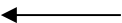


İLKAY ÖZDEMİR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ERKEN EMBRİYONİK GELİŞİMDE SENTROZOMUN
ROLÜNÜN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOPİK
DÜZEYDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

İLKAY ÖZDEMİR

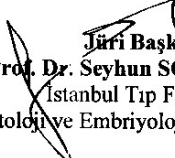
**DANIŞMAN
PROF. DR. SEYHUN SOLAKOĞLU**

**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HİSTOLOJİ VE
EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Tıp Fakültesi, Hsitoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Programında Yüksek Lisans öğrencisi İlkay ÖZDEMİR tarafından Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'un danışmanlığında hazırlanan "Erken Embriyonik Gelişimde Sentrozomun Rclünün Işık ve Elektron Mikroskopik Düzeyde Değerlendirilmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 22 /08/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Jüri Başkanı
Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU
İstanbul Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

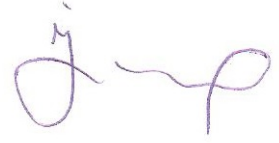

Jüri
Prof. Dr. M. Ertan KERVANCIOĞLU
İ. Ü. -Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları Anabilim Dalı


Jüri
Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK
İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

İlkay Özdemir



İTHAF

Hayatın bana sunduğu en anlamlı hediyeye, varoluş sebebime, hiç büyümeyen bebeğime, oğluma, Oğuz'uma...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin başlangıcından, tezimin tamamlanma aşamasına kadar bilgi ve deneyimleri ile yoluma ışık tutmuş olan, daima yardımını ve desteğini hissettiğim, danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda, konunun belirlenmesinden, deneylerimin tamamlanmasına kadar tüm aşamalarda derin bilgi ve deneyimlerini paylaşan, gerekli tüm olanakları sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Mehmet Ertan KERVANCIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime olan değerli katkılarından dolayı anabilim dalımız emekli öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ayhan Bilir'e, Prof. Dr. Leyla Tapul'a ve Prof. Dr. Bülent Ahışhalı'ya teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, her konuda desteklerini aldığım ve daima dostluklarını hissettiğim, Doç. Dr. Sibel Köktürk'e, Doç. Dr. Tuğba Kotil'e ve Dr. Öğr. Üyesi Elif Kervancıoğlu Demirci'ye çok teşekkür ederim.

Yardımlarından dolayı, Biyolog Gülçin Ekter Kanter'e, Biyolog Dr. Naciye Erol'a teşekkürlerimi sunarım.

Elektron mikroskopik çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Biyolog Funda Onar'a, Biyolog Fadime Aktar'a ve Biyolog Ebru Karabulut Akyön'e çok teşekkür ederim.

Floresan mikroskopik görüntülemelerimde desteklerini aldığım, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin tamamlanma sürecindeki değerli destekleri için, Biyolog Sibel Doğan'a, Biyolog Aysel Akyüz Civan'a, Moleküler Biyolog Aslı Erdoğan'a, Biyolog Hasan Serdar Mutlu'ya, Dr. Fatmanur Karakuş'a ve Selen Bozkurt Demiray'a çok teşekkür ederim.

Arkadaşlarım, Biyolog Dr. Türkan Sarıoğlu'na, Dr. Emel Arslan'a, Biyolog Feride Karahan'a, Dr. Merve Pehlivan'a, Biyolog Dr. Tuğba Ekiz Yılmaz'a, sekreterimiz Sosyolog Gülcan ztrk ve tecrübeli teknisyenimiz Selahattin nal'a yardımları ve dostlukları için çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu uzun süreçte her zaman yanımda olduklarını bildiğim, eşim, şenol zdemir'e, ocuklarım, Oğuz'um, Fatih'im ve Cemre'm'e sabırları ve destekleri için, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 46340



İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Erkek Üreme Sistemi	4
2.2. Testis:.....	5
2.2.1. Testis Gelişimi	5
2.2.2. Testis Histolojisi	7
2.2.3. Sertoli Hücreleri.....	9
2.2.4. Spermatogenik Seri Hücreleri.....	9
2.2.5. Spermatogenez	10
2.2.5.1. Spermatogonyal Faz.....	11
2.2.5.2. Spermatosit Fazı.....	11
2.2.5.3. Spermatid Fazı	12
2.3. Olgun Spermatozoanın Yapısı	13
2.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Sperm Analizi.....	18
2.4.1. Sperm'in İnce Yapısal Anomalileri.....	18
2.4.2. Sperm Baş Anomalileri.....	19
2.4.3. Sperm Boyun Anomalileri	21
2.4.4. Sperm Kuyruk Anomalileri.....	21
Kuyruk Orta Parça Anomalileri	21
Kuyruk Esas Parça Anomalileri	22
2.5. Sentrozom	22

2.6. Sentrin	27
2.7. Speriolin	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. Örneklerin Toplanması	31
3.2. Işık Mikroskopik İnceleme	32
3.2.1. Papanicolaou Boyası	32
3.2.2. Papanicolaou Boyası İle Morfolojik Değerlendirme Örnekleri	33
3.2.3. İmmünofloresan İşaretleme	34
3.2.4. İF Boyama Protokolü	35
3.2.5. İF İşaretleme İle Sentrin Ve Speriolin İfadesinin Değerlendirilmesi	36
3.3. Elektron Mikroskopik İnceleme	36
3.3.1. TEM Takip Protokolü	37
3.3.2. Sperm Anomali Listelerinin Oluşturulması	38
3.3.3. TEM ile Sperm İnce Yapı Değerlendirme Örnekleri	43
3.3.3.1. Baş Enine Kesit Değerlendirme Örnekleri	43
3.3.3.2. Baş Uzmanına Kesit (baş+boyun) Değerlendirme Örnekleri	45
3.3.3.3. Sperm Uzmanına Kesit (baş+boyun+kuyruk) Değerlendirme Örnekleri	47
3.3.3.4. Kuyruk Orta Parça Enine Kesit Değerlendirme Örnekleri	49
3.3.3.5. Kuyruk Esas Parça Enine Kesit Değerlendirme Örnekleri	50
4. BULGULAR	51
4.1. IM İncelemesi ile Saptanan Morfolojik Bulgular	51
4.2. İmmünofloresan Boyama Sonuçları	52
4.3. TEM incelemesi ile Saptanan İnce Yapısal Bulgular	55
5. TARTIŞMA	92
KAYNAKLAR	99
ETİK KURUL KARARI	112
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI	113
ÖZGEÇMİŞ	114

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Baş enine kesitleri değerlendirme tablosu (Grup 1).....	39
Tablo 3-2: Baş uzamına kesitleri değerlendirme tablosu (Grup 2).....	40
Tablo 3-3: Sperm uzamına kesitleri değerlendirme tablosu (Grup 3)	41
Tablo 3-4: Kuyruk orta parça enine kesitleri değerlendirme tablosu (Grup 4a).....	42
Tablo 3-5: Kuyruk esas parça enine kesitleri değerlendirme tablosu (Grup 4b).....	42
Tablo 3-6: Sperm başlarının değerlendirilmesi	44
Tablo 3-7: Sperm baş ve boyunlarının değerlendirilmesi.....	46
Tablo 3-8: Sperm baş, boyun ve kuyruk değerlendirmesi	48
Tablo 3-9: Kuyruk orta parça değerlendirmesi	49
Tablo 3-10: Kuyruk esas parça değerlendirmesi	50
Tablo 4-1: Kontrol örneği TEM değerlendirme sonuçları.....	70
Tablo 4-2: Kontrol örneği TEM kuyruk değerlendirme sonuçları	71
Tablo 4-3: 1. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	72
Tablo 4-4: 1. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları	73
Tablo 4-5: 2. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	74
Tablo 4-6: 2. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları	75
Tablo 4-7: 3. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	76
Tablo 4-8: 3. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları	77
Tablo 4-9: 4. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	78
Tablo 4-10: 4. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları	79
Tablo 4-11: 5. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	80
Tablo 4-12: 5. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları	81
Tablo 4-13: 6. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	82
Tablo 4-14: 6. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları	83
Tablo 4-15: 7. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	84
Tablo 4-16: 7. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları	85
Tablo 4-17: 8. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	86
Tablo 4-18: 8. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	87
Tablo 4-19: 9. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	88
Tablo 4-20: 9. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	89

Tablo 4-21: 10. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	90
Tablo 4-22: 10. Hasta TEM değerlendirme sonuçları	91



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Erkek üreme sistemi organları	4
Şekil 2-2: Primordiyal germ hücrelerinin göçü	6
Şekil 2-3: Primordiyal germ hücrelerinin gonad taslağına ulaşmaları	6
Şekil 2-4: Testis embriyolojisi.....	7
Şekil 2-5: Testisin yapısı.....	8
Şekil 2-6: Seminifer Tübül Epiteli.....	9
Şekil 2-7: Testisin histolojik yapısı	10
Şekil 2-8: Spermatogenez süreci.....	11
Şekil 2-9: Spermiyogenezin aşamaları	12
Şekil 2-10: Olgun spermatozoonun yapısı.....	14
Şekil 2-11: Sperm kuyruğunun yapısı	15
Şekil 2-12: Kuyruk orta parça ince yapısı	16
Şekil 2-13: Kuyruk Esas Parça ince yapısı	16
Şekil 2-14: Aksonemin yapısı.....	17
Şekil 2-15: Sentrozomun şematik görünümü.....	23
Şekil 2-16: Sentrozom döngüsü ve sentriyol duplikasyonu.....	26
Şekil 3-1: Örneklerin ayrılması.....	31
Şekil 3-2: Sperm baş görüntülerine örnekler.	34
Şekil 3-3: Kuyruk orta parça görüntülerine örnekler.....	34
Şekil 3-4: Kuyruk esas parça görüntülerine örnekler.	34
Şekil 3-5: Sentrin immünoreaktivitesi	36
Şekil 3-6: Speriolin İmmünoreaktivitesi.....	36
Şekil 3-7: TEM ile gözlemlediğimiz sperm baş görüntüleri.....	43
Şekil 3-8: TEM ile gözlemlediğimiz sperm baş uzamına kesit (baş+boyun) görüntüleri	45
Şekil 3-9:TEM ile gözlemlediğimiz sperm uzamına kesit (baş+boyun+ kuyruk) görüntüleri.....	47
Şekil 3-10: TEM ile gözlemlenen kuyruk orta parça enine kesit (Grup 4a) görüntüleri	49
Şekil 3-11: TEM ile gözlemlenen kuyruk orta parça enine kesit (Grup 4b) görüntüleri	50
Şekil 4-1: Kontrol örneğine ait PAP boyaması.....	51
Şekil 4-2: Hasta örneğine ait PAP boyaması	52

Şekil 4-3: Kontrol örneklerinde sentrin ekspresyonu	52
Şekil 4-4: Kontrol örneklerinde sperm başları ve sentrin ekspresyonu	53
Şekil 4-5: Kontrol örneklerinde speriolin ekspresyonu	53
Şekil 4-6: Kontrol örneklerinde sperm başları ve speriolin ekspresyonu	54
Şekil 4-7: Hasta örneklerinde sperm başları ve speriolin ekspresyonu	54
Şekil 4-8: Speriolin için negatif kontrol boyaması	55
Şekil 4-9: Fertil bireye ait normal görünümlü spermatozoon.....	57
Şekil 4-10: Fertil bireye ait sperm bağlantı parçası ultrastrüktürü	58
Şekil 4-11: 1. Hastaya ait, çift boyunlu ve aynı zarda iki kuyruk bulunduran yuvarlak başlı spermatozoon	58
Şekil 4-12: 1. Hastaya ait çift boyunlu spermatozoonlar.....	59
Şekil 4-13: 2. Hastaya ait boyunda adjuvant sentriyol	59
Şekil 4-14: 2. Hastaya ait sperm boynunda adjuvant sentriyol.....	60
Şekil 4-15: 3. Hastaya ait spermatozoonda, sitoplazmik artık.....	60
Şekil 4-16: 5. Hastaya ait spermatozoonda çift boyun ve düzensiz akrozom.....	61
Şekil 4-17: 5. Hastaya ait spermatozoonda bükük baş	62
Şekil 4-18: 6. Hastaya ait spermatozoonda dekonpanse çekirdek	62
Şekil 4-19: 7. Hastaya ait spermatozoonda çift boyun	63
Şekil 4-20: 8. Hastaya ait spermatozoonda çekirdek vakuölü	63
Şekil 4-21: 9. Hastaya ait spermatozoonda proksimal sentriyol.....	64
Şekil 4-22: 9. Hastaya ait anormal morfolojiye sahip spermatozoon	64
Şekil 4-23: 10. Hastaya ait spermatozoonlarda, implantasyon fossasında kayma ve çift boyun görüntüleri.....	65
Şekil 4-24: 10. Hastaya ait spermatozoonda çift boyun	65
Şekil 4-25: 10. Hastaya ait bükük başlı ve üç boyunlu spermatozoon	66
Şekil 4-26: 10. Hastaya ait Şekil 4.21’de yer alan spermin boyun görüntüsü.....	66
Şekil 4-27: Şekil 4-27: Akrozom Reaksiyonu 1	67
Şekil 4-28: Akrozom Reaksiyonu 2.....	67
Şekil 4-29: Kuyruk, enine ve uzamına kesitler	68
Şekil 4-30: Normal yapıdaki sperm kuyruğunun, baştan uca doğru, enine kesitleri	68
Şekil 4-31 Şekil: Kuyruk orta parça anomalileri	69
Şekil 4-32: Kuyruk esas parça anomalileri	69

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ICSI.....	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IF	İmmünoflresan
TEM.....	Geçirimli elektron mikroskobu
PCM.....	Perisentriyolar materyal
PS	Proksimal sentriyol
DS	Distal sentriyol
YÜT	Yardımla üreme teknikleri
DSÖ.....	Dünya Sağlık Örgütü
IM	Işık mikroskobu
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SRY	Y kromozomu üzerinde cinsiyet belirleyici bölge
TDF	Testis belirleyici faktör
FM	Floresan mikroskobu
DFS	Fibröz kılıf displazisi
PCD	Primer siliyer diskinezi
IMSI	İntrasitoplazmik morfolojik olarak seçilmiş sperm enjeksiyonu
SPATA16	Spermatogenez ilişkili gen 16
MTOC	Mikrotübül organize edici merkez
PLK1	Polo-like-kinaz 1
CDK2	Siklin bağımlı kinaz 2
SPD2	C. Elegans Sentrozomal Proteini
CEP192	Sentrozomal protein 192
PLK4	Polo-like-kinaz 4
Ana2	Anastral spindle 2
STIL	Sentriyolar montaj proteini
SAS-6	İğ iplikçiği proteini 6 geni
CPAP	Sentrozomal P4.1 ilişkili protein
CETN1-2	Sentrin 1-2

POC1B	Sentriyolar protein homolog B
GFP	Yeşil floresan protein
ELISA.....	Enzim bağımlı immün-sorbent testi
APC	Anafaz ilerletici kompleks
CDK.....	Siklin bağımlı kinaz
SPATC1	Spermatogenez ve sentriyol ilişkili gen 1
ÜYTE	Üremeye yardımcı tedaviler
TZI	Teratozoospermi indeksi
PAP.....	Papanicolaou
PBS	Fosfat Tampon
DAPI	4'-6-Diamidino 2-fenil indol
IGg	İmmünoglobülin G
FITC	Floresan izo-tiyo-siyanat
INCR	Çekirdek içi sitoplazma artığı
AS	Adjuvan sentriyol

ÖZET

Özdemir İ. (2019). Erken embriyonik gelişimde sentrozomun rolünün ışık ve elektron mikroskopik düzeyde değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

İnfertilitenin tedavisinde sıkça kullanılan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulaması, bazı ender olgularda, döllenmeyi sağladığı halde, erken bölünmelerde bozukluklarla sonuçlanabilmektedir. Embriyonik gelişim, zigotun ilk bölünmesiyle başlayıp, düzenli olarak gerçekleşen mitozlarla sürdürülür. Bu süreçte, kaynağı paternal olan sentrozom önemli bir rol üstlenir. Sperm sentrozom işlevindeki aksaklıkların, embriyonun erken gelişimindeki bölünme bozukluklarıyla ilişkili olabileceği, bazı araştırmacılar tarafından önerilmiştir. Çalışmamızda, tekrarlanan ICSI uygulamaları sonucunda, embriyoları yüksek oranda anormal bölünme görüntüsü sergilemiş olan çiftlerin, erkek partnerlerinden ejakülat sperm örnekleri toplanmıştır. Bu örnekler, fertil erkeklerin örnekleri ile karşılaştırmalı olarak, mikroskopik düzeyde incelenmiştir. Alınan örneklerin bir kısmı morfolojik analiz için Papanicolaou metoduyla boyanmış, bir kısmı elektron mikroskopik inceleme için hazırlanmıştır. Örneklerin kalan kısımları dondurularak sıvı azotta saklanmıştır. Yeterli hasta sayısına ulaşıldığında, dondurulan örnekler çözdürülmüştür. Sonrasında, immünofloresan (IF) boyama yöntemi ile sentrozom proteinlerinden, sentrin ve speriolin ekspresyonları değerlendirilmiştir. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile incelenen örneklerde, spermatozoada gözlemlenen ince yapısal özellikler, ayrıntılı biçimde belirlenerek tasnif edilmiştir. Değerlendirmelerin sonunda, bazı hastalarda morfolojik değerler normal sınırlarda bulunurken, bazılarında düşük morfolojik değerler saptanmıştır. Sentrozom proteinlerinin ekspresyonları açısından anlamlı sonuçlara ulaşamamıştır. TEM incelemesinde, bazı hastalarda, yüksek düzeylerde boyun anomalisi saptanmıştır. Özellikle iki hastada, spermatozoada yüksek oranda çift boyun ve dolayısıyla birden çok sentriyol görüntüsü izlenmiştir. Bu iki vakada ICSI ile seçilen spermatozoonların çift boyunlu olabileceği ihtimalinin yüksek olduğu değerlendirilmiştir. ICSI’de kullanılan böyle bir sperm ile zigota fazla sayıda sentriyolün taşınmış olabileceği, bunun da, çok kutuplu mitoz mekiği oluşturarak, bölünmelerde bozukluklara ve fragmantasyona yol açabileceği düşünülmüştür. Açıklanamayan durumlarda spermatozoanın TEM ile incelenmesinin, planlanacak yardımla üreme tedavi seçenekleri noktasında yol gösterici olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Sperm, sentrozom, geçirimli elektron mikroskop, sentrin, speriolin

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 46340



ABSTRACT

Özdemir İ. (2019). Light and electron microscopic evaluation of the role of centrosome in early embryonic development. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and embryology. Master Thesis. İstanbul.

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is a common method used for infertility treatment. However, in some cases, after fertilization, it may result with early cleavage abnormalities. Embryonic development proceeds with regular mitotic divisions. During, this process paternally inherited centrosome acts an important role. Some investigators suggest that abnormal sperm centrosome may relate to early cleavage abnormalities of embryo. In our study, we collected ejaculated sperm samples from male partners of couples whose embryos showed high incidence of abnormal cleavage as a result of ICSI treatments. These samples were investigated at microscopic level comparing with samples of fertile men. Samples were examined with light and electron microscopy. Furthermore, expression of centrosome proteins centrin and pericentrin were investigated with immunofluorescence staining. As a result of investigations it was seen that while morphological results of some patients were within normal range, some patients showed low morphological rates. Insignificant results on expression levels of centrosome proteins were found. In some patients, high percentage of neck anomalies were detected in TEM examination. Especially in two patients, rate of double-necked spermatozoa was high and therefore numbers of centriole structures were seen more than one. We suggested that in these two cases, possibility of being double-necked of selected spermatozoa for ICSI was high. When this sperm was used in ICSI, zygote might have got many centrioles and this could have led to fragmentations in cleavages forming multipolar mitotic spindles. We suggest that TEM examination of spermatozoa can be a guiding method to assisted reproductive techniques in cases of unexplained infertility.

Key Words: Sperm, centrosome, transmission electron microscope, centrin, pericentrin

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, günümüzde, çocuk sahibi olmak isteyen çiftler için önemli bir sorun teşkil etmektedir. İnfertil çiftlerin %40'ında neden, erkek infertilitesidir. Son yıllarda, yardımla üreme tekniklerindeki gelişmelerle, nispeten başarılı tedaviler gerçekleştirilebilmektedir (1).

Hareket bozukluklarıyla oluşan infertilitenin tedavisi, spermin yumurta hücresi içine geçişini kolaylaştıracak bir manüpülasyon gerektirir (2). Bu geçişi sağlayan bir yöntem olan yumurta sitoplazması içine sperm enjeksiyonu (İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu-ICSI) uygulamasının geliştirilmesi, sorunu bir ölçüde çözümlerse de, uygulamalar her zaman başarı ile sonuçlanamayabilir (3). Bazı olgularda, döllenme gerçekleşmiş olsa da, embriyo gelişiminde bozukluklar gözlemlenebilmektedir. Döllenme sonrasında zigotun ilk bölünmesiyle başlayacak olan gelişimin sürdürülebilmesi, hücre bölünmelerinin devamı ile sağlanmaktadır. Düzenli olarak gerçekleşecek hücre bölünmelerinde, ilgili organel olan sentrozom, önemli bir işlev üstlenmektedir. Bölünmede görevli sentrozom, bir çift sentriyol ve onu çevreleyen perisentriyolar materyal (PCM) olarak adlandırılan bulutumsu bir maddeden oluşmaktadır. Döllenme sırasında zigotun sentrozomu, paternal olarak sperm tarafından sağlanır. Spermde boyun bölgesine yerleşmiş olan sentrozom, baş ile birlikte ooplazma içine taşınır. Sperm sentrozomunun proksimal sentriyolü (PS), elektron mikroskopik incelemelerle boyun bölgesinde gözlemlenebilmektedir. Spermin distal sentriyolü (DS) ise, bütünlüklü yapısını korumayıp bozunmuş bir durumda kuyruğun başlangıcında yer alır. Oositte ise sentrozom inaktive olmuş durumdadır (4). Zigotta işlev görecektir olan sentrozomun sentriyolü sperm tarafından sağlanırken, PCM, ooplazmadaki proteinlerce oluşturulmaktadır. Embriyonik gelişim sürecindeki bölünmeler için gerekli olan mitotik iğ iplikleri, sperm sentriyolleri ve oosit sitoplazmasındaki PCM proteinlerinin birlikte oluşturduğu sentrozomun perisentriyolar alanından başlatılır (1). Bazı ender infertil çiftlerin ICSI uygulamalarında, fertilizasyon gerçekleşmekte, ancak, embriyoda izlenen asimetrik bölünmeler, ya da yüksek düzeyde fragmentasyon durumu gibi bölünme bozukluklarının oluşması sebebiyle, gebelik sağlanamamaktadır (5). Zigot sentrozomunun büyük ölçüde paternal kaynaklı olduğu bilgisinden yola çıkarak, erken embriyonik gelişimdeki bu bozuklukların, embriyoya spermle aktarılan sentriyolün

fonksiyonuyla ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bu durumda, bölünme bozukluklarıyla sonuçlanan başarısız ICSI uygulamalarında sperm sentriyol fonksiyonundaki aksamaların rolü önem kazanmaktadır (6).

Sentriyol ve onu çevreleyen PCM, birçok protein içerir. Bunlardan sentrin, sentriyol ve bazal cisim yapısında bulunan, Ca^{2+} bağlayıcı, evrimsel olarak korunmuş, önemli bir sentrozom proteindir (7). Bir diğer protein olan speriolin, sentrozom yapısına katılan, döllenmiş oositteki sperm aster oluşumunda ve sentrozom fonksiyonunda rol aldığı düşünülen bir proteindir (8).

Spermin dölleme potansiyelinin belirlenebilmesi amacıyla gerçekleştirilen analizler, uygulanacak yardımla üreme teknikleri (YÜT) açısından önem taşımaktadır (9,10). Rutin laboratuvar uygulamalarında semen, genellikle lamalar üzerine yayılır, boyanır ve ışık mikroskopunda incelenerek morfolojik olarak değerlendirilir. Bu değerlendirme ile, baş, boyun ve kuyruk, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) yönergelerinde yer alan morfometrik parametrelere uygun olarak nitelenir (11).

DSÖ tarafından önerilen boyama prosedürleri Papanicolaou, Diff-Quick ve Shorr teknikleridir (11). Işık mikroskobu (IM) aracılığı ile gerçekleştirilen analiz, morfolojik değerlendirmenin yanı sıra, canlı sperm örneklerinde, hareketin izlenmesine de olanak sağlamasına rağmen, çözünürlük gücü açısından organel düzeyindeki birçok kusuru tanımlamada yetersiz kalmaktadır. Işık mikroskobu ile gözlemlenen sperm baş, boyun ve kuyruk anomalilerinin daha iyi tanımlanması noktasında elektron mikroskobu, sınırları aşabilen bir araç konumundadır. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile, organel düzeyinde ince yapı ayrıntıları gözlemlenirken, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile de, spermin üç boyutlu görüntüsü incelenebilir. Hem TEM, hem de SEM spermin çok daha ayrıntılı olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. Sperm patolojilerinin ince yapı düzeyinde tanımlanması, spermin fonksiyonel yetersizliklerinin açıklanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bu açıdan bakıldığında, spesifik vakalarda, spermin, özellikle TEM ile analizi önem kazanmaktadır (9).

Tüm bu bilgiler ışığında planlanan çalışmamızda, tekrarlanan ICSI uygulamaları sonucunda, embriyoları büyük oranda anormal bölünme görüntüsü sergileyen çiftler, çalışmaya dahil edilmişlerdir. Bu çiftlerin erkek partnerlerinin ejakulat sperm örnekleri, fertil erkeklerin ejakulat sperm örnekleri ile karşılaştırmalı olarak, baş, boyun, kuyruk yapısı, organeller ve sentriyol bileşenlerinden sentrin ve speriolin açısından,

mikroskopik düzeyde incelenmiştir. Ayrıca, sperm ince yapısının elektron mikroskopik incelemesi sonucu gözlemlenen anomalilerin tasnifi amaçlanmıştır. Bulguların değerlendirilmesiyle spermatozoadaki özelliklerin, erken embriyonik bölünme bozuklukları ile olabilecek ilişkisi irdelenmeye çalışılmıştır.

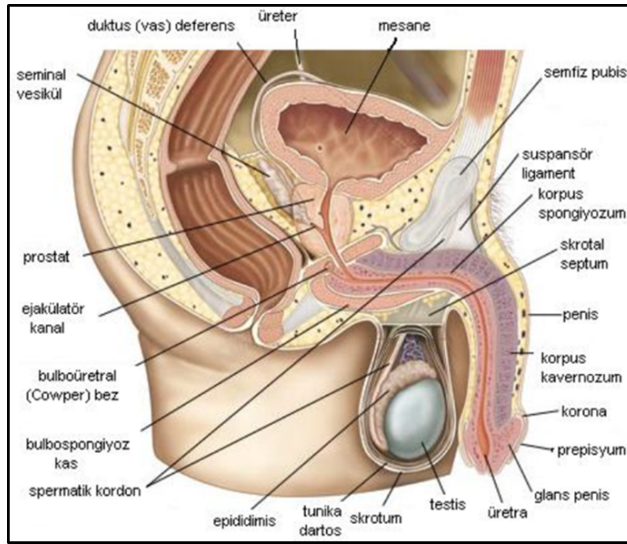


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi organları, haploid yapıdaki erkek gametlerin üretilmesinden, geçici olarak depolanmasından, dışarıya iletilmesinden ve cinsiyet hormonlarının sentezlenerek salgılanmasından sorumludurlar. Başlıca, testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmaktadırlar (12).

Testisler, spermatogenez (erkek gameti olan spermatozoanın üretimi) ve steroidogenez (seks hormonları olan androjenlerin üretimi) olmak üzere başlıca iki fonksiyondan sorumludur (13). Genital kanallar, duktuli efferentes, epididim, vaza deferens, ejakülatör kanal ve erkek üretrasının bir bölümünden oluşur. Bu kanallar spermatozoanın dışarıya iletilmesini sağlar. Seminal vezikül, prostat ve bulbo üretral bezlerden oluşan yardımcı bezler, salgılarıyla semeni oluşturarak, ejaküle edilen spermatozoaya besin sağlarlar (12). Penis ise erektile doku barındıran çiftleşme organıdır (13). Erkek genital organları, Şekil 2.1’de görülmektedir (14).



Şekil 2-1: Erkek üreme sistemi organları (14)

2.2. Testis:

Yetişkin bir erkekte, vücut boşluğu dışında, skrotum içinde asılı olarak yer alan bir çift oval şekilli erkek üreme organıdır. Yaklaşık olarak 4-5 cm uzunluğunda, 2,5-3 cm genişliğinde ve 20-25 gr ağırlığındadır. Olgun testisin posterior yüzü epididimis ile komşuluk yapar (15). Testislerin anatomik olarak vücut dışında yerleşmeleri, spermatogenez sürecinin, vücut ısısından 2 ila 3°C daha düşük olan optimum ısıda gerçekleşmesini sağlamaktadır (16). Testisler gamet üretimine hayat boyu kesintisiz olarak devam ederler (13).

2.2.1. Testis Gelişimi

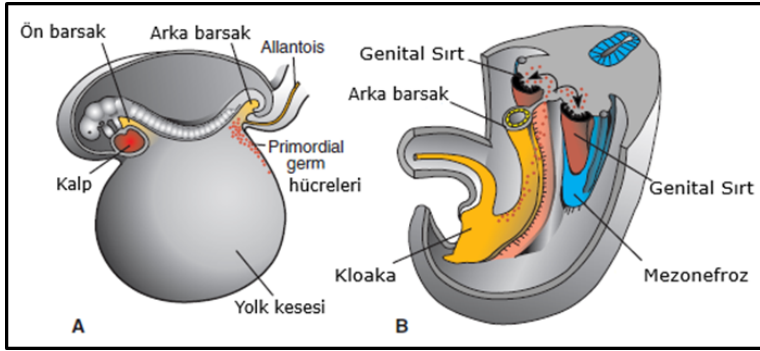
Testisler karın arka duvarında, üriner sistemle ilişkili halde gelişirler ve daha sonra skrotum içine inerler (13). Embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmiş olsa da, gelişimin 7. haftasına kadar morfolojik olarak gonodal farklılık yoktur (17). Testisler de overler gibi üç kaynaktan köken almaktadırlar.

Ara mezoderm; Arka karın duvarındaki ürogenital kabartıları yapar. Leydig hücrelerinin ve miyoid hücrelerin kaynağıdır.

Mezodermal epitel; Ürogenital kabartıları döşer. Sertoli hücrelerinin kaynağıdır.

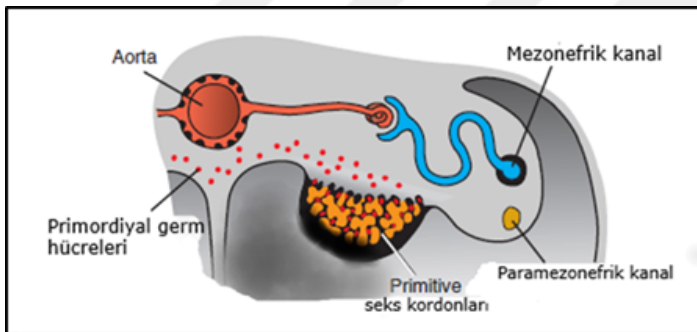
Primordiyal Germ Hücreleri; Yolk kesesinden gelişmekte olan gonadlara göç ederler. Spermatogonyumların kaynağıdır (18).

Primordiyal germ hücreleri, primitif çizgi boyunca göç ederek üçüncü haftada vitellus kesesinin duvarındaki endoderm hücreleri arasına yerleşirler. Dördüncü haftada vitellus kesesi duvarından göçe başlayan bu hücreler, beşinci haftada ilkel gonadlara ulaşırlar. Altıncı haftada ise, genital sırtlara ulaşmışlardır (Şekil 2.2) (19) . Primordiyal germ hücrelerinin genital sırta ulaşamadıkları durumlarda testis gelişimi gerçekleşmez (17).



Şekil 2-2: Primordiyal germ hücrelerinin göçü (19)

Primordiyal germ hücrelerinin gonad taslağına ulaşmaları, ürogenital kabartılardaki hücreleri indükleyerek prolifer olmalarını sağlar. Prolifere olan hücreler, primer seks kordonlarını oluştururlar (Şekil 2.3) (19).

