

## BÖLÜM 5

# ERKEK İNFERTİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN GÜNCEL SEMEN BİYOBELİRTEÇLERİ

Mehmet Serkan ÖZKENT<sup>1</sup>

### GİRİŞ

İnfertilite, çiftlerin düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen 1 yıl içinde spontan gebelik elde edememesi olarak tanımlanır. Primer infertilite hiç çocuğu olmayan çiftleri ifade ederken, sekonder infertilite daha önce en az bir kez (aynı veya farklı cinsel partnerle) gebelik elde edebilen infertil çiftleri tanımlamak için kullanılır (1). Üreme çağındaki nüfusun yaklaşık %15'i 1 yıl içerisinde gebelik elde edememekte ve tıbbi yardıma ihtiyaç duymaktadır. Bu çiftlerin yaklaşık yarısında infertiliteden erkek kısırlığına bağlı bir faktör sorumlu tutulmaktadır (2, 3). Bu nedenle infertil çiftler araştırılırken erkek faktörünün ayrıntılı incelenmesi büyük önem arz etmektedir.

Erkek infertilitesi değerlendirilmesi ayrıntılı bir öykü ve fizik muayene ile en az iki semen analizini içermelidir (4). Öykü ve fizik muayene infertilite etyolojisine yönelik bazı ipuçları sağlarken, semen analizleri, sperm miktarı ve kalitesi ile ilgili verilerle erkek fertilitésinin temel bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Biyolojik ve laboratuvar faktörler numuneler arasında önemli farklar oluşturabileceğinden kesin tanı için birden fazla semen analizi önerilmektedir (4, 5). Ayrıca, semen analizi sonuçları yorumlanırken cinsel perhiz süresi, yakın zamanda geçirilmiş hastalıklar gibi semen analiz sonuçlarını etkileyebilecek olası faktörler de dikkatli bir şekilde sorgulanmalıdır (6).

Fakat semen analizi ile ilgili fertil ve infertil hastaların ayırımında altın standart bir değer veya yöntem bulunmamaktadır. Fertil ve infertil erkekler arasında geniş çapta örtüşen semen parametreleri, alternatif testlerin olmaması veya invaziv tanı prosedürlerine ihtiyaç duyulması gibi faktörler klinisyenleri farklı yöntem arayışlarına yönlendirmiştir (5). Bu nedenle çeşitli biyobelirteçler incelenmeye başlanmıştır.

<sup>1</sup> Uzm. Dr., Konya Şehir Hastanesi Üroloji Kliniği, msozkent@gmail.com

Gelişen araştırma teknolojisi ve teknikleri, hızla gelişen genomik, proteomik, transkriptomik ve metabolomik alanlar, yeni potansiyel biyobelirteçlerin keşfedilmesini olanaklı kılmış ve infertil erkeklerin değerlendirilmesinde umut verici olmuştur. Bu nedenle plazmadan, idrardan ve semenden elde edilen biyobelirteçlerin kullanımı denenmiştir. Kan-testis bariyeri gibi faktörlerden dolayı tipik olarak testislerde ve epididimde bulunan çeşitli yapı ve proteinler plazmada saptanamayabilir veya çok az saptanabilirken semende konsantrasyonlarda görülmektedir. Semen protein bileşimindeki farklılıklar belirli bir organda devam eden patolojik bir süreci gösterebilir. Bu kavram en iyi prostat spesifik antijenin (PSA) prostat hastalıklarının bir belirteci olarak keşfedilmesiyle gösterilmektedir (7). PSA ilk olarak menide keşfedilmiş ve spermden izole edilmiştir. Prostat kanserini tanımlamak için kullanılan en yaygın belirteç olan PSA, semende kan serumundan çok daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur (7). PSA keşfi hikayesine benzer şekilde, potansiyel biyobelirteçler seminal plazmada serum veya idrardan çok daha fazla miktarda mevcut olabilir. Bu biyobelirteçler, kütle spektrometrisi gibi kapsamlı analitik tekniklerle kolayca tanımlanma ve nicelleştirilme potansiyeline sahiptir (8). Bu durum araştırmacıları seminal biyobelirteçleri kullanmaya yönlendirmiştir (6, 9-12).

Bu güncel araştırmaların ışığında bu derlemede, özellikle doğal erkek fertilitesi, azospermi etiyolojilerini ayırt etme ve yardımcı üreme tekniği başarısını tahmin etme alanlarındaki seminal biyobelirteçler incelenecektir. Bir üroloğun bakış açısından, erkek infertilitesi teşhisinde seminal plazmadan elde edilen biyobelirteçler güncel çalışmalar ışığında ele alınacaktır.

## **ERKEK İNFERTİLİTESİ: ETYOLOJİK FAKTÖRLER, DEĞERLENDİRMEDE KULLANILAN YÖNTEMLER**

Günümüzde infertilite önemli bir sağlık problemi olarak varlığını sürdürmektedir. Tipik olarak, bir süredir gebelik elde edemeyen çiftler için fertilité değerlendirilmesi başlatılır. Bir gebelik elde edebilmek için en iyi fırsatları, herhangi bir engel varlığı veya mevcut tedavileri belirlemek için ayrıntılı bir değerlendirme yapılmalıdır. Gebelik elde etmeye çalışan sekiz çiftten biri ilk çocuğa hamile kalmaya çalışırken ve altı çiftten biri ise sonraki çocuğa hamile kalmaya çalışırken herhangi bir sorunla karşılaşmaktadır (13). Bu çiftlerin neredeyse yarısından erkek faktörü sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle gebelik isteyen çiftlerde erkek faktörünün ayrıntılı incelenmesi gerekmektedir.

Erkek infertilitesi etyolojisi multifaktöriyeldir. Olguların yaklaşık %30-40'ında sperm parametrelerinde bozukluğa sebep olacak bir faktör tespit edilememekte-

dir. Bu gibi durumlar idiyopatik erkek infertilitesi olarak tanımlanmaktadır. Bu erkeklerin daha önce doğurganlığı etkileyen bir hastalık öyküsü yoktur. Bu erkeklerde semen analizi patolojik bulguları ortaya çıkarsa bile fizik muayene, endokrin, genetik ve biyokimyasal laboratuvar testleri normaldir. Günümüzde idiyopatik erkek infertilitesinin çevre kirliliği, reaktif oksijen ürünleri ile ilişkili sperm DNA hasarı, genetik ve epigenetik anormalliklerle ilişkili endokrin bozukluklar gibi faktörlerin sonucu oluşabileceği düşünülmektedir (14). Ayrıca açıklanamayan erkek infertilitesi, normal sperm parametreleri ve partner değerlendirmesi ile kaynağı bilinmeyen infertilite olarak tanımlanır. Çiftlerin %20 ile %30'u açıklanamayan infertiliteye sahiptir (14).

Erkek infertilitesinin bilinen nedenleri olarak şu faktörler sorumlu tutulmaktadır;

- Konjenital veya edinilmiş ürogenital anormallikler,
- Ürogenital sistem enfeksiyonları,
- Gonadotoksik maruziyet (örneğin radyoterapi veya kemoterapi),
- Endokrin bozukluklar,
- Maligniteler (Testis tm vb.),
- İleri babalık yaşı,
- Genetik anormallikler (Klinefelter, XX male vb.)
- Artan skrotal sıcaklık (örneğin varikoselin bir sonucu olarak) (15).

İnfertilite nedeni ile başvuran bir hastada öncelikli olarak ayrıntılı bir tıbbi öykü alınmalıdır. Tıbbi öyküde daha önce çocuk sahibi olup olmadığı, canlı gebelik elde edilip edilmediği, aile öyküsü, ek hastalık varlığı, cerrahi girişim öyküsü, aldığı kemoterapi veya radyoterapi gibi tedavilerin varlığı ayrıntılı şekilde not edilmelidir (16). Fizik muayenede pubik kıllanma, testis hacmi ve yapısı, peniste anomali varlığı (hipospadias, fimozis vb.), vas deferens varlığı, epididim dolgunluğu, varikozel mevcudiyeti ve jinekomasti değerlendirilmelidir (17).

Tıbbi öykü ve fizik muayeneyi takiben infertil erkeğin değerlendirilmesindeki diğer aşama semen analizidir. Tutarlı ve doğru sonuçlar elde etmek için absitans periyodu sorgulanmalı, laboratuvara hızlı teslimat ve uygun taşıma sıcaklığı gibi ideal toplama yönergeleri sağlanmalıdır. Birden fazla sperm analizi yapılacak ise mümkünse aynı laboratuvarında değerlendirilmelidir. Semen analizi değerlendirmesi dünya sağlık örgütü (DSÖ) kriterlerine ve referans değerlerine göre yapılmalıdır. Semen hacmi, sperm sayısı, sperm hareketliliği (hızlı ileri hareket, yavaş ileri hareket, ilerleyici olmayan hareket ve hareketsiz ayrı ayrı not edilmelidir), sperm morfolojisi referans değerlerine göre incelenmelidir (18-20). DSÖ kriterlerine göre semen analizi normal ise tek bir test yeterlidir. Aksi takdirde en az iki

test yapılması gereklidir. Bireysel sperm parametrelerinin hiçbiri (konsantrasyon, morfoloji ve motilite) kendi başına infertilite için tanısal değildir. Semen analizinin sonuçlarına göre önemli tedavi kararları verilse bile semen analizi, fertil ile infertil erkekleri kesin olarak ayırt edemez. Sonuçlar en az iki testte anormal ise androlojik araştırma detaylandırılmalıdır (21).

Azospermi (semen içerisinde spermatozoanın tamamen yokluğu) ve ağır oligozoospermi vakalarında (spermatozoa < 5 milyon/mL) erkek genital kanalının obstruksiyonu ve genetik anormalliklerin insidansında artış gözlenmektedir. Bu durumlarda, hormonal profilin daha kapsamlı bir değerlendirmesi patolojik durumlar arasında daha ileri ve daha doğru bir şekilde ayırıcı tanı koymaya yardımcı olabilir.

Semen analizinin kolay uygulanabilir olmasına rağmen tanımlayıcı bir değerlendirme olması, fertil ve infertil erkeklerin spermleri arasında kesin ayırım yapmıyor olması gibi faktörler infertilite ile ilgili farklı çalışmalara yönlendirmiştir. Bu amaçla antisperm antikör testi değerlendirilmiştir. Fakat sistematik derleme ve meta-analiz değerlendirmeleri antisperm antikörlerinin semen kalitesi veya doğal gebelik oranları ile ilişkisi olmadığı sonucuna varmıştır (22, 23). Daha sonraki çalışmalarda infertilite sorunu yaşayan erkeklerde sperm DNA hasarı oluşabileceği belirtilmiştir (24). DNA fragmentasyonu veya tek ve çift zincirli DNA kırıklarının birikmesi sperm için ortak bir özelliğidir. Fakat sperm DNA fragmentasyon seviyesindeki artışın doğal gebelik şansını azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca sperm DNA hasarının infertil erkeklerde daha çok tespit edilmiş olması infertilitenin sebepleri arasında olabileceğini düşündürmüştür. Sperm DNA hasarının infertil çiftlerin klinik yönetimi üzerindeki etkisini kesin ve doğrudan test eden hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Fakat artmış DNA fragmentasyon indeksinin daha düşük yardımcı üreme teknik başarıları, tekrarlayan gebelik kayıpları, embriyo gelişim kusurları ve doğum kusurları ile ilişkili olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (24-28). Sperm DNA hasarı artışından varikozel varlığı, hormonal anomaliler, kronik enfeksiyon ve yaşam tarzı faktörleri (sigara, alkol vb.) gibi faktörlerin sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Sperm DNA hasarı ölçümü doğal gebelik danışmanlığına yardımcı olabilirken, antioksidanlar gibi tedavilerin DNA fragmentasyon indeksini azaltmada ve gebelik oranlarını iyileştirmede klinik yararının çok az olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle varikoselektomi gibi spesifik erkek infertilite tedavileri konusunda kararsız olan bazı çiftlere önerilse de infertil çiftlerde DNA fragmentasyon indeksi testi rutin olarak önerilmemektedir (29).

Son araştırmalar, erkek faktörü kısırlığında oksidatif stresin önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Oksidatif stres, sperm DNA, RNA transkriptleri ve telomer-

lere zarar vererek, kusurlu sperm fonksiyonuna ve genel olarak erkek doğurganlığının azalmasına, tekrarlayan düşük riskinin artmasına ve doğuştan malforme bebeklere neden olur (30-32). Yüksek serbest oksijen radikali seviyelerinin daha çok sperm hasarına sebep olduğu bildirilmiştir (33). Oksidatif stres genellikle kötü yaşam tarzı (sigara kullanımı vb.) ve çevresel maruziyet ile ilişkilidir. Bu nedenle yaşam tarzı değişikliklerinin DNA parçalanma riskini azaltabileceği ve sperm kalitesini iyileştirebileceği düşünülmüştür (32). Fakat serbest oksijen radikalleri eliminasyonundaki zorluklar ve fizyolojik/patolojik referans aralıkları üzerinde fikir birliği olmaması gibi faktörler serbest oksijen radikalleri ölçümünün infertilitede klinik uygulanabilirliğini zorlaştırmaktadır. Ayrıca yüksek serbest oksijen radikalleri seviyelerine rağmen bu hastalarda uygulanan antioksidan tedavinin fertiliteye çok az faydasının olması veya hiç faydasının olmaması bu testin infertil erkekler için rutin bir klinik test olmasını engellemiştir (34).

Birçok fertilizasyon veya implantasyon başarısızlığı vakasının, genetik bozuklukların bir sonucu olarak meydana geldiği uzun zamandır bilinmektedir. Sperm anöploidi veya anormal sayıda kromozom tespiti için floresan in situ hibridizasyon (FISH) testi yaygın olarak kullanılmaktadır (35). Sperm FISH testi tipik olarak spermatojenik mayotik hatalardan kaynaklanan anöploidileri tanımlamak için spesifik DNA elemanlarına floresan etiketler kullanır (36). Hem normal karyotipli hem de anomalili erkeklerde FISH testi ile spermin kromozom yapısı incelenebilir. Spermdeki anöploidi spermatogenezde ciddi hasar ve translokasyonlarla ilişkilidir. Kromozomal sayısal anormalliklerle ilgili yapılan çalışmalar, çoğu fertil erkeğin genellikle <2 anöploid sperm ürettiğini ortaya koymuştur. FISH testinin klinik uygulaması, oligozoospermik, teratozoospermik, astenozoospermik ve tekrarlayan gebelik kaybı dahil olmak üzere bir dizi infertil erkek popülasyonunda incelenmiştir (36, 37). Düşük semen parametreleri, yüksek sperm anöploidi oranları ile korelasyon gösterse de test maliyeti bir şekilde rutin kullanımı engelleyicidir. Bu nedenle FISH testi yalnızca tekrarlayan düşükleri olan çiftler gibi en ilgili klinik senaryolarda kullanılma eğilimindedir. Bu popülasyondaki çiftler için sperm FISH testi, preimplantasyon genetik tespit ile in vitro fertilizasyon veya bir sperm donörünün ayrımı veya kullanılması gibi üreme alternatifleri dahil olmak üzere hasta danışmanlığına ve tedavi kararlarına yardımcı olabilir (38).

İnfertilite değerlendirilmesinde kullanılan başka bir test olan postkoital test fertilitate değerlendirilmesinde farklı çalışmalarda incelenmiş olsa da zayıf tekrarlanabilirlik ve hasta rahatsızlığı nedeniyle artık kullanımı önerilmemektedir (39).

## SEMİNAL BİYOBELİRTEÇLER

Belirtildiği gibi erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde pek çok test kullanılsa da bu testlerin fertilitiyi öngörmedeki belirsizliği araştırmacıları yeni testlerin incelenmesine yönlendirmiştir. İnsan sperminin %5'ini spermatozoa içeren testis salgıları ve %95'ini ise aksesuar seks bezlerinden salgılanan seminal plazma oluşturmaktadır (11). Seminal plazma içeriğinin ise %65'i seminal veziküller, %25'i prostat bezi, %10'u ise bulbourethral bezler/seminifer tübül/epididim/vas deferens salgılarından oluşur. Bu kompleks karışım erkek infertilitesi etiyojisinde kapsamlı bir şekilde çalışılabilen erkek üreme bezlerinden türetilen en yüksek molekül konsantrasyonunu içerir (6, 40, 41). Ayrıca seminal plazmanın sperm korunması ve olgunlaşmasına da yardımcı olduğu, sperm kapasitasyonu ve kadın üreme sistemindeki kadın salgılarıyla etkileşimi gibi çeşitli mekanizmaları düzenlediği bilinmektedir (10, 12). Bu durum seminal plazmanın erkek infertilitesindeki rolü konusunda merak uyandırmaktadır. Bu nedenle çeşitli seminal plazma biyobelirteçleri erkek infertilitesini değerlendirmek için incelenmeye başlanmıştır (42).

## TESTİS İFADE PROTEİN 101 (TEX101)

İnsanlarda 19. kromozomun uzun kolunda 19q13.31 konumunda bulunan TEX101 proteini Kurita ve ark. (43) tarafından orijinal olarak farelerde tanımlanmıştır. Ağırlıklı olarak germ hücrelerinin plazma membranında glikosilfosfatidilinositol bağlantılı protein olarak ifade edilen testiküler germ hücresine özgü bir glikoproteindir. İmmünoelektron mikroskopik çalışmalar, molekülün çoğunlukla spermatositlerin ve spermatidlerin plazma membranında yer aldığını, ancak Sertoli ve Leydig hücreleri dahil başka hiçbir insan dokusunda veya hücre tipinde ekspres edilmediğini göstermiştir (44).

Spermatogenez, testiste meydana gelen ve testisin seminifer tübülleri içindeki karmaşık bir parakrin ve endokrin aktivite sistemi tarafından kontrol edilen çok sayıda sperm üretiminden sorumlu olan oldukça düzenli bir süreçtir (45). LH tarafından düzenlenen Leydig hücrelerinden testosteron salınımı, spermatogenezin başlangıcını ve germ hücrelerinin spermatozoaya gelişiminden sorumludur (45). Hücre proliferasyonunu takiben, diploid spermatogonial hücreler (testisin kök hücreleri), spermatositlere farklılaşır ve bunlar da mayoz bölünmeye uğrayarak haploid spermatidler üretir. Spermatogenezin son aşamasında ise yuvarlak haploid spermatidler, bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişiklik sonrası olgun spermatozoaya dönüşürler. Olgun spermatozoa tüm gerekli ve benzersiz bölgele-ri içerir; akrozom oluşumu, flagellum (kuyruk) gelişimi, sitoplazmanın ortadan

kaldırılması ve çekirdeğin yoğunlaşması. Spermatogenezin sonunda, morfolojik olarak olgunlaşan tam sperm Sertoli hücre mikroçevresinden ayrılır ve seminifer tübül lümenine iletilir. Serbest bırakılan spermatozoa, daha fazla olgunlaşması için pasif olarak epididime göç eder (46).

Germ hücrelerinin testiküler spermatozoaya gelişimini, post-testis olgunlaşması için epididime göçü takip eder. Testiküler spermatozoa, morfolojisi sperm hücrelerine benzer olmasına rağmen, tam olarak olgunlaşmamıştır. Hem motiliteden hem de zona pellucida'ya bağlanma ve yumurta hücreleri ile etkileşime girme yeteneğinden yoksundurlar. Testiküler spermatozoa epididimal tübüle girdiğinde, transkripsiyonel ve translasyonel sessizliğin eşlik ettiği post-testiküler olgunlaşma başlar (47). TEX101, daha önce belirtildiği gibi, testiküler germ hücresine özgü bir proteindir ve spermatositlerin, yuvarlak ve uzun spermatidlerin ve testiküler spermatozoanın plazma membranında bulunur. Epididimdeki spermilerin olgunlaşması sırasında, TEX101 sperm yüzeyinden ayrılır ve testiküler anjiyotensin dönüştürücü enzim (tACE) tarafından seminal sıvıya salınır. Bu proteinlerin, özellikle de TEX101'in sperm yüzeyinden dökülmesi, spermin zona pellucida'ya bağlanma yeteneği için gereklidir (48, 49). Ayrıca TEX101 bölünmesi ve kümülüs hücrelerinin yüzeyine bağlanması, kümülüs tarafından Ca<sup>2+</sup> mobilizasyonuna ve progesteron üretimine yol açar. Bu olaylar akrozom reaksiyonunu indükler ve kümülüs tabakasının penetrasyonunu kolaylaştırır (50, 51).

Elde edilen veriler TEX101'in güçlü bir erkek infertilite biyobelirteci olarak ortaya çıkabileceğini göstermektedir. Bugüne kadar obstrüktif azospermi (OA) ve nonobstrüktif azospermi (NOA) arasında ayırım yapmak için tek kesin tanı yöntemi testis biyopsisiydi. Ancak TEX101'in OA ve NOA arasında ayırım yapmak için güçlü bir non-invaziv yöntem olabileceği belirtilmiştir. Drabovich ve ark. (52) OA'yı %100 özgüllükle normal spermatogenezden ve OA'yı %100 duyarlılık ve %73 özgüllükle NOA'dan ayırt edebildiklerini raporlamışlardır. Çalışma sonucunda OA ve NOA ayırıcı tanısında kullanılacak non-invaziv tanı yöntemi olduğunu belirtmişlerdir (52). Ayrıca, NOA'nın farklı alt tiplerini ayırt edebildicini raporlamışlardır; 20 ng/mL veya daha yüksek TEX101 seviyelerinin normal spermatogenez temsil ettiği, 5-120 ng/mL seviyelerinin hipospermatogenez veya olgunlaşma durması ile ilişkili olduğu ve 5 ng/mL'nin altındaki seviyelerin Sertoli cell-only sendromunu gösterdiği belirtilmiştir (52). Vazektomi öncesi ve sonrası erkeklerden elde edilen eşleştirilmiş seminal plazma numunelerinin değerlendirildiği bir çalışma ise erkek üreme yolundaki fiziksel tıkanıklıkların invaziv olmayan tanımlanması için TEX101'in mutlak tanısal özgüllüğünü ve duyarlılığını doğrulamıştır. TEX101'in erkek üreme yolundaki fiziksel tıkanıklıkların belirlen-

mesine yardımcı olabileceği belirtilmiştir (53). TEX 101'in tACE tarafından uzaklaştırılmasının fertil spermatozoa üretimi için önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle TEX101'in erkeklerde güçlü bir kontraseptif ilaç üretimi için potansiyel bir hedef olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (54).

TEX101'in fonksiyonel spermatozoa üretimi üzerindeki etkilerini in vivo araştıran 2 çalışmada heterozigot (TEX101+/-) ve homozigot (TEX101-/-) mutant fareler üretilmiştir (55, 56). Bu çalışmalarda TEX101'in bozulmasının fizyolojik olarak hiçbir zararlı etkiye neden olmadığı belirtilmiştir. Fakat TEX101-/- fareler, normal çiftleşme yeteneğine sahip olmasına rağmen, yavru üretememişlerdir ve bu da infertil fenotipi doğrulamıştır. İlginç bir şekilde, TEX101-/- ve TEX101 vahşi tip fareler arasında testislerin ağırlığı ve histolojisinde önemli bir fark izlenmemiştir. Ayrıca sperm sayısı, akrozom reaksiyon etkinliği ve sperm hareketliliği ve canlılık parametreleri incelenmiş olup anlamlı bir fark izlenmemiştir (55, 56).

Diğer birçok çalışma da benzer şekilde TEX101'in erkek infertilitesinde kullanılabilecek umut verici bir biyobelirteç olduğunu, klinik testlerin tanısal testis biyopsilerinin yerini alma potansiyeline sahip olduğunu ve yardımcı üreme teknikleri için sperm bulma tahmini ile tedavi başarısını artırabileceğini bildirmişlerdir.

## **UBİQUITİN**

Ubiquitin hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde bulunan 76-amino asitli küçük ve yüksek oranda korunmuş bir proteindir. Ubiquitin-proteozom sistemi proteinlerin yarı ömrünü kontrol etmek ve ayrıca DNA hasar onarımı, epididimal geçiş sırasında anormal spermelerin tanımlanması, sinyal iletimi ve protein sıralama gibi sayısız biyolojik yolu geri dönüşümlü bir şekilde düzenlemek için kullanılır (57). Ubiquitination olarak bilinen bu biyolojik süreçte ubiquitin diğer substrat proteinlerine kovalent olarak bağlanır ve kendisi tarafından modifiye edilen proteinler için proteolitik ve proteolitik olmayan reaksiyonlara yol açar (58).

Rete testis yoluyla testisten çıktıktan sonra sperm, son olgunlaşmaya uğradıkları epididimde depolanır (59). İnsan epididimi üç ayrı bölümden oluşur: kaput, korpus ve kauda. Bunların her birinin sperm olgunlaşmasında, beslenmesinde, taşınmasında ve depolanmasında belirli bir rolü vardır. Epididim epiteli tarafından apokrin tarzda çok sayıda protein salgılanır. Epididim sıvısı sperm immobilizasyonu, sperm plazma zarının stabilizasyonu ve fertilitate yeteneğinin sağlanması gibi reaksiyonlarda rol oynayan 200'den fazla ana protein içerir. Spermin buradaki olgunlaşması sperm depolama sırasında ve kadın genital yoluna boşaltıldıktan sonra karşılaştıkları oksidatif hasardan korur. Rezidü sitoplazma damlacıkları ve anormal sperm, sperm epididimden aşağı inerken fagosite edi-



lır. Bu fagositozdan temel sorumlu yapı ubiquitindir. Epididimal hücreler tarafından salgılanan ubikuitinin anormal sperm yüzeyine yapıştığı, ubikuitine bağımlı, sperm kalite düzenleyici bir mekanizmaya sahip olduğu gözlenmiştir (60-62). Bu etkileri ubiquitinin erkek doğurganlığının daha doğru bir şekilde değerlendirilmesi, infertilite tespiti ve üreme toksikolojisinin yanı sıra erkek kontraseptifleri için yeni hedefler sağlayarak androloji, infertilite tedavisi ve biyoteknoloji alanlarında etkili bir biyobelirteç olarak kullanılabilceğini düşündürmüştür.

Sutovsky ve ark. (63) tarafından yapılan bir çalışmada yüksek sperm ubikuitin düzeylerinin sperm motilitesi, sperm sayısı ve normal morfoloji sperm yüzdesi ile ters orantılı olduğu bulunmuştur. Ubikuitinin semen kalitesini gösteren bir biyobelirteç olarak kullanımının faydalı olabileceğini belirtmişlerdir. Fakat aynı zamanda iyi klinik semen parametreleri olan bazı hastalarda da yüksek izlenmesi ise etkileyen başka faktörler olabileceğini düşündürmüştür (63). Başka bir çalışmada ejakülattan salınan ubiquitine sperm yüzdesinin, normal sperm morfolojisi ve motilitesi ile pozitif korele olduğu raporlanmıştır (64).

Mevcut çalışmalar ubiquitine sperm yüzey proteinlerinin, kusurlu sperm başları ve kuyrukları, lökositler, spermatidler, hücre kalıntıları vb. dahil olmak üzere pek çok semen anormalliklerinin ortak bir göstergesi olarak kullanılabilceğini göstermiştir. Bu durum, ubiquitinin insan semen kalitesi için güçlü bir biyobelirteç olarak rolünü desteklemektedir.

## **PROSTAT SPESİFİK ANTİJEN ANTİKORLARI**

Prostatik spesifik antijen (PSA) veya kallikrein-3 (KLK3), insanlarda 19. kromozom üzerinde bulunan KLK3 geni tarafından kodlanan insan sperminde bulunan glikoprotein yapıda serin proteazdır. Kallikrein ilişkili peptidaz ailesinin bir üyesidir ve esas olarak prostat bezinin epitel hücreleri tarafından salgılanır (65). Olgun PSA'nın moleküler ağırlığı yaklaşık 28 kDa olup 237 amino asitten ve bir karbonhidrat zincirinden oluşur (66). PSA, seminal plazmada en bol bulunan prostat kaynaklı serin proteazlardan biridir. Seminal sıvıdaki asıl görevi semenogleinin düşük moleküler kütleli (5-20 kDa) polipeptidlere parçalanmasını sağlayarak spermin likefaksiyonunu sağlamak ve hareketli spermelerin serbestçe yüzmesini sağlamaktır. PSA, normal prostatlı erkeklerin serumunda küçük miktarlarda bulunur, ancak prostat kanseri dahil olmak üzere çeşitli prostat anormallikleri sırasında yükselir (67).

Semendeki PSA seviyesinin sperm motilitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiş olup, bu da PSA seviyesinin/aktivitesinin doğurganlığı etkileyebileceğini düşündürmektedir. Ayrıca servikal mukusun çözülmesine yardımcı olur, böylece

spermlerin uterusu girmesine izin verir (65). PSA'ya karşı antikorların, semen sıvılaştırma ve servikal mukus çözünme süreçlerine müdahale ettiği ve böylece immüno-infertilitede önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Buradan yola çıkan çalışmada Naz ve Butler (65) immüno-infertil kadın ve erkeklerin serumlarında PSA'ya karşı antikorların varlığını ve insidansını incelemişlerdir. Çalışmalarında immüno-infertil kadın ve erkeklerden oluşan bir popülasyonun PSA'ya karşı antikorlara sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak PSA antikorlarının immüno-infertilite ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir (65). Başka bir çalışmada Gupta ve ark. (68) KLK3 genindeki polimorfizmlerin infertilite riski ile ilişkili olduğunu raporlamışlardır.

İmmüno-infertilite, infertil bir çiftin kadın veya erkek partnerinde bulunan antisperm antikorlarından kaynaklanır ve erkek kısırlığının önemli bir nedeni olarak ortaya çıkmaktadır. PSA antikorları da erkeklerde immüno-infertilite için önemli bir biyobelirteç olarak görülmektedir.

## **İNSAN AKROZOMAL VEZİKÜL PROTEİNİ 1 (ACRV1)**

Akrozomal protein SP-10 olarak da bilinen ACRV 1, kromozom 11'in q23 ve q24 bantlarının birleşim yerinde bulunan tek kopya ACRV1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. SP-10 geni testise özgüdür ve yuvarlak spermatidlerde kopyalanır ve çevrilir (69). ACRV1'in esas olarak insan testislerinde bulunduğu Western blot analizi ile doğrulanmıştır. İmmünofloresan ve immünohistokimyasal boyamalar, insan testislerindeki yuvarlak ve uzun spermatidlerdeki yerini ortaya çıkararak memeli spermatogenezindeki rolünü ortaya çıkarmıştır (70). Foster ve ark. (71) çalışmasında testis ekstraktlarında gözlenen 45-kDa SP-10 peptidininin epididimal, ejakülat ve kapasitif sperm ekstraktlarında olmadığını, ancak testis ekstraktlarında saptanmayan 25 ila 18 kDa immünoreaktif SP-10 peptitlerini içerdiklerini bildirmişlerdir. Testiste tam uzunlukta bir 45-kDa SP-10 öncü proteinin bulunuyor olması, bunun 32, 30, 28 ve 26 kDa'lık SP-10 peptitleri, SP-10 öncü proteininin testiste proteolitik işlenmesinden ve/veya alternatif eklemekten kaynaklandığını göstermektedir (71). Ayrıca, epididimal, ejakülat ve kapasiteye sahip spermlerin elektron mikroskopik analizi, akrozomun ekvator segmentinin ana segmentinde ve arka ampulünde bulunurken maksimum ACRV1 konsantrasyonu bulunduğunu belirtirken ön ekvator segmentinde minimumun seviyede bulunduğunu belirtmiştir. Akrozomal reaksiyondan sonra, iç akrozomal membranda ACRV1 proteini tespit edildi ve hibrit veziküllerle ilişkiliydi. Bu bulgular, ACRV1 proteininin sperm-zona bağlanması veya penetrasyonunda rol oynayabileceğini ve dolayısıyla erkek fertilitesinde önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (71).

## LİPOKALİN TİPİ PROSTAGLANDİN D SENTAZ (L-PGDS)

İlk olarak 1985 yılında sıçan beyninden saflaştırılan L-PGDS ipokalin ailesinin bir enzim olarak tanımlanan ilk üyesi olan ekstraselüler bir proteindir. İnsanlarda L-PGDS geni, lipokalin gen kümesinin bir parçası olan kromozom 9q34.2-34.3 üzerinde bulunur (72). L-PGDS baskın olarak leptomeninklerde, koroid pleksusta ve oligodendrositlerde lokalizedir ve beyin omurilik sıvısına salgılanır. Ayrıca insan ve diğer memelilerin testis ve epididiminde, Leydig hücreleri, Serotoli hücreleri ve duktal epitel hücrelerinde lokalizedir ve bunlardan seminal plazmaya salgılanır (73-75). Son birkaç yılda, L-PGDS'nin biliverdin ve bilirubin gibi yüksek afiniteli safra pigmentleri, retinaldehit ve retinoik asit gibi retinoidler, tiroid hormonları ve esansiyel yağ asitleri ile bağlandığı gösterilmiştir (76). Bu nedenle, L-PGDS'nin safra pigmentleri gibi toksik metabolitlerin temizleyicisi ve/veya beyin, retina, fetüs ve sperm gelişimi için gerekli moleküllerin taşıyıcısı olarak hareket edeceği tahmin edilmiştir (77-79).

Erkek genital sistemi boyunca spermatozoayı çevreleyen seminal plazmada bulunur. Fakat buradaki işlevi net olarak bilinmemektedir. Seminifer tübüllerdeki büyüyen germ hücrelerine ve epididimdeki olgunlaşan spermelere retinoidlerin, tiroid hormonlarının ve esansiyel yağ asitlerinin önemli bir taşıyıcısı olarak hareket ettiğine inanılmaktadır (76). Seminal Plazma L-PGDS'nin OA teşhisinde potansiyel bir belirteç olarak rolünü değerlendiren bir çalışmada, Heshmat ve ark. (80) seminal L-PGDS seviyesinin, azospermili erkeklerde seminal kanaldaki açıklığı değerlendirmek için potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında azospermisi ve yüksek seminal L-PGDS'si (100 µg/l'den fazla) olan erkeklerde NOA tanısının biyopsi yapılmadan öngörülebileceğini bulgulamışlardır (80). Başka bir çalışmada ise normal erkeklere kıyasla oligozoospermik erkeklerde L-PGDS konsantrasyonunun önemli ölçüde daha düşük olduğu belirtilmiştir (81). Chen ve ark. (82) sperm yüzeyindeki ve seminal plazmadaki L-PGDS içeriği ile infertilite arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında L-PGDS seviyesinin normal gruptan NOA ve OA hastalarına kademeli olarak düştüğü ve bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Ağır oligozoospermik hastalarda normozoospermik deneklere kıyasla sperm üzerindeki L-PGDS'de önemli bir azalma gözlenmiştir (82). Başka bir çalışmada seminal plazma L-PGDS düzeyinin seminal kanallardaki herhangi bir tıkanıklık hakkında bilgi vereceği ve OA ile NOA ayırımında kullanılabileceği belirtilmiştir (83). Seminal plazmadaki L-PGDS seviyesinin kalitatif sperm parametreleriyle önemli ölçüde ilişkili olduğu ve toplam hücre konsantrasyonu, sperm motilite yüzdesi ve normal morfoloji ile pozitif ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle, seminal

plazmadaki L-PGDS konsantrasyonlarının erkek infertilitesi değerlendirilmesinde kullanılabilir seminal biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir.

## **MALONDİALDEHİT ASİT (MDA)**

Son yıllarda, oksidatif stres sonucunda erkek üreme sisteminde oluşan reaktif oksijen radikalleri üretimi, sperm kalitesi ve işlevi üzerinde potansiyel toksik etkileri nedeniyle gerçek bir endişe kaynağı haline gelmiştir (84). Aerobik koşullar altında yaşayan hücreler sürekli olarak oksijen paradoksu ile karşı karşıyadır. Yaşamı desteklemek için oksijen gereklidir. Ancak reaktif oksijen radikalleri metabolitleri hücrenin hayatta kalmasını tehlikeye atabilir ve/veya hücre fonksiyonlarını değiştirebilir (84).

Seminal oksidatif stres, reaktif oksijen radikalleri oluşturma ve temizleme aktiviteleri arasındaki dengesizliğin bir sonucu olarak gelişir (85). Oksidatif stres sadece sperm plazma zarının akışkanlığına değil, aynı zamanda sperm çekirdekindeki DNA'nın bütünlüğüne de zarar verir (86). Fizyolojik miktarlarda reaktif oksijen radikalleri varlığı normal sperm fonksiyonunun kontrolünde önemli olsa da reaktif oksijen radikallerine aşırı maruz kalmanın spermatozoa için zararlı olduğu bilinmektedir (87). İdiyopatik infertilite ve erkek faktörü mevcut olan infertilitede sperm DNA hasarı önemli ölçüde artar. Böyle bir artış, yüksek seviyelerde seminal oksidatif stres ile ilişkili olabilir (88). Memeli spermatozoa zarları yüksek doymamış yağ asitleri bakımından zengindir ve lipid peroksidasyonunun aracılık ettiği oksijenin neden olduğu hasara duyarlıdır. Bu tür oksidatif stres durumunun değerlendirilmesi, bu erkek faktörlü infertilitenin uygun antioksidanlarla tıbbi tedavisine yardımcı olabilir (89). Lipid peroksidasyonunun böyle bir son ürünü MDA'dır. Yüksek seminal MDA seviyelerinin artan lipid peroksidasyonunu ve bunun sonucunda sperm membranlarında oksidatif hasarı temsil ettiği bildirilmiştir (90). Nouri ve ark. (91) seminal sıvıdaki MDA seviyesinin lipid peroksidasyon derecesinin bir göstergesi olabileceğini ve infertilite etiyojisinde kullanılabilir bir biyobelirteç olduğunu belirtmişlerdir (91). Ayrıca başka çalışmalarda MDA düzeylerinin sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi ile negatif ilişkili olduğu bildirilmiştir (92, 93). Yüksek seminal plazma MDA seviyeleri infertil erkeklerle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, seminal plazma MDA seviyesinin oksidatif strese bağlı erkek infertilitesinin biyobelirteçlerinden biri olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir (94).

## **SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD)**

SOD, seminal plazmadaki en önemli antioksidan savunma enzimlerinden biridir. Seminal reaktif oksijen radikallerini temizlemeye yardımcı olur. Böylece spermle-ri, sperm plazma zarının lipid peroksidasyonu gibi zararlı etkilerden korur. SOD bakır ve çinko moleküllerini kullanarak süperoksit anyonunun oksijen ve hid-rojen peroksite dismutasyonunu katalize etmekten sorumludur. Seminal plazma SOD aktivitesi, sperm konsantrasyonu ve motilitesi ile pozitif korelasyon gösterir-ken, sperm DNA fragmentasyon hızı ile ters ilişkilidir (31, 95). Murawski ve ark. (95) seminal plazmadaki SOD aktivitesi ile semen kalite parametreleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Sağlıklı sperm donörleri ile karşılaştırıldığında, infertil hastaların seminal plazmasında önemli ölçüde daha düşük SOD aktivitesi olduğunu belirtmişler ve düşük SOD aktivitesinin erkek kısırlığından sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir (95). Benzer şekilde farklı bir çalışmada ise düşük seminal plazma SOD seviyesinin armış sperm DNA frag-mentasyonunun bir belirteci olabileceği belirtilmiştir (96).

Seminal plazma SOD aktivitesi, spermin reaktif oksijen radikalleri aracılı lipid peroksidasyonuna karşı korunmasında önemli bir rol oynar ve bu nedenle sperm motilitesinin korunması için esastır. Çalışmalar seminal plazma SOD seviyesinin erkek kısırlığının değerlendirilmesi ve tedavisi için kullanılacak güçlü bir bi-yobelirteç olabileceği görüşünü desteklemektedir.

## **MELATONİN**

Epifiz bezi tarafından salgılanan bir indolamin olan melatonin, güçlü bir serbest radikal temizleyici ve antioksidan olarak bilinir (97). En etkili doğal lipofilik an-tioksidan olduğuna inanılan E vitamininden iki kat daha aktif olduğu kanıtlan-mıştır. Melatoninin en iyi bilinen fizyolojik rolü, sirkadiyen ritim koordinasyonu, bağışıklık, uyku döngüsü düzenlemesi, kan basıncının korunmasıdır. Ayrıca in-san vücudundaki hücre ve organların büyümesi, gelişmesi ve yaşlanması ile ilgi-li çeşitli önemli fizyolojik süreçler de melatonin tarafından modüle edilir (98). Melatonin hücre zarlarını kolayca geçebilir ve radikal oksijen ve nitrojen türle-rinin doğrudan temizleyicisi olarak hareket ederek hücre içi makromolekülleri ve DNA'yı korur (99). Melatonin etkisinin iki klasik bölgesi olan hipotalamus ve hipofizin yanı sıra testis, epididim, vas deferens, prostat gibi genital organlardaki melatonin reseptörleri, üreme sistemi üzerinde melatonin etkisini göstermektedir (100). Ayrıca erkeklerde spermatozoa üzerinde bulunurlar ve çeşitli sperm aktivi-telerinin düzenlenmesinde rol aldıkları öne sürülmektedir.

Antioksidan özelliklerinden dolayı melatonin ayrıca insan spermlerini hücre ölümü ve reaktif oksijen radikallerinin neden olduğu DNA parçalanmasından korur. Böylece melatonin erkek doğurganlığında önemli bir rol oynar (101). Avad ve ark. (102) infertil erkeklerde melatonin hormon profilini değerlendirdikleri çalışmalarında, erkek infertilitesinde reproduktif nöroendokrin aksın modülasyonunda melatoninin rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, düşük seminal melatonin seviyeleri, düşük sperm motilitesi, varikosel ve NOA olan infertil erkeklerle ilişkilendirilmiştir (102). Başka bir çalışmada ise sperm DNA fragmentasyonu ile seminal plazma melatonin seviyeleri arasında anlamlı bir pozitif korelasyon bildirilmiştir (103). Kratz ve ark. (104) çalışmasında azalan melatonin seviyelerinin, ejakülattaki oksidatif-antioksidatif dengeyi değiştirerek doğurganlığı azalttığı belirtilmiştir. Dondurulmuş spermlerin çözülmesinden sonra melatonin takviyesi, özellikle kriyoprezerve edilmiş spermlerde hücre içi reaktif oksijen radikalleri ve MDA seviyelerini azaltarak hareketliliklerini ve canlılıklarını önemli ölçüde artırmıştır (105). Mevcut bulgular seminal melatonin seviyesinin infertilite değerlendirilmesinde önemli bir belirteç olduğunu göstermektedir.

### **EKSTRASELLÜLER MATRİKS PROTEİN 1 (ECM1)**

ECM1 kromozom 1q21'de bulunan ECM1 geni tarafından kodlanan 85-kDa proteindir (106). ECM1, esas olarak epididim tarafından semen içine salgılanır, bu nedenle epididimde eksprese edilen ECM1 olarak da bilinir. Drabovich ve ark. (52) ECM1'in testis biyopsisi yapılmadan OA ile NOA'yı ayırt edebileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında 2.3 mg/ml eşik değerindeki seminal plazma ECM1 seviyelerinin, OA'yı %100 özgüllük ile normal spermatogenezden ve OA'yı %73 özgüllük ve %100 duyarlılıkla NOA'dan ayırt edebildiklerini raporlamışlardır (52). Başka bir çalışmada Kadhem ve ark. (107), seminal plazma ECM1 proteininin özellikle FSH ve LH ile kombine edildiğinde OA tanısında kullanılacak etkin bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde başka bir çalışma ise seminal plazma ECM1, TEX101 ve ACRV1'in OA ve NOA ayırımında kullanılacak en güçlü biyobelirteçler olduğunu bildirmiştir (6).

ECM1'in özellikle spermatogonia ve Sertoli hücreleri olmak üzere spermatogenez sürecinin düzenlenmesine önemli ölçüde katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu durum erkek doğurganlığındaki ana rolünü açıklamaktadır. Yapılan çalışmalar son yıllarda erkek infertilitesinin bir belirteci olarak incelenen etkin yeni biyobelirteçlerden biri olduğunu göstermektedir.

## LAKTAT DEHİDROGENAZ C (LDHC)

Laktat dehidrogenaz (LDH) vücudun çeşitli dokularında bulunur ve NADH'nin NAD'a oksidasyon/redüksiyonu ile birlikte piruvatın laktata karşılıklı dönüşümünü katalize ederek glikolizin terminal enzimi olarak işlev görür (108). LDHC ise sadece testis ve spermatozoada ortaya çıkan, LDH'nin testise özgü izozimidir. Erken dönemde yapılan çalışmalar, LDHC'nin spermatozoada bulunan tek LDH izozimi olduğunu ileri sürse de son araştırmalar LDHA'nın da spermatozoada bulunduğunu göstermiştir. Fakat LDHC erkek germ hücrelerine özgü olarak kabul edilmektedir. Esas olarak sitoplazmada bulunur ve hücre dışı sıvıya sitoplazmik damlacıklar olarak salınır. Bu nedenle seminal plazmada kolayca tespit edilebilir (109-111),.

İmmünohistokimyasal çalışmalar, LDHC'nin spermatositlerde, spermatidlerde ve spermde bol miktarda bulunduğunu göstermiştir. Sperm yüksek düzeyde glikoliz sergiler. LDHC glikoliz işleminin sürdürülmesinde ve sperm flagellumunda ATP oluşumunda önemli bir rol oynar. Birkaç in vitro çalışma, glikoz metabolizmasının sperm motilitesi, hiperaktivasyon ve kapasitasyon için gerekli olan ATP'nin üretiminde önemli bir rolü olduğuna dair kanıt sağlamıştır (110, 112). Odet ve ark. (110) çalışmalarında LDHC'nin erkek fertilitesi ve sperm fonksiyonu için gerekli olan flagellumda glikoliz ve ATP üretimi süreçlerinin sürdürülmesinde önemli rol oynadığını göstermiştir. Benzer şekilde Dodo ve ark. (113) çalışmasında da LDHC eksikliği olan spermın ciddi şekilde bozulmuş motilite gösterdiği bildirilmiştir. Rolland ve ark. (114) da LDHC'nin bir seminal biyobelirteç olarak tespit edilebileceğini ve bu tür biyobelirteçlerin fertil ve infertil erkeklerin ayrımında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

## GALEKTİN 3

Galektin 3, hücre adezyonunda rol oynayan, insan seminal plazmasında immün-modülatör özelliklere sahip  $\beta$ -galaktozit bağlayıcı bir proteindir. Spermatozoa-zona pellucida etkileşimi ve döllemeinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Mei ve ark. (115), galektin 3'ün post testiküler olgunlaşma sırasında sperm yüzeyine transfer edildiğini ve kapasitasyondan sonra sperm-zona pellucida bağlanmasında önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca düşük galektin 3 seviyelerinin düşük dölleme oranları ile ilişkili olduğunu raporlamışlardır (115). Bulgular infertilite etyolojisinde kullanılması için umut vadedicidir.

## MAKROFAJ MİGRASYON İNHİBİTÖR FAKTÖR (MIF)

Makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF) bir proinflamatuvar sitokindir. Erkeklerde epididimden geçerken sperm olgunlaşmasında ve sperm motilitesinde önemli rol oynar. Testisin Leydig hücreleri tarafından salgılanır ve epididimde yüksek oranda eksprese edilir. MIF miktarı ile sperm konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon vardır. Ayrıca yüksek sperm ile ilişkili MIF'in zayıf sperm motilitesi ile bağlantılı olduğu gözlenmiştir (116). Bulgular infertilite değerlendirilmesinde etkili bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

## SONUÇ

Erkek infertilitesi, çevresel, mesleki, genetik, yaşam tarzı değişiklikleri gibi faktörlerin etkilediği çok faktörlü bir kökene sahiptir. Semen analizi, geçmişten günümüze erkek infertilitesi tanısı için altın standart test olmaya devam etmektedir. Fakat fertil ile infertil erkekleri kesin olarak ayırt edemiyor olması, ayrıca rutin semen analizinin kapasitasyon süreci, zona pellucida etkileşimi için gerekli olan sperm yüzey proteinlerinin elde edilmesi ve spermin yumurtayı dölleme yeteneği gibi faktörler hakkında bilgi vermiyor oluşu olumsuz yönleridir. Ayrıca, semen analizi çeşitli çevresel faktörlerden, enfeksiyonlardan ve diğer patolojilerden etkilenebilmektedir. Bu durum semen analizinin sonuçlarını normal veya belirsiz hale getirebilir. Bu belirsizlik sonucunda ise erkek infertilitesinin teşhisinin başarısız olmasına ve tedavinin gecikmesine neden olabilir. Seminal plazma, yeni biyobelirteçlerin keşfi için invaziv olmayan bir tanı yöntemi olarak infertilite etyolojisinde kullanılabilir. Bu biyobelirteçler henüz rutin kullanıma girmemiş olsa da doğal fertilitenin değerlendirilmesinde, infertilite etyolojisinde ayrıcı tanıda, OA/NOA ayırımında non-invaziv bir yöntem olarak ve yardımcı üreme teknikleri başarısının tahmin edilmesinde faydalı olabilir. Ayrıca yeni tedaviler için hedefe yönelik ilaçlar için yeni anlayışlar getirebilir.

## KAYNAKLAR

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, et al. The International committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on art terminology. *Journal of Human Reproduction*. 2009;24: 2683-7. doi:10.1093/humrep/dep343.
2. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, et al. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. *Cambridge University Press*. 2000.
3. Collaborators GPaF. Population and fertility by age and sex for 195 countries and territories, 1950-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2018;392: 1995-2051. doi:10.1016/s0140-6736(18)32278-5.
4. Schlegel PN, Sigman M, Collura B, et al. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/



- ASRM guideline part I. *Journal of Urology*. 2021;205: 36-43.
5. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *The New England Journal of Medicine*. 2001;345: 1388-93. doi:10.1056/NEJMoa003005.
  6. Bieniek JM, Drabovich AP, Lo KC. Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian Journal of Andrology*. 2016;18: 426-33. doi:10.4103/1008-682x.175781.
  7. Rao AR, Motiwala HG, Karim OM. The discovery of prostate-specific antigen. *BJU International*. 2008;101: 5-10. doi:10.1111/j.1464-410X.2007.07138.x.
  8. Drabovich AP, Saraon P, Jarvi K, et al. Seminal plasma as a diagnostic fluid for male reproductive system disorders. *Nature Reviews Urology*. 2014;11: 278-88. doi:10.1038/nrurol.2014.74.
  9. Lazzarino G, Listorti I, Muzii L, et al. Low-molecular weight compounds in human seminal plasma as potential biomarkers of male infertility. *Journal of Human Reproduction*. 2018;33: 1817-28. doi:10.1093/humrep/dey279.
  10. Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, et al. Proteomics of human seminal plasma: identification of biomarker candidates for fertility and infertility and the evolution of technology. *Molecular Reproduction and Development*. 2013;80: 350-7. doi:10.1002/mrd.22178.
  11. Samanta L, Parida R, Dias TR, et al. The enigmatic seminal plasma: a proteomics insight from ejaculation to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2018;16: 41. doi:10.1186/s12958-018-0358-6.
  12. Camargo M, Intasqui P, Bertolla RP. Understanding the seminal plasma proteome and its role in male fertility. *Basic and Clinical Andrology*. 2018;28: 6. doi:10.1186/s12610-018-0071-5.
  13. Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertility and Sterility*. 1990;54: 978-83. doi:10.1016/s0015-0282(16)53990-9.
  14. Agarwal A, Parekh N, Panner Selvam MK, et al. Male oxidative stress infertility (MOSI): Proposed terminology and clinical practice guidelines for management of idiopathic male infertility. *The World Journal of Men's Health*. 2019;37: 296-312. doi:10.5534/wjmh.190055.
  15. Nieschlag E, Behre HM. *Andrology: male reproductive health and dysfunction*: Springer Science & Business Media; 2001.
  16. Kasman AM, Zhang CA, Li S, et al. Association between preconception paternal health and pregnancy loss in the USA: an analysis of US claims data. *Human Reproduction*. 2021;36: 785-93. doi:10.1093/humrep/deaa332.
  17. Nieschlag E, Behre HM. Anamnesis and physical examination. *Andrology*. 2010: 93-100.
  18. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, et al. World health organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*. 2010;16: 231-45. doi:10.1093/humupd/dmp048.
  19. Boeri L, Belladelli F, Capogrosso P, et al. Normal sperm parameters per se do not reliably account for fertility: A case-control study in the real-life setting. *Andrologia*. 2021;53: e13861. doi:10.1111/and.13861.
  20. Campbell MJ, Lotti F, Baldi E, et al. Distribution of semen examination results 2020 - A follow up of data collated for the WHO semen analysis manual 2010. *Andrology*. 2021;9: 817-22. doi:10.1111/andr.12983.
  21. Jequier AM. Semen analysis: a new manual and its application to the understanding of semen and its pathology. *Asian Journal of Andrology*. 2010;12: 11-3. doi:10.1038/aja.2009.12.
  22. Munuce MJ, Berta CL, Pauluzzi F, et al. Relationship between antisperm antibodies, sperm movement, and semen quality. *Urologia Internationalis*. 2000;65: 200-3. doi:10.1159/000064876.
  23. Leushuis E, van der Steeg JW, Steures P, et al. Immunoglobulin G antisperm antibodies and prediction of spontaneous pregnancy. *Fertility and Sterility*. 2009;92: 1659-65. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.082.
  24. McQueen DB, Zhang J, Robins JC. Sperm DNA fragmentation and recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*. 2019;112: 54-60.e3. doi:10.1016/j.

fertnstert.2019.03.003.

25. Simon L, Emery B, Carrell DT. Sperm DNA fragmentation: consequences for reproduction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1166: 87-105. doi:10.1007/978-3-030-21664-1\_6.
26. Nicopoullos J, Vicens-Morton A, Lewis SEM, et al. Novel use of COMET parameters of sperm DNA damage may increase its utility to diagnose male infertility and predict live births following both IVF and ICSI. *Human Reproduction*. 2019;34: 1915-23. doi:10.1093/humrep/dez151.
27. Yifu P, Lei Y, Shaoming L, et al. Sperm DNA fragmentation index with unexplained recurrent spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*. 2020;101740: 101740. doi:10.1016/j.jogoh.2020.101740.
28. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2012;27: 2908-17. doi:10.1093/humrep/des261.
29. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2015;103: e18-25. doi:10.1016/j.fertnstert.2014.12.103.
30. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertility and Sterility*. 2005;84: 850-3. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.03.080.
31. Alahmar A. Role of oxidative stress in male infertility: An updated review. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2019;12: 4-18. doi:10.4103/jhrs.JHRS\_150\_18.
32. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, et al. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*. 2017;14: 470-85. doi:10.1038/nrurol.2017.69.
33. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, et al. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertility and Sterility*. 2006;86: 878-85. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.02.111.
34. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, et al. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*. 2004;8: 616-27. doi:10.1016/s1472-6483(10)61641-0.
35. Sarrate Z, Blanco J, Anton E, et al. FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling. *Asian Journal of Andrology*. 2005;7: 227-36. doi:10.1111/j.1745-7262.2005.00061.x.
36. Hwang K, Weedon JW, Lamb DJ. The use of fluorescent in situ hybridization in male infertility. *Therapeutic Advances in Urology*. 2010;2: 157-69. doi:10.1177/1756287210373758.
37. Bernardini LM, Costa M, Bottazzi C, et al. Sperm aneuploidy and recurrent pregnancy loss. *Reproductive Biomedicine Online*. 2004;9: 312-20. doi:10.1016/s1472-6483(10)62147-5.
38. Minhas S, Bettocchi C, Boeri L, et al. European association of urology guidelines on male sexual and reproductive health: 2021 update on male infertility. *European Urology*. 2021;80: 603-20. doi:10.1016/j.eururo.2021.08.014.
39. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2015;103: e44-50. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.03.019.
40. Robert M, Gagnon C. Sperm motility inhibitor from human seminal plasma: presence of a precursor molecule in seminal vesicle fluid and its molecular processing after ejaculation. *International Journal of Andrology*. 1994;17: 232-40. doi:10.1111/j.1365-2605.1994.tb01248.x.
41. Batruch I, Lecker I, Kagedan D, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and post-vasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *Journal of Proteome Research*. 2011;10: 941-53. doi:10.1021/pr100745u.
42. Kumar N, Singh NK. "Emerging role of novel seminal plasma bio-markers in male infertility: a review". *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*. 2020;253: 170-9. doi:10.1016/j.ejogrb.2020.08.015.

43. Kurita A, Takizawa T, Takayama T, et al. Identification, cloning, and initial characterization of a novel mouse testicular germ cell-specific antigen1. *Biology of Reproduction*. 2001;64: 935-45. doi:10.1095/biolreprod64.3.935.
44. Schiza CG, Jarv K, Diamandis EP, Drabovich AP. An emerging role of TEX101 protein as a male infertility biomarker. *EJIFCC*. 2014;25: 9-26.
45. McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, et al. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *The Journal of Endocrinology*. 1996;148: 1-9. doi:10.1677/joe.0.1480001.
46. de Rooij DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 2001;121: 347-54. doi:10.1530/rep.0.1210347.
47. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*. 2009;15: 213-27. doi:10.1093/humupd/dmn055.
48. Yin L, Chung CM, Huo R, et al. A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009;66: 900-8. doi:10.1007/s00018-009-8482-2.
49. Deguchi E, Tani T, Watanabe H, et al. Dipeptidase-inactivated tACE action in vivo: selective inhibition of sperm-zona pellucida binding in the mouse. *Biology of Reproduction*. 2007;77: 794-802. doi:10.1095/biolreprod.107.060004.
50. D'Alessandris C, Canipari R, Di Giacomo M, et al. Control of mouse cumulus cell-oocyte complex integrity before and after ovulation: plasminogen activator synthesis and matrix degradation. *Endocrinology*. 2001;142: 3033-40. doi:10.1210/endo.142.7.8277.
51. Chen H, Kui C, Chan HC. Ca(2+) mobilization in cumulus cells: role in oocyte maturation and acrosome reaction. *Cell calcium*. 2013;53: 68-75. doi:10.1016/j.ceca.2012.11.007.
52. Drabovich AP, Dimitromanolakis A, Saraon P, et al. Differential diagnosis of azoospermia with proteomic biomarkers ECM1 and TEX101 quantified in seminal plasma. *Science Translational Medicine*. 2013;5: 212ra160. doi:10.1126/scitranslmed.3006260.
53. Korbakis D, Brinc D, Schiza C, et al. Immunocapture-selected reaction monitoring screening facilitates the development of ELISA for the measurement of native TEX101 in biological fluids. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015;14: 1517-26. doi:10.1074/mcp.M114.047571.
54. Endo S, Yoshitake H, Tsukamoto H, et al. TEX101, a glycoprotein essential for sperm fertility, is required for stable expression of Ly6k on testicular germ cells. *Scientific Reports*. 2016;23: 23616. doi: 10.1038/srep23616.
55. Fujihara Y, Tokuhiko K, Muro Y, et al. Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110: 8111-6. doi:10.1073/pnas.1222166110.
56. Li W, Guo XJ, Teng F, et al. TEX101 is essential for male fertility by affecting sperm migration into the oviduct in mice. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2013;5: 345-7. doi:10.1093/jmcb/mjt031.
57. Rennie ML, Chaugule VK, Walden H. Modes of allosteric regulation of the ubiquitination machinery. *Current Opinion in Structural Biology*. 2020;62: 189-96. doi:10.1016/j.sbi.2020.02.003.
58. Amm I, Sommer T, Wolf DH. Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2014;1843: 182-96. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.031.
59. Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, et al. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biology of Reproduction*. 2000;62: 1790-803.
60. Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *Journal of Cell Science*. 2001;114: 1665-75. doi:10.1242/jcs.114.9.1665.
61. Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, et al. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Na-*

- ture. 1999;402: 371-2.
62. Sutovsky P, Terada Y, Schatten G. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Human Reproduction*. 2001;16: 250-8.
  63. Sutovsky P, Hauser R, Sutovsky M. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Human Reproduction*. 2004;19: 628-38. doi:10.1093/humrep/deh131.
  64. Muratori M, Marchiani S, Criscuoli L, et al. Biological meaning of ubiquitination and DNA fragmentation in human spermatozoa. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 2007;63: 153-8.
  65. Naz RK, Butler TS. Antibodies to prostate-specific antigen in immunoinfertile women and men. *Journal of Reproductive Immunology*. 2013;97: 217-22. doi:10.1016/j.jri.2012.11.005.
  66. Ménez R, Michel S, Muller BH, et al. Crystal structure of a ternary complex between human prostate-specific antigen, its substrate acyl intermediate and an activating antibody. *Journal of Molecular Biology*. 2008;376: 1021-33. doi:10.1016/j.jmb.2007.11.052.
  67. Lilja H. Biology of prostate-specific antigen. *Urology*. 2003;62: 27-33. doi:10.1016/S0090-4295(03)00775-1.
  68. Gupta N, Sudhakar DVS, Gangwar PK, et al. Mutations in the prostate specific antigen (PSA/ KLK3) correlate with male infertility. *Scientific Reports*. 2017;7: 11225. doi:10.1038/s41598-017-10866-1.
  69. Reddi PP, Shore AN, Acharya KK, et al. Transcriptional regulation of spermiogenesis: insights from the study of the gene encoding the acrosomal protein SP-10. *Journal of Reproductive Immunology*. 2002;53: 25-36. doi:10.1016/S0165-0378(01)00104-8.
  70. Tang A, Yan Q, Sun L, et al. Developmental expression of ACRV1 in humans and mice. *Andrologia*. 2012;44: 16-22. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01095.x.
  71. Foster JA, Klotz KL, Flickinger CJ, et al. Human SP-10: acrosomal distribution, processing, and fate after the acrosome reaction1. *Biology of Reproduction*. 1994;51: 1222-31. doi:10.1095/biolreprod51.6.1222.
  72. White DM, Mikol DD, Espinosa R, et al. Structure and chromosomal localization of the human gene for a brain form of prostaglandin D2 synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267: 23202-8. doi:10.1016/S0021-9258(18)50077-6.
  73. Urade Y, Hayaishi O. Biochemical, structural, genetic, physiological, and pathophysiological features of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000;1482: 259-71. doi:10.1016/s0167-4838(00)00161-8.
  74. Gerena RL, Irikura D, Urade Y, et al. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biology of Reproduction*. 1998;58: 826-33. doi:10.1095/biolreprod58.3.826.
  75. Malki S, Nef S, Notarnicola C, et al. Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *The EMBO Journal*. 2005;24: 1798-809. doi:10.1038/sj.emboj.7600660.
  76. Leone MG, Haq HA, Saso L. Lipocalin type prostaglandin D-synthase: which role in male fertility? *Contraception*. 2002;65: 293-5. doi:10.1016/S0010-7824(02)00280-9.
  77. Heird WC, Prager TC, Anderson RE. Docosahexaenoic acid and the development and function of the infant retina. *Current Opinion in Lipidology*. 1997;8: 12-6. doi:10.1097/00041433-199702000-00004.
  78. Sohmer H, Freeman S. The importance of thyroid hormone for auditory development in the fetus and neonate. *Audiology & Neuro-otology*. 1996;1: 137-47. doi:10.1159/000259194.
  79. Sorrentino C, Silvestrini B, Braghieroli L, et al. Rat prostaglandin D2 synthetase: its tissue distribution, changes during maturation, and regulation in the testis and epididymis. *Biology of Reproduction*. 1998;59: 843-53. doi:10.1095/biolreprod59.4.843.
  80. Heshmat SM, Mullen JB, Jarvi KA, et al. Seminal plasma lipocalin-type prostaglandin d synthase: A potential new marker for the diagnosis of obstructive azoospermia. *The Journal of*

- Urology*. 2008;179: 1077-80. doi:10.1016/j.juro.2007.10.070.
81. Tokugawa Y, Kunishige I, Kubota Y, et al. Lipocalin-type prostaglandin d synthase in human male reproductive organs and seminal plasma. *Biology of Reproduction*. 1998;58: 600-7. doi:10.1095/biolreprod58.2.600.
  82. Chen DY, Zhu MY, Cui YD, et al. Relationship between contents of lipocalin-type prostaglandin D synthase on the surface of infertility sperm and in seminal plasma. *Biochemistry Biokhimiia*. 2007;72: 215-8. doi:10.1134/s0006297907020125.
  83. Chen D-Y, Wang J-J, Huang Y-F, et al. Relationship between lipocalin-type prostaglandin D synthase and  $\alpha$ -glucosidase in azoospermia seminal plasma. *Clinica Chimica Acta*. 2005;354: 69-76. doi:10.1016/j.cccn.2004.11.009.
  84. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 2003;79: 829-43. doi:10.1016/s0015-0282(02)04948-8.
  85. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48: 835-50. doi:10.1016/s0090-4295(96)00313-5.
  86. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility*. 1999;115: 1-7. doi:10.1530/jrf.0.1150001.
  87. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility, and Development*. 1995;7: 659-68. doi:10.1071/rd9950659.
  88. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility*. 2003;79 :1597-605. doi:10.1016/s0015-0282(03)00337-6.
  89. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *Journal of Andrology*. 1995;16: 464-8.
  90. Khodair H, Mahran Z, Hashim O, et al. Evaluation of lipid peroxidation in cases of idiopathic male infertility: correlation with the hypo-osmotic swelling test. *Egyptian Journal of Dermatology and Venerology*. 2013;33: 42-5. doi:10.4103/1110-6530.123925.
  91. Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, et al. Vitamins C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normozoospermic men. *Journal of Reproductive BioMedicine*. 2008;6: 1-10.
  92. Shiva M, Gautam AK, Verma Y, et al. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry*. 2011;44: 319-24. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.11.009.
  93. Chyra-Jach D, Kaletka Z, Dobrakowski M, et al. The associations between infertility and antioxidants, proinflammatory cytokines, and chemokines. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018;2018: 8354747. doi:10.1155/2018/8354747.
  94. Collodel G, Moretti E, Micheli L, et al. Semen characteristics and malondialdehyde levels in men with different reproductive problems. *Andrology*. 2015;3: 280-6. doi:10.1111/andr.297.
  95. Murawski M, Saczko J, Marcinkowska A, et al. Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2007;45: 123-6.
  96. Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G. Decreased activity of superoxide dismutase in the seminal plasma of infertile men correlates with increased sperm deoxyribonucleic acid fragmentation during the first hours after sperm donation. *Andrology*. 2015;3: 748-55. doi:10.1111/andr.12061.
  97. Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, et al. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;738: 419-20. doi:10.1111/j.1749-6632.1994.tb21831.x.
  98. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, et al. Melatonin and reproduction revisited. *Biology of Reproduction*. 2009;81: 445-56. doi:10.1095/biolreprod.108.075655.

99. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*. 2005;27: 119-30. doi:10.1385/endo:27:2:119.
100. Pang SF, Li L, Ayre EA, et al. Neuroendocrinology of melatonin in reproduction: recent developments. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 1998;14: 157-66. doi:10.1016/S0891-0618(98)00029-5.
101. Espino J, Ortiz Á, Bejarano I, et al. Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertility and Sterility*. 2011;95: 2290-6. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.063.
102. Awad H, Halawa F, Mostafa T, et al. Melatonin hormone profile in infertile males. *International Journal of Andrology*. 2006;29: 409-13. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00624.x.
103. Sharbatoghli M, Rezazadeh Valojerdi M, Bahadori MH, et al. The relationship between seminal melatonin with sperm parameters, DNA fragmentation and nuclear maturity in intra-cytoplasmic sperm injection candidates. *Cell Journal*. 2015;17: 547-53. doi:10.22074/cellj.2015.15.
104. Kratz EM, Piwowar A, Zeman M, et al. Decreased melatonin levels and increased levels of advanced oxidation protein products in the seminal plasma are related to male infertility. *Reproduction, Fertility, and Development*. 2016;28: 507-15. doi:10.1071/rd14165.
105. Karimfar M, Niazvand F, Haghani K, et al. The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. *Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2015;28: 69-76. doi:10.1177/0394632015572080.
106. Smits P, Ni J, Feng P, et al. The human extracellular matrix gene 1 (ECM1): genomic structure, DNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization. *Genomics*. 1997;45: 487-95. doi:10.1006/geno.1997.4918.
107. Kadhem H, Mossa H, Alkawaz U. Evaluation of the clinical role of extracellular matrix 1 protein for diagnosis of obstructive azoospermia. *International Journal of Modern Pharmaceutical Research*. 2019;3: 70-6.
108. Everse J, Kaplan NO. Lactate dehydrogenases: structure and function. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 1973;37: 61-133. doi:10.1002/9780470122822.ch2.
109. Goldberg E. Lactate dehydrogenases in spermatozoa: subunit interactions in vitro. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1965;109: 134-41. doi:10.1016/0003-9861(65)90298-5.
110. Odet F, Duan C, Willis WD, et al. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (LDHC) is required for male fertility. *Biology of Reproduction*. 2008;79: 26-34. doi:10.1095/biolreprod.108.068353.
111. Sleight SB, Miranda PV, Plaskett NW, et al. Isolation and proteomic analysis of mouse sperm detergent-resistant membrane fractions: evidence for dissociation of lipid rafts during capacitation. *Biology of Reproduction*. 2005;73: 721-9. doi:10.1095/biolreprod.105.041533.
112. Miki K. Energy metabolism and sperm function. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 2007;65: 309-25.
113. Dodo M, Kitamura H, Shima H, et al. Lactate dehydrogenase C is required for the protein expression of a sperm-specific isoform of lactate dehydrogenase A. *The Journal of Biochemistry*. 2018;165: 323-34. doi:10.1093/jb/mvy108.
114. Rolland AD, Lavigne R, Daully C, et al. Identification of genital tract markers in the human seminal plasma using an integrative genomics approach. *Human Reproduction*. 2012;28: 199-209. doi:10.1093/humrep/des360.
115. Mei S, Chen P, Lee CL, et al. The role of galectin-3 in spermatozoa-zona pellucida binding and its association with fertilization in vitro. *Molecular Human Reproduction*. 2019;25: 458-70. doi:10.1093/molehr/gaz030.
116. Aljabari B, Calogero AE, Perdichizzi A, et al. Imbalance in seminal fluid MIF indicates male infertility. *Molecular Medicine*. 2007;13: 199-202. doi:10.2119/2006-00114.Aljabari.