

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FERTİL VE İNFERTİL SEMEN ÖRNEKLERİNDE
ENERJİ ÜRETİMİNDE GÖREV ALAN BAZI
SİTOZOLİK VE MİTOKONDRIYAL ENZİM
AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Bil.Uzm. Hülya LEVENTERLER

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Nurten DİKMEN

ADANA-2005

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

FERTİL VE İNFERTİL SEMEN ÖRNEKLERİNDE
ENERJİ ÜRETİMİNDE GÖREV ALAN BAZI
SİTOZOLİK VE MİTOKONDRIYAL ENZİM
AKTİVİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Bil.Uzm. Hülya LEVENTERLER

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Nurten DİKMEN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
SBE D-23 nolu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2005

KABUL VE ONAY

Biyokimya Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Fertil ve İnfertil Semen Örneklerinde Enerji Üretiminde Görev Alan Bazı Sitozolik ve Mitokondriyal Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.6.2005

İmza

Prof. Dr. Nurten DİKMEN

Ç.Ü. Tıp Fakültesi

Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Suna SOLMAZ

Ç.Ü. Tıp Fakültesi

İmza

Prof. Dr. Belkıs AYDINOL

Dicle Üniversitesi Tıp Fakül.

İmza

Doç. Dr. Güzide YÜCEBİLGİÇ

Ç.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi

İmza

Doç. D. Soner KOLTAŞ

Ç.Ü. Tıp Fakültesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulununtarih vesayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sait POLAT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında ilgi, sevgi, sabır ve anlayış ile hiçbir zaman yardımını esirgemeyen, her konuda çok büyük desteğini gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Nurten Dikmen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardım ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Suna Solmaz'a ve anabilim dalı başkanlığı süresince destek ve hoşgörüsünü esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Levent Kayrın'a teşekkür ederim. Eğitimim sırasında yardımlarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, çalışanlarına ve beni destekleyen Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri ile çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı SBE D-23 nolu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu'na, Sağlık Bilimleri Enstitüsü başkanı Prof. Dr. Sait Polat ve enstitü çalışanlarına teşekkür ederim. Çalışmalarımda yardımlarından dolayı Doç. Dr. Soner Koltaş, Doç.Dr. Davut Alptekin, Öğretim görevlisi Dr. Gülşah Seydaoğlu ve Nükleer Tıp Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca yardım ve katkılarından dolayı Safiye Taga ve Ayşen Durmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince beni destekleyen, her zaman yanımda olan aileme, eşime, oğluma ve kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. İnfertilitenin Değerlendirilmesi	6
2.2.1. Kadında İnfertilite Nedenleri	6
2.2.2. Erkekde İnfertilite Nedenleri	7
2.3. Semen Analizi	10
2.3.1. Sperm Örneğinin Alınması	10
2.3.2. Semen Örneğinin Değerlendirilmesi	10
2.3.3. Semen Makroskopik İncelemesi	11
2.3.4. Semen Mikroskopik İncelemesi	12
2.3.5. Spermatogenez	16
2.3.6. Semen	19
2.4. Malat Dehidrogenaz (MDH) ve Malik Enzimler (ME)	22
2.4.1. MDH (EC 1.1.1.37)	23
2.4.2. MDH1 Geni İçin Gen Kartı	23
2.4.3. Amino Asit Dizi Benzerliği	26
2.4.5. Substrat Özgünlüğünün Düzenlenmesi	26
2.5. Malik Enzim	27
2.5.1. Malik Enzim 1 (ME1)	28
2.5.2. Malik Enzim 2 (ME2)	28
2.5.3. Malik Enzim 3 (ME3)	28

2.5.4. MDH ve ME'in Klinik Olarak Önemi	34
2.6. Laktat Dehidrogenaz ve C4 İzoenzimi	35
2.6.1. Ontogen ve Testiste Yerleşim	36
2.6.2. LDH-C4'ün Kinetiği	37
2.6.3. Substratlar (Metabolik Önemi)	37
2.6.4. İnhibitörler	39
2.6.5. Moleküler Özellikleri	40
2.6.7. Testis Hasarı ve İnfertilitede Bir "Marker" Olarak LDH-C4	41
2.7. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Koruma	42
2.7.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	42
2.7.2. Oksidatif Stres ve Lökositler	42
2.7.3. Oksidatif Stres ve Sperm Fonksiyonu	43
2.7.4. Lipit Peroksidasyonu	43
2.7.5. Antioksidan Korumalar	44
2.7.6. Glutatyon	45
2.7.7. Fosfolipit Hidroperoksit Glutatyon Peroksidaz	48
2.8. Seminal Sıvıda Fruktoz ve Glukoz	50
2.9. Leptin	53
2.10. Testosteron	58
2.10.1 Testosteron Sentezi	58
2.10.2. Testosteron Etki Mekanizmaları	59
2.10.3. Testosteron ve İnfertilite	60
2.10.3.Seminal Plazmada Hormonal Steroidler	61
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	62
3.1. Cihazlar	62
3.2. Örneklerin Temini ve Gruplandırması	63
3.3. Sperm Homojenizasyonu	66
3.4. Sperm Yıkama (Swim up)	67
3.5. Analiz Yöntemleri	68
3.5.1. Malat Dehidrogenaz (MDH) Aktivite Tayini	68
3.5.2. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite Tayini	71
3.5.3. Redükte Glutatyon (GSH) Tayini	73

3.5.4. Glukoz Tayini	75
3.5.5. Fruktoz Tayini	77
3.5.6. Serbest Testosteron Tayini	79
3.5.7. Leptin Tayini	80
4. BULGULAR	81
5. TARTIŞMA	82
5.1. Örnek Seçimi ve Spermiyogram Özelliklerine Göre Değerlendirme	120
5.2. MDH Aktivitesi İle İlgili Değerlendirme	121
5.3. LDH Aktivitesi İle İlgili Değerlendirme	127
5.4. GSH Düzeyi İle İlgili Değerlendirme	129
5.5. Fruktoz ve Glukoz Düzeyi İle İlgili Değerlendirme	131
5.6. Hormonlar ve Erkek Üreme Sistemi	134
5.6.1. Leptin Düzeyi İle İlgili Değerlendirme	135
5.6.2. Testosteron Düzeyi İle İlgili Değerlendirme	136
5.6.3. Seminal Sıvıda NAD-MDH Aktivitesi <20mU/ml Olan Örneklerin Değerlendirilmesi	138
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	139
7. KAYNAKLAR	142
8. ÖZGEÇMİŞ	151

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Antony Van Leeuwenhoek	3
Şekil 2. Antony Van Leeuwenhoek'un spermatozoa gözlemleriyle ilgili çizimleri	4
Şekil 3. Antony Van Leeuwenhoek'un sperm şekliyle ilgili olarak ilk düşünceleri	5
Şekil 4. Makler sperm sayım kamerası	12
Şekil 5. Makler sperm sayım kamerasının yakın görünümü	12
Şekil 6. Makler kamerasında semen örneğinin damlatılarak hazırlanması	13
Şekil 7. Makler kamerasında spermlerin görüntüsü	13
Şekil 8. Normal morfolojiye sahip, olgun sperm örneği	15
Şekil 9. Normal ve anormal morfolojiye sahip sperm görüntüleri	16
Şekil 10. Erkek üreme sistemi	17
Şekil 11. Testislerin yapısı	19
Şekil 12. 2. kromozom üzerinde MDH1 geninin yerleşimi	25
Şekil 13. Halofilik bir archaeobacteria olan Haloarcula marismortui'de MDH yapısı	25
Şekil 14. İnsanda mNADME kompleksi	30
Şekil 15. Malik enzimin aktif bölgesi	31
Şekil 16. Malatın enzim üzerinde aktif bölgeye bağlanması	32
Şekil 17. Malik enzimin katalitik mekanizması	33
Şekil 18. LDH molekülünün yapısı	40
Şekil 19. Sistein	46
Şekil 20. Glutasyon sentezi	47
Şekil 21. Sertoli hücrelerinde de novo sentez ve glutasyon döngü sistemi	48
Şekil 22. Polyol yolu	50
Şekil 23. Leptin molekülünün 3 boyutlu moleküler yapısı	53
Şekil 24. Leptin reseptör izoformları	54
Şekil 25. Leptinin gonadal organlar üzerine etkisi	54
Şekil 26. Leptin hipotalamik-hipofiz-testiküler aks	56

Şekil 27. Leptinin spermatojenik hücrelerin farklılaşması ve yenilenmesi üzerinde etkileri	57
Şekil 28. Testosteronun yapısı	58
Şekil 29. FSH ve LH'nin hedef dokudaki etkinlikleri	61
Şekil 30. Fruktoz standart eğrisi	78
Şekil 31. Homojenizasyon öncesinde spermilerin morfolojik görünümü	81
Şekil 32. Homojenizasyondan sonra spermilerin morfolojik görünümü	82
Şekil 33. Spermiyogram değerlendirmesine göre grupların karşılaştırılması	114
Şekil 34. Seminal sıvıda NAD-MDH ve NADP-MDH aktiviteleri	115
Şekil 35. Seminal sıvıda LDH aktivitesi	116
Şekil 36. Seminal sıvıda GSH düzeyi	116
Şekil 37. Seminal sıvıda glukoz düzeyi	117
Şekil 38. Seminal sıvıda fruktoz düzeyi	117
Şekil 39. Seminal sıvıda serbest testosteron düzeyi	118
Şekil 40. Seminal sıvıda leptin düzeyi	118
Şekil 41. Sperm homojenatlarında NAD ve NADP bağlı MDH aktiviteleri	119
Şekil 42. Sperm homojenatlarında LDH aktivitesi	119

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Sperm üretimi için ihtiyaç duyulan hormonlar ve etkileri	9
Çizelge 2. İnsanda seminal plazmada bulunan çeşitli maddelerin konsantrasyonları	21
Çizelge 3. İnsan semeninde bulunan steroidler	61
Çizelge 4. Grup A- Olgü yaşı, semen hacmi ve spermiyogram değerleri	84
Çizelge 5. Grup B- Olgü yaşı, semen hacmi ve spermiyogram değerleri	85
Çizelge 6. Grup C- Olgü yaşı, semen hacmi ve spermiyogram değerleri	86
Çizelge 7. Grup D- Olgü yaşı, semen hacmi ve spermiyogram değerleri	87
Çizelge 8. Grup E- Olgü yaşı, semen hacmi	87
Çizelge 9. Grup A- Seminal sıvı örneklerinde MDH (NAD/NADP) ve LDH aktiviteleri	88
Çizelge 10. Grup B- Seminal sıvı örneklerinde MDH (NAD/NADP) ve LDH aktiviteleri	89
Çizelge 11. Grup C- Seminal sıvı örneklerinde MDH (NAD/NADP) ve LDH aktiviteleri	90
Çizelge 12. Grup D- Seminal sıvı örneklerinde MDH (NAD/NADP) ve LDH aktiviteleri	91
Çizelge 13. Grup E- Seminal sıvı örneklerinde MDH (NAD/NADP) ve LDH aktiviteleri	91
Çizelge 14. Grup A- Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri	92
Çizelge 15. Grup B- Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri	93
Çizelge 16. Grup C- Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri	94
Çizelge 17. Grup D- Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri	95
Çizelge 18. Grup E- Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri	96

Çizelge 19. Grup A- Seminal sıvı örneklerinde serbest testosteron ve leptin düzeyleri	97
Çizelge 20- Grup B- Seminal sıvı örneklerinde serbest testosteron ve leptin düzeyleri	98
Çizelge 21- Grup C- Seminal sıvı örneklerinde serbest testosteron ve leptin düzeyleri	99
Çizelge 22- Grup D- Seminal sıvı örneklerinde serbest testosteron ve leptin düzeyleri	100
Çizelge 23- Grup D- Seminal sıvı örneklerinde serbest testosteron ve leptin düzeyleri	100
Çizelge 24. Yaş, semen hacmi ve spermiyogram özelliklerinin gruptaki ortalama değerleri	101
Çizelge 25. Seminal sıvıda NAD/NADP-MDH ve LDH aktivitelerinin ortalamaları	102
Çizelge 26. Seminal sıvıda GSH, glukoz ve fruktoz değerlerinin ortalamaları	103
Çizelge 27. Seminal sıvıda serbest testosteron ve leptin düzeylerinin ortalamaları	104
Çizelge 28. A Grubu sperm örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri	105
Çizelge 29. B Grubu sperm örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri	106
Çizelge 30. C Grubu sperm örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri	107
Çizelge 31. D Grubu sperm örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri	108
Çizelge 32. Sperm örneklerinde MDH ve LDH aktivitelerinin ortalamaları	108
Çizelge 33. Gruplardaki değişkenlerin A (kontrol) grubu ile karşılaştırılmaları sonucunda bulunan “p” değerleri	109
Çizelge 34. Grupların birbirleriyle karşılaştırılmaları sonucunda bulunan “p” değerleri	110
Çizelge 35. A Grubundaki değişkenlerin kendi içinde korelasyonu	111
Çizelge 36. B Grubundaki değişkenlerin kendi içinde korelasyonu	111
Çizelge 37. C Grubundaki değişkenlerin kendi içinde korelasyonu	112
Çizelge 38. D Grubundaki değişkenlerin kendi içinde korelasyonu	112
Çizelge 39. E Grubundaki değişkenlerin kendi içinde korelasyonu	113

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
ADP	Adenozin Difosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
cDNA	Komplementer Deoksi Ribonükleik Asit
Da	Dalton
DHEAS	Dehidroepiandrosteron
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
dl	Desi Litre
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GOD	Glukoz Oksidaz
GnRH	Gonadotropin Serbestleştirici Hormon
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutasyon
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GSSG	Okside Glutasyon
LH	Luteinleştirici Hormon
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
ICSI	Intra Cytoplasmic Sperm Injection
JAK	Janus Kinaz
kDa	Kilo Dalton
LDH	Laktat Dehidrogenaz
L	Litre
MAPK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MDH	Malat Dehidrogenaz
ME	Malik Enzim
mg	Mili Gram
M	Molarite
μg	Mikro Gram
μl	Mikro Litre

ml	Mili Litre
mM	Mili Molar
µmol	Mikro Mol
mU	Mili Unite
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
NAD⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid (okside)
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid (indirgenmiş)
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NAD(P)H	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (indirgenmiş)
ng	Nano Gram
nm	Nano Metre
NO	Nitrik Oksit
Ob-R	Leptin Reseptörü
OD	Optik Dansite
O₂⁻	Süperoksit Anyonu
OH⁻	Hidroksil Radikali
ONOO⁻	Peroksinitrit Anyonu (ONOO ⁻)
p	Kromozomun Kısa Kolu
pg	Piko Gram
q	Kromozomun Uzun Kolu
ROO⁻	Peroksil Radikali
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Superoksit Dismutaz
UV	Ultraviole
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Teşkilatı)

ÖZET

Fertil ve İnfertil Semen Örneklerinde Enerji Üretiminde Görev Alan Bazı Sitozolik ve Mitokondriyal Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması

İnfertilitenin yaklaşık % 50 oranında erkek faktörüne bağlı olduğu bildirilmiştir. Spermiyogram, erkek fertilizasyon potansiyelini değerlendirmede çok önemlidir. Bu amaçla sperm; konsantrasyon, motilite ve morfoloji özellikleri yönünden değerlendirilir.

Çalışmada fertil ve infertil semen gruplarında, spermde enerji metabolizmasını incelemek için Malat ve Laktat Dehidrogenaz (MDH-NAD/NADP ve LDH) aktiviteleri; glukoz, fruktoz ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri incelendi. Lokal hormon etkinliğini araştırmak için de serbest testosteron ve leptin düzeylerini karşılaştırdık. İnfertil grup sayı, motilite ve morfolojiye göre dört alt gruba ayrıldı. Enzim aktiviteleri kinetik yöntemlerle, GSH, fruktoz ve glukoz spektrofotometrik olarak hormon düzeyleri RIA yöntemiyle ölçüldü.

Seminal sıvı çalışmalarında enerji metabolizmasının kilit bir enzimi olan NAD-MDH ve LDH aktivitesi ile GSH düzeyi fertil grupta infertil gruplardan anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek bulundu. Bu değişkenlerin sperm fonksiyonlarını değerlendirmede önemli katkıları olabileceğine inanmaktayız.

Seminal sıvıda leptin ve serbest testosteron düzeyleri oligoteratospermik grupta kontrol grubundan anlamlı oranda ($p<0.05$) düşük bulundu. Azospermik grupta ise serbest testosteron düzeyi kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti. Oligoteratospermik grupta testosteron düzeyi ile seminal sıvı NAD-MDH aktivitesi arasında pozitif korelasyon saptanması, testosteronun bu enzimin aktivitesini düzenleyen bir faktör olabileceğini düşündürmüştür.

Sperm tarafından fruktozun yanı sıra glukozun da aktif bir şekilde kullanıldığı, tüketimleri arasında yüksek oranda benzerlik bulunduğu, fertil grupta bu metabolitlerin tüketiminin infertil gruptan daha fazla olduğu dikkatimizi çekti. Bu bulgular, spermde enerji ihtiyacının karşılanmasında fruktozun yanı sıra glukozun da etken olduğunu gösterdi.

Genel olarak MDH'in NAD formunun NADP formuna oranla hem seminal sıvı hem de spermde daha aktif olarak çalıştığını tesbit ettik. Sperm homojenatlarında, bütün gruplarda LDH aktivitesi kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde ($p<0,05$) düşük bulundu.

Anahtar sözcükler: Laktat Dehidrogenaz, leptin, Malat Dehidrogenaz, semen, testosteron,

ABSTRACT

Comparison of Some of the Cytosolic and Mitochondrial Enzyme Activities which Play Role in Fertile and Infertile Semen Samples

It is reported that infertility is due to male factor approximately at 50%. Spermogram too important in the evaluation of male fertilization potential. So sperm can be evaluated according to concentration, motility and morphology.

In this study, in fertile and infertile semen groups, Malate dehydrogenase (MDH) and Lactate Dehydrogenase (LDH) activities (to study energy metabolism of sperm) and levels of glucose, fructose and reduced glutathione (GSH) were investigated. Free testosterone and leptin levels were compared to explore the efficiency of local hormones. Infertile group was classified in to four subgroups according to concentration, motility and morphology. Enzyme activities were measured with kinetic method, GSH, fructose and glucose levels were evaluated spectrophotometrically and hormone levels were measured with RIA method.

NAD-MDH (the key enzyme of energy metabolism) and LDH activities and GSH levels were found significantly ($p<0.05$) higher in seminal plasma of fertil group. We believe that these variables may have an important contribution in the evaluation of sperm functions.

In seminal plasma of oligoteratospermic group, levels of free testosterone and leptin were found significantly lower ($p<0.05$) than control group. A positive correlation was found between testosterone level and seminal plasma NAD-MDH, so it is thought that testosterone may be a factor that regulates activity of this enzyme.

It is reported that in addition to fructose sperm also use glucose, and consumption of these sugars similar to each other. Fertile group use more fructose and glucose than infertile group. It is showed that glucose is important for energy requirement of sperm.

We reported that NAD-MDH works better than NADP form, both in seminal plasma and sperm. It is found that LDH activities of all groups were significantly ($p<0.05$) lower than control group.

Keywords: Lactate Dehydrogenase, leptin, Malate Dehydrogenase, semen, testosterone.

1. GİRİŞ

Üreme kapasitesinin istek dışında azalması infertilite adını alır. Bir başka ifade ile, kontraseptif bir yöntem uygulamadan, düzenli bir cinsel yaşama rağmen (ortalama haftada iki kez beraberlik düzenli cinsel yaşam olarak kabul edilir) bir yıl süreyle gebelik oluşmaması infertilite olarak tanımlanır. Yapılan araştırmalarda, toplumlarda infertilite oranının % 10-15 dolayında olduğu bildirilmiştir ^{1,2,3}.

Kliniklere infertilite problemi ile başvuran çiftlerin % 48'inde erkeğe bağlı faktörün olması erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasını bir ön koşul olarak beraberinde getirmektedir. Reprodüktif yaştaki erkeklerin % 6'sında infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Bu olguların yaklaşık % 90'ında da bozulmuş spermatogenez vardır ^{1,2,3}.

Erkeklerde anatomik, endokrin, immünolojik bir bozukluk veya enfeksiyon infertilite nedeni olabilir. İnfertilitede erkek faktörünün kesinlik kazanabilmesi için; öykü, genel fizik muayene, semen analizi ve hormonal tetkikler sırasıyla yapılmalı ve gereğinde testis biyopsisi; biyokimyasal ve fonksiyonel testlerle desteklenmelidir. Bu nedenle erkek faktörünü ortaya koyan en basit test spermiyogramdır. Dikkatli bir şekilde yapılan semen analizi testislerin spermatogenetik ve steroidogenetik aktivitesi ile aksesuar bezlerin çalışması hakkında sağlıklı bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır ^{1,2,3}.

Semen analizi makroskopik, biyokimyasal ve mikroskopik araştırmaları kapsar ve özellikle şu noktalar üzerinde durulur.

- ejakülat hacmi ve semenin likefikasyonu
- semenin biyokimyasal özellikleri
- semendeki spermatozoa konsantrasyonu
- hareketli spermatozoa yüzdesi
- spermatozoanın morfolojisi
- diğer hücrelerin tanımlanması ⁴.

Morfolojik olarak kabul edilebilecek bir sperm, öncelikle baş ve kuyruk bölümlerinden oluşmaktadır. Spermin baş kısmında akrozom, postakrozom ve nükleus bulunmaktadır. Daha sonra çok ince bir tabakadan oluşan boyun kısmı vardır ki ancak

elektron mikroskopunda görülebilir. Boyun kısmından sonra orta kısım gelir. Bu bölüm en önemli bölümlerden biridir, çünkü burada spermilere hareket için gerekli enerjiyi verecek olan mitokondriler bulunmaktadır⁴.

Çalışmayı planlarken, özellikle fertilizasyon yeteneği için önemli olan sperm etkinliğini irdeleyebilmek amacıyla sperm enerjisi metabolizması üzerinde durulmuş ve bu konuda kilit noktalarda öneme sahip enzim aktivitelerinin incelenmesi kararlaştırılmıştır. Bu düşüncelere paralel olarak (öncelikle sitoplazmada glikolitik yolun son enzimi olduğu için) Laktat Dehidrogenaz'ın (LDH); sperm ve seminal sıvıda ayrı ayrı çalışılması düşünülmüştür. Hedeflenen ikinci enzim Malat Dehidrogenaz (MDH)'dir. MDH trikarboksilik asit döngüsünün son enzimidir. Mitokondrial enzim aktivitesinin gösterilebilmesi için ve sentetik aktiviteler göz önüne alınarak bu enzimin NAD ve NADP bağlı iki formunun sperm ve seminal sıvıda ayrı ayrı çalışılması planlanmıştır. Enerji metabolizmasına destek olması amacıyla glukoz ve fruktoz düzeylerinin belirlenmesi de düşünülmüştür.

Yapılan araştırmalarda infertil erkeklerin, fertil gruptan daha fazla düzeyde total antioksidan kapasiteyi baskıladıkları ve daha düşük düzeylerde antioksidan içerdikleri bildirilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin, sperm fonksiyonlarını üç yoldan etkilediği açıklanmıştır:

- Motilitenin azalması
- Anormal morfoloji
- Sperm-yumurta penetrasyonunun azalması⁵.

Bu çalışmada antioksidan etkinliği değerlendirmek amacıyla seminal sıvıda Redükte Glutasyon (GSH) düzeyinin saptanması amaçlandı. Ayrıca GSH düzeyi ile diğer değişkenler arasında olası bir ilişkinin araştırılması düşünüldü.

Öte yandan seminal sıvıda, hormonal profili gözden geçirmek amacıyla serbest testosteron ve leptin düzeylerinin saptanması amaçlanmıştır. Buna bağlı olarak seminal sıvıda bu hormonlar ile dehidrogenaz enzimleri (MDH, LDH) arasında bir ilgi olup olmadığı da üzerinde durduğumuz konular arasında yer almaktadır.

Sözü edilen değişkenlerin her birinin tek başına ya da bütün olarak bir kombinasyon halinde farklı çalışma gruplarında (fertil ve infertil semen örneklerinde) değerlendirilmesinin, sperm aktivitesinin hangi yönde etkilenebileceği konusunda bir fikir oluşturabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. Tarihçe

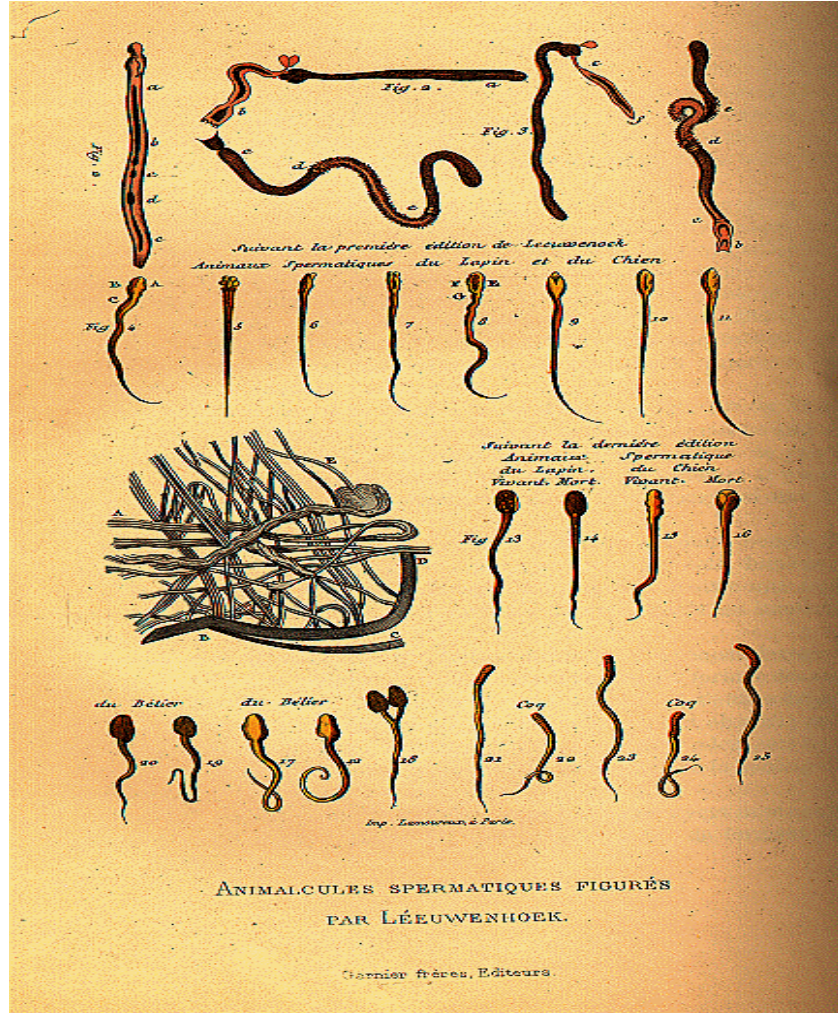
Sıra dışı bir bilim adamı olan Antony Van Leeuwenhoek (Şekil 1) 17. yüzyılın başlarında Hollanda'da yaşamıştır. Yüksek eğitim ya da üniversite derecesine sahip olmayan Leeuwenhoek'un hobisi mikroskop lensleri yapmaktır. 1668'den önce basit bir mikroskop yapmayı başardı ve bu gözlemleriyle biyoloji tarihinde önemli buluşların öncüsü oldu⁶.



Şekil 1. Antony Van Leeuwenhoek (1632-1723)⁶

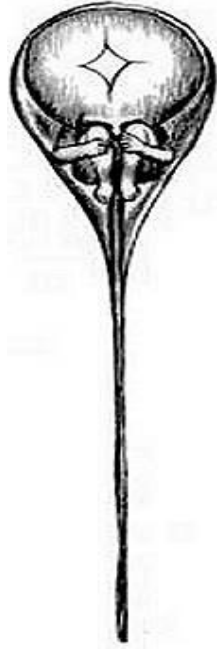
Yaptığı gözlemler ile bakteri, parazitik mikroskopik protistler, sperm hücreleri, kan hücreleri ve mikroskopik nematodları keşfetti. Antony Van Leeuwenhoek semende yaptığı ilk incelemede globüllere benzettiği bu yapılar üzerinde pek durmamıştı. Üç-dört yıl sonra 1677'de Hamm ile semende yaptıkları incelemede kuyrukları olan küçük hayvanlar gördüler. Leeuwenhoek bu gözlemlerini (Şekil 2) London Royal Society'ye yazdığı mektupta bildirdi. Spermin insan vücudunda geliştiğine inanmaktaydı ve semenin içindeki spermin fosfat kristallerini ilk kez tanımladı^{6,7}. Leeuwenhoek ve Hamm, spermatozoanın insanın minyatür yapısını içerdiğini düşünmüşlerdir (Şekil 3).

Bu fikir “ ilkoluşum teorisi “ (preformation theory) olarak bilinmektedir. Bu teoriye göre; spermatozoa oosite girmesinden sonra minyatür insanın gelişimi gerçekleşecektir⁴.



Şekil 2. Antony Van Leeuwenhoek'un spermatozoa gözlemleriyle ilgili çizimleri⁸

1775'de Spallanzani oosit ve spermatozoanın yeni bir insan gelişimi için gerekli olduğunu ispatlamıştır. 1830'da Prevost ve Dumas spermatozoanın fertilizasyon için önemli olduğunu ve 1841'de Von Kolliker, testis seminifer tübüllerinde hücre bölünmesinin son ürününün spermatozoa olduğunu açıklamışlardır^{4,9}. 1929'da Macomber ve Sanders sperm sayım tekniğini geliştirdiler^{4,9}.



Şekil 3. Antony Van Leeuwenhoek'un sperm şekliyle ilgili olarak ilk düşünceleri (ilkoluşum teorisi-preformation theory) ⁸

1929'da Macomber ve Sanders sperm sayım tekniğini geliştirdiler. MacLeod (1942), Macleod ve Gold (1953), Eliasson (1971) ve Hellinga (1949,1976) konvansiyonel sperm analizinin bilimsel temellerini açıklamışlardır. Bu metodlar hala referans olarak kullanılmaktadır ^{4,9,10}.

Spermin tanımlanıp semen analiz tekniklerinin kullanıma girmesi özellikle infertilite araştırmaları konusunda önemli bir çığır açmıştır. 1970'li yılların sonlarından itibaren ortaya çıkan yeni teknolojiler ve bunların klinik kullanımları hem infertiliteye yol açan nedenlerin daha iyi anlaşılmasını sağlamış hem de milyonlarca çiftin çocuk sahibi olabilme şansını artırmıştır. 1978 yılında in vitro fertilizasyon (IVF) yöntemi ile ilk tüp bebeğin doğumu gerçekleştirilmiş ve daha sonra bu yöntem erkek infertilitesi, açıklanamayan infertilite gibi bir çok endikasyon için başarıyla kullanılmıştır. 1992'de intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemiyle elde edilen ilk gebelikler ile ICSI, günümüzde şiddetli erkek infertilite tedavisinde çok önemli bir yer edinmiştir.

2.2. İnfertilitenin Değerlendirilmesi

Bir yıl içerisinde korunma yöntemi olmadan sürdürülen düzenli bir cinsel yaşama rağmen (ortalama haftada iki kez beraberlik düzenli cinsel yaşam olarak kabul edilir) gebelik oluşmamasına infertilite adı verilir. Hiç gebelik oluşmaması durumu primer infertilite; daha önce mevcut bir gebeliğin ardından gebelik elde edilmemesi ise sekonder infertilite olarak tanımlanır. Gebelik için hiçbir şansa sahip olmama sterilite olarak ifade edilir. Yapılan araştırmalarda, toplumlarda infertilite oranının % 10-15 dolayında olduğu bildirilmiştir ^{12,13,14}.

Erkek infertilitesi, infertil çiftlerin %10-30'unda tek neden, %15-30'unda ise kadındaki probleme ek olarak karşımıza çıkmakta, dolayısı ile vakaların yaklaşık %50'sinde görülmektedir ^{12,13}.

İnfertilite nedenleri

Sperm	% 30-40
Ovülatör	% 15-20
Fallop tüpleri	% 25-40
Serviks	% 5
Nedeni bilinmeyen	% 5-15 ¹⁵ .

2.2.1. Kadında İnfertilite Nedenleri

- Pelvik inflamatuvar hastalık
- Uterus dışında gebelik
- Abdominal cerrahi
- İntrauterin alet komplikasyonları
- Fibroidler
- Kadında eşinin spermine karşı alerjik reaksiyon oluşması
- Ovülasyon yetersizliği
- Endometriozis
- Hipofiz bezi yetersizliği
- Over yetersizliği
- Uzun dönem doğum kontrol ilacı kullanmanın etkileri
- Hipotiroidizm ya da hormonal dengesizlikler

- Yaş (kadınlarda 35 yaşından sonra fertilite kapasitesi azalmaktadır)
- Anormal uterus şekli
- Servikal mukus yetersizliği
- Tekrarlayan düşükler
- Yetersiz beslenme
- Tiroid fonksiyonunda yetersizlik
- Diabet
- Fallop tüplerinde blok
- Konjenital anomaliler
- Tübal ligasyon ^{15,16}.

2.2.2. Erkekte İnfertilite Nedenleri

- Sperm ile ilgili problemler
 - Düşük sperm sayısı
 - Sperm üretiminde bozukluk (defektif sperm sayısında artış)
 - Oligospermi (sperm sayısının düşük olması)
 - Azospermi (sperm bulunmaması)
 - Seminal kanallarda tıkanıklık
 - Seminal sıvı bozuklukları
- Isı sperm potansiyelini azaltabilir
 - Kronik yüksek ateş
 - Seks öncesi egzersiz
 - Seks öncesi sıcak banyo
- Sperm kalitesi ya da sayısında düşmeyi genellikle etkileyen nedenler
 - Alkol
 - İlaçlar
 - Esrar
 - Nikotin
 - Bazı tıbbi uygulamalar
 - Pestisitler
 - Kurşun
 - Kronik alkolizm

- Belirli hormonal bozukluklar sperm kalitesini etkiler
Hipofiz bozuklukları
Feminizasyon
- Testiküler bozukluklar sperm üretimini etkiler
Testiküler vein varikozu
Testiküler hasar
Testiküler tümör
Varikozel
Testikül anomali
İnmemiş testis (çocuklukda başarılı şekilde müdahale edilmemişse)
Testiküler burulma
Kabakulak
Radyasyona maruz kalma
- Testiküler kanalın bloke olması (sperm salınımını etkiler)
Testiküler kanalda kızıl (scarring)
Cinsel yolla bulaşan hastalıklar
Gonera
Klamidya
Genital kanal anomalisi
- Retrograd ejakülasyonu (mesaneye ters ejakülasyon-çeşitli nedenlerden dolayı oluşabilir)
Prostat cerrahisi
Bazı tıbbi müdahaleler
- Ejakülasyonun oluşmaması (çeşitli nedenlere bağlı olabilir)
İktidarsızlık (impotens)
Eretil disfonksiyon
Diabet
Prostat cerrahisi
Üretra cerrahisi
Kan basıncı ile ilgili uygulamalar
- Bazı kromozom bozuklukları
- XXY erkekler

- Bazı tıbbi uygulamalar ^{17,18}.

Erkek faktörünü ortaya koyan önemli testler:

1. Spermiyogram
2. Postkoidal test
3. Antisperm antikor ölçümü (serum veya seminal plazmada)
4. Spermatozoanın fertilizasyon kapasite testleri
5. Serumda:
 - Serbest ve total testosteron
 - Luteinleştirici hormon
 - Follikül uyarıcı hormon
 - Prolaktin düzeyleri de önemlidir ³.

Endokrinolojik inceleme

Sperm üretimi için ihtiyaç duyulan erkek seks hormonları Çizelge 1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Sperm üretimi için ihtiyaç duyulan hormonlar ve etkileri ¹⁹

Hormon	Etkisi
GnRH	FSH ve LH hormonlarının salgılanmasını sağlar. Beyinde hipotalamustan salgılanır.
FSH	Testisteki sertoli hücrelerini uyararak sperm üretimini sağlar. Hipofiz bezinden salgılanır.
LH	Leydig hücrelerinde testosteron sentezlenmesini ve sperm üretiminin devamlılığını sağlar. Hipofiz bezinden salgılanır.
Prolaktin	LH’ın Leydig hücreleri üzerindeki etkisini artırır. Hipofiz bezinden salgılanır.
Testosteron	Sperm üretiminin devamlılığını sağlar. Testisteki Leydig hücrelerinden salgılanır.
Estradiol	LH sentezini kontrol eder. Karaciğer, kas ve yağ dokusunda testosteronun metabolize edilmesi ile oluşur. %20-25’i Leydig hücrelerinden salgılanır.
İnhibin	FSH salınımını engeller. Sertoli hücrelerinden salgılanır.
Aktivin	FSH salınımını artırır. Leydig hücrelerinden salgılanır.

2.3. Semen Analizi (Spermiyogram)

İnfertil çiftlerde yarıya yakın bir oranda erkekte problem olduğu belirlenmiştir. Erkeklerde anatomik, endokrin, immünolojik bir bozukluk veya enfeksiyon, infertilite nedeni olabilecektir. Bu nedenle erkek faktörünü ortaya koyan en basit test spermiyogramdır ²

2.3.1. Sperm Örneğinin Alınması

Hastalar ile yapılan ilk görüşmede örnek vermek için gelecekları gün 3-5 günlük bir cinsel perhiz süresine uymaları tavsiye edilir. 2-7 gün arasındaki cinsel perhiz süresi yeterli görülürse de kısa süreli cinsel perhizde semendeki sperm sayısı az, uzun süreli cinsel perhizde de (erkek faktörü mevcut ise) sperm sayısı yeterli olsa bile motilitenin düşük olduğu gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda, uzun süreli cinsel perhizin spermlerin akrozin içeriğinde de azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Önerilen cinsel perhiz süresine uyulduğunda, dikkatli bir şekilde yapılan semen analizi testislerin spermatogenetik ve steroidogenetik aktivitesiyle aksesuar bezlerin çalışması hakkında sağlıklı bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır ^{2,11}.

Hastalara steril şartlarda, steril kutular verilerek bu amaçla düzenlenmiş sperm verme odasını kullanmaları sağlanır. Hastalar, mastürbasyonla örnek vermeleri gerektiği konusunda bilgilendirilir, kullandıkları kutuların üzerine isimleri etiketle yapıştırılır. Örnek verme esnasında nelere dikkat etmeleri gerektiği önceden hazırlanmış bir bildiri ile kendilerine açıklanmalıdır. Örnek toplanması esnasında krem ya da kayganlaştırıcı bir madde kullanmaması, örnek toplanan kutuya su ya da başka bir madde kaçırmaması söylenir. Semen toplanan kutuyla ilgili olarak daha önceden yapılan kimyasal ve biyolojik testlerle toksik olmadığı ispatlanmış kutular satın alınmalıdır. Hastanın örneğini aldıktan sonra kendi eli ile laboratuvardaki ilgili biyologlara teslim etmeleri gerektiği izah edilmelidir ^{2,11}.

2.3.2. Semen Örneğinin Değerlendirilmesi

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasında ilk basamak semen analizidir. Bu inceleme esnasında Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirtilen kriterler (WHO, 1992) esas alınmaktadır. Semen analizi makroskopik ve mikroskopik incelemelerden oluşur ^{10,11}.

2.3.3. Semen Makroskopik İncelemesi

Makroskopik incelemede semen içeriği likefikasyon, görünüm, volüm ve pH özellikleri yönünden değerlendirilmektedir^{4,10,11}.

1. Likefikasyon (Semenin Çözünürlüğü)

Ejakülasyon sırasında akıcı olan semen koagüle olur. Prostattan salgılanan amilaz ve proteolitik enzimler 10-30 dakika içerisinde semenin likefiye olmasını (çözünürlük kazanmasını) sağlar. Laboratuvara ulaşan semen örneği 37°C'de (etüvde) likefiye olana kadar bekletilir, sonra incelemeye alınır. Bu süreyi aşan örnekler viskoz olarak kabul edilir^{4,10,11}.

2. Görünüm

Normalde semen sarı-gri renkte, parlak ve homojendir. Prostat bezinden salgılanan spermin'in oksidasyonundan kaynaklanan kendine özgü bir kokusu vardır. Semende eritrositlerin bulunması halinde renk kırmızı-kahverengidir. Uzun süreli cinsel perhizlerde ve pyospermide renk sarıya dönüşür^{4,10,11}.

3. Volüm

WHO kriterlerine göre semen hacmi 2 ml veya daha fazla olmalıdır. 1 ml'den az olması durumu, **hipospermik** olarak isimlendirilip toplama sırasında örneğin dökülmüş olabileceği, kısa cinsel perhiz süresi, retrograd ejakülasyonu veya ejakülatör kanalda darlık gibi nedenler düşünülebilir. Miktarı 6 ml'den fazla olan semen içeriği **hiperspermik** olarak adlandırılır, bu durumda cinsel perhiz süresi uzun veya seminal sıvı fazladır^{2,10,11}.

4. pH

Normal pH değeri 7.2 – 8.0 arasındadır. Akut enfeksiyonlarda pH değeri 8'in üzerine çıkabilir. pH'nın düşük olması sperm salınımının yetersizliği ve bu nedenle ejakülatın daha çok asidik prostat sıvısından oluştuğunu gösterebilir^{10,11}.

2.3.4. Semen Mikroskopik İncelemesi

Mikroskopik incelemede semen içeriği; sperm konsantrasyonu, hareketliliği (motilite), morfoloji ve yuvarlak hücre sayısı ve bu hücrelerin sınıflandırılması yönünden incelenmektedir^{10,11}.

1. Konsantrasyon

Sperm sayımı için günümüzde en fazla kullanılan aletlerden biri “Makler Sperm Sayım Kamerası”dır (Şekil 4,5). 1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından sperm sayımı için özel olarak tasarlanmıştır. Semen örneğinin incelendiği kameranın 10 µm derinliğinde olması spermatozoanın tek bir düzlemde serbest hareketine olanak sağlamaktadır. Makler kamerası ile spermelerin hareketlilik yüzdeleri daha kesin olarak saptanabilmektedir^{20,21,22}.

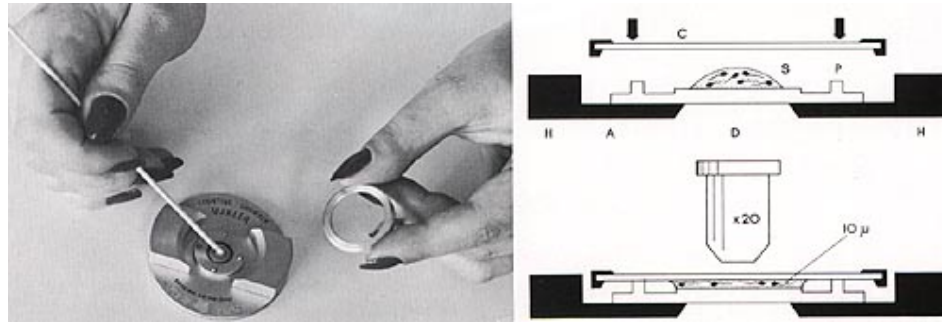


Şekil 4. Makler sperm sayım kamerası²¹



Şekil 5. Makler sperm sayım kamerasının yakın görünümü^{21,22}

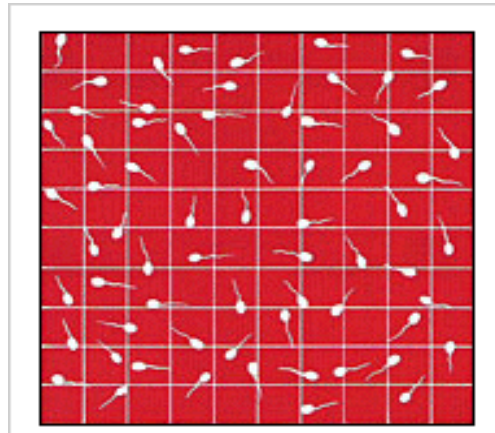
Güvenilir bir değerlendirme için ideal olan Makler sperm sayım aletindeki 100 karedeki spermleri saymaktır. Sayım şu şekilde gerçekleştirilir. Bir damla semen (5 μ l) kameranın merkezine damlatılıp üzerine kapak camı kapatılır. Dört adet kuartz bacak sayesinde spermler, 10 μ m derinlikte yüzeceklerdir (Şekil 6). Bu derinlikte ancak bir adet sperm başı sığabilir. Bu sebeple bir hat üzerinde yapılacak sayım 20x büyütme altında 10 karede motil ve non-motil sperm sayılır ve 10^6 ile çarpılarak mililitredeki ($\times 10^6$ /ml) sperm sayısı belirlenir. Normal sperm konsantrasyonu $>20 \times 10^6$ /ml ve totalde 40×10^6 'dur²⁰.



Şekil 6. Makler kamerasında semen örneğinin damlatılarak hazırlanması²¹

2. Motilite

Motilite değerlendirilirken konsantrasyon sayımında olduğu gibi x20 büyütme altında ve 10 karede yapılır (Şekil 7). Motil spermlerin, toplam sperm sayısına oranı yüzde olarak motiliteyi verir^{10,20,22}.



Şekil 7. Makler kamerasında spermlerin görüntüsü²²

Dünya Sağlık Örgütü hareketliliği 4 sınıfta değerlendirmektedir:

- a- hızlı doğrusal progresif hareket
- b- yavaş doğrusal ya da doğrusal olmayan hızlı hareket
- c- progresif olmayan hareket
- d- hareketsiz

Normal sperm konsantrasyonunun $>50\%$ 'si motil ve bu değer 25% 'i progresif olmalıdır^{10,20}.

3. Morfoloji

Morfolojik değerlendirmede WHO veya Kruger'in strict kriterleri kullanılmaktadır. WHO kriterlerine göre normal değer $>30\%$ iken Kruger strict kriterlerine göre 14% olmalıdır. Morfolojik değerlendirmede sperm baş, boyun ve kuyruk anomalileri yönünden dikkatle incelenmelidir^{20,23}.

Sperm morfolojisi değerlendirilirken önce lam üzerine yayma yapılarak seçilen boya ile boyama yapılır (WHO için Papanicolaou ve Kruger strict kriterleri için Diff-Quick veya Spermac). Değerlendirme immersiyon yağ altında yapılır tercihen 100 veya 200 sperm incelenerek $\%$ normal cinsinden sonuç verilir^{20,24}.

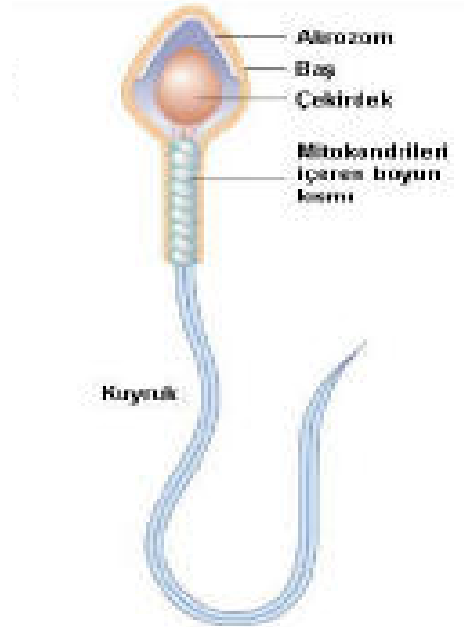
Kruger Strict Kriterleri'ne Göre Morfoloji Değerlendirmesinde Diff-Quick Boyama Tekniği

- 5 µl likefiye olmuş, taze semen örneği lam üzerine damlatılarak yayma yapılır.
- Preparat 3-5 dakika dış ortamda kurutulur.
- 5 dakika şale içerisinde bulunan fiksatif (tesbit) içerisinde bekletilir.
- Boyama işlemi için Diff-Quick boya seti şu basamaklarla uygulanır
- I nolu boya içinde 1 dakika bekletilir ve su ile yıkanır (I nolu boya: Eozin G-pH 6.6 fosfat tamponu ile)
- II nolu boya içinde 1 dakika bekletilir ve su ile yıkanır (II nolu boya: Eozin G-pH 6.6 fosfat tamponu ile)
- Preparat kurutulur
- Üzerine immersion yağı damlatılarak (x100) faz kontrast mikroskopta incelenir.
- Boyama sonrasında akrozom yeşil, nükleus kırmızı, boyun ve kuyruk yeşil boyanır²⁴.

Normal Sperm Morfolojisi

Morfolojik değerlendirme Kruger kriterlerine göre yapılmıştır. Normal sperm morfolojisi > %14 olmalıdır (Şekil 8,9). Kruger kriterlerine göre:

Baş	Düz oval Akrozom, başın % 40-70'ini oluşturur. Normal ölçüler; uzunluk 5-6 µm, genişlik 2.5-3.5 µm Borderline baş formları anormal olarak sınıflanır.
Boyun	Abaksiyel implantasyon olmamalı ve intakt olmalı
Orta kısım	Silindir şeklinde 1 µm genişlikte ve baş uzunluğunun 1.5 katı uzunlukta olmalı. Baş büyüklüğünün ½'den büyük sitoplazmik droplet olmamalı
Kuyruk	Orta kısımdan hafifçe ince, kıvrım içermeyen 45 µm uzunlukta olmalı ^{20,23} .



Şekil 8. Normal morfolojiye sahip, olgun sperm örneği¹⁹



Şekil 9. Normal ve anormal morfolojiye sahip sperm görüntüleri ^{19,25}

2.3.5. Spermatogenez

Spermatogenez üç aşamada incelenir:

1. Germ hücrelerinin (gametlerin) üretimi,
2. Germ hücrelerinin fertilizasyon (aynı zamanda mayoz bölünme) için fonksiyonel olarak hazırlanması,
3. Onları aktif olarak motil kılan yapısal farklılaşmaları ^{4,19}.

1. Gametlerin Üretilmesi

Embriyogenezin erken dönemlerinde, primordial germ hücreleri gelişmekte olan gonadlara göç ederler. Spermatogenez esnasında bu hücreler testis hücrelerinin seminiferöz tübüllerinde bulunurlar. İmmatür (olgunlaşmamış) germ hücreleri spermatogonia olarak adlandırılırlar ve seminiferöz tübüllerde bulunan hücrelerden mitoz bölünme sonucunda gelişirler ^{4,19}.

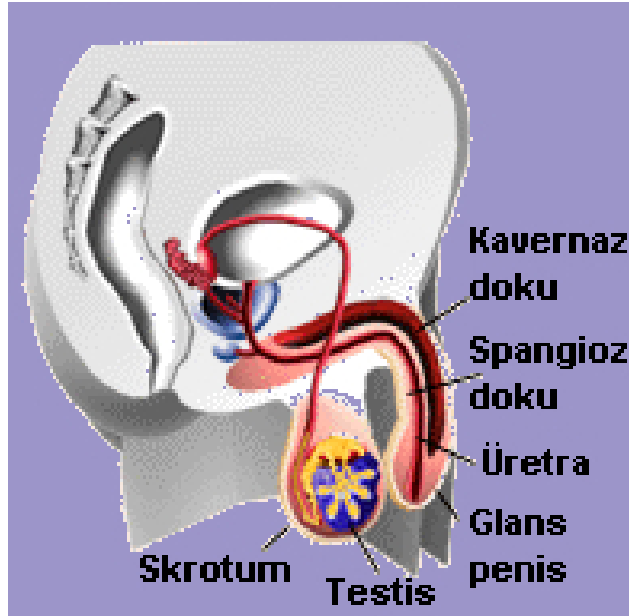
2. Fonksiyonel Farklılaşma

Bazı hücreler bölünmeyi durdurarak primer spermatositlere farklılaşmaktadır. Her primer spermatosit redüksiyon bölünmesine (ilk mayoz bölünme) giderek sekonder spermatosit oluşturur. İkinci mayoz bölünme tamamlandığında dört haploid spermatid üretilir ^{4,19}.

3. Yapısal Farklılaşma

Spermatidler, morfolojik farklılaşmaya giderek olgun spermatozoayı oluştururlar. Bu farklılaşma olayı spermiogenezis olarak adlandırılır; spermatidler uzar ve flagella gelişir fakat birbirlerine ve sitoplazmik köprülerle Sertoli hücrelerine bağlıdır. Bu olayın avantajı, spermatidlerin ana hücreden kaynaklanan bütün ürünlerden faydalanabilmesidir^{4,19}.

Spermiler erkek cins bezleri (gonadlar) olan testislerde üretilirler (Şekil 9). Testisler overler gibi çift fonksiyonludur; sperm üretiminin yanısıra endokrin işlevleri de vardır. Testisler yapıları ve görevleri farklı iki majör komponentten oluşmuştur. Leyding ya da interstisiyal hücreler majör endokrin içeriğine sahiptirler. Bu hücrelerin primer ürünü olan testosteron erkekte embriyonik gelişim, pubertede sekonder seksüel gelişim ve cinsel gücün korunması için önemlidir. Testislerin büyük bölümünü kaplayan seminiferöz tübüller spermatozoa üretiminden sorumludur^{4,19}.



Şekil 10. Erkek üreme sistemi¹⁹

Seminiferöz tübülleri, Sertoli ve germinal hücrelerden oluşmuştur:

- Sertoli hücreler kendi içlerinde bağlantılar oluşturmuştur. Bu bağlantılar proteinlerin interstisiyal alandan seminiferöz tübül alanına geçişini engeller ve kan-testis bariyeri oluşturmuş olur.
- Sertoli hücreleri gelişmekte olan germ hücrelerini sararak germ hücre farklılaşması için uygun ortam hazırlamaktadır.
- Bu hücreler hasara uğramış germ hücrelerini fagositoza uğratmakta ve germ hücrelerinin spermatozoa oluşumunda kullanılmayan sitoplazma parçalarını da fagositozla almaktadır.
- FSH ya da testosterona cevap olarak Sertoli hücreleri yüksek affiniteye sahip bir molekül olan androjen-bağlayan protein sekrete etmektedir ²⁶.

Spermilerin ejakülasyonla dış ortama verilmesine kadar izledikleri kanallar testis içi (intratestiküler) ve testis dışı (ekstratestiküler) olmak üzere iki grupta incelenir. İntratestiküler kanallar; tubuli rekti, rete testis ve duktuli efferentes olup ekstratestiküler kanallar da epididimis ve duktus deferens (vas deferens) dir. Bu kanalların yapısal özellikleri ve dolayısıyla spermilerin matürasyonuna katkıları da birbirinden farklıdır ²⁶.

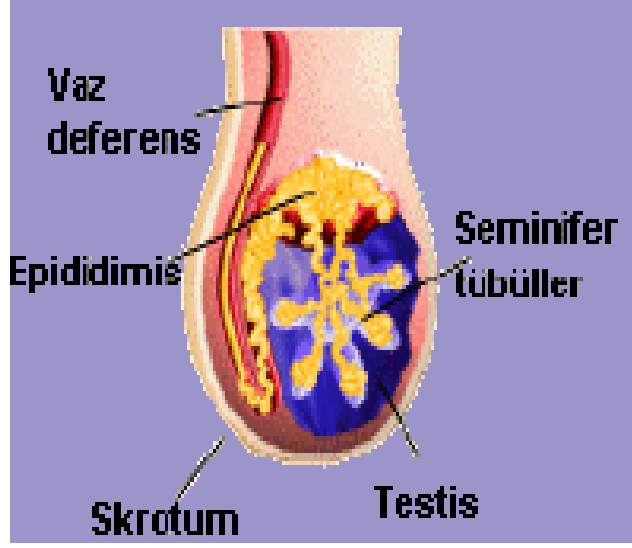
İntratestiküler Kanallar

Tubulu Rekti ve Rete Testis: Seminifer tübüller kısa ve düz tübüller (tubuli rekti) aracılığıyla rete testise açılırlar ²⁶.

Duktuli Efferentes: Rete testis ve epididimis arasında yer alır, çok sıralı prizmatik epitelle döşelidir. Epitel hücrelerinin bir grubu sillidir ve sillerin hareketi ile lümendeki sıvı ve spermilerin epididimise doğru ilerlemesi sağlanır ²⁶ (Şekil 11).

Ekstratestiküler Kanallar

Duktus Epididimis: Anatomik olarak üç bölümden meydana gelmiştir. Baş (kaput), gövde (korpus) ve kuyruk (kauda). Epididimis spermilerin olgunlaşarak



Şekil 11. Testislerin yapısı ¹⁹

fonksiyonel özelliklerini kazandıkları kanal olarak diğer erkek genital boşaltma kanallarından farklıdır ²⁶.

Duktus (vas) Deferens: Duktus epididimisten başlayarak prostatik üretranın sonlandığı yere kadar uzanır. Erkek genital boşaltma kanalları içinde duvarı en gelişmiş, en iyi organize olanıdır ²⁶.

2.3.7. Semen

Ejakülasyon

Sempatik sinir sisteminin uyarılması, epididimis ve duktus deferens kaslarının peristaltik kontraksiyonuna neden olmaktadır. Spermatozoa içeren sıvı epididimis, duktus deferens ve ampüllada depolandıktan sonra ejakülatör kanal boyunca prostatik üretraya geçirilmektedir. Seminal keseler de, 2-3 ml kadar alkali bir sıvıyı ejakülatör kanal boyunca üretraya sekrete etmektedir ⁴.

Prostat kaslarının kasmasıyla 1-2 ml sulu prostat sekresyonu gerçekleştirilir. Prostatik üretradan, üretraya geçiş sağlanır. Üretra etrafındaki kasların kontraksiyonu ejakülatı üretranın dışına göndermeye çalışır ⁴. Ejakülasyon sırasında mesane kapatılarak retrograd ejakülasyonu (mesaneye ejakülasyon) önlenmiş olur ⁴.

Semen

Ejakülat ya da semen (meni) hipotalamo-pitüiter aks dahilinde testislerin işlevi ve posttestiküler boşaltma kanallarıyla aksesuar bezlerin salgılarından oluşan bir son üründür. Normal insan ejakülatının ortalama hacmi yaklaşık olarak 3 ml olup 2-6 ml aralığında değişir ve iki komponenti vardır:

1. testisler tarafından üretilen spermatozoa,
2. seminal plazma; 1/3'ü prostat sekresyonundan, 2/3'ü seminal kese sekresyonundan oluşur ⁴.

Normal semen hacminin % 10'unu spermatozoa, % 90'ını seminal plazma oluşturur. Seminal plazmanın en önemli görevi (pH = 7.2-7.8) spermatozoa transportu ve tampon görevi görerek vajinanın pH'sının yükseltilmesidir. pH 6,2'nin altına düştüğünde spermatozoa yavaşca immobilize olacaktır. Hacmin az olması yeterince tampon kapasitesi oluşturamayacağı için spermatozoa immobilizasyonu gerçekleşecek, hacmin fazla olduğu durumda da spermatozoa konsantrasyonu düşecektir. Bu durum dezavantaj gibi görülmemelidir, çünkü spermatozoa ejakülatın ilk kısmında yer almaktadır ⁴.

Seminal plazma, ejakülatın sıvı bölümüdür; erkekte çeşitli salgı bezlerinin (epididimis, vas deferens, ampulla, seminal vezikül, prostat bezi) sekresyonundan oluşan bir karışımdır. Aynı kişinin farklı ejakülatlarında, seminal plazma kompozisyonu mevsimsel farklılık gösterebilmektedir. Ayrıca ejakülasyondan sonra seminal plazmadaki enzim ve spermlerin metabolik aktivitesine bağlı olarak da seminal plazmanın kompozisyonu değişmektedir ²⁶.

İnsan ejakülatının ilk fraksiyonu sperm ve prostatik bir sekresyon olan sitrik asit yönünden zengindir. Fruktoz konsantrasyonu, seminal veziküllerin majör sekretuar ürünüdür ve ejakülatın sonraki sekresyonlarında yükselmektedir ²⁶.

Diğer vücut sıvılarından farklı olarak seminal plazma yüksek konsantrasyonlarda potasyum, çinko, sitrik asit, fruktoz, fosforilkolin, spermin, serbest amino asitler, prostaglandinler ile önemli düzeyde asit fosfataz, beta-glukronidaz, laktik dehidrogenaz, alfa amilaz ve prostat spesifik antijenler içermektedir ²⁶.

Çizelge 2. İnsanda Seminal Plazmada Bulunan Çeşitli Maddelerin Konsantrasyonları ²⁶

<u>Madde</u>	<u>Konsantrasyon (mM)</u>
Sodyum	43-112
Potasyum	14-28
Kalsiyum	5-7
Magnezyum	1.2-5
Klorür	28-56
Bikarbonat	8
Fruktoz	2-33
Glukoz	0.4
Sorbitol	0.6
İnozitol	3-3.5
Laktik asit	2.2-5.6
Pirüvik asit	3.4
Sitrik asit	5.2-7.3
Glutamik asit	6.5
Askorbik asit	0.6
Karnitin	0.2-1.3
Asetilkarnitin	0.06-0.28
Gliserofosfokolin	2.0-3.3
Fosfokolin	14-21
Spermin	3
Spermidin	0.1
Putresin	0.2
Kreatin	1.5
Arjinin	5.2
Ergotionin	eser düzeyde
Ürik asit	0.1-0.4
Protein (mg/ml)	35-50

2.4. Malat Dehidrogenaz (MDH) ve Malik Enzimler (ME)

MDH ve ME'ler pek çok metabolik yolun önemli enzimleridir. Bu yollar arasında:

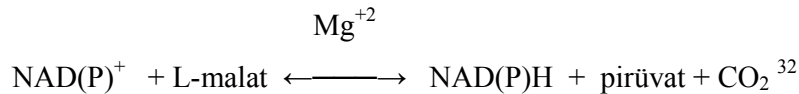
- anaerobik solunum
- trikarboksilik asit döngüsü
- glukoneogenez
- glioksilat döngüsü
- NADPH eldesi ve yağ asit biyosentezi sayılabilir²⁷.

MDH (E.C. 1.1.1.37) NAD⁺ bağımlı olup sitozol ve mitokondriye yerleşmiştir. Mitokondride sitrik asit siklusunda önemli bir rol oynar; malat, dehidrogenasyon ile yükseltgenip okzaloasetat oluşturulurken, NAD⁺ NADH'a indirgenir^{28,29,30,31}.



NADH elektron transport sistemine girerek ATP üretimine yardım eder. Okzaloasetat pek çok metabolik yolda önemli rol oynar; trikarboksilik asit siklusu, amino asit sentezi, glukoneogenez, oksidasyon/redüksiyon dengesinin korunması, sitoplazma ve hücre organelleri arasında metabolit değişiminin hızlanması bu işlevler arasında sayılabilir^{27,31,32}.

Malat dehidrogenaz ailesi içerisinde yer alan ME'ler NAD(P) bağımlı olup sitozol ve mitokondride bulunurlar. Bu enzimler, malatın oksidatif dekarboksilasyonunu gerçekleştirerek pirüvat, NAD(P)H ve CO₂ oluştururlar^{32,33}.



NADPH yağ asit sentezi için redükte edici ajan olarak görev alır. Yağ asitleri sadece mükemmel bir enerji kaynağı olmayıp fosfolipit tabakasının yapısal birimlerini oluştururlar. Böylece NADP⁺ bağımlı dehidrogenazlar bir hücrenin metabolik ve yapısal bütünlüğünün korunması için önemlidir^{27,32}.

MDH farklı kaynaklardan izole edilmiştir; öbakteri, algler, mantar, bitkiler, memeliler ve organeller örneğin mitokondria, kloroplast, glioksizomlar ve peroksizomlar¹. Doğada çok yaygın olarak bulunan (ubiquitous) bu enzimler pek çok canlıda iyi korunmuş durumda bulunan proteinlerdir²⁸.

MDH ile ilgili araştırmalar 1960'lı yıllarda başlamış, yapısı 1968 yılında çalışılmıştır²⁷.

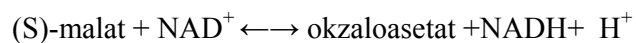
2.4.1. MDH (EC 1.1.1.37)

Alternatif İsimlendirmeler

Malat dehidrogenaz
Malik dehidrogenaz
L-malat dehidrogenaz
NAD-L-malat dehidrogenaz
Malik asit dehidrogenaz
NAD-bağımlı malik dehidrogenaz
NAD-malat dehidrogenaz
NAD-malik dehidrogenaz
malat (NAD) dehidrogenaz
NAD-bağımlı malat dehidrogenaz
NAD-özgün malat dehidrogenaz
NAD-bağlı malat dehidrogenaz
MDH
Keto asit redüktaz alfa-1 (KETAR)³⁴.

2.4.2. MDH1 Geni İçin Gen Kartı

Tanımlama	Malat dehidrogenaz, sitoplazmik (EC 1.1.1.37)
Kromozomal yerleşim	Kromozom 2
	Lokus 2p13.3
Proteinler	Büyüklüğü 333 amino asit 36295 Da
	Altbirim Homodimer
	Katalitik aktivite:



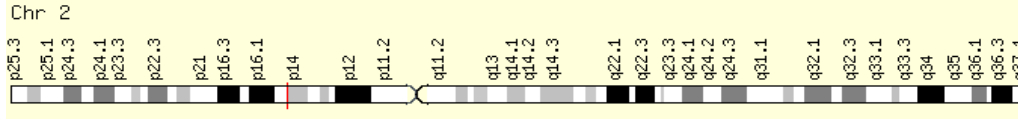
	Hüresel yerleşim: Sitoplazmik
Metabolik yollar	Sitrat siklusu (TCA siklusu) Pirüvat metabolizması Glioksilat ve dikarboksilat metabolizması Karbon fiksasyonu Redüktif karboksilat siklusu (CO ₂ fiksasyonu) ^{35,36}
Optimum pH:	7,4 ³⁰
İnhibitörler:	Çeşitli iyodine ajanlar; tiroksin, iyot, siyanit moleküler iyot – SH gruplarını okside ederek (Varrone 1970) enzimi inaktive ederler. 2-Tenoil-trifloroaseton (Gutman ve Hartstein -1974) ve klorotirikin (Schindler-1975) MDH'ı inhibe eder ³⁰ .
Aktivatörler	Fosfat, arsenat ve çinko iyonları uyarıcıdır. Merküribenzoatın düşük konsantrasyonlarının aktivatör olduğu gösterilmiştir ³⁰ .

MDH1 geni; böbrek, akciğer, kalp, iskelet kası, karaciğer, pankreas, prostat, dalak, timus, beyin ve omurilikde eksprese edilmiştir ³⁵.

MDH'lar eş altbirimlerden oluşan multimerik enzimlerdir, dimer ya da tetramer olarak organize olmuşlardır. Her subünit kataliz fonksiyonu yönünden bağımsız olarak hareket eder, katalitik bölgeler arasında ilişki bildirilmemiştir. Genellikle NAD⁺-bağımlı MDH'lar metabolik düzenlemeye katılmazlar; mitokondrial enzim istisnadır, bir bölgesinde subünit için allosterik kontrole bağımlıdır ²⁸.

Mitokondriyal ve sitoplazmik MDH olarak iki formdaki enzimler farklı genlerle kodlanmaktadır. Birktoft ve ark. (1982) iki enzim arasında (aynı şekilde LDH ile de) yakın yapısal homoloji bulmuşlar ve ortak bir ata genden geldikleri sonucuna varmışlardır. Tanaka ve ark. (1996) insan cDNA ile kodlanan 334 amino asitlik bir protein izole etmişler ve fare/sıçan sitozolik MDH ile %96 benzerlik gösterdiğini açıklamışlardır. Yetişkin insan dokularında Northern blot analizi ile yapılan çalışmada bu genin kalp ve iskelet kasında yüksek düzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir ²⁸.

Floresan in situ hibridizasyon ile enzimin kromozomal yerleşiminin 2p16 olduğunu saptamışlardır (Şekil 12) ³⁵.

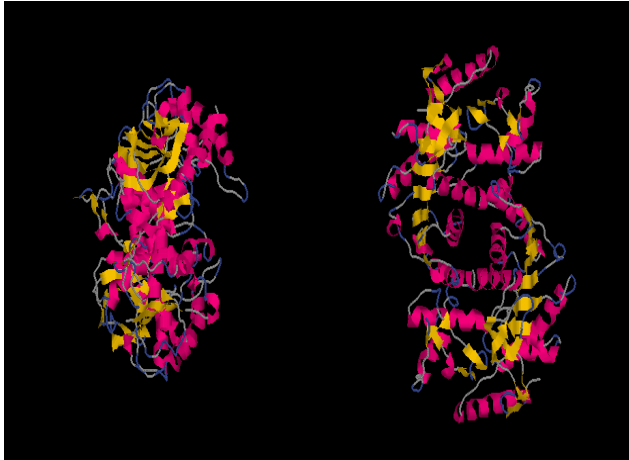


Şekil 12. 2. kromozom üzerinde MDH1 geninin yerleşimi ³⁵

Farede MDH'nin sitozolik formu Mor2 geni ile mitokondrial formu Mor geni ile sembolize edilmiştir (insanda kullanılan mitokondrial ve sitozolik izozimlerin zıt numaralandırma sistemi). “MOR” ifadesi enzimin oksidoredüktaz fonksiyonu ile ilgilidir ²⁹.

MDH'nin yapısı *Haloarcula marismortui*'de çalışılmış ve şu şekilde aydınlatılmıştır (Şekil 13) ²⁷:

- MDH, alfa ve beta protein oksidoredüktazlara aittir.
- 606 amino asit ve 4690 atom ile homodimerik proteindir.
- Her alt birim, bir koenzim bağlar.
- Her zincir 303 amino asit içerir, moleküler ağırlığı 32662'dir.
- A zinciri 11 alfa heliks ve 14 beta tabakası; B zinciri 10 alfa heliks ve 14 beta tabakası içerir ²⁷.



Şekil 13. Halofilik bir archaeobacteria olan *Haloarcula marismortui*'de MDH yapısı ²⁷

2.4.4. Amino Asit Dizi Benzerliği

MDH amino asit dizileri, birbiriyle ilgili iki ana filogenetik enzim grubuna ayrılır. Farklı MDH izozimleri, aynı hücre çeşitlerinin değişik hücre organellerinde yerleşim gösterir. Farklı kaynaklardaki MDH izozimlerinin dizi benzerliği kompleksdir. Örneğin; bazı öbakteri türlerinde (Escherichia coli, Salmonella typhimurium) ökaryotların mitokondriyal izozimleri ile yüksek dizi benzerliği gösterirken diğer öbakterial MDH'lar (Thermus spp) ökaryotik MDH'ların sitoplazmik ve kloroplast izozimleri ile benzerdir²⁸.

MDH'ın aktif bölgesi hidrofobik vakuolde yerleşmiş olup substrat ve koenzimin nikotinamit halkası için bağlayıcı bölge içerir. Enzim:koenzim:substrat üç boyutlu kompleks oluşumuna bağlı olarak proteinde biçimsel değişim gözlenir. Fonksiyonel olarak önemli amino asitler substrat ile yakın temasa geçmiştir. MDH'ların 98-110 amino asit arasındaki bölgesi yüksek korumaya sahiptir ve kataliz için önemli rol oynar. MDH'ın farklı modüler konformasyonlarının katalitik siklusun farklı basamaklarında rol oynadığına dair bulgular mevcuttur. Floresan substrat analog çalışmalarında NAD⁺ ve NADH bağlanması mitokondriyal MDH'ın substrat bağlama bölgesinde iki farklı konformasyonel durum içermektedir²⁸.

LDH ve MDH birbirlerine çok benzeyen 2-keto asit dehidrogenazlar olup eşit mekanizmalarla benzer reaksiyonları katalizlerler. Bütün yapısal benzerliğe rağmen bu fonksiyonel olarak benzer enzimler arasında sekans homolojisi düşüktür. Fakat bu enzim ailelerinde fonksiyonel aktif bölge amino asitleri yüksek derecede korunmuş durumdadır⁴. LDH için doğal NADP⁺ spesifik enzim izole edilmemiştir. Bu olay B. stearothermophilus LDH'da tek amino asit (D53S) eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu durum şunu gösterir ki LDH ve MDH'da nükleotid bağlama karakterleri tek bir amino asit değişimiyle farklılaştırılmaktadır. Ayrıca aynı faktörler her iki enzimde de etkili olmaktadır²⁸.

2.4.5. Substrat Özgünlüğünün Düzenlenmesi

Bütün MDH'larda kesinlikle korunmuş 3 arjinin amino asidi (R102, R109 ve R171) substrat bağlanması ve kataliz için önemlidir. R102 ve R109 hareketli bölgenin altında olup üç boyutlu kompleksde substrat ile etkileşime girer. R109 LDH'da

substratın transisyon aşamasında stabilizasyonunda rol oynamakta, substratın karbonil bağı polarize edilerek R109 ile stabilize edilmektedir. Bu amino asidin MDH'da korunması kataliz mekanizmasının LDH'a benzer olduğunu desteklemektedir²⁸.

MDH ve LDH moleküllerinin rasyonel yeni tasarımları, tek bir amino asit değişimiyle enzim substrat özgünlüğünün nasıl yeniden tanımlandığını göstermektedir. MDH'da 102. pozisyonundaki amino asit arjinin; LDH'da glutamindir. Tercih edilen substratlar MDH için okzaloasetat ve LDH için pirüvattır. E. coli MDH R102Q mutant enzimi okzaloasetat substratı için yüksek derecede seçicilik göstermektedir. Organizma üzerinde güçlü evrimsel baskı nedeniyle okzaloasetat için yüksek derecede seçiciliğe sahip bağlayıcı bir mekanizma gelişmekte ve R102 MDH'da korunuyor gibi görünmektedir²⁸.

2.5. Malik Enzim

Malik enzim (ME) NAD'nin redüksiyonuyla beraber L-malatın pirüvata oksidatif dekarboksilasyonunu katalizlemektedir. NAD(P)⁺ye ek olarak enzim, divalent katyonlara (Mg⁺² ya da Mn⁺²) ihtiyaç duyar (kofaktör olarak)^{37,38,39,40,41}.



Bu enzimlerle malatın, pirüvata dönüşümü iki basamakta gerçekleşmektedir; malatın oksidasyonu (dehidrogenasyon) ile okzaloasetat üretilir. Okzaloasetatın dekarboksilasyonu pirüvat ve CO₂ oluşturulur. ME'ler ihtiyaç duydukları dinükleotid kofaktöre göre üç gruba ayrılırlar: NAD⁺ ya da NADP⁺ bağlı enzimler kofaktör olarak sadece NAD⁺ ya da NADP⁺ kullanır ve NAD(P)⁺ bağlı çift özgünlüğe sahip enzimler NAD⁺ ya da NADP⁺ nin her ikisini de kofaktör olarak kullanırlar^{38,40}.

ME aktivitesi ilk olarak güvercin karaciğerinde çalışılmıştır. O zamandan bu yana pek çok yaşayan organizmada saptanmıştır; bakteri, maya, mantar, bitki, insan ve diğer hayvanlar. 40'dan fazla ME'in cDNA dizileri tesbit edilmiştir. Memelilerde ME'in üç izoformu bildirilmiştir: sitozolik NADP⁺ bağımlı ME (sNADP-ME), mitokondrial NADP⁺ bağımlı ME (mNADP-ME) ve mitokondrial NAD(P)⁺ bağımlı ME (mNAD-ME). mNAD-ME, NAD⁺ ve NADP⁺ yi kofaktör (çift özgünlük) olarak kullanır fakat fizyolojik şartlarda NAD⁺ yi tercih eder^{38,40,42}.

2.5.1. Malik Enzim 1 (ME1)

ME1 (EC 1.1.1.40)

Alternatif isimler:

- ME, NADP-bağımlı, sitozolik
- ME, soluble
- MDH, NADP-bağımlı, soluble
- 572 amino asitten oluşmuştur
- Moleküler kütlesi 64,1kD'dur
- ME1 geninin yerleşimi 6q12 olarak belirlenmiştir ^{43,44,45}.

2.5.2. Malik Enzim 2 (ME2)

ME 2 (EC 1.1.1.38)

Alternatif isim:

- ME NAD-bağımlı, mitokondrial
- 584 amino asitten oluşmuştur
- Moleküler kütlesi 65,4 kD'dur
- ME2 geninin yerleşimi 18q21 olarak belirlenmiştir ^{44,45}.

2.5.3. Malik Enzim 3 (ME3)

ME3 (E.C.1.1.1.39)

Alternatif isim

- ME NAD(P)-bağımlı mitokondrial
- Kofaktör olarak NAD ya da NADP kullanır
- 2,2-kb ME3 transkripti; kalp, iskelet kası, beyin, kolon, böbrek, pankreas ve overde yüksek düzeyde eksprese edilmiş
- İnce bağırsak, akciğer ve testislerde düşük düzeyde eksprese edilmiştir.
- Karaciğer, periferik kan, lökosit ve plasentada eksprese edilmemiştir.
- ME3 ekspresyonunun düşük bölünme oranına sahip organlarda daha fazla olduğu bildirilmiştir ^{44,45,46}.
- ME3 geninin yerleşimi 11q22.3 olarak belirlenmiştir.

Doğadaki geniş dağılımlarına bağlı olarak ME'ler önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. ME ile katalizlenen biyokimyasal reaksiyonlar pirüvat, CO₂ ve NAD(P)H üretir ve bu ürünlerle farklı biyolojik olaylar desteklenir. Örneğin ME, CO₂ üretimi nedeniyle tropik C4 bitkilerinde fotosentetik reaksiyonlarda çok önemli rol oynar. Mantar ve diğer organizmalarda NADPH üretimine bağlı olarak ME'in lipojenik fonksiyonları vardır. Benzer şekilde memelilerde sNADP-ME izoformu NADPH oluşturulmasında, karaciğer ve adipoz dokuda, yağ asidi ve steroid biyosentezinde rol almaktadır. sNADP-ME diyet kontrolündedir. Yüksek karbohidratlı diet ya da tiroit hormonlarıyla indüklenebilir. sNADP-ME geninin promoter bölgesinde tiroit cevap elementi bulunur. sNADP-ME'in mikrozomal ilaç detoksifikasyonunda da rolü vardır³⁸.

mNAD-ME izoformu NADH ve pirüvat ürünlerine bağlı olarak hızlı proliferen olan dokularda (dalak, timus, ince bağırsağın mukozal hücreleri) ve özellikle de tümörlerde enerji üretiminde önemli rol oynar. mNAD-ME glutamin metabolizması için önemlidir. Glutamin; plazma, doku ve hücre kültür ortamlarında en yaygın amino asittir. Glutamin pek çok tümör hücresi için ana enerji kaynağıdır, bu hücrelerin çoğu enerji üretimi için glukozu kesin bağımlılık göstermez. Glutaminin pirüvata metabolizması için olası bir yol düşünülmüştür^{38,41}.

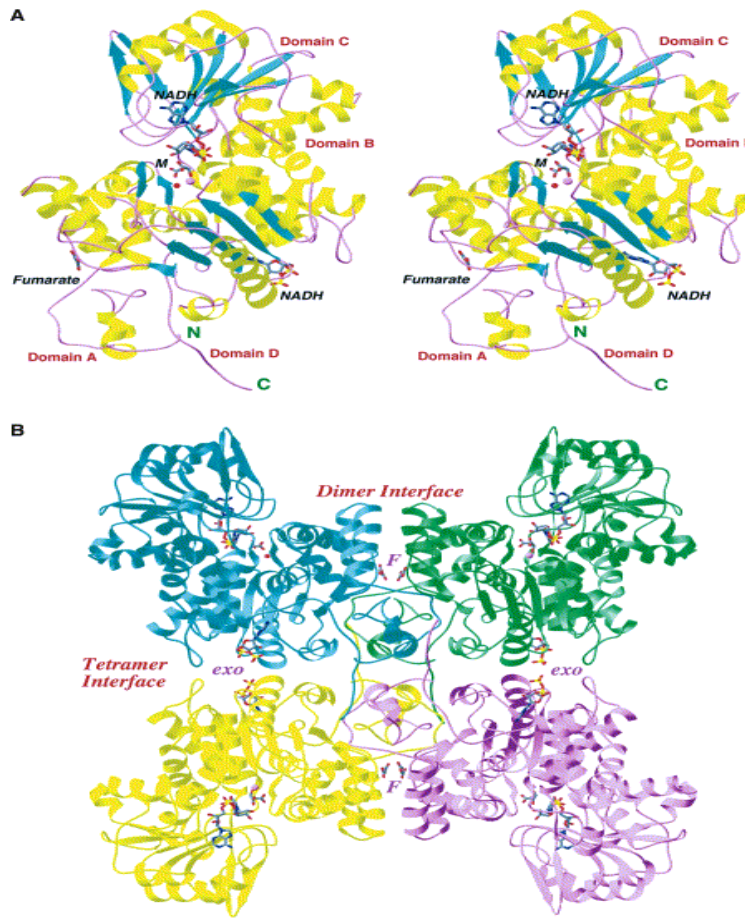
Glutamin → glutamat → α-ketoglutarat → süksinat → fumarat → malat → pirüvat³⁸

Bu yol "glutaminoliziz" olarak adlandırılır ve glukozu pirüvata dönüştüren glikoliz yoluna analogdur. Sitrik asit döngüsünde (Krebs siklusu) α-ketoglutarat, malata dönüşmektedir. Sitrik asit siklusunda bir sonraki reaksiyon, malatın oksaloasetat üretmek üzere oksidasyonu olup MDH ile katalizlenir. Glutaminoliziz yolunda ise malat, oksidatif dekarboksilasyon ile pirüvata dönüştürülür, bu tepkime ise ME ile katalizlenir³⁸.

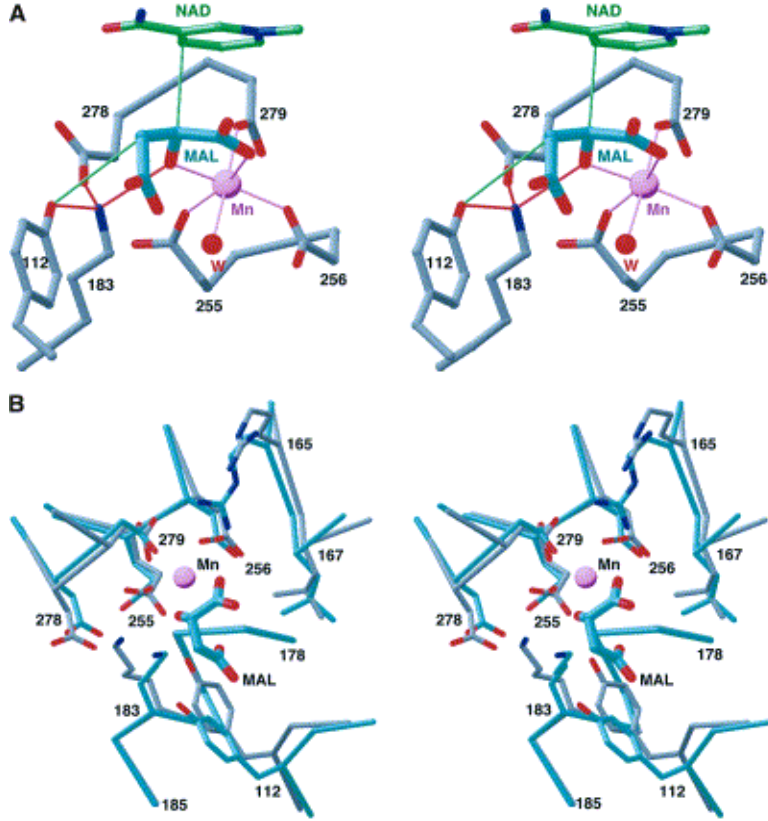
ME'ler genellikle homotetramerdir. Monomerleri 550 amino asit içerir ve moleküler ağırlığı 60 kDa'dur. Bu nedenle enzimler, dehidrogenazlardan (MDH) daha büyüktür. Bazı bitkilerden ve termofilik bakteri B. Stearothermofilus'dan heterodimerik ME'ler tanımlanmıştır. Önemli biyolojik fonksiyonlarına bağlı olarak değişik organizmaların ME amino asit dizileri önemli koruma göstermektedir. Örneğin insan, sıçan ve fare sNADP-ME'leri %90 dizi benzerliği gösterir. İnsan mNAD-ME, insan

mNADP-ME ya da sNADP-ME ile %55 dizi benzerliği gösterir. Yüksek derecede korunmuşla ilgili olarak diğer dikkat çekici bir örnek insan mNADP-ME ve mısır kloroplast NADP-ME %47 amino asit dizi benzerliği paylaşmasıdır³⁸.

mNAD-ME, diğer iki memeli ME izoformundan farklıdır. Substrat malata bağlı olarak ME kooperatif bir enzimdir ve katalitik aktivitesi allosterik olarak fumarat (düşük düzeyde süksinat) ile kontrol edilir. Fumarat, aktivatör; ATP inhibitör olarak çalışır. Fumarat ve ATP, sNADP-ME ve mNADP-ME 'in katalitik aktivitesi üzerinde etki göstermez (Şekil 16)^{38,39}



Şekil 16. İnsanda mNADME kompleksi. (A) İnsanda mNADME monomerinin şematik yapısı. NADH molekülü aktif bölgededir, NADH molekülünün ADP bölümü dışa doğru yerleşmiştir. (B) Enzim tetramerinin şematik yapısı. Fumarat molekülü (F) dimer interface arasında yer alır^{39,42}



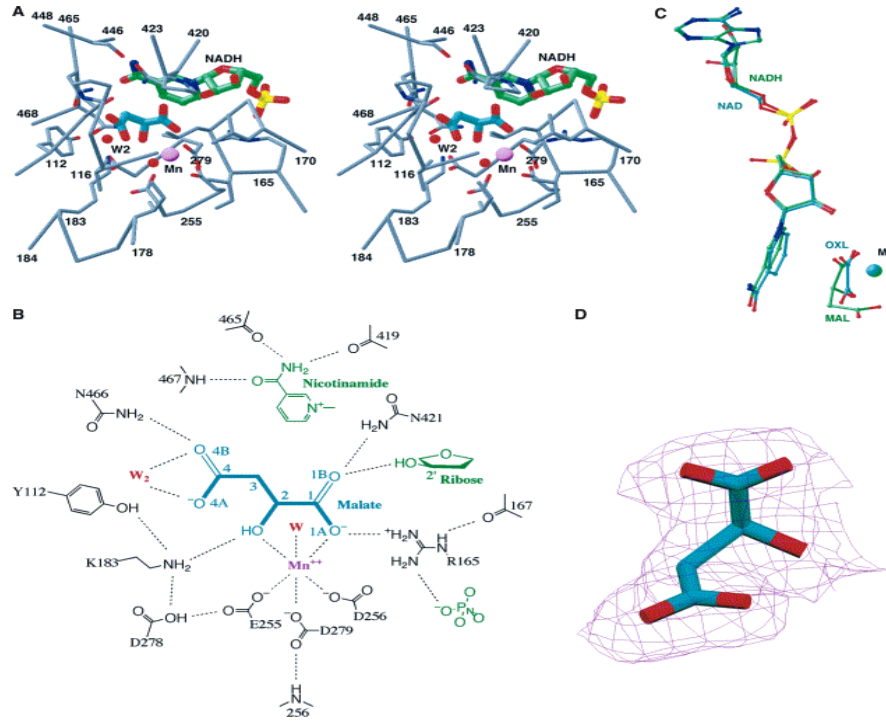
Şekil 17. Malik enzimin aktif bölgesi ⁴²

(A) Stereo diagram enzimin katalitik amino asitlerini ve kasyon ligandlarını göstermektedir. (B) Diagram, açık ve kapalı formda aktif bölgede amino asitlerin konformasyonunu karşılaştırmaktadır ^{2,13}.

mNAD-ME'de 4 monomer tetrahedral konumda değil planar pozisyonundadır. Tetramer; dimer dimeri görünümündedir. Bu bilgi biyokimyasal çalışmalarla uyumludur. Çünkü ME'in solüsyonda monomer ↔ dimer ↔ tetramer şeklinde dengede bulunduğu gösterilmiştir. Güvercin karaciğer ME tetramerinde yapılan kinetik ve substrat bağlama çalışmaları ile tetramerin 4 aktif bölgesinden (Şekil 18) ikisinin katalitik olarak yarışma halinde olduğu bildirilmiştir ^{38,42}.

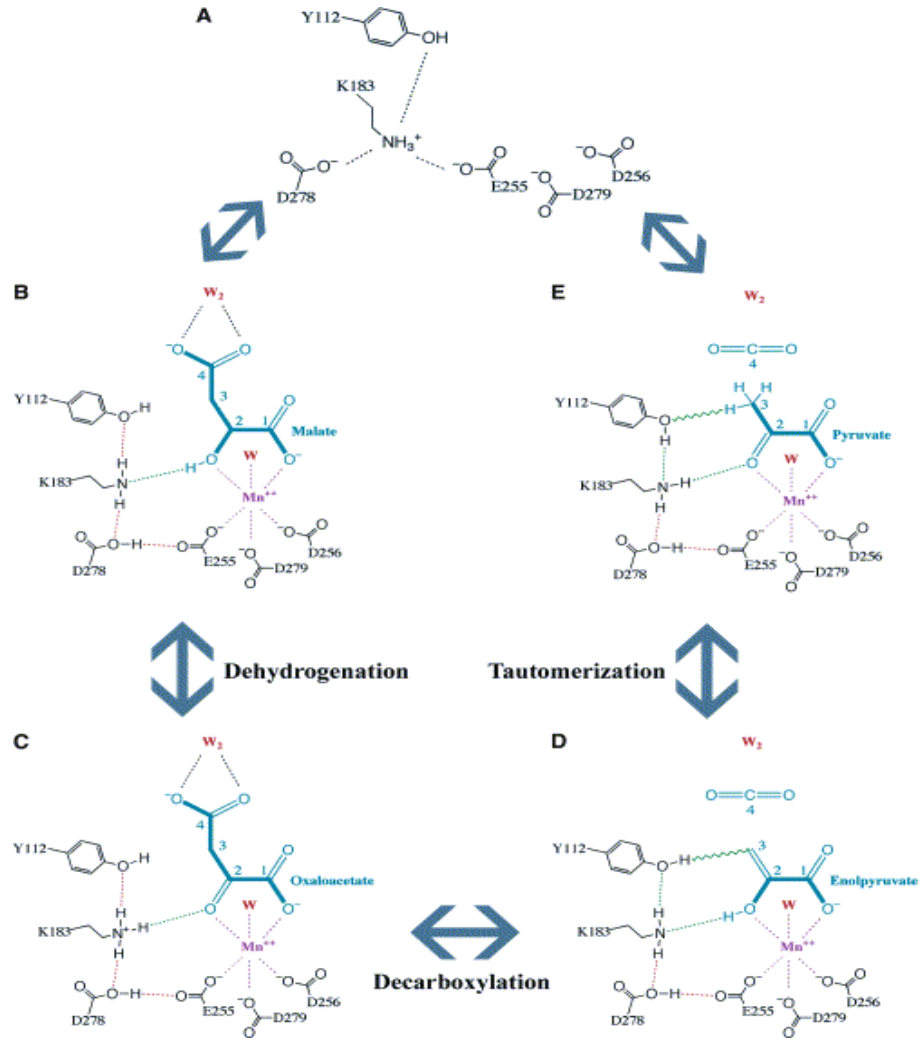
Enzimin her monomerinin NAD⁺ bağlayan 2 bölge içerdiği; ikinci NAD⁺ bağlayıcı bölgenin katalitik bölge olduğu (Şekil 19) düşünülmektedir. NAD⁺'nin bu bölgeye bağlanmasının biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir. Doğal ligandların bu bağlanma bölgesine olan benzerliği bilinmemektedir. Fakat yapısından şu

anlaşılmaktadır ki bu ikinci bölge mNAD-ME'in allosterik inhibitörü olan ATP'nin bağlanma yeri olabilir. ATP'nin insanda iki ME izoformunun katalitik aktivitesi üzerinde etkisi yoktur. Böylece bu bağlanma bölgesinde önemli olan Arjinin amino asitleri (R197, R542, R556) diğer iki ME izoformunda bulunmazlar³⁸.



Şekil 18. Malatın enzim üzerinde aktif bölgeye bağlanması . (A) Stereo diagram malatın aktif bölgeye bağlanmasını göstermektedir. (B) Malat ve aktif bölgede enzim arasında hidrojen bağı etkileşimleri (C) NADH/malat ve NAD⁺/okzalatin enzime bağlanma modları (D) Aktif bölgede malat molekülü için 2.3 °A'da rezolüsyonda elektron yoğunluğu haritası⁴².

ME'in katalitik aktivitesi yeni bir sınıf oksidatif dekarboksilaz olup divalent katyonlara (Mg⁺² ya da Mn⁺²) ihtiyaç duyar. Katyonun katalizde önemli rol oynadığı, malat üzerinde hidroksil grubunu polarize ederek dehidrogenasyonu hızlandırdığı ve ardından dekarboksilasyon basamağında okzaloasetatın karbonil grubunu polarize ettiği bildirilmiştir⁴⁰.



Şekil 19. Malik enzimin katalitik mekanizması ⁴²

- (A) Substrat bağlanmadan önce enzim açık formda
- (B) Malatın bağlanmasıyla enzim kapalı formda Lizin183 nötr formda ve C2 hidroksilden proton çıkarmak için hazır durumda
- (C) Dekarboksilasyon reaksiyonu sonrası; Tirozin112 C3 atomunu protone etme durumunda
- (D) Pirüvata tautomerizasyon sonrası ^{2,13}.

2.5.4. MDH ve ME'in Klinik Olarak Önemi

MDH'ın özellikle mitokondriyal izoenzimlerinin; hepatoselüler karsinoma, akut dolaşım yetersizliği ve akut hepatitin düzeyini değerlendirmede faydalı olduğu bildirilmiştir ⁴⁷.

ME, önemli metabolik rolü nedeniyle parazitik bir nematod olan *Ascaris suum* ile ilgili araştırmalarda önemli bir yer edinmiştir ⁴⁸.

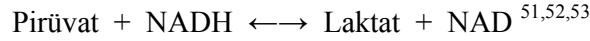
Özcan ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada patojen bir parazit olan *Entamoeba histolytica* suşlarının patojen olmayanlardan ayırt edilmesi için kültürde üretilen örneklerde elektroforetik ayırım yapılmış *Entamoeba histolytica* suşlarının farklı yürüdüğü izlenip ME'in tanıda yararlı olduğu gösterilmiştir ⁴⁹.

E.coli'de yapılan bir çalışmada NAD-bağlı MDH aktivitesi sonucunda oluşan bir ürün olan oksaloasetatın hidrojen peroksiti temizleyerek antioksidan rol oynadığı bildirilmiştir ⁵⁰.

İdiopatik epilepsi (Idiopathic generalized epilepsy) genetik olarak saptanmış epilepsi sendromudur. Greenberg ve ark. ME2-merkezli 9-SNP haplotip homozigot olarak bulunduğu idiyopatik epilepsi riskinin arttığını bildirmişlerdir ⁴⁴.

2.6. Laktat Dehidrogenaz ve C4 İzoenzimi

Glikolitik yolun son enzimi olan Laktat Dehidrogenaz (LDH) (L-laktat:NAD⁺-oksidoredüktaz E.C.1.1.1.27) sitozolik bir enzim olup aşağıdaki reaksiyonu katalizlemektedir ^{51,52,53}:



LDH, memelilerde iki farklı altbirimin birleşiminden oluşan beş tetramerik izozim olarak bulunur. İzozimler katalitik, fiziksel ve immünolojik özellikleri yönünden farklılık göstermektedir. Cahn ve ark. (1962) polipeptit altbirimlerini “H” ve “M” olarak göstermişler. İki saf izozim çeşidi H₄ ve M₄; hibritler ise H₃M, H₂M₂, HM₃’dür. “H” altbirimi, kalp kası; “M” altbirimi iskelet kası ve karaciğerde baskındır. Bu alt birimler bir çok kaynaktan A ve B olarak tanımlanmıştır. LDH klinik olarak önemlidir. Çünkü bazı izozimlerinin serum düzeyleri belirli dokulardaki patolojik durumları göstermektedir ^{51,52,53}.

Testis ve spermatozoada sperm izozimi (izozim x) tanımlanmıştır (Zinkham ve ark. 1964; Stambaugh ve Buckley 1967). McKee ve ark. (1972), Spielman ve ark. (1973); Goldberg (1972) immünolojik ve enzimatik olarak LDH-X’in değişik formlarını açıklamışlardır ^{54,55}.

Olgun insan testisi (Blanco ve Zinkham,1963; Blanco ve ark. 1964) ve sperminde (Goldberg,1963;1964) altıncı izozimin bulunması, LDH’ın üçüncü bir polipeptit altbiriminin bulunduğunu göstermekte olup bu LDH-X olarak gösterilir. Zinkham ve ark. (1964) LDH-X’in olgun spermatozoada en baskın fraksiyon (LDH-C₄) ve memeli sperm hücrelerinde iso-, allo- ve otoantijen olan tek izozim olduğunu göstermişlerdir ⁵⁵. Sperme özgü LDH c geninin insanda 11. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunduğu bildirilmiştir ⁵⁶.

İnsanda, olgun testis ve sperimde altıncı izozimin gösterilmesinden sonra pek çok canlıda A ve B’den başka LDH kodlayan gen bulunduğu bildirilmiştir (Markert ve ark. 1975). Bu gen üçüncü LDH lokusu olarak karakterize edilmiş, memeli testisi ve bazı kuşlarda gözlenmiştir. Altbirim, (C) allelik genlerinin ürünü olup A ve B altbirimlerinin ürünlerinden farklıdır. Bu izozimin altbirimi LDH’ın A ve B altbirimleriyle in vivo koşullarda etkileşime (güvercin ve domuz hariç) girmez (Blanco ve ark., Miskert 1963). Fakat bu etkileşim in vitro şartlarda (Goldberg 1965) uygun olarak gerçekleşir. Daha

sonraki çalışmalarda Gavella ve Liporac insan sperm ve testisinde ek bir LDH formunun bulunduğunu, B ve C altbirim heteropolimerlerinden oluştuğunu göstermişlerdir⁵⁵.

Testiste LDH-C sentezi cinsiyet olgunlaşması sırasında gerçekleşmekte ve LDH-C olgun spermatozoada en baskın LDH fraksiyonu olmaktadır (Zinkham ve ark. 1964). Bu izozimin katalitik özellikleri olgun sperm hücrelerine ek olarak spermatogenezin metabolik ihtiyaçları ışığında da araştırılmıştır. Saflaştırılan proteinin yapısal çalışmalarında gösterilmiştir ki LDH-C₄ farklı bir gen ürünü olup LDH izozimlerine geniş homoloji gösterir. İnsan ve tavşanlarda yapılan biyokimyasal çalışmalar LDH-C₄'ün diğer izozimlerden farklı özellikleri olduğunu açıklamıştır^{55,57}.

2.6.1. Ontogen ve Testiste Yerleşim

Çalışılan her memelide LDH-C₄'ün sadece testis ve spermatozoada bulunduğu diğer erkek yada kadın dokularında olmadığı bildirilmiştir. Dizi analiz çalışmaları LDH-C₄'ün A₄ ve B₄ izozimlerinden farklı olduğunu açığa çıkarmıştır (Li ve ark.1983a; Whitt, 1984). Bu üç gen aynı oranda evrimleşmiş olsaydı, LDH c geninin A ve B genlerinin elde edildiği ortak atadan geldiği düşünülecekti. Fakat fare ve sıçanda -C₄ izozim dizileri beklenilenden değişik bulunmuştur. Bu durum -C₄ izoziminin -A₄ ve -B₄ izozimlerinden daha hızlı evrimleştiği görüşünü öne çıkarmaktadır (Whitt, 1984). Böylece Ldh c geni, Ldh-a yada Ldh-b geninden sonra gelişmiş olup yapı içerisinde değişmiş olabilir⁵⁵.

LDH-C₄ ve spermatogenez arasında bir bağ vardır; prepubertal erkekler bu enzime sahip değildir ve LDH-C₄ düzeyi testis olgunlaşmasıyla artar. Fare ve sıçanlarda hipofizektomi yapılmasından sonra LDH-C₄ kaybı ve seminiferöz epitelinde gerileme kaydedilmiştir (Goldberg ve Hawtrey 1968; Goldberg review,1977). Hintz ve Goldberg (1977) hücre düzeyinde, spermatogenezin ilk basamağı olan midpaçiten spermatositlerinde flöresan yoğunluğu ile LDH-C₄'ü tesbit etmişler ve spermatogenezin ilerlemesiyle düzeyin arttığını göstermişlerdir. Böylece Ldh c geni, spermatogenezde özel bir zamanda aktive olmaktadır. Bu olay bir gelişim programının kontrolü altında olmalıdır çünkü bu kompleks farklı bir diziye yönlendirilmektedir. İmmünoflöresan tekniği kullanarak -C₄'ün fare ve tavşanda sperm yüzeyinde bulunduğu gösterilmiştir (Erickson ve ark. 1975)²⁸. Tilki testisinde de LDH-C ilk

olarak paçiten spermatositlerinde ve sperm plasma membranına yerleşmiş durumdadır (Bradley ve ark.1996). Li ve ark. (1989) LDH-C₄'ün germ hücrelerinde dağılımını yeniden çalışmışlardır. Bu izozim, paçiten spermatositleri, yuvarlak spermatidler ve kondanse spermatidlerde baskın durumda olup olgun spermatozoa sadece LDH-C izozimi içermektedir. Somatik hücrelerdeki LDH'lar B altbirim içermekte olup bu altbirim germ hücrelerinde spermatogenez boyunca bulunmaktadır. Sertoli hücreleri, A ve B altbirimlerinin birleşimi sonucu oluşan bütün izozimler için pozitif durumdadır. Burgos ve ark. (1995) ise LDH-C₄'ün spermatosit sitozölü, spermatid, spermatozoa ve sperm mitokondria matriksinde yerleşimi konusunda çalışmalar yapmışlardır. Spermatozoada bulunan total LDH-C₄'ün %10 oranında LDH sperm yüzeyinde, %85 ve %10 kadarı da sırasıyla sitozöl ve mitokondride dağılmış durumda olduğunu göstermişlerdir (Alvarej ve Storey, 1984)⁵⁵.

2.6.2. LDH-C₄'ün Kinetiği

LDH-C₄, kinetik özellikleri ve substrat özgünlüğü ile -A₄ ve -B₄ izozimlerinden farklıdır. Çeşitli yazarlar tarafından testiküler izozimin değişik katalitik özellikleri açıklanmıştır (Battelino ve ark.1968; Hawtrey ve Goldberg, 1970). Fare LDH-C₄ yüksek derecede termostabiliteye sahip olup LDH-A₄ ve LDH-B₄ ile karşılaştırıldığında farklı substrat ihtiyaçları vardır (Hawtrey ve Goldberg, 1970; Wheat ve Goldberg, 1975; Coronal ve ark. 1983; Gupta ve Goldberg, 1981)⁵⁵.

2.6.3. Substratlar (Metabolik Önemi)

Bütün LDH izozimleri pirüvat ve laktat dönüşümünü katalizler fakat bu olay değişik kinetik özelliklerle gerçekleşir (Battelino ve ark. 1968; Coronal ve ark. 1983; Gupta ve ark. 1988). Etkileşimde zorunlu bir dizilim vardır; önce koenzim bağlanır sonra substrat. Balıkta allelik izozimler (B altbirimler) kinetik özellikleri yönünden değişmekte ve balığın farklı ortamlara adapte olması yönünden önemli olmaktadır. Sığır ve domuz kalbi LDH'ında pirüvatın ketoformu substrat olarak kullanılır. LDH tarafından kullanılan diğer substratlar çeşitli α -hidroksi ve α -ketoasitler olup α -hidroksi-bütirat ve α -ketobütirat içerir (Schatz ve Segal 1969). α -hidroksi-bütirat ve α -ketobütirat, pirüvat ve laktat ile karşılaştırıldığında düşük V_{maks} değerine sahiptir. Goldberg (1977) LDH-C₄'ün substrat özgünlüğü ve kinetik parametrelerini diğer LDH

izozimleri ile karşılaştırmıştır. LDH-C₄ özellikle α -ketoasitler için geniş bir substrat ve koenzim özgünlüğüne sahiptir. LDH-C'nin Km ölçümleri laktat için yüksek duyarlılığa sahip olduğunu göstermiştir (Gupta ve ark.,1988). Substrat transformasyonu için turnover sayısı somatik LDH'larda çok daha düşüktür. Mita ve Hall sıçan testisinde yuvarlak spermatidlerin, laktatı enerji kaynağı olarak kullandığını göstermişlerdir. Glioksilat LDH için substrat olarak kullanılabilir. Glioksilat, glikolik asite redüklenebileceği gibi okzalata okside olabilir (Warren,1970). Reaksiyon karışımında katalitik düzeylerde koenzim bulunduğunda LDH, kanizaro (canizarro) reaksiyonunu katalizler; glioksilatın %50'si redükte, %50'si okside olur. LDH-C₄ testiste LDH-A ve LDH-B'nin yerine geçmesi spermin özel adaptif metabolizması olduğunu gösterir. Spermatozoa LDH-C₄ 'ü testiküler germ hücrelerinde bulunur ve laktatı ana enerji kaynağı olarak kullanır. Laktat rete testis sıvısında, oviduktal sıvıda ve seminal plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Sertoli hücreleri spermatide laktat sağlar (Mita ve Hall, 1982). Plazmadan diğer substratların difüzyonu germ hücre metabolizmasının desteklenmesi için uygun değildir. Yukarıda ifade edildiği gibi LDH-C₄ sperme özgü bir enzim olup spermin plazma membranına yerleşmiştir ve diğer somatik LDH izozimleriyle karşılaştırıldığında farklı bir dağılım sergiler. Sperm LDH-C₄ 'ün sperm motilitesi için gerekli enerjiyi üretmek üzere seminal plazmadan laktatı kullandığı öne sürülmektedir. Fakat Yoshida ve ark. (1989) farklı olarak saflaştırılmış LDH-C₄'ün pirüvat ve α -ketoglutarata olan duyarlılığının laktattan daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Substrat konsantrasyonunun artmasıyla (özellikle laktat) insanda LDH-C₄'ün güçlü bir şekilde inhibe olduğu bildirilmiştir. LDH-C₄ sıçan spermatogenik epitelinde lösini metabolizmasında önemli rol oynuyor gibi görünmektedir (Grootegoed ve ark. 1985). Sertoli hücreleri lösini, metil-2 oksovalerata ve spermatozoid ile spermatidler de 2-hidroksi-4-metil valerata dönüştürmektedir. Bu dönüşüm spermatojenik hücrelerin sitozolünde LDH-C₄ ile katalizlenmektedir⁵⁵.

E coli'de insan c-DNA ile üretilen Ldh-C, 35 kDa'luk altbirimden oluşmuş ve enzimatik olarak aktif 140-kDa'luk tetramer açığa çıkmıştır. Hücre kültürlerinden saflaştırılan LDH-C₄ ısıya dayanıklıdır, 0.3 mM'ın üzerindeki pirüvat ile inhibe olur ve bu izozim Km'i pirüvat için 0.003 mM ve turnover sayısı 14000'dir (nmol NADH okside/mol LDH/dakika) (Levan ve Goldberg 1991)⁵⁵.

2.6.4. İnhibitörler

LDH'nin en etkili inhibitörü pirüvat ve NAD^+ 'nin redükte durumda eklenmesidir. Redükte pirüvat (Acpy) ve NAD^+ eklenmesi, NAD^+ -pirüvat ilavesinden daha iyi bir inhibitördür. Oksamat, pirüvat substrat olarak kullanıldığında LDH izozimlerinin yarışmalı inhibitörüdür. N-izopropil oksamat LDH-C₄'ün yarışmalı inhibitörüdür. Oksamat yapısındaki izopropil zincir LDH-C₄ için yüksek affinite gösterir, diğer izozimler için affinitesi düşüktür⁵⁵.

Bütün LDH izozimleri sülfidril ajanlarla inhibe olmakta ve bu etki sistein 165 (Sis165) üzerinden gerçekleşmektedir (Holbrook ve ark. 1975). Bu amino asit "esansiyel tiyol" olarak adlandırılmakla beraber katalize katılmaz. Aktif bölgeye modifiye ajan eklenmesi, koenzim bağlanması ve katalizi engeller, inhibisyon gerçekleşir. Bu amino asit çevresindeki dizi araştırılmış ve çeşitli LDH izozimlerinden dodekapeptit olarak izole edilmiş olup çok iyi korunmuştur (Taylor ve Oxley, 1976). Bu peptit özellikle ilgi çekmektedir; çünkü farede LDH-C, civa içeren ajanlarla kısmen inhibe olmaktadır. Bunun Sis165 delesyonu ya da bu amino asit çevresinde modifikasyon ile gerçekleştiği öne sürülmektedir (Goldberg 1972). LDH-C₄ diğer somatik LDH'larla karşılaştırıldığında sülfidril ajanların kataliziyle gerçekleşen inhibisyona daha az duyarlıdır⁵⁵.

Gossipol, pamuk bitkisinden elde edilen bir polifenolik pigment olup LDH-C₄'ün güçlü bir inhibitörüdür. NAD-laktat reaksiyonuyla ilgili olarak gossipol yarışmalı bir inhibitördür. Fakat NADH-pirüvat sisteminde gossipol yarışmalı olmayan bir inhibitör olarak görev alır (Gupta ve ark.). LDH izozimleri arasında LDH-C₄ gossipole en hassas olanıdır ve erkeklerde fertilitate regülasyonunda duyarlı bir hedef olarak yer alır⁵⁵.

2.6.5. Moleküler Özellikleri

LDH-C tipi LDH altbirimleri bütün vertebralılarda 35 kDa ağırlığa sahiptir; fakat her canlıda her altbirimde amino asit kompozisyonu değişmektedir. İstisna durumlar, bazı canlılarda 70 kDa'luk dimerlerden oluşan LDH'lar görülürken bazı canlılarda da tetramerler saptanmıştır (Goldberg 1977). Pan ve ark. fare ve sıçan dokularında LDH-C'de 330 amino asitlik dizilimini çalışmışlar, LDH-A ve LDH-B ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak A, B,C altbirim dizilerinde büyük bir varyasyon gösterilmiştir. Li ve ark. (1983b) değişik canlı ve dokulardan elde edilen fare ve sıçan

testisini de içeren yedi LDH izozimini, amino asit dizilim varyasyonu ve tüm dehidrogenaz polipeptit zincir ve domain'leri yönünden karşılaştırmışlardır. Koenzim bağlama domain'inin substrat bağlama domain'inden daha fazla korunmuş olduğunu bulmuşlardır; testiküler LDH-C₄ izoziminin ise loop ve D heliks bölgesinin diziliminin somatik LDH-A₄ ve LDH-B₄ izozimlerinden çok farklı olduğu, NH₂-terminal kolunun tamamıyla değişken olduğunu saptanmışlardır. LDH-C izoziminin amino terminalinde yirmi amino asit büyük değişkenlik gösterir. Bu amino asitlerin birincil görevi diğer altbirimlerin karboksi terminal bölgesiyle etkileşime girerek tetramerik LDH'in kuarterner yapısının stabilizasyonunu sağlamaktır (Adams ve ark., 1973). Vertebralılarda filogenetik ağaca göre incelenen yedi LDH yapısından LDH-A₄ ve LDH-B₄ izozimlerinin birbirlerine benzerliği C₄'lerden daha fazladır⁵⁵.



Şekil 20. LDH molekülünün yapısı⁵⁸

2.6.6. LDH-C₄ İle İmmünizasyona Bağlı Olarak İnfertilite

Kemirgenler, tavşan ve habesmaymununda yapılan çalışmada, saflaştırılmış heterolog LDH-C₄ ile hayvanların immünizasyonu sonucunda fertilitede azalma olduğu fakat tamamen infertilite gerçekleşmediği bildirilmiştir (Godberg, 1973; Lerum ve Goldberg 1974; Goldberg 1975; Goldberg ve ark. 1981; Gupta ve ark. 1994). LDH-C₄'e karşı geliştirilen antikolar fertilitayı iki ya da daha fazla yolla baskılamaktadır. IgG ile enzim aktivitesinin baskılanması, sperm enerjisi metabolizmasına zarar vererek sperm fonksiyonlarını yok edebilmektedir. LDH-C₄ yüzeyinde, antikor bağlama bölgeleri sperm aglütinasyonuna yardım edebilmektedir (komplement yardımcı

sitotoksiste gibi) (Goldberg ve ark. 1981). Kadın üreme kanalına anti LDH-C₄ serum transfer edildiğinde sperm transportunun önemli düzeyde inhibe edildiği (Kille ve Goldberg, 1979) bildirilmiştir. Her iki cinsiyetin de immünizasyonundan sonra çiftleşme gerçekleştirilmesi belirgin sinerjistik (synergistic) etki oluşturmamıştır. Gupta ve Kinsky, dişi farenin LDH-C₄ ile sistemik immünizasyonundan sonra izogenik gebelik oranının etkilenmediğini göstermişlerdir. İmmunize edilmiş kemirgenlerde önemli sayıda canlı embriyo elde edilmiştir. LDH-C₄'ün dişi fertilité oranı üzerinde bir etkisi varsa bu etki heterelog bir antijenle hayvanda immünizasyon gerçekleştirildikten sonra gözlenmelidir. İmmünize erkeklerin dişi fareyi fertilité yeteneğinin kaybolduğu saptanmış bunun da testiküler enfeksiyon ya da oto immün –benzeri aktiviteye bağlı olabileceği açıklanmıştır⁵⁵.

İmmünize erkeklerde spermosit interaksiyonun nasıl interferans verdiği tam açıklık kazanmamıştır, spermin ovidukta taşınmasında etki gözlenmemiştir. İmmünizasyondan sonra epididimide sperm aglütinasyonu gözlenmiş olması spermin antikorlarla etkileşimi sonucunda aglütine olduğu ve böylece fertilizasyonun engellenmiş olabileceği bildirilmiştir (Gupta ve Malhotra, 1994). Burada LDH-C₄'ün dişilerde aşılama için antijen olarak kullanımından önce, erkeklerde güvenilirliğinin ortaya konulmuş olmasının gerektiği tavsiye edilmektedir⁵⁵.

2.6.7. Testis Hasarı ve İnfertilitede Bir “Marker” Olarak LDH-C₄

Spermatogenezdeki patolojik bozukluklar, LDH-C₄' de de bozukluklara neden olmaktadır. Bu izozim, azospermi ya da aspermi durumundaki infertil erkeklerin seminal plazma ya da testiküler biyopsilerinde saptanmamıştır. Virji ve Eliasson (1985) “LDH-C₄ / sperm” oranının, seminiferöz epitel etkinliğiyle ilgili olduğunu açıklamıştır⁵⁵.

Gavelle ve Cvitkovi (1985) ile Velasco ve ark. (1993) seminal sıvıda LDH-C₄'ü erkek için infertilite indeksi olduğunu açıklamışlardır. LDH-C₄ ayırımı; oligospermik ve normospermik gruplar ile fertil ve fertilité ispatlanmış gruplarda iyi tanımlanmış durumdadır. LDH-C₄'ün germinal aktivite ve spermatozoid kalitesinin değerlendirilmesinde klinikte önemli bir marker olduğu sonucu vurgulanmıştır⁵⁵.

2.7. Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Koruma

İnfertilite her altı çiftten birinde görülmekte ve en yaygın sebep olarak sperm fonksiyonundaki bozukluklar gösterilmektedir (Hull ve ark. 1985). İnsanda semen kalitesinin yılda % 3 azaldığı ve erkek reproduktif problemlerinin arttığı (Auger ve ark. 1995) bildirilmiştir. Bu nedenle erkek infertilitesinin sebepleri, sperm hücre yapısı ve biyokimyasındaki defektler ile fertilizasyon potansiyelinin nasıl etkilendiği araştırılan konular arasındadır⁵⁹.

2.7.1. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Oksijen ve oksijen kaynaklı oksidanlar genel olarak reaktif oksijen türleri (ROT) olarak bilinip bunların oluşturduğu hücrel hasardaki artış “oksidatif stres” olarak ifade edilmektedir^{60,61,62}.

ROT son derece reaktif, okside edici ajanlar olup serbest radikal sınıfına aittir. Serbest radikal (oksijen kaynaklı olmayabilir) bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron içeren bileşiktir. En yaygın ROT; süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksil radikali (ROO^-) ve çok reaktif hidroksil (OH^-) radikalidir. Azot kaynaklı bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) üreme ve fertilizasyonda önemli rol oynamaktadır^{60,61}.

Serbest radikaller erkek fertilitesi üzerinde önemli role sahiptir. Oksidatif strese bağlı olarak spermde fonksiyon kaybının ROT'nin fazla üretimiyle ilgili olduğu gösterilmiştir. Başka bir açıklamaya göre, düşük düzeydeki ROT bazı sperm fonksiyonlarının fizyolojik kontrolünden sorumludur. H_2O_2 sperm üzerinde hem faydalı hem de zararlı etki oluşturarak fertilizasyon olayını etkilemektedir^{60,61}.

2.7.2. Oksidatif Stres ve Lökositler

Semende lökositlerin (en fazla granülositler) bulunması ciddi erkek faktörü kaynaklı infertilite olguları ile ilgili bulunmuştur. Semendeki lökositlerin esas kaynağı, etki mekanizması, bakteri, virüs ve genitoüriner-inflamasyonların sperm fonksiyonundaki rolü tam açıklık kazanmamıştır. Semende lökosit bulunması spermatozoanın in vitro fertilizasyon kapasitesini azaltmadığı fakat yıkanmış sperm örneklerinde lökositlerin ROT üretimine neden olarak sperm fonksiyonunu azalttığı açıklanmıştır. Üremeye yardımcı tedavi tekniklerinde kullanılan sperm hazırlama

yöntemlerinin (percoll gradient/sperm yıkama/sentrifügasyon) seminal plazmanın koruyucu etkisini ortadan kaldırdığı ya da spermatozoa tarafından ROT üretiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir ⁶⁰.

Lökositospermi ve ROT arasındaki ilgi, semende artan kemokin (IL-8) ve azalan SOD aktivitesiyle ilgili bulunmuştur. Defektif ROT sisteminin, lökositospermi ile beraber oksidatif strese artışa neden olmasını belirli proinflamatuvar sitokinlerin yönlendirmiş olabileceği öne sürülmüştür ⁶⁰.

2.7.3. Oksidatif Stres ve Sperm Fonksiyonu

Aitken ile Clarkson (1987) ve Alvarez (1987) insanda spermatozoanın ROT oluşturabileceğini ve sperm fonksiyonları zarara uğradığında bu etkinin daha da artacağını bildirmişlerdir. Spermatozoa plazma membranında, yüksek konsantrasyonda poliunsatüre yağ asitleri bulunması nedeniyle daha fazla oksidatif strese maruz kalmakta ve hücre membranında oluşan peroksidatif hasar membranın daha geçirgen olmasına neden olmaktadır ⁵⁹.

Spermatozoada oluşturulan ROT indüksiyonlu hasarın mekanizmaları, sperm plazma membran lipitleri üzerinde oksidatif etki oluşturarak lipit peroksidasyon kaskatının başlamasına neden olur. Bunun sonucunda spermatozoa hareket, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyon yeteneğini kaybeder (Jones 1979, Aitken 1993). Oolemma ile membran füzyon olayları ve akrozom reaksiyonu ROT-indüksiyonlu hasara motiliteden daha elverişli durumdadır (Aitken 1989). Ayrıca ROT sperm aksonimi, DNA, RNA ve protein sentezini (de Lamirande ve Gagnon, 1992), mitokondrial fonksiyonu etkiler ⁵⁹.

2.7.4. Lipit Peroksidasyonu

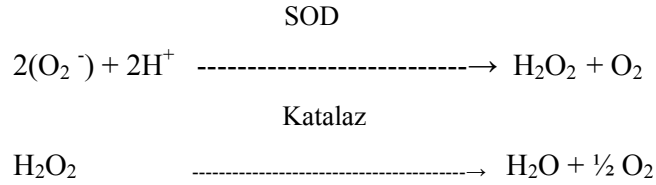
İnsan spermatozoası, ekzojen H₂O₂ varlığında oluşan lipit peroksidasyon ürünü nedeniyle hareket kaybına maruz kalmaktadır. Sperm plazma membranında bulunan unsatüre yağ asitleri yapıya akışkanlık kazandırıp fertilizasyonla ilgili olarak, membran füzyon olaylarında etkili olmaktadır. Bu moleküllerde çift bağ bulunması onları serbest radikal etkilerine maruz bırakıp lipit peroksidasyon kaskatının başlamasına neden olmaktadır. İnsan spermatozoasında lipit peroksidasyonu (Aitken, 1992) başladığında sperm plazma membranında lipit peroksidatlarının birikmesine neden olmaktadır. Lipit

peroksitleri membran akışkanlığını değiştirerek membran bağımlı anahtar enzimlerin (örneğin $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+}$ -ATPaz; bu hücrelerde kalsiyum homoestazının korunmasında önemli) aktivitesini negatif yönde etkilemektedir ^{59,62}.

2.7.5. Antioksidan Korumalar

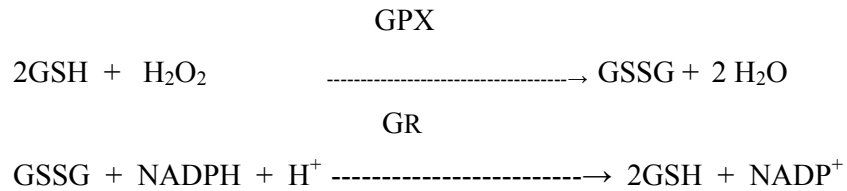
Semende oluşan hücresel hasar, ROT oluşumu ve antioksidan koruma arasındaki dengenin sağlanamamasından kaynaklanmaktadır. Gonadlar ve seminal sıvıda antioksidan koruma süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz ve redüktaz sistemi ile sağlanmaktadır. Bu denge oksidatif stres düzeyi (OSD) olarak tanımlanıp sperm hasarı ve infertilitede önemli rol oynayabilmektedir ⁶⁰.

SOD, süperoksit anyonunu (O_2^-) O_2 ve H_2O_2 'e ve katalaz da H_2O_2 'i H_2O ve O_2 'e dönüştürür ⁶⁰.



SOD ve katalaz, nötrofillerde NADPH-oksidaz sonucu oluşan süperoksit anyonunu (O_2^-) temizler, lipit peroksidasyonunun azaltılmasında ve spermatozoanın genitoüriner enfeksiyona karşı korunmasında önemli rol oynar ⁶⁰.

Glutatyon peroksidaz (GPX) Selenyum içeren bir antioksidan enzim olup çeşitli peroksitlerdeki (H_2O_2) peroksil radikalinin elimine edilmesini sağlar. Glutatyon (GSH) elektron vericisi olarak davranır, okside glutatyon (GSSG) oluşur. GSSG, glutatyon redüktaz (GR) ile NADPH varlığında redükte edilir. GSH disülfid yapıda olan GSSG ile bir denge oluşturur ⁶⁰.



Irvine D.S, antioksidan enzimlerin ejaküle edilmiş insan spermatozoasının korunmasına katılıp katılmadığının çelişki halinde olduğunu bildirmiştir. Çünkü bu enzimler sperm orta parçasında sitoplazmaya yerleşmiş durumdadır. Bu durumda sperm için önemli olan baş ve kuyruk kısımlarının plazma membranını koruyamamaktadır. İnsan spermatozoasının göze çarpan bir özelliği sitoplazmik alanın eksikliği olup spermi oksidatif strese daha elverişli konuma getirip antioksidan savunma kapasitesini azaltmaktadır. Mitokondriyanın yüksek yoğunluğu nedeniyle oksijen radikalleri sitoplazmada (orta parçada) birikebilir; oysa spermatozoanın oksidanları temizleme yeteneği kısıtlıdır. Bu nedenle seminal sıvıda antioksidan kapasite bulunması zorunluluğu doğmuştur. Seminal plazma potansiyel bir antioksidan kaynağıdır ve SOD (Kobayashi ve ark.1991), ürik asit, alfa tokoferol, E vitamini (Jones ve ark. 1979, Zini ve ark.1993) içerir ⁵⁹.

Ejaküle olmuş spermatozoanın oksidatif strese maruz kaldığı bilinmekte olup intraselüler ve ekstraselüler mekanizmalar bu hücreleri spermiogenezden sonra, epididimal taşıma esnasında ve ejakülasyondan sonra hasara karşı korumaktadır. Oksidatif stres spermatogenez sırasında da oluşabilir ve erkek infertilitesinin patofizyolojisinde rol alabilir. Antioksidan enzimler katalaz, SOD, GPX ve glutatyon transferaz (GTR) ve heksoz monofosfat yolu sıçan testisinde bulunmakta olup testiküler gelişim sırasında bu enzimlerde önemli değişiklikler gözlenmiştir ⁵⁹.

2.7.6. Glutatyon

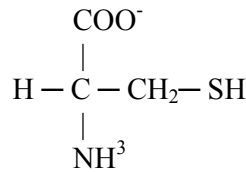
İnsanda bulunan önemli bir antioksidan, glutatyon tripeptidi olup oksidatif hasar ve toksinlere karşı korumada merkezi rol oynar; glutatyon peroksidaz ve glutatyon S-transferaz için ko-faktör olarak görev alır. Glutatyon ve glutatyon S-transferazın üremede önemli rol oynadığı bildirilmiştir fakat seminal sıvıda glutatyon ve glutatyon S-transferaz hakkındaki literatür bilgileri kısıtlı durumdadır ^{59,63}.

Redükte glutatyon (GSH) vücudun pek çok organ ve dokusunda bulunur ve yüksek antioksidan özelliğe sahiptir (Meister,1992). Glutatyon memeli hücrelerinde en yaygın olarak bulunan non-protein tiol bileşiğidir (Irvine 1996). GSH biyolojik olaylarda anahtar rol oynar; protein ve DNA sentezi, amino asitlerin taşınması gibi. Fakat glutatyonun en önemli rolü hücreleri oksidasyona karşı korumalarıdır; sülfidril

grubu (SH) güçlü bir nükleofil olup oksidanlar, elektrofiller ve serbest radikallere karşı korumada etkilidir (Levy ve ark. 1993). Sıçan ve fare testisinde yüksek konsantrasyonlarda glutatyon tesbit edilmiştir (Grosshans ve Calvin, 1985). Spermatogenez süresinde sıçan testisinde glutatyon konsantrasyonunda 3 kat artış saptanmıştır. Hamster'dan izole edilen spermatozoid ve spermatozoidleri, yüksek konsantrasyonda GSH içermekte, glutatyon sentezi yapabilmekte ve glutatyon-bağımlı savunma mekanizmalarını kullanabilmektedir (Den Boer ve ark.1989,1990). Testis, üreme kanal sıvıları ve epididimal spermatozoada belirli düzeylerde glutatyon bulunmasına rağmen ejaküle edilen spermatozoada daha az düzeyde bulunmaktadır (Agrawi ve Vahna-Perttula, 1988). Glutatyon kullanımının erkek infertilitesini iyileştirmesi nedeniyle glutatyon düzeyini yükselten bileşikler erkek infertilite tedavisinde kullanılmaktadır⁶⁵.

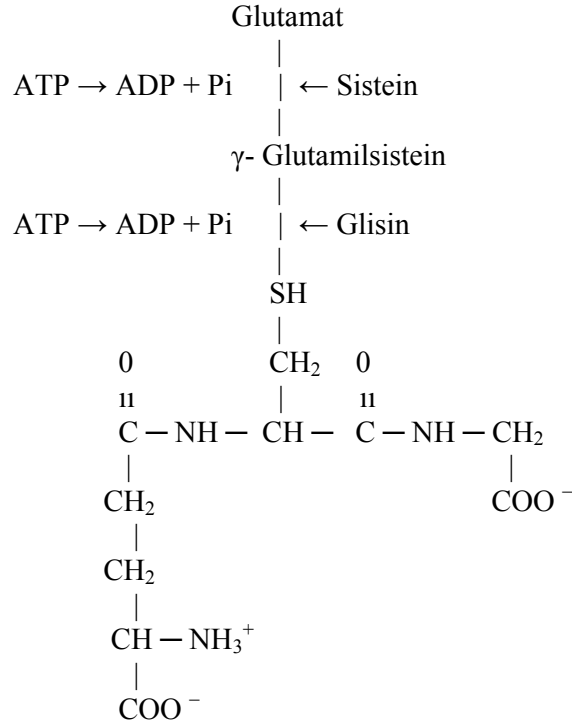
Sistein glutatyon sentezinin öncü maddesidir. Glutatyon, insan dokularında bulunan üç amino asit (sistein, glisin ve glutamik asit) zincirinden oluşan bir tripeptittir⁶³.

Sistein (serbest bir amino asit) potansiyel olarak toksiktir, gastrointestinal kanal ve kan plazmasında spontan olarak katabolize olur ya da yıkıma uğrar⁶³.



Şekil 21. Sistein⁶³

Glutatyon sentezinde ilk reaksiyon, hız belirleyici bir basamaktır ve glutatyon geri dönüşümüyle inhibe olur. Bunun anlamı, yeterince glutatyon sentezlendiğinde reaksiyon kendi son ürünü ile inhibe olur. İkinci reaksiyonda glutatyon ile böyle bir inhibisyon yoktur⁶³.



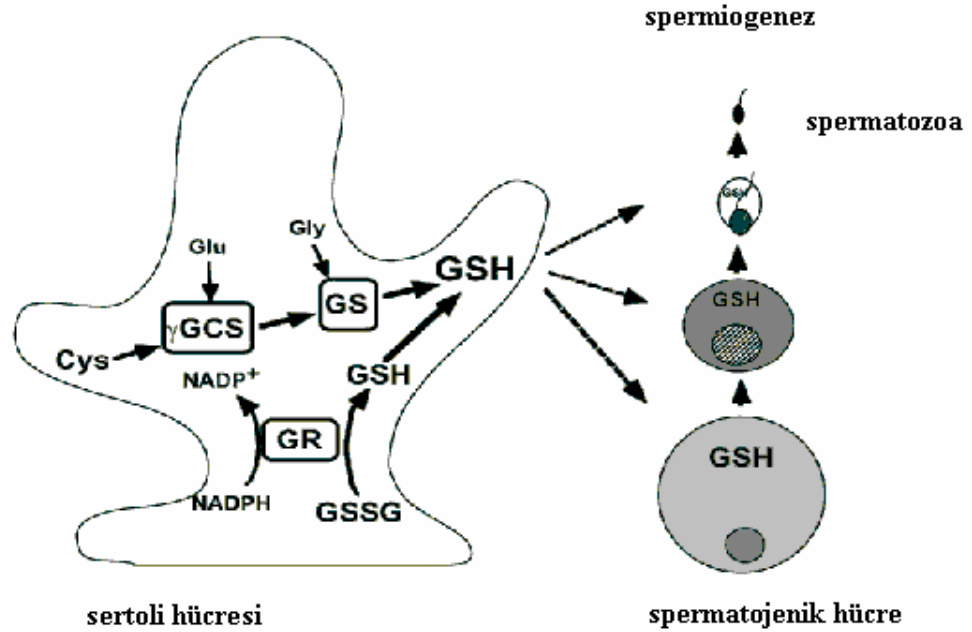
Şekil 22. Glutasyon sentezi ⁶³

Glutasyon, nötralizasyon ya da zararlı oksiradikallerin yok edilmesi için kullanıldığında bu geri dönüşümlü kontrol kaybedilir ⁶³.

L- sisteinin bir öncü olarak kullanılabilir olması, hücrede ne kadar glutasyon sentezlendiğini belirler. Kullanılabilecek durumda olan sistein, glutasyon üretimi için hız belirleyici faktör olmaktadır ⁶³.

Sistein düzeyi düştüğünde, vücut metiyonini sisteine dönüştürür. Makrofajlar (immün “scavenger” hücreler) ve Astrositler (nöron aktivitesini düzenleyen bir grup beyin hücresi) glutasyon üretimi için sistini tercih eder. Fakat lenfosit ve nöronlar sisteini tercih eder ⁶³.

Spermatojenik hücrelerde Sistein, glutasyondan ziyade protamin sentezinde kullanılır. Bu da özellikle spermiogenez için önemlidir ve GR’ın katılımı azdır. Spermatozanın glutasyon içeriğinin çok az olması nedeniyle Sertoli hücrelerinden GSH temini spermatojenik hücreler için hem ROT’dan koruma hem de spermatogeneze amino asit kaynağı olarak gereklidir (Şekil 23) ⁶⁴.



Şekil 23. Sertoli hücreleri de novo sentez ve glutatyon döngü sistemine sahip olup spermatojenik hücelere GSH temin eder. Sertoli hücreleri GSH sentezi için de novo yoluna ve GSSG döngü sistemine sahiptir. Spermatojenik hücelere daha az potansiyele sahiptir. Sertoli hücrelerinin yardımcı bir diğer fonksiyonu spermatojenik hücelere GSH temin etmektir⁶⁴.

Sertoli hücreleri direk bir etkileşim ile glutatyon sağlıyor görünmektedir. Glutatyonun Sertoli hücrelerinden sistein sağlamadaki önemli rolü GGT'den yoksun fare ile yapılan bir çalışmayla desteklenmiştir. GGT-knockout farede testis ve seminal kese hacmi azalmıştır, ciddi oligozoospermik ve infertildir. Glutatyon ya da N-asetilsistein (sisteinin membran geçirgen öncü maddesi) takviyesi, testis ve seminal kese hacmini normale dönüştürür ve mutant fare fertil olur. Bu bulguya göre GGT, hücre yüzeyinde glutatyonu, amino asitlere metabolize etmektedir. Açığa çıkan sistein spermatojenik hücelere tarafından alınıp protamin biyosentezinde kullanılmaktadır^{64,65}.

2.7.7. Fosfolipit Hidroperoksit Glutatyon Peroksidaz

Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PHGPx;GPx-4, E.C.1.11.1.12), selenosistein içeren, 7 memeli glutatyon peroksidazdan biridir⁶⁶. GPx4 geni 19p13.3 bölgesinde yerleşmiştir. Bu enzim 197 amino asitten oluşmuştur, aktif merkez 73. amino asit olan selenosisteindir⁶⁷.

PHGPx biomembranları oksidatif strese karşı korumada önemli bir enzimdir. Diğer glutatyon peroksidazların aksine PHGPx hücrel membranlardaki kolesterol ve fosfolipid hidroperoksitlerini doğrudan alkol türevlerine çevirir. Böylece hücreleri, lipit peroksidasyonunun zararlı etkilerine karşı koruma görevini gerçekleştirir⁶⁸.

PHGPx'in testiste gonadotropin bağımlı yüksek düzeyde ekspresyonu farklı bir rolü olduğuna dikkat çekmektedir. gpx-4 (PHGPx'i kodlayan gen) testiküler dokuda üç farklı formda eksprese edilmektedir. Alternatif başlama kodonlarının kullanılmasıyla enzim sitozol, mitokondri ya da nukleusa yönlendirilebilmektedir. İn situ hibridizasyon yöntemi ile gpx-4'ün en yaygın olarak geç spermatojenik hücrelerde eksprese edildiği açığa çıkarılmıştır. Testiste PHGPx aktivitesi genellikle spermatidlerle ilgili bulunmuştur. Fakat olgun spermatozoada PHGPx aktivitesini tesbit etmek zor olmuştur⁶⁶.

gpx-4 geninin ürünü olan PHGPx spermde bulunan majör selenoprotein olup fertilizasyon için önemlidir. Çünkü spermatogenezde hidroperoksit detoksifikasyonu, mitokondrial kapsül oluşumu ve kromatin kondenzasyonu gibi pek çok olaya katılır. Buna bağlı olarak PHGPx'i kodlayan GPx4 geninde meydana gelen mutasyonların infertiliteye neden olacağı düşünülmektedir⁶⁶.

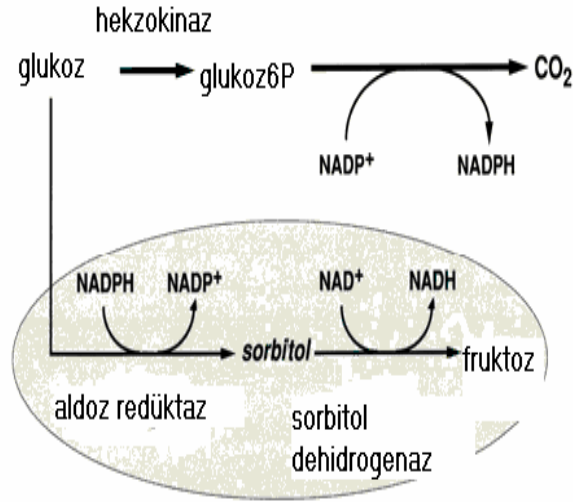
PHGPx, spermatojenik hücre ve spermatozoanın majör selenoproteini olup ciddi selenyum eksikliğinde yeterince oluşamamaktadır. Bu durumda fertilizasyon kapasitesi kaybedilmekte, motilite zayıflamakta ve orta parça ile baş ve kuyrukta morfolojik değişimler tesbit edilmektedir. Yapılan çalışmalarda insan sperminin PHGPx'i PHGPx aktivitesi olarak ölçülmüş ve sperm sayısı, motilite ve yapısal bütünlük arasında pozitif korelasyon bulunmuştur⁶⁹.

2.8. Seminal Sıvıda Fruktoz ve Glukoz

Semende fruktoz varlığı ilk defa 1946'da Mann tarafından gösterilmiştir. Seminal plazmadaki fruktoz, seminal keselerden elde edilmiştir, bu aksesuar cinsiyet bezinin sekresyon fonksiyonunun değerlendirilmesinde uygun bir marker olduğu düşünülmektedir. Fruktoz aynı zamanda semende spermatozoa için enerji kaynağı olup astenozoospermi gibi patolojik durumlarda önem kazanmaktadır^{70,71}.

Spermatozoa mitokondrileri ile fruktozu tamamen CO₂ ve H₂O'ya metabolize etmektedir. Bunu fruktoliz ve Trikarboksilikasit döngüsü aktiviteleri ile sağlamaktadır⁷². Seminal fruktoz nadir olarak deferent kanalların konjenital eksikliğinin teşhisinde ve ejakülatör kanal obstrüksiyonunda kullanılabilir (Ozgok ve ark. 2001)⁷¹.

Spermatozoanın ana enerji kaynağı olan fruktoz, seminal kese hücrelerinde glukozdan elde edilmektedir. Aldoz Redüktaz seminal keselerde bulunur ve fruktoz sentezine katılır. Glukoz, Aldoz Redüktaz enzimi katalizörlüğünde NADPH kullanılarak redükte edilir ve sorbitol oluşturulur. Sorbitol ise Sorbitol Dehidrogenaz enzimi ile NAD⁺ kullanarak oksidasyona uğrar ve fruktoz sentezlenir (Polyol yolu Şekil 24)⁷².



Şekil 24. Polyol yolu⁷³

Polyol yolu 1956'da Hers tarafından ilk defa seminal keselerde tanımlanmış, kan glukozunun fruktoza dönüştürüldüğü ve sperm hücreleri tarafından enerji kaynağı olarak kullanıldığı açıklanmıştır⁷³.

Fruktozun insan semeninde ortalama konsantrasyonu 2-3 mg/ml (11-16 µmol)'dur. Fruktoza ek olarak insan semeninde glukoz gibi diğer şekerler de bulunmaktadır; fakat glukoz konsantrasyonu, fruktoz konsantrasyonunun 1/50'si kadardır. Total fruktoz referans değeri WHO (1999) tarafından ejakülat başına 13 µmol olarak bildirilmiştir. Seminal fruktozdan farklı olarak seminal glukozun, semen kalitesinin değerlendirilmesinde bir parametre olarak kullanılmasının önemi detaylı olarak bilinmemektedir⁷¹.

Seminal plazmadaki düşük glukoz konsantrasyonuna rağmen glukoz, spermatozoanın şeker tüketiminin yarısını karşılamaktadır; seminal fruktoz tüketiminin ortalama düzeyi 12.4 µmol/ml ve glukoz için de 0.3 µmol/ml olarak bildirilmiştir (Martikainen ve ark. 1980). Glukoz kullanımındaki tercih heksokinaza duyulan affiniteye bağlı olabilmektedir. Heksokinaz, memeli spermatozoasında fruktolizi başlatır sadece fruktoz değil glukoz gibi diğer şekerleri de fosforlar (Mann ve Lutwak-Mann, 1981). Anaerobik fruktolizin metabolik son ürünleri pirüvat ve laktattır⁷¹.

Yapay kültür medyumunda sperm motilitesinin glukoz konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmiş, spermatozoanın maksimum motilitesi 11-17 µmol/ml konsantrasyonunda elde edilmiştir ve bu değer siklus ortasında servikal mukusdaki değere yakın bulunmuştur. Fruktoz konsantrasyonu, glukozdan 50 kat daha fazla bulunmasına rağmen seminal glukoz spermatozoa tarafından kullanılmaktadır (Martikainen ve ark. 1980). Normal semen örneklerinde (sperm konsantrasyonu > 50x10⁶/ml) glukoz konsantrasyonu, oligozoospermik semen örneğinden daha hızlı düşmekte, vazektomize ve azospermik erkeklerin semen örnekleri, normal kontrol semen örnekleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek ve stabil glukoz konsantrasyonu göstermektedir⁷¹.

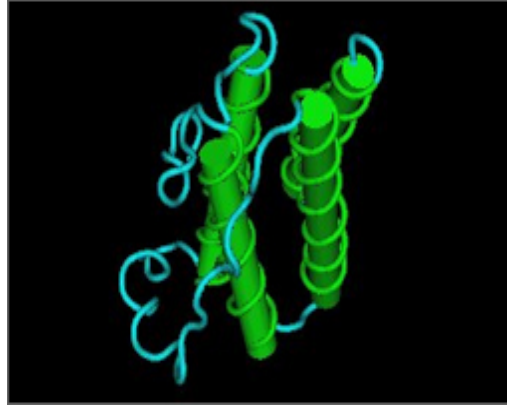
Glukozun insan spermünde optimal kapasitasyon ve fertilizasyon için gerekli olduğu bildirilmiş fakat glikoliz için ekstra metabolik enerji sağlayıp sağlamadığı açıklık kazanmamıştır⁷¹.

Spermatozoa, servikal kanalda fertilizasyondan günler öncesinde beklemekte ve maksimal glukoz oksidasyon oranına, siklus ortasında servikal mukusta normal düzeyde bulunan glukoz konsantrasyonunda ulaşmaktadır. Glukoz, dişi genital kanalında spermatozoa için enerji kaynağı olup servikal mukusun glukoz içeriğinde siklik değişiklikler görülüp infertiliteye neden olmaktadır (van der Linden ve ark. 1992) ⁷¹.

Semende glukoz konsantrasyonu düşük olmasına rağmen spermatozoa tarafından enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Değişik şeker bileşiklerinin semen ya da servikal kanalda insan spermatozoasının enerji ihtiyacını karşılamadaki fonksiyonu tam olarak açıklanmamıştır. Fertilitenin düşük olduğu hastalarda glukoz konsantrasyonunun da düşük olduğu düşünülmektedir. Ayrıca normal semene glukoz eklenmesinin de bir avantajı tesbit edilmemiştir ⁷¹.

2.9. Leptin

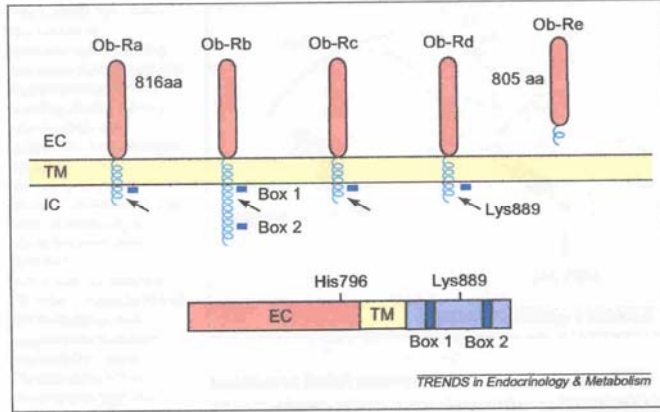
Leptin, 16 kDa'luk, ob geninin ürünü (Zhang ve ark1994) bir protein olup hormon/sitokin özelliğine sahiptir (Campfield ve ark. 1996) (Şekil 25) ⁷⁴. Bu proteinin tersiyer yapısı sitokinlerden özellikle granülosit koloni-uyarıcı faktöre benzemektedir (Hiroike ve ark. 2000); dört alfa heliks, iki uzun ve bir kısa loop ile bağlanmıştır (Zhang ve ark. 1997)⁷⁵. Leptin, yiyecek alımını azaltıp enerji tüketimini artırarak enerji dengesinin düzenlenmesine aktif olarak katılır (Bray ve York,1997)⁷⁴. Doygunluk faktörü olarak hipotalamik ve merkezi sinir sistemi üzerinde etkinlik gösterir. Leptin serum düzeyleri kişisel vücut kütle indeksi ile korelasyon göstermektedir (Saad ve ark. 1997)⁷⁴. Bunun yanı sıra leptinin pek çok görevi vardır; nöroendokrin sistemin düzenlenmesi, hematopoiez, anjiogenez, puberte ve üreme (Dallongevilleve ark. 1998, Cunningham ve ark. 1999, Quinton ve ark. 1999, Wauters ve ark. 2000) ^{74,75,76}.



Şekil 25. Leptin proteinin 3 boyutlu moleküler yapısı ⁷⁷

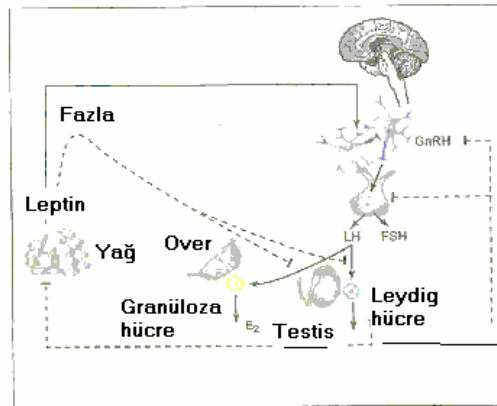
Leptin biyolojik etkinliğini, leptin reseptörleriyle etkileşime girerek gerçekleştirmektedir. Leptin reseptöründe mRNA'nın alternatif splicing'i, fare ve insanda çeşitli izoformlarla sonuçlanmaktadır (Tartaglia, 1997) (Şekil 26). Sinyal iletim yolu; leptin/leptin reseptör etkileşimi, janus kinaz/sinyal iletimi ve transkripsiyon (JAK/STAT) aktivatörü ve mitojen-aktive protein kinaz (MAPK) ile gerçekleşmektedir. Birçok türde yapılan çalışmalarda leptinin, hipotalamus-hipofiz-gonadal aksisi etkilediği belirtilmiştir. Leptin reseptör mRNA'sı da ön hipofiz ve hipotalamusta fazla miktarda bulunmaktadır. Leptinin, Gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH),

Liteinleştirici hormon (LH) ve Follikül uyarıcı hormon (FSH) sekresyonu üzerine etkisi çift yönlüdür. Hem stimülatör hem de inhibitör etki gösterir. Leptin reseptörleri endometrium, overler, leydig hücreleri ve meme bezi epitelinde mevcuttur ⁷⁸.



Şekil 26. Leptin reseptör izoformları ⁷⁸

Leptin, GnRH'ı uyararak üreme fonksiyonlarını etkilemektedir (Şekil 27). Serum leptin konsantrasyonları, gonadotropinlerden bağımsız olarak non-obstrüktif azospermik hastalarda normozoospermik erkeklerden daha yüksek bulunmuştur (Steinman ve ark. 2001). Buna bağlı olarak, serum leptin düzeyinin erkeklerde gonadal fonksiyonun düzenlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir ⁷⁸.

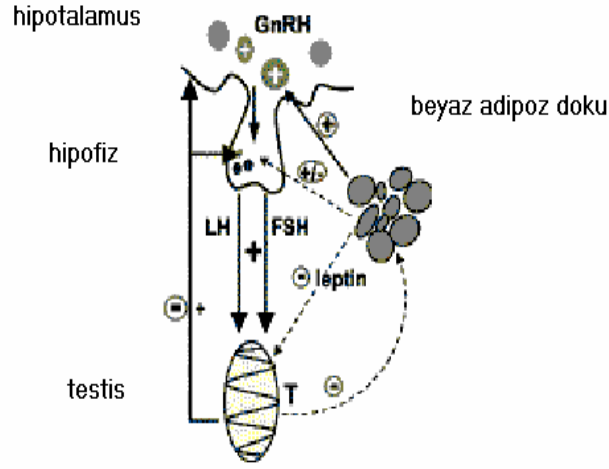


Şekil 27. Leptinin gonadal organlar üzerine etkisi ⁷⁸

Leptinin kan-testis bariyerini geçişinin bulunmasından sonra (Banks ve ark. 1999) periferal rolü daha çok ön plana çıkmış, tübülü seminiferi ve seminal plazmada bulunduğu gösterilmiştir (Camina ve ark. 2002, Glander ve ark. 2002). Bank ve ark. çalışmalarında kan kaynaklı leptinin beyin ve testise geçiş gösterdiğini fakat bu geçişin iki farklı işlemle gerçekleştiğini açıklamışlardır. Beyine geçiş doyurulabilir (saturable) taşıma sistemi ile sağlanırken testise geçiş sızma ile oluşmaktadır^{75,79}.

Leptin, periferal reseptörüyle etkileşime girerek kemirgenlerde Leydig hücrelerde ve sıçan testisinde testosteron salınımını baskılamaktadır (Caprio ve ark.1999, Tena-Sempere ve ark. 1999). Fare testisinde, germ hücrelerinin gelişimi sırasında değişik leptin reseptörlerinin her basamağa özgü ekspresyonu gözlenmiştir (El-Hefnawy ve ark. 2000). Seminiferöz tübüllerde leptin indüksiyonlu STAT3 fosforilasyonu, fare testisi interstitial hücrelerde STAT3 ve mitojen-aktivasyonlu protein (MAP) fosforilasyonu bu hücrelerdeki biyolojik etkinliği desteklemektedir (El-Hefnawy ve ark. 2000). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, leptinin insanda testiküler dokuda varlığı ve seminal plazmadaki leptin konsantrasyonu ile insan spermatozoasının motilitesi arasında negatif korelasyon bulunduğu gösterilmiştir (Glander ve Kratzsch, 2000; Glander ve ark. 2002). Bu çalışmalar leptinin gonadal fonksiyonunu iki şekilde desteklemektedir; merkezi nöroendokrin sistem üzerinden indirek olarak ya da periferal doku membran reseptörleri üzerinden direk olarak⁷⁵.

Leptin hipotalamik-hipofiz-testiküler aks üzerinde değişik düzeylerde etkinlik göstermektedir (Şekil 28). Hipotalamusdaki ilk etkinliği GnRH salınımının uyarılması olup leptinin fizyolojik düzeylerinde etkilidir. Hipofiz düzeyinde LH ve FSH salınımını düzenler; metabolik duruma bağlı olarak uyarıcı ya da inhibe edici etki gösterir. Testis üzerine direk etki ederek Testosteron salınımını inhibe eder, özellikle obesite durumunda leptin düzeyi yüksektir. Testiküler testosteron, beyaz adipoz dokuda leptin salınımını direk olarak inhibe eder⁸⁰.

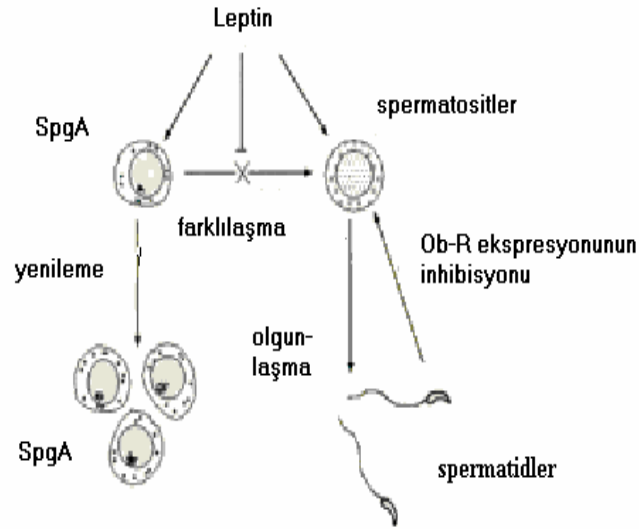


Şekil 28. Leptin hipotalamik-hipofiz-testiküler aks⁸⁰

Seminal plazmadaki leptinin kaynağı tam olarak açıklanmamıştır (Glander ve ark. 2002). Testiküler etkinliğe bağlı olarak kan-testis bariyerinin geçildiği (Banks ve ark.), tübülü seminiferide bulunduğu (Glander ve ark. 2002) gösterilmiş fakat kan ve seminal plazma leptin konsantrasyonları arasında bir korelasyon (Camina ve ark. 2002, Glander ve ark. 2002) gösterilmemiştir⁷⁵. Düşük spermatozoa kalitesine sahip olan semen örnekleri düşük miktarda leptin reseptörü ve leptin bağlama kapasitesine sahiptir. Yaşlanan sağlıklı erkeklerde artan serum leptin düzeyleri ve azalan testosteron düzeyleriyle negatif korelasyon gösterilmiş (Van Den Saffele ve ark. 1999) ve testosteron verilmesiyle bu artışın düşürüldüğü bildirilmiştir (Luukkaa ve ark. 1998)⁷⁴ Von Sobe ve ark. (2003) çalışmalarında, semende leptin düzeyleri ile serum leptin değerleri arasında pozitif; semen leptin düzeyi ve serum testosteron değerleri arasında ise negatif korelasyon gösterdiğini açıklamışlardır⁷⁴.

Hefneway TE ve ark. fare testisinde, leptin reseptörünün (Ob-R) dağılımını, gelişim ve farklılaşmanın değişik basamaklarında germ hücreleri ile olan korelasyonu açıklamışlardır. Ob-R izoform çeşitlerinin değişik yaş gruplarında varyasyonu saptamışlar, buna bağlı olarak da leptinin farklı hücre tiplerini uyarabileceğini vurgulamışlardır. Bu sonuçlara bağlı olarak; leptin tarafından STAT3 sinyal yolunun

uyarılması, bu hormonun (hematopoiez'deki rolüne benzer şekilde) spermatojenik hücrelerin farklılaşması ve yenilenmesi üzerinde etkili olduğunu göstermektedir (Şekil 29). Ob-R'ü yetişkin testisinde, seminiferöz epitel siklusunda spermatositlerin IX ve X. basamaklarında eksprese edilmektedir. Ob-/Ob- fare infertil olup spermatosit aşamasında testiste spermatogenetik sonlanma görülmektedir. Hefneway TE ve ark. leptinin direk rolünün STAT3'ün fosforilasyonu ile germ hücrelerinde proliferasyon ve farklılaşmayı sağlayarak gerçekleştiğini ve bunun da leptin eksikliği bulunan farelerde görülen infertiliteyi kısmen açıkladığını bildirmişlerdir ⁸¹.

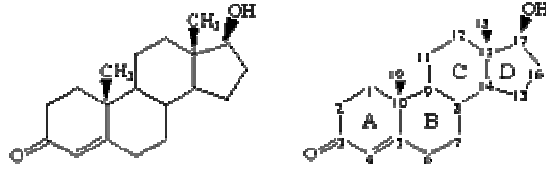


Şekil 29. Leptinin spermatojenik hücrelerin farklılaşması ve yenilenmesi üzerinde etkileri ⁸¹

2.10. Testosteron

Testosteron testislerde sentezlenip plazmaya salınan en önemli androjendir. Diğer bir androjenik steroid olan dihidrotestosteron (DHT), testosterondan sentezlenmekte olup erkekte total kan androjenlerinin sadece küçük bir kısmını oluşturmaktadır. Plazma testosteron düzeyi erkeklerde yaklaşık olarak 700 ng/dl, DHT 45 ng/dl'dir^{82,83}.

Erkeklerde kan testosteronunun % 95'i testislerde Leydig hücrelerinden sağlanmaktadır. Daha düşük düzeylerde adrenal korteks ve overde de testosteron sentezi gerçekleşmektedir. Testosteron, yapısında aktivitesi için önemli olarak 17-β-OH ve 3-keto grup içermektedir (Şekil 30)^{82,84}.



Şekil 30. Testosteron yapısı⁸²

Testosteron reseptörü 76.000 moleküler ağırlıkta Tip I protein olup sitoplazma ve nükleusda bulunmaktadır⁸².

2.10.1. Testosteron Sentezi

Kolesterol Leydig hücrelerinde asetattan sentezlemekte ya da kan ile testise taşınmaktadır. Kolesterol Leydig hücrelerinde, kolesterol yan zincir kırıcı enzim ile pregnenolona dönüştürülmektedir. 3-β-hidroksisteroid dehidrogenaz/izomeraz enzimi le pregnenolon; progesteron oluşturulmaktadır. 17-α- hidroksilaz enzimi ile 17-hidroksipregesteron açığa çıkarılıp 17,20 Liyaz enzimi ile androstendion oluşturulur. Son olarak 17-β-hidroksisteroiddehidrogenaz enzimi ile testosteron sentezlenmiş olur⁵¹. Testosteron sentez ve salınımı ön hipofizden, LH ile uyarılmaktadır. Testosteron feedback mekanizması ile hipotalamusta, Luteinleştirici Hormon Salıcı Hormon üzerine etki göstererek kendi sentezini inhibe eder^{85,86}.

Testosteron, kanda % 100 oranında proteinlere bağlı olarak taşınır:

- % 55'i seks hormon-bağlayıcı globuline (SHBG)
- % 40'ı albümine

- % 5'i kortizol-bağlayıcı globulin proteinlere bağlanarak taşınır. SHBG düzeyinde artış erkeklerde östrojen benzeri etkilerin fazlaşmasına neden olmaktadır ⁸⁴.

Testosteronun inaktivasyonu üç şekilde gerçekleşir:

- 17-OH grubun oksidasyonu
- A halkasının redüksiyonu
- 3-keto grubun redüksiyonu ile ⁸².

2.10.2. Testosteronun Etki Mekanizmaları

Testostereon direk olarak ya da metabolitler üzerinden etki gösterir. Testosteron hedef dokularda biyolojik olarak daha aktif olan DHT ya da östradiole dönüşür. DHT dönüşümü salgı bezlerinde, saç foliküllerinde, dermal fibroblastlarda ve prostatta gerçekleşir ⁸⁴.

Testosteronun Direk Etkileri

- Wolffian kanalının farklılaşması ve iç genital yapının gelişimi
- Kas üzerinde anabolik etkiler
- Spermatogenezin uyarılması
- Gırtlığın genişlemesi
- Seks gücünün artması ⁸⁴

Testosteronun DHT Üzerinden Etkileri

- DHT'a kesin ihtiyaç duyulduğu durumlar:
 - Erkek dış genital yapının gelişimi
 - Prostat gelişimi
- DHT'a kısmen ihtiyaç duyulan durumlar:
 - Dış genital yapıda gelişme
 - Erkek tipinde vücut tüylerinin gelişimi
 - Testislerin inmesi ⁸⁴

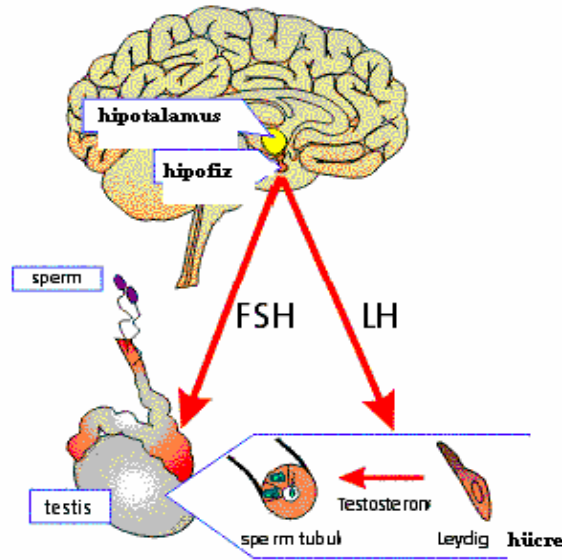
Testosteron prenatal gelişim, puberte dönemi ve puberte sonrasında cinsiyet organları ve cinsiyet özelliklerinin gelişiminde önemli roller üstlenmektedir. Ayrıca kas ve kemik gelişimi üzerinde anabolik etki göstererek kaslarda protein sentezini ve kas kütlelerini artırır. Hematolojik ve immünolojik etkileri vardır. Böbreklerde

eritropoetini artırır. Su-elektrolit dengesine (Na^+ tutulumu, K^+ , kalsiyum, fosfat düzenlemesi) katılır⁸⁴.

2.10.3. Testosteron ve İnfertilite

Testosteron testisler tarafından üretilen ana hormon olup normal gelişim, erkek cinsiyet organları ve cinsiyet karakterlerinin gelişimi için önemli bir role sahiptir. Testosteron, yetişkin erkeklerin yaşamı boyunca sperm üretimi, seks gücünün korunması, erektil potansiyel, prostat bezinin fonksiyonu ve diğer reproduktif yapılar için ihtiyaç duyulan bir hormondur. Testosteron üretimi gonadotropin hormonları ile kontrol edilirler. Hipofiz bezi beyinin hipotalamus bölgesi ile kontrol edilir. Hipotalamus GnRH üretir. GnRH, hipofizden iki hormon üretimini kontrol eder: FSH ve LH⁸⁵.

LH ve FSH kan dolaşımına katılarak farklı etkinlikler gösterirler. LH özelleşmiş Leydig hücrelerinde testosteron üretimini uyarır, sperm üretimini uyarır (Şekil 31). Düşük testosteron düzeyleri seks gücünün azalmasına, mental ve fiziksel aktivitenin düşmesine, infertiliteye bağlı olarak sperm üretiminde azalma ve kemik kaybına neden olmaktadır. Testosteron yetersizliği hipogonadizm olarak adlandırılıp erkek faktörlü infertilite sebeplerinin % 2-5'i bu sebebe dayandırılmaktadır⁸⁵.



Şekil 31. FSH ve LH'nin hedef dokudaki etkinlikleri⁸⁵

2.10.4. Seminal Plazmada Hormonal Steroidler

Seminal plazma zengin metabolit içeriğinin yanı sıra çeşitli hormonal steroidler ve onların öncü moleküllerini içermektedir ⁸⁶.

Leydig hücreleri, androjenlerin (testosteron , DHT) ve onların öncü moleküllerinin (androstendion, 17 α -hidroksiprogesteron, pregnenolon ve dehidroepiandrosteron-DHEAS) ana kaynağıdır ⁸⁶.

Seminal plazmada bulunan en önemli steroid DHEAS sülfattır. Seminal plazmadaki DHEAS sülfat konsantrasyonu vazektomide, dihidrotestosteron (% 40 azalma) ve testosteronda (% 23 azalma) olduğu gibi düşme göstermez ^{86,87}. Östrojenler de seminal plazmanın elemanıdır ve kaynağı prostatın sekretuar aktivitesidir ⁸⁷.

Bazı steroidlerin seminal plazma düzeyi kan düzeyinden önemli ölçüde düşüktür. Testosteronun, kan plazması/seminal plazma oranı40 iken dihidrotestosteronun 1.7'dir ⁸⁷.

Çizelge 3. İnsan semeninde bulunan steroidler ⁸⁷

Testosteron
Testosteron konjugatları
Dihidrotestosteron
Dihidrotestosteron sülfat
Andrstendion
Dehidoepiandrosteron
Dehidoepiandrosteron sülfat
5 α -Androsten-3 α ,17 β -diol ve 3 β -izomeri
Östradiol ve sülfatı
Östron ve sülfatı
Progesteron
17 α -Hidroksiprogesteron
Pregnenolon ve sülfatı
Kortizol
5 α -Androsten-16-en-3 α -ol ve 3 β -izomeri
5,16-Androstadien-3 β -ol ve 4-en-izomeri

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Cihazlar

- Mikrosantrifüj	Beckman
- Elektrikli terazi	Mettler P1210 ve Mettler AJ100
- Elektrikli terazi	Libror Aeu-210
- pH metre	WTW Sentix 50
- Spektrofotometre	UV-260 Shimadzu
- 3ml, 1 ml Kuvars küvet	Hellma
- Otomatik pipet	Gilson (p-20, p-200), Socorex (200-1000)
- Derin dondurucu	Uğur, Arçelik
- Manyetik karıştırıcı	Nm 110 Nüve
- Su banyosu (Ben-mari)	Electro-mag
- Gama sayacı	Berthold LB2111
- Işık mikroskop	Pleuger XSZ 107
- Elektron mikroskop	Nikon Eclipse E600
- Etüv	Memmert
- Santrifüj	Heraus sepatech
- Makler sperm sayma kamerası	
- Mekanik homojenizatör	Heidolph
- Ultrasonik homojenizatör	VIRTIS-Virsonic 300
- Ozmometre	Knauer
- Buz makinesi	Forma scientific
- Buzdolabı	Arçelik
- İnkübatör	Shel Lab TC2323

3.2. Örneklerin Temini ve Gruplandırılması

Ç.Ü.T.F. Etik Kurulu kararı doğrultusunda planlanan bu çalışmada, Ç.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı-Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'ne infertilite problemi ile müracaat ederek spermiyogram tetkiki yaptırması tavsiye edilen hastaların semen örnekleri, olguların olurları alındıktan sonra bu çalışmada kullanılmıştır. Semen örnekleri spermiyogram özellikleri yönünden değerlendirilip sonuçları rapor edildikten sonra çalışma için ayrılmıştır.

Hastalar ile yapılan ilk görüşmede örnek vermeğe gelecekleri gün 3-5 günlük bir cinsel perhiz süresine uyarak gelmeleri tavsiye edilmiştir. 2-7 gün arasındaki cinsel perhiz süresi yeterli görülürse de kısa süreli cinsel perhizde semendeki sperm sayısı az, uzun süreli cinsel perhizde de (erkek faktörü mevcut ise) sperm sayısı yeterli olsa bile motilitenin düşük olduğu gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda, uzun süreli cinsel perhizin spermlerin akrozin içeriğinde de azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Önerilen cinsel perhiz süresine uyulduğunda, dikkatli bir şekilde yapılan semen analizi testislerin spermatogenetik ve steroidogenetik aktivitesiyle aksesuar bezlerin çalışması hakkında sağlıklı bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır.

Hastaların steril şartlarda, steril kutular kullanarak bu amaçla düzenlenmiş sperm verme odasını kullanmaları sağlanmıştır. Hastalar, mastürbasyonla örnek vermeleri gerektiği konusunda bilgilendirilmiş, kullandıkları kutuların üzerine isimleri etiketle yapıştırılmıştır. Örnek verme esnasında nelere dikkat etmeleri gerektiği önceden hazırlanmış bir bildiri ile kendilerine açıklanmıştır. Örnek toplanması esnasında krem ya da kayganlaştırıcı bir madde kullanmaması, örnek toplanan kutuya su ya da başka bir madde kaçırmaması söylenmiştir. Semen toplanan kutuyla ilgili olarak daha önceden yapılan kimyasal ve biyolojik testlerle toksik olmadığı ispatlanmış kutular satın alınmıştır. Hastanın örneğini aldıktan sonra kendi eli ile laboratuvardaki ilgili biyologlara teslim etmeleri gerektiği izah edilmiştir.

Semen örnekleri spermiyogram özellikleri yönünden değerlendirilip sonuçları rapor edildikten sonra çalışma için ayrılmıştır. Örneklerin ayırımı yapılırken hastanın herhangi patolojik bir öyküsü esas alınmamış ancak lökosit içeren, viskoz olan ve anormal bir görüntüye sahip (örneğin kanlı) örnekler

çalışmaya alınmamış, perhiz süresine uygun olarak (ortalama 3-5 gün) toplanmış örnekler seçilmeye dikkat edilmiştir.

Örnekler spermiyogram özelliklerine göre; hacim, konsantrasyon, motilite ve morfoloji yönünden değerlendirilmiş, sperm ve seminal sıvı içeriği birbirinden ayrıldıktan sonra ve aşağıda belirtildiği şekilde bir gruplandırmayla saklamaya alınmışlardır:

- A Grubu (n = 40) - Konsantrasyon, motilite ve morfoloji normal
(Kontrol grubu, normospermi)
- B Grubu (n = 25) - Konsantrasyon ve morfoloji düşük, motilite normal
(oligoteratospermi)
- C Grubu (n = 26)- Konsantrasyon ve motilite normal , morfoloji düşük
(teratospermi)
- D Grubu (n = 12)- Motilite düşük (astenospermi)
- E Grubu (n = 16)- Azospermik (semende sperm bulunmaması)

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1992 verilerine göre konsantrasyon, motilite ve morfoloji için normal olarak kabul edilen değerler:

Hacim	≥ 2 ml
Konsantrasyon	$\geq 20 \times 10^6$ /ml
Motilite	> %50
Morfoloji	\geq %14 (Kruger)

Deneysel Çalışma Planı

3-5 Günlük perhiz süresine uygun olarak steril şartlarda alınan
semen örneği



37°C'de likefikasyon



Mikroskopik inceleme (spermiyogram)
(konsantrasyon, motilite ve morfolojik kriterlere göre
kontrol grubu ve diğer gruplar ayrılır)



Seminal sıvı ve sperm içeriği birbirinden ayrılır



-70°C'de derin dondurucuda bekletilir



Deneysel çalışma yapılacağı zaman örnekler çözülür



Seminal sıvı

- * Malat Dehidrogenaz aktivitesi
(NAD ve NADP bağımlı)
- * Laktat Dehidrogenaz aktivitesi
- * Redükte Glutasyon düzeyi
- * Glukoz düzeyi
- * Fruktoz düzeyi
- * Serbest testosteron düzeyi
- * Leptin düzeyi



Sperm

- Sperm homojenizasyonu
- * Malat Dehidrogenaz aktivitesi
(NAD ve NADP bağımlı)
- * Laktat Dehidrogenaz aktivitesi

3.3. Sperm Homojenizasyonu

Homojenizasyonla ilgili olarak, çalışmalarımızda standart olarak tüm örneklere uygulamayı kararlaştırdığımız ideal şartlar şu basamaklarla sıralanabilir:

- Ejakülat 37°C’de likefiye olduktan sonra mikroskopik (sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi) olarak değerlendirilir.
- Ejakülat 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir.
- Sperm ve seminal sıvı içeriği birbirinden ayrılır.
- Sperm içeriği yıkama (swim up) yapıldıktan sonra homojenize edilir (yıkama işlemi ileri sayfalarda açıklanmıştır).
- Bu basamağın ardından, sperm ve seminal sıvı içeriği, birbirinden ayrı olarak homojenizasyonun yapılacağı güne kadar derin dondurucuda (-70 °C’de) bekletilip, homojenize edileceği gün tekrar çözülür
- Dijitonin (% 0.02) ve fosfat tamponu (pH 8.0 ve 0.1M) çözeltilerinden 1/1 oranında bir karışım hazırlanır.
- Sperm içeriği yukarıdaki karışım ile istenilen sperm konsantrasyonuna göre makler kamerasında sayılarak dilüe edilir (çalışmamızda 20×10^6 /ml).
- Seyreltilmiş sperm örneği ultrasonik homojenizatörde 6 mikro probe şiddette ve 1-1.5 dakika cam şişe buz içerisinde tutularak homojenize edilir.
- Homojenizasyon sonucunda sperm parçalanması ışık mikroskop ile değerlendirildi. Spermilerin orta bölüm ve kuyruk kısmında parçalanma tesbit edildi. Homojenizasyon sonucundaki parçalanma görüntüleri elektron mikroskop ile görüntülendi.
- Seminal sıvı ve sperm içeriklerinde deneysel çalışmalar ayrı ayrı gerçekleştirildi. Hem sperm hem seminal sıvıda ortak olarak NAD ve NADP bağımlı MDH aktivitesi ile LDH aktivitesi tesbit edildi.
- Seminal sıvıda ayrıca aşağıdaki çalışmalar yapıldı :
 - * Redükte Glutasyon düzeyi
 - * Glukoz düzeyi
 - * Fruktoz düzeyi
 - * Serbest testosteron düzeyi
 - * Leptin düzeyi

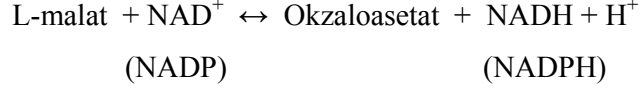
3.4. Sperm Yıkama (Swim up)

- Ejakülat 37°C'de likefiye olduktan sonra mikroskopik olarak incelenir.
- Ejakülat 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- Seminal sıvı içeriği üstten ayrı bir tüpe alınır ve derin dondurucuya kaldırılır.
Altta kalan sperm üzerine (tüpte kalan sperm pelletinin konsantrasyonuna göre) 2 ml yıkama medyumu (Yıkama medyumu olarak hücre kültür işlemlerinde kullanılan bikarbonat, Hepes'li tampon ve İnsan Serum Albümin içeren medyumlar tercih edilmektedir. Yıkama medyumu 37°C'de %6'luk CO₂'e ayarlanmış inkübatörde bir gece bekletilir.) eklenir
- 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Üstten, süpernatant pastör pipeti ile atılır.
- Sperm pelleti üzerine tekrar 1-2 ml yıkama medyumu eklenir.
- 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.
- Üstten, süpernatant pastör pipeti ile atılır.
- Tüpte kalan sperm pelleti çalışma için kullanılır ya da derin dondurucuda bekletilir.

3.5. Analiz Yöntemleri

3.5.1. Malat Dehidrogenaz (MDH) Aktivite Tayini

MDH, NAD/NADP'yi koenzim olarak kullanan ve L-malat ve okzaloasetatın birbirlerine dönüşümünü katalizleyen bir oksideredüktazdır³⁰.



Prensip

Reaksiyon hızını tesbit etmek için malatın okzaloasetata dönüşümü sırasında, 340 nm'de NAD/NADP'nin indirgenmesiyle oluşan NADH/NADPH'a bağlı olarak abzorbanstaki artış ölçülmektedir³⁰.

Ayırıcılar

- Fosfat tamponu (0.1 M pH 8.0)
12.25 g Na₂HPO₄
1.84 g KH₂PO₄
saf su ile litreye tamamlanıp pH = 8.0'e ayarlanır.
- Fosfat tamponu (0.067 M pH = 7.4)
9.464 g/L Na₂HPO₄'den 19.2 ml
1.072 g/L KH₂PO₄'den 80.2 ml alınıp karıştırılır ve pH = 7.4'e ayarlanır.
- Tris-HCl tamponu (0.1 M pH = 9.0)
0.1 M Tris etanolamin hazırlanır
0.1 M Tris-HCl ile pH 9.0'a ayarlanır.

- Malik enzim (0.006 M)
0.008 g malik enzim tartılıp 0.067 M pH = 7.4 fosfat tamponu ile hacim 10 ml'ye tamamlanır (günlük hazırlanır).
- NAD (0.00375 M)
0.0248 g NAD tartılıp 0.067 M pH = 7.4 fosfat tamponu ile hacim 10 ml'ye tamamlanır (günlük hazırlanır).
- NADP (0.00375 M)
0.028 g NADP tartılıp 0.067 M pH = 7.4 fosfat tamponu ile hacim 10 ml'ye tamamlanır (günlük hazırlanır).

Yöntem

Spektrofotometre 37°C'de 340 nm'ye ayarlanır. Aşağıdaki şekilde pipetleme yapılır:

	<u>Kör (ml)</u>	<u>Örnek (ml)</u>
- 0.1 M pH 9.0 Tris-HCl tamponu	2.9	2.6
- NAD/NADP	---	0.2
- Enzim (seminal sıvı/sperm) *	0.1	0.1

Küvetler 5 dakika inkübe edilir. Küvete 0.1 ml malat eklenir. Abzorbanstaki değişim (ΔA) 5 dakika izlenir³⁰.

* Seminal sıvı ve sperm örneklerinde MDH aktivitesi ayrı ayrı çalışılmıştır. Çözülen seminal sıvı örnekleri mikrosantrifüjde 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant enzimatik aktivite tayininde kullanılmıştır. Sperm örnekleri de çözüldükten sonra homojenize edilmiş ve bu homojenatta MDH aktivitesi ölçülmüştür.

Hesaplama

$$\text{mU/ml} = \Delta A / (6.22 \times \text{örnek hacmi} / \text{ml reaksiyon karışımı})$$

$$= \Delta A / (6.22 \times 0.1/3)$$

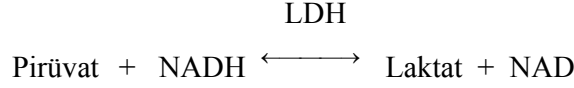
$$= \Delta A / 0.21$$

$$\Delta A = 340 \text{ nm'de dakika başına abzorbansta değişim}$$

$$6.22 = \text{NADH'in } 340 \text{ nm'de milimolar abzorbtivitesi} \\ (\text{Ekstinksiyon katsayısı}) (\text{mmol}^{-1})$$

3.5.2. Laktat Dehidrogenaz Aktivite Tayini

Laktat dehidrogenaz (LDH, EC 1.1.1.27), sitozolik bir enzim olup glikolitik yolun son basamağı olan pirüvatın laktata dönüşümünü katalizlemektedir⁸⁸:



Deneyde enzimin çift yönlü çalışmasından ve laktatın pirüvata oksidasyonu sırasında NAD'nin redükte olmasından faydalanılarak redükte durumdaki NADH'ın oluşması 340 nm'de abzorbanans artışına neden olmaktadır. Bu artış hızı, örnekteki LDH aktivitesiyle doğru orantılıdır⁸⁸.

Ayıraç

- Laktat 50 mmol/L
- NAD 7 mmol/L
- Tampon 0,1M HCl tamponu H 8.9
- Sodyum azide % 0.05 (koruyucu olarak)

Örneklerin Hazırlanması

Çalışmada sperm ve seminal sıvı içerikleri birbirinden ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Sperm örnekleri homojenizasyon bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Tüm örnekler çift çalışılmıştır. Örnekler 50 µl karışım içerisinde (25 µl örnek + 25 µl su olarak) hazırlanmış ve aktivite değeri 2 ile çarpılarak hesaplanmıştır.

DeneySEL İşlem

- Spektrofotometrede (Shimadzu UV-260) 340 nm'de çalışılır ve kör olarak su kullanılır.
- Küvete 1 ml ayıraç eklenir ve 37°C'de 30 saniye bekletilir.
- 50 µl örnek eklenerek hafifce karıştırılır.
- 30 saniye bekletilir.

- 340 nm'de abzorbars okunur. İlk okunan değer başlangıç A olarak kabul edilir.
- 60. Saniyede tekrar abzorbars okunur, bu değer de final A'dır.
- Final A'dan başlangıç A değeri çıkarılarak dakika başına abzorbars değişimi (ΔA) hesaplanır.

* Seminal sıvı ve sperm örneklerinde LDH aktivitesi ayrı ayrı çalışılmıştır. özölen seminal sıvı örnekleri mikrosantrifüjde 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant enzimatik aktivite tayininde kullanılmıştır. Sperm örnekleri de çözöldükten sonra homojenize edilmiş ve bu homojenatta LDH aktivitesi ölçölmüştür.

Aktivite Hesabı

$$\text{LDH aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A \times TV \times 1000}{6.22 \times SV \times LP}$$

ΔA = 340 nm'de dakika başına abzorbansta değişim

TV = Total reaksiyon hacmi

SV = Örnek hacmi

6.22= NADH'ın 340 nm'de milimolar abzorbtivitesi (Ekstinksiyon katsayısı)

LP = Işık yolu (1 cm)

1000 = ml'yi litreye çevirme birimi

$$\text{LDH Aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta A \times 1.05 \times 1000}{6.22 \times 0.05}$$

$$= \Delta A(\text{dakika}) \times 3376$$

3.5.3. Redükte Glutatyon (GSH) Tayini

Prensip

5-5'-ditiyobis [2-nitrobenzoik asit] [DTNB:3-karboksi-4-nitrofenil disülfid: Elman Ayıracı] sülfidril bileşikleri ile tepkimeye girdiğinde bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks yapı oluşturur. Bu sarı bileşiğin optik dansitesi 412 nm'de okunarak GSH miktarı saptanır⁸⁹.

Ayırıklar

Çöktürücü çözelti

Glasiyel metafosforik asit	1.67 g
Disodyum EDTA	0.2 g
Sodyum klorür	30 g

100 ml saf su içinde çözünür.

2. Na₂HPO₄ (0.3M)

3. DTNB çözeltisi

DTNB 20 mg

100 ml %1'lik sodyum sitrat çözeltisi içinde eritilir.

Yöntem

Yöntem Beutler'den modifiye edilmiştir.

Seminal sıvı direk çalışılmıştır.

	Örnek (µl)	Kör (µl)
Numune	100	--
Su	--	100
Çöktürücü	300	300

Ependorf tüpündeki örnek 5 dakika santrifüj edilir (çöktürme amaçlı). Üst kısım alınır.

Süzüntü	200	200
Na ₂ HPO ₄	800	800

412 nm'de köre karşı okunur (OD1). Sonra tüplere 100'er µl DTNB eklenir. 412 nm'de köre karşı tekrar okuma yapılır (OD2).

Hesaplama

$$C = \frac{OD2 - OD1}{13600} \times \frac{11}{2} \times \frac{4}{2} \times 100$$

100 : µmol'e dönüşüm katsayısı

13600: Ekstinksiyon katsayısı

$\frac{11}{2} \times \frac{4}{2} \rightarrow$ seyrelme faktörü

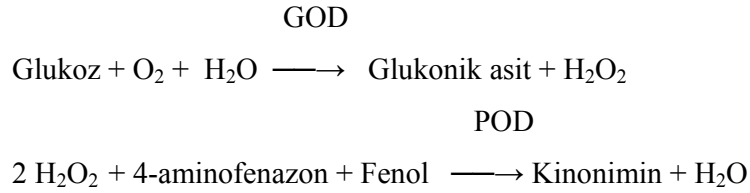
2 1

$$C = \Delta OD \times 11618 \text{ (}\mu\text{mol/L)}$$

3.5.4. Glukoz Tayini [Glukoz oksidaz (GOD-PAP) metodu, Enzimatik-Trinder yöntemi] (Glucon)⁹⁰

Prensip

Glukozun, ortamda bulunan glukoz oksidaz ile enzimatik oksidasyon sonucunda oluşan H₂O₂ peroksidaz katalizörlüğünde 4-aminofenazon ile reaksiyona girerek kırmızı mor renkte kinonimin oluşturmaktadır. Spektrofotometrik olarak 500 nm'de ölçülen renk şiddeti glukoz konsantrasyonunu yansıtmaktadır. Çalışmada, seminal sıvı örneklerinde glukoz düzeyi ölçülmüştür⁹⁰.



Ayırıcılar

1. Tampon
 - Fosfat tamponu 0.1 mol/l, pH 7,0
 - Fenol 11 mmol/l
2. GOD-PAP ayırıcı
 - 4-aminofenazon 0.77 mmol/l
 - Glukoz oksidaz ≥ 1.5 kU/l
 - Peroksidaz ≥ 1.5 kU/l
3. Standart
 - Glukoz 5.55 mmol/l (100 mg/dl)

Yöntem

Ependorf tüplerine aşağıdaki gibi pipetleme yapılır

	Kör	Standart	Örnek
Standart	----	10 µl	---
Seminal sıvı	---	---	10 µl
Ayıraç	1000 µl	1000 µl	1000 µl

Tüpler karıştırılır. 15-25 °C’de inkübe edilir. 500 nm’de köre karşı okuma yapılır.

Hesaplama

Glukoz konsantrasyonu (mmol/l) = $\frac{\text{Abzorbans (örnek)}}{\text{Abzorbans (standart)}} \times 5.55$

Abzorbans (standart)

(mg/dl) = $\frac{\text{Abzorbans (örnek)}}{\text{Abzorbans (standart)}} \times 100$

Abzorbans (standart)

3.5.5. Seminal Sıvıda Fruktöz Tayini (Solomon Metodu)⁹¹

Prensip

Testin esası Seliwanoff testidir.

Seliwanoff Testi'nin Prensibi: Heksozlar asit ortamda ısıtıldıklarında hidroksi metil furfural türevleri oluşur. Keto heksozlar bu reaksiyona daha hassastır. Aldoheksozlar ise daha geç dönüşmektedirler. Seliwanoff ayırıcındaki rezorsinol ile ketoheksozların furfural türevleri pembe renk verdikleri için aldoheksozlardan kolaylıkla ayrıştırılırlar.

Ayıraç

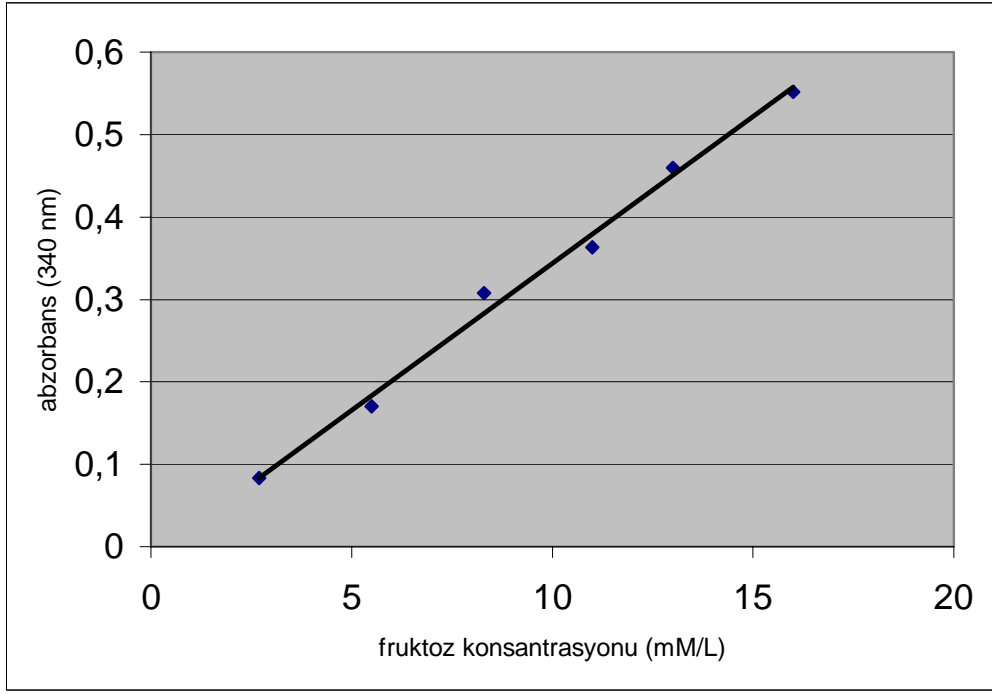
Aşağıdaki şekilde Resorsinol ayıracı hazırlanır:

- Resorsinol 50 mg
- Konsantre HCl 30 ml
- Saf su 100 ml

Teknik

1. Seminal sıvı santrifüj edilmiş ve süpernatandan 100 µl bir tüp içerisine konulup 1 ml yukarıdaki karışımdan eklenmiştir
2. Karışım, kaynar su banyosuna konur
3. Deney şartlarımızda ilk 10 saniyede renk değişimi gözlenir gözlenmez deney tüpleri su banyosundan çıkarılarak soğutmaya alınmıştır. Soğuyan örnekten 1 ml alınarak 340 nm'de kör olarak suya karşı spektrofotometrik okuma yapılmıştır.

Çalışmada fruktoz standart eğrisi için dalga boyu taraması yapılarak en uygun dalga boyu olarak 340 nm tesbit edilmiştir. 2,7 mM/L, 5,5 mM/L, 8,3 mM/L, 11,0 mM/L, 13,0 mM/L, 160 mM/L konsantrasyonlarda fruktoz standartları hazırlanarak standart eğri çizilmiştir (Şekil 32) ve örneklerin fruktoz konsantrasyonu bu eğriden değerlendirilmiştir.



Şekil 33. Fruktoz standart eğrisi

3.5.6. Serbest Testosteron (Biosource KIPB19000) ⁹²

Prensip

Radyoaktif ¹²⁵I kullanılarak örnekteki Serbest Testosteron (ST) içeriği tesbit edilmektedir. Tüplerdeki anti-testosteron bağlanan ¹²⁵I-ST düzeyi örneğin ST içeriği ile ters orantılı olmaktadır.

Ayırıcılar

- ¹²⁵I-Testosteron tracer
- Serbest testosteron standartları (pg/ml) : 0 0,25 1 5 20 65
- “coated tüpler”

Yöntem

- Tüplere 100 µl standart, örnek ve kontrol eklenir.
- 1 ml, ¹²⁵I-Testosteron tracer eklenerek karıştırılır.
- 3 saat oda sıcaklığında inkübe edilir.
- Tüplerin içeriği aspire edilir.
- Gama sayacında bir dakika okuma yapılır.
- Standart eğriden değerlendirilir.

LEPTİN (IRMA DSL-23100)⁹³

Prensip

Bu test, iki yönlü immünoradiometrik yöntem (IRMA) prensibine dayanmaktadır. IRMA yarışçı olmayan bir yöntem olup iki antikor arasında ölçüm yapmaktadır. İlk antikor tüplerin duvarlarına yerleşmiş, diğer antikor tesbit için radio etiketleme yapılmıştır.

Ayırıcılar

- Anti-Leptin (I-125) ayırıcı
- Standartlar (A,B,C,D,E,F,G)
(ng/ml) 0 0,25 0,5 2,5 10,0 30,0 120,0
- Yıkama solüsyonu

Yöntem

Çalışmaya başlamadan önce bütün kimyasallar oda ısısında bekletilmeli ve hafifce karıştırılmalıdır.

1. İki tüp total sayım için ayrılır.
2. Standart, kontrol ve örneklerden 100 µl tüplere pipetlenir.
3. Her tüpe 200 µl, Anti-Leptin (I-125) ayırıcı eklenir.
4. 1-2 saniye hafifce karıştırılır.
5. Bütün tüpler, oda sıcaklığında ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) 18-24 saat bekletilir.
6. Total sayım tüpleri dışında bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
7. Total sayım tüpleri dışında bütün tüplere 3 ml yıkama solüsyonu eklenir.
8. Total sayım tüpleri dışında bütün tüplerin içeriği aspire edilir.
9. 7 ve 8. basamaklar iki kez tekrarlanır.
10. Gama sayacında bir dakika okuma yapılır.
11. Standart eğriden değerlendirilir.

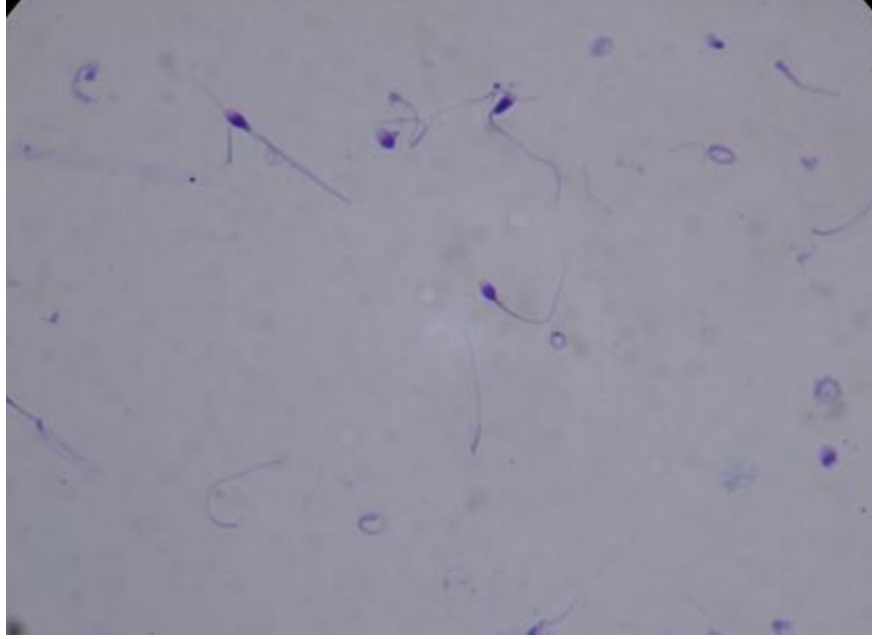
4. BULGULAR

Çalışmada, semen örneği likefiye olduktan sonra mikroskopik incelemesi yapılmış daha sonra santrifüj edilerek seminal sıvı ve sperm bölümleri birbirlerinden ayrılmıştır. Çeşitli analizler; seminal sıvı ve sperm bölümlerinde ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Spermde yapılacak incelemelerden önce sperm homojenizasyonu için ideal şartlar araştırılmıştır. Bu amaçla mekanik ve ultrasonik homojenizatörde denemeler yapılmış, farklı tamponlarla, değişik sürelerde deney düzeneği tekrarlanmıştır. En verimli sonuçlar ultrasonik homojenizatörde elde edilmiştir. Homojenizasyon sonrasında spermin kuyruk ve orta bölmesinde kırılmalar saptanmış, başın parçalanması gerçekleşmemiştir. Homojenizasyon sonucunda spermde oluşturulan parçalamalar ışık mikroskopu ile görüntülenmiştir. Şekil 33'de homojenizasyon öncesi normal sperm görüntüleri, şekil 34'de ise homojenizasyondan sonra elde edilen kırılmalar gösterilmektedir.



Şekil 33. Homojenizasyon öncesinde spermelerin morfolojik görünümü (x100)



Şekil 34. Homojenizasyondan sonra spermlerin morfolojik görünümü (x100)

Semen örneği mikroskopik olarak incelendikten sonra spermiyogram özelliklerine göre aşağıdaki şekilde gruplandırılmıştır:

A Grubu (n = 40) - Konsantrasyon, motilite ve morfoloji normal
(Kontrol grubu, normospermi)

B Grubu (n = 25) - Konsantrasyon ve morfoloji düşük, motilite normal
(oligoteratospermi)

C Grubu (n = 26)- Konsantrasyon ve motilite normal , morfoloji düşük
(teratospermi)

D Grubu (n = 12)- Motilite düşük (astenospermi)

E Grubu (n = 16)- Azospermik (semende sperm bulunmaması)

Deneyler seminal sıvı ve sperm homojenatlarında ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde öncelikle seminal sıvıda yapılan çalışmalar tanımlanacaktır:

- Çizelge 4,5,6,7,8'de sırasıyla bütün gruplarda olgu yaşı, semen hacmi ve spermiyogram değerleri verilmiştir.

- Çizelge 9,10,11,12,13'de sırasıyla bütün gruplarda MDH (NAD/NADP) ve LDH aktiviteleri verilmiştir.

- Çizelge 14,15,16,17,18'de sırasıyla bütün gruplarda GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri verilmiştir.

- Çizelge 19,20,21,22,23'de sırasıyla bütün gruplarda serbest testosteron ve leptin düzeyleri verilmiştir.

Bu bölümün ardından seminal sıvıda yapılan çalışmaların istatistiksel değerlendirmeleri yer almaktadır.

- Çizelge 24'de yaş, semen hacmi ve spermiyogram özelliklerinin gruplardaki ortalama değerleri verilmiştir.

- Çizelge 25'de tüm grupların seminal sıvıda NAD/NADP-MDH ve LDH aktivitelerinin ortalamaları verilmiştir.

- Çizelge 26'de tüm gruplarda seminal sıvıda GSH, glukoz ve fruktoz değerlerinin ortalamaları verilmiştir.

- Çizelge 27'de tüm gruplarda seminal sıvıda serbest testosteron ve leptin düzeylerinin ortalamaları verilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde sperm homojenatlarında yapılan enzimatik deneyler ve bunlara ait istatistiksel değerlendirmeleri içermektedir:

- Çizelge 28,29,30,31'de tüm gruplarda sperm örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri verilmiştir.

- Çizelge 32'de tüm gruplarda sperm örneklerinde MDH ve LDH aktivitelerinin ortalamaları verilmiştir.

- Çizelge 33'de gruplardaki değişkenlerin A (kontrol) grubu ile karşılaştırılmaları sonucunda bulunan "p" değerleri

- Çizelge 34'de grupların birbirleriyle karşılaştırılmaları sonucunda bulunan "p" değerleri verilmiştir.

- Çizelge 35,36,37,38,39 'da grupların kendi içinde korelasyonları sonucunda elde edilen "r ve p" değerleri verilmiştir.

Cizelge 4. Grup A- Olgu yaşı, semen hacmi ve spermogram değerleri

Olgu no	Yaş	Semen hacmi (ml)	Konsan. (x10 ⁶ /ml)	Motilite (% motil)	Morfoloji (% normal)
1	36	1.5	50	%70	%16
2	34	4.0	40	%80	%14
3	27	3.0	30	%70	%28
4	35	4.0	120	%80	%20
5	28	2.0	50	%75	%16
6	28	3.0	40	%70	%17
7	28	2.0	35	%70	%15
8	35	2.0	35	%70	%20
9	30	2.0	150	%70	%14
10	36	2.0	60	%45	%18
11	30	2.0	23	%70	%14
12	27	2.0	40	%70	%16
13	28	4.0	45	%80	%16
14	20	4.0	45	%80	%16
15	41	2.0	120	%80	%30
16	33	3.0	30	%75	%14
17	30	4.0	45	%75	%14
18	27	5.0	50	%70	%16
19	20	5.0	45	%70	%20
20	26	3.0	70	%70	%20
21	45	5.0	80	%70	%20
22	39	5.0	80	%60	%20
23	35	3.0	150	%80	%21
24	37	2.5	75	%60	%16
25	36	2.0	40	%70	%20
26	33	4.0	45	%70	%14
27	30	3.0	35	%65	%14
28	32	6.0	30	%70	%28
29	40	3.0	30	%70	%14
30	26	4.0	26	%80	%30
31	30	3.0	45	%75	%15
32	36	4.0	40	%70	%15
33	28	4.0	70	%80	%15
34	31	4.0	60	%70	%17
35	29	3.0	35	%70	%15
36	34	4.0	24	%70	%16
37	28	6.0	40	%75	%23
38	47	3.0	28	%70	%15
39	27	3.0	45	%70	%16
40	41	1.5	24	%70	%16

Çizelge 5. Grup B- Olgu yaşı, semen hacmi ve spermiyogram değerleri

Olgu no	Yaş	Semen hacmi (ml)	Konsan. (x10 ⁶ /ml)	Motilite (% motil)	Morfoloji (% normal)
1	32	5.0	14	%50	%2
2	34	3.0	10	%40	%4
3	37	2.0	7	%65	%6
4	32	4.0	16	%50	%2
5	33	2.0	12	%75	%3
6	30	3.0	6	%50	%1
7	23	2.0	14	%50	%3
8	34	3.0	7	%60	%2
9	42	2.0	10	%70	%1
10	36	2.0	13	%55	%4
11	34	4.0	18	%80	%9
12	27	2.0	10	%60	%2
13	34	3.0	15	%70	%5
14	36	3.0	16	%70	%4
15	35	2.0	17	%70	%5
16	32	3.0	15	%70	%5
17	32	3.0	15	%75	%2
18	58	2.0	16	%75	%8
19	40	5.0	15	%70	%4
20	32	4.0	7	%65	%6
21	25	4.0	4	%50	%2
22	33	2.0	10	%70	%6
23	33	3.0	15	%70	%3
24	34	2.0	16	%70	%7
25	33	2.0	14	%65	%3

Çizelge 6. Grup C-Olgu yaşı, semen hacmi ve spermiyogram değerleri

Olgu no	Yaş	Semen hacmi (ml)	Konsan. ($\times 10^6$ /ml)	Motilite (% motil)	Morfoloji (% normal)
1	28	3.0	30	%70	%7
2	28	3.0	50	%70	%4
3	30	2.0	50	%70	%5
4	38	3.0	23	%65	%3
5	35	4.0	60	%80	%10
6	20	2.0	20	%70	%10
7	34	2.0	50	%75	%9
8	34	2.0	40	%75	%10
9	31	8.0	100	%80	%10
10	33	5.0	50	%75	%8
11	58	3.0	130	%80	%6
12	26	6.0	25	%50	%1
13	26	3.0	45	%65	%7
14	30	2.0	60	%70	%7
15	43	3.0	45	%70	%10
16	42	5.0	26	%50	%2
17	30	4.0	40	%70	%6
18	25	3.0	30	%60	%2
19	25	2.0	45	%60	%8
20	35	3.0	30	%75	%7
21	27	4.0	80	%60	%7
22	31	8.0	40	%70	%8
23	31	3.0	40	%70	%7
24	19	3.0	35	%60	%6
25	29	4.0	33	%70	%5
26	39	3.0	30	%70	%6

Çizelge 7. Grup D- Olgu yaşı, semen hacmi ve spermiyogram değerleri

Olgu no	Yaş	Semen hacmi (ml)	Konsan. (x10 ⁶ /ml)	Motilite (% motil)	Morfoloji (% normal)
1	29	3.0	15	%0	%2
2	38	4.0	8	%35	%3
3	34	4.0	15	%1	%2
4	30	3.0	35	%30	%1
5	34	3.0	40	%30	%6
6	21	5.0	20	%20	%5
7	31	4.0	25	%0	%1
8	32	4.0	90	%0	%1
9	28	5.0	10	%30	%1
10	27	2.0	40	%30	%1
11	23	2.5	8	%30	%2
12	21	5.0	20	%20	%5

Çizelge 8. Grup E- Olgu yaşı ve semen hacmi

Olgu no	Yaş	Semen hacmi (ml)
1	28	2.0
2	30	4.0
3	40	3.0
4	40	2.0
5	25	2.5
6	40	1.0
7	29	4.0
8	32	3.0
9	31	8.0
10	25	2.0
11	35	2.0
12	30	3.0
13	37	2.0
14	31	2.0
15	33	2.0
16	37	3.0

Çizelge 9. Grup A- Seminal sıvı örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri

Olgu no	NAD-MDH (mU/ml)	NADP-MDH (mU/ml)	LDH (U/L)
1	105	400	2903
2	114	123	556
3	152	62	573
4	152	238	934
5	47	176	1417
6	90	143	641
7	143	214	1215
8	176	123	1215
9	133	100	1080
10	105	219	607
11	24	266	1924
12	95	290	1890
13	71	133	1316
14	33	142	877
15	14	53	3000
16	95	114	1053
17	86	190	2734
18	95	98	875
19	180	238	2430
20	28	56	880
21	105	100	1809
22	180	100	1742
23	47	95	1721
24	76	81	1809
25	24	143	2052
26	109	124	640
27	76	333	680
28	143	162	610
29	105	80	540
30	76	124	540
31	24	219	540
32	100	95	837
33	33	133	810
34	38	114	705
35	152	58	708
36	38	190	1148
37	24	143	1250
38	95	152	1317
39	185	238	1350
40	188	143	550

Çizelge 10. Grup B- Seminal sıvı örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri

Olgu no	NAD-MDH (mU/ml)	NADP-MDH (mU/ml)	LDH (U/L)
1	62	166	810
2	223	200	304
3	171	133	351
4	238	109	472
5	133	176	938
6	114	105	472
7	123	138	445
8	110	95	330
9	209	19	300
10	180	85	675
11	71	128	877
12	109	252	1147
13	10	66	1512
14	285	95	743
15	133	295	877
16	33	38	580
17	52	62	810
18	104	28	513
19	85	119	844
20	24	95	965
21	14	266	1363
22	52	276	1226
23	85	85	763
24	85	109	1120
25	90	95	932

Çizelge 11. Grup C- Seminal sıvı örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri

Olgu no	NAD-MDH (mU/ml)	NADP-MDH (mU/ml)	LDH (U/L)
1	76	476	900
2	114	119	574
3	100	285	700
4	123	190	472
5	166	90	404
6	52	71	310
7	160	238	520
8	143	238	541
9	190	38	550
10	180	52	466
11	100	105	1782
12	57	147	1620
13	57	95	1944
14	38	110	1552
15	110	71	614
16	124	47	506
17	86	62	1350
18	47	66	1256
19	110	314	1148
20	28	305	1013
21	128	114	1094
22	66	181	1418
23	47	100	1755
24	162	157	743
25	95	100	605
26	147	110	750

Çizelge 12. Grup D- Seminal sıvı örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri

Olgu no	NAD-MDH (mU/ml)	NADP-MDH (mU/ml)	LDH (U/L)
1	14	105	1350
2	38	33	675
3	24	271	1458
4	24	276	1937
5	52	95	1282
6	28	28	730
7	10	171	2430
8	14	133	2565
9	81	62	1485
10	86	400	2633
11	52	71	1114
12	57	47	554

Çizelge 13. Grup E- Seminal sıvı örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri

Olgu no	NAD-MDH (mU/ml)	NADP-MDH (mU/ml)	LDH (U/L)
1	10	62	621
2	24	176	1107
3	62	209	830
4	47	157	1647
5	19	105	743
6	10	109	1350
7	10	95	945
8	19	105	554
9	24	190	729
10	62	143	830
11	112	238	554
12	24	19	473
13	0	343	1485
14	162	0	297
15	19	152	878
16	5	105	1998

Çizelge 14. Grup A-Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri

Olgu no	GSH (µmol/L)	Glukoz (mg/dl)	Fruktoz (mg/100 ml)
1	48.48	0.0	260
2	40.40	0.0	168
3	36.36	0.4	320
4	56.56	1.4	400
5	40.40	2.8	253
6	38.38	5.2	246
7	44.44	4.5	320
8	30.30	2.1	233
9	36.36	3.0	170
10	36.36	0.7	265
11	42.42	6.0	108
12	50.50	5.0	24
13	46.46	5.3	126
14	32.32	6.3	156
15	40.40	5.5	159
16	46.46	4.6	66
17	30.30	6.6	60
18	42.42	0.0	54
19	38.38	0.0	72
20	36.36	0.0	60
21	40.40	2.0	213
22	30.30	0.4	54
23	54.54	2.0	20
24	66.66	0.4	68
25	80.80	4.4	66
26	72.72	1.0	74
27	54.54	1.4	82
28	30.30	2.3	275
29	40.40	0.0	40
30	36.36	0.4	62
31	34.34	0.3	380
32	28.28	0.2	311
33	50.50	0.8	244
34	30.30	0.0	243
35	40.40	0.0	473
36	42.42	0.3	207
37	40.40	0.9	217
38	38.38	2.2	213
39	80.80	1.6	502
40	34.34	0.0	127

Çizelge 15. Grup B-Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri

Olgu no	GSH (µmol/L)	Glukoz (mg/dl)	Fruktoz (mg/100 ml)
1	20.20	3.0	307
2	20.20	1.8	253
3	42.42	1.7	300
4	34.34	2.3	234
5	28.28	6.0	260
6	26.26	3.4	192
7	38.38	2.2	150
8	36.36	3.3	280
9	24.24	8.3	410
10	36.36	7.7	348
11	38.38	1.3	314
12	46.46	1.5	317
13	30.30	1.5	301
14	22.22	2.4	196
15	30.30	1.6	166
16	24.24	1.8	195
17	22.22	1.6	156
18	16.16	1.0	181
19	30.30	6.3	396
20	28.28	1.1	387
21	40.40	4.0	534
22	24.24	3.8	435
23	40.40	1.0	154
24	28.28	1.5	204
25	32.32	1.2	133

Çizelge 16. Grup C-Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri

Olgu no	GSH (µmol/L)	Glukoz (mg/dl)	Fruktoz (mg/100 ml)
1	30.30	2.3	240
2	22.22	1.5	180
3	14.14	1.4	280
4	20.20	2.8	250
5	8.08	4.0	210
6	20.20	5.7	250
7	14.14	1.8	280
8	38.38	2.4	190
9	38.38	3.1	190
10	32.32	1.6	200
11	56.56	0.0	206
12	48.48	3.4	270
13	46.46	3.0	316
14	60.60	0.0	300
15	34.34	0.6	206
16	26.26	0.0	124
17	22.22	0.2	370
18	44.44	0.3	380
19	46.46	2.0	217
20	42.42	0.6	126
21	24.24	0.0	90
22	48.48	2.0	211
23	40.40	4.0	319
24	57.57	0.2	206
25	32.32	4.3	316
26	60.60	0.0	52

Çizelge 17. Grup D-Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri

Olgu no	GSH (µmol/L)	Glukoz (mg/dl)	Fruktoz (mg/dl)
1	46.46	5.5	500
2	36.36	3.0	705
3	48.48	6.6	798
4	38.38	3.6	800
5	52.52	2.6	584
6	12.12	3.0	506
7	60.60	4.2	900
8	60.60	6.7	705
9	46.46	3.7	760
10	80.80	3.4	782
11	60.60	3.4	900
12	44.44	2.8	540

Çizelge 18. Grup E-Seminal sıvı örneklerinde GSH, glukoz ve fruktoz düzeyleri

Olgu no	GSH (µmol/L)	Glukoz (mg/dl)	Fruktoz (mg/dl)
1	12.12	6.4	135
2	14.14	9.6	149
3	10.10	10.0	143
4	12.12	14.0	242
5	12.12	8.2	198
6	15.15	12.0	236
7	12.12	9.3	215
8	16.16	11.0	163
9	22.22	20.2	391
10	7.07	19.3	540
11	48.48	20.0	259
12	16.16	19.0	496
13	50.50	29.5	550
14	20.20	17.3	180
15	30.30	17.6	550
16	18.18	24.0	964

Çizelge 19. Grup A- Seminal sıvı örneklerinde serbest testosteron ve leptin düzeyleri

Olgu no	Ser.Testosteron (pg/ml)	Leptin (ng/ml)
1	0.3	0.10
2	0.6	0.15
3	1.0	0.35
4	3.0	0.11
5	1.8	0.11
6	1.4	0.11
7	1.7	0.17
8	3.7	0.12
9	4.0	0.12
10	1.7	0.36
11	1.4	0.41
12	1.0	0.11
13	2.8	0.08
14	8.5	0.2
15	4.6	0.18
16	3.5	0.16
17	2.3	0.01
18	1.1	0.0
19	2.7	0.0
20	1.2	0.27
21	1.3	0.31
22	0.8	0.0
23	1.3	0.0
24	1.2	0.08
25	3.1	0.4
26	2.6	0.26
27	2.8	0.12
28	5.4	0.12
29	1.5	0.04
30	1.8	0.90
31	2.2	0.10
32	1.5	0.27
33	1.6	0.07
34	2.7	0.06
35	3.3	0.04
36	1.7	0.24
37	1.6	0.11
38	1.9	0.51
39	2.8	0.24
40	2.2	0.16

Çizelge 20. Grup B-Seminal sıvı örneklerinde Serbest testosteron ve leptin düzeyleri

Olgu no	Ser. Testosteron (pg/ml)	Leptin (ng/ml)
1	1.5	0.05
2	1.3	0.02
3	1.1	0.00
4	4.5	0.00
5	5.2	0.00
6	1.7	0.04
7	3.5	0.00
8	3.0	0.22
9	1.6	0.00
10	1.3	0.00
11	2.3	0.00
12	1.1	0.10
13	1.1	0.12
14	5.0	0.10
15	1.7	0.36
16	1.0	0.32
17	6.5	0.34
18	1.2	0.27
19	3.5	0.04
20	0.6	0.08
21	0.9	0.09
22	0.5	0.15
23	0.9	0.12
24	1.3	0.00
25	1.1	0.18

Çizelge 21. Grup C-Seminal sıvı örneklerinde Serbest testosteron ve leptin düzeyleri

Olgu no	Ser. Testosteron (pg/ml)	Leptin (ng/ml)
1	4.5	0.09
2	6.1	0.19
3	1.7	0.01
4	5.1	0.08
5	2.2	0.04
6	8.7	0.17
7	3.2	0.24
8	0.8	0.21
9	2.5	0.29
10	4.9	0.47
11	6.4	0.14
12	3.1	0.05
13	5.0	0.07
14	5.0	0.02
15	8.0	0.12
16	1.8	0.16
17	5.2	0.15
18	1.0	0.02
19	0.9	0.16
20	2.8	0.00
21	6.5	0.16
22	5.4	0.14
23	3.0	0.31
24	0.8	0.36
25	0.9	0.29
26	1.3	0.18

Çizelge 22. Grup D-Seminal sıvı örneklerinde serbest testosteron ve leptin düzeyleri

Olgu no	Ser. Testosteron (pg/ml)	Leptin (ng/ml)
1	2.5	0.52
2	5.0	0.05
3	4.2	0.10
4	4.1	0.07
5	3.5	0.13
6	3.2	0.13
7	5.8	0.07
8	2.6	0.07
9	3.6	0.25
10	1.0	0.12
11	4.8	0.05
12	3.4	0.15

Çizelge 23. Grup E-Seminal sıvı örneklerinde serbest testosteron ve leptin düzeyleri

Olgu no	Ser. Testosteron (pg/ml)	Leptin (ng/ml)
1	1.4	0.00
2	0.6	0.01
3	0.3	0.20
4	0.4	0.01
5	0.9	0.50
6	1.8	0.01
7	0.7	0.01
8	0.3	0.10
9	0.9	0.01
10	0.5	0.10
11	1.7	0.20
12	0.3	0.20
13	2.1	0.30
14	0.1	0.14
15	0.4	0.40
16	1.8	0.30

Çizelge 24. Yaş, Semen hacmi ve spermiyogram özelliklerinin gruplardaki ortalama değerleri

Grup	Yaş	Semen hacmi (ml)	Konsantrasyon (x10 ⁶ /ml)	Motilite (% motil)	Morfoloji (% normal)
A					
Ortalama±SD	32.1±5.9	3.3±1.1	53.1±31.6	71.3±6.6	17.8±4.4
Ortanca	30.5	3.0	45.0	70.0	16.0
(min-maks)	(20-47)	(1.5-6.0)	(24.0-150.0)	(45.0-80.0)	(14.0-30.0)
B					
Ortalama±SD	34.0±6.4	2.8±0.9	12.4±3.9	64.0±10.0	3.9±2.1
Ortanca	33.0	3.0	14.0	70.0	4.0
(min-maks)	(23-58)	(2.0-5.0)	(4.0-18.0)	(45.0-80)	(1.0-9.0)
C					
Ortalama±SD	31.8±7.9	3.5±1.6	46.4±24.5	68.4±7.9	6.5±2.6
Ortanca	30.5	3.0	40.0	70.0	7.0
(min-maks)	(19-58)	(2.0-8.0)	(20.0-130.0)	(50.0-80.0)	(1.0-10.0)
D					
Ortalama±SD	29±5.3	3.7±1.0	27.1±22.9	18.8±14.3	2.5±1.8
Ortanca	29.5	4.0	20.0	25.0	2.0
(min-maks)	(21-38)	(2.0-5.0)	(8.0-90.0)	(0.0-35.0)	(1.0-6.0)
E					
Ortalama±SD	32.6±5.0	2.8±1.5			
Ortanca	31.5	2.2			
(min-maks)	(25-40)	(1.0-8.0)			

Çizelge 25. Seminal sıvıda NAD-MDH, NADP-MDH ve LDH aktivitelerinin ortalamaları

Grup	Seminal sıvı NAD-MDH (mU/ml)	Seminal sıvı NADP-MDH (mU/ml)	Semen LDH (U/L)
A Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	93.9±52.1 95.0 (14.0-188.0)	155.1±77.7 137.5 (53.0-400.0)	1236.9±687.0 1066.5 (540-3000)
B Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	111.8±72.1 104.0 (10.0-285.0)	129.4±76.5 109.0 (19.0-295.0)	774.7±335.4 810.0 (300-1512)
C Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	104.0±46.8 105.0 (28.0-190.0)	149.2±104.4 110.0 (38.0-476.0)	945.6±493.0 746.5 (310-1944)
D Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	40.0±25.7 33.0 (10.0-86.0)	141.0±117.1 100.0 (28.0-400.0)	1517.7±729.8 1404.0 (554-2633)
E Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	38.0±43.6 21.5 (0.0-162.0)	138.0±84.3 126.0 (0.0-343.0)	940.0±465.8 830.0 (297-1998)

Çizelge 26. Seminal sıvıda GSH, glukoz ve fruktoz değerlerinin ortalamaları

Grup	GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Glukoz (mg/dl)	Fruktoz (mg/100 ml)
A Ortalama \pm SD Ortanca (min-maks)	43.5 \pm 12.9 40.4 (28.2-80.8)	2.0 \pm 2.1 1.2 (0.0-6.6)	184.7 \pm 124.8 169.0 (20.0-502)
B Ortalama \pm SD Ortanca (min-maks)	30.4 \pm 7.9 30.3 (16.1-46.4)	2.8 \pm 2.1 1.8 (1.0-8.3)	272.1 \pm 104.3 260.0 (133.0-534.0)
C Ortalama \pm SD Ortanca (min-maks)	35.7 \pm 15.0 36.3 (8.0-60.6)	1.8 \pm 1.6 1.7 (0.0-5.7)	229.9 \pm 79.9 214.0 (52.0-380.0)
D Ortalama \pm SD Ortanca (min-maks)	48.9 \pm 16.7 47.4 (12.1-80.8)	4.0 \pm 1.4 3.5 (2.6-6.7)	706.6 \pm 143.3 732.5 (500-900)
E Ortalama \pm SD Ortanca (min-maks)	18.7 \pm 13.6 14.6 (0.0-50.5)	15.4 \pm 6.4 15.6 (6.4-29.5)	338.1 \pm 228.2 239.0 (135-964)

Çizelge 27. Seminal sıvıda serbest testosteron ve leptin düzeylerinin ortalamaları

Grup	Serbest Testosteron (pg/ml)	Leptin (ng/ml)
A Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	2.4±1.3 1.8 (1.2-8.5)	0.20±1.9 0.12 (0.0-0.9)
B Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	2.1±1.6 1.3 (0.5-6.5)	0.11±0.1 0.08 (0.0-0.3)
C Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	3.7±2.3 3.1 (0.8-8.7)	0.16±0.11 0.15 (0,0-0.4)
D Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	3.6±1.2 3.5 (1.0-5.8)	0.14±0.13 0.11 (0.0-0.5)
E Ortalama±SD Ortanca (min-maks)	0.9±0.6 0.65 (0.1-2.1)	0.15±0.15 0.12 (0.0-0.5)

Çizelge 28. A Grubu sperm örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri

Olgu no	Sperm NAD-MDH (mU/ml ejakülat)	Sperm NADP-MDH (mU/ml ejakülat)	Sperm LDH (U/L)
1	48	19	202
2	80	14	1721
3	52	9	1755
4	33	14	1654
5	57	14	500
6	95	14	1458
7	33	9	1633
8	95	19	1147
9	43	0	2870
10	95	14	670
11	104	0	404
12	57	0	1958
13	81	0	972
14	48	0	2093
15	109	0	1242
16	147	0	702
17	48	24	1238
18	95	28	608
19	109	9	547
20	105	0	486
21	119	9	378
22	95	0	1215
23	109	0	1147
24	86	0	810
25	95	38	1215
26	76	0	2498
27	76	0	1020
28	90	0	810
29	86	9	770
30	71	0	980
31	114	0	1800
32	95	0	1458
33	124	0	1210
34	114	0	1100
35	95	0	972
36	114	0	1210
37	100	0	810
38	95	0	780
39	105	0	1020
40	100	0	980

Çizelge 29. B Grubu sperm örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri

Olgu no	Sperm NAD-MDH (mU/ml ejakülat)	Sperm NADP-MDH (mU/ml ejakülat)	Sperm LDH (U/L)
1	9	0	2160
2	57	76	405
3	9	66	405
4	19	76	1580
5	0	19	540
6	0	66	607
7	28	0	310
8	132	28	607
9	147	38	540
10	147	38	864
11	100	33	635
12	105	0	1370
13	147	0	1755
14	124	0	864
15	124	0	540
16	128	33	162
17	105	0	304
18	114	0	743
19	81	0	750
20	124	28	158
21	128	0	290
22	86	0	1478
23	100	0	472
24	100	0	1472
25	95	0	985

Çizelge 30. C Grubu sperm örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri

Olgu no	Sperm NAD-MDH (mU/ml ejakülat)	Sperm NADP-MDH (mU/ml ejakülat)	Sperm LDH (U/L)
1	162	71	1418
2	171	66	783
3	166	80	1350
4	214	71	1654
5	235	71	378
6	142	19	432
7	285	19	1120
8	166	57	460
9	223	28	1053
10	214	42	702
11	114	0	460
12	124	0	680
13	110	0	500
14	105	0	547
15	119	0	1020
16	119	0	1350
17	38	0	460
18	105	0	870
19	95	0	702
20	100	0	1120
21	62	0	680
22	47	0	608
23	86	0	810
24	180	24	910
25	114	0	610
26	62	0	1120

Çizelge 31. D Grubu sperm örneklerinde MDH ve LDH aktiviteleri

Olgu no	Sperm NAD-MDH (mU/ml ejakülat)	Sperm NADP-MDH (mU/ml ejakülat)	Sperm LDH (U/L)
1	81	0	2295
2	95	0	581
3	143	0	607
4	105	0	607
5	86	0	337
6	114	0	493
7	66	0	472
8	81	0	95
9	95	0	607
10	119	95	2633
11	147	0	175
12	105	0	472

Çizelge 32. Sperm örneklerinde NAD-MDH, NADP-MDH ve LDH aktivitelerinin ortalamaları

Grup	Sperm NAD-MDH (mU/ml)	Sperm NADP-MDH (mU/ml)	Sperm LDH (U/L)
A			
Ortalama±SD	87.3±26.5	6.0±9.3	1152.2±576.0
Ortanca	95.0	0.0	1060.0
(min-maks)	(33.0-147.0)	(0.0-38.0)	(202-2870)
B			
Ortalama±SD	88.3±49.3	20.0±26.7	799.8±537
Ortanca	100.0	0.0	607.0
(min-maks)	(0.0-147.0)	(0.0-76.0)	(158-2160)
C			
Ortalama±SD	136.8±61.8	21.0±29.2	838.3±349.3
Ortanca	119.0	0.0	742.5
(min-maks)	(38-285)	(0.0-80.0)	(378-1654)
D			
Ortalama±SD	103.0±24.6	7.9±27.4	781.1±806.8
Ortanca	100.0	0.0	537.0
(min-maks)	(66.0-147.0)	(0.0-95.0)	(95-2633)

Çizelge 33. Gruplardaki değişkenlerin A (Kontrol) grubu ile karşılaştırılmaları sonucunda “p” değerleri

Konsantrasyon	B	C	D	E
A	0.000		0.001	
Motilite				
A	0.000		0.000	
Morfoloji				
A	0.000	0.000	0.000	
Seminal sıvı NAD-MDH				
A			0.001	0,000
Sem. Sıvı LDH				
A	0.006		0.01	
GSH				
A	0.000			0,000
Glukoz				
A	0.025		0.002	0,000
Fruktoz				
A	0.006		0.000	0,015
Testosteron				
A	0.014	0.055	0.004	0,000
Leptin				
A	0.013			
Sperm NAD-MDH				
A		0.01		
Sperm LDH				
A	0.008	0.020	0.005	

Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 34. Gruplardaki değişkenlerin birbirleri ile karşılaştırılmaları sonucunda “p” değerleri

Konsantrasyon	C	D	E
B	0.01		
C		0.01	
Motilite			
B		0.01	
C		0.01	
Morfoloji			
B	0.01		
C		0.01	
Seminal sıvı NAD-MDH			
B		0.01	0.000
C		0.01	0.000
Semi. Sıvı LDH			
C			
GSH			
B		0.01	0.001
C		0.01	0.001
D			0.000
Glukoz			
B		0.01	0.000
C		0.01	0.000
D			0.000
Fruktoz			
B		0.01	
C		0.01	
D			0.000
Testosteron			
B	0.01	0.01	0.003
C			0.000
D			0.000
Sperm NAD-MDH			
B	0.01		

Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

Çizelge 35. A Grubundaki değişkenlerin kendi içerisinde korelasyonu
(r= korelasyon katsayısı)

Karşılaştırılan değişkenler	r	P
Sperm motilitesi ile semende NAD-MDH	- 0,367	0,02
Seminal sıvı LDH ile sperm konsantrasyonu	0,339	0,03
Leptin ile sperm konsantrasyonu	- 0,328	0,03
Semi. sıvı LDH ile glukoz	0,421	0,007
Glukoz ile testosteron	0,424	0,006
Sperm NADP-MDH ile sperm NAD-MDH	- 0,356	0,02
Sperm NAD-MDH ile sperm LDH	- 0,343	0,03

Çizelge 36. B Grubundaki değişkenlerin kendi içerisinde korelasyonu

Karşılaştırılan değişkenler	r	P
Hasta yaşı ile sperm motilitesi	0,440	0,02
Hasta yaşı ile sperm morfolojisi	0,437	0,02
Sperm konsantrasyonu ile sperm motilitesi	0,544	0,005
Sperm konsantrasyonu ile sperm morfolojisi	0,416	0,03
Sperm motilitesi ile sperm morfolojisi	0,468	0,01
Glukoz ile sperm morfolojisi	- 0,460	0,02
Fruktoz ile sperm konsantrasyonu	- 0,424	0,03
Semi.sıvı NAD-MDH ile semi. sıvı LDH	- 0,648	0,000
Semi.sıvı NAD-MDH ile testosteron	0,497	0,01
Semi.sıvı NAD-MDH ile leptin	- 0,416	0,03
Glukoz ile fruktoz	0,481	0,01
Semi.sıvı NAD-MDH ile sperm NADP-MDH	0,461	0,02

Çizelge 37. C Grubundaki değişkenlerin kendi içerisinde korelasyonu

Karşılaştırılan değişkenler	r	P
Hasta yaşı ile sperm motilitesi	0,516	0,007
Semi.sıvı NADPH-MDH ile semen hacmi	- 0,475	0,01
Hasta yaşı ile fruktoz	- 0,393	0,04
Sperm konsantrasyonu ile sperm motilitesi	0,487	0,01
Sperm motilitesi ile sperm morfolojisi	0,579	0,002
Semi.sıvı NAD-MDH ile semi.sıvı LDH	- 0,607	0,001
Semi.sıvı LDH ile GSH	0,662	0,000
Semi.sıvı NAD-MDH ile fruktoz	- 0,547	0,004
Semi.sıvı NAD-MDH ile leptin	0,536	0,005
Sperm NAD-MDH ile semi.sıvı NAD-MDH	0,572	0,002
Sperm NAD-MDH ile semi.sıvı LDH	- 0,702	0,000
Semi.sıvı NAD-MDH ile GSH	- 0,470	0,01

Çizelge 38. D Grubundaki değişkenlerin kendi içerisinde korelasyonu

Karşılaştırılan değişkenler	r	P
Semen hacmi ile semi.sıvı NADP-MDH	- 0,603	0,03
Sperm motilitesi ile semi.sıvı NAD-MDH	0,703	0,01
Sperm morfolojisi ile semi.sıvı NADP-MDH	- 0,603	0,03
Semi.sıvı NAD-MDH ile sperm motilitesi	0,703	0,01
Semi.sıvı NADP-MDH ile semen hacmi	- 0,603	0,03
Semi.sıvı NADP-MDH ile sperm morfolojisi	- 0,652	0,02
Semi.sıvı LDH ile sperm konsan.	0,577	0,04
Semi.sıvı LDH ile sperm morfolojisi	- 0,864	0,000
Semi.sıvı NADP-MDH ile GSH	0,603	0,03
Glukoz ile sperm motilitesi	- 0,630	0,02
Glukoz ile sperm morfolojisi	- 0,703	0,01
Glukoz ile semi.sıvı NAD-MDH	- 0,616	0,03

Çizelge 39. E Grubundaki değişkenlerin kendi içerisinde korelasyonu

Karşılaştırılan değişkenler	r	P
Semi.sıvı NAD-MDH ile semen LDH	- 0,513	0,042
Glukoz ile fruktoz	0,842	0,000
Hasta yaşı ile leptin düzeyi	0,591	0,016

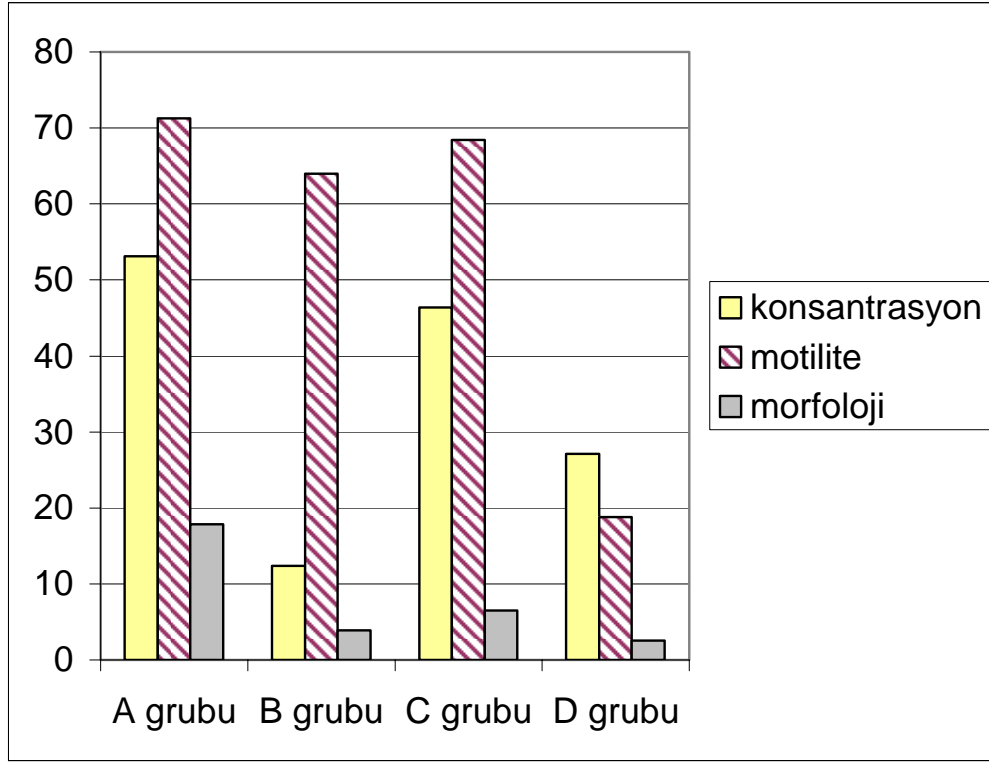
İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizinde ve grafiklendirilmesinde SPSS (12.0) ve Excell paket programlarından yararlanılmıştır.

Grupların karşılaştırılmasında “ Mann Whitney U Testi “ kullanılmıştır.

Gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.

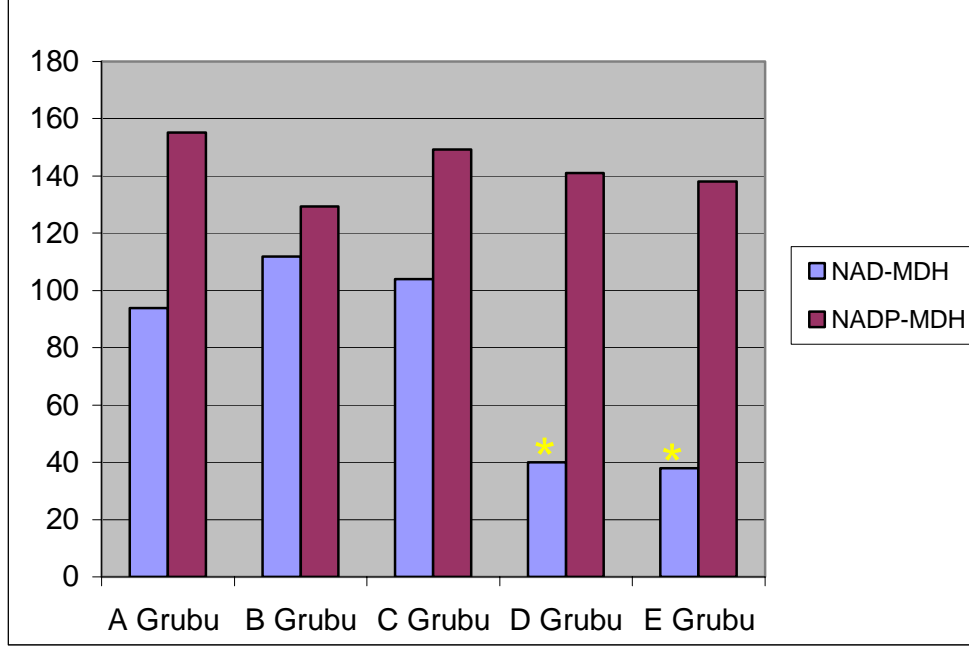
Gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı kabul edilmiştir.



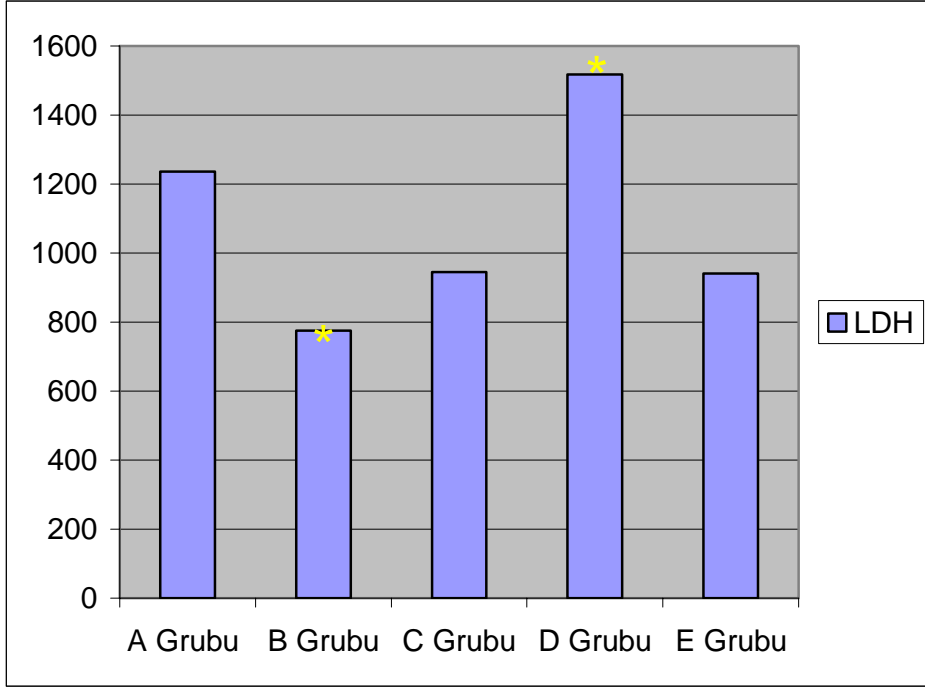
Şekil 35. Spermioyogram değerlendirilmesine göre grupların karşılaştırılması

konsantrasyon- $\times 10^6/\text{ml}$
 motilite- % motil
 morfoloji- % normal olarak değerlendirilmiştir

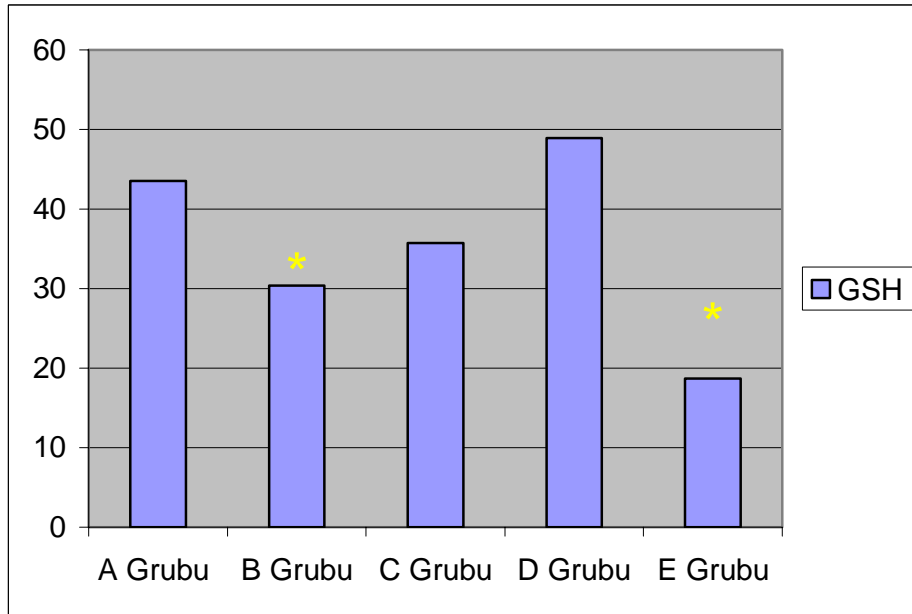
Bu bölümde yer alan grafikler, değişkenlerin ortalama değerleri kullanılarak gösterilmiş, bütün gruplar kontrol grubuyla karşılaştırılarak $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı kabul edilen sütunlar * ile işaretlenmiştir.



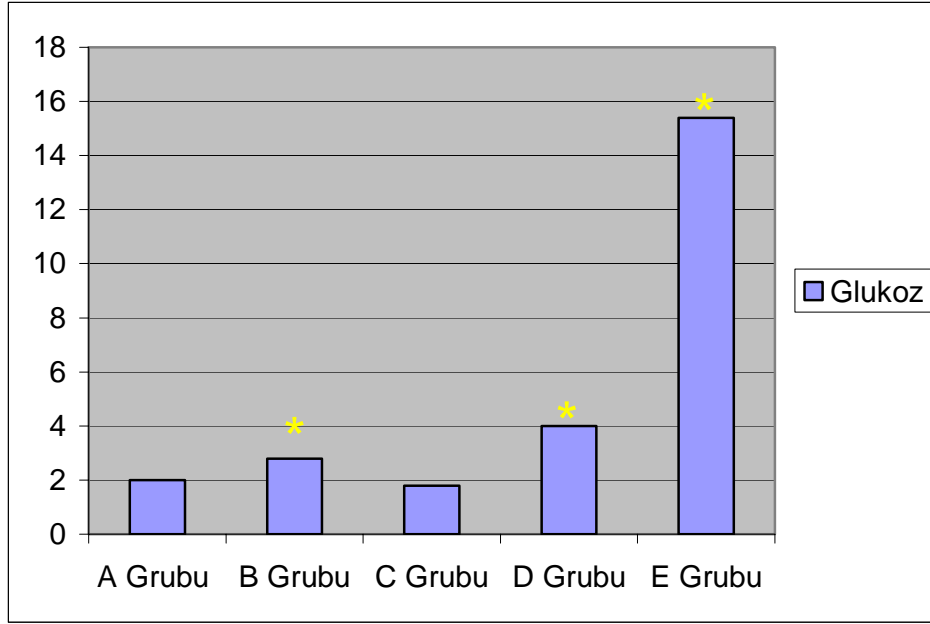
Şekil 36. Seminal sıvıda NAD-MDH ve NADP-MDH aktiviteleri (mU/ml)



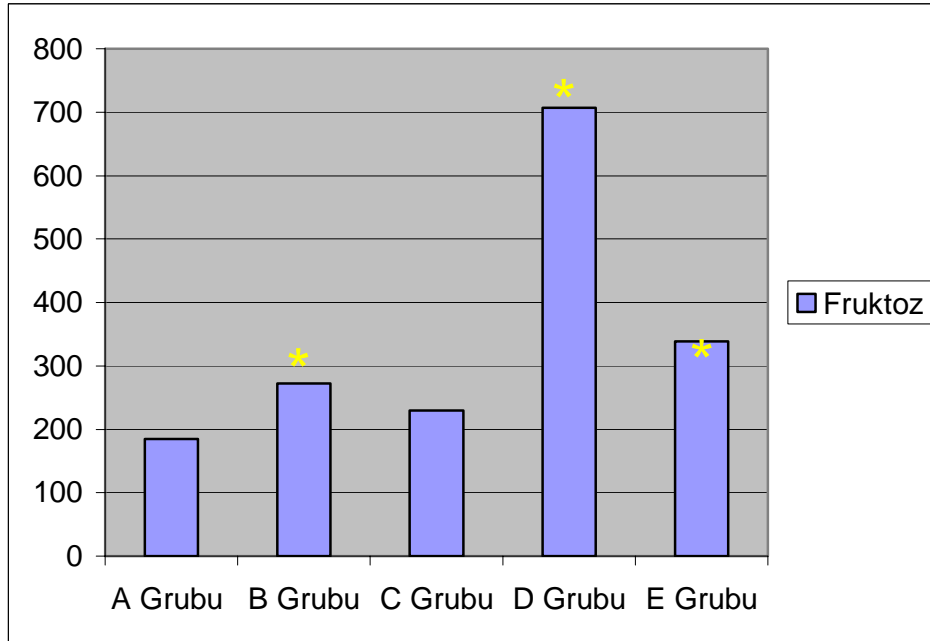
Şekil 37. Seminal sıvıda LDH aktivitesi (U/L)



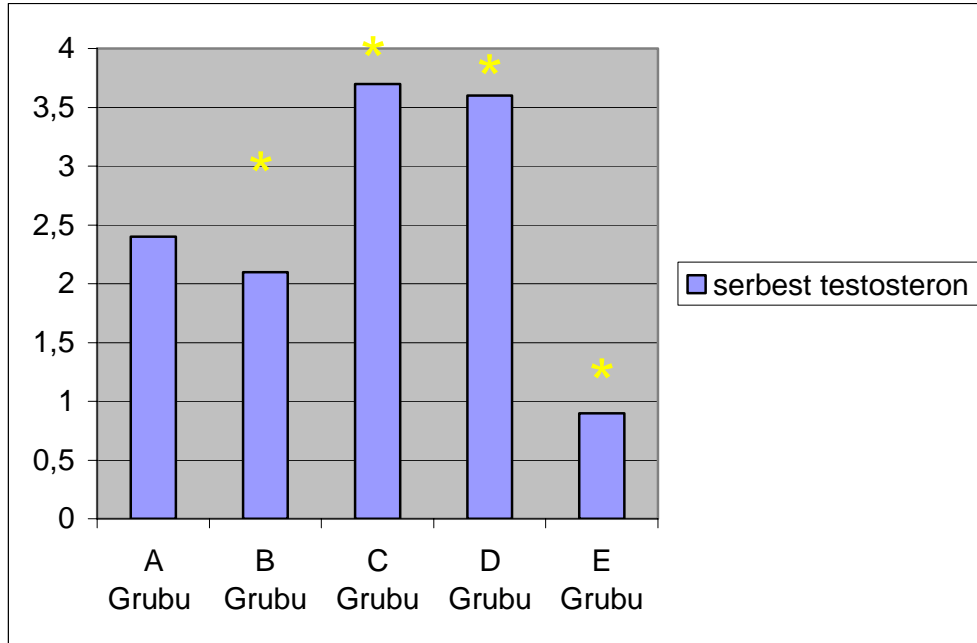
Şekil 38. Seminal sıvıda GSH düzeyi (µmol/L)



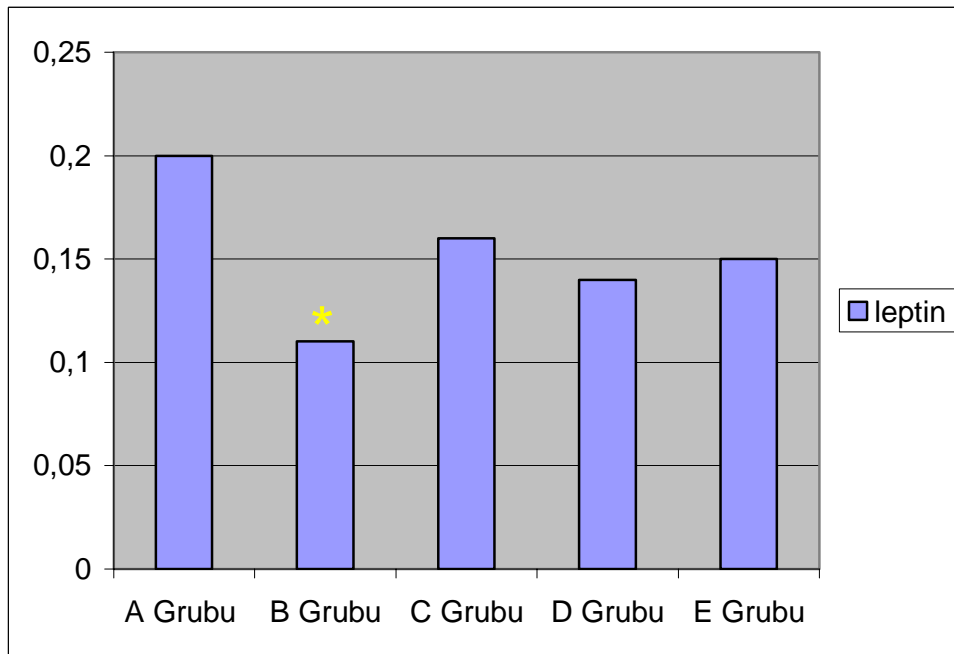
Şekil 39. Seminal sıvıda glukoz düzeyi (mg/dl)



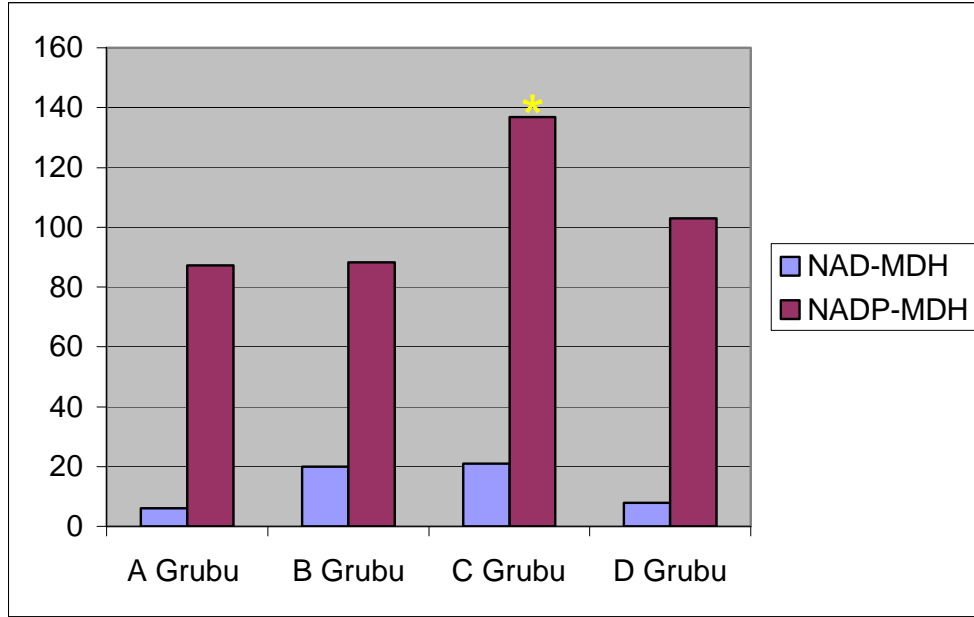
Şekil 40. Seminal sıvıda fruktoz düzeyi (mg/100 ml)



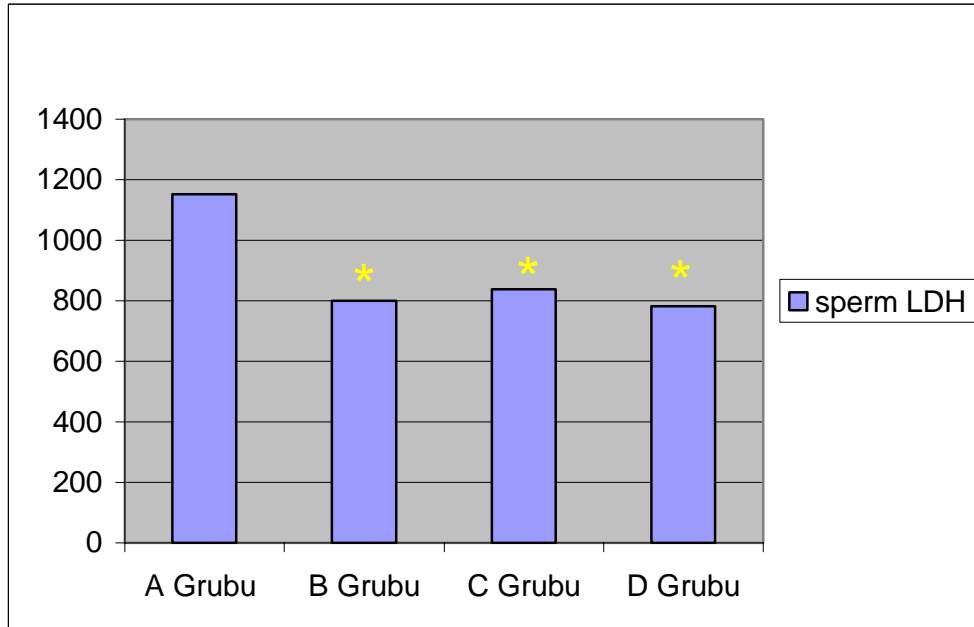
Şekil 41. Seminal sıvıda serbest testosteron düzeyi (pg/ml)



Şekil 42. Seminal sıvıda leptin düzeyi (ng/ml)



Şekil 43. Sperm homojenatlarında NAD ve NADP bağlı MDH aktiviteleri (mu/ml)



Şekil 44. Sperm homojenatlarında LDH aktivitesi (U/L)

5. TARTIŞMA

Yapılan araştırmalarda, toplumlarda infertilite oranının % 10-15 dolayında olduğu bildirilmiştir. İnfertilite problemi ile başvuran çiftlerin yaklaşık % 50'sinde erkeğe bağlı faktörün olması, “erkek fertilizasyon kapasitesinin araştırılmasını” atılacak ilk adım olarak beraberinde getirmektedir.

İnfertilitede erkek faktörünün kesinlik kazanabilmesi için; öykü, genel fizik muayene, semen analizi ve hormonal tetkikler sırasıyla yapılmalı ve gereğinde testis biyopsisi; biyokimyasal ve fonksiyonel testlerle desteklenmelidir. Bu nedenle erkek faktörünü ortaya koyan en basit test spermiyogramdır. Dikkatli bir şekilde yapılan semen analizi testislerin spermatogenetik ve steroidogenetik aktivitesiyle aksesuar bezlerin çalışması hakkında sağlıklı bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır.

5.1. Örnek Seçimi ve Spermiyogram Özelliklerine Göre Değerlendirme

Çalışmada, örneklerin seçimi yapılırken olguların herhangi patolojik bir öyküsü esas alınmamış ancak lökosit içeren, viskoz olan ve anormal bir görüntüye sahip (örneğin kanlı) örnekler çalışmada kullanılmamış, perhiz süresine uygun olarak (ortalama 3-5 gün) toplanmış örneklerin ayrılmasına dikkat edilmiştir. Bunun dışında örnekler; yaş ve semen hacmi yönünden bir seçime tabi tutulmamış, mevsimsel ve kişisel varyasyonlar göz önüne alınmayıp hiç bir olgu çalışılan hiç bir değeri yönünden zaman içerisinde takibe alınmadan tamamen rastgele seçimler yapılmıştır. Olgular sadece spermiyogram (konsantrasyon, motilite ve morfoloji) özelliklerine bağlı olarak aşağıda belirtildiği şekilde gruplandırılmışlardır:

A Grubu (n = 40) - Konsantrasyon, motilite ve morfoloji normal
(Kontrol grubu, normospermi)

B Grubu (n = 25) - Konsantrasyon ve morfoloji düşük, motilite normal
(oligoteratospermi)

C Grubu (n = 26)- Konsantrasyon ve motilite normal , morfoloji düşük
(teratospermi)

D Grubu (n = 12)- Motilite düşük (astenospermi)

E Grubu (n = 16)- Azospermik (semende sperm bulunmaması)

Gruplar arasında yaş ve semen hacmi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit edilmemiştir.

Yapılan çalışmalarda yaşa bağlı olarak yılda; semen hacminin 0.03 ml, motilitenin % 0.7, progresif motilitenin % 3.1 azaldığı bildirilmiştir. Sağlıklı erkeklerde semen hacmi, sperm sayısı, motilite ve morfoloji özellikleri yönünden varyasyonlar olabileceği vurgulanmıştır⁹⁴. Örneğin perhiz (abstinans) süresine bağlı olarak gün başına semen hacminde 0.62 ml, sperm sayısında $17.6 \times 10^6/\text{ml}$ ve motilitede % 1.2'lik artış olduğu açıklanmıştır⁹⁵. Çalışılan örneklerde sperm sayısındaki düşmenin % motilitede azalmaya ve morfolojik olarak % anormal olarak ifade edilen sperm sayısında da artışa neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda B grubundaki örneklerde, sperm konsantrasyonu ($12.4 \pm 3.9 \times 10^6/\text{ml}$) ile morfoloji (3.9 ± 2.1) arasında pozitif korelasyon ($r = 0.416$ $p = 0.03$) saptandı. C grubundaki örneklerde ise sperm konsantrasyonu (46.4 ± 24.5) ile motilite (68.4 ± 7.9) arasında pozitif korelasyon ($r = 0.487$ $p = 0.01$) tesbit edildi. Normal (ya da fertil) kabul edilecek semen örneğinde; sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji değerlerinin de normal kabul edilen sınırlarda bulunması beklenmektedir. Doğal olarak konsantrasyon, motilite ve morfoloji arasında saptanan korelasyonlar o semen örneğinin fertil ya da infertil olarak hangi grupta yer alacağını belirtecektir.

5.2. MDH Aktivitesi İle İlgili Değerlendirme

MDH pek çok metabolik yolun önemli bir enzimidir. Ökaryotik hücrelerde mitokondrial ve sitoplazmik olmak üzere iki izozim olarak bulunmaktadır. Mitokondriya ve sitozolde bulunan MDH, NAD'yi koenzim olarak kullanır; malat, okzaloasetata redüklenirken NADH açığa çıkar. Diğer NADP bağımlı MDH ise, daha çok sitozolde bulunan temizleyici bir enzimdir. Bu sınıf MDH'ın birincil görevi, malatın dekarboksilasyonunu gerçekleştirerek pirüvat, NADPH ve CO₂ oluşturmasıdır²⁸.

MDH1 geni; böbrek, akciğer, kalp, iskelet kası, karaciğer, pankreas, prostat, dalak, timus, beyin ve omurilikte eksprese edilmiştir³⁵. Brooks, (1978) spermatozoanın epididimal dokudan 5-400 kat daha aktif NADP+-malat dehidrogenaz içeriğine sahip olduğunu açıklamıştır⁹⁶. Prasad ve ark. (1976) normal, vazektomize, oligospermik ve infertil erkeklerden elde edilen 99 semen örneğinde MDH düzeyini

elektroforetik olarak çalışmışlar, bu gruplarda MDH'ın farklı bir sonuç göstermediğini açıklamışlardır⁹⁷. Gronczewska J ve ark. (2003) ringa balığı spermatozoasında malik enzim aktivitesini göstermişlerdir⁹⁸. Yaptığımız araştırmalarda, bu bilgiler dışında, insan semeninde, spermde MDH aktivitesi ile ilgili açıklama ya da üreme üzerinde olası direk ya da dolaylı bir etkisini vurgulayan bir literatür bilgisine rastlamadık. Karşılaştırılan kaynaklar daha fazla MDH'ın moleküler yapısını açıklayan özellikteydi. Bu nedenle MDH aktivitesi ile ilgili sonuçlarımızı tartışırken herhangi bir literatür bilgisiyle karşılaştırma imkanı olmadan verilerimizi kendi içinde kıyaslama durumunda kaldı.

MDH aktivitesi çalışma gruplarının seminal sıvı ve sperm bölümlerinde NAD ve NADP bağımlı olmak üzere iki formda incelenmiştir.

Seminal sıvıda NAD-MDH aktivitesi (ortalama±SD) A grubunda, 93.9±52.1 mU/ml); D (40.0±25.7 mU/ml) ve E (38.0±43.6 mU/ml) gruplarına oranla anlamlı düzeyde (D ve E grubu için $p<0,05$) yüksek bulunmuştur. D grubundaki olguların ortak özelliği motilitesi düşük örneklerin seçilmiş olmasıdır. Bu durumda MDH aktivitesindeki artışın, sperm motilitesinin artmasına destek olduğu sonucunu düşündürmektedir. E grubu azospermik örneklerden oluşmaktadır. Bu grup seminal sıvının diğerlerinden oldukça düşük MDH aktivitesine sahip olması ilginç görünmüştür.

Diğer grupların seminal sıvısında NAD-MDH aktivitesi karşılaştırıldığında; B grubu D ile E'den, C grubu da D ile E'den anlamlı düzeyde ($p<0,01$) yüksek bulunmuştur.

Kontrol grubuna (A grubu) benzer şekilde B (111.8±72.1 mU/ml) ve C (104.0±46.8 mU/ml) gruplarında da MDH aktivitesi D ve E gruplarından yüksek bulunmuştur. B ve C grupları belirli sperm özellikleri yönünden (morfoloji ya da motilite) A grubundan farklıdır. Bunların seminal sıvılarında MDH aktivitesi A grubundan anlamlı olarak farklıdır. Oysaki D grubu bütün özellikleri yönünden (konsantrasyon, motilite ve morfoloji ortalaması düşük) A grubundan farklı bulunmuştur. Bu durumda sperm aktivitesini etkileyen faktörlerin (konsantrasyon, motilite, morfoloji) hepsinin yetersiz düzeylerde bulunması ile MDH aktivitesinin düşüklüğü arasında bir ilişki bulunduğu ve bunda da motilitenin en yüksek payı oluşturduğu düşünülmüştür. Çünkü D grubu seminal sıvı örneklerinde MDH aktivitesi ile sperm motilitesi arasında da pozitif korelasyon ($r=0.703$ $p=0.01$) saptanmıştır.

Seminal sıvı örneklerinde NADP-MDH aktivitesi de saptanmış olup oligoteratospermik grupta bu aktivite (129.4 ± 76.5 mU/ml) kontrol grubundan (155.1 ± 77.7 mU/ml) biraz düşük gibi görünmekle beraber istatistiksel olarak anlamlı bir fark vermemiştir. Oysa Dikmen ve ark. seminal sıvıda NADP-bağımlı dehidrogenaz aktivitesini çalışmışlar; oligospermik örneklerde dehidrogenaz aktivitesini kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük bulduklarını açıklamışlardır⁹⁹. Bu aktivitenin MDH ya da G6PD dışında olası bir başka dehidrogenazdan kaynaklanabileceği ve bu konunun daha ileri araştırmalarla aydınlatılması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmanın bir diğer bölümünde sperm örnekleri homojenize edilerek hazırlanan homojenatta sperm konsantrasyonu 20×10^6 /ml olarak düzenlenmiş ve NAD/NADP – MDH ve LDH enzim aktiviteleri mU/ml ($mU/20 \times 10^6$ /ml) homojenat olarak değerlendirilmiştir.

C grubu sperm örneklerinde NAD-MDH aktivitesi (ortalama \pm SD) 136.8 ± 61.8 mU/ml ejakülat) A (87.3 ± 26.5 mU/ml) ve B (88.3 ± 49.3 mU/ml) gruplarından anlamlı düzeyde (A grubu için $p < 0.05$ B grubu için $p < 0.01$) yüksek bulunmuştur. C grubunun A grubundan tek farkı morfolojinin bozuk olmasıdır. Bu durumda, morfolojideki defektlerin sınıflandırılarak değerlendirilmesinin enzim aktivitesindeki farkları açıklamaya ışık tutabileceği düşünülmektedir.

MDH, “malat-aspartat shuttle” yolunun önemli bir enzimi olup sitozolik NADH’ın mitokondriye taşınmasında etkili bir rol oynar ve oksidatif ATP üretimi gerçekleşir. MDH aktivitesindeki düşme dokularda ATP üretiminin de azalmasına yol açmaktadır. LDH ise çeşitli metabolik durumlarda stabil yapıda olan bir enzimdir ve sitozolik MDH/LDH oranının hayvan dokularında enerji metabolizmasının değerlendirilmesinde faydalı bir indikatör olduğu bildirilmiştir. Hosoya ve ark. çalışmalarında yarış atlarının yarışlarda yüksek performans gösterebilmek için etkili bir enerji üretim sistemine ihtiyaç duyduklarını ve bu hayvanların lökositlerinde sitozolik MDH/LDH oranının yarış atlarının enerji metabolizmasını değerlendirmede önemli bir gösterge olduğunu açıklamışlardır¹⁰⁰.

Çalışma planlanırken spermin enerji metabolizması üzerinde etkili olabilecek unsurlar üzerinde durulmuş ve MDH aktivitesinin sperm fonksiyonlarını etkileyebileceği düşünülmüştür. Yukarıda yapılan çalışmada olduğu gibi sperm hücreleri de etkinliklerini gerçekleştirebilmek ve dolayısıyla hareket yetenekleri için

etkili bir enerji metabolizmasına ihtiyaç duyarlar. Çalışmada MDH aktivitesi ve sperm motilitesi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Bu durum, MDH aktivitesinin değerlendirilmesinin sperm enerji metabolizmasının hangi yönde işlediği konusunda destekleyici bilgi oluşturacağı görüşünü destekliyor görünmektedir.

MDH/LDH oranının değerlendirilmesinin hücrelerde enerji metabolizmasını irdeleme yönünde iyi bir gösterge olduğu görüşünden yola çıkarak gruplarda MDH ve LDH arasındaki ilgi araştırıldı. Bu durumda :

- A grubunda sperm NAD-MDH ile sperm LDH arasında negatif korelasyon ($r = -0.343$ $p = 0.03$)

- A grubunda spermde NAD-MDH ile NADP-MDH arasında negatif korelasyon ($r = -0.356$ $p = 0.02$) tesbit edilmiştir.

- B grubunda seminal sıvı NAD-MDH ile seminal sıvı LDH arasında negatif korelasyon ($r = -0.648$ $p = 0.000$)

- C grubunda seminal sıvı NAD-MDH ile seminal sıvı LDH arasında negatif korelasyon ($r = -0.607$ $p = 0.001$)

- C grubunda sperm NAD-MDH ile seminal sıvı LDH arasında negatif korelasyon ($r = -0.702$ $p = 0.000$)

- C grubunda sperm NAD-MDH ile seminal sıvı NAD-MDH arasında pozitif korelasyon ($r = 0.572$ $p = 0.002$)

- E grubunda seminal sıvı NAD-MDH ile seminal sıvı LDH arasında negatif korelasyon ($r = -0.513$ $p = 0.042$)

Yukarıdaki yedi maddeyle ilgili korelasyonları toplu olarak değerlendirildiğinde; genel olarak gruplarda seminal sıvı ya da spermde NAD-MDH ve LDH aktivitesi arasında negatif korelasyon görülmüştür. Spermde mitokondriler aktif duruma geçip malat (aynı zamanda koenzim olarak da NAD) kullanılmaya başladığında MDH aktivitesi artmakta fakat bu arada laktat kullanımını azaldığı için LDH aktivitesinin düşmekte olduğunu düşünülmüştür. Buna bağlı olarak pirüvatın kullanımının yetersiz kaldığı ve mitokondrilerin yeterince aktivite gösteremediği (örneğin yeterince oksijen alamadığı) olgularda; mitokondriyal bir enzim olan MDH aktivitesi düşük kalmakta bu durumda laktatın, glikolitik yolu kullanmaya yönelerek LDH aktivitesinin yükselmesine neden olması muhtemel gibi görünmektedir.

Gerez ve ark. çalışmalarında medyumda belirli konsantrasyonda (0.5-4 mM) bulunan malatin, sperm mitokondrisi tarafından pirüvat tüketimi ve Pirüvat Dehidrogenaz aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir ¹⁰¹.

Lahnsteiner ve ark. bir alabalık çeşidi olan *Oncorhynchus mykiss*'de semen fertilizasyon kapasitesi ve sperm motilitesi, seminal plazma kompozisyonu ile sperm metabolizması arasındaki ilgiyi araştırarak semen kalitesinin biomarker'larını belirlemeye çalışmışlardır ¹⁰².

Seminal plazmada sperm metabolizması için fikir verebilecek derecede öneme sahip şu analizler bildirilmiştir:

1. Spermatozoa için izotonik ortam sağlayan, motiliteyi inhibe eden inorganik bileşikler (pH, sodyum, potasyum, kalsiyum, ozmolilite) (Morisawa ve ark. 1983).
2. Enerji metabolizmasının belirteci olan organik bileşikler (trigliseritler, gliserol, yağ asitleri, glukoz, laktat) (Lahnsteiner ve ark. 1993).
3. Litik enzimler (asit fosfataz, alkalen fosfataz, β -D-glukuronidaz, proteaz); dejenere spermatozoanın elimine edilmesinden sorumlu ve muhtemelen spermatozoa dışına sızan enzimler (malat dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz, adenosin trifosfataz, aspartat aminotransferaz) ¹⁰².

Sperm metabolizmasıyla ilgili olarak yapılan çalışmalarda MDH, solunum aktivitesi, aspartataminotransferaz aktivitesi ve total lipit düzeylerinin fertilizasyon oranında (multiple regresyon modelinde % 75'den fazla total varyans ile) semen kalitesini açıklayan belirteçler olduğu bildirilmiştir. Uzun süre bekletilen semen örneğinde MDH sızmasının gerçekleştiği ve solunum aktivitesinin arttığı açıklanmıştır. Enzim düzeylerindeki artış anoksik şartlarda yetersiz enerji ihtiyacına cevap vermek amacıyla gerçekleşmektedir. Bu enzimler ve sperm motilitesi arasında korelasyon saptanmıştır. Metabolik blokerlerle yapılan deneyler sperm enerji metabolizması ve motilitesinin oksidatif fosforilasyon ve sitrat siklusuna bağlı olduğunu göstermiştir (Lahnsteiner ve ark. 1997) ¹⁰².

Memeli spermatozoası, oosit fertilizasyonu öncesi biyokimyasal modifikasyonlara ihtiyaç duymaktadır. Bu modifikasyonlar bir hazırlık dönemi olan kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu içerir. Sperm katabolik olaylar sonucunda kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu için gereken enerjiyi üretir. MDH, redükte ekivalenlerin iç mitokondrial membran boyunca taşınmasında önemli rol oynar;

MDH'in somatik hücrelerde mitokondrial izoenzimlerinin bulunması bu durumda etkilidir. MDH-NADP enzimi, pentoz fosfat yolu ile sitozolde yerleşmiştir ve hücrede redükte NADP'nin ana kaynağıdır. MDH-NAD koç, domuz ve sığır spermatozoasının orta parçasında bulunmuştur. Redükte ekivalenlerin sitozolden mitokondriya taşınması "malat-aspartat shuttle" ile gerçekleşmektedir. Cordoba ve ark. sığır spermatozoasında yaptıkları çalışmada, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu indüksiyonu sonrasında NAD(P)-bağımlı MDH ve izositrat dehidrogenaz aktivitesini ölçmüşler; MDH'in NADP formunun aktivitesinin daha sabit seyrettiğini, MDH-NAD aktivitesinin ise azaldığını bildirmişlerdir. Cordoba ve ark. çalışmaları sonunda bu enzimlerin kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarında redükte ekivalen ve/veya temininde önemli rol oynadıklarını açıklamışlardır. Biz de bu çalışmaya benzer şekilde, MDH'in NAD formunda gruplar arasında (hem seminal sıvı hem de sperm için) istatistiksel olarak anlamlı farklar bulup NADP formunun ise daha stabil seyrettiğini tesbit ettik. Bu durum NAD bağlı MDH'in sperm enerjisi ile ilgili olaylarda daha aktif olduğunu düşündürdü¹⁰³.

Sperm örneklerinde MDH aktivitesi incelendiğinde bazı örneklerde NADP formunda aktiviteyi yoğun bir şekilde "0" olarak tesbit edildi. Sperm homojenizasyonu esnasında ısı faktörünü korumaya çalışmamıza rağmen enzimin ısı stabilitesinin düşük olduğu ve bu nedenle "0" aktivite bulunduğunu düşünüldü. Scheibe ve ark. da kloroplastlarda yaptıkları çalışmada NADP-MDH'in ısıya rezistansının düşük olduğunu, NADPH eklenmesiyle ısı instabilitesinin kazanıldığını açıklamışlardır¹⁰⁴.

Morfolojik değerlendirme, sperm araştırmalarında kullanılan temel parametrelerden biridir. Sperm defektlerinin çeşitliliği morfolojik değerlendirme için önemli olmakla beraber infertilite problemlerinin araştırmasında ve spermün kişisel değerlendirilmelerinde ek metodlara ihtiyaç duyulmaktadır (Piasecka 2001)¹⁰⁵.

Rutin sperm boyamalarıyla yapılan incelemelerde (Wang 1991, Kruger 1995, Marin 1995) sperm başı detaylı olarak; orta parça ise genel olarak değerlendirilmektedir. Bu inceleme orta parça hakkında açıklayıcı bilgi vermemektedir. Oysa ki orta parça mitokondrial tabakayı içerip bu tabaka; enerji üretimi, iyonların taşınması, akrozom reaksiyonu ve motiliteden sorumludur¹⁰⁵.

Olgun memeli sperminde yaklaşık olarak 50-75 mitokondria bulunmakta ve spermatogenez boyunca sperm mitokondrisi önemli morfolojik değişiklikler ve hücrenel

organizasyonlar geçirmektedir. Spermatozoada bulunan mitokondri (sperm-tip mitokondria), morfoloji ve biyokimyasal özellikleri yönünden somatik hücre mitokondriasinden değişiktir. Sperm ve somatik hücre mitokondrisi arasındaki morfolojik farklılıklar ¹⁰⁵:

1. Dış mitokondrial membranın fiziksel ve kimyasal özellikleri (Keyhani ve Storey 1973; Hrudka 1978,1987; Baccetti 1984; Cataldo 1996).

2. Bazı enzimlerin sperm mitokondriasına yerleşmiş özel izoformları vardır; örneğin laktat dehidrogenaz için LDHX (Hutson ve ark. 1977; Valesco ve ark. 1993; Gallino ve ark. 1994; Orlando ve ark. 1994) diaforaz (Gavella ve Lipovac, 1992), kreatin fosfokinaz (Tombes ve ark 1985; Orlando ve ark. 1994; Gavella ve ark. 1995), E1-pirüvat dekarboksilaz (Burgos ve ark. 1994); heksokinaz (Travis ve ark. 1998) ve sitokrom c_T –testise özgü formu (Hess ve ark. 1993)

3. Mitokondrial substrat ve inhibitörlere farklı duyarlılık bulunması (Dop ve ark. 1977; Storey ve Kayne 1977; Gallina ve ark.1994; Burgos ve ark. 1994). Piasecka ve ark. da sperm enerji metabolizmasının karakteristik özelliklerini ve sperm mitokondrial metabolizmayı açıklığa kavuşturacak yeni metodlara ihtiyaç duyulduğunu vurgulamışlardır ¹⁰⁵.

Kohsaka ve ark. da inceledikleri hayvanlar içerisinde LDH'ın sperm baş orta parça ve kuyrukta yerleştiğini MDH'ın ise orta parçada mitokondrial matriksde bulunduğunu (1992) açıklamışlardır ¹⁰⁶. Matsuzawa ve ark. da MDH'ın spermde iki izozim halinde (MDH-A ve MDH-B) bulunduğunu (1987) ifade etmişlerdir ¹⁰⁷.

Yukarıda verilen bilgilere bağlı olarak; sperm mitokondrial aktivitesinde MDH'ın enerji metabolizması üzerindeki önemini vurgularken, motiliteye ek olarak enzimin sperm morfolojisi üzerinde de etken, önemli bir kriter olabileceğini düşünmekte ve MDH üzerinde daha detaylı ileri çalışmaların faydalı olabileceğine inanmaktayız.

5.3. LDH Aktivitesi İle İlgili Değerlendirme

LDH glikolitik yolda, laktat ve pirüvatın dönüşümlü reaksiyonunu katalizlemektedir. Memelilerde LDH'ın 5 tetramerik izozimi bulunmakta bunları oluşturan alt birimler “A ve B” ya da “H ve M” şeklinde gösterilmektedir. Bu tetramerlerin farklı somatik dokulardaki oranları değişmekte fakat LDH-C4 sadece

olgun testis ve spermatozoada görülmektedir. LDH-C4, spermatozoada sitozolde ve akrozomun küçük bir bölümünde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda somatik LDH (özellikle LDH-4) aktivitesinin klinik bir parametre olarak kullanılmasının, germinal aktivite ve seminiferöz tübül spermatozoid kalitesinin değerlendirilmesinde iyi bir marker olduğu açıklanmıştır⁵⁵.

Çalışmamızda seminal sıvı ve sperm örneklerinde LDH aktivitesini ayrı ayrı değerlendirildi.

Li ve ark.¹⁰⁸ çalışmalarında, kontrol grubu seminal sıvı örneklerinde LDH aktivite değerini ortalama $1.49 \pm 0.02 \times 10^{-3}$ U/ml; Verdejo ve ark.¹⁰⁹ da kontrol grubu seminal sıvı örneklerinde LDH aktivitesini 2465 ± 339 IU/L olarak açıklamışlardır. Biz de çalışmamızda kontrol grubu seminal sıvı örneklerinde LDH aktivite düzeyini (ortalama \pm SD) (A grubu) 1236.9 ± 687.0 U/L olarak tesbit ettik. Aktivite değerlerindeki bu varyasyonun örnek seçimi ve deney şartlarına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

B grubu seminal sıvı örneklerinde LDH düzeyi (ortalama \pm SD 774.7 ± 335.4 U/L) kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük ($p < 0.05$) bulunmuştur. B grubu oligoteratospermik (konsantrasyon ve morfoloji düşük) örneklerden oluşmaktadır. Orlando CC ve ark. çalışmalarında oligozoospermik hastalarda LDH-X (LDH-C) düzeyini kontrol grubunun 1/3'ü kadar bulduklarını açıklamışlardır¹¹⁰. Benzer şekilde Sawane ve ark. da oligozoospermik grupta LDH-C4 aktivitesini önemli düzeyde düşük ($p < 0.01$) bulmuşlardır¹¹¹.

Çalışmada D grubu (motilite düşük) seminal sıvı örneklerinde LDH aktivitesini (ortalama \pm SD 1517.7 ± 729.8 U/L) kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek ($p < 0.05$) bulundu. Beklentimiz bunun tam tersi yönündeydi. Çünkü yapılan açıklamalar LDH aktivitesinin sperm motilitesi ile ilgili olduğu şeklindeydi. Yine bu grupta LDH aktivitesi ve morfoloji arasında negatif korelasyon ($r = -0.864$ $p = 0.000$) saptandı. D grubu seminal sıvı örneklerindeki LDH aktivitesinin yüksek olmasının seminal veziküllerden bir sızmaya bağlı ya da sperm morfolojisindeki bozukluk neticesinde sızmaya bağlı olabileceğini düşünüyoruz. D grubundaki olguların sperm LDH düzeyinin (781.1 ± 806.8 U/L) kontrol grubundan (1152.2 ± 576.0 U/L) anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) düşük olması da bu durumu doğrulamaktadır. Bu durum sperm metabolizmasında olumsuz etki oluşturarak hareket kaybını provoke ettiği düşüncesini telkin etmiştir.

A ve D grubu seminal sıvı örneklerinde LDH aktivitesi ve sperm sayısı arasında pozitif korelasyon (A grubu için $r=0.339$ $p=0.03$ ve D grubu için $r=0.577$ $p=0.04$) bulundu. Çalışmamızı destekler şekilde Velasco JA ve ark.¹¹², Keltimlidis ve ark.¹¹³, Orlando CC ve ark.¹¹⁰, ile Sawane ve ark.¹¹¹ da (oligozoospermik grupta) sperm sayısı ile LDH aktivitesi arasında güçlü korelasyon bulduklarını açıklamışlardır.

Sperm örneklerinde, bütün gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında LDH aktivitesi anlamlı düzeyde ($p<0.05$) düşük bulunmuştur. Gruplarda LDH aktivitesi (ortalama \pm SD):

- A grubu (1152 \pm 576.0)
- B grubu (799.8 \pm 537)
- C grubu (838.3 \pm 349.3)
- D grubu (781.1 \pm 806.8)

Gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında C grubunda LDH aktivitesi B grubundan anlamlı düzeyde ($p<0.01$) yüksek tesbit edilmiştir.

Gavella ve ark.¹¹⁴ ile Casano R. ve ark.¹¹⁵. çalışmalarında sperm örneklerinde LDH-C4 aktivitesini oligozoospermik hastalarda, kontrol grubundan daha yüksek bulduklarını açıklamışlardır. Çalışmamızda sperm örneklerinde total LDH aktivitesini ölçerek bunun tam tersi bir sonuç elde edildi. Diğer araştırmacıların LDH-C4 aktivitesini ölçmüş olmalarının belki daha hassas bir değerlendirme imkanı sağlamış olabileceği düşüncesindeyiz.

5.4. GSH Aktivitesi İle İlgili Değerlendirme

İnsanda bulunan önemli bir antioksidan, glutatyon tripeptidi olup oksidatif hasar ve toksinlere karşı korumada merkezi rol oynar. Glutatyon ve glutatyon S-transferazın üremede önemli rol oynadığı bildirilmiş olmakla beraber seminal sıvıda glutatyon ve glutatyon S-transferaz hakkındaki literatür bilgileri kısıtlı durumdadır .

GSH vücudun pek çok organ ve dokusunda bulunur ve yüksek antioksidan özelliğe sahiptir . Çalışmamızda seminal sıvı örneklerinde GSH düzeyini saptayarak antioksidan etkinlik ve diğer enzim aktiviteleri arasında olası bir ilgiyi araştırmayı düşündük. B ile E gruplarında GSH düzeyi (ortalamalar B için $30.4\pm 7.9\mu\text{mol/L}$ ve E için $18.7 \pm 13.6 \mu\text{mol/L}$) kontrol grubundan (A grubu) ($43.5\pm 12.9 \mu\text{mol/L}$) anlamlı

düzeyde düşük ($p<0.05$) bulunmuştur. Diğer gruplarda ortalamalar karşılaştırıldığında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- D grubu ($48.9\pm 16.7\mu\text{mol/L}$), B grubundan ($30.4\pm 7.9\mu\text{mol/L}$) anlamlı düzeyde ($p<0.01$) yüksek
- B grubunda ($30.4\pm 7.9\mu\text{mol/L}$), E grubundan ($18.7\pm 13.6\mu\text{mol/L}$) anlamlı düzeyde ($p<0.01$) yüksek
- C grubu ($35.7\pm 15.0\mu\text{mol/L}$) E grubundan ($18.7\pm 13.6\mu\text{mol/L}$) anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.01$)
- D grubu ($48.9\pm 16.7\mu\text{mol/L}$) E grubundan ($18.7\pm 13.6\mu\text{mol/L}$) anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.01$) olarak tesbit edilmiştir.

Genel olarak sonuçlarımız Bhardwaj ve ark¹¹⁶. sonuçları ile uyum göstermektedir. Onlar da bizim sonuçlarımıza paralel olarak çalışmalarında, oligozoospermik ve azospermik grupta GSH düzeyinin kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük bulduklarını açıklamışlardır. Ayrıca azospermik grubun oligozoospermik gruptan daha düşük düzeyde GSH içeriğine sahip olduğunu vurgulamışlardır. Bhardwaj ve ark. çalışmalarının sonunda; glutatyonun membran bütünlüğü ve sitoskeletal bütünlüğün korunmasında rol oynadığı, glutatyondaki kaybın oksidatif yanmada artışa bağlı olarak germ hücre harabiyetine neden olabileceği, bunun sonucunda da oligospermi ve azospermi durumlarının görülebileceğini açıklamışlardır¹¹⁶.

C grubu seminal sıvı örneklerinde LDH aktivitesi ile GSH düzeyi arasında pozitif korelasyon ($r=0.062$ $p=0.000$) saptanmıştır. Bu durumda, GSH düzeyinin LDH aktivitesini değerlendirmede destekleyici bir katkısı olabileceğini düşünmekteyiz.

C grubu seminal sıvı örneklerinde NAD-MDH aktivitesi ile redükte GSH düzeyi arasında negatif korelasyon ($r=-0.470$ $p=0.01$) ve D grubu seminal sıvı örneklerinde NADP-MDH ile redükte GSH düzeyi arasında pozitif korelasyon ($r=0.603$ $p=0.03$) saptanmıştır. Bu sonuca bağlı olarak; MDH'in NAD formunun motiliteden etkilenmesi nedeniyle D grubu dışındaki diğer çalışma gruplarında aktif, NADP formunun ise yetersiz motiliteye sahip olan D grubunda aktif olduğunu ve bu nedenle sözü edilen korelasyonları vermiş olabileceğini telkin etmektedir.

Lenzi ve ark. GSH'ın sperm motilitesini artırıcı rol oynadığını ve infertil erkeklere glutatyon verilmesinin motilitede artışa neden olduğunu bildirmişlerdir ^{117,118}. Çalışmamızda GSH düzeyi ve motilite arasında bir ilgi saptanmadı.

Ochsendorf FR ve ark. spermde GSH düzeyini açıklamışlardır ¹¹⁹. Fakat biz sperm örneklerinde kullandığımız yöntem ile redükte GSH düzeyini tesbit edemedik.

5.5. Fruktoz ve Glukoz Düzeyi İle İlgili Değerlendirme

Fruktoz, seminal keselerden salgılanır ve yine veziküler kaynaklı özel proteinlerle kompleks oluşturur. Normal likefikasyon şartlarında fruktoz tamamen dialize olabilir. Fakat semenin asidik şartlara maruz kalması likefikasyonu bloke eder ve fruktoz dialize olamaz. Böylece fruktoz semenin likefikasyonunda rol oynar. Likefikasyon esnasında glukoz oluşmaya başlar. Fruktozun glukozla dönüşmeye başlaması prostatik sekresyon kaynaklıdır. Ejakülasyondan sonra spermatozoa “fruktoliz” olarak tanımlanan olayla fruktoz kullanmaya başlar. Spermatozoa semen içerisinde bulunduğu süre boyunca onun enerji kaynağı fruktozdur ^{120,121}. Yüksek sperm konsantrasyonunda seminal sıvı fruktoz konsantrasyonunun düşük olması beklenir. Bu nedenle azospermik ve oligozoospermik olguların seminal fruktoz düzeyi normozoospermik gruptan yüksek bulunmuştur. Seminal fruktoz konsantrasyonunun, motil sperm sayısı ile negatif korelasyon göstermesi ejakülasyondan sonra sadece motil spermin fruktoz tüketeceği gerçeğine dayanmaktadır (Gustavo 2001) ¹²⁰.

Glukozun insan sperminde optimal kapasitasyon ve fertilizasyon için gerekli olduğu bildirilmiş fakat glikoliz için ekstra metabolik enerji sağlayıp sağlamadığı açıklık kazanmamıştır. Glukoz dışındaki diğer şekerlerin kapasitasyon için esansiyel olmadığı ancak küçük, hızlandırıcı bir katkısı olabileceği açıklanmıştır. Servikal mukusun glukoz içeriğinin yüksek olduğu fakat fruktoz içermediği, burada sperm tarafından glukoz kullanıldığı bildirilmiştir. Seminal sıvıdaki glukoz konsantrasyonu fruktozun 1/50'si kadar olmasına rağmen glukoz spermin enerji tüketiminin yarısını karşılamaktadır. Glukoz kullanımındaki tercih heksokinaza duyulan affiniteye bağlı olabilmektedir. Heksokinaz, memeli spermatozoasında fruktolizi başlatır sadece fruktoz değil glukoz gibi diğer şekerleri de fosforlar. Normal semen örneklerinde (sperm konsantrasyonu $> 50 \times 10^6 / \text{ml}$) glukoz konsantrasyonu, oligozoospermik semen örneğinden daha hızlı düşmekte, vazektomize ve azospermik erkeklerin semen

örnekleri, normal kontrol semen örnekleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek ve stabil glukoz konsantrasyonu göstermektedir⁷¹.

Memeli spermatozoası fertilizasyon olayı öncesi kapasitasyon işlemine ihtiyaç duymaktadır. Kapasitasyon esnasında spermatozoa, “hiperaktivasyon” olarak tanımlanan motilite değişimine maruz kalır; fertilizasyon ve dişi üreme kanalında mukozal bariyeri aşabilmek için daha etkin bir performans kazanmış olur. Bu işlemin vitro şartlarda kültür medyumuna eklenen bileşiklerle desteklenmektedir. Kapasitasyon olayı sırasında gerçekleştirilen anahtar olaylardan biri tirozin fosforilasyonu olup protein kinaz A ve C'nin kapasitasyondaki etkisi gösterilmiştir. İn vitro şartlarda medyumda bulunan HCO_3^- , Ca^{+2} ve albümin düzeyleri kapasitasyon olayını etkilemektedir. Sperm aktivitesini etkileyen medyumdaki diğer önemli bileşikler enerji komponentleri olan glukoz, pirüvat ve laktattır. İnsan ve fare spermatozoasında glukozun birincil derecede karbon kaynağı ve glikolizin de kapasitasyon için en önemli metabolik yol olduğu bildirilmiştir. Farede glukoz yokluğunda zona pellusida penetrasyonu ve sperm-oosit füzyonunun engellendiği bildirilmiştir. Oositten ziyade spermin, pentoz fosfat yolu (PFY) ile glukozu metabolize etmesi gerekmektedir. NADPH'in insan sperminde protein tirozin fosforilasyonunu modüle etmesi; PFY ile metabolize edilen glukozun protein tirozin fosforilasyonuna katıldığını göstermektedir. Tirozin fosforilasyonuna bağlı olarak gerçekleşen kapasitasyonun ardından olay , akrozom reaksiyonu ile sonlanmaktadır. Akrozom reaksiyonu sırasında dış akrozomal membran, spermatozoanın plazma membranı ile birleşir ve veziküler içerik dışarı salınır. Akrozomal içeriğin boşaltılması oosit zona pellusida penetrasyonu için önemlidir^{121,122}.

Spermatogenez; son derece senkronize, düzenli, devamlı ve kompleks hücresel farklılaşma olaylarını içermekte olup spermatogonial “kök hücre” yüksek düzeyde özelleşmiş haploid spermatozoaya dönüşmektedir. Spermatogonia enerji kaynağı olarak glukozu kullanmakta fakat spermatosit ve spermatidler, ATP konsantrasyonunu belirli bir düzeyde tutabilmek için laktat/pirüvata ihtiyaç duymaktadırlar. Spermatozoa ise enerji kaynağı olarak glukoz ya da fruktozu kullanabilmektedir. Böylece spermatogenezin her aşamasında enerji için ihtiyaç duyulan substrat değişmektedir¹²³.

Çalışmamızda, glukoz düzeyleri B (2.8±2.1 mg/dl) , D (4.0±1.4 mg/dl) ve E (15.4±6.4 mg/dl) gruplarında kontrol grubundan A (2.0±2.1 mg/dl) anlamlı düzeyde

($p<0.05$) yüksek bulundu. Diğer grupları birbirleriyle karşılaştırdığımızda B grubunun değeri (2.8 ± 2.1 mg/dl) D (4.0 ± 1.4 mg/dl) ve E (15.4 ± 6.4 mg/dl) gruplarından anlamlı düzeyde ($p<0.01$) düşük; yine aynı şekilde C grubu da (1.8 ± 1.6) D ve E gruplarından, D grubu da E grubundan anlamlı düzeyde ($p<0.01$) düşük olarak tesbit edilmiştir.

Yukarıdaki sonuçları yorumladığımızda sperm tarafından glukoz kullanımının olduğunu bizim verilerimiz de desteklemiş oldu. Çünkü kontrol grubunda glukoz değeri diğer gruplardan anlamlı olarak düşük ve azospermik grupta ise en yüksektir. Spermiyogram özelliklerine göre glukoz değeri diğer gruplar arasında da değişiklik göstermekte; örneğin motilitenin düşük olduğu D grubunda glukoz kullanımının da düşük olduğunu görmekteyiz. Ayrıca B grubu seminal sıvı örneklerinde glukoz düzeyi ile sperm morfolojisi arasında negatif bir korelasyon ($r = -0.460$ $p = 0.02$) saptandı. Bu durumu normal morfolojiye sahip spermlerin glukoz tüketiminde artışa neden olabileceği şeklinde yorumlamayı düşündük. Literatür bilgilerinde bu yönde bir bulguya rastlamadık.

D grubu örneklerde glukoz düzeyi ile sperm motilitesi arasında negatif korelasyon ($r = -0.630$ $p = 0.02$) ve glukoz düzeyi ile morfoloji arasında yine negatif bir korelasyon ($r = -0.703$ $p = 0.01$) saptanmıştır. Pova ve ark. da çalışmalarında sperm motilitesi ile glukoz konsantrasyonu arasında negatif korelasyon bulduklarını açıklamışlardır¹²⁴.

Pova ve ark¹²⁴. normal insan semeninde glukoz içeriğini 0.41 ± 0.09 mmol/l, Diamandis ve ark¹²⁵. normal grupta glukoz içeriğini 7.37 mmol/l ve Setchell BP²⁶ ise 0.4 mM olarak açıklamıştır. Glukoz düzeyi ile ilgili açıklanan değerler varyasyon göstermektedir.

Testislerde glukoz taşınmasının GLUT-3 ile yüksek affinite ile gerçekleştiği, fruktoz taşınmadığı, spermde ise GLUT-5 ile fruktoz taşınıp glukoz taşınmadığı bildirilmiştir^{126,127}. Wang ve ark. ise spermde, glukozun taşınmasının glukoz taşıyıcılarından GLUT 3 ve 14 ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir¹²⁸.

Fruktoz sonuçlarını incelediğimizde B (272.1 ± 104.3 mg/100 ml), D (706.6 ± 143.3 mg/100 ml) ve E (338.1 ± 228.2 mg/100 ml) gruplarının ortalama değerlerinin kontrol grubundan A (184.7 ± 124.8 mg/100 ml) anlamlı düzeyde ($p<0.05$) yüksek bulunmuştur. Fruktoz için bulunan bu sonuçlar aynı gruplarda glukoz için de paralellik göstermektedir. Diğer gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında D (706.6 ± 143.3 mg/100 ml) grubu B (272.1 ± 104.3) grubundan, D grubu C (229.9 ± 79.9) grubundan ve

D grubu E grubundan anlamlı düzeyde ($p<0.01$) yüksek bulunmuştur. Burada karşımıza çıkan tablo kontrol grubunda fruktoz kullanımının en fazla (glukoz için de benzer durum geçerli) olduğu, motilitenin yetersiz olduğu D grubunda ise fruktoz değerinin yüksek, dolayısıyla enerji tüketiminin az olduğudur. Bu durumda sperm motilitesi ile fruktoz düzeyi arasında bir ilgi beklerken istatistiksel olarak bir korelasyon saptanmadı. Patel ve ark¹²⁹. motil sperm sayısı ve fruktoz düzeyi arasında pozitif korelasyon bulduklarını açıklamışlar. Öte yandan B grubunda fruktoz düzeyi ile sperm konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon ($r= -0.424$ $p=0.03$) saptandı. B ve E gruplarında glukoz ve fruktoz düzeyleri arasında pozitif korelasyon (B için $r=0.481$ $p=0.01$ E için $r=0.842$ $p=0.000$) tesbit edildi. Bu durum bize Patel ve ark¹²⁹. yaptığı açıklamada olduğu gibi glukoz ve fruktozun aynı kaynaktan regüle edildiğini düşündürmüştür.

C grubu seminal sıvı örneklerinde NAD-MDH aktivitesi ile fruktoz düzeyi arasında negatif korelasyon ($r= -0.547$ $p=0.004$) saptandı. Bu durum glukoz düzeyi için de geçerlidir.

Bu sonuçları özetlediğimizde; fruktoz ve glukozun sperm tarafından kullanıldığını, aynı kaynaktan, benzer mekanizmalarla regüle edildiklerini düşündüğümüzü vurgulamak isteriz.

5.6. Hormonlar ve Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme fonksiyonları hipofiz bezinden salgılanan FSH (folikül uyarıcı hormon) ve LH (luteinize edici hormon) hormonlarıyla kontrol edilir. FSH erkeklerde testiste sperm üretimini, LH ise testiste bulunan leydig hücrelerini uyararak testosteron hormonunun salgılanmasını sağlar. Testosteron erkeksi fiziksel karakterlerinin gelişmesini etkiler ve sperm üretimine katkıda bulunur⁸⁵.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda leptinin kadın ve erkek üreme sistemi üzerinde önemli roller üstlendiği açıklanmıştır⁷⁸.

Çalışmada sperm enerji metabolizmasının yanı sıra seminal sıvıda hormon profilini de gözden geçirmek ve hangi düzeyler arasında ilişki olabileceğini araştırmak amacıyla testosteron ve leptin düzeyleri de incelendi. Özellikle testosteron düzeyi ile dehidrogenaz aktivitesi gösteren enzimler arasındaki olası bir ilgi merak ettiğimiz konular arasındaydı.

5.6.1. Leptin Düzeyi İle İlgili Değerlendirme

167 amino asitlik bir protein olan leptin adipoz dokunun yanı sıra plasenta, mide ve iskelet kasında da üretilmektedir. Leptin, kan akımına salınır ve parakrin mekanizmalarla etki gösterir, yetişkinlerde GnRH salgılanmasını uyarıp gonadlar üzerinde indirek etkiler oluşturur. Leptin üremedeki periferol rolünü MAP kinazları indükleyerek gerçekleştirmektedir. Ayrıca leptinin ob/ob farede 17 α -hidroksilaz için mRNA düzeyini artırdığı in vivo olarak gösterilmiştir. Böylece leptinin üremede direk veya indirek bir rol üstlendiği bildirilmektedir^{74,75}.

Kontrol grubunda seminal sıvıda leptin düzeyini ortalama 0.20 ± 1.9 ng/ml olarak saptadık. Literatürde leptin düzeyi ile değişik sonuçlara rastlanıldı. Bu farklılığın, çalışılan grupların özelliklerinden ya da yöntemin değişikliğinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Örneğin Glander ve ark.⁷⁶ normal semen örneğinde leptin düzeyini 1.45 ± 0.18 ng/ml, Sohbe ve ark.⁷⁴ 0.21 ± 0.21 μ g/l, Lackey ve ark.¹³⁰ da genel olarak insan semeni için $0.55-1.15$ ng/ml olarak açıklamışlardır.

B grubu (oligoteratospermi) seminal sıvı örneklerinde leptin düzeyini (0.11 ± 0.1 ng/ml) kontrol grubundan (0.20 ± 1.9 ng/ml) anlamlı olarak ($p < 0.05$) düşük saptadık. B grubundaki örnekler konsantrasyon ve morfoloji yönünden kontrol grubundan daha düşük değerlere sahipti. Bu durumda, leptin konsantrasyonunun sperm konsantrasyonu ve morfolojisini etkilediği düşünülmüştür. Camina ve ark.¹³¹ çalışmalarında sperm konsantrasyonu, motilite, vitalite, morfoloji ve leptin konsantrasyonu arasında korelasyon bulmadıklarını açıklamışlardır. Öte yandan Jope ve ark.⁷⁵ düşük kalitede sperm içeriğine sahip semen örneklerinin daha düşük düzeyde leptin reseptörü ve leptin bağlama kapasitesine sahip olduklarını açıklamışlardır.

Sohbe ve ark.⁷⁴ yine bizim çalışmamıza ters düşecek şekilde çalışma gruplarındaki sonuçlarını şu şekilde açıklamışlardır; obstrüktif azospermi ve düşük düzey azospermi gruplarında leptin düzeyini kontrol grubundan hemen hemen iki katı fazla bulmuşlardır. Oysa ki bizim normal olgularda leptin düzeyi, infertil spermogram içeriğine sahip semen örneğinden daha yüksek değerde tesbit edilmişti.

Yine bir başka grup, Glander ve ark.⁷⁶ çalışmalarında seminal sıvıda kontrol grubunda leptin düzeyini, patolojik (vazektomi yapılan) gruptan daha düşük ($1/2$ oranında) bulmuşlardır.

Diğer çalışmacıların olgularında sonuçların daha farklı olması, bu çalışmacıların olgularında reseptör düzeyinde bir bozukluk olabileceğini, bizim infertil gruplarda ise hormonun seminal sıvıya geçişiyle ilgili bir problem olabileceği sonucunu düşündürmüştür. Verilerimize göre leptin normal, olgun sperm oluşumu için önemli bir faktördür.

B grubu seminal sıvı örneklerinde NAD-MDH aktivitesi ile leptin düzeyi arasında negatif korelasyon ($r = -0,416$ $p = 0,03$), C grubunda ise pozitif korelasyon ($r = 0,536$ $p = 0,005$) saptanmıştır.

E grubu seminal sıvı örneklerinde leptin düzeyi ile hasta yaşı arasında pozitif korelasyon ($r = 0,591$ $p = 0,016$) saptandı. Van Den Saffele ve ark⁷⁴ (1999) yaşlanan sağlıklı erkeklerde serum leptin düzeyinde artış olduğunu bildirmişlerdir. Fakat seminal sıvıda leptin düzeyi ve yaş arasında korelasyon gösterecek bir literatür bilgisine rastlamadık.

5.6.2. Testosteron Düzeyi İle İlgili Değerlendirme

Testosteron testisler tarafından üretilen ana hormon olup normal gelişim, erkek cinsiyet organları ve cinsiyet karakterlerinin gelişimi için önemli bir role sahiptir. Testosteron, yetişkin erkeklerin yaşamı boyunca sperm üretimi, seks gücünün korunması, erektil potansiyel, prostat bezinin fonksiyonu ve diğer reproduktif yapılar için ihtiyaç duyulan bir hormondur. Testosteron üretimi gonadotropin hormonları ile kontrol edilir.

Çalışmamızda seminal sıvı örneklerinde, kontrol grubunda testosteron düzeyi ortalama 2.4 ± 1.3 pg/ml olarak saptandı. B ve E gruplarında testosteron düzeyi (B grubu ortalaması 2.1 ± 1.6 pg/ml ve E grubu ortalaması 0.9 ± 0.6 pg/ml) kontrol grubundan anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) düşük; C (3.7 ± 2.3 pg/ml) ve D (3.6 ± 1.2 pg/ml) gruplarında ise kontrol grubundan anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) yüksek bulundu. Tohoku ve ark.¹³² normal erkeklerde seminal plazmada testosteron düzeyini 72 ng/100 ml ve hasta grupta 52 ± 41 ng/100ml olarak açıklamışlardır. Zalata ve ark.¹³³ anormal sperm karakterlerine sahip semen örneklerinin testosteron düzeyinin normozoospermik örneklerden düşük olduğunu bildirmişlerdir. Luboshitzky ve ark.¹³⁴ da infertil erkeklerin kontrollerden daha düşük seminal plazma testosteron düzeyine sahip olduğunu, sperm sayısı, motilite ve morfoloji özelliklerinin seminal plazmada testosteron düzeyi ile önemli düzeyde

korelasyon gösterdiğini açıklamışlardır. Bu literatüre paralel olarak, bizim çalışma gruplarımız içerisinde oligoteratospermik ve azospermik grup kontrol grubundan düşük düzeyde testosteron düzeyine sahip iken C ve D gruplarındaki yüksek düzeyi ileri incelemelere değer bir bulgu olarak değerlendirdik.

A grubu örneklerde glukoz ve testosteron düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanması ($r=0.424$ $p=0.006$) bu hormon ve bu metabolit arasında sentez ve kullanım mekanizması açısından bir ilgi olabileceği sonucunu düşündürmüştür. Öte yandan B grubu örneklerde seminal sıvı NAD-MDH aktivitesi ile testosteron düzeyi arasında pozitif korelasyon ($p=0.497$ $p=0.01$) saptanmıştır. Bu durumda testosteron düzeyinin NAD-MDH enziminin aktivitesine katkıda bulunan bir faktör olabileceğini düşünmekteyiz.

5.6.3. Seminal Sıvıda NAD-MDH Aktivitesi < 20 mU/ml Olan Örneklerin Değerlendirilmesi

Seminal sıvıda NAD-MDH aktivitesi < 20 mU/ml olan örnekler, çalışılan belirli özellikleri yönünden incelenerek bu bulgular aşağıda sunulmuştur:

No	NAD-MDH mU/ml	NADP -MDH mU/ml	LDH U/L	Testos pg/ml	Leptin ng/ml	Sperm konsan. x10 ⁶ /ml	Motilite % motil	Morfo. % nor.	Gebelik
1	10	66	1512	1.1	0.12	15	% 70	% 5	yok
2	14	266	1363	0.9	0.09	4	% 50	% 2	bekar
3	14	105	1350	2.5	0.52	15	% 0	% 2	yok
4	10	171	2430	5.8	0.07	25	% 0	% 1	yok
5	14	133	2565	2.6	0.07	90	% 0	% 1	yok
6	14	53	3000	4.6	0.18	120	% 80	% 30	?
7	10	62	621	1.4	0.0	Azosp.			yok
8	19	105	743	0.9	0.5	Azosp.			yok
9	10	109	1350	1.8	0.01	Azosp.			yok
10	10	95	945	0.7	0.01	Azosp.			yok
11	19	105	554	0.3	0.01	Azosp.			yok
12	0	343	1485	2.1	0.3	Azosp.			yok
13	19	152	878	0.4	0.4	Azosp.			yok

Bu sonuçlardan yola çıkarak; MDH aktivitesinin, spermde fertilizasyon potansiyelini ve erkek infertilitesini değerlendirmede önemli bir katkısı olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Erkek infertilitesi ile ilgili olarak yapılan araştırmalarda atılacak ilk ve en önemli adım spermiyogramdır. Spermiyogram incelemesi sonucunda ulaşılan değerler, yapılan pek çok ileri araştırmaları destekleyici ya da yönlendirici noktalara taşıyabilmektedir.
2. Sperm metabolizmasını değerlendirebilmek amacıyla değişik seminal sıvı ve sperm örneklerinde MDH aktivitesi NAD ve NADP bağımlı olmak üzere iki formda incelendi. Fertil grup seminal sıvı örneklerinde NAD-MDH aktivitesini infertil gruptan anlamlı olarak yüksek bulundu. Genel olarak MDH'ın NAD formunun NADP formuna oranla hem seminal sıvı hem de sperm bölümlerinde daha aktif olarak çalıştığı tesbit edildi. Ayrıca bir grup seminal sıvı örneğinde MDH aktivitesi ve sperm motilitesi arasında pozitif korelasyon saptandı. Buna bağlı olarak MDH aktivitesinin sperm fonksiyonları, motilitesi üzerinde etkili olduğunu düşünmekteyiz. Bu konuda MDH enzimi üzerinde yapılacak daha ileri çalışmaların sperm fonksiyonlarını değerlendirmede yol gösterici rol oynayacağına inanıyoruz. İnsan semeni ya da sperminde MDH ile ilgili, bu konuya katkısı bulunabilecek literatür bilgisine rastlanmamıştır. İnsan semeni ya da spermatozoasında MDH ile ilgili mevcut bilgileri tartışabilecek daha ileri çalışmaların, erkek üreme potansiyelini değerlendirmede yeni bir bakış açısı kazandırabileceği düşünülmüştür.
3. Sunulan çalışmada seminal sıvı ve sperm örneklerinde LDH aktivitesi değerlendirildi, enzim aktivitesini fertil grupta, infertil gruptan daha yüksek olarak tesbit edildi. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda LDH aktivitesini MDH ile beraber değerlendirmenin (MDH/LDH oranı olarak) daha faydalı olduğu belirtilmektedir.
4. Çalışmada üzerinde durulan bir diğer nokta GSH düzeyi ve dehidrogenaz enzimleri arasında olası bir ilginin varlığıydı. GSH düzeyi; fertil grupta, infertil gruptan anlamlı olarak yüksek saptandı.

Bazı gruplarda MDH aktivitesi ile GSH düzeyleri arasında farklı yönlerde (pozitif ve negatif) korelasyonlar gözlemlendi. Bu durumun enzimin farklı formlarının (NAD/NADP) etkinliğine bağlı olabileceğini düşünmekte fakat genel olarak GSH düzeyinin MDH aktivitesini değerlendirmede destekleyici rolü olabileceğine inanmaktayız.

5. Çalışmayı planlarken; seminal sıvıda fruktoz düzeyini saptamamızın, diğer değerlere (örneğin enzim aktivitelerine) destekleyici bir bilgi verebileceğini düşünmüştük. Genel olarak, fruktozun sperm enerjisi ihtiyacını karşıladığı bilgisinden yola çıkarak seminal sıvıda glukoz düzeyini de gözden geçirmek istemiştik. Bulgularımızı değerlendirdiğimizde sperm tarafından fruktozun yanı sıra glukozun da aktif bir şekilde kullanıldığı ve fruktoz ile glukoz tüketimi arasında yüksek düzeyde benzerlik bulunduğu dikkatimizi çekti. Bu bulgularla, spermde enerji ihtiyacının nasıl karşılandığı konusuna biz de destekleyici bir bilgi eklediğimize inanıyoruz.
- 6 Seminal sıvıda leptin düzeyini inceleyerek gruplar arasında olası bir farkı araştırıldı ve oligoteratospermik grupta, kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük saptandı. Buna bağlı olarak leptin düzeyinin; sperm konsantrasyonu ve morfolojisi üzerinde etkili olduğunu düşünmekteyiz. Bu konuda yapılabilecek yeni çalışmaların bizim bulgularımızı destekleyici olabileceği görüşündeyiz.
7. Çalışmada seminal sıvıda incelemeye aldığımız bir diğer hormon serbest testosterondur. Oligoteratospermik ve azospermik grupta testosteron düzeyini kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşük saptandı. Yine oligoteratospermik grupta testosteron düzeyi ile NAD-MDH aktivitesi arasında pozitif korelasyon saptanmış olması testosteronun bu enzimin aktivitesini etkileyen bir faktör olabileceğini düşündürmüştür.
8. Çalışmanın son bölümünde NAD-MDH aktivitesi < 20 mU/ml olan örnekleri, gruptaki örneklerde genel olarak, sperm fonksiyonlarının

olumsuz yönde etkilenmesi ve bu kişilerde gebelik elde edilmemiş olması dikkatimizi çekti. Bu noktadan yola çıkarak MDH aktivitesi ile infertilite arasındaki ilişkinin daha iyi planlanmış, ileri çalışmalarla irdelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. MDH aktivitesinin sperm fonksiyonları üzerindeki etkilerini daha detaylı gösterebilecek ve hatta spermatogenez aşamalarında, olgun bir sperm oluşuncaya kadar MDH düzeylerinin nasıl seyrettiğini açıklayabilecek çalışmaların yapılabilmesi düşüncelerimizin aydınlatılabilmesi konusunda çok önemli olabileceğine inanmaktayız.

7. KAYNAKLAR

1. Male Infertility-Overview & Causes-Urologychannel
Erişim: <http://urologychannel.com/maleinfertility/index.shtml>
Erişim tarihi: 7.1.2005
2. **Delilbaşı L.** *Tüp Bebek-Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuar Yöntemleri*. Bayındır Sağlık, Eğitim ve Araştırma Vakfı, Ankara, **1997**.
3. **Günalp S.** Kadın Doğum Hekiminin Erkek Faktörünün Araştırılması ve Değerlendirilmesindeki Rolü Ne Olmalıdır? *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi*, **2004**;7(29):129-140.
4. **Lens JW.** The Spermatozoon. Bras M, Lens JW, Piederiet MH, *ivf lab-Laboratory aspects of in vitro fertilization*, Organon pres.**1996**.
5. **Irvine SD.** Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev of Reprod.*, **1996**;1:6-12.
6. Antony van Leewenhoek (1632-1723)
Erişim: <http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leewenhoek.html>
Erişim tarihi: 2.12.2004
7. **Ruestow EG.** Leeuwenhoek's Perception of the Spermatozoa.
Erişim: <http://zygote.swathmore.edu/fert1a.html>
Erişim tarihi 1.12.2004
8. Erişim: <http://www.amuseum.de/physik/exh96/sperm.gif>
Erişim tarihi: 19.4.2005
9. **Liphultz LI.** The Continuing Debate Over The Possible Decline in Semen Quality. *Fertil Steril*, **1996**;65:909-911.
Erişim: <http://www.infertility-male.com/treatment/debate.htm>
Erişim tarihi: 19.4.2005
10. **Rrumbullaku L.** Semen Analysis.
Erişim: <http://Semen Analysis.htm>
Erişim tarihi: 19.4.2005
11. World Health Organization (1992). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Cervical Mucus Interaction. 3rd Edn. Cambridge University Pres, Cambridge.
12. Male Factor Infertility
Erişim: <http://uuhsc.utah.edu/healthinfo/adultmen/infertil.htm>
Erişim tarihi: 19.4.2005
13. Andrology: Causes, symptoms, treatment for male infertility, impotence. The Male Factor Infertility.
Erişim: <http://www.andrology.com/maleinfertility.htm>
Erişim tarihi: 19.4.2005
14. Infertility: Infertility Causes Infertility Testing and Infertility Treatment
Erişim: <http://www.advabcedfertility.com/infert.htm>
Erişim tarihi: 20.4.2005

15. Infertility-Causes of Infertility
Eriřim:://www.holistic-online.com/Remedies/infertility/inf_causes.htm
Erişim tarihi:20.4.2005
16. Causes of Infertility
Eriřim:://www.fertilitydocs.com/causesof.html
Erişim tarihi:20.4.2005
17. Causes of Male Infertility
Eriřim:://www.wrongdiagnosis.com/m/male_infertility/causes.htm
Erişim tarihi:20.4.2005
18. Causes of Male Infertility
Eriřim:://www.andrologyaustralia.org/infertility/causes.htm
Erişim tarihi:20.4.2005
19. Erişim:http://www.fertijin.com.tr/ili.asp?id=ef1
Erişim tarihi:22.4.2005
20. **Duru NK.** Subfertil ve İnfertil Sperm Parametreleri. *GATA Tıp Fakóltesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Notları* Ankara, **1998.**
21. Semen Evaluation
Eriřim:http://www.zdline.com/maklercc.htm
Erişim tarihi: 21.4.2005
22. Makler Counting Chamber
Eriřim:http://sepalreproductivedevices.com/template_products.cfm?classID=50www.zdline.com/maklercc.htm
Erişim tarihi: 21.4.2005
23. **Enginsu E, Günalp S, Orhon E.** *Sperm Morfoloji Atlası.* Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları No :4, Yılmaz Ofset, **1995.**
24. **Işık AZ, Vicdan K.** *İn Vitro Fertilizasyon Uygulamalarında Laboratuar.* Çağdaş Medikal Ankara, **1999.**
25. Spermogram
Erişim :http://www.jinekolognet.com/detay.asp?pid=181
Erişim tarihi:21.4.2005
26. **Setchell BP, Maddocks S.** The Male Reoroductive System. Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction.* Raven Pres, Ltd. New York, **1994:**1063-1175.
27. Malate Dehydrogenase
Erişim: http://www. Arches.uga.edu/~lxyang/bcmb8010/malate%20dehydrogenas.pdf
Erişim tarihi 14.3.2005
28. **Christopher RG, Nicholls DJ.** Malate Dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science*, **1994;**3:1883-1888.
29. Malate Dehydrogenase
Erişim:./query.fcgi?cmd=Retrieve&db=OMIM&dopt=Detailed&tmpl=dispomimTemplate&listu
ids=1
Erişim tarihi: 9.3.2004

30. Malate Dehydrogenase
Erişim: www.worthington-biochem.com/MDH/default.html
Erişim tarihi: 9.3.2004
31. **Wright SK, Kish MM, Viola RE.** From Malate Dehydrogenase to Phenyllactate dehydrogenase. *J Biol Chem*, **2000**;275(41):31689-31694.
32. **Lindstrom A.** Immunological Investigation of Chlamydomonas Malic Enzyme, **1977**.
Erişim: http://www.bio.davidson.edu/old_site/student/Lindthesis/AmyThesis.html
Erişim tarihi: 11.6.2004
33. **Yang Z, Zhang H, Hung HC, Kuo CC, Tsai LC, Yuan HS, Chou WY.** Structural studies of the pigeon cytosolic NADP⁺-dependent malic enzyme. *Prot Scien* **2002**;11:332-341.
34. Enzyme 1.1.1.37
Erişim : http://www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?enzyme+1.1.1.37
Erişim tarihi: 28.6.2004
35. GeneCard for MDH1
Erişim : <http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/genecards/carddisp?MDH1>
Erişim tarihi: 7.6.2004
36. Human Protein-MDH1
Erişim : <http://harvester.embl.de/harvester/P409/P40925.htm>
Erişim tarihi: 7.6.2004
37. **Voegele RT, Mitsch MJ, Finan TM.** Characterization of two members of a novel malic enzyme class. *BBA* **1999**;1432:275-285.
38. **Xu Y, Bhargava G, Wu H, Loeber G, Tong L.** Crystal structure of human mitochondrial NAD(P)⁺- dependent malic enzyme.: a new class of oxidative decarboxylases. *Structure*, **1999**;7(8):877-889.
39. **Yang Z, Lanks CW, Tong L.** Molecular Mechanism for the Regulation of Human Mitochondrial NAD(P)⁺-Dependent Malic Enzyme by ATP and Fumarate. *Structure*, **2002**;10:951-960.
40. **Yang Z, Batra R, Floyd DL, Hung HC, Chang GG, Tong L.** Potent and Competitive Inhibition of Malic Enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*, **2000**;274:440-444.
41. **Bhargava G, Mui S, Pav S, Wu H, Loeber G, Tong L.** Preliminary Crystallographic Studies of Human Mitochondrial NAD(P)⁺- Dependent Malic Enzyme. *J Struc Biol*, **1999**;127:72-75.
42. **Tao X, Yang Z, Tong L.** Crystal Structures of Substrate Complexes of Malic Enzyme and Insights into the Catalytic Mechanism. *Structure*, **2003**;11:1141-1150.
43. Malic enzyme 1
Erişim: <http://harvester.embl.de/harvester/Q167/Q16797.htm>
Erişim tarihi: 24.3.2005
44. Malic enzyme 1,2,3
Erişim: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim>
Erişim tarihi: 22.3.2005
45. **Mitsch MJ, Voegele RT, Cowie A, Osteras M, Finan TM.** Chimeric Structure of the NAD(P)⁺- and NADP⁺-dependent Malic Enzymes of Rhizobium meliloti. *J Biol Chem*, **1998**;273(15):9330-9336.

46. **Zelewski M, Swierczynski J.** Malic enzyme in human liver. *Eur J Biochem*, **1991**;201:339-345.
47. **Kawai M, Hosaki S.** Clinical usefulness of malate dehydrogenase and its mitochondrial isoenzyme in comparison with aspartate aminotransferase and its mitochondrial isoenzyme in sera of patients with liver disease. *Clin Biochem*, **1990**;23(4):327-334.
48. **Rao GSJ, Coleman DE, Karsten WE, Cook PF, Haris BG.** Crystallographic Studies on Ascaris NAD-Malic Enzyme Bound to Reduced Cofactor and Identification of an Effector Site. *J. Biol. Chem.***2003**;278(39):38051-38058.
49. **Özcan K, Koltaş IS, Aras D.** Çukurova Bölgesinde Amoebosis Olgularında İzole Edilen Entamoeba Histolytica'nın İzoenzim Elektroforeziyle Patojenitesinin Araştırılması, TÜBİTAK Projesi, Proje No:1585, **2000**.
50. **Oh TJ, Kim IG, Park SY, Kim KC Shim HW.** NAD-dependent malate dehydrogenase protects against oxidative damage in Escherichia coli K-12 through the action of oxaloacetate. *Env Toxicol Pharmacol*, **2002**;11:9-14.
51. **Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell VW.** *Harper's Biochemistry*.25th.Ed .Appleton & Lange Publications, **2000**.
52. Kosinski RJ. Additional Information on Lactate Dehydrogenase
Erişim:<http://biowww.clemson.edu/bpc/bpLLab/111/LDH.html>
Erişim tarihi:5.3.2002
53. **Laudat A, Foucault P, Palluel AM.** Relationship between seminal LDH-C₄ and spermatozoa with acrosome anomalies. *Clin Chim Acta*, **1997**;265:219-224.
54. **Wong C, Paez,LR, Noguera B; Perez A, BaezaI.** Selective inhibition of the sperm-specific lactate dehydrogenase isozyme-C₄ by N-isopropyl oxamate. *BBA*, **1997**;1343(1):16-22.
55. **Gupta GS.** LDH-C₄: A Unique Target of Mammalia Spermatozoa. *Clin Rev Biochem Molec Biol*, **1999**;34(6):361-385.
56. **Edwards Y, West L, Van HV, Cowell J, Goldberg E.** Regional localization of the sperm-specific lactate dehydrogenase, LDHC gene, on human chromosome 11.*Ann Hum Genet*, **1998**;Jul-53(3):215-9.
57. **Velasco JAN, Zapata I, HernandezP, Albacete MP, Oltra JTO, Paricio JJP.** Lactic dehydrogenase –C₄ activity in seminal plasma and male infertility. *Fertil Steril*, **1993**;60(2):331-335
58. Erişim:<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/a/a1/LDH.PNG>
Erişim tarihi: 6.5.2005
59. **Irvine DS.** Glutathione as a treatment for male infertility. *Rev Reprod*, **1996**;1:6-12.
60. Sikka SC Oxidative Stress and Role of Antioxidants in Normal and Abnormal Sperm Functions.
Erişim:<http://www.bioscience.org/1996/v1/e/sikka1/htmls/sikka.pdf>
Erişim tarihi: 9.3.2005.
61. **Sanocka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Kurpisz M.** Oxidative Stres and Male Infertility. *J Androl*, **1996**;7(4):449-454.
62. **Storey BT.** Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Molec Hum Reprod*, **1997**;3(3):203-213.

63. Erişim: http://www.1whey2health.com/glutathione_cysteine.htm
Erişim tarihi:23.12.2004
64. Roles of glutathione redox system
Erişim:<http://www.asiaandro.com/1008-682X/4/231.htm>
Erişim tarihi: 23.12.2004
65. **Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM.** Glutathione and hypotaurine in vitro:effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, **2000**;15:61-68.
66. **Maiorino M, Bosello V, Ursini F, Foresta C, Garolla A, Scapin M, Sztajer H, Flohe L.** Genetic Variations of gpx-4 and Male Infertility in Humans. *Biol Reprod*, **2003**;68:1134-1141.
67. **Kelner MJ, Montoya MA.** Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4):chromosomal location to 19p13.3. *Biochem Biophys Commun*, **1998**;249:53-55.
68. Erişim: www.medicine.viawa.edu/esr/education/.../Paper3/2haOLPaper3.pdf
Erişim tarihi: 2.1.2005
69. **Garrido N, Meseguer M, Alvarez J, Simon C, Pellicer A.** Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. *Fertil Steril*, **2004**;82(3):10591066.
70. **Phadke AM, Samant NR, Deval SD.** Significance of seminal fructose studies in male infertility. *Fertil Steril*, **1973**;24(11):894-903.
71. **Suominen J.** Seminal fructose and glucose in asthenozoospermia. *Int J Androl*, **2001**;24:253-254.
72. Erişim:www.biochem.wisc.edu/biochem875/pdfs/wk_7/Devlin_chapter7pdf
Erişim tarihi: 23.12.2004
73. Polyol pathway first identified in the seminal vesicle. *Pharm Rev*, 1998;50(1):21-34
Erişim:<http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/content/full/50/1/21>
Erişim tarihi: 23.12.2004
74. **Sobbe HU, Koebnick C, Jenne L, Kiesewetter.** Leptin concentrations in semen are correlated with serum leptin and elevated in hypergonadism. *Andrologia*, **2003**;35:233-237.
75. **Jope T, Lammert A, Kratzsch J, paasch U, Glander HJ.** Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int J Androl*, **2003**;26:335-341.
76. **Glander HJ, Lammert A, Paasch U, Glasow A, Kratzsch J.** Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia*, **2002**;34:227-233.
77. Erişim :http://marketing.appliedbiosystems.com/iscience_v3/v1i3_focus_snps.asp
Erişim tarihi: 6.1.2005
78. **Caprio M, Fabbrin E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A.** Leptin in reproduction. *TIEM*, **2001**;12(2):65-72.

79. **Banks WA, McLay RN, Kastin AJ, Sarmiento U, Scully S.** Passage of leptin across the blood-testis barrier. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **1999**;276:1099-1104.
80. **Sempere MT, Barreiro ML.** Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Molec Cell Endoc*, **2002**;188(1-2):9-13.
81. **Hefnawy TE, Ioffe S, Dym M.** Expression of the leptin receptor during germ cell development in the mouse testis. *Endocrinology*, **2000**:141(7)2624-2630.
82. Androgens.
Eriřim:http://www.neurosci.pharm.utelodo.edu/MBC3320/androgens.htm
Erişim tarihi. 4.1.2005
83. Testosterone implant.
Eriřim:http://www.tiscali.co.uk/lifestyle/healthfitness/health_advice/netdoctor/archieve/10000...
Erişim tarihi: 7.1.2005
84. Erişim:http://Endotext_com-Endocrinology of Male Reproduction
Erişim tarihi: 6.5.2005
85. Diagnosis of male infertility
Eriřim:http://www.andrologyaustralia.org/infertility/diagnosis/diagnosis1hormonal.htm
Erişim tarihi. 7.1.2005
86. Hypogonadism and infertility: a guide for men
Eriřim:http://www.pituitary.org.uk/resources/hypogon-m.htm
Erişim tarihi: 7.1.2005
87. **Pohanka M, Hampl R, Sterzl I, Starka L.** Steroid hormones in human semen with particular respect to dehydroepiandrosterone and its immunomodulatory metabolites. *Endoc Regul*, **2002**;36:79-86.
88. Sigma-lactate dehydrogenase kit (228-UV).
89. **Beutler E.** *Red cell Metabolism*.3rd.Ed., Orlando:Grune and Stratton,**1984**.
90. **Glucon**-glukoz kiti (Glukoz oksidaz GOD-PAP metodu).
91. **Özkurt ř.** *Laboratuar Metodları*, GATA Basımevi. Ankara, **1975**
92. Serbest testosteron kiti-Biosource KIPB19000
93. Leptin kiti- IRMA DSL-23100
94. New findings confirm male fertility declines with age.
Eriřim:http://eurekalert.org/pub_release/2003-02/esfh-nfc020203.php
Erişim tarihi:17.1.2005
95. Erişim:http://jpgmonline.com/article.asp?issn=0022-3859;year=volume=42;issue...
Erişim tarihi:17.1.2005
96. **Brooks DE.** Activity and androgenic control of enzymes associated with the tricarboxylic acid cycle, lipid oxidation and mitochondrial shuttles in the epididymal spermatozoa of the rat. *Biochem J*, **1978**;174:741-752.
97. **Prasad R, Mumford D, Gordon H.** Lactate and malate dehydrogenase and alpha-esterases in oligospermia. *Fertil Steril*, **1976**;Jul27(7):832-5.

98. **Gronczewska J, Zietera MS, Biegiewska A, Skorkowski EF.** Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring *Clupea harengus*. *Comp Biochem Physiol*, **2004**;134C:207-213.
99. **Leventerler H, Taga S, Çağlar E, Kibar M, Dikmen N.** Seminal sıvıda NADP-bağımlı dehidrogenaz ve İndirgenmiş glutatyon düzeyinin incelenmesi. 17. Ulusal Biyokimya Kongresi ODTÜ Kongre ve Kültür Merkezi-Ankara 24-27 Haziran **2002**.
100. **Hosoya M, Inoue A, Kimura N, Arai T.** Enzyme activities in some types of peripheral leukocytes of thoroughbred race horses before and after the races. *Res Vet Sci*, **2004**;77:101-104.
101. **Gerez BNM, Gallina F, Burgos C, Blanco A.** Effect of L-malate on pyruvate dehydrogenase activity of spermatozoa. *Arch Biochem Biophys*, **1994**; 308(2):520-4.
102. **Lahnsteiner F, Berger B, Weismann T, Patzner RA.** Determination of semen quality of the rainbow trout, *Onchorynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture*, **1998**;163(1-2).163-181.
103. **Cordoba M, Pintos L, Beconi T.** Differential activities of malate and isocitrate NAD(P) dependent dehydrogenases are involved in the induction of capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia*, **2004**;37:40-46.
104. **Scheibe R, Geissler A, Rother T.** Analysis of biophysical differences between oxidized and reduced chloroplast NADP-malate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys*, **1993**;300(2):635-640.
105. **Piasecka M, Rozewicka WR, Ogonski T.** Computerized analysis of cytochemical reactions for dehydrogenases and oxygraphic studies as methods to evaluate the function of the mitochondrial sheath in rat spermatozoa. *Andrologia*, **2001**;33:1-12.
105. **Kohsaka T, Takahara H, Tagami s, Sasada H, Masaki J.** A new tecnique for the precise location of lactate and malate dehydrogenase in goat, boar and water buffalo spermatozoa using gel incubation film. *J Reprod Fertil* , **1992**;May95(1):201-9.
106. **Matsuzawa T, Sawada H.** Histochemical changes in rat sperm malate dehydrogenase activities during passage through epididymis. *Endocrinol Jpn.* **1987**;34(2):231-5.
107. **Li H, Chen Q, Li S, Yao W, Li L, Shi X, Wang Y, Castranova V, Vallyathan V, Ernst E, Chen C.** Effect of Cr(VI) exposure on sperm quality: human and animal studies. *Anu Occup Hyg*, **2001**;45(7):505-511.
108. **OrlandoC, Casano R, Caldini AL Forti G, Barni T, Bonfanti L, Serio M.** Measurement of seminal LDH-X and transferrin in normal and infertile men. *J Androl* **1998** May-June;9(3):220-3.
109. **Sawane MV, Kaore Sb, Gaikwad RD, Patil PM, Patankar SS, Dehkar AM.** Seminal LDH-C4 isoenzyme and sperm mitochondrial activity : a study in male partner of infertile couples. *Indian J Med Sci.*, **2002**; Nov 56(11):560-6.
110. **Velasco N, Zapata T, Hernandez M, Albacete P, Oltra T, ParicioP.** Lactic dehydrogenase – C4 activity in seminal plasma and male infertility. *Fertil Steril* **1993** Aug;60(2):331-5.
111. **Keltimlidis K, Papadimas J, Bontis J, Mantalenakis S.** LDH ioenzymes in semen of infertile men. *Arch Androl.*, **1989**;22(1):77-84.
112. **Gavella M, Lipovac V, Vucic M, Rocić B.** Relationship of sperm superoxide dismutase-like activity with other sperm-specific enzymes and experimentally induced lipid peroxidation in fertile men. *Andrologia.* **1996** Jul-AUG;28(44):223-9

113. **Bhardwaj A, Verma A, Majumdar S, Khanduja KL.** Status of vitamin E and reduced glutathione in semen of oligozoospermic and azoospermic patients. *Asian J Androl*, **2000** Sep;2:225-228.
114. **Lenzi A, Lombardo F, Gandini L, Culasso F, Dondero F.** Glutathione therapy for male infertility. *Arch Androl*, **1992** Jul-Aug;29(1):65-8.
115. **Lenzi A, Culasso F, Gandini L, Lombardo F, Dondero F.** Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod*, **1993** Oct;8(10):1657-62.
116. **Ochsendorf FR, Buhl R, Bastlein A, Beschmann H.** Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Hum Reprod*, **1998** Feb;13(2):353-9.
117. **Gonzales GF.** Function of seminal vesicles and their role on male infertility. *Asian J Androl* **2001** Dec;3:251-258.
118. **Kendirci A.** Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi, *Doktora Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana, **1995**.
119. **Urner F, Luisier GL, Sakkas D.** Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod*, **2001**;64:1350-1357.
120. **Mitra K, Shivaji S.** Novel tyrosine phosphorylated post pyruvate metabolic enzyme, dihydrolipoamide dehydrogenase, involved in capacitation of hamster spermatozoa.
Erişim: www.biolreprod.org/cgi/rapidpdf/biolreprod.103.022780v1.pdf
Erişim tarihi: 9.3.2005
121. **Bajpai M, Gupta G, Setty BS.** Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *Euro J Endoc*, **1998**;138:322-327.
122. **Povoa HJ, Bastos JJ, Silva ME, Ariza A, Moreas MI, Rodrigues RE, Silva MS.** Glucose in human semen. *Biomed Biochim Acta*, **1986**;45(5):685-6.
123. **Diamindis EP, Arnett WA, Foussias G, Pappas H, Ghandi S, Melegos DN, Mullen B, Yu H, Srigley J, Jarvi K.** Seminal plasma biochemical markers and their association with semen analysis findings. *Urology*, **1999** March; 53(3):596-603.
124. **Bowen R.** Hexose transporters.
Erişim : http://cvmb.colostate.edu/hbooks/molecules/hexose_xport.html
Erişim tarihi: 4.3.2005
125. Glucose transport proteins.
Erişim : http://www.medbio.info/Horn/Time%203-4glucose_transport_proteins.htm
Erişim tarihi: 4.3.2005
126. **Wang H, Xu M, Li J, Xiao J, Xu Z, Zhou Z, Sha J.** A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical application.
Erişim : http://www.njmu.edu.cn/shenzhi/research_date/spermatozoa.htm
Erişim tarihi: 11.1.2005
127. **Patel SM, Skandhan KP, Mehta YB.** Seminal plasma fructose and glucose in normal and pathologic conditions. *Acta Eur Fertil*, **1998** Nov-Dec;19(6):329-32.
128. **Lackey BR, Gray SL, Henricks DM.** Measurement of leptin and insulin-like growth factor-1 in seminal plasma from different species. *Physiol Res*, **2002**;51:309-311.

129. **Camina JP, Lage M, Menendez C, Grana M, Devesa J, Casanueva FF.** Evidence of free leptin in human seminal plasma. *Endocrine*, **2002** Apr;17(3):169-74.
130. **Shirai M, Matsuda S, Mitsukawa S, Nakamura M, Yonezawa K.** FSH, LH and testosterone levels in human seminal plasma. *Tohoku J Exp Med*, 1975 Jun;116(2):201-2.
131. **Zalata A, Hafez T, Verdonck L, Vermeulen L, Comhaire F.** Androgens in seminal plasma markers of the surface of the male reproductive tract. *Int J Androl*, 1995;18(5):271-277.
132. **Luboshitzky R, Zverling MK, Orr ZS, Nave R, Herer P.** Seminal plasma androgen/oestrogen balance in infertile men. *Int J Androl*, **2002**;25:345-351.

8. ÖZGEÇMİŞ

1968 Ceyhan-Adana doğumlu olan Hülya Leventerler, Adana Özel Ayas Lisesi'ni bitirdikten sonra Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun olmuştur. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nde çalışmaya başladı. Bu arada Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Eğitimini tamamladı. Daha sonra aynı anabilim dalında doktora çalışmasına başladı. Halen Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nde çalışmaya devam etmektedir.

Evli ve bir kız, bir erkek 2 çocuk annesidir.