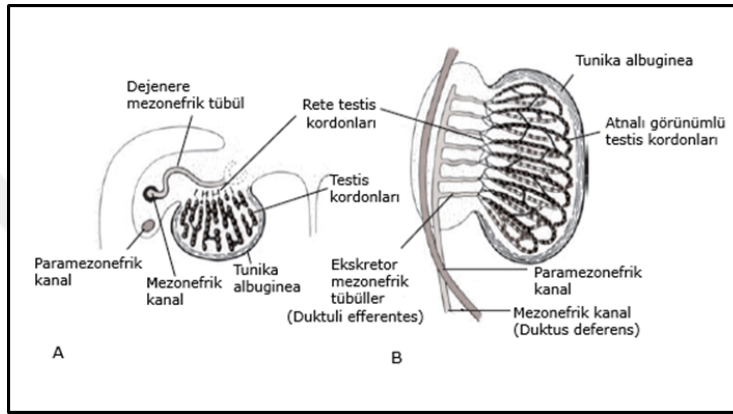


Şekil 2-3: Primordiyal germ hücrelerinin gonad taslağına ulaşmaları (19)

Testis gelişimi bir seri gen indüksiyonu ile ilişkilidir. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki SRY geni anahtar rolü üstlenmektedir. SRY geninin protein ürünü olan testis belirleyici faktör (TDF), farklılaşmamış gonadın gelişimini testis yönünde sürdürmesini sağlar (18).

Testisi oluşturmak üzere proliferasyona devam ederek medullanın derinliklerine doğru ilerleyen primitif cinsiyet kordonları, rete testisi oluşturacak ağı da yaparlar. Gelişen bu testis kordonları daha sonra tunika albuginea adlı yoğun bağ dokusunun oluşmasıyla yüzey epitelinden ayrılır. Gelişimin dördüncü ayında testis kordonları at nalı şeklini almıştır (Şekil 2.4). Rete testisle devam eden bu kordonlar primitif germ

hücrelerini ve bezin yüzey epitelinden gelişen sertoli hücrelerini içermektedir. İntertisyel alandaki Leydig hücreleri ise gonodal sırtın orjinal mezenşiminden köken almaktadırlar. Gebeliğin sekizinci haftasında Leydig hücrelerinin testosteron üretmeye başlamalarıyla genital kanalların ve dış genital organların erkek fenotipiyle gelişimi indüklenmiş olur (17).

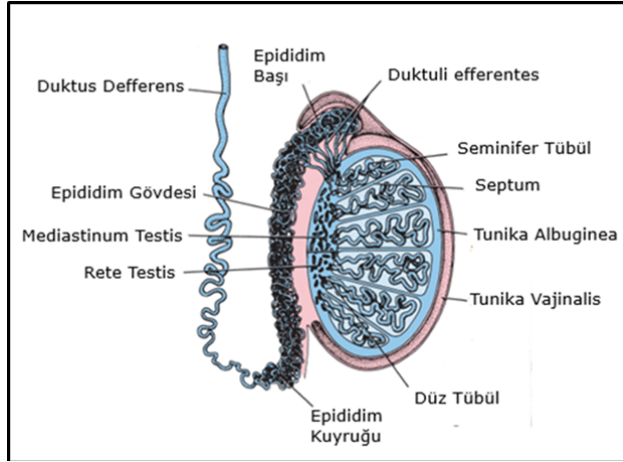


Şekil 2-4: Testis embriyolojisi

A- Tunika albugineanın oluşumu, B- Testis kordonlarının atnalı görünümünü alması (19)

2.2.2. Testis Histolojisi

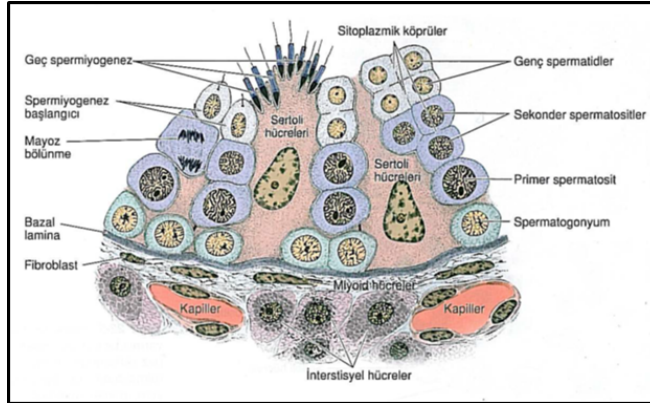
Testislerin dışı, tunika albuginea adı verilen, yoğun bağ dokusundan oluşmuş, kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tunika albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşır ve mediastinum testis adını alır. Buradan, bezin içine doğru, fibröz uzantılar girmektedir. Bu uzantılar, bezi, testis lobülleri ya da bölmeleri olarak adlandırılan, yaklaşık 250 adet piramit şekilli kısma ayırır (20). Bu lobüllerin herbiri 1 ila 4 adet seminifer tübül içermektedir. Seminifer tübüller oldukça uzun olmalarına karşın çok fazla kıvrım yaparak kendi üzerine katlanmalar göstermektedir (Şekil 2.5) (13).



Şekil 2-5: Testisin yapısı (13)

Seminifer tübüllerin arasında, Leydig hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stroma yer alır. Bu stroma interstisyel alan olarak da adlandırılır (13). Seminifer tübüller, günde ortalama 2×10^8 spermin üretildiği, 150-250 μm çapında ve 30-70 cm uzunluğunda tüplerdir. Her bir testiste yaklaşık 250-1000 adet olacak şekilde bulunmaktadır. Bir testisteki toplam uzunluğu 250 m'yi bulabilen bu çok kıvrımlı tübüller, oldukça kısa ve daha dar olan düz tübüller aracılığı ile rete testise bağlanırlar. Rete testis, mediastinum içinde anastomozlar yapan kanallar sistemidir. Rete testis kanalları, her bir testis için 10-20 adet olan duktuli efferentes ile duktus epididimisin baş kısmına bağlanmışlardır (20).

Seminifer tübüller, en dışta tunika propriya ile çevrelenmiş, seminifer, germinal ya da spermatogenik epitel olarak da adlandırılan, çok katlı bir epitelden oluşur (13,20). Bazal membranı fibröz bir bağ doku ile kaplı olan oldukça özelleşmiş bu epitelin en alt katmanında düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler bulunmaktadır (Şekil 2.6) (20).



Şekil 2-6: Seminifer Tübül Epiteli (20)

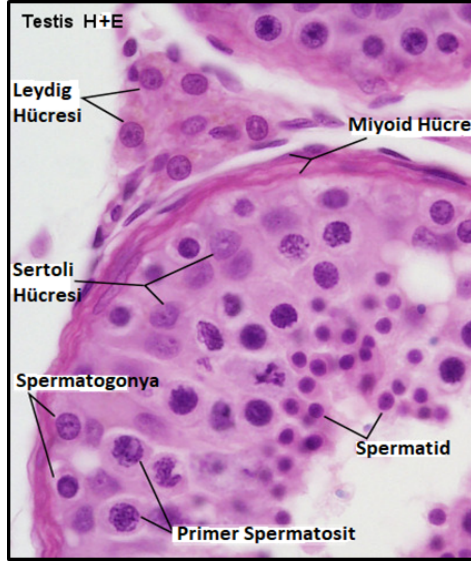
Seminifer Tübül epitelinin, Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri olmak üzere, başlıca iki tip hücre oluşturur.

2.2.3. Sertoli Hücreleri

Tübüllerin yapısal düzenini sağlayan, spermatogenik hücreleri çevreleyerek onlara destek olan, yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir. Bu hücreler puberteden sonra bölünmezler (13).

2.2.4. Spermatogenik Seri Hücreleri

Düzenli olarak bölünüp farklılaşan ve olgun spermatozoonu oluşturan hücrelerdir (20). Sertoli hücreleri arasında yerleşen hücre tabakaları şeklinde gelişimlerini sürdürürler (Şekil 2.7) (21). Gelişim aşamalarına göre tip A ve B spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, erken (yuvarlak) spermatid, geç (uzamış) spermatid ve spermatozoa olarak adlandırılırlar (13).

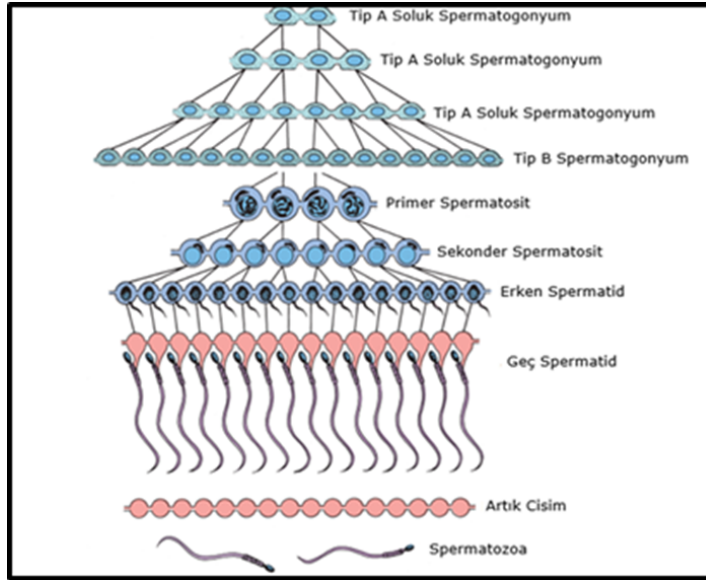


Şekil 2-7: Testisin histolojik yapısı (21)

Seminifer Tübüllerin aralarında bulunan interstisyel doku, gevşek bağ dokudan oluşmuştur. Bu alanda fibroblastlar, kapillerler, lenfatikler ve testosteron üretiminde görevli Leydig hücreleri bulunur (12,13,20). Büyük, poligonal ve eozinofilik yapıdaki bu hücreler sitoplazmalarında bir steroid hormon olan testosteronu barındırdıklarından, köpüksü bir sitoplazma görünümü sergilemektedirler (13).

2.2.5. Spermatogenez

Kök ve öncül hücreler olan spermatogonyumdan, olgun sperm hücresi gelişimi sürecine spermatogenez adı verilir (Şekil 2.8) (13). Spermatogenez, pubertede spermatogonyumların proliferasyonu ile başlar ve yaşam boyu devam eder (20). Üç fazda incelenir (13).



Şekil 2-8: Spermatogenez süreci (13)

2.2.5.1. Spermatogonyal Faz

Pubertede, spermatogonyumlar mitoz ile bölünmeye başlarlar. Bölünerek çoğalan spermatogonyumlar rutin histolojik preparatlarda çekirdek görünümüne göre ayımsanabilen A ve bunların bölünüp farklılaşmasıyla oluşan B tipi olarak iki çeşittir (20). A Tipi spermatogonyumlar ince granüllü kromatini olan oval nukleuslara sahiptirler (13). Çekirdek görünümüne göre Tip A koyu (Ad) ve Tip A soluk (Ap) olarak iki çeşidi bulunur. Tip A koyu spermatogonyumların, seminifer epitelin kök hücresi olduğu düşünülmektedir. Bölünerek yine Tip A koyu ya da Tip A soluk spermatogonyumların birer çiftini oluşturmaktadırlar. Tip A soluk spermatogonyumlar ise mitozla sayılarını arttırdıktan sonra spermatogenez sürecine doğru ilerleyen hücrelerdir. Farklılaşarak Tip B spermatogonyumları oluşturmaktadırlar. B tipi spermatogonyumlar, daha küresel ve soluk çekirdekli dirler (20). Öncül hücreler olan bu hücrelerin oluşmasıyla spermatogonyal faz sona erer (12,13).

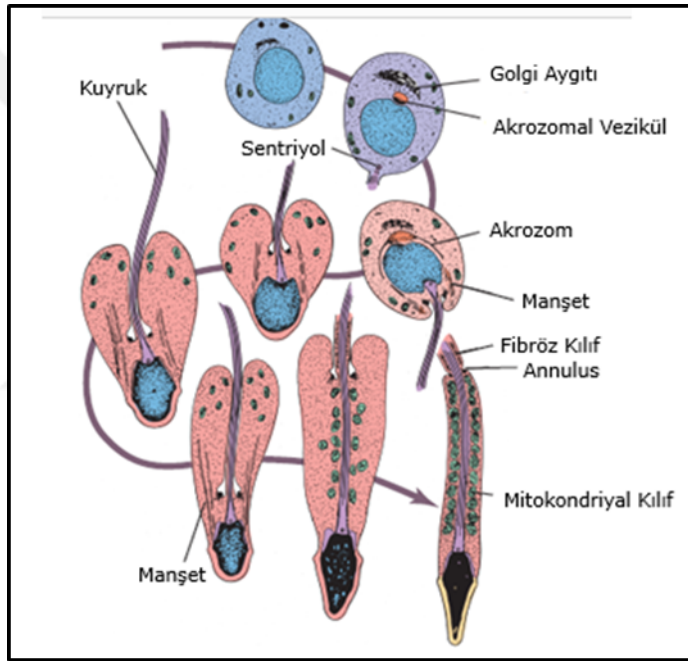
2.2.5.2. Spermatosit Fazı

Mayoz fazı olarak da adlandırılabilen bu evrede ilk olarak, Tip B spermatogonyumlar bölünerek primer spermatositleri oluştururlar. Primer spermatositler, DNA sentezinin gerçekleştiği, $2n$ ve $4d$ kromozoma sahip olan, büyük hücrelerdir. Birinci mayoz bölünme sonucu primer spermatositlerden, haploid kromozom sayısına ($1n$, 23 kromozom, $2d$ DNA) sahip sekonder spermatositler oluşur.

Sekonder spermatositler, oluştuktan hemen sonra ikinci mayoza girdiklerinden, testise ait histolojik kesitlerde gözlenmeleri zor olan hücrelerdir. İkinci mayoz tamamlandığında ve nükleer membranlar yeniden oluştuğunda her bir sekonder spermatositten, $1n$, 23 kromozom ve $1d$ DNA içeren iki adet spermatid oluşmuştur (13).

2.2.5.3. Spermatid Fazı

Spermatidlerin olgun sperme farklılaştığı fazdır. Bu fazda yüksek düzeyde bir yeniden şekillenme gerçekleşir. Spermiyogenez adı verilen bu şekillenme dört aşamadan oluşur (Şekil 2.9) (13).



Şekil 2-9: Spermiyogenezin aşamaları (13)

1-Golgi Fazı: Spermatid sitoplazmasındaki golgi kompleksinde kümeler şeklinde granüller bulunmasıyla karakterizedir. Glikoprotein bakımından zengin olan bu proakrozomal granüller, çekirdeğe komşu yerleşimli, zarla çevrili akrozomal vezikül adı verilen kese içinde toplanırlar. Faz boyunca genişleyen ve içeriği artan akrozomal vezikülün konumu gelişen spermin ön kutbunu belirler. Sitoplazmada jukstanükleer yerleşim gösteren sentrozom da akrozomal vezikülün aksi yönüne göç ederek, oluşmakta olan spermin arka kutbuna yerleşir. Kuyruk aksonemi oluşumu, sentrozomun sentriyolleri ile başlatılır (13).

2-Kep Fazı: Bu fazda akrozomal vezikül genişleyerek çekirdeğin ön yarısı üzerine yayılır. Akrozomal vezikülün adı bu yeni halinde akrozomal keptir. Akrozomal kebin altında yer alan çekirdek zarında, porlar yok olur, çekirdek içeriği de yoğunlaşır (13).

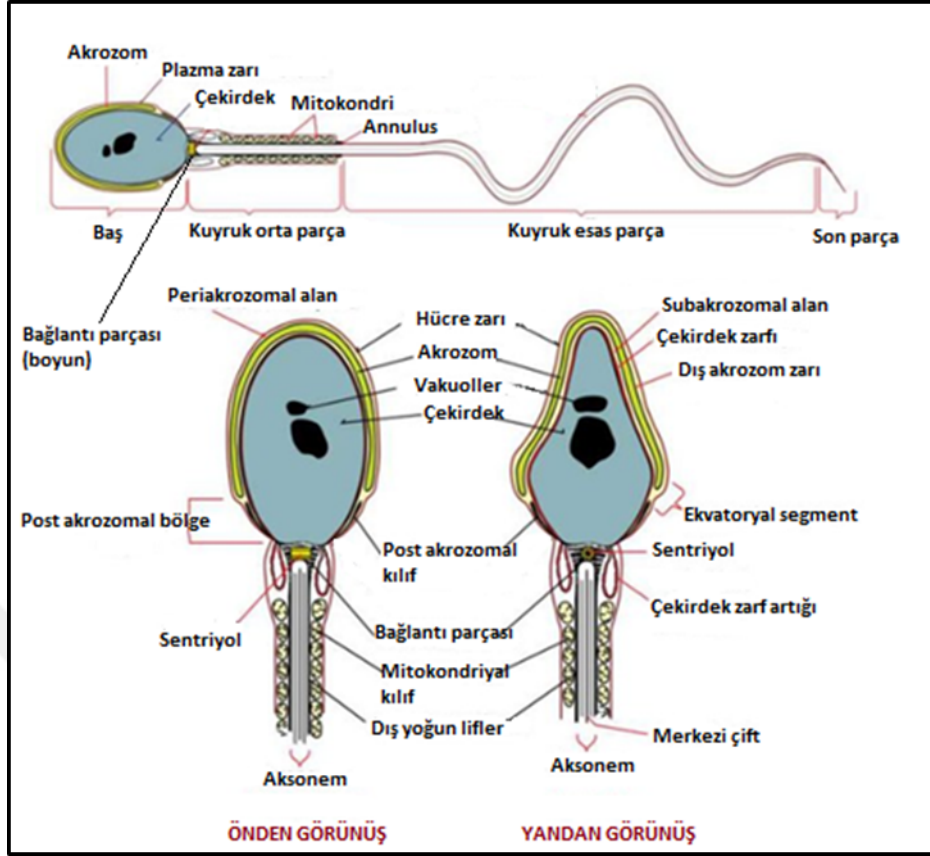
3-Akrozom Fazı: Bu fazda spermatidin başı Sertoli hücresi içine iyice gömülür. Böylece başın ön kısmı bazal laminaya yakın dururken, kuyruk da, seminifer tübül lümenine doğru uzanmış olur. Kondanse olan çekirdek yassılaşır ve uzar. Akrozomla çevrili nukleus, plazma membranının ön kısmına iyice yaklaşırken, spermatidin sitoplazması da, arka tarafa doğru gider. Sitoplazmadaki mikrotübüller, akrozomun arkasından, hücrenin arka kutbuna kadar uzanan, manşet adlı silindirik kılıfı oluştururlar. Plazma membranı, uzayan kuyruğu sararken, aksonemin etrafında fibröz bir kılıf oluşmuştur. Mitokondri de, kuyruğun çekirdeğe yakın bölümünde, aksonem etrafında bir sarmal oluşturacak şekilde konumlanarak, orta parçayı oluşturur. Kuyruğun mitokondrisiz bölgesi esas parçayı, en son kısmı da son parçayı oluşturmuştur (13).

4-Olgunlaşma Fazı: Bu fazda spermiyogenez tamamlanır. Sitoplazmanın fazla bölümleri sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek, olgun spermin küçük ince yapısı tamamlanmış olur.

Şekillenmesi tamamlanan spermatozoa, spermiyasyon adı verilen basamak ile seminifer tübül lümenine salınır (13).

2.3. Olgun Spermatozoanın Yapısı

Olgun bir insan spermi, yaklaşık olarak 60 mikrometre uzunluğundadır. Başlıca, baş, boyun ve kuyruktan oluşmuştur (Şekil 2.10) (22). Işık mikroskobu ile spermin, baş, kuyrukta biraz daha kalın olan orta parça ve daha ince olan esas parça ayırd edilebilmektedir. Boyun ise baş ve kuyruğu birbirine bağlayan küçük bir bölümdür (11,13).



Şekil 2-10: Olgun spermatozoonun yapısı (22)

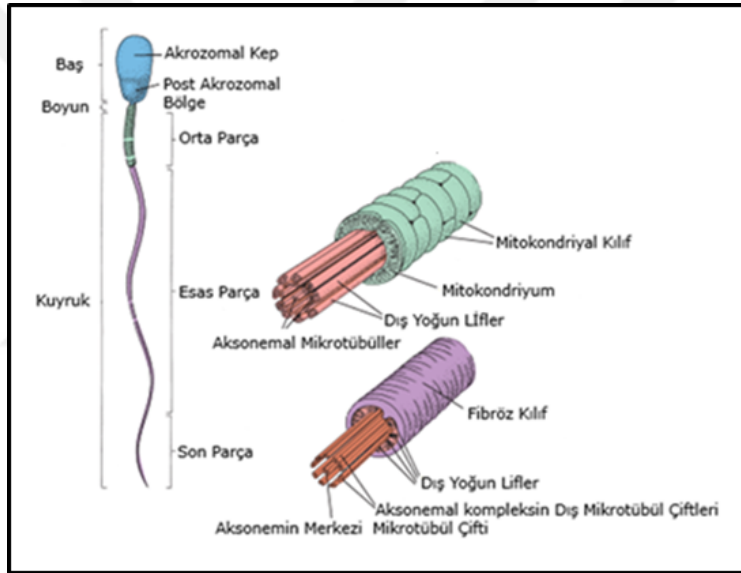
Yaklaşık olarak uzunluğu 4,5 μm , genişliği 3 μm ve kalınlığı da 1 μm olan baş, hafifçe yassılaştırmış ve kuyruktan uzak olan uca doğru hafif sivrileşmiş bir görünüme sahiptir (13).

Başa oldukça heterokromatik durumda bulunan çekirdek yerleşmiştir. Başta oluşturan çekirdeğin, üçte iki ön kısmını saran akrozom, hücre zarının altında yer alan akrozomal kılıf ile çevrelenmiştir. Başın üçte bir arka kısmı ise postakrozomal kılıfla sarılıdır (13,18). Akrozomal kep, tripsin benzeri proteazlar içeren bir bölgedir. Burada bulunan hiyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi proteazlar akrozomal enzimler olarak adlandırılır ve ovumun zona pellusidasının delinmesi işleminde görev alırlar (13).

Baş ve kuyruğu birleştiren boyun bölgesi, bağlantı parçası olarak da adlandırılır. Kısa bir bölge olan boyunda, spermin sentrozomu bulunur. Başa yakın olarak konumlanmış proksimal sentriyolün etrafı çizgili sütunlar adı verilen bağlantı parçası sütunlarıyla sarılmıştır. Kuyruğa yakın konumlanmış olan distal sentriyolün

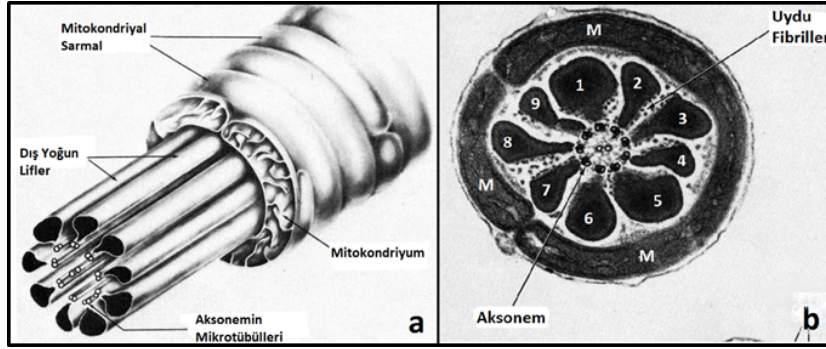
mikrotübülleri, başa yaklaştığı bölgede açılarak, iç kısımda tonoz olarak isimlendirilen bir yapı oluşturur. Böylece tipik sentriyol görünümü kaybolur ve atipik sentriyol olarak tanımlanabilen bir sentriyol yapısı oluşur. Distal sentriyolün başa uzak olan ucundan ise kuyruk aksonemi başlatılır (23).

Kuyruk spermin hareketini sağlayan parçadır ve üç bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.11) (13). Başa en yakın konumda yer alan ve yaklaşık olarak 7 µm uzunluğundaki ilk kuyruk bölgesi, orta parça olarak isimlendirilir. Kuyruğun en kalın bölgesini oluşturan bu bölgede en içte tüm kuyruk boyunca uzanan aksonem bulunur. Aksonemin hemen dışında keratin içerikli dokuz adet dış yoğun fibril yerleşmiştir (13).



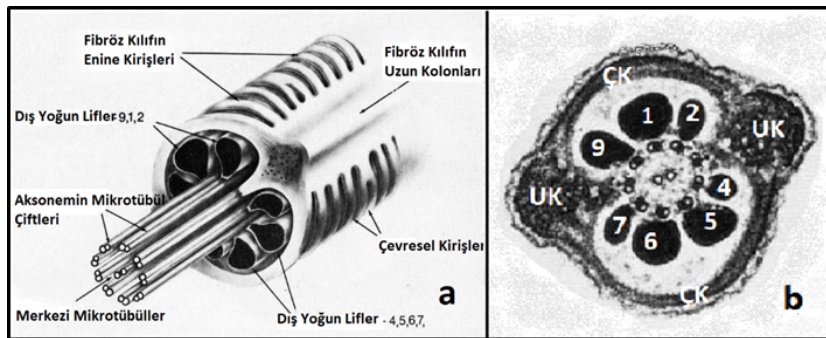
Şekil 2-11: Sperm kuyruğunun yapısı (13)

Spermin kuyruk enine kesitlerinin ultrastrüktürel görünümünde, büyüklük ve şekil olarak farklılıklar gösteren bu dokuz lifin üç tanesi genellikle diğer altısından daha büyükçedir. Daha büyük olan lifler 1, 5 ve 6 olarak numaralandırılır. Numaralandırma saat yönünde 1'den 9'a kadar gidilerek tamamlanır (Şekil 2.12) (23). Disülfid bağlarından zengin olan bu lifler, kuyruk hareketini güçlendirmektedir. Dış yoğun lifler arasındaki boşluklarda, değişken sayıda küçük uydu fibrillere rastlanmaktadır. Kuyruk orta parçanın en dışında, plazma membranının hemen altında, sperm hareketinden sorumlu olan mitokondriyal sarmal yer alır. Mitokondriyal sarmal, annulus adı verilen bir yapıyla sonlanır ve kuyruk bir sonraki bölümüyle devam eder (23).



Şekil 2-12: Kuyruk orta parça ince yapısı (23)

Kuyruğun ikinci bölümü olan esas parça yaklaşık 40 μm uzunluğundadır. En içte aksonem ve onu çevreleyen dış yoğun lifler burada da varlığını sürdürür. Esas parçanın en dışında bir fibröz kılıf yer almaktadır (13). Fibröz kılıf, dorsal ve ventral olarak uzanan uzun kolonlar ve çevresel kirişlerle oluşturulmuştur (Şekil 2.13) (23). Dış yoğun lifler kuyruk esas parçasının ilerleyen bölümlerinde azalarak kaybolur. Bu bölümde ilk kaybolanlar 3 ve 8 numaralı liflerdir. Bunların yerini alan uzun kolonlar, aksonemin merkezi mikrotübül çiftiyle aynı düzlemde bulunur. Bu yerleşim, çevresel kirişler arasındaki mesafenin azalıp artmasıyla sağlanan kuyruk vuruşlarının oluşmasına olanak tanır (23).



Şekil 2-13: Kuyruk Esas Parça ince yapısı (23)

Kuyruğun son parçası ise yaklaşık 5 μm 'lik bir bölgedir. Sadece aksonemin bulunduğu bu bölge ile kuyruk sonlanmaktadır (13).

yapılardır. Kuyruğun motoru olarak iş gören bu yapılar, ATP'deki kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye çevirerek hareketi sağlarlar (26).

2.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Sperm Analizi

Bikonveks lenslerin kullanıldığı ilk optik mikroskoplarla gerçekleştirilen hücre yapısı araştırmalarında, çeşitli türlere ait hareketli spermatozoonlar fark edilmiş ve bu hücreler 1677'de Antoni Van Leeuwenhoek tarafından "animacula" (mikroskopik hayvanlar) olarak adlandırılmıştır. Zaman içerisinde mikroskopların tasarımları ve çözme gücü geliştikçe gametler ve genital organlara ait dokuların yapısal özelliklerinin ayrıntılı olarak tanımlanması mümkün olmuştur. İlerleyen zamanda Elektron Mikroskobunun keşfiyle hücre ve organel düzeyindeki araştırmalar yeni bir boyut kazanmıştır (27).

Elektron mikroskobu, son seksen yılda hücrelerin ve dokuların ince yapılarının araştırılmasında çok değerli bir araç haline gelmiştir. Geçirimli (TEM) ve taramalı (SEM) olmak üzere iki çeşidi bulunan elektron mikroskobu, dokuların, hücrelerin ve organellerin yüzey ve iç yapılarını, ışık (IM) ve floresan mikroskobunun (FM) çözünürlüklerinin çok ötesinde, yüksek büyütmede araştırmaya olanak sağlamaktadır. Bu özellikleriyle gamet hücrelerinin yapısal incelemesinde elektron mikroskobu oldukça değerli bir yere sahiptir (28). Sperm hücresinde de baş yapısında bulunan akrozom, membran, boyun bölgesindeki yapılar, kuyruktaki mitokondri ve aksonem yapılarındaki ultrastrüktürel özellikler TEM ile kolayca tespit edilebilmektedir. TEM analizi, özellikle, çekirdeğin ince yapı morfolojisinin gözlemlenebilmesini sağlayarak, sperm kromatininde IM ile tespit edilemeyen anormalliklerin, kuyrukta aksonem yapısındaki bazı bozuklukların saptanmasında tek yöntemdir (29).

2.4.1. Spermin İnce Yapısal Anomalileri

Spermatozoa, üretim sürecinin çok hızla gerçekleşmesine bağlı olarak, yüksek oranda yapısal anomali sergileyen bir hücredir. Elektron mikroskopik sperm araştırmaları sonucunda iki ana tip ince yapı anomali saptanmıştır: Sistematik (monomorfik) ve sistematik olmayan (polimorfik) sperm defektleri. Sistematik sperm defektleri, aynı hastalığı taşıyan tüm hastaların spermatozoasında bulunan, genetik bir özelliğe dayanan, ailesel, belirgin bir anomaliden oluşmaktadır (9,30). Bu anomaliler, spermin baş, boyun ya da kuyruk bölgesini etkileyebilir. Yuvarlak başlı ve akrozomsuz spermatozoonlarla karakterize globozoospermi (31–33), miniakrozom (34) ve krater

kusuru (35), sperm başına ait sistematik anomali örnekleridir. Boyun bölgesi ve kuyruğa ait sistematik anomalilere ise, fibröz kılıf displazisi (DFS) (36,37), primer siliyer diskinezi (PCD) (38,39) ve bağlantı parçasının diğer yapısal kusurları örnek olabilir. Fibröz kılıf yokluğu ve boyun bölgesi anomalisinin birlikteliği ile karakterize bazı nadir kombine sistematik sperm defektlerinin tespitinde de TEM oldukça yararlı bir tekniktir (40).

Sistematik olmayan sperm anomalileri ise sistematik olanlara oranla çok daha sık görülür. Çeşitli enfeksiyonlar, hormonal dengesizlikler, varikosel, olumsuz yaşam koşulları gibi faktörlere bağlı olarak ortaya çıkarlar. Bu anomaliler, belirli bir terapi veya olumlu yaşam tarzı değişiklikleriyle tedavi edilebilmektedir. Sistematik olmayan defektler, sıklıkla, infertil erkeklerin spermalarında tespit edilmekle birlikte, fertil erkeklerin spermalarında da gözlenmektedirler. TEM analizi ile spermin, akrozom, kromatin, mitokondri, aksonem, dış yoğun fibril, fibröz kılıf ve plazma zarında yapılabilen ayrıntılı gözlemler tüm bu anomalilerin saptanabilmesini sağlamaktadır (41).

2.4.2. Sperm Baş Anomalileri

İnfertil erkeklerde sistematik olmayan sperm başı anomalileri yaygın olarak gözlemlenmektedir. Işık mikroskopik analiz, sperm sayısı ve hareketlilik ile ilgili bilgi sağlarken, ultrastrüktürel analiz, çekirdek ve kuyruğa ait özelliklerin değerlendirilmesine olanak tanır (9).

