



T. C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**AZOSPERMİK OLGULARDAN ALINAN TESE DOKULARININ
MİKROBİYOTA YÖNÜNDEN ANALİZİNİN ERKEK
İNFERTİLİTESİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

AYŞE ALTUN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. İLKNUR KESKİN

İSTANBUL- 2023

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji
Tez Sahibi : Ayşe ALTUN
Tez Başlığı : Azospermik olgulardan alınan TESE dokularının mikrobiyaya
yönünden analizinin erkek infertilitesi ile ilişkisinin araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 13.06.2023

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

<u>Danışman</u>	<u>Kurumu</u>	<u>İmza</u>
Doç.Dr. İlknur KESKİN	İstanbul Medipol Üniversitesi	
<u>Sınav Jüri Üyeleri</u>		
Prof.Dr. Süleyman YILDIRIM	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Doç.Dr.Seda KARABULUT	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Doç.Dr. Turan DEMİRCAN	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	
Doç.Dr. Murat DURSUN	İstanbul Üniversitesi	

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu ve planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallara uygun olarak elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgilere ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bunları kaynaklar listesinde belirttiğimi, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ayşe ALTUN

TEŞEKKÜR

Doktora tez süresi boyunca benim ile bilgi birikimini paylaşan, hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, deneyimleri ve desteği ile her zaman yanımda olan danışmanım Sayın Prof. Dr. İlknur Keskin'e, çalışmamın örnek temininde ve deneysel aşamalarında elinden gelen tüm özveriyi gösteren sevgili hocam Prof. Dr. Ateş Kadioğlu'na, Doç. Dr. Murat Dursun'a, Dr. Sibel Bulgurcuoğlu Kuran'a, Dr. Erva Seviç Yılmaz'a ve Uzm. Bio. İlkay Özdemir'e,

Laboratuvar çalışmalarım süresince yanımda olan, yardımını ve bilgisini benimle paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Süleyman Yıldırım'a, Prof. Dr. Betigül Öngel'e ve Doç. Dr. Seda Karabulut'a,

Deney aşamalarımda bana ev sahipliği yapıp, özverili şekilde destek olan İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı ekibine,

Doktora eğitimimde her an yanımda olan doktora arkadaşlarım Kübra Nur Uzun'a ve Dilara Dağlı'ya,

Eğitim hayatım boyunca beni cesaretlendiren, desteğini ve sevgisini her daim hissettiren, üzerimde sonsuz emeğe sahip olan başta sevgili anneme ve sevgili babama, tüm aileme minneti bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
RESİMLER LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Erkek Genital Sistemi	5
4.1.1. Testis histolojisi	6
4.1.2. Seminifer tübüller.....	8
4.1.3. İnterstisyel doku	13
4.1.4. Semen.....	15
4.2. Erkek İnfertilitesi	16
4.3. Kan Testis Bariyeri ve Zonula Okludens (ZO)	17
4.3.1. Bağlantı dinamikleri ve spermatogenezdeki rolü.....	19
4.4. Mikrobiyota.....	20
4.4.1. Ürogenital mikrobiyota	23
4.4.2. Mikrobiyota ve testis bağlantısı	24
4.4.3. Erkek infertilitesinde mikrobiyota	28
5. MATERYAL VE METOT	33
5.1. Hasta Grupları	33
5.2. Örneklerin Toplanması.....	35
5.3. Işık Mikroskobu Preparasyonu	36
5.3.1. Hematoksilen-eozin boyama.....	36
5.3.2. Gram boyama	37

5.3.3. Dokuda ZO-1 proteinin immünohistokimyasal olarak boyaması	37
5.4. Floresan Mikroskop Preparasyonu.....	39
5.4.1. Dokuda Neisseria Gonorrhoeae immünfloresan boyaması	39
5.5. Testis Dokusunda Mikrobiyota Çalışması	39
5.5.1. Testis dokusundan DNA ekstraksiyonu	39
5.5.2. DNA ölçümü	40
5.5.3. 16s rRNA gen sekanslama ve bileşimsel analizler	41
5.6. Geçirimli Elektron Mikroskobu Preparasyonu	42
5.7. İstatiksel Değerlendirme	42
6. BULGULAR	43
6.1. Hastaların Demografik Sonuçları.....	43
6.2. Işık Mikroskobu Bulguları	44
6.2.1. Hematoksilen-eozin değerlendirmesi	44
6.2.2. Gram boyama değerlendirilmesi	52
6.2.3. Dokuda ZO-1 proteinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi	56
6.3. Floresan Mikroskop Bulguları	59
6.3.1. Dokuda Neisseria gonorrhoeae varlığının immünfloresan olarak değerlendirilmesi	59
6.4. Testis Dokusunda Mikrobiyota Bulguları	61
6.5. Geçirimli Elektron Mikroskop Bulguları	70
7. TARTIŞMA	77
8. SONUÇ	83
9. KAYNAKLAR	84
10. ETİK KURUL ONAYI	94
11. ÖZGEÇMİŞ	96

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

AEC	3-amino-9-etilkarbazol
AMH	Anti-Müllerian Hormon
BM	Bakteriyel Mikrobiyom
CDT	Elüsyon Tamponu
DAPI	4 6, 6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	Etilen Diaminetetraasetik Asit
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
FSH	Folikül Stimüle Hormon
H-E	Hematoksilen-Eozin
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
KTB	Kan Testis Bariyeri
LH	Luteinizan Hormon
LDT	Hücre Lizis Tamponu
MDT	Doku Lizis Tamponu
MESA	Mikrocerrahi ile Sperm Aspirasyonu
OAT	Oligoastenoteratozoospermi
OTU	Operasyonel Taksonomik Ünite
PBS	Fosfat Tamponu, Phosphate Buffered Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PESA	Perkutan Epididimal Sperm Aspirasyonu
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asid
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
SAM	S-adenozil-L-metiyonin
TESA	Testiküler Sperm Aspirasyonu
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
UV	Ultraviyole
WDT	Yıkama Tamponu
ZO-1	Zonula Okludens-1

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.	Erkek üreme sisteminin bileşenleri.	5
Şekil 4.2.	Testis yapısı ve testisi saran yapılar.	7
Şekil 4.3.	Testisin ışık mikroskopik kesiti.	8
Şekil 4.4.	Seminifer tübül duvarında spermatogenik seri hücreleri ve sertoli hücrelerinin yerleşimi.	9
Şekil 4.5.	Spermatogenez evreleri.	10
Şekil 4.6.	Spermiyogenez evreleri.	11
Şekil 4.7.	Sertoli hücrelerinin yapısı.	13
Şekil 4.8.	İnterstisyel hücrelerin yapısı.	15
Şekil 4.9.	Sertoli hücreleri arasındaki KTB'yi oluşturan sıkı bağlantı bölgeleri. ...	19
Şekil 4.10.	Bağırsak mikrobiyotasının testis ve bağırsak eksenini arasındaki geçişi. ..	26
Şekil 4.11.	<i>Neisseria Gonorrhoeae</i> 'nin ürogenital sistem epiteline invazyonu.	27
Şekil 4.12.	Seminal sıvıda tespit edilen bakteri türleri.	29
Şekil 4.13.	Spermatogenik seri hücreleri boyunca negatif ve pozitif etkiye sahip bakteri türleri.	30
Şekil 4.14.	Erkek üreme sisteminde spermin maruz kaldığı mikrobiyal ortam.	31
Şekil 4.15.	Üriner sistem, bağırsak, testiküler ve seminal yapının mikrobiyom içerikleri...	32
Şekil 5.1.	Çalışma tasarımına ait Materyal-Metot akış şeması.	34
Şekil 6.1.	TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait alpha çeşitlilik analizinde Shannon test verileri.	62
Şekil 6.2.	TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait alpha çeşitlilik analizinde Chao test verileri.	62
Şekil 6.3.	TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait alpha çeşitlilik analizinde Simpson testi verileri.	63
Şekil 6.4.	TESE (+) ve TESE (-) grupları beta çeşitlilik analizinde PCA test verileri.	64
Şekil 6.5.	TESE (+) ve TESE (-) grupları beta çeşitlilik analizinde PCoA-bray test verileri.	64
Şekil 6.6.	TESE (+) ve TESE (-) grupları arası beta çeşitlilik analizinde PCoA-Unifrac test verileri.	65

Şekil 6.7.	Krona analizine göre TESE (+) grubundaki bakterilerin oranları.....	66
Şekil 6.8.	Krona analizine göre TESE (-) grubundaki bakterilerin oranları.....	66
Şekil 6.9.	Gruplar arası phylum analizinin taxabar plot verileri.	67
Şekil 6.10.	Gruplar arası genus analizinin taxabar plot verileri.	68
Şekil 6.11.	Core Mikrobiyom analizinde TESE (+) gruba ait bakteri yoğunluğu.....	69
Şekil 6.12.	Core Mikrobiyom analizinde TESE (-) gruba ait bakteri yoğunluğu.....	70



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1. Johnsen skorlama kriterleri	37
Tablo 6.1. Hastalara ait demografik veriler.....	43
Tablo 6.2. Kontrol grubuna ait ejakülat sperm parametreleri.....	43
Tablo 6.3. Çeşitli parametreler açısından gruplar arası ortalamaların ($\pm$ o.s.h ile) karşılaştırılması.	44
Tablo 6.4. Tüm dokuların histopatolojik değerlendirmesi ve Johnsen skorlaması. .	46



RESİMLER LİSTESİ

- Resim 6.1.** Kontrol grubuna ait testis dokusu. Seminifer tübülde spermatogonyum (siyah ok), spermatositler (kırmızı ok, yeşil ok), elongated sperm hücresi (mavi ok), tübül lümenine doğru sıralanmış spermatogenik seri hücreleri (mavi çizgi) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, Bar: 50µm, H-E boyama. 47
- Resim 6.2.** Kontrol grubuna ait bütünlüğünü koruyan bir seminifer tübülün yapısı. Spermatogenik seri hücrelerinin tümünü içerdiği görülmektedir. Mavi oklar sperm hücrelerinin başlarını göstermektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar: 10µm, H-E boyama. 48
- Resim 6.3.** TESE (+) gruba ait testis dokusu. Seminifer tübül bazal membranı (gri ok), spermatogonyum (siyah ok), spermatositler (kırmızı ok, yeşil ok), elongated sperm hücresi (mavi ok) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, Bar: 50µm, H-E boyama. 49
- Resim 6.4.** TESE (+) gruba ait seminifer tübül içinde yer alan elongated sperm hücresi (mavi ok). Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, Bar: 50µm, H-E boyama. ... 50
- Resim 6.5.** TESE (-) gruba ait testis dokusu. Az sayıda spermatogonyum varlığı hipospermatogenezin (germ hücre hipoplazisi) göstergesidir. Germinal epitelin gevşek ve incelmış olduğu görülmektedir. Spermatogenik seri hücreleri içermeyen atrofik tübül yapısı dikkat çekmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar: 10µm, H-E boyama. 51
- Resim 6.6.** TESE (-) gruba ait seminifer tübül yapısı. Seminifer tübül duvarında hyalin, fibröz ve eozinofilik materyal ile konsantrik kalınlaşma (siyah ok) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, Bar: 50µm, H-E boyama. 52
- Resim 6.7.** Gram boyama kontrolü için, hazır kültürden gram pozitif kok (kırmızı) ve gram negatif çomak (mavi) bakterileri alınıp lam kenarlarına yayılarak korele boyama yapılmıştır. 53
- Resim 6.8.** Kontrol grubuna ait testis sürüntüsünde bakteri boyanması mevcut değildir, Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar: 10 µm, Gram boyama. . 54

- Resim 6.9.** TESE (+) gruba ait testis sürüntüsünde bakteri varlığı gösterilmiştir. Gram negatif diplokoklar pembe renkte (siyah ok) ve gram pozitif koklar mor benzeri renkte (kırmızı ok) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar: 10 µm, Gram boyama. 55
- Resim 6.10.** TESE (-) gruba ait testis sürüntüsünde bakteri varlığı gösterilmiştir. Gram negatif diplokoklar pembe renkte (siyah ok) ve gram pozitif koklar mor benzeri renkte (kırmızı ok) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar: 10 µm, Gram boyama. 56
- Resim 6.11.** Kontrol grubuna ait testis dokusunda sertoli hücreleri arası bağlantı bölgelerinde ZO-1 (→) ekspresyonu mevcuttur. Seminifer tübüller (ST), Bazal Membran (BM), İnterstisyum alanı (IS). Işık Mikroskobu, Büyütme: 40X, ZO-1 immunohistokimya boyaması. 57
- Resim 6.12.** TESE (+) gruba ait testis dokusunda bazı seminifer tübüllerde (ST) Bazal Membran (BM) altında sertoli hücreleri arası bağlantı bölgelerinde ZO-1 (→) ekspresyonu mevcuttur. Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, ZO-1 immunohistokimya boyaması..... 58
- Resim 6.13.** TESE (-) gruba ait testis dokusunun bazı seminifer tübüllerin (ST) Bazal Membrana (BM) yakın bölgesinde bazal kompartmanda hafif ZO-1 (→) boyanması görülmüştür. İnterstisyum alanı (IS), Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, ZO-1 immunohistokimya boyaması..... 58
- Resim 6.14.** Kontrol grubunda *Neisseria gonorrhoeae* immünfloresan boyaması; A- Spermatogenik seri hücrelerinin tümünü içeren seminifer tübül yapısı (halka, çizgi) Büyütme: 40X, B- DAPI ile çekirdek boyanması (beyaz ok) Büyütme: 100X, Floresan mikroskobu. 59
- Resim 6.15.** TESE (+) gruba ait testis dokusunda *Neisseria gonorrhoeae* immünfloresan boyaması. Spermatogenik seri hücreleri mevcut olan mozaik bir tübülün yapısı, A-B mikrograflarında seminifer tübüller arası ve seminifer tübül içi FITC yeşil boyaması (beyaz ok), A Büyütme: 40X, B Büyütme: 100X, Floresan mikroskobu. 60

- Resim 6.16.** TESE (-) gruba ait testis dokusunda *Neisseria gonorrhoeae* immünfloresan boyaması. Spermatogenik seri hücreleri içermeyen boş tübül yapısı (halka), A-B mikrograflarında seminifer tübüller arası ve seminifer tübül içi FITC yeşil boyaması (beyaz ok). A Büyütme: 40X, B Büyütme: 100X, Floresan mikroskobu. 60
- Resim 6.17.** Kontrol grubuna ait testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) sertoli hücreleri arasında izlendi. Büyütme X20000..... 71
- Resim 6.18.** Kontrol grubuna ait mikrobiyota gözlenmeyen testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sertoli hücreleri arası sıkı bağlantıların (→) varlığı kan-testis bariyerinin korunduğunu göstermektedir. Büyütme X20000..... 72
- Resim 6.19.** TESE (+) grupta mikrobiyota gözlenmeyen testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sertoli hücreleri arası sıkı bağlantılar (siyah ok) ile doku bütünlüğü korunmuştur. Sertoli hücre çekirdeği (N), bazal membran (bm). Büyütme X5000. 73
- Resim 6.20.** TESE (+) grupta mikrobiyota gözlenen testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sertoli hücreleri arası sıkı bağlantılar (siyah ok), hücreler arası bağlantılarda yer yer açılmalar (kırmızı ok). Büyütme X20000..... 74
- Resim 6.21.** TESE (-) grupta mikrobiyota gözlenmeyen testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) bazal ile adluminal bölme arasında görülmüştür. Sertoli hücreleri (S), sertoli hücre çekirdeği (N). Büyütme X5000..... 75
- Resim 6.22.** TESE (-) grupta mikrobiyota gözlenen testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) bazal kompartmana yakın görülmüştür ve yer yer bağlantı bütünlüğünde bozulmalar gözlenmiştir. Sertoli hücreleri (S). Büyütme X75000. 76

1. ÖZET

AZOSPERMİK OLGULARDAN ALINAN TESE DOKULARININ MİKROBİYOTA YÖNÜNDEN ANALİZİNİN ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Mikrobiyota, insan vücudunun belirli bölgelerine yerleşmiş mikroorganizma topluluklarıdır. Bakteriyel mikrobiyom (BM) ise bakteri hücresi dışı mikro çevre bileşeni olarak tanımlanmıştır. Son yıllarda mikrobiyotanın insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkileri hakkında daha fazla veri elde edilmiş ve bazı hastalıkların patofizyolojisinde mikrobiyotanın rol oynadığına dair güçlü kanıtlara ulaşılmıştır. Bu durum, birçok farklı branşın insan mikrobiyotasına ilgi duymasına neden olmuş ve bu konu üzerine yapılan çalışmalar önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, günümüzde patojen odaklı çalışan tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarları için, insan florasında bulunan ve patojen olmayan yüzlerce bakteri, mantar ve virüsün tanımlanması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Erkek infertilitesinin genitoüriner sistem enfeksiyonları ile ilişkisi ve doğrudan mikrobiyal etkiye bağlı olup olmadığı henüz belirlenememiştir. Çalışmamızda mikroskobik testiküler sperm ekstraksiyonu (m-TESE) yöntemiyle elde edilen testis dokuları kullanılmıştır. İnfertil erkek hastalara ait ejakülatta sperm varlığı gözlenen testis dokusu kontrol grubu olarak belirlenirken, azospermi olduğu bilinen hastalardan elde edilen sperm içeren ve sperm içermeyen testis dokuları çalışma grupları olarak belirlenmiştir. Testiküler dokuların mikrobiyota içeriğine bakılmış ve mikrobiyota ile spermatogenez ilişkisi araştırılmıştır. Kontrol grubuna ait testis dokularında mikrobiyota gözlenmemiştir. Sperm içeren TESE (+) ve sperm içermeyen TESE (-) çalışma gruplarına ait testis dokularında ise Kan-Testis Bariyerinde (KTB) bozulma olan örneklerde mikrobiyotaya rastlanmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre, kontrol grubunda bütünlüğünü korumuş seminifer tübül yapısı gözlenirken TESE (+) ve TESE (-) gruplarda seminifer tübül yapısının bozulma görülmüştür. Kontrol grubunda ve sperm içeren testis dokusunda KTB yapısında bulunan Zonula Okludens-1 (ZO-1) ekspresyonu normal olarak gözlenmiştir. Sperm içermeyen testis dokularında ise bazı tübül yapılarında Sertoli hücrelerinin lateral yüzeyleri boyunca ZO-1 ekspresyonu gözlenirken, bazılarında ZO-1 ekspresyonu gözlenmemiştir. Geçirimli elektron mikroskobu ile hücreler arası sıkı bağlantı yapısı üzerine elde ettiğimiz bulgular, ışık mikroskobu bulgularımızı destekler niteliktedir. Bu bilgiler ışığında Sertoli hücrelerindeki azalmış ZO-1 ekspresyonunun artmış mikrobiyota varlığıyla ilişkili olarak spermatogenez sürecini etkileyebileceği düşünülmektedir. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların spermatogenezde rolü olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda, azospermik hastalara ait KTB'nde bozulma gözlenen testis dokularında *Neisseria gonorrhoeae* bakterisi immünfloresan yöntemlerle gösterilmiştir. Ayrıca gram boyama ile negatif çomak ve pozitif kok varlığı gösterilerek yeni nesil dizileme yöntemi ile yapılan genetik tabanlı analizlerle mikrobiyota varlığı kanıtlanmıştır. Bu doğrultuda KTB'nin bozulmasıyla ilişkili olarak lenfatik veya hematojen yolla testise bakteri taşınmasının infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Azospermi, Erkek İnfertilitesi, Kan-Testis Bariyeri, Mikrobiyota

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF MALE INFERTILITY ASSOCIATION WITH MICROBIOTA ANALYSIS OF THE TESTIS TISSUE FROM AZOOSPERMIC CASES

Microbiota refers to microorganism colonies that inhabit precise parts of the human body. The bacterial microbiome (BM) is defined as an extracellular microenvironmental component. In recent years, more data has been obtained about the potential effects of microbiota on human health, and strong evidence has shown their role in the pathophysiology of some diseases. This has caused the interest of many different branches for human microbiota research and studies on this issue, have significantly increased. Moreover, the identification necessity of hundreds of bacteria, fungi, and viruses that are non-pathogens and comprise the human body has emerged for pathogen research in medical microbiology laboratories today. Male infertility association with genitourinary system infections and its connection with the direct microbial effect have not been determined yet. In our study, testis tissue was used by the microscopic testicular sperm extraction (m-TESE) method. Ejaculations which are known for their sperm content, from infertile male patients were used as the control group while sperm-containing and not-containing testicular tissue from azoospermia patients were used as the study group. The microbiota content of the testicular tissue was investigated and the association between microbiota and spermatogenesis were studied. There was no microbiota in the control group testicular tissue. Microbiota was detected in the samples with deteriorated blood-testis barrier (BTB) of the TESE (+) and TESE (-) groups. According to our findings, intact seminiferous tubule structure was observed in the control group, while tubules deteriorated in the TESE (+) and TESE(-) groups. Zonula-occludens (ZO-1) expressions were normal pertaining to BTB in the control and the sperm-containing testis groups. ZO-1 expressions were detected in Sertoli cells in some tubule structures of the testis tissue not containing sperm. Electron microscope findings of the intracellular tight junctions were supporting the results from the light microscope. With regard to these findings, the deteriorated ZO-1 expression may effect spermatogenesis in the Sertoli cells as related to the increased microbiota. Tight junctions between the Sertoli cells are known to play role in spermatogenesis. In our study, *Neisseria gonorrhoeae* bacteria were demonstrated by immunofluorescence methods in testicular tissues of azoospermic patients with impaired BTB. In addition, negative rod and positive cocci were shown by gram staining, and microbiota was proved by genetic basis analysis with next-generation sequencing. Accordingly, bacterial infections transmitted through lymphatic or hematogenic routes to the testis may cause infertility.

Key Words: Azoospermia, Blood-Testis Barrier, Male Infertility, Microbiota

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, düzenli ve korunmasız ilişkiye rağmen 1 yıl içinde gebeliğin gerçekleşmemesidir. Çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkileyen bir durumdur. Erkek infertilitesi ise bu oranın yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Günümüzde fertiliteye ait normal değerlerle ilgili olarak sperm değerlendirmesinde standardizasyon sağlanamadığından çoğu araştırmacı ve merkez Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization-WHO) kriterlerini esas almaktadır (1). Özellikle yardımla üreme kliniklerinde infertil çiftin değerlendirilmesi ve tedavi şeklinin belirlenmesinde semen özelliklerinin doğru incelenmesinin önemli rolü vardır. Sperm üretim bozuklukları, sperm kanallarındaki tıkanıklıklar, sperme karşı antikor varlığı, inmemiş testis ve testis travması doğrudan erkek infertilitesine sebep olabileceği gibi radyasyon, alkol ve sigara kullanımı, ergenlik sonrası geçirilmiş kabakulak benzeri enfeksiyonlar, hastalıklar ve hormonal bozukluklar infertiliteye yol açabilir. Sperm parametrelerinde yer alan sayı, motilite ve morfoloji kriterlerindeki anormallikler, erkek infertilitesinin başlıca nedenlerindendir. En ağır erkek infertilite durumu semende hiç sperm bulunmayan *azospermi* olgusudur (2).

Sağlam olan Kan-Testis Bariyeri'nin bozulması, seminifer tübüllerde sperm üretiminde sorun yaşanacağı iddia edilmektedir (3). Seminifer tübülde yer alan Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, adherens tipi bağlantılar ve oluklu bağlantılar KTB'ni oluşturur. Spermatogenezin düzgün şekilde gerçekleşmesinde rol oynayan Zonula Okludens-1 (ZO-1) proteini, KTB'nde bütünlüğü korumada görev almaktadır (4). Erkek genitoüriner sistem enfeksiyonlarının, erkek infertilitesine neden olacağına dair düşünceler bulunmaktadır. Erkek genitoüriner sistem enfeksiyonlarının yardımcı üreme tıbbi alanında semen parametreleri ve sperm fertilizasyon kapasitesi üzerine etkisi henüz tam olarak belirlenememiştir (5). Kültür ve moleküler temelli tanı yöntemlerinin bu alanda etkili olarak kullanılması ile mikrobiyomun sırları açıklanmaya başlanmıştır (6). Mikrobiyomu oluşturan mikroorganizma topluluğu, temelde her biri bağımsız bir genomik Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) taşıyan farklı hücrelerin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Mikroorganizma topluluğunun bütününde Ribozomal Ribonükleik Asit RNA (rRNA) (5S, 16S ve 23S) bulunmaktadır. Bakteri türleri arasında rRNA yüksek oranda korunmaktadır. Özellikle

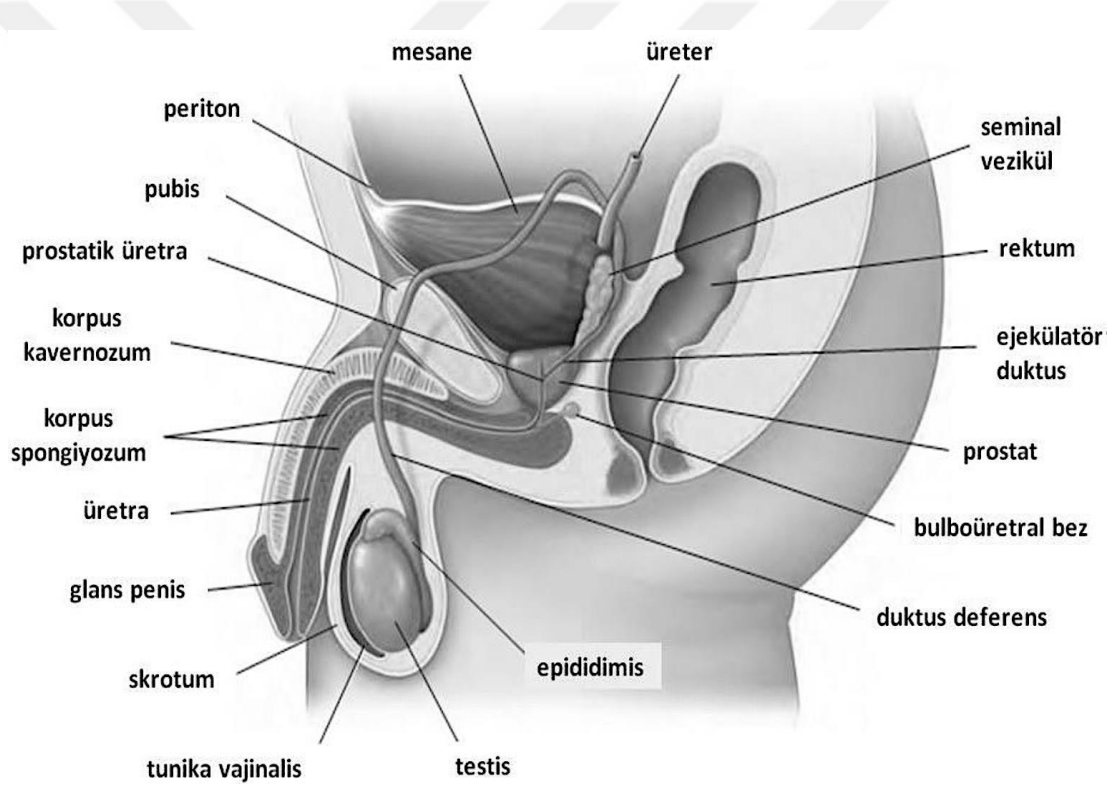
16S rRNA (transkripsiyon sonrası), hatta bazen 16S rDNA, yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğuyla, tüm bakterilerde aynı dizilimle son derece korunmuştur (7). Diğer taraftan, bakteriler tür ve alt-tür seviyesinde filogenetik ayırma ve sınıflandırmayı mümkün kılan değişken bölgelere sahiptir. Mikrobiyotaya ait mikrobik çeşitlilik, objektif analiz edilerek anlaşılmaktadır. Bu noktadan yola çıkarak, hastalıklara ilişkin mikrobiyota çeşitliliğindeki değişiklikler araştırılabilmektedir (8). Erkek üreme sistemindeki enfeksiyöz hastalıklar, sperm üretiminde bozulmaya neden olabilmektedir (9). İlk kez Alfano ve arkadaşları insan testisinin mikrobiyolojik olarak steril olmadığını ve testis dokusunda mikrobiyotanın varlığını kanıtlamışlardır (10). Bu çalışma, önemli verilerin alındığı ilk araştırma olmasına rağmen, kontrol grubunun onkolojik hastalardan oluşması ve mikrobiyota ortamının etkilenmiş olabileceği düşüncesiyle, veriler yeterince desteklenememiştir. Bu durumda daha fazla araştırma yapma gerekliliği ortaya çıkmıştır. Testiste mikrobiyota topluluğunun varlığını göstermekle birlikte, özellikle bu ortamda spermatogenezin ne şekilde etkilendiğinin araştırılması, diğer çalışmaların önünü açabilecek potansiyeldedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda, bağırsak bakteriyal mikrobiyomunun da spermatogenezini güçlü şekilde etkileyebildiği gösterilmiştir (11).

Bu tez çalışmasında, azospermik ve sperm üretimi olan infertil hastalardan testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile alınan testis dokusuna ait mevcut mikrobiyal çeşitliliğin ve spermatogenez ile ilişkisinin yeni nesil dizileme yöntemi ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda erkek infertilitesinde rol oynadığı bilinen, gram negatif *Neisseria gonorrhoeae* bakterisinin, literatürde bir ilk olacak şekilde, insan testis dokusunda immünfloresan yöntemler ile varlığının araştırılması ve gram boyama ile desteklenmesi hedeflenmiştir. Ayrıca mikrobiyota analizi yapılan testis dokularında, KTB'de önemli yeri olan sıkı bağlantı proteini ZO-1'in immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmesi ve geçirimli elektron mikroskobu altında KTB yapısı incelenerek erkek infertilitesi ile ilişkisinin araştırılması planlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Erkek Genital Sistemi

Erkek üreme sistemi, erkek seks hormonlarının (testesteron, androjen) sentezi ve sekresyonu ile birlikte, spermin sürekli üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından sorumludur. Erkek üreme sisteminde yer alan testisler erkek üreme hücresi üretiminde görevlidir. Epididimis, vaz deferens, ejakülatuar kanal ve erkek üretrasının bir parçası ise spermin depolanması ve taşınmasından sorumludur. Ayrıca seminal vezikül, prostat, bulboüretral bez ve penis erkek üreme sistemini oluşturan diğer yapılardır (12,13) (Şekil 4.1).



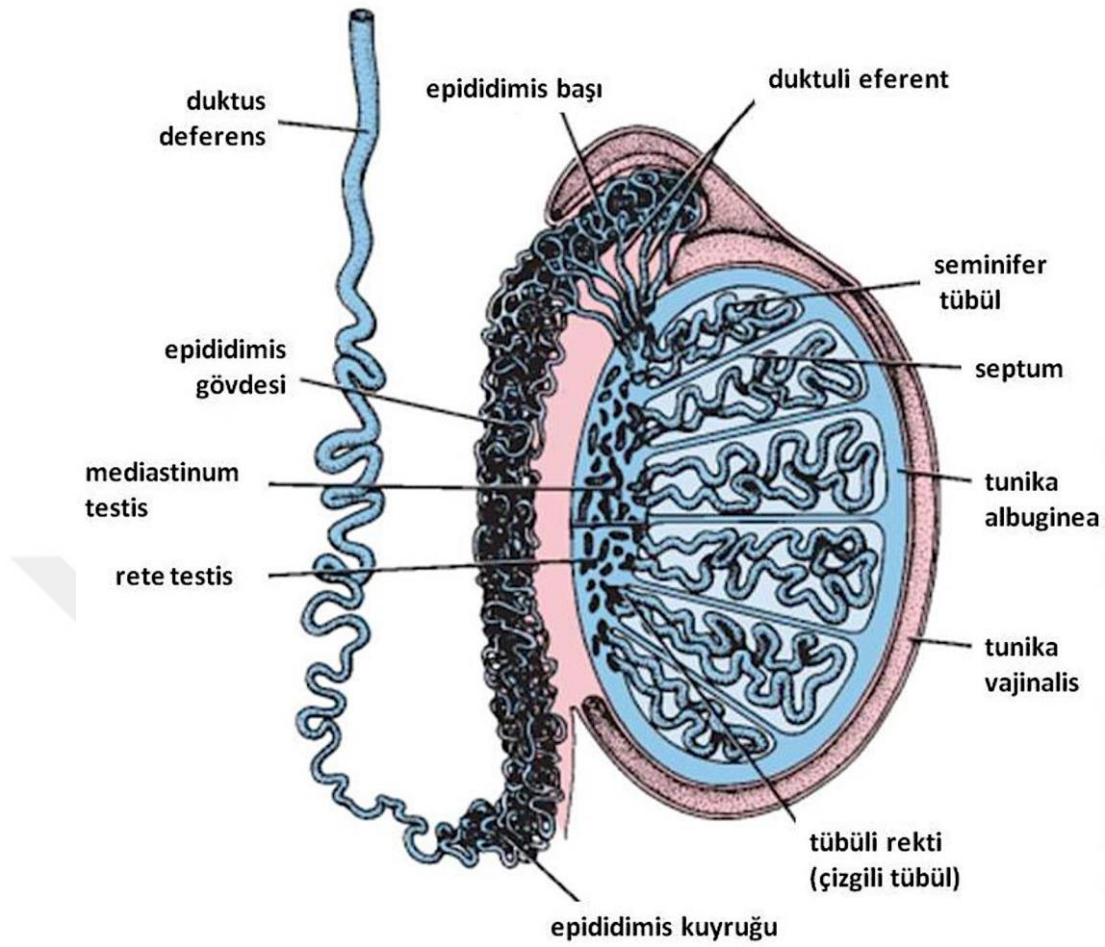
Şekil 4.1. Erkek üreme sisteminin bileşenleri (12).

4.1.1. Testis histolojisi

Erişkinde testisler yaklaşık 4x3x2.5 cm. boyutlarında olup, skrotum içerisinde yerleşmiş, melanin pigmenti ve sinir sonlanmasından zengin, kahverengi ince bir deriye sahip, sağ ve solda yerleşmiş, oval şekilli, bir çift üreme organıdır. Testisler karın boşluğu dışında olup, vücut ısısından 2-3°C düşük bir ısıda olabilmeleri için, skrotum içerisine funiculus spermaticus ile asılı olarak yer alırlar (13).

Testis, genel olarak hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyonu olan bir bezdir. Ekzokrin salgısı canlı sperm hücreleridir ve salgılama biçimi aktif holokrindir. Endokrin görevi ise intrauterin hayatta sertoli hücreleri tarafından salgılanan Anti-Müllerian Hormon (AMH) ve inhibinin yanında, leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron hormonunun salgılanması şeklindedir (14).

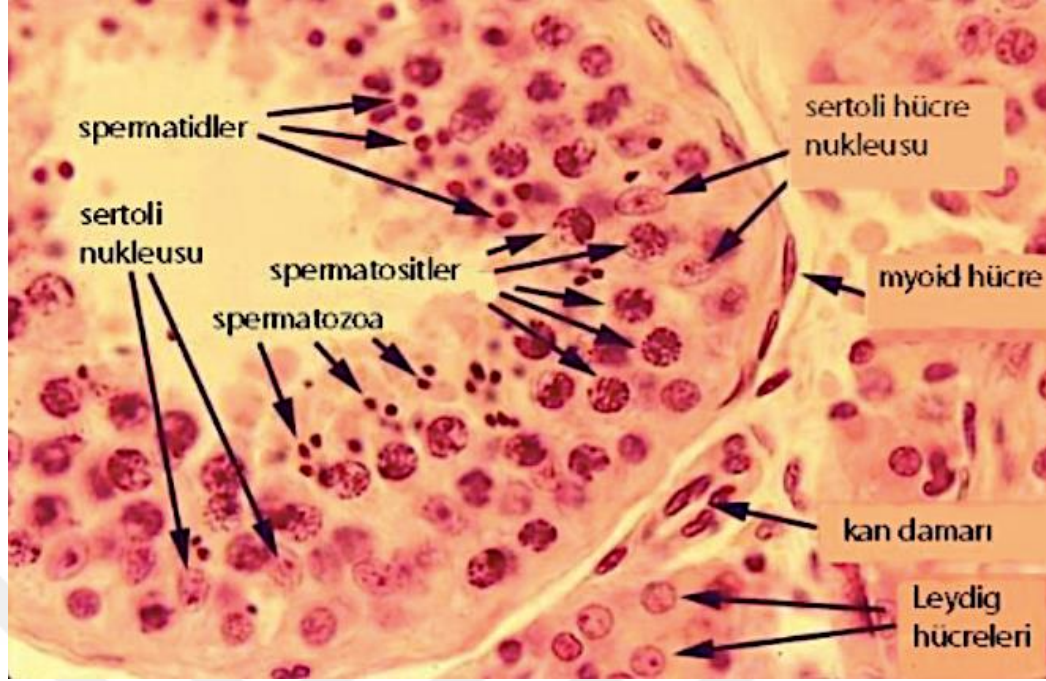
Skrotum ile testis arasında iki tabakalı testiküler kapsül bulunur. Tunika vaginalis ve tunika albuginea adını alan bu tabakalar testisi sarmaktadır. Tunika vaginalis, visseral ve pariyetal olarak iki yapraklı periton zarı olup, epiteli tek sıra mezotel hücrelerinden oluşur. Visseral yaprak tunika albugineaya yapışık bulunurken, pariyetal yaprak ise skrotumun iç yüzeyinde yer almaktadır. En belirgin tabaka olan tunika albuginea kalın fibroelastik bağ doku arasındaki düz kas lifleri ile birlikte olup, testis içindeki tübüllerin arasını doldurur. Tunika albugineanın altında damardan zengin tunika vasküloza adlı gevşek bağ dokusu yer alır. Bu tabaka tunika albugineanın testis içine olan uzantılarının iç yüzünü de örtmektedir. Bütün lobu saran pariyetal yaprağın dışında, çizgili bir kas olan musculus kremaster tabakası bulunmaktadır. Testiküler kapsül yapısı ise periyodik kasılmalar yapan dinamik bir membrandır (12,15) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Testis yapısı ve testisi saran yapılar (13).

