



NORMAL, FAZLA KİLOLU VE OBEZ BİREYLERDE İZUMO-1 SPERM YÜZEY RESEPTÖRÜNÜN EKSPRESYON DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI*
THE CONTRAST OF THE EXPRESSION LEVEL IN İZUMO-1 SPERM RECEPTORS FOR NORMAL, OVERWEIGHT AND OBESE PERSON

Vahide Cansu SEYMENOĞLU¹, Gözde Özge ÖNDER¹, Fazile CANTÜRK TAN², Münevver BARAN³, Oğuz EKMEKÇİOĞLU⁴, Güzide ŞATIR BAŞARAN⁵, Arzu YAY¹

¹Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kayseri

²Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Kayseri

³Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Kayseri

⁴Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Kayseri

⁵Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri

ÖZ

Çalışmamızda normal, fazla kilolu ve obez bireylerde sperm kalite düzeyleri arasındaki farklılıkları, sperm-yumurta füzyonunda görev alan İzumo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyon düzeylerini ve artmış Beden Kitle İndeksi (BKİ)'nin sperm DNA'sı üzerine olası etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Çalışmada, 18-35 yaş aralığında, BKİ normal (n=20), fazla kilolu (n=19) ve obez (n=18) erkek bireylerden alınan semen örnekleri kullanıldı. Sperm örnekleri Diff Quik boyama yöntemi ile boyanarak morfolojik kriterleri açısından değerlendirildi. İzumo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyon düzeylerini belirlemek için western blot analizi kullanıldı. Sperm DNA hasarlarını belirlemek amacıyla yüksek alkali şartlarda tek hücre jel elektroforezi yöntemi kullanıldı. Gruplara ait olan sperm örneklerinde, ortalama sperm konsantrasyonu, sperm motilite oranı ve normal morfolojiye sahip sperm oranlarının özellikle de obez bireylerde düştüğü gözlemlendi. Morfolojik hasarların, obez bireylerden fazla kilolu ve normal kilolu bireylere doğru azaldığı belirlendi. İzumo-1 sperm yüzey reseptörü ekspresyon düzeylerine bakıldığında, en yüksek İzumo-1 ekspresyonu obez grubunda bulunmaktaydı (p>0.05). Gruplardaki DNA hasarı incelendiğinde comet parametreleri, sperm morfolojik değerlendirme sonuçları ile uyumlu olarak diğer gruplara göre obez grubunda DNA hasarının anlamlı derecede arttığını gösterdi (p<0.001). Sonuç olarak çalışmamızda, BKİ'nin erkek infertilitesi ve bununla ilişkili olan sperm sayısı ve morfolojisi ya da sperm DNA hasarı ile İzumo-1 protein ekspresyonu, ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: İzumo-1, sperm yüzey reseptörü, tek hücre jel elektroforezi, western blot.

ABSTRACT

In this study it was aimed to determine; the differences between the sperm qualities of normal, over weight and obese person, the expression levels of the Izumo-1 sperm receptor which is assigned in sperm-egg fusion and the possible effects of the increased body mass index (BMI) on the sperm DNA. Semen samples from normal (n=20), over weight (n=19) and obese (n=18) male subject saged 18-35, were used in the study. Sperm samples were stained with Diff Quick staining method and evaluated for morphological criteria. Western blot analysis was used to determine the expression level of Izumo-1. The alkaline comet assay method was used to determine the sperm DNA damages. Mean sperm concentration, sperm motility ratio and sperm rates with normal morphology fell in obese subjects in the sperm samples. Morphological damages were found to decrease from obese individual stoover weight and normal weight individuals.

The highest level of Izumo-1 sperm receptor expression was found in the obese group (p>0.05). Comet parameters showed significant increase in DNA damage in obese group compared to other groups (p<0.001). In conclusion, our study showed that BMI correlates with male infertility and associated sperm count and morphology or sperm DNA damage with Izumo-1 protein expression.

Keywords: Cometassay, Izumo-1, sperm surface receptor, western blot.

Corresponding Author: Doç. Dr. Arzu YAY, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Betül Ziya EREN Genom ve Kök Merkezi, Kayseri, ORCID: 0000-0002-0541-8372, E-mail: arzu.yay38@gmail.com

Yüksek Lisans Vahide Cansu Seymenoğlu, cansu_s90@hotmail.com, 0000-0001-6240-2644

Dr. Öğr. Üyesi Gözde Özge ÖNDER, gozdekorkmaz@erciyes.edu.tr, 0000-0002-0515-9286

Doç. Dr Fazile CANTÜRK TAN, fcanturk@erciyes.edu.tr, 0747-2209-0000-0002

Dr. Öğr. Üyesi Münevver BARAN, b.munever@hotmail.com, 0000-0003-0369-1022

Prof. Dr Oğuz EKMEKÇİOĞLU, oguz.ekmekcioglu38@gmail.com, 0000-0003-3259-992X

Arş. Gör. Güzide ŞATIR BAŞARAN, gbasaran@erciyes.edu.tr, 0000-0002-8232-5006

*4. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Antalya, Türkiye kongresinde sunulmuştur.

Makale Geliş Tarihi : 17.05.2020

Makale Kabul Tarihi: 28.10.2020

GİRİŞ

Obezite, besinler ile vücuda alınan enerjinin harcanan enerjiden fazla olması durumunda, vücut yağ kitlesinin artması ile karakterizedir ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından en riskli 10 hastalıktan biri olarak kabul edilir. Obezite beden kitle indeksi (BKİ) ile ölçülebilmektedir. BKİ, bireyin vücut ağırlığının (kg), boy uzunluğunun (metre cinsinden) karesine ($BKİ=kg/m^2$) bölünmesiyle elde edilen bir değerdir (1). Obeziteye bağlı kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, insülin direnci gibi hastalıklar incelenirken beden sağlığı üzerine odaklanılsa da, veriler infertiliteye de neden olduğu yönündedir (2,3). İnfertilite, korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yılın sonunda gebelik sağlanamaması olarak tanımlanır (4). İnfertilite nedeninin yaklaşık %40-50'si kadın faktörü iken, %30-40'ının erkek faktörü olduğu görülmektedir (5). Erkek infertilitesine neden olan faktörler inmemiş testis, testis torsiyonu, varikosel ve üreme kanallarının obstrüksiyonu olarak bilinse de, son zamanlarda artmış BKİ'nin erkek üreme fonksiyonları üzerinde negatif bir etkiye sahip olduğu da bildirilmektedir (1). Fertilizasyon doğal olarak bir bireyin gelişmesini sağlayacak olan zigotun oluştuğu önemli bir süreçtir. Bu süreçte sperm ve yumurta, zar füzyonu da dahil olmak üzere sıralı olaylara eşlik eder. İnsan üreme kontrolünde fertilizasyonun önemine rağmen, füzyonun altında yatan moleküler temel bir sır olarak kalmıştır. Spermatozoa membranında sperm hücresine özgü proakrozin, PH-20, PH-30, sp56, galaktoziltransferaz, spermadezinler, progesteron reseptörü (6) ve İzumo-1 gibi antijenler bulunur. Bir sperm membranı yüzey reseptörü olarak bilinen İzumo-1, sperm ve yumurta hücrelerinin füzyonunda etkili ve gerekli bir membran yüzey reseptörü olarak tanımlanmıştır (7).

Sperm DNA kalitesi kişinin üreme yeteneğini gösterir. Erkeğin yaşam şekli, beslenme alışkanlıkları da sperm DNA'sının kalitesinde önemli bir rol oynamaktadır. Obez erkeklerde DNA kırılma oranlarının arttığı bildirilmiştir (8). Semen analizi parametreleri olan morfoloji, motilite ve örnekteki spermatozoa konsantrasyonu; üreme potansiyelinin değerlendirilmesi açısından yetersiz kalmaktadır. Semen örneğinde sperm DNA bütünlüğünün tanınması, yüksek oranda üreme etkinliği için çok önemlidir. Bundan dolayı DNA bütünlük çalışmaları, yardımcı üreme tekniklerinin kullanımı öncesinde infertil erkeklerin değerlendirilmesinde son derece önemlidir (9). Bununla birlikte erkek obezitesi ile sperm yüzey reseptörü olan İzumo-1 ve DNA bütünlüğü arasındaki ilişki tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu çalışmanın amacı BKİ normal, fazla kilolu ve obez kişilerden alınan semen örneklerinde BKİ değerleri ile sperm morfolojisi, İzumo-1 yüzey reseptörünün western blot analizi ile ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması ve yüksek alkali şartlarda tek hücre jel elektroforez metoduyla DNA hasarının incelenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 20 Mart 2015 tarih ve 2015/153 no'lu kararı ile Tıp Fakültesi Üroloji Polikliniği ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2015-6180 no'lu proje kodu ile projelendirilmiştir. Erciyes Üniversitesi Tıp

Fakültesi Üroloji Polikliniği'ne başvuran, 18 ile 35 yaş aralığında herhangi bir kronik veya metabolik rahatsızlığı olmayan hastalara çalışma ile ilgili ayrıntılı açıklama yapıp, 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' ile onayları alındı. Çalışmada, hastalardan 2-3 günlük cinsel perhiz sonrası masturbasyon yolu ile elde edilen steril semen örnekleri kullanıldı. Çalışmaya katılan bireylere verilen semen kabına hastanın adı, soyadı ve tarih yazılıp, semen verirken dikkat edilecek hususların bulunduğu yazılı bir form verildi. Hastaların BKİ değerlerine göre gruplar şu şekilde oluşturuldu; a) Normal (n=20); $18.5 \leq BKİ < 25 \text{ kg/m}^2$ b), Fazla Kilolu (n=19); $25 \leq BKİ < 30 \text{ kg/m}^2$ c), Obez (n=18); $BKİ \geq 30 \text{ kg/m}^2$

Örnekler 37°C 'de etüvde 1 saat inkübe edilerek likefiye olması sağlandı. Semen likefiye olma süresini tamamladıktan sonra DSÖ kriterlerine göre; sayı, motilite, volüm, pH ve morfoloji yönünden değerlendirilmek üzere ayrıldı (10). Mikroskopik olarak makler sayım kamerası kullanılarak sperm konsantrasyon ve motilitesi değerlendirildi. Morfoloji için bir damla semen örneği (10 μl) lam üzerine damlatılıp yayılarak havada kurutuldu. Bunu takiben Diff Quik ile boyanarak değerlendirildi (11).

Çalışmada, western blot işlemi için gruplara ait bireylerden alınan ejakulattan protein ekstraksiyonu yapıldı. Bunun için örnekler lysis buffer içinde 30 dakika bekletildi. Daha sonra 13000 rpm de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve protein konsantrasyonu Bradford tekniğiyle belirlendi (12). Proteinler uygun konsantrasyonlarda sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle ayrıştırıldı ve 1 gece boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de poliviniliden florür (PVDF) membranlara transfer edildi. Ertesi gün oda sıcaklığında %5'lik süt tozu kullanılarak 1 saat süreyle bloke edildi. Bloklamaislemi bittikten sonra membran İzumo-1 antikor (1:1000, sc-79543, Santacruz biotechnology, Dallas, Texas, United States) ile bir gece $+4^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. Bağlanmayan primer antikorlar uzaklaştırıldı ve sekonder antikor ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Bağlanmayan sekonder antikorların da uzaklaştırılmasının ardından aranan proteinler gösterildi. Western blot işleminden sonra elde edilen bantların yoğunluğuna göre Image J software programında değerleri alındı ve gruplar arasında karşılaştırma yapıldı (13). Spermde DNA hasarı yüksek alkali şartlarda tek hücre jel elektroforez (comet) yöntemi kullanılarak araştırıldı. Dilüe semen örnekleri $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika 300 g de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan sperm örnekleri PBS ile yıkandı. Daha sonra comet yöntemine geçildi. Kısaca, her bir lam PBS de hazırlanmış %1'lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, 37°C 'de % 0,7'lik düşük erime noktalı agarozun 100 μl 'si ile 10 μl hücre süspansiyonu karıştırıldı ve lamdaki ilk katın üzerine yayıldı. Lamlar buz aküsünün üzerinde $+4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika katılaşmaya bırakıldı. Lameller lamlardan kaldırıldı ve taze hazırlanmış soğuk lysis çözeltisinde (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mMTris, %1 Triton X-100, %10 DMSO ve 40 mMdithiothreitol, pH:10) $+4^\circ\text{C}$ 'de 1 saat lysis edildi. Daha sonra lysis çözeltisine 100 $\mu\text{g/ml}$ proteinaz K (Sigma) eklenecek lamlar 37°C 'de bir gece inkübe edildi. Lamlar lysis çözeltisinden alındı, taze hazırlanmış elektroforez tamponu (300 mMNaOH ve 1 mM EDTA, pH: 13) ile yatay elektroforez tankı dolduruldu ve

lamlar yerleştirildi. DNA sarmalının ayrışması için 20 dakika bekletildi. 8°C'de 12 V-250 mA' de 20 dakika elektroforez yapıldı. Daha sonra lamlar, deterjanların ve alkali iyonların uzaklaştırılması için nötralizasyon çözeltisi (0.4 M Tris, pH 7.5) ile yıkandı. Nötralizasyon işleminden sonra 50 µl ethidiumbromide (1 µg/ml)'le boyandı ve lamelle kapatıldı. DNA hasarının oluşmaması için bütün uygulamalar karanlıkta yapıldı. Elde edilen preparatlardan floresan mikroskop (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) kullanılarak 400x büyütmede görüntüler çekildi. Herbir denekten rastgele seçilmiş 100 hücre görüntüsü Comet Assay Software Project (CASP-1.2.2, Windows 2010) programı ile analiz edildi. DNA hasarı, sperm başından göç etmiş, comete neden olan kırılmış DNA kuyruğunun varlığıyla belirlendi. Kuyruklu görünüm hasarlı, kuyuksuz görünüm hasar görmemiş olarak düşünüldü (14).

Veriler R 3.2.2 programı ile değerlendirildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. İki denekten fazla gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalarda Tukey ve Dunn Bonferroni kullanıldı. Anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edildi.

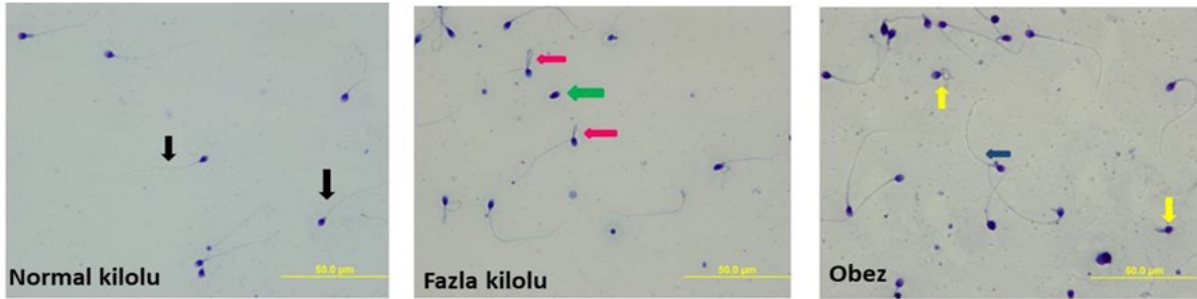
BULGULAR

Çalışmamızda, normal kilolu bireylere (BKİ<25 kg/m²) ait örneklerde (n=20) ortalama sperm konsantrasyonu 15x10⁶/ml, sperm motilite oranı %75 ve normal morfolojiye sahip sperm oranı %36 olarak bulundu. Fazla kilolu bireylere (BKİ<30 kg/m²) ait ejakulatlarda (n=19) ortalama sperm konsantrasyonu 12x10⁶/ml, sperm motilitesi %72 ve normal morfolojili sperm oranı %4 idi. Diff Quik boyaması sonrası obez bireylere (BKİ≥30 kg/m²) ait ejakulatta (n=18) ortalama sperm konsan-

rasyonu 9.4x10⁶/ml, sperm motilitesi %67 ve normal morfolojili sperm oranı %3 olarak bulundu (Tablo I). Ayrıca ışık mikroskopi değerlendirilmesinde, sperm başı yapısındaki anomalilerin ve buna benzer birçok parametrenin obez hastalarda (Dağ defekti ve abeksiyel implantasyon gibi) diğer gruplara göre daha belirgin olduğu gözlemlendi. Görüntüler ışık mikroskopunda x100'lük büyütmede değerlendirilerek ve en az 100 sperm hücresi üzerinde yapılarak elde edilmiştir (Şekil I).

Çalışmada, İzumo-1 sperm yüzey reseptörünün normal, fazla kilolu ve obez bireylerdeki ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi kullanılarak belirlendi. Sonuçlarımıza göre, sperm yumurta füzyonunda görev alan İzumo-1 ekspresyonunun tüm gruplarda mevcut olduğu gözlemlendi. BKİ normal bireylerde İzumo-1 ekspresyonu BKİ yüksek olan bireylere göre daha düşüktü. En yüksek İzumo-1 ekspresyonu ise obez grubunda gözlemlendi (Şekil II). Ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo II) (p>0.05).

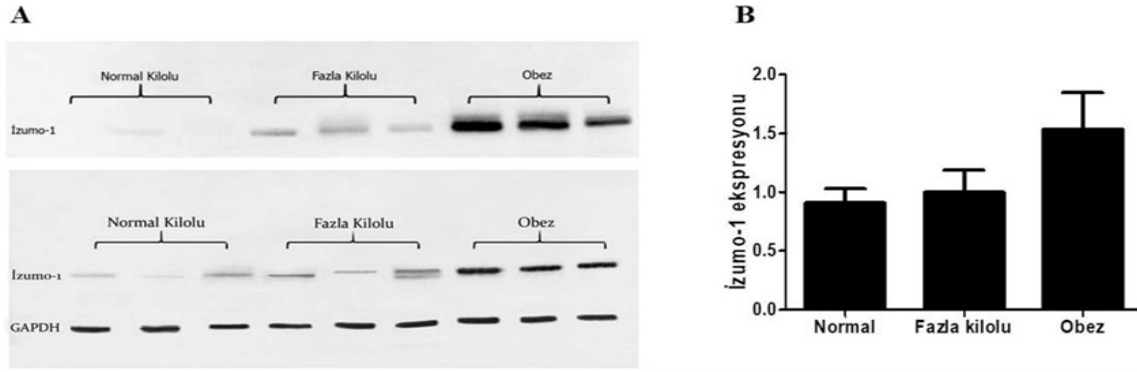
Çalışmada, BKİ değerlerinin sperm DNA hasarı üzerine olası etkileri yüksek alkali şartlarda tek hücre jel elektroforez yöntemi kullanılarak hasarlı DNA'ya sahip spermelerde kuyruk oluşumu şeklinde belirlendi. Bu yöntemle belirlenen kuyruk uzunluğu spermdeki DNA hasarını göstermekteydi. BKİ normal, fazla kilolu ve obez bireylerden alınan sperm örneklerine ait tüm parametrelerin sonuçları Tablo II'de gösterilmiştir. Normal vücut ağırlığına sahip bireylerden alınan sperm örneklerinde DNA hasarı diğer tüm gruplara göre daha düşüktü ve gruplar arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı. BKİ fazla kilolu grubuna ait sperm DNA hasarı ise, obez grubuna göre daha düşük iken kontrol grubuna göre ise daha yüksekti (p<0.001). Çalışmada kuyruk DNA parametrelerinin obez grubunda



Şekil I: A. Normal kilolu (Siyah ok: Normal sperm şekli), B. Fazla kilolu (Pembe ok: Sarmal kuyruk, Yeşil ok: Serbest), C. Obez (Sarı ok: Dağdefekti, Mavi ok: Abeksiyelimplantasyon)

Tablo I. BKİ normal ve yüksek olan ejakulatların spermogram ve morfoloji sonuçlarının ortalama değerleri.

Gruplar	Sperm konsant x10 ⁶ /ml	Total sperm x10 ⁶	Total motilite %	Total normal morfoloji %	Baş anomalisi %	Boyun anomalisi %	Kuyruk anomalisi %
Normal Kilolu	15	39	75	36	55	25	13
Fazla Kilolu	12	38	72	4	51	31	14
Obez	9.4	24	67	3	57	21	17



Şekil II: A. BKİ normal, fazla kilolu ve obez gruplarına ait İzumo-1 protein bantları. B. Grafik; İzumo-1 protein ekspresyonunun gruplara göre dağılımı.

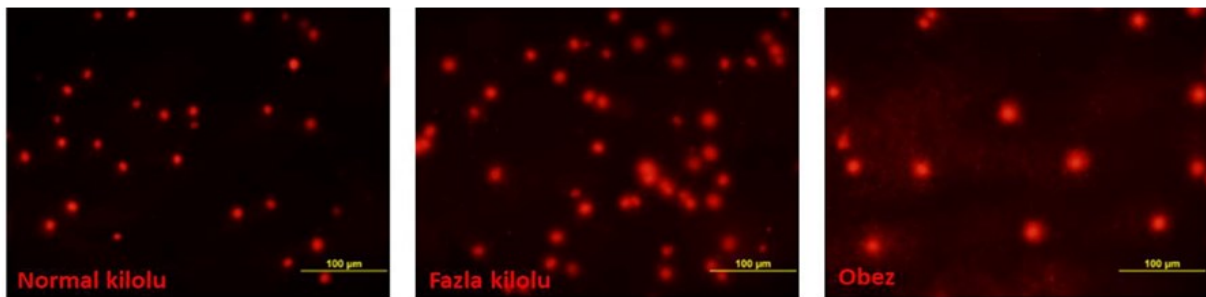
Tablo II. Gruplara ait İzumo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyon düzeylerinin ve comet yöntemi parametrelerinin istatistiksel sonuçları

Parametreler	Gruplar			P
	Normal	Fazla Kilolu	Obez	
İzumo-1 Ekspresyonu (Ort±SS)	0.91±0.12	1.00±0.19	1.53±0.31	0.099
Baş comet (µm) (Ort±SS)	140.29±1.29 ^a	130.80±17.13 ^b	110.98±0.87 ^c	<0.001
Kuyruk comet (µm) (Ort±SS)	17.88±0.65 ^a	36.24±0.93 ^b	40.65±0.88 ^c	<0.001
Comet uzunluğu (µm) (Ort±SS)	158.17±1.65 ^a	167.04±1.86 ^b	151.63±1.86 ^c	<0.001
Baş DNA comet (%) (Ort±SS)	97.46±0.08 ^a	93.50±0.16 ^b	89.5±0.24 ^c	<0.001
Kuyruk DNA comet (%) (Ort±SS)	2.54±0.08 ^a	6.50±0.16 ^b	10.5±0.24 ^c	<0.001
Kuyruk Moment (Median(1.-3.Çeyrek))	0.30(0.10-0.60) ^a	2.0(1.2-3.0) ^b	4.0(3.0-6.0) ^c	<0.001
Olive Kuyruk Moment (Ort±SS)	1.45±0.06 ^a	4.36±0.13 ^b	6.26±0.16 ^c	<0.001

Baş comet, kuyruk comet, comet uzunluğu, baş DNA comet, kuyruk DNA comet, olive kuyruk moment değerleri için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve kuyruk moment için Kruskal Wallis testi kullanıldı. Aynı satırda yer alan aynı küçük harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler farklılığı ifade etmektedir.

(Şekil III) diğer gruplara göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0.001$). Bu sonuç BKİ yüksek obez bireylerde sperm DNA hasarına bağlı olarak infertilite riskinin yüksek olabileceğini göstermektedir.

yüksek olması durumunda, vücut yağ kitlesinin yağsız vücut kitlesine oranla artması ile karakterize bir hastalık olan obezite infertiliteye neden olabilen sağlık sorunlarından biridir (15). Bu çalışmada, erkek infertilitesine sebep olabilen obezitede genel sperm analizinin değer-



Şekil III: Kontrol grubu kuyruk DNA % 2.53; Fazla kilolu grubu kuyruk DNA % 6.5 ve Obez grubu kuyruk DNA % 10.47 (Ethidium bromide boyama x400, Olympus BX51).

TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfertilite, birçok sağlık sorununda olduğu gibi bireysel özelliklerden ve yaşam tarzından etkilenmektedir. Vücuda besinlerle alınan enerjinin, harcanan enerjiye göre

lendirilmesinin yanı sıra normal kilolu, fazla kilolu ve obez bireylerden elde edilen semen örneklerinde İzumo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyon düzeylerini karşılaştırmayı ve ayrıca comet metodu kullanarak

sperm DNA hasarına dair bilgiler elde etmeyi amaçladık. Sperm analiz edilirken sperm morfolojisi, sperm konsantrasyonu, motilite, vitalite (spermin canlılığı) gibi parametreler değerlendirilmektedir. Sperm morfolojisinin incelemesinin, fertilitenin ve spermatogenez kalitesinin duyarlı bir göstergesi olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan araştırmalara göre bebek sahibi olabilmek için yüksek sayıda sperm olması yeterli değildir. Sperm sayısının yanı sıra spermlerin hareket yetenekleri ve normal bir şekil yapısına sahip olmaları da son derece önemlidir. Bu yüzden erkeğin çocuk sahibi olabilme potansiyelini en iyi şekilde gösteren kriterlerden birisi sperm morfolojisidir (16,17). Erkeklerde obezitenin sperm parametreleri (sayı, motilite ve morfoloji) üzerine etkisi, hem insan hem de hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Kemirgenlerde diyetle indüklenen obezitenin, sperm hareketliliğini, epididimaldeki artışlarla birlikte sperm sayısını azalttığı ve normal morfolojiye sahip sperm yüzdesini düşürdüğü gösterilmiştir (18). Ancak, 16 hafta boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenmenin sperm motilitesi üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını gösteren bir çalışma da mevcuttur. Bu durumu serum kolesterol düzeyindeki artışın az olması ile açıklamışlardır (19). Bazı çalışmalarda BKİ ile sperm konsantrasyonu arasında anlamlı ilişkinin olmadığı gösterilmiştir (20,21) olsa da sperm morfolojisinin kesin kriterler ile değerlendirilmesinin fertilizasyon oranını tahmin etmede önemli olduğu ve fertilizasyon ile sperm morfolojisinin anlamlı bir pozitif korelasyon gösterdiği çok sayıda çalışmada vurgulanmıştır (21,22). Jensen ve arkadaşları BKİ>25 kg/m² olanların %22'sinde sperm konsantrasyon ve sayısının normal bireylere göre düşük olduğunu saptamıştır (22). BKİ yüksek veya çok yüksek olması, özellikle de seminal sperm konsantrasyonundaki azalmalara ilişkin sperm kalitesindeki bozulmalarına neden olduğu vurgulanmıştır (23). Çalışmamızda, literatürdeki bilgilere paralel olarak normal kilolu bireylere ait örneklerde ortalama sperm konsantrasyonu, sperm motilite oranı ve normal morfolojiye sahip sperm oranları BKİ yüksek olan bireyler ile karşılaştırıldığında normal kilolu bireylerde daha yüksek olduğu gözlemlendi. Buna rağmen BKİ yükseldikçe bu değerlerin düştüğü ve obez grubuna ait sperm kalitesinin de azaldığı belirlendi. Sperm membranında, fertilizasyon için birçok sperm yüzey reseptörü görev almaktadır. Bunlardan biri olan ve çalışmamızda da ele aldığımız İzumo-1 sperm yüzey reseptörü immunoglobulin süper ailesine ait bir transmembran proteindir. Western blot analizleri İzumo-1'in hem testis hem de spermde eksprese olduğunu göstermiştir. Moleküler çalışmalar, Japonların düşün tapınağının adına itafen İzumo-1 adını verdikleri spermatozoon yüzeyindeki bir reseptörün oosit ile füzyonunda temel bir molekül olduğunu göstermişlerdir (24). Fare ve insanlarda, İzumo-1'in sperm zarı üzerindeki bir molekül kompleksi organize ederek veya stabilize ederek gamete füzyonu için gerekli olduğu bilinmektedir (25). Yapılan son çalışmalarda İzumo-1'in gamete füzyonu için kesinlikle şart olduğu gösterilse de, İzumo-1'in moleküler fonksiyonu ve diğer sperm proteinleri ile olan ilişkisi, yapısı ya da farklı sperm membranlarındaki ifadesi hakkında bilgiler oldukça sınırlıdır. Hayasaka ve arkadaşları (26) çalışmalarında, şiddetli oligozoospermi ve/veya atenozoospermi ya da fertilizasyon yetersizliği olan erkeklerden aldıkları sperm örneklerinde İzumo-1

ekspresyonunun varlığını göstermişlerdir. Ancak İzumo-1 geninde gerçekleşen çeşitli yapısal değişimler ile fertilizasyon oranının değişebileceğini de gösteren çalışmalar mevcuttur (27-29). Bizde çalışmamızda BKİ'nin İzumo-1 ekspresyonunu nasıl etkilediğini araştırdık. Sonuçta, tüm gruplarda İzumo-1'in eksprese edildiği, normal ve fazla kilolu bireyler ile karşılaştırıldığında en yüksek İzumo-1 ekspresyonunun obez grubuna ait bireylerde olduğu gösterildi. Elde edilen veriler her ne kadar İzumo-1 ekspresyon artışının BKİ ile doğru orantılı olduğunu gösterse de sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum gözlem sayısının azlığından kaynaklanabilir. Ancak, bu sonuçlara göre obezitenin spermde bulunan membran proteinlerinin kompozisyonunu değiştirdiği de söylenebilir.

Obez kişilerde muhtemelen oksidatif stres nedeniyle sperm DNA hasarının arttığı bilinmektedir (30). Sallmen ve arkadaşları (31) BKİ artışı ile DNA kırılmalarının arttığını, motilitenin ise azaldığını belirlemişlerdir. Bu durumun spermatogenezin kötü kalitesiyle ve dolayısıyla azalmış motilite ve sperm sayısı ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Sperm nükleer kromatin anormallikleri veya DNA hasarı, spermatogenezde ya da DNA'nın paketlenmesinden kaynaklanabilir (32). Oosit ve zigot paternal genomdaki hasarı bir dereceye kadar onarabilme yeteneğine sahip olmakla birlikte DNA çift zincir kırıklarının onarımı güçleşmekte ve bu durum embriyo gelişimini etkilemektedir (33). Bu nedenle fertilize olabilen ancak implantasyon başarısızlığı veya erken dönem düşüklerinin görüldüğü durumlarda sperm DNA'sı önem taşımaktadır (34). Simon ve arkadaşları (35) çalışmalarında sperm DNA hasarının embriyo kalitesini nasıl etkilediğini belirlemek için comet yöntemini kullanarak infertil çiftlerde sperm DNA hasarı analizi yapmışlar ve sperm DNA hasarının düşük olduğu grubun daha kaliteli embriyo yüzdesine sahip olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda, BKİ'nin DNA bütünlüğü üzerine olası etkisini belirlemek amacıyla DNA hasarı alkali comet yöntemi ile belirlendi. Elde ettiğimiz veriler, özellikle DNA hasarını belirleyen kuyruk uzunluğunun en yüksek obez bireylere ait olan semen örneklerinde olduğunu gösterdi. BKİ normal bireylerde DNA hasarı diğer iki gruba göre daha düşüktü ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktaydı.

Sonuç olarak çalışmamızda, BKİ'nin artış seviyesi ile sperm fonksiyonlarının bozulma oranlarının paralel olarak etkilendiğini göstermiştir. Bunun yanı sıra henüz yeni keşfedilen ve sperm-oosit füzyonunda gerekli olan İzumo-1 sperm yüzey reseptörünün ekspresyonunda da artış olduğu gözlenmiştir. Obezitenin spermatogenez üzerinde ve sonraki nesiller için potansiyel etkileri ile ilgili klinik ve deneysel araştırmaların giderek arttığı görülmektedir. Ancak bilinen o ki, normal DNA yapısına sahip sperm, fertilizasyonun sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi ve sağlıklı bir embriyo gelişimi için gereklidir. Obezite ve beraberinde gelen moleküler komplikasyonların patogenezinde rolü olan faktörlerin aydınlatılması ve bilinen risk faktörleri ile ilişkisinin belirlenmesi yeni tedavi yollarının geliştirilmesinde önemlidir. Bu nedenle başta deneysel araştırmalar olmak üzere gebelik oranlarını da içeren klinik çalışmalarla bu bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Erdemir F. The evaluation of the relationship between obesity and male infertility. *J Clin Anal Med* 2013; 4:76-82.
2. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; 24:683-689.
3. Bellver J, Busso C, Pellicer A, et al. Obesity and assisted reproductive technology outcomes. *Reprod Biomed Online* 2006; 12:562-568.
4. Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme (1. Baskı), Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara 2002: 231-244.
5. Yumru AE, Öndeş B. İnfertilite ve İVF'e Hasta Seçimi. *JAREM* 2011; 1:57-60.
6. Trubner M, Glander HJ, Schaller J. Localization of adhesion molecules on human spermatozoa by fluorescence microscopy. *Andrologia* 1997; 29 (5):253-260.
7. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin super family protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434:234-238.
8. Pacey AA. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil* 2010; 13:189-193.
9. Agarwal A, Allameneni SSR. The effect of sperm DNA damage in assisted reproduction outcomes. *Minerva Ginecol* 2004; 56:235-245.
10. Cooper TG, Noonan E, Eckardstein S, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16(3):231-245.
11. Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, et al. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch Androl* 1987; 18(3):275-277.
12. Ernst O, Zor T. Linearization of the Bradford Protein Assay. *J Vis Exp* 2010; 38:1-7.
13. Yay A, Önder GO, Ozdamar S, et al. The effects of leptin on rat brain development; an experimental study. *Int J Pept Res Ther* 2019; 25:1605-1616.
14. Sarıozkan S, Cantürk F, Yay A, Akçay A. The effect of different storage temperature on sperm parameters and DNA damage in liquid stored newzealand rabbit spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012; 18:475-480.
15. Moragianni VA, Jones S-ML, Ryley DA. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril* 2012; 98:102-108.
16. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001; 79:559-563.
17. Sadler T. *Langman's Medical Embryology* (5th Ed), William and Wilkins, Baltimore 1985; pp 7-83.
18. Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandez GS. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9:32.
19. Palmer NO, Fullston T, Mitchell M, et al. SIRT6 in Mouse spermatogenesis is modulated by diet-induced obesity. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23:929-939.
20. Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, et al. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril* 2008; 90:619-626.
21. Huang CC, Cheng Lin DP, Tsao HM, et al. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005; 84:130-140.
22. Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril* 2004; 82:863-870.
23. Hammiche F, Laven JS, Boxmeer JC, et al. Sperm quality decline among men below 60 years of age under going IVF or ICSI treatment. *J Androl* 2011; 32:70-76.
24. Inoue N, Ikawa M, Isotani A, Okabe M. The immunoglobulin super family protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* 2005; 434:234-238.
25. Inoue N, Hamada D, Kamikubo H, et al. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion. *Development* 2013; 140:3221-3229.
26. Hayasaka S, Terada Y, Inoue N, et al. Positive expression of the immunoglobulin super family protein IZUMO on human sperm of severely infertile male patients. *Fertil Steril* 2007; 88:214-216.
27. Inoue N, Ikawa M, Okabe M. Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 377:910-914.
28. Sosnik J, Miranda PV, Spiridonov NA, et al. Tssk 6 is required for Izumo localization and gamete fusion in the mouse. *J Cell Sci* 2009; 122(15):2741-2749.
29. Young SA, Aitken J, Baker MA. Phosphorylation of Izumo1 and its role in male infertility. *Asian J Androl* 2015; 17(5):708.
30. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2012; 19:221-231.
31. Sallmén M, Sandler DP, Hoppin JA, et al. Reduced fertility among overweight and obese men. *Epidemiology* 2006; 17:520-523.
32. El-Melegy NT, Ali M. Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *International Braz J Urol* 2011; 37:495-506.
33. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*, Editör çeviri: Aytekin Y, Solakoglu S, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara 2006; ss 431-438.
34. Cavkaytar S, Batioglu S, Gunel M, et al. Genetic evaluation of severe male factor infertility in Turkey: a cross-sectional study. *Hum Fertil (Camb)* 2012; 15:100-106.
35. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod* 2014; 29:2402-2414.