Çekirdeğin şekilsel olarak değerlendirilmesinde, baş içeriğinde çift ya da çok çekirdek bulunması önemli bir kriterdir. Bu defekte baş içersinde aralarında membranöz bir septum bulunan birden çok sayıda nukleus bulunmaktadır. Serum prolaktin düzeyi yüksek olan bireylerde bu anomalinin yüksek görülme sıklığı bildirilmiştir (42). Çekirdekteki en yaygın bozukluklar, kromatin paketlenmesindeki aksamalar ve nukleus içindeki vakuol görünümüdür (43). Çekirdek vakuollerinin kaynağına dair birkaç farklı görüş bulunmaktadır. Fekonia ve arkadaşları sperm vakuollerinin döllenme kusurları ile ilgili olduğunu ve TEM ile yaptıkları incelemeler sonucunda bu yapıları, membranöz malzemeye dolu nükleer girintiler olarak tanımladıklarını bildirmişlerdir (44). Kacem ve arkadaşları (2010), spermatozoa nükleer vakuollerinin çoğunun akrozomdan kaynaklandığını ileri sürmüştür (45). Gatimel ve arkadaşlarının (2013) bir çalışmasında ise, total globozoospermili iki erkekten alınmış

örneklerde vakuollerin akrozomal olmayan bir kökenden kaynaklandığı gösterilmiştir (46). Zhang ve arkadaşları (2012), spermlerinin tümünün vakuole sahip olduğunu gözlemledikleri bir olguda bu vakuollerin dört çeşit görüntü sergilediğini bildirmişlerdir (47). Spermatogenez sırasında spermatozoonun oldukça azalan sitoplazmasının bazen çekirdek içine doğru girerek orada kaldığı fikri de vakuol oluşumuna ait bir diğer görüştür. Bazı insan sperm ince yapı değerlendirmelerinde, çekirdekler içindeki vakuollerde, organeller ve membranlar gibi sitoplazmik yapılara rastlanmıştır (28,44,48,49). Ancak, bu nükleer sitoplazmanın oluşum mekanizmaları ve klinik etkileri henüz açıklanamamıştır (44).

TEM ile sperm analizi, kromatindeki kondensasyon derecesini ortaya koymada oldukça etkilidir. İncelenen sperm çekirdeklerinde farklı kromatin görüntüleri tespit edilmiştir (41). Çok iyi derecede kondense olmuş kromatin oldukça koyu renkli bir görüntü verirken, paketlenmedeki aksamalarla granüler yapı görüntüsü oluşmaya başlar. Kondensasyondaki aksama ne kadar fazlaysa, kromatinin koyu görüntüsü o ölçüde açılarak, granüler görünüm gittikçe belirginleşmektedir. Fertil erkeklerin küresel veya eliptik başlı spermelerinde de granüler kromatine sıkça rastlanabilir. Ancak infertil erkeklerde kondensasyon yetersizliğine sahip sperm oranları oldukça fazladır (50).

TEM ile tespit edilebilen sperm baş defektlerinden biri de akrozomdaki anomalilerdir. Akrozom içeriğindeki azalma, artma, düzensiz akrozom ya da reaksiyona uğramış akrozom görüntüleri sperm ince yapı araştırmalarında kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Akrozom biyogenezi sırasında Golgi aparatından kaynaklanan veziküllerdeki anormallikler, normal olmayan akrozom oluşumlarına yol açabilir (51). Globozoospermi olgularında, spermin akrozomsuz oluşu da yine TEM ile kolaylıkla gözlemlenebilir (31). Bu olgularda, akrozomsuz yuvarlak baş görünümüne, anormal kondensasyonlu kromatin, artmış DNA fragmentasyonu ve anopleidi de eşlik edebilmektedir (32). Böyle bir spermin normal süreçle oositi döllemesi ihtimal dışı olacağından gebeliğin sağlanması için ICSI, IMSI ve kalsiyum-iyonofor gibi prosedürlere ihtiyaç duyulur (52,53). Bazı mutasyonların da eşlik ettiği globozoospermi olgularında tablo daha da ağırlaşmaktadır. Karaca ve arkadaşları 2014'te, bir homozigot SPATA16 mutasyonunun eşlik ettiği bir globozoospermi olgusunda gebelik sağlandığını bildirmişlerdir (54). Yakın tarihli yayınlarda 'kısmi globozoospermi'

tanımından bahsedilmektedir. Toplam sperm popülasyonunun yaklaşık %50'sinde yuvarlak baş görüntüsünün saptanmasında bu terim kullanılmaya başlanmıştır (55).

Baccetti ve arkadaşları, 1989 yılında yayınladıkları çalışmalarında, krater kusuru olarak tanımladıkları sistematik sperm defektini TEM incelemesi ile saptadıklarını bildirmişlerdir. Akrozomal hipoplazi (miniakrozom), nadir görülen sistematik bir defektir. Bu defektin tanısı da ancak TEM ile konulabilmektedir (34).

Sperm başının TEM ile incelenmesiyle yukarıdakilere ek olarak, başı çevreleyen membran bütünlüğü, çekirdek cebi görüntüsü gibi yapıların tespiti de mümkün olmaktadır.

2.4.3. Sperm Boyun Anomalileri

Boyun, spermin baş ve kuyruğunu birbirine bağlayan parçadır. Bağlantı parçası olarak da isimlendirilir. Bu bölgede, embriyo gelişiminde kilit role sahip bir organel olan, sentriyol bulunmaktadır. Bağlantı parçasına ait farklı derecelerde anomaliler tarif edilmiştir. Başsız spermatozoa, bağlantının sağlam olmayışıyla ilişkilendirilmiştir. Boyun bölgesinde sıkça karşılaşılan bozuklukların başında sitoplazmik artık gelmektedir (56). Sitoplazmik artık, fertil erkeklerin spermalarında düşük oranlarda saptanırken, infertil erkeklerin spermalarında görülme oranı %100'lere kadar çıkabilmektedir. Bükük başlı ve kuyruksuz spermaların da boyun bölgesi defekti taşıdığı gösterilmiştir. Boyun bölgesine ait bir diğer anomali, baş ve kuyruğun yanlış hizalanması sonucu ortaya çıkan implantasyon fossasında kaymadır. Ender olarak rastlanan çift boyun, anormal yapıda bazal plak gibi oluşumlar da boyunda rastlanması muhtemel olan bozukluklar arasında sayılabilir (9,57,58).

Boyun bölgesinin en önemli yapısı olan sentrozomdaki işlevsel bozukluklarının boyun anomalilerine eşlik edeceği durumlarda, sperm aster oluşumunda veya embriyonik bölünmelerde aksamalar oluşabilmektedir (6,59–61).

2.4.4. Sperm Kuyruk Anomalileri

Kuyruk Orta Parça Anomalileri

İnsan sperminin kuyruk orta parçasında bulunan mitokondri, normal sperm hareketi için gerekli olan enerji üretiminden sorumludur. Mitokondriyal sarmaldaki

düzensizlikler TEM ile gözlemlenebilmektedir. Kuyruk orta parçasının enine kesitleri mitokondriyum düzensizliklerini ortaya koyarken, boyuna kesitler, sarmalın uzunluğu hakkında bilgi verir. Mitokondriyal sarmalın normalden uzun ya da kısa oluşu harekette bozulmalara yol açmaktadır. TEM analizi ile tespit edilebilen mitokondriyal kusurlar, açıklanamayan astenozoospermi olgularında aradaki ilişkiyi göstermede önem teşkil etmektedir. TEM incelemesi, orta parçadaki mitokondri yokluğunun teşhisini de sağlamaktadır. DFS vakalarında mitokondrisiz spermlere rastlanmaktadır (62).

Orta parçada mitokondrinin iç kısmında ve aksonemin etrafına yerleşmiş olan dış yoğun liflerde fazlalık, eksiklik ya da düzensizlik şeklinde kusurlara rastlanabilir. Dış yoğun liflerin iç kısmında yerleşmiş olan aksonemin “9+2” yapısında düzensizlikler oluşabilir. Ortadaki bir çift mikrotübülün bulunmaması ile “9+0” şeklinde anormal aksonem yapısı ortaya çıkmaktadır. Ayrıca ortadaki çiftin etrafında yerleşmiş olan mikrotübüllerde eksiklik, fazlalık, düzensiz yerleşim kusurları da TEM analiziyle ortaya konabilir. Bir diğer önemli kusur da aksonemin çevresel mikrotübüllerinde bulunması gereken dinein kollarının kısmen ya da tümünden eksikliğidir. Tüm bu kusurlar hareketi olumsuz yönde etkilemektedirler (62,63).

Kuyruk Esas Parça Anomalileri

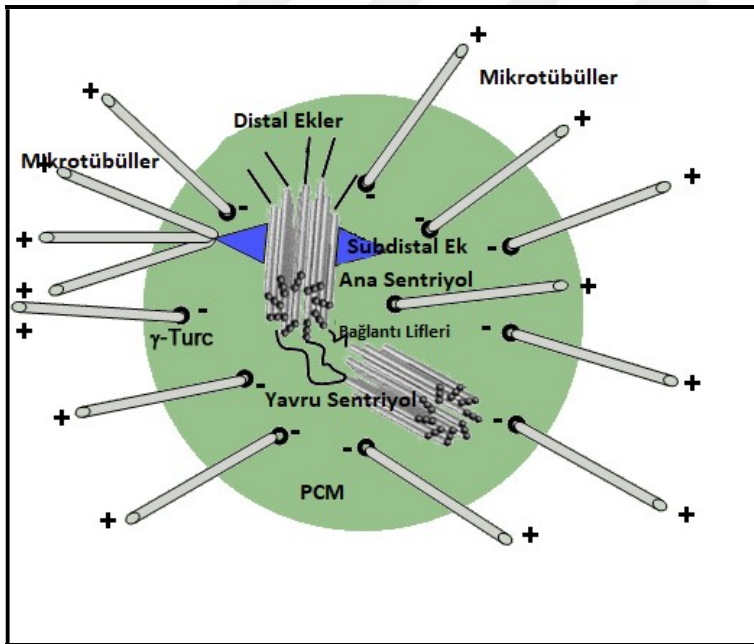
Esas parça boyunca devam eden fibröz kılıftaki düzensizlikler ya da dış yoğun liflerin anormallikleri bulunabilecek kusurlar içinde sayılabilir. Aksonemde, yine, bir önceki bölümde sayılan aksamalar esas parçada da izlenebilmektedir (36,41,63).

Tüm bu bahsedilen sperm ince yapı defektleri genellikle, IM ile farkedilememektedir. Özellikle alışılmış testler ile açıklanamayan infertilite olgularında TEM analizi, sperm ince yapısındaki yaygın bir bozukluğun atlanmaması açısından altın standart olarak önemini korumaktadır (28,29,62,64).

2.5. Sentrozom

Sentrozom, temel olarak hücrenin mikrotübül organize edici merkezi (MTOC) olarak tanımlanan, yaklaşık 1 µm boyutunda, zarsız bir organeldir (65). Genellikle hücre çekirdeğine yakın yerleşim göstermektedir. Yapısal olarak, birbirlerine dik açıyla konumlanmış bir çift sentriyol ve onları çevreleyen perisentriyoler materyalden oluşmuştur (Şekil 2.15) (20). Tanımlamada hücrenin mikrotübül organize edici merkezi şeklinde tarif edilseler de, hücre biyolojisindeki önemleri bunun çok daha ötesindedir

(65). Silyum ve flagellum yapılarının organizasyonundan, hücre polaritesinin oluşturulması ve hücre döngüsünün düzenlenmesine kadar pek çok dinamikte rol alan, karmaşık bir organeldir (66). Ana işlevleri olan mikrotübül organizasyonu, hücrenin hareketi, polaritesi, şeklinin korunması, veziküllerin taşınması, sayısız sinyal molekülünün hedeflenmesi gibi birçok hücresel aktiviteyi kolaylaştırır (65). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, kök hücrelerin asimetric bölünmeleri (67,68), immünolojik sinaps oluşumu (69), DNA hasar kontrolü (70) gibi farklı mekanizmalarda sentrozomun kritik roller üstlendiğini ortaya koymaktadır (67). Her geçen gün yeni hücre fonksiyonları ile ilişkilendirilen sentrozomlar, hücre dinamiklerinde iki temel işlev ile öne çıkarlar. Bu işlevlerin ilki, ökaryotların atalarından beri var olan ve hücresel duyu ya da hareket komponenti olarak görev yapan silyumu oluşturmaktır (silyogenez). İkincisi ise, hayvan hücrelerine ait bir özellik olarak bölünmede görev almaktır (71).



Şekil 2-15: Sentrozomun şematik görünümü (72)

19. yy sonlarında, Beneden, Neyt ve Boveri gibi araştırmacılarla başlayan sentrozom çalışmaları, yaklaşık 130 yıldır devam etmektedir (5,6,73,74). Son yirmi yılda sentrozom fonksiyonlarında kaydedilen önemli keşifler bu organelle olan ilgiyi

arttırmıştır. Sentrozomun hücre bölünmesi ve döngüsündeki çok fonksiyonlu rolü, detaylı moleküler çalışmalar ve gelişmiş görüntüleme yöntemleri ile ayrıntılı olarak aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Somatik hücrelerde sentrozomun yapı, sayı ya da protein bileşimlerindeki kusurlar, kanser ve mikrosefaliyi de kapsayan pekçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (75). Bu tür hastalıklar için geliştirilecek yeni tedavi stratejileri, sentrozom biyolojilerini hedeflemektedir (76,77).

Sentrozomun merkezinde bulunan her bir sentriyol, çark şeklinde özel bir düzenlenim gösteren, dokuz adet, üçlü mikrotübül grubu içerir. Sentriyolün, merkezde mikrotübül barındırmayan bu özel düzenlenim şekli, “9+0 yapısı” olarak tanımlanır (65). Çark görüntüsünü oluşturan mikrotübül üçlüleri belli bir açıyla yerleşmişlerdir. Herbir üçlüyü A, B, ve C mikrotüpçükleri oluşturmaktadır. Sentriyolde mikrotüpçükler, bir kararlı uç ve bir uzama ucu ile, polarize olmaktadır. Sentriyolün kararlı ucuna kök, silyumun uzadığı bölgeye uç adı verilir. Uç uzayarak, sentriyol mikrotüplerinin devamı niteliğinde olan aksonemi (siliyer çekirdeği) oluşturur (78).

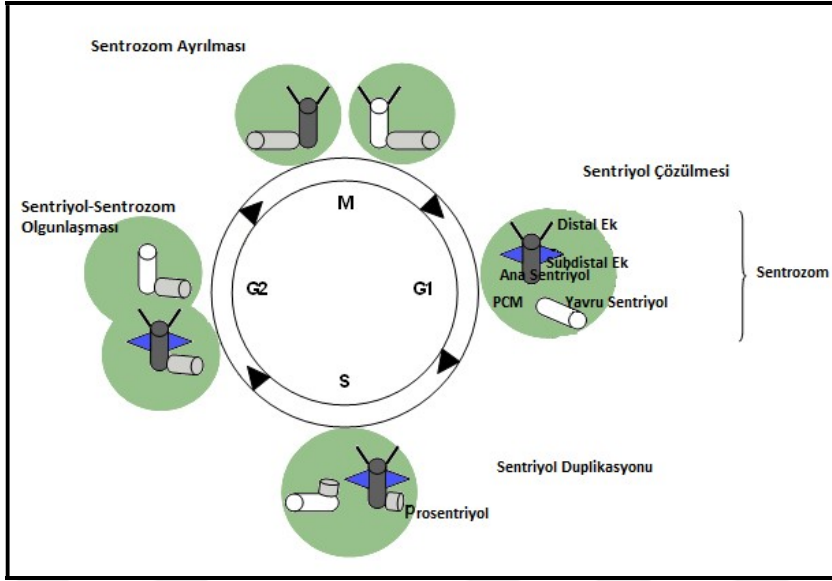
Sentrozomun merkezini oluşturan sentriyol çiftinin etrafını, perisentriyolar materyal olarak isimlendirilen ve elektron-yoğun granüllerden oluşmuş matris sarmıştır (78,79). PCM, γ -tubulin halka kompleksleri (γ -TuRC'ler), perisentrin, sentrin ve kalsiyum duyarlı lifler gibi birçok proteini barındırır (73,80–82). Hücre iskeletinin oluşumuna ve organizasyonuna yardımcı olan PCM, astral mikrotübüllerin tutturulduğu yerdir. Eksi uçlarıyla PCM'ye tutunan mikrotübüllerin uzaması, tubulin alt birimlerinin ilavesiyle gerçekleştirilir (83,84). Zarsız bir organel olan sentrozomun üç boyutlu mimarisi içeriğindeki proteinlerin spesifik etkileşimleriyle korunmaktadır (85).

200 nm çap ve 500 nm uzunluğuyla, yaklaşık olarak, küçük bakterilerin yarısı boyutlarında olan sentriyol, hücre içindeki büyük yapılardan biridir (86). Sentrozomu oluşturan sentriyol çiftlerinden birisi, diğerine göre daha yaşlıdır ve ana sentriyol olarak isimlendirilir. Daha genç olan sentriyol ise yavru sentriyoldür. Yeni oluşan bir sentriyolün ana sentriyol olabilmesine kadar yaklaşık iki hücre siklusunu kapsayan bir olgunlaşma süreci gerekmektedir (78). Ana ve yavru sentriyoller arasında küçük yapısal farklılıklar bulunmaktadır. Bir ana sentriyolün duvarında, distal ve subdistal ekler olarak adlandırılan yapılar yer alır. Subdistal ekler silyumun yerleşimine yardımcı

olurken, distal ekler, sentriyolü hücre zarına bağlar ve veziküler trafiğe aracılık ederler. Yavru sentriyol, bu ek yapıları barındırmaz (87).

Evrimsel süreç boyunca, yapıları yüksek düzeyde korunan sentriyollerin, hücre içindeki sayıları da, tıpkı, genetik materyal miktarının sabit tutulmasındaki gibi, sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (66,88,89). Sayının korunması, hücre siklusu sürecinde, düzenli olarak gerçekleştirilen sentriyol duplikasyonu ile sağlanır. G1 fazında standart bir hücrede iki sentriyol bulunurken, S fazında, yeni sentriyol oluşumu başlar. Bölünmeye hazırlanan bir hücrede DNA'nın S fazında duplike olması gibi, sentrozom oluşumu da siklus boyunca sadece bir kez, bu fazda gerçekleştirilir. Başlangıçta bir çift olan sentriyol sayısının iki çifte çıkarıldığı bu süreç "sentriyol duplikasyonu" olarak adlandırılır. Sentriyol duplikasyonunun sonunda her bir sentriyol çifti bir eski, bir de yeni sentriyol içerir. Bu çiftlerden her biri, hücre bölünmesi sırasında farklı iğ kutuplarını inşa ederler. Böylece, bölünme tamamlandığında oluşan iki yavru hücrenin her birine birer çift sentriyol sağlanmış olur (78).

Sentriyol duplikasyonu, S fazında ana ve yavru sentriyollerin ortogonal düzenlerini kaybedip, birbirlerinden ayrılma ile başlar (90). Bu ayrılma sentriyollerin proksimal uçları arasında bulunan zayıf bağlarla belli bir sınırdan tutulur. Yeni sentriyol formasyonu, ayrılan sentriyollerin her birinin yanı başında, duvarına bitişik olarak gerçekleşir. Yeni oluşmaya başlayan bu sentriyoller prosentriyol olarak isimlendirilir. S ve G2 fazı boyunca prosentriyol uzaması devam eder (Şekil 2.16) (72). Sentriyoller ile prosentriyoller, sıkı bir bağla bir arada tutulurlar. Geç mitoz kadar bu bağ eski ve yeni sentriyollerini bir arada tutmaya devam eder. G2'nin geç evresinde zayıf bağların çözülmesiyle, duplikasyonunu tamamlayan sentrozomlar iğ kutuplarına göç ederler (91).



Şekil 2-16: Sentrozom döngüsü ve sentriyol duplikasyonu (72)

Sentryol duplikasyonunda evrimsel olarak korunan bir dizi protein görev almaktadır (92). Bu süreçte yeni sentriyollerin oluşumu, PLK1 ve CDK2 gibi hücre döngüsü kinazları ile düzenlenir (93,94). Yeni oluşum, PCM proteinlerinden SPD2 ve CEP192 tarafından başlatılır. Duplikasyonunun ana düzenleyicisi olarak kabul edilen PLK4, Sas-5, Ana2 ve STIL'i fosforilleyerek SAS-6 ile birlikte sentriyol çarkının özünü oluşturur. Çarkın periferi Bld10 ve CEP135 ile oluşturulurken, Sas-4 ve CPAP sentriyolün mikrotübül duvarının oluşumuna yardım eder. Lümeni dolduran yapılar ise, CETN1-2, POC1B ve POC5 proteinleridir (78,95,96).

Sentryol dinamikleri bazı hücrelerde farklı karakteristik özellikler sergilemektedir. Örneğin, tüm çok hücreli canlılarda ya da bir canlının her hücresinde sentriyol bulunmayabilir. Sitotoksik T lenfositleri gibi bazı akyuvarlar G1 fazında diğer hücreler gibi silyum oluşturmazlar (97). Buna karşın titrektüylü epitel hücreleri çok sayıda silyum oluşturmaktadırlar. Özel bir yapılanma gösteren bu tip hücrelerde, her ana sentriyol başına bir yavru sentriyol yerine, daha fazlası üretilir. Bu özel yapılar "deuterosome" olarak adlandırılmaktadır (98). Kas hücreleri ve yumurta hücresi gibi bazı hücrelerde de sentriyoller elimine edilirler. Son derece özelleşmiş bir hücre olan insan spermatozoasında ise, boyun bölgesinde yerleşmiş olan sentriyollerden birisi atipik özellikler sergilemektedir (78).

2.6. Sentrin

Sentrin, kalsiyum bağlayıcı proteinler ailesine ait, 20 KDa ağırlığında, asidik bir proteindir. Kaltraktin olarak da bilinen sentrin, kalsiyum bağlayıcı bir diğer protein olan kalmodulin ile %50 özdeşlik gösterir (99,100). Tek hücreli organizmalardan (101), memelilere kadar tüm ökaryotik hücrelerde yer alan bu proteinler, evrimsel süreçte yüksek oranda korunmuşlardır (102). Kalmodulin ve diğer kalsiyum bağlayıcı proteinler gibi parvalbümin süper ailesine ait olan sentrinler, genel olarak sentrozom ve onunla ilişkili olan yapılarda yerleşmişlerdir (103).

Sentrin ile ilgili çalışmalar seksenli yıllarda, Salisbury ve arkadaşlarının bir çalışmalarında Tetraselmis Sitriata alginde, kuyruğu sitoplazmaya bağlayan kökleri izole etmeleriyle başlamıştır (104). İzole ettikleri bu proteini sentrin olarak isimlendirmişlerdir. Sonraki yıllarda sentrine karşı ürettikleri antikorlarla çeşitli organizma formlarında uyguladıkları işaretlemelerde, sentrinin, incelenen tüm hücrelerde sentrozom ve flagellar aparatlarda lokalize olduğunu bildirmişlerdir (105). Sentrozom ve benzeri yapıların, hücre dinamikleri ve hücre bölünmesindeki önemli rolleri, içerdikleri proteinler ve özellikle sentrin ile ilgili araştırmaların yoğunlaşmasına yol açmıştır. Ancak hala sentrin işlevi ile ilgili aydınlatılmaya ihtiyaç duyulan noktalar bulunmaktadır.

Sentrin, hem perisentriyolar materyalde, hem de sentriyolde lokalize olan bir sentrozom proteinidir (106–108). Yirminci yüzyılın sonlarında sentrin fonksiyonu ile ilgili bilgiler son derece kısıtlı olmasına karşın, son otuz yılda, mayalar ve Klamidyalarda sentrin mutasyonu üzerine yürütülen araştırmalar, sentrozom duplikasyonu ve sonrasındaki ayrılmada üstlendiği esas rolü gözler önüne sermektedir (109–111).

İnsan genomu sentrinin sadece üç izoformunu içerirken (CETN1–3), kemirgenlerde, dört farklı gen tarafından kodlanan dört ayrı izoform (CETN1–4) ifade edilmektedir (100,112). İnsan sentrin DNA sekansları, *Xenopus* (% 81), *Chlamydomonas* (% 70), *Naegleria* (% 65), *Atriplex* (% 56) *Saccharomyces cerevisiae* (% 52) ile benzerlikler göstermektedir (107).

Memeli sperm hücrelerinin boyun bölgelerinde yüksek oranda sentrin ekspresyonunun izlenmesi, araştırmaların testis dokusunda yoğunlaşmasına yol açmıştır (105). Gametlere yönelik sentrin çalışmaları sonucunda, bazı araştırmacılar, proteinin

ekspresyon düzeyindeki yetersizliklerin, infertilite ile ilişkili olabileceğini savunmuşlardır (113).

İnsanda spermatogenez sırasında sentrin, erken evredeki spermatidlerde akrozom yapısının karşısında, çekirdeğin etrafında yoğun olarak gözlenmiştir. Uzamış spermatidlerde, olgun testis spermatozoasında ve ejaküle edilmiş spermelerde sentrin ekspresyonu sürmektedir (114).

1999'da Manandhar ve arkadaşları tarafından, fare spermiyogenezi sürecinde sentriyol ve sentrin dejenerasyonunun incelendiği bir çalışmada, spermiyasyon sonrası epididime gelen spermelerin burada olgunlaşmaya devam ettiği ve sentrin kaybının da epididimde gerçekleştiği bildirilmiştir (115). Aynı ekipteki araştırmacıların yer aldığı daha geliştirilmiş yeni bir çalışma ile, GFP-CETN2 uygulanan farelerde, epididiminin üst bölgesinde GFP-CETN2 ifadesiyle sentriyol çifti gözlenmiş, kanal boyunca ilerledikçe, önce DS'nin, sonra da spermin kauda'ya geçtiği sırada, PS'nin dejenerasyonu gösterilmiştir. Duktus deferense gelindiğinde, fare spermelerinde GFP-CETN2 immünoreaktivitesi artık gözlenmemektedir. Bu çalışmaya göre, sperm, testislerde üretildikten sonra epididimin kaput bölgesine geldiğinde dölleme yeteneğine sahip değildir. Daha sonra, korpusta ilerler ve kauda sonuna ulaştığında, hem motilite hem de dölleme yeteneğini kazanır. Bu bulgularla, yeni bir “testis sonrası sperm olgunlaşması” veya “epididim olgunlaşması süreci” önerilmiştir (116). Başka bir çalışmada, primat spermatogenez sürecinde sentrozomlar incelenmiş ve sentrin ekspresyonunun ejakulat spermatozoalarının çoğunda çift spot şeklinde gözlemlendiği bildirilmiştir (117).

Chemes ve Rawe, 2003'te yayınladıkları çalışmalarında, fibröz kılıf displazisi (DFS) tanısı almış infertil hasta spermelerinde, sentrin ekspresyonunun, fertil bireylere göre düşük olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca DFS tanılı hasta spermelerinde, yüksek oranda ektopik yerleşimli sentrin varlığı, IF işaretleme yöntemi ile gösterilmiştir (9).

Çeşitli memeli türlerinde spermatogenez aşamalarında ve olgun spermatozoada gerçekleştirilen araştırmalarla açıklanmaya çalışılan sentrin dinamikleri, insan spermatogenez ve zigottaki incelemelerle sürdürülmüştür. Tachibana ve arkadaşlarının bir çalışmasında, insan tesa örneklerinde sentrin ekspresyonu incelenmiş ve erken spermatid evresinden olgun spermatozoa oluşumuna kadar tüm evrelerde sentrinin varlığı gösterilmiştir (114). Manandhar ve arkadaşları, bir çalışmada, domuz

zigotunda ve blastosist aşamasına kadar gelişen embriyosunda sentrin ekspresyonunun olmadığını, ancak blastosist aşamasından itibaren pluripotent gelişim için gerekli olan sentrinin tekrar sentezlendiğini gözlemlediklerini ve zigottaki sentrinin muhtemelen ubiquitin-proteozom yoluyla yıkıldığını bildirmişlerdir (7). 2008’de Hinduja ve arkadaşlarının bir çalışmada, oligoastenozoospermi hastalarının spermalarında ELISA yöntemiyle gerçekleştirilen ölçümlerde, sentrin seviyeleri, fertil donör spermelerine göre, anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ayrıca araştırmacılar, sentrin seviyeleri ve bu hastalarda uygulanan ICSI protokolleri sonuçları arasında korelasyon olduğunu bildirmişlerdir (118). Ancak ELISA ile ejakülat örneğinin tümünün incelenmiş olması, sonuçların spesifik olarak sperm sentrin seviyelerini göstermesi noktasında soru işaretleri oluşturmaktadır.

Sentrin üzerindeki araştırmalar ilerledikçe, proteinin hücre dinamiklerindeki rolü de açıklık kazanmaya başlamıştır. Tiago ve arkadaşlarının 2012’deki bir çalışmalarında, sentrinin sentrozom duplikasyonunda rol almadığı, ilginç olarak DNA onarımında rolü olduğuna dair sonuçlar ileri sürülmektedir (119). Rekombinant DNA teknolojisi ile sentrin 1 geninin (CETN1) silindiği farelerle yapılan bir çalışma, spermiyogenezde ve spermatid olgunlaşmasının geç aşamalarında CETN1’in önemli bir rolü olduğunu doğrulamaktadır. Bu çalışmada, CETN1 (-) erkek fareler infertil olarak saptanırken, CETN1 (-) dişi ve CETN1 (+) erkek fare fertilizasyonunda sorun olmadığı gözlenmiştir. Araştırmacılar, CETN1 (-) erkek farelerde, spermiyogenezin geç olgunlaşma fazında kuyrukların ciddi oranda bozulduğunu ve neredeyse hiç canlı sperm oluşmadığını bildirmişlerdir (113).

Moretti ve arkadaşları, DFS ve bağlantı parçası anomalisinin her ikisini de barındıran bir hastanın spermeleriyle gerçekleştirdikleri ve sentriyolün fertilizasyondaki rolünü sentrin 1 üzerinden değerlendirmeyi amaçladıkları bir araştırmalarında, sentrin ekspresyon düzeyini düşük bulurken, spermelerin yaklaşık yarısında farklı lokalizasyonda işaretlenme saptamışlardır (120). Yine aynı grubun başka bir çalışmada, sistematik sperm kuyruğu defekti sergileyen üç vakada, sentrin ve ICSI başarı oranları karşılaştırılmış ve bu vakalarda uygulanan ICSI sonuçlarında, sadece sentrin düzeylerinin değil, kuyruk kusurlarının da etkili olabileceği ileri sürülmüştür (121).

2.7. Speriolin

Mitozun temel mekanizmaları evrimsel süreçte oldukça iyi biçimde korunmuştur. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları, mitozun düzenli ilerleyişini sağlamaktadır. Mitozun kontrolünde görevli moleküllerden birisi, anafaz uyarıcı komplekstir (APC) (122). APC'nin kontrol noktalarında işlevsel olabilmesi, aktive edilmesiyle mümkün olur. genel olarak hücre döngüsünü düzenleyen siklin bağımlı kinazlardan (CDK) olan, CDK20, APC aktivasyonu için gerekli olan moleküldür. Mitozun erken evrelerinde aktifleşen CDK20, 167 amino asit içeren N-terminal bölgesi ile sentrozomlarla etkileşir (123).

Mitoz sürecinde rol alan CDK20'nin mayotik bölünme geçiren hücrelerdeki varlığı ve mayoz 1'in profazındaki spermatosit sitoplazmasında kümeleştiğinin saptanması, mayozda da rol aldığının göstergesidir. Bu ifade modeli, CDK20'nin mitoz ve mayozda benzer amaçlara hizmet ettiğini göstermektedir (124,125).

2004'te, Goto ve Eddy tarafından, spermatogenez sürecinde, CDK20'nin WD7 domainine bağlanan ve APC aktivasyonunu ile ilişkilendirilen bir protein tanımlanmıştır. Speriolin olarak isimlendirilen bu yeni protein, spermatogenik hücelere özgüdür ve mayoz sırasında erkek germ hücrelerinde WD7 domainine bağlanarak, CDK20'yi düzenlemektedir (125).

Speriolin, 591 amino asitten oluşur ve 62 kDa ağırlığındadır. Sentriyollerde, perisentrin ile aynı konumda yer alır. Elektron mikroskopik immünolojik işaretlemelerle insan sperminde intakt proksimal sentriyölü çevrelediği, düzensiz distal sentriyölün periferinde lokalize olduğu saptanmıştır. Farelerde yapılan çalışmalarda iki hücreli embriyoda varlığı gösterilmiştir. Bu özelliği ile embriyoya taşındığı ilk olarak tespit edilmiş sperm sentrozom proteini (8,125).

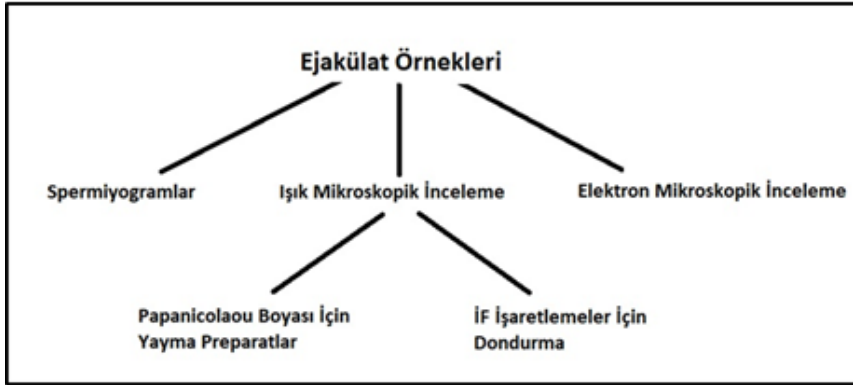
Speriolini kodlayan gen SPATC1 olarak adlandırılır ve 8. kromozomda bulunur. Zamanla ilerleyen çalışmalar proteinden çok, gen üzerine yoğunlaşmaktadır (8,125).

İnsan ve kemirgen spermatozoalarında gerçekleştirilen araştırmalarla, sentriyollerde lokalize olduğu gösterilen speriolin, fare zigotunun ilk bölünmesiyle oluşan iki hücreli embriyoda da saptanmıştır. Embriyoda ekspresyonu gösterilmiş ilk sentrozom proteini olan speriolinin, erken embriyonik gelişim bozukluklarıyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (8).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Üremeye yardımcı tedaviler merkezlerine (ÜYTE) başvurmuş ve yinelenen ICSI uygulamaları sonucunda, embriyolarında yüksek oranda anormal bölünme görüntüsü izlenmiş olan çiftler çalışmaya dahil edilmiştir. Bu çiftlerin erkek partnerlerinden, en az üç günlük cinsel perhiz sonrasında, masturbasyon yoluyla ejakülat sperm örnekleri toplanmıştır. Laboratuvar ortamında bekletilerek likefiye olmaları sağlanan örnekler, spermiyogramın ardından ışık ve elektron mikroskopik incelemelerin gerçekleştirilmesi için ikiye ayrılmıştır (Şekil 3.1). Her örneğin ışık mikroskopik inceleme için ayrılan birinci bölümünün az bir kısmıyla, lam üzerine yapılan yaymalar oda ortamında kurutulduktan hemen sonra soğutulmuş methanol kullanılarak 10 dakika süre ile tespit edilmiştir. Örneğin birinci bölümünün kalan kısmı, sentrozom proteinlerinin ifadesinin değerlendirileceği immünofloresan işaretlemeleri gerçekleştirmek üzere dondurulmuştur. Ejakülat örneklerinin, TEM incelemesi için ayrılan ikinci bölümleri ise santrifüjlendikten sonra tespit edilmiştir.



Şekil 3-1: Örneklerin ayrılması

Çalışmaya dahil edilen 10 hasta ve kontrol olarak, fertil erkeklerden alınan sperm örneklerinin tümüne aynı işlemler uygulanmıştır. Her denek çalışma hakkında bilgilendirilerek, aydınlatılmış onamları alınmıştır. Çalışmamız, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (İ.Ü. İnsan Etik Kurulu 27/12/2013 tarih ve 2013/789/22 sayılı kararı).

3.2. Işık Mikroskopik İnceleme

Işık mikroskopik inceleme için örnekler için iki tür boyama prosedürü uygulanmıştır.

- 1- Morfolojik İnceleme için, Papanicolou boyası.
- 2- Sentrozom proteinlerinden sentrin ve speriolin için immünofloresan boyama.

3.2.1. Papanicolaou Boyası

Lamlara yayma şeklinde hazırlanan preparatlar soğuk metanol ile fiks edilmiş ve aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

1. % 80 etanol 30 saniye
2. % 50 etanol 30 saniye
3. Saf su 30 saniye
4. Harris hematoxilen 4 dakika
5. Saf su 30 saniye
6. Asidik etanol (lam 4–8 kez batırılarak)
7. Akan musluk suyu altında 5 dakika
8. % 50 Etanol 30 saniye
9. % 80 Etanol 30 saniye
10. % 95 Etanol en az 15 dakika
11. Oranj G-6 boyası 1 dakika
12. % 95 Etanol 30 saniye
13. % 95 Etanol 30 saniye
14. % 95 Etanol 30 saniye
15. EA-50 yeşili 1 dakika
16. % 95 Etanol 30 saniye
17. % 95 Etanol 30 saniye
18. % 100 Etanol 15 saniye

19. % 100 Etanol 15 saniye

20. Toluol 5 dakika

21. Toluol 5 dakika

22. Toluol 15 dakika

23. Entellan ve lamelle kapama (11)

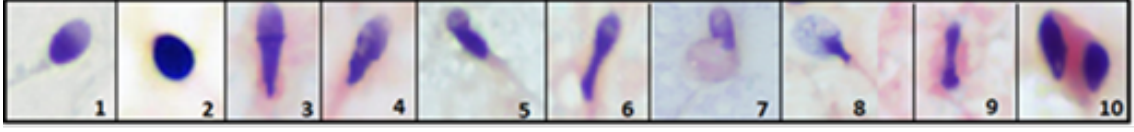
Boyanmış preparatlarda her denek için 200 sperm Olympus BX61 Işık Mikroskobunda, 100X immersiyon objektifi kullanılarak incelenmiştir. Değerlendirmelerin gerçekleştirilmesinde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Laboratuvar El Kitabı 5. Basımında yer alan kriterler temel alınmıştır. İncelemede, baş anomalileri, boyun ve kuyruk orta parça anomalileri (boyun ve orta parça birlikte değerlendirilmiştir), kuyruk esas parça anomalileri ve sitoplazmik artık (sperm başı büyüklüğünün üçte birinden daha fazla hacimli olanlar) görülme oranları yüzde olarak saptanmıştır. Bu sperm bölümlerinin her biri için normal morfolojiye sahip olan sperm normal, bu bölümlerin en az birinde anomaliye sahip olanlar ise anormal kabul edilerek, genel morfoloji değerlendirmesi tamamlanmıştır. Ayrıca her olgu için teratozoospermi indeksi (TZİ) hesaplanmıştır.

TZİ hesaplamasında, Menkveld ve arkadaşlarının 2001'de önerdiği, ayrıca, ESHRE (Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyolojisi Derneği) ve NAFA (İskandinavya Androloji Derneği) el kitabıyla (ESHRE/NAFA, 2002) uyumlu olan WHO Laboratuvar El Kitabının 5. Basımı referans alınmıştır. Hesaplama aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$TZİ = (\text{Baş anomalisi sayısı} + \text{Orta parça anomalisi sayısı} + \text{Esas parça anomalisi sayısı} + \text{Sitoplazmik artık sayısı}) / \text{Anormal sperm sayısı}$$

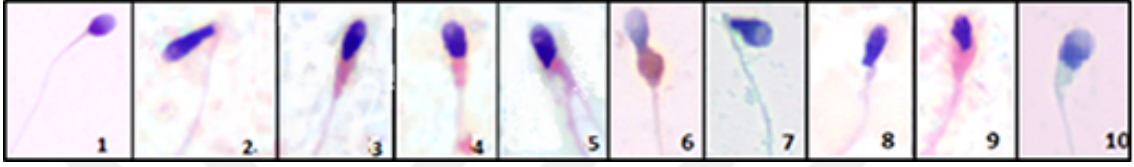
3.2.2. Papanicolaou Boyası İle Morfolojik Değerlendirme Örnekleri

Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4'te, kontrol ve hasta gruplarımıza ait boyanmış yayma preparatlarda gözlemlediğimiz, normal ve anomalili sperm görüntülerine örnekler yer almaktadır.



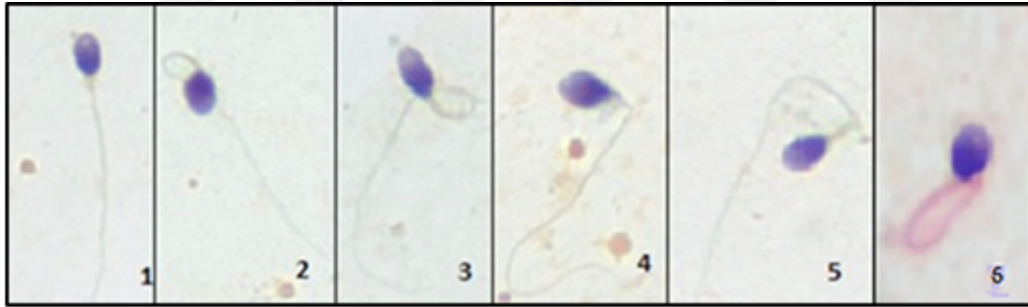
Şekil 3-2: Sperm baş görüntülerine örnekler.

1 nolu resim normal sperm başı görüntüsü sergilerken, 2-10 nolu resimlerde çeşitli sperm baş defektleri izlenmektedir.



Şekil 3-3: Kuyruk orta parça görüntülerine örnekler.

1 nolu resim normal bir orta parça görüntüsü sergilerken, 2-10 nolu resimlerde çeşitli orta parça defektleri izlenmektedir.



Şekil 3-4: Kuyruk esas parça görüntülerine örnekler.

1 nolu resim normal bir kuyruk esas parça görüntüsü sergilerken, 2-6 nolu resimlerde çeşitli esas parça defektleri izlenmektedir.

3.2.3. İmmüno Floresan İşaretleme

Dondurulmuş örnekler çözme işleminin ardından, sperm yıkama işlemi uygulanmıştır. Yıkanan spermle pozitif şarjlı lamlara çok ince şekilde yayılan örnekler, -20°C’de muhafaza edilen metanolle 10 dk fikse edilmiştir. Fiksasyonu tamamlanan örnekler, aşağıdaki protokol uygulanarak, sentrin ve speriolin proteinleri için ayrı ayrı olmak üzere işaretlenmiştir.

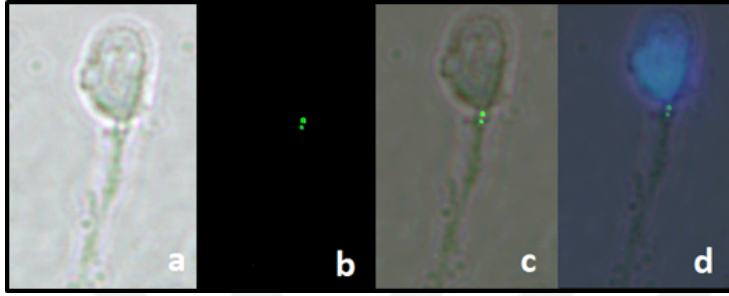
3.2.4. İF Boyama Protokolü

1. Soğuk methanol ile fiksasyon sonrası PBS ile yıkama
2. PBS'te hazırlanmış %0,2'lik Tween 20 + %0,2'lik TritonX 100 çözeltisinde 10 dk bekletilerek permeabilizasyonun sağlanması
3. PBS ile yıkama
4. %10 serum (sekonder antikora uygun olarak seçilen) ile 20 dk bloklama aşaması
5. PBS ile kısa süreli yıkama
6. Primer antikor uygulaması (dilüentle hazırlanmış 1:100 konsantrasyonda ve +4 °C'de 1 gece bekletilerek)
7. PBS ile yıkama
8. Sekonder antikor uygulaması (1:200 dilüsyonla oda sıcaklığında 40 dk bekletilerek)
9. PBS ile yıkama
10. DAPI ile ikincil boyama ve kapama işlemi

İmmunofloresan işaretlemeye Sentrin için, Primer antikor olarak 1:100 dilüsyonda Anti-Centrin 1 antibody (ab11257-Abcam), ve sekonder antikor olarak, 1:200 dilüsyonda Goat Anti-Rabbit IgG-FITC (sc2012-Santa Cruz Biotechnology) kullanılmıştır. Speriolin için 1:200 dilüsyonda Anti-Speriolin (N-20) (sc-98147 Santa Cruz Biotechnology) primer antikor ve 1:200 dilüsyonda Donkey Anti-Goat IgG-CFL594 (sc362277-Santa Cruz Biotechnology) sekonder antikor kullanılmıştır. Sekonder antikordan sonraki son yıkama işleminin ardından DAPI içeren medium (Fluoroshield Mounting Medium With DAPI-abcam-ab104139) ile DNA boyanması sağlanmış ve lamelle kapatılan örnekler Olympus BX61 ve Leitz Wetzlar 307-083.103 floresan mikroskopta uygun filtrelerle incelenmiştir.

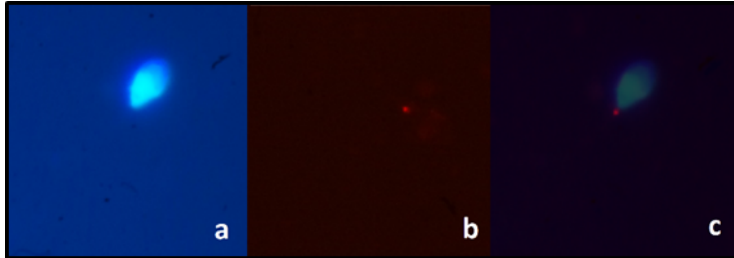
3.2.5. İF İşaretleme İle Sentrin Ve Speriolin İfadesinin Değerlendirilmesi

İF yöntemi ile boyanmış preparatlarda, her denek için 100 sperm sayılarak, protein ifadesinin izlendiği sperm oranları yüzde olarak belirlenmeye çalışılmıştır. Şekil 3.5. ve 3.6.’da sentrin ve speriolin işaretlenmelerine ait örnek görüntülere yer verilmiştir.



Şekil 3-5: Sentrin immünoreaktivitesi

a) Spermatozoon (faz kontrast görüntüsü), b) a’daki spermatozoonun boyun bölgesinde sentrin ekspresyonu, c) ilk iki fotoğrafın birleştirilmiş görüntüsü d) Dapi ile DNA işaretlemesi ve FITC ile sentrin işaretlemesine ait birleştirilmiş görüntü (DNA; mavi, sentrin; yeşil olarak görülmektedir)



Şekil 3-6: Speriolin İmmünoreaktivitesi

a) DNA işaretlemesi ile sperm başının görüntülenmesi, b) a’daki spermatozoonun boyun bölgesinde speriolin ekspresyonu, c) ilk iki fotoğrafın birleştirilmiş görüntüsü (Dapi ile işaretlenen DNA mavi, speriolin kırmızı olarak görülmektedir)

3.3. Elektron Mikroskopik İnceleme

Deneklerden alınan ve TEM analizi için ayrılan sperm örnekleri ilk olarak 1200 rpm’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Sonrasında, üstteki süpernatant atılarak pelletin üzerine %2,5’luk tamponlu glutaraldehid çözeltisi eklenmiştir. Bu şekilde +4°C’de 24 saat

bekletilerek fiksasyonu gerçekleştirilen sperm örnekleri takibe alınmıştır. Örneklerle, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda kullanılan TEM takip protokolü uygulanmıştır.

3.3.1. TEM Takip Protokolü

1. Gluteraldehit ile fiksasyon sonrasında 10 dakika fosfat tamponla yıkama
2. Osmiyum tetroksit ile 1 saat sekonder fiksasyon +4 °C'de
3. Fosfat tamponla 10 dakika yıkama +4 °C'de
4. Fosfat tamponla 10 dakika yıkama +4 °C'de
5. Uranil asetat ile 30 dakika +4 °C'de
6. Fosfat tamponla 10 dakika yıkama +4 °C'de
7. %30 Alkol 10 dakika +4 °C'de
8. %50 Alkol 10 dakika +4 °C'de
9. %70 Alkol 10 dakika oda sıcaklığında
10. %90 Alkol 10 dakika oda sıcaklığında
11. %100 Alkol 10 dakika oda sıcaklığında
12. %100 Alkol 10 dakika oda sıcaklığında
13. Propilen oksit 10 dakika oda sıcaklığında
14. Propilen oksit 10 dakika oda sıcaklığında
15. 1:1 oranında Propilen oksit epon karışımı 1 saat oda sıcaklığında
16. 1:3 oranında Propilen oksit epon karışımı 1 saat oda sıcaklığında
17. Saf epon 1 saat oda sıcaklığında
18. Kapsüllere bloklama
19. 60 derecelik etüvde 18 saat polimerizasyon

Elde edilen epon bloklar önce Leica EM TRIM2 cihazı ile trimlenmiş ve yarı ince kesitler alınmıştır. Daha sonra Leica EM UC7 ultramikrotomda elmas bıçak kullanılarak 60 nm kalınlıkta ince kesitler alınmıştır. Bakır gridlere yerleştirilen dokular, 30 dk boyunca uranil asetat ve 10 dk boyunca kurşun nitrat damlaları üzerinde

bekletilerek kontrastlanmıştır. Jeol JEM 1011 transmisyon elektron mikroskopta incelenen örnekler, Mega View III dijital kamera ve Soft Imaging System AnalySIS programı ile görüntülenmiştir.

3.3.2. Sperm Anomali Listelerinin Oluşturulması

Öncelikle, Spermatozoanın TEM incelemesiyle saptanabilenen çeşitli yapı bozuklukları belirlenmiştir. Baş, boyun, kuyruk orta parça ve kuyruk esas parça için saptanabilen anomalilerin listeleri düzenlenmiştir. Düzenlenen anomali listeleri kullanılarak değerlendirme tabloları oluşturulmuştur.

Hastaların herbiri için ince kesitlerdeki sperm görüntüleri 4 ana grupta toplanmıştır.

1. Grup: Başın enine kesitleri (Sadece baş bölgesinden geçen, boyun ve kuyruktan geçmeyen kesit)
2. Grup: Başın uzamına kesitleri (Baş ve boyun bölgelerinden geçen, kuyruktan geçmeyen kesit)
3. Grup: Spermin uzamına kesitleri (baş, boyun ve kuyruk bölgelerinin üçünden de geçen kesit)
4. Grup: Kuyruk enine kesitleri
 - a- Kuyruk orta parça enine kesitleri (mitokondriyal sarmalın yer aldığı kuyruk bölgesinin enine kesiti)
 - b- Kuyruk esas parça enine kesiti (mitokondriyumsuz bölgenin enine kesitleri)

İncelenen örneklerdeki her bir sperm kesiti, bu gruplardan sadece birine dahil edilmiştir.

TEM değerlendirmesi için oluşturulan tablolar aşağıdadır (Tablo 3.1, 3.2, 3.3, 3.4 ve 3.5). Deneklere ait her bir sperm görüntüsü için, değerlendirme tabloları üzerinde sadece bir sütun kullanılarak işaretlemeler gerçekleştirilmiştir. Her denek için, 1., 2., ve 4. Gruplardan 100'er sperm değerlendirilmiştir. Sperm uzunlamasına kesitlerinin yer aldığı üçüncü grupta ise her hasta için elli sperm değerlendirilmiştir. Kesitlerde tam sperm görüntüsünün tek düzlemde yakalanabilme olasılığı düşük olduğundan böyle bir yol izlenmiştir. Değerlendirmelerin sonunda veriler toplanıp ortalamaları alınarak, her

vaka için hangi anomalinin % kaç oranında görüldüğüne dair yaklaşık sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 3-1: Baş enine kesitleri değerlendirme tablosu (Grup 1)

1. GRUP: BAŞ ENİNE KESİT (Sadece Baş) 1. Hasta																										
Sperm No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Baş Şekli	Normal																									
	Anormal																									
Membran	Düzenli																									
	Düzensiz																									
Çekirdek	Çek.'ten uzak mem.																									
	Tek parça																									
	İki parça																									
	Çok parça																									
	Değişmiş																									
	1																									
	2																									
	3																									
	4																									
	5																									
Kondensasyon	%10 ve daha az																									
	15%																									
	20%																									
	25%																									
Vakuol oranı	%30 ve üstü																									
	1																									
	2																									
	3																									
	4																									
Vakuol sayısı	5 ve üstü																									
Akrozom	Normal																									
	Azalmış İçerik																									
	Artmış İçerik																									
	İnklüzyon																									
	Düzensiz Akrozom																									
	Çek.'den Uzak Akr.																									
	Akrozom Yokluğu																									
	Akrozom Reacted																									

Bu tabloda, baş bölgesinden geçmiş, boyun ve kuyruk bölgelerinden geçmemiş sperm kesit görüntüleri değerlendirilmiştir. Bu tablodan bir hasta için 4 adet kullanılmıştır.

Tablo 3-2: Baş uzamına kesitleri değerlendirme tablosu (Grup 2).

2. GRUP: BAŞ UZAMINA KESİT (Baş+ Boyun) 1. Hasta																					
Sperm No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Baş Şekli	Normal																				
	Anormal																				
Membran	Düzenli																				
	Düzensiz																				
	Çek.'ten uzak mem.																				
Çekirdek	Tek parça																				
	İki parça																				
	Çok parça																				
	Değişmiş																				
Çekirdek	Çek. Cebi																				
Kondensasyon	1																				
	2																				
	3																				
	4																				
	5																				
Vakuol oranı	%10 ve daha az																				
	15%																				
	20%																				
	25%																				
	%30 ve üstü																				
Vakuol sayısı	1																				
	2																				
	3																				
	4																				
	5 ve üstü																				
Akrozom	Normal																				
	Azalmış İçerik																				
	Artmış İçerik																				
	İnklüzyon																				
	Düzensiz Akrozom																				
	Çek.'den Uzak Akr.																				
	Akrozom Yokluğu																				
	Akrozom Reacted																				
Boyun	Normal Bağ. Par.																				
	Anormal Bağ. Par.																				
	Stoplazmik Artık																				
	İnklüzyon																				
	Vakuol																				
	Granüllü Bağ. Par.																				
	Anormal Bazal Plate																				
	İmp. Fos.'da kayma																				
	Çift boyun																				
	Birden çok kuyruk																				

Bu tabloda baş ve boyun bölgesinin her ikisinden de geçmiş, kuyruk bölgesinden geçmemiş sperm kesit görüntüleri değerlendirilmiştir. Bu tablodan her hasta için beş adet kullanılmıştır.

Tablo 3-3: Sperm uzamına kesitleri değerlendirme tablosu (Grup 3)

3. GRUP: SPERM UZAMINA KESİT (Baş+Boyun +Kuyruk) 1. Hasta																										
Sperm No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Baş Şekli	Normal																									
	Başsız																									
	Büyük																									
Membran	Anormal																									
	Düzenli																									
	Düzensiz																									
Çekirdek	Çek.'kten uzakta memb.																									
	Tek parça																									
	İki parça																									
Kondensasyon	Çok parça																									
	Değişmiş çek.																									
	Çek. Cebi																									
Vakuol		1																								
		2																								
		3																								
		4																								
		5																								
Vakuol sayısı	%10 ve daha az																									
		15%																								
		20%																								
		25%																								
Akrozom	%30 ve üstü																									
	0-1																									
		2																								
		3																								
		4																								
Bağlantı Parçası	5 ve üstü																									
	Normal																									
	Azalmış İçerik																									
	Artmış İçerik																									
Genel Kuyruk Özelliği	Inklüzyon																									
	Düzensiz Akrozom																									
	Çek.'den Uzak Akrozom																									
	Akrozom Yokluğu																									
Yapısal Kuyruk Özell.	Normal Bağ. Par.																									
	Anormal Bağ. Par.																									
	Sitoplazmik artık																									
	Inklüzyon																									
Yapısal Kuyruk Özell.	Vakuol																									
	Granüllü Bağ. Par.																									
	Anormal Bazal Plate																									
	Imp. Fos.'da Kayma																									
Yapısal Kuyruk Özell.	Çift Boyun																									
	Birden fazla kuyruk																									
	Tek Kuyruk																									
	Aynı Zarda Çok Kuy.																									
Yapısal Kuyruk Özell.	Çift Kuyruk																									
	Düzenli Mit. Dizilimi																									
	Düzensiz Mit. Dizilimi																									
	Şişmiş Mitokondri																									
Yapısal Kuyruk Özell.	Dağılmış Mitokondri																									
	Kısa Mitokondriyal Kılıf																									
	Mit. Kılıf Yokluğu																									
	Annulus yokluğu																									
Yapısal Kuyruk Özell.	Düzensiz Fibriller																									

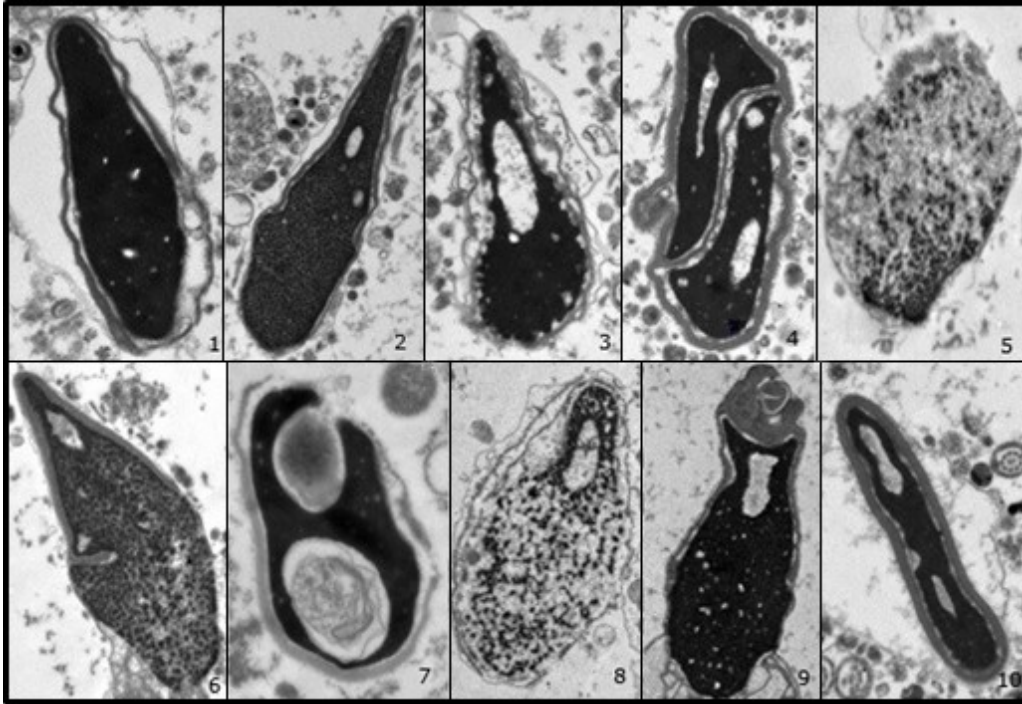
Bu tabloda, baş, boyun ve kuyruğun tümünü kapsayan sperm kesit görüntüleri değerlendirilmiştir. Bu şekildeki görüntü yakalama olasılığı oldukça düşük olduğundan, her hasta için ikişer tablo kullanılarak elli sperm değerlendirilmiştir.

3.3.3. TEM ile Sperm İnce Yapı Değerlendirme Örnekleri

Aşağıda TEM değerlendirmelerinin nasıl yapıldığına dair örnekler yer almaktadır. Grupların her birine ait örnek görüntüler ve bu görüntülerin değerlendirildiği tablolara yer verilmiştir.

3.3.3.1. Baş Enine Kesit Değerlendirme Örnekleri

Şekil 3.7.'de ve Tablo 3.6'da, sperm sadece baş bölgesinden geçmiş kesit görüntülerine örnekler ve bu görüntülerin değerlendirme tablosu görülmektedir. Çekirdek kondensasyonu değerlendirilirken, birden beşe kadar derecelendirme ölçeği kullanılmıştır (En kötü kondensasyon derecesi 1, en iyi kondensasyon derecesi 5 olarak kabul edilmiştir). Değerlendirme sonucunda, 5 ve 8 no.lu spermilerin kondensasyon derecesi bir, 6 no.lu sperm'in kondensasyon derecesi iki, 2 nolu sperm'in kondensasyon derecesi üç, 9 no.lu sperm'in kondensasyon derecesi dört, 1, 3, 4, 7 ve 10 no.lu spermilerin kondensasyon dereceleri beş olarak kabul edilmiştir.



Şekil 3-7: TEM ile gözlemlendiğimiz sperm baş görüntüleri

Farklı hastalarda rastlanan, farklı yapısal özelliklere sahip sperm başları görülmektedir.

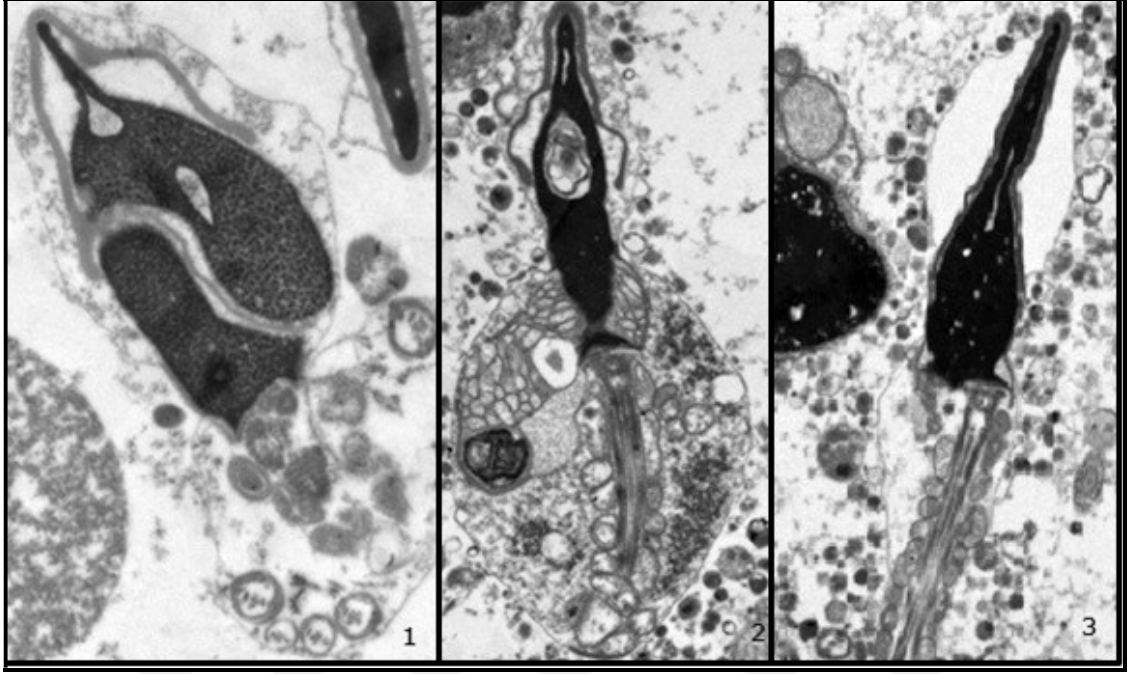
Tablo 3-6: Sperm başlarının değerlendirilmesi

1. GRUP: BAŞ ENİNE KESİT (Sadece Baş)											
Sperm No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Baş Şekli	Normal	X	X	X		X	X	X	X		X
	Anormal				X					X	
Membran	Düzenli	X	X		X		X	X		X	X
	Düzensiz			X		X			X		
	Çek.'ten uzak mem.	X									
Çekirdek	Tek parça	X	X	X		X	X	X	X	X	X
	İki parça				X						
	Çok parça										
	Değişmiş										
Kondensasyon	1					X			X		
	2						X				
	3		X								
	4									X	
	5	X		X	X			X			X
Vakuol oranı	%10 ve daha az az	X	X			X	X		X	X	
	15%				X						
	20%										
	25%			X							X
	%30 ve üstü							X			
Vakuol sayısı	0-1	X		X		X			X	X	
	2		X				X	X			X
	3				X						
	4										
	5 ve üstü										
Akrozom	Normal		X				X				X
	Azalmış içerik			X							
	Artmış içerik									X	
	İnklüzyon										
	Düzensiz Akrozom	X			X			X			
	Çek.'den Uzak Akr.										
	Akrozom Yokluğu					X			X		
	Akrozom Reacted										

Şekil 3.7.'de yer alan on ayrı sperm baş görüntüsü, baş şekli, membran özellikleri, çekirdek yapıları, kondensasyon dereceleri, içerdikleri vakuol oran ve sayıları, son olarak da akrozom özellikleri açısından belirlenen parametreler üzerinden değerlendirilmiştir.

3.3.3.2. Baş Uzamına Kesit (baş+boyun) Değerlendirme Örnekleri

Şekil 3.8. ve ve Tablo 3.7.'de, baş ve boyun parçalarının ikisinin de izlendiği sperm kesitlerine örnekler ve bu görüntülerin değerlendirme tablosu görülmektedir.



Şekil 3-8: TEM ile gözlemlendiğimiz sperm baş uzamına kesit (baş+boyun) görüntüleri

Farklı hastalarda rastlanan, farklı yapısal özelliklere sahip sperm baş+boyun görüntüleri izlenmektedir.

