300 lopçuğa ayırır. Sperm seminfertübüller içinde üretilir. Seminfertübüller arasında bağ dokusu bulunur. Bu bağ

dokuda sinirler, kan ve lenf damarları ve Leydig hücreleri bulunur. Leydig hücrelerinde testiküler androjenler salgılanır (Abraham L. Kierszenbaum ve ark., 2006).

Testisler, embriyolojik dönemde karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak oluşurlar ve daha sonra göç edip, skrotum içinde spermatik kordların ucunda asılı olacak şekilde konumlanırlar. Skrotuma doğru meydana gelen bu göç sırasında her bir testis kendi etrafındaki peritonu, tunikavaginalis olarak adlandırılan seröz bir zar olarak sürükler. Tunikavaginalistunikaalbugineayı ön ve yan bölümlerinden sarar (Junqueira L.C. ve Carneiro J., 2009).

Testislerhem ekzokrin hem de endokrin salgı yapan, bileşik tubüler bir çift bezdir. Ekzokrin salgısı, sperm hücreleridir. Salgılama biçimine göre holokrin salgı yapar. Endokrin salgısı, Leydig hücreleri tarafından yapılan testosteron hormonu, intrauterin hayatta Sertoli hücreleri tarafından salgılanan Anti-Mülleryen hormon (AMH=MIF) ve inhibindir (Ross M. H., 2003).



Şekil 2.1. Testis histolojisi genel görünümü (Akın G., 2009).

2.1.2.1. Seminifertübüller

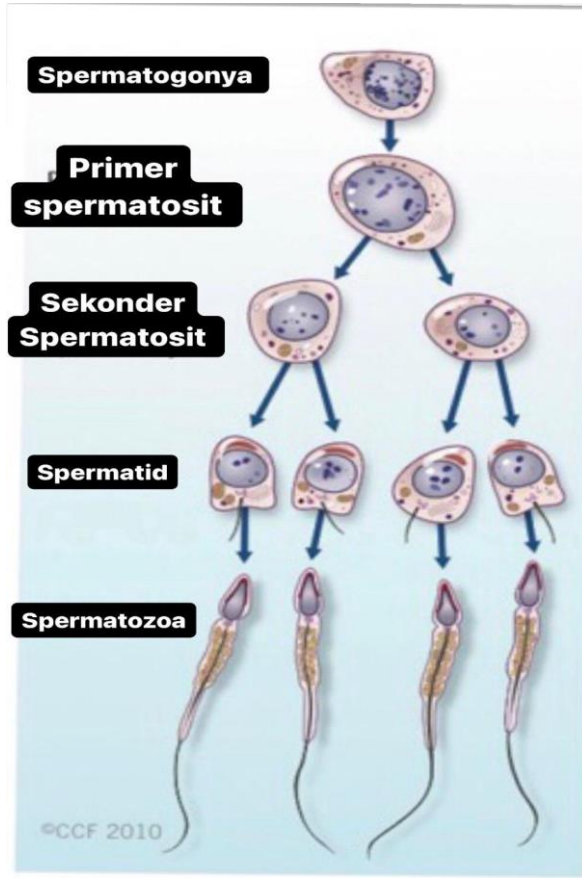
Her bir seminifertübülrete testise açılırlar (Kierszenbaum., 2006). Seminifertübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve germinal epitelle kaplıdır (Junqueira ve ark., 2009). Seminifer epitel bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrilidir (Abraham L. ve Kierszenbaum, 2006). Seminifertübüllerde bazal laminaya tutunan iki grup hücre tipi bulunur:

1. Spermatogenik hücreler
2. Sertoli hücreleri

2.1.2.2. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatozoon oluşturma aşamalarıdır. İlk olarak spermatogonyumdan hücreler bölünmeye başlar. Spermatogonyum, ortalama 12 µm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan küçük bir hücredir (Eroschenko V.P. 2008, Young B. ve ark., 2000). Cinsel olarak olgunluğa ulaştığında spermatogonyum mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur. Tip A spermatogonyumlar kök hücreler özelliğindedir. Bölünmeyi sürdürebilir veya sürmekte olan mitoz döngüleri sonunda farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluşturur. Tip B spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan progenitör hücrelerdir. Primer spermatositler 46 kromozoma sahiptir. Primer spermatositler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu primer spermatositlerden oluşur. Primer spermatositler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir. Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatositler oluşur. Bu hücreler 23 kromozoma (22+X veya 22+Y) sahip daha küçük hücrelerdir. Testisten alınan histolojik kesitlerde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur. Bu hücreler interfazda çok kısa süre kalan ve hemen ikinci mayoz bölünmeye başlayan kısa ömürlü hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi sonucu 23 kromozomlu spermatidler oluşur. Sonuç olarak, mayoz bölünme sonunda haploid sayıda

kromozom içeren hücreler oluşur. Döllenme sonucunda normal diploid sayıda hücreler oluşur (Young B. ve ark., 2000, Jangueria L.C., 1998).



Şekil 2.2. Spermatogenezin şematik gösterimi.

2.1.2.3. Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatozoon üretiminin farklılaşma aşamasıdır. Spermatidler erkek DNA'sını oosit içine aktarmak için özelleşmiş hücreler olan spermatozoona dönüşme sürecidir. Hücre bölünmesinin olmadığı bu dönemde Spermatidler küçük boyutları (7-8 μm), yoğunlaşmış kromatinli nükleusları ile ayırt edilebilir. Bu hücreler seminifer tübüllerde lümeneye yakın olarak konumlanırlar. Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, kamçı genişlemesini ve sitoplazmanın çoğunluğunun kaybolmasını içeren karmaşık olaylar dizisidir.

Spermiyogenez aşamaları tamamlandığında, seminifer tübüllerin lümenine olgun spermatozoonlar salınır (Eroschenko V.P., 2008). Spermiyogenez üç evreye ayrılabilir:

2.1.2.4. Golgi fazı

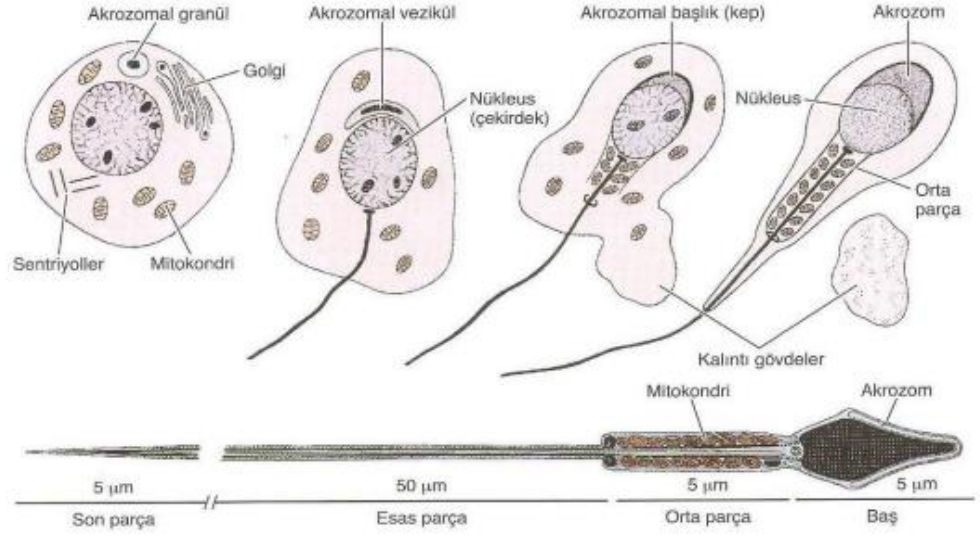
Spermatid sitoplazması, belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondri, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazma retikulum içerir. Proakrozomal granüller Golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek zarla sınırlı bir akrozom vezikülünün içinde yer alan tek bir akrozom granülü oluşturur. Sentriyoller, oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma yerleşirler. Kamçı aksonemi oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden çekirdeğe doğru göç ederken hareket ettikçe aksonem bileşenleri çevresine sarılır (Eroschenco, 2008).

2.1.2.5. Akrozomal evre

Akrozom vezikülü ve granülü yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve proteaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Akrozom özelleşmiş bir lizozom gibi işlev görür. Bu enzimlerin oositleri çevreleyen korona radiata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidada delik oluşturur (Eroschenco, 2008). Spermiyogenezin bu evresinde, spermatidseminifertübülün tabanına doğru yönelir ve aksonem lümenine doğru uzanır. Çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden gelişerek kamçıyı oluşturur. Mitokondri kamçının proksimal kısmı etrafında toplanarak orta parça olarak adlandırılan kalınlaşmış bölgeyi oluşturur.

2.1.2.6. Olgunlaşma evresi

Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlarseminifertübüllerin lümenine salınır (Eroschenco, 2008).



Şekil 2.3. Spermatozoonun olgunlaşma evresi (Junqueira L.C. ve ark., 2009).

2.2. Semen

Semen, sperm hücreleri, testis ve epididimisin salgısı, ejakülasyon sırasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerde üretilen salgıların birleşmesi sonucu meydana gelir (WHO 2002). Sperm hücreleri, semenin %2-5'ini oluşturur. İnsanda ejakülat miktarı kişisel farklılık göstermekle birlikte 2-6 ml kadardır. Semen pH'sı 7.2-8 arasında değişiklik gösterir ve ortalama 20 dakika içinde likefiye olur (WHO 2002, Green D.P., 1993).

2.3. 2021 Sperm Analizi 2021 WHO Kriterleri

Progresif sperm motilitesinin kapsamı gebelik oranları ile ilişkilidir (World Health Organization, 1999). 2021 Who kriterlerinde 2010'a göre çok değişiklik gözlenmedi. Değişiklik yapılan parametrelerde sperm hareketliliğiyle ilgili olarak, motiliteyi derecelendirmek için dört kategorili bir sistem önerilir.

Hem sperm motilitesinin manuel olarak değerlendirilmesinden hem de bilgisayar destekli sperm analizinden elde edilen klinik veriler, hızlı ilerleyen spermatozoanın tanımlanmasının önemli olduğunu göstermektedir (Barratt ve ark., 2011, Aitken ve ark. 1981, Eliasson 2010). Bu nedenle önerilen kategoriler (yaklaşık hız limitleri ile):

- Hızlı ilerleyen ($25 \mu\text{m/s}$) – spermatozoa, lineer veya geniş bir daire içinde aktif olarak hareket eder, başlangıç noktasından bitiş noktasına bir saniyede en az $25 \mu\text{m}$ (veya $\frac{1}{2}$ kuyruk uzunluğu) mesafe kat eder;
- Yavaş ilerleyen ($5 \text{ ila} < 25 \mu\text{m/s}$) – başlangıç noktasından bitiş noktasına kadar $5 \text{ ila} < 25 \mu\text{m}$ (veya en az bir baş) mesafeyi kapsayan, doğrusal veya geniş bir daire içinde aktif olarak hareket eden spermatozoa $\frac{1}{2}$ kuyruk uzunluğundan daha az uzunluk) bir saniyede;
- Progresif olmayan ($< 5 \mu\text{m/s}$) – ilerlemenin olmadığı diğer tüm aktif kuyruk hareketleri modelleri – yani küçük dairelerde yüzme, kamçı kuvveti başlangıçtan itibaren $5 \mu\text{m}$ 'den daha az (bir kafa uzunluğu) başı yerinden oynatıyor bitiş noktasına gelin; ve
- Hareketsiz – aktif kuyruk hareketi yok.

Tablo.2.1. WHO 2010 ve WHO 2021 sperm parametreleri karşılaştırma tablosu.

	DSÖ 2010	DSÖ 2021
Semen hacmi (ml)	1,5	1,4
Toplam sperm sayısı (ejekülat başına 106)	39	39
Toplam hareketlilik (%)	40	42
Progresif hareketlilik (%)	32	30
İlerleyici olmayan hareketlilik (%)	1	1
Hareketsizperm (%)	22	20
Canlılık (%)	58	54
Normal formlar (%)	4	4

Spermatozoa bir baş ve kuyruktan oluşur. Kuyruğun başa bağlı ve mitokondriyi içeren daha kalın kısmına orta parça denir. Son parçanın ışık mikroskobu ile görülmesi zor olduğundan, hücrenin bir baş (ve boyun) ve kuyruk (orta parça ve ana parça) içerdiği düşünülebilir. Bir sperm anormallik olmadan kabul edilebilmesi için baş, orta parça, kuyruk ve sitoplazmik kalıntının normal kabul edilmesi gerekir. Tüm borderline formlar anormal kabul edilmelidir.

Sperm anormallikleri kategorileri (İlgilenilen bölgeler) şunlardır:

- baş (%H)
- boyun ve orta kısım (%NM)
- kuyruk (%T)
- aşırı kalıntı sitoplazma (%C).

Normal (ideal, tipik), anormal için bir ve dört anormal kategorinin (H, NM, T, C) her biri için bir anahtarla birçok tuşlu sayaç kullanılabilir. Tek bir spermde gözlenen diğer anormallikleri girerken ilk tuş basılı tutularak çoklu anormalliklerin girilmesi için mekanik bir sayaç kullanılabilir. Bu operasyonla her sperm sadece bir kez sayılır ve anormalliklerinin her biri ayrı ayrı puanlanır.

200 sperm değerlendirilmesinden, ideal ve anormal sperm yüzdesini ve ayrıca her bir anormallik tipinin yüzdesini elde etmek mümkündür – yani %H, %NM, %T ve %C (değerlendirme doğru yapılırsa bu son rakamların toplamı %100'den fazla olmalıdır).

Bu anormallik sınıflarındaki sperm yüzdesi, kategorideki kusurlu toplam sperm sayısının, puanlanan toplam sperm sayısına bölünmesiyle hesaplanır. Bu sayılar teratozoospermi indeksini hesaplamak için kullanılır.

2.4.Obezite ve İnfertilite ile İlişkisi

Obezite, aşırı vücut yağı birikimi olarak karakterize edilir ve klinik olarak vücut kitle indeksine (BMI) göre tanımlanır ve ağırlık (kg)/boy (metre) kare (kg/m²) olarak ölçülür (WHO 2000). BMI >30 kg/m² olması olarak tanımlanan obezite, dünya genelinde 18 yaş üstü 1,9 milyardan fazla yetişkini etkileyen, pandemik oranlara yaklaşan bir

hastalıktır (Craig ve ark., 2017). Morbidobezite ise BMI'nin >35 kg/m² olması olarak tanımlanır. Obezite erkeklerde düşük doğurganlık potansiyeli ile ilişkilidir. Artan visseral yağlanma, steroidogenezi ve spermatogenezi lokal (testis disfonksiyonu) ve periferik olarak (hipogonadizm, inflamasyon ve oksidatif stres) etkiler.

Sperm DNA bütünlüğü ve epigenetik modifikasyonlar, obeziteye bağlı infertilite yönetiminde önemli hususlardır. Hiperinsülinemi, hiperleptinemi, sistemik inflamasyon ve oksidatif stres gibi metabolik morbiditeler, erkeklerde obezite kaynaklı infertilitesinin önemli metabolik araçlarıdır. Yağlanmanın iyileştirilmesi doğurganlık sonuçlarını iyileştirebilir (Leisegang ve ark., 2021).

Obezitenin semen parametrelerinde (sperm konsantrasyonu, hareketlilik, canlılık, morfoloji, DNA bütünlüğü ve mitokondriyal fonksiyon dahil), endokrin değişiklikler (hipogonadizm, hiperinsülinemi ve hiperleptinemi dahil) ve sistemik ve üreme sistemi iltihabı ve oksidatif stres yoluyla erkek infertilitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir.

Obezogenik bir ortam, leptin gibi adipokinlerin hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenini ve erkek üreme fonksiyonlarını modüle ettiği inflamatuvar yanıtları ortaya çıkarabilir. Oksidatif stresin indüklenmesinin, obezitede erkek üreme fonksiyonlarının bozulmasına yol açan ortak bir yol olduğu ileri sürülmektedir. Ek olarak, obez erkekler, artan aromataz aktiviteleri nedeniyle veya östrojenin pulsatil GnRH salınımını ve ardından LH ve FSH salınımını inhibe eden negatif geri besleme mekanizması nedeniyle testosteron seviyelerinden daha yüksek östrojene sahiptir (Leisegang ve ark., 2021).

Obezitedeki hipogonadizme, hem hipofizden LH 'nin döngüsel sekresyonunun nabız amplitüdünün azalması hem de testis tarafından LH 'ye verilen yanıtın azalması aracılık edebilir. Testosteronun periferik olarak artan aromatazasyonu yoluyla SHBG, FSH ve inhibin B'de azalma ve E2'de yükselme de yaygın olarak görülür (Craig ve ark., 2017).

Erkek obezitesi, salgın oranlarda büyüyen önemli bir sorundur. Obez erkeklerin infertil olma olasılığı daha yüksektir. Sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte, muhtemelen obeziteye bağlı endokrin düzensizliklerin ve spermatogenez üzerindeki zararlı etkilerinin bir kombinasyonudur. Son zamanlardaki epigenetik kanıtlar, bir erkeğin, gebe kalma zamanındaki obezitesinin metabolik hafızasının, sperm yoluyla doğrudan yavrularına aktarılabilirliğini ve dolayısıyla onların somatik sağlığı için önemli sonuçları olabileceğini düşündürmektedir.

Nesiller arası kalıtım ve epigenetiğin daha iyi anlaşılması, hem bu mekanizmaları anlamak hem de erkeklerde prekonsepsiyonel davranış değişikliği için güçlü bir araç olarak kullanmak için çok önemlidir. Morbidobez kadınların yardımcı üreme teknikleri sırasında komplikasyon ve yüksek riskli gebelik şansının daha yüksek olduğu artık iyi bilindiği gibi, obez erkeklerin aynı zamanda daha yüksek metabolik düzensizlik riski taşıyan çocuklara babalık yaptığı da ortaya çıkabilir (Craig, 2017).

Obezite ayrıca sperm DNA hasarını indükleyerek apoptoz, DNA fragmantasyonu ve yavrulara epigenetik transferde artışa neden olur. Erkek obezitesi aynı zamanda klinik pratikte yardımcı üreme tekniklerindeki başarının azalmasıyla da ilişkilidir (Leisegang ve ark., 2021).

2.5.Sperm ve PLC-Zeta

Dünya üzerinde yedi çiftten birinin infertilite sorunu çektiği bilinmektedir (Evens, 2004). Erkek infertilitesinin altında yatan nedenlerin sayısı çok fazladır.

Pretestiküler, testiküler ve posttestiküler olarak gruplandırılır.

Pretestiküler nedenler, genellikle hormonal kaynaklıdır.

Testiküler nedenler, Testis içinde etki ederek infertiliteye neden olan durumları içerir.

Posttestiküler ise sperm fonksiyon veya hareketliliğiyle ilgili anomalilerdir (Tanagho, 2009).

İn vitro fertilizasyon (IVF) kliniklerine başvuran çiftler için ICSI, birçok erkek faktörlü kısırlık vakasının tedavisinde geleneksel tüp bebek tedavileriyle karşılaştırıldığında son derece başarılı bir tedavi şeklidir.

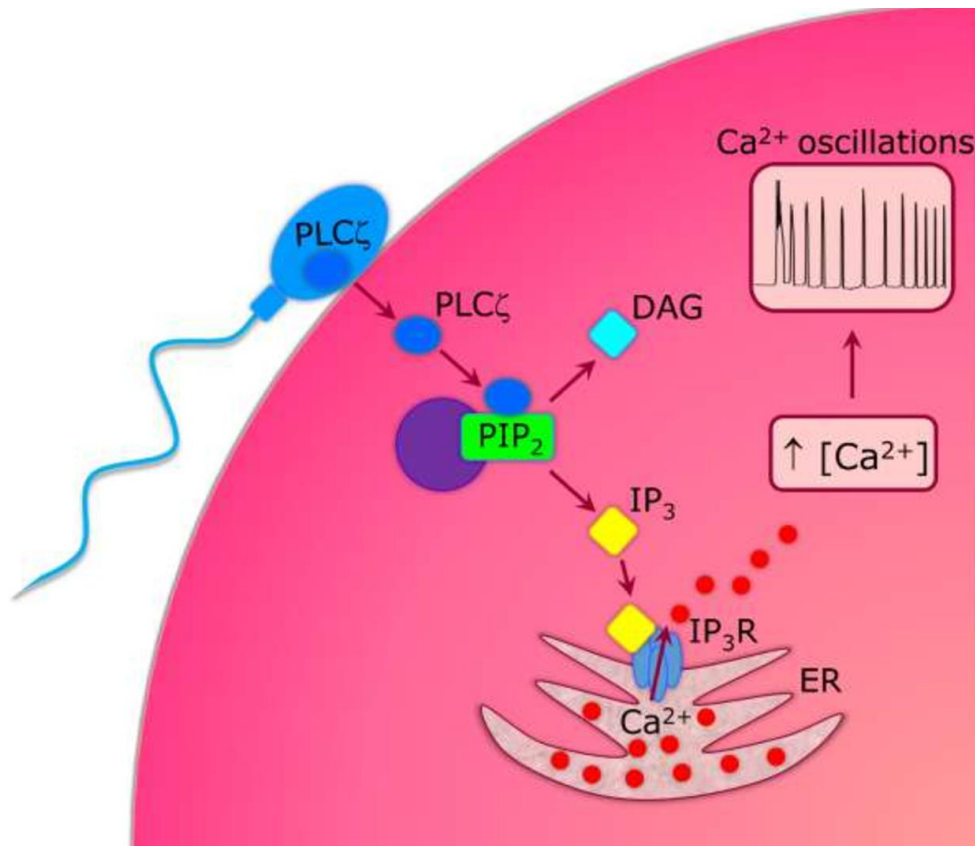
Oosit aktivasyonu, döllenmeden sonra embriyo gelişimini başlatan ilk ve en kritik adımdır. 'Oosit aktivasyonu' terimi, bir dizi biyokimyasal ve morfolojik olayı tanımlamaktadır.

Bugüne kadar incelenen tüm türlerde, bir yumurtanın aktivasyonundaki en erken sinyal olayı hücre içi serbest kalsiyum (Ca²⁺) konsantrasyonunun düzeyindeki büyük ve geçici bir artıştır (M. Swann ve Lai, 2012, Runft ve ark., 2002).

Her Ca^{2+} artışı yaklaşık 1 dakika sürer ve Ca^{2+} geçişleri 5-30 dakikalık aralıklarla meydana gelir (Miyazaki S. ve ark., 2006). Bu tür Ca^{2+} salınımları, in vitro fertilizasyon ve ICSI sonrasında insan ve fare oositlerinde gözlemlenmiştir (Sato, 1999). Bu tür Ca^{2+} salınımları oosit aktivasyonu için son derece önemlidir ve daha sonraki embriyo gelişimini etkileyebilir.

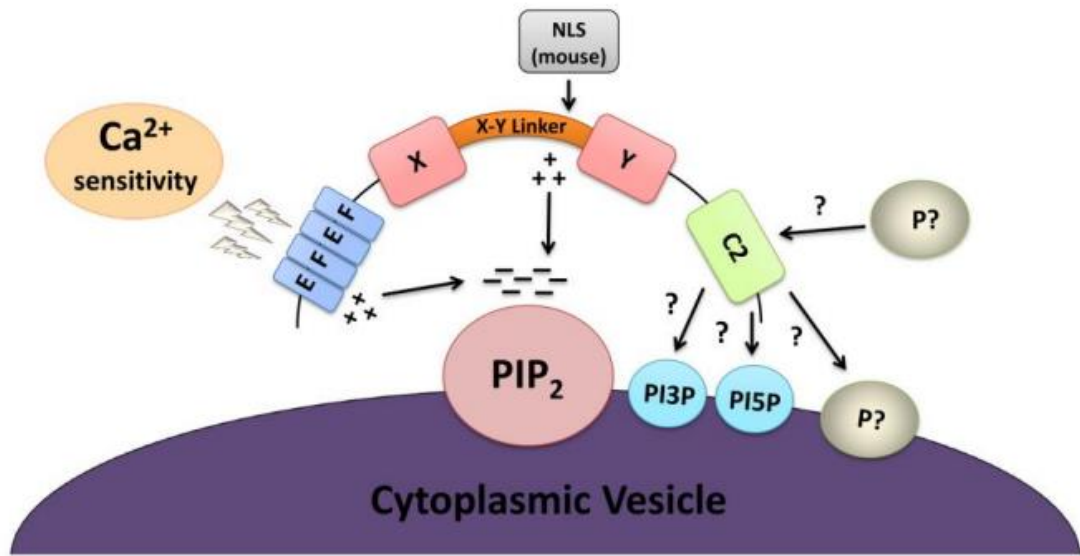
Birikmiş bilimsel ve klinik kanıtlar, Ca^{2+} salınımlarının, PLC-Zeta olarak adlandırılan sperm özgülü bir PLC izoformunun oosit sitoplazmasına girişine izin veren sperm oosit membran füzyonundan sonra tetiklendiği fikrini desteklemektedir (Saunders ve ark., 2002). PLC-Zeta cDNA veya rekombinant proteinin enjeksiyonu, fare ve insan oositlerinin partenogenetik aktivasyonunu ve ardından fare embriyolarının döllenmeden sonra görülenlere benzer oranlarda blastosist aşamasına kadar gelişimini uyarır.

PLC-Zeta, insan oositlerini de içeren, tüm memeli oositlerinde uzun süreli Ca^{2+} salınımları ürettiği defalarca gösterilen tek fizyolojik ajan olmaya devam etmektedir (Ito ve ark., 2011)



Şekil. 2.4. Sperm spesifik PLC-Zeta tarafından tetiklenen yumurta aktivasyonunun şematik gösterimi.

Sperm-yumurta zarı füzyonunun ardından, PLC-Zeta sperminden yumurta sitozolüne salınır ve zara bağlı substratı olan fosfoinositid 4,5-bisfosfatı (PIP₂) içeren ayrı bir hücre içi veziküler zarı hedefler. PLC-Zeta aracılı PIP₂ hidrolizi, InsP₃ ve DAG olmak üzere iki ikinci haberci üretir. InsP₃ daha sonra endoplazmik retikulum üzerindeki InsP₃ reseptörüne (InsP₃R) bağlanır; bu etkileşim, hücre içi depolardan Ca²⁺ salınımını tetikler ve daha sonra yumurta aktivasyonunu başlatan Ca²⁺ salınımlarının karakteristik modelini üretir.



Şekil 2.5. PLC-Zeta'nın memeli yumurtalarında önerilen hücre içi etki mekanizmasının şematik gösterimi.

Dölleyici sperminden teslim edildikten sonra PLC-Zeta, C2 alanının PI3P, PI5P veya henüz tanımlanamayan bir (membran veya sitozolik) yumurta proteini ile potansiyel etkileşimi yoluyla spesifik bir veziküler membran ile birleşir. Daha sonra PLC-Zeta, pozitif yüklü birinci EF-el alanı ve XY-bağlayıcı bölgesinin C-terminal kısmı ile elektrostatik etkileşimler yoluyla negatif yüklü substratı PIP₂ ile birleşir. Katalitik XY alanı daha sonra PIP₂'nin enzimatik bölünmesiyle ilerler.

PLC-Zeta'nın dinlenme nanomolar Ca²⁺ seviyelerinde aktif olmasını sağlayan yüksek Ca²⁺ duyarlılığı, EF-el alanları tarafından sağlanır. Fare PLC-Zeta'sinin XY bağlayıcısının, enzimi hücre döngüsüne bağlı bir şekilde pronükleuslara hedefleyen bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içerdiği rapor edilmiştir (referanslara dayalı şekil) (Nomikos M., Swann K. ve Lai F.A., 2012, Nomikos M., ve ark., 2007, Lomasney ve

ark., 1999). Ancak bu tür popülasyonların fizyolojik olarak geçerli olup olmadığı belirsizliğini koruyor. Spesifik PLC-Z lokalizasyonu, aynı memeli türü içindeki değişken kalıpları tanımlayan ve sıklıkla aynı antikor probunu kullanan çok sayıda çalışma nedeniyle bir endişe kaynağı olmaya devam etmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hastalardan Örneklerin Alınması

Pamukkale Üniversitesi Hastaneleri Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarına semen analizi için gelen hastalardan E-60116787-020-255627 sayılı 13.09.2022 tarihli, 13 sayılı girişimsel olmayan etik kurul onayı ile semen numuneleri alındı(Ek-1). Geçmiş öyküsünde kriptorşidizm, kemoterapi ve kanser tedavisi gören hastalar çalışma dışında bırakıldı.

Semen örnekleri, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) nün hazırladığı “ 2021 WHO laboratuvar el kitabı insan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi” adlı kitapta anlatılan kurallar çerçevesinde değerlendirildi. Semen analizi sonuçlarına göre hastalar 2 gruba ayrıldı. Kontrol grubu: obez olmayan spermiogram analizi veren hastalar (n: 49) Obez Hasta Grubu (BMI>30) n=18) olarak belirlenen hasta gruplarının semen analizleri yapıldı.

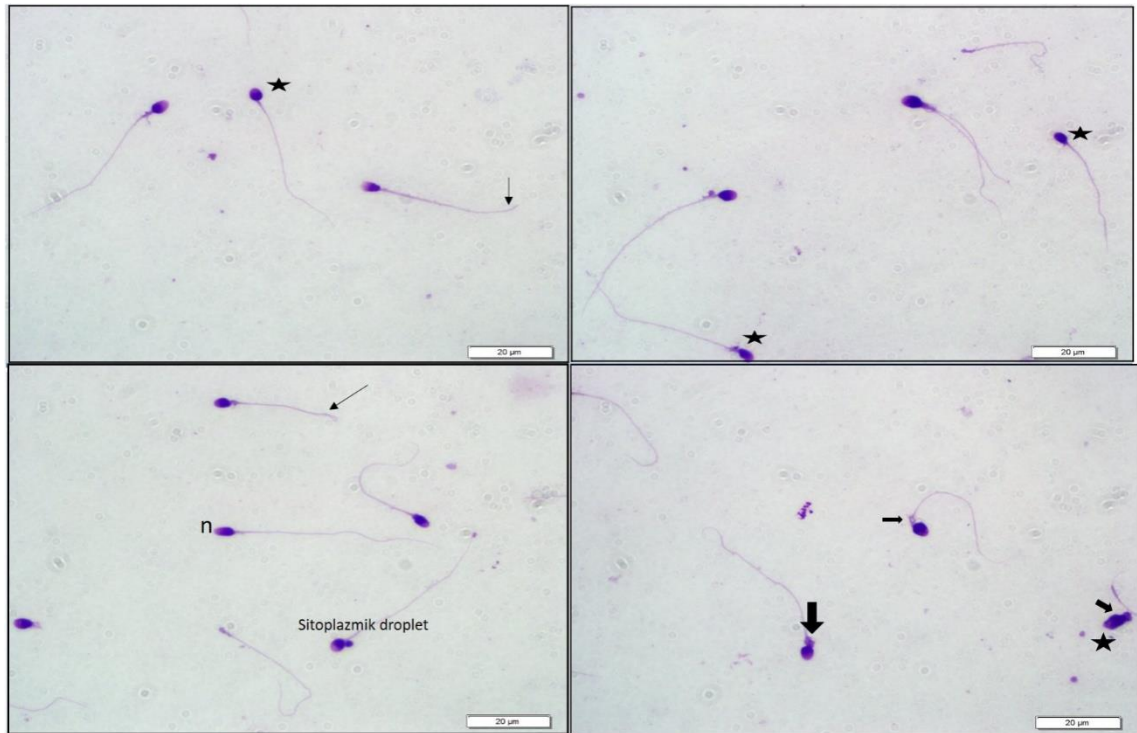
3.2. Semen Analizi

- Ejakülasyon yöntemi ile alınan semen örnekleri steril kaplara alındı.
- İlk 15 dakika içerisinde 37C°’deki ısıtıcı tablaya konularak likefiye olması beklendi. Yarım saatten uzun süren likefaksiyon süreleri kayıt altına alındı.
- Likefiye olmayan semen örnekleri için eşit miktarda fosfat-tamponlu salin kullanılarak likefiye edildi.
- Likefiye olan sperm örnekleri ilk 1 saat içerisinde viskozite, volüm, sperm konsantrasyonu, canlılık, pH ölçümü, motilite yönünden değerlendirilmesi

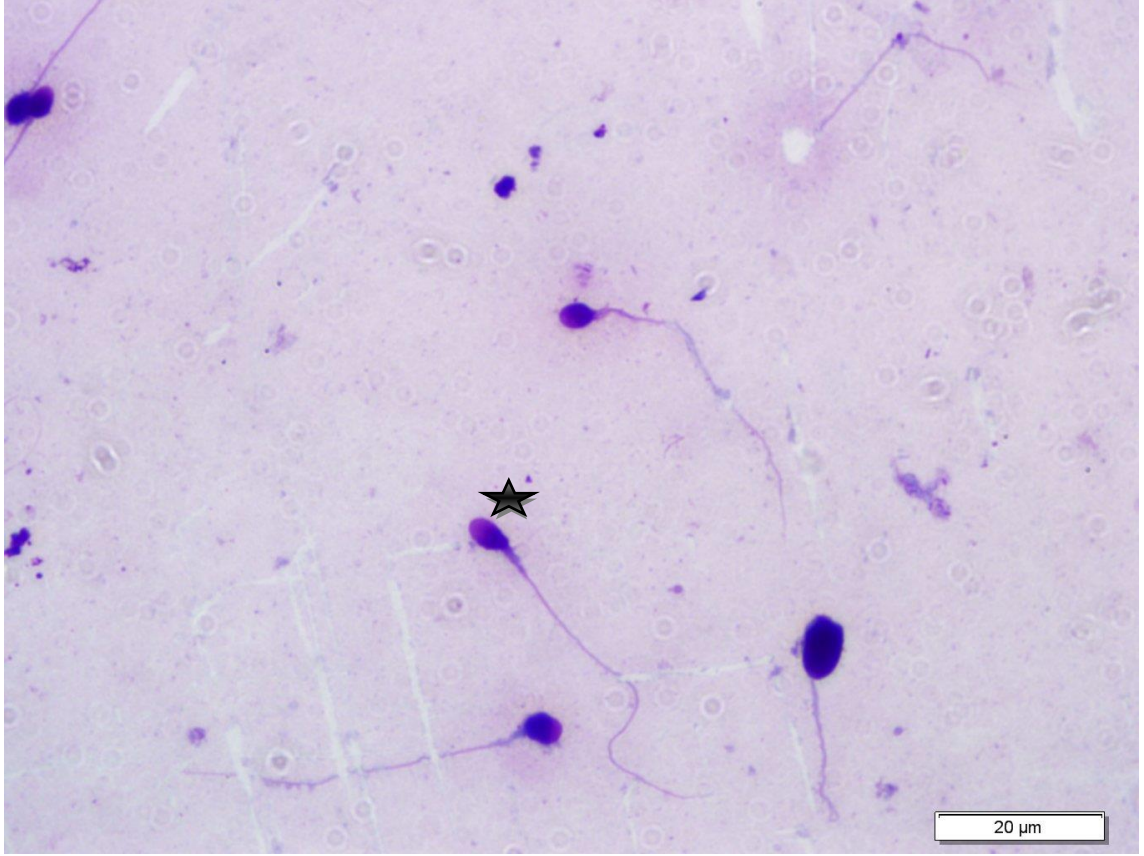
gerekir. Kruger morfolojisi için ıslak yayma preparatları hazırlandı ve kurumaya bırakıldı.

- İlk olarak hacmi ölçülen sperm örnekleri renk ve görünüm açısından değerlendirildi.
- Semen iyice karıştırıldı ve viskozitesi kontrol edildi. Viskoz olan semen numunesi hafifçe pipetlenerek çözülmesi sağlandı. Çözülmeyen numunelerde likefaksiyon çözme yöntemi uygulandı ve viskozite not edildi. Viskozite için eşik değer semenin damlatma esnasında 2 cm'den daha uzun şeklinde kabul edildi.
- Sperm sayımı için özel geliştirilmiş olan Makler sayım kamerasına 1 damla damlatılarak inverted mikroskopta sayıldı.
- Hücreler hareketli, hareketsiz ve yerinde hareketli olarak sınıflandırılıp sayım tamamlandı.
- Hacmi bilinen sayım alanı sayesinde konsantrasyon, toplam sperm sayısı, motilite, motil sperm sayısı hesaplamaları yapıldı.
- Sperm sayım işlemi en az iki tekrar yapılarak değerler karşılaştırıldı. Eğer sperm sayısı düşükse ve maklerde sperm görülmemiş ise lam-lamel arasına karıştırılmış sperm örneği damlatılıp tarama yapıldı. Sperm görülmesi halinde sonuç raporlandı. Eğer tekrar sperm görülmemesi durumu var ise semenin tamamı santrifüj tüpüne konuldu ve 15 dakika 3000 g'de santrifüj edildi.
- Dipte oluşan pelletin tamamı lama aktarılıp lamelle kapatıldı ve kontrol edilmemiş alan bırakmayacak şekilde sperm taraması yapıldı. Sonuçlar not edildi. Semen analizi biten semen numunesinden Kruger morfolojisi için yayma preparat hazırlandı.
- Karıştırılıp homojenize edilen numuneden bir damla numune, kimliklendirilen lamın ucuna bırakılarak ikinci bir lam ile yayma yapıldı. Kurumaya bırakılan lama Diff-quick boyama protokolüyle boyama yapıldı. Işık mikroskopunda morfolojik değerlendirme yapıldı.
- Büyük veya küçük, sivri, armut şekilli, yuvarlak, vakuollü (2 vakuolden fazla veya boyanmamış vakuollü alanları başın %20'sinde daha büyük) spermler baş defekti olarak belirlendi. Ayrıca post akrozomal bölgede bir vakuol içermesi veya akrozomun küçük veya büyük olması, çift başlılık ve bunların kombinasyonlarının görüldüğü spermler baş anomalisi grubuna dahil edildi.

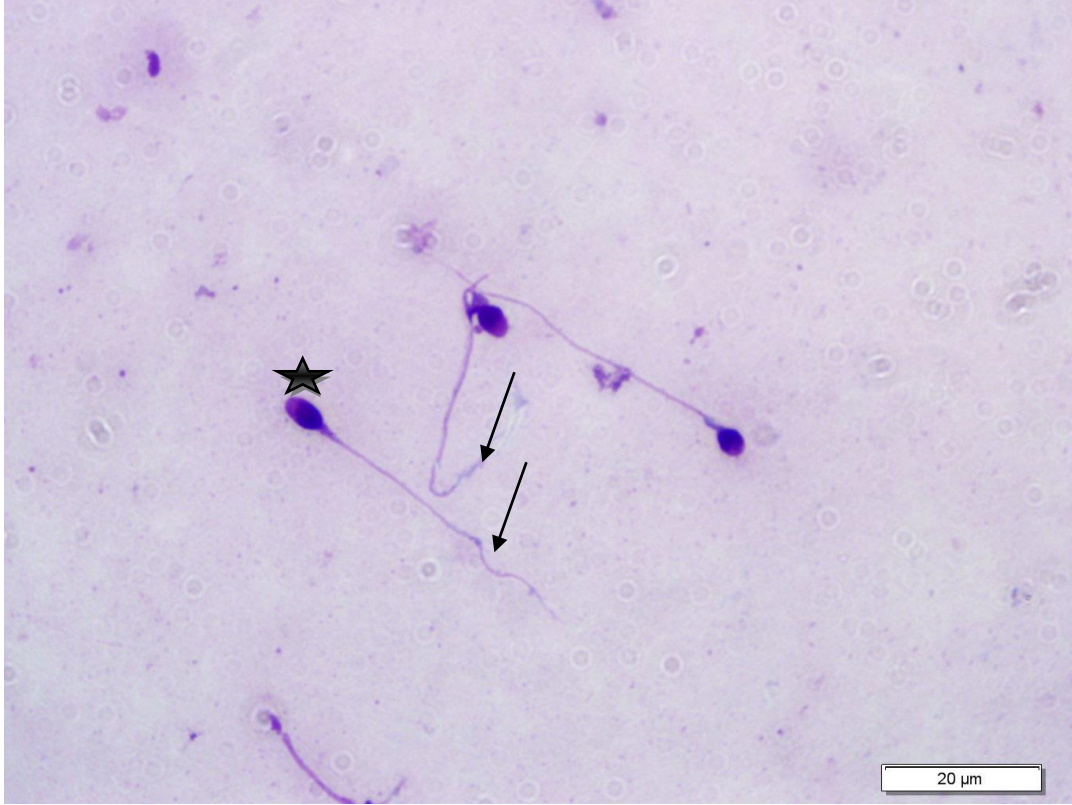
- Kısa, birden fazla sayıda, kırık, başın merkezi ile aynı konumda olmayan, keskin açılı bükülmeler, sarmal veya bunların kombinasyonları şeklinde görülen spermler boyun anomalisi olarak kabul edildi. Orta parça defekti olarak kısa, birden fazla sayıda, keskin açılı bükülmeler, sarmal, düzensiz genişlik ve bunların kombinasyonları dahil edildi. Aşırı rezidüel cisim: Bol miktarda düzensiz boyanmış, spermin başının üçte birinden veya daha fazla sitoplazmalı sıklıkla orta parça ile ilişkili olup bu spermler anormal kabul edildi (WHO El Kitabı, 2021)



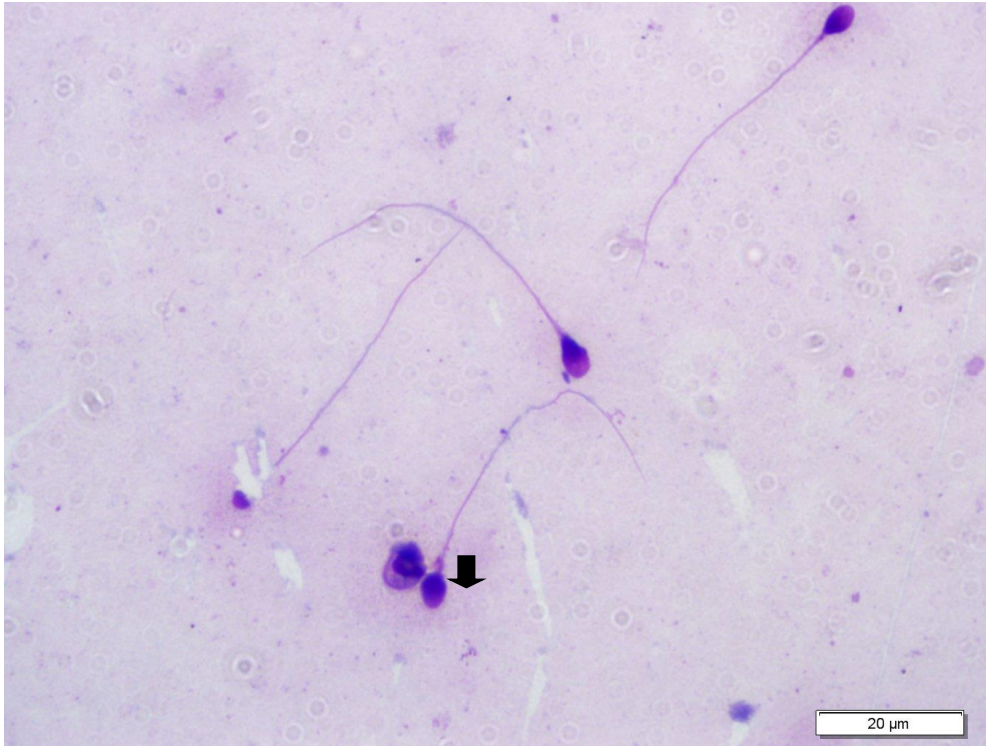
Resim 3.1. Sperm morfolojik değerlendirmesi. Yıldız: Baş anomalisi, ince ok: kuyruk anomalisi, n = normal sperm, kalın ok: boyun anomalisi, diff-quick boyama, 100X Bar: 20um



Resim 3.2. Sperm morfolojik değerlendirmesi Yıldız: Baş anomalisi, diff-quick boyama, 100X Bar: 20um



Resim 3.3. Sperm morfolojik değerlendirmesi Yıldız: Baş anomalisi, ince ok: kuyruk anomalisi, diff-quik boyama, 100X Bar: 20um



Resim 3.4. Sperm morfolojik değerlendirmesi Kalın ok: boyun anomalisi, diff-quik boyama, 100X Bar: 20um

3.3. İmmünohistokimyasal Boyama

Alınan semen örnekleri lamlara yayma işlemi yapıp kurumaya bırakıldı. %4 tamponlu formaldehit çözeltisinde 10 dakika bekletildikten sonra yıkandı. Daha sonra lamalar %70'lik etil alkolde 5 dakika bekletildi. Sırasıyla %90'lık ve %100'lük etil alkolde 5 dakika bekletildi. Hastalar toplanıncaya kadar lamalar kurutulup +4 °C'de saklandı.

İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi:

- 1)5-5-5 toplam 15 dakika PBS' ile yıkandı.
- 2)Hücrelerin endojenperoksidaz aktivitesi, %30' luk H₂O₂: Metanol (1:9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
- 3)PhosphateBufferedSaline ile yıkanan hücreler, serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 4)Hücreler üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece inkübasyona bırakıldı. Bu çalışmada kullanılacak primer antikor PLC-Zetadır. Primer antikorlar distile su ile dilüe edildi.
- 5)Hücreler, PhosphateBufferedSaline ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikorda 60 dakika bekletildi.
- 6) PhosphateBufferedSaline ile yıkanması yapılan hücreler, biotinlenmiş-sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin 30 dakika kadar muamele edilir.
- 7)Hücreler son kez PhosphateBufferedSaline ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3- 30 dakika kadar muamele edilir.
- 8)Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için hücreler hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
- 9)Preperatlar akan suda yıkanır ve sırasıyla %50, %70, %80, %96, %100' lük etil alkol serilerinde bekletildi.

10) Alkol serilerinden çıkan dokular ksilen I ve ksilenII'de 2 şer dakika bekletildi.

11) Ksilenden alınan preperatların üzeri kuruması beklenilmeden entellan ile kapatıldı.

3.4. Trizol ile RNA İzolasyonu

mRNA düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla bütün gruplarda RNA izolasyonu Trizol Reagent ile gerçekleştirildi. Sıvılaşmış semen steril olarak spermogramı değerlendirildikten sonra:

- Konik tabanlı steril tüpün alt kısmına 0,5 ml %90'lık gradient solüsyonu konulup üzerine 0,5 ml %45'lik gradient solüsyonu sızdırılarak yavaş yavaş birbirine karışmayacak şekilde konuldu.
- Üzerine semen numunesinin tamamı konuldu. 1600 devirde 10 dakika (Prog. No: 3) santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üstteki tüm fazlar atılır dipte oluşan pellet bırakıldı.
- Pellet üzerine 1 ml G-IVF (ya da Rinse) ilave edilip tekrar 1600 devir 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası pelleti bozmadan üstte supernatant eksiltiilip 0,5 ml ye yakın bırakıldı.
- Semen örneği yüksek devirli santrifüjde döndürülerek çöktürüldü, üzerine 500 µl olacak şekilde Trizol uygulandı ve 1,5 mililitrelik ependorf tüplerine alındı ve -200C de saklandı.

Deney aşamasında aşağıdaki protokole göre işlemler devam ettirildi.

- Her bir ependorf tüpe 100 µl kloroform eklenip ve iyice pipetlendikten sonra tekrar oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi.
- Soğutmalı santrifüj ile +4oC' de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj işlemi sonrası RNA bulunduğu renksiz olan üst faz ayrı ependorf tüplere aktarıldı.
- Toplanan üst fazın üzerine 250µlizopropanol eklenerek pipetleme işlemi yapılmış ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası tüpler +4oC'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi.

- Santrifüj sonrası supernatan kısım uzaklaştırıldı. Peletin üzerine %70'lik etanol eklenerek ve +4oC'de 15.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası supernatant atılmış ve kalan etanolün arınması sağlandı.
- Kalan pelet üzerine 30 µlRNaz-DNaz içermeyen su eklenerek, RNA elde edildi.
- RNA'lar çalışmalar gerçekleştirilene dek -80OC'de saklandı.
- İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Termo) yardımı ile gerçekleştirilmiştir.
- Sulandırılan RNA örnekleri, 1µl RNasefree distile su kullanılarak Nanodrop cihaz kaidesi üzerine bir damla halinde pipetlenip ve bilgisayardaki program analizi ile kör alındıktan sonra, 1µl olacak şekilde pipetlenip 230, 260, 280 nm'de okundu.

3.5. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan, cDNA sentezi temin edilen A.B.T. LABORATORY INDUSTRY (A.B.T. tmCdna SYNTHESIS KİT WİTH RNaseInh. (Highcapacity) ticari kit yardımıyla ilgil protokole göre gerçekleştirildi.

Protokole göre:

Kitin içerisinde bulunan

10x Reactionbuffer 2 mikro molar ⁵⁴		DK
dNTPmix (2,5 Mm each)	1 mikrolitre	27
Randomhexamere (50 mikromolar)	2 mikrolitre	54
ReverseTranscriptase (200)	1 mikrolitre	27
RNaseInhibitor	0,5 mikrolitre	13,5
RNasefreeWater	3,5 mikrolitre	94,5
RNA Template	10 mikrolitre	10

Hasta sayısına göre oranlayarak mix hazırlandı.ve önceden rna analizi ile elde edip -20 de muafaza ettiğimiz rnalardan 10 mikro litre ependorflara eklendi. RT-PCR cihazına

yerleştirildi. Cihaz 25 derecede 10 dk,37 derece de 120 dk,85 derecede 5 dk ve 4 derece de 5 dk tutarak cDNA elde edildi. Sentezlenen cDNA'lar, RT-PCR işlemine kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.1. Genlerin primer dizaynı

Gene name	Primer sekansı	Ürün Uzunluğu	AccessionNumbers
GAPDH	F:5'ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3' R:5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'	101	NM_001357943.2
PLC-Zeta	F:GCAGGCTACTTTTGGAGAGTCC-3' R:5'TTCATGGGTTTCCTTTAAGGTTCC-3'	98	NM__033123

3.6. Gerçek-Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (rt-PCR)

Çalışmada 96 kuyucuklu mikrolpaka okuyabilen ThermoScientificPikoReal 96 cihazıyla PCR yapıldı. Gerçek-zamanlı PCR işleminde, "PLC-zeta" geninin mRNA düzeyindeki gen ekspresyonu değişimi araştırıldı. Bunun için housekeeping gen olan GAPDH geni çalışmamızda kullanıldı.

İlgili hücre dizininden TRI-Reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır ve takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi tespit edilmiştir. Sonrasında, total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon aşamasında, her bir kuyucuk başına "5 µl SYBR Green" (AppliedBiosystem, USA), "6.5 µl moleküler biyolojik saflıkta su", "1.5 µl cDNA", "1 µl ForwardPrimer" ve "1 µl ReversePrimer" kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.

RT-PCR Protokolü :

Initialdenaturation 95°C'de 300 saniye 1 siklus

Denature 95°C'de 10-30 saniye 40 siklus

Anneal 55-68°C'de 10-60 saniye 40 siklus

Extend 72°C'de 2-5 saniye/step 1 siklus

3.7. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesinde , parametrik test varsayımları sağlandığında iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi, parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Grupların Demografik Özellikleri

Yapılan çalışmada kontrol grubuyla ve obez hasta gruplarının yaş aralıkları karşılaştırıldığında 30 yaş üstü hasta grubu obez hastalarda daha fazla olduğu saptandı. Kontrol grubundaki hastaların %55,1 (n=27) obez hasta grubunda %83 (n=15) 30 yaş üstü olduğu saptandı. Yapılan analiz sonucunda yaş açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0,05$). Fakat obez hasta grubunda daha yüksek yüzdeye sahip olması klinik yönden dikkat çekiciydi.

Grupların BMI leri karşılaştırıldığında obez hasta grubunun BMI $32,48\pm 2,53$ saptanırken kontrol grubunda bu değer $24,94\pm 2,81$ 'e düşmüştü. Bu sonuçlar kilo değişimiyle de koreleydi ve istatistiksel olarak anlamlı saptandı ($p=0,0001$).

Tablo 4.1. Grupların demografik özelliklerinin karşılaştırılması

		GRUPLAR		
		Kontrol	Obez	p
Yaş	17 - 24 yaş	10 (%20,4)	1 (%5,6)	
	25 - 29 yaş	12 (%24,5)	2 (%11,1)	0,08 (kk=5,044)
	30 ve üzeri	27 (%55,1)	15 (%83,3)	
A.O ± S.S		174,61 ± 7,78	172,33 ± 7,26	
BOY	med (IQR)	176 (168,5 - 180)	171 (168 - 178,25)	0,284 (t=1,081)
	min -maks	155 - 193	160 - 185	
	A.O ± S.S	76,16 ± 10,57	96,61 ± 10,97	
KİLO	med (IQR)	78 (70 - 85)	97,5 (87,5 - 100,75)	0,0001* (t=-6,948)
	min -maks	55 - 95	80 - 123	
	A.O ± S.S	24,94 ± 2,81	32,48 ± 2,53	
BMI	med (IQR)	25,18 (22,89 - 26,37)	30,68 (30,68 - 34,86)	0,0001* (z=-6,238)
	min -maks	16,6 - 29,76	30,02 - 38,39	

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdeler); kk= ki-kare testi; t: Bağımsız gruplarda t testi; z: Mann Whitney U testi

4.2. Grupların Kan Hormon Analizi Sonuçları

Kan hormon analizleri değerlendirildiğinde FSH, LH, TSH ve östrojen düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunamadı (p>0,05). Total testosteron karşılaştırıldığında kontrol grubunun testosteron düzeyleri obez gruba göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu saptandı (sırasıyla 4,8±1,28; 3,6 ± 1,61) (p<0,05). Prolaktin düzeyleri Kontrol grubunda 12,6±7,2 bulunurken obez hasta grubunda bu değer 17,15±9,28 olarak yükseldiği görüldü ve istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,031).

Tablo 4.2. Grupların kan hormon analizi sonuçları

	Kontrol		Obez		p
	A.O ± S.S	med (IQR)	A.O ± S.S	med (IQR)	
FSH	5,68 ± 3,33	5,13 (3,11 - 6,87)	5,16 ± 3,03	4,9 (3,34 - 6,9)	0,624 (z=-0,491)
LH	5,86 ± 2,38	5,92 (3,92 - 7,21)	6,14 ± 2,99	5,96 (3,86 - 8,47)	0,733 (t=-0,343)
TSH	5,14 ± 12,7	1,75 (1 - 2,61)	1,58 ± 0,86	1,57 (0,74 - 2,3)	0,622 (z=-0,545)
TOTAL TESTOSTERON	4,8 ± 1,28	4,72 (3,86 - 5,53)	3,6 ± 1,61	3,5 (2,28 - 5,43)	0,01* (t=2,687)
PROLAKTİN	12,6 ± 7,2	10,8 (8,56 - 12,78)	17,15 ± 9,28	13,5 (10,7 - 24,9)	0,031* (z=-2,157)
ÖSTROJEN	23,03 ± 7,2	24,2 (17,15 - 29,55)	22,2 ± 9,48	20,15 (16,08 - 25,6)	0,809 (t=0,244)

*p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdelikler); t: Bağımsız gruplarda t testi; z: Mann Whitney U testi

4.3. Grupların Semen Analizi Sonuçları

Grupların semen analizleri incelendiğinde abstinans süresi, volüm değerleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Sperm konsantrasyonu, progresif sperm sayısı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubunda daha fazla olduğu saptandı. Semen pH analizi sonucu istatistiksel olarak anlamlı obez hastaların semen örneklerinin daha alkali olması dikkat çekiciydi (p<0,05).

Non-progresif hareketli ve hareketsiz sperm sayısının obez hastalarda daha fazla olduğu belirlendi. Fakat yapılan istatistiksel analiz sonucu anlamlı değişiklikler saptanmadı. Sperm dışı hücreler tanımlamak için kullandığımız diğer hücreler

istatistiksel olarak anlamlı olmasa da obez hasta grubunda daha yüksekti. Grupların kruger morfolojik sınıflaması sonucu yapılan değerlendirmede normal sperm, baş, boyun ve kuyruk anamalisi değerleri gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşturmadı ($p>0,005$). Her iki gruptaki sperm hücrelerinin canlılık yüzdeleri birbirinden farklı bulunmadı ($p>0,005$).

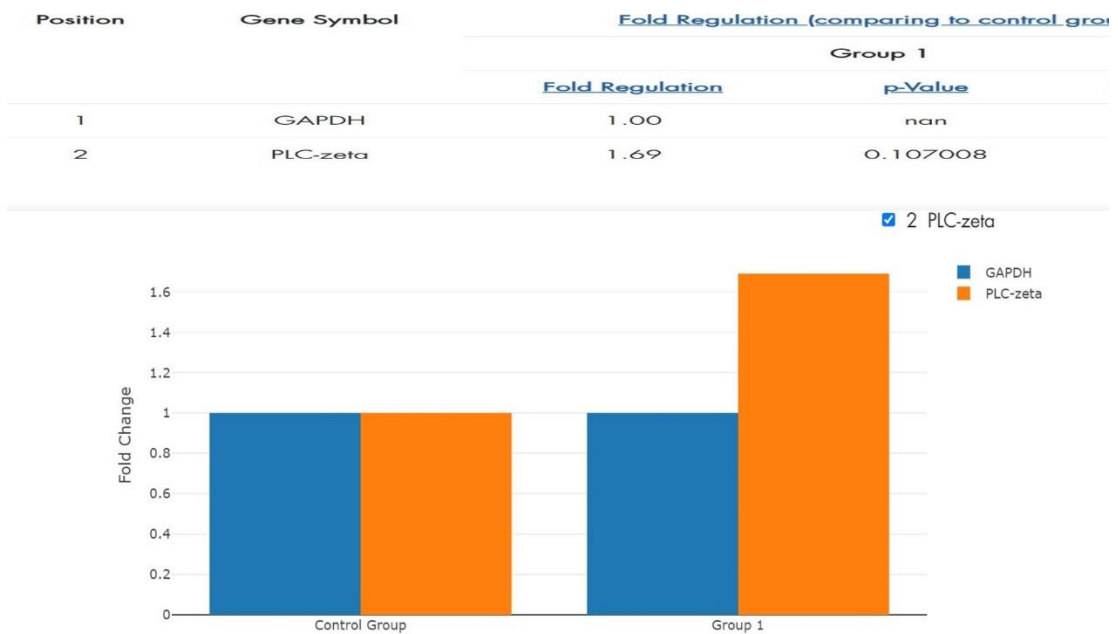
Tablo 4.3.1. Grupların Semen analizi sonuçları

	Kontrol		Obez		p
	A.O \pm S.S	Med (IQR)	A.O \pm S.S	Med (IQR)	
Abstinans Süresi	3,9 \pm 1,19	4 (3 - 4)	3,83 \pm 0,86	4 (3 - 4,25)	0,619 (z=-0,497)
pH	8,21 \pm 0,47	8,5 (8 - 8,5)	8,5 \pm 0,38	8,5 (8,5 - 8,63)	0,024* (z=-2,258)
Volüm	3,07 \pm 1,25	3 (2 - 4)	3,13 \pm 1,6	2,95 (2 - 4,7)	0,876 (t=-0,157)
Konsantrasyon	56,23 \pm 41,55	47 (27,5 - 72,5)	54,92 \pm 51,98	38,5 (9,55 - 86)	0,586 (z=-0,545)
İleri hızlı progresif	17,02 \pm 16,22	13 (6,5 - 23)	12,56 \pm 12,16	10 (1,75 - 20,25)	0,369 (z=-0,899)
İleri yavaş progresif	16,05 \pm 17,37	14 (3 - 25)	14,8 \pm 15,39	9 (1,9 - 22)	0,601 (z=-0,524)
Progresif	33,21 \pm 26,9	29 (12,17 - 44,5)	27,36 \pm 23,3	24 (3,48 - 47,25)	0,376 (z=-0,884)
Non progresif	5,14 \pm 5,12	4 (2 - 7)	5,77 \pm 7,05	4 (1 - 7)	0,614 (z=-0,505)
Hareketsiz	18,05 \pm 15,64	14 (10 - 20)	21,73 \pm 27,44	11 (4,6 - 22,5)	0,671 (z=-0,425)
Diğer hücre	4,29 \pm 3,75	3 (2 - 4)	5,5 \pm 5,14	3 (2,75 - 6,5)	0,317 (z=-1)
Kruger Normal	1,97 \pm 2,09	1 (0 - 3)	2 \pm 1,91	1 (1 - 2,75)	0,704 (z=-0,379)
Kruger Baş	91,92 \pm 6,46	93,5 (88,25 - 97)	88,85 \pm 11,23	94 (81 - 97)	0,683 (z=-0,409)
Kruger Boyun	17,11 \pm 26,86	4 (1,25 - 12,5)	22,15 \pm 30	4 (2 - 46,5)	0,624 (z=-0,49)
Kruger Kuyruk	7,89 \pm 15,23	1,5 (1 - 3,75)	9,15 \pm 12,1	1 (1 - 20,5)	0,555 (z=-0,591)
Vitalite	49,44 \pm 12,6	48 (40,5 - 61,5)	49,4 \pm 7,3	48 (44 - 55,5)	0,994 (t=0,007)

* $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25. – 75. Yüzdeler); t: Bağımsız gruplarda t testi; z: Mann Whitney U testi.

4.4. PLC-Zeta RT-PCR Analizi Sonuçları

Yapılan triplike PCR analizleri sonucunda PLC-Zeta ekspresyonunun obez hastalarda kontrol grubuna göre 1,69 kat arttığı belirlendi. Yapılan istatistiksel incelenmede anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$).

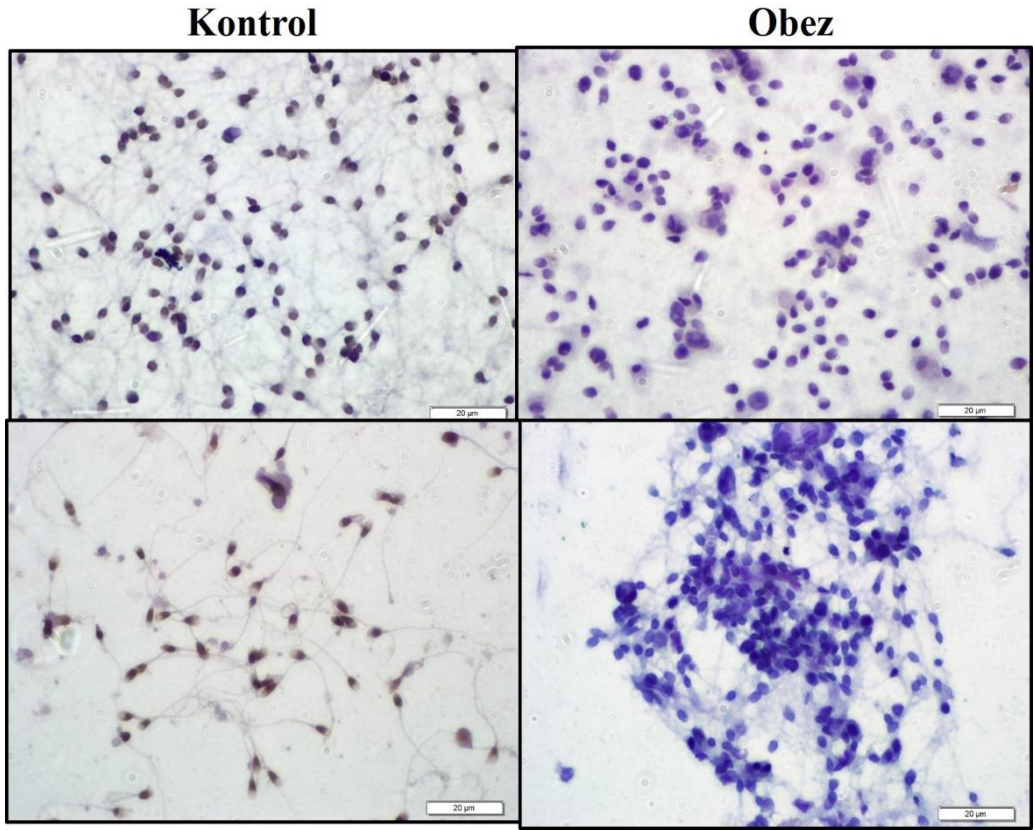


Tablo 4.4.1. PLC-Zeta PCR Sonuçları

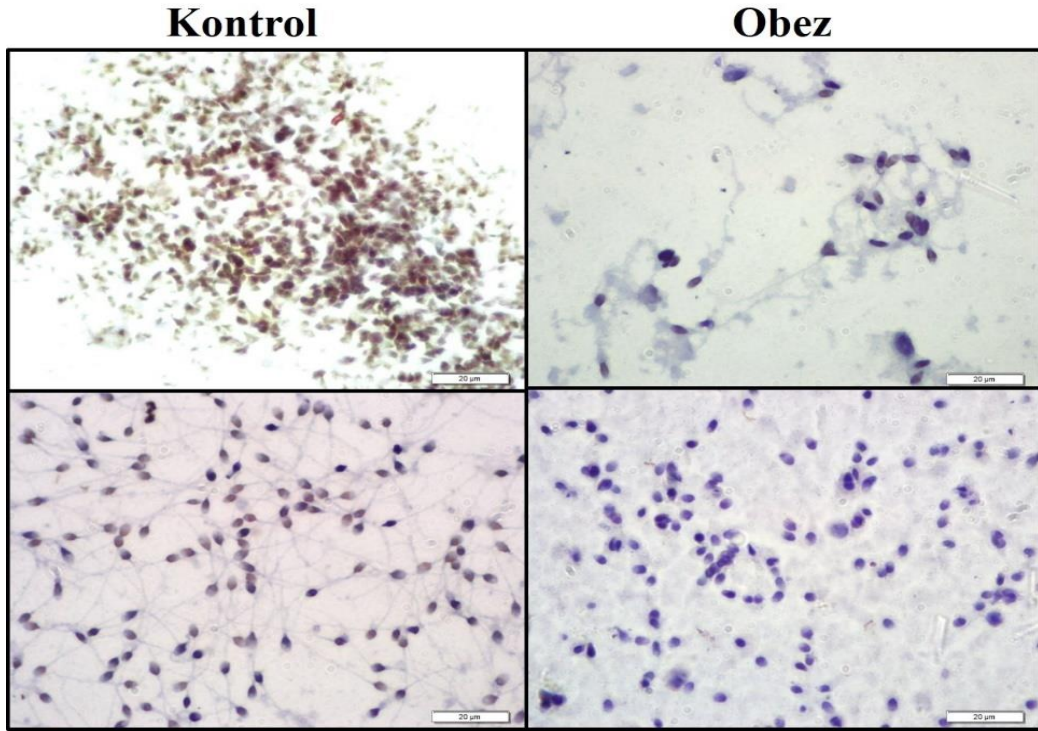
4.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme (PLC-Zeta)

Yapılan immünohistokimyasal analiz sonucunda kontrol grubunda PLC-Zeta boyaması baş kısmında, akrozomda, ekvatoryal düzlemde, postakrozomal çekirdek bölgesinde lokalizeydi. Değerlendirilen her alanda PLC-Zeta (+) hücre varlığı dikkat çekiciydi. Obez hastaların sperm immün boyamalarında boyanan hücre sayısının çok azaldığı, bazı hastalarda hiç reaksiyon alınmadığı saptandı. Kontrol grubuna benzer

şekilde PLC-Zeta boyanma özellikle akrozomal bölgesi ve postakrozomal çekirdekte belirgindi.



Resim 4.1. Kontrol ve Obez hasta gruplarında PLC-Zeta ekspresyon bölgeleri.



Resim 4.2. Kontrol ve Obez hasta gruplarında PLC-Zeta ekspresyon bölgeleri

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda total testosteron düzeyi Kontrol grubunda obez hastalara göre yüksek saptanmıştır. Fakat kan prolaktin düzeyi, obez grubunda istatistiksel olarak anlamlı daha yüksektir. Yapılan semen analizlerinde obez grubunun sperm parametreleri normal gruba göre daha düşük saptanmasına rağmen istatistiksel anlamlılık yoktu. Sadece pH düzeyinin obez hastalarda daha yüksek olması istatistiksel anlamlıydı. PLC-Zeta ekspresyonu obez grubunda kontrol grubuna göre mRNA ekspresyonu anlamlı olarak yüksek saptanmasına rağmen immünohistokimyasal boyama sonuçlarında obez grubunda sperm hücrelerinin zayıf boyandığı görüldü.

Yapılan bir çalışmada yüksek BMI'li erkeklerde sperm epigenetik özelliklerin değiştiği bildirildi (Soubry ve ark., 2016). Başka bir çalışma sperm DNA metilasyon değişiklikleri ile bunların sperm sayısı, hareketliliği ve canlılığı üzerindeki etkileri arasındaki ilişkiyi gösterdi (Jenkins., 2016). Bununla birlikte, obezite ve sperm parametreleri ile ilgili önceki çalışmalar, karışık sonuçlar göstermiştir. Bazıları obezite ve sperm sayısı (Eisenberg ve ark., 2014, Hakonsen, 2011) arasında negatif ilişkiler gözlemlerken, bazıları konsantrasyon (Hakonsen ve ark., 2011, Alshahrani ve ark., 2016, Jensen ve ark., 2004), başka çalışmalar hareketlilik ve normal morfolojik formların sayısı (Hammoud ve ark., 2008, Magnusdottir ve ark., 2005), arasında negatif ilişki saptamıştır. Fakat diğer bazı çalışmalar obezite ve sperm parametreleri arasında bir ilişki bulamamıştır (Aggerholm ve ark., 2008, Duits ve ark 2010, Pauli ve ark 2008, Qin D. D ve ark., 2007).

Belloc ve ark. tarafından yapılan araştırmada alınan semen hacmi ile BMI'nin konsantrasyonu ve ilerleyen hareketliliği üzerindeki etkisi arasında bir korelasyon bulmuşlardır. Ancak, sperm morfolojisi ile BMI arasında bir korelasyon bulamamışlardır (Belloc S. ve ark., 2014). Aksine, Relwani ve arkadaşları (Relwani R. ve ark., 2011) BMI'nin sperm özellikleri üzerinde herhangi bir etkisi bulamamıştır.

Obezite ve erkek subfertilitesi ile ilgili sonuçları yayımlayan MacDonald ve arkadaşları tarafından 4853 erkeği kapsayan ve 5 çalışmayı içeren büyük bir meta-analiz yayınlanmış ve sperm özellikleri ile herhangi bir korelasyon bulunmamıştır (MacDonald A.A. ve ark., 2010). Sermondade ve arkadaşları 21 çalışmadan 13 077 hastayı içeren güncellenmiş bir çalışma yayınlamış ve sonuçları aşırı kilolu, obez ve morbid obez erkeklerde azospermi riskinin arttığını göstermiştir (Sermondade N. ve ark., 2013).

1.285 erkekten alınan sperm örneklerinin incelendiği bir çalışmada, obezite ile sperm parametreleri arasındaki ilişki araştırılmış. Obezite, daha düşük semen hacmi, sperm sayısı, konsantrasyon ve hareketlilik (ilerleyen hareketlilik, toplam hareketlilik) ile ilişkilendirilmiştir. Obezite ayrıca oligospermi ve astenospermi de dahil olmak üzere erkek infertilitesinin kategorik sonuçlarıyla bağlantılı bulunmuştur. Ek olarak, diyabetik erkekleri tek başına incelediklerinde obezite ile düşük sperm konsantrasyonu ve motilitesi ve daha yüksek oligospermi olasılığı arasındaki ilişki devam ettini saptamışlar. Bulgular obezitenin sperm kalitesine olumsuz etkileri ile ilgili literatüre katkıda bulunmuştur (Ramaraju G.A. ve ark., 2018).

Bizim çalışmamızda ise hasta gruplarında bütün sperm parametreleri WHO 2021 kriterlerine göre incelenmiştir. Sperm konsantrasyonu, progresif hareketli sperm sayısı istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol grubunda obez grubuna göre daha fazla bulunmuştur. Semen pH analizi sonucu istatistiksel olarak anlamlı obez hastaların semen örneklerinin daha alkali bulunmuştur. Non-progresif hareketli ve hareketsiz sperm sayısının obez hastalarda daha fazla olduğu, fakat istatistiksel anlamlı olmadığı görüldü. Sperm dışı hücreler obez hasta grubunda daha yüksekti. Grupların kruger morfolojik sınıflaması sonucu yapılan değerlendirmede normal sperm, baş,boyun ve kuyruk anamalisi değerleri gruplar arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Bu sonuçlar bize diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında Obez hasta sayısının arttırılmasıyla anlamlı sonuçların elde edilme olasılığının artacağını düşündürdü.

Normal sağlıklı erkeklerin sperm kromatin bütünlüğü dahil olmak üzere semen parametrelerine (DNA fragmantasyon indeksi) bakılmış ve elde edilen sonuçlar; Sperm hareketliliğinde önemli azalma ve DNA fragmantasyon indeksinde önemli artış, yardımcı üreme teknikleri uygulanan obez erkeklerin normal kilolu erkeklere kıyasla canlı doğum oranında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe sahip olduğunu göstermiştir (Campbell J.M. ve ark., 2015).

Stewart ve arkadaşları 2009 (Stewart T.M. ve ark., 2009) yılında yaptığı çalışmada WHO kriterlerine göre sperm parametrelerini, gebelik sonuçlarını ve hormon profillerini ve obeziteyle ilişkisini karşılaştırmışlar. Elde ettikleri sonuçlarda obezite, azalan toplam sperm sayısı ile anlamlı şekilde ilişkili bulmuşlardır. Yapılan çalışmada Obez erkeklerde (BMI >30 kg/m²) T, SHBG ve inhibin önemli ölçüde düşük, ancak FSH yüksek saptanmıştır (Stewart T.M. ve ark., 2009).

2004 de Jensen ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 96-98 yılları arasında askere alınan erkeklerde semen analizi ve hormon profillerini karşılaştırmışlar. BMI >25 kg/m², sperm konsantrasyonunda %21.6 (%95 GA %4.0-%39.4) ve toplam sperm sayısında %23.9 (%95 CI %4.7-%43.2) azalmaya sahipti. Sperm sayısında önemsiz azalma, testis boyutu, semen hacmi ve hareketli sperm yüzdesi yüksek BMI'den etkilenmediği saptanmıştır. Azalmış serum testosteron, SHBG ve inhibin B, artmış E2 ile pozitif bir ilişki göstermiştir(Jensen TK ve ark., 2004).

Yapılan bir çalışmada 2014 ve 2019 yılları arasında, 35'i (%46,7) pozitif sperm elde edilen toplam 75 azospermik erkek değerlendirilmiş. Hastaların çoğunluğu (%57,3) normal BMI'ye (20 kg/m² ile 25 kg/m² arasında) veya birinci derece obeziteye (25 kg/m² ile 30 kg/m² arasında) sahipti. Yapılan çalışmada BMI ile pozitif sperm alımı veya hormon seviyeleri (LH, FSH, SHBG, prolaktin) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. Bununla birlikte, daha yüksek BMI'ye sahip hastalarda daha düşük serum testosteron seviyeleri gözlenmiştir (p=0,035) (Pavan-Jukic D ve ark., 2020).

Bieniek ve arkadaşları Kuzey Amerika da yaptığı prospektif çok merkezli çalışmada BMI ile ejakulat volümü (r=-0.04), Sperm konsantrasyon (r=0.08), morfoloji (r= 0.04) ve motilite (r=0.07) arasında zayıf ama anlamlı negatif korelasyon saptandı. Azospermi ve oligospermi oranları normal vücut ağırlıklı (sırasıyla %9,8-%24,5) kişilerle karşılaştırıldığında obez erkekler den daha yüksek (sırasıyla %12.7,%31.7) BMI ile T seviyesi negatif kolere bulundu. E2 düzeyi ile BMI arasında pozitif korelasyon saptandı. FSH ve LH seviyeleri ile BMI arasında herhangi bir ilişki saptanmadı (Bieniek J.M. ve ark., 2016).

Bizim çalışmamızda FSH, LH, TSH ve östrojen düzeyleri arasında gruplar arası anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Fakat Total testosteron düzeyleri kontrol grubunda

obez gruba göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek saptanmıştır. Prolaktin düzeyleri ise obez hastalarda istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek bulundu. Obez hastalarda LH hormonunda anlamlı fark olmamasına rağmen, T düzeyindeki anlamlı düşüş literatürle uyumlu bir şekilde steroidogenezin baskılanması yönünde bilgi vermektedir.

PLC-Zeta fonksiyonunun potansiyel klinik etkileri vardır. Memelilerde azalmış bir PLC-Zeta ifadesi, spermin oositte Ca^{2+} salınımları oluşturma yeteneğini kısmen veya tamamen siler. Ancak Ca^{2+} sinyali, oosit aktivasyonu ve partenogenetik gelişim, sadece fare/insan PLC-Zeta mikroenjeksiyonu ile sağlanabilir. Ek olarak, yakın tarihli klinik kanıtlar, PLC-Zeta'nın başarısız ifadesi ile erkek veya idiyopatik infertilite arasında olası bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Özellikle, tekrarlayan IVF başarısızlığı durumlarında PLC-Zeta işlevselliği ciddi şekilde etkilenmiş görünmektedir (Yoon S-Y ve ark., 2008, Heytens E. ve ark., 2009, Kashir J. ve ark., 2012).

Escoffier ve ark. (2016) ICSI'yi takiben döllenme başarısızlığı durumlarında PLC-Zeta'nın kilit bir faktör olduğuna dair kanıt üretti; PLC-Zeta'yı kodlayan insan genindeki bir mutasyonun, spermde proteinin yokluğuna yol açtığını ve bu durumun oosit aktivasyonunu önlemek için yeterli olduğunu gösterdi (Escoffier J. ve ark., 2016). Bozuk PLC-Zeta veya PLC-Zeta kaynaklı Ca^{2+} salınımı, anormal sperm parametreleri ve morfolojisi, sperm DNA fragmentasyonu ve oksidasyonu ve anormal embriyogenez/gebelikler dahil olmak üzere birçok erkek infertilitesi formuna bağlanabilir. Bu tür sperm, sperm başı içinde yok/azalmış seviyeler ve PLC-Zeta'nın anormal lokalizasyon paternleri sergiler (Kashir J., 2020).

PLC-Zeta çok sayıda türün sperminde tanımlanmıştır ve genel olarak sperm başının farklı hücre altı bölgelerinde lokalize olarak görünmektedir ve her spesifik popülasyon için potansiyel olarak farklı fonksiyonel rollere sahiptir (Kashir J. ve ark., 2014) PLC-Zeta, fare ve domuz sperminin akrozomal ve post-akrozomal bölgelerinde tanımlanmış olup, domuz sperminde de bir kuyruk popülasyonu tanımlanmıştır (Fujimoto ve ark., 2004, Kaewmala ve ark., 2012). At sperminde PLC-Zeta'nın akrozomda, ekvatorial segmentte, baş orta kısmında ve flagellumun ana parçasında rapor edildiği rapor edilmiştir (Bedford-Guaus ve ark., 2021). İnsanlarda sperm başının akrozomal, ekvator ve akrozomal sonrası bölgelerinde üç farklı PLC-Zetapopülasyonu tanımlanmıştır.

Önceki bir çalışma, PLC-Zeta 'nın fare ve insan sperminin akrozomunda lokalize olduğunu ve sperm yüzeyinde daha fazla PLC-Zeta popülasyonunun mevcut olduğunu öne sürdü (Aarabi ve ark., 2012). Bununla birlikte, aynı antikorları kullanan çok sayıda çalışma, PLC-Zeta'nın fare sperminin akrozomal sonrası bölgesine (Fujimoto ve ark., 2004, Young ve ark., 2009) ve ayrıca insan sperminin akrozomal, ekvatorial ve akrozomal sonrası bölgelerine lokalizasyonunu göstermiştir (Yoon ve ark., 2008, Kashir ve ark., 2011, Kashir ve ark., 2013, Grasa ve ark., 2008) Aslında, fare sperminde PLC-Zeta lokalizasyonu konusunda yalnızca fikir birliği var gibi görünüyor. PLC-Zeta lokalizasyonundaki bu farklılık sadece farklı türler arasındaki gözlemlerle sınırlı değildir; bir çalışma, insan denekler arasında spermde gözlemlenen lokalizasyon modellerinde önemli farklılıklar olduğunu rapor etmektedir (Kashir ve ark., 2013).

Saleh ve arkadaşları, ilerleyen erkek yaşının fare spermindeki PLC protein seviyeleri ve lokalizasyon modelleri üzerindeki etkisini yarı kantitatif olarak tespit etmek için immünoablota ve immünofloresan kullanırken, aynı zamanda testislerdeki PLC mRNA seviyelerini de kantitatif olarak incelemişlerdir. Geniş bir yaş dağılımı sağlamak için 8, 12, 24 ve 36 haftalık fareleri incelemişler ve ayrıca fare sperminin insan sperminde olduğu gibi aynı ölçüde PLC değişkenliği gösterip göstermediğini ve ilerleyen erkek yaşının ve fare türünün bunun üzerinde önemli bir etkisi olup olmadığını incelemişlerdir. Fare spermindeki PLC seviyeleri, insan spermine benzer şekilde önemli düzeyde değişkenlik göstermiştir. Bununla birlikte, bu değişkenlik yaş, tür ve fare spermindeki toplam PLC seviyelerinden etkilenmiştir. Daha genç farelerden alınan spermlerin ağırlıklı olarak postakrozomal bir lokalizasyon paterni sergilediğini, yaşlı farelerden alınan spermlerin ise daha genç muadillerine kıyasla daha yüksek akrozomal PLC seviyeleri sergilediğini ve bunun yanı sıra sperm içindeki PLC seviyelerinin azaldığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, PLC protein ve mRNA seviyelerinde olduğu gibi, PLC seviyelerindeki değişkenlik de hem B6 hem de CD1 suşlarını farklı şekillerde etkilemiştir. (Saleh ve ark., 2020)

Bizim çalışmamızda ise bazı obez hastalarda az sayıda spermlerde akrozomal ve postakrozomal PLC-Zeta ekspresyonu devam ederken, bazı obez hastalarda hiç ekspresyon görülmediği saptandı. Çalışmamızdaki obez hastaların %83,3 ü 30 yaş ve üzeri olduğu için Saleh ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı destekler niteliktedir.

Sperm spesifik PLC-Zeta, PLC-Zeta'yı kodlayan RNA enjeksiyonu ile fare yumurtalarında ifade edildiğinde hücre içi Ca^{2+} salınımlarını ve yumurta aktivasyonunu indüklediği bilinmektedir (Yoda ve ark., 2004). PLC-Zeta fare, insan ve domuz sperminin sırasıyla akrozomal ve akrozomal sonrası, akrozomal ve ekvatorun yanı sıra akrozomal sonrası ve ekvatorial bölmelerinde tanımlanmıştır. Tüm türlerde sürekli olarak potansiyel kuyruk lokalizasyonu gözlemlenmiştir (Kashir., 2017). Grasa ve ark. (Grasa ve ark., 2008) ve Young ve ark. (Young ve ark., 2009), sırasıyla insan ve fare sperminde, kapasitasyondan önce, PLC-Zeta 'nin akrozomal popülasyonlarının belirgin olduğunu ve kapasitasyon sonrasında ağırlıklı olarak post-akrozomal lokalizasyona kaydığını gösterdi.

Yapılan bir çalışmada Flow sitometrisi ile değerlendirilen PLC-Zeta miktarı ile in vitro fertilizasyon oranlarının ilişkili olup olmadığını test etmek için tasarlanmıştır. İnfertil 43 çiftten alınan semen örneklerinde PLC-Zeta proteininin yüzde ve ortalama floresan yoğunluğu (MFI) yüzde olarak analiz edilmiştir. Sonuçlar immüno Floresan etiketleme ile doğrulanmıştır. Döllenme oranı %40 veya daha düşük olan hastalar düşük döllenme grubunda yer alırken, yüksek döllenme grubunda döllenme oranı %60 ve üzerinde olan hastalardan oluşmuştur. Akış sitometrisi ile yapılan kantitatif analizler, düşük ve yüksek fertilizasyon oranları arasında fosfolipaz C-zeta oranı veya MFI dikkate alındığında anlamlı bir fark olmadığını göstermiştir. Gebelik oranları ile fosfolipaz C-zeta miktarı arasında bir korelasyon bulunmamıştır. Toplam fertilizasyon başarısızlığı vakalarının hiçbirinde fosfolipaz C-zeta eksikliği yoktu.

Yapılan bir çalışmada toplamda 32 erkekten alınan 32 numune kullanılmış ve analiz edilmiştir. Tüm ejakülatlar normal semen parametreleri sergileyen hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. (sperm konsantrasyonu: $62.7 \pm 44.1 \times 10^6$, motilite: % 41 ± 9 , canlılık: % 78 ± 9). Bu çalışmanın sonuçları, dondurma-çözme işlemlerinden sonra spermatozoa üzerinde PLC-Zeta varlığının azaldığını göstermektedir (Aras-Tosun D ve ark., 2022). Kashir et al. (2011), altı sperm donöründe kriyoprezervasyonun ardından spermatozoadaki PLC-Zeta immüno Floresan seviyelerinde önemli bir azalma (örneklere göre %20'den %56'ya) bulmuştur (Moreau ve ark., 2019). Western blot kullanarak kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası nicel PLC-Zeta ifadesini karşılaştırmıştır. Çözüldükten sonra tam uzunluktaki PLC-Zeta proteinini temsil eden bandın azaltılmış bir yoğunluğunu gösterdiğini saptamıştır. Ayrıca, kriyoprezervasyondan sonra

akrozomal PLC-Zeta lokalizasyonu sonrası gösteren spermilerin oranında önemli bir düşüş bulmuşlardır.(Kashir ve ark., 2011)

Yapılan başka bir çalışmada kontrol denekleri (kanıtlanmış oosit aktivasyon kapasitesi olan erkekler; n = 16) ve spermeleriyle tekrarlayan intrasitoplazmik sperm enjeksiyon başarısızlığı ile sonuçlanan erkekler (oosit aktivasyon eksikliği [OAD]; n = 5) çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma sonunda kontrol deneklerinden alınan spermeler, OAD teşhisi konan infertil erkeklere kıyasla PLC-Zetaimmünofloresan sergileyen sperm oranının önemli ölçüde daha yüksek olduğunu gösterdi (sırasıyla %82.6 ve %27.4) (Kashir ve ark., 2013).

Bizim çalışmamızda immünohistokimyasal sonuçlara zıt olarak PCR analizlerinde obez hastalarda PLC-Zeta ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır. mRNA ekspresyon düzeyindeki bu artış protein düzeyinde gerçekleşmemesi bize obez hastalarda protein sentezi aşamalarında sekteye uğrayan kısmın traslasyon aşaması olduğunu düşündürdü.

Çalışmamızın limitasyonları vardır. Obez hasta sayısının az olması, Androlojilabaratuarına başvuran hastaların infertilite tedavisi uygulandıysa yapılan Intrauterin inseminasyon, ICSI sonuçları ve bunların gebelik ya da canlı doğumla sonuçlanıp sonuçlanmadıkları konusunda bilgi yoktur.

6. SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızda obez hastalarda testosteron düşüklüğü, prolaktin yüksekliği ispatlanmıştır. Yapılan PCR analizinde PLC-Zeta ekspresyonunun arttığı fakat immünohistokimyasal düzeyde protein ekspresyonunun azaldığı görüldü. Bu sonuçta bize obezitenin mRNA ekspresyon düzeyinde değil, protein sentezinde, translasyon aşamasında PLC-Zeta ekspresyonunda bozukluğa neden olabileceğini gösterdi. Fakat net bilgileri elde edebilmek için hasta sayısının arttırıldığı daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Aggerholm, A. S., Thulstrup, A. M., Toft, G., Ramlau-Hansen, C. H., & Bonde, J. P. (2008). Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertility and sterility*, *90*(3), 619-626.
- Aitken, R. J., Sutton, M., Warner, P., & Richardson, D. W. (1985). Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *Reproduction*, *73*(2), 441-449.
- Alshahrani, S., Ahmed, A.-F., Gabr, A. H., Abalhassan, M., & Ahmad, G. (2016). The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia*, *48*(10), 1125-1129. <https://doi.org/10.1111/and.12549>
- Aras-Tosun, D., Cakar, Z., Can, A., Ozkavukcu, S., Kaplanoglu, I., & Cinar, O. (2022). Phospholipase C-zeta levels are not correlated with fertilisation rates in infertile couples. *Andrologia*, *54*(1). <https://doi.org/10.1111/and.14269>
- Barratt, C. L. R., Björndahl, L., Menkveld, R., & Mortimer, D. (2011). ESHRE special interest group for andrology basic semen analysis course: A continued focus on accuracy, quality, efficiency and clinical relevance. *Human Reproduction*, *26*(12), 3207-3212.
- Bedford-Gauas, S. J., McPartlin, L. A., Xie, J., Westmiller, S. L., Buffone, M. G., & Roberson, M. S. (2011). Molecular cloning and characterization of phospholipase C zeta in equine sperm and testis reveals species-specific differences in expression of catalytically active protein. *Biology of reproduction*, *85*(1), 78-88.
- Belloc, S., Cohen-Bacrie, M., Amar, E., Izard, V., Benkhalifa, M., Dalléac, A., & de Mouzon, J. (2014). High body mass index has a deleterious effect on semen parameters except morphology: Results from a large cohort study. *Fertility and sterility*, *102*(5), 1268-1273.
- Bieniek, J. M., Kashanian, J. A., Deibert, C. M., Grober, E. D., Lo, K. C., Brannigan, R. E., Sandlow, J. I., & Jarvi, K. A. (2016). Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men. *Fertility and sterility*, *106*(5), 1070-1075.
- Campbell, J. M., Lane, M., Owens, J. A., & Bakos, H. W. (2015). Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*, *31*(5), 593-604.
- Craig, J. R., Jenkins, T. G., Carrell, D. T., & Hotaling, J. M. (2017). Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. *Fertility and sterility*, *107*(4), 848-859.
- Dalçık, H., & Yıldırım, M. (2016). Moore Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. *Nobel Tıp Kitabevi, Ürogenital Sistem*, 243-256.
- Duits, F. H., Van Wely, M., Van Der Veen, F., & Gianotten, J. (2010). Healthy overweight male partners of subfertile couples should not worry about their semen quality. *Fertility and sterility*, *94*(4), 1356-1359.
- Eisenberg, M. L., Kim, S., Chen, Z., Sundaram, R., Schisterman, E. F., & Buck Louis, G. M. (2014). The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: Data from the LIFE study. *Human reproduction*, *29*(2), 193-200.

- Eliasson, R. (2010). Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian journal of andrology*, 12(1), 26.
- Eroschenko, V. P., & Demir, R. (2001). *Di Fiore histoloji atlası: Fonksiyonel ilişkileriyle*. Palme Yayıncılık.
- Escoffier, J., Lee, H. C., Yassine, S., Zouari, R., Martinez, G., Karaouzène, T., Coutton, C., Kherraf, Z., Halouani, L., & Triki, C. (2016). Homozygous mutation of PLCZ1 leads to defective human oocyte activation and infertility that is not rescued by the WW-binding protein PAWP. *Human molecular genetics*, 25(5), 878-891.
- Evens, E. M. (2004). A global perspective on infertility: An under recognized public health issue. *The University of North Carolina at Chapel Hill*, 18, 1-42.
- Fujimoto, S., Yoshida, N., Fukui, T., Amanai, M., Isobe, T., Itagaki, C., Izumi, T., & Perry, A. C. (2004). Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Developmental biology*, 274(2), 370-383.
- Grasa, P., Coward, K., Young, C., & Parrington, J. (2008). The pattern of localization of the putative oocyte activation factor, phospholipase C ζ , in uncapacitated, capacitated, and ionophore-treated human spermatozoa. *Human Reproduction*, 23(11), 2513-2522.
- Green, D. P. L. (1993). Mammalian fertilization as a biological machine: A working model for adhesion and fusion of sperm and oocyte. *Human Reproduction*, 8(1), 91-96.
- Håkonsen, L. B., Thulstrup, A. M., Aggerholm, A. S., Olsen, J., Bonde, J. P., Andersen, C. Y., Bungum, M., Ernst, E. H., Hansen, M. L., Ernst, E. H., & Ramlau-Hansen, C. H. (2011). Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. *Reproductive Health*, 8(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1742-4755-8-24>
- Hammoud, A. O., Wilde, N., Gibson, M., Parks, A., Carrell, D. T., & Meikle, A. W. (2008). Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertility and sterility*, 90(6), 2222-2225.
- Özel HB,(2009) Tek Taraflı Testis Torsiyonunda Karşı Testiste Testiküler Anjiotensin Dönüştürücü Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Histolojik ve Histoşimik Olarak Değerlendirilmesi.(Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi)
- Heytens, E., Parrington, J., Coward, K., Young, C., Lambrecht, S., Yoon, S.-Y., Fissore, R. A., Hamer, R., Deane, C. M., & Ruas, M. (2009). Reduced amounts and abnormal forms of phospholipase C zeta (PLC ζ) in spermatozoa from infertile men. *Human Reproduction*, 24(10), 2417-2428.
- Ito, J., Parrington, J., & Fissore, R. A. (2011). PLC ζ and its role as a trigger of development in vertebrates. *Molecular Reproduction and Development*, 78(10-11), 846-853. <https://doi.org/10.1002/mrd.21359>
- İlkan, A. (2014). *Düşük fertilizasyona neden olan sperm örneklerinde fosfolipaz C zeta'nın immunfloresan gösterimi ve Plc ζ gen mutasyonlarının tayini* [Master's Thesis, İstanbul Bilim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. <http://acikerisim.demiroglu.bilim.edu.tr:8080/xmlui/handle/11446/168>
- Jenkins, T. G., Aston, K. I., Hotaling, J. M., Shamsi, M. B., Simon, L., & Carrell, D. T. (2016). Teratozoospermia and asthenozoospermia are associated with specific epigenetic signatures. *Andrology*, 4(5), 843-849. <https://doi.org/10.1111/andr.12231>
- Jensen, T. K., Andersson, A.-M., Jørgensen, N., Andersen, A.-G., Carlsen, E., & Skakkebaek, N. E. (2004). Body mass index in relation to semen quality and

- reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertility and sterility*, 82(4), 863-870.
- Junqueira, L. C., Carneiro, J., & Kelley, R. O. (1998). Temel Histoloji (Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışalı B). *Bariş Kitapevi*, 8, 407-418.
- Junqueira Temel Histoloji / PDF*. (t.y.-a). Geliş tarihi 28 Şubat 2024, gönderen <https://www.scribd.com/document/501428622/Junqueira-Temel-Histoloji>
- Junqueira Temel Histoloji / PDF*. (t.y.-b). Geliş tarihi 28 Şubat 2024, gönderen <https://www.scribd.com/document/501428622/Junqueira-Temel-Histoloji>
- Kaewmala, K., Uddin, M., Cinar, M., Große-Brinkhaus, C., Jonas, E., Tesfaye, D., Phatsara, C., Tholen, E., Looft, C., & Schellander, K. (2012). Investigation into Association and Expression of *PLC ζ* and *COX-2* as Candidate Genes for Boar Sperm Quality and Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2), 213-223. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01831.x>
- Kashir, J. (2020). Increasing associations between defects in phospholipase C zeta and conditions of male infertility: Not just ICSI failure? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(6), 1273-1293. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01748-z>
- Kashir, J., Buntwal, L., Nomikos, M., Calver, B. L., Stamatiadis, P., Ashley, P., Vassilakopoulou, V., Sanders, D., Knaggs, P., & Livanidou, E. (2017). Antigen unmasking enhances visualization efficacy of the oocyte activation factor, phospholipase C zeta, in mammalian sperm. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 23(1), 54-67.
- Kashir, J., Heynen, A., Jones, C., Durrans, C., Craig, J., Gadea, J., Turner, K., Parrington, J., & Coward, K. (2011). Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. *Reproductive biomedicine online*, 23(2), 263-267.
- Kashir, J., Jones, C., Lee, H. C., Rietdorf, K., Nikiforaki, D., Durrans, C., Ruas, M., Tee, S. T., Heindryckx, B., & Galione, A. (2011). Loss of activity mutations in phospholipase C zeta (PLC ζ) abolishes calcium oscillatory ability of human recombinant protein in mouse oocytes. *Human reproduction*, 26(12), 3372-3387.
- Kashir, J., Jones, C., Mounce, G., Ramadan, W. M., Lemmon, B., Heindryckx, B., De Sutter, P., Parrington, J., Turner, K., & Child, T. (2013). Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability. *Fertility and sterility*, 99(1), 107-117.
- Kashir, J., Konstantinidis, M., Jones, C., Heindryckx, B., De Sutter, P., Parrington, J., Wells, D., & Coward, K. (2012). Characterization of two heterozygous mutations of the oocyte activation factor phospholipase C zeta (PLC ζ) from an infertile man by use of minisequencing of individual sperm and expression in somatic cells. *Fertility and sterility*, 98(2), 423-431.
- Kashir, J., Nomikos, M., Lai, F. A., & Swann, K. (2014). Sperm-induced Ca²⁺ release during egg activation in mammals. *Biochemical and biophysical research communications*, 450(3), 1204-1211.
- Kierszenbaum, A. L., & Demir, R. (2006). *Histoloji Ve Hücrebiyolojisi: Patolojije Giriş*. Palme Yayıncılık.
- Leisegang, K., Sengupta, P., Agarwal, A., & Henkel, R. (2021). Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrologia*, 53(1). <https://doi.org/10.1111/and.13617>

- Lomasney, J. W., Cheng, H.-F., Roffler, S. R., & King, K. (1999). Activation of phospholipase C δ 1 through C2 domain by a Ca^{2+} -enzyme-phosphatidylserine ternary complex. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21995-22001.
- MacDonald, A., Herbison, G. P., Showell, M., & Farquhar, C. M. (2010). The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: A systematic review with meta-analysis. *Human reproduction update*, 16(3), 293-311.
- Magnusdottir, E. V., Thorsteinsson, T., Thorsteinsdottir, S., Heimisdottir, M., & Olafsdottir, K. (2005). Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Human reproduction*, 20(1), 208-215.
- Miyazaki, S., & Ito, M. (2006). Calcium signals for egg activation in mammals. *Journal of pharmacological sciences*, 100(5), 545-552.
- Moore, K. L., & Persaud, T. V. N. (2009). Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (2. Baskı). *H. Dalçık, M. Yıldırım (Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri*.
- Moreau, J., Fargeon, S., Gatimel, N., Parinaud, J., & Léandri, R. D. (2019). Expression of phospholipase PLC Zeta in human spermatozoa: Impact of cryopreservation. *Andrology*, 7(3), 315-318. <https://doi.org/10.1111/andr.12593>
- Nomikos, M., Mulgrew-Nesbitt, A., Pallavi, P., Mihalyne, G., Zaitseva, I., Swann, K., Lai, F. A., Murray, D., & McLaughlin, S. (2007). Binding of phosphoinositide-specific phospholipase C- ζ (PLC- ζ) to phospholipid membranes: Potential role of an unstructured cluster of basic residues. *Journal of Biological Chemistry*, 282(22), 16644-16653.
- Nomikos, M., Swann, K., & Lai, F. A. (2012a). Starting a new life: Sperm PLC-zeta mobilizes the Ca^{2+} signal that induces egg activation and embryo development: An essential phospholipase C with implications for male infertility. *BioEssays*, 34(2), 126-134. <https://doi.org/10.1002/bies.201100127>
- Nomikos, M., Swann, K., & Lai, F. A. (2012b). Starting a new life: Sperm PLC-zeta mobilizes the Ca^{2+} signal that induces egg activation and embryo development: An essential phospholipase C with implications for male infertility. *BioEssays*, 34(2), 126-134. <https://doi.org/10.1002/bies.201100127>
- Ovalle, W. K., & Nahirney, P. C. (2009). Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. *Netter's Essential Histology. Güneş Tıp Kitabevleri*, 354-370.
- Pauli, E. M., Legro, R. S., Demers, L. M., Kunselman, A. R., Dodson, W. C., & Lee, P. A. (2008). Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertility and sterility*, 90(2), 346-351.
- Pavan-Jukic, D., Starc, A., Stubljarić, D., & Jukic, T. (2020). Obesity with High Body Mass Index Does Not Influence Sperm Retrieval in Males with Azoospermia. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 26, e923060-1.
- Qin, D.-D., Yuan, W., Zhou, W.-J., Cui, Y.-Q., Wu, J.-Q., & Gao, E.-S. (2007a). Do reproductive hormones explain the association between body mass index and semen quality? *Asian Journal of Andrology*, 9(6), 827-834. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00268.x>
- Qin, D.-D., Yuan, W., Zhou, W.-J., Cui, Y.-Q., Wu, J.-Q., & Gao, E.-S. (2007b). Do reproductive hormones explain the association between body mass index and semen quality? *Asian Journal of Andrology*, 9(6), 827-834. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00268.x>
- Ramaraju, G. A., Teppala, S., Prathigudupu, K., Kalagara, M., Thota, S., Kota, M., & Cheemakurthi, R. (2018). Association between obesity and sperm quality. *Andrologia*, 50(3), e12888. <https://doi.org/10.1111/and.12888>

- Relwani, R., Berger, D., Santoro, N., Hickmon, C., Nihsen, M., Zapantis, A., Werner, M., Polotsky, A. J., & Jindal, S. (2011). Semen Parameters are Unrelated to BMI But Vary With SSRI Use and Prior Urological Surgery. *Reproductive Sciences*, 18(4), 391-397. <https://doi.org/10.1177/1933719110385708>
- Ross, M. H., Kaye, G. I., & Pawlina, W. (2003). *Cartilage. Histology: A text and atlas with cell and molecular biology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Runft, L.L., Jaffe, L.A ve Mehlmann, L.M. (2002)... - Google Akademik. (t.y.). Geliş tarihi 21 Şubat 2024, gönderen https://scholar.google.com/scholar?hl=tr&as_sdt=0%2C5&q=Runft%2C+L.L.%2C+Jaffe%2C+L.A+ve+Mehlmann%2C+L.M.+%282002%29+D%3%B6llen+mede+yumurta+aktivasyonu%3A+her+%C5%9Feyin+ba%C5%9Flad%C4%B1%C4%9F%C4%B1+yer.+Dev.+Biyol.+245%2C+237%E2%80%93254&btnG=
- Saleh, A., Kashir, J., Thanassoulas, A., Safieh-Garabedian, B., Lai, F. A., & Nomikos, M. (2020). Essential role of sperm-specific PLC-zeta in egg activation and male factor infertility: An update. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 28.
- Sato, M. S., Yoshitomo, M., Mohri, T., & Miyazaki, S. (1999a). Spatiotemporal analysis of [Ca²⁺] irises in mouse eggs after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell calcium*, 26(1-2), 49-58.
- Sato, M. S., Yoshitomo, M., Mohri, T., & Miyazaki, S. (1999b). Spatiotemporal analysis of [Ca²⁺] irises in mouse eggs after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell calcium*, 26(1-2), 49-58.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., & Lai, F. A. (2002). *PLC ζ : A sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development*. <https://journals.biologists.com/dev/article-abstract/129/15/3533/41784>
- Sermondade, N., Faure, C., Fezeu, L., Shayeb, A. G., Bonde, J. P., Jensen, T. K., Van Wely, M., Cao, J., Martini, A. C., & Eskandar, M. (2013). BMI in relation to sperm count: An updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Human reproduction update*, 19(3), 221-231.
- Soubry, A., Guo, L., Huang, Z., Hoyo, C., Romanus, S., Price, T., & Murphy, S. K. (2016). Obesity-related DNA methylation at imprinted genes in human sperm: Results from the TIEGER study. *Clinical Epigenetics*, 8(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0217-2>
- Stewart, T. M., Liu, D. Y., Garrett, C., Brown, E. H., & Baker, H. W. G. (2009). Recruitment bias in studies of semen and other factors affecting pregnancy rates in fertile men. *Human reproduction*, 24(10), 2401-2408.
- Uysal Özel, H. B. (t.y.). *Tek taraflı testis torsiyonunda karşı testiste testiküler anjiyotensin dönüştürücü enzim aktivitesindeki değişimlerin histolojik ve histoşimik olarak değerlendirilmesi*.
- WHO, C. (2000). Obesity: Preventing and managing the global epidemic. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 894(i-xii), 1-253.

EKLER

Ek 1. Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 13.09.2022-E.255627



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-60116787-020-255627
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Doç. Dr. Nazlı ÇİL

İlgi : 31/08/2022 tarihli dilekçeniz. *192.168.86.91*
2457

İlgi dilekçe ile başvurmuş olduğunuz "**Obezitenin İnsan Sperm Fosfolipaz-C Zeta Aktivasyonu Üzerine Etkisi**" konulu çalışmanız **13.09.2022 tarih ve 13 sayılı** kurul toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra; söz konusu çalışmanın yapılmasında **ETİK AÇIDAN SAKINCA OLMADIĞINA**, altı ayda bir çalışma hakkında Kurulumuza bilgi verilmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Tahir TURAN
Başkan

Belge Doğrulama Kodu :BSN81J584J Pin Kodu :09042

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/pau-ebys>

Adres:Tıp Fakültesi Dekanlığı Kınıklı/Denizli

Telefon:0 (025) 8 Faks:0 (258) 296 17 65

e-Posta:tibbietetik@pau.edu.tr Elektronik Ağ:http://www.pau.edu.tr

Kep Adresi: paurektorluk@hs01.kep.tr

Bilgi için: Selda ERKİŞİ
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni

