

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NORMAL NORMOSPERMİK FERTİL ERKEKLERDE
SPERMİYUMUN ANTİJENİK YAPISI
VE BU YAPININ VARİKOSELLİ HASTALARDAKİ
DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ
IŞIK MİKROSKOBU DÜZEYİNDE
İMMUNOSİTOKİMYASAL
ÇALIŞMA**

Dr. B. Emre BİLGİÇ

UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2007

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NORMAL NORMOSPERMİK FERTİL ERKEKLERDE
SPERMİYUMUN ANTİJENİK YAPISI
VE BU YAPININ VARİKOSELLİ HASTALARDAKİ
DEĞİŞİMİNİN İNCELENMESİ
IŞIK MİKROSKOBU DÜZEYİNDE
İMMUNOSİTOKİMYASAL
ÇALIŞMA**

Dr. B. Emre BİLGİÇ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Esin AŞAN

ANKARA

2007

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tez çalışmamın gerçekleşmesi için konumun seçiminde ve tezimin her aşamasında bana yardımcı olan, destek olan danışmanım sayın Prof. Dr. Esin AŞAN'a, gerekli ortamı sağlayan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine en derin saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı ve Tüp Bebek Ünitesi öğretim üyeleri ve diğer çalışanlarının bana tezim için gerekli olan materyalleri sağladıkları için teşekkür ederim.

ÖZET

BİLGİÇ, B.E., Normal normospermik fertil erkeklerde spermiyumun antijenik yapısı ve bu yapının varikoselli hastalardaki değişimi: ışık mikroskopu (immunfloresans) düzeyinde immunohistokimyasal çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Uzmanlık Tezi. Ankara, 2007. Çalışmanın temel amacı normospermik fertil hastalarda eksprese edilen bazı moleküllerin, spermiyumların son yıllarda tanımlanan yapısal özellikleriyle ilişkilendirmek ve normal spermiyum işlevine katkıda bulunmaktır. Bir diğer amaç ise aynı moleküllerin varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerindeki dağılımı normal grupla karşılaştırmalı olarak incelenerek varikoselelin etkisiyle olan ekspresyon farkları değerlendirilmiştir. Bu amaçla henüz CD kodu almamış 80396, anti-CD46, anti-CD52, anti-CD55, anti-CD63, anti-CD173, anti-LeY, anti-CD14, anti-CD44, anti-CD151 ve anti-CD155 monoklonal antikorları kullanılarak sperm yayması üzerine indirekt immunofloresan yöntemi uygulandı. Çalışmada sperm yüzey antijenlerinin dağılımı ve varikoselele olan ilişkisi tartışıldı. 80396 antikorunun normal grupta tüm kuyruk boyunca homojen ve zayıf, varikoselli grupta kuyrukta güçlü ekspresyonunun izlenmesi ilginçti. CD46 normal normospermik fertil hasta grubunda akrozomda homojen, varikoselli grupta ise granüler tarzda bir pattern gösterdi. CD52'nin normospermik fertil hastalardaki spermiyumların homojen ve az boyanması, varikosele grubunda ise belirgin bir kuyruk boyanmasının yanı sıra ekvatoryal segmenti de boyanmış olması literatürle uyumlu idi. CD55 normospermik fertil hastaların spermiyumlarında boyun bölgesinde, varikosele grubunda ise akrozomunda gözlemlendi ve bu boyanma granüler bir dağılım şeklinde idi. CD63 normospermik fertil hastaların spermiyumlarında kuyrukta homojen, yoğunluğu az bir boyanma olarak izlendi. Varikoselli grupta ise kuyruktaki immun reaktivite belirgindi ve akrozomda CD46'ya benzer tarzda granüler bir boyanma izlendi. CD173 normal normospermik fertil hastaların spermiyumlarında immun reaksiyon vermedi. Varikoselli grupta ise antijenin kuyrukta ve ekvatoryal segmentte bulunduğu dikkati çekti. LeY (CD174) normospermik fertil hasta spermelerinde immun reaktivitesi yoktu. Varikoselli hastaların spermiyum örneklerinde ise özellikle boyun bölgesini ilgilendiren kuyrukta immun boyanma belirgindi. CD14 normal normospermik fertil erkek spermiyumlarında ve varikosele grubunda değişiklik göstermedi. Her 2 grupta da immunreaktivitenin kuyruk bölgesinde birbirine paralel iki hat şeklinde oluştuğu izlendi. İlginç olarak spermiyum başını alttan saran V harfi biçimindeki immun reaktivite dikkati çekti. CD44 fertil normospermik hastalarda çok hafif bir akrozomal boyanma ve bu boyanmanın yer yer ekvatoryal segmenti de ilgilendirdiği dikkati çekti. Varikoselli hastalarda ise spermiyum kuyruğunun tüm uzunluğu boyunca belirgin bir immun reaktivite saptandı. CD155'in her 2 grup spermiyum örneklerinde de immunreaktivitesi kuyrukta idi.

Anahtar Kelimeler: sperm, varikosele, immunofloresan

Destekleyen kuruluş: HÜTF 06 D 09 101 004

ABSTRACT

BİLGİÇ, B.E., Antigenic properties of spermium in the fertile normal normospermic males and the alteration of this antigenic property in patients with varicocele: Immunohistochemical study with light microscopy. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Uzmanlık Tezi. Ankara, 2007. The main goal of this study is to relate the structural properties of the spermium with some molecules which is expressed in fertile males and make a contribution to the understanding of normal sperm function. Another aim of this study was to compare the distribution of the same molecules in sperms taken from patients who had varicocele and normal males to understand the difference in distribution. For this purpose we did indirect immunofluorescence using 80396 molecule which do not have a CD code, anti-CD46, anti-CD52, anti-CD55, anti-CD63, anti-CD173, anti-LeY, anti-CD14, anti-CD44, anti-CD151, and anti-CD155 monoclonal antibodies. In this study we discussed the sperm surface antigen distribution and its relation with varicocele. 80396 antibody showed a homogeneous, weak expression in the tail and a strong expression in the varicocele group. CD46 showed homogeneous distribution in the acrosome region of the spermium in fertile normal normospermic males compared to granular pattern in varicocele group. CD52 showed homogeneous and weak staining in the sperms of the fertile normal normospermic males compared to significant staining at tail and equatorial segment staining was comparable to the literature. CD55 showed staining at the neck region of the sperms of the fertile normal normospermic males and granular staining at the acrosome at the varicocele group. CD63 showed homogeneous staining at the tail of the sperms of the fertile normal normospermic males. Staining was strong and granular at the tail of the sperms of the varicocele group. CD173 did not show any immunostaining at the spermium of the fertile normal normospermic males. Staining was at the tail and equatorial segment in the sperms of the varicocele group. There was no staining for the LeY (CD174) antibody of the sperms of the fertile normal normospermic males compared to the tail staining nearer to the neck region of the sperm of the varicocele patients. CD14 staining was at the tail of the sperm as parallel lines in both spermium of the fertile normal normospermic males and varicocele patients. There was a V shaped reactivity at the bottom of the spermium head. CD44 staining was very weak at the acrosomal region and equatorial segment in the spermium of the fertile normal normospermic males compared to full tail staining in the spermium of varicocele patients. CD155 staining was at the tail in both groups.

Keywords: sperm, varicocele, immunofluorescence

Destekleyen kuruluş: HÜTF 06 D 09 101 004

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
RESİMLER, ŞEKİLLER VE TABLOLAR	xii
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
• TESTİSLER	3
• SEMİNİFER TÜBÜLLER	4
• LEYDİĞ HÜCRELERİ	5
SEMİNİFER TÜBÜL EPİTELİ VE SPERMATOGENEZ	6
• SERTOLİ HÜCRELERİ	6
• SPERMATOGENEZ	9
- SPERMATOGONİAL EVRE	10
- SPERMATOSİT EVRESİ	11
- SPERMİYOGENEZ	13
SİTOPLAZMİK ARTIK	18
SPERMİYASYON	18
SPERMİYUM	19
- BAŞ	20
- KUYRUK	21
- BOYUN	24
- ORTA PARÇA	24
- ESAS PARÇA	25
- SON PARÇA	25

- ERKEK GENİTAL KANALIN HORMONAL KONTROLÜ

25

MATERYAL VE METOD 26

BULGULAR 30

- 80396 immunreaktivitesi 30
- CD46 immunreaktivitesi 32
- CD52 immunreaktivitesi 32
- CD63 immunreaktivitesi 36
- CD55 immunreaktivitesi 37
- CD173 immunreaktivitesi 40
- CD174 immunreaktivitesi 43
- CD14 immunreaktivitesi 45
- CD44 immunreaktivitesi 48
- CD155 immunreaktivitesi 49

TARTIŞMA 51

- VARİKOSEL 56
- 80396 immunreaktivitesi 58
- CD46 immunreaktivitesi 59
- CD63 immunreaktivitesi 61
- CD52 immunreaktivitesi 59
- CD55 immunreaktivitesi 60
- CD173 immunreaktivitesi 61
- CD174 immunreaktivitesi 62
- CD14 immunreaktivitesi 62
- CD44 immunreaktivitesi 63
- CD155 immunreaktivitesi 66

SONUÇLAR 68

KAYNAKLAR 71

SİMGELER VE KISALTMALAR

CD	Clusters of differentiation
LH	Lutein hormon
c-AMP	Siklik adenosin monofosfat
FSH	Folikül stimule edici hormon
ABP	Androjen bağlayıcı protein
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
DNA	Deoksiribonükleik asit
ATP	Adenosin trifosfat
ATPaz	Adenosin trifosfataz
RNA	Ribonükleik asit
ZP3	Zona Pellucida glikoprotein 3
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PBS-BSA	Fosfat tampon solüsyonu-sığır serum albumini
IAM	İç akrozomal membran
OAM	Dış akrozomal membran
PR	Posterior halka
ES	Ekvatorial segment
PAR	Post-akrozomal bölge
PAS	Post akrosomal kılıf
PT	Perinükleer Teka
SOAF	Sperm-born-oocyte activating factor
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
DAF	Decay-accelerating factor
GPI	Glikozil fosfatidil inozitol
NK	Natural Killer

RESİMLER, ŞEKİLLER VE TABLOLAR

sayfa

Resim 1	5
Resim 2	11
Resim 3	14
Resim 4	19
Resim 5	24
Şekil 1a (80396)	31
Şekil 1b (80396)	31
Şekil 1c (80396)	32
Şekil 2a (CD46)	33
Şekil 2b (CD46)	33
Şekil 2c (CD46)	33
Şekil 3a (CD52)	34
Şekil 3b (CD52)	35
Şekil 4a (CD63)	36
Şekil 4b (CD63)	36
Şekil 5a (CD55)	37
Şekil 5b (CD55)	38
Şekil 5c (CD55)	38
Şekil 5d (CD55)	39
Şekil 6a (CD173)	40
Şekil 6b (CD173)	40
Şekil 6c (CD173)	41
Şekil 7a (CD174)	42
Şekil 7b (CD174)	43
Şekil 8a (CD14)	44
Şekil 8b (CD14)	44
Şekil 8c (CD14)	45
Şekil 8d (CD14)	45
Şekil 8e (CD14)	46
Şekil 9a (CD44)	47

Şekil 9b (CD44)	47
Şekil 10a (CD155)	48
Şekil 10b (CD155)	49
Şekil 10c (CD155)	49
Tablo 1	50
Resim 6	53

GİRİŞ

Spermiyum testis seminifer tübüllerinde spermatogenez ve spermiyogenez denilen birbirini izleyen iki farklı süreçle gelişen erkek üreme hücresidir. Spermatogenez başlıca haploid spermatidin oluşmasını, spermiyogenez ise haploid spermatidin yapısal değişimler geçirerek spermiyuma dönüşmesini tanımlayan süreçlerdir (1,2). Spermiyogenezdeki en önemli değişim akrozomun gelişmesidir. Akrozom çekirdeği yarımay biçiminde saracak şekilde gelişmesini sürdürürken, çekirdek kromatini yoğunlaşmaya ve kuyruk gelişmeye başlar. Erken spermiyogenez sürecinde genler transkripsiyona açılır ve hücreye özgü proteinlerin sentezi ve uygun yerlere yerleşimi gerçekleşir. Bu yolla spermiyum, epididimal olgunlaşma ve, kapasitasyon sürecini geçirmek üzere temel yapılarını büyük ölçüde kazanmış olur (3).

Spermiyum testisteki olgunlaşma sürecini tamamladıktan sonra epididimisi geçerken farklılaşmaya devam eder. Epididimal olgunlaşmada spermiyum hareket özelliğini ve zonayı tanıma kapasitesini kazanır. Bu süreç içinde akrozom ve hücre zarına ait spermiyum işlevini belirleyen pek çok molekül de biyokimyasal değişimlere uğrar ve hücre büyük ölçüde antijenik özelliğini kazanır (4). Ejekülasyonla atılan epididimal olgunlaşma sürecini tamamlamış spermiyumun döllenme yeteneğini kazanması dışı üreme yollarında geçirdiği kapasitasyon denilen bir süreçle devam eder. Kapasitasyon, spermiyumun zonaya bağlanması ve bunu izleyen akrozom reaksiyonu ve daha sonra her iki hücre membranının birbirleriyle birleşerek kaynaşmasıyla yani fertilizasyonla sonuçlanır (5,6). Kapasitasyon spermiyumun akrozom reaksiyonunu başlatmak üzere geçirdiği ve tam fertilizasyon kapasitesini kazandığı bir süreç olup, spermiyum hareketinin hiperaktivasyon şeklinde tanımlandığı bir dönemdir. Kapasitasyon normalde dışı üreme yollarında gerçekleşmesine karşın ejakülasyon yapılmış spermiyumların seminal plazmadan ayrılıp in vitro koşullarda gerçekleşebilir (7,8). Sadece kapasite olmuş spermilerin akrozom reaksiyonunu gerçekleştirebilmesi ve bu süreçlerin birbirlerini çok kısa sürelerle izleyerek oluşması, her iki olayın fertilizasyondaki

önemini gösterdiği kadar spermiyum işlevini değerlendirmede önemli bir yapısal/işlevsel bir farklanma olarak karşımıza çıkmaktadır (8).

Spermiyum hem dişi üreme hücresinden hem de organizmadaki diğer somatik hücrelerden farklı bir biçime sahip, ileri derecede yapısal ve işlevsel polarite gösteren özgün bir hücredir (6,9,10,11,12,13,14). Spermiyum testis ve epididimal olgunlaşma sürecinde moleküler organizasyonunu tamamlamış, transkripsiyonel olarak inaktif bir hücredir. Başka bir deyişle hücrenin dış etkenlere cevap olarak oluşturacağı yapısal farklanmalar yeni protein üretimi şeklinde gerçekleşmez. Kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu sürecindeki değişimler, mevcut olan antijenik yapının veya protein içeriğinin fosforilasyon gibi kimyasal olaylarla modifiye olması şeklinde gerçekleşir. Bu nedenle bu aşamadaki spermiyum, hücre işlevini gösteren antijenik özelliklerin tanımlanması için uygun bir hücredir. Yapılan çalışmalar ileri derecede yapısal polarite gösteren bu hücrenin birbirlerinden zarla ayrılmış aktif kompartmanlardan oluştuğunu göstermiştir. Bu aktif kompartmanlar başlıca iç ve dış akrozomal membranlarla sınırlanan akrozom (ön ve arka akrozomal bölgeler), post akrozomal bölge ve bununla ilişkili olarak perinükleer teka ve ilk spermiyum-oosit bağlanmasının gerçekleştiği ekvatoryal segment olarak tanımlanabilir (9,15).

Bu araştırmada insan spermiyumu üzerinde eksprese olduğu bilinen ve ekspresyonunun önemli olabileceğini düşündüğümüz 80396, CD46, CD52, CD55, CD63, CD173, LeY, CD14, CD44, CD155 antikorları ile spermiyumun antijenik yapısı yukarıda tanımlanan aktif bölgeler yönünden immunofloresan boyama ile değerlendirildi. Bulgularımıza destek olmak ve bir miktarda etyolojisine katkıda bulunmak amacıyla da multifaktoriyel bir patoloji olarak gelişen varikoselli hastalardan elde edilen sperm örnekleri de çalışmaya dahil edildi.

GENEL BİLGİLER

TESTİSLER

Testisler olgun erkek üreme hücrelerinin üretildiği, skrotum denilen bir kesede yerleşmiş bir çift organdır. Testisler karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişmeye başlarlar. Daha sonra skrotuma inerlerken, peritonun bir kısmını da birlikte sürüklerler. Bu periton kesesi daha sonra Tunika vaginalise dönüşür ve testisin anterolateral bölgesini örten seröz bir kese yaparak organın skrotum içinde hareketli olmasını temin eder. Bu yerleşimleri testislerin spermatogenezis için gerekli 34-35 °C gibi, vücut ısısından yaklaşık 2-3 °C derece düşük bir ısıda gerçekleşmesini sağlar.

Testisler Tunika albuginea denen düzensiz sıkı bağ dokusundan yapılmış bir kapsülle sarılıdır. Bunu altında Tunika vaskülosa denilen damardan zengin bir gevşek bağ dokusu yer alır. Tunika albugineanın posterior kısmı kalınlaşarak Mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testisten ayrılan bağ dokusu bölmeleri testisi piramit biçimli, yaklaşık 250 adet lobule ayırır. Lobullerin içinde 1-4 arasında seminifer tübül denilen oldukça kıvrıntılı borular bulunur. Lobullerin apeksinde seminifer tübülleri tubuli rektiye açılır. Tubuli rekti seminifer tübülleri rete testise bağlayan düz kanallardır. Rete testis mediastinumda bulunan pleksusa benzer yapıda epitel ile örtülü bir kanallar sistemidir. Seminifer tübüllerde oluşan spermatozoonlar, tubuli rekti yoluyla önce rete testise, daha sonra sayıları 10-20 arasında değişen duktuli eferenteslere ulaşırlar ve epididimise geçerler.

Olgun testisin arka yüzü ile epididimis ilişki içerisindedir. Hem testis hem de epididimis skrotal kese içerisinde vaza deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusuları içeren spermatik kordon ile asılıdır.

SEMINİFER TÜBÜLLER

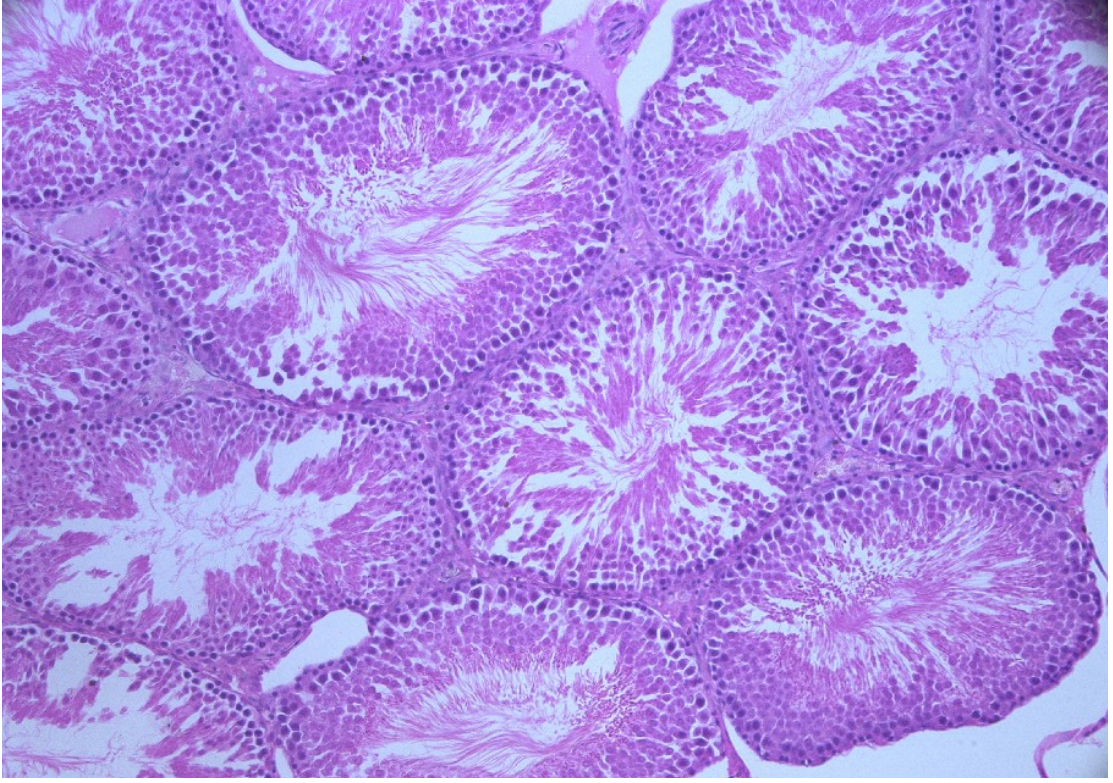
Seminifer tübüller yaklaşık 30-70 cm uzunluğunda, 150-250 mikrometre çapında kıvrıntılı t b llerdir. Seminifer epitel, kompleks çok sıralı bir epitel olup iki temel hücre tipi içerir:

1. Destek hücreleri (sustentak ler ya da Sertoli hücreleri)
2. Gelişmekte olan erkek germ hücreleri (spermatogenetik hücreler)

Seminifer tübüller belirgin bir bazal membran üzerine oturmuşlardır ve aralarında gevşek bağ dokusu bulunur. Bu bağ dokusuna peritübüler doku ya da Lamina propria denir. Bu bağ dokusunda kan damarları, lenfatik kanallar veya sinuzoidler, makrofajlar ve Leydig hücre grupları bulunur. Androjen  reten Leydig hücreleri kan damarlarına yakın yerleşmiştir ve testisin temel endokrin hücre gruplarını oluşturur.

Bazı hayvan türlerinde çok belirgin olmak üzere seminifer tübüller myoid hücreler (peritübüler kontraktıl hücreler) denilen bir grup modifiye olmuş fibroblast benzeri hücre ile  evrenmiştir. Myoid hücreler insanda seminifer epitelin etrafında halkalar oluşturacak şekilde düzenlenmiştir. İnce yapı düzeyinde düz kas hücrelerindeki benzer kasılabilen ipliksi proteinler içerirler. Myoid hücrelerin ritmik kontraksiyonlarla oluşturdukları peristaltik dalgalar, spermiyumun seminifer tübüllerden kanal sistemine doğru akarak hareket etmesini kolaylaştırır.

Yaşlanma ile bu bağ dokusu azalır ve yoğunlaşır. Seminifer tübüllerin dağılımı ve çapı azalır. Ancak, hayatın erken dönemlerinde seminifer tübüllerin çevresindeki myoid hücreleri de içeren lamina proprianın kalınlaşması bazı infertilite olgularıyla birlikte görülür.



Resim 1. Testisten alınan bu mikrografta seminifer tübüllerin enine kesitleri, seminifer tübül lümeninde gelişmekte olan spermatogenetik seri hücreler ve seminifer tübül lümenindeki spermiyumlar ayırt edilmektedir. X20 Hematoksilen eozin.

LEYDİĞ HÜCRELERİ

Leydig hücre toplulukları, kan damarları ve lenfatik kanal veya sinuzoidler yakınında, intertübüler alanda yerleşmiştir. Leydig hücreleri büyük poligonal eozinofilik, lipid damlacıklarından zengin hücrelerdir. Çoğunlukla gruplar yapacak şekilde bulunurlar. Birçok steroid üreten hücrelerde olduğu gibi Leydig hücreleri de yaygın düz yüzlü endoplazmik retikulum, lipid damlacıkları, tübüloveziküler kristal mitokondriyon içerir.

Embriyoda testis hücrelerinden salgılanan testosteron ve salgılanan diğer androjenler, gonadların erkeklik yönünde farklanması için gereklidir. İnsanda plasentadan üretilen gonadotropik hormon, anne kanından fetüsa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Embriyonik interstisyel hücreler gebeliğin 4. ayına kadar tamamen

farklanmış olarak kalırlar ve sonra testosteron sentezinde bir azalmayla birlikte gerilerler. Gebeliğin geri kalan zamanında ve hipofizden salgılanan LH hormonu uyarısı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları puberte öncesi döneme kadar sessiz kalırlar.

Puberteden sonra c-AMP aracılı mekanizma tarafından LH ile uyarılmanın ardından Leydig hücreleri, 5 α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona dönüştürülebilen, erkekte spermatogenezisin başlaması ve sekonder seks karakterlerinden sorumlu olan testosteronu üretir. Serumda bulunan testosteronun yaklaşık %95'i (seks hormonu bağlayıcı globulin ve diğer proteinlere tutunmuş halde) Leydig hücreleri tarafından sentezlenir. Kalan testosteron ise adrenal korteks tarafından üretilir. Yetişkinde ise testosteron salgısı spermatogenezisin devamlılığı için gereklidir.

Testosteron başta adipoz dokuda olmak üzere birçok dokuda östrojenlere aromatize edilebilir. FSH uyarımından sonra Sertoli hücrelerince üretilen ABP, gelişen spermatogenik hücrelerin çevresinde yüksek bir testosteron yoğunluğu sağlar.

SEMINİFER TÜBÜL EPİTELİ VE SPERMATOGENEZİS

Seminifer epitel, gelişmekte olan spermatogenetik seri hücreler ve bunlarla çok yakın ilişkideki Sertoli hücrelerinden oluşur.

SERTOLİ HÜCRELERİ

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epiteldeki en belirgin hücre tipidir. Puberteden sonra, seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık % 10'unu oluşturur. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatogenik hücre popülasyonu düştüğü zaman, Sertoli hücreleri tekrar epitelin ana elemanı haline gelir.

Sertoli hücreleri bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan, spermatogenik hücreleri saran prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin lateral ve apikal hücre zarlarında oluşan çöküntüler içine gelişmekte olan spermatogenik seri hücreleri yerleşmişlerdir. Bu nedenle ışık mikroskopunda spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda yan uzantı nedeniyle, Sertoli hücrelerinin sınırları

iyi belirlenemez. Sertoli hücreleri proliferasyon yeteneğini yitirmiş destek hücreleridir. Prolifere olan ve farklılaşan germ hücreleri sertoli hücrelerinin yan yüzeylerindeki çöküntülere yerleşerek yavaş yavaş lümene hareket ederler. Bu yakın yapısal ilişki Sertoli hücrelerinin germ hücrelerinin gelişmesindeki rolünü açıkça ortaya koymaktadır. Hücrelerin bazale yakın girintili-çıkıntılı çekirdekleri vardır. Çekirdekçik çoğu kez belirgindir.

Hücre sitoplazmasında çok sayıda uzun mitokondriyon, lipid damlacıkları, iyi gelişmiş düz yüzlü endoplazma retikulumu bulunur. Golgi kompleksi iyi gelişmiştir. Seyrek lizozom ve lipofuksin pigmenti içerebilir. Hücre iskeleti elemanları iyi gelişmiş olup, gerek hücreye gerekse gelişmekte olan germ hücrelerine mekanik destek sağlar.

Sertoli hücrelerinin birbirleri arasında ve başka hücrelerle arasında pek çok bağlantı kompleksleri vardır:

- **Sıkı bağlantı (zonula okludens):** Kan-testis bariyerinin olduğu alandaki Sertoli hücreleri arasındadır.
- **Tutturucu bağlantı:** Bağlanma bölgesinde aktin filamalarıyla birlikte Sertoli hücreleri arasında ve Sertoli hücresiyle germ hücreleri arasındadır.
- **Ektoplazmik özelleşme:** Sertoli hücreleri arasında ve Sertoli hücresiyle germ hücreleri arasındadır.
- **Tubulobulbar kompleks:** Sertoli hücreleri arasında ve Sertoli hücresiyle germ hücreleri arasındadır.

Sertoli hücrelerinin birbirlerine komşu hücre zarları seminifer epitelin bazale yakın kısmında sıkı bağlantı kompleksleriyle birbirine bağlanır. Böylece bu bağlantı kompleksleri seminifer epiteli zonula okludensin altında kalan dar bir bazal kompartman ve lümene doğru yer alan geniş bir adlüminal kompartmana ayırır. Sertoli hücreleri arasında oluşan bu bağlantı kan-testis bariyeri olarak bilinir. Kan testis bariyeri adlüminal kompartmandaki spermatogenetik hücreleri bazal kompartmandan ve dolayısıyla çevre bağ dokusundan ayırır ve gametlerin immun sistem tarafından tanımlanmalarını engelleyerek immun cevabı önler. Spermatogenezis puberteden sonra başladığı için yeni gelişmekte olan germ hücreleri yüzeylerinde farklı reseptörler içerebildikleri gibi bu süreçte farklı

kromozom sayılarına da sahip olabilirler. Böylece kan tesis bariyeri bu izolasyonu sağlayarak germ hücrelerine karşı gelişen immun cevabı önler.

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları şunlardır:

- **Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek:** Spermatogenik seri hücreleri birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanırlar. Bu hücre ağı daha önce değinildiği gibi Sertoli hücrelerinin sitoplazmik uzantıları ve çöküntüleri ile fiziksel olarak desteklenir. Çünkü hücreler bu çöküntülerin içine yerleşmişlerdir. Spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar kan-testis bariyeriyle kan akımından izole edildiği için sertoli hücreleri spermatogenetik hücrelerin metabolik desteğini sağlar.
- **Fagositoz:** Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan rezidüel (artık) cisimcikler olarak adlandırılan fazla hücre sitoplazması Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir ve lizozomlar tarafından sindirilir.
- **Olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla, spermiyasyon denilen bir süreçte, seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak**
- **Sekresyon:** Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere, spermilerin taşınmasında kullanılan proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılar. Androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimi Sertoli hücreleri tarafından follikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. ABP seminifer tübül içerisinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlarlar.
- **İnhibin ve aktivin alt ünitelerini (α ve β alt üniteleri) salgılamak:** İnhibin ($\alpha\beta$ heterodimeri) hipotalamustan ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör (GnRH) ve FSH üzerine negatif feedback bir etki gösterir. Aktivin ($\alpha\alpha$ veya $\beta\beta$ homodimer) FSH salınımı üzerine pozitif feedback etki gösterir.
- **Anti-Müllerian hormon üretimi:** Bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlayan bir

glikoproteindir. Testosteron ise Wolf (mezonefrik) kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar. Sertoli hücreleri puberteden sonra bölünmezler. Enfeksiyon, kötü beslenme, X ışınına maruz kalma gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklı hücrelerdir ve bu zararlı etkilere maruz kaldıklarında, sağ kalım oranları spermatogenik seri hücrelerine oranla çok daha yüksektir.

- **Kan-testis bariyeri oluşturmak:** Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve büyük moleküllerin geçişi için uygundur. Seminifer epitelin bazal kompartmanında olan spermatogonyumlar kanda dolaşan moleküllerle ilişki kursalar bile bu hücreler testiste daha önce bulunduğu organizma tarafından yabancı olarak kabul edilmezler. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, kan-testis bariyerini oluşturarak büyük moleküllerin adluminal kompartmana taşınmasını engeller. Böylece spermatogenezin daha ileri aşamalarındaki farklı antijenik yapıda olabilen germ hücreleri, immün ataktan korunmuş olur (16,17,18)

SPERMATOGENEZ

Spermatogenez ana germ hücresi olan spermatogonyumun olgun erkek üreme hücresi spermatozoon veya spermiyuma farklılaşmasındaki tüm hücresel değişiklikleri tanımlayan bir süreçtir.

Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler olgunlaşıp farklılaşmanın değişik evrelerindeki germ hücreleridir. Bu hücrelerin spermatogonyum denilen ana hücreleri bazal kompartmanda bulunur. Buna karşılık farklılaşmakta olan primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermiyumlar adluminal kompartmanda yerleşmişlerdir. Spermatogonyum mitotik bölünmelerle kendini yenileyen ve primer spermatositleri de oluşturan diploid hücrelerdir. Primer spermatositler bazal kompartmandan adluminal kompartmana geçer. 1. mayoz bölünmeyle sekonder spermatositleri oluşturur. Sekonder spermatositler de 2. mayoz bölünmeyi tamamladıklarında spermatid denilen haploid hücreyi oluştururlar. Bu haploid hücre adluminal kompartmanın üst bölümlerinde olgun erkek üreme hücresine veya spermiyuma dönüşür.

Spermatogenezis 3 ana evreye ayrılabilir:

- **Spermatogonial evre:** Spermatogonyumların bölünerek kendini yenilemesi ve sonrasında primer spermatositlere farklılaşmasıdır.
- **Mayoz veya spermatosit evresi:** Primer spermatositlerin 2. mayoz bölünme ile hem kromozom sayılarını hem de DNA miktarlarını yarıya indirerek haploid spermatidleri oluşturmasıdır.
- **Spermiyogenez evresi:** Spermatidlerin biçim değiştirerek olgun spermatozoaya dönüşmesindeki evreleri tanımlar.

SPERMATOGONİAL EVRE

Spermatogonyumlar yaklaşık 12 µm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan diploid germ hücresidir. Cinsel olgunluğun başlaması ve testosteronun etkisiyle spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle çoğalmaya ve kendi kendilerini yenilemeye başlarlar.

3 tip spermatogonyum vardır (16,17,18):

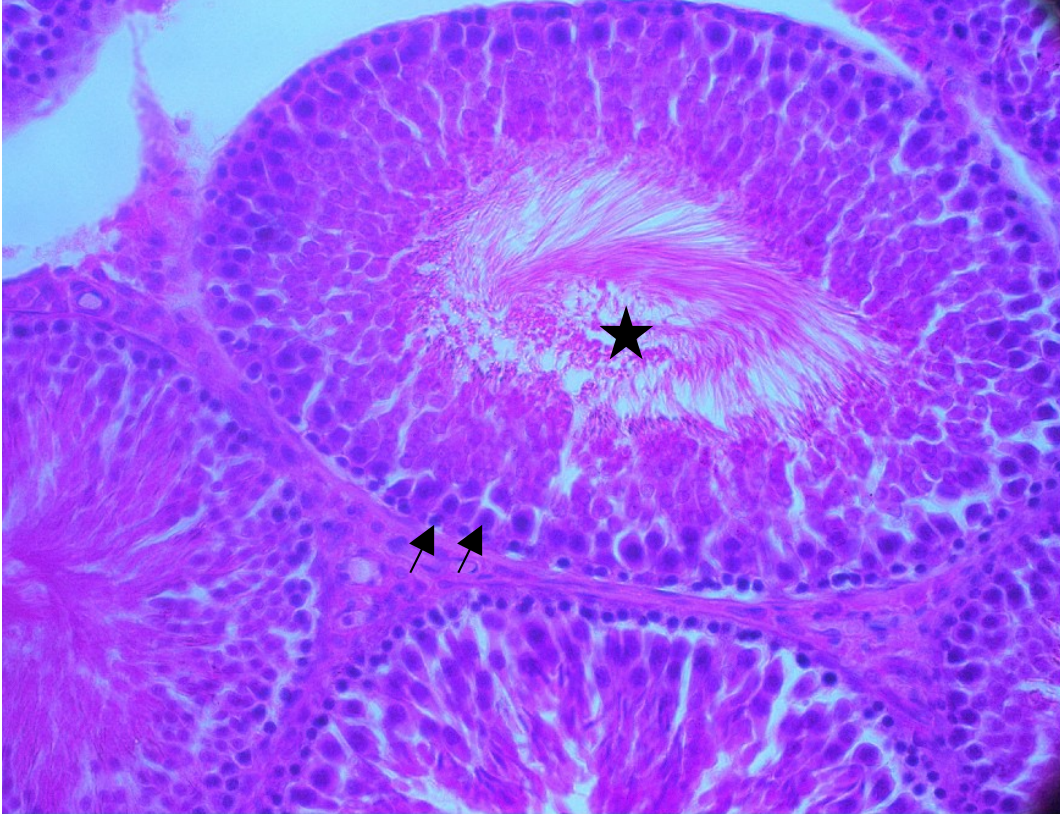
- Tip A koyu spermatogonyum
- Tip A açık spermatogonyum
- Tip B spermatogonyum

Tip A koyu spermatogonyumlar: Ufak, yaklaşık 12 µm çapında, kubbe şeklinde hücrelerdir. Heterokromatinden zengin yassı oval nükleuslarıyla ayırt edilirler. Bu hücreler rezerv veya kök hücrelerdir. Mitozla kendilerini yenileyerek ilave Tip A koyu spermatogonyumları ve Tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Genellikle çekirdek zarına yakın yerleşmiş iki çekirdekçik içeren koyu renkli oval çekirdekleri ile ayırt edilirler.

Tip A açık spermatogonyumlar: Açık renk boyanan ökromatinden zengin oval çekirdekleriyle ayırt edilirler. Organelden fakirdirler ancak bol serbest ribozom içerirler. Testosteronun etkisiyle çoğalarak ilave Tip A açık spermatogonyumları ve Tip B spermatogonyumları oluştururlar.

Tip B spermatogoniyum:

Tip B spermatogonyumlar yuvarlak çekirdekleriyle ayırt edilirler. Bu özelliği dışında kendilerini oluşturan Tip A açık spermatogonyumlara benzerler. Bu hücreler mitozla bölünerek primer spermatositleri oluştururlar.



Resim 2. seminifer epitelin ayrıntılı yapısı görülmektedir. Bazal membrana yakın koyu spermatogonyumlar (ok), spermatosit 1 (ok ucu) ve gelişmekte olan spermiyumlar (yıldız) görülmektedir. X40 hematoksilin eozin.

MAYOZ VEYA SPERMATOSİT EVRESİ

Tip B spermatogonyumlar bölünerek primer spermatositler oluştururlar. Ve hemen 1. mayoz bölünmenin profazına girerler. Primer spermatositler kromozomlarını eşlerler (diploid $2n$ kromozom) ve $4n$ DNA içerirler. Primer spermatositler seminifer tübüllerdeki gelişmekte olan germ hücrelerinin en iri olanıdır. Çekirdekleri yoğunlaşmakta olan kromozomları nedeniyle iyi ayırt edilir. Birinci mayoz bölünmenin profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamada olacaktır.

Primer spermatositler oluşur oluşmaz, bazalden adluminal kompartmana geçerler. Komşu Sertoli hücreleri arasından geçişleri sırasında, kan-testis bariyerinin bozulmasını önlemek üzere Sertoli hücreleri ile aralarında geçici bağlantılar kurarak yukarıya doğru hareket ederler. Birinci mayoz bölünmede DNA, $2n$ DNA olarak paylaştırılır ve her yavru hücre haploid (n) sayıda kromozom içerir. 2. mayoz bölünmede ise hücrelerdeki DNA miktarı yarıya inerek haploid (n) olarak yavru hücrelere aktarılır. Ancak kromozom sayıları haploid olarak kalır. Birinci mayoz bölünmenin profazı 22 gün sürer ve 4 evrede gerçekleşir:

- **Leptoten:** Primer spermatositlerin kromozomları yoğunlaşarak uzun iplikler şekline dönüşür. Hücreler lümene doğru hareket etmeye başlar.
- **Zigoten:** Homolog kromozomlar biraraya gelirler. Ve bu süreçte testisler kan-testis bariyerini aşıp adlüminal kompartmana geçerler.
- **Pakiten:** En uzun dönem olup spermatositler bu dönemde dış etkilere karşı çok hassastırlar. Bir araya gelmiş homolog kromozomlar, bir kromozom çifti oluşturarak daha kalın ve belirgin hale gelirler. Bu şekilde çiftin kromozomları tetrad olarak adlandırılan dörtlü yapıyı oluşturur.
- **Diyakinezis:** Homolog kromozom tetradları arasında gen segmentlerinin değişimi gerçekleşir. Buna crossing-over denir. Bu şekildeki rastlantısal genetik rekombinasyonla her gamet farklı bir genetik yapıya sahip olur. Daha başka bir deyişle her iki ebeveyninden gelen homolog kromozomlar arasındaki genler yeni kombinasyonlar oluşturur ve genetik çeşitliliği kuşaktan kuşağa aktarır.

İlk mayoz bölünmenin profazı yaklaşık 22 gün sürdüğünden kesitlerde spermatositlerin profazın farklı evrelerindeki hücreleri ayırt edilebilir. Profazın sonunda çekirdek zarı kaybolur ve metafaz I başlar. Bu süreçte homolog kromozom çiftleri ekvatorial planda sıralanır. Anafaz I'de çiftler birbirinden ayrılarak hücrenin aksi kutuplarına hareket ederler. Telofaz I'de ise iki yavru hücre oluşur. Bunlar sekonder spermatositlerdir. Hücreler birbirinden ayrılmaz. Birbirleriyle sitoplazmik köprülerle ilişki içerisindeyler.

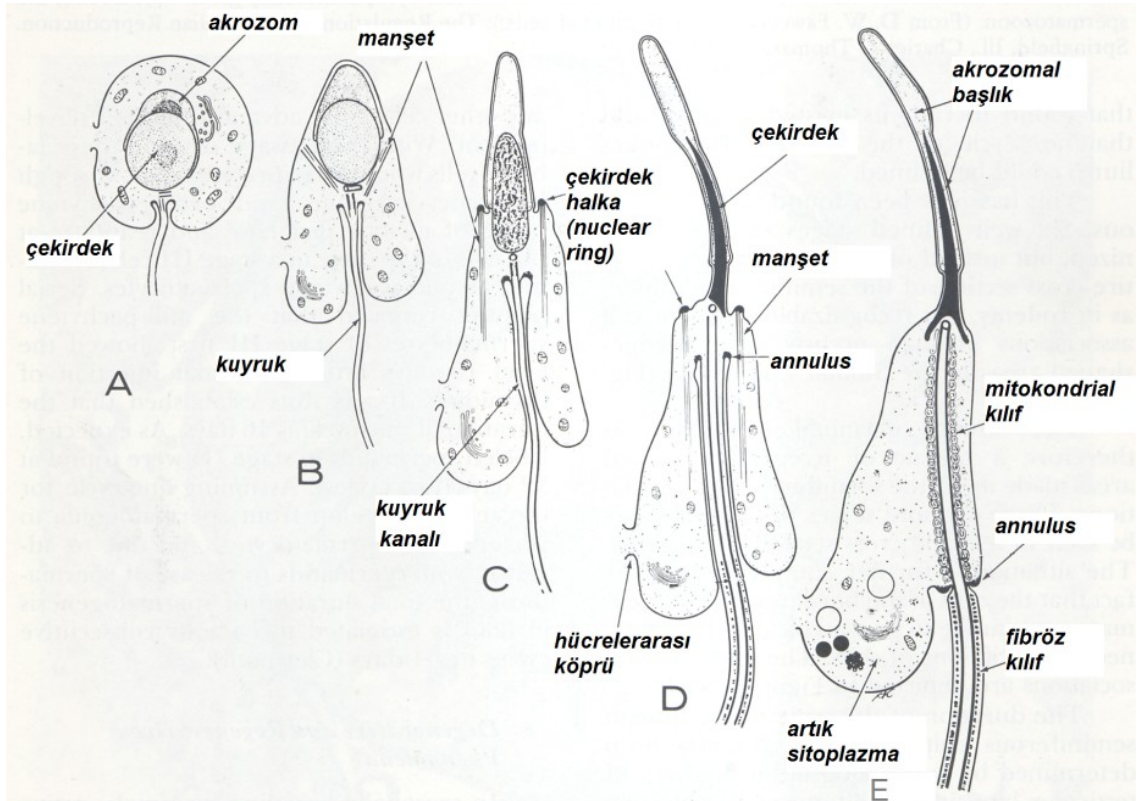
Birinci mayoz bölünme sonucu oluşan sekonder spermatositler 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren, ancak halen 2n DNA içeren küçük hücrelerdir. Anafaz I'de X ve Y kromozomları sekonder spermatositlere ayrılarak geçtiğinden oluşan hücreler sadece X veya Y kromozomu taşırlar. Böylece spermatositler veya bunlardan oluşan spermiler, embriyonun cinsiyetini tayin ederler. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur. Çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir. İkinci mayoz bölünme başlamadan önce hücreler kromozomlarını eşlemezler. Sekonder spermatositlerin mayoz bölünmesi 23 kromozom içeren iki hücrenin, spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır. Spermatositlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı (DNA sentezi) görülmediği için, 2. bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1n) hücreler meydana gelir. İkinci mayoz bölünmenin metafaz safhasında kromozomlar ekvatoryal segmente dizilir ve kromatidler birbirinden ayrılarak hücrenin aksi kutuplarına hareket ederler. Böylece mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid sayıda kromozom içeren 4 adet spermatid oluşur. Döllenme ile bunlar normal diploid sayıya dönerler.

İkinci mayoz bölünme sonucu oluşan spermatidler, her biri 23 adet tek zincirli kromozom veya kromatid içeren DNA miktarı yarıya inmiş küçük, yuvarlak, 8 nm çapında hücrelerdir. Spermatogenez esnasında hücreler, tam olarak birbirlerinden ayrılmazlar ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlıdırlar. Böylece bir açık tip A spermatogoniumdan köken alan 4 spermatid de birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı ufak bir sitoplazma kitlesi halinde lümene yakın bir pozisyonda yerleşirler.

SPERMİYOGENEZ

Spermiyogenez DNA miktarı ve kromozom sayısı yarıya inmiş spermatidlerin olgun spermiyum (sperm, spermatozoon) haline dönüşmek üzere geçirdiği hücresel farklılaşma süreci olarak tanımlanır. Spermatidler küçük boyutları (7-8 µm çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren çekirdekleri ile ayırt edilebilirler. Spermatidler granüllü endoplazma retikulumundan ve mitokondriyondan zengin hücrelerdir ve iyi gelişmiş bir golgi kompleksleri vardır. Seminifer tübüllerde lümen yakınında (jukstaluminal) yerleşmişlerdir. Spermiyogenez spermatidlerin Sertoli

hücresi sitoplazması içine yuvalanması, akrozom oluşumu, kromatinin yoğunlaşması ve çekirdeğin yassılaşıp her iki yana doğru uzayarak bilinen yapısını kazanması, flagellum veya kuyruğun gelişmesi ve mitokondriyonların göç ederek orta parçadaki yerlerini almaları sitoplazmanın çoğunun artık materyal olarak kaybolmasını içeren bir hücresel değişim sürecidir. Sonuçta seminifer tübül lümenine salınan olgun spermiyum (spermatozoon ya da sperm) oluşur (19,20,21).



Resim 3. Gametes-The Spermatozoon kitabından alınmıştır (J.G.Grudzinskas, J.L. Yovich 1997).

Spermiyogenezis 4 evreden oluşur (19,20,21):

- Golgi evresi
- Başlık evresi
- Akrozomal evresi
- Olgunlaşma evresi

GOLGİ EVRESİ

Spermiyuma farklanmanın ilk işareti çekirdeğe bitişik yerleşmiş Golgi kompleksinin trans yüzünde ufak membranla sınırlandırılmış preakrozomal granüllerin belirmesidir. Gelişme ilerledikçe granüller birbirleriyle birleşerek “akrozomal vezikül” denen geniş tek bir granülde toplanır. Bu erken dönemde bile akrozom içeriğindeki hidrolitik enzimler ayırt edilebilir. Akrozomal vezikül çekirdeğin ön kutbuna yerleşmiştir. Bu dönemde vezikülü sınırlayan membran ise çekirdek zarına dayanmıştır. Akrozomal vezikülün tepe noktası yaklaşık sperm çekirdeğinin uç noktasını gösterecek şekildedir. Golgi kompleksi akrozomal vezikül yüzeyi ile yakın ilişkide kalır ve yeni preakrozomal granüller oluşturarak gelişmeye devam eder. Akrozomal vezikülün hacmi arttıkça çekirdek dış zarına dayanan akrozomal membran başlangıç noktasından ayrılarak yarım daire halini almaya başlar. Akrozomal veziküllerin oluşmasıyla eş zamanlı olarak sentrioller çekirdek yakınındaki yerleşimlerinde ayrılarak karşı kutba yönelirler ve birbirlerine dik olarak yerleşirler. Distal sentriolden kuyruğu oluşturacak olan mikrotubuluslar gelişmeye başlar. Bu mikrotübülüsler daha sonra aksonemi oluşturacaklardır (22,23).

BAŞLIK (CAP) EVRESİ

Bu süreçte akrozomal vezikül hacimce büyümeye başlar. Akrozomal vezikül membranı çekirdek dış zarını çevrelercesine bir yol izleyerek her iki yana doğru uzar ve çekirdeğin ön yüzünü yarım daire şeklinde kaplamaya başlar. Bu süreç içinde henüz akrozomal vezikül içeriği yukarıda tanımlanan şekilde yayılmış akrozomal alanın tümünü kapsayacak şekilde gelişmesini tamamlamamıştır. Daha başka bir deyişle akrozomal vezikül olduğu ilk bölgede belirgin olarak izlenir.

AKROZOMAL EVRE

Bu evre spermiyogenezisin en önemli evresi olup başlıca spermin sperm başının bilinen normal yapısını kazanmasıyla sonuçlanır. Başlık evresinde henüz akrozomal bölgeyi doldurmamış olan akrozomal içerik tümüyle iç ve dış akrozomal membranlar arasında yayılarak akrozomu biçimlendirir. Çekirdek kromatini

kondanse olmaya ve çekirdek yassılaşıp sperm başı uzamaya başlar ve mitokondriyonlar daha önce tanımlandığı şekilde, orta parçadaki normal yerleşim bölgelerine doğru göç ederler. Çekirdek hacmi küçülmüştür ve çekirdek yassılaştıkça sperme özgü yapısal özellikleri belirgin olmaya başlar.

Akrozomal vezikül ve granül yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom hiyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri etkisi olan bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür (23). Bu enzimlerin, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Spermiyumlar oositle karşılaştığında, akrozomun dış membranı birçok bölgede spermiyumun plazma membranı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin hücre dışına boşalmasını sağlar. Böylece iç akrozomal membran dışarıya açılır. Bu olay akrozomal reaksiyon olarak bilinir ve döllenmenin ilk basamaklarından birisini oluşturur.

İnsan spermiyumunda akrozom içinde bulunan hidrolitik enzimlerin en iyi tanımlananları hyaluronidaz, akrozin-proakrozin, tripsine benzer proteinaz olup bu enzimler akrozomal matriks içinde inaktif zimogen salgı granülleri gibi biçimlenir ve bu paketlenme ve inaktif enzim depolanması ve matriksteki özel inhibitörler aracılığıyla sağlanır.

Bu evrede, spermatid başı seminifer tübülün tabanına ve aksonem lümene doğru uzanacak şekilde döner ve pozisyonunu değiştirir. Ayrıca çekirdek uzamaya ve kromatin yoğunlaşmaya devam eder. Sperm DNA'sı normal somatik hücre DNA'larından farklı bir biçimlenmeye sahiptir. Somatik hücrelerde DNA histonların çevresinde histonları saracak şekilde dairesel bir kompaktlaşma gösterirken, sperm DNA'sı protamin denilen proteinlerin iştirakıyla çizgisel ve sımsıkı paketlenmiş bir yapılanma içerir. Ve bu yolla memeli sperm DNA'sı mitotik kromozomlardaki DNA'nın yaklaşık altı katı daha fazla kompaktlaşmasıyla oluşmuştur. Bu kompakt DNA daha küçük hacimdeki çekirdeğin içine sığacak şekilde paketlenmiştir (24).

Çekirdeğin ön ucunda akrozom gelişimi devam ederken sentrioller akrozomun karşı kutbuna doğru hareket ederek birbirlerine dik bir pozisyonda yerleşirler. Sentiollerden bir tanesi aksonemi oluşturmak üzere radial bir pozisyon alırken diğer sentriol olduğu yerde kalır ve kuyruğu çekirdeğe bağlayan boyun bölgesini (connecting piece) oluşturur. Aksonemi oluşturacak olan hücre membranına dik yerleşmiş sentriol (distal sentriol) duvarındaki mikrotübüller aksonemi oluşturmak üzere bir araya toplanırlar. Flagellum, spermatid ve onu destekleyen Sertoli hücresi arasındaki boşlukta uzamaya devam eder, mitokondriyonlar da flagellumun (kuyruğun) ön kısmı etrafına halka şeklinde dizilerek orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge, spermiyumun hareket için kullandığı enerjinin sağlandığı bölgedir. Flagellumun hareketi bilindiği gibi, mikrotübüller, ATP ve dynein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşimi ile birbirlerine olan pozisyonlarını değiştirmeleri ile gerçekleşir.

Sperm başının uzaması ve biçimlenmesinde önemli bir rol oynayan yapı da bu süreçte gelişen ve işlevi bitince yok olan bir yapıdır; buna manşet denir. Manşet akrozomun posterior sınırında oluşan perinükleer halka (marjinal halka) denen bir yapıya bağlanmış, kaudale doğru uzanan mikrotübülüslerden oluşmuştur. Perinükleer halkadan (Marjinal halka) manşeti oluşturmak üzere mikrotübül demetleri uzar. Manşet perinükleer halka ve bu halkadan uzanan mikrotübül demetlerinden oluşur. Ve sperm başı ya da çekirdeğinin uzamasında rol oynar. Çekirdek uzaması geç spermiyogenez boyunca devam eder. Bu aşama boyunca, manşet geçici olarak sitoplazmanın arka-dış bölgesinde oluşur. Manşet, erken spermatidlerin uzamasında ortaya çıkar ve spermatid çekirdeğinin uzaması ve yoğunlaşmasının bitmesine yakın kaybolur. Geçici olarak oluşan ve daha sonra kaybolan bu manşetin yeri spermiyumun orta parçasıyla esas parçasının birbirleriyle birleştiği bölge olarak tanımlanabilir. Bu bölgeye annulus denir.

Perinükleer halka'dan çıkan mikrotübül demetleri, akrozom distal ucunun yan tarafında merkez-distalden boyun bölgesine doğru ilerler. Manşet gelişimiyle spermatid çekirdeği yoğunlaşır. Akrozom başı da distale doğru uzar. Akrozom başı ve spermatidin baş bölgesi yassılaşır. Manşet mikrotübülüslerinin çeşitli moleküllerin sperm alt bölgesine ve boyun bölgesine iletilmesinde işlev gördüğü düşünülmektedir. Manşet, spermatidin artık sitoplazmasının atılmasında da rol

oynamaktadır; sitoplazmayı distal uca çekerek, spermiasyon esnasında artık sitoplazmanın atılmasını kolaylaştırmaktadır (25).

OLGUNLAŞMA EVRESİ

Spermatidin fazla sitoplazması kuyruk yönünde uzar ve koparak seminifer tübül lümenine atılır. Bu parçalar Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler. Spermiyumlar Sertoli hücrelerinden ayrılıp lümene geçerler. Bu arada diğer spermatidlerle olan bağlantıları da kopar. Yeni oluşan bu spermiyumlar hareketsizdirler ve dölleme yeteneklerini ve hareket özelliklerini epididimal olgunlaşma ve dişi genital yollarındaki kapasitasyondan sonra kazanırlar.

Sitoplazmik Artık (Rezidüel cisim)

Spermiyogenez esnasında oluşan bu sitoplazmik artıklar bazen spermiyumun boyun bölgesine veya kuyruğun orta kısmında bağlı olarak gözlenebilir. Normalde Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilmesi gereken bu artıkların, spermiyuma bağlı olarak kalması olağan bir yapılanma olarak değerlendirilmiştir. Ancak daha sonra değinileceği üzere bu tür artık sitoplazmanın sayıca artması spermiyum işlevindeki bazı bozukluklarda bir arada görünmektedir. Sitoplazmik artık genellikle artan miktarda RNA granülleri, birkaç mitokondriyon, lipid damlaları ve artık membranlar içerir.

SPERMİASYON

Spermiasyon seminifer tübülün germinal epitelinden spermiyumların salınmasını tanımlar. Bu süreç Sertoli hücreleri tarafından kontrol edilir. Sertoli hücrelerin ara filamanlarının ve sitoplazmik mikrotübüllerinin işbirliğiyle gerçekleşir (18). Spermatidler farkedildikçe yeni germ hücrelerinin üretilmesiyle yavaşça seminifer tübül lümenine doğru hareket ederler. Gelişimlerinin son evrelerinde kuyrukları lümene uzar. Çekirdek ve akrozomu içeren baş ise karşı tarafta Sertoli hücrelerinin yüzeyindeki girintilerin içinde yer alır. Spermiyumların salınması sırasında, baş Sertoli hücresinden aktif olarak çıkar ve sitoplazması spermiyumu serbestleştirecek şekilde bunu izler.

SPERMİYUM (SPERMATOZOON)

Bu araştırmanın konusu olan erkek üreme hücresi veya spermiyum, aktif olarak hareket edebilip sıvı bir ortamda serbestçe yüzebilen, uzun (65 µm) ileri derecede polarlaşmış özgün bir hücredir.

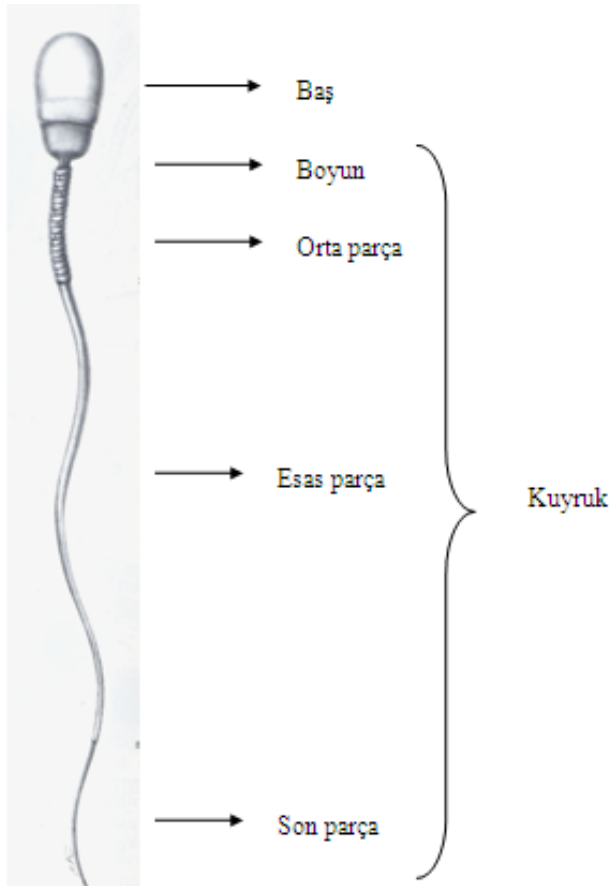
Spermiyum temel olarak iki kısımdan oluşur:

- Baş
- Kuyruk

Baş bölgesinde hücrenin çekirdeği ve bunu ön bölgeden saran akrozom yer alır.

Kuyruk bölgesi ise histolojik yapısına göre dört kısma ayrılır:

- Boyun
- Orta parça
- Esas parça
- Son parça



Resim 4. Gametes-The Spermatozoon'dan alınmıştır (J.G.Grudzinskas, J.L. Yovich 1997).

BAŞ

Spermium başının temel organizasyonu tüm memeli spermiumlarında aynıdır ancak, hem çekirdek hem de akrozomun boyutları değiştiğinden baş büyüklüğü ve şekli de farklı memeli türlerinde değişkenlik göstermektedir. İnsanda önden görüşte ovaldir ve yandan bakışta piriformdur (piramit şeklinde). Tabana yakın kalınlaşır ve tepeye yakın daralır. Uzunluğu 4-5 µm, genişliği 2.5-3.5 µm'dir. Çekirdek, sperm başının büyük bir parçasını oluşturur. Ve 23 kromozom içeren transkripsiyona kapalı elektron yoğun bir çekirdek içerir. Baş bölgesini saran hücre zarı boyun ve kuyruk boyunca da hücreyi çevreler. Sperm başının ön 2/3'ünü örten akrozom, iç ve dış akrozomal zarlarla sınırlanmış hidrolitik enzimlerden zengin lizozom benzeri bir yapıdır. Kapasite olmuş spermiumların oosite penetrasyonu esnasında akrozom reaksiyonu gerçekleşir. Dış akrozomal membran hücre zarıyla birleşerek iç akrozomal membran ve akrozomal içeriği dışarıya boşaltılır. Ve bu yolla sperm oosit çevresindeki korona hücrelerini geçerek sıkıca zonaya bağlanır. Spermiumun zona pellusidadaki ZP3 molekülüne bağlanması akrozom reaksiyonunu başlattığı düşünülmektedir. Bu yolla iki hücre zarının birleşmesinden önce spermium oosite sıkı bir şekilde yapışır ve olay başarılı bir fertilizasyonla sonuçlanır. Akrozom, sperm penetrasyonu sırasında ovumun zona pellusidasını sindiren spermin oosite ulaşacağı mesafeyi eriten; böylece fertilizasyonun oluşumu kolaylaştıran enzimler içerir. Akrozomda tanımlanan enzimler hyaluronidaz, nöraminidaz, aril sülfataz ve tripsin benzeri bir proteaz olan akrozin'dir.

KUYRUK

Spermiumun kuyruk bölgesi spermin hareketinden sorumlu olan bölge olup bu hareketi oluşturmak üzere birbirleriyle özel ilişki gösteren mikrotübülüslerden oluşmuş bir yapı gösterir. Bu yapı klasik olarak aksonem olarak bilinir.

Aksonem spermiuma ait 4 bölgeyi de kapsayacak şekilde tüm kuyruk boyunca uzanır. Sperm kuyruğunun motor aygıtını oluşturur. Aksonemin organizasyonu tüm

ökaryotik hücrelerdeki silia ve flagellaya benzer. Bu yapı klasik olarak 9+2 şeklinde formüle edilir, 2 tane santral mikrotübülüsü çevreleyen 9 çift dairesel mikrotübülüsden oluşur. Mikrotübülüs çiftleri A ve B subüniteleri içerir. Mikrotübüllerin temel bileşeni α ve β tübülün proteindir. α ve β tübülün molekülleri bir sıra halinde dizilerek protofilamanları oluşturur. Protofilamanlar da yine uzunlamasına düzenlenmeyle bir araya gelip mikrotübül duvarını şekillendirirler. A tübülü her birisi 13 protofilamentten oluşurken, B tübülü 10-11 protofilamandan oluşur. Bu nedenle A subünitesi enine kesitlerde tam kapalı bir mikrotübül yapısı gösterirken, B subünitesi tam olmayan protofilaman içeriği nedeniyle eninen kesitlerde C harfi şeklinde izlenir. B mikrotübülüsü açık bölgesinden A mikrotübülüne bağlanmıştır. Aksonemin ortasındaki ikili mikrotübülüs 13 mikrofilamandan oluşmuş tam bir yapı gösterir. Bu santral mikrotübül çifti amorf bir iç kılıfla çevrelenmiştir. Periferik mikrotübül çiftleri A subünitesinden iç halkaya doğru uzanan ışınal (radial spoke) bağlarla aksonemin orta kısmına tutunurlar.

Dokuzlu mikrotübül çiftleri dairesel düzende birbirlerine nexin filamanlarıyla bağlanıp sabitlenmişlerdir. Nexin bağları çiftler boyunca 96nm'de bir olmak üzere yerleşim gösterir ve çiftlerin kayması sırasında gelen gücün boylu boyunca düzenlenmesi için elastik elementler olarak görev görürler. Mikrotübülüs çiftlerinin birbirleri üzerinden kayarak hareketini sağlayan mikrotübülle ilişkili motor proteinler iç ve dış dynein kolları şeklinde biçimlenmiştir. Dynein A mikrotübülüsüne bağlanmıştır. Dış dynein kolları A subünitesinden aksonemi çevreleyen hücre zarına doğru, iç dynein kolları ise A tübülüsünden aksonemin ortasına doğru uzanacak şekilde yerleşmişlerdir.

Kuyruğun hareketini sağlayan aksonem dışında bu hareketi düzenleyen, bazen de mikrotübüllerin kaymasından doğan harekete karşı koyup hareketin yönünü ve biçimini değiştiren ilave kılıflar vardır. Spermiyumun orta parçasında dokuzlu mikrotübülüs çiftlerinin dışında bu düzene uyacak bir biçimde dairesel yerleşmiş 9 adet dış yoğun fibril bulunur. Dış yoğun fibriller enine kesitlerde tabanları geniş, uç kısımları ince, kabaca üçgen biçimli yapılar olarak ayırt edilir. Bu düzenleniş bir merkez çevresindeki çiçek yapraklarını andıracak şekildedir. Şöyleki, fibrillerin incelmış uç kısımları mikrotübül çiftlerine doğru uzanırken, genişlemiş yaprak

biçimindeki tabanları periferde doğru açılacak şekilde yerleşmişlerdir. Dış yoğun fibriller orta parçada en kalındır. Aşağıya doğru indikçe kalınlıkları azalır. Orta parçada seyreden dış yoğun fibrillerin 2 adedi orta ve esas parçaların birleştiği yer olan annulus bölgesinde solanır. Geriye kalan 7 dış yoğun fibril esas parça boyunca seyreder.

Dış yoğun fibriller (outer dense fiber), sisteinden yoğun keratin benzeri bir protein içerir ve geniş difülsit bağları ile bağlanmışlardır. Fibriller içerisinde kontraktıl proteinler bulunmaz ancak ATPaz veya Ca bağlayıcı özellikleri bulunabilir. Bu durum motilite kontrolünde rolü olabileceğini gösterir. İnsan spermiyumunda maksimum kıvrılma esas parçanın dış yoğun fibrilin yoğun bölgesinde görülür. Bu sebeple, dış yoğun fibriller esnek olmayan çubuklar gibi davranır. Dış yoğun fiberlerin asimetrik dizilişi aksonemin farklı bölgelerinde zorlanmalar oluşturarak, flagellanın hareketini düzenler.

BOYUN PARÇASI

Boyun parçası 0.5 μm uzunluğunda olup başlıca çekirdek zarına yapışmış proksimal sentriol ile aksonemi oluşturacak olan distal sentriyolü içeren bir bağlantı bölgesidir. Sentriollerin dışında dokuzlu kolon halinde kuyruktaki dış yoğun fibrillerle (outer dense fiber) devam eden fibrillerin yer aldığı bilinmektedir. “Proksimal sentriol” bağlantı parçasında bazal tabakanın hemen distalinde ve kuyruğa dik olacak şekilde yer alır. “Distal sentriol” kuyruğun eksenile uyumludur. Olgun spermiyumlarda genellikle yoktur. “Sitoplazmik damlacık” denilen artık sitoplazmanın küçük bir parçası insan spermiyumunun sıklıkla boyun kısmında bulunur.

ORTA PARÇA

Spermatozoonun orta parçası tüm kuyruk boyunca uzanan yukarıda tanımlanan aksonem olarak bilinen bir öz içerir. Aksonem 2 adet santral mikrotübülüsü çevreleyen 9 çift periferik mikrotübülüsten oluşmuş bir yapıdır. Silyum ile aynı düzenlenime sahiptir. Orta parçada en önemli özellik kuyruğa hareketi sağlayan enerjiyi üreten mitokondriyonun bu parçadaki özel yerleşimidir. Mitokondriyonlar

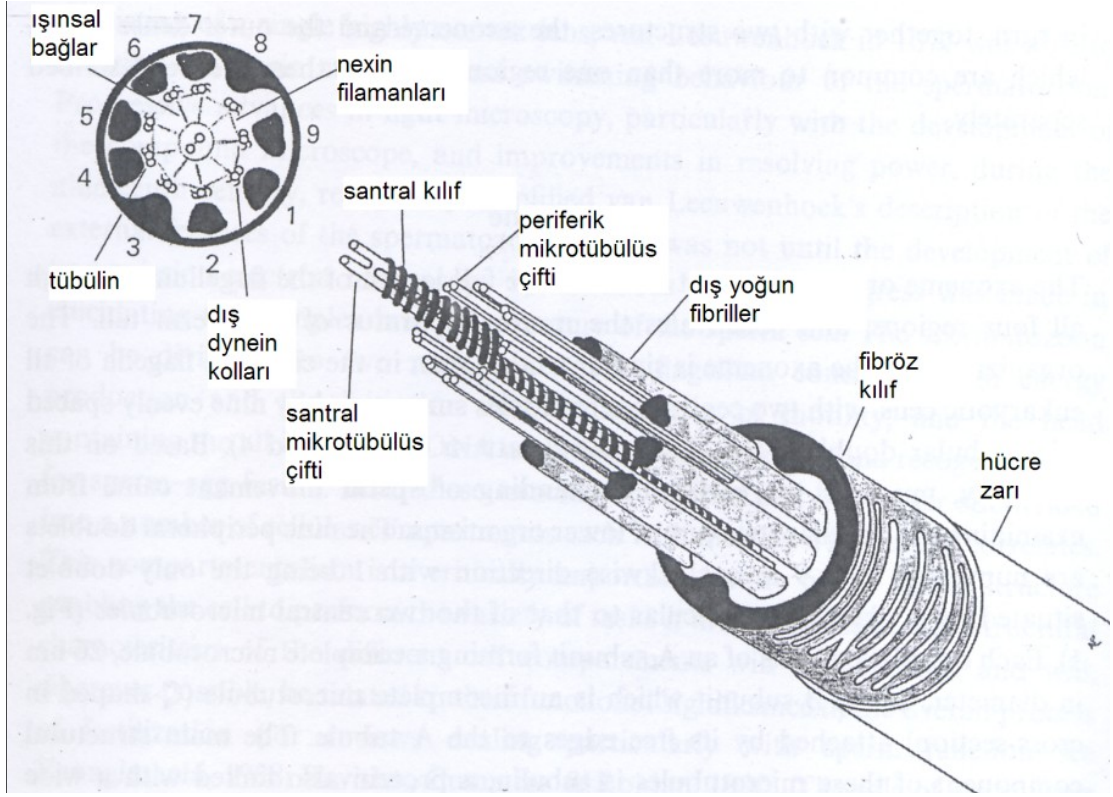
bu bölgede dairesel olarak düzenlenmişlerdir ve dış yoğun fibrillerin çevresinde bir kılıf oluştururlar. Mitokondriyonların bu dizilimi annulusta kesilir. Tüm memeli türlerinde mitokondriyonların dizilimi birbirine benzerdir ancak heliks şeklindeki mitokondrial kılıfın uzunluğu değişir. İnsanda orta parça 5-7 μm uzunlukta ve 1-1.5 μm çaptadır. Mitokondrial kılıfın bittiği annulus bölgesinde hücre zarı sıkıca bu bölgeye tutunmuştur. Zarın annulusa olan bu sıkı kuyruk hareketleri sırasında mitokondriyonların yer değiştirmesini önlediği düşünülmektedir. Orta parçada aksonemi çevreleyen 9 adet dış yoğun fibril bulunmaktadır. Daha önce değinildiği gibi dış yoğun fibrillerden 2 tanesi annulusta son bulur. Kalan 7 tanesi ise esas parçada devam ederler.

ESAS PARÇA

Esas parça 45 μm uzunluğunda ve 0.5 μm çapındadır. Kuyruğun en uzun kısmıdır. Son parçaya yaklaştıkça daralır. Esas kısmın aksonemi orta kısımdaki aksonem ile devam eder. 7 adet dış yoğun fibrille ile çevrelenmiş aksonem bu bölgeye özgü olarak fibröz kılıf ile sarılıdır. Fibröz kılıf esas parçanın dorsalinde ve ventralinde, dorsal ve ventral longitudinal kolonlar oluşturur. Sperm kuyruğunun uzunluğuna paralel düzenlenmiş bu kolonlar düzenli aralıklarla seyreden dairesel seyirli bağlayıcı parçalarla birbirlerine bağlanmıştır. Dorsal fibröz kılıfın dorsal ve ventral kılıfları aksoneme doğru ilerleyerek kuyruğun bu bölgesini 2 asimetrik parçaya ayırır. Bu parçaların distal bölümünde 3 adet dış yoğun fibril ve buna karşı gelen proksimal parçada ise 4 adet dış yoğun fibril yerleşmiştir. Fibröz kılıfın işlevi elastik bir korse gibi kuyruk hareketini kontrol ederek dış yoğun fibrillerle benzer ve tamamlayıcı bir görev üstlenmektir. Patolojik sperm örneklerinde fibröz kılıfta görülen anomaliler ve bu yapıdaki bozukluklar, motiliteyi etkilemekte ve kılıfın motilite paterni için önemine işaret etmektedir.

SON PARÇA

Esas parçanın distal ucunda fibröz kılıf ortadan kalkarak kuyruk son parçayla devam eder. Bu parça hücre zarıyla çevrelenmiş aksonemden oluşur. 5-7 μm arası uzunluktadır ve sadece kuyruk membranıyla kaplı aksonemi içerir. Bu yapı klasik silyum aksonemiyle büyük benzerlik gösterir.



Resim 5. Bloom and Fawcett. A Textbook Of Histology'den alınmıştır (Twelfth Edition, 1994).

ERKEK GENİTAL KANALININ HORMONAL KONTROLÜ

FSH ve LH, sırasıyla Sertoli ve Leydig hücrelerinin fonksiyonunu düzenlerler. FSH, Sertoli hücrelerinden inhibin ve aktivin üretimini başlatır. İnhibin, hipotalamus ve hipofizyal FSH salınımı üzerine negatif feedback etkisi yapar. Aktivin ise ters bir etkiye sahiptir.

Hipofizin deneysel çıkarılması (hipofizektomi) ardından spermatogenezin duraklamasının gösterildiği üzere, FSH ve LH spermatogenik işlevin vazgeçilmez düzenleyicileridir.

Androjen bağlayıcı protein'in (ABP) Sertoli hücreleri tarafından sentez ve salınımı FSH tarafından uyarılır. ABP, androjenleri (testosteron veya dihidrotestosteron) bağlar ve ABP-androjen kompleksi gelişen spermatogenik hücrelerin çevresinde yüksek androjen seviyelerini sağlar. Ayrıca yine bu kompleks yüksek yoğunlukta androjen bulunduran epididimise de taşınır.

Erişkin testisinde Sertoli hücreleri 3 ana salgısal protein üretir:

- İnhibin
- Aktivin
- Androjen bağlayıcı protein
- Fetal Sertoli hücreleri Müllerian inhibe edici madde (MIS) sentezler ve salgılar.

LH, Leydig hücrelerinde testosteron sentezini uyarır. Hem testosteron hem de 5α -redüktaz ile testosteronun indirgenme metaboliti olan dihidrotestosteron, aynı anda androjen reseptörüne tutunur.

Testosteron, LH salınımına negatif feedback etkisi gösterir. Kanda yüksek testosteron ön hipofizden LH salınımını engeller. Testosteron seminal veziküllerin fonksiyonunu uyarırken, dihidrotestosteron prostat bezine etki eder.

MATERYAL VE METOD

Semen örneklerinin alınması ve hazırlanması:

Normal normospermik fertil erkeklerde ve varikoselli hastalarda sperm yüzey antijenlerinin incelenmesi amacıyla Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Ana Bilim Dalı'nda varikozel tanısı almış, ameliyat öncesi sperm analizi için androloji laboratuvarına başvuran hastalardan alınan semen örneklerinin kalan kısmı varikozel grubu için materyal olarak kullanıldı. Normal grup için ise 1 sene içinde fertil olduğunu kanıtlamış erkeklerden semen örneği alındı. Hastaların yaşları 18-47 yaş arasında değişmekteydi. Çalışmamız Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi, Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (proje no: FON 07/1, Karar no: FON 07/1-31, Toplantı no: 2007/03).

3-5 günlük cinsel perhiz sonrası masturbasyon yolu ile alınan semen örnekleri 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde 30 dakika bekletildi. Ardından viskozite, likefaksiyon ve hareket açısından değerlendirildi. 1 ml semen örneği 1 ml pure sperm ile 1500 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp kalan örnek pure sperm ile dilue edildi. Bu şekilde elde edilen yıkanmış sperm örneğinden jelatinle kaplanmış lam üzerine yayma yapıldı. Oda ısısında 30 dakika -1 saat kurutuldu. Hazırlanan örnekler aynı gün içinde indirekt immunfloresan yöntemi ile boyandı.

Kullanılan malzeme ve solüsyonların hazırlanması:

- Jelatinli lam
- Fosfat tampon solüsyonu (PBS)
- Fosfat tampon solüsyonu-sığır serum albumini (PBS-BSA)
- Primer antikor
- Sekonder antikor
- Propidyum iyodür

Jelatinli lam hazırlanması:

- Jelatin powder (Sigma, G-6650)
5 gr

- Chrom (III)-Koliumsulfat($\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Merck, K.N: K-2830535)
0.5 gr
- Distile su
1000ml

Belirtilen miktarlarda jelatin tozu ve Chrom alum sulphate 1000ml distile su içinde karıştırılarak eritildikten sonra ısıtıldı. Kaynadıktan sonra filtre kağıdı ile süzüldü. Rodajlı lamalar bir asansöre dizildi ve yarı yarıya %70'lik alkol ve eter karışımından geçirilerek temizlendi, kurutuldu. Kuruduktan sonra rodajlı lamalar soğumuş olan jelatin solüsyonundan geçirildi ve tekrar kurumaya bırakıldı.

Fosfat tampon solüsyonu (PBS) hazırlanması:

Solüsyon I :

Sodium dihydrogen phosphatemonohydrat ($\text{Na}^+\text{PC}^{\text{f}}\text{O}$) (Merck, K.N:3090)	13.7 gr.
Sodium chloride (NaCl) (Merck, K.N: 6408)	87.66 gr.
Distile su	1000 ml.

Solüsyon II :

Di Sodyum hidrojen orthophosphate dihydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (BDH Chemicals, K.N: 30157)	71.2 gr.
Sodium chloride (NaCl) (Merck, K.N: 6408)	350.64gr
Distile su	4000ml

Stok solüsyonu

Hazırlanan solüsyon I ve solüsyon II ayrı ayrı süzüldükten sonra 4000 ml. solüsyon II + 500 ml. solüsyon I karıştırılarak bir pHmetre yardımı ile solüsyon I veya II eklenerek stok solüsyonun pH'sı 6,9'a ayarlandı.

Kullanma solüsyonu

Stok solüsyonu 1/10 oranında distile su ile sulandırıldı. Yine aynı şekilde solüsyon I veya II eklenerek kullanma solüsyonun pH'sı 7.4 olarak ayarlandı.

Fosfat tampon solüsyonu-sığır serum albumini (PBS-BSA) hazırlanması:

Hazırlanan fosfat tampon solüsyonu (PBS pH:7.4) içine %22'lik BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma K.N: A-7034) temiz bir enjektörle eklenerek hazırlandı.

Primer antikorlar:

Çalışmada kullanılan primer antikorlar VIII.-Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshop'tan (2005) ve ticari olarak sağlandı. Bu antikorlar PBS-BSA karışımı ile verilen oranlarda sulandırılarak kullanıldı.

Özgüllük	Klon adı	Kaynağı	İzotipi	Sulandırma oranı
80396	-	-	msIgG	1:20
CD46	122-2	Chemicon	msIgG1	1:100
CD52	FL-61	Santa Cruz	msIgG1	1:50
CD63	RFAC4	Chemicon	msIgG1	1:100
CD55	BRIC216	Chemicon	msIgG1	1:100
CD173	MEM-195	Horejsi	msIgG1	1:100
LeY (CD174)	A70-C/C8	Karsten	msIgM	1:100
CD14	B-A8	Lab Vision	mIgG1	1:40
CD44	DF1485	Dakocytomation	mIgG1	1:40
CD155	D171	Lab Vision	mIgG1	1:40

Sekonder antikör:

- Rabbit anti-mouse IgG-FITC (Dako F0261)
- Goat ani-rabbit IgG-FITC (Chemicon AP132F)
- PBS-BSA
- NHS

Anti-mouse IgG-FITC (Dako F0261) hazırlanmış olan PBS-BSA ile 1:40 oranında sulandırıldı. Bu solusyona 1:100 oranında NHS eklendi. CD52 dışındaki tüm primer antikorlar için hazırlanmış bu sekonder antikör kullanıldı. CD52 için ise Anti-rabbit IgG-FITC (Chemicon AP132F) 1:50 oranında PBS-BSA ile sulandırıldı. Bu solusyona 1:100 oranında NHS eklendi. CD52 için bu hazırlanan sekonder antikör kullanıldı.

Propidyum İyodür hazırlanışı:

Propidyum iyodid (Oncor Propidium iodide/Antifade)

1 µlt

Distile su

5000 µlt

Yukarıda belirtilen reçeteye uygun olarak 1 µlt Propidyum iyodür, 5000 µlt distile suya karıştırılarak vortekslendi ve çekirdek boyası olarak kullanıldı.

İndirekt immunfloresan yöntemi aşağıdaki gibi uygulandı (26).

1. Semen yayması oda ısısında kurumaya bırakıldı. (30dk-1 saat)
2. Yaymalar 10 dk metanolde tespit edildi. Ardından 30 dk oda sıcaklığında kurutuldu.
3. Kuruduktan sonra semen yaymaların etrafı Dakopenle sınırlandırıldı.
4. Uygun şekilde dilüsyonu yapılmış primer antikor damlatıldı. Oda ısısında nemli ortamda (üzeri kapakla kapatılmış, ıslatılmış gazlı bez içeren nemli küvet içinde) 1 saat inkübe edildi. (Gerekirse bu şekilde +4 C’de bir gece bekletilebilir.)
5. Primer antikor ile 1 saat inkübasyon sonrası lamalar PBS yıkama solusyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı.
6. Uygun şekilde hazırlanan sekonder antikor yaymaların üzerine damlatıldı ve 30 dakika süreyle nemli ortamda karanlıkta inkübe edildi.
7. Tekrar şalelere dizilen lamalar, PBS yıkama solüsyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı.
8. Uygun şekilde hazırlanan propidyum iyodür yaymaların üzerine damlatıldı.
9. Fazla sıvı alındıktan sonra yaymaların üzeri lamel ile kapatıldı.

Kontrol boyaması:

Kontrol amacıyla boyanan kesitlerde, primer antikor basamağı atlanarak, izleyen basamaklar aynen uygulandı.

Değerlendirme:

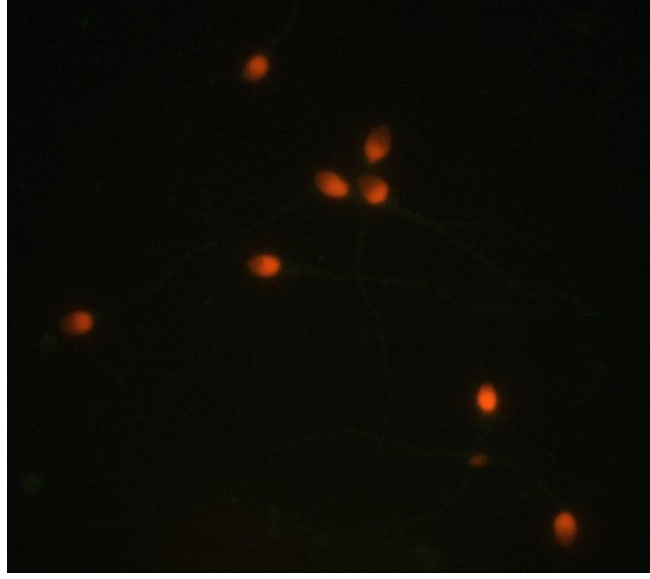
Semen (sperm) yayması ile hazırlanan ve indirekt immün floresan yöntemi kullanılarak immün işaretleme yapılan sperm örnekleri aynı gün veya ertesi gün içinde Leica DMR-reflection contrast mikroskop-RCM (Wetzlar-Almanya) ile X100 büyütmede değerlendirildi ve DC200 dijital kamera ile fotoğraflandı.

BULGULAR

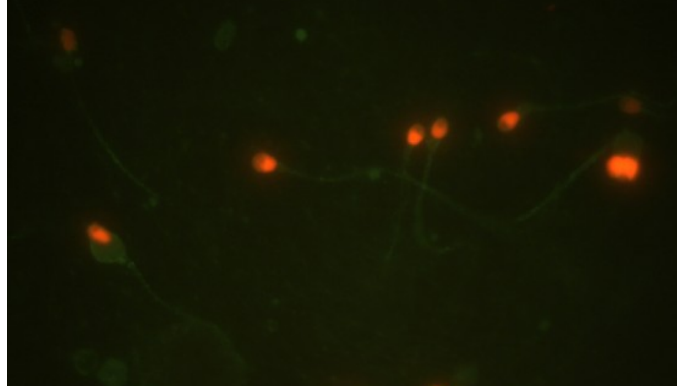
Yapılan bu çalışmaya ilişkin bulgular normospermik fertil erkeklerden elde edilen spermiyumların ve bu hücreye ilişkin çeşitli aktif bölgelerin antijenik özelliklerini ortaya koymaya yöneliktir. Bu antijenik özelliklere ait bulgularımızı desteklemek amacıyla varikoselli hastalardan elde edilen sperm örnekleri de çalışmaya dahil edilmiş, bu yolla elde edilen veriler normal fenotipteki bulgularımıza destek sağlaması için kullanılmıştır. Ancak varikoselli hastalardan elde edilen bulguların da etyolojisi henüz açıklığa kavuşmamış bu patolojiye destek olabilecek nitelikte olduğu görülmüştür. Kullandığımız monoklonal antikorların bir kısmı spermiyumla aktivasyonu daha evvel gösterilmiş; bir grubu ise kimyasal yapısı ve bağladığı ligandı açısından spermiyumla immunreaksiyon vereceğini düşündüğümüz antikorlardır.

80396

Normal normospermik fertil erkeklerden elde edilen spermiyumlarda immun reaksiyonun homojen ve hafif olarak tüm kuyruk boyunca olduğu saptandı. Varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde ise kuyruktaki immun boyanma yoğunluğunun önemli ölçüde arttığı, yer yer granüler yer yer de kuyruk boyunca çizgisel bir dağılım gösterdiği izlendi. Boyanma yoğunluğunun bir grup spermiyumda boyun bölgesinde yoğun olduğu dikkati çekti. Varikoselli hastalarda alınan örneklerde 2 ya da 3 başlı spermiyumların izlendiği dikkati çekti. Bu yapılanmanın çekirdek fragmentasyonu ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Kuyruğun spermiyum başına bağlandığı bölgede artık sitoplazma olabilecek veya balonlaşmış olağan dışı bir yapının sıklıkla gözlemlendiği saptandı. Varikozel grubundaki artmış kuyruk immun boyanmanın kuyruğun sperm başına bağlandığı bölgedeki bozukluk spermiyogenezis esnasında sitoplazmik artığın çok abartılı bir biçimde gerçekleştiğini düşündürür yönde idi. Bu türden bozuklukların sperm başıyla hareketli kuyruğun senkronize bir biçimde hareketini engelleyecek bir bağlantı oluşturabileceği düşünüldü.

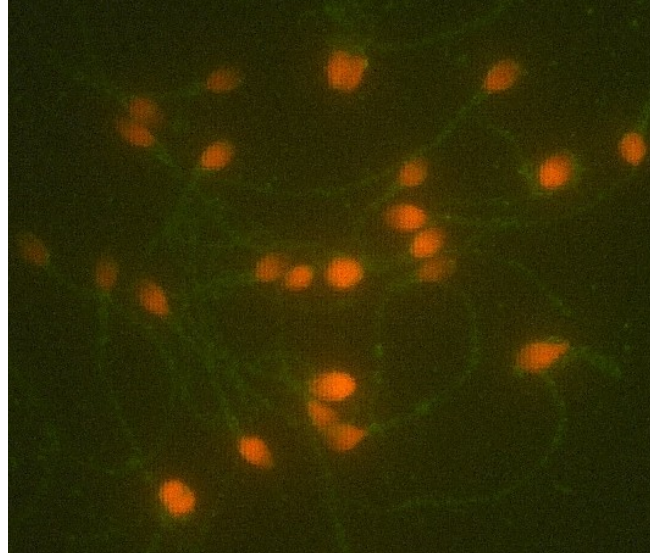


Şekil 1a



Şekil 1b

Şekil 1a ve 1b: 80396 monoklonal antikoru ile normal normospermik fertil erkeklerden elde edilen spermiyumlarda, immun reaksiyonun homojen ve hafif olarak tüm kuyruk boyunca oluştuğu saptandı. İmmunofloresan X100.

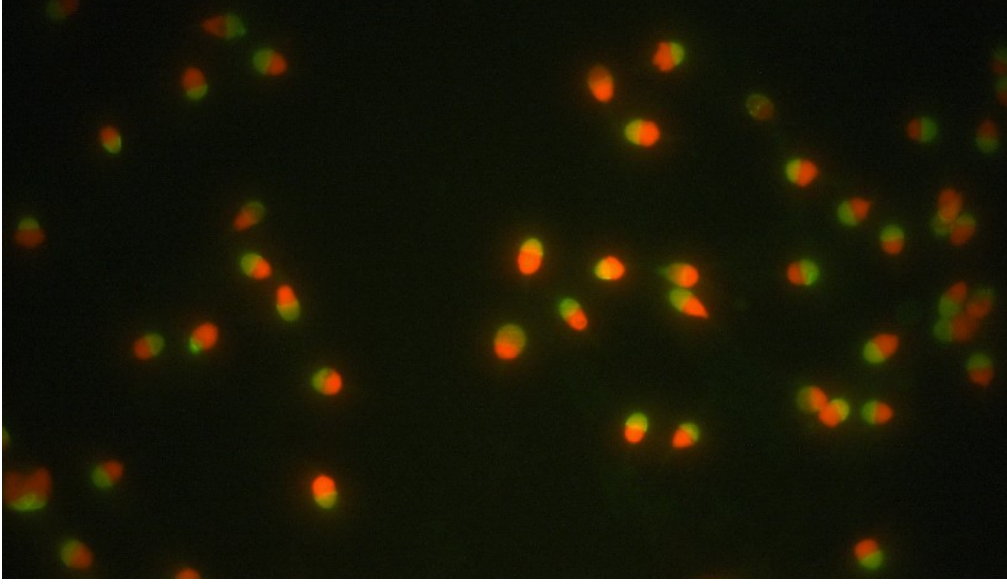


Şekil 1c

Şekil 1c: 80396 monoklonal antikoru ile varikoselli hastalardan elde edilen spermiyumlarda kuyruktaki immun boyanma yoğunluğunun önemli ölçüde arttığı, yer yer granüler yer yer de kuyruk boyunca çizgisel bir dağılım gösterdiği izlendi. Boyanma yoğunluğunun bir grup spermde boyun bölgesinde yoğun olduğu dikkati çekti. Boya: immunofloresan X100.

CD46

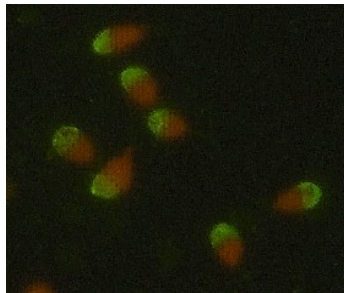
Normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda yapılan immun boyanmanın homojen olarak akrozomu ilgilendirdiği gözlemlendi. İmmun reaktivitenin arka akrozomal yani, ekvatoryal bölgeyi de kapsadığı dikkati çekti. İmmun reaksiyon veren akrozom çekirdeğin ön kısmını çevrelemiş, yarı dairesel bir yapı olarak dikkati çekti. Varikosel hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinin immun boyamasında ise akrozom bölgesindeki boyanmanın normal hasta grubuna göre önemli ölçüde değiştiği saptandı. Bu değişiklik akrozomal bölgedeki immun reaktivitenin iri granülleri ilgilendirecek biçimdeki tipik heterojen granüler boyanmaydı. Akrozomun tepesini saran yarım ay biçimindeki immun reaktivitenin ise yayma preparatı olması nedeniyle spermiyum başının arka bölgesindeki akrozomal boyanmanın bir yansıması olduğu düşünüldü. Hem varikosel hem varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde kuyruk bölgesinde boyanma saptanmadı.



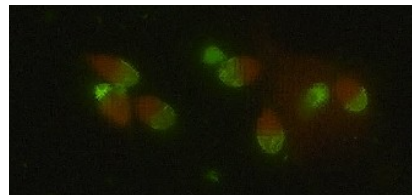
Şekil 2a.

Şekil 2a: Anti-CD46 monoklonal antikoru ile normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda yapılan immun boyanmanın homojen olarak akrozomu ilgilendirdiği gözlemlendi. İmmun reaktivitenin arka akrozomal yani, ekvatoryal bölgeyi de kapsadığı dikkati çekti. İmmun reaksiyon veren akrozom çekirdeğin ön kısmını çevrelemiş, yarı dairesel bir yapı olarak dikkati çekti.

Boya: İmmunofloresans X100



Şekil 2b



Şekil 2c.

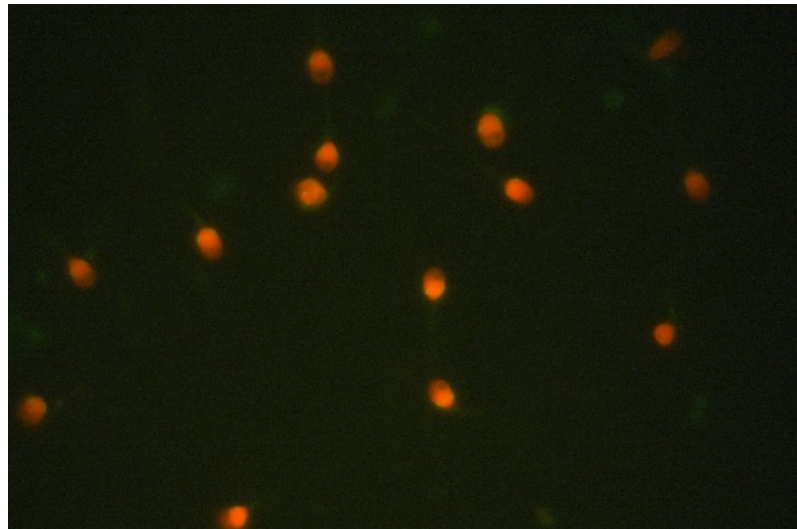
Şekil 2b ve 2c: Anti-CD46 monoklonal antikoru ile varikosel hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinin immun boyamasında ise akrozomal bölgedeki immun reaktivitenin iri granülleri ilgilendirecek biçimdeki tipik heterojen granüler şekilde olduğu gözlenmektedir.

Boya: İmmunofloresan X100

CD52

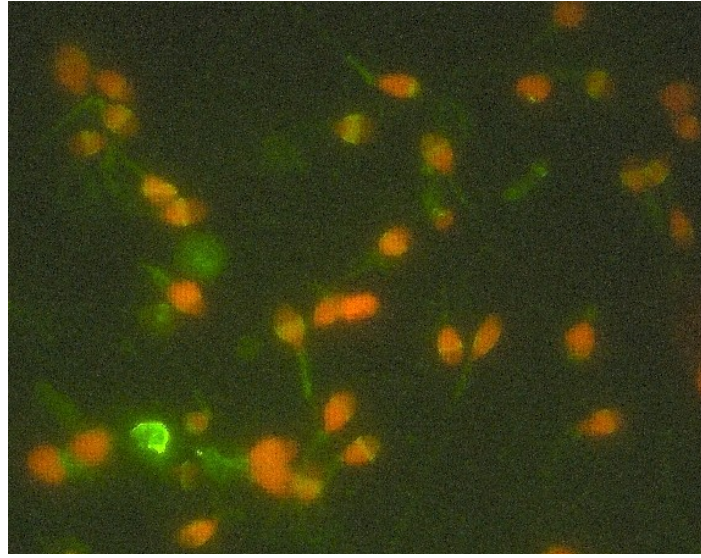
Normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermelerde yapılan immun boyamada kuyrukta homojen boyanma izlendi ancak kuyruktaki boyanmanın da çok az sayıda hücreyi ilgilendirdiği dikkati çekti. Varikoselli hastalardan elde edilen sperm örneklerinde ise kuyruktaki boyanmanın belirgin olduğu ve özellikle kuyruğun orta parçasını ilgilendirdiği gözlemlendi. Ayrıca immun reaktivitenin ekvatoryal segmenti de ilgilendirdiği belirgin olarak izlendi. Çok hafif olarak immun reaktivitenin akrozomal bölgeyi de ilgilendirdiği, ancak arka akrozomal bölge ve kuyruğun orta parçasındaki immun reaktivitenin belirgin olduğu dikkati çekti.

Ekvatorial segment spermiyumun oositle ilk ilişki kurduğu kompartmandır. İmmun reaktivitenin sadece varikoselli hasalardan elde edilen sperm örneklerinde görülmesi varikosele bağlı infertilitede değerlendirilmesi gereken bir gözlemdir. Ancak bu görüşün ileri çalışmalarıyla farklı gruplardan elde edilen spermiyum örnekleriyle yapılan çalışmalarla yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir.



Şekil 3a.

Şekil 3a: Anti-CD52 monoklonal antikoru ile normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda yapılan immun boyamada kuyrukta homojen boyanma izlendi; ancak bunun çok az sayıda hücreyi ilgilendirdiği dikkati çekti. Boya: İmmunofloresan X100



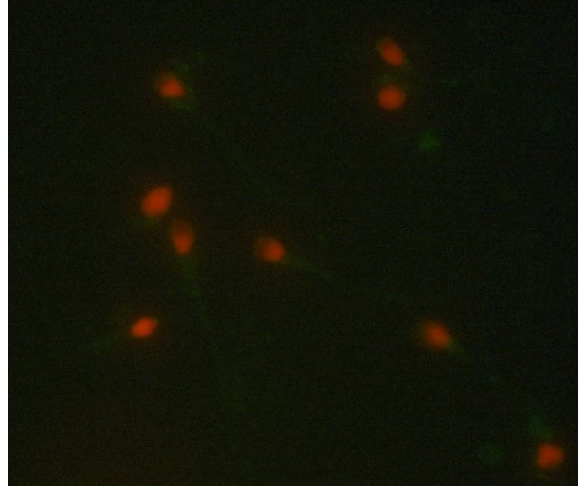
Şekil 3b.

Şekil 3b: Anti-CD52 monoklonal antikoru ile varikoselli hastalardan elde edilen spermiyumlarda ise kuyruktaki immun boyanmanın belirgin ve özellikle kuyruğun orta parçasını ilgilendirdiği gözlemlendi. Ayrıca immun reaktivitenin ekvatoryal segmenti de ilgilendirdiği belirgin olarak izlendi. Çok hafif olarak immun reaktivitenin akrozomal bölgeyi de ilgilendirdiği, ancak arka akrozomal bölge ve kuyruğun orta parçasındaki immun reaktivitenin belirgin olduğu dikkati çekti. Boya: İmmunofloresan X100

CD63

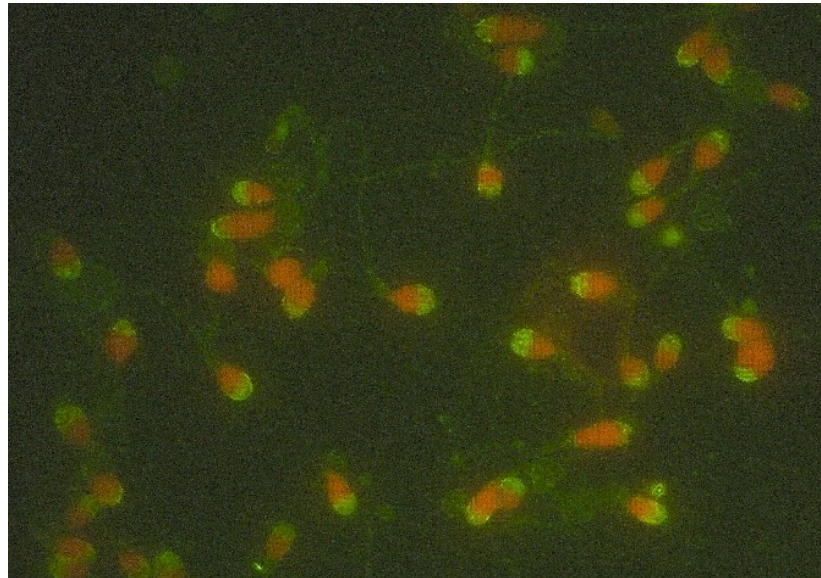
Normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda yapılan immun boyamada kuyrukta homojen yoğunluğu az bir boyanma izlendi. Varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde ise akrozomal bölgenin immun reaktivitesi belirgindi. Bu immun reaktivite CD46 'nın immun reaktivitesine

benzer tarzda granüler bir dağılım göstermekteydi. İmmun boyamanın akrozomun tepesini saran yarım ay biçimindeki dağılımı yine CD46'ya büyük bir benzerlik gösterdi. Ayrıca normal normospermik fertil erkek hastalarda gözlenen kuyruktaki immün reaktivitenin varikoselli hastalardan elde edilen örneklerde de belirgin olduğu dikkati çekti.



Şekil 4a

Şekil 4a: Anti-CD63 monoklonal antikoru ile normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda yapılan immün boyanmada kuyrukta homojen ve yoğunluğu az bir boyanma izlenmektedir. Boya: İmmunofloresan X100



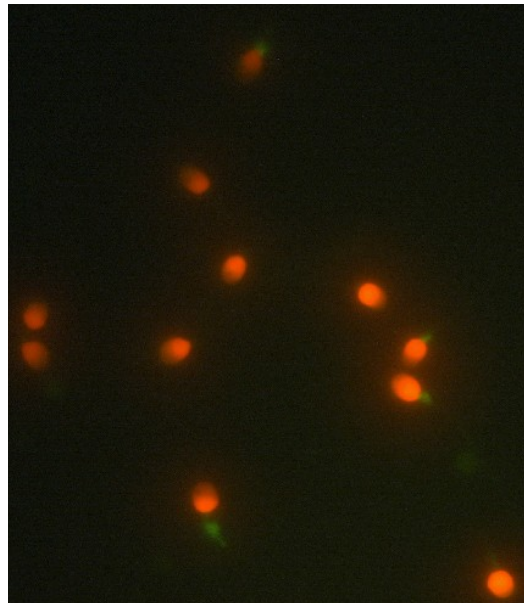
Şekil 4b

Şekil 4b: Anti-CD63 monoklonal antikoru ile varikoselli hastalardan elde edilen spermiyumlarda akrozomal bölgenin immun reaktivitesi belirgindi ve bu immun reaktivitenin CD46 'nın immun reaktivitesine benzer tarzda granüler bir dağılım göstermekteydi. Normal normospermik fertil erkek hastalarda gözlenen kuyruktaki immun reaktivitenin varikoselli hastalardan elde edilen örneklerde de belirgin olduğu dikkati çekti. Boya: İmmunofloresan X100

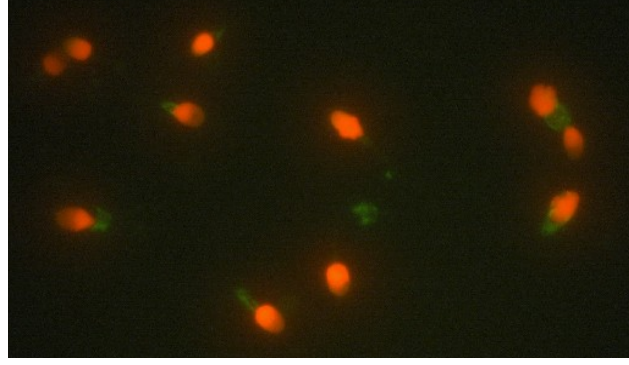
CD55

Normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda yapılan immun boyanmada boyun ve orta parçanın üst bölgesinde çok belirgin immun reaksiyon olduğu dikkati çekti. Varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde ise normal grupta görülmeyen belirgin akrozomal immun reaktivite gözlemlendi. Akrozomdaki bu boyanmanın seyrek olarak granüler bir patern gösterdiği saptandı. Akrozomal boyanmanın yer yer arka akrozomal bölgeyi yani ekvatoryal segmenti de ilgilendirdiği gözlemlendi.

Hem normal grupta hem de varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde kuyruğun sadece boyun bölgesinin çok belirgin bir şekilde immun reaktivite verdiği, kuyruğun geri kalan kısmında ise immun reaktivitenin zayıf olduğu gözlemlendi.

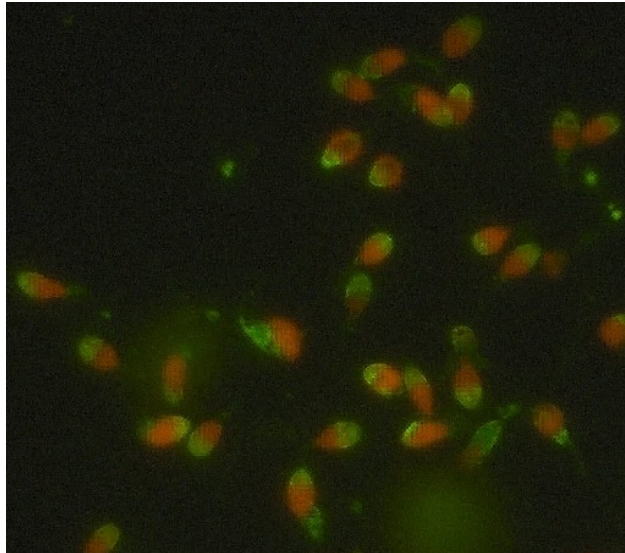


Şekil 5a

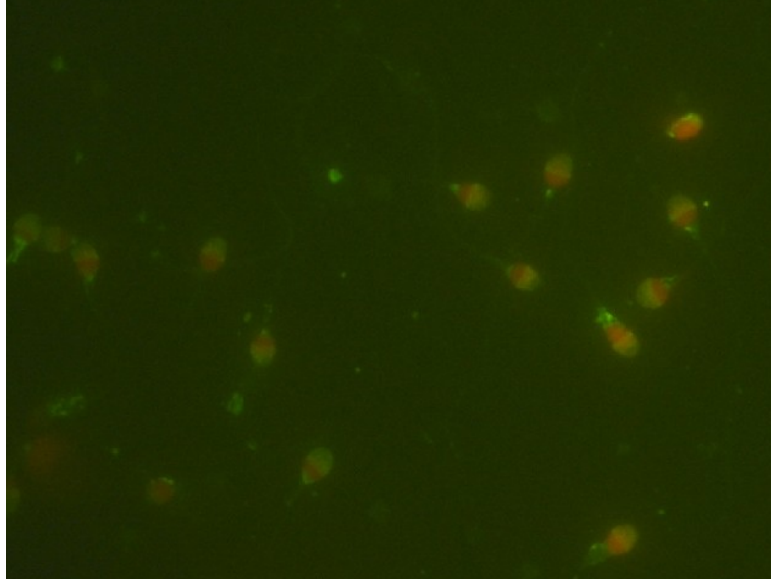


Şekil 5b

Şekil 5a ve 5b: Anti-CD55 monoklonal antikoru ile normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda yapılan immun boyanmada boyun ve orta parçanın üst bölgesinde çok belirgin immun reaksiyon olduğu dikkati çekti.
Boya: İmmunofloresan X100



Şekil 5c



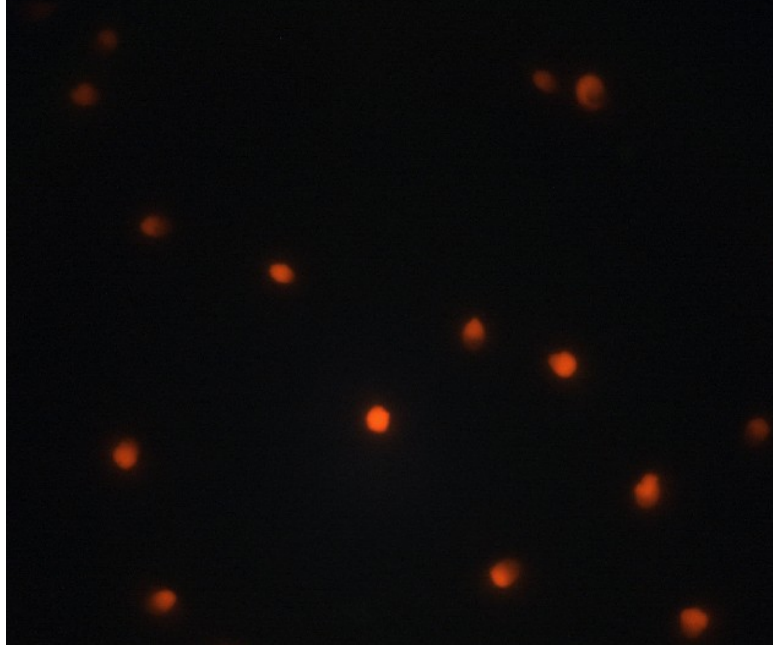
Şekil 5d

Şekil 5c ve 5d: Anti-CD55 monoklonal antikoru ile varikoselli hastalardan elde edilen spermiyumlarda ise belirgin akrozomal immun reaktivite gözlemlendi. Akrozomal boyanmanın yer yer arka akrozomal bölgeyi yani ekvatoryal segmenti de ilgilendirdiği gözlemlendi. Boya: İmmunofloresan X100

CD173

CD173 antijeni için yapılan immun boyamada normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde spermiyumların hiçbir bölgesinde immun reaksiyon görülmediği saptandı.

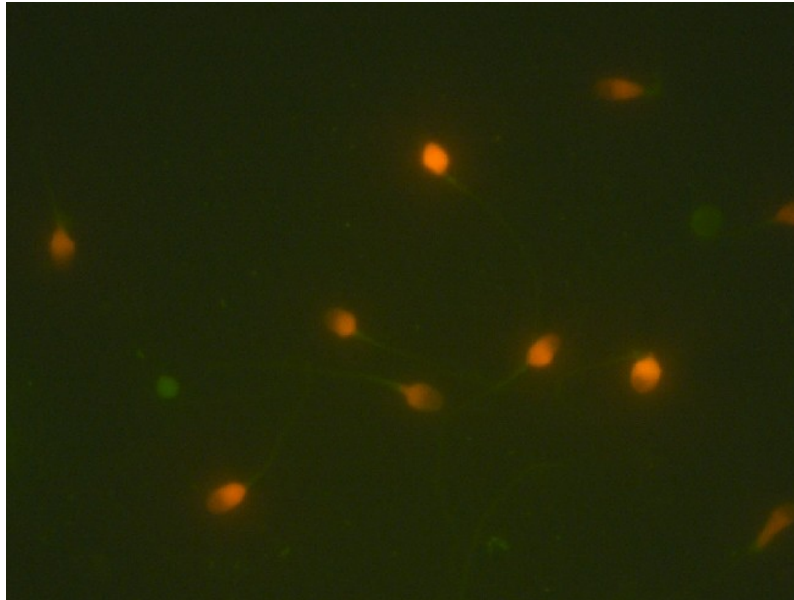
Varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde yapılan immun boyamada ise antijenin çok belirgin bir şekilde kuyruğun tüm segmentleri boyunca eksprese olduğu gözlemlendi. Ayrıca immun boyanmanın ekvatoryal segmenti de ilgilendirdiği dikkati çekti.



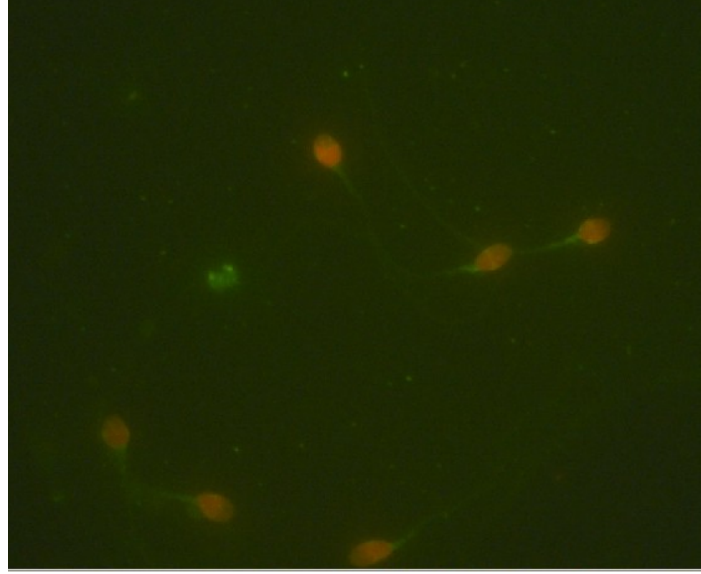
Şekil 6a

Şekil 6a: Anti-CD173 monoklonal antikoru ile yapılan immun boyamada normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumların hiçbir bölgesinde immun reaksiyon görülmediği saptandı.

Boya: İmmunofloresan X100



Şekil 6b



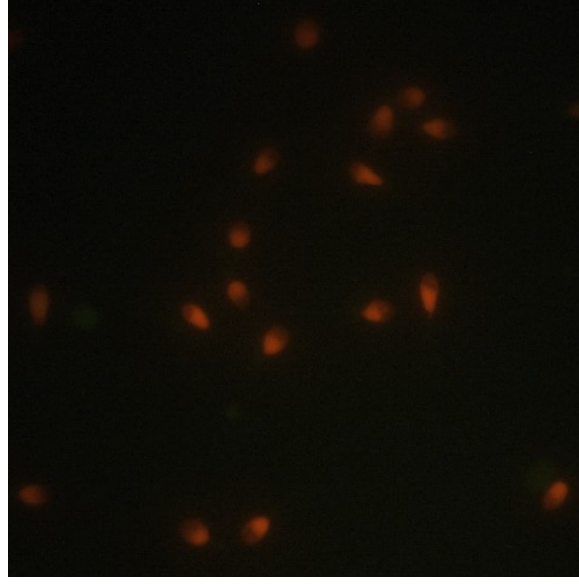
Şekil 6c

Şekil 6b ve 6c: Anti-CD173 monoklonal antikoru ile varikoselli hastalardan elde edilen spermiyumlarda yapılan immun boyamada antijenin çok belirgin bir şekilde kuyruğun tüm segmentleri boyunca eksprese olduğu gözlemlendi. Ayrıca immun boyanmanın ekvatoryal segmenti de ilgilendirdiği dikkati çekti.

Boya: İmmunofloresan X100

LeY (LEWIS Y/CD174)

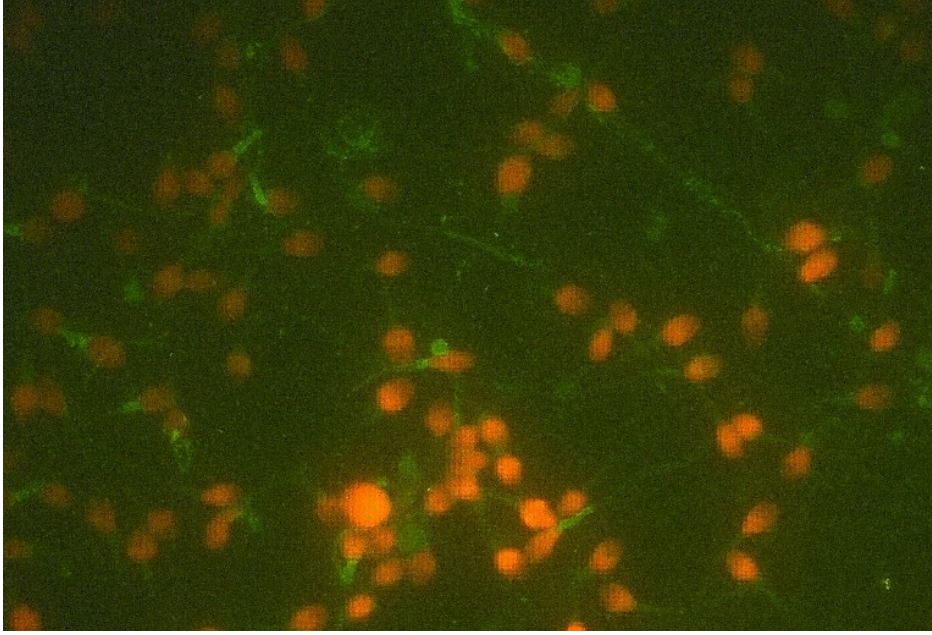
LeY antijeni için yapılan immun boyamada normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda immun reaksiyon izlenmedi. Varikoselli hastalardan alınan spermiyum örneklerinde ise tüm gruplarda boyun ve kuyruğun orta parçasını ilgilendiren immün boyanma dikkati çekti.



Şekil 7a

Şekil 7a: Anti-CD174 monoklonal antikoru ile yapılan immün boyamada normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda immün reaksiyon izlenmedi.

Boya: İmmunofloresan X100



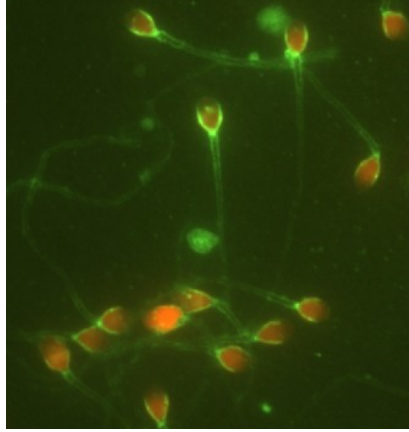
Şekil 7b.

Şekil 7b: Anti-CD174 monoklonal antikoru ile varikoselli hastalardan alınan spermiyumlarla yapılan immün boyamada ise tüm gruplarda kuyrukta belirgin bir boyanma izlendi. İmmün reaktivitenin özellikle boyun ve orta parça bölgesini ilgilendirdiği dikkati çekti. Boya: İmmunofloresan X100

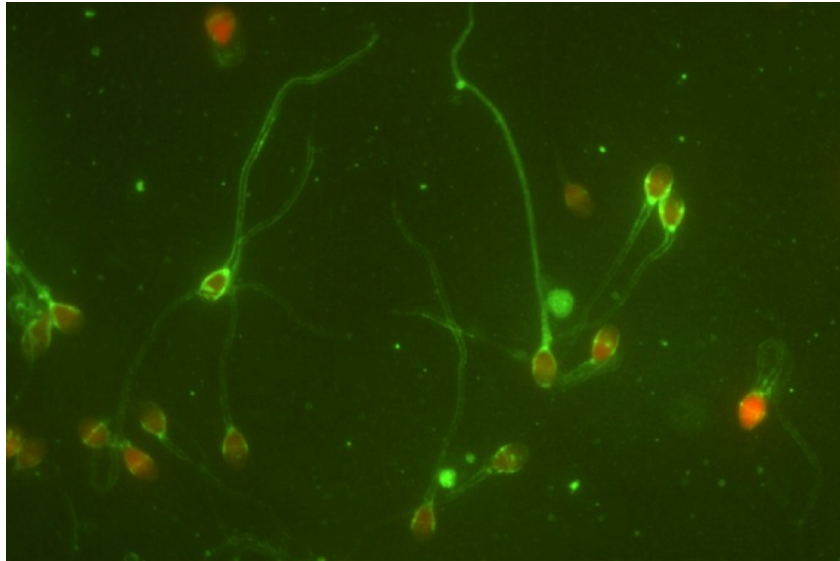
CD14

CD14 antijeni için yapılan immün boyamada immün reaktivitenin normal normospermik fertil erkek hastalarda ve varikosel hastalarında değişiklik göstermediği, ancak bu antijenin spermiyumda çok özgün bir ekspresyon gösterdiği dikkati çekti. İmmün reaktivite her iki grup spermiyum örneğinde de akrozom çevresi dışında kalan tüm yapıyı çizgisel tarzda işaretleyecek şekilde idi. Kuyruk bölgesinde ise çizgisel tarzda birbirine paralel iki hat şeklindeki immün reaktivite her iki grup hasta örneğinde de izlendi. Kuyruğun sperm başına bağlandığı

bölgeden başlayarak, sperm başını alttan saran “V” harfi biçimindeki immün reaktivite dikkati çekti. “V” harfi kollarının her iki tarafta sonlandığı bölgede yer alan noktasal tarzdaki immün reaktivite belirgindi. Bu noktasal reaksiyonun spermiyum başının görüntü sahasına girmeyen arka bölümünde de bulunan “V” harfi şeklindeki boyanmanın yansıması olduğu düşünüldü.



Şekil 8a

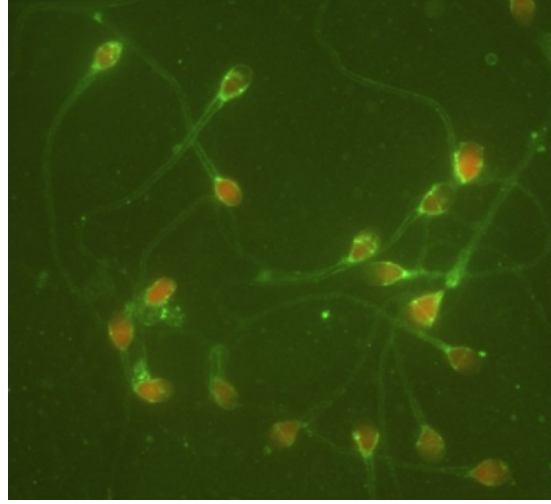


Şekil 8b

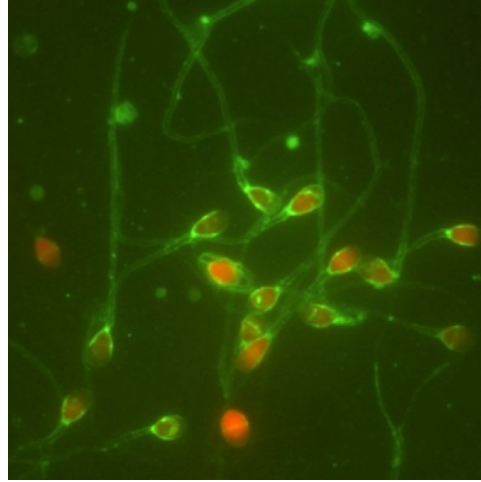
Şekil 8a ve 8b: Anti-CD14 monoklonal antikor ile yapılan immün boyamada immün reaktivitenin normal normospermik fertil erkek hastaların spermiyumlarında değişiklik göstermediği, ancak bu antijenin spermiyumda çok özgün bir ekspresyon gösterdiği dikkati çekti. İmmün reaktivite akrozom çevresi dışında kalan tüm yapıyı çizgisel tarzda işaretleyecek şekildeydi. Kuyruk bölgesinde ise çizgisel tarzda birbirine paralel iki hat şeklindeki immün reaktivite izlendi. Kuyruğun spermiyum

başına bağlandığı bölgeden başlayarak, sperm başını alttan saran “V” harfi biçimindeki immün reaktivite dikkati çekti.

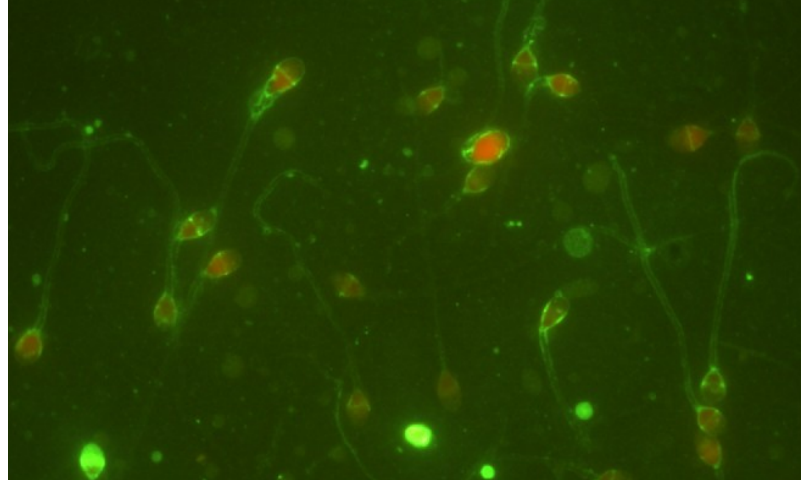
Boya: İmmunofloresan X100



Şekil 8c



Şekil 8d

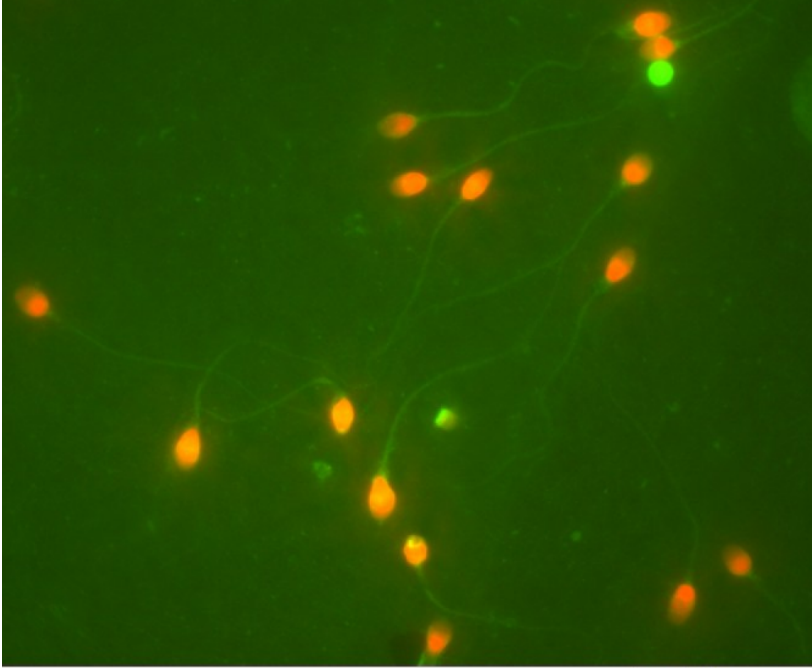


Şekil 8e

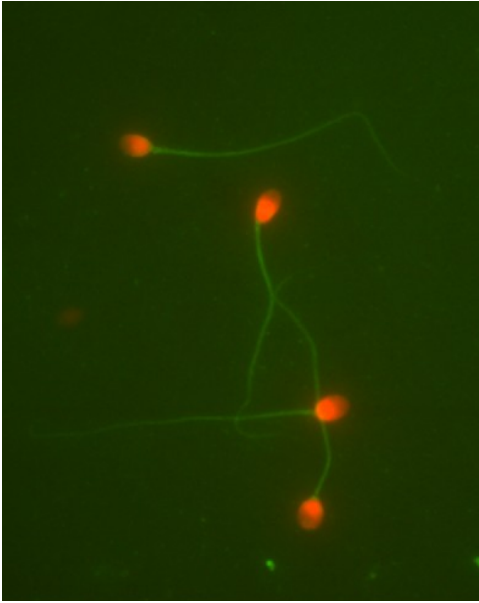
Şekil 8c, 8d ve 8e: Anti-CD14 monoklonal antikor ile yapılan immun boyamada immun reaktivitenin varikosel hastalarının spermiyumlarında değişiklik göstermediği gözlemlendi. Boya: İmmunofloresan X100

CD44

CD44 antijeni ile yapılan immun boyamada hem normal normospermik fertil erkek hastalardan hem de varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde immun reaksiyonlarda bir farklılık olmadığı görüldü. İmmun reaktivitenin her iki örnekte de sperm kuyruğunun tüm uzunluğu boyunca oluştuğu saptandı.



Şekil 9a

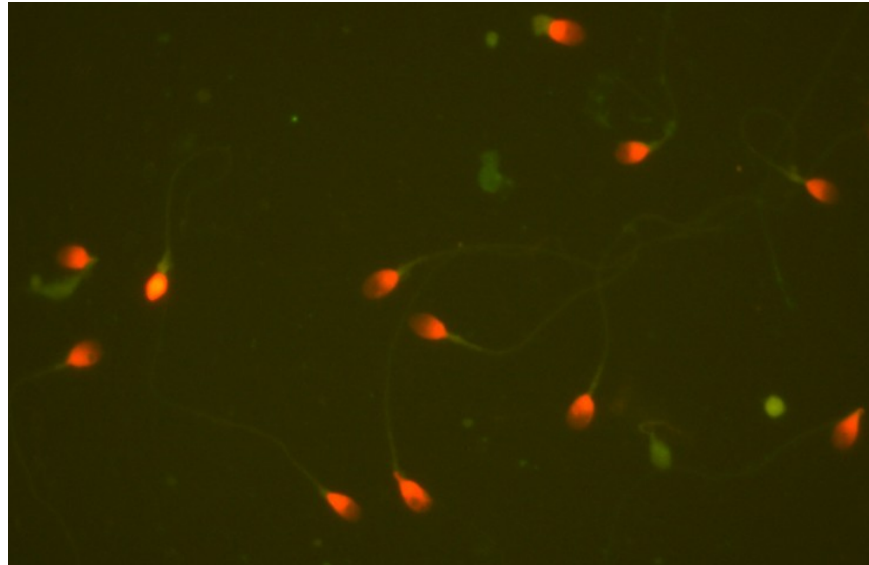


Şekil 9b

Şekil 9a ve 9b: Anti-CD44 monoklonal antikoru ile yapılan immun boyamada hem normal normospermik fertil erkek hastalarda hem de varikoselli hastalardan elde edilen spermiyumların immun reaksiyonlarında bir farklılık olmadığı görüldü. İmmun reaktivitenin her iki örnekte de spermiyum kuyruğunun tüm uzunluğu boyunca olduğu izlendi. Boya: İmmunofloresan X100

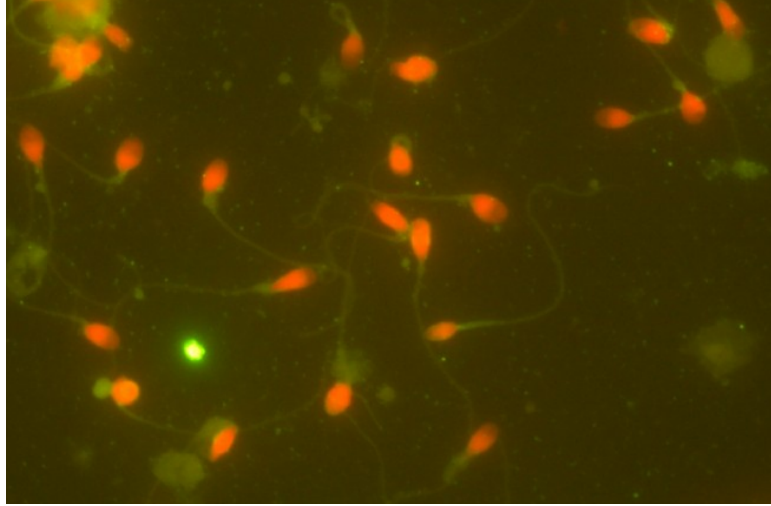
CD155

Normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumlarda immun reaksiyonun homojen bir biçimde, ancak yoğunluğu az olarak kuyruk bölgesini ilgilendirdiği gözlemlendi. Varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde yapılan immun boyamada ise kuyruktaki immun reaksiyon yoğunluğunun önemli ölçüde arttığı ve boyun ve orta parça bölgesinde yoğunlaştığı gözlemlendi. Boyun bölgesinde kuyruğun diğer kısımlarına göre hafif bir kalınlaşma, yer yer balonlaşmayı andırır tarzda olağan dışı bir yapılanma izlendi. Bu değişimin kuyruğu boyayan antijene bağlı olmadığı, varikoselle oluşan spermiyum morfolojisindeki değişikliğin bu antijenle daha belirgin olarak gözlenebilmesinden kaynaklandığı düşünüldü. Bu yapılanmanın normal spermiyumlarda da gözlenebilen artık sitoplazma olabileceği düşünüldü.

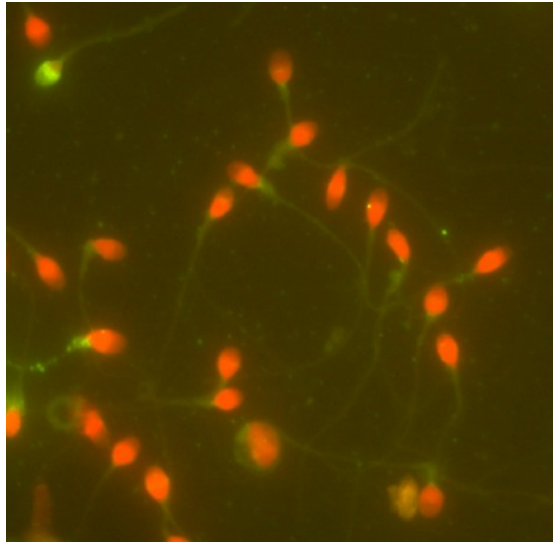


Şekil 10a.

Şekil 10a: Anti-CD155 monoklonal antikoru ile normal normospermik fertil erkek hastalardan elde edilen spermiyumların immun reaksiyonun homojen ancak yoğunluğu az olarak kuyruk bölgesini ilgilendirdiği gözlemlendi. Boya: immunofloresans X100



Şekil 10b



Şekil 10c

Şekil 10b ve 10c: Anti-CD155 monoklonal antikoru ile varikoselli hastalardan elde edilen spermiyumlarda yapılan immun boyamada ise kuyruktaki immun reaksiyon yoğunluğunun önemli ölçüde arttığı ve boyun bölgesinde yoğunlaştığı gözlemlendi. Boyun bölgesinde kuyruğun diğer kısımlarına göre hafif bir kalınlaşma, yer yer balonlaşmayı andırır tarzda olağan dışı bir yapılanma izlendi. Boya: İmmunofloresan X100

	BAŞ			KUYRUK		
	A K R O Z O M	E KVA TOR YAL SEG ME NT	POST AKRO ZOMA L BÖLG E	BOYU N ve ORTA	ES AS	SO N
80396(N)	-	-	-	+	+	+
80396(V)	-	-	-	++	++	++
CD46(N)	++++	++++	-	-	-	-
CD46(V)	++++	-	-	-	-	-
CD52(N)	-	-	-	+	+	+
CD52(V)	+	+++	-	+++	+++	-
CD63(N)	-	-	-	+	+	+
CD63(V)	++++	-	-	++++	++++	++++
CD55(N)	-	-	-	+++	-	-
CD55(V)	++++	++++	-	++++	-	-
CD173(N)	-	-	-	-	-	-
CD173(V)	-	++	-	+++	+++	+++
LeY(N)	-	-	-	-	-	-
LeY(V)	-	-	-	++++	+++	+++
CD14(N)	-	++	++++	++++	++++	++++
CD14(V)	-	++	++++	++++	++++	++++
CD44(N)	-	-	-	+++	+++	+++
CD44(V)	-	-	-	+++	+++	+++
CD155(N)	-	-	-	++	++	++
CD155(V)	-	-	-	++	++	++

Tablo 1: Çalışmada kullanılan antikörlerin spermiyum üzerindeki ekspresyonlarının derecesi gösterilmektedir. (+: hafif; ++++:kuvvetli)

N: Normal grup

V: Varikoselli grup

TARTIŞMA

Ejekülasyonla atılan spermiyum testis dışındaki erkek genital yollarında örneğin epididimiste olgunluğu tamamlamış erkek üreme hücresidir. Fertilizasyonun oluşması için hücrenin dişi genital yollarında kapasitasyon denilen olgunlaşma sürecini tamamlamış olması gerekir.

Spermiyum epididimal kanaldan geçerken öne doğru olan hareket yeteneğini ve zonayı tanıma özelliğini kazanır. Bu olgunlaşma sürecinde akrozomda, hücre zarında ve sperme ait değişik kompartmandaki moleküller kimyasal değişimlere uğrar ve hücre olgunlaşır. Bazı moleküllerdeki kimyasal değişiklikler ise kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu sürecinde oluşur ve moleküller spermiyumun farklı bölgelerine yerleşirler. Bu şekilde hücre kendisini fertilizasyona hazırlamak üzere önemli değişiklikleri içeren ve sürekli olan bir farklanma süreci geçirir.

Bu çalışmada akrozom reaksiyonunu gerçekleştirmemiş, ancak in vitro olarak kapasitasyon sürecini tamamladığı düşünülen (27) spermiyumların antijenik yapısını 80396, CD46, CD52, CD55, CD63, CD173, LeY, CD14, CD44, CD155 molekülleri kullanılarak tanımlanması amaçlandı. Çalışmanın temel amacı normospermik fertil hastalarda eksprese edilen bu moleküllerin, spermiyumların son yıllarda tanımlanan yapısal özellikleriyle ilişkilendirmek ve normal spermiyum işlevine katkıda bulunmaktır.

İkincil amaç olarak da moleküllerin ekspresyonu varikoselli hastalarda incelenmiş ve tanımlanan normal yapının varikoselden ne şekilde etkilendiği araştırılmıştır. Bu amaçla aynı moleküllerin varikoselli hastalardan elde edilen spermiyum örneklerindeki dağılımı normal grupla karşılaştırmalı olarak incelenerek varikoselin etkisiyle olan ekspresyon farkları değerlendirilmiştir.

Spermiyum genel bilgilerde tanımlanan klasik yapısının ötesinde işlevleri henüz tartışma konusu olmakla birlikte birbirlerinden zarla ayrılmış aktif bölgelerden

oluşur. Bu bölgeler özellikle spermiyumun baş kısmında tanımlanmış olup spermiyum başının gelişmesi ve olgunlaşmasında çeşitli işlevler üstlenmiştir. Ve başarılı bir fertilizasyonun gerçekleşmesi için tanımlanan bu aktif bölgelerin önemli işlevler üstlendiği düşünülmektedir.

Bu nedenle çalışmanın bulgularını irdelemek üzere tanımlanan bu bölgeler üzerindeki bilgi aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

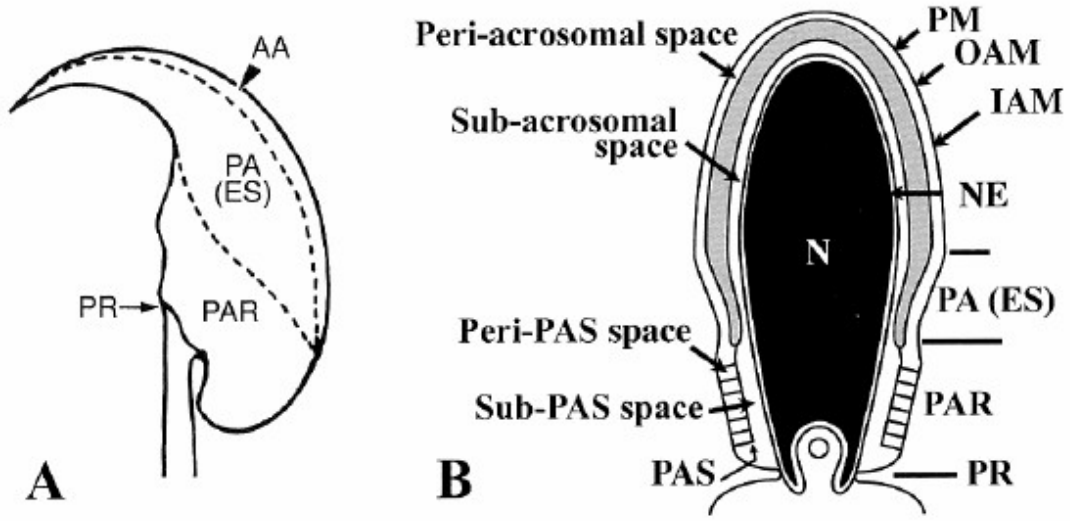
Spermiyum başı temel olarak

- çekirdek
- akrozom
- akrozomu çevreleyen az miktardaki sitoplazma

‘dan oluşur.

Bu şekilde spermiyum başında akrozom iç ve dış membranı hücre membranı ve çekirdek membranı ile çevrelenmiş spermiyum işlevinde önemli rolleri olan bazı kompartmanlar tanımlanmıştır. Akrozom çekirdeğin ön bölümünü saran ve spermiyum başının yaklaşık 2/3 ünü saran yarım ay veya şapka biçimli bir yapıdır. İç akrozomal membran (IAM) çekirdek zarına, dış akrozomal membran (OAM) hücre zarına komşu olan akrozom membranlarıdır.

Memeli spermiyum başını çevreleyen hücre zarı, kaudal bölgede çekirdek zarına yapışır. Bu yolla hücre zarı çekirdek zarına bağlanmış olur. Hücre zarının spermiyum başının alt kısmında bulunan çekirdek zarıyla bağlantı yaptığı bu bölgeye *posterior halka (PR)* denir. Bu halka spermiyum başının alt ucuna yakındır.



Resim 6. Sperm başının yapısı.

Sperm başı 2 ana bölgeden oluşur:

- *Akrozomal bölge*
- *Post-akrozomal bölge*

Akrozomal bölge kendi içinde tekrar 2 kısma ayrılır:

- *Ön akrozomal bölge*
- *Arka akrozomal bölge veya Ekvatorial segment (ES)*

İşlevsel olarak ön akrozomal bölge akrozom reaksiyonu ve buna bağlı spermiyum-zona ilişkisinden, arka akrozomal bölge veya ekvatoryal segment ise spermiyum-oosit bağlanmasından sorumludur. Ekvatoryal segmentte hücre zarı altına yer alan hücre iskeleti elemanlarıyla çok sıkı ilişki içindedir. İç ve dış akrozomal zarlar birbirlerine periodik çapraz bağlarla bağlanmıştır. Ve bu bölgede membran akışkanlığı bu yolla sınırlanmıştır. Ekvatoryal segment geç spermatid evresinde oluşur ve spermiyum oosit içine girene kadar yapısını muhafaza eder (28,29,30). Bu bölge akrozom reaksiyonundan sonra spermiyum hücre zarıyla oolemmenin ilk birbirleriyle kaynaştığı bölge olarak işlevsel bir öneme sahiptir (31,32,33). Ekvatoryal segmentteki membranın akışkanlığının azalması burada bir sağlam engel oluşturarak, ön ve arka akrozomal bölgelerdeki membran proteinlerinin yer değiştirmesini önler. Post-akrozomal bölge (PAR), ekvatoryal segmentin alt ucundan posterior halkaya (PR) kadar uzanan bölgeyi tanımlar.

Spermiyum başında hücre zarıyla dış akrozomal membran arasında kalan bölge periakrozomal bölgedir. İç akrozom zarıyla çekirdek zarı arasında kalan bölge ise subakrozomal bölgedir.

Spermiyum işlevi ve bunu düzenleyen moleküllerle yapılan çalışmalarda özellikle perinükleer teka denilen bir bölgenin tanımlandığı ve çalışmaların bunun üzerine yoğunlaştığı dikkati çekmektedir. Bu bölgenin değişik tanımlamaları yapılmakla birlikte genel olarak perinükleer teka, çekirdeği çevreleyen hücre iskeleti elemanlarından zengin bir kılıf olarak tanımlanır. Bu kılıf sadece çekirdeğin kuyruğa bağlandığı bazal bölgede bulunmaz. Elektron mikroskopik ve sitokimyasal özelliklerine göre perinükleer teka 2 bölüme ayrılır:

- **Apikal bölge:** Subakrozomal bölge olarak da tanımlanır. Çekirdek zarıyla iç akrozomal membran arasındaki yoğun granüler yapıda bir maddeyle dolu ince bir sitoplazmik halkadır. Bu bölge akrozom reaksiyonu sürecinde dış akrozomal zarın hücre zarıyla birleşerek akrozom içeriğinin boşaldığı ve bu yolla iç akrozomal membranın dışa açıldığı “perforatorium” bölgesini de içerir.
- **Posterior akrozomal bölge:** Postakrozomal segment (postakrozomal perinükleer teka) akrozomun bulunmadığı, her 2 taraftaki akrozom uçlarından posterior halkaya kadar uzanır. Genel olarak kaliks veya huni biçiminde bir yapıdır. Bu bölgede post akrozomal kılıf (PAS-post acrosomal sheath) bulunur. Postakrozomal kılıf ön tarafta subakrozomal bölgeyle devam eder. Arka (akrozomun bulunmadığı) tarafta ise hücre zarıyla çekirdek zarı arasındaki bölgeyi tanımlar. Bu bölgedeki içerik hücre zarına bitişik olan çizgisel görünümlü birbirine paralel fibrile benzer kalın yapılardan oluşmaktadır. Ve bu bölge merdiven basamağı gibi çizgisel yapılanma gösterir. Kılıfın geri kalanında ise homojen çizgisel yapı göstermeyen bir madde ile doludur. Bazı araştırmacılar sadece bu bölgedeki çekirdek zarına bitişik çizgisel yapıyı PAS olarak tanımlamakta ve bu yapıyla hücre zarı arasında kalan yapıyı ise sub-PAS olarak isimlendirmektedirler. Aynı çalışmada ise akrozom hariç, çekirdekle plazma membranı arasındaki boşluk PT (Perinükleer Teka) olarak isimlendirilmiştir.

Ancak perinükleer tekanın subakrozomal bölgede de yani çekirdek çevresinde de devam ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Perinükleer teka içerisinde ekstraksiyona dayanıklı somatik hücrelerde bulunan hücre iskeleti bileşenlerinden farklı birgrup hücre iskeleti elemanıyla dolu olduğu gösterilmiştir. Bu yapıların aktin, tubulin, spektrin, calisin, cyclin 1 ve 2 olarak tanımlanmıştır. Yukarıda tanımlanan moleküllerin insan spermiyum üzerindeki ekspresyonu konusunda farklı görüşler olmakla birlikte perinükleer tekanın hücre iskeletinden zengin bir yapı olduğu genel kabul görmektedir. Perinükleer teka spermiyum başının şekillenmesi ve akrozomun yayılarak çekirdeği sarması sürecinde sağlam bir iskelet oluşturur. Bu süreçte çekirdek zarıyla i  akrozomal zar arasında ve /veya çekirdek zarıyla hücre zarı arasındaki ilişkiyi stabil ve sağlam bir hale getirir. Bu nedenle peri nükleer teka gelişmediğinde akrozom gelişemez (34,35,36).

Perinükleer teka proteinlerinin epididimal maturasyon sürecinde disülfid bağlarıyla bağlanıp daha dayanıklı bir hale geldiği, böylece dişi üreme yollarında ilerleyen spermiyum genomunun diş etkenlerden korunmasında bir işlevi olabileceği ileri s r lm ştir. Perinükleer teka spermiyum başının biçimlenmesi esnasında bir yapısal sağlamlık yoluyla bu biçimlenmeyi kolaylaştırır.

Postakrozomal perinükleer tekanın oosit aktivasyonundaki rolü iyi tanımlanmıştır. Spermiyumun yumurtaya penetrasyonundan sonra peri nükleer teka ayrılarak oosit sitoplazmasına geçer. Bu süreç içinde spermiyum nükleusu erkek pron kleusuna dönüşür ve post akrozomal perinükleer tekadan salınan spermiyum kaynaklı oosit aktive edici faktör (sperm-born-oocyte activating factors (SOAF 1, SOAF 2)) oositi aktive ederek başarılı bir fertilizasyonun gerçekleşmesine katkıda bulunur. Bu nedenle perinükleer teka bulunmayan spermiyum başlarının mikroenjeksiyonları başarısız bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci bölümünü oluşturan varikozel patolojisine ilişkin yeni bilgiler aşağıdaki özetlenmiştir.

VARİKOSEL

Varikosele, testisleri drene eden pampiniform pleksusu oluşturan spermatik venlerin uzayıp genişleyerek kıvrıntılı bir biçim alması ve venöz dolaşımda ters akım (reflü) oluşturması nedeniyle ortam ısısının ve testisteki hidrostatik basıncın artmasıdır. Değişen bu koşulların spermatogenesisin oluşumunu etkilediği uzun yıllar bilinmesine karşın, varikosele bağlı infertilitenin mekanizması henüz açıkça ortaya konmamıştır. Varikoselin genel popülasyonda insidansı yaklaşık %15'tir. İnfertil erkeklerin ise % 19-41'nde varikosele görülmektedir (16,17).

Varikoselde artmış intraskrotal ısının ile düşük spermiyum parametreleriyle olan ilişkisi 1960'lerden beri araştırılmaktadır. Varikoselli infertil erkeklerin normal fertil erkeklere kıyasla skrotal ısısının minimal arttığını gösteren çalışmaların yanı sıra (37,38,39), varikoselli ve varikoselsiz infertil erkekler karşılaştırıldığında skrotal ısıda hiçbir değişiklik olmadığı da rapor edilmiştir (18,40). Varikosele ve skrotal hipertermi arasındaki doğrudan ilişkili veriler her ne kadar çelişkili ise de hem hayvan modelleri hem çoğu insan çalışması net bir şekilde yükselmiş intratestikular ısının varikoselle ilişkili olduğunu göstermektedir (18,40).

Artan ısının spermatogenesis üzerindeki negatif etkilerini açıklayan mekanizmalar belirgin değildir. Artan ısının seminifer tübüllerdeki germ hücre çekirdeklerindeki RNA bağlayıcı proteinleri veya direkt olarak DNA'yı etkilediği düşünülmektedir. Yüksek ısının Sertoli ve Leydig hücrelerinde negatif etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür (22,23,41,42). Varikoselin azalmış serum testosteron konsantrasyonu ile ilişkisini gösteren çalışmalar, patolojinin Leydig hücresi işlev bozukluğuna bağlı olduğu düşündürmüştür (43,44,45,46). Bazı çalışmalarda rapor edilen varikosele bağlı değişmemiş testosteron düzeyinin ise Leydig hücresi hiperplazisine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (46,47). Yapılan bazı çalışmalarda ise varikoselli ve varikoselsiz erkeklerde hem periferik hem testiküler venöz kanında FSH, LH, testosteron ve estradiol konsantrasyonlarında anlamlı bir fark gözlenmediği bildirilmiştir (48,49,50,51).

Antisperm antikorlarının spermiyumun agglutinasyon ve immobilizasyonuna, spermiyum sitotoksitesine, servikal mukusa, spermiyum penetrasyonunun bozulmasına, kapasitasyonun ve akrozom reaksiyonunun engellenmesine ve makrofajlar tarafından artan spermiyum fagositozuna neden olduğu gösterilmiştir (52,53). Anti-sperm antikor düzeyinin infertil erkeklerde normal erkek popülasyonuna göre yüksek olduğu gösterilmiştir (54,55,56,57). Anti-sperm antikorlarının infertilitede önemli derecede arttığını gösteren bu çalışmalar ilaveten infertil varikoselli hastaların anti-sperm antikorlarının da anlamlı ölçüde yüksek olduğu ileri sürülmüştür (58).

İdiyopatik normospermik erkek infertiltesinde varikoselin rolünün araştırıldığı çalışmalarda, bozukluğun morfoloji ya da sayıdan çok spermiyum işlevinde olduğu düşünülmüş ve bu işlev bozukluğunun spermin zona pellusidaya bağlaması sürecindeki akrozom reaksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (59,60). İn vitro olarak indüklenen akrozomal ekzositozisin veya akrozom reaksiyonunun varikoselli hastalarda gerçekleşmediği gösterilmiştir (61). Bu nedenle ekzositozisin oluşmamasını sinyal ileti yollarındaki bir bozukluğa veya Ca iyonu akışına bağlı olabileceği düşünülmüştür (62). Varikoselin infertiliteyle olan ilişkisini açıklamak üzere yapılan bu çalışmalarda akrozom reaksiyonunun görülmemesinin sadece mekanizmayı tetikleyen faktörlere bağlı olmadığı, akrozom içeriğine, akrozom oluşumuna ve bu oluşumdaki nedeni bilinmeyen bazı sapmalara ait olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle varikoselli hastalarda ve normal hastalardaki akrozomla immün reaksiyon veren moleküllerin arasındaki farklılığın bu konuda yol gösterici olabileceği düşünülmüştür.

Reaktif oksijen ürünleri (ROS) normal aerobik metabolizma sonucu ortaya çıkan süperoksid anyonları, hidroksil radikali, nitrik oksid, hidrojen peroksi gibi radikallerdir (63). İnsan spermiyumunun lökositler ve makrofajlar gibi aerobik koşullarda ROS üreten hücrelerden olduğu gösterilmiştir (64,65,66). Spermatozoanın ROS üretimi sinyal transdüksiyon mekanizmalarında (67), spermiyum kapasitasyonun düzenlenmesinde ve akrozom reaksiyonu ve spermiyum-oosit bağlanmasının kolaylaştırılmasında işlev gören fizyolojik bir süreç olduğu bilinmektedir (68,69,70). Normal sağlıklı erkeklerde seminal plazma aşırı ROS üretiminin etkilerini nötralize etmek için doğal antioksidanlar içerdiği fakat

patolojik koşullarda ROS üretiminin antioksidan kapasiteyi aşarak oksidatif strese sebep olduğu gösterilmiştir (71,72,73,74). Artan ROS üretimi spermiyumun baş ve orta bölgesindeki zarda lipid peroksidasyonuna neden olarak spermiyum işlevini bozduğu, spermiyum morfolojisini değıştirdiğı, azalmış motiliteye ve etkisiz spermiyum-oosit birleşmesine neden olduğu ileri sürülmüştür (76,77). ROS'un ayrıca yüksek oranda DNA hasarına sebep olduğu bilinmektedir (77,78). Köksal ve arkadaşları varikoselli hastalarda ROS miktarının anlamlı ölçüde arttığını göstermişlerdir. Varikoselli hastalarda önemli bir morfoloji bozukluğu olan rezidüel spermiyum sitoplazmasının gözlenmesidir. Spermiyogenesis sürecinde atılan bu sitoplazma parçasının yok olmaması ve spermiyuma bağılı olarak gözlenmesinin ROS'a bağılı olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca oluşan bu artık sitoplazmanın da yine ROS üretiminde etkili olduğu bilinmektedir (79).

Zini ve arkadaşları varikoselli hastalarda önemli bir morfoloji bozukluğu olan rezidüel sperm sitoplazmasının gözlendiğini bildirmişlerdir (79). Spermiyogenesis sürecinde atılan bu sitoplazma parçasının yok olmaması ve spermiyuma bağılı olarak gözlenmesinin ROS'a bağılı olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca oluşan bu artık sitoplazmanın da yine ROS üretiminde etkili olduğu bildirilmiştir. Bu açıdan bulgularımız Zini ve arkadaşlarının gözlemleriyle paralellik göstermektedir.

80396

80396 antikoru CD kodu almamış ve birimize workshop'tan gelmiş bir antikordur. Bu çalışmada 80396 antikoru ile yapılan immun boyamada, antikorum normal grupta kuyruk bölgesinde hafif olarak varikoselli grupta ise yine kuyruk bölgesinde daha yoğun ve granüler tarzda boyandığı gözlendi. Antikorum normal grupta tüm kuyruk boyunca homojen biçimde izlenmesi, diğerkuyruğı boyanan antikorklarda olduğu gibi boyanmanın kuyrukta bulunan subsellüler yapılarla ilişkisini düşündürdü. Varikosel hastalardaki granüler boyanma ise bu yapılarıdaki fregmantasyonu düşündürmekle birlikte konunun bu yönden açıklanması için elektron mikroskopik ve immunohistokimyasal çalışmalarla kanıtlanması gereklidir. Antikordan bağımsız olarak diğerkuplarda da spermiyumun orta bölgesi ile ilgili artık sitoplazmanın varikoselli grupta çok sık izlendiğı dikkati çekti.

CD46

Membran kofaktör proteinidir. Kompleman aktivasyon geninin regülasyonunu sağlayarak hücreleri kompleman atağından koruduğu gösterilmiştir. Fertilizasyonda ligand veya koruyucu bir molekül olduğu gösterilmiştir. Akrozomal CD46'nın spermiyum kapasitasyonu esnasında spermiyumun baş kısmından eksprese edildiği gösterilmiştir. CD46'nın iç akrozomal membranda eksprese olduğu ve bu bölgenin akrozom reaksiyonu ile birlikte dışa açılan bölge olduğu gösterilmiştir (80). Ve bu reaksiyonda da kompleman aktivasyonunun rol oynadığı ileri sürülmüştür. Molekülün ayrıca spermiyum-oosit füzyonu üzerinde etkili olabileceği üzerinde durulmaktadır (81). CD46'nın infertiliteyle ilişkili olarak eksprese olduğu ve anti-sperm antikorların hedefi olabileceği gösterilmiştir (80,82,83,84).

Yapılan immun boyanmalarda normal normospermik fertil hasta grupta akrozomda homojen şekilde eksprese olan molekül varikoselli grupta granüler tarzda bir pattern gösterdi. Böylece molekülün fertilizasyon için gerekli ve akrozom reaksiyonunu düzenleyen bir molekül olduğu ancak infertil hastalardaki anti-sperm antikorlarının hedefi olduğu gösterildi. Bulgularımız molekülün normal ve varikoselli gruptaki ekspresyonu ile değerlendirildiğinde literatürle uyumludur. Varikosel grubundaki granüler biçimdeki akrozomal boyanmanın akrozom oluşum esnasındaki bir bozukluktan kaynaklanan fragmentasyon ya da akrozom oluşumunun tam gerçekleşmemesi sonucu pre-akrozomal granüllerin bir görüntüsünü simgeleyebileceği üzerinde duruldu. Ancak varikosel grubundaki granüler ekspresyonun için ileri çalışmalarla değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

CD52

CD52 lenfosit ve monosit üzerinde yer alan glikozilfosfolipid (GPI) bağımlı bir glikoproteindir (84). Fizyolojik rolü net olarak bilinmemekte; CD52'ye karşı oluşan monoklonal antikor (CAMPATH-1) kompleman bağımlı hücre lizisinde belirgin etkisi vardır (85) ve lenfoproliferatif hastalıklarda tedavi amaçlı ve doku transplantasyonunda lenfosit supresyonu için sık kullanılır (86,87,88,89). İnsan spermiyumunda eksprese olan CD52 homoloğu gp20 denilen bir sialoglikoproteindir. Epididimal sekresyonla HE5 (CD52) ejakulattaki spermiyum

motilitesi arasındaki ilişki açıklandığı bir çalışmada, CD52'nin spermiyum yüzeyindeki ekspresyonundaki azalmanın motiliteninde azalmasına neden olduğu ortaya konmuştur (90). Ayrıca CD52'nin epididimis, seminal plazma ve mature spermiyumun üzerinde bulunup spermatidde de bulunmaması bu antijenin spermiyum maturasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir (91,92,93). Ancak yapılan son çalışmalar CD52 homoloğu olan antijeninin spermiyumdaki ekspresyonunun yukarıda tanımlananlardan farklı olarak infertil hastalarda bulunan kompleman bağımlı spermiyum hareketini azaltan monoklonal antikora bağlandığını gösterilmiştir. Bu nedenle bu antijenin diğerlerinden farklı olarak O-linked karbonhidrat içermesi bu antijen ekspresyonunun üreme sistemi üzerindeki özgünlüğünün nedeni olarak gösterilmiştir (91).

Yapılan bu çalışmada CD52'nin normospermik fertil hastalardaki spermiyumların homojen ve az boyanması, varikozel grubunda ise belirgin bir kuyruk boyanmasının yanı sıra ekvatoryal segmenti de boyamış olması yukarıdaki literatürle uyumlu olarak bulgularımızı açıklamaktadır. Antijenin varikozelli hastalardaki kuyruk ve ekvatoryal segment ekspresyonunun değerlendirilmesi için varikozel dışı infertil hastalarla da karşılaştırılmalı olarak incelenmesi gerekli görülmüştür.

CD55

İnsanda bulunan bir membrana bağlı komplement regülatör proteindir (94,95,96). Diğer adı DAF'tır (decay-accelerating factor). GPI bağımlı bir glikoproteindir. CD55, uygun olmayan kompleman aktivasyonuna karşı bir bariyer oluşturur. Özellikle klasik yolda C3 konvertazın oluşmasını engelleyerek bu işlevini gerçekleştirir (97). İnsanda CD55 sperm üzerinde ve erkek üreme sistemi kanalında boyunca eksprese edilir (98,99). Fertilizasyonda koruyucu bir ligand veya molekül olduğu üzerinde görüşler vardır.

Yapılan bu çalışmada normospermik fertil hastaların spermiyumlarında boyun bölgesinde belirgindi. Varikozel grubunda ise akrozomun immun reaktivitesi yoğun olarak gözlemlendi ve bu boyanma granüler bir dağılım şeklinde gözlenmekteydi. Molekülün insan spermiyumu üzerindeki dağılımı üzerine yapılan çalışmalar

oldukça nadirdir. Varikosel grubunda gözlenen immun reaktivitenin işlevsel olarak yorumlanabilmesi için daha ileri çalışmalara gerek olduğu düşünüldü.

CD63

CD63 tetraspanin ailesinin bir üyesidir (100). CD63 endoteldeki Weibel-Palade yapılarındaki intraselüler lizozomal/endozomal/granül proteinlerinde, endotelde, aktive trombosit yüzeyinde, degranüle olmuş nötrofil, monosit ve makrofajlarda, fibroblast, osteoklast, düz kas hücresi, nöral doku (beyindeki beyaz cevher ve periferik sinirler) ve sinoviyal hücrelerde eksprese olur (101). CD63 geç endozomlar için bir marker olarak kullanılmıştır (101). CD63'ün diğer tetraspanin grubu CD9 gibi moleküllerle bağlanabileceği bilinmektedir (102). Yapılan bu çalışmada normospermik fertil hastaların spermiyumlarında kuyrukta homojen, yoğunluğu az bir boyanma izlendi. Varikoselli grupta ise kuyruktaki immun reaktivitenin belirgin olduğu; ilaveten akrozomda CD46'ya benzer tarzda granüller bir boyanma izlendi. Akrozom modifiye olmuş bir lizozom olarak kabul edildiğinden geç endozom markeri olarak kabul edilen bu molekülün akrozomdaki ekspresyonu bu ilişkiyi göstermesi açısından ilginçtir. Ancak çalışmanın temelini oluşturan normal normo spermik fertil hastaların spermiyumlarında bu reaksiyonun görülmemesi yoruma açık bir konudur. CD63 lizozomla hücre zarı arasındaki ilişkiyi de sağlayan bir protein olduğundan konunun bu yönüyle de akrozom reaksiyonu ve fertilizasyona olan katkıları açısından ileri çalışmalarla değerlendirilmesinin gerekli olduğu düşünüldü.

CD173

CD173 genel olarak eritrositlerde, endotel hücrelerinde eksprese edilen transmembran süperailisine ilişkin bir proteindir (103). Ayrıca bazı karsinomlarda ve normal insan meme epitelinin farketmemiş bazı hücrelerindedir ekspresyonu gözlenmektedir (104). Lökemik ve normal hematopoietik CD34+ kök hücrelerin de CD173 eksprese ettiği gösterilmiştir (103). CD173'ün fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir.

Yapılan bu çalışmada işlevi tam olarak bilinmeyen tetraspan grubu bu molekülün normal normospermik fertil hastaların spermiyumlarında immun reaksiyon vermediği saptandı. Varikoselli grupta ise antijenin kuyrukta ve ekvatorial segmentte bulunduğu dikkati çekti. Ekvatoryal segmentin spermiyum-oosit birleşmesi sürecinde oosite ilk yapışan bölge olması fertilizasyondaki önemine işaret eder. Ancak molekülün sadece varikoselli gruptaki ekspresyonu bu açıdan ilginçtir. Varikosel dışı diğer spermiyum patolojilerinde de antijen ekspresyonunun değerlendirilmesi molekülün işlevine katkıda bulunabilir.

LeY (CD174)

Kan grup antijenidir. Diğer ismi CD174 dir. Normal ve tümoral gastrointestinalepitelial hücrelerde eksprese edilir (105). Spermiyum üzerindeki fonksiyonu bilinmemektedir. Ancak testiküler germ hücre tümörlerinde diferansiasyon markerı olarak kullanılmaktadır (105). İşlevi tam olarak bilinmemektedir. Apoptosis ile ilişkili olduğu veya hücre göçünü kolaylaştırıcı olduğu etkisi üzerinde durulmaktadır.

İşlevi tam olarak bilinmeyen bu kan grup antijeninin normospermik fertil hasta spermalarında immun reaktivitesi bulunmamaktaydı. Varikoselli hastalardan alınan sperm örneklerinde ise kuyrukta belirgin bir boyanma çekti. Bu boyanmanın boyun bölgesini ilgilendirdiği belgindi. Antijen ekspresyonundan bağımsız olarak bu molekülün spermiyum gelişmesinin artık ürünü olan ve normal grup hastalarda da seyrek izlenebilen sitoplazmik artıkları da gösterebildiği ilgi çekti. Bu nedenle varikosel patolojisinin ilgilendirebileceği düşünüldü.

CD14

CD14 ilk defa monositlerin ve makrofajların yüzeyinde tanımlanmıştır (106). CD14 hücre membranına glikozil fosfatidil inozitol (GPI) bağı ile tutunur (107,108). CD14 özellikle Gram (-) bakterilerde bulunan lipopolisakkaritlerin (LPS, endotoksin) homing reseptörüdür (108,109). CD14, LPS aracılı osteoklast farklılaşması yoluyla oluşan kemik rezorpsiyonunda da rol alabilmektedir. Mikroglial hücreler üzerindeki CD14'ün, mikroglia hücresi için toksik olan

Alzheimer'in amiloid peptidine bağlandığı ileri sürülmektedir. CD14 respiratuar epitelial hücrelerinde, korneada, silier cisim epitelial hücrelerinde, üroepitelial hücrelerinde de rastlanmıştır (110,111,112). Ek olarak CD ekspresyonu düz kas hücrelerinde, fibroblastlarda, pankreas β adacık hücrelerinde ve spermiyumlarda da tespit edilmiştir (113,114). Yapılan çalışmalara molekülün hem seminal plazmada hem de spermiyum yüzeyinde bulunduğunu göstermiştir ve erkek üreme sistemi hücreleri üzerinde aktivasyon gösterebileceği üzerinde durulmuştur (115). Ancak bu aktivasyonun ne şekilde gerçekleştiğinin ayrıntıları bilinmemektedir.

Bu çalışmada CD14 antijeni normal normospermik fertil erkek spermiyumlarında ve varikozel gruplarında değişiklik göstermemektedir. Her 2 grupta da immunreaktivitenin kuyruk bölgesinde birbirine paralel iki hat şeklinde olduğu izlendi. İlginç olarak spermiyum başını alttan saran V harfi biçimindeki immun reaktivite dikkati çekti. V harfi şeklinde boyanan bu yapının postakrozomal perinükleer tekayı ilgilendirdiği belirgindi. Perinükleer teka çekirdek çevresindeki bir hücre iskeleti bölümü olup spermiyum başının biçimlenmesi, akrozom yayılımı sürecinde çekirdek zarı ile hücre zarı arasında bir yapısal destek işlevi üstlendiği öne sürülmüştür. Ayrıca bu bölgenin spermiyum kaynaklı oosit aktive edici faktörü (sperm borne oocyte activating factor) salgıladığı bilinmektedir ve bu faktörün oosit aktivasyonu ve buna bağlı olarak başarılı bir fertilizasyon için gerekli olduğu bilinmektedir. CD14'ün bu özgün boyanmasının perinükleer tekayı ilgilendirmesi ileride yapılacak çalışmalar için bir kaynak oluşturu niteliktedir.

CD44

CD44 birçok hücre tipinde bulunan ve klasik olarak hyaluronan reseptörü olarak bilinen bir hücre yüzey glikoproteinidir. CD44'ün geniş ligand ve ekstrasellüler matriks moleküllerinden fibronektin (116), kollagen (117) ve fibrine (118) bağlandığı ileri sürülmektedir. CD44'ün hücrel adhezyon ve migrasyonu, lenfosit aktivasyonu ve proliferasyonu, NK (Natural Killer) hücrelerin sitosidal aktivitesi ve tümör metastazı gibi çok çeşitli olayda rol aldığı bilinmektedir (119,120,121,122). CD44 aracılığı ile gerçekleşen sinyal, sitokin salınımı ve T lenfosit aktivasyonunu uyarır (121). CD44 molekülünün lenfosit aktivasyonu ve göçü dışında hemopoezde, tümör ilerlemesi ve yayılmasında da rol oynadığı bilinmektedir (123). CD44'ün

spermiyumun akrozomunda da eksprese olduğu gösterilmiştir (124). Molekölün hyaluronana bağlanarak hücre içi Ca konsantrasyonunu arttırıp spermiyum hareketini kolaylaştırdığı ileri sürölmüştür.

CD44 ile yapılan boyamada fertil normospermik hastalarda çok hafıf bir akrozomal boyanma ve bu boyanmanın yer yer ekvatorial segmenti de ilgilendirdiği dikkati çekti. Ayrıca bu grupta spermiyum kuyruğundaki immun reaktivite belirgindi. Varikoselli hastalardan elde edilen örneklerde ise sadece spermiyum kuyruğunun tüm uzunluğu boyunca belirgin bir immun reaktivite gösterdiği saptandı. Belirgin bir şekilde kuyruk bölgesinde eksprese olması bu bölgede yer alan hareketi sağlayan aksonem ve diğer ipliksi proteinlerle ilişkili olduğunu düşöndürmektedir. Literatürün aksine immun reaktivitenin normal normospermik fertil hastalarda akrozom bölgesi için çok hafif ancak başlıca kuyruk bölgesinde olduğu dikkati çekti.

CD155

CD155 proteini (insan poliovirüs reseptörü, PVR) nektinle ilişkili bir hücre adhezyon molekülüdür (125) . CD155 proteini immünoglobulin süperaillesinin bir üyesidir. Deneysel olarak nektinden yoksun bırakılan erkek farelerde infertil oldukları gösterilmiştir. Bu infertilitenin nedeninin ise spermiyumun oviduktaki hareketinin azalması, spermiyum-zona ilişkisinin ve spermiyum-oosit bozulmasına bağlı olduğu ileri sürölmüştür (126). CD226'nın ligandı olduğu düşönlömektedir. CD155'ten yoksun bırakılan farelerde yapılan bir başka çalışmada spermiyumun baş ve kuyruğun orta parçasında yapısal bozukluklar olduğunu, etkin bir spermiyum-oosit penetrasyonunun gerçekleşmediği gösterilmiştir. Molekölün hücre iskeletiyle ilişkili olduğu, hücre göçü ve hücre adezyonuyla ilişkili olduğu molekül hakkında bilinenler arasındadır (126).

Yapılan bu çalışmada normospermik fertil hastalardan elde edilen spermiyum örneklerinde belirgin bir kuyruk immun reaktivitesi gözlendi. Bu reaktivite dışında spermiyumun diğer bölgeleriyle ilgili molekülö ilgilendiren herhangi bir ekspresyon gözlenmedi. Varikozel grubundan elde edilen spermiyum örneklerinde ise boyanmanın yine kuyruk bölgesini ilgilendirdiği ancak spermiyumun boyun

bölgesinde kalınlaşma, yer yer balonlaşma tarzında bir immunreaktivite izlendi. Antijenin kuyruk bölgesinde olması, hareketiyle ilgili fonksiyonunu düşündürür yöndedir. Varikoselli hastalarda gözlenen immun reaktivite özgünlüğünün ise antijenin dağılımından çok spermiyum gelişmesi sürecindeki bir bozukluğu işaret edebileceği üzerinde duruldu. Antikorum spermiyum işlevi üzerindeki fonksiyonunun değerlendirilmesi için çeşitli infertil hastalık gruplarındaki ekspresyonun normale karşılaştırmalı olarak incelenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

SONUÇLAR

Bu çalışma ileri derecede polarlaşmış özgün bir hücre olan erkek üreme hücresi veya spermiyumun antijenik yapısını ve buna bağlı olarak işlevini açıklamaya yöneliktir. Bu amaçla insan spermiyumu üzerinde eksprese olduğu bilinen ve ekspresyonunun önemli olabileceğini düşündüğümüz 80396, CD46, CD52, CD55, CD63, CD173, LeY, CD14, CD44, CD155 antikorları ile spermiyumun antijenik yapısı spermiyumun son zamanlarda tanımlanan aktif bölgeleri yönünden immunofloresan boyama ile değerlendirildi. Normal normospermik hastalardaki bulguları desteklemek üzere multifaktoriyel bir patoloji olarak gelişen varikoselli hastalardan elde edilen sperm örnekleri de çalışmaya dahil edildi.

Sperm yüzey antijenlerinin infertilitedeki işlevlerinin normal normospermik ve varikoselli hastalarda araştırılmasının planlandığı bu çalışmada normal ve varikoselli hastaların spermelerindeki antijen dağılımları incelendi ve şu sonuçlar elde edildi:

1. 80396 normal normospermik fertil grupta kuyruk bölgesinde hafif olarak, varikoselli grupta ise yine kuyruk bölgesinde daha yoğun ve granüler tarzda boyandığı gözlemlendi. Varikozel grubundaki artmış kuyruk immun boyanmanın kuyruğun sperm başına bağlandığı bölgedeki bozukluk spermiyogenezis esnasında sitoplazmik artığın çok abartılı bir biçimde gerçekleştiğini düşündürür yönde idi. Bu türden bozuklukların sperm başıyla hareketli kuyruğun senkronize bir biçimde hareketini engelleyecek bir bağlantı oluşturabileceği düşünüldü.
2. CD46 antijeni normal normospermik fertil grupta akrozomda homojen şekilde eksprese olurken, varikoselli grupta granüler tarzda bir pattern gösterdi. Akrozomdaki 2 farklı immun boyanma paterninin anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalar yapılması gerektiği düşünüldü.
3. CD52 antijeni normal normospermik fertil hastalarda homojen ve az, varikozel grubunda ise belirgin bir kuyruk immun boyanması yanı sıra ekvatorial segmenti de immun boyanma görüldü. İmmun reaktivitenin sadece varikoselli

hastalardan elde edilen sperm örneklerinde görülmesi ilginç kabul edildi ve ileri çalışmalarla bunun desteklenmesi düşünüldü.

4. CD55 antijeni normal normospermik fertil hastalarda boyun bölgesinde belirgindi. Varikosel grubunda ise akrozomun immun reaktivitesi yoğun ve granüler bir dağılım şeklinde gözlemlendi. İki hasta grubundaki immun boyanma farklılığının anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulabileceği düşünüldü.
5. CD63 antijeni normal normospermik fertil hastaların spermelerinde kuyrukta homojen, yoğunluğu az bir boyanma şeklinde izlendi. Varikoselli grupta ise kuyruktaki immun reaktivitenin belirgin olduğu; ilaveten akrozomda CD46'ya benzer tarzda granüler bir boyanma izlendi. Bu immun boyanma paterninin daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünüldü.
6. CD173 antijeni normal normospermik fertil hastaların spermelerinde immun reaksiyon vermediği saptandı. Varikoselli grupta ise antijenin kuyrukta ve ekvatorial segmentte bulunduğu dikkati çekti. Bu immun boyanma paterninin daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünüldü.
7. CD174 (LeY) antijeni normal normospermik fertil hasta spermelerinde immun reaktivitesi bulunmamaktaydı. Varikoselli hastalardan alınan sperm örneklerinde ise kuyrukta belirgin bir boyanma dikkati çekti. Bu boyanmanın boyun bölgesini ilgilendirdiği belirgindi. Bu immun boyanma paterninin daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünüldü.
8. CD14 antijeni normal normospermik fertil erkek spermiyumlarında ve varikosel gruplarında değişiklik göstermedi. Her 2 grupta da immun reaktivitenin kuyruk bölgesinde birbirine paralel iki hat şeklinde olduğu izlendi. İlginç olarak sperm başını alttan saran V harfi biçimindeki immun reaktivite dikkati çekti. V harfi şeklinde boyanan bu yapının postakrozomal perinükleer tekayı ilgilendirdiği belirgindi. Bu ilginç immun boyanma paterninin daha iyi anlaşılması için ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünüldü.

9. CD44 antijeni normal normospermik fertil hastalarda çok hafif bir akrozomal boyanma ve bu boyanmanın yer yer ekvatorial segmenti de ilgilendirdiği dikkati çekti. Ayrıca bu grupta sperm kuyruğundaki immun reaktivite belirgindi. Varikoselli hastalardan elde edilen örneklerde ise sadece sperm kuyruğunun tüm uzunluğu boyunca belirgin bir immun reaktivite gösterdiği saptandı. Bu immun boyanma paterninin anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulabileceği düşünüldü.
10. CD155 antijeni normal normospermik fertil hastalardan elde edilen sperm örneklerinin kuyruk kısmında immun reaktivitesi belirgindi. Varikosel grubundan elde edilen sperm örneklerinde ise boyanmanın yine kuyruk bölgesini ilgilendirdiği ancak spermin boyun bölgesinde kalınlaşma, yer yer balonlaşma tarzında bir immun reaktivite izlendi. Antijenin kuyruk bölgesinde olması, hareketiyle ilgili fonksiyonunu düşündürür yönde idi.

KAYNAKLAR:

1. Abraham L., Kierszenbaum. Histology and Cell Biology. Sayfa:538
2. Michael H. Ross, Wojciech Pawlina. Histology. Sayfa: 738
3. Zhonglin Hao, Kula N. Jha, Young-Hwan Kim, Soumya Vemuganti, V.Anne Westbrook, Olga Chertihin, Karin Markgraf, Charles J. Flickinger, Michael Coppola, John C. Herr and Pablo E. Visconti. Expression analysis of the human testis-specific serine/threonine kinase (TSSK) homologues. A TSSK member is present in the equatorial segment of human sperm. Mol. Hum. Reprod. **10**: 433–444.
4. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. Adolf-Friedrich Holstein, Wolfgang Schulze and Michail Davidoff. Reproductive Biology and Endocrinology 2003, **1**:107
5. Toshimori K. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. Cell Tissue Res. 1998 Aug;293(2):177-87.
6. Yoshinaga K., Toshimori K. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. In: The Biology of Spermatozoa Maturation. (ed., Toshimori K.) Microsc. Res. Tech. 61: 39-45. 2003.
7. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, Euing LL, Markert CI, Greenwald GS, Pfaff DN, eds. The physiology of reproduction. New York, Raven Press, 1988: 135-55
8. Rajesh K Naz and Preeti B Rajesh. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. Reprod Biol Endocrinol. 2004; 2: 75.
9. Kiyotaka Toshimori and Chizuru Ito. Formation and organization of the mammalian sperm head. Arch. Histol. Cytol. 66(5): 383-396 (2003)
10. Kazuya Yoshinaga and Kiyotaka Toshimori. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. Microscopy research and technique 61:39-45 (2003)
11. Ricardo D. Moreno and Carlos P. Alvarado. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: New and old evidence. Molecular Reproduction and Development 73:1430-1434 (2006)

12. Abraham L. Kierszenbaum and Laura L. Tres. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* 67 (4): 271-284 (2004)
13. Adela Mujica, Fernando Navarro-Garcia, Enrique O. Hernandez-Gonzalez, and Maria De Lourdes Juarez-Mosqueda. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. *Microscopy research and technique.* 61:76-87 (2003)
14. Peter Sutovsky, Gaurishankar Manandhar, Alex Wu and Richard Oko. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: Implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microscopy research and technique* 61:362-378 (2003)
15. Darren J. Ellis, Sadaf Shadan, Peter S. James, Robert M. Henderson, J. Michael Edwardson, Amanda Hutchings and Roy Jones. Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar, and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy. *Journal of Structural Biology* 138 (2002) 187-198.
16. Hendry, W.F., Sommerville, I.F., Hall, R.R. et al. (1973) Investigation and treatment of the subfertile male. *Br. J. Urol.*, 45, 684-692.
17. Cockett, A.T.K., Takihara, H. And Constantino, M.J. (1984) The varicocele. *Fertil. Steril.*, 41, 5-11
18. Lund, L. And Nielsen, K.T. (1996) Varicocele testis and testicular temperature. *Br. J. Urol.*, 78, 113-115
19. Leslie P. Gardner. *Color Textbook of Histology.* Sayfa 410. 1997
20. Abraham L. Kierszenbaum. *Histology and cell Biology.* sayfa 541. 2002
21. Michael H. Ross, Lynn J. Romrell, Gordon I. Kaye. *Histology. A Text and Atlas.* Third Edition. Sayfa 601.
22. Nishiyama, H., Danno, S., Kaneko, Y. Et al. (1998) Decreased expression of cold-induced RNA-binding proteins (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am. J. Pathol.*, 152, 289-296
23. Nakimi, M., Nakamura, M., Okuyama, A. et al. (1987) Influence of temperature on the function of Sertoli and Leydig cells of human testes. *Fertil. Steril.*, 47, 475-480.
24. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organisation in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* 1991; 44: 569-574

25. Fujisawa, M., Yoshida, S., Kojima, K. Et al. (1989) Biochemical changes in testicular varicocele. Arch. Androl., 22, 149-159
26. John D. Bancroft, Marilyn Gamble. Theory and practise of histological techniques. The fifth edition. Sayfa 589
27. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organisation in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol. Reprod. 1991; 44: 569-574
28. Kiyotaka Toshimori. Maturation of mammalian spermatozoa: modifications of the acrosome and plasma membrane leading to fertilization. Cell Tissue Res. (1998) 293:177-187
29. Olson GE ve Winfrey VP (1991) Changes in actin distribution during sperm development in the opossum, *Monodelphis domestica*. Anatomical domestica. Anatomical Record. 230 209-217
30. Russel L, Peterson RN, Freund M (1980) On the presence of bridges linking the iner and outer acrosomal membranes of boar spermatozoa. Anat. Rec. 198:449-459
31. Bedford JM (1975) Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididimis. In: Hamilton DW, Greep RO (eds) Handbook of physiology, section, vol 7. Endocrinology, vol 5. American Physiology Society, Washington, pp 303-317
32. Cooper TG (1986) The epididymis sperm maturation and fertilization. Springer, Berlin Heidelberg New York.
33. Yanagimachi R (1994) Mammalian fertilization. In: Knobil e, Neill JD (eds) The physiology of reproduction, 2nd edn. Raven Pres, New York, pp 189-317
34. Katerina Dvarakova, Harry D. Moore, Natasa Sebkova and Jiri Palacaek. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. Reproduction (2005) 130, 61-69
35. G. Manadhar and K. Toshimori. Fate of postacrosomal perinuclear theca recognized by monoclonal antibody MN13 after sperm head microinjection and its role in oocyte activation in mice. Biology of Reproduction 68, 655-663 (2003)
36. Adela Mujica, Fernanda Navarro Garcia, Enrique O. Hernandez-Gonzales and Maria De Lourdes Juarez-Mosqueda. Perinuclear theca during spermatozoa maturation leading to fertilization. Microskopy research and technique 61: 76-87 (2003)

37. Goldstein, M. And Eid, J. (1989) Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in man with varicoceles. *J. Urol.*, 142, 743-745
38. Zorngniotti, A.W. and MacLeod, J. (1973) Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil. Steril.*, 24, 854-863
39. Jockenhovel, F., Grave, A. and Nieschlag, E. (1990) A portable digital data recorder for long-term monitoring of scrotal temperatures. *Fertil. Steril.*, 54, 694-700
40. Mieusset, R., Biyan, L., Mondinat, C. Et al (1987) Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile man. *Fertil. Steril.* 48, 1006-1011
41. Nakamura, N., Namiki M., Okuyama, A. et al. (1987) Temperature sensitivity of human spermatogonia and spermatocytes in vitro. *Arch. Androl.*, 19, 127-132
42. Fujisawa, M., Yoshida, S., Kojima, K. Et al. (1989) Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch. Androl.*, 22, 149-159
43. Turner, T.T. and Lopez, T.J. (1990) Testicular blood flow in prepubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to the unilateral lesion. *J. Urol.*, 144, 1018-1021
44. Shafik, A., Wali, M.A., Abdel Azis, Y.E. et al. (1989) Experimental model of varicocele. *Eur. Urol.*, 16, 298-303
45. World Health Organization (1992) The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil. Steril.*, 57, 1289-1292.
46. Sirvent, J.J., Bernat, R., Navarro, M.A. et al. (1990) Leydig cell in idiopathic varicocele. *Eur. Urol.*, 17, 257-261.
47. Su, L., Goldstein, M. And Schlegel, P.N. (1995) the effect of varicolectomy on serum testosterone levels in infertile men with varicoceles. *J. Urol.*, 154, 1752-1755
48. Swerdloff, R.S and Walsh, P.C. (1975) Pituitary and gonadal hormones in patients with varicocele. *Fertil. Steril.*, 26, 1006-1012
49. Schiff, I., Wilson, E., Newton, R. et al (1976) Serum luteinizing hormon follicule-stimulating hormone and testosterone responses to gonadotropin-releasing factor in males with varicoceles. *Fertil Steril.*, 27, 1059-1061.

50. Hudson, R.W. and McKay, D.E (1980) The gonadotropin release of men with varicoceles to gonadotropin-releasing hormone. *Fertil. Steril.*, 33, 427-432
51. Hudson, R.W., Crawford, V.A and McKay, D.E (1981) The gonadotropin response of men with varicoceles to a four-hour infusion of gonadotropin-releasing hormone. *Fertil. Steril.*, 36, 633-637
52. Bronson, R., Cooper, G. Ve Rosenfield, D. (1984) Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertil. Steril.*, 42, 171-173
53. Haas, G.G. (1986) The inhibitory effect of sperm associated immunoglobulin on cervical mucus penetration. *Fertil. Steril.*, 46, 334-337
54. Haas, G.G., Cines, D.B. ve Schreiber, A.D. (1980) Immunologic infertility: identification of patients with antisperm antibody. *N. Engl. J. Med.*, 303, 722-727
55. Knudson, G., Ross, L., Stuhldreher, D. Et al. (1994) Prevalence of sperm bound antibodies in infertile man with varicocele: the effect of varicocele ligation on antibody levels and semen response. *J. Urol.*, 151, 1260-1262
56. Hendry, W.F., Morgan, H. Ve Stedronska, J. (1977) The clinical significance of antisperm antibodies in male subfertility. *Br. J. Urol.*, 49, 757-762
57. Moghissi. K.S. ve Thomas, A.J. (1990) Male infertility. *ACOG Tech. Bulletin*, 142, 1.
58. Golomb, J., Vardinon, N., Homonnai, Z.T. et al. (1986) Demonstration of antisperm antibodies in varicocele related infertility with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fertil. Steril.*, 45, 397-402
59. Rogers, B.J., Mygatt, G.G., Soderdahl, D.W. et al. (1985) Monitoring of suspected infertile man with varicocele by the sperm penetration assay. *Fertil. Steril.*, 44, 800-805
60. Vigil, P., Wohler, C., Bustos-Obregon, E. et al. (1994) Assesment of sperm function in fertile and infertile man. *Andrologia*, 26, 55-60
61. Benoff, S., Cooper, G.W., Hurley, I. et al. (1993) human sperm fertilization potential in vitro is correlated with differential expression of a head spesific mannose ligand receptor. *Fertil. Steril.*, 59, 854-862
62. Benoff, S., Cooper, G.W., Hurley, I. et al. (1994) The effect of calcium ion channel blockers on sperm fertilization potential. *Fertil. Steril.*, 62,606-617

63. Sharma, R.K. ve Agarwal, A. (1996) Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48, 835-850
64. Babior, B.M., Kipries, R.S. ve Curnutte, J.T. (1973) The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Invest.*, 52, 741-744
65. Klebanoff, S.J. (1980) Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.*, 93, 480-489
66. Holland, M.K., Alvarez, J.G. and Storey, B.T (1982) Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididimal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 27, 1109-1118 ve ark. 1982
67. Schreck, R., Rieber, P. And Baeuerle, P.A (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF-kappa transcription factor and HIV-1. *EMBO J.*, 10, 2247-2258
68. De Lamirande, E. and Gagnon, C. (1993) Human sperm hyperactivation in whole sperm and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil. Steril.*, 59, 1291-1295
69. De Lamirande, E., Eiley, D. And Gagnon, C.(1993) Inverse relationship between the indication of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biologic fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int. J. Androl.*, 16, 258-266
70. Aitken, R.J and Fisher, H.(1994) Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefits and risk. *Bioassays*, 16, 259-267
71. Aitken, R.J., Clarkson, J.S, Hargreave, T.B. et al.(1989) Analysis of the relationship between defective sperm function and generation of reactive oxygen species in cases of oligospermia. *J. Androl.*, 10, 214-220
72. Iwasaki, A. and Gagnon, C. (1992) Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil. Steril.*, 57, 409-416
73. De Lamirande, E. and Gagnon, C. (1995) Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum. Reprod.*, 10, 15-21
74. Alkan, I., Simsek, F., Haklar, G. Et al. (1997) Reactive oxygen species production by spermatozoa of patients with idiopathic infertility. *J. Urol.*, 157, 140-143

75. Aitken, R.J., Clarkson, J.S (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the generation of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 81, 459-469
76. Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. Et al. (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.*, 8, 338-348
77. Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J. Et al.(1998) Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 13, 896-900
78. Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E. Et al. (1998) Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effective antioxidants. *Hum. Reprod.*, 13, 1429-1436.
79. Zini, A., Defreitas, G., Freeman, M. Et al. (2000) Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 74, 461-464
80. Kitamura M, Matsumiya K, Yamanaka M et al (1997) Possible association of infertility with sperm-specific abnormality of CD46. *J Reprod Immunol* 33:83–88
81. Jiang H, Pillai S (1998) Complement regulatory proteins on the sperm surface: relevance to sperm motility. *Am J Reprod Immunol* 39:243–248
82. Nomura M, Kitamura M, Matsumiya K et al (2001) Genomic analysis of idiopathic infertile patients with sperm-specific depletion of CD46. *Exp Clin Immunogenet* 18:42–50
83. Wilton AN, Johnstone RW, McKenzie IFC et al (1992) Strong associations between RFLP and protein polymorphisms for CD46. *Immunogenetics* 36:79–85
84. Xia ,M-Q.,Hales ,G.,Lifely ,MR. Et al (1993)Structure of the CAMPATH-1 antigen ,a glycosylphosphatidylinositol anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis .*Biochem J.*,293,633-640
85. Hale ,G, Brigh ,S., et al (1983)Removal of t cells from bone marrow for transplantation :a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement .*Blood* ,62,873-882

86. Bindon ,C.I.,Hale ,G., et al (1988)Importance of antigen specificity for complement mediated lysis by monoclonal antibodies .*Eur.J.Immunol.*18,1507-1514
87. Hale ,G., Dyer ,M.J.S. et al(1988)Remission induction in non hodgin lenfoma with reshaped human monoclonal antibody.*Lancet* ,ii,1394-1399
88. Dyer,M.J.S. et al (1989)Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo patients with lymphoid malignancies :influence of antibody isotype.*Blood* ,73,1431-1439
89. Hale ,G., et al (1990)The CAMPATH-1 antigen (CDw52)Tissue Antigens ,35,118-127
90. Ettenger ,R.B., and Yadin (1995)The poantial role of therapeutic antibodies in the regulation of rejection .*Transplant .Proc.*,27:13-17
91. Yeng.C.H.,Perez-Sancez et al (1997a)Mturation of human epididymal spermatozoa with respect to their morphology and aġabeylity to undergo the acrosome reaction .*Hum.Reprod.Update* ,3,205-213
92. Hale et al (1993)The GPI anchored lymphocyte antigen CDw52 is associated with the epididmal maturation of huyman spermatozoa .*J.Reprod .Immunol.*23,189-205
93. Kirchoff et al (1993)Amajor mRNA of human epididymis princibal cells ,HE5, encodes the leucocyte differentiation CDw52 antigen peptide backbone .*Mol.Reprod.Dev.*34,8-15
94. T.E. Mollnes, W.C. Song and J.D. Lambris, Complement in inflammatory tissue damage and disease, *Trends Immunol.* **23** (2002), p. 61.
95. D. Hourcade, V.M. Holers and J.P. Atkinson, The regulators of complement activation (RCA) gene cluster, *Adv. Immunol.* **45** (1989), p. 381.
96. T. Miwa and W.C. Song, Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases, *Int. Immunopharmacol.* **1** (2001), p. 445.
97. D.M. Lublin and J.P. Atkinson, Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function, *Annu. Rev. Immunol.* **7** (1989), p. 35.
98. O.A. Vanderpuye, C.A. Labarrere and J.A. McIntyre, The complement system in human reproduction, *Am. J. Reprod Immunol.* **27** (1992), p. 145.

99. T.J. Oglesby, J.E. Longwith and P.C. Huettner, Human complement regulator expression by the normal female reproductive tract, *Anat. Rec.* **246** (1996), p. 78.
100. Radford KJ, Mallesch J and Hersey P. Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int. J. Cancer* 1995 62:632
101. Radford KJ, Thorne RF and Hersey P. Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *J. Immunol.* 1997 158:3353
102. Formation of complexes involving CD63 and the TM4SF protein CD9 have also been identified by co-precipitation (Berditchevski et al. 1996; Radford et al. 1996)
103. Tagaki S, fujikawa K, Imai T, Fukuhara N, Fukudome K, Minegishi M, Tsuchiya S, Konno T, hinuma Y, Yoshie O. Identification of a highly specific surface marker of T-cell acute lymphoblastic leukemia and neuroblastoma as a new member of the transmembrane 4 superfamily. *Int J Cancer.* 1995, 61(5): 706-15
104. Karsten U, Papsdorf G, Pauly A, Vojtesek B, Moll R, Lane EB, Clausen H, Stoisek P, Kasper M. Subtypes of non-transformed human mammary epithelial cells cultured in vitro: histo-blood antigen H type 2 defines basal cell-derived cells. *Differentiation.* 1993, 54(1):55-66
105. Baldus SE, Monig SP, Zirbes TK, Thakran J, Kothe D, Koppel M, Hanisch FG, Thiele J, Schneider PM, Holscher AH, Dienes HP. Lewis(y) antigen (CD174) and apoptosis in gastric and colorectal carcinomas: correlations with clinical and prognostic parameters. *Histol Histopathol.* 2006 May;21(5):503-10
106. Griffin JD, Ritz J, Nadler LM, Schlossman SF. Expression of myeloid differentiation antigens on normal and myeloid cells. *J. Clin. Invest.* 1981; **68**: 932–41.
107. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K *et al.* Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the *PIG-A* gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993; **73**: 703–11.

108. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; **249**: 1431–3.
109. Ziegler-Heitbrock HW. Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J. Inflamm.* 1995; **45**: 13–26.
110. Song PI, Abraham TA, Park Y *et al.* The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; **42**: 2867–77.
111. Fearn C, Kravchenko VV, Ulevitch RJ, Loskutoff DJ. Murine CD14 gene expression in vivo: extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 1995; **181**: 857–66.
112. Shimizu T, Yokota S, Takahashi S *et al.* Membrane-anchored CD14 is important for induction of interleukin-8 by lipopolysaccharide and peptidoglycan in uroepithelial cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004; **11**: 969–76.
113. Sugawara S, Arakaki R, Rikiishi H, Takada H. Lipoteichoic acid acts as an antagonist and an agonist of lipopolysaccharide on human gingival fibroblasts and monocytes in a CD14-dependent manner. *Infect. Immun.* 1999; **67**: 1623–32.
114. Vives-Pi M, Somoza N, Fernandez-Alvarez J *et al.* Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2003; **133**: 208–218.
115. Claire L Harris,^{*} Miriam A Vigar,^{*} Julia E Rey Nores,[†] Vaclav Horejsi,[‡] Mario O Labeta,[†] and B Paul Morgan The lipopolysaccharide co-receptor CD14 is present and functional in seminal plasma and expressed on spermatozoa
116. Jalkanen, S. and Jalkanen, M. (1992) Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J. Cell Biol.* **116**, 817–825
117. Faassen, A.E., Schrager, J.A., Klein, D.J., Oegema, T.R., Couchman, J.R. and McCarthy, J.B. (1992) A cell surface chondroitin sulphate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J. Cell Biol.* **116**, 521–531

- 118.Henke, C.A., Roongta, U., Mickelson, D.J., Knutson, J.R. and McCarthy, J.B. (1996) CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix. *J. Clin. Invest.* **97**, 2541–2552
- 119.Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., Shaw, S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature*, 361(6407), 79-82, 1993.
- 120.Lesley, J., Kincade, P.W. and Hyman, R. (1993) Antibody-induced activation of the hyaluronan receptor function of CD44 requires multivalent binding by antibody. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1902–1909
- 121.Patel D.D., Liao H., Haynes B.F. CD44 workshop panel report. “Leucocyte Typing VI” (Ed. Kishimoto T., Kikutani H. Ve ark.)’da, Garland publishing, 1998, s.373-375
- 122.Ross J.A., Borland G., Sadler K.M., Guy K. Induction of CD44 variantexpression and upregulation of CD44expression on K562 cells. “Leucocyte Typing VI” (Ed. Mason D ve ark.)’da, Oxford University Press,2002 s. 17-19
- 123.Oostendrop R.A., Spitzer E., Reisbach G., Dörmer P. CD44 workshop: CD44 modulates adhesive behavior of hemapoietic progenitor cells. “Leucocyte Typing VI” (Ed. Kishimoto T., Kikutani H. Ve ark.)’da, Garland publishing, 1998, s.378-379
- 124.Rani Bains B.Sc, Jude Adhedge, Ray J. (2002) Carson Human sperm cells Express CD44. *Fertility and Sterility* 78, No;2 August
- 125.Béatrice Baury , Damien Masson , Brian M. McDermott, Jr. , Anne Jarry , Hervé M. Blotti  re , Philippe Blanchardie , Christian L. Labois  se , Patrick Lustenberger , Vincent R. Racaniello and Marc G. Denis.Identification of secreted CD155 isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 309, Issue 1, September 2003, Pages 175-182
- 126.Steffen Mueller , Thomas A Rosenquist , Yoshimi Takai , Richard A Bronson , Eckard Wimmer. Loss of nectin-2 at Sertoli-spermatid junctions leads to male infertility and correlates with severe spermatozoan head and midpiece malformation, impaired binding to the zona pellucida, and oocyte penetration. *Biol Reprod.* 2003 Oct ;69 (4):1330-40 12801998