Tunika albugineadan uzanan bağ dokuları, rete testisten organ içine girerek ışınal seyirli fibröz septumlar oluşturarak testisi 200-300 adet piramit şekilli lobüllere bölmektedir. Lobüllerin uç kısımları mediastinuma doğrudur ve her lobülde 1-4 adet aşırı kıvrımlı seminifer tübül bulunur. Lobülün tepesine doğru tübüller düzleşir ve tubuli rekti yani boşaltıcı tübüllerin ilk bölümünü oluşturur (16).

Tunika vaskülozadan köken alan ve tübüllerin arasını dolduran gevşek bağ dokusu interstisyumu ve bezin stromasını oluşturur. Her bir tübül yaklaşık 50 cm boyunda, 150-250 μm çapındadır ve toplam tübül uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüllerin epiteli çok katlı germinal epiteldir. Tübüllerin bazal membranı elastik fibrilden zengindir ve bazal membranın hemen dışında, fibroblastları ve miyoid hücreleri içeren peritübüler fibröz, tunika propria yer alır. Peritübüler dokuda kan ve lenf damarları, mononükleer lökosit ve interstisyel endokrin hücreleri bulunur (13) (Şekil 4.3) (17).

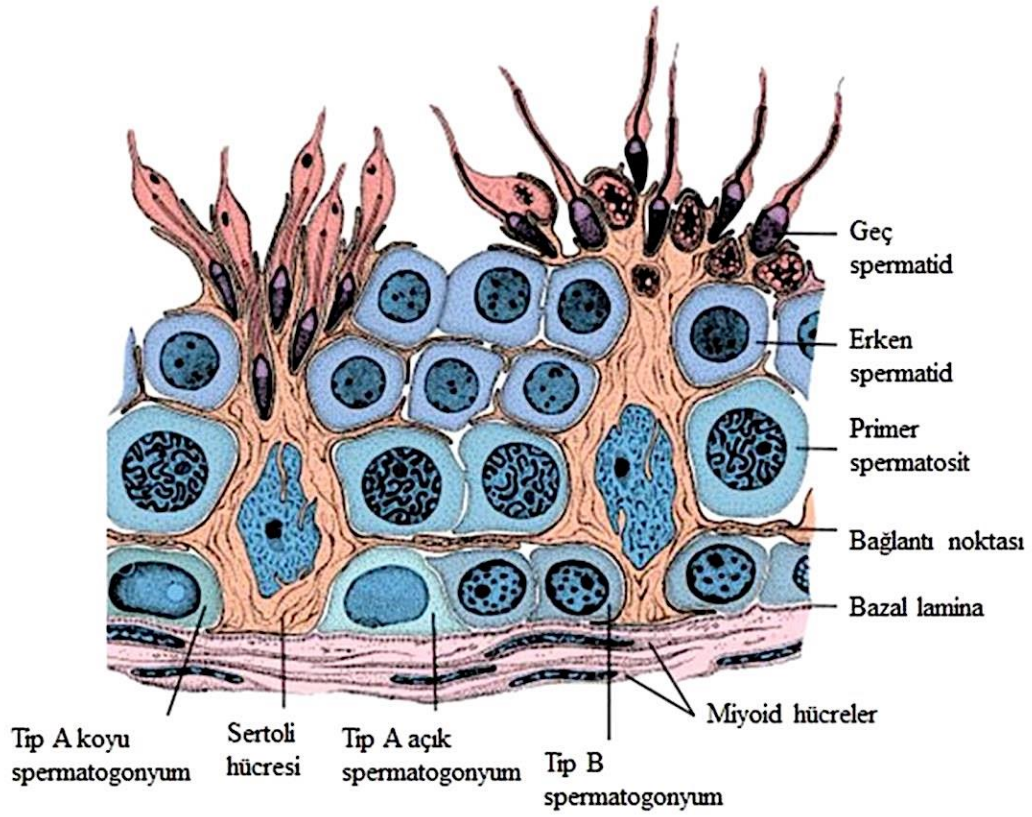


Şekil 4.3. Testisin ışık mikroskopik kesiti (17).

4.1.2. Seminifer tübüller

Testisler içinde yer alan seminifer tübüller, spermatogenezin tüm aşamalarındaki sperm öncü hücreleri bulunduran kanal sistemidir. Seminifer tübüller her testiste 600-1200 adet civarındadır ve tübüllerin çapı 150-300 mikron civarındadır. Seminifer tübüller içindeki sperm öncü hücreler spermatogenez sürecine girerek, olgun sperm hücresinin üretilmesi ve tübül lümeninden, ana kanalcığa taşınmasını sağlar. Tübül epitelinde spermatogonik hücreler ve Sertoli hücreleri yer almaktadır. Epitel yaklaşık 6-8 tabaka şeklinde organizedir ve spermatogonyumlardan olgun sperm oluşana kadar spermatogonik seri hücre tiplerinin hepsi görülmektedir (18).

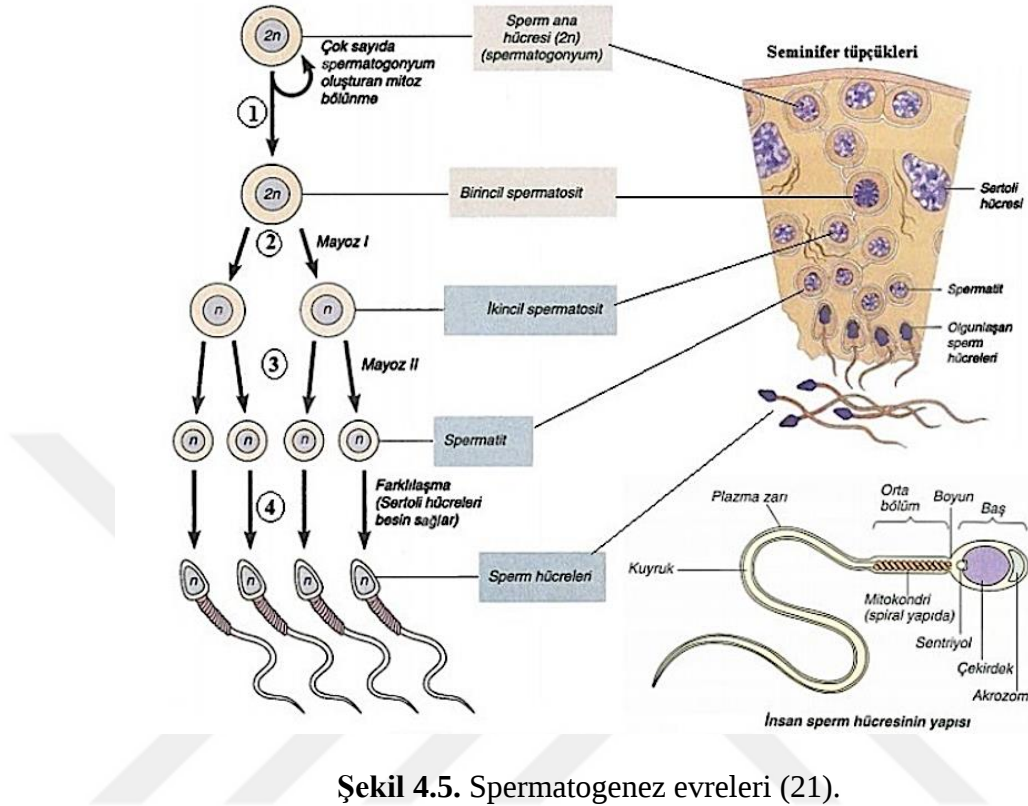
İntrauterin yaşamda 12-20. haftalarda fetüs testislerinde, leydig hücreleri aktif halde olup testosteron salgılamaya başlamaktadırlar. Bu hormonal gelişim, fetüsün erkek yönünde gelişimi için gereklidir. Postnatal dönemin 20. haftasından doğum sonrası puberteye kadar olan dönemde hormon salgısı gerçekleşmemektedir. Böylece seminifer tübüller puberteye kadar herhangi bir değişikliğe uğramazlar. Puberte sonrası primordiyal germ hücreleri, mayoz bölünmeye girmek için spermatogonyumlara farklılaşmaktadırlar. Spermatogonyumların germ hücreden farklılaşması sonucu A ve B tipi spermatogonyumlar oluşmaktadır (19) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Seminifer tübül duvarında spermatogenik seri hücreleri ve sertoli hücrelerinin yerleşimi (13).

Spermatogenez, birçok hormonal ve parakrin faktörle düzenlenen, dinamik bir süreçtir. Bu süreç, gonadotropinlerin etkisi altında otokrin, parakrin ve endokrin etkilerle gerçekleşmektedir. Spermatogonyumlardan A tipi hücreler koyu ve açık olmak üzere iki alt tipe ayrılmaktadır. Koyu A (Ad spermatogonyum) tipi spermatogonyumlar, oval heterokromatik çekirdeğe sahip hücrelerdir. Koyu A tipi ve açık A tipi (Ap spermatogonyum) hücreleri oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Açık A tipi spermatogonyumların çekirdekleri soluk boyanır ve çekirdekçik belirgin olarak izlenebilir. Açık tip A spermatogonyumlar seminifer tübüllerin bazal kompartımanında, bazal membran üzerine oturmuş durumda bulunurlar Ap spermatogonyumlar testosteronun etkisiyle 16 günde bir mitoz ile bölünerek B tipi spermatogonyuma farklılaşırlar. B tipi spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek, preleptoten primer spermatositleri oluştururlar. Diploid kromozom sayısına sahip primer spermatositler bundan sonra mayoz bölünme ile çoğalırlar. İkinci mayoz bölünme sonrası haploid kromozom sayısına sahip 4 adet spermatid meydana gelir (20).

Mayoz bölünmenin tamamı Sertoli hücrelerinin kendi aralarında oluşturdukları KTB'nin (adluminal kompartman) gerçekleşmektedir (21) (Şekil 4.5).

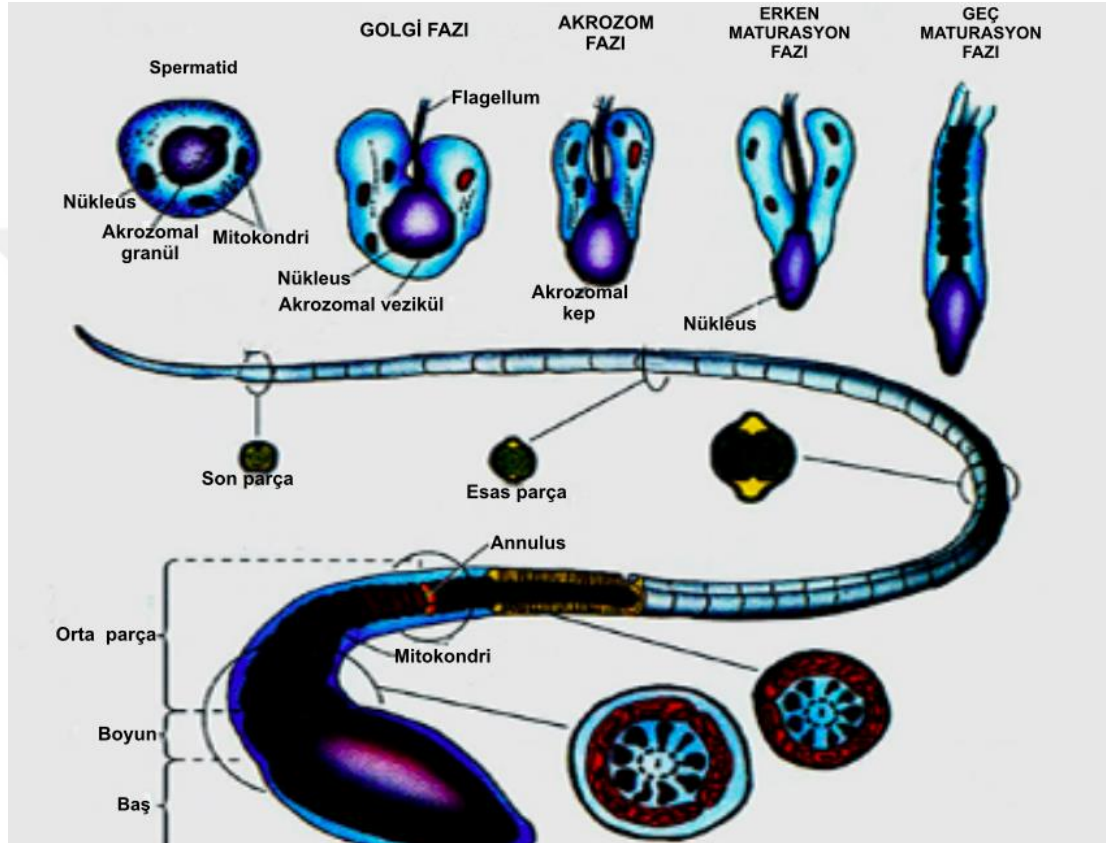


Şekil 4.5. Spermatogenez evreleri (21).

Spermatogenez takiben spermiyogenez (olgunlaşma-maturasyon) evresi devam etmektedir. Yuvarlak spermatidlerin matür spermatidlere farklılaşma süreci olan spermiyogenezde birçok gelişim evresi gerçekleşmektedir. Spermatidten olgun sperm yapısı oluşumuna kadar geçen süreçte spermiyogenezis aşamasındaki hücreler, Sertoli hücreleri ile iletişim halindedir. Bu süreç boyunca spermatidler golgi, başlık (şapka), akrozom ve maturasyon (olgunlaşma) evrelerini geçirerek olgun sperm haline dönüşmektedirler (18).

Spermatitte granüler endoplazmik retikulum tarafından üretilen hidrolitik enzimler bir araya gelerek akrozom veziküllerini oluşturur ve çekirdek zarına yapışık olarak yerleşim gösterirler. Bu sırada sentriyoller çekirdek bölgesinden ters yönde ilerleyerek kuyruğun aksonemini oluştururlar. Akrozom vezikülü büyür ve vezikülün zarı çekirdeği kısmen sarar. Son büyüklüğüne ulaştığında bu yapı artık akrozom olarak bilinir. Bu arada distal sentriolden çıkan mikrotübüller aksonem denilen yapıyı oluşturur ve kuyruk uzamaya başlar. Mitokondriler boyun bölgesinde aksonemi

evreler ve spermiyumun flagellumu meydana gelir. Spermatitlerde bu aşamada protoplazmik köprüler ortadan kalkar ve birbirleriyle olan bağlantılar kaybolur. Daha sonra, oluşan olgun spermiler seminifer tübül lümenine atılarak, tbli rektiden geçip, epididimiste depolanırlar. Maturasyonunu tamamlamamış olan spermiler hareket yeteneklerini duktus epididimiste, dölleme yeteneklerini ise dişi genital kanallarda kazanırlar (19) (şekil 4.6).



şekil 4.6. Spermiyogenez evreleri (19).

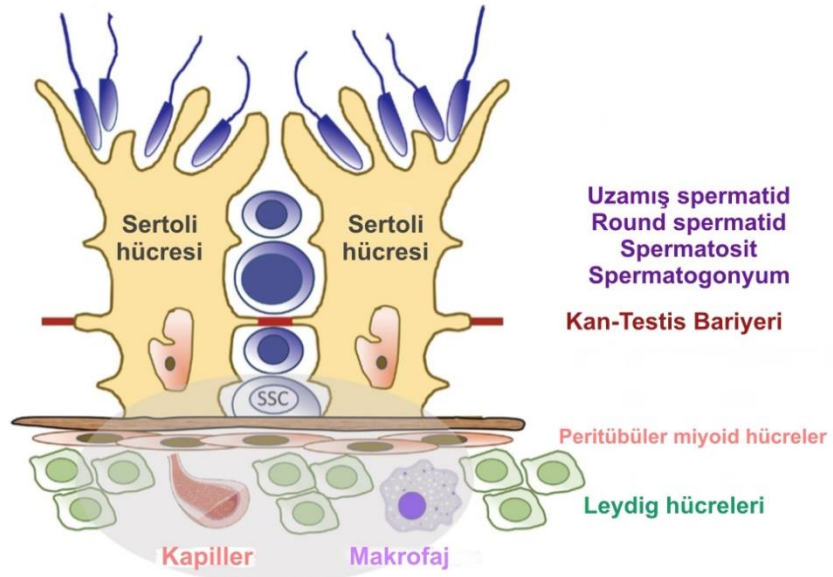
Olgun bir sperm baş, boyun, orta parça ve kuyruk bölümlerinden oluşur. Baş kısmı yassı oval olup, histon proteine sarılı yoğun kromatinli genetik materyal içerir (22). Çekirdeğin üzerini enzim içerikli akrozom yapısı sarar ve sperm başını kuşatan çok az sitoplazma içerir, en dıştan hücre zarı ile çevrilidir. Spermin ekirdeğinin altında transvers yerleşimli proksimal sentriyoller bulunur ve daha sonra orta parçası ile devam eder. Orta parçada spiral yerleşimli mitokondriler bulunur ve alt tarafta distal sentriyol ile sonlanır (23). Orta parçanın devamında kuyruk konumlanmıştır. Kuyruk esas ve son parça olmak üzere iki bölümden oluşur. Orta parçanın devamı longitudinal seyirli dış fibrillerden ve dıştan çevreleyen fibröz bir kılıftan oluşan esas parçayı

oluşturur. Son parçada ise fibriller, fibroz kılıf yönünden azalır ve sadece mikrotübüller kalır (19, 20).

Seminifer tübüllerde, tübül epiteli boyunca bazal membran üzerine oturmuş, lümene kadar uzanan Sertoli hücreleri bulunmaktadır. Çevresinde yer alan germ hücreleri ile özel bağlantı kompleksleri oluşturur ve spermatogenik seriye ait germ hücrelerinin etrafını kuşatırlar. Desmozom benzeri bağlantılar, uzamış formdaki spermatidler tutan ektoplazmik bağlantılar ile komşu germ hücreleri arasında spesifik bağlantılar kurarlar. Böylece germ hücrelerinin beslenme ve hormonal etkileşim gibi fonksiyonları Sertoli hücreleri aracılığıyla gerçekleşmiş olur. Aynı zamanda spermlerin oto-immun reaksiyonlardan korunmasında da görev alan sertoli hücreleri, spermatidin farklılaşması sırasında açığa çıkan sitoplazmik fragmantasyonları da fagosit eder (24).

Sertoli hücreleri arasında bulunan bağlantı kompleksleri KTB'ni oluşturur. KTB pubertede spermatogenez başladığı zaman oluşur. KTB tübül içinde konumuna bağlı olarak seminifer epiteli iki kompartmana ayırmaktadır. Spermatogonyumlar ve öncü spermatositleri (leptoten, zigoten) içeren bazal kompartman ve olgun spermatositler (pakiten), spermatidler ve spermatozoaları içeren adluminal kompartman şeklinde iki bölüme ayrılmıştır (Şekil 4.7). Testis içindeki kan damarlarının duvarları ve peritübüler miyoid hücreleri de KTB fonksiyonuna katkıda bulunur (25).

Sertoli hücre salgısı, filament ve mikrotübüller yardımıyla spermatogenik hücrelerin lümene doğru salınmasını sağlar. Sertoli hücrelerinin ayrıca, hem endokrin hem ekzokrin salgıları vardır. Folikül Stimüle Hormon (FSH) etkisiyle salgıladığı androjen bağlayan protein testostereona bağlanarak, seminifer epitelde spermatogenez için gerekli olan testosteron miktarını ayarlar. Sertoli hücrelerinin salgıladığı steroid olmayan faktör inhibin de, hipofizden FSH üretimini baskılayarak spermatogeneze girecek olan spermatogonyumların sayısının ayarlanmasına katkıda bulunur. Diğer Sertoli hücre ürünleri arasında, ekstrasellüler matriksi oluşturan maddeler (laminin, kollagen tip IV ve tip I), proteinler (seruloplazmin, transferrin, inhibin, büyüme faktörleri vd) ve steroidler (dihidrotestosteron, testosteron, androstenediol, östradiol vd) yer almaktadır (19).



Şekil 4.7. Sertoli hücresinin yapısı (26).

4.1.3. İnterstisyel doku

Seminifer tübüllerin arasını dolduran bağ dokusu interstisyel doku olarak adlandırılmaktadır. Bu doku içerisinde leydig (interstisyel) hücreler, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, farklılaşmamış mezenkimal hücreler ve pencereli kapillerler bulunmaktadır (27) (Şekil 4.8).

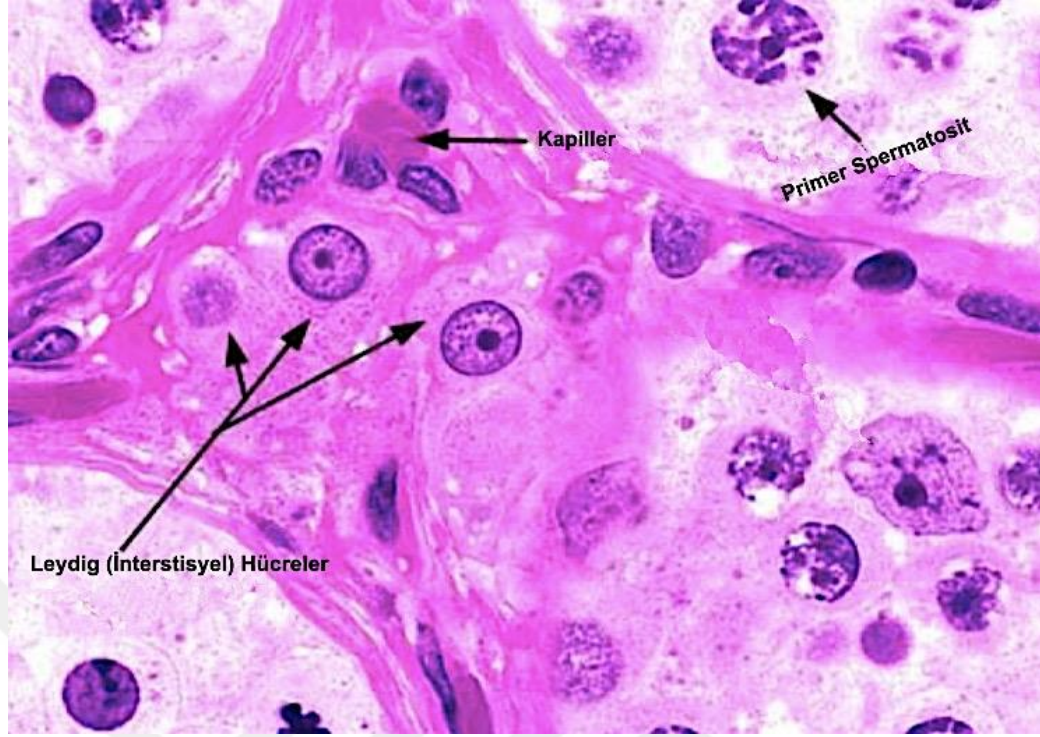
Leydig hücreleri, testis hacminin %3'ünü oluşturmaktadır. Bu hücelere özellikle kan damarlarının etrafında, tek tek ya da gruplar halinde rastlanmaktadır. Plazenta kökenli gonadotropinlerin etkisiyle testosteron hormonu üretmek leydig hücrelerinin görevlerinden biridir. Puberte öncesinde leydig hücrelerine bağlı testosteron üretimi en düşük seviyelerdeyken puberte sonrası yüksek seviyelerde devam etmektedir. Bu hormon, fetüste erkek genital organların embriyolojik farklılaşmasında rol almaktadır. Erken fetal dönemde sayıları oldukça fazladır. Gebeliğin beşinci ayından sonra ise leydig hücreleri dejenerasyona uğramaya başlar ve sayıları gittikçe azalır. Buna bağlı olarak testosteron düzeyi de gittikçe düşmektedir. Doğumdan sonra bu hücrelerin uyarımını sağlayan plazenta yapısı ortadan kalktığı için hücreler tamamen dinlenmeye çekilmektedirler. Puberte döneminde ise hipofizden salgılanan Luteinizan Hormonun (LH) etkisiyle leydig hücreleri tekrar aktifleşmektedir. Leydig hücrelerinin salgılamış olduğu testosteron hormonunun

(androjen) bir diğ er görevi de erkeklerde sekonder seks karakterlerinin gelişmesidir (25).

Leydig hücreleri, büyük ovoid ya da poligonal şekilli ve asidofil hücrelerdir. Steroid hormon salgılayan hücrelerde görülen tipik lipid damlacıklarını içermektedirler. Çok sayıda mitokondriye ek olarak, iyi gelişmiş golgi aygıtı ve agranüler endoplazmik retikulum'a sahiptirler.  ubuk biçimli Reinke kristalleri bu hücrelerde dikkat çeken oluşumlardan biridir. Ancak bu kristallerin fonksiyonları henüz tam olarak açıklanamamıştır (28).

Spermatogenik hücreler yüksek ısıya dayanıksızdırlar. Bu hücreler için ideal ısının 35 C olduğu bildirilmiştir. Zengin bir venöz pleksus, testiküler arterlerin etrafını sararak normal kan dolaşımına ters bir ısı akımı sağlar ve böylece spermatogenik hücreler için uygun ortam sıcaklığı sağlanmış olur. Kriptor idizmde (inmemiş testis) spermatogenez vücut ısısı ile baskılanmaktadır ancak leydig hücreleri vücut ısısına karşı dayanıklıdır. Bu nedenle infertilite vakalarının %90'ında sperm üretiminde bozulmalar meydana gelse de sekonder seks karakterleri normal olarak ortaya çıkmaktadır (29).

Yapılan araştırmaların sonuçlarına göre kötü beslenmenin, aşırı alkol kullanımının, kadmiyum tuzlarının, bazı ilaçların ve radyasyona maruziyetin spermatogenik hücrelere toksik etki göstererek kısırlığa yol açtığı bildirilmiştir. Zararlı etkenler ortadan kalktığında seminifer epitelde geriye kalan spermatogonyumlar rejenere olarak spermatogenez sürecini yeniden başlatabilmektedirler (15).



Şekil 4.8. İnterstisyel hücrelerin yapısı (30).

4.1.4. Semen

Testisten salgılanan sperm, prostat bezi salgısı, seminal vezikül bezi salgısı ve bulboüretal bezlerin salgılarından oluşan viskozitesi yüksek sıvıya semen denilmektedir. Makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilen farklı içeriklerdeki semen sıvısı, miktarı ve sperm sayısı açısından farklılık göstermektedir. Semen sıvısı makroskopik olarak incelendiğinde 2-6 ml miktarında, opak gri renkte ve pH'ının 7,2-8 olması gerekmektedir. Mikroskopik değerlendirmede semen sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi açısından incelenmektedir. Sperm sayımı için Neubauer, hemositometre, makler gibi çeşitli sayım kamaraları ile total semen sıvısı içerisindeki sperm sayısı verilmektedir. Sperm sayısına göre ml'deki sperm sayısının 16 milyon/ml ve üzeri olması *normospermi*, 16 milyon/ml'den az olması *oligozoospermi*, 100.000/ml'den az olması *kriptozospermi*, tüm semen sıvısında hiç sperm bulunmaması *azospermi* olarak adlandırılmaktadır. Motilite yönünden sperm, lineer bir şekilde ileri yönde hızlı, ileri yönde daha yavaş ve yerinde hareket ederler. Hareketsiz immotil sperm de bulunabilmektedir. Hareket probleminin artmasına bağlı olarak *astenospermi* ortaya çıkmaktadır. Bu durum ml'de %40'ın altında motil spermin görülmesi olarak tanımlanmaktadır. Sperm hücresinin baş, boyun ve kuyruğunun yapısal olarak

değerlendirilmesi ile morfolojisi belirlenir. Baş, boyun ve kuyruk anomalilerine bağlı olarak erkek infertilite sorunu doğmaktadır. Normal morfolojinin Kruger kriterlerine göre %4'ün altında olması sonucu *teratospermi* tanısı verilmektedir (31).

4.2. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, çiftlerde en az bir yıl süreyle korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması durumu olarak ifade edilmektedir (31). Bu durumun yaklaşık %40'ı erkeğe bağlı sebeplerden kaynaklanmaktadır. Erkek infertilitesi genetik ve epigenetik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır.

Testislerde sperm üretimi, hipotalamus ve hipofiz bezlerin kontrolündedir. Bezlerden salgılanan FSH, LH, prolaktin ve testosteron hormonlarının seviyelerinin düşüklüğü ya da yüksekliği sperm üretim bozukluğuna neden olmaktadır. Bu hormonların tümünün düşüklüğü hipogonadotropik hipogonadizm durumunu oluşturur. Sperm üretiminin bozuk olduğu durumlarda FSH hormonu yüksek olma eğilimindedir. FSH spermatogenezi, LH ise testislerden testosteron salgılanmasını kontrol etmektedir. Sperm üretiminin yetersizlik durumunda testosteron seviyesinin düşük olduğu görülmektedir. Kişiye bağlı özellikler de hormon seviyesini etkileyen bir durumdur (32).

Erkek infertilitesinde özellikle sperm sayısının 5 milyonun altına indiği ciddi sperm sayı problemlerinde genetik durum araştırılmalıdır. Erkek kısırlığında yaklaşık %10'luk bir kısmının genetik nedenlere bağlı olduğu bilinmektedir. Karyotip analizi anomalisi ve mikro Y delesyon varlığı erkek infertilitesinin oluşmasına neden olur ve tanı amaçlı önemli parametrelerdir. Erkek infertilitesinin tıkanıklığa bağlı olduğu düşünülen ya da şüphelenilen azospermi hastalarında ultrasonografi eşliğinde obstrüksiyon belirlenebilmektedir (31). Bunun yanında erkek kısırlığında özellikle tıkanıklığa bağlı azospermisi olan erkeklerde testiste üretilen spermin dışarıya atılmasını sağlayan kanalların gelişmediği durumlar Vaz Agenezisi olarak tanımlanır ve bu durumlarda cerrahi yöntemlerle infertilite durumu ortadan kaldırılabilir. Yine tıkanıklığa bağlı azospermi olan ve kanallarında gelişme problemi olan erkeklerde kistik fibrozis hastalığının taşıyıcılığı bulunabilmektedir. İnfertilitenin testis kaynaklı olmasından şüphelenilen durumlarda skrotal ultrasonografi ile testis

değerlendirilip tanı konabilmektedir. Erkek infertilitesinin en önemli nedenlerinden biri olan varikozel tanısı da skrotal renkli dopler ultrasonografi ile konulmaktadır. Damar bozukluğu olan varikozel durumunda, kanlanmanın yetersizliği nedeniyle testisin beslenememesine bağlı olarak erkek infertilitesi ortaya çıkmaktadır (33).

Erkek infertilitesine dair yapılan ilk inceleme spermiyogram incelemesidir. Erkek infertilitesinde en önemli problemlerden birisi ejakülatta spermin görülmediği azospermi durumudur. İn vitro fertilizasyon tekniğinin gelişmesi farklı sperm parametreleri açısından erkek kaynaklı bu gibi durumlarda tedaviye yardımcı olmaktadır. Azospermi olgularında, testislerde spermatogenezin devam ettiği seminifer tübüllere odaklanılarak alınan tübül parçalarından matür sperm hücrelerinin elde edilmesi erkek infertilitesi açısından başarıyı arttırıcı bir ilerleme olmuştur (33). Cerrahi yöntemler ile ejakülatta hiç sperm olmaması, immotil sperm, tekrarlayan IVF başarısızlıkları ya da cerrahi işlemle sperm eldesi gerektiren hastalarda epididimal veya testiküler sperm elde etme metodları uygulanmaktadır. Bu yöntemlerden rutinde en çok tercih edileni TESE yönteminde, testisin tunika albugineasına insizyon yapılmakta ve seminifer tübülün opak, dolgunca görülen odaklarından örnekleme yapılarak doku içerisinde sperm hücresi aranmaktadır. Bu işlem, optik lup kullanılarak veya 15-25 X büyütme ameliyat mikroskobu altında mikro TESE tekniğiyle daha detaylı olarak tübüller incelenerek gerçekleştirilmektedir. Tıkanık olduğu düşünülen vakalarda Mikrocerrahi ile Sperm Aspirasyonu (MESA) tekniğinde mikroskop eşliğinde kesi açılarak epididimisten enjektör yardımıyla sıvı aspire edilebilmektedir. Perkutan Epididimal Sperm Aspirasyonu'nda (PESA) MESA'dan farklı olarak kesi açılmaz ve kelebek set ile epididimisten sıvı aspire edilir. Testiküler Sperm Aspirasyonu (TESA) ile de testis içinden iğne yardımıyla sperm aspire edilir. Bu teknikler aracılığıyla ağır erkek infertilite durumlarında üremeye destek amaçlı çözümlere alternatifler sunulmaktadır (31).

4.3. Kan Testis Bariyeri ve Zonula Okludens (ZO)

KTB, spermatogenik seri hücrelerinin beslenmesine ve desteklenmesine yardımcı olmaktadır. Sertoli hücreleri arasında yer alan KTB seminifer epiteli, bazal ve adlüminal olmak üzere iki kompartımana ayırmaktadır (18). Bazal bölgede gelişimlerinin erken evrelerinde olan germ hücreleri spermatogonya, preleptoten spermatositler bulunurken, daha sonraki mayotik (leptoten, zigoten ve pakiten

spermatositler) ve post-mayotik (yuvarlak ve uzayan spermatidler) germ hücreleri adlüminal bölme içinde bulunmaktadır. Spermatogenezin erken aşamasında farklılaşma sürecine girmiş olan hücreler (preleptoten spermatositler) KTB'yi geçerek adlüminal kompartmana geçmektedir. Bu süreçte Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar hızlı bir şekilde yıkılmakta ve ardından yeniden kurulmaktadır. Spermatogenezin sağlıklı bir şekilde gerçekleşebilmesi için bu açılıp kapanma mekanizması dengeli bir şekilde gerçekleşmelidir (34).

Sıkı bağlantılar, hücrelerin lateral yüzeylerinde iki komşu plazma zarını birbirine bağlamakta ve hücreleri bir bant şeklinde tamamen sarmaktadır. Bitişik hücrelerden uzantısal olarak gelen fibriller birleşerek hücreler arasındaki paraselüler boşluğu kapatır ve bunun sonucunda geçirimsiz bir bariyer oluşturur. Fibriller, doğrudan veya bazı yerlerde dolaylı olarak hücre iskeleti, sinyal proteinleri ve sitoskeletal proteinlerle bağlantılar kurarak entegre bir membran protein yapısı oluştururlar. Sertoli hücreleri arasında ve KTB'de tanımlanmış bağlantı proteinleri mevcuttur. Bu proteinler transmembran proteini olan okludin, klaudin, hücre adhezyon molekülleri ve zonula okludensdir (35). Okludin proteini, preleptoten / leptoten evresindeki spermatositlerin KTB boyunca hareketinde ve hücre polarizasyonunun kurulmasında yardımcı olmaktadır. İki hücre dışı ve iki hücre içi olmak üzere toplamda dört adet interselüler alandan oluşmaktadır. Yapısında Ser, Thr ve Tyr aminoasitlerini bol bulunduran okludinin C terminal bölgesi, bağlantı plağının birkaç sitoplazmik proteini ile bağlantı kurar ve hücrenin hayatta kalmasından sorumlu sinyal molekülleri ile etkileşime girer (36). Klaudin ailesi, KTB yapısının bütünlüğünün korunmasına görev alır. Yan yana bulunan hücrelerin zarlarında, bir klaudin molekülü diğer klaudin proteini ile homofilik veya heterofilik olarak birleşebilir. Okludin gibi klaudin proteini de hücre hareketliliği ile doğrudan ilişkiye sahiptir. Hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks bağlantısını sağlayan proteinler olan hücre adhezyon molekülleri hücre aktivasyonu, göçü, büyümesi ve farklılaşması gibi olaylarda rol almaktadırlar (35). Zonula okludens proteinleri, integral proteinler olan okludin ve klaudin gibi proteinleri aktin hücre iskeletine bağlayan adaptör proteinlerdir. Toplamda 16 farklı aileden oluşan ZO-1, ZO-2 ve ZO-3 guanilat kinaz ailesine mensuptur. Testislerde, ZO-1 proteini konneksin 43 proteini ile etkileşim halindedir ve bu sayede bağlantılar arası iletişimi düzenlemektedir. Sıkı bağlantı alanlarının oluşumu için ZO-1 ve ZO-2 proteinleri, klaudin

kendi immünoşupresif, antiviral ve anti bakteriyel savunma mekanizmalarının olduğu gösterilmiştir (39).

KTB'deki sıkı bağlantı proteinlerinin organizasyonundaki bozulmalar, protein ekspresyonundaki azalma spermatogenezin doğru şekilde ilerleyişini engellemektedir. Mayozun erken evresinden ileri evresine geçişte preleptoten spermatositler bazal kompartmandan adluminal kompartmana sıkı bağlantıların açılmasıyla geçebilmektedir. Spermatogenezin sürekliliği için bağlantı komplekslerindeki yapım ve yıkımının sorunsuz şekilde gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu süreçteki aksaklıklara bağlı olarak bağlantı dinamiklerindeki yerel seçici geçirgen özelliğın bozulması durumunda sperm üretimi sekteye uğramaktadır. Bu gibi durumlarda en belirgin patoloji, matürasyon arresti olarak karşımıza çıkmaktadır. Spermatogenezin her aşamasında duraksama gerçekleşebilmektedir. Progenitor germ hücreleri olan spermatogonyumların, KTB'nin sıkı bağlantı dinamiklerindeki bozulmalara bağlı olarak yeterli desteklenememesinden dolayı hipospematogenez ortaya çıkabilmektedir. KTB'deki bozukluklar, Sertoli hücreleri arası bağlantılarda gerçekleşen kopmalar spermatogenezin gerçekleşmesine engel olmaktadır. İleri evre hücreler arası bağlantı bozukluğu durumu Sertoli hücre sendromuna yani tübüller içerisinde yalnızca sertoli hücresi görülmesine neden olmaktadır (36).

Okludin, ZO-1, N-kaderin gibi proteinlerin oluşturduğu hücreler arası bağlantıların kaybının, Sertoli hücrelerinde fonksiyon bozukluklarına ve ileri evrede germ hücrelerinin apoptozuna dahi neden olabileceği gösterilmiştir. N-kaderin miktarında meydana gelen değişiklikler sonucu germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasındaki bağlantılar da doğrudan etkilenecek germ hücrelerinin olgunlaşmadan seminifer tübül lümenine atılmasına sebep olabilmektedir (40). Yukarıda sayılan bütün bu olasılıklar olgun bir spermin üretimini engelleyecek unsurlardır. Dolayısıyla erkek infertilitesinin ortaya çıkmasına neden olabileceği iddia edilmektedir (34).

4.4. Mikrobiyota

Mikrobiyota, vücut içinde ve dışında yaşayan tüm mikroorganizmaları (bakteriler, virüsler, mayalar ve parazitler vb.) kapsayan bir tanımdır. Vücudun her bölgesinde, kendisine ait farklı mikrobiyota bulunmaktadır. Bu mikroorganizma

topluluğunda 100 trilyon kadar bakteri bulunur ve toplam ağırlıkları 2-3 kg civarındadır. Mikrobiyotadaki bakterilerin sayısı, insan vücut hücrelerinin sayısına göre yaklaşık 10 kat fazladır. Bakteriyel mikrobiyom ise RNA, proteinler, metabolitler ve gen ürünleri gibi bakteri hücre dışı mikroçevre bileşeni olarak tanımlanmıştır (41). Mikrobiyomdaki genlerin sayısı da insan genomundaki genlerin sayısından yaklaşık 150 kat daha fazladır. İnsan genomuna kıyasla mikrobiyomun 100 kat daha fazla olduğu ve sekiz milyon farklı gen barındırdığı bildirilmiştir (42).

1683'te Antony van Leeuwenhoek Londra Kraliyet Cemiyeti'ne yazdığı bir mektupta, ilk insan mikrobiyotasını “dış plaklarında hareket eden çok küçük canlı hayvancıklar” şeklinde tarif etmiş ve mikrobiyota araştırmalarının temelini oluşturmuştur. 2008'de İnsan Mikrobiyom Projesi (Human Microbiome Project-HMP) başlatılmıştır (43). Bu proje insan vücudundaki mikroorganizmaları tanımlamak, insanlar arasında çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösteren mikrobiyal farklılıkları tespit etmek ve mikrobiyota çeşitliliğinin hastalıklarla ilişkisini araştırmayı hedeflenmiştir. Bu projede oral-nazal kavite, cilt, dışkı, gastrointestinal sistem gibi değişik nişteki bakterilerin rolü analiz edilmiştir. İdrar, steril olduğu düşüncesi ile başlangıç aşamasındaki çalışmalara dahil edilmese de ilerleyen zamanlarda DNA dizilim teknolojilerinin gelişmesi ile üriner sistem mikrobiyotasıda tanımlanmıştır (44).

Son yıllarda tanımlanan genler ve genetik biliminin ilerlemesi sayesinde, kültürlenme ve izolasyon olmaksızın mikroorganizmalar ile çalışmayı mümkün kılan metagenomik yaklaşımlar geliştirilmiştir (45). Gelişen teknoloji ile birlikte, insanlarda mikrobiyomun hastalık ve sağlık durumundaki rolü tanımlanmıştır. Hastalık halinde vücuttaki mikrobiyomlarda çeşitlilik açısından azalma/artış ve yoğunluk olarak önemli değişikliklere (disbiyoz) rastlanmaktadır. İnsan genomundaki genetik varyasyonların, insan mikrobiyomundaki taksonomik ünitelerin varlığı veya yokluğu ile doğrudan ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır. Buna bağlı olarak bazı hastalıkların (diyabet, artrit gibi kompleks hastalıklar) etiyolojisinde yer alan genetik varyasyonların önemli bir bölümü, aynı zamanda bu hastalıklarla ilişkilendirilmiş mikrobiyom değişiklikleriyle bağlantılıdır (46).

Geçtiğimiz 20 yılda hayata geçirilen iki önemli proje İnsan Genom Projesi (İGP, Human Genome Project-1990-2003) ve İnsan Mikrobiyom Projesi (İMP, Human Microbiome Project-2008-2012) insana ait tüm kalıtsal bilginin ortaya çıkarılmasını amaçlamıştır. İGP'nin ilk yıllarında, referans genom dizilerinin de elde edilmesiyle hastalıklara ait genetik bilgilerin kolaylıkla tanımlanabileceği düşünülmüştür (44).

Mikrobiyomun belirlenmesi ve geniş veri ağının toplanmasında rol oynayan, başta Amerika ve Avrupa olmak üzere farklı ülkelere de desteklenen, mikrobiyom temelli projeler (Örneğin; Amerika Bağırsak Projesi-American Gut, Flemenk Bağırsak Florası Projesi-Flemish Gut Flora Project, Hastane Mikrobiyom Projesi Hospital Microbiome Project, Dünya Mikrobiyom Projesi-Earth Microbiome Project, Brezilya Mikrobiyom Projesi-Brazilian Microbiome Project) son 10 yılda gerçekleştirilmiştir ve her geçen gün bu çalışmalara daha büyük örneklemeler ve daha geniş metadatalar içeren projeler eklenmektedir (47).

Konvansiyonel mikrobiyolojide eksiklikler nedeniyle mikroorganizmaların tanımlanamaması, metagenomik yöntemlerin kullanımıyla aşılmıştır. Hastalık halinde insan mikrobiyomunda meydana gelen değişiklikler üzerine yeni çalışmalar mevcut olup farklı ülkelerden hastalık topluluklarıyla ilgili veriler toplanmaktadır. Benson ve arkadaşlarının insan mikrobiyomunun konak genetiği ile bağlantılı olabileceği fikri, daha sonra yapılan hayvan deneyleri ile desteklenmiş ve bulguların tekrarlanmasıyla çeşitli genom bölgeleri açığa çıkarılmıştır. Çalışmalara ait veriler değerlendirildiğinde nicel özellik bölgesinde (Quantitative Trait Loci-QTL), immün düzenlemelerde etkili *Irak3*, *Lyz1*, *Lyz2*, *Ifng*, ve *Il22* gibi genlere rastlanması önem arz etmektedir (48).

İnsanlarda genom-mikrobiyom arasındaki bağlantı, birinci derece akrabaların mikrobiyomlarının benzerliği ile fark edilmiş ve tek yumurta ikizlerindeki mikrobiyal yakınlığın, çift yumurta ikizlerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğunun gösterilmesiyle kanıtlanmıştır. Bu araştırmada, karmaşık hastalıklara sebep olduğu kanıtlanan insan genleri ile yine karmaşık hastalıklarla bağdaştırılmış mikrobiyal içeriğin istatistiksel açıdan bağlantılı olduğu gösterilmiştir (49).

Metagenomik yöntemler ile hastalıkta veya sağlıkta mikrobiyom çeşitliliği, geniş çaptaki DNA içeriğinin ileri düzey bilgisayarlar ve biyoinformasyon tasarımı yolların kullanılmasıyla ortaya konabilmektedir. Bu doğrultuda, tetranükleotid

boyutuna ulaşan DNA'ların *in silico* analizlerle genleri belirlenerek günümüze kadar genetik dizilemesi tamamlanmış canlıların genleri ile eşleştirmesi yapılmaktadır (50). Bu sayede metagenoma ait gen ve sınıf tanımlaması gerçekleştirilmiştir.

Hastalık ve sağlık halinde mikrobiyal çeşitliliğin değiştiğini, gelişmiş yapay öğrenme ve nicel sinyal değerlendirme yöntemleri aracılığıyla yüksek hassasiyetle belirleyen bilgisayar sistemleri, yeni biyolojik göstergelerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. El Mouzan ve arkadaşları, crohn hastalığında rol oynayan 16S rRNA'yı gelişmiş yapay zeka modelleriyle analiz etmişlerdir. Böylelikle toplulukta daha nadir rastlanan türlerin bağırsak mikrobiyotasının bozulmasına sebep olabileceğini kanıtlanmış ve mikrobiyomun hastalık öngörüsünde gösterge olabileceği önerisinde bulunulmuştur (51). Biyoistatistiksel yöntemler ve metagenomik değerlendirmeler için tasarlanan yollar, hastalıkların dışa yansması ile metagenomun bağdaştırılmasını mümkün kılmaktadır.

4.4.1. Ürogenital mikrobiyota

Erkek genital sistemi penis, testisler, salgı kanalları ve salgı bezleri (bulboüretal bezi, prostat bezi, seminal vezikül) olmak üzere farklı kısımları içerir (15). Ürogenital mikrobiyotanın büyük kısmının alt genital yolda yer aldığı kabul edilmektedir. Erkek genital sistem mikrobiyotasında bakteriler, üretra ve penis gövdesi ile penis başı arasındaki bölgede yoğunluk göstermektedir. Özellikle penisin dış etkenlerin maruziyeti, sünnet olma ve cinsel deneyim mikrobiyal türlerde farklılığa neden olmaktadır. Adölesan erkeklerde koronal sulkus mikrobiyotası üzerine yapılan bir çalışmada 16S rRNA sekanslaması yapılmış ve sünnetli erkeklerde en sık saptanan türlerin *Corynebacteria*, *Staphylococcus*, *Anaerococcus* olduğu sünnetsiz erkeklerde ise *Peptoniphilus*, *Prevotella*, *Finnegoldia*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium*, *Delftia* ve az oranda *Pseudomonas* olduğu görülmüştür. Sünnetin mikrobiyota üzerine etkisine bakıldığında, yetişkin koronal sulkus mikrobiyotasını değiştirdiği ve sünnet öncesinde anaerobik flora baskınken sünnet sonrasında aerob floranın arttığı belirtilmiştir. Cinsel deneyim de penis mikrobiyotasını etkilemektedir. Cinsel yolla geçiş gösteren bakterilerin *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma genitalum*, *Mycoplasma hominis* ve *Sneathia* olduğu bilinmektedir (52). Bu bakterilerin, cinsel ilişki sırasında vajinadan erkek

üretasına ve koronal sulkusa geçerek burada kolonize olduğu gösterilmiştir. Seksüel geçişli enfeksiyonun temel etkeni *Neisseria gonorrhoeae* 'dir ve üretrite yol açar (53). Semen vasıtasıyla erkek ve kadın ürogenital sistemi etkileşime geçer ve mikroorganizmal transfer gerçekleşir. Semende bulunan organizmalar vajinal florayı değiştirerek cinsel yolla bulaşan hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Erkek idrar yolunda *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium*, *Bacteroides*, *Cocci* ve *Lactobacilli* suşları en çok görülen mikroorganizmalardır. Erkek üst genital sistemi mikrobiyolojik olarak genellikle sterildir ancak enfeksiyon durumunda, idrarda artan polimikrobiyal topluluklar nedeniyle var olan mikrobiyota içeriği de değişime uğrar ve genital sistem inflamasyonuna sebep olur (54).

İnsan mikrobiyotası için çoğalmaya en uygun yer gastrointestinal sistemdir. Üriner sistem hastalıklarının meydana gelmesinde bağırsak mikrobiyotası özel bir role sahiptir. Bağırsak mikrobiyotası, kişilerin yaşam şekline göre değişen diyet ve antibiyotik kullanımı gibi birçok faktöre bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir ve gastrointestinal sistem florasında ortaya çıkan değişiklikler, üriner sistem hastalıklarına yol açabilir (55). İnflamatuvar bağırsak hastalıkları tekrarlayan nefrolitiasis, morbid obezite, kistik fibrozis gibi patolojik durumlarda *oxalobacter formigens* kolonizasyonunun azaldığı rapor edilmiştir ve bu durumların da kalsiyum oxalat taşlarıyla birlikteliği vardır. Ayrıca kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda da kötü bir bağırsak mikrobiyotasının ilişkisi gösterilmiştir. Genel anlamda idrar yollarının etkilenimi söz konusudur ve böbrekler, üreterler, mesane, üretra ve üreme organlarının tamamı etkilenecek ürogenital hastalıklar ortaya çıkabilir. İdrarda ve ürogenital sistemde bulunan mikroorganizmaların kaynağı, doğrudan kan dolaşımına geçmiş bakteriler olabileceği gibi bağırsaktan veya oral mikrobiyomdan hematogen veya lenfojen yayılım göstererek bu bölgeye yerleşen bakteriler de olabileceği iddia edilmiştir (56).

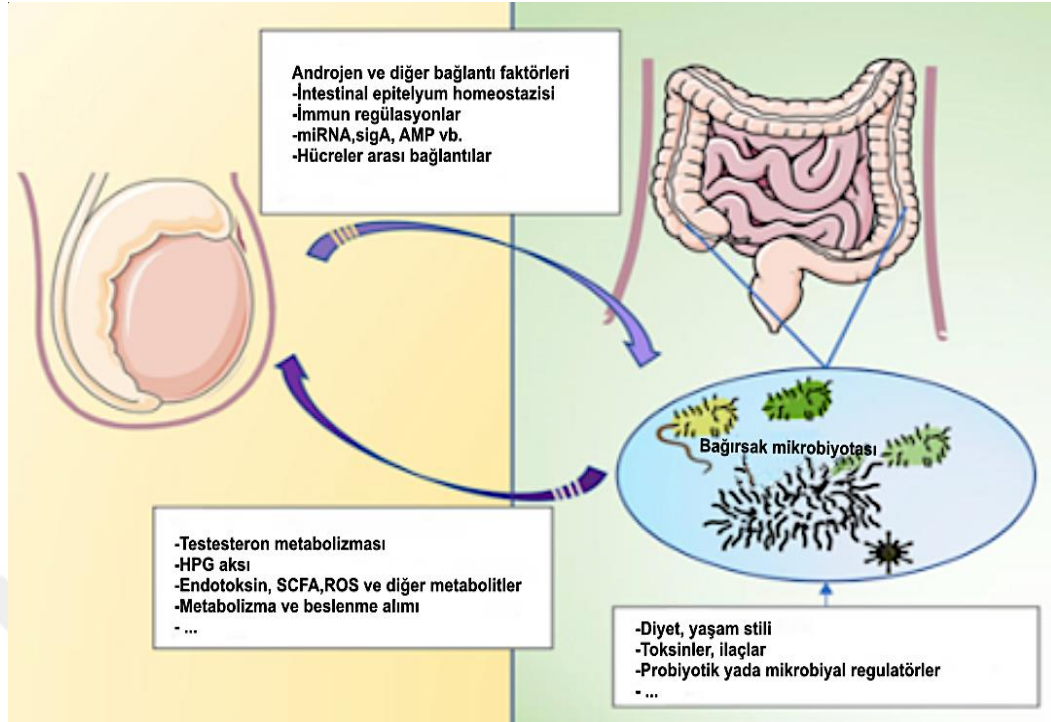
4.4.2. Mikrobiyota ve testis bağlantısı

İnsan bağırsak mikrobiyotası yaşanan bölgenin beslenme alışkanlıklarına, yaşam stiline, kişinin bağışıklık sistemine, kullanılan ilaçlara ve probiyotik alımına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bağırsak florasının organlara geçişi, birçok mekanizma üzerinden gerçekleşmektedir. Gastrointestinal sistemde intestinal epitelin

homeostazındaki değişim ile hücreler arası bağlantıların bozulması, birçok sisteme bakteri geçişini kolaylaştırmaktadır. Testis ve bağırsak eksenini arasında mikrobiyal popülasyonun geçişi de androjen-testesteron metabolizma sorunu ve hipotalamus-hipofiz-gonad aksının bozulması ile bağlantılı olabileceği iddia edilmektedir. Ayrıca endotoksinler, kısa zincirli yağ asitleri, Reaktif Oksijen Ürünleri (ROS) ve diğer metabolitler de testis ve gastrointestinal sistem arasında bakteri geçişinde önemli rol aldığı iddia edilmektedir (57) (Şekil 4.10).

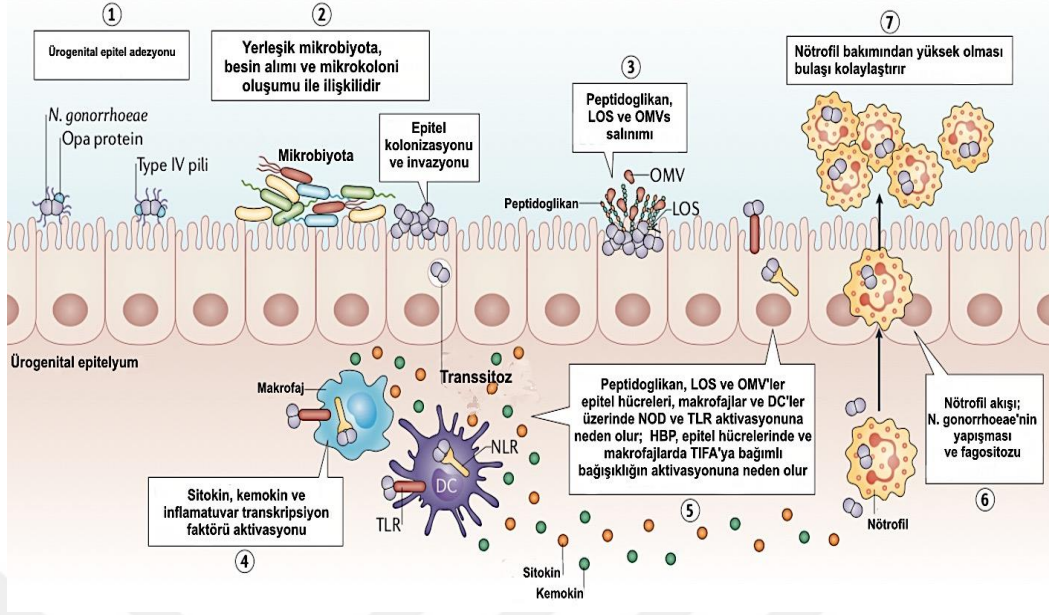
Erkek genitoüriner sistem enfeksiyonları, erkek infertilitesi açısından her zaman tartışmanın odak noktasında yer almaktadır. Erkek infertilitesinin yaklaşık %15'inin genital sistem enfeksiyonu ile ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (58). *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* ve *Ureaplasma urealyticum* yaygın genitoüriner sistem patojenleri arasında sayılabilir ve güncel literatürde geniş çapta incelenmiştir (59). Erkek genitoüriner sistem enfeksiyonlarının, yardımcı üreme tıbbi alanında semen parametreleri ve sperm dölleme kapasitesi üzerine etkisi henüz tam olarak belirlenememiştir.

İlk kez Alfano ve arkadaşları insan testisinde bakteriyal flora varlığını saptayarak testisin steril olmadığını göstermiştir (10). Elde edilen veriler, testis dokusunda mikrobiyota topluluğunun varlığını göstermekle birlikte özellikle merak konusu olan, bu ortamda spermatogenezin ne şekilde etkilendiği üzerine diğer çalışmaların önünü açabilecek potansiyeldedir. Bu konu hakkında yapılan bir çalışmada infertil erkekler ile fertil erkeklerin semen örnekleri kıyaslandığında sıklıkla *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* ve *Ureaplasma urealyticum* ile enfekte olduğu ve infertilitenin önemli ölçüde *Neisseria gonorrhoeae* ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (60). Başka bir çalışmada ise fertil erkeklerde *Neisseria gonorrhoeae* tespit edilmemişken infertil erkeklerin %6,5'inde saptanmıştır (61). Bu bilgiler ışığında infertil gruba ait semen örneklerindeki bakteriospermi prevalansının, fertil gruba göre anlamlı ölçüde yüksek olabileceği kanısına varılabilir. Mikrobiyolojik analizler, infertil erkeklerin semeninde en çok bulunan bakteri türünün *Chlamydia trachomatis* (%12,5) ve *Neisseria gonorrhoeae* (%11) olduğunu göstermiştir ve bakteri varlığının sperm parametrelerinde meydana gelen anormallikler ile önemli ölçüde ilişkili olabileceği iddia edilmiştir (61).



Şekil 4.10. Bağırsak mikrobiyotasının testis ve bağırsak eksenini arasındaki geçişi (57).

Neisseria gonorrhoeae esas olarak çeşitli epitelyal yüzeylere yapışan ve çoğalmanın ardından yeni konakçılara ulaşmak için mukozal epitel ile temas kurar. Enfeksiyonu oluşturan birincil olay ve patogenezdaki ilk adım, tip IV pili ve opasite (Opa) gibi bakteriyel yüzey yapılarına aracılık eden proteinlerin mukoza epiteline yapışmasıdır. Tip IV pililer, bakterinin epitel hücre yüzeyinde mikrokoloniler oluşturmalarını sağlamaktadır. Epitele invazyon ve bunun sonucunda epitelde gerçekleşen transsitoz, enfeksiyonun yayılmasına yol açabilir. *Neisseria* ailesine ait bakterilerin infertil erkeklerin semenlerinde daha fazla bulunması, lokal enfeksiyona yol açarak sperm üretimini etkilediği iddia edilmektedir (62) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. *Neisseria Gonorrhoeae*'nin ürogenital sistem epiteline invazyonu (62).

Spermatogenez sürecinde, normalde seminifer tübüllerde iyi korunmuş olan KTB'nin farklı nedenlerle bozulmasıyla sperm üretiminde sorun yaşanacağı bilinmektedir (26). Testiste yüksek oranda mikrobiyota varlığının KTB'de önemli ölçüde bozulma ve dejenerasyon meydana gelmesi muhtemeldir (57). Yapılan bir çalışmada, doğumdan itibaren steril koşullarda yetiştirilen sağlıklı fareler ile geleneksel yöntemlerle yetiştirilen fareler kıyaslandığında, geleneksel yöntemlerle yetiştirilen grupta testislerde Okcludin, ZO-2 ve E-kadherin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (63). Testisteki disbiyotik koşullar altında KTB'de görülen değişikliklerin tamamına ilişkin yeterli bilgi mevcut değildir. Kolon epitelindeki birleşik proteinler (glikoproteinler, proteoglikanlar, lipoproteinler, metalloproteinler) ve KTB'deki sıkı bağlantı proteinlerin kaybı, bağırsaktan testise mikrobiyota geçişine yol açtığı iddia edilmektedir. Bağırsak mikrobiyomu ile seminal mikrobiyom arasında olası bir bağlantı olduğuna dair güçlü kanıtlar elde edilmiştir. Bağırsak mikrobiyomu ile KTB arasındaki etkileşimi araştıran bir çalışmada, KTB'nin bütünlüğündeki herhangi bir bozulmada bağırsak mikrobiyotasına ait floranın testise geçişi meydana gelerek steril koşulların kaybolabileceği gösterilmiştir (64).

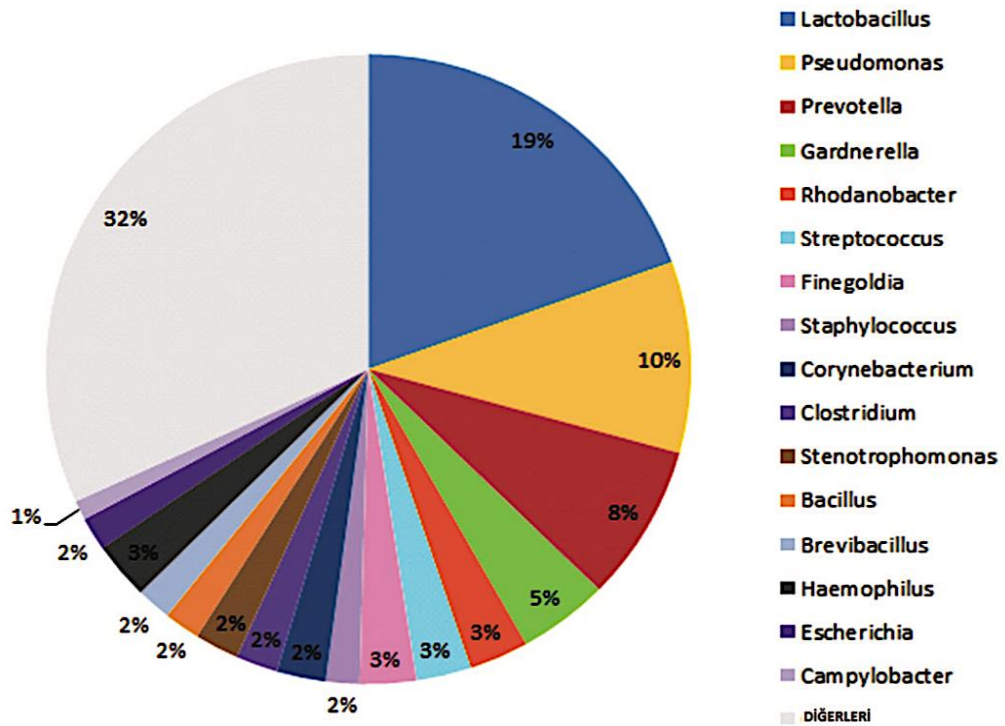
4.4.3. Erkek infertilitesinde mikrobiyota

Epidemiyolojik verilere göre, dünyada üreme çağındaki kişilerin %10'unun infertil olduğu tahmin edilmektedir. İnfertilite nedenleri incelendiğinde erkek faktörünün önemli bir yüzdeye sahip olduğu görülmektedir. Bunun primer sebeplerinden biri sperm parametrelerindeki bozukluklardır. Sperm konsantrasyonu, hareketi ve morfolojisindeki bozulmalar doğrudan infertilite nedenidir. Oligoastenoteratozoospermi (OAT) gibi üç sperm kusurunun bir arada olması durumlarında ve etiyolojisi bilinen (enfeksiyon, varikosel, hormonal anormallik) durumlarda bu durum ilaç tedavisi (antioksidan veya hormonal tedaviler) ile düzeltilmeye çalışılmaktadır. %30'a yakın oranda ise spesifik bir etiyoloji belirlenmemektedir ve bu durum idiyopatik OAT olarak kabul edilmektedir (65). Erkek üreme sisteminde bakteriyosperminin önemi hakkında çok az şey bilinmektedir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi üzerine ayrıca spermatogenez sürecine bakterilerin pozitif ve negatif etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Temel olarak sperm parametrelerini düzeltmek amaçlı kullanılan antioksidanlar, serbest radikalleri nötralize ederek ROS'ların temizlenmesi, enzim inhibisyonu ve indirgenmesi veya bağırsakta askorbat oto-oksidasyonunun inhibisyonu yoluyla etki göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle L Karnitin, L-Arginin, Glutasyon, Selenyum, Çinko, Folik Asit, Koenzim Q10, B Vitamini Kompleksi, E, C, D Vitamini gibi antioksidan kapasitesi yüksek olan vitamin, mineral ve aminoasitlerin sperm parametrelerinde olumlu etkisi olduğunu ortaya koymaktadır (66). Probiyotiklerin antioksidan etkilerinin olması, erkek infertilitesinde destekleyici tedavi olarak kullanılması son dönem çalışmalarda yağun şekilde yer verilmiştir. Probiyotikler içinde yer alan laktobasiller ve bifidobakteri suşlarının antioksidan üretiminde önemli iki grup olduğu vurgulanmıştır (67).

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda, erkek üreme sistemi enfeksiyonlarına bağlı olarak gelişen üreme sistemindeki mikrobiyal varlık belirsiz etiyolojilerin aydınlatılmasında önemli bir rol oynamıştır. Yeni nesil sekanslama teknolojisi ile mikrobiyal topluluklardan büyük ölçekli mikrobiyal DNA ve RNA sekansları doğrudan çıkarılarak üreme sistemindeki patojenik mikroorganizmaların

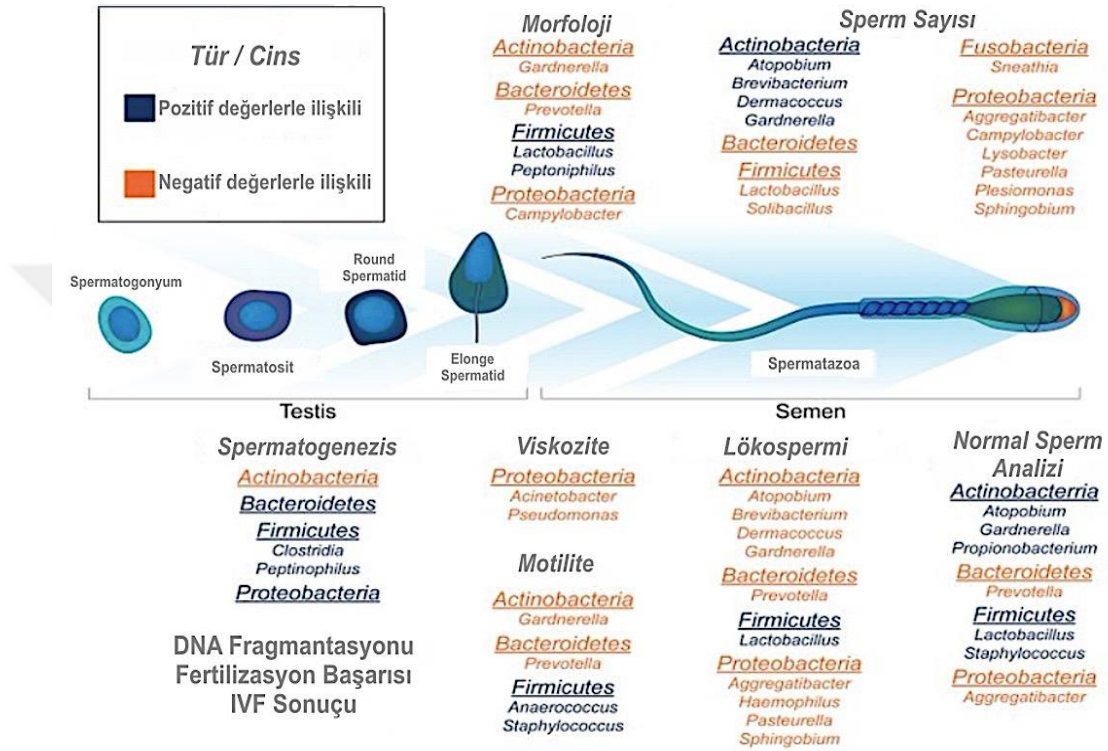
varlığı gösterilebilmektedir (68). Erkek ürogenital sisteminde bulunan çeşitli mikroorganizmalar sperm parametrelerindeki anormallikler, özellikle anormal motilite, yetersiz mitokondriyal fonksiyon ve DNA bütünlüğünün kaybı ile ilişkili olduğu iddia edilmektedir. Erkek ürogenital enfeksiyonları ile infertilite arasındaki ilişkinin etiyolojisini ve patogenezi daha iyi anlamak için seminal sıvının içerdiği bakteri türlerini anlamak önemlidir (69). Weng ve arkadaşları, seminal mikrobiyomu oluşturan mikroorganizmaların dağılımını tespit etmek amacıyla, 96 semen örneğinde semendeki bakteriyel toplulukların analizini yapmışlardır. En fazla bulunan türlerin *Lactobacillus* (%19,9), *Pseudomonas* (%9,85), *Prevotella* (%8,51) ve *Gardnerella* (%4,21) olduğunu belirtmişlerdir. Normospermi örneklerinde *Lactobacillus* ve *Gardnerella*'nın oranı daha yüksek bulunurken, oligozoospermi örneklerinde *Prevotella*'nın oranının daha yüksek olduğu görülmüştür ve gruplar arası anlamlı fark bulunmuştur (70) (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Seminal sıvıda tespit edilen bakteri türleri (70).

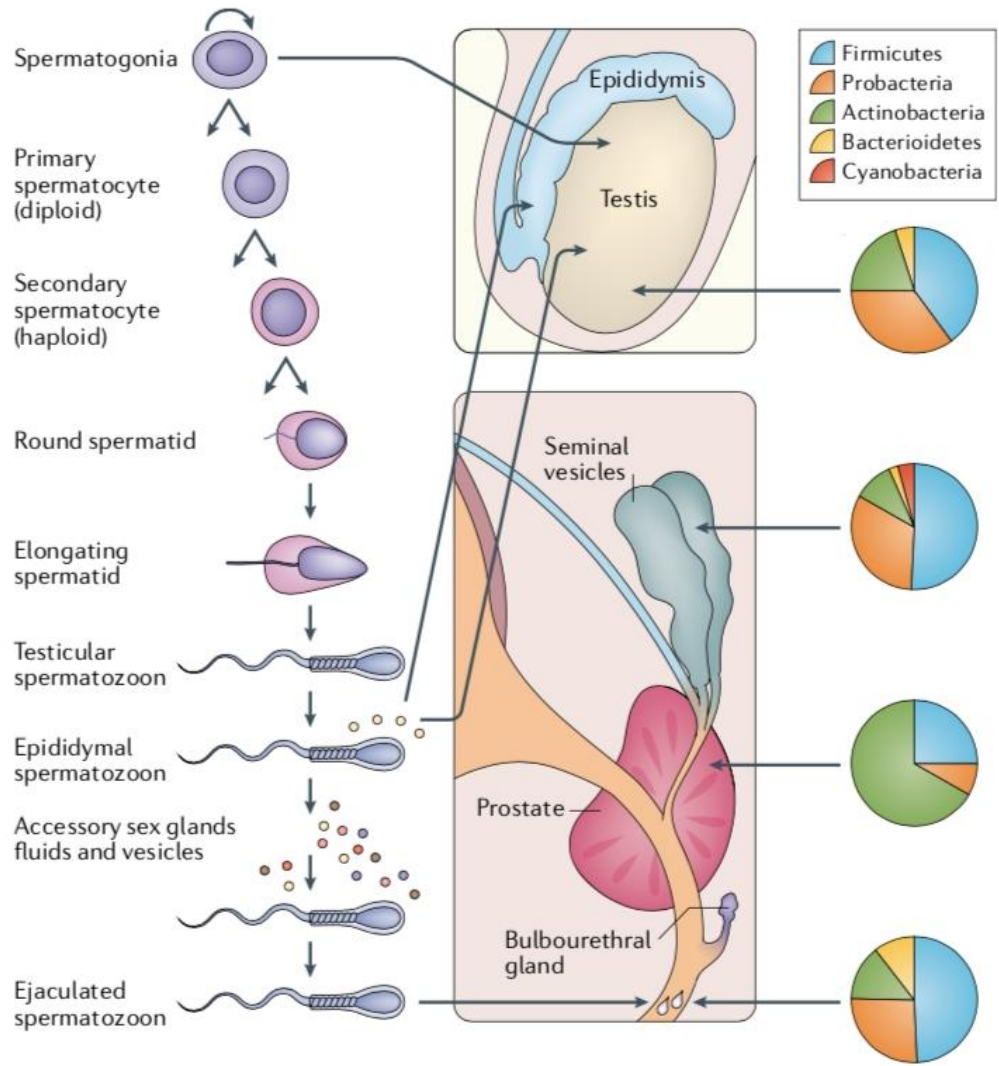
Yapılan bir çalışmada seminal sıvı içeriği çeşitli parametreler (sperm sayısı, motilitesi, morfolojisi, seminal sıvı viskozitesi normal veya anormal, lökospemi görülen ya da görülmeyen) baz alınarak oluşturulan gruplarda ayrı ayrı incelenmiştir.

Tüm gruplarda *Aktinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve alt türlerine rastlandığı bildirilmiştir. Sonuçlar herhangi bir sorun olmayan normospermi grubunda dahi belirli bakteri türlerinin varlığına işaret etmektedir. Semende bakterilerin çeşitlilik ve yoğunluk açısından farklı oluşunun erkek infertilitesinin ortaya çıkabileceği iddia edilmektedir (71) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Spermatogenik seri hücreleri boyunca negatif ve pozitif etkiye sahip bakteri türleri (71).

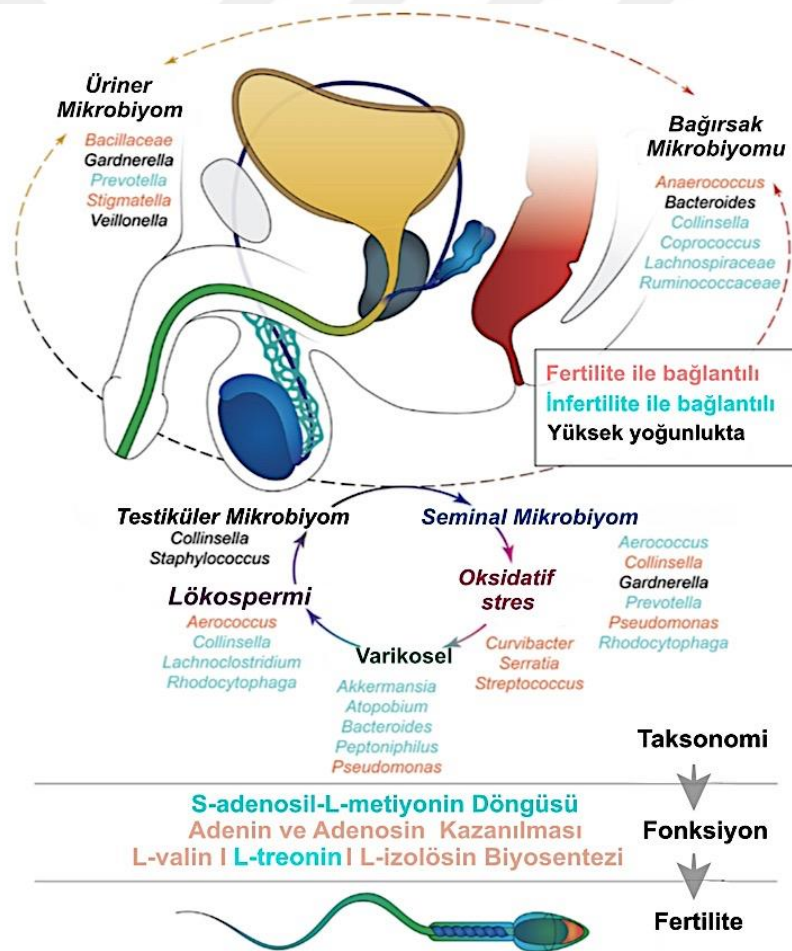
Testis, epididimis, seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretral bezlerden alınan örneklerde yapılan araştırmanın sonuçlarına göre *Aktinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Cyanobacteria* gruplarının her bölgede farklı oranlarda bulunduğu gösterilmiştir (72) (Şekil 4.14). Bu çalışmaların sonuçları, semen örneklerinde bakteriyospermi ve lökospermi varlığının spermatogenez üzerine negatif etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca seminal mikrobiyom, genital sistem fonksiyon bozukluğu ve obstrüksiyonu oluşturarak erkek fertilitasını bozabilme potansiyeli taşıyacağı bildirilmiştir (73).



Şekil 4.14. Erkek üreme sisteminde spermin maruz kaldığı mikrobiyal ortam (72).

Ejakülasyon sırasında semene seminal vezikül bezi, prostat bezi ve bulboüretral bezlerin sıvılarının karışması dolayısıyla semen içerisinde analiz edilen bakterilerin kökeni net bir şekilde açıklanamamaktadır (74). Yapılan bağırsak mikrobiyotası analizinde sperm kalitesi ve *Anaerococcus* cinsi mikroorganizmaların varlığı arasında negatif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. *Anaerococcus prevoti* veya *Anaerococcus vaginalis*'in infertil hastaların semen örneklerinde kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir. İnfertil ve fertil erkeklerin semen mikrobiyomları taksonomik olarak incelendiğinde, infertil erkeklerin semeninde artmış *Aerococcus* varlığına rastlanmıştır. Ayrıca *Prevotella* ve *Pseudomonas* cinslerinin semen kalitesi ve hareketi ile ters ilişkili olduğu görülmüştür. Yüksek

oksidatif stresi veya lökospermisi olan erkeklerde yalnızca minimal taksonomik farklılıklar bulunmuştur. Çalışmaya ek olarak idrar ve semen örneklerindeki S-adenozil-L-metiyonin (SAM) miktarı incelendiğinde, infertil erkeklerde normospermik erkeklere kıyasla daha yüksek oranda SAM varlığı belirlenmiştir. SAM metilasyon, oksidatif stres ve aminopropilasyonda rol aldığı bilinen bir metabolittir. SAM, spermatozoada görülen benzersiz metilasyon paternlerinin sürdürülmesi için kritik bir öneme sahiptir. SAM döngüsü spermatogenez sürecinde ve sperm hareketinin sağlanmasında, aminopropilasyon yoluyla spermidin gibi poliaminlerin sentezini modüle etmektedir. Metagenomik veriler DNA metilasyonu, oksidatif stres ve poliamin sentezi yoluyla kısırlığın patogeneğinde çok yönlü rol alan SAM döngüsünde önemli değişikliklerin varlığını göstermiştir (75) (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Üriner sistem, bağırsak, testiküler ve seminal yapının mikrobiyom içerikleri (75).

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Hasta Grupları

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran hastalardan androlojik değerlendirme sonrası (Tüm hastalar üroloji hekimi tarafından muayene edilmiş olup en az 3 spermiyogram testi, karyotipleme, Y mikrodelesyon testi ve serum FSH, testosteron, LH, prolaktin seviyeleri açısından değerlendirilmiştir) mikroTESE işlemine karar verilenler çalışmaya dahil edilmiştir. Son 1 yıl içinde antibiyotik kullanımı olmayan, probiyotik ve benzeri takviye almayan, son 6 ay içinde hafif düzeyde de olsa enfeksiyöz bir hastalık geçirmeyen, cinsel yolla bulaşan hastalıklar yönünden (hepatit B ve C, insan immün yetmezlik virüsü, sitomegalovirüs, sifiliz ve chlamydia) taranan ve herhangi bir enfeksiyon tespit edilmeyen, kronik-immünolojik hastalığı olmayan ve ejakülatuar kanallarda obstrüksiyon olmayan erkek infertil hastalar çalışmaya uygun olarak belirlenmiştir.

Non-obstruktif azospermi olgularının seçimi için;

- Geçirilmiş skrotal, inguinal ya da retroperitoneal cerrahi girişimleri olmayan,
- Mesane boyun cerrahisi geçirmemiş ve transüretal prostat rezeksiyonu yapılmamış,
- Sarkoidoz, tüberküloz gibi granümatöz hastalık öyküsü bulunmayan,
- Transrektal ultrasonografide seminal vezikül genişliği 12-15 mm'nin üzerinde tespit edilen hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

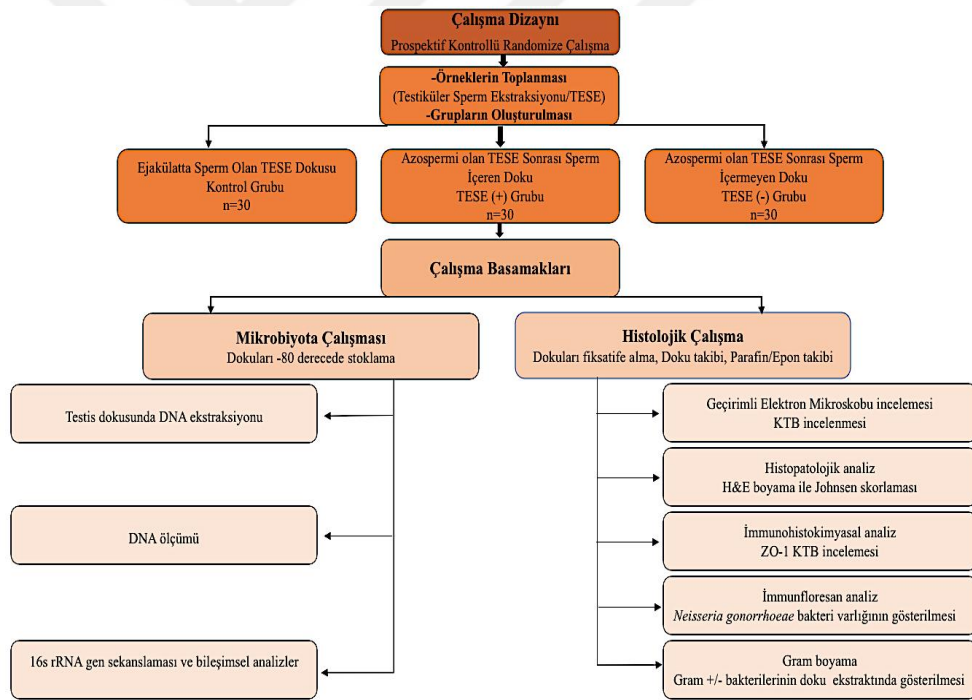
Çalışma dizaynında dışlanma kriterleri olarak;

- Konjenital bilateral vaz deferens yokluğu olan,
- Epididimal tıkanıklık saptanan,
- Bilateral vas deferens agenezisi olan,
- Unilateral vaz deferens agenezisi olan,
- Vaz deferens tıkanıklığı ve ejakülatuar kanal tıkanıklığı olan,
- Periferik kan yayması karyotip analizine göre kromozom sayısında fazlalık veya eksiklik bulunan hastalar (ör:47+XXY vb.),
- Y kromozomu mikrodelesyonu ile bazı genlerin (Azospermi Faktör a ve b

bölgelerindeki genler) tamamında kayıp olan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

Azospermi tanısı almış hastalara tüp bebek tedavisi için TESE işlemi uygulanmış ve ameliyat sırasında alınan biyopsi materyalleri çalışma grubu olarak kullanılmıştır. Diğer taraftan, tekrarlayan tüp bebek tedavi başarısızlığı olan veya tüp bebek tedavisi sırasında semen örneği veremeyen (psikojenik veya felç nedeniyle semen örneği veremeyenler dahil) hastalara sperm üretimi olduğu halde TESE ameliyatı yapılmaktadır (76). Bu gruptaki hastalar, çalışmamızda azospermik olmayan testis dokusu ile azospermik olan testis dokusunun kıyaslanabilmesi için kontrol grubu olarak seçilmiştir. Özetle; kontrol grubu için sperm üretimi olan infertil hastalar seçilmiştir.

Çalışma tasarımı içeriği Şekil 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.1. Çalışma tasarımına ait Materyal-Metot akış şeması.

TESE işlemi sonrasında sperm varlığı değerlendirmesine göre gruplandırma;

TESE (+) Grubu;

- Ejakülatta sperm olmayan (azospermi), TESE’de sperm bulunan hasta

TESE (-) Grubu;

- Ejakülatta sperm olmayan (azospermi), TESE’de sperm bulunmayan hasta Kontrol Grubu;

- Ejakülatta sperm olan TESE hastası şeklinde yapılmıştır.

Çalışmaya alınan toplamda 90 hastanın mikrobiyolojik analizi sonrası;

- TESE (+) Grup: Mikrobiyota bulunan n=15, Mikrobiyota bulunmayan n=15
- TESE (-) Grup: Mikrobiyota bulunan n=15, Mikrobiyota bulunmayan n=15
- Kontrol Grubu: Mikrobiyota bulunmayan n=30 olarak belirlenmiştir.

5.2. Örneklerin Toplanması

Çalışmaya dahil edilen hastalara, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ABD’ye ait üroloji ameliyathanesinde üroloji uzman hekimi tarafından mikro TESE işlemi uygulanmıştır. Çalışma dizaynı öncesi, cild florasını ekarte etmek amacıyla yapılan değerlendirmede %10’luk povidone iyot ile 5 dakika boyunca yapılan scrub işleminin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda, tüm hastalara operasyon sahası antiseptik solüsyon %10’luk povidone iyot ile 5 dakika boyunca temizlenmiştir. Kesi açılmadan önce deriden sürüntü alınmış ve negatif kontrol amaçlı 16S rRNA incelenmek üzere mikrobiyolojik analize gönderilmiştir. Ardından konvansiyonel biyopsi ile mikro TESE yöntemine geçilmiştir. Sağ testis dokusundan yaklaşık 2-3 mm boyutunda alınan örnekler, yağsız yıkama mediumu (SpermRinse, Ref: 20423, Vitrolife) içeren steril tüplere konulmuştur. İşlem sonunda ince eriyebilen bir sütur ile tunika albuginea kapatılmıştır. Testis dokusu, seminifer tübüllerin sağılması için insülin enjektörleri yardımıyla diseke edilmiştir ve invert mikroskop altında (Olympus Eppendorff Transfer Man NK2) sperm hücrelerinin varlığı değerlendirilmiştir. Dokular sperm varlığına göre gruplanarak ışık mikroskobu ve elektron mikroskobu takibi için uygun fiksatif içine alınmıştır. Dokunun bir kısmı mikrobiyota çalışması için -80°C’de saklanmıştır.

5.3. Işık Mikroskobu Preparasyonu

TESE dokuları morfolojik değerlendirme, gram boyama, immünohistokimyasal ve immünfloresan boyama için İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarında takibe alınmıştır. Tüm grupların testis dokuları %10'luk Bouin fiksasyonundan sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilmiştir. Ksilol ile şeffaflaştırılan dokular, 60°C'lik etüve alınarak parafin içinde gece boyunca bekletilmiştir ve ardından oda ısısında parafine gömülerek bloklanmıştır. Parafin bloklardan mikrotom (Thermo Scientific, HM340E) ile yaklaşık 5 µm kalınlığında alınan kesitler, pozitif şarjlı lamalar üzerine aktararak hematoksilin-eozin boyama, gram boyama, immünohistokimyasal ve immünfloresan boyama için hazır hale getirilmiştir.

5.3.1. Hematoksilin-eozin boyama

Pozitif şarjlı lamlara alınmış doku kesitleri deparafinizasyon için 1 saat ksilolde tutulmuştur. Azalan alkol serilerinde (%100, %96, %90, %70 alkol) beşer dakika tutulan kesitler, distile suya alınarak 5 dakika boyunca bekletilmiştir. Lamlar, Gill hematoksilinde (Sigma Aldrich, GHS132) 7 dakika süresince bekletilmiştir. Boyanma sonrası 25 dakika akar su altında tutularak mordanlamanın tamamlanmasıyla 15 dakika eozinde bekletilip distile suda yıkanmıştır. Yükselen alkol serilerinden (%70, %96, %100) geçirilen kesitler, ksilole alınmıştır ve 10 dakika sonra entellan kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Kapatma işleminin ardından morfolojik değerlendirme için ışık mikroskobu (Nikon Instruments Inc., Amerika Birleşik Devletleri) altında X200 ve X400 büyütmelerde inceleme yapılmıştır. Her kesitte en az 10 alan seçilerek 50 seminifer tübül 20X büyütmede Johnsen Skorlaması'na göre değerlendirilmiştir (77). Johnsen skorlaması aşağıdaki Tablo 5.3.1.1.'deki kriterlere göre yapılmıştır.

Tablo 5.1. Johnsen skorlama kriterleri

	Spermatogenezisin semikantitatif değerlendirilmesinde Johnsen Skoru
1	Tübüller içerisinde hücre yok
2	Tübüller içerisinde germ hücresi yok, Sertoli hücreleri mevcut
3	Germ hücresi olarak yalnız spermatogonia mevcut
4	Yalnızca birkaç spermatosit var (<5), spermatid/spermatozoa yok
5	Spermatozoa/spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
6	Spermatozoa yok, yalnızca birkaç spermatid var (<5-10)
7	Spermatozoa yok, birçok spermatid var
8	Yalnızca birkaç spermatozoa var (<5-10)
9	Birçok spermatozoa var, germinal epitel bozuk ve lümen oblitere
10	Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenezis

5.3.2. Gram boyama

Gram boyama yöntemi için testiküler dokuların bir kısmı homojenize edilmiştir. Pozitif şarjlı lamalar üzerine hazırlanan yayma preparatlar havada kurutulmuştur. Lamların üstü kristal viyole boyası ile kaplanarak 1 dakika boyunca bekletilmiştir. Bol distile su ile yıkanan lamalar, 1 dakika boyunca lugol çözeltisi ile muamele edildikten sonra tekrar distile su ile yıkanmıştır. Ardından %95'lik etanole alınarak 10-15 saniye bekletilen lamalar tekrar distile suyla yıkanmıştır. Sulu fuksin boya çözeltisi ile lamların üstü kaplanıp 30 saniye bekletilmiştir ve son olarak kurutma kağıdı ile kurutulmuştur. Işık mikroskobu (Nikon Instruments Inc., Amerika Birleşik Devletleri) altında incelenen preparatlarda, mor renkte görülen mikroorganizmalar gram (+), pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram (-) olarak değerlendirilmiştir (78).

5.3.3. Dokuda ZO-1 proteinin immünohistokimyasal olarak boyaması

Dokular, immünohistokimyasal boyama protokolü için bouin fiksatifinde 16 saat bekletilerek tespit edilmiştir. Tespit sonrası %70 alkolde rengi berraklaşana kadar bekletilen dokular, daha sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edilmiştir ve ksilol ile şeffaflaştırılmıştır. Gömme işlemi öncesi, 60°C'lik etüve alınan dokular parafinde 1 gece boyunca bekletilmiştir. Daha sonra oda ısısında parafin içine gömülerek bloklanmıştır. Parafin bloklardan mikrotom ile 4-5µm kalınlığında kesitler alınıp pozitif şarjlı lamalar üzerine aktarılmıştır. Başlangıçta,

parafinden uzaklaştırılmak istenen kesitler, 1 saat ksilolde tutulmuştur. Azalan alkol serilerinde (%100, %96, %90, %70 alkol) beşer dakika tutulan kesitler, 5 dakika boyunca distile suda bekletilmiştir. Daha sonra endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için kesitler %3 hidrojen peroksit (H_2O_2), (Merck, REF:108600.1000) solüsyonuna alınarak oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Distile su ile üç defa çalkalanarak durulanmıştır. Dokudaki antijenik maskelenmeyi ortadan kaldırmak amacıyla, 1/10'luk Etilen Diamine Tetraasetik Asit (EDTA),(Merck, Sigma ED4SS) içinde 110°C'de 20 dakika bekletilen kesitler, 20 dakika boyunca oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Kesitler, distile suda üçer kez çalkalanıp durulandıktan sonra iki kez beşer dakika olacak şekilde Phosphate Buffered Saline'de (PBS; fosfat tamponu, pH:7.2-7.4, Merck 524650) bekletilmiştir. Hidrofobik kalem (Pappen, DAKO) ile kesitlerin çevresi çizilerek oda sıcaklığında 10 dakika süre ile protein blokajı (Ultra V blok, Invitrogen Blocking Solution REF: 859043) uygulanmıştır. Kesitler 1/100 oranında dilüe edilmiş ZO-1 antikoru (Millipore Anti-ZO-1 Tavşan Polyclonal Antibody AB 2272) ile +4°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir ve inkübasyon sonrası PBS'e alınarak 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra sekonder antikor ile oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilen kesitler, 10 dakika süreyle streptavidin peroksidaz (Invitrogen HRP–Streptavidin REF: 859043) ile muamele edilmiştir. Kesitler PBS'de iki kez beşer dakika yıkanmıştır. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için 3-10 dakika 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) kromojen ile inkübasyon sonrası Mayer hematoksilin ile boyama yapılmıştır. Son olarak entellan kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Boyanmış kesitler, ışık mikroskobu (Nikon Instruments Inc., Amerika Birleşik Devletleri) altında X20, X40 ve X100 büyütmelemlerde incelenip fotoğraflanmıştır. Gruplar arası skorlamada, çok, orta ve az ZO-1 boyanması şeklinde digital analiz ImageJ 1.53t (National Institutes of Health, USA) programı ile semikantitatif değerlendirme yapılmıştır. Verilerin analizinde GraphPad Prism (ver. 7.00) yazılımı kullanılmıştır.

5.4. Floresan Mikroskop Preparasyonu

5.4.1. Dokuda *Neisseria Gonorrhoeae* immünfloresan boyaması

Kesitlere ilk olarak deparafinizasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlem için kesitler sırası ile 1 saat ksilolde bekletildikten sonra azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70 alkol) beşer dakika geçirilip 5 dakika distile suda tutulmuştur. Dokudaki antijenik maskelenmeyi ortadan kaldırmak amacıyla, 1/10'luk Etilen Diamine Tetraasetik Asit (EDTA),(Merck, Sigma ED4SS) içinde 110°C'de 20 dakika bekletildikten sonra, 20 dakika boyunca oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Oda sıcaklığında soğutulan kesitler, yıkama işlemi için, üç kez beşer dakika PBS ile muamele edilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmaları ortadan kaldırmak amacıyla, kesitler, 20 dakika süreyle blocking serum (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) içinde oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Daha sonra 5 dakika süreyle üç kez PBS ile yıkama işlemine tabi tutulan kesitler, 1/100 oranında dilüe edilmiş *Neisseria gonorrhoeae* antikoru (GeneTex, Rp pAb HRP, GTX3691) ile bir saat +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Negatif kontrol amacıyla, bir grup kesit aynı işlemlere primer antikor ilave edilmeden (primer antikor yerine PBS kullanılmıştır) tabi tutulmuştur. Kesitler üzerinden primer antikorun uzaklaştırılması için, üç kez beşer dakika PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası kesitler, Fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) ile 15 dakika muamele edilmiştir. PBS solüsyonu ile yıkama işlemi 5 dakika süreyle tekrar edilmiştir ve kesitler kapama solüsyonu Mounting+DAPI (4 6, 6-diamidino-2-fenilindol) medium ile kapatılmıştır. İmmün pozitif hücreleri görüntülemek amacıyla floresan ataçmanlı araştırma mikroskopundan (Zeiss Axio Scope A1) ve kamera/görüntü analiz sisteminden yararlanılmıştır.

5.5. Testis Dokusunda Mikrobiyota Çalışması

5.5.1. Testis dokusundan DNA ekstraksiyonu

TESE dokusuna ait mikrobiyota analizi Diagen Biyoteknoloji Merkezi'nde yapılmıştır. Mikrobiyota analiz çalışmasında kullanılan tüm malzemeler, çapraz kontaminasyonu önlemek için, RNaz solüsyonu ile silinip kullanılan malzemeler ve ortam, ultraviyole (UV) ışık ile sterilize edilmiştir. Negatif kontroller hazırlanmıştır. Kullanılan malzemelerden, PCR kitlerinden, ortam havasından ve testis deri

sürüntülerinden örnekleme yapıp kontaminasyon kaynaklı olabilecek sonuçlar, negatif kontrollerle karşılaştırılarak sunulmuştur. Böylelikle, elde edilen testiküler doku mikrobiyotasında doku dışı kontaminasyon olup olmadığına bakılmıştır. Mikrobiyota analizi için 25 mg büyüklüğündeki testis dokuları -80°C’de stoklanmıştır. Mikrobiyota çalışmasında aynı gün dokular kuru buz içerisinde araştırmanın yapılacağı Diagen biyoteknoloji merkezine götürülmüştür.

Dokuda ekstraksiyon protokolü için, QuickGene (Dokudan DNA ekstraksiyon kiti) ekstraksiyon cihazı kullanılmıştır. İlk olarak, 25 mg doku numunesi 250 µl MDT (Doku Lizis Tamponu) solüsyonu ile birlikte homojenizasyon tüpüne aktarılmıştır. Homojenizasyon için tüpün içerisine 15 mg 0,1 mm cam boncuk veya 10 tane 1,0 mm zirkon boncuk eklenmiştir. Homojenizatörde 5000 rpm’de 2x120 saniye uygulama yapılmıştır. Numune, homojenize edildikten sonra, üzerine 25 µl EDT (Proteinaz K) solüsyonu eklenip 56°C’de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, oda sıcaklığında 10 dakika 15000 g santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj sonrası 200 µl süpernatant, 1,5 ml’lik mikro tüpe aktarılmıştır. Üzerine 180 µl LDT (Hücre Lizis Tamponu) solüsyonu eklenip 15 saniye vorteks yapıldıktan sonra mikrotüp, 70°C’de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bir sonraki aşamada, %99’luk soğuk etanolden 240 µl eklenip 15 saniye vorteks yapılmıştır. Mikrotüpün bütün içeriği QuickGene (Kurabo) filtreli kasete aktarılmıştır ve cihaz protokolü takip edilerek yıkamalar ve elüsyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 750 µl WDT (Yıkama tamponu) solüsyonu kullanılarak üç defa yıkama yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonucunda, 200 µl CDT (Elüsyon Tamponu) ile sulandırılmış ortalama 50-60 ng genomik DNA elde edilmiştir.

5.5.2. DNA ölçümü

Colibri Titertek Berthold cihazı kullanılarak DNA ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Örnek tipi DNA-50, ışık yolu uzunluğu otomatik olacak şekilde parametreler ayarlanmıştır. Cihazın kapağı açıldıktan sonra körleme için, kit içerisinde bulunan elüsyon tamponundan 2 µl konulduktan sonra kapak kapatılıp işlem başlatılmıştır. Numunelerden sırasıyla 2 µl alınıp ölçüm seçeneği kullanılarak DNA ölçme işlemi tamamlanmıştır.

5.5.3. 16S rRNA gen sekanslama ve bileşimsel analizler

Ekstrakte edilen bakteri DNA'larında bulunan 16S rDNA V3-V4 bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edildikten sonra HiSeq platformunda (Illumina) yaklaşık olarak bölgenin tamamının örtüştüğü 2x250 bp pair-end (çift uçlu) protokolü takip edilerek dizileme gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon sırasında kullanılan bu primerler hem HiSeq sekanslama için hem adaptörleri için hem de PCR ürünlerinin direk dizilenmesi ve çip üzerinde havuz sistemi oluşturmak için single-end (tek uçta) barkodları içermektedir. 16S rRNA gen içeriğinden elde edilen veri, filogenetik ve hizalama (alignment) tabanlı yaklaşımlar ile data çözümlemesiyle en yüksek seviyede verim alınmasını sağlamaktadır. Özgün moleküler barkodlar ile okuma çiftleri ayrıştırılmıştır ve pair-end (çift uçlu) okumaları FLASH V1.2.7 kullanılarak birleştirilmiştir (79). FLASH yazılımı, DNA fragmentinin karşılıklı kesişen sonlarından oluşturulan okuma ile bazı okumaların örtüşmesiyle bile pair-end'leri birleştirebilmesi için tasarlanmıştır (80). QIIME (V1.7.0) kalite kontrol prosesine göre raw taq'lardaki yüksek kalite filtresi ile temiz taq'lar elde etmek için spesifik filtreleme koşulları altında gerçekleştirilmiştir (81). Bu taq'lar UCHIME algoritması kullanılarak kimera sekansları tespiti için referans database ile karşılaştırılmıştır ve kimera sekansları çıkarılmıştır. Sonunda efektif taq'lar elde edilmiştir. Ek olarak, birleştirilen okuma sonuçlarına kalite filtresi uygulanmıştır ve beklenen hata oranı (P-value) 0,05 üzerinde olanlar elenmiştir. 16S rRNA gen dizileri UPARSE algoritması kullanılarak %97 benzerlik kesim oranı (cut-off) ile Operasyonel Taksonomik Ünite (OTU) kümelerine ayrılmıştır. Taksonomik sınıflara karar vermek için sadece 16S V3-V4 bölgesini içeren SILVA optimize edilmiş versiyonu ile OTU'lar haritalanmıştır. Ayrılmış (demultiplexed) okumaların UPARSE OTUs kullanılarak haritalanması ile yoğunluklar elde edilmiştir. Tüm OTU'ların temsili dizilerinin filogenetik ilişkisini elde etmek için, çok sayıda diziyi karşılaştırabilir olan MUSCLE kullanılmıştır. Önceki iki basamakta oluşturulan OTU tabloları ile Alpha-diversity ve beta-diversity analizleri yapılmıştır (82).

5.6. Geçirimli Elektron Mikroskobu Preparasyonu

Testislerden alınan doku örnekleri, %2,5'luk 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit fiksatifinde +4°C'de 4 saat fikse edildikten sonra tamponda yıkanmıştır. Daha sonra %1'lik osmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyon yapılmıştır. Yükselen alkol serilerinden (%70-5dk, %90-10 dk, %96-10 dk, %100-2x15 dk) geçirilerek dehidrate edilen dokular, daha sonra propilen oksitten geçirilmiştir. Ardından Epon 812'ye gömülerek 60°C'de etüvde polimerize edilmiştir. Ultramikrotomda (Reichert, Supernova ultramicrotome) alınan yarı ince kesitler (1 µm) toluidin mavisi ile boyanmıştır. Yarı ince kesitlerde yer tayini yapıldıktan sonra bakır gridler üzerine alınan yaklaşık 60 nm kalınlığındaki ince kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanmıştır. İnce kesitler, JEOL 1200 SX geçirimli elektron mikroskobu ile X3000, X5000, X75000, X20000 büyütmelemlerde incelenip fotoğraflanmıştır.

5.7. İstatiksel Değerlendirme

Verilerin analizinde GraphPad Prism (ver. 7.00) yazılımı kullanılmıştır. Normalite Shapiro-Wilk testi ile ölçülmüştür. Normal dağılım gösteren çoklu grupların kıyaslanmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA, Dunnet testi) kullanılırken, normal dağılım göstermeyen grupların kıyasında ise Kruskal-Wallis (Dunn testi ile) varyans analizi kullanılmıştır. Tüm veriler ortalama $\pm$ ortalamaların standart hatası (o.s.h) olarak sunulmuştur. $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık seviyesi olarak kabul edilmiştir.

p değerlerine tekabül eden ve anlamlılık seviyesini belirten yıldız sayısı sırasıyla şu sınırlara göre ifade edilmiştir:

- $n.s. = p > 0.05$
- $* = p \leq 0.05$
- $** = p \leq 0.01$
- $*** = p \leq 0.001$
- $**** = p \leq 0.0001$

Bu derecelendirme, yıldız sayısı arttıkça aradaki anlamlılık seviyesinin de o kadar artmakta olduğunu göstermektedir.

6. BULGULAR

6.1. Hastaların Demografik Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik verileri incelendiğinde üç grup için yaş ortalaması $35,02 \pm 0,68$ 'dir. Boy ve kilo açısından değerlendirmede ortalama değerleri sırasıyla $175,6 \pm 0,84$ cm ve $78,84 \pm 1,7$ kg şeklinde bulunmuştur. Hastaların hormon değerleri incelendiğinde en yüksek standart sapma FSH hormonunda saptanmıştır (Tablo 6.1). Kontrol grubu hastalarına ait sperm sayısı ortalama olarak $25,81 \pm 5,91$ milyon bulunurken, motil hücre yüzdesi ortalama $35,94 \pm 5,6$ bulunmuştur (Tablo 6.2).

Tablo 6.1. Hastalara ait demografik veriler.

Parametre (birim) Hasta sayısı	Min-max (medyan) Ort.s.e.m	Standart sapma (s.s)
Yaş (yıl) n=90	26-44 (35) 35,02±0,68	4,60
Boy (cm) n=90	160-194 (175) 175,6±0,84	5,63
Kilo (kg) n=90	55-111 (78) 78,84±1,7	11,40
BMI (kg/m²) n=90	17,6-37,1 (25,4) 25,61±0,57	3,86
LH n=90	0,1- 92,6 (10) 12,51±2,01	13,5
FSH n=90	0,1-149 (10,69) 19,41±3,7	24,86
PRL n=90	4,57-35 (10,37) 11,35±0,74	4,96
Testosteron n=90	0,33-10,05 (4,7) 4,77±0,33	2,21

Tablo 6.2. Kontrol grubuna ait ejakülat sperm parametreleri.

Parametre (birim) Hasta sayısı	Min-max (medyan) Ort.s.e.m	Standart sapma (s.s)
Sperm sayısı (x10⁶) n=30	5-90 (12) 25,81±5,91	23,66
Motil hücre yüzdesi n=30	0-60 (40) 35,94±5,6	22,53

Çalışma grupları incelendiğinde yaş ($p=0,019$) ve FSH ($p<0,0001$) değerlerinin gruplar arası anlamlı fark gösterdiği bulunmuştur. Kontrol grubu hastalarının yaşlarının ($37,6 \pm 1,09$), TESE (+) ($33,13 \pm 1,10$) ve TESE (-) ($34,33 \pm 1,14$) gruplarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca kontrol grubu, TESE (+) ve TESE

(-) gruplarda BMI, LH, PRL ve testosteron değerleri açısından gruplar arası bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 6.3).

Tablo 6.3. Çeşitli parametreler açısından gruplar arası ortalamaların ($\pm$ o.s.h ile) karşılaştırılması.

	Kontrol Grubu Min-max (medyan) Ort$\pm$o.s.h	TESE (-) Grubu Min-max (medyan) Ort$\pm$o.s.h	TESE (+) Grubu Min-max (medyan) Ort$\pm$o.s.h	p değeri	p seviyesi
Yaş^a	31-44 (37) 37,6 $\pm$ 1,09	26-42 (34) 34,33 $\pm$ 1,14	26-40 (33) [†] 33,13 $\pm$ 1,10 [†]	0,019	*
Boy^a	169-184 (178) 176,1 $\pm$ 1,19	170-180 (175) 175,3 $\pm$ 0,87	160-194 (176) 175,5 $\pm$ 2,1	0,911	n.s
Kilo^a	60-83 (78) 75,07 $\pm$ 1,7	55-105 (78) 77,8 $\pm$ 2,85	58-95 (82) 83,67 $\pm$ 3,68	0,107	n.s
BMI^a	19,6-26,4 (24,5) 24,19 $\pm$ 0,41	17,6-33,5 (25,5) 25,32 $\pm$ 0,87	18,7-37,1 (26,6) 27,33 $\pm$ 1,35	0,076	n.s
LH^b	0,1-17,8 (10,8) 9,835 $\pm$ 1,09	0,18-92,6 (9,7) 16,21 $\pm$ 5,60	4,73-33 (9,8) 11,48 $\pm$ 1,79	0,914	n.s
FSH^a	0,1-10,69 (5) 5,245 $\pm$ 0,74	10,3-149 (28,36) [†] 36,7 $\pm$ 8,82 [†]	1,55-49,5 (14,97) [†] 16,29 $\pm$ 3,69 [†]	<0,0001	****
PRL^b	4,57-17,27 (10) 10,43 $\pm$ 0,92	7,07-35 (12,2) 13,43 $\pm$ 1,77	7-17 (9) 10,18 $\pm$ 0,82	0,269	n.s
Testosteron^a	3,63-8,62 (5,2) 5,292	0,33-8,08 (4,24) 3,884	0,99-10,05 (4,63) 5,147	5,292	n.s

[†] kontrole göre anlamlı farklılık gösteren grup

a Tek Yönlü Varyans Analizi (Dunnet çoklu kıyaslandırma testi ile beraber)

b Kruskal-Wallis Varyans Analizi (Dunnet çoklu kıyaslandırma testi ile beraber)

ort.= ortalama

o.s.h= ortalamaların standart hatası

n.s= not significant (anlamlı seviyede değil)

6.2. Işık Mikroskobu Bulguları

Çalışmamızda kontrol grubu, TESE (+) ve TESE (-) gruplarının testis biyopsi örneklerine ait doku preparatları ışık mikroskobunda incelenmiştir ve Johnsen kriterlerine göre gruplar arası farklılıklar gözlemlenmiştir.

6.2.1. Hematoksilen-eozin değerlendirmesi

Kontrol grubuna ait histopatolojik değerlendirmede, seminifer tübüllerin etrafı bazal membranla sarılı, bazal membrana komşu spermatogonyum hücreleri, belirgin nükleusa sahip primer ve sekonder spermatid hücreleri ve lümene doğru yerleşik farklılaşma geçirmiş sperm hücrelerinin varlığı gözlemlenmiştir (Resim 6.1 ve Resim 6.2). Kontrol ve TESE (+) grubuna ait Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanmış testis dokuları ışık mikroskobunda incelendiğinde, seminifer tübüllerin birçoğunda bazal membranın hücrelerle yakın ilişkide olduğu, tübül duvarında spermatogenik seri

hücrelerinin var olduğu ve bunların birbiriyle etkileşimde olduğu görülmüştür. TESE (+) grubuna ait dokularda bazal membrandan tübül lümenine doğru spermatogenik seriye ait hücrelerin diziliminde düzensizliklerin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, belirgin olarak primer spermatositlere, spermatidlere ve tübüllerin lümeninde spermatogenik seriye ait farklı evrelerde hücre topluluklarına rastlanmıştır (Resim 6.3 ve Resim 6.4).

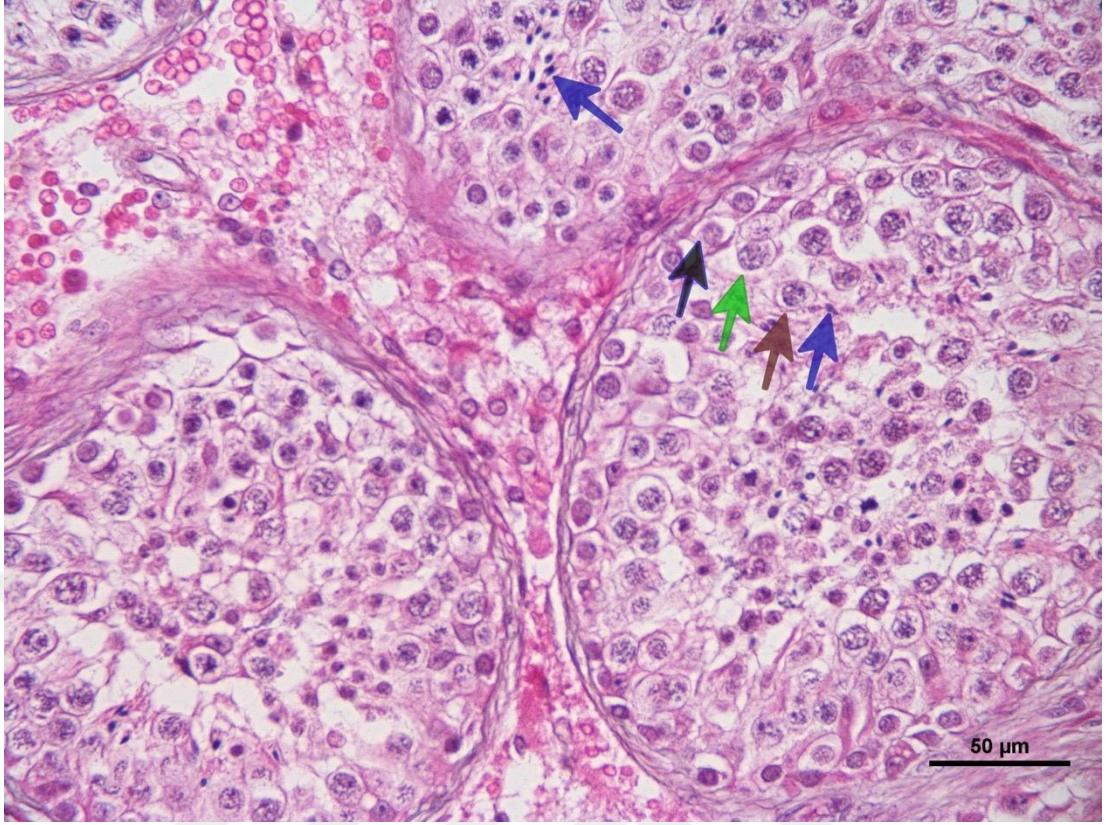
TESE (-) gruba ait H-E ile boyanan testis dokusu incelendiğinde, seminifer tübül içerisinde spermatogenik seri hücre gruplarına rastlanmamıştır. Çoğu seminifer tübülde düzenli bir lümen bulunmaması (dejenere), tübül yapısının küçülmesi (atrofik) ve hiyalinize tübüller gözlemlenmesi yapısal bütünlüğün belirgin şekilde bozulduğunun göstergesidir. Bazı tübüllerde, spermatogonyumlar görülmüş olsa da spermatogenezin diğer evrelerindeki hücrelerin görülmediği belirlenmiştir. Seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri yoğun olarak bulunmaktadır ve sitoplazmalarının eozinle boyanmamış olmasından dolayı şeffaf görüntüler elde edilmiştir (Resim 6.5 ve Resim 6.6). Bu duruma bağlı olarak spermatogenik seri hücrelerinden sadece spermatogonyuma rastlanmıştır. Bazı tübüllerde hipospermatogenez (Germ Hücre Hipoplazisi) nedeniyle germinal epitel yapısının gevşek olduğu görülmektedir ve incelmış boş tübül yapısına rastlanmıştır (Resim 6.5). Bazı dokulara ait kesitlerde, hiyalinleşmiş bozulmuş bazal membran varlığı görülmüştür ve tübül içi hücrelerin bazal membran ile bağlantılarının koptuğu tespit edilmiştir. Kontrol, TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait testis biyopsileri histopatolojik olarak incelenerek Johnsen skorlaması yapılmıştır. Johnsen skorlamasına göre spermatogenik seriye ait hücrelerin tübüller içerisindeki varlığına bakılıp, doku başına 50 tübül Johnsen 1-10 arası skorlanarak yüzdelik olarak veriler bulunmuştur. Gruplar arası semikantitatif analiz sonucunda kontrol grupta diğer iki gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (* $p < 0.05$) (Tablo 6.4).

Tablo 6.4. Tüm dokuların histopatolojik değerlendirmesi ve Johnsen skorlaması.

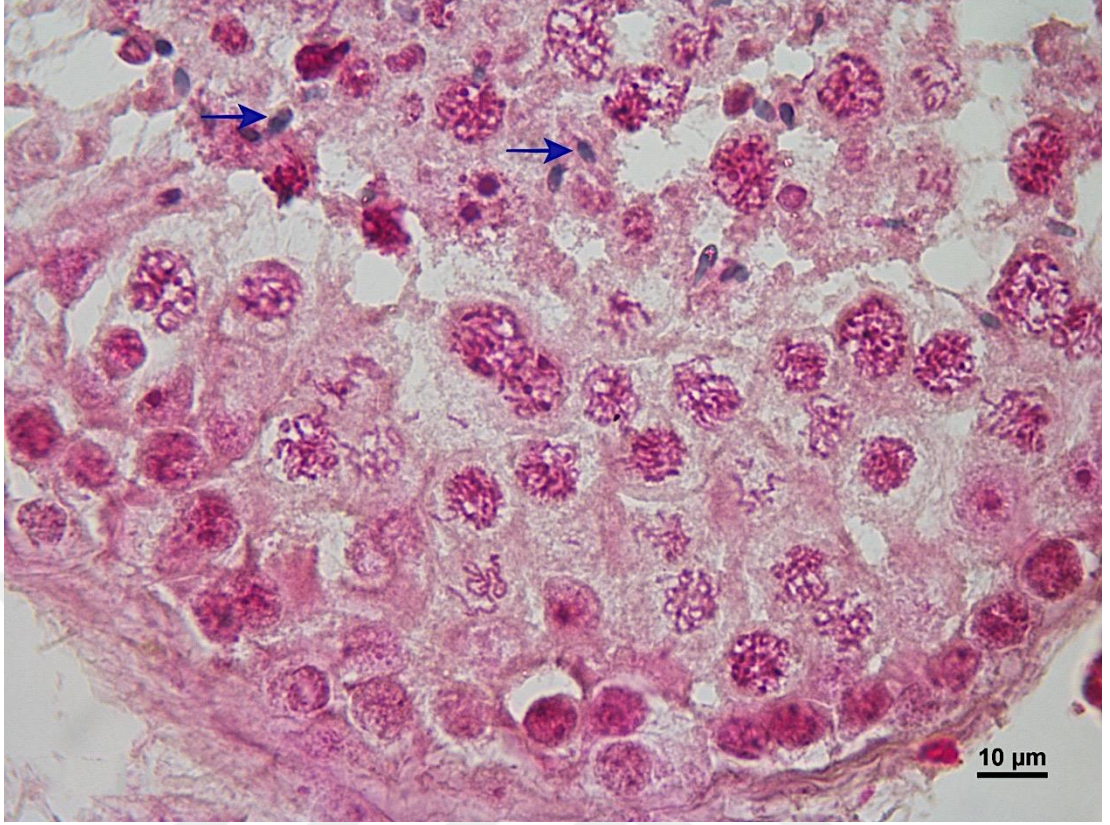
	Histolojik Kriter Skorlaması (Modifiye Johnsen Skorlaması)										Total
	Seminifer epitel yok	Germinal hücre yok, yalnız sertoli hücre	Sadece spermatogonia	Spermatid ya da spermatozoa yok, az sayıda spermatosit	Spermatid ya da spermatozoa yok, çok sayıda spermatosit	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, az sayıda erken spermatid	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, çok sayıda erken spermatid	Tübül başına ondan az spermatozoa, birkaç geç spermatid	Hafif derecede bozulmuş spermatogenez, birçok geç spermatid, düzensiz epitel	Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenezis	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
TESE (+) Grubu	0	0	0	0	0	4	6	16	4	0	30
TESE (-) Grubu	0	8	4	6	12	0	0	0	0	0	30
Kontrol Grubu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	30

TESE (+) Grubu			TESE (-) Grubu		
	n	%		n	%
Johnsen 10	0	0	Johnsen 10	0	0
Johnsen 9	4	13,3	Johnsen 9	0	0
Johnsen 8	16	53,3	Johnsen 8	0	0
Johnsen 7	6	20	Johnsen 7	0	0
Johnsen 6	4	13,3	Johnsen 6	0	0
Johnsen 5	0	0	Johnsen 5	12	40
Johnsen 4	0	0	Johnsen 4	6	20
Johnsen 3	0	0	Johnsen 3	4	13,3
Johnsen 2	0	0	Johnsen 2	8	26,6
Johnsen 1	0	0	Johnsen 1	0	0
Total	30	~100,0	Total	30	~100,0

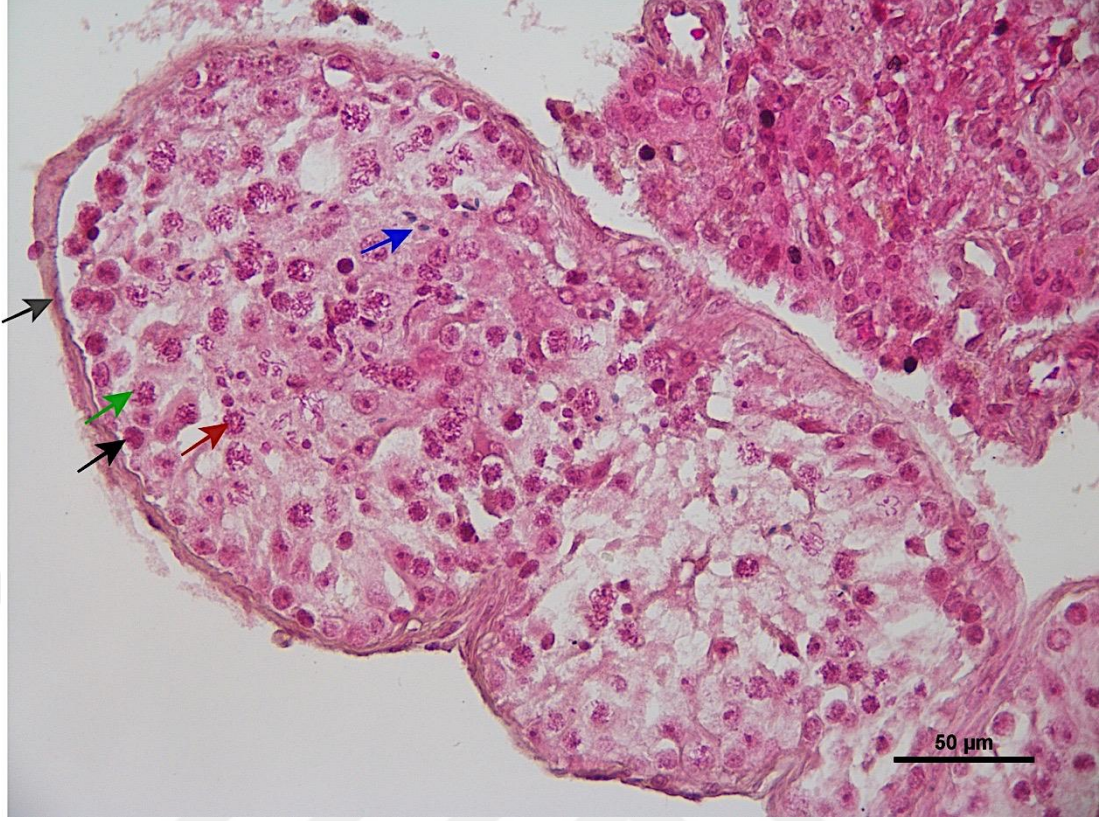
Histopatolojik Analiz	Kontrol Grubu (n=30)	TESE (+) Grubu (n=30)	TESE (-) Grubu (n=30)	p Değeri
Johnsen Skorlaması	10±0.2	7,86 ±0.2	4,93±0.2	0.031*



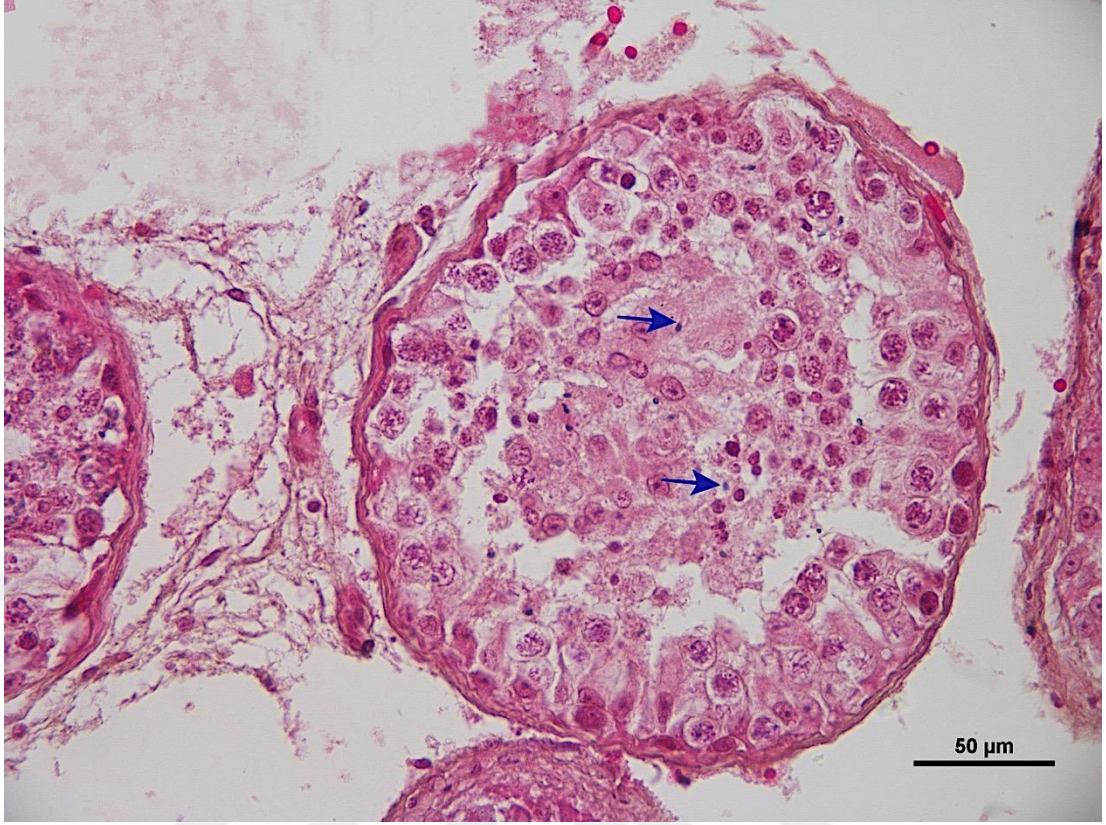
Resim 6.1. Kontrol grubuna ait testis dokusu. Seminifer tübülde spermatogonyum (siyah ok), spermatositler (kırmızı ok, yeşil ok), elongated sperm hücresi (mavi ok), tübül lümenine doğru sıralanmış spermatogenik seri hücreleri (mavi çizgi) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, Bar: 50µm, H-E boyama.



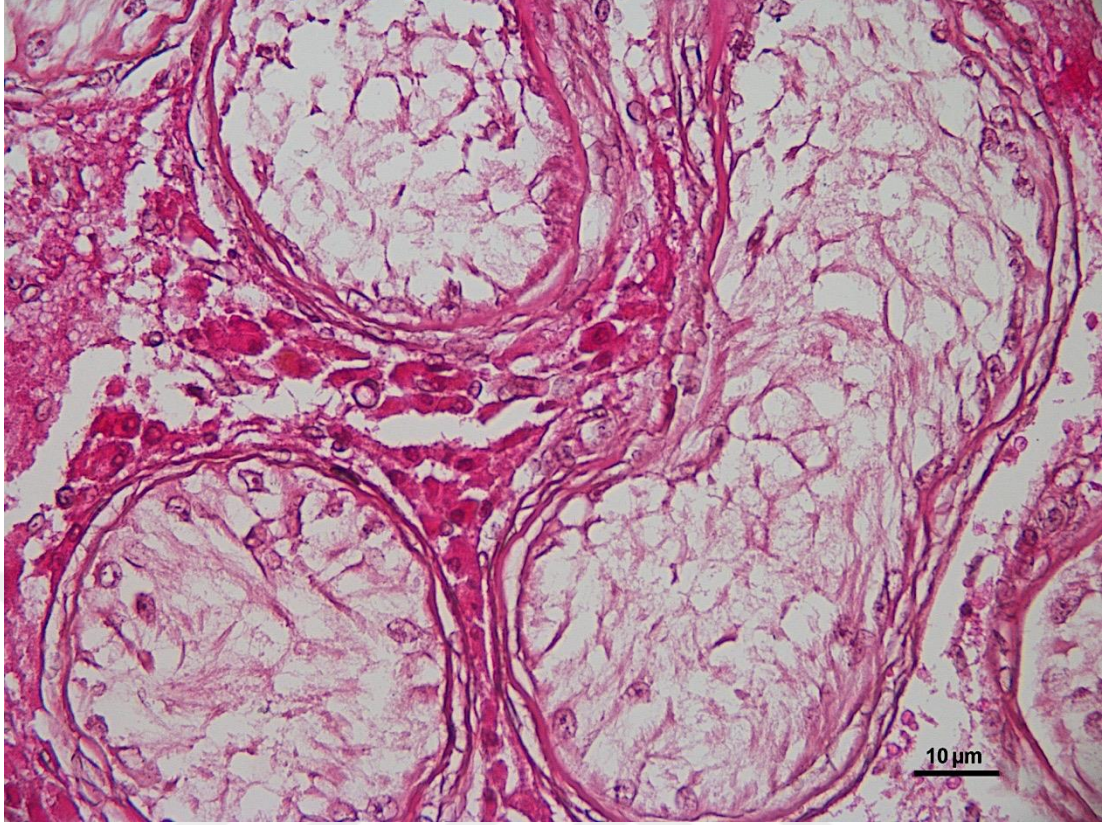
Resim 6.2. Kontrol grubuna ait bütünlüğünü koruyan bir seminifer tübülün yapısı. Spermatogenik seri hücrelerinin tümünü içerdiği görülmektedir. Mavi oklar sperm hücrelerinin başlarını göstermektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar:10µm, H-E boyama.



Resim 6.3. TESE (+) gruba ait testis dokusu. Seminifer tübül bazal membranı (gri ok), spermatogonyum (siyah ok), spermatositler (kırmızı ok, yeşil ok), elongated sperm hücresi (mavi ok) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme:40X, Bar: 50µm, H-E boyama.



Resim 6.4. TESE (+) gruba ait seminifer tübül içinde yer alan elongated sperm hücresi (mavi ok). Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, Bar: 50µm, H-E boyama.



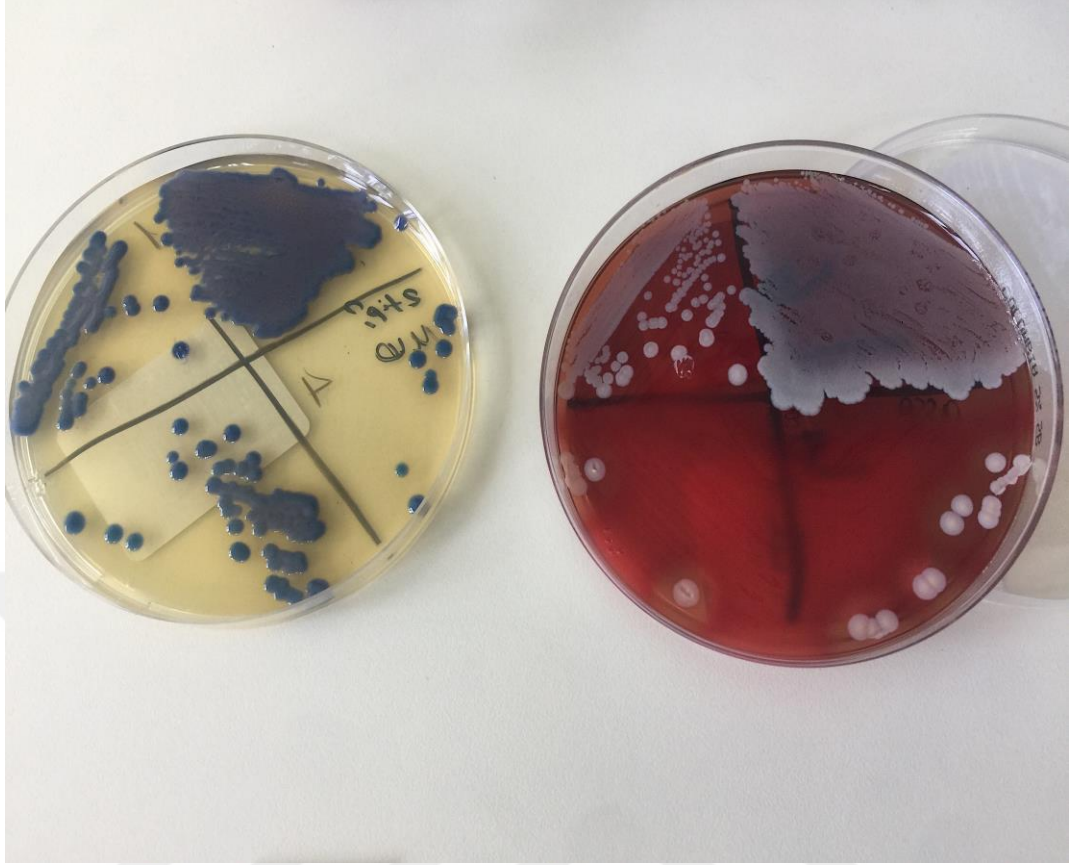
Resim 6.5. TESE (-) gruba ait testis dokusu. Az sayıda spermatogonyum varlığı hipospermatogenezin (germ hücre hipoplazisi) göstergesidir. Germinal epitelin gevşek ve incelmış olduğu görülmektedir. Spermatogenik seri hücreleri içermeyen atrofik tübül yapısı dikkat çekmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar:10µm, H-E boyama.



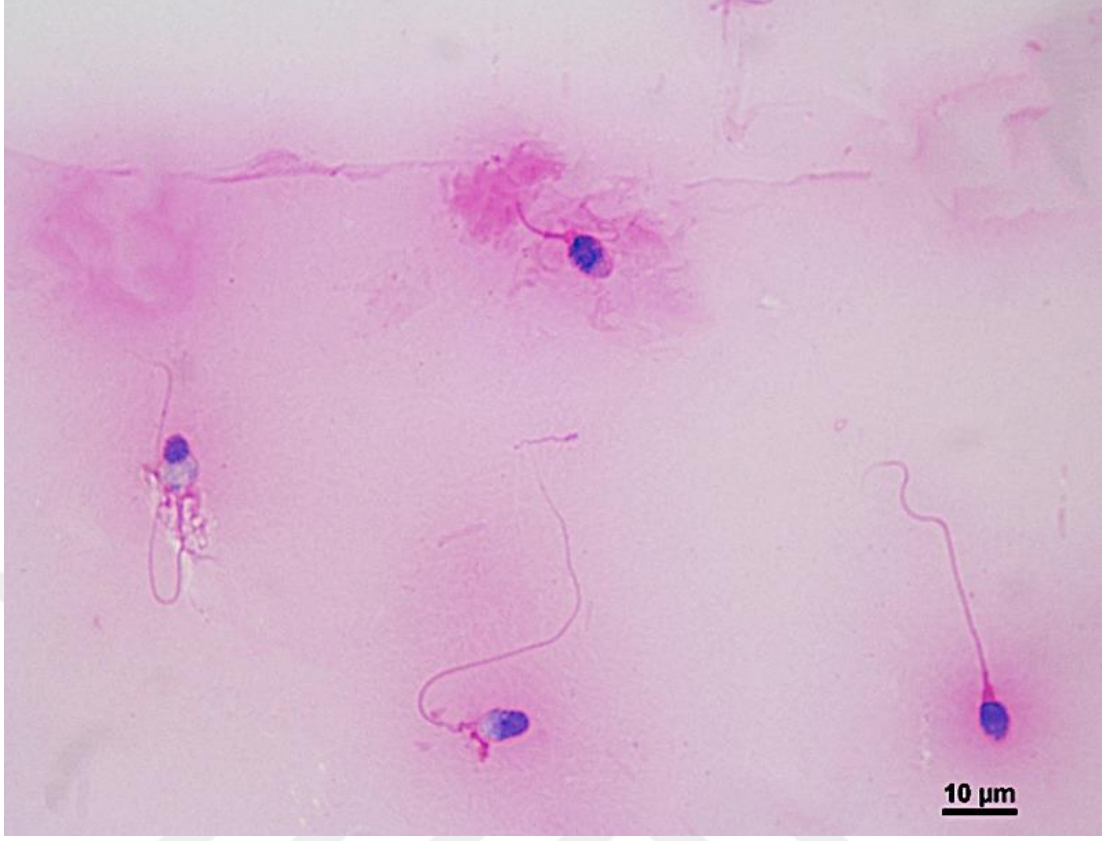
Resim 6.6. TESE (-) gruba ait seminifer tübül yapısı. Seminifer tübül duvarında hyalin, fibröz ve eozinofilik materyal ile konsantrik kalınlaşma (siyah ok) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, Bar: 50µm, H-E boyama.

6.2.2. Gram boyama değerlendirilmesi

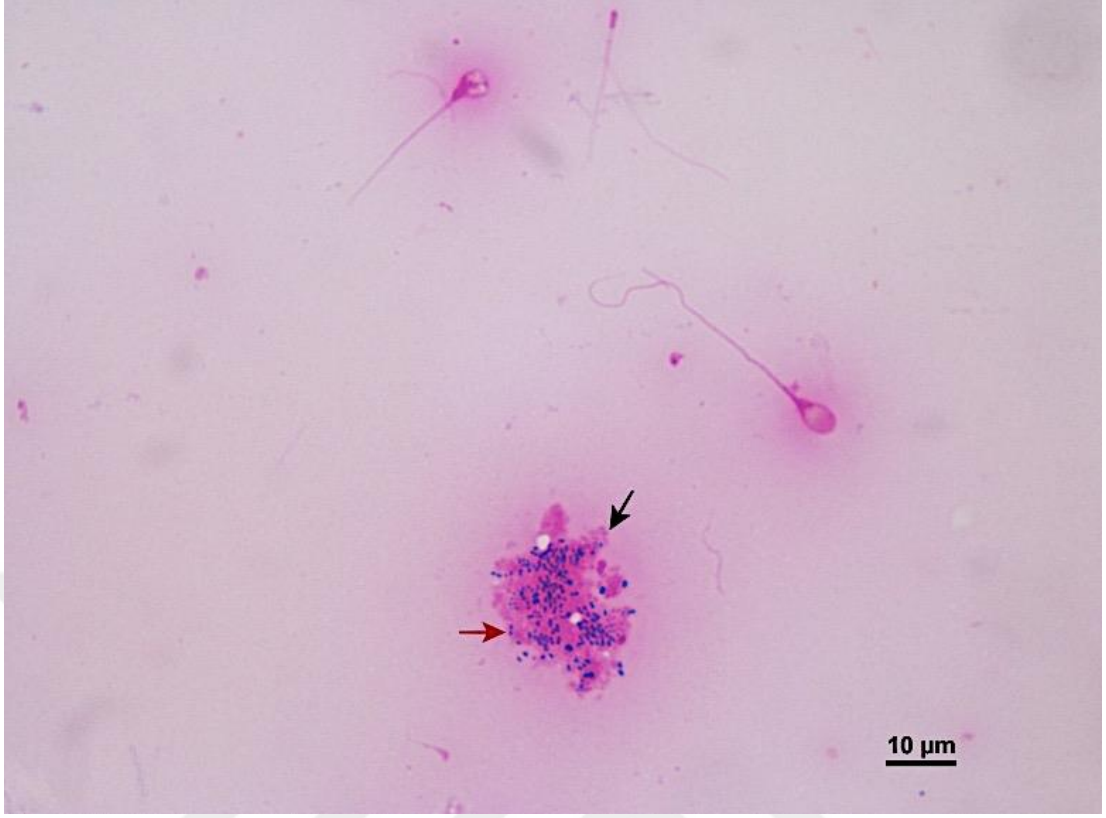
Gram boyama kontrolü için hazır kültürden gram pozitif kok (kırmızı), gram negatif çomak (mavi) bakterileri alınıp lam kenarlarına yayılarak korele boyama yapılmıştır (Resim 6.7). Boyama sonrası kontrol grubuna ait doku ekstrelerinde bakteriyel varlığa rastlanmamıştır (Resim 6.8). TESE (+) ve TESE (-) gruplarında gram pozitif ve gram negatif bakteri varlığı benzer yoğunlukta gözlemlenmiştir (Resim 6.9 ve Resim 6.10). Gram negatif bakteri diplokok benzeri yapıda pembe renkte boyanma gösterirken, gram pozitif bakteriler kok benzeri yapıda mor renkte boyanma göstermiştir.



Resim 6.7. Gram boyama kontrolü için, hazır kültürden gram pozitif kok (kırmızı) ve gram negatif çomak (mavi) bakterileri alınıp lam kenarlarına yayılarak korele boyama yapılmıştır.

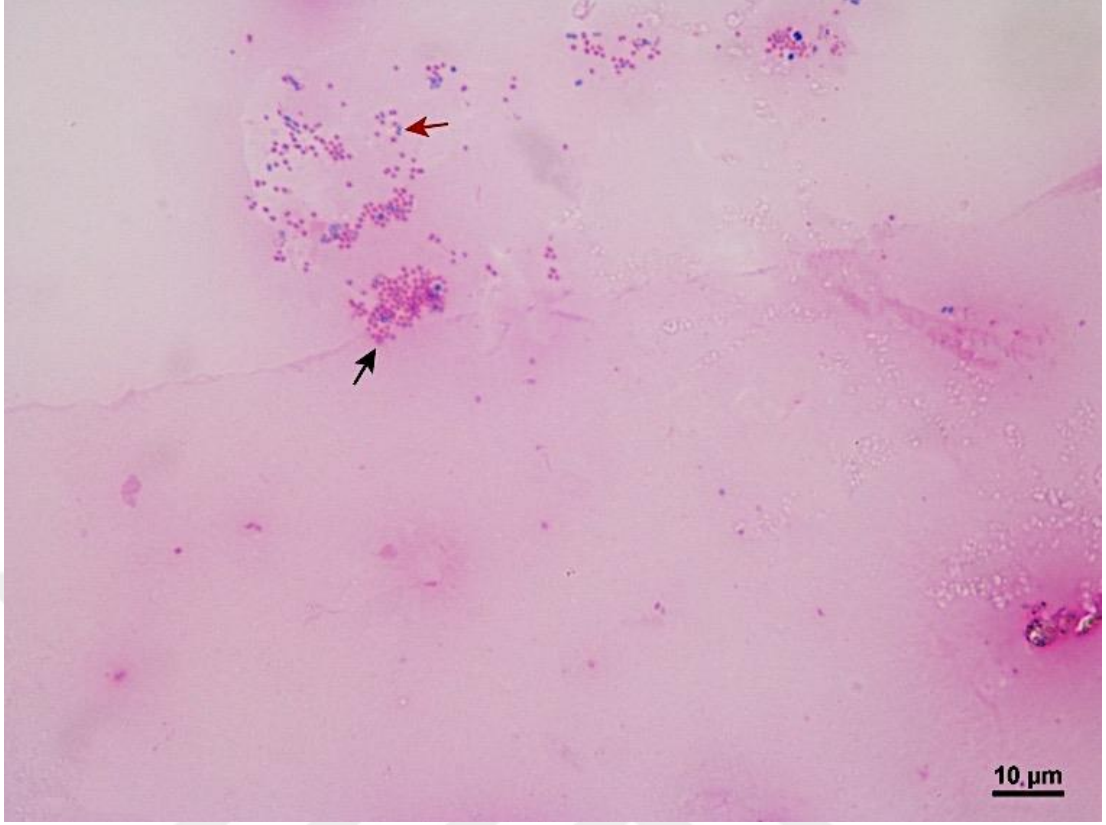


Resim 6.8. Kontrol grubuna ait testis sürüntüsünde bakteri boyanması mevcut değildir, Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar: 10 µm, Gram boyama.



Resim 6.9. TESE (+) gruba ait testis sürüntüsünde bakteri varlığı gösterilmiştir.

Gram negatif diplokoklar pembe renkte (siyah ok) ve gram pozitif koklar mor benzeri renkte (kırmızı ok) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar:10 µm, Gram boyama.



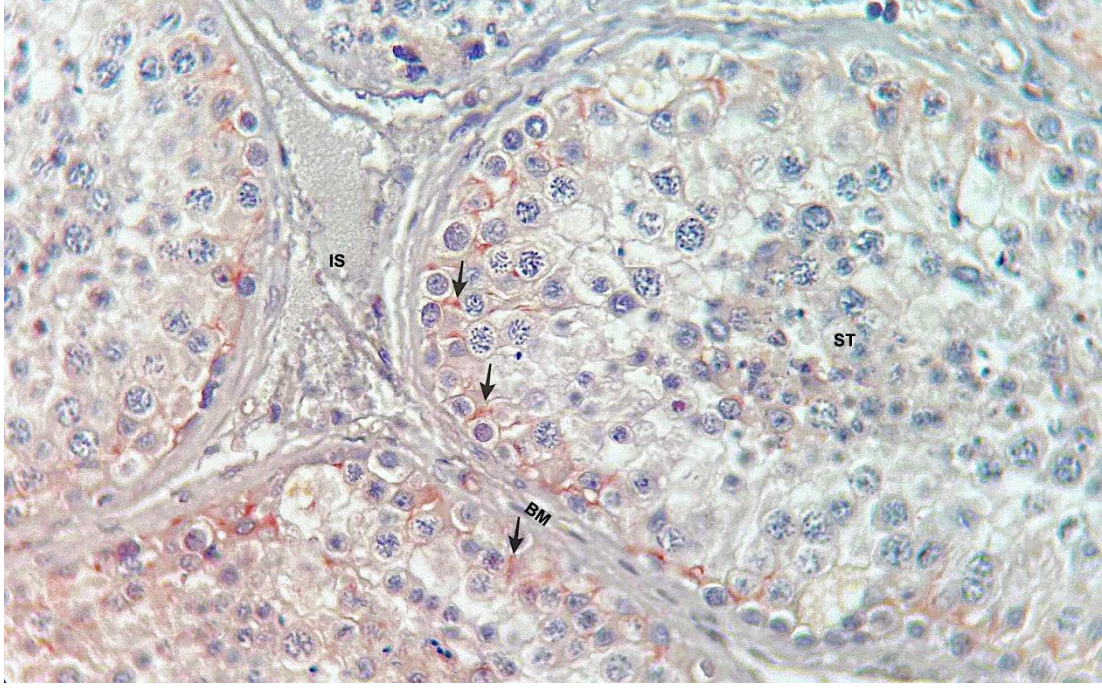
Resim 6.10. TESE (-) gruba ait testis sürüntüsünde bakteri varlığı gösterilmiştir.

Gram negatif diplokoklar pembe renkte (siyah ok) ve gram pozitif koklar mor benzeri renkte (kırmızı ok) görülmektedir. Işık mikroskobu, Büyütme: 100X, Bar: 10 µm, Gram boyama.

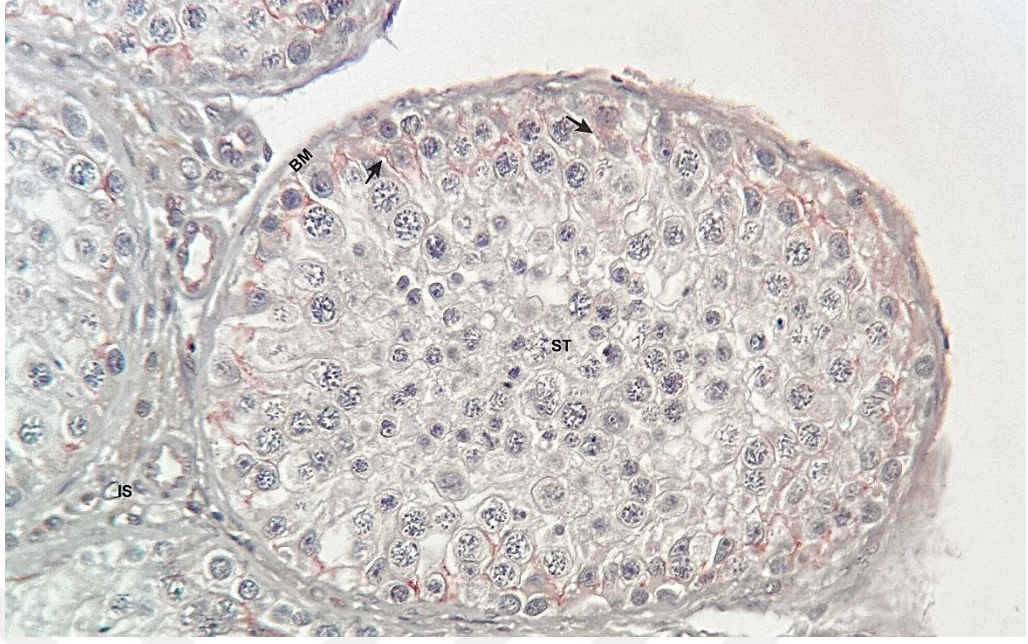
6.2.3. Dokuda ZO-1 proteinin immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

Testiküler doku biyopsi örneklerinde KTB'ni oluşturan bağlantı proteini ZO-1'in immünohistokimyasal boyanması sonrasında kontrol grubunda Sertoli hücreleri arasında normal ZO-1 ekspresyonu gözlenmiştir (Resim 6.11). Ayrıca sertoli hücrelerinin lateral ve yan yüzeyleri boyunca kesintisiz bir boyanma tespit edilmiştir. TESE (+) grubuna ait testis dokularının bazı alanlarında ZO-1 ekspresyonunun az olduğu gözlenmiştir. Ancak bu grupta bütünlüğünü korumuş seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri arasında da ZO-1 ekspresyonunun çok olduğu gözlenmiştir (Resim 6.12). TESE (-) grubuna ait testis dokularında ise bazı tübüllerde sadece Sertoli hücrelerini içeren seminifer tübüllerin varlığı sadece Sertoli hücre sendromunun mevcut olduğunu göstermektedir. Bu örneklerde ZO-1 ekspresyonu gözlenmemiştir. TESE (-) grubunda spermatogonyumların olduğu seminifer

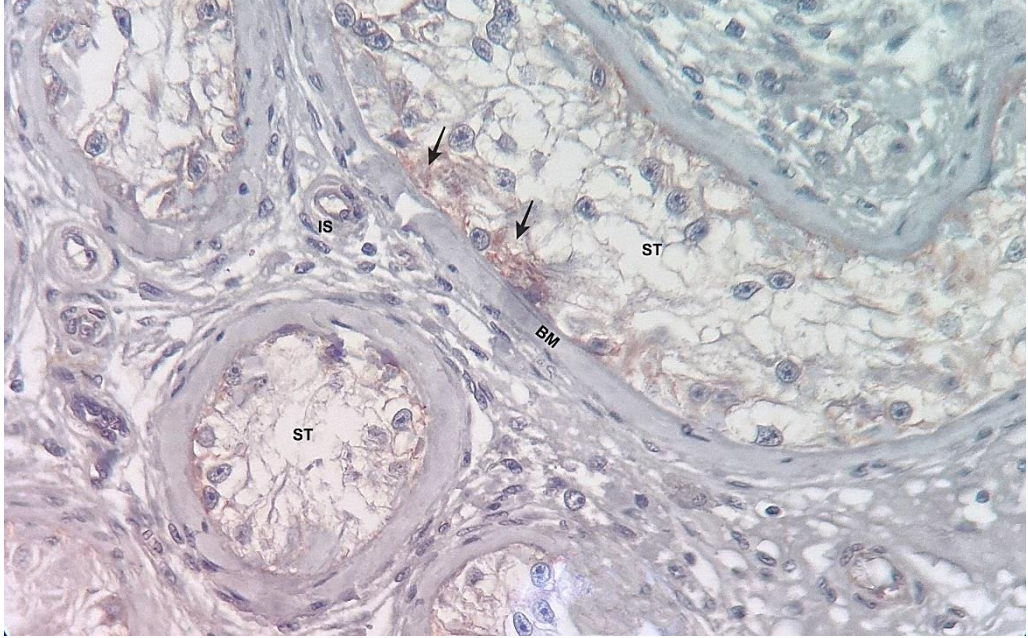
tübüllerin bazılarında bazal kompartmanın bir kısmında ve adluminal bölgeyi kaplayan yan yüzeylerinde ZO-1 ekspresyonu görülmüştür (Resim 6.13). Kontrol grubunda yüksek ekspresyon gösteren ZO-1 reaksiyonu, TESE (+) grubu ve TESE (-) gruplarına göre anlamlı olarak yüksek gözlenmiştir (* $p < 0.05$). Semi kantitatif istatistiksel sonuçlar; Kontrol Grubu: 65.4 ± 2.2 , TESE (+) Grubu: 44.5 ± 2.02 , TESE (-) Grubu: 23.4 ± 1.8 .



Resim 6.11. Kontrol grubuna ait testis dokusunda sertoli hücreleri arası bağlantı bölgelerinde ZO-1 (→) ekspresyonu mevcuttur. Seminifer tübüller (ST), Bazal Membran (BM), İnteristiyum alanı (IS). Işık Mikroskobu, Büyütme: 40X, ZO-1 immunohistokimya boyaması.



Resim 6.12. TESE (+) gruba ait testis dokusunda bazı seminifer tübüllerde (ST) Bazal Membran (BM) altında sertoli hücreleri arası bağlantı bölgelerinde ZO-1 (→) ekspresyonu mevcuttur. Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, ZO-1 immunohistokimya boyaması.

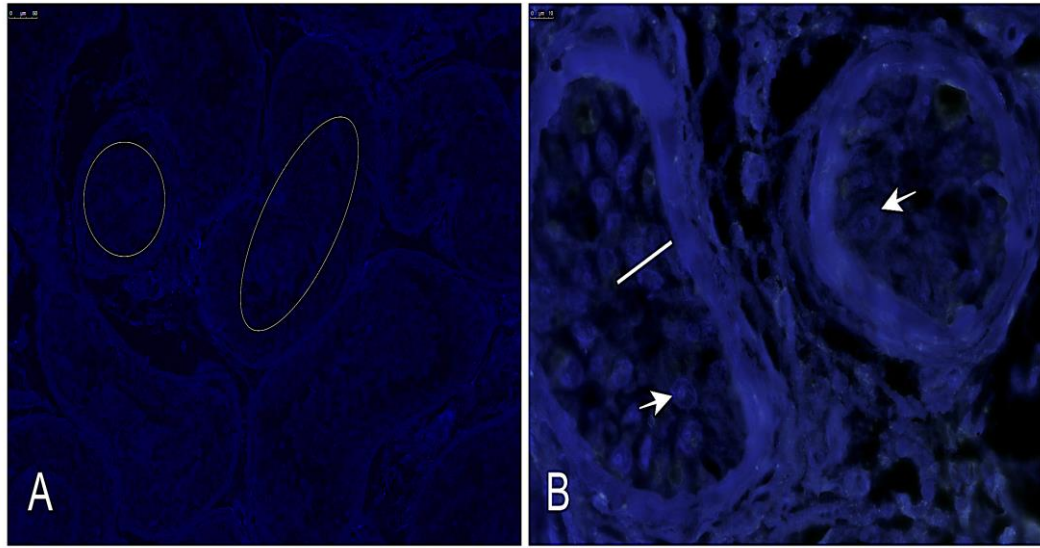


Resim 6.13. TESE (-) gruba ait testis dokusunun bazı seminifer tübüllerin (ST) Bazal Membrana (BM) yakın bölgesinde bazal kompartmanda hafif ZO-1 (→) boyanması görülmüştür. İnteristisyum alanı (IS), Işık mikroskobu, Büyütme: 40X, ZO-1 immunohistokimya boyaması.

6.3. Floresan Mikroskop Bulguları

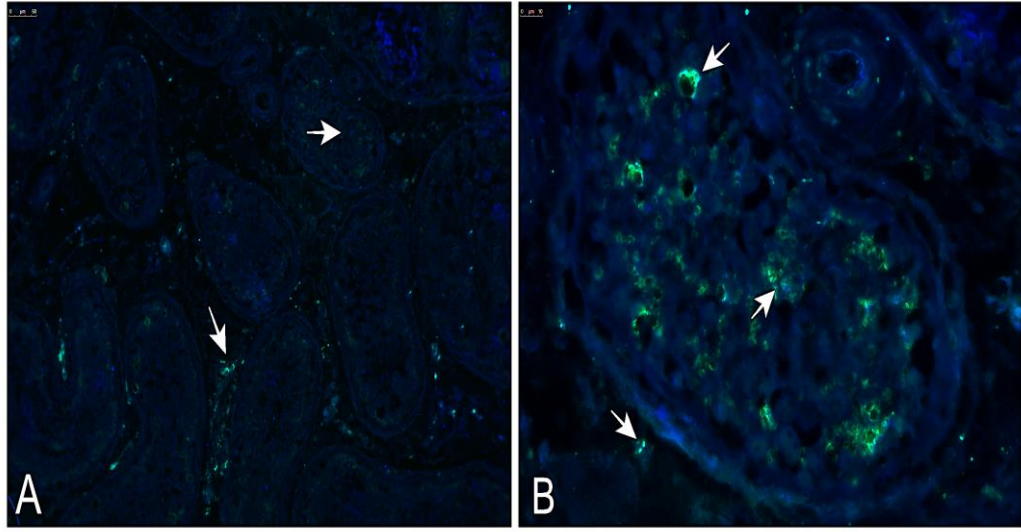
6.3.1. Dokuda *Neisseria gonorrhoeae* varlığının immünfloresan olarak değerlendirilmesi

Neisseria gonorrhoeae bakterisinin immünfloresan boyanması sonrası kontrol grubuna ait testiküler dokularda bakteriye ait herhangi bir boyanmaya rastlanmamıştır (Resim 6.14). TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait testiküler dokularda *Neisseria gonorrhoeae* bakterisi immünfloresan olarak yeşil ışımlar yapmıştır ve böylece varlığı gösterilmiştir (Resim 6.15 ve Resim 6.16).

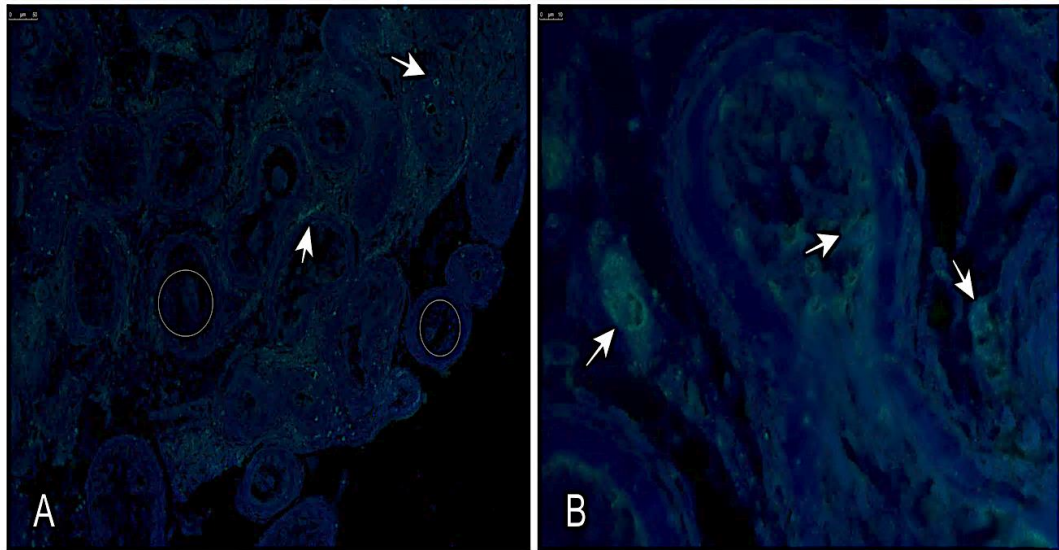


Resim 6.14. Kontrol grubunda *Neisseria gonorrhoeae* immünfloresan boyanması;

A- Spermatogenik seri hücrelerinin tümünü içeren seminifer tübül yapısı (halka, çizgi) Büyütme: 40X, B- DAPI ile çekirdek boyanması (beyaz ok) Büyütme: 100X, Floresan mikroskobu.



Resim 6.15. TESE (+) gruba ait testis dokusunda *Neisseria gonorrhoeae* immünfloresan boyaması. Spermatogenik seri hücreleri mevcut olan mozaik bir tübülün yapısı, A-B mikrograflarında seminifer tübüller arası ve seminifer tübül içi FITC yeşil boyaması (beyaz ok), A Büyütme: 40X, B Büyütme: 100X, Floresan mikroskobu.



Resim 6.16. TESE (-) gruba ait testis dokusunda *Neisseria gonorrhoeae* immünfloresan boyaması. Spermatogenik seri hücreleri içermeyen boş tübül yapısı (halka), A-B mikrograflarında seminifer tübüller arası ve seminifer tübül içi FITC yeşil boyaması (beyaz ok). A Büyütme: 40X, B Büyütme: 100X, Floresan mikroskobu.

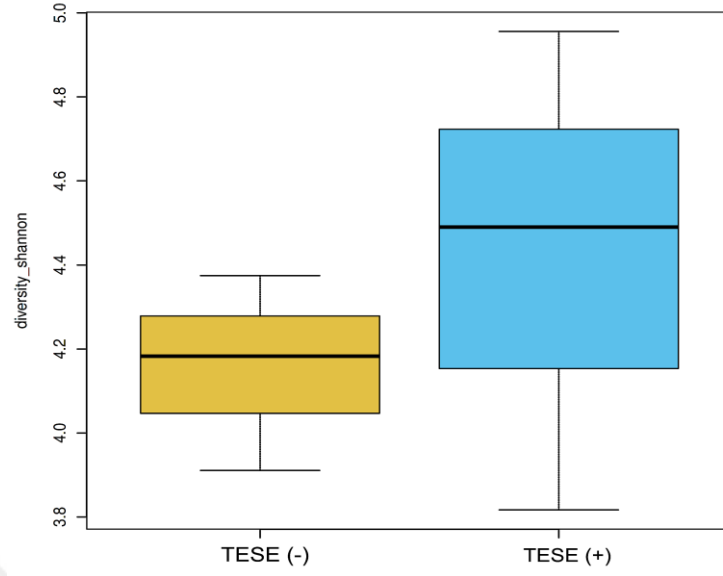
6.4. Testis Dokusunda Mikrobiyota Bulguları

Dizileme sonrası kontrol grubuna ait testiküler dokularda mikrobiyotaya rastlanmamıştır. 16S rRNA varlığına rastlanmayan kontrol grubu dışında TESE (+) grubu (n=15) ve TESE (-) grubu (n=15) doku örneklerinde mikrobiyota gözlenmemiştir. Mikrobiyota varlığı; TESE (+) grubu (n=15) ve TESE (-) grubuna (n=15) ait testiküler doku örneklerinden elde edilmiştir. Ayrıca negatif kontrol amacıyla çalışma sahası kontrol altına alınarak yapılan analizde PCR sonucunda bantlar izlenmemiştir yani mikrobiyota varlığı gözlenmemiştir. Çalışmaya bu koşullarda devam edilmiştir.

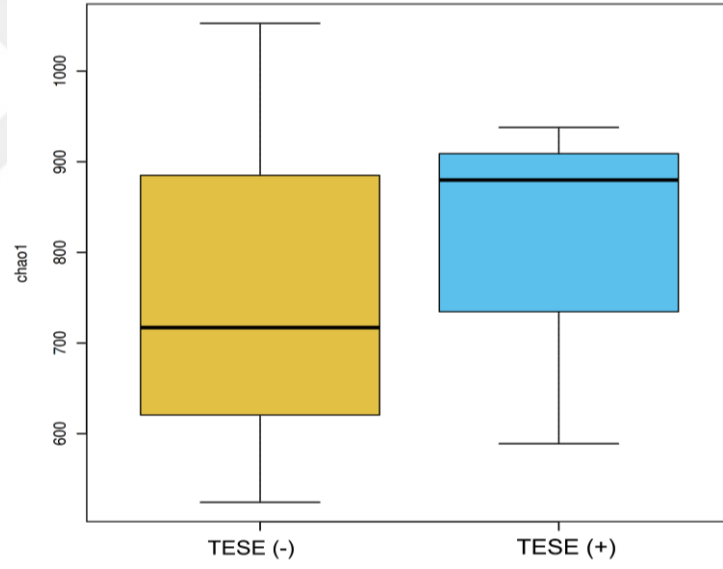
Alpha çeşitlilik analizine göre;

Alpha çeşitlilik analizinde shannon testine göre gruplar arası çeşitlilik TESE (+) grubunda, TESE (-) grubuna göre daha fazla izlenmiştir fakat anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p= 0,51$) (Şekil 6.1). Alpha çeşitlilik analizinde chao testine göre TESE (-) grubunda bakteri yoğunluk miktarı TESE (+) grubundan daha fazla bulunmuştur ancak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p= 0,82$) (Şekil 6.2).

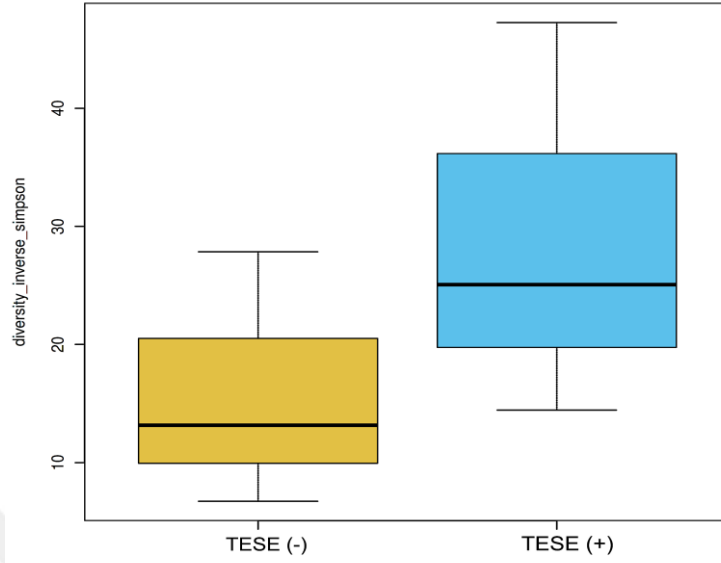
Alpha çeşitlilik analizinde simpson testine göre gruplar arası farklılıklar rastgele gözlenmektedir. TESE (-) grubunda çeşitlilik birbirine yakinken, TESE (+) grubunda çeşitlilik birbirinden uzak olarak izlenmiştir ve anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p= 0,27$) (Şekil 6.3). Alpha çeşitlilik istatistiksel analizi için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır.



Şekil 6.1. TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait alpha çeşitlilik analizinde Shannon test verileri.



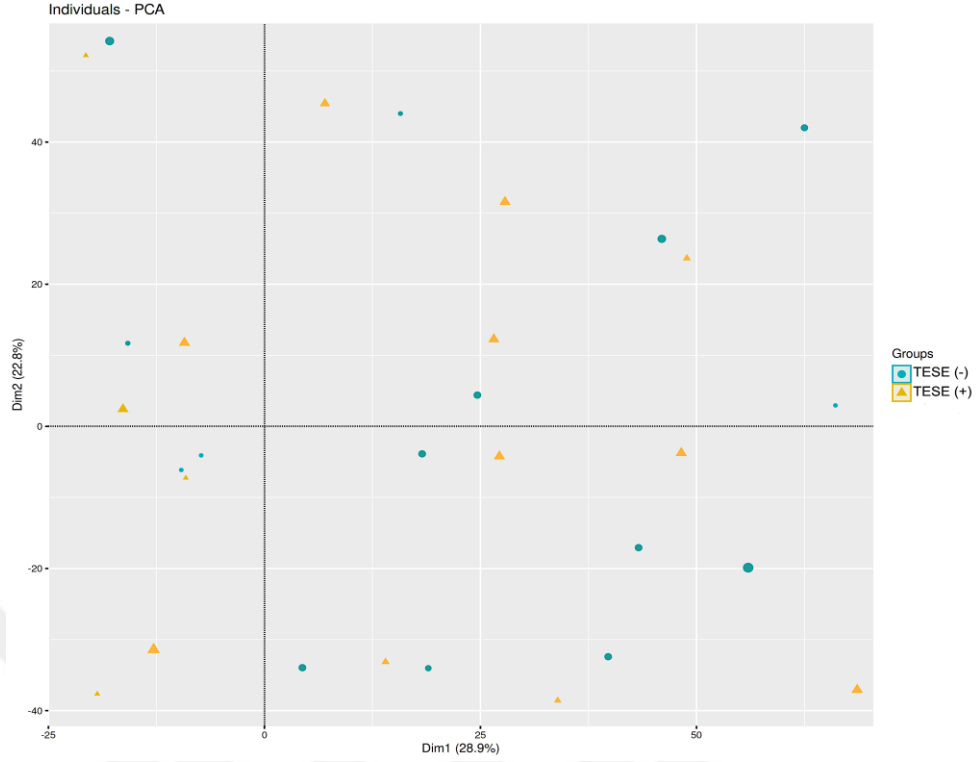
Şekil 6.2. TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait alpha çeşitlilik analizinde Chao test verileri.



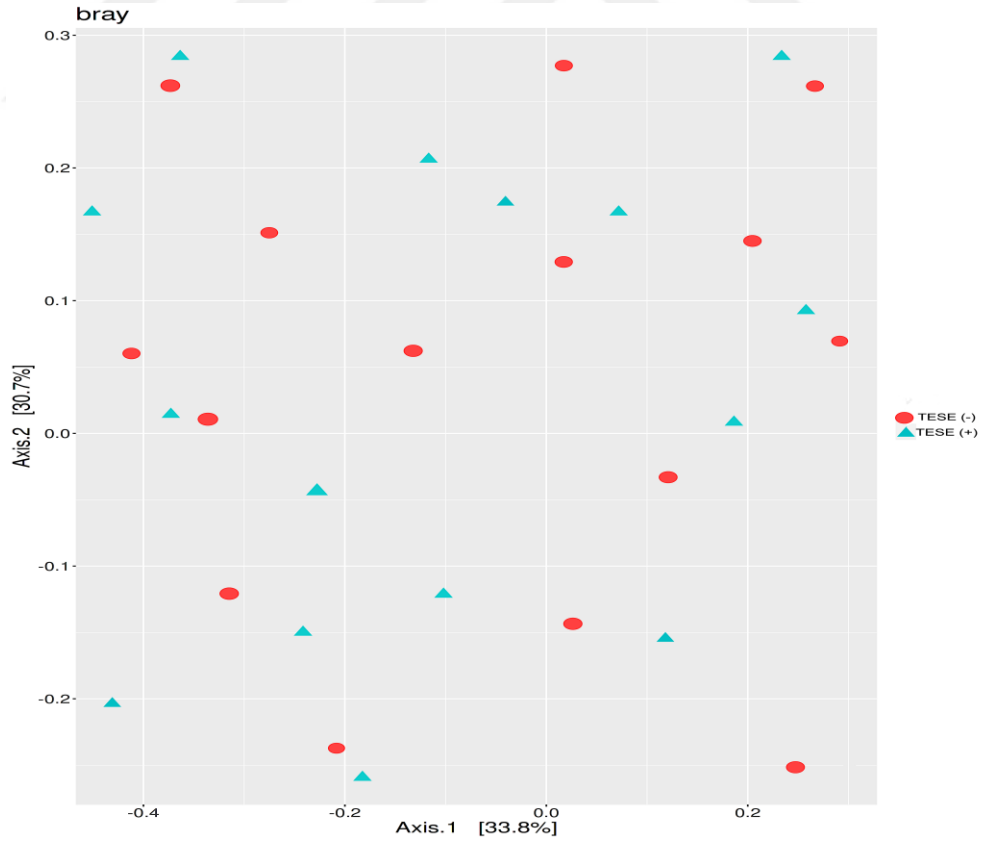
Şekil 6.3. TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait alpha çeşitlilik analizinde Simpson testi verileri.

Beta çeşitlilik analizine göre;

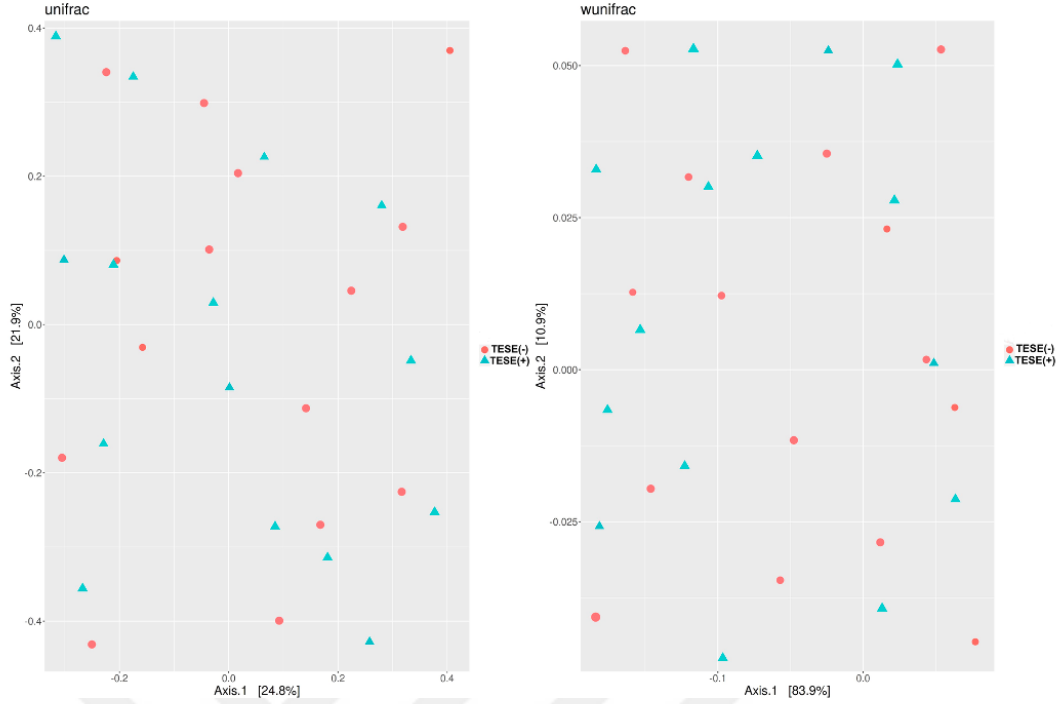
Gruplar arası benzerliği değerlendirmek için yapılan beta çeşitlilik analizinde PCA testine göre TESE (+) ve TESE (-) grupları arasında fark gözlenmemiştir. Bireysel varyasyonlar gözlense de grup bazında varyasyon oluşmamıştır ($p=0,47$) (Şekil 6.4). PCoA-bray testine göre TESE (-) ve TESE (+) grupları arasında farklılık gözlenmemiştir ($p=0,55$) (Şekil 6.5). PCoA analizinde unifract (unweighted/weighted) testine göre TESE (-) ve TESE (+) grupları arasında filogenik olarak yoğunluk ve çeşitlilik açısından benzer gösterilmiştir ($p=0,43$) (Şekil 6.6). Permanova testi ile istatistiksel analiz kullanılmıştır. Elde edilen sayısal değerler relative abundance değerlerini tespiti için yüzdelik sisteme normalize edilmiştir.



Şekil 6.4. TESE (+) ve TESE (-) grupları beta çeşitlilik analizinde PCA test verileri.



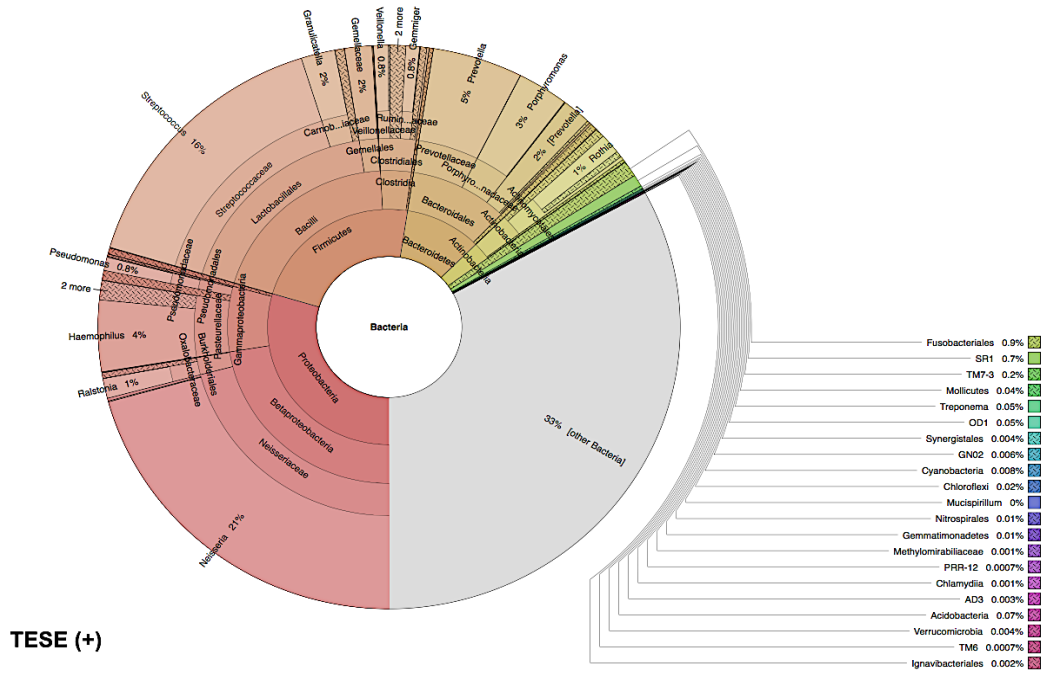
Şekil 6.5. TESE (+) ve TESE (-) grupları beta çeşitlilik analizinde PCoA-bray test verileri.



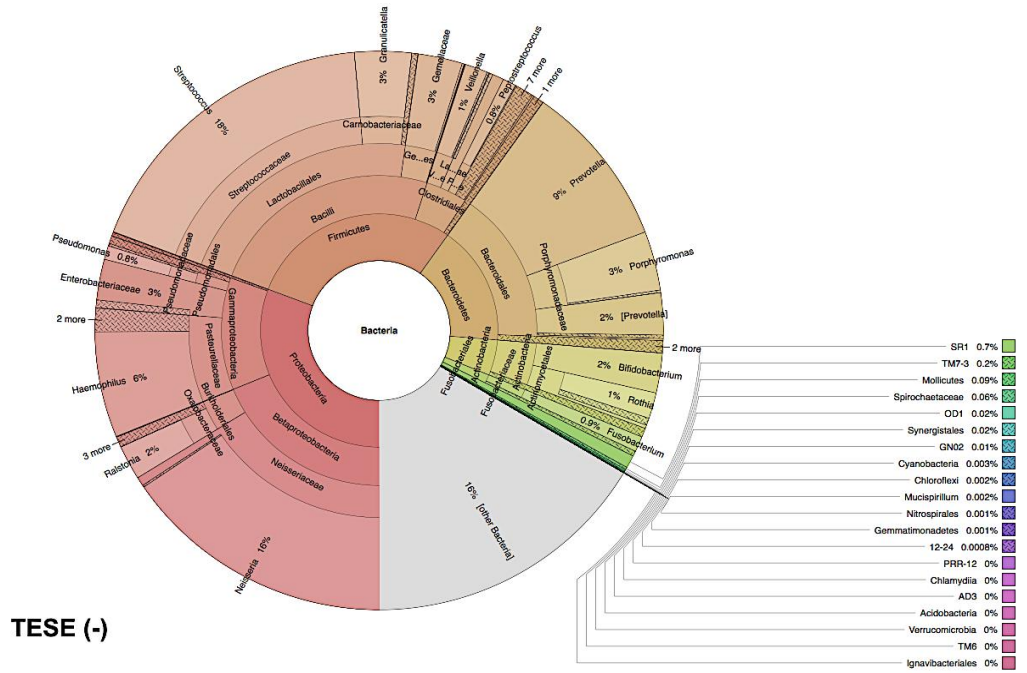
Şekil 6.6. TESE (+) ve TESE (-) grupları arası beta çeşitlilik analizinde PCoA-Unifrac test verileri.

Krona analizine göre;

TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait testiküler dokularda mikrobiyota içerikleri krona analizi ile yüzdesel olarak değerlendirilmiştir. *Proteobacteria*, TESE (+) grubunda %30 oranında bulunurken TESE (-) grubunda %31 oranında görülmüştür ve oranlar birbirine benzer bulunmuştur. Aynı şekilde *Firmucutes* bakterisinin sırasıyla %23 ve %29 oranlarında varlığı tespit edilmiştir. *Bacteroidetes*, TESE (+) grubunda %10 oranındayken TESE (-) grubunda %17 oranı ile benzerlik göstermektedir. *Actinobacteria* %2 oranında TESE (+) grubunda mevcutken, %5 oranında TESE (-) grubunda bulunmaktadır. *Fusobacteria*, %0,9 oranında TESE (+) grubunda gözlenirken TESE (-) grubunda bu oran %1 olarak bulunmuştur. Bu bakterilerin alt türlerine ait bakteri popülasyonu ve yüzdelik bulunma oranları Şekil 6.7 ve 6.8’de verilmiştir. Elde edilen sayısal değerler relative abundance değerlerini tespiti için yüzdelik sisteme normalize edilmiştir.



Şekil 6.7. Krona analizine göre TESE (+) grubundaki bakterilerin oranları.



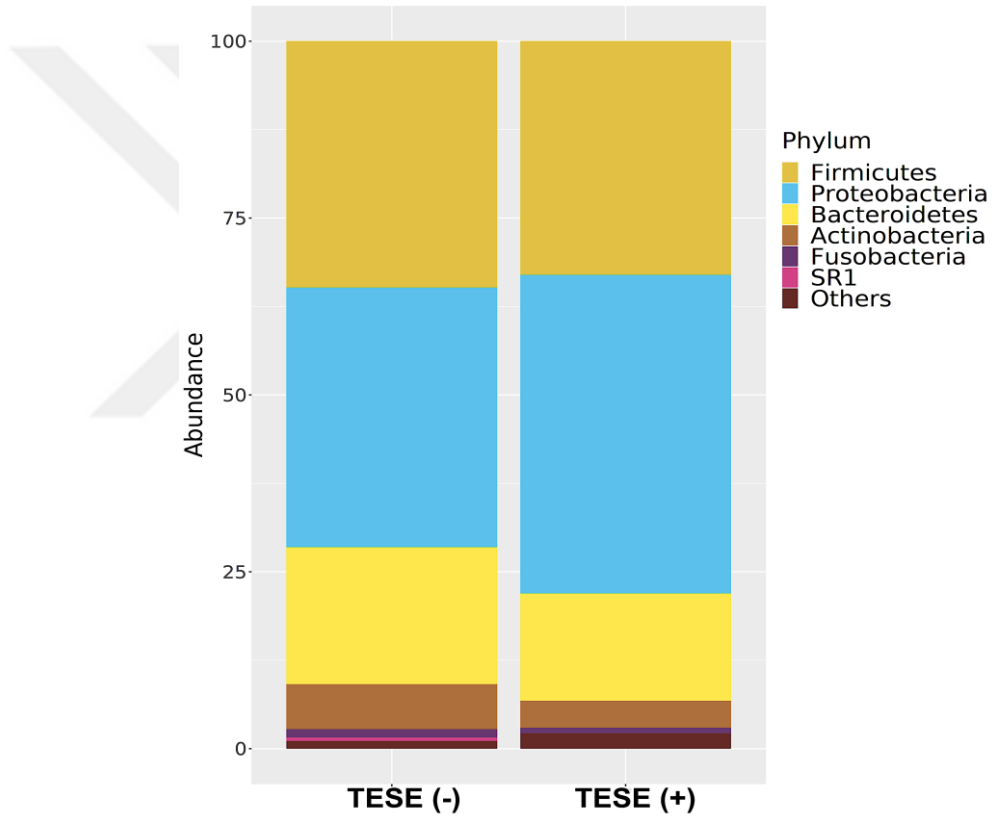
Şekil 6.8. Krona analizine göre TESE (-) grubundaki bakterilerin oranları.

Taxabar plot yöntemi sonuçlarına göre;

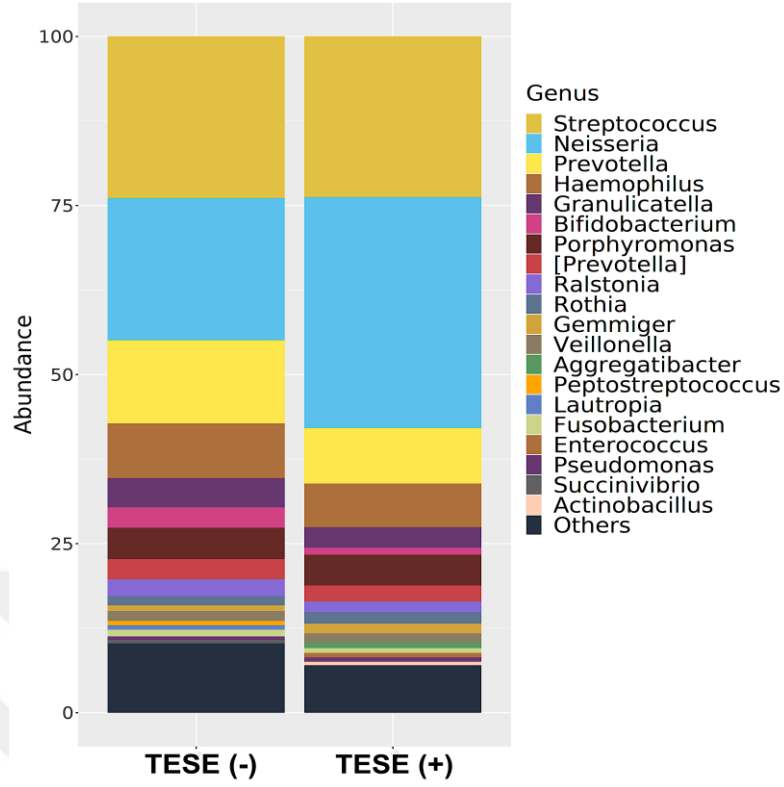
TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait dokuların mikrobiyota içeriklerinin taxabar plot ile phylum türlemesi sonuçlarına göre, TESE (+) grubunda *Firmicutes* bakterisi TESE (-) grubu ile benzer bulunmuştur. *Proteobacteria* miktarı iki grupta da benzer bulunmuştur.

TESE (-) grubunda TESE (+) grubuna göre *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Fusobacteria* bakterileri minimal düzeyde yüksek bulmuştur (Şekil 6.9).

Testiküler dokuların mikrobiyota içeriklerinin taxabar plot ile genus alt türlemesine göre *Proteobacteria* alt grubu olan *Neisseria* bakteri türünün varlığı, TESE (+) grubunda TESE (-) gruba göre yüksek görülmüştür. *Streptococcus*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Granulicatella*, *Bifidobacterium*, *Porphyromonas*, *Ralstonia*, *Rothia*, *Gemmiger*, *Veillonella*, *Aggregatibacter*, *Peptostreptococcus*, *Lautropia*, *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Succinivibrio*, *Actinobasillus* bakterileri iki grupta benzer gözlenmiştir (Şekil 6.10).



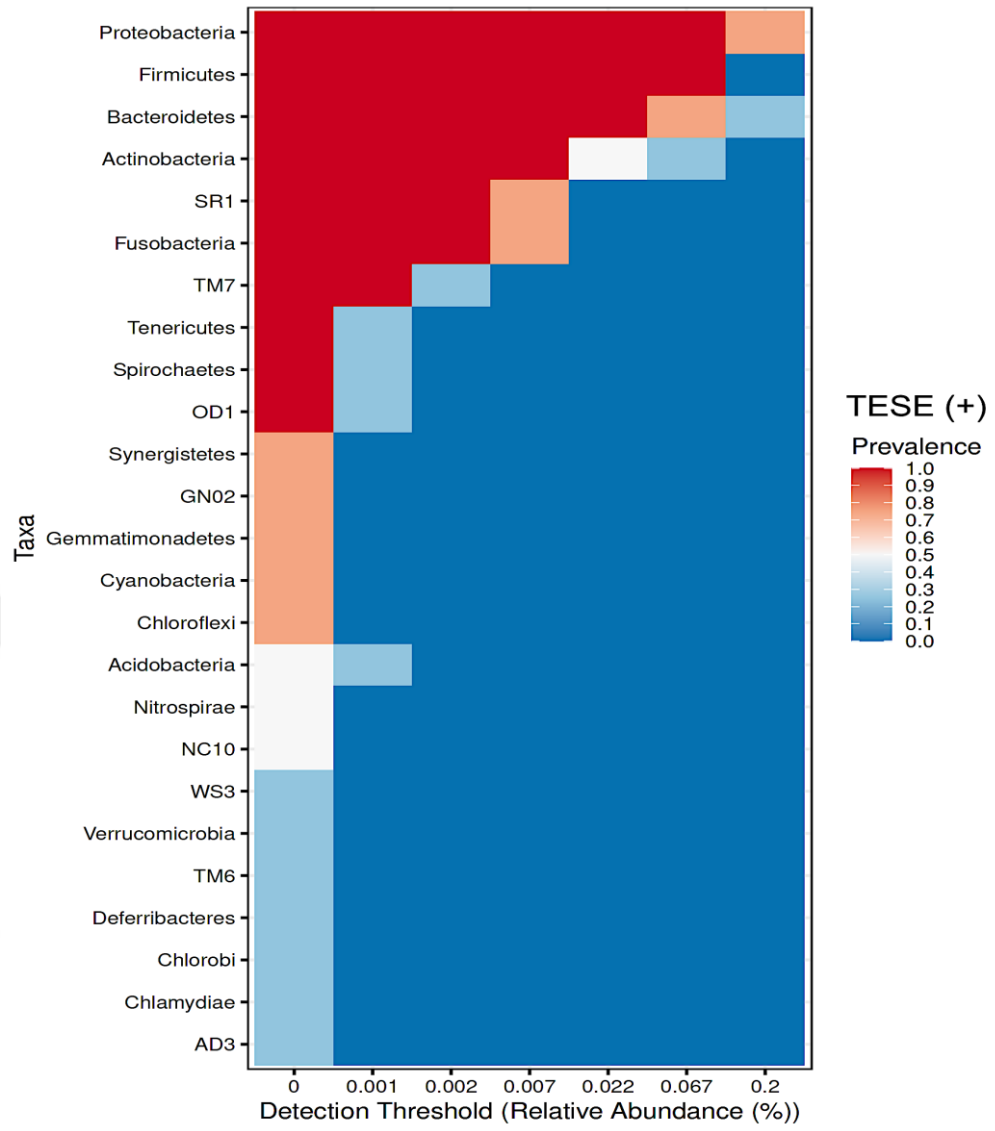
Şekil 6.9. Gruplar arası phylum analizinin taxabar plot verileri.



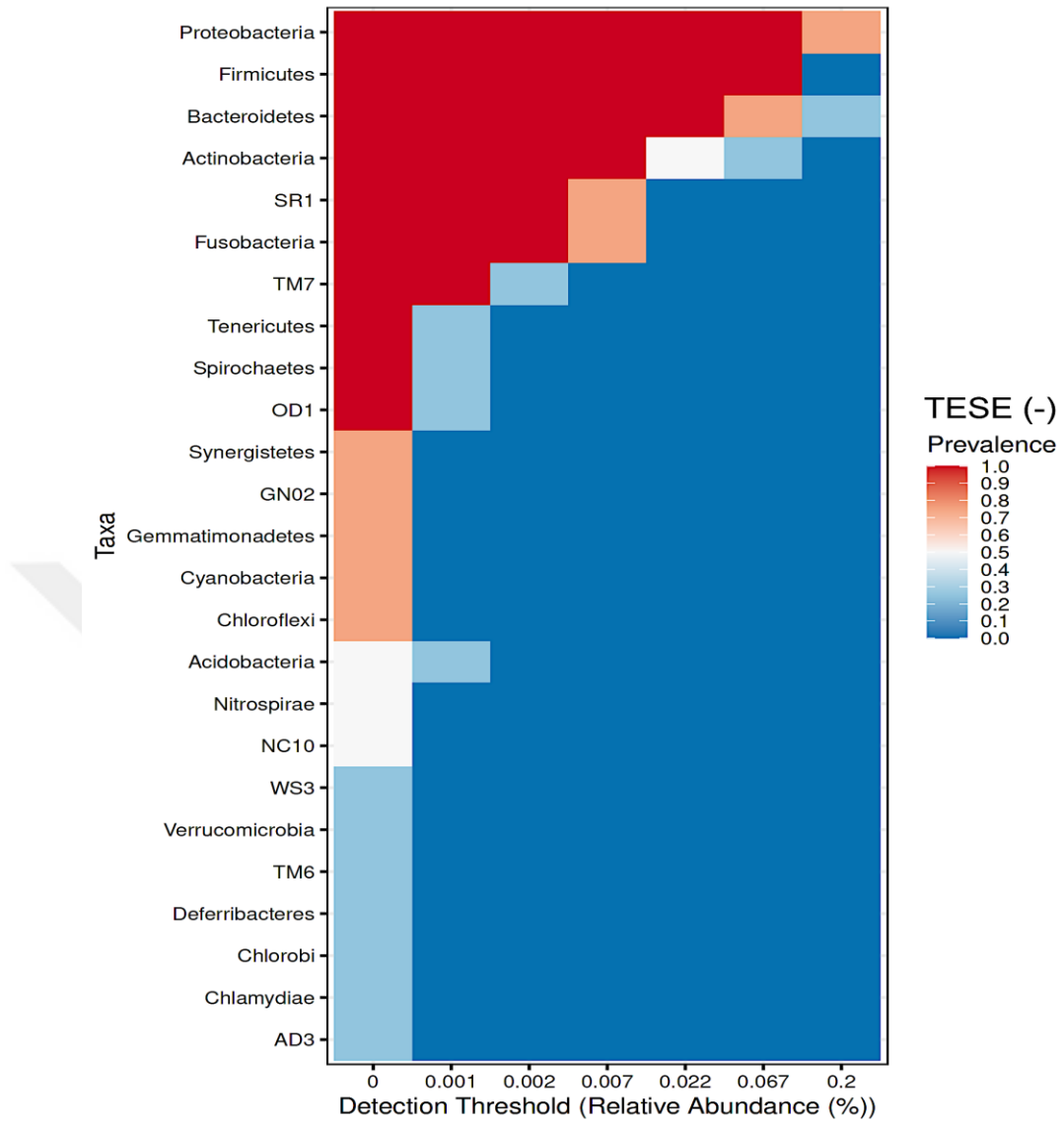
Şekil 6.10. Gruplar arası genus analizinin taxabar plot verileri.

Core mikrobiyom analizine göre;

TESE (+) ve TESE (-) grupları örneklerinin mikrobiyota içeriklerinde core mikrobiyom analizine göre iki grup arasında prevalans değerlendirilmesi yapılmıştır. İki grupta da *Firmucutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Fusobacteria* varlığına yoğun şekilde rastlanmıştır (Şekil 6.11 ve Şekil 6.12).



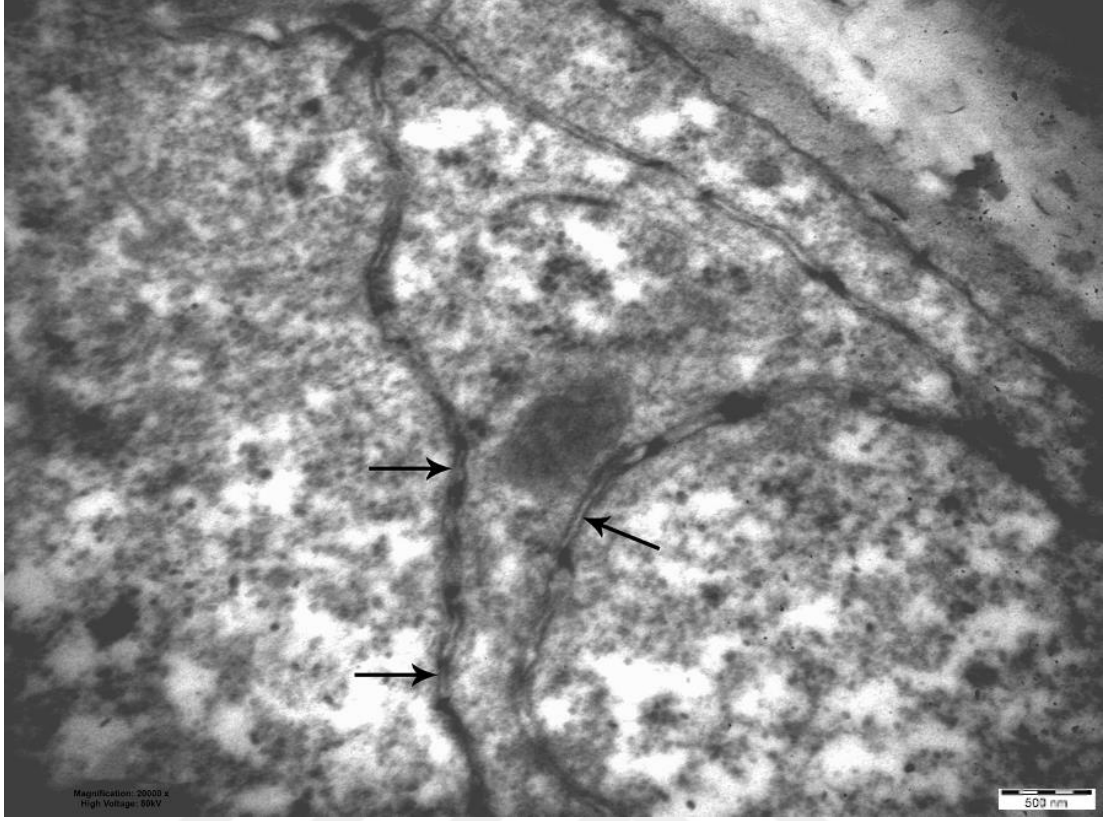
Şekil 6.11. Core Mikrobiyom analizinde TESE (+) gruba ait bakteri yoğunluğu.



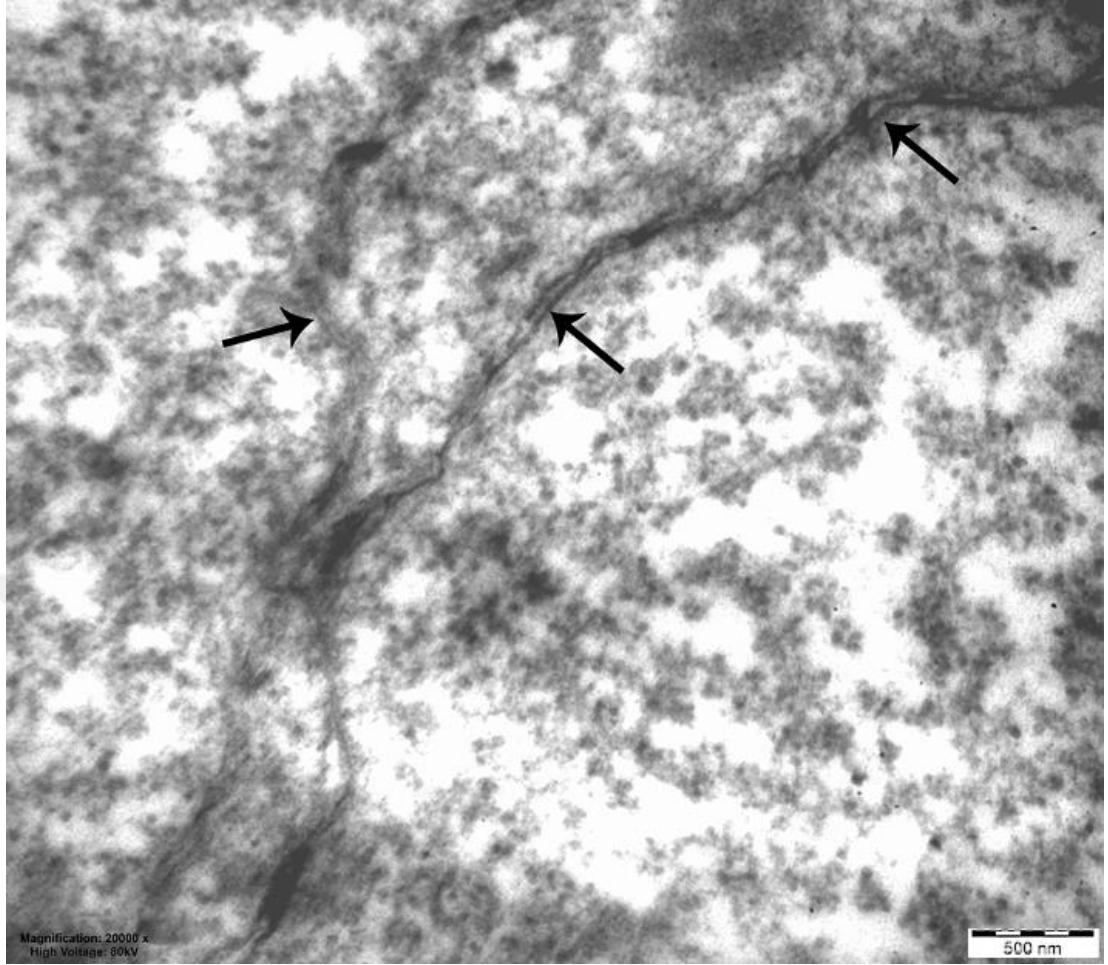
Şekil 6.12. Core Mikrobiyom analizinde TESE (-) gruba ait bakteri yoğunluğu.

6.5. Geçirimli Elektron Mikroskop Bulguları

Kontrol grubuna ait testis dokuları geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) incelendiğinde, seminifer tübül içerisinde bulunan sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantılar görüldü. Seminifer tübüleri çevreleyen bazal membran bütünlüğünü korumaktaydı. Kontrol testis dokularında bazal membranın alt hizasında spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatidler gözlemlendi. Ayrıca kan testis bariyerinin bazal ve adluminal kompartmanını ayırt edecek şekilde sıkı bağlantıların sertoli hücrelerinin lateral yüzeyleri boyunca kesintisiz devam ettiği gözlemlendi (Resim 6.17 ve Resim 6.18).

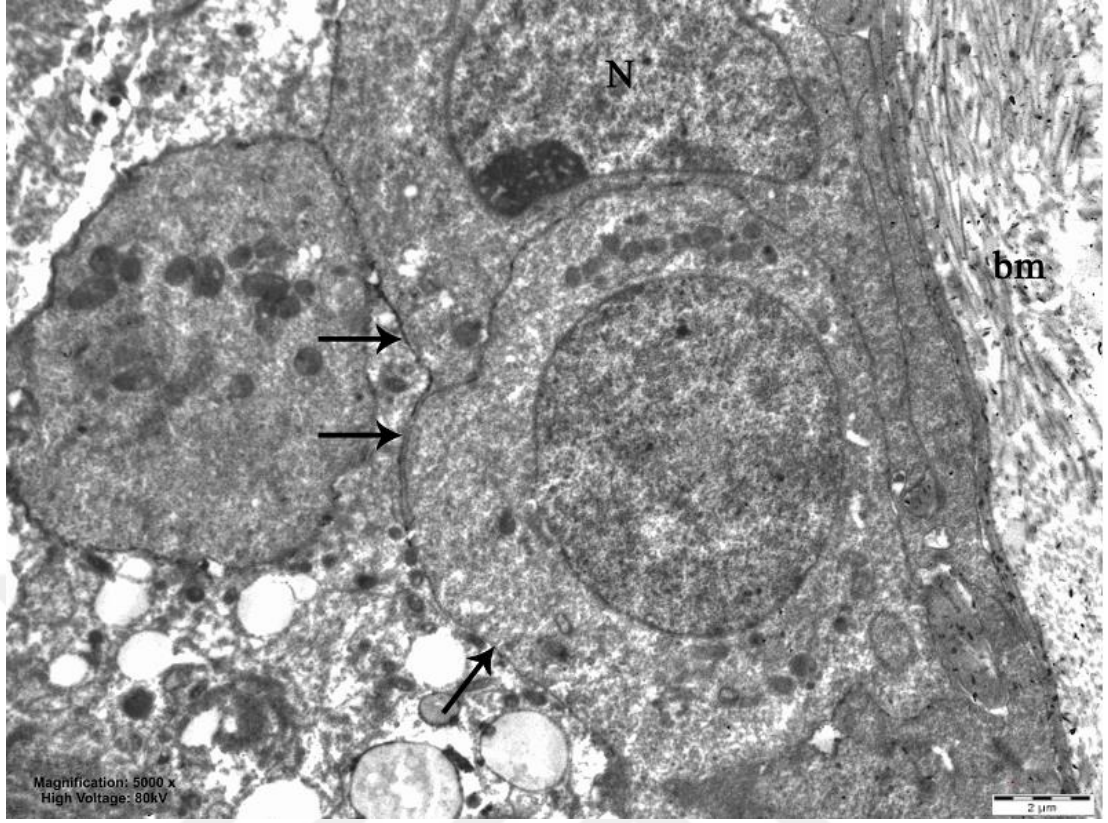


Resim 6.17. Kontrol grubuna ait testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) sertoli hücreleri arasında izlendi. Büyütme X20000.

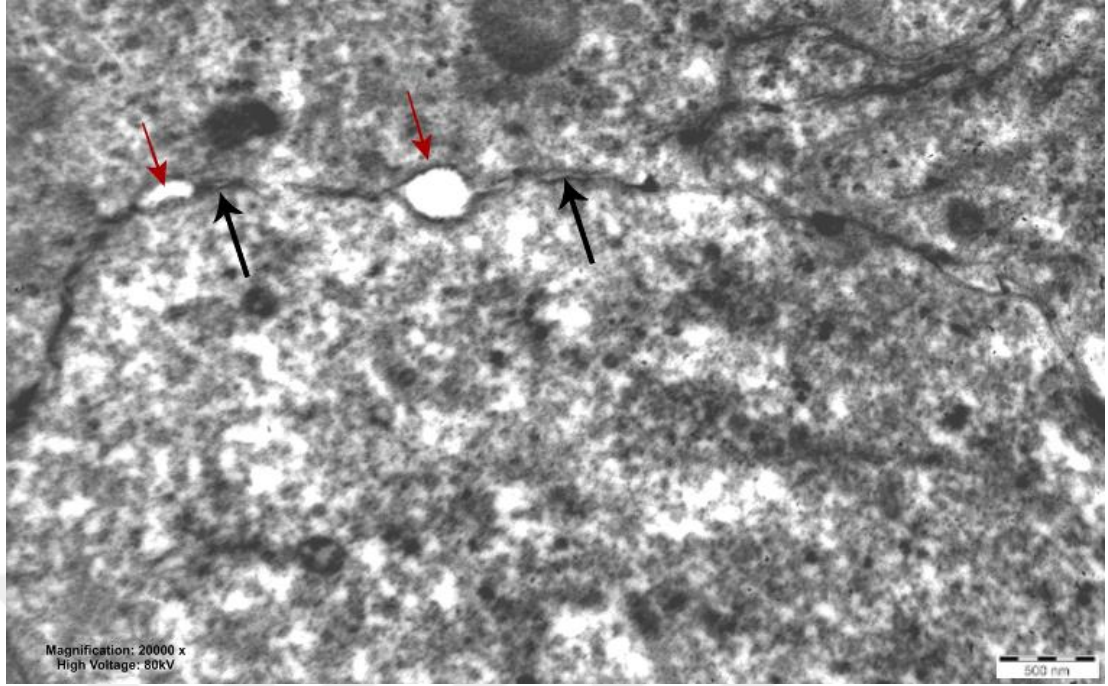


Resim 6.18. Kontrol grubuna ait mikrobiyota gözlenmeyen testis dokusunun geçirirli elektron mikroskobu görüntüsü. Sertoli hücreleri arası sıkı bağlantıların (→) varlığı kan-testis bariyerinin korunduğunu göstermektedir. Büyütme X20000.

TESE (+) grubunun mikrobiyota gözlenmeyen doku örneklerinde, sertoli hücreleri aralarında sıkı bağlantılar gözlenmiştir ve KTB’de bozulma olmadığı görülmüştür (Resim 6.19). Bazal membran alt yüzeyinde spermatogenik seri hücrelerine rastlanmıştır. Fakat mikrobiyota gözlenen dokularda, KTB’ni oluşturan sertoli hücrelerinin hücre kaynaşma kısımlarında kopmaların olduğu, KTB’nin bütünlüğünün korunmadığı gözlenmiştir (Resim 6.20).

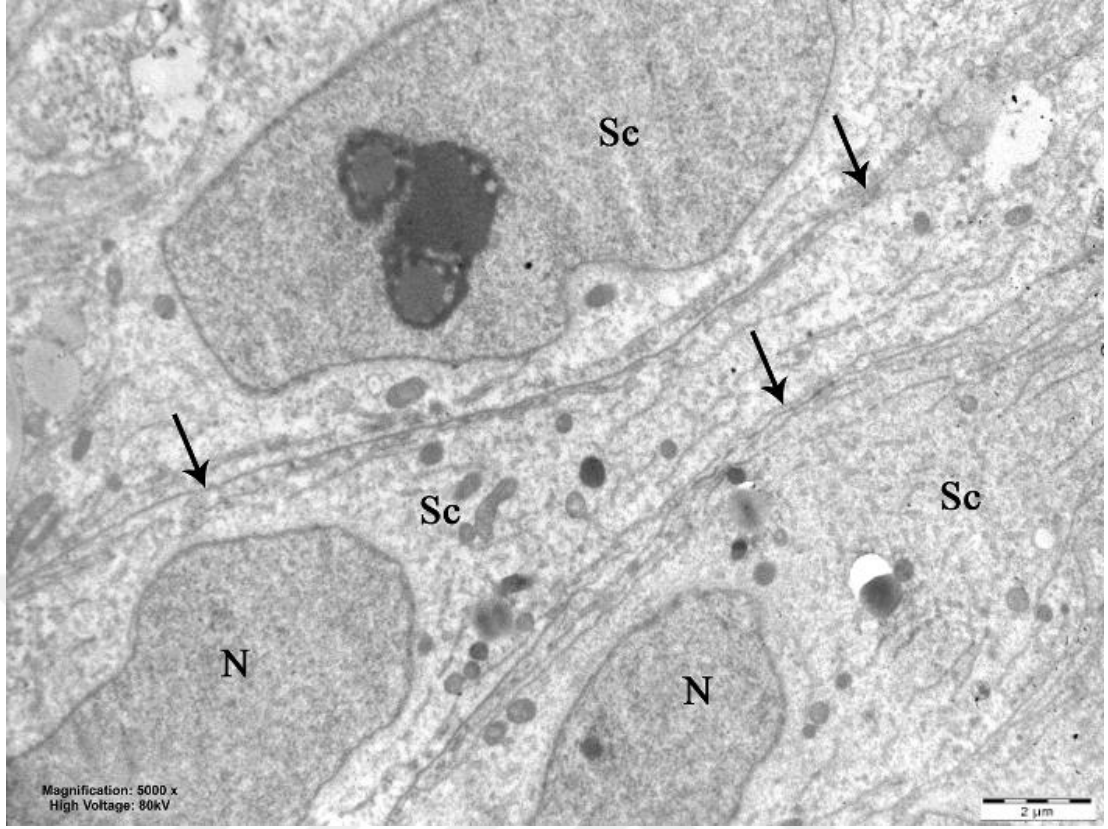


Resim 6.19. TESE (+) grupta mikrobiyota gözlenmeyen testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sertoli hücreleri arası sıkı bağlantılar (siyah ok) ile doku bütünlüğü korunmuştur. Sertoli hücre çekirdeği (N), bazal membran (bm). Büyütme X5000.

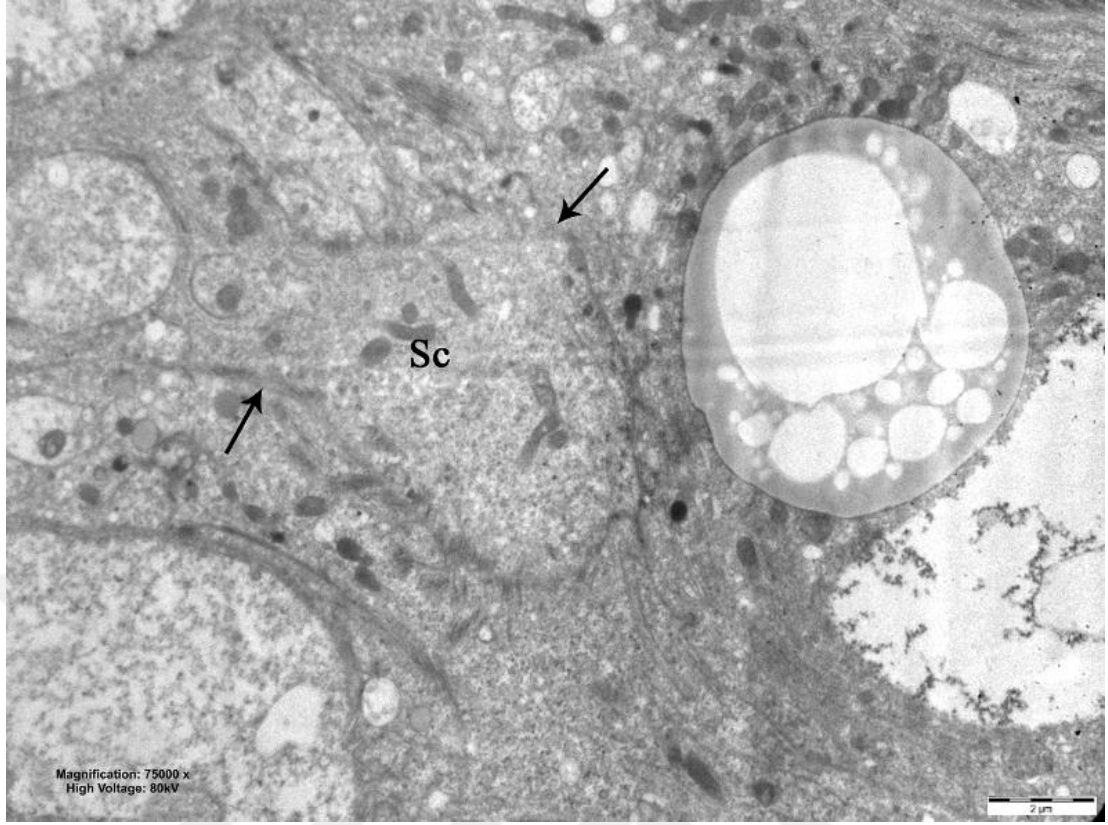


Resim 6.20. TESE (+) grupta mikrobiyota gözlenen testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sertoli hücreleri arası sıkı bağlantılar (siyah ok), hücreler arası bağlantılarda yer yer açılmalar (kırmızı ok). Büyütme X20000.

TESE (-) gruba ait testis dokusunda ise seminifer tübüllerin duvarlarında kollajen liflerinin arttığı ve peritübüler duvarın kalınlaştığı gözlenmiştir. Çoğu seminifer tübülde yalnızca Sertoli hücreleri gözlenmiştir ve hücre sitoplazmasında vakuolize hiyalin maddelerin varlığına rastlanmıştır. TESE (-) grubunda KTB'ni oluşturan sıkı bağlantılar sertoli hücrelerinin tüm lateral yüzeyi boyunca gözlenmiştir ve bu dokularda mikrobiyota analizinde bakteri varlığı gözlenmemiştir (Resim 6.20). Mikrobiyota varlığının izlendiği TESE (+) ve TESE (-) dokularının KTB'ni oluşturan sıkı bağlantı yapılarının bozulduğu, yer yer bütünlüğün korunmadığı gözlenmiştir ve spermatogenik seri hücrelerine rastlanmamıştır. (Resim 6.21 ve Resim 6.22).



Resim 6.21. TESE (-) grupta mikrobiyota gözlenmeyen testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) bazal ile adluminal bölme arasında görülmüştür. Sertoli hücreleri (S), sertoli hücre çekirdeği (N). Büyütme X5000.



Resim 6.22. TESE (-) grupta mikrobiyota gözlenen testis dokusunun geçirimli elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) bazal kompartmana yakın görülmüştür ve yer yer bağlantı bütünlüğünde bozulmalar gözlenmiştir. Sertoli hücreleri (S). Büyütme X75000.

7. TARTIŞMA

İnsan vücudunda var olan mikroorganizmalar (bakteri, arkea, virüs, mantar ve diğer tek hücreli ökaryotlar), mikroorganizmaların genetik materyali ve çevrenin tamamını mikrobiyom olarak açıklayabiliriz. Mikrobiyom, insan ile ortak yaşam içinde varlığını sürdüren bir “süper organizma” olarak kabul edilmektedir (83). Bu topluluğun büyük bir kısmını bağırsak mikrobiyomu meydana getirmektedir. İnsan ile besinler, patojenik organizmalar, toksinler gibi çevresel faktörler arasında geçiş yaparak metabolizmanın düzgün işleyişinde önemli rol oynamaktadırlar. Doğum sırasında anneden aktarılan mikrobiyom, doğum şekliyle doğrudan ilişkilidir ve beslenme alışkanlıkları, yaşam şekli, maruz kalınan patojenlerin ve parazitlerin etkisiyle içerik açısından değişikliğe uğramaktadır (84).

Hastalıkların oluşum nedenleri üzerine yapılan son çalışmalarda mikrobiyomun, sağlığın sürdürülmesi ve hastalıkların ortaya çıkması süreçlerinde temel rol oynadığı iddia edilmektedir (85). Yeni nesil dizileme tekniklerinin geliştirilmesi, vücutta kolonize olan mikrobiyomların daha derin analizine olanak sağlamıştır. Bununla paralel olarak, mikrobiyomların sağlık ve hastalıklarla ilişkisini analiz eden çalışmaların sayısı artmıştır (86). Çalışmalardan elde edilen veriler ışığında erkek infertilitesinin potansiyel bir nedeni olarak, seminal mikrobiyota disbiyozu öne sürülmüştür (87). Bununla birlikte, bu ilişkiyi ele alan yayınlanmış çalışmaların sayısı hala sınırlıdır ve mikrobiyota profillerinin bireylerde değişmesi nedeniyle sonuçlar farklılık göstermektedir. Henüz kesin bir fikir birliğine varılmamış olsa da son yıllardaki çalışmalarda seminal mikrobiyotanın *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* filumlarından oluştuğu bildirilmiştir (9). Çalışmamızda, azospermi grubunun KTB’de bozulma görülen testis dokularında da benzer bakteri popülasyonuna rastlanmıştır.

Erkek infertilitesinin olası nedenleri üzerine yapılan araştırmalarda insan semen örneklerinde yüksek sayıda mikroorganizma saptanmıştır. Bu mikroorganizmalar infertilite öyküsü olan erkeklerde çeşitli kompozisyonlarla karşımıza çıkmaktadır (88). Yapılan bir çalışmada, infertil erkekler ile fertil erkeklerin semen mikroorganizma içerikleri karşılaştırılmıştır ve belirgin farklılıklar gözlenmese de *Anaerococcus* cinsi bakterilere infertil erkeklerin semen örneklerinde daha sık rastlandığı bildirilmiştir

(89). Ancak bu sonuçların erkek infertilitesi ile nedensel ilişkisini açıklamak için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Ürogenital sistem enfeksiyonlarının fertilite üzerine doğrudan etkileri olduğu bilinmektedir. Ancak, ürogenital sistem dışı enfeksiyonların fertiliteyi dolaylı yoldan etkileyebileceğinin de üzerinde durulması gerekmektedir. Vücudun herhangi bir bölgesinde enfeksiyon olması ilgili alanda inflamatuvar yanıtı tetikler ve dolaşıma sitokinlerin salınımı gerçekleşir (90). Oluşan antikorların üreme sistemi fonksiyonlarına negatif etkileri olduğu düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada kontrol grubuna ait testis doku ekstratlarında bakteri varlığına rastlanmamıştır. TESE (+) ve TESE (-) gruplarında ise gram pozitif ve gram negatif bakteriler gözlenmiştir. Bu veriler, testiküler dokuya bakteri geçişinin sperm üretimini negatif yönde etkileyebileceğini ve spermatogenez sürecinde soruna yola açacağını düşündürmektedir. Benzer şekilde spermatogenez aşamasında sorun olduğu bilinen infertil erkeklerin kan-testis bariyerinde de bütünlük bozulduğundan, o bölgeye bakteriyel göç olası bir senaryodur.

Proteobacteria'nın alt gruplarından *Neisseria gonorrhoeae* bakterisine spesifik yapılan immünfloresan boyamada kontrol grubu testis dokularında pozitif ışıma gözlenmemiştir. TESE (+) ve TESE (-) gruplarında ise immünfloresan yöntemlerle *Neisseria gonorrhoeae* bakterisinin varlığı gösterilmiştir. Azospermi hastalarında varlığı immünfloresan ve illumina yöntemleri ile kanıtlanan *Neisseria gonorrhoeae*'nin cinsel yolla bulaştığı bilinmektedir (91). Bulgular bu bakterinin sadece testis histolojisini değil aynı zamanda spermatogenez de bozduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, sperm üretimi olumsuz etkilenmiş azospermi hastalarında bakteri görülmesi, bağırsak-testis ekseninde de bir geçişin olabileceğini düşündürmektedir.

Bu konuda yapılan çalışmaların bir kısmında, bizim bulgularımıza benzer şekilde infertil erkeklerin semeninde bakteri tür çeşitliliğinde bir artış olduğu bildirilirken (92), diğer bir kısmında ise infertil ve fertil bireylerin semenlerinde bakteri tür çeşitliliği açısından fark bulunmadığı bildirilmiştir (93, 94). Çeşitli araştırmalar, normospermi semen örneklerinde *Lactobacillus*'un azaldığını bildirirken, (92, 70) astenozoospermik ve azospermik hastalarda bu cinsin artışı gösteren zıt

sonuçlar bildirilmiştir (95). Çalışmamızda azospermi gruplarında bulunan *Prevotella* cinsindeki artış literatürdeki bulgularla benzerdir ve sperm parametrelerinde düşüşle ilişkilendirilmektedir (75). Ayrıca çalışmamızda azospermi testis dokularında gözlenen *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* cinslerinin de erkek infertilitesiyle doğrudan ilişkili olduğu iddia edilmektedir.

Bağırsak mikrobiyotası sadece obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklarla sınırlı kalmayıp (96), sinir sistemi, üreme sistemi ile ilgili hastalıklar da dahil olmak üzere birçok fizyolojik olayda rol oynamaktadır (97). Bağırsak mikrobiyomunun hematojen yol ile dokularla iletişimde olduğu fikri yeni bir kavram değildir (98). Örneğin bağırsak-beyin eksen, nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir ve kaynaklarda önemle vurgulanmaktadır (97). Bağırsak disbiyozisinin erkek infertilitesini ve spermatogenezi etkilediğini iddia eden çalışmalar mevcuttur (99). Bu durum, disbiyotik bağırsağın testis dokusunda inflamasyonu nasıl tetiklediği sorusunu gündeme getirmektedir. Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada; disbiyotik bağırsak florasına bağlı olarak bağırsak duvarındaki sıkı bağlantıların bütünlüğünün bozulması nedeniyle, sistemik dolaşıma bakteriyel translokasyonun gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu durumun, kronik düşük dereceli iltihaplanma ile artan bağırsak geçirgenliğine benzer bir mekanizma ortaya koyduğu bildirilmiştir (100). Çalışmamızda da azospermik testis dokularındaki mikrobiyal floranın buna benzer bir mekanizmayla geçişinin olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, testiküler dokuların histopatolojik incelenmesi ve Johnsen skorlamasına göre, TESE (-) grubunda spermatogenez sürecinin bozulduğu gösterilmiştir. Kontrol grubunun histopatolojik değerlendirmesinde, tübül epiteli boyunca spermatogenik seri hücreleri ve tübül lümenine doğru matür sperm hücreleri gözlenmiştir. TESE (+) grubunda da bazı tübüllerin lümenine doğru sperm ve diğer spermatogenik seri hücrelerinin varlığı gözlenmiştir. Bu iki gruba ait serum hormon düzeyleri incelendiğinde, değerlerin referans aralığında olduğu görülmüştür. TESE (-) grubu testis dokusuna bakıldığında, seminifer tübül içerisinde spermatogenik seri hücre gruplarına rastlanmamıştır fakat bazı tübüllerde spermatogonyum görülmüştür. Histopatolojik incelemeler, literatürdeki çalışmaları destekler nitelikte olup testis dokularında sperm görülme olasılığının hormonal değerlerle bağlantılı olduğunu düşündürmektedir.

İmmünohistokimyasal incelemede, kontrol grubu dokularında sertoli hücreleri arasında, olması gereken bölgelerde ZO-1 ekspresyonu yüksek oranda gözlenmiştir. TESE (+) grubuna ait testis dokularının bazı alanlarında ZO-1 ekspresyonunda azalmalar görülürken, TESE (-) grubunda spermatogenik seri hücreleri görülmeyen örneklerde sadece sertoli hücrelerinin var olduğu alanlarda ekspresyon az miktarda gözlenmiş ve seminifer tübül genelinde ZO-1 ekspresyonu tespit edilmemiştir. Sonuçlar, KTB'nde ZO-1 ekspresyonu gözlenmeyen, yani bariyer bütünlüğü bozulmuş tübülleri içeren dokularda, bakterilerin bariyeri aşarak dokuya invaze olduğunu düşündürmektedir. KTB'nin bozulmasına bağlı olarak bakterilerin, bağırsaktan hematojen yolla ya da lenf yoluyla geçmiş olması muhtemeldir. Bağırsak epitelinin de bozulduğu durumlarda, bağırsaktan diğer organlara mikrobiyal topluluğun geçiş ihtimali artmaktadır (101). TESE (-) grupta spermatogonyum gözlenen seminifer tübüllerin bazılarında ise KTB düzeyinde ZO-1 ekspresyonu gözlenmiştir ve bu dokularda mikrobiyata varlığına rastlanmamıştır.

Testis dokuları ultrastrüktürel düzeyde incelendiğinde, kontrol grubunda sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantılar bütünlüğünü korumaktadır. Mikrobiyota gözlenmeyen TESE (+) grubunda kan-testis bariyeri bütünlüğü korunurken, mikrobiyota gözlenen dokularda ise kan-testis bariyeri bütünlüğünün bozulduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde KTB, mikrobiyota izlenmeyen TESE (-) grubunda sertoli hücrelerinin tüm lateral yüzeyi boyunca bütünlüğü korunmuş şekilde gözlenmiştir. Mikrobiyota varlığının izlendiği dokularda ise sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarda ve KTB'de yer yer bütünlüğün bozulduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, diğer çalışma basamaklarını destekler nitelikte olup, KTB'de meydana gelen bozulmanın spermatogenezi etkilediğini ve testise bakteri geçişine izin verdiğini düşündürmektedir (102).

Araştırmamızda illumina teknolojisinden yararlanarak yapılan genetik tabanlı mikrobiyota araştırması, histolojik çalışmaları destekler nitelikteydi. Nitekim 16S rRNA düzeyinde yapılan çalışmamızda kontrol grubuna ait testiküler dokularda mikrobiyota varlığına rastlanmamıştır. TESE (+) ve TESE (-) gruplarda ise KTB düzeyinde bozulma olan örneklerde mikrobiyota gözlenmiştir. Alpha çeşitlilik analizine göre gruplar arası bakteri çeşitliliği ve yoğunluğu; TESE (-) grupta, TESE (+) gruba göre daha fazla görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Her dokunun kendine has bakteri popülasyonu vardır ve bu kişinin

beslenme alışkanlıklarına ve yaşam tarzına bağlı değişkenlik göstermektedir. Ayrıca beta çeşitlilik analizine göre gruplar arası bakteri çeşitliliği ve yoğunluğu açısından TESE (+) ve TESE (-) grupları benzer bulunmuştur. TESE (+) ve TESE (-) gruplarına ait dokuların mikrobiyota içeriklerine yapılan krona analizinde *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* ve *Fusobacteria* bakterileri tespit edildi. Alfano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı grupların testis dokularında bulunan bakteri türleri, yaptığımız çalışma ile benzerlik göstermektedir (10). TESE (+) grupta TESE (-) gruba göre daha düşük oranda *Proteobacteria*'nın alt grubu olan *Neisseria* türü varlığına rastlanmıştır. Çalışmamızda bu iki grupta KTB'de bozulma olan dokularda, immünfloresan boyama ile *Neisseria* bakterisinin varlığı gösterilmiştir. Ayrıca *Streptococcus*, *Prevotella*, *Haemophilus*, *Granulicatella*, *Bifidobacterium*, *Porphyromonas*, *Ralstonia*, *Rothia*, *Gemmiger*, *Veillonella*, *Aggregatibacter*, *Peptostreptococcus*, *Lautropia*, *Fusobacterium*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Succinivibrio* ve *Actinobasillus* bakterilerinin KTB'de bozulma olan azospermi hastalarının testis dokularında tespiti, sperm üretimi ile mikrobiyota arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışma sonucumuza benzer şekilde, infertil erkek semenlerinde ve ayrıca sperm DNA hasarı yüksek olan semen örneklerinde *Firmicutes* ve *Enterococcus* bakterilerinin arttığı bildirilmiştir ve sonuçlar sperm DNA hasarı ile ilişkilendirilmiştir (103). Elde edilen veriler ışığında çalışmamızda gözlenen en önemli fark, TESE (-) grubunda bakteri miktarı ve yoğunluğunun fazla olmasıdır. Buna istinaden bakteri yoğunluğundaki artışın, TESE'de sperm bulma oranı üzerinde negatif bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Hematojen ve lenfatik yolla gastrointestinal sistemden testise ulaşan bakteriyel flora yoğunluğun da spermatogenezi etkiliyor olabileceği göz ardı edilmemelidir (104). Dolayısıyla bulduğumuz sonuç tek başına bu tablo üzerine etki etmektedir denilemez.

Son on yıl boyunca semende bakteri varlığı enfeksiyon durumuyla ve dolayısıyla spermatozoa sayısında azalmayla, semende saptanan lökositlerde artışla ilişkilendirilmiştir. Birçok patojenik bakterinin sperm fizyolojisi üzerindeki olumsuz etkisi önceki çalışmalarda gösterilmiştir (105). Patojen bakterilere maruz kalmanın spermda hareketliliğin azalmasına veya apoptozun artmasına yol açabileceği iddia edilmektedir. Genel olarak bakterilerin, lipopolisakkaritler, hemolizinler ve sperm

fizyolojisini etkileyebilen spermatotoksik faktörler salabileceği bildirilmiştir. Motilitede azalma, teratozoospermi, apoptoz, DNA fragmentasyonu, sperm aglütinasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu bakteriyel enfeksiyonun sonuçları olarak bildirilmiştir (106). Seminal sıvıdaki bakteriler, genellikle lökositospermi ve sitokin sekresyonunu indükleyen ve inflamasyona yol açan lokal bir immün reaksiyonu tetikleyicisi gibi görünmektedir (107).

Bağırsak-testis arasındaki mikrobiyal geçiş mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Metagenomik analizler sonucunda elde edilen verilerde, SAM döngüsünde meydana gelen değişiklikler buna açıklık getirilmesi açısından önemli ipuçları sunmaktadır. SAM döngüsü DNA metilasyonu, oksidatif stres ve poliamin sentezi yoluyla infertilitenin patogeneğinde çok yönlü rol oynamaktadır. Öte yandan, mikrobiyota seminal sıvının özelliklerini değiştirerek spermatozoa fizyolojisini dolaylı olarak etkileyebilir. Bu nedenle, aksesuar bezlerdeki potansiyel bir disbiyoz, seminal sıvının bileşimini değiştirerek spermatozoanın işlevini negatif yönde etkileyebilmektedir (75).

Semende ve daha genel olarak erkek genital sisteminde bakteriyel kolonizasyon çalışmaları arasında gözlemlenen farklı sonuçlar birçok faktörle açıklanabilir. İlk olarak, mikrobiyota stabil olmayabilir ve bu da zamanla farklı kolonizasyon paternlerinin görülmesine sebep olmaktadır (108). Çalışmalar arası coğrafi değişkenlik, beslenme alışkanlığı, yaşam stili gibi değişken dinamikler sonuçlar üzerine etkili diğer faktörler olarak sayılabilir (109). Tüm bunlar, mikrobiyotanın bileşimini potansiyel olarak etkileyerek farklı sonuçlara yol açabilir. Bu nedenle erkek infertilitesi açısından mikrobiyotanın dinamiklerini daha iyi anlamak için çok yönlü çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. SONUÇ

Testis dokusunun steril olmadığının yakın zamanda ortaya çıkması dolayısıyla, testiste mikrobiyota varlığına dair sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Erkek infertilitesi üzerine mikrobiyotanın etkisinin insan testiküler dokusunda histolojik olarak incelendiği bir çalışma henüz literatürde yer almamaktadır. Aynı zamanda sperm üretimi olan erkeklere ait dokularda mikrobiyotaya rastlanmaması ve bunun daha önce gösterilmemiş olması çalışmamıza nitelik kazandırmaktadır. Kan-testis bariyerinde bozulmaya neden olduğunu düşündüğümüz testis mikrobiyotasının yanında *Neisseria gonorrhoeae*'nin immünfloresan olarak gösterilmesi de bu konuda yapılan ilk araştırma olma özelliğindedir. Bu bulgular doğrultusunda, mikrobiyota varlığına kontrol testis dokularında değil de azospermik dokularda rastlanması, mikrobiyotanın spermatogenez sürecini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Çalışmamız sonuçları doğrultusunda testis dokusuna bakteri geçişinin hangi yol ve mekanizma ile olduğu tam olarak belirlenememiştir. Bağırsak epitelindeki bozulma, sistemik dolaşıma bakteri geçişinin doğrudan spermatogenez üzerine etkisinin araştırılacağı daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç vardır.

9. KAYNAKLAR

1. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R., Vij S et al.; Male infertility. *Lancet*. 397:319–333, 2021.
2. Boynukalın FK, Güven S, Günalp S. Sperm DNA hasarı ve üremeye yardımcı teknikler. *J Turk Soc Obstet Gynecol*. 1: 52-58, 2014.
3. Shen Y, You Y, Zhu K, Fang C, Yu X, Chang D. Bibliometric and visual analysis of blood-testis barrier research. *Front Pharmacol*. 13: 969257, 2022.
4. Molele RA, Ibrahim MIA, Zakariah M, Mahdy MAA, Clift S, Geoffrey T Fosgate GT et al. Junctional complexes of the blood-testis barrier in the japanese quail (*Coturnix Coturnix japonica*). *Acta Histochem*. 124(7):151929, 2022.
5. Brubaker L, Wolfe AJ. The female urinary microbiota, urinary health and common urinary disorders. *Ann Transl Med*. 5:34, 2017.
6. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 86:207–214, 2012.
7. Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature*. 486:215–221, 2012.
8. Hilt EE, Mckinley K, Pearce MM, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, Mueller ER et al. Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 52:871–876, 2014.
9. Farahani L, Tharakan T, Yap T, Ramsay WJ, Jayasena NC, Minhas S. The Semen Microbiome And Its Impact On Sperm Function and Male Fertility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Andrology*. 9(1):115-144, 2021.
10. Alfano M, Ferrarese R, Locatelli I, Ventimiglia E, Ippolito S, Gallina P et al. Testicular Microbiome in Azoospermic Men—First Evidence of the Impact of An Altered Microenvironment. *Human Reproduction*. 1212–1217, 2018.
11. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D’Argenio AV. Microbiota and human reproduction: the case of male infertility. *MDPI, High-Throughput*. 9:10, 2020.

12. Moore KL, Persaud TV. The developing human: Clinically oriented embryology. 7th Ed. Pennsylvania: Elsevier Science. 288L328, 2003.
13. Ross MH, Pawlina W. Histology. 5th Edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2006.
14. Özpak L, Pazarbaşı A. Erkek İnfertilitesinin Sitogenetiği. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 20(4): 230-245, 2011.
15. Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi. Ankara Palme Yayıncılık. 459-467, 2006.
16. Akbalık ME, Saruhan BG, Topaloğlu U, Ketani MA. kanatlılarda genital sistem histolojisi. Dicle Üniv Vet Fak Derg. 2(5):73-82, 2016.
17. Sobotta/Hammersen. Histoloji renkli mikroskopik anatomi atlası. 4. Baskı. Editör: Prof. Dr. Meral Tekelioğlu. Beta Yayıncılık. İstanbul. 1994.
18. Eşrefoğlu M. Özel histoloji. Medipres Matbaacılık, Malatya. p: 251-267, 2009.
19. Gartner LP, Hiatt JL: Color textbook of histology. Pennsylvania, W.B. Saunders Company. 493-98, 1997.
20. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas (4th ed), Lippincott Williams-Wilkins, Philadelphia. 689-696, 2003.
21. <https://www.biyolojidersim.com/gametogenez-1-spermatogenez/>, Erişim Tarihi: 13 Şubat 2023.
22. Yalçın B, Çevik M. Erkek infertilitesinde spermatozoon DNA hasarının rolü ve önemi. MAE Vet. Fak Derg. 3(2):135-140, 2018.
23. Alkan E, Başar MM. Sperm motilite bozuklukları: Terminoloji, etiyoloji ve tedavide yenilikler. Memorial Şişli Hastanesi, Üroloji Bölümü. 16(58): 186-190, 2014.
24. Erben T. Histoloji II. Ankara: Güneş Kitabevi, 1990.
25. Karaöz E. Özel histoloji. Isparta: SDÜ Yayın Evi, 2002.

26. Hofmann MC, Mcbeath E. Sertoli cell-germ cell interactions within the niche: paracrine and juxtracrine molecular communications. *Front. Endocrinol.* 13:897062, 2022.
27. Junqueira LC, Carneiro J. Temel histoloji. Çeviri Editörleri: Solakoğlu S. Aytekin Y. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevi. 2009.
28. Tanyolaç A. Özel histoloji. Ankara: Yorum Basın Yayın Sanayi, 1999.
29. Kayalı H. Özel histoloji. İstanbul Üniversitesi Film Merkezi, İstanbul, 1989.
30. Michael H. Ross WP. Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 6th Ed. West Camden Street. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 351, 2011.
31. Pallotti F, Lombardo F, Paoli D. Comment On Boitrelle ve ark. The Sixth Edition of The WHO manual for human semen analysis: A critical review and swot analysis. *12(7): 1044*, 2022.
32. De Kretser DM, Meihardt A, Meehan T, Phillips a DJ, O'Bryan a MK, Loveland KA. The roles of inhibin related peptids in gonadal function. *Mol Cell Endocrinol.* 161:43-46, 2000.
33. Koşar P, Özçelik N. Erkek infertilitesinde genetik değerlendirme. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi.* 14(4): 48-52, 2009.
34. Cheng CY, Mruk DD. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev.* 82: 825-874, 2002.
35. Alper D, Erdem F. Adhezyon molekülleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci.* 17:75-7, 1997.
36. Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Stephan C, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology.* 18(3): P. 413-421, 2004.
37. Fink C, Weigel R, Hembes T, Wettwery HL, Kliesch S, Bergmann M et al. Altered expression ef ZO-1 and ZO-2 in sertoli cells and loss of blood–testis barrier integrity in testicular carcinoma. *İn Situ. Neoplasia.* 8(12):1019-1027, 2006.

38. Siu MKY, Wong CH, Lee WM, Cheng CY. Sertoli-germ cell anchoring junction dynamics in the testis are regulated by an interplay of lipid and protein kinases. *J Biol Chem.* 1;280(26):25029-47, 2005.
39. Özpak L, Pazarbaşı A. Erkek infertilitesinin sitogenetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.* 20(4): 200-216, 2011.
40. Chen Y, Merzdorf C, Paul DL, Goodenough DA. COOH terminus of occludin is required for tight junction barrier function in early xenopus embryos. *The Journal of Cell Biology.* 138 (4): 891-9, 1997.
41. Carpenter S. American Psychological Association, "That Gut Feeling". Vol. 43, No. 8, page 50. <http://www.apa.org/monitor/2012/09/gut-feeling.aspx>, Erişim Tarihi: 13 Şubat 2023.
42. Waldor MK, Tyson G, Borenstein E, Ochman H, Moeller A, Finlay BB et al. Where next for microbiome research? *PLOS Biology.* 10-1371, 2015.
43. Davies J. In amap for human life, count the microbes, too. 291: 2316,2001.
44. Yılmaz A, Akgül T, Yalınay M, Tekin M Ö. Ürogenital mikrobiyota, 1. basım, Sayfa: 155-164, 2022.
45. Relman DA, Falkow S. The meaning and impact of the human genome sequence for microbiology. *Trends Microbiol.* 9: 206–208, 2001.
46. Gündoğdu A. Bir "Süper Organizma" olarak insan; Mikrobiyomun genetik kontrolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 46(4):147-151, 2016.
47. The NIH HMP Working Group et al: The NIH Human Microbiome Project. In: *Genome Res.* 19, S.2317-2323, 2009.
48. Andrew K Benson. Host genetic architecture and the landscape of microbiome composition: humans weigh in. *Genome Biology.* Vol 16, Article number: 203, 2015.
49. İnsan mikrobiyom projesi, mikrobiyotanın geleceği ve kişiye özel tıp uygulamaları. *J Biotechnol and Strategic Health Res.* 1 (Special issue): 1-6, 2017.
50. Gürsoy NC, Otlı B. Mikrobiyotada çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *J Biotechnol and Strategic Health Res.* 56-67, 2017.

51. El Mouzan MI, Winter HS, Al Sarkhy AA, Korolev K, Menon R, Assiri AA. Bacterial dysbiosis predicts the diagnosis of Crohn's disease in Saudi children. *Saudi J Gastroenterol.* 27(3):144-148, 2021.
52. Keleş İ. Erkek Ürogenital Hastalıkları ve Mikrobiyota. *J Biotechnol and Strategic Health Res.* 86-94, 2017.
53. Kilci Aİ, Okyay RA, Ateş S, Şahin AR. Mikrobiyota. 105- 131,2019.
54. Yılmaz A, Akgül T, Yalınay M, Tekin M Ö. Ürogenital mikrobiyota. 1.basım, 90-95, 155-164, 2022.
55. Bozok T, Şimşek T, Kömür S, Ulu A. Normal mikrobiyal floranın insan sağlığı üzerine etkisi ve insan mikrobiyom projesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.* 23(3): 420-426, 2014.
56. Karakan T, Akgül KT, Ağras K. Üriner mikrobiyota. *The New Journal of Urology.* 14 (1): 65-70, 2019.
57. Li X, Cheng W, Shang H, Wei H, Deng C. The interplay between androgen and gut microbiota: Is there a microbiota-gut-testis axis. *Reproductive Sciences.* 29:1674–1684, 2022.
58. Akhigbe RE, Dutta S, Hamed MA, Ajayi AF, Sengupta P, Ahmad G. Viral infections and male infertility: A comprehensive review of the role of oxidative stress. *Front. Reprod. Health.* 3;4:782915, 2022.
59. Molina NM, Plaza-Díaz J, Vilchez-Vargas R, Sola-Leyva A, Vargas E, Mendoza-Tesarik R et al. Assessing the testicular sperm microbiome: A low-biomass site with abundant contamination. *Reprod Biomed Online.* 43(3):523-531, 2021.
60. Wang Y, Xie Z. Exploring the role of gut microbiome in male reproduction. *Andrology.* 10(3):441-450, 2022.
61. Cook RL, Hutchison SL, Ostergaard L, Braithwaite RS, Ness RB. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann Intern Med.* 142(11):914–25, 2005.
62. Quillin SJ, Seifert HS. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 16(4):226-240, 2018.

63. Al-Asmakh M, Stukenborg JB, Reda A, Anuar F, Strand ML, Hedin L. The gut microbiota and developmental programming of the testis in mice. *PLoS One*. 9(8):e103809, 2014.
64. Griswold MD. Interactions between germ cells and sertoli cells in the testis. *Biol Reprod*. 52(2):211-216, 1995.
65. Han F, Dong MZ, Lei WL, Xu ZL, Gao F, Schatten H et al. Oligoasthenoteratospermia and sperm tail bending in PPP4C-deficient mice Affiliations expand. *Mol Hum Reprod*. 22;27(1), 2021.
66. Hussein HK, Elnaggar MH, Al-Zahrani NK. Antioxidant role of folic acid against reproductive toxicity of cyhalothrin in male mice. *Glo Adv Res J Environ Sci Toxicol*. 1(4): 66-71, 2012.
67. Akgül T, Doğantekin E, Agras K. İdiyopatik erkek infertilitesinde probiyotiklerin yeri. *Androl Bul*. 21:67–71, 2019.
68. Pearce MM, Zilliox MJ, Rosenfeld AB, Thomas-White KJ, Richter HE, Nager CW et al. Pelvic Floor Disorders Network. The female urinary micro- biome in urgency urinary incontinence. *Am J Obstet Gyne*. 213(3):347.e1-11, 2015.
69. Han H, Zhong R, Zhou Y, Xiong B, Chen L, Jiag Y et al. Hydroxytyrosol Benefits Boar Semen Quality via Improving Gut Microbiota and Blood Metabolome. *Front Nutr*. 17; 8:815922, 2022.
70. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T et al. Bacterial Communities in Semen from Men of Infertile Couples: Metagenomic Sequencing Reveals Relationships of Seminal Microbiota to Semen Quality. *PLoS One*. 23; 9(10): e110152, 2014.
71. Lundy SD, Vij SC, Rezk AH, Cohen JA, Bajic P, Ramasamy R. The microbiome of the infertile male. *Curr Opin Urol*. 30(3):355-362, 2020.
72. Altmae S, Franasiak JM, Mandar R. The seminal microbiome in health and disease. *Nature Reviewa Urology*. 6,703-721, 2019.
73. Alqawasmeh O, Fok E, Yim H, Li T, Chung J, Chan D. The microbiome and male infertility: looking into the past to move forward. *Human Fertiliy*. 1-13, 2022.

74. De Francesco MA, Negrini R, Ravizzola G, Galli P, Manca N. Bacterial species present in the lower male genital tract: a five- year retrospective study. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 16:47–53, 2011.
75. Lundy SD, Sangwan N, Parekh NV, Manesh, Selvam MKP, Gupta S et al. Functional and taxonomic dysbiosis of the gut, urine, and semen microbiomes in male infertility. *European Association of Urology*. 826–836, 2021.
76. Devroey P: ICSI with Testicular Sperm: Tecniques for Retrieval in Obstructive and Non- Obstructive Azoospermia. In Filiroci M, Flamigni C(eds): *Treatment of infertility: The New Fronteriers* (Boca Raton, Florida, 22-24 Jan), Communications Media for Education Inc. New Jersey, 1998.
77. Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1(1):2-25, 1970.
78. York MK. Staining procedures: Gram stain. In: Garcia LS (editor in chief). *Clinical Microbiology Procedures Hand- book*. 2nd ed. update, ASM Press, Washington D.C.
79. Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 27.21: 2957-2963, 2011.
80. Bokulich NA, Subramanian S, Faith JJ, Gevers D, Gordon JI, Knight R et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature methods* 10.1: 57-59, 2013.
81. Caporaso, JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* 7.5: 335-336, 2010.
82. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27.16: 2194-2200, 2011.
83. Çetinbaş S, Kemeriz F, Göker G, İ. Biçer, Y.S. Velioğlu. İnsan Mikrobiyomu: Beslenme ve Sağlık Üzerindeki Etkileri. *Akademik Gıda*. 15(4): 409-415, 2017.

84. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 21(29):8787-8803, 2015.
85. Edward MG, Couper J. Microbiome in health and disease. *J Paediatr Child Health*. 56(11):1735-1738, 2020.
86. Laudes M, Geisler C, Rohmann N, Bouwman J, Pischon T, Schlicht K. Microbiota in Health and Disease-Potential Clinical Applications. *Nutrients*. 29;13(11):3866, 2021.
87. Koedooder R, Singer M, Schoenmakers S, Sacelkoul PHM, Morre SA, Jonge J et al. The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. *Hum Reprod*. 4;34(6):1042-1054, 2019.
88. Ding N, Zhang X, Zhang XD, Jing J, Liu SS, Mu YP et al. Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut microbes. *Gut*. 69(9):1608-1619, 2020.
89. Kiessling AA, Desmarais BM, Yin H-Z, Loverde J, Eyre RC. Detection and identification of bacterial DNA in semen. *Fertil Steril*. 90:1744–56, 2008.
90. Chen X, Gong L, Xu J. Antioxidative activity and protective effect of probiotics against high-fat diet-induced sperm damage in rats. *Animal*. 7:287–92, 2013.
91. Chemaitelly H, Majed A, Abu-Hijleh F, Bloondeel K, Matsaseng TC, Kiarie J et al. Global epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in infertile populations: Systematic review, meta-analysis and metaregression. *Sex Transm Infect*. 97(2):157-169, 2021.
92. Mandar R, Punab M, Korrovits P, Türk S, Ausmees K, Lapp E et al. Seminal microbiome in men with and without prostatitis. *Int J Urol*. 24(3):211-216, 2017.
93. Javurek AB, Spollen WG, Johnson SA, Nathan JB, Bromert KH, Givan SA et al. Consumption of a high-fat diet alters the seminal fluid and gut microbiomes in male mice. *Reprod Fertil Dev*. 29(8):1602-1612, 2017.

94. Zhang P, Feng Y, Li L, Ge W, Yu S, Hao Y et al. Improvement in sperm quality and spermatogenesis following faecal microbiota transplantation from alginate oligosaccharide dosed mice. *Gut*. 70:222–5, 2021.
95. Zhao Y, Zhang P, Ge W, Feng Y, Li L, Sun Z et al. Alginate oligosaccharides improve germ cell development and testicular microenvironment to rescue busulfan disrupted spermatogenesis. *Theranostics*. 10(7):3308-3324, 2020.
96. Bouter KE, Raalte DH, Groen AK, Nieuwdorp M. Role of the Gut Microbiome in the Pathogenesis of Obesity and Obesity-Related Metabolic Dysfunction. *Gastroenterology*. 152(7):1671-1678, 2017.
97. Wang HX, Wang YP. Gut microbiota-brain axis. *Chin Med J (Eng)*. 5;129(19): 2373-80, 2016.
98. Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J. The first microbial colonizers of the human gut: Composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev*. 81(4): e00036-17, 2017.
99. Barbonetti A, Cinque B, Vassallo MRC, Mineo S, Francavilla S, Cifone MG et al. Effect of vaginal probiotic lactobacilli on in vitro-induced sperm lipid peroxidation and its impact on sperm motility and viability. *Fertil Steril*. 95:2485–8, 2011.
100. Zhang P, Liu J, Xiong B, Zhang C, Kang B, Gao Y et al. Microbiota from alginate oligosaccharide-dosed mice successfully mitigated small intestinal mucositis. *Microbiome*. 8: 112, 2020.
101. Martinot E, Thirouard L, Holota H, Monroe M, Garcia M, Beaudoin C. Intestinal microbiota defines the gut-testis axis. 71(4):844-845, 2022.
102. Zhang H, Yin Y, Wang G, Liu Z, Liu L, Sun F. Interleukin-6 disrupts blood-testis barrier through inhibiting protein degradation or activating phosphorylated ERK in Sertoli cells. *Sci Rep*. 4:4260, 2014.
103. Duracka M, Lukac N, Kaxaniová M, Kantor A, Hleba L, Ondruska L et al. Antibiotics Versus Natural Biomolecules: The Case of In Vitro Induced Bacteriospermia by *Enterococcus Faecalis* in Rabbit Semen. *Molecules*. 27;24(23):4329, 2019.

104. Zhang T, Sun P, Geng Q, Fan H, Gong Y, Hu Y et al. Disrupted spermatogenesis in a metabolic syndrome model: the role of vitamin A metabolism in the gut-testis axis. *Gut*. 71, 2021.
105. Helli B, Kavianpour M, Ghaedi E, Dadfar M, Haghighian HK. Probiotic effects on sperm parameters, oxidative stress index, inflammatory factors and sex hormones in infertile men. *Hum Fertil (Camb)*. 25:499–507, 2020.
106. Valcarce D, Genovés S, Riesco M, Martorell P, Herráez MP, Ramón D et al. Probiotic administration improves sperm quality in asthenozoospermic human donors. *Benef Microbes*. 8:193– 206, 2017.
107. Maretti C, Cavallini G. The association of a probiotic with a prebiotic (Flortec, Bracco) to improve the quality/quantity of spermatozoa in infertile patients with idiopathic oligoasthenoteratospermia: A pilot study. *Andrology*. 5(3): 439- 444, 2017.
108. Valcarce DG, Martinez-Vazquez JM, Riesco MF, Robles V. Probiotics reduce anxiety-related behavior in zebrafish. 14; 6(5):e03973, 2020.
109. Bukharin VO, Perunova NB, Ivanova EV, Chaynikova IN, Bekpergenova AV, Bondarenko T et al. Semen microbiota and cytokines of healthy and infertile men. *Asian J Androl*. 24(4):353-358, 2022.

10. ETİK KURUL ONAYI

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Sayı : E-10840098-772.02-3982
Konu: Etik Kurulu Kararı

23/08/2021

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Azospermik Olgulardan Alınan TESE Dokularının Mikrobiyota Yönünden Analizinin Erkek İnfertilitesi ile İlişkisinin Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADISOYADI	AYŞE ALTUN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji-Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 02F4B365X9 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Sa



İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
Karar Bilgileri	Karar No:853	Tarih: 19/08/2021		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Katılım *	İmza
Dr. Öğr. Üyesi Mahmut TOKAÇ	Tıp Tarihi ve Etik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Uygun dur
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Uygun dur
Doç. Dr. Mehmet Kemal ÖZDEMİR	Elektrik ve Elektronik	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Uygun dur
Doç. Dr. İknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☒ H ☐	E ☐ H ☒	Katılmadı
Doç. Dr. Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Uygun dur
Dr. Öğr. Üyesi Neziha HACIHASANOĞLU ÇAKMAK	Biyokimya	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Uygun dur
Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	Tıbbi Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	Uygun dur

* :Toplantıda Bulunma

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrağınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 02F4B365X9 kodu ile doğrulayabilirsiniz.