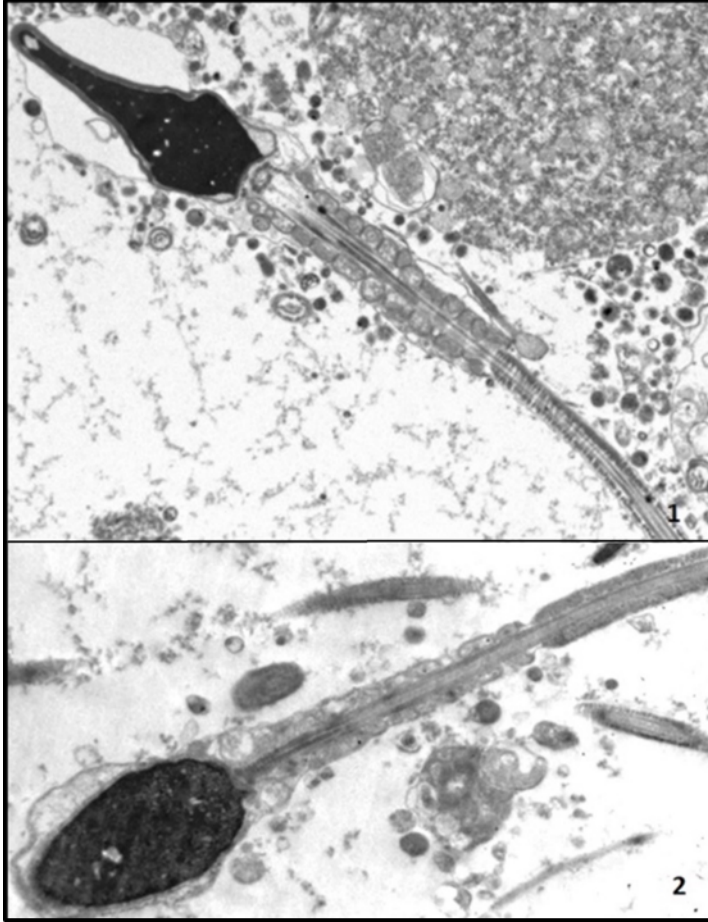
Tablo 3-7: Sperm baş ve boyunlarının değerlendirilmesi

2. GRUP: BAŞ UZAMINA KESİT (Baş+ Boyun)									
Sperm No		1	2	3	4	5	6	7	8
Baş Şekli	Normal		X	X					
	Anormal	X							
Membran	Düzenli	X		X					
	Düzensiz		X						
	Çek.'ten uzak mem.	X		X					
Çekirdek	Tek parça		X	X					
	İki parça	X							
	Çok parça								
	Değişmiş								
	Çek. Cebi		X						
Kondensasyon	1								
	2								
	3	X							
	4		X						
	5			X					
Vakuol oranı	%10 ve daha az	X							
	15%			X					
	20%								
	25%								
	%30 ve üstü		X						
Vakuol sayısı	1								
	2	X	X						
	3								
	4								
	5 ve üstü			X					
Akrozom	Normal			X					
	Azalmış içerik								
	Artmış içerik								
	İnklüzyon								
	Düzensiz Akrozom	X	X						
	Çek.'den Uzak Akr.								
	Akrozom Yokluğu								
	Akrozom Reacted								
Boyun	Normal Bağ. Par.								
	Anormal Bağ. Par.	X	X	X					
	Stoplazmik Artık	X	X						
	İnklüzyon								
	Vakuol		X						
	Granüllü Bağ. Par.		X						
	Anormal Bazal Plate								
	İmp. Fos.'da kayma			X					
	Çift boyun								
Birden çok kuyruk	X								

Şekil 3.8.'de yer alan üç ayrı sperm görüntüsü, baş şekli, membran özellikleri, çekirdek yapıları, kondensasyon dereceleri, içerdikleri vakuol oran ve sayıları, akrozom gibi özelliklerine ilaveten, boyuna ait yapısal özellikler açısından, belirlenen parametreler üzerinden değerlendirilmiştir.

3.3.3.3. Sperm Uzamına Kesit (baş+boyun+kuyruk) Değerlendirme Örnekleri

Şekil 3.9. ve Tablo 3.8.'de, baş, boyun ve kuyruk parçalarının üçünün de izlendiği sperm kesitlerine örnekler ve bu görüntülerin değerlendirme tabloları görülmektedir.



Şekil 3-9:TEM ile gözlemlediğimiz sperm uzamına kesit (baş+boyun+ kuyruk) görüntüleri

Farklı hastalarda rastlanan, farklı yapısal özelliklere sahip sperm baş+boyun+ kuyruk görüntüleri izlenmektedir.

Tablo 3-8: Sperm baş, boyun ve kuyruk değerlendirmesi

3. GRUP: SPERM UZAMINA KESİT (Baş+Boyun +Kuyruk)																
Sperm No		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Baş Şekli	Normal	X	X													
	Başsız															
	Bükük															
	Anormal															
Membran	Düzenli	X	X													
	Düzensiz															
	Çek. kten uzakta memb.	X	X													
Çekirdek	1 tek parça	X	X													
	İki parça															
	Çok parça															
	Değişmiş çek.															
	Çek. Cebi	X														
Kondensasyon	1															
	2															
	3															
	4		X													
	5	X	X													
Vakuol	%10 ve daha az															
	15%															
	20%															
	25%															
	%30 ve üstü															
Vakuol sayısı	0-1	X														
	2		X													
	3															
	4															
	5 ve üstü															
Akrozom	Normal	X														
	Azalmış İçenk															
	Artmış İçenk															
	İnküzyon															
	Düzensiz Akrozom															
	Çek.'den Uzak Akrozom															
Bağlantı Parçası	Akrozom Yokluğu															
	Normal Bağ. Par.	X	X													
	Anormal Bağ. Par.															
	Sitoplazmik kök															
	İnküzyon															
	Vakuol															
	Granüllü Bağ. Par.															
	Anormal Bazal Plate															
	Imp. Fos.'da Kayma															
	Çift Boyun															
Genel Kuyruk Özelliği	Birden fazla kuyruk															
	1 tek kuyruk	X	X													
	Aynı Zarda Çok Kuy.															
Yapısal Kuyruk Özell.	Çift Kuyruk															
	Düzenli Mit. Dizilimi	X	X													
	Düzensiz Mit. Dizilimi															
	Şişmiş Mitokondri															
	Bölünmüş Mitokondri															
	Kısa Mitokondriyal Kılıf															
	Mit. Kılıf Yokluğu															
Yapısal Kuyruk Özell.	Annulus yokluğu															
	Düzensiz Fibriller															

Şekil 3.9.'da yer alan iki ayrı sperm görüntüsü, baş, boyun (bağlantı parçası) ve kuyruğa ait yapısal özellikler açısından belirlenen parametreler üzerinden değerlendirilmiştir.

3.3.3.4. Kuyruk Orta Parça Enine Kesit Değerlendirme Örnekleri

Şekil 3.10. ve Tablo 3.9.'da, kuyruk orta parçaya ait enine kesit görüntülerine örnekler ve bu görüntülerin değerlendirme tablosu görülmektedir.



Şekil 3-10: TEM ile gözlemlenen kuyruk orta parça enine kesit (Grup 4a) görüntüleri

Farklı yapısal özelliklere sahip kuyruk orta parça enine kesit görüntüleri izlenmektedir.

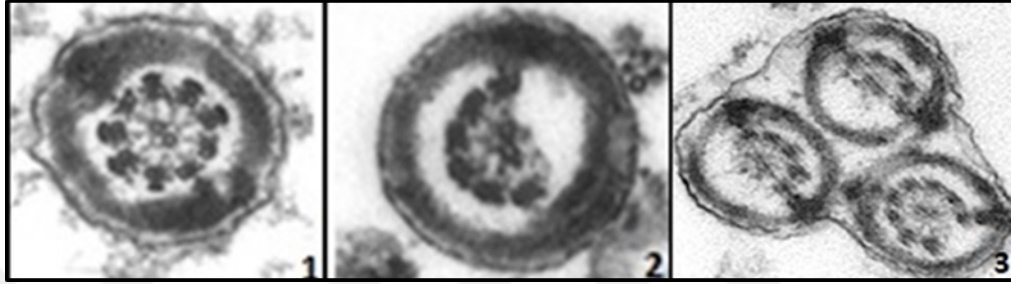
Tablo 3-9: Kuyruk orta parça değerlendirmesi

4. GRUP (a): Kuyruk Orta Parça Enine Kesitleri																					
Kuyruk Numaraları		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.
	1	X	X	X																	
	2																				
	3																				
	4 ve üzeri																				
Kuy. Kes. Say.																					
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	X	X	X																	
	Düzensiz Mit. Dizilimi																				
	Şişmiş Mitokondri																				
	Dağınık Mitokondri			X																	
Dış Yoğun Fibril.	Normal D.Yoğun Fibr.	X		X																	
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik		X																		
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.																				
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	X																			
	9+0 Aksonem Yapısı																				
	Aks. Eksik Mikrotübül		X																		
	Aks. Fazla Mikrotübül																				
	Kırık ya da yarım Aks.																				
	Aksone min Yokluğu			X																	
	Düzensiz Yer. Mikrotüb.																				

Şekil 3.10.'da yer alan üç ayrı kuyruk kesiti, aynı zardaki kuyruk sayısı, mitokondriyal kılıf, dış yoğun fibriller ve özellikleri açısından belirlenen parametreler üzerinden değerlendirilmiştir.

3.3.3.5. Kuyruk Esas Parça Enine Kesit Değerlendirme Örnekleri

Şekil 3.11. ve Tablo 3.10.'da, kuyruk esas parçaya ait enine kesit görüntülerine örnekler ve bu görüntülerin değerlendirme tabloları görülmektedir.



Şekil 3-11: TEM ile gözlemlenen kuyruk orta parça enine kesit (Grup 4b) görüntüleri

Farklı yapısal özelliklere sahip kuyruk orta parça enine kesit görüntüleri izlenmektedir.

Tablo 3-10: Kuyruk esas parça değerlendirmesi

4. GRUP (b): Kuyruk Esas Parça Enine Kesitleri																					
Kuyruk Numaraları		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.
	1	X	X																		
	2																				
	3			X																	
	Kuy. Kes. Say.	4 ve üzeri																			
Düzensiz Dış Yoğun Fibriller																					
Düzensiz Fibröz Kılıf																					
Düzensiz Uzun Kolonlar																					
Aksonem	Normal Yapı	X																			
	9+0 Aksonem Yapısı																				
	Aks. Eksik mikrotübül																				
	Aks. Fazla mikrotübül																				
	Kırık ya da yarım Aks.		X	X																	
	Aksone min Yokluğu																				
Aksonem	Düzensiz Yer. Mikrotüb.																				

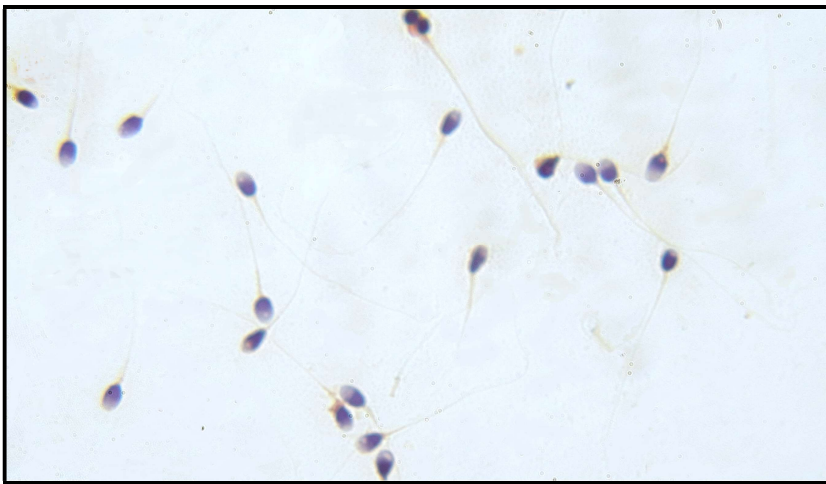
Şekil 3.11.'de yer alan üç ayrı kuyruk esas parça kesiti, aynı zardaki kuyruk sayısı, dış yoğun fibriller, fibröz kılıf, uzun kolonlar ve aksonem özellikleri açısından belirlenen parametreler üzerinden değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

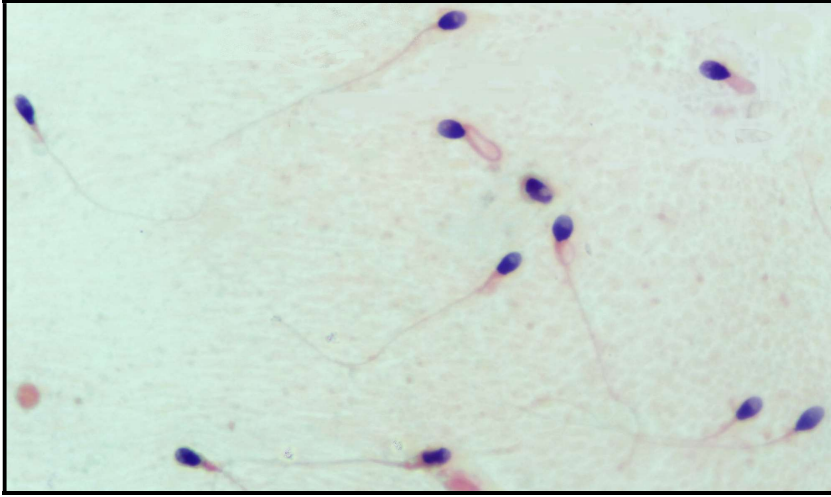
Çalışmamızda IM ile sperm morfolojisi, FM ile sentrin ve speriolin proteinlerinin ekspresyon düzeyleri ve TEM ile sperm incecıyapı özellikleri irdelenmeye çalışılmıştır.

4.1. IM İncelemesi ile Saptanan Morfolojik Bulgular

PAP boyama prosedürü uygulanmış sperm yaymalarının IM ile incelenmesi sonucunda hasta ve kontrol örnekleri için morfolojik değerlendirmeler ve TZİ hesaplamaları yapılmıştır. Kontrol grubu örneklerinin değerlendirme sonuçları, normal değerlerdedir. Hasta grubuna ait örneklerin bazılarında normal sınırlarda morfolojik sonuçlar gözlenirken, bazılarında, düşük oranlarda morfolojik sonuçlar saptanmıştır. Özellikle bir hastada morfoloji yüzdesi oldukça düşük bulunmuştur. Hesaplanan TZİ'ler, kontrol grubunda ve hastaların bazılarında normal sınırlardadır. Bazı hastalarda TZİ sonuçları normal sınırların üzerindedir. IM ile gerçekleştirilen morfolojik inceleme sonuçlarının her hastada değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Şekil 4.1'de kontrol örneğine ait PAP boyaması görüntüsü ve Şekil 4.2'de hasta örneğine ait PAP boyaması görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4-1: Kontrol örneğine ait PAP boyaması

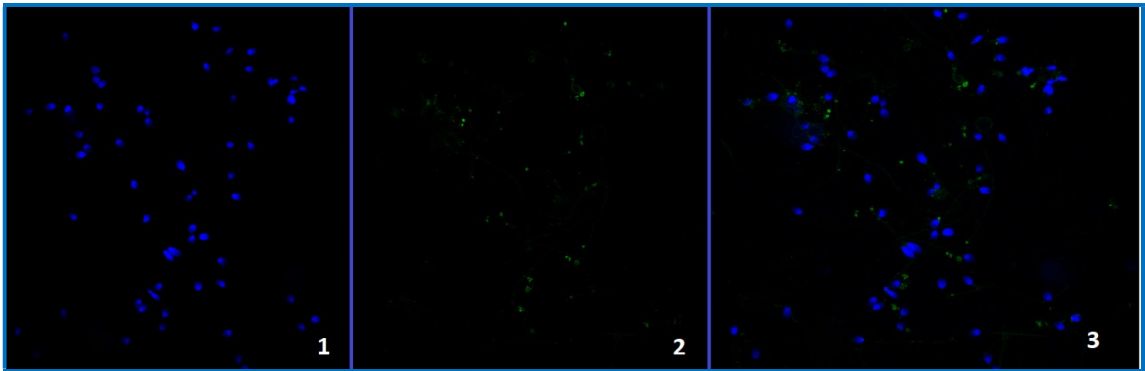


Şekil 4-2: Hasta örneğine ait PAP boyaması

4.2. İmmüno Floresan Boyama Sonuçları

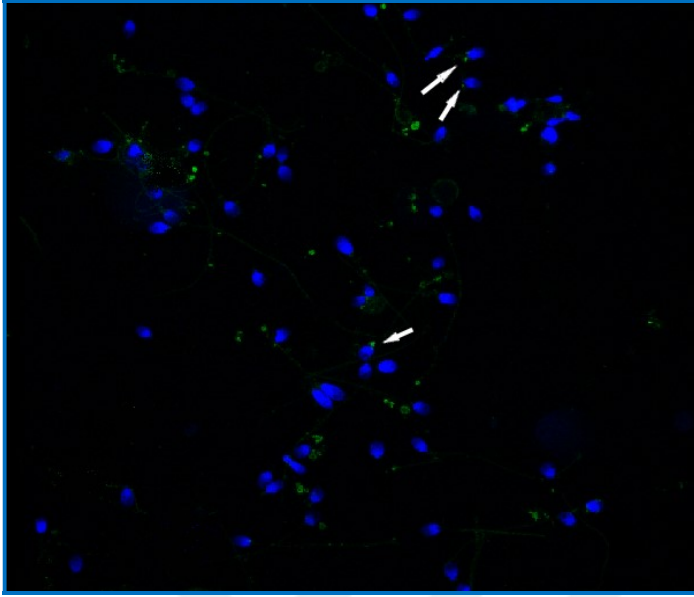
IF yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz boyamalarla sentrin ve speriolin ekspresyonlarının gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Sentrin proteinine ait boyamalarda, boyun bölgesinde işaretlenmelere rastlanmış olsa da, ne kontrol ne de hasta örnekleri için protein ekspresyonunun nicel olarak değerlendirilebileceği kadar spesifik sonuçlara ulaşılamamıştır.

Kontrol örneklerinde IF boyamaları sonucu elde edilen sentrin ekspresyonunu görüntüleri, Şekil 4.1. ve 4.2.'de yer almaktadır.



Şekil 4-3: Kontrol örneklerinde Sentrin ekspresyonu

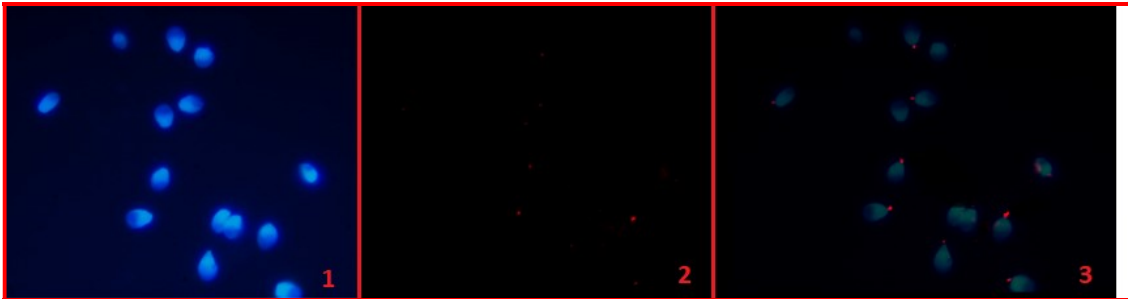
1-DAPI ile sperm başlarının görüntülenmesi, 2-FITC ile sentrin ekspresyonunun görüntülenmesi, 3- 1 ve 2. fotoğrafların birleştirilmiş şekli.



Şekil 4-4: Kontrol örneklerinde sperm başları ve Sentrin ekspresyonu

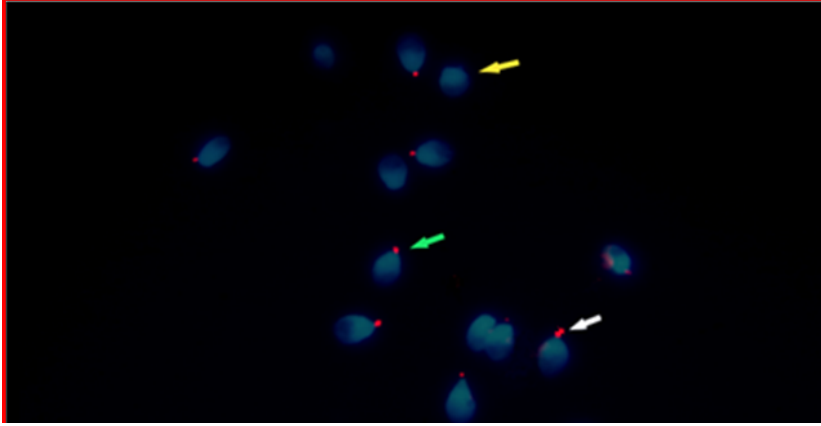
Şekil 4.1’de yer alan 3. görüntünün büyütülmüş şekli. Beyaz oklar, boyun bölgesinde sentrin ekspresyonu gösteren spermlieri işaretlemektedir.

Speriolin proteinine ait IF boyamaları sonucu, kontrol örneklerinde boyun bölgelerinde işaretlenme gösteren sperm oranı yaklaşık %71 olarak saptanmıştır. Hasta örneklerindeki speriolin boyamalarında, bazı hastalarda kontrole yakın oranlarda ekspresyon gözlenmiş, bazılarında ise boyanma oranları düşük kalmıştır.



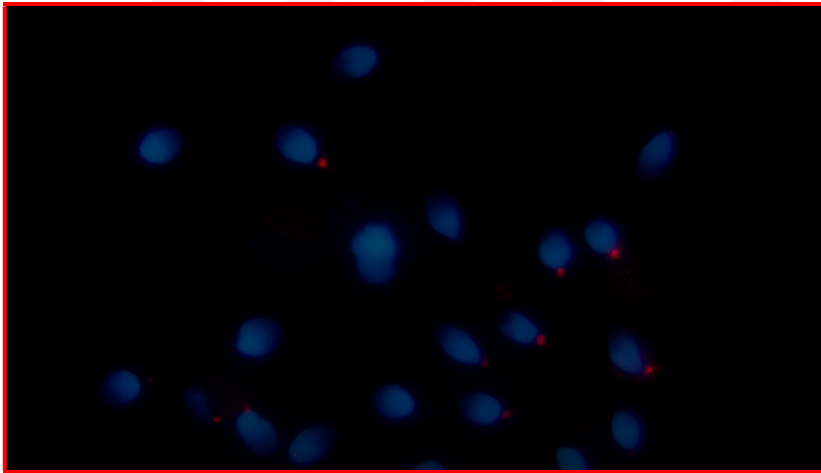
Şekil 4-5: Kontrol örneklerinde Speriolin ekspresyonu

1-DAPİ ile sperm başlarının görüntülenmesi, 2- CFL 594 ile speriolin ekspresyonunun görüntülenmesi, 3- 1 ve 2. Fotoğrafların birleştirilmiş şekli.

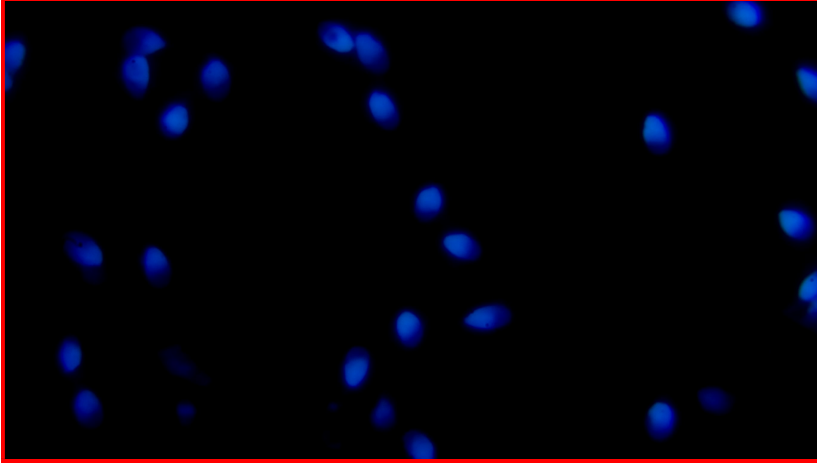


Şekil 4-6: Kontrol örneklerinde sperm başları ve Speriolin ekspresyonu

Şekil 4.3'te yer alan 3. görüntünün büyütülmüş şekli. Yeşil ok; boyun bölgesinde tek spot halinde speriolin ekspresyonu gösteren spermatozoonu, beyaz ok; boyun bölgesinde çift spot halinde speriolin ekspresyonu gösteren spermatozoon, sarı ok ise speriolin ekspresyonu göstermeyen spermatozoonu işaretlemektedir.



Şekil 4-7: Hasta örneklerinde sperm başları ve speriolin ekspresyonu



Şekil 4-8: Spriolin için negatif kontrol boyaması

4.3. TEM incelemesi ile Saptanan İnce Yapısal Bulgular

Çalışmamızda gerçekleştirilen TEM incelemelerinde, normal inceyapı özellikleri taşıyan ve çeşitli inceyapısal anomalilere sahip olan sperm görüntüleri tespit edilmiştir. Baş ince yapısında farklı kondensasyon düzeylerine sahip olan spermiler gözlemlenmiştir. Sperm başlarındaki kondensasyon düzeylerini değerlendirirken birden beşe kadar derecelendirme yoluna gidilmiştir. En iyi kondanse olan spermatozoon beş, en kötü kondanse olan da bir olacak şekilde derecelendirerek puanlanmıştır. TEM analizi için oluşturduğumuz tablolar yardımıyla baş için, kondensasyon derecesinden vakuol sayısı ve oranına, membran bütünlüğünden akrozom içeriğine kadar çok sayıda özelliği içeren ayrıntılı bir değerlendirme gerçekleştirilmiştir. İncelediğimiz hasta örneklerinin bazılarında, boyunlarda, kontrolden yüksek oranda anomali saptanmıştır. Bu anomaliler arasında sitoplazmik artık, vakuol içeren boyun, anormal görünümlü bazal plak, implantasyon fossasında kayma, çift boyun görüntüsü oranları dikkat çekmektedir. Bazı hastalarda önemli oranlarda çift boyun ve dolayısıyla çift proksimal sentriyol görüntülerine rastlanmıştır. Bu vakalarda TEM ile tespit edilen çift boyun yüzdelerinin, IM ile gözlemlenen çift kuyruk yüzdelerinden önemli ölçüde farklı olduğu görülmüştür. Bu bulgular, çift boyun gözlemlenen bu spermilerin, çift kuyruklu olmayıp, aslında birbirine yakın konumlanmış iki aksonem içeren, ama aynı zar içinde bulunduğu için tek olarak değerlendirilen bir kuyruğa sahip olduklarını düşündürmektedir. TEM incelemelerimizle tespit edilmiş, aynı zar içerisinde iki kuyruk yapısı bulunduran sperm

kesit görüntüleri de bu düşüncüyü desteklemektedir. Bu yapıdaki spermelerde, aynı zarda olmalarına karşın, aynı kesit düzlemine her iki kuyruk yapısının da girmesi olasılığının düşük olduğu düşünüldüğünde, sperm görüntülerindeki implantasyon fossasındaki kayma ve birden çok bazal plate görüntüleri önem kazanmaktadır. Tüm bu yapılar, birden çok boyun, ya da normalden fazla sentriyol içeriği ile yakından ilişkilidir.

TEM incelemelerimizde, her hastada proksimal sentriyol görüntüsü saptanmıştır. Bu sentriyol görüntülerinde hemen hemen hiçbir yapısal bozukluk gözlemlenmemiştir. Sadece bir hastada önemli miktarda adjuvant sentriyol varlığı tespit edilmiştir.

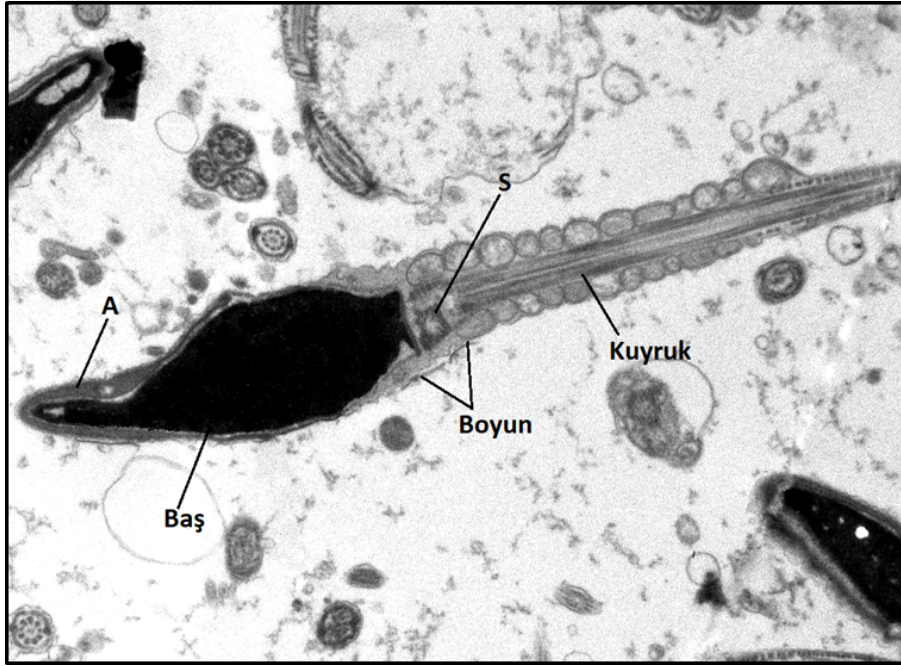
Kuyruk enine kesitlerinin değerlendirme sonuçları incelendiğinde, bazı özelliklerin, orta parça ve esas parçada saptanan yüzdeleri arasında, belirgin değişimler izlenmiştir. Tüm hastaların sonuçları incelendiğinde, bu değişimin, hemen hemen her hastada aynı şekilde gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Gözlemlediğimiz TEM inceleme sonuçlarına göre;

- Kuyruk orta parçaya ait enine kesit görüntülerinde, normal aksonem yapısı izlenen kuyruk yüzdesi, kuyruk esas parçaya ait enine kesit görüntülerinde normal aksonem izlenen kuyruk yüzdesine göre daha yüksektir.
- Kuyruk orta parçaya ait enine kesit görüntülerinde, “9+0” aksonem yapısı izlenen kuyruk yüzdesi, kuyruk esas parçaya ait enine kesit görüntülerinde “9+0” aksonem yapısı izlenen kuyruk yüzdesine göre daha yüksektir.
- Kuyruk orta parçaya ait enine kesit görüntülerinde, “aksonemde eksik mikrotübül” yapısı görülen kuyruk yüzdesi, kuyruk esas parçaya ait enine kesit görüntülerinde “aksonemde eksik mikrotübül” yapısı izlenen kuyruk yüzdesine göre daha düşüktür.
- Kuyruk orta parçaya ait enine kesit görüntülerinde “kırık ya da yarım aksonem” yapısı izlenen kuyruk yüzdesi, esas parça kesit görüntülerinde “kırık ya da yarım aksonem” yapısı izlenen kuyruk yüzdesine göre daha düşüktür.
- Kuyruk orta parçaya ait enine kesit görüntülerinde, “aksonemi bulunmayan” kuyruk kesiti yüzdesi, esas parçaya ait kesit

görüntülerinde “aksonemi bulunmayan” kuyruk kesiti yüzdesine göre daha yüksektir.

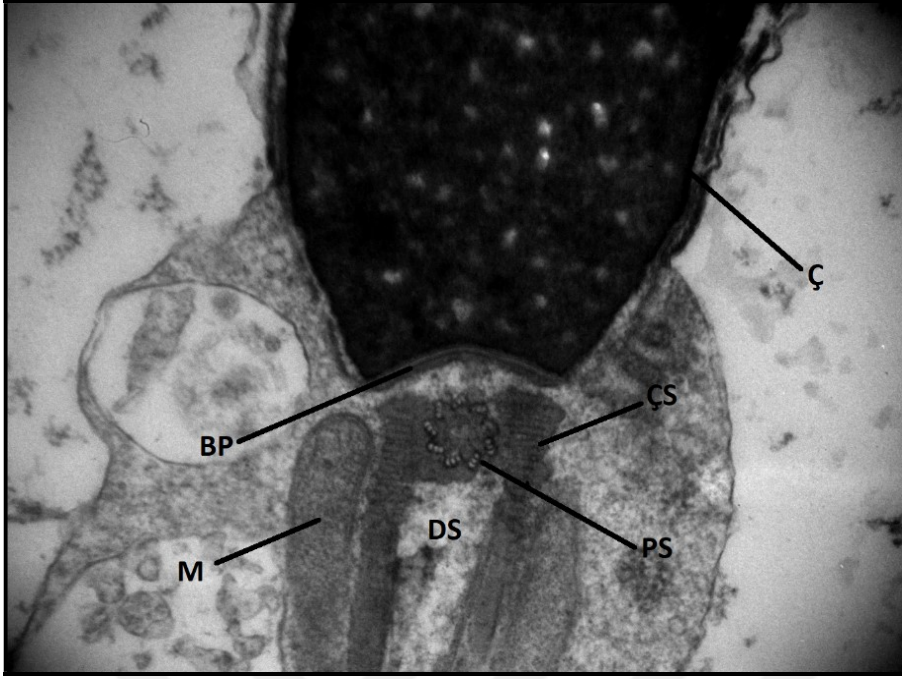
- Kuyruk orta parçaya ait enine kesit görüntülerinde “aksonemde düzensiz yerleşimli mikrotübül” yapısı görülen kuyruk yüzdesi, orta parçaya ait kesitlerde “aksonemde düzensiz yerleşimli mikrotübül” yapısı izlenen kuyruk yüzdesine göre daha düşüktür.

Şekil 4.5.’den 4.32’ye kadar TEM ile gözlemlediğimiz sperm görüntülerine ait örneklerle yer verilmiştir. Bu görüntülerde çeşitli ince yapısal özellikler ve anomaliler görülmektedir.



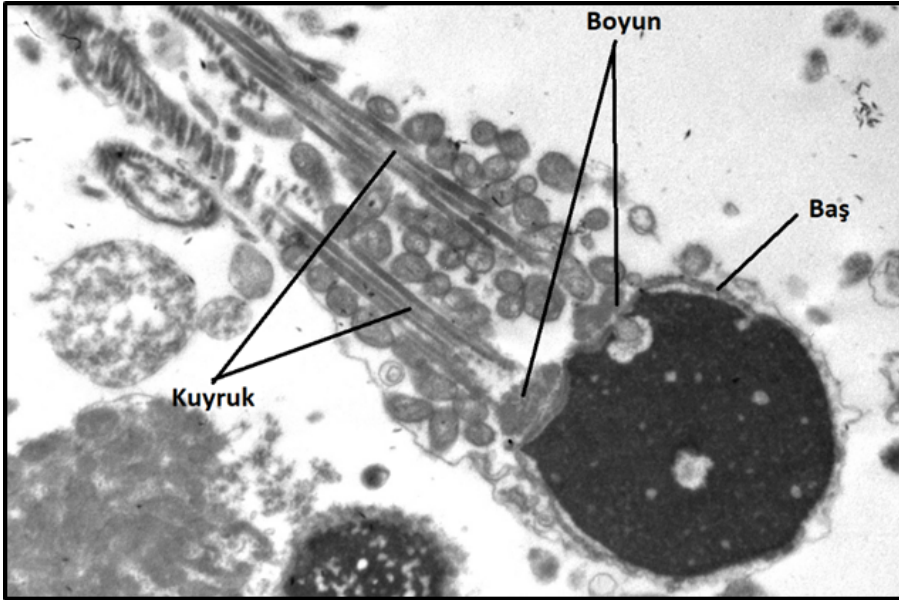
Şekil 4-9: Fertil bireye ait normal görünümlü spermatozoon

A; akrozom, S; proksimal sentriyol



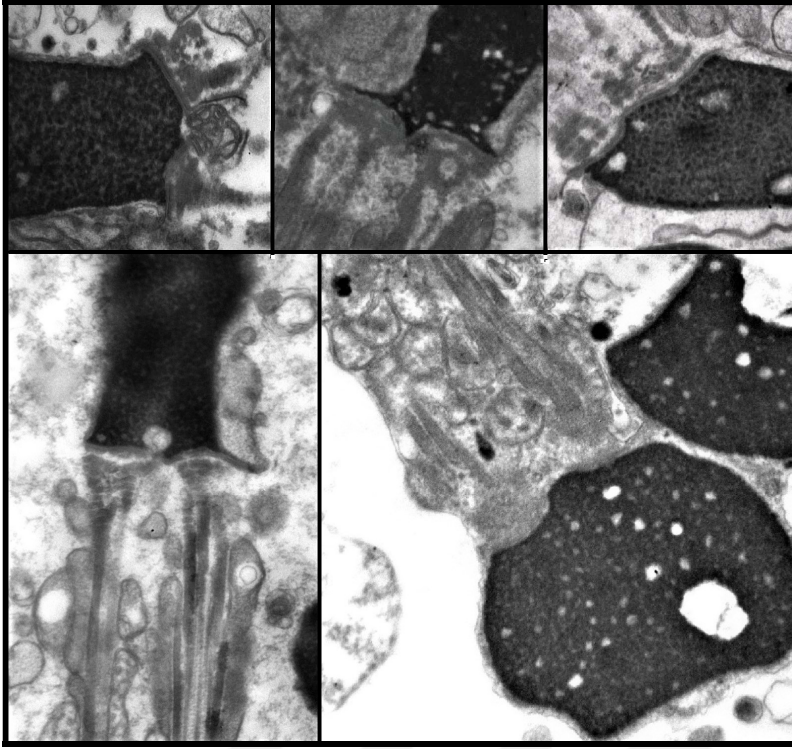
Şekil 4-10: Fertil bireye ait sperm bağlantı parçası ultrastrüktürü

PS; proksimal sentriyol, ÇS; çizgili sütunlar, DS; distal sentriyola ait tonoz, M; mitokondri, BP; bazal plate, Ç; çekirdek

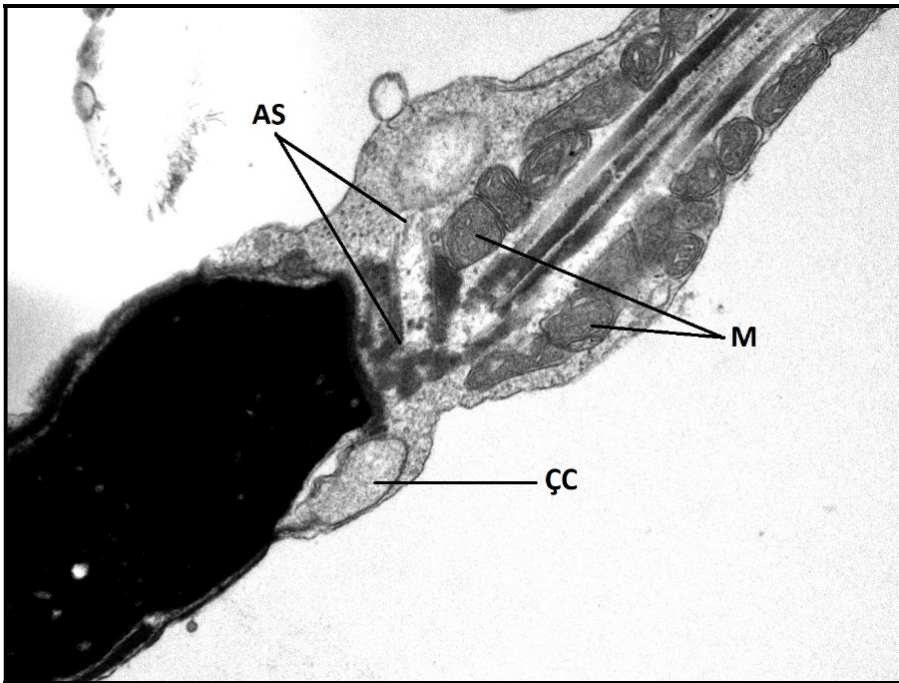


Şekil 4-11: 1. Hastaya ait, çift boyunlu ve aynı zarda iki kuyruk bulunduran yuvarlak başlı spermatozoon

Spermatozoonda, iki boyun ve aynı zar içinde devam eden iki aksonem yapısı bulunmakta.

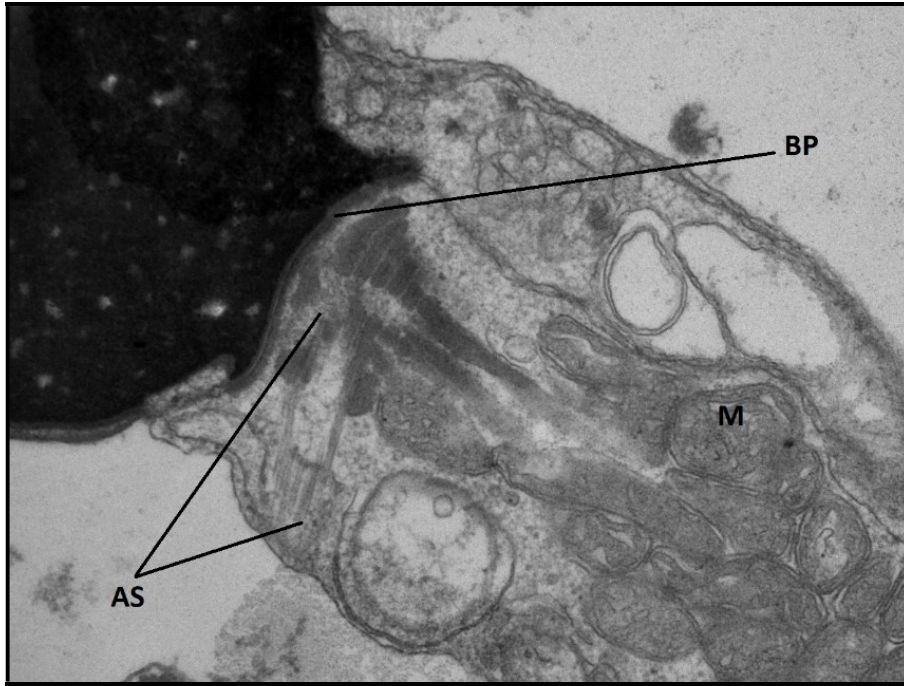


Şekil 4-12: 1. Hastaya ait çift boyunlu spermatozoonlar



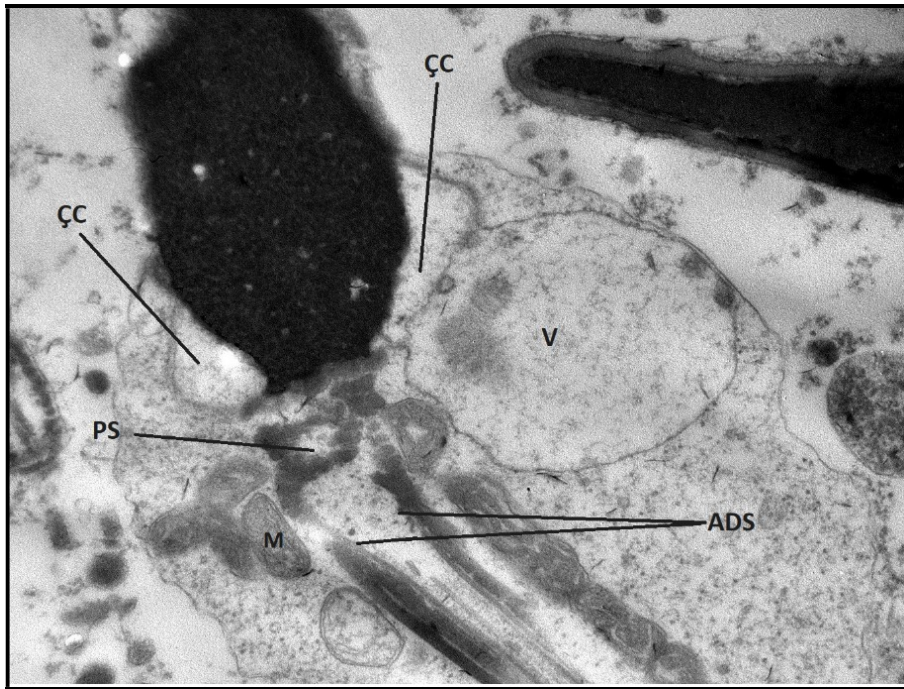
Şekil 4-13: 2. Hastaya ait boyunda adjuvant sentriyol

AS; Adjuvan sentriyol, ÇC; çekirdek cebi, M; mitokondri.



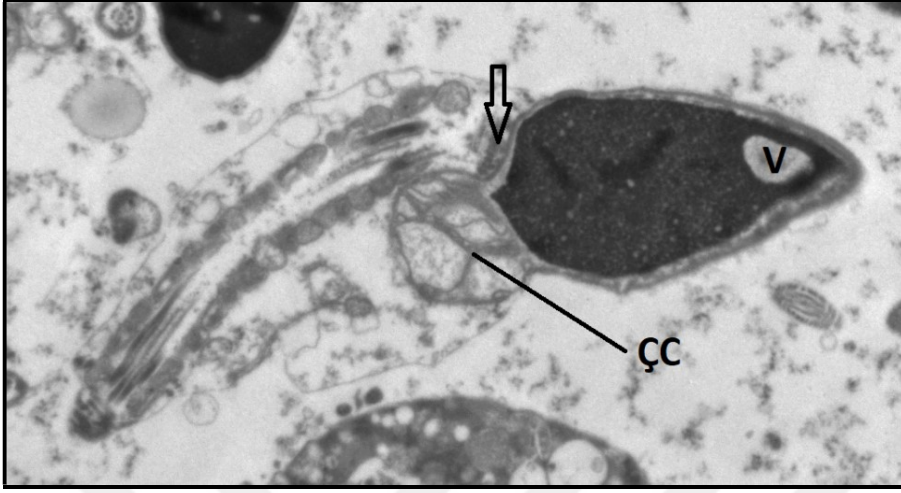
Şekil 4-14: 2. Hastaya ait sperm boynunda adjuvant sentriyol

AS; adjuvan sentriyol, BP; bazal plate, M; mitokondri



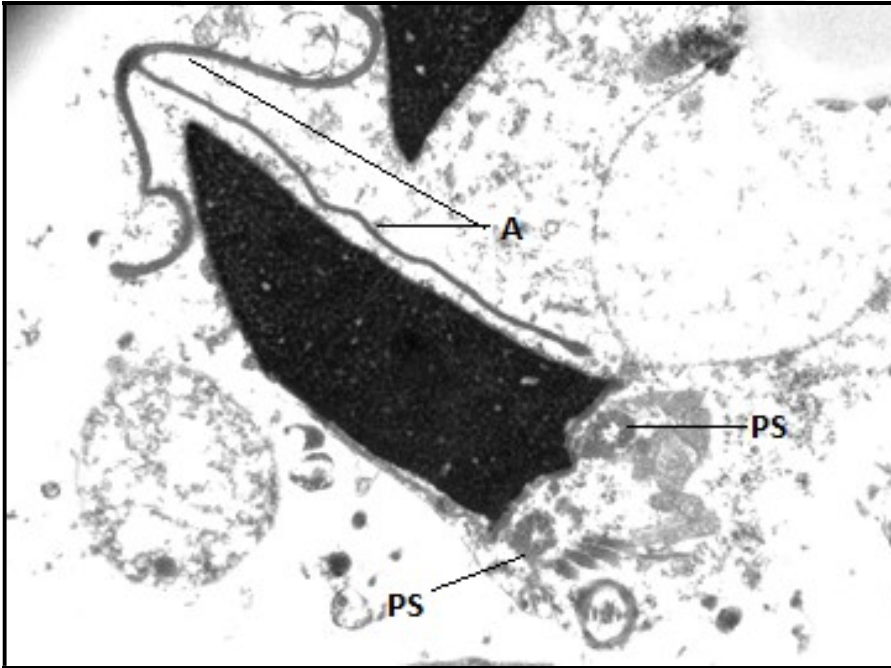
Şekil 4-15: 3. Hastaya ait spermatozoonda, sitoplazmik artık

ÇC; çekirdek cebi, M; mitokondri, V; vakuol, PS; proksimal sentriyol, ADS; atipik distal sentriyol



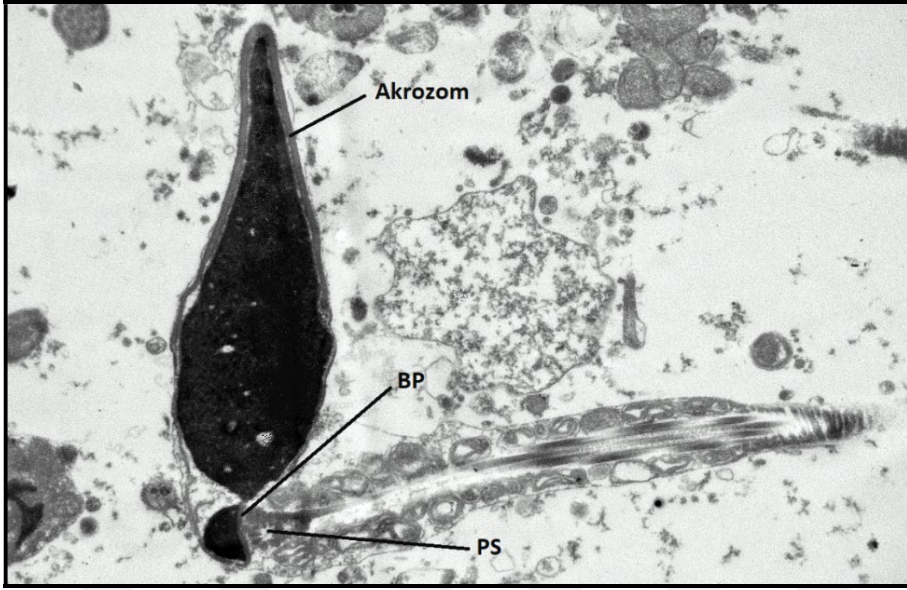
Şekil 4-16: 4. Hastaya ait spermatozoonda, implantasyon fossasında kayma

Ok; baş uzun eksenine doğrultusunda yerleşmemiş olan boyun, V; vakuol, ÇC; çekirdek cebi)



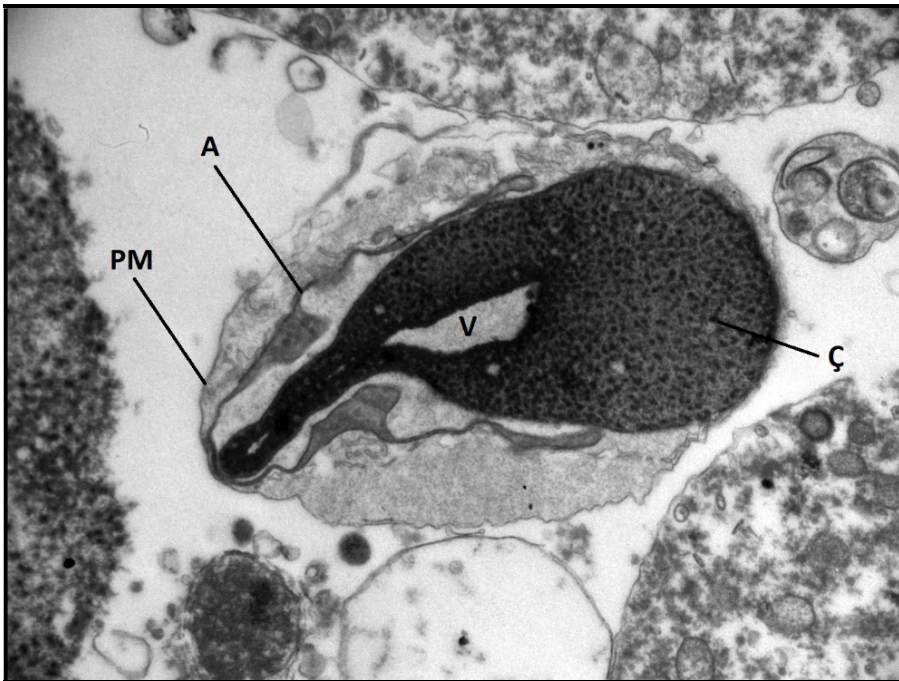
Şekil 4-16: 5. Hastaya ait spermatozoonda çift boyun ve düzensiz akrozom

PS; proksimal sentriyol, A; akrozom



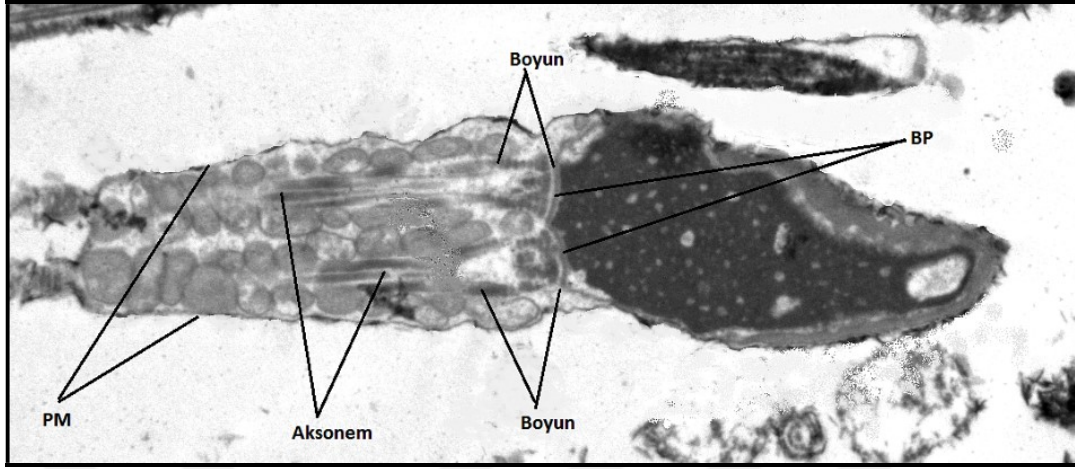
Şekil 4-17: 5. Hastaya ait spermatozoonda bükük baş

Baş ve kuyruğun anormal şekilde bağlanması sonucu oluşan bükük baş görüntüsü (BP; bazal plate, PS; proksimal seentriyol).



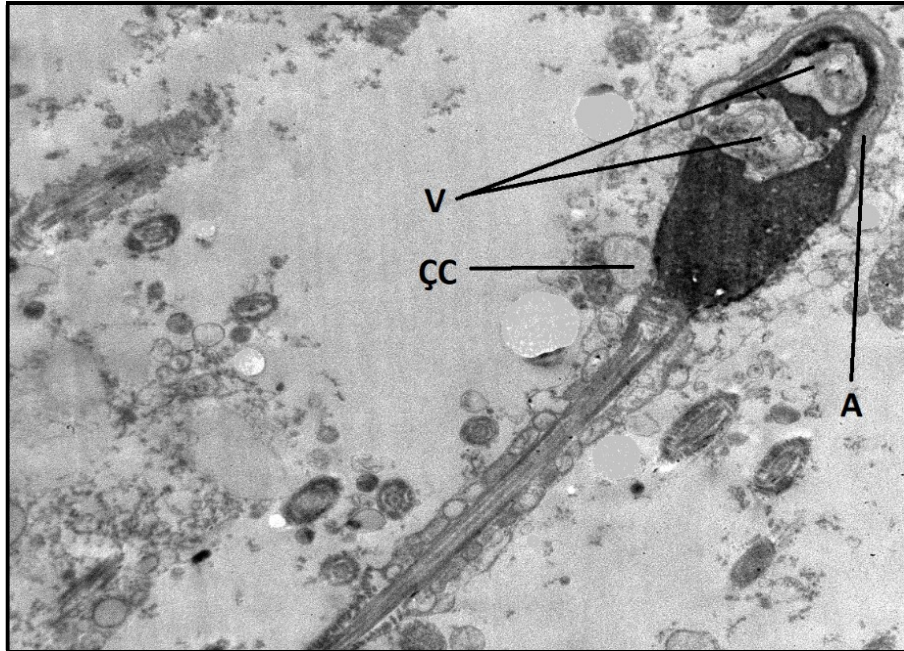
Şekil 4-18: 6. Hastaya ait spermatozoonda decondanse çekirdek

Düzensiz akrozoom, çekirdekten uzak membran, decondanse çekirdek görüntüsü (PM; plazma membranı, A; akrozoom, Ç; çekirdek, V; vakuol).



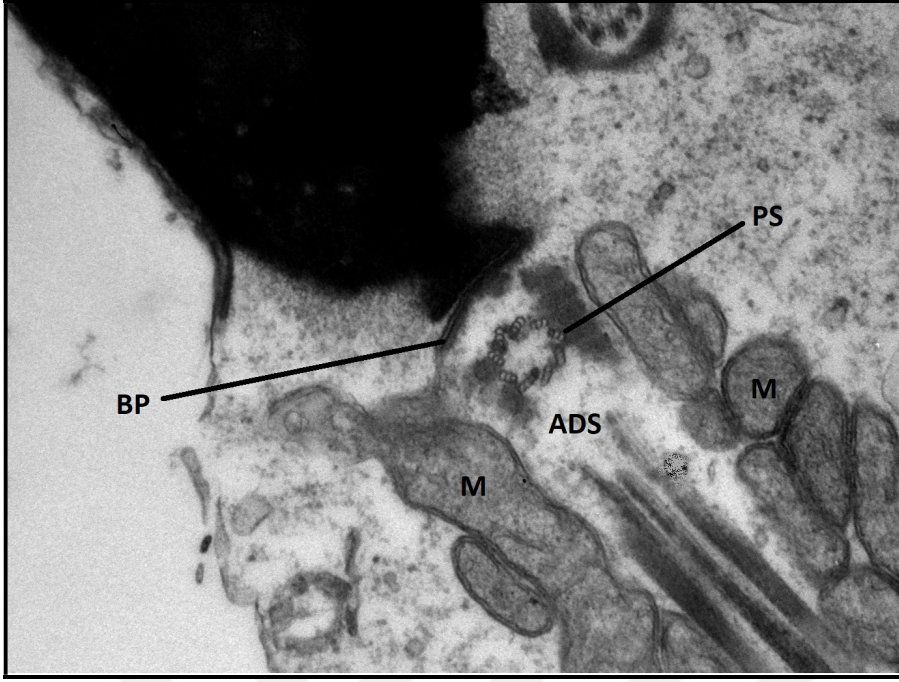
Şekil 4-19: 7. Hastaya ait spermatozoonda çift boyun

İki adet bazal plate, iki adet boyun ve aynı zarda iki adet kuyruk yapısı (BP; bazal plak, PM; plazma membranı).



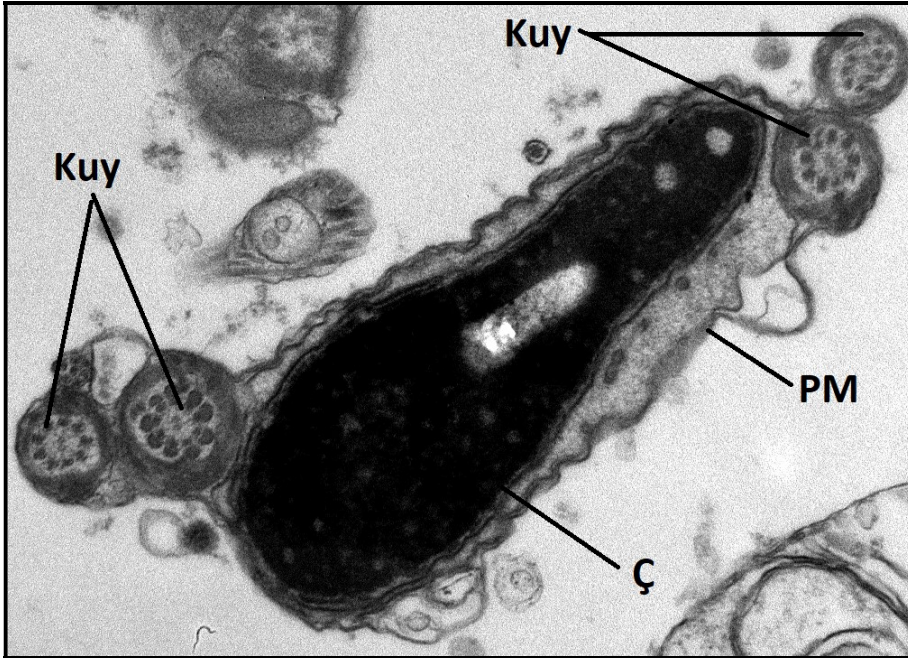
Şekil 4-20: 8. Hastaya ait spermatozoonda çekirdek vakuolü

Çekirdek hacminin %30'u oranında vakuol içeriği (V; vakuol, ÇC; çekirdek cebi, A; akrozom)



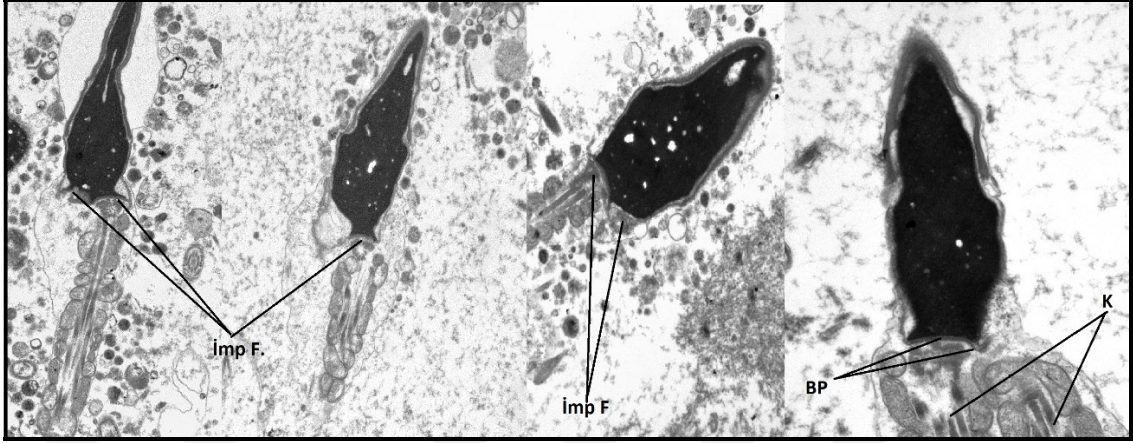
Şekil 4-21: 9. Hastaya ait spermatozoonda proksimal sentriyol

Sitoplazmik artık ve birden çok kuyruk kesiti görüntüsü içeren boyunda proksimal ve atipik distal sentriyol. BP; bazal plate, PS;proksimal sentriyol, ADS; atipik distal sentriyol, M; mitokondri



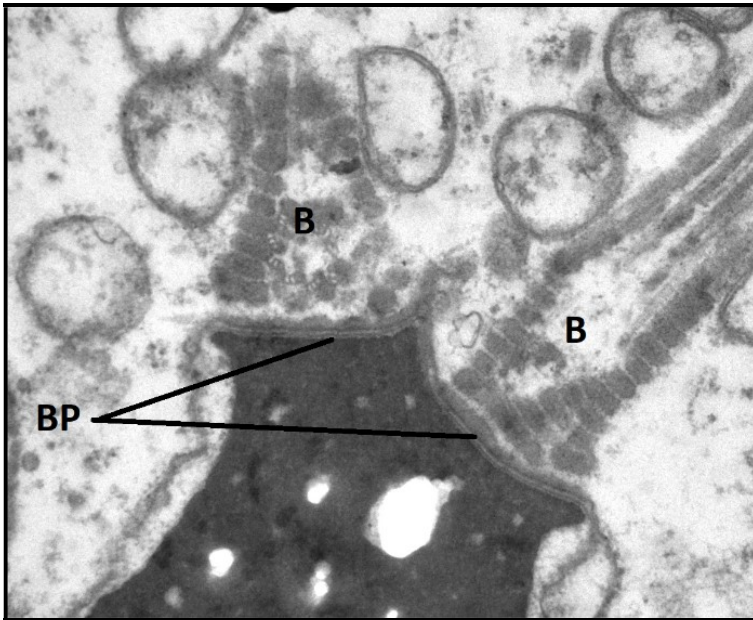
Şekil 4-22: 9. Hastaya ait anormal morfolojiye sahip spermatozoon

Anormal yerleşimli ve birden çok sayıda kuyruk (Kuy; kuyruk, PM; plazma membrane, Ç; çekirdek).



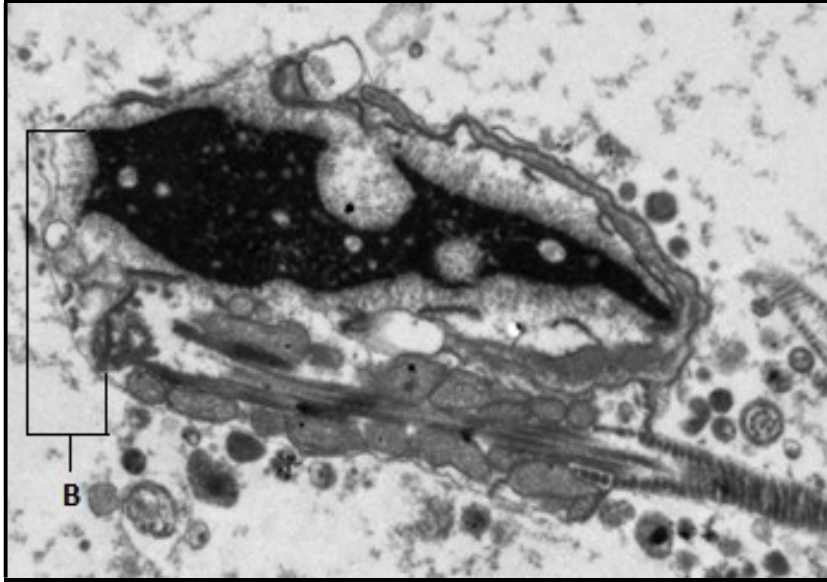
Şekil 4-23: 10. Hastaya ait spermatozoonlarda, implantasyon fossasında kayma ve çift boyun görüntüleri.

En sağda, yukarı doğru dönerek devam eden bazal plate görüntüsü (İmp F; implantasyon fossası, BP; bazal plate, K; kuyruk)

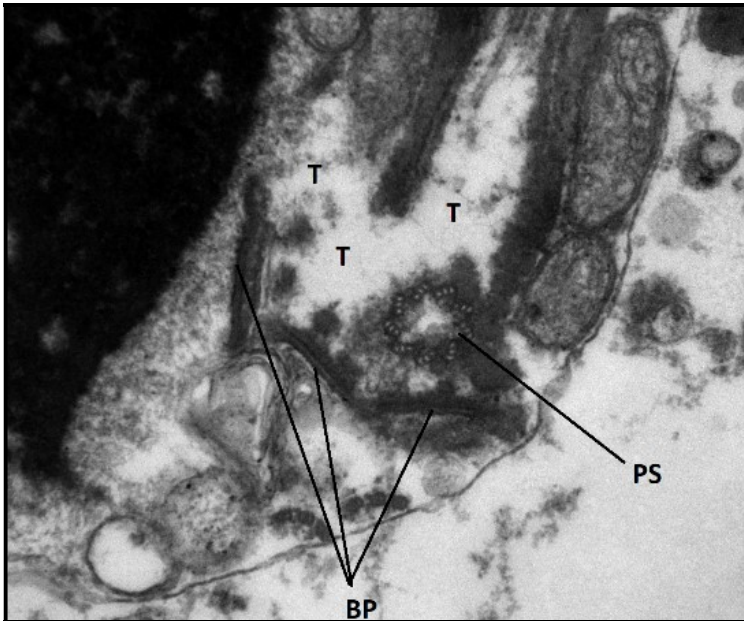


Şekil 4-24: 10. Hastaya ait spermatozoonda çift boyun

B; boyun, BP; bazal plak

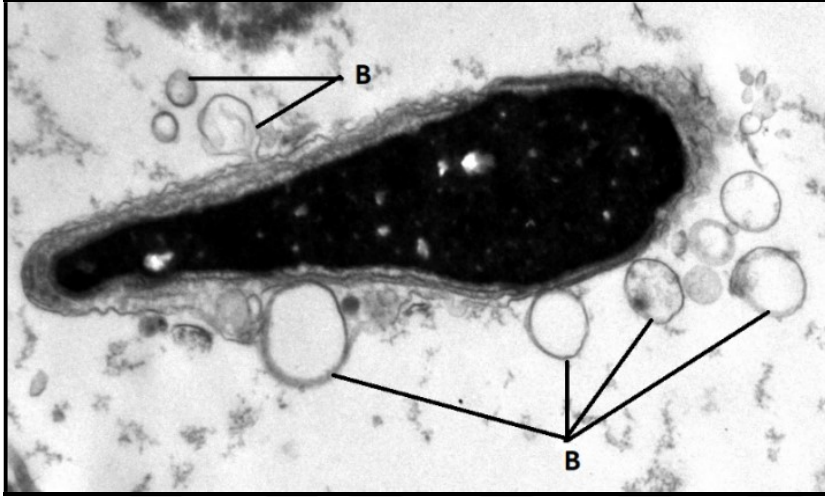


Şekil 4-25:10. Hastaya ait bükük başlı ve üç boyunlu spermatozoon



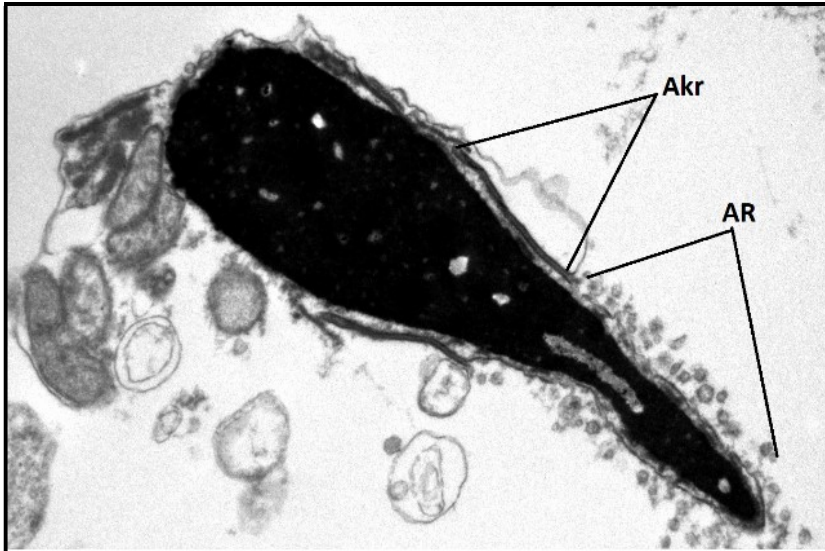
Şekil 4-26: 10. Hastaya ait Şekil 4.21’de yer alan spermin boyun görüntüsü

Büyütülmüş görüntüde, üç bazal plak (BP), üç tonoz boşluğu (T) ve proksimal sentriyol (PS).



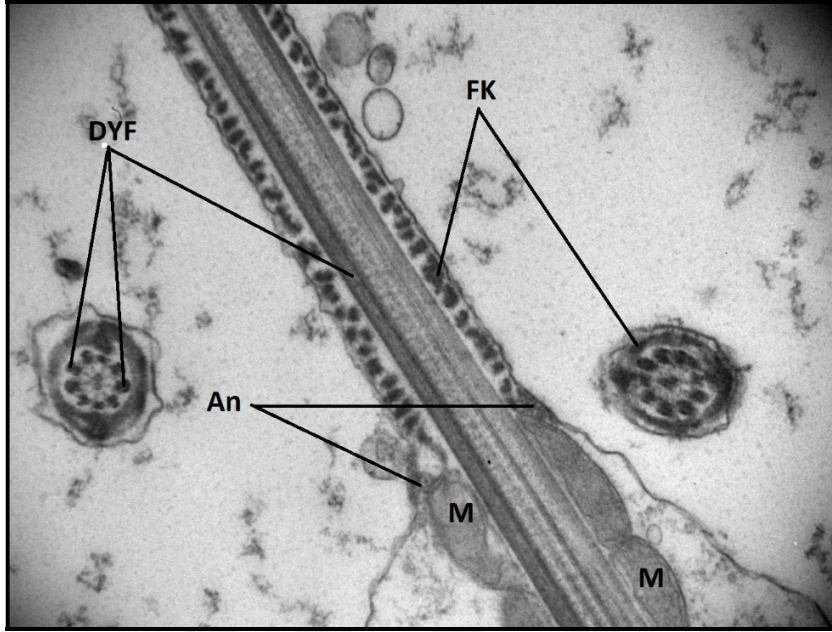
Şekil 4-27: Şekil 4-27: Akrozom Reaksiyonu 1

Baloncuklar (B) şeklinde membranın dışına taşan akrozom içeriği



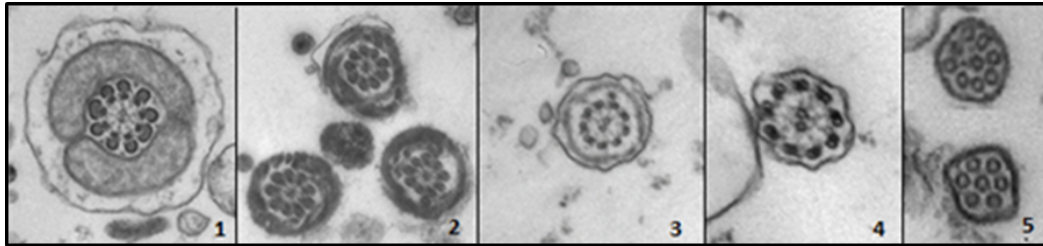
Şekil 4-28: Akrozom Reaksiyonu 2

İntakt akrozom yapısı (Akr) ve reaksiyona uğramış akrozom bölgesi (AR).



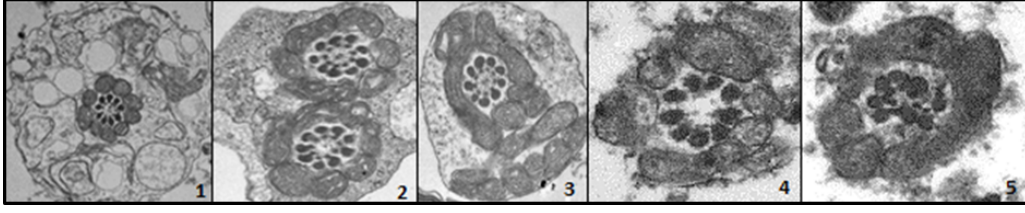
Şekil 4-29: Kuyruk, enine ve uzamına kesitler

DYP; dış yoğun fibriller, FK; fibröz kılıf, An; annulus, M; mitokondri



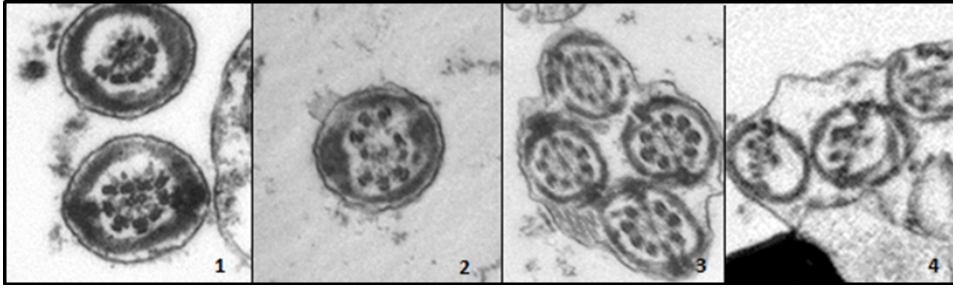
Şekil 4-30: Normal yapıdaki sperm kuyruğunun, baştan uca doğru, enine kesitleri

- 1-Orta parça (en içten dışa doğru; aksonem, dış yoğun lifler, mitokondriyal sarmal, plazma membranı)
- 2-Esas parçanın üst bölgesi (en içten dışa doğru; aksonem, dış yoğun lifler, fibröz kılıf, plazma membranı)
- 3-Esas parçanın alt bölgesi (en içten dışa doğru; aksonem, fibröz kılıf, plazma membranı)
- 4-Son parça (içte aksonem, dışta plazma membranı)
- 5-Son parçanın en uç kısmı (gittikçe eksilen mikrotübüllerle aksonemin kayboluşu, dışta plazma membranı)



Şekil 4-31 Şekil: Kuyruk orta parça anomalileri

- 1-Kuyruk çevresinde sitoplazmik artık 2-Aynı zarda çift kuyruk
- 3-Fazladan mitokondri 4-“9+0” aksonem yapısı
- 5-Düzensiz yerleşimli dış yoğun lifler ve mikrotübüller



Şekil 4-32: Kuyruk esas parça anomalileri

- 1-Üstte yarım aksonem, altta düzensiz yerleşimli mikrotübüller
- 2-Kırık aksonem 3-Aynı zarda dört kuyruk bulunması
- 4-Eksik ve düzensiz yerleşimli mikrotübüller

TEM sperm değerlendirmeleri sonuçlarına aşağıda yer verilmiştir (Tablo 4.1-4.22).

Tablo 4-1: Kontrol örneği TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (Kontrol)					
Baş Şekli	Normal	%94.0		Normal	%81.0
	Başsız	%0.0		Azalmış İçerik	%9.0
	Bükük	%0.0		Artmış İçerik	%0.0
	Anormal	%6.0		Düzensiz Akrozom	%3.7
Membran	Düzenli	%91.7	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	%1.3
	Düzensiz	%8.3		Akrozom Yokluğu	%3.0
	Çek.'kten uzakta memb.	%5.7		Akrozom Reaksiyonu	%2.0
Çekirdek	Tek parça	%98.3		Normal Bağlantı Parçası	%85.0
	İki parça	%1.7		Anormal Bağlantı Parçası	%15.0
	Çok parça	%0.0		Sitoplazmik artık	%15.0
	Değişmiş çek.	%0.0		İnklüzyon	%0.0
	Çek. Cebi	%9.0		Vakuol	%9.0
Kondensasyon	1	%1.7	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	%0.0
	2	%1.3		Anormal Bazal Plate	%0.0
	3	%2.7		İmplantasyon Fos.'da Kayma	%2.0
	4	%12.7		Çift Boyun	%0.0
	5	%81.7		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	%4.0
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	%84.0	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	%98.0
	15%	%7.3		Aynı Zarda Çok Kuyruk	%0.0
	20%	%2.7		Çift Kuyruk	%2.0
	25%	%2.0		Düzenli Mitokondri Dizilimi	%98.0
	%30 ve üstü	%4.0		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	%2.0
Vakuol Sayısı	0-1	%90.7	Yapısal Kuyruk Öz.	Eksik Mitokondri	%0.0
	2	%7.3		Dağılmış Mitokondri	%0.0
	3	%1.3		Kısa Mitokondriyal Kılıf	%2.0
	4	%0.7		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	%0.0
	5 ve üstü	%0.0		Düzensiz Fibriller	%0.0

Tablo 4-2: Kontrol örneği TEM kuyruk değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (Kontrol)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	%96.0	Kuy. Kes. Say.	1	%96.0
	2	%4.0		2	%4.0
	3	%0.0		3	%0.0
	4 ve üzeri	%0.0		4 ve üzeri	%0.0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	%80.0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		%2.0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	%16.0	Düzensiz Fibröz Kılıf		%0.0
	Eksik Mitokondri	%4.0	Düzensiz Uzun Kolonlar		%0.0
	Fazla Mitokondri	%0.0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%74.0
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.	%96.0		9+0 Aksonem Yapısı	%2.0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	%0.0		Aks. Eksik Mikrotübül	%10.0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	%4.0		Aks. Fazla Mikrotübül	%0.0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%86.0		Kırık ya da Yarım Aks.	%8.0
	9+0 Aksonem Yapısı	%2.0		Aksonemin Yokluğu	%2.0
	Aks. Eksik Mikrotübül	%4.0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	%4.0
	Aks. Fazla Mikrotübül	%2.0			
	Kırık ya da Yarım Aks.	%0.0			
	Aksonemin Yokluğu	%4.0			
	Düzensiz Yer. Mikrotü.	%2.0			

Tablo 4-3: 1. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (1. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	% 38,7	Akrozom	Normal	% 3,3
	Başsız	% 0,0		Azalmış İçerik	% 17,3
	Bükük	% 4,0		Artmış İçerik	% 5,7
	Anormal	% 61,3		Düzensiz Akrozom	% 24,3
Membran	Düzenli	% 49,3	Akrozom	Çek. 'den Uzak Akrozom	% 3,3
	Düzensiz	% 50,7		Akrozom Yokluğu	% 47,7
	Çek. 'kten uzakta memb.	% 29,3		Akrozom Reaksiyonu	% 9,3
Çekirdek	Tek parça	% 68,0	Bağlantı Parçası	Normal Bağlantı Parçası	% 46,0
	İki parça	% 20,7		Anormal Bağlantı Parçası	% 54,0
	Çok parça	% 11,3		Sitoplazmik artık	% 29,0
	Değişmiş çek.	% 5,7		İnklüzyon	% 2,0
	Çek. Cebi	% 7,0		Vakuol	% 7,5
Kondensasyon	1	% 1,3	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	% 0,0
	2	% 9,7		Anormal Bazal Plate	% 2,0
	3	% 33,0		İmplantasyon Fos. 'da Kayma	% 0,5
	4	% 40,3		Çift Boyun	% 35,0
	5	% 15,7		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	% 27,0
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	% 43,0	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	% 44,0
	15%	% 28,3		Aynı Zarda Çok Kuyruk	% 44,0
	20%	% 17,7		Çift Kuyruk	% 12,0
	25%	% 2,3		Düzenli Mitokondri Dizilimi	% 32,0
	%30 ve üstü	% 8,7		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	% 40,0
Vakuol Sayısı	0-1	% 31,7	Yapısal Kuyruk Öz.	Eksik Mitokondri	% 0,0
	2	% 28,0		Dağılmış Mitokondri	% 4,0
	3	% 14,7		Kısa Mitokondriyal Kılıf	% 4,0
	4	% 6,3		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	% 24,0
	5 ve üstü	% 19,3		Düzensiz Fibriller	% 4,0

Tablo 4-4: 1. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (1. Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	%70.0	Kuy. Kes. Say.	1	%84.0
	2	%24.0		2	%10.0
	3	%4.2		3	%6.0
	4 ve üzeri	%2.0		4 ve üzeri	% 0,0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	%52.0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		%18.0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	%44.0	Düzensiz Fibröz Kılıf		%14.0
	Eksik Mitokondri	%20.0	Düzensiz Uzun Kolonlar		%12.0
	Fazla Mitokondri	%30.0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%66.0
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.	%82.0		9+0 Aksonem Yapısı	%2.0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	%10.0		Aks. Eksik Mikrotübül	% 18,0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	%10.0		Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%68.0		Kırık ya da Yarım Aks.	%16.0
	9+0 Aksonem Yapısı	%8.0		Aksonemin Yokluğu	%4.0
	Aks. Eksik Mikrotübül	%16.0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	%14.0
	Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0			
	Kırık ya da Yarım Aks.	%0.0			
	Aksonemin Yokluğu	%6.0			
	Düzensiz Yer. Mikrotü.	%4.0			

Tablo 4-5: 2. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (2. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	% 77,3		Normal	% 54,0
	Başsız	% 8,0		Azalmış İçerik	% 22,0
	Bükük	% 0,0		Artmış İçerik	% 2,3
	Anormal	% 22,7		Düzensiz Akrozom	% 9,7
Membran	Düzenli	% 75,3	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	% 9,0
	Düzensiz	% 24,3		Akrozom Yokluğu	% 10,3
	Çek.'kten uzakta memb.	% 21,7		Akrozom Reaksiyonu	% 5,3
Çekirdek	Tek parça	% 94,0		Normal Bağlantı Parçası	% 63,0
	İki parça	% 0,7		Anormal Bağlantı Parçası	% 37,0
	Çok parça	% 0,0		Sitoplazmik artık	% 33,5
	Değişmiş çek.	% 4,0		İnklüzyon	% 0,5
	Çek. Cebi	% 10,0		Vakuol	% 16,5
Kondensasyon	1	% 2,3	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	% 0,0
	2	% 4,7		Anormal Bazal Plate	% 12,0
	3	% 10,0		İmplantasyon Fos.'da Kayma	% 4,5
	4	% 30,3		Çift Boyun	% 4,0
	5	% 53,0		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	% 15,5
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	% 72,7	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	%84,0
	15%	% 14,3		Aynı Zarda Çok Kuyruk	% 12,0
	20%	% 7,0		Çift Kuyruk	% 4,0
	25%	% 1,3		Düzenli Mitokondri Dizilimi	% 84,0
	%30 ve üstü	% 4,7		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	% 12,0
Vakuol Sayısı	0-1	% 59,7	Yapısal Kuyruk Öz.	Eksik Mitokondri	% 0,0
	2	% 21,0		Dağılmış Mitokondri	% 0,0
	3	% 13,3		Kısa Mitokondriyal Kılıf	% 20,0
	4	% 3,7		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	% 8,0
	5 ve üstü	% 2,3		Düzensiz Fibriller	% 0,0

Tablo 4-6: 2. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (2. Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	% 82,0	Kuy. Kes. Say.	1	% 94,0
	2	% 10,0		2	% 6,0
	3	% 4,0		3	% 0,0
	4 ve üzeri	%4,0		4 ve üzeri	% 0,0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	% 80,0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		% 2,0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	% 12,0	Düzensiz Fibröz Kılıf		% 18,0
	Eksik Mitokondri	% 12,0	Düzensiz Uzun Kolonlar		% 14,0
	Fazla Mitokondri	% 4,0			
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.	% 84,0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	% 60,0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	% 8,0		9+0 Aksonem Yapısı	% 4,0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	% 8,0		Aks. Eksik Mikrotübül	% 12,0
				Aks. Fazla Mikrotübül	% 4,0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	% 66,0	Aksonem	Kırık ya da Yarım Aks.	% 12,0
	9+0 Aksonem Yapısı	% 6,0		Aksonemin Yokluğu	% 8,0
	Aks. Eksik Mikrotübül	% 8,0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	% 4,0
	Aks. Fazla Mikrotübül	% 4,0			
	Kırık ya da Yarım Aks.	% 0,0			
	Aksonemin Yokluğu	% 16,0			
	Düzensiz Yer. Mikrotü.	% 0,0			

Tablo 4-7: 3. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (3. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	% 91,7		Normal	% 72,3
	Başsız	% 0,0		Azalmış İçerik	% 18,0
	Bükük	% 0,0		Artmış İçerik	% 0,7
	Anormal	% 8,3		Düzensiz Akrozom	% 4,3
Membran	Düzenli	% 83,0	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	% 3,3
	Düzensiz	% 17,0		Akrozom Yokluğu	% 3,3
	Çek.'kten uzakta memb.	% 5,7		Akrozom Reaksiyonu	% 2,3
Çekirdek	Tek parça	% 99,0		Normal Bağlantı Parçası	% 73,0
	İki parça	% 1,0		Anormal Bağlantı Parçası	37%
	Çok parça	% 0,0		Sitoplazmik artık	22,00%
	Değişmiş çek.	% 0,0		İnklüzyon	% 0,0
	Çek. Cebi	% 14,5		Vakuol	% 19,5
Kondensasyon	1	% 0,0	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	% 0,0
	2	% 1,0		Anormal Bazal Plate	% 0,5
	3	% 4,3		İmplantasyon Fos.'da Kayma	% 3,0
	4	% 16,3		Çift Boyun	% 0,5
	5	% 79,7		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	% 11,0
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	% 73,0	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	% 80,0
	15%	% 13,7		Aynı Zarda Çok Kuyruk	% 20,0
	20%	% 4,7		Çift Kuyruk	% 0,0
	25%	% 5,3		Düzenli Mitokondri Dizilimi	% 76,0
	%30 ve üstü	% 2,0		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	% 8,0
Vakuol Sayısı	0-1	% 76,3	Yapısal Kuyruk Öz.	Eksik Mitokondri	% 0,0
	2	% 16,0		Dağılmış Mitokondri	% 16,0
	3	% 5,7		Kısa Mitokondriyal Kılıf	% 8,0
	4	% 2,3		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	% 8,0
	5 ve üstü	% 0,7		Düzensiz Fibriller	% 8,0

Tablo 4-8: 3. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (3. Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	% 80,0	Kuy. Kes. Say.	1	%58,0
	2	% 8,0		2	% 18,0
	3	% 8,0		3	% 14,0
	4 ve üzeri	% 4,0		4 ve üzeri	% 10,0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	% 54,0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		% 4,0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	% 46,0	Düzensiz Fibröz Kılıf		% 8,0
	Eksik Mitokondri	% 6,0	Düzensiz Uzun Kolonlar		% 2,0
	Fazla Mitokondri	% 10,0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	% 38,0
Dış Yoğun Fibril	Normal Dış Yoğun Fibr.	% 64,0		9+0 Aksonem Yapısı	% 2,0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	% 12,0		Aks. Eksik Mikrotübül	% 28,0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	% 22,0		Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	% 66,0		Kırık ya da Yarım Aks.	% 22,0
	9+0 Aksonem Yapısı	% 4,0		Aksonemin Yokluğu	% 6,0
	Aks. Eksik Mikrotübül	% 14,0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	% 22,0
	Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0			
	Kırık ya da Yarım Aks.	% 4,0			
	Aksonemin Yokluğu	% 8,0			
	Düzensiz Yer. Mikrotü.	% 14,0			

Tablo 4-9: 4. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (4. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	% 75,0	Akrozom	Normal	% 69,0
	Başsız	% 8,0		Azalmış İçerik	% 16,0
	Bükük	% 4,0		Artmış İçerik	% 5,0
	Anormal	% 25,0		Düzensiz Akrozom	%11,0
Membran	Düzenli	% 76,3	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	% 6,7
	Düzensiz	% 23,7		Akrozom Yokluğu	% 1,3
	Çek.'kten uzakta memb.	% 18,3		Akrozom Reaksiyonu	% 1,7
Çekirdek	Tek parça	% 97,7	Bağlantı Parçası	Normal Bağlantı Parçası	% 62,0
	İki parça	% 2,3		Anormal Bağlantı Parçası	% 38,0
	Çok parça	% 0,0		Sitoplazmik artık	% 32,0
	Değişmiş çek.	% 0,7		İnklüzyon	% 0,0
	Çek. Cebi	% 3,7		Vakuol	% 5,0
Kondensasyon	1	% 0,3	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	% 0,0
	2	% 2,0		Anormal Bazal Plate	% 4,0
	3	% 11,0		İmplantasyon Fos.'da Kayma	% 16,5
	4	% 27,7		Çift Boyun	% 0,5
	5	% 59,0		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	% 31,5
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	% 70,3	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	% 76,0
	15%	% 18,3		Aynı Zarda Çok Kuyruk	% 24,0
	20%	% 4,3		Çift Kuyruk	% 0,0
	25%	% 3,0		Düzenli Mitokondri Dizilimi	% 64,0
	%30 ve üstü	% 4,0		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	% 20,0
Vakuol Sayısı	0-1	% 72,0	Yapısal Kuyruk Öz.	Eksik Mitokondri	% 0,0
	2	% 15,7		Dağılmış Mitokondri	% 0,0
	3	% 10,0		Kısa Mitokondriyal Kılıf	% 4,0
	4	% 2,0		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	% 12,0
	5 ve üstü	% 0,3		Düzensiz Fibriller	% 8,0

Tablo 4-10: 4. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (4. Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	%70.0	Kuy. Kes. Say.	1	%68.0
	2	%6.0		2	% 4,0
	3	%16.0		3	%10.0
	4 ve üzeri	%8.0		4 ve üzeri	%18.0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	%78.0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		%0.0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	% 22,0	Düzensiz Fibröz Kılıf		%8.0
	Eksik Mitokondri	%12.0	Düzensiz Uzun Kolonlar		%0.0
	Fazla Mitokondri	%20.0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%68.0
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.	%80.0		9+0 Aksonem Yapısı	% 0,0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	% 4,0		Aks. Eksik Mikrotübül	%12.0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	%16.0		Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%80.0		Kırık ya da Yarım Aks.	%10.0
	9+0 Aksonem Yapısı	%0.0		Aksonemin Yokluğu	% 0,0
	Aks. Eksik Mikrotübül	%8.0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	%16.0
	Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0			
	Kırık ya da Yarım Aks.	%2.0			
	Aksonemin Yokluğu	%6.0			
	Düzensiz Yer. Mikrotü.	%4.0			

Tablo 4-11: 5. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (5. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	% 72,0		Normal	% 41,3
	Başsız	% 4,0		Azalmış İçerik	% 17,3
	Bükük	% 12,0		Artmış İçerik	% 0,3
	Anormal	% 28,0		Düzensiz Akrozom	% 20,3
Membran	Düzenli	% 64,0	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	% 2,0
	Düzensiz	% 36,0		Akrozom Yokluğu	% 18,3
	Çek.'kten uzakta memb.	% 15,0		Akrozom Reaksiyonu	% 4,3
Çekirdek	Tek parça	% 88,0		Normal Bağlantı Parçası	% 69,0
	İki parça	% 10,0		Anormal Bağlantı Parçası	% 31,0
	Çok parça	% 2,0		Sitoplazmik artık	% 25,0
	Değişmiş çek.	% 4,0		İnklüzyon	% 0,5
	Çek. Cebi	% 1,5		Vakuol	% 10,0
Kondensasyon	1	% 0,0	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	% 1,5
	2	% 6,7		Anormal Bazal Plate	% 0,0
	3	% 16,7		İmplantasyon Fos.'da Kayma	% 13,5
	4	% 40,3		Çift Boyun	% 5,5
	5	% 36,3		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	% 14,0
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	% 77,0	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	% 88,0
	15%	% 10,7		Aynı Zarda Çok Kuyruk	% 8,0
	20%	% 4,7		Çift Kuyruk	% 4,0
	25%	% 4,3		Düzenli Mitokondri Dizilimi	% 76,0
	%30 ve üstü	% 3,3		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	% 8,0
Vakuol Sayısı	0-1	% 86,3	Yapısal Kuyruk Öz.	Eksik Mitokondri	% 0,0
	2	% 7,3		Dağılmış Mitokondri	% 8,0
	3	% 3,3		Kısa Mitokondriyal Kılıf	% 12,0
	4	% 1,7		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	% 16,0
	5 ve üstü	% 1,3		Düzensiz Fibriller	% 8,0

Tablo 4-12: 5. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (5.Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	%94.0	Kuy. Kes. Say.	1	%94.0
	2	%4.0		2	%6.0
	3	%2.0		3	%0.0
	4 ve üzeri	%0.0		4 ve üzeri	%0.0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	%88.0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		%0.0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	%12.0	Düzensiz Fibröz Kılıf		%0.0
	Eksik Mitokondri	%0.0	Düzensiz Uzun Kolonlar		%0.0
	Fazla Mitokondri	%0.0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%62.0
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.	%84.0		9+0 Aksonem Yapısı	%0.0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	%8.0		Aks. Eksik Mikrotübül	%32.0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	%10.0		Aks. Fazla Mikrotübül	%0.0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%68.0		Kırık ya da Yarım Aks.	%4.0
	9+0 Aksonem Yapısı	%12.0		Aksonemin Yokluğu	%0.0
	Aks. Eksik Mikrotübül	%8.0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	%6.0
	Aks. Fazla Mikrotübül	%0.0			
	Kırık ya da Yarım Aks.	%2.0			
	Aksonemin Yokluğu	%6.0			
	Düzensiz Yer. Mikrotü.	%6.0			

Tablo 4-13: 6. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (6. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	%44.7		Normal	%18.0
	Başsız	%6.7		Azalmış İçerik	%23.7
	Bükük	%0.0		Artmış İçerik	%1.7
	Anormal	%48.7		Düzensiz Akrozom	%17.0
Membran	Düzenli	%76.0	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	%3.3
	Düzensiz	%24.0		Akrozom Yokluğu	%39.7
	Çek.'kten uzakta memb.	%54.7		Akrozom Reaksiyonu	%0.3
Çekirdek	Tek parça	%99.3		Normal Bağlantı Parçası	%44.0
	İki parça	%0.7		Anormal Bağlantı Parçası	%56.0
	Çok parça	% 0,0		Sitoplazmik artık	%37.5
	Değişmiş çek.	%0.0		İnklüzyon	%0.0
	Çek. Cebi	%0.0		Vakuol	%25.0
Kondensasyon	1	%0.3	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	%0.0
	2	%4.7		Anormal Bazal Plate	%0.0
	3	%25.3		İmplantasyon Fos.'da Kayma	%5.5
	4	%53.0		Çift Boyun	%0.0
	5	%16.6		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	%39.0
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	%48.3	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	%80.0
	15%	%23.6		Aynı Zarda Çok Kuyruk	%20.0
	20%	%12.3		Çift Kuyruk	%0.0
	25%	%6.0	Yapısal Kuyruk Öz.	Düzenli Mitokondri Dizilimi	%98.0
	%30 ve üstü	%9.7		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	%2.0
Vakuol Sayısı	0-1	%81.0		Eksik Mitokondri	%0.0
	2	%17.7		Dağılmış Mitokondri	%0.0
	3	%7.0		Kısa Mitokondriyal Kılıf	%54.0
	4	%0.7		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	%0.0
	5 ve üstü	%2.7		Düzensiz Fibriller	%52.0

Tablo 4-14: 6. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (6. Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1		Kuy. Kes. Say.	1	%64.0
	2			2	%16.0
	3			3	%8.0
	4 ve üzeri			4 ve üzeri	%12.0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi		Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		%8.0
	Düzensiz Mit. Dizilimi		Düzensiz Fibröz Kılıf		%0.0
	Eksik Mitokondri		Düzensiz Uzun Kolonlar		%0.0
	Fazla Mitokondri		Normal Aks. Yapısı		%52.0
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.		9+0 Aksonem Yapısı		% 0,0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik		Aks. Eksik Mikrotübül		%12.0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.		Aks. Fazla Mikrotübül		% 0,0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı		Aksonem	Kırık ya da Yarım Aks.	%8.0
	9+0 Aksonem Yapısı			Aksonemin Yokluğu	%12.0
	Aks. Eksik Mikrotübül			Düzensiz Yer. Mikrotü.	%16.0
	Aks. Fazla Mikrotübül				
	Kırık ya da Yarım Aks.				
	Aksonemin Yokluğu				
	Düzensiz Yer. Mikrotü.				

6. Hastanın PAP boyama metoduyla gerçekleştirilen morfolojik incelemesinde spermelerin tamamına yakınının kuyruksuz olduğu, var olan kuyrukların da çok kısa olduğu gözlenmiştir. TEM incelemesinde kuyruk orta parçaya ait değerlendirme yapılabilecek sayıda kesite rastlanamamıştır.

Tablo 4-15: 7. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (7. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	% 80,7		Normal	% 57,3
	Başsız	% 0,0		Azalmış İçerik	% 18,7
	Bükük	% 0,0		Artmış İçerik	% 1,7
	Anormal	% 19,3		Düzensiz Akrozom	%12,3
Membran	Düzenli	% 66,0	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	% 6,3
	Düzensiz	% 34,0		Akrozom Yokluğu	% 12,7
	Çek.'kten uzakta memb.	% 17,3		Akrozom Reaksiyonu	% 0,0
Çekirdek	Tek parça	% 95,7	Bağlantı Parçası	Normal Bağlantı Parçası	% 74,0
	İki parça	% 4,0		Anormal Bağlantı Parçası	% 26,0
	Çok parça	% 0,3		Sitoplazmik artık	% 24,0
	Değişmiş çek.	% 7,0		İnklüzyon	% 2,0
	Çek. Cebi	% 42,5		Vakuol	% 28,5
Kondensasyon	1	% 0,3		Granüllü Bağlantı Parçası	% 0,0
	2	% 2,3		Anormal Bazal Plate	% 0,0
	3	% 8,0		İmplantasyon Fos. 'da Kayma	% 8,5
	4	% 17,0		Çift Boyun	%4,3
	5	% 72,3		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	% 2,7
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	% 43,0	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	% 96,0
	15%	% 19,7		Aynı Zarda Çok Kuyruk	% 4,0
	20%	% 13,7		Çift Kuyruk	% 0,0
	25%	% 6,7	Yapısal Kuyruk Öz.	Düzenli Mitokondri Dizilimi	% 92,0
	%30 ve üstü	% 17,0		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	% 8,0
Vakuol Sayısı	0-1	% 46,7		Eksik Mitokondri	% 0,0
	2	% 26,3		Dağılmış Mitokondri	% 0,0
	3	% 15,3		Kısa Mitokondriyal Kılıf	% 4,0
	4	% 4,0		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	% 4,0
	5 ve üstü	% 4,0		Düzensiz Fibriller	% 0,0

Tablo 4-16: 7. Hasta TEM kuyruk değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (7. Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	% 96,0	Kuy. Kes. Say.	1	%96,0
	2	% 4,0		2	% 4,0
	3	% 0,0		3	% 0,0
	4 ve üzeri	% 0,0		4 ve üzeri	% 0,0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	% 78,0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		% 0,0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	% 22,0	Düzensiz Fibröz Kılıf		% 4,0
	Eksik Mitokondri	% 2,0	Düzensiz Uzun Kolonlar		% 4,0
	Fazla Mitokondri	% 10,0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	% 80,0
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.	% 96,0		9+0 Aksonem Yapısı	% 0,0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	% 4,0		Aks. Eksik Mikrotübül	% 18,0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	% 0,0		Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0
	Aksonem	Normal Aks. Yapısı		% 94,0	Kırık ya da Yarım Aks.
9+0 Aksonem Yapısı		% 0,0		Aksonemin Yokluğu	% 0,0
Aks. Eksik Mikrotübül		% 4,0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	% 4,0
Aks. Fazla Mikrotübül		% 0,0			
Kırık ya da Yarım Aks.		% 2,0			
Aksonemin Yokluğu		% 2,0			
Aksonem	Düzensiz Yer. Mikrotü.	%0.0			

Tablo 4-17: 8. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (8. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	% 95,0		Normal	% 37,0
	Başsız	% 0,0		Azalmış İçerik	% 29,3
	Bükük	% 0,0		Artmış İçerik	% 2,3
	Anormal	% 5,0		Düzensiz Akrozom	% 3,7
Membran	Düzenli	% 57,0	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	% 0,3
	Düzensiz	% 43,0		Akrozom Yokluğu	% 3,3
	Çek.'kten uzakta memb.	% 7,7		Akrozom Reaksiyonu	% 32,7
Çekirdek	Tek parça	% 100,0		Normal Bağlantı Parçası	% 81,0
	İki parça	% 0,0		Anormal Bağlantı Parçası	% 19,0
	Çok parça	% 0,0		Sitoplazmik artık	% 9,5
	Değişmiş çek.	% 0,3		İnklüzyon	% 2,0
	Çek. Cebi	% 4,0		Vakuol	% 16,5
Kondensasyon	1	% 0,0	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	% 0,0
	2	% 1,0		Anormal Bazal Plate	% 0,0
	3	% 3,3		İmplantasyon Fos.'da Kayma	% 4,5
	4	% 21,7		Çift Boyun	% 5,5
	5	% 74,0		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	% 4,5
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	% 74,3	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	% 96,0
	15%	% 13,0		Aynı Zarda Çok Kuyruk	% 0,0
	20%	% 8,0		Çift Kuyruk	% 4,0
	25%	% 2,0		Düzenli Mitokondri Dizilimi	% 100,0
	%30 ve üstü	% 2,7		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	% 0,0
Vakuol Sayısı	0-1	% 76,7	Yapısal Kuyruk Öz.	Eksik Mitokondri	% 0,0
	2	% 18,7		Dağılmış Mitokondri	% 0,0
	3	% 3,0		Kısa Mitokondriyal Kılıf	% 4,0
	4	% 1,0		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	% 4,0
	5 ve üstü	% 0,7		Düzensiz Fibriller	% 0,0

Tablo 4-18: 8. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (8. Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	% 100,0	Kuy. Kes. Say.	1	%98,0
	2	% 0,0		2	% 2,0
	3	% 0,0		3	% 0,0
	4 ve üzeri	% 0,0		4 ve üzeri	% 0,0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	% 98,0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		% 0,0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	% 2,0	Düzensiz Fibröz Kılıf		% 0,0
	Eksik Mitokondri	% 0,0	Düzensiz Uzun Kolonlar		% 0,0
	Fazla Mitokondri	% 5,0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	% 90,0
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.	% 100,0		9+0 Aksonem Yapısı	% 0,0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	% 0,0		Aks. Eksik Mikrotübül	% 10,0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	% 0,0		Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	% 96,0		Kırık ya da Yarım Aks.	% 0,0
	9+0 Aksonem Yapısı	% 2,0		Aksonemin Yokluğu	% 0,0
	Aks. Eksik Mikrotübül	% 2,0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	% 0,0
	Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0			
	Kırık ya da Yarım Aks.	% 0,0			
	Aksonemin Yokluğu	% 0,0			
	Düzensiz Yer. Mikrotü.	% 0,0			

Tablo 4-19: 9. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (9. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	% 79,3	Akrozom	Normal	% 67,3
	Başsız	% 4,0		Azalmış İçerik	% 13,7
	Bükük	% 4,0		Artmış İçerik	% 2,0
	Anormal	% 20,7		Düzensiz Akrozom	% 17,7
Membran	Düzenli	% 59,0	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	% 7,6
	Düzensiz	% 40,3		Akrozom Yokluğu	% 4,7
	Çek.'kten uzakta memb.	% 25,0		Akrozom Reaksiyonu	% 5,3
Çekirdek	Tek parça	% 94,7	Bağlantı Parçası	Normal Bağlantı Parçası	% 58,5
	İki parça	% 5,0		Anormal Bağlantı Parçası	% 41,5
	Çok parça	% 0,3		Sitoplazmik artık	% 34,5
	Değişmiş çek.	% 1,7		İnklüzyon	% 0,0
	Çek. Cebi	% 6,3		Vakuol	% 28,0
Kondensasyon	1	% 1,3	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	% 0,0
	2	% 0,3		Anormal Bazal Plate	% 1,0
	3	% 3,0		İmplantasyon Fos.'da Kayma	% 10,0
	4	% 19,7		Çift Boyun	% 1,0
	5	% 75,7		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	% 17,0
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	% 73,7	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	% 88,0
	15%	% 18,7		Aynı Zarda Çok Kuyruk	% 12,0
	20%	% 5,0		Çift Kuyruk	% 0,0
	25%	% 2,3		Düzenli Mitokondri Dizilimi	% 92,0
	%30 ve üstü	% 1,7		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	% 0,0
Vakuol Sayısı	0-1	% 58,3	Yapısal Kuyruk Öz.	Eksik Mitokondri	% 0,0
	2	% 28,0		Dağılmış Mitokondri	% 16,0
	3	% 10,3		Kısa Mitokondriyal Kılıf	% 0,0
	4	% 0,7		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	% 0,0
	5 ve üstü	% 1,3		Düzensiz Fibriller	% 8,0

Tablo 4-20: 9. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (9. Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	%90.0	Kuy. Kes. Say.	1	%72.0
	2	%4.0		2	%14.0
	3	%0.0		3	%8.0
	4 ve üzeri	%2.0		4 ve üzeri	%6.0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	% 88,0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		%0.0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	% 0,0	Düzensiz Fibröz Kılıf		%0.0
	Eksik Mitokondri	% 4,0	Düzensiz Uzun Kolonlar		%2.0
	Fazla Mitokondri	% 8,0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%50.0
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.	% 88,0		9+0 Aksonem Yapısı	%0.0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	% 12,0		Aks. Eksik Mikrotübül	%36.0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	% 2,0		Aks. Fazla Mikrotübül	%2.0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	% 84,0		Kırık ya da Yarım Aks.	%4.0
	9+0 Aksonem Yapısı	% 2,0		Aksonemin Yokluğu	%2.0
	Aks. Eksik Mikrotübül	% 6,0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	%16.0
	Aks. Fazla Mikrotübül	%2.0			
	Kırık ya da Yarım Aks.	%0.0			
	Aksonemin Yokluğu	% 2,0			
	Düzensiz Yer. Mikrotü.	%0.0			

Tablo 4-21: 10. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM İLE SPERM İNCEYAPI DEĞERLENDİRME SONUÇLARI (10. Hasta)					
Baş Şekli	Normal	%84.7		Normal	%60.7
	Başsız	%0.0		Azalmış İçerik	%22.0
	Bükük	%4.0		Artmış İçerik	%0.3
	Anormal	%15.3		Düzensiz Akrozom	%35.7
Membran	Düzenli	%87.0	Akrozom	Çek.'den Uzak Akrozom	%4.0
	Düzensiz	%13.0		Akrozom Yokluğu	%5.0
	Çek.'kten uzakta memb.	%33.3		Akrozom Reaksiyonu	%0.3
Çekirdek	Tek parça	%95.3		Normal Bağlantı Parçası	%61.0
	İki parça	%4.7		Anormal Bağlantı Parçası	%39.0
	Çok parça	% 0,0		Sitoplazmik artık	%17.5
	Değişmiş çek.	% 3.0		İnklüzyon	%0.0
	Çek. Cebi	%19.5		Vakuol	%16.0
Kondensasyon	1	% 0,0	Bağlantı Parçası	Granüllü Bağlantı Parçası	%3.0
	2	% 1.3		Anormal Bazal Plate	%10.0
	3	%2.7		İmplantasyon Fos.'da Kayma	%16.5
	4	%19.7		Çift Boyun	%15.0
	5	%76.3		Birden Çok Kuyruk Görüntüsü	%13.5
Vakuol Oranı	%10 ve daha az	%71.0	Genel Kuyruk Öz.	Tek Kuyruk	%76.0
	15%	%14.0		Aynı Zarda Çok Kuyruk	%20.0
	20%	%5.3		Çift Kuyruk	%4.0
	25%	%2.3		Düzenli Mitokondri Dizilimi	%80.0
	%30 ve üstü	%7.3		Düzensiz Mitokondri Dizilimi	%4.0
Vakuol Sayısı	0-1	%69.7	Yapısal Kuyruk Öz.	Eksik Mitokondri	%0.0
	2	% 18,7		Dağılmış Mitokondri	%0.0
	3	%6.7		Kısa Mitokondriyal Kılıf	%12.0
	4	%2.7		Mitokondriyal Kılıf Yokluğu	%8.0
	5 ve üstü	%2.3		Düzensiz Fibriller	% 0,0

Tablo 4-22: 10. Hasta TEM değerlendirme sonuçları

TEM ile Kuyruk Enine Kesitlerinin İnceyapı Değerlendirmesi (10. Hasta)					
Kuyruk Orta Parça			Kuyruk Esas Parça		
Kuy. Kes. Say.	1	%76.0	Kuy. Kes. Say.	1	%78.0
	2	%18.0		2	%14.0
	3	%6.0		3	%6.0
	4 ve üzeri	%0.0		4 ve üzeri	%2.0
Mit. Kılıf	Düzenli Mit. Dizilimi	%86.0	Düzensiz Dış Yoğun Fibriller		%0.0
	Düzensiz Mit. Dizilimi	%8.0	Düzensiz Fibröz Kılıf		%0.0
	Eksik Mitokondri	%2.0	Düzensiz Uzun Kolonlar		%0.0
	Fazla Mitokondri	%4.0	Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%42.0
Dış Yoğun Fibril.	Normal Dış Yoğun Fibr.	%84.0		9+0 Aksonem Yapısı	%2.0
	Dış Yoğ. Fibr. Eksiklik	%2.0		Aks. Eksik Mikrotübül	%38.0
	Düzensiz Dış Yoğ. Fibr.	%14.0		Aks. Fazla Mikrotübül	% 0,0
Aksonem	Normal Aks. Yapısı	%74.0		Kırık ya da Yarım Aks.	% 16,0
	9+0 Aksonem Yapısı	%12.0		Aksonemin Yokluğu	%2.0
	Aks. Eksik Mikrotübül	%2.0		Düzensiz Yer. Mikrotü.	%28.0
	Aks. Fazla Mikrotübül	%2.0			
	Kırık ya da Yarım Aks.	%4.0			
	Aksonemin Yokluğu	%0.0			
	Düzensiz Yer. Mikrotü.	%6.0			

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, tekrarlayan ICSI uygulamaları sonucunda, embriyoları yüksek oranda, bölünme bozukluklarıyla seyreden kötü gelişim paterni sergilemiş embriyolara sahip çiftlerin, erkek partnerlerinin ejakülat spermeleri incelenmiştir. Embriyonun erken gelişim evrelerinde sergilemiş olduğu, bölünme bozukluklarının, zigot sentrozomunun büyük bir bölümünü oluşturan sperm sentriyolleri ile olan ilişkisi irdelenmeye çalışılmıştır.

Spermin ooplazma içine girişi sonrasında, ikinci mayoz bölünme tamamlanır. Sperm ve oosit nukleusları dekondanse olarak pronukleusları oluştururlar. Bu aşamada, erkek pronukleus, oositin merkezinde, dişi pronukleus ise periferde, metafaz iğ iplikçiğine yakın mesfede konumlanmıştır. Sperm aracılığıyla zigota taşınmış olan sentriyole bağlanarak uzamaya başlayan mikrotübüller sperm asterlerini oluştururlar. Bu mikrotübüller, oositin pronukleusuna kadar uzanarak, bir anlamda onu spermin pronukleusuna doğru çekerler. Böylece her iki pronukleus da zigotun merkezinde ve birbirlerine yakın şekilde konumlanmış olur. Sonrasında, pronukleusların zarlarında gerçekleşen parçalanmaların yardımıyla genetik materyal birleştirilerek 46 kromozomlu zigot oluşturulur (126).

İnsanın gelişim süreci, zigotun tüm somatik hücreleri oluşturmak için defalarca bölünmesiyle ilerler. Somatik hücrelerin neredeyse tümü, zigottan itibaren, kontrollü bir biçimde kopyalanarak sayıları korunmuş olan iki sentriyol içermektedir. Normal bir bölünmenin gerçekleşebilmesi için, hücrenin, interfazda iki, mitozda dört sentriyol içermesi beklenir. Ancak şimdiye kadar, memeli zigotlarında dört sentriyol gösterilebilmiş değildir. Araştırmalarla zigot içinde sadece üç sentriyol gözlemlenebilmiştir (127,128).

Sentriyoller, memeli spermatozoasının boyun bölgesinde lokalize olmuştur. İnsanın da dahil olduğu, kemirgen dışı memelilerde, boyun bölgesinde proksimal sentriyol (PS), tipik yapıda izlenmektedir. Distal sentriyol (DS) ise, kuyruk aksonemini başlatmaktadır, ancak spermatogenez sürecinde dejenere olması sebebiyle, TEM araştırmalarında üçlü mikrotübüllerin oluşturduğu dokuz kollu çark görüntüsü izlenmez. Son yıllara kadar kabul gören bu görüşe göre, spermiyogenez sırasında, sperm sentrozomuna ait bazı spesifik proteinlerin miktarlarının değiştirilmesiyle, sentriyoller

ve PCM yeniden düzenlenmektedir. Sentriyol indirgenmesi olarak adlandırılan bu olayla, erken spermatidlerde DS'nin tipik yapısı dağılır, çevresindeki PCM elimine edilir ve bunların yerinde tonoz yapısı gözlemlenir (117,129,130). Olgun spermatozoonun boyun bölgesinde PS dışında gözlemlenen artık mikrotübüller DS'nin fonksiyonuyla hiç ilişkilendirilmemiştir. Bu yüzden matür spermatozoanın tek bir işlevsel sentriyol içerdiği ve zigota da, bir tane sentriyol aktarıldığı görüşü uzun yıllar kabul görmüştür (131–133). Bununla birlikte, zigotun ilk bölünmesiyle, yeni oluşan her iki hücrede ikişer sentriyol bulunmaktadır. Spermin zigota aktaracağı tek sentriyol ile bunun gerçekleştirilebilmesi mümkün görünmemektedir (134). Çünkü sentriyol duplikasyonu sırasında prosentriyoller, oluşuma başlamak için, mevcut sentriyollerin duvarını platform olarak kullanmaktadırlar (135). Zigotun sadece bir işlevsel sentriyol devralmış olacağı durumda, ikinci prosentriyolün orijini bilinemeyecektir (134). Araştırmalarla böcek spermlerinin, bilinene ek olarak ikinci bir atipik yapılı sentriyol içerdiklerinin gösterilmesi, ve bu atipik yapının normal üreme ve embriyo gelişimi için gerekli olduğunun anlaşılması, memeli ve insan sperm sentrozom çalışmalarına hız vermiştir (136). Bu doğrultuda ilerleyen araştırmalar, insanda, PS'nin yanı sıra, dejenere olduğu varsayılan DS'nin de, yapısını değiştirerek, spermatozoada varlığını sürdürdüğünü göstermektedir. Bu düşünce, sperm sentrozomu ve embriyonun ilk bölünmesi ile ilgili bakış açısını genişletmiştir (78). DS'nin yeni tanımlanan atipik yapısı, sentriyol ve PCM'de yer alan proteinlerin bazılarının azaltılması, ya da dağıtılması gibi süreçler içermektedir. Bu süreçteki en çarpıcı değişim, DS mikrotübüllerinin, başa yakın bölgeye doğru, açılarak, bir koni görünümü oluşturmalarıdır. Mikrotübüllerin, kuyruktan başa doğru gidiş yönünde birbirinden uzaklaşmalarıyla, ters oval bir kesik koni görünümü sergileyen atipik yapı şekillenmiş olur. DS, tabanıyla da aksoneme bağlıdır. İn vivo ve in vitro araştırmalar, flagellumun bağlı olduğu atipik DS'nin, mitozda iğ kutuplarında yerleşme ve yavru sentriyol oluşturma, yeteneklerine sahip olduğunu göstermektedir (134). Avidor-Reiss ve Fishman 2018'de yayınladıkları çalışmalarında atipik yapıdaki DS'nin, zigotun ikinci sentriyolu olarak işlev gördüğünü, makalelerinde yer verdikleri bir modellemeyle açıklamışlardır (78).

Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz TEM incelemelerimizde sperm boyun bölgesi kesitlerinde, kuyruk aksoneminin başlangıcı ve proksimal sentriyol arasındaki alanda, birbirlerinden uzaklaşarak ilerleyen, yani açılarak koni görünümü oluşturan DS

mikrotübül görüntüleri tespit edilmiştir. Bu mikrotübüllerin aralarındaki mesafe, kuyruktan başa doğru gidildikçe artmaktadır. Üç boyutlu olarak düşünüldüğünde tabanı başa, tepesi de kuyruk aksoneminin başlangıcına yakın olarak konumlanmış bir koni görünümünü mevcuttur. Bu gözlemler, Avidor-Reiss (78) ve Fishman'ın (129) çalışmalarıyla uyumludur.

Erkek fertilite potansiyelinin belirlenmesinde, sperm sayısı, motilite ve morfoloji gibi semen parametrelerinin değerlendirilmesi oldukça önemlidir (10,137). Ancak, rutin semen analizi sonuçları normal sınırlarda olan ve tespit edilmiş başka herhangi bir sistemik sorunu olmayan bazı vakalarda bile infertiliteye rastlanabilmektedir. Bu gibi durumlarda, spermde, rutin IM incelemeleriyle saptanamayan ultrastrüktürel değişikliklerin bulunması ihtimali akla getirilmelidir (9). Spermatozoanın TEM ile incelenmesi, geleneksel semen analizlerine göre çok daha ayrıntılı bilgiler sunduğu için oldukça değerlidir. Ultrastrüktürel inceleme, organellere ait özelliklerdeki değişikliklerin gözlemlenebilmesine olanak tanır. Pek çok vakada sperm ultrasütrüktürünün incelenmesiyle saptanan sperm defektleri, infertilitenin sebebinin anlaşılmasını sağlamıştır. Sperm çekirdeğinin kondensasyon anomalileri, kromatinin paketlenme sürecinde protaminlerdeki bir eksiklik ya da histon ve protomin yer değişimini düzenleyen ubikuitin-proteasom sistemindeki aksamalardan kaynaklanmaktadır (33). Kromatin paketlenmesindeki aksamaların fertiliteyi ve embriyo gelişimini olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Bu aksamalar kondensasyon bozukluklarının yanı sıra büyük vakuollere de yol açabilmektedirler. Perdrix ve arkadaşları, büyük oranda geniş vakuollere sahip spermatozoada, kromatin kondensasyon hataları, akrozom düzensizlikleri ve anöploidilerin birlikte görülebildiğini bildirmişlerdir (138). Çalışmamızda incelediğimiz vakalarda sperm kondensasyonunun durumu derecelendirilmiştir. Üç hastada hafif derecede decondensasyon görüntüsü sergileyen sperm yüzdeleri yüksek bulunmuştur. Ayrıca bu hastalarda normal görünümlü akrozom yüzdelерinin oldukça düşük olduğu görülmüştür. Bu hastaların ikisinde çekirdek hacminin %15'inden fazlasını kaplayan vakuol oranları da yüksek bulunmuştur. Bu bulgular Perdrix ve arkadaşlarının 2011'de yayınladıkları bilgilerle paralellik göstermektedir. Anomalilerin birden fazlasının birlikte bulunması durumunda, döllenme oranlarının azaldığı ve embriyo gelişim bozukluklarının görüldüğü bildirilmiştir (139). Kısa bir süre önce yayınlanmış bir çalışmada teratozoospermik olguların spermalarında çekirdek içinde görülen sitoplazma artıkları

olarak tanımlanan INCR görüntüleri incelenmiş ve bozuk morfoloji ile INCR varlığı arasında korelasyon saptanmıştır (29). TEM incelemelerimizde içinde sitoplazmik komponentler barındıran çekirdek görüntülerine rastlanmıştır. Bu özellikteki spermlerin genellikle bozuk morfolojiye sahip oldukları görülmüştür. Bu tespitler literatürle uyumludur. Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz ayrıntılı TEM incelemesiyle, spermatozoanın ultrastrüktürel özelliklerinde bir sınıflama oluşturulmaya çalışılmıştır. Spermin baş, boyun ve kuyruk bölgeleri için oluşturulan değerlendirme tablolarıyla, gözlemlenen yapısal anomali oranlarının tespitine gidilmiştir. Gerçekleştirdiğimiz bu yarı kantitatif değerlendirme, Skowronek ve arkadaşlarının 2010 yılında yayınlanan çalışmalarıyla benzerlikler göstermektedir. Araştırmacılar, 25 teratozoospermi olgusunu inceledikleri çalışmalarında, her hasta için, baş ve kuyruğun herbirine ait 100 kesit üzerinde, başa ait olarak plazma membranı, çekirdek zarfı, akrozom, kromatin, kuyruğa ait olarak ta aksonem bileşenleri ve mitokondri özelliklerini değerlendirmişlerdir (140). Bizim çalışmamızda bu özelliklere ek olarak çekirdeğin vakuol içerikleri ve boyuna ait özellikler de incelenmiştir. Bulgularımızın, spermin TEM ile tetkiki noktasında literatüre katkı sağlayacağını öngörmekteyiz.

Gerçekleştirdiğimiz ayrıntılı TEM incelemesi, spermin ultrastrüktürüne ait bazı saptamalara ulaşılmasını sağlamıştır. Vakaların kuyruk aksonem yapısı özelliklerinin görülme yüzdeleri, kuyruk kesitinin bölgesiyle ilişkili olarak değişimler göstermektedir. Bu değişimler, kuyrukta, başlangıç bölgesinden uca doğru gidildikçe aksonemin bozulma olasılığının arttığını gösterir niteliktedir. Aksonemdeki bu bozulma, mikrotübül yerleşiminde düzensizliklerin oluşması, bazı mikrotübüllerin eksilmesi, ya da yanyana konumlanmış birkaç mikrotübülün kuyruğun bitimine kadar uzamamaları yüzünden yarım aksonem yapısının oluşması şeklinde gerçekleşmektedir. Bu bulgularımız sperm anomalileri ve işlev bozuklukları açısından mikrotübül polimerizasyonunun önemini belirten çalışmaların ışığında daha kapsamlı yeni çalışmalara konu oluşturabilir.

Çalışmamızda, kuyruk orta parça kesitlerinde, aksonem içermeyen kuyruk kesit sayısı, esas parçada aksonem içermeyen kesit sayılarına göre daha yüksek bulunmuştur. Bu tespit, aksonemin bulunmadığı durumlarda, kuyruğun varlığını sürdürmediğini ve aksonemin sonlanmasıyla, kuyruğun da uzamaya devam etmeden, daha kısa şekilde sonlanmış olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Yine benzer şekilde, kuyruk orta parça

kesitlerinde, “9+0” aksonem yapısı izlenen kuyruk kesit sayıları, esas parça kesitlerinde izlenen sayıya göre daha yüksek bulunmuştur. Bu gözlem de, merkezi mikrotübüllerin olmaması durumunda aksonemin varlığını sürdüremediğini ve kuyruğun daha kısa şekilde sonlanmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu noktada aksonemin merkezini oluşturan iki mikrotübülün önemi ortaya çıkmaktadır. Wang ve arkadaşları, çoklu kuyruk morfolojisi bozukluğu gözlenen olgularda spermilerin kısa ya da kıvrılmış kuyruklu olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu spermilerin ultrastrüktürel analizlerinde kuyruklarda %84'lere varan oranlarda “9+0” aksonem yapısı saptamışlardır. Bu bulgular sonunda, sperm aksoneminde “9+0” olarak ifade edilen merkezi mikrotübül kaybının kuyruk anormalliklerinin ana özelliği olarak görülebileceğini bildirmişlerdir (141). Chemes ve arkadaşlarının bir çalışmasında DFS tanıılı spermelerde kuyrukların kısa olduğu ve aksonemde merkezi çift kaybının gözlemlendiği bildirilmiştir (33). Tang ve arkadaşları, çoklu kuyruk morfolojisi bozukluklarıyla ilişki olduğu düşünülen CFAP 43 veya CFAP 44 genlerinin mutasyona uğratılmasıyla farede oluşturdukları modelde, spermilerin kısa olduğunu ve kuyruk aksonemlerinde merkezi mikrotübüllerin kaybını gözlemlediklerini bildirmişlerdir (142). Çalışmamızda gözlemlediğimiz veriler, aksonemin merkezi mikrotübüllerinin kuyruk yapısındaki önemi ve kısa kuyruk oluşumundaki rolü noktasında literatürdeki bilgilerle örtüşmektedir. Ancak aksonemdeki bu yapısal anomalileri koşullayan etkenlerin ortaya konması açısından yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Tez çalışmasında gerçekleştirdiğimiz TEM analizlerinde, bir hastanın spermelerinin çoğunluğunda adjuvan sentriyol görüntüsü gözlemlenmiştir. Adjuvan sentriyol, eski terminolojideki ismiyle “sentriyol mikrotübül uzantısı”, spermiyogenez sırasında spermatidlerde ortaya çıkan, PS'nin iki ya da üç katı uzunluğa ulaşabilen mikrotübüller uzamalarıdır. Yakın zamanda Garanina ve arkadaşlarının bir çalışmasında, tekrarlanan IVF uygulamaları sonucunda, her defasında, ilk bölünmenin ardından gelişimini durduran embriyolara sahip iki çiftte erkek partnerlerin spermeleri incelenmiştir. İdiyopatik erkek fertilitesi tanısı almış olan bu hastalarda yapılan TEM incelemesinde spermelerin çoğunluğunda adjuvan setriyol görüntüsü izlenmiştir. Fertil vericilerin ve bu hastaların spermelerinde izlenen “PS+AS” uzunlukları ölçülmüş ve hastalarda bu uzunluk, fertil olanlara göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, araştırmacılar tarafından, spermatogenez sürecinde, AS yapısının giderilmesinde oluşan aksaklıkların, oluşacak embriyoların gelişiminde olumsuz etkileri olabileceği

şeklinde yorumlanmıştır (143). Çalışmamızda incelediğimiz ve spermelerinde sıkça AS yapısına rastladığımız hastanın örneklerinde, “PS+AS” ölçümü yapılmamış olmakla birlikte, bu yapıların, fertil örneklerinde rastlanan AS görüntülerine kıyasla daha uzun görünümlü olmaları, bu hastada embriyo gelişimindeki bozukluğun ICSI’de kullanılan spermatozoanın AS içeriğiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Olgun spermatozoada AS yapısının büyük oranda bulunmasının, spermatogenez sürecindeki hangi mekanizmalarla ilişkili olduğu ve bu yapının embriyo gelişimini nasıl etkiliyor olabileceğine yönelik yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu açıktır.

Speriolin, 2004 yılında Goto ve Eddy tarafından, spermatogenez hücrelere özgül sentrozomla ilişkili bir protein olarak tanımlanmıştır. Aynı araştırmacılar bir çalışmada, insan spermatozoasında IF yöntemiyle, yaklaşık olarak %90 oranında, genellikle tek spot olarak speriolin işaretlenmesi izlediklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, işaretlenmenin saptanmadığı spermelerin bozuk morfolojiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Tez çalışmamızda, IF yöntemi ile fertil donör spermelerinde speriolin ekspresyon oranı, %71 olarak tespit edilmiştir. Hasta grubunda sonuçlar değişkenlik göstermekle birlikte, morfoloji ve TEM analiz oranlarının normal bulunduğu örneklerde, speriolin işaretlenme düzeyleri nispeten kontrol sonuçlarına yakın olarak saptanmıştır. Morfolojik oranların düşük gözlemlendiği örneklerin speriolin ekspresyon oranları da düşük bulunmuştur. Speriolin ekspresyon düzeylerine dair gözlemlendiğimiz sonuçlar, literatüre uyum göstermektedir.

Sentrin, spermin boyun bölgesinde güçlü şekilde saptanabilen sentrozom proteinlerinden biridir. Fertil erkeklerin spermelerinde %98 oranında sentrin ekspresyonu izlenmektedir. Düşük ekspresyon düzeyleri infertilite ile ilişkilendirilmiştir (120,121,144,145). İnfertil vakalarda sentrin boyanma indeksinin düşük olduğu bildirilse de, çalışmamızda gerçekleştirilen sentrin işaretlemelerinde sonuçlar oldukça düşük kalmıştır. Kullanılan boyama yönteminin optimizasyonunun sağlanması için çaba sarfedilmiş olmakla birlikte, materyal temini için kullanılan kaynakların kısıtlı olması sebebiyle, işaretlenme elde edilen örneklerin, nicel değerlendirme açısından yeterli düzeyde olmaması, bu konuda yapılacak olan yorumların kesinliğini kısıtlamaktadır.

Çalışmamızda incelediğimiz olguların, morfolojik, ultrastrüktürel ve sentrozom proteini ekspresyonu açısından farklı özellikler sergilemiş olmaları, aslında bu grubun, tek bir sebebe bağlı olmadan, farklı parametrelerle ilişkili olarak, embriyo gelişim

bozukluğuna giden ICSI sonuçlarına sahip olduklarını düşündürmektedir. Özellikle iki vakada boyun bölgesi anomalilerin sıkça belirlenmiş olması, dikkat çekicidir. Bu anomaliler arasında yer alan implantasyon fossasında kayma, birden çok kuyruk görüntüsü, çift boyun gibi bulgular, aslında, boyun bölgesinden iki ayrı aksonemle başlayan, ancak tek zar içinde devam eden kuyruk yapısıyla ilişkili olabilecek niteliktedir. Bu yapıdaki kuyruk başlangıcına sahip bir spermatozoon, bir tane normal yapıda (PS) ve bir tane de atipik yapıda (DS) