

T.C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SPERM TİROZİN KİNAZ AKTİVİTESİNİN
İMMÜNOSİTOKİMYASAL İNCELENMESİ

Biyolog İlkay Şafak TAVUKÇUOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2010

T.C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SPERM TİROZİN KİNAZ AKTİVİTESİNİN
İMMÜNOSİTOKİMYASAL İNCELENMESİ

Biyolog İlkay Şafak TAVUKÇUOĞLU

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2010

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

İlkay Şafak Tavukçuoğlu

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. TİROZİN KİNAZLAR.....	4
4.2. PROTEİN KİNAZLAR ve SİNYAL İLETİMİ.....	5
4.2.1. Protein Fosforilasyonu.....	5
4.2.2. Spermlerde Tirozin Kinaz Aktivitesi.....	6
4.2.3. Protein Kinaz A (PKA).....	6
4.2.4. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazlar (MAPK).....	7
4.3. TİROZİN KİNAZ AKTİVASYONUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	8
4.3.1. Kolesterol.....	8
4.3.2. Kalsiyum.....	8
4.3.3. Sitokinler.....	9
4.4. REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ (ROT).....	9
4.4.1. Reaktif Oksijen Türevlerinin Biyolojik Rollerini.....	10
4.4.2. Semendeki Reaktif Oksijen Türevleri.....	11
4.4.2.1. Spermler.....	11
4.4.2.2. Lökositospermi.....	12
4.4.2.3. Sperm Hazırlama Teknikleri.....	13
5. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	13
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	15
5.2.1. Çalışma Grupları.....	15
5.2.2. Semen Toplanması.....	15
5.2.3. Lökosit Konsantrasyonu Tespiti.....	15
5.2.4. Swim up Yöntemi.....	16
5.2.5. Konsantrasyon Yöntemi.....	16
5.2.6. İmmünohistokimyasal Boyama.....	17

5.2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	17
6. BULGULAR.....	18
7. TARTIŞMA.....	22
8. SONUÇ.....	25
9. TEŞEKKÜR.....	26
10. KAYNAKLAR.....	27

SİMGE VE KISALTMALAR

ADP	: Adenozindifosfat
AKAPs	: A kinaz çapa bağlanma proteinleri
ART	: Yardımcı üreme teknikleri
AT 1	: Anjiotensin reseptörü
ATP	: Adenozintrifosfat
Ca⁺²	: Moleküler kalsiyum
CABYR	: Kalsiyum bağlayan ve tirozin fosforilasyonunu düzenleyen protein
cAMP	: Siklik adenozin mono fosfat
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
ERK	: Hücre dışı sinyallerle düzenlenen kinazlar
GPX	: Glutasyon peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HCO₃⁻	: Bikarbonat iyonu
HO₂	: Hidroperoksil radikali
HRP	: Horse raddish peroksidaz
HSP	: Heat shock protein
IFN-α	: İnterferon alfa
IFN-γ	: İnterferon gamma
IGF	: İnsülin büyüme faktörü
IL 6	: İnterlökin 6
JAK	: Janus Ailesi Kinazlar
kDa	: Kilo dalton
LDH	: Laktik dehidrojenaz
MAPK	: Mitojenle aktive protein kinazlar
MEK	: Mitojen hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz
mmol/l	: Milimol/litre
NADH	: Nikotinamid adenozin dehidrojenaz
NADPH	: Nikotinamid adenozin dinükleotid fosfat
NO	: Nitrik oksit

O₂	: Moleküler oksijen
O₂[·]	: Süperoksit radikali
OH[·]	: Hidroksil radikali
PBS	: Fosfat tampon solusyonu
PGF	: Platelet büyüme faktörü
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
PTK	: Protein tirozin kinaz
PTPase	: Fosfotirozil protein fosfataz
Raf	: ERK aktivasyonuna aracılık eden protein
Ras	: Sıçan sarkoma virüsü
RNT	: Reaktif nitrojen türevleri
RO	: Alkoksi radikali
ROO	: Peroksil radikali
ROT	: Reaktif oksijen türevleri
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
Shc	: Adaptör protein bağlanma bölgesi
SOD	: Süper oksit dismutaz enzimi
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
ÜYTE	: Üremeye yardımcı teknikler
WHO	: Dünya sağlık örgütü
ZP	: Zona pellusida
μl	: Mikro litre

İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından 22.05.2009 tarih 2009/05-01 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi No : HE/0482009

1. ÖZET

Akrozom reaksiyonu sonucu fertilizasyonun gerçekleşmesi spermilerin dışı genital sisteminde ilerlerken kazandıkları kapasitasyon yeteneğine bağlıdır. Kapasitasyon yeteneği kazanan ve hiperaktivasyon gösteren spermiler akrozom reaksiyonu ve fertilizasyonu gerçekleştirebilirler. Fosfo tirozin kinaz aktivasyonunun kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve dolayısıyla fertilizasyon sürecinde etkili olduğu ve bu süreçte reaktif oksijen türevlerinin tirozin kinaz aktivasyonunu etkilediği bildirilmiştir.

Çalışma, semende reaktif oksijen türevi kaynağı lökositlerin artmış olduğu lökospermili vakaları ile normospermili vakalardan seçilen iki grupta gerçekleştirildi. Ayrıca her iki grup, sperm hazırlama yönteminde kullanılan santrifüj işlemi sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türevlerinin olası etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla iki alt gruba ayrıldı. İkiye ayrılan semen örnekleri santrifüj işleminin uygulanmadığı swim-up ve santrifüj uygulanan konsantrasyon yöntemleriyle hazırlandı ve immünohistokimya için sperm yaymaları hazırlandı. Hazırlanan örnekler streptavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle fosfo tirozin monoklonal antikoruyla işaretlendi.

Yapılan değerlendirmelerde sperm tirozin kinaz aktivasyonunun spermilerin kuyruk bölgesinde lokalize olduğu, vakaların ekspresyon seviyelerinin bireysel farklılıklar gösterdiği izlendi. Normospermili vakalarda konsantrasyon grubunda swim-up grubuna göre aktivasyonun arttığı ancak bu artışın anlamlı olmadığı izlendi. Lökospermili vakalarda da konsantrasyon yöntemi uygulanan grupta bir artış gözlemlendi. Normospermili ve lökospermili gruplar arasında ise anlamlı bir fark tespit edilmedi. Normo ve lökospermili vakalarda reaktif oksijen türevlerinin sperm tirozin kinaz aktivitesi üzerine etkili olduğu söylenebilirse de bireysel farklılıkları ve sonuçlarını açıklayacak ileri çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir.

2. SUMMARY

Acrosome reaction and fertilization depends on the capacitation ability gained by the sperms while in the female reproductive tract. Sperms that gain capacitation ability and show hyperactivity can realize acrosome reaction and fertilization. It is reported that phospho tyrosine kinase activation is effective in achieving capacitation, acrosome reaction and hence in fertilization process and reactive oxygen species have an effect in achieving tyrosine kinase activation during this process.

This study was conducted in two groups by selecting cases of normospermia and cases of leukocytospermia with increased levels of leukocytes due to reactive oxygen species in semen. Additionally both groups have been separated into two subgroups each, in order to evaluate the effects of reactive oxygen species that appear in the centrifuge operation used during sperm preparation process. Semen samples that were separated into two were prepared by using swim up method where centrifuge process was not used and concentration method where centrifuge process was used and sperm smears were prepared for immunocytochemistry. The prepared samples were marked with anti-phospho tyrosine monoclonal antibody by using streptavidin-biotin peroxidase method.

In the evaluation process, it was observed that sperm tyrosine kinase activation was localized in the tail section of the sperms, and expression levels of each case showed individual variances. Among the normospermia cases, it was observed that the activation increased in the concentration group in relation to the swim-up group, but this increase was not significant. In the leukocytospermia cases also the concentration group had increased activation. No significant differences were observed between normospermia and leukocytospermia groups. Even though it can be said that both among the normospermia cases and leukocytospermia cases, reactive oxygen derivatives are effective in sperm tyrosine kinase activity, further studies should be held in order to explain individual differences and results.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Memeli spermli ejakülasyon sonrası birçok biyokimyasal ve fonksiyonel değişime maruz kalırlar. Bu süreç spermli içinde buldukları hücreli komponentlerden ayrılmaları ve oositi fertilize edebilmeleri için gerekli olup kapasitasyon olarak adlandırılır (1). Bu fonksiyonel değişimler sperm motilitesinin hiperaktivasyona dönüşmesi ve akrozom reaksiyonuna girme kapasitesinin kazanımıyla ilişkilidir (2). Bu süreçte dişı genital sisteminde yüksek miktarlarda bulunan epidermal büyüme faktörünün (EGF), sperm başında yer alan epidermal büyüme faktörü reseptörlerine (EGFR) bağlanmasıyla gerçekleşen kapasitasyon sürecinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (3). Adenil siklaz, siklik adenozin mono fosfat (cAMP) artışına sebep olarak protein kinaz A (PKA) stimülasyonuna neden olur (4). Böylece serin/threonin ve tirozin fosforilasyonundaki artış, ortamdaki Ca^{+2} miktarını değiştirerek mitojenle aktive olan kinaz (MAPK) ailesinin bir üyesi olan hücre dışı sinyallerce düzenlenen kinazlar (extracellular signal regulated kinase/ERK) yolağının olaya katılımını sağlamaktadır (5). Bununla birlikte farklı koşullar; PKA, tirozin kinaz ve tirozin fosfataz aktivasyonlarını etkileyerek, tirozin fosforilasyonu ile ilişkili motilite ve akrozom reaksiyonu gibi olaylarda değişimlere neden olmaktadır.

Belirli miktarlarda üretilen reaktif oksijen türevleri (ROT) nin sperm akrozom reaksiyonunun regülasyonu ve kapasitasyon gibi fizyolojik olaylarda rol oynadığı bilinmektedir (6). Sperm sinyal iletisinde ROT'nin tirozin fosforilasyonun da artışa yol açarak kapasitasyon gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Semen de ROT'nin primer kaynağı lökositlerdir. Ayrıca in-vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi üremeye yardımcı teknikler (ÜYTE) için sperm hazırlama aşamasında gerçekleştirilen santrifüj uygulamalarının da ROT üretimine neden olduğu ortaya konmuştur (7).

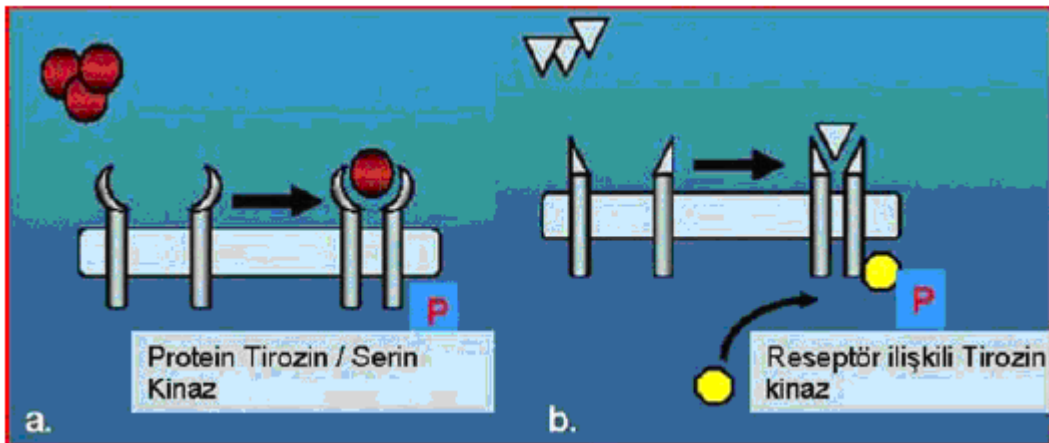
Bu bilgiler ışığında planlanan çalışmamızda, normal sperm tirozin kinaz aktivitesinin immünotokimyasal olarak gösterilerek, lökositospermi ve sperm hazırlama işlemi sırasında uygulanan santrifüj kaynaklı ROT'nin bu aktivite üzerinde ki olası etkilerine açıklık getirilmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. TİROZİN KİNAZLAR

Reseptör tirozin kinazlar (RTK) transmembran proteinlerdir. Bu grup içerisinde insülin, epidermal, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri gibi pek çok alt üye bulunmaktadır. Bu yüzey reseptörleri kendi başlarına enzimler olup tirozin kalıntılarından substrat proteinleri fosforillerler. Reseptör tirozin kinazlar sitoplazmik bölümde aktivasyondan sorumlu bir parça taşırlar. Bu reseptörlerin ekstraselüler yüzüne ligandın bağlanmasıyla sitoplazmik yüzünde yer alan tirozin rezidülerinde fosforilasyon meydana gelir. Bu proteinler arasında hücre membranında bulunan reseptörler, G-proteinleri ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır. Protein kinazlar membran yerleşimli ve sitoplazmik tirozin kinazlar olarak iki gruba ayrılır. Bu proteinler katalitik özelliklerine göre tirozin ve serin/threonin kinazlar olarak da sınıflandırılır (8).

Hücrenin dinlenme evresinde RTK'ların inaktif ve aktif formları denge halindedir. Bu reseptörler büyüme faktörleri ile bağlandıktan sonra aktif hale geçerler ve sitoplazmadaki hedef proteinlerle etkileşerek sinyal iletimini gerçekleştirirler. RTK aktivasyonu, reseptörün kendi kendini fosforile etmesiyle başlar. İkinci aşamada ise, bu fosforile bölgelere çeşitli adaptör proteinler bağlanır ve uyarının hücre içine iletimini sağlarlar (Şekil 1).



Şekil 1: Sitokin reseptörleri a. Reseptör tirozin kinazlar b. Tip I / Tip II reseptörler (71).

Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homology-2) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler, SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinleri arasında köprü görevi görmektedirler. RTK aktivasyonunun sonlandırılması fosfataz grubu proteinlerince gerçekleştirilir. Bu aktivasyon aracılığıyla RTK bağımlı iletim kontrol altında tutulur. Dinlenme halindeki hücrelerde bu proteinler sitoplazmada inaktif halde bulunurlar. Büyüme faktörleri veya sitokinler ile hücrenin uyarılmasından sonra aktif hale gelen proteinler, sitoplazmadaki veya nükleustaki hedeflerine yönelirler (9).

4.2. PROTEİN KİNAZLAR VE SİNYAL İLETİMİ

4.2.1. Protein Fosforilasyonu

Protein fosforilasyonu; hücre mekanizmalarından, hücre büyümesi, hücre siklusu kontrolü, sitoplazmanın iskelet yapısı ve reseptör düzenlenmesi gibi çeşitli olaylarda etkili olur. Ökaryotik hücrelerde protein aktivitesinin düzenlenmesinde en yaygın mekanizma serin/threonin veya tirozin rezidülerine fosfat gruplarının ilave olması ya da uzaklaştırılması şeklinde gerçekleşir. Proteinlerin fosforilasyonu protein kinaz ve fosfatazların kontrolü altındadır. Fosfat gruplarındaki ilave ya da uzaklaştırma sonucunda proteinlerin aktivasyon ve inaktivasyon değişimleri gerçekleşmektedir. Bu temelde hücre içi protein fosforilasyonu transmembran sinyal iletimi için kullanılmaktadır. Reseptörlerin yokluğunda iç katalitik etki reseptör olmayan protein tirozin kinaz (PTK)'lara non kovalent bağlarla bağlanan sitoplazmik alt ünitelerle sağlanır (10, 11).

Fertilizasyon sırasında sperm fonksiyonları hücre içi sinyal sisteminde kontrol edilen protein fosforilasyonu ile düzenlenir. Spermelerde serin/threonin ve tirozin fosforilasyonu gelişir. cAMP bağımlı protein kinaz A ise sperm fonksiyonlarında merkezi bir rol oynayarak bilinen tirozin kinazlar ve diğer serin/threonin kinazlar arasında öne çıkar (12). Protein fosforilasyonu ile sperm oositi bulması ve füzyon olayı için gerekli olan kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu düzenlenmektedir. Fosforilasyon immünohistokimya ile değerlendirildiğinde kişisel sperm popülasyonunda heterojenik bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Protein tirozin fosforilasyonu düzenlenmesi kapasitasyon ve sperm oosit etkileşimi sırasında sperm farklı bölümlerinde gelişebilmektedir.

4.2.2. Spermelerde Tirozin Kinaz Aktivitesi

Memeli spermelerinde tirozin fosforilasyonuna dair kanıtlar anti fosfotirozin antikoru kullanılarak ortaya konmuş, immün reaktiflerle sperm kapasitasyonu ve oosit zona pellusida proteinleriyle etkileşimi arttırdığı gösterilmiştir (13). İnsan spermelerinde kapasitasyon ve zona pellusidaya bağlanma sırasında farklı bölgelerde ardışık fosforilasyonlar gelişmektedir. Bunun sonucunda fosforile olan proteinlerle spesifik sperm fonksiyonları arasında bağlantı olduğu ortaya konmuştur (14). Sperm kuyruk bölgesi pek çok tür için önemli biyolojik yanıtların olduğu bir bölgedir (15). Tirozin protein fosforilasyonu da sperm kuyruk bölgesinde tespit edilmiştir (16-18). Fosforilasyon artışının esas parçada başlayarak orta parçaya doğru devam ettiği bildirilmiştir. Spermelerin zona pellusidaya bağlanması aşamasında progresif bir şekilde esas ve orta parçada fosforilasyon görüldüğü rapor edilmiştir (19). Flagellar proteinlerdeki tirozin fosforilasyonunun hiperaktif hareket yeteneği kazanma ile ilişkili olduğu (20,21) ve protein kinaz A bağlanma proteinlerinin (AKAPs) fibröz kılıf üzerinde lokalize olduğu bildirilmiştir. ERK 1 ve ERK 2 proteinlerinde fosforilasyon; kapasitasyon sırasında aktive olmuş insan spermelerinde tespit edilmiştir (22). Bu durum birçok moleküler mekanizma ve sinyal ileti basamağının gerçekleşmesi ile oluşmaktadır. Kapasitasyon, membran akıcılığının artmasına neden olur. Kolesterol akımı iyon kanallarında aktivasyona neden olarak, sperm membran potansiyelinde değişikliğe ve tirozin protein fosforilasyonunun da artışa yol açar. Tirozin fosforilasyonu, hiperaktivasyon gelişimine ve akrozom reaksiyonunun indüklenmesine neden olur. Bu da protein fosforilasyonunun hiperaktivasyon ve kapasitasyon gibi çok önemli biyolojik olaylarda rolü olduğunu göstermektedir.

4.2.3. Protein Kinaz A (PKA)

Sperm proteinlerinden serin/threonin rezidülerinde gerçekleşen fosforilasyonun kapasitasyonla ilişkili olduğu gösterilmiştir. PKA'nın yanında ERK 1/2 de sperm hücrelerinde gerçekleşen biyolojik olaylar zincirindeki sürece katılmaktadır. Anti fosforin ve anti fosfo-threonin antikoru kullanılarak insan spermelerinde kapasitasyon sırasında serin/threonin fosforilasyonu ve özellikle PKA artışı görüldüğü bildirilmiştir (23, 24). Bu çalışmalar serin/threonin proteinlerinin fosforilasyonunu PKA

aktivitesinin erken artışı ve takip eden süreçte tirozin protein fosforilasyonu ile ilişkilendirmiştir. Ayrıca cAMP bağımlı serin rezidüleri fosforilasyonunun kuyruğun hiperaktivesi sırasında arttığı bildirilmiştir (21). Bu fizyolojik substratın karakterize bir şekilde lokalize olarak sperm oosit etkileşiminde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (25).

4.2.4. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazlar (MAPK)

MAPK ailesi üyelerinden ilk olarak insülinle aktive edilen protein serin kinaz yapılan biyokimyasal çalışmalarla maya tomurcuklarındaki feromon cevabının genetik analizleri sonucunda ortaya konmuştur. Bu da üç çeşit protein kinazın varlığını göstermiştir. MAP kinaz kinaz kinaz, MAP kinaz kinaz ve MAP kinaz. MAP kinazlar büyüme faktörlerinin ve diğer sinyal moleküllerinin aktive ettiği protein serin ve threonin kinazlardır. En iyi tanımlanmış formu ERK ailesidir. Protein kinaz yada G proteiniyle ilişkili reseptörlerle görev yaparlar. cAMP ve Ca⁺² bağımlı yol farklı hücrelerde ERK yolunu uyarabilir yada baskılayabilir. ERK'lerin sperm motilitesi, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonuna katıldığı bilinmektedir. MAP kinazlardan serin/threonin kinazlar birçok hücre çeşidinde sinyal iletiminde görev almakta ve p21 Ras aktivasyonunun serin/threonin kinaz Raf¹ (MAPK) stimülasyonu yoluyla düzenlenmektedir. Raf, MEK'i aktive ve fosforile etmektedir. MEK (Mitojen hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz)'de ERK1 ve ERK2'yi fosforile etmektedir (26). İnsanlarda progesteron ERK 2'yi stimüle ederek kapasitasyon ve akrozomal ekzositozda rol almaktadır (27). MAPK izoformu ERK 2, adaptör protein Shc ve Ras insan spermlerinin başında lokalize olarak protein fosforilasyonunun düzenlenmesi için bir yol göstermektedir. MAPK dolaylı olarak tirozin fosforilasyonunu etkilemektedir.

4.3.TİROZİN KİNAZ AKTİVASYONUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

4.3.1. Kolesterol

Plazma membranının kompleks ve dinamik yapısı hücre fizyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Sperm plazma membranının lipid kompozisyonu diğer somatik hücre membranlarından farklıdır. Sperm başının membranı yüksek miktarda kolesterol içerir bu durum membran akışkanlığı ve kapasitasyonda önemli rol oynar (28). Sperm plazma membranındaki kolesterol dışı genital kanallarından geçerken yüksek molekül ağırlıklı albumin ve yüksek yoğunluktaki lipoproteinlere dönüşür. Sperm plazma membranındaki kolesterol akımı kapasitasyonda membran sinyal yollarının aktivasyonu ile ilgilidir. β siklodekstrinler sperm plazma membranında kolesterol akımını sağlayarak cAMP/PKA yoluyla kapasitasyon artışı ve protein tirozin fosforilasyonuna neden olmaktadır (29). Bu bulunanlar kolesterol akımının tirozin fosforilasyonunda cAMP/PKA yolunda önemli bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Kolesterol akımı indirekt olarak sinyal yolları üzerinde etkilidir. Membran akışkanlığı artar ve sperm hücre plazma membranının Ca^{+2} ve HCO_3^- gibi aşağı akım sağlayabilen iyonlara karşı geçirgenliği artar.

4.3.2. Kalsiyum

Kapasitasyon sırasında gelişen en önemli biyokimyasal olay Ca^{+2} salınımıdır. Birçok önemli kanıt, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu indüksiyonu için Ca^{+2} gerekliliğini desteklemektedir (30). İnsan sperm fonksiyonlarından kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve zona pellusidaya in-vitro olarak bağlanma bölgesel olarak Ca^{+2} gerektirmektedir. Hücre dışındaki Ca^{+2} spermelerde tirozin fosforilasyonu üzerinde etkilidir. İnsanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda hücre dışı Ca^{+2} miktarındaki artışın tirozin fosforilasyonunu arttırdığı bazı çalışmalarda da sperm kapasitasyonu sırasında tirozin fosforilasyonunu negatif etkilediği görülmüştür (5). Hücre içi ATP elde edilebilirliğindeki azalmanın Ca^{+2} a bağlı tirozin fosforilasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (31). Birçok memeli türünde sperm kapasitasyonu sırasında hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artar (22).

4.3.3. Sitokinler

Sitokinler, yaygın olarak immün sistem hücrelerinin çeşitli stimülasyonlara ve yabancı antikorlara karşı yanıt olarak ürettikleri polipeptit yapılı bir hormon ailesidir. Kadın ve erkek genital sistem sekresyonlarında ve kan dolaşımında bulunmaktadır (32). Sitokinlerin spermlerde motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, zona pellusidaya bağlanma ve penetrasyonda pozitif veya negatif tarzda etki gösterdiği bildirilmiştir (33). Sitokinlerden bazılarında interferon α (IFN- α), interferon γ (IFN- γ) ve tümör nekroz faktör α (TNF α) örnek olarak verilebilir. Sitokinlerin sperm motilitesini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (33). IL-6' da erkek genital bezlerinin enfeksiyonunda tanı amaçlı kullanılan bir sitokin olup önemli spesifik belirteçlerden biridir. Semende IL-6 ve ROT konsantrasyonları arasında korelasyon bulunduğu bilinmektedir. ROT oluşumundan, sitokinlerin spermatozoa membranındaki lipidlerin peroksidasyonunu uyarıcı etkileri sorumlu tutulmaktadır. Bununla birlikte, belirli düzeyde üretilen IL-6'nın aynı zamanda sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunu da artırarak fertilizasyonda rol oynadığı saptanmıştır.

4.4. REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ (ROT)

Serbest radikaller bir ya da daha fazla ayrılmamış elektron içeren bileşiklerdir (34). Serbest radikaller oksijenden türerler ve reaktif oksijen türevleri olarak adlandırılırlar. Bunlar süperoksit iyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) peroksil (ROO^-) radikalleri ve hidroksil (OH^-) radikalleridir (35). Nitrojenden türeyen reaktif nitrojen türevleri (RNT) ise nitrik oksit (NO^-) ve peroksinitrit iyonu ($ONOO^-$) dur (36).

İnfertil erkeklerde yaklaşık % 40 oranında ROT'nin anormal şekilde yükseldiği gösterilmiştir (37). İnsan spermleri plazma membran kompozisyonu nedeniyle reaktif oksijen türevlerinin indükleyici zararlarına karşı aşırı kırılığandır (38). Sperm plazma membranı fazla miktarda çoklu doymamış yağ asidi ihtiva etmesinden dolayı oksidatif stress indüksiyonu zararına karşı hassastır (39). Bu durum sitoplazmadaki düşük konsantrasyondaki temizleme enzimlerinden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), vitamin E ve katalazın aktiflenmesine neden olmaktadır (40). ROT'nin özellikle H_2O_2 ve süperoksit anyonunun, insan sperm kapasitasyonu ve protein tirozin

fosforilasyonu düzenlenmesine katıldığı bilinmektedir (41). ROT'nin cAMP'de sinyal basamakları tarafında yalancı akım artışı etkisi yarattığı aynı zamanda sınırlı bölgede aşağı akım yarattığı ileri sürülmektedir (5,42). Hidrojen peroksidin adenilat siklaz aktivasyonu ile cAMP üretimine, bu sayede PKA bağımlı protein tirozin fosforilasyonuna yol açtığı düşünülmektedir. Spermelerde adenilat siklazın HCO_3^- tarafından aktivasyonunun ortaya konmasından bu yana H_2O_2 ve HCO_3^- 'in rollerinin tamamen ya da kısmi şekilde birbiri yerine geçebileceği düşünülmektedir (43). ROT üretim miktarı ve koruyucu sistem arasındaki dengenin, sperm fonksiyonlarının anlık olarak ilerlemesi veya sekteye uğraması konusunda belirleyici olduğu düşünülmektedir. NADH (nikotinamid dehidrojenaz) ve NADPH (nikotinamid adenzin dinükleotid fosfat)'ın sperm kapasitasyonunun gelişimine katkıda bulunduğu, dış kaynaklı NADPH'ın spermelerde protein tirozin fosforilasyonunu arttırdığı ve kapasitasyona yardımcı olduğu bulunmuştur (43). NADPH sperm oksidaz dan süper oksit anyonu oluşturmak için ko-enzim rolü oynar, daha sonra SOD (süperoksit dismutaz) tarafından H_2O_2 'ye dönüştürülür. NADH oksidasyonu ile PKA aktivitesi için gerekli ATP, LDH (laktik dehidrojenaz) desteği tarafından sağlanarak piruvat laktata dönüştürülür (44). ROT üretimi yoluyla NADH diaforaz sperm fonksiyonları üzerine etki eder. Yüksek diaforaz aktivitesi nedeniyle fazla ROT üretimi infertil erkeklerde görülmektedir (45). Nitrik oksit serbest radikali oluşumunun sperm fonksiyonları ile ilişkili olduğu, kapasite olamayan spermelerde düşük seviyede NO^- üretildiği kapasitasyon sürecinde zaman bağımlı olarak NO^- sentezinin arttığı gözlenmiştir (46, 47). Kapasitasyon sırasında artan NO^- seviyesi cAMP yoluyla protein tirozin fosforilasyonunda düşüşü sağlamak ve düşük konsantrasyondaki NO^- ise akrozom reaksiyonunu ve spermelerin zona pellusidaya bağlanma yeteneklerini arttırmaktadır (48).

4.4.1. Reaktif Oksijen Türevlerinin Biyolojik Rollerini

ROT, yağ asitleri, sülfidril grupları ve nükleik asitler gibi birçok biyolojik molekülle reaksiyona girebilir. Bu durum artrit, ateroskleroz ve dejeneratif yaşlanma gibi birçok hastalığın patolojisinde rol oynamaktadır (34). ROT'nin spermeler üzerindeki zararlı etkileri 60 yıldan daha fazla bir süre önce tespit edilmiş ve genelde sperm süspansiyonlarındaki ROT'nin lipid peroksidasyonu ve DNA oksidasyonu üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Sperm fonksiyonlarında düşme ve subfertiliteye neden olduğu kabul

edilmiştir (49-37). Ancak ROT fizyolojik rollere de sahiptirler, lökositler tarafından fagositik işlemler sonucunda yutulan bakterilerden üretilirler. Küçük bir miktarı da diğer hücre çeşitlerinde mesajcı olarak rol oynar (50). Değişik mesajlara uygun özel reseptör bağlanma bölgelerinde rol almaktadırlar. ROT oksidasyon içindeki hedeflerini sıklıkla değiştirirler. Genellikle sülfidril grupları ve belirli kimyasal reaksiyonları hedeflerler. Bu mekanizmalar birçok çapraz etkileşim arasından çeşitli yolların düzenlenmesine yeni olanaklar sağlar (51). ROT hücre içi birçok basamağın düzenlenmesine katılmaktadırlar. Gen ekspresyonunu düzenleyebilmekte, özellikle oksidatif stresin yüksek seviyesinde anti oksidan proteinlerin düzenlenmesinde rol almaktadırlar. Lökositler tarafından hücre adezyonu ve antikor üretimi düzenlenmekte ve bununla beraber zorunlu olmayan apoptoz için pro-apoptotik etki göstermektedirler.

Hidrojen peroksitin reseptör otofosforilasyonunu kolaylaştırmasıyla, epidermal ve platelet büyüme faktörlerinin aktivasyonlarının arttığı bilinmektedir. Nisbeten yükselen konsantrasyondaki $\sim 1\text{mmol/l}$ H_2O_2 ya da tiol'deki geniş oksidatif değişim tirozin fosfatazı inhibe ederek tirozin kinaz tarafından tetiklenen tirozin fosforilasyonuna yol açmaktadır (52). Nisbeten düşük konsantrasyondaki H_2O_2 veya tiol tirozin kinaz aktivitesini arttırmakta hem insülin reseptörleri hemde hücre içi kinazlardan MAPK ve protein kinaz C'yi aktive etmektedir. Oksidanlar, hücre içi kalsiyum konsantrasyon artışıyla da protein fosforilasyonuna katkıda bulunmaktadırlar.

4.4.2. Semendeki Reaktif Oksijen Türevleri

İnsan semeni tüm erkek genital sistemi boyunca seminifer tübüller ve aksesuar bezlerden sentezlenen çeşitli ürünlerin kombinasyonundan oluşan kompleks bir karışımdır. Seminal hücreler; matür veya immatür sperm, spermatogenik oluşum basamaklarındaki yuvarlak hücreler, lökositler ve diğer epitelyal hücrelerdir.

4.4.2.1. Sperm

Sperm kaynaklı ROT üretimi, aktif olarak oksijen kullanan hücrelerde mitokondrial elektron taşıma zinciri gibi hücre içi indirgenme aktivitesinden sızan elektronlardan oluşturulmaktadır (53). Fizyolojik oksijen baskısında oksijenin % 1-3'ü mitokondrilerde

süper oksit iyonlarına (O_2^-) indirgenmektedir (34). İmmatür spermilerin ve geniş sitoplazmik droplete sahip anormal spermilerin önemli ROT üreticileri olduğu bilinmektedir (54). Glukoz metabolizmasıyla ilişkili glukoz 6 fosfataz, NADPH oksidaz sistemi ve NADH bağımlı oksidoredüktaz gibi enzimatik işlemler plazma membranı ve mitokondri gibi iki farklı yerde meydana gelebilmektedir (56).

Tirozin proteini fosforilasyonu ve sperm kapasitasyonu oksijen türevlerince de düzenlenir (50). Kapasite spermier süperoksit iyonu üretirler bunun yanında hidrojen peroksit de insan spermierinde tirozin fosforilasyonunu stimüle eder (2). Son zamanlarda spermier ürettiği süperoksit iyonunun cAMP ve Ca^{+2} düzenlemesi altında olduğu gösterilmiştir (20). Çünkü oksijen türevlerinin sperm cAMP konsantrasyonunu attırdığı gösterilmiş ve Ca^{+2} bağımlı cAMP konsantrasyon artışı kapasitasyon sırasında ölçülmüştür (16). Bu sonuçlar sperm kapasitasyonu ile Ca^{+2} , cAMP ve tirozin fosforilasyon yolları arasındaki etkileşim olduğu fikrini desteklemektedir (20). Bu sinyal reaksiyonları muhtemelen membran kolesterol sızıntısı tarafından tetiklenerek oluşan basamaklardır.

4.4.2.2. Lökositospermi

Semende bulunan çoğunluğu granülositlerden oluşan lökositlerin ağır erkek infertilitesi vakaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (55). Semende artan lökosit miktarı lökositospermi olarak adlandırılır. Lökositospermi tablosunun sperm kalitesinde düşme, hiperaktivasyonda azalma ve fonksiyon bozukluklarına yol açtığı bilinmektedir (56). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tanımlamasına göre lökositospermi ortamdaki peroksidaz pozitif lökosit konsantrasyonunun mililitrede $> 1 \times 10^6$ olması demektir (57).

Semendeki peroksidaz pozitif lökositlerin orijini büyük ölçüde prostat ve seminal veziküllerdir (56). Bunların semende başlıca ROT üretim kaynağı olduğu bulunmuştur (58). Aktive lökositlerin aktive olamayan lökositlere oranla 100 kat fazla miktarda ROT ürettiği tespit edilmiştir (59). Lökositler çeşitli inflamasyon ve enfeksiyon sebepleriyle de aktive olabilmektedirler (60). Seminal lökosit konsantrasyonu anormal yüksekse lökosit kaynaklı ROT sperm harabiyeti oluşturur (61). Bu durum seminal plazmanın içerdiği yüksek miktarda ROT temizleyicilerle engelenmektedir (62). Ancak lökosit kaynaklı

ROT'nin sperm kapasitasyonu üzerine direk veya indirekt etkileri net olarak ortaya koyulamamıştır (37).

4.4.2.3. Sperm Hazırlama Teknikleri

Birçok vakada spermler oksidatif strese maruz kalmakta ve bu durum DNA hasarına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda embriyo gelişiminde azalma, erken embriyo ölümü ve abortus gelişebilmektedir. Semendeki esas ROT kaynağının lökositler ve morfolojik olarak anormal yapıdaki spermler olduğu bilinmektedir. Canlı spermleri, ROT üreten spermlerden ve lökositlerden mümkün olduğunca çabuk uzaklaştırarak, sperm hazırlama teknikleriyle indüklenen ROT'nin etkisini minimuma indirmek çok önemlidir. Sperm hazırlama tekniği olarak swim up, konsantrasyon, gradient santrifüj ve cam yünü filtrasyonu gibi birçok yöntem kullanılmaktadır (63). Çift gradientli santrifüj ve cam yünü filtrasyon yöntemleri matür spermleri immatür olanlardan, hasar görmüşlerden ve lökositlerden ayırmak için uygun yöntemlerdir (64). Medyumlara antioksidanlar ilave edilerek santrifüjde spermlerin maruz kaldığı etkinin azaltılması amaçlanmaktadır (65). Sperm preparasyonunda pentoksifillin, glutatyon, N-asetil sistein ve albümin gibi birçok antioksidan ilavesi ROT' ni temizleyici etki göstermektedir (66).

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- 1) Aseton (Carlo Erba) 301511
- 2) Metanol (Reidel de Haën) 24229
- 3) Leucoscreen (FertiPro Belçika)
- 4) Sage Hepes Medium (Quinns ivf USA)
- 5) PBS (Merck) 1.06579.1000
- 6) Histostain plus kit (Zymed) 85-9043
- 7) Fosfotirozin primer antikoru (Neomarkers) MS-445-P
- 8) Aminoetilkarbazol (AEC) Kromojen (Zymed) 00-2007
- 9) Hematoksilen (Merck) 1.05175.0500
- 10) Mounting medium (Labvision) TA-060-UG

5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.2.1. Çalışma Grupları

Çalışma grupları, yardımcı üreme teknikleri için başvuran hastaların arta kalan ve spermogram analizi için başvuran ve araştırmaya katılmaya gönüllü olan hastalardan alınan semen örneklerinden oluşturuldu. Kontrol grubu olarak normospermi değerlerine sahip santrifüj ve swim-up ile hazırlanmış sperm örneklerinde tirozin kinaz aktivitesi immünotokimyasal olarak belirlendi. Diğer bir grupta, lökositospermili bireylerde, lökositlerce üretilen yüksek ROT'ne maruz kalan spermilerin tirozin kinaz aktivitesi immünotokimyasal olarak değerlendirildi. Lökospermi grubu da normospermi grubu gibi sperm hazırlama tekniklerine bağlı olarak iki alt gruba ayrıldı.

5.2.2. Semen Toplanması

Semen örnekleri normospermi (n=42), lökositospermi (n=21) (1 ml semende 1×10^6 dan fazla sayıda lökositli olan vakalar), yaş aralığı 25 - 46 olan erkeklerden 2-5 günlük cinsel perhiz sonrası masturbasyon yöntemiyle Fertijin ÜYTE merkezinde Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine uygun olarak steril, geniş ağızlı polipropilen kaplara alındı. Örneklerin oda ısısında 30 dakika likefiye olması beklendi (57).

5.2.3. Lökosit Konsantrasyonu Tespiti

Semen örneğinde yuvarlak hücre konsantrasyonunu belirlemek için Makler sayım kamarasına 10µl semen örneği koyularak faz kontrast mikroskopta (Nikon E-400) X20 objektif ile sayım yapıldı. Konsantrasyon milyon/ml olarak belirlendi. Hücre konsantrasyonu $> 1 \times 10^6$ ise Leucoscreen (FertiPro Belçika) kiti ile boyanarak lökositlerin ayrımı yapıldı. Hazırlanan reaktandan alınan 10µl'lik solüsyon ile 10µl likefiye olmuş semen örneği lam üzerinde karıştırıldı ve üzerine lamel kapatılarak faz kontrast mikroskopta (Nikon E 400) X40 objektifte 100 hücre sayılarak kahverengi boyanan lökositlerle pembe boyanan diğer yuvarlak hücrelerin yüzdesi belirlendi. Bu yüzde

yuvarlak hücre konsantrasyonu ile çarpılarak milyon/ml olarak lökosit konsantrasyonu belirlendi (67).

5.2.4. Swim-Up Yöntemi

Normospermi ve lökositospermi grubuna ait sperm parametreleri (sayı, hareketlilik, progresyon, aglutinasyon, yuvarlak hücre ve morfoloji) makler chamber ile değerlendirildikten sonra 15 ml falcon yuvarlak dipli tüplerde üzerlerine 2 ml sperm hazırlama medyumunu konarak 37° C, % 5 CO₂ ve % 95 nem içeren Herause BBD 6220 inkübatörde 2 saat süreyle 45° açı ile yüzmeye bırakıldı (68).

Normospermi ve lökositospermi vakalarında spermilerin yüzmüş olduğu bölgeden ~ 10µl alınan örnek 12 mm çapındaki lameller üzerine ince bir tabaka halinde yayıldı. Kuruması beklenen örnekler 10 dakika süreyle - 20°C deki aseton ile fiske edildi. Fiksasyona - 20°C deki metanolla 10 dakika boyunca devam edildi. Nunc 4 kuyucuklu kültür kaplarında her bir kuyucuğa bir lamel konularak immün boyama için hazırlandı.

5.2.5. Konsantrasyon Yöntemi

Lökositospermi ve normospermi vakalarında swim up sonrası kalan kısım Herause labofuge 400 santrifüjde 300 g'de 10 dakika süreyle 15 ml'lik falcon yuvarlak dipli tüplerde santrifüj edildi (57). Tüpün üzerinde kalan kısım dökülerek pellet kısmından ~ 10µl alınan örnek 12 mm çapındaki lameller üzerine ince bir tabaka halinde yayıldı. Kuruması beklenen örnekler 10 dakika süreyle - 20°C deki aseton ile fikse edildi ve fiksasyona - 20°C deki metanol ile 10 dakika boyunca devam edildi. Hazırlanan lameller Nunc 4 kuyucuklu kültür kaplarında her bir kuyucuğa bir lamel olacak şekilde ayrıldı. Her bir kuyucuğa hasta isimleri hangi grup örneği olduğu, konsantrasyonu ve günün tarihi not edildi.

5.2.6. İmmünohistokimyasal Boyama

Nunc 4 kuyucuklu kültür kaplarında bulunan lameller rehidratasyon amacıyla PBS (fosfat tampon çözeltisi) solüsyonuyla yıkandı. En son PBS alınarak non-immün serumla (Zymed histostain kit) 20 dakika süreyle bloking işlemi uygulandı. Bloking sonrası her bir kuyucuğa 1µl anti-fosfo tirozin primer (Neomarkers) antikor uygulaması yapıldı. Dörtlü kuyucukların ortasına ıslak pamuk yerleştirilerek streç film ile hava alması engellenecek şekilde kaplandı ve 4°C da 1 gece inkübasyona bırakıldı. Primer antikorlar toplanarak 3 kez 5'er dakika süreyle PBS solüsyonuyla yıkandı. Sekonder antikor olarak 20 dakika süreyle biotin uygulaması yapıldı ve PBS yıkamaları tekrarlandı. HRP (horse raddish peroksidaz) streptavidin 20 dakika süreyle uygulandı ve takiben PBS yıkamaları tekrarlandı. Son yıkama aşamasında aminoetilkarbazol kromojen hazırlandı ve son yıkama sonrasında her bir kuyucuğa kromojen koyularak karanlıkta reaksiyon oluşana kadar ~ 25 dakika inkübe edildi. Spermelerde oluşan reaksiyonlar Olympus inverted mikroskop altında değerlendirilerek reaksiyon durduruldu ve hematoksilen ile zıt boyama uygulandı. Çeşme suyu ile iki kez yıkandıktan sonra daha önce % 70 lik alkol ile temizlenmiş lamellar üzerine tarih, isim ve hangi grup örneği olduğu yazılarak lameller kapatma solüsyonu ile yapıştırılarak kurumaya bırakıldı. Reaksiyon veren spermelerin tüm lamel üzerindeki total spermelere oranı alınarak pozitif reaksiyon veren sperm yüzdesi hesaplandı. Örnekler Olympus BX 50 ışık mikroskopunda X 600 büyütmede fotoğraflandı.

5.2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Analize 63 hasta dahil edildi. Kategorik değişkenler için frekans tabloları, sayısal değişkenler için tanımlayıcı istatistikler (ortalama, std. sapma, ortanca, minimum, maksimum) sunuldu. Gruplar arası ortalama fark kontrolünde normal dağılım koşulu sağlanmadığından Mann Whitney-U test tekniği kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p değerinin 0,05 ten küçük olması durumu olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

Çalışmamıza % 66,7'si (n=42) normospermi, %33,3'ü (n=21) lökospermi olan 63 hasta dahil edildi. Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemiyle uyguladığımız immünohistokimya sonucu fosfo tirozin ekspresyonunun tüm gruplarda spermilerin kuyruk bölgesinde lokalize olduğu tespit edildi. Spermilerin kuyruğunda izlenen aktivasyonun esas parçalarda lokalize olduğu gözlemlendi (Resim 1).



Resim 1: Sperm kuyruğunda esas parçada lokalize immün ekspresyon izlenmekte.
Hematoksilen, X 600.

Hasta bazında ekspresyon seviyelerinin bireysel farklılıklar gösterdiği izlendi. Bazı vakalarda hiç ekspresyon yok iken bazılarında yüksek aktivasyon değerleri tespit edildi (Tablo1,2).

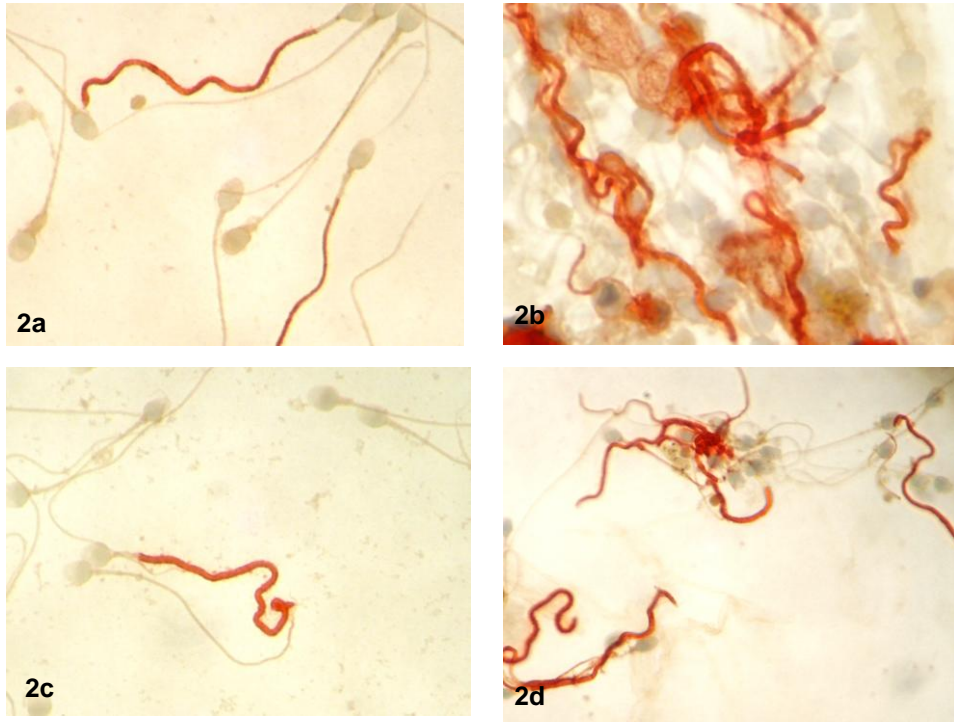
NORMOSPERMİ	Swim-up	Konsantrasyon
Ortalama %	1,88	2,78
Minimum	0	0
Maksimum	19,6	25,3

Tablo 1: Normospermili örneklerde fosfo tirozin kinaz ekspresyonu değerleri.

LÖKOSPERMİ	Swim-up	Konsantrasyon
Ortalama %	1,71	2,20
Minimum	0	0
Maksimum	10	19,63

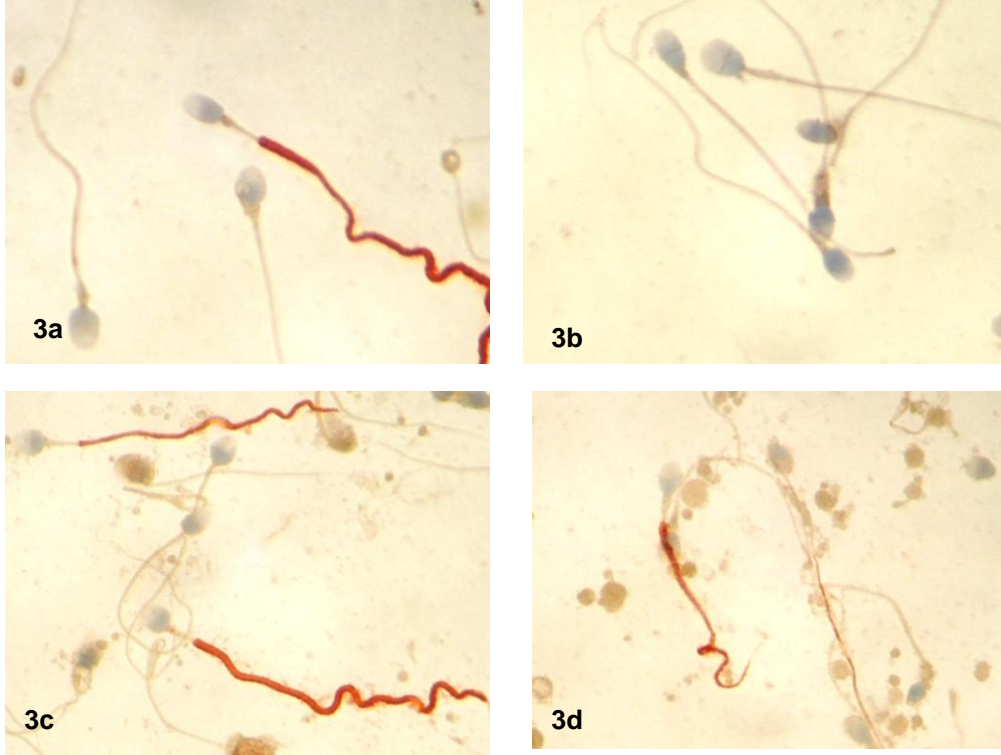
Tablo 2: Lökospermili örneklerde fosfo tirozin kinaz ekspresyonu değerleri.

Normospermili vakaların swim-up yöntemiyle hazırlanan örneklerde fosfo tirozin kinaz ekspresyonu pozitif sperm sayısı yüzdesi ortalama $1,88\pm3,71$ konsantrasyon yöntemiyle hazırlanan gruba ait örneklerde ise ortalama $2,78\pm5,27$ olarak bulundu (Resim 2). Santrifüje ve dolayısıyla reaktif oksijen türevlerine maruz kalan konsantrasyon grubunda tirozin kinaz aktivitesinde bir artış izlenmesine karşın bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.



Resim 2: Normospermili vakalarda swim-up yöntemiyle (a-c) ve konsantrasyon yöntemiyle (b-d) hazırlanmış spermelerde fosfo tirozin kinaz ekspresyonu. Hematoksilen, X 600.

Lökospermili vakaların swim-up yöntemiyle hazırlanmış olan grubunda fosfo tirozin aktivasyonu ortalaması $1,71 \pm 3,02$ konsantrasyon yöntemiyle hazırlanan örneklerde ise tirozin kinaz aktivasyonu gösteren sperm oranı $2,20 \pm 4,67$ olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel fark saptanmadı (Resim 3).



Resim 3: Lökospermili vakalarda swim-up yöntemiyle (a-c) ve konsantrasyon yöntemiyle (b-d) hazırlanmış spermelerde fosfo tirozin kinaz ekspresyonu. Hematoksilen, X600.

Normospermi ve lökospermili grupların swim-up ve konsantrasyon yöntemleri kullanılarak aynı şekilde hazırlanmış sperm örneklerinde aktivasyon değerleri karşılaştırıldığında da gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi.

7. TARTIŞMA

Spermilerin testislerde olgunlaştıktan sonra epididimal matürasyonlarını tamamlayıp ejakülasyon sonucu vücut dışına çıkmaları oositleri fertilize etme yeteneğine sahip oldukları anlamına gelmemektedir. Akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon oluşabilmesi spermilerin dişi genital sisteminde ilerlerken kazandıkları kapasitasyon yeteneğine bağlıdır. Ancak kapasitasyon yeteneği kazanan ve hiperaktivasyon gösteren spermier akrozom reaksiyonunun gelişmesi sonucu oosit fertilizasyonunu gerçekleştirebilirler. Spermier, kendi genetik yapılarını oositin genetik yapısıyla birleştirerek yeni bir genotipin oluşumunu sağlarlar. Spermier dişi genital kanallarından geçişleri sırasında oositi fertilize etme yeteneği ve ileri doğru hareket yeteneği kazanırlar. Bu durum zona pellusidaya bağlanma ve sonrasında gelişen ekzositoz için ön koşuldur. Sperm kapasitasyonu sırasında birçok biyokimyasal olay ve membran yapısının değişimi gerçekleşir (54). Bu işlemler sırasında membranın kolesterol içeriği azalır ve iyonik membran geçirgenliği artar (69). Bu durum membran hiperpolarizasyonuna öncülük ederken hücre içi pH, Ca^{+2} ve cAMP konsantrasyonlarında artışa neden olur (70). Bunlara ilave olarak spermier kapasitasyon altında iken yüksek oranda süperoksit iyonu ürettiği ve tirozin fosforilasyonunun arttığı bilinmektedir. Tirozin fosforilasyonunun değişik sperm aktiviteleri üzerindeki önemi gösterilmiştir. Motilitedeki modifikasyon biçimi genellikle kapasitasyon ile ilişkili geçici bir davranış tarzıdır. Kapasitasyona uğramış spermierin süperoksit iyonu ürettikleri ve bunun sonucunda da insan spermierinde tirozin fosforilasyonunu stimüle ettikleri bildirilmiştir (40). Spermier ürettiği süperoksit iyonunun cAMP ve Ca^{+2} düzenlemesi altında olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber kinaz ve fosfataz enzimlerinin sperm fosfotirozin içeriğinin düzenlenmesinde anahtar rol oynadığı anlaşılmıştır (18). Sperm kapasitasyonu ve protein tirozin fosforilasyonunda ROT'ların rol oynadığı bilinmektedir. Kapasite spermier tarafından üretilen süperoksit iyonları hidrojen peroksitle birlikte protein tirozin fosforilasyonunu stimüle etmektedir. Yapılan çalışmalar Ca^{+2} un sperm protein fosforilasyonunda rolü olduğunu ancak spermierin kapasite olamayacakları koşullarda mevcut hücre dışı Ca^{+2} un protein tirozin fosforilasyonunda azalmaya neden olduğunu bildirmektedir (17).

Mililitredeki bir milyon ya da üzerindeki peroksidaz pozitif lökositin tespiti, lökositospermi olarak adlandırılır (57). Lökositospermi sperm parametrelerini olumsuz

etkilemesinin yanı sıra semende ROT oluşumunun aşırı artışına sebep olur. Sperm süspansiyonlarında artan ROT'nin sperm parametrelerini olumsuz etkilediği bildirilmiştir ROT'nin yüksek miktarlara ulaşması da sperm tirozin kinaz aktivitesinin azalmasına ve sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunun olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır (35). Enfeksiyonlara bağlı olarak artan lökosit konsantrasyonu sonrası spermiler yüksek oranda ROT'nin olumsuz etkilerine maruz kalırlar. Sperm örneklerindeki yuvarlak hücrelerin tümü lökositlerden oluşmamaktadır, erkek üreme sistemine ait dokulardan gelen hücrelerin semende bulunması ROT kaynağı olduklarını göstermemektedir. Bunların ayrımının lökositler yönünden peroksidaz pozitif olarak tespiti önemlidir. ROT'nin sperm tirozin kinaz aktivitesi üzerine etkilerini immünohistokimyasal olarak incelediğimiz çalışmamızda yardımcı üreme teknikleri için başvuran hastaların spermioqram testlerinde peroksidaz pozitif yuvarlak hücre konsantrasyonları 1milyon/ml üzerinde olan hastalar çalışmaya dahil edilmiş. Profilaktik olarak antibiyotik kullanılan hastalar çalışma grubuna dahil edilmemiştir. Aynı zamanda yardımcı üreme teknikleri için sperm hazırlığı aşamasında santrifüj uygulanan konsantrasyon yöntemi sonrasında sperm süspansiyonlarında ROT'nin uygulanan santrifüj işlemine bağlı olarak artması söz konusu olmaktadır (64,65). Santrifüj işleminin uygulanmadığı swim up yönteminde ise bu etki oluşmamaktadır. Fizyolojik kabul edilen düşük düzeylerde ki ROT'nin sperm fonksiyonlarını olumlu etkilediği ancak artan konsantrasyonlarda sperm immobilizasyonu ve ölüme yol açtığı da bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, düşük dozlardaki H₂O₂ in spermilerde adenil siklaz aktivasyonu ile cAMP'yi artırdığını ve PKA aktivasyonu ile tirozin fosforilasyonuna yol açtığını bildirmektedir (43). Düşük ve yüksek konsantrasyonlarda ROT'nin tirozin kinaz aktivasyonu üzerindeki etkilerinin değiştiği bilindiği için çalışmamızda, lökosperminin kaynak oluşturduğu ROT üretimini etkilerinin yanı sıra semenin hem santrifüj uygulanmayan swim-up yöntemi, hem de ROT üretimine neden olan santrifüj yöntemiyle hazırlanması ile oluşturulan iki alt grup oluşturuldu. Lökospermili bireylerden elde edilen sonuçlar normospermili bireylerden alınan semen örneklerinin aynı yöntemlerle hazırlanan örneklerine ait fosfo tirozin immün ekspresyon sonuçlarıyla karşılaştırıldı. İmmün boyama sonuçlarını değerlendirdiğimizde tirozin kinaz aktivasyonunun spermilerin kuyruk bölgesinde esas parçada lokalize olduğu izlendi. Mevcut çalışmalar tirozin kinaz aktivasyonunun öncelikle esas parçada olduğunu ve esas parçada gerçekleşen ekspresyonu takiben orta parçada geliştiğini bildirmektedir (16). Tüm

gruplarda sperm kuyruklarının esas parçalarında immün pozitif reaksiyon tespit etmemize karşın bazı kaynaklar tirozin fosforilasyonunun tamamlanmış kapasitasyon ya da zona pellusida füzyonunu takiben arttığını ve akrozomal bölgede de gerçekleştiğini bildirmektedir (19). Çalışma grubunu oluşturan bireylerde ekspresyon seviyelerinin farklılıklar gösterdiği bazı bireylerde hiç immün reaksiyon izlenmezken bazılarında yüksek oranda immün reaktif sperm bulunduğu tespit edildi. Normospermili grupta immünpozitiflik oranlarının ortalama değerleri alındığında sperm hazırlama tekniklerinden konsantrasyon yöntemi uygulanan ve in-vitro olarak ROT artışı olduğu kabul edilen örneklerde aktivasyon oranının arttığı ancak bu artışın swim-up yöntemiyle karşılaştırıldığında anlamlı olmadığı görüldü. Lökospermili grupta swim-up yöntemiyle hazırlanan sperm örneklerinde immün reaktivite oranının normospermili gruba göre çok az düşüş gösterdiği izlendi. ROT üretiminin tirozin kinaz aktivitesini arttırdığı ancak aşırı ROT üretiminin bu aktivitede değişikliklere yol açtığı mevcut çalışmalarda bildirilmiştir (18-22). Araştırmamızı planladığımızda, in-vitro ortamlarda farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ ilave ederek hazırladığımız deney gruplarında tirozin kinaz immün aktivitesi ve ROT konsantrasyonu ilişkisini değerlendirdiğimiz ön bir çalışma gerçekleştirdik. Tez çalışmamıza dahil etmediğimiz ön çalışma sonuçlarında fizyolojik sınırların üzerinde yüksek ROT varlığının tirozin kinaz aktivitesini azalttığını ancak daha yüksek ROT konsantrasyonlarında tirozin kinaz aktivitesinin yine artış gösterdiğini gözlemledik. Bu bilgilere paralel olarak lökospermili grupta lökosit kaynaklı mevcut yüksek ROT'nin tirozin kinaz aktivitesini az da olsa düşürdüğü, lökospermili gruba artı ROT üretimine neden olacak santrifüjlü konsantrasyon yöntemi uygulandığında ise aktivasyonun yeniden artış gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Elde etmiş olduğumuz bulguların sperm tirozin kinaz aktivitesinin lokalizasyonu ve ROT ile ilişkisinin tanımlanmasına bir katkı sağladığını ancak bireysel farklılıkların açıklanabilmesi için vaka sayılarının artırılarak klinik anlamda da katkı sağlanabilmesi amacıyla ileri çalışmalarla genişletilmesi gerektiğini söyleyebiliriz.

8. SONUÇ

- İmmünohistokimyasal olarak fosfo tirozin ekspresyonunun tüm gruplarda spermilerin kuyruk bölgesinde ve esas parçada lokalize olduğu tespit edildi.
- Ekspresyon seviyelerinin bireysel farklılıklar gösterdiği izlendi.
- Normospermili vakalarda ROT üretimine neden olan santrifüj işleminin sperm örneklerinde fosfo tirozin ekspresyonunda artışa neden olduğu tespit edildi.
- ROT'nin semende en önemli kaynağı olan lökosit içeren lökospermili grupta olası yüksek ROT değerlerinin fosfo tirozin ekspresyonunda azalmaya yol açtığı izlendi.
- Lökospermili gruba uygulanan santrifüj işlemine bağlı olarak daha fazla arttığı düşünülen ROT değerlerinin düşmüş fosfo tirozin ekspresyonunu tekrar yükselttiği gözlemlendi.
- Tüm bulgular değerlendirildiğinde belirli konsantrasyonda düşük düzeylerde ortaya çıkan ROT'nin tirozin kinaz ekspresyonunu arttırdığı. Yüksek ROT değerlerinin belirli bir konsantrasyonda ekspresyonda azalmaya yol açarken aşırı ROT değerlerinin tirozin aktivasyonunu tekrar artırdığı sonucuna varıldı.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisansım süresince, tüm eğitimim ve çalışmalarım esnasında bilgi birikimini paylaşan, katkılarını ve hoşgörüsünü esirgemeyen tezimi hazırlamam esnasında bilgisini desteğini ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanı hocam Sayın Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Bio. Türkan SARIOĞLU ve Bio. Melike ERSÖZ'e

Yüksek Lisansımın her aşamasında desteği ve yardımı olan arkadaşım İlknur KARAOSMANOĞLU'na,

Bugünlere gelmemde sonsuz emeği olan sevgili Anneme, sevgili Babama,
Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen sevgili eşim
Güliz TAVUKÇUOĞLU'na ve canım oğlum Sarp'a

TEŞEKKÜR EDERİM.

10. KAYNAKLAR

1. de Lamirande E, Harakat A, Gagnon C. Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH is associated with the production of superoxide anion. *J Androl.* 1998, 19:215-25.
2. de Lamirande E, Leclerc P, Gagnon C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosomereaction and fertilization. *Mol Hum Reprod.* 1997,3:175-194.
3. Burks DJ, Carbalada R, Moore HDM and Sailing PM. Interaction of tyrosine kinase from human sperm with the zona pellusida at fertilization. *Science* 1995, 269:83-86.
4. Parinaud J and Milhet P. Progesteron produces a Ca^{+2} dependent 3',5' cyclic adenosine monophosphate increase in human sperm. *J Clin Endoc Metabolism.* 1996, 81: 1357-1360.
5. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Interaction between Ca^{+2} cyclic 3',5' adenosine monophosphate the superoxide anion and tyrosine phosphorylation in the regulation of human sperm capacitation *J Androl.* 1998, 19:434-443.
6. Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M and Irwine D. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox regulated cAMP mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci.* 1998, 111: 645- 656.
7. Quinn P, Lydic ML, Ho M, Bastuba M, Hendee F, Brody SA. Confirmation of the beneficial effects of breif co incubation of gametes in human in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1998, 69:399-402.
8. Pawson T, Raina M, Nash P. Interaction domains: From simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Letters* 2002; 513:2-10.
9. Doğan AL, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004, 35:34-42.
10. Hunter T. Signalling –2000 and beyond. *Cell* 2000, 100:113-127.
11. Neet K and Hunter T. Vertebrate non receptor protein tyrosine families. *Genes Cells* 1996, 1:147-169.
12. Visconti PE and Kopf GS. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998, 59:1-6.
13. Leyton L and Sailing P. 95 kDa sperm proteins bind ZP3 and serve as tyrosine kinase substrates in response to zona binding. *Cell* 1989, 57:1123-1130.

14. Sakkas D, Lepens –Luisier G, Lucas H, Chardonnnes D, Campana A, Franken DR, Urner F. Localisation of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biol Reprod.* 2003, 68: 1463-1469.
15. Petrunkina AM, Gehlhaar R, Drommer W, Waberski D, Topfer-Petersen E. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reprod.* 2001, 121: 889-896.
16. Naz RK, Ahmad K, Kumar R. Role of membrane phosphotyrosine protein in human spermatozoal function. *J Cell Sci.* 1991, 99: 157-165.
17. Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moos SB. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin- dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol.* 1996, 180: 284-296.
18. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein –tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radical Biology Medicine.* 1997, 22:643-656.
19. Urner F, Lepens-Luisier G, Sakkas D. Protein tyrosine phosphorylation in sperm during gamete interaction in the Mouse: the influence of glucose. *Biol Reprod.* 2001, 64: 1350-1357.
20. Mahony MC and Gwathmey T. Protein tyrosine phosphorylation during hyperactivated motility of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) spermatozoa. *Biol Reprod.* 1999, 60:1239-1243.
21. Nassar A, Mahony M, Morshedi M, Lin MH, Srisombut C, Oehninger S. Modulation of sperm tail protein tyrosine phosphorylation by pentoxifylline and its correlation with hyperactivated motility. *Fertil Steril.* 1999, 71:919-923.
22. Naz RK and Preeti B Rajesh. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reprod Biol and Endoc.* 2004, 11:1-12.
23. Naz RK. Involvement of protein serin and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1999, 60:1402-1409.
24. de Lamirande E and Gagnon C. The extra cellular signal-regulated kinase ERK pathway is involved in human sperm sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol Human Reprod.* 2002, 8:124-135.

25. Maiti A, Mishra KP, Majumder GC. Identification of goat sperm ecto-cyclic AMP independent protein kinase substrate localized on sperm outer surface. *J Cell Biochem.* 2004, 92:164-177.
26. Ashizawa K, Hoshimoto K, Higashio M, Tsuzuki Y. The addition of mitogen-activated protein kinase and p34cdc2 kinase substrate peptides inhibits the flagellar motility of de membrated fowl spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997, 240:116-121.
27. Luconi M, Krausz C, Barni T, Vanelli GB, Forti G, Baldi E. Progesteron stimulates p42 extracellular signal-regulated kinase (p42erk) in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1998, 4:251-258.
28. Martinez P and Morros A. Membran lipid dynamics during human sperm capacitation. *Front Biosci.* 1996, 1:103-107.
29. Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm, beta cyclodextrins initiate transmembran signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem.* 1999, 274: 3235-3242
30. Fraser LR. Minimum and maximum extracellular Ca⁺² requirments during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. *J Reprod Fertil.* 1987, 81:77-89.
31. Baker MA, Hetherington L, Ecroyd H, Roman SD, Aitken RJ. Analysis of the mechanism by wich calcium negatively regulates the tyrosine posphorilation cascade associated with sperm capacitation. *J Cell Sci.* 2004, 117:211-222.
32. Temma K, Shimoya K, Hashimoto K, Zhang Q, Koyama M, Murata Y. Detection of erythropetin in human seminal plazma. *Fertil Steril.* 2004, 81:798-801.
33. Naz RK and Kaplan P. Interleukin-6 enhances the fertilizing capacity of human sperm by increasing capacitation and acrosome reaction. *J Androl.* 1994, 15:228-233.
34. Halliwell B and Gutteridge JM. Antioxidant defense mechanisms from the beginning to the end (of the beginning) *Free Radical Research* 1999, 4: 261-272.
35. Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species *Hum Reprod Emb.* 2004, 10: 387-399.
36. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, and Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine* 1996, 26: 869-880.

37. Agarwall A, Saleh R and Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003, 79:829–843.
38. Pardon F, Bracekett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril*. 1997, 67:1115-1120.
39. Alvarez JG and Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 1995, 42: 334-346.
40. de Lamirande E and Gagnon C. Capacitation associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine* 1995, 18: 487-495.
41. Aitken RJ, Buchingham DW, Harkiss D, Paterson M, Fisher H, Irwin DS. The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation. *Mol Cell Endocrinol*. 1996, 117:83-93.
42. Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irwin DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated cAMP – mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J Cell Sci*. 1998, 111: 645-656.
43. Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*. 2004, 70:518-522.
44. Duan C and Goldberg E. Inhibition of lactate dehydrogenase C4 (LDH-C4) blocks capacitation of mouse sperm in vitro. *Cytogenet Genome Res*. 2003, 103:352-359.
45. Gavella M, Lipovac V, Sverko V. Superoxide anion production and some sperm-specific enzyme activities in infertile men. *Andrologia* 1995, 27:7-12.
46. Revelli A, Ghigo D, Moffa F, Massobrio M, Tur-Kaspa I. Guanylate cyclase activity and sperm function. *Endoc Rev*. 2002, 23:484-494.
47. Belen-Herrero M, Chatterjee S, Lefievre L, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000, 29:522-536.
48. Sengoku K, Tamate K, Yoshida T, Takaoka Y, Miyamoto T, Ishikawa M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 1998, 69:522-527.

49. Sukcharoen N, Keith J Irvine DS, Aitken RJ. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertil Steril*. 1995, 63:1293-1300.
50. Babior BM. NADPH oxidase an update. *Blood* 1999, 93:1464-1476.
51. Cooper C, Patel RP, Brookes PS and Darley-Usmar VM. Nanotransducers in cellular redox signalling. Modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem Sci*. 2002, 27:489-492.
52. Salmeeen A, Andersen JN, Myres MP, Meng TC, Hinks JA, Tonks NK and Barford D. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a silyphenil amid intermediate. *Nature* 2003, 423:769-773.
53. Aitken RJ and Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod Fertil and Develop*. 2004, 16:581-588.
54. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ, Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reprod*. 2001, 16:1922-1930.
55. Aitken RJ, Hulme MJ, Henderson CJ, Hergreave TB, Ross A. Analysis of the surface labeling characteristic of human spermatozoa and the interaction with anti-sperm antibodies. *Journal of Reproduction & Fertility* 1987, 80:473-485.
56. Wolff H. The biological significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 1995, 63:1143-1147.
57. World Health Organization WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. *Cambridge University Press*. 1999
58. Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Naz RK, Sikka SC. Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. *Fertil Steril*. 1995, 64:166-171.
59. Plante M, de Lamirande E and Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril*. 1994, 62:387-393.
60. Pasqualotto FF, Sharma RK, Agarwal A, Nelson DR, Thomas AJ and Potts JM. Seminal oxidative stress in chronic prostatitis patients. *Urology* 2000, 55: 881-885.
61. Shekarriz M, Thomas AJ, and Agarwal A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. *Adult Urol*. 1995, 45:103-107.

62. Kovalski NN, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effects of seminal plasma and scavengers. *Ferti Steril.* 1992, 58:809-816.
63. Ralf RH and Wolf- Bernhard S. Sperm preparation for ART. *Repro Biol and Endoc.* 2003, 1:1081-22.
64. Mc Kinney KA, Lewis SEM, Thonpson W. Persistent effects of pentoxifylline on human sperm motility, after drug removal in normozoospermic and asthenozoospermic individuals. *Andrologia* 1994, 26:235-240.
65. Calogero AE, Fishel S, Hall J, Ferrera E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burello N, Thonton S, D'Agata R. Corelation between intracellular cAMP content kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Human Reproduction* 1998, 13: 911-915.
66. Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. Effects of phosphodiesteraz inhibitors caffein and pentoxifylline on spontaneous and stimulus induceed acrosome reaction in human sperm. *Fertil Steril.* 1992, 58:1185-1189.
67. Barrat CLR, Bolton AE, Cooke ID. Functional significance of white blood cell in the male and female reproductive track. *Human Reproduction* 1990, 5:639-644.
68. Mahadevan M and Baker G. Assesment and preparation of semen for in vitro fertilization in: *Clinical in vitro Fertilization* Edited by: Wood C, Trounson A, Springer-Verlag Berlin; 1984, 83-97.
69. Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod.* 1998, 59:7-11.
70. Zeng Y, Clark EN, Florman HM. Sperm membran potential: hyper-polarization during capacitation regulates zona pellucida dependent acrosomal secretion. *Dev Biol.* 1995, 171:554-563.
71. Yılmaz Ö, Turgay N. Sitokin ilişkili hücre içi sinyal iletimi ve paraziter enfeksiyonlardaki önemi. *Türkiye Paraz Derg.* 2009, 33:4301-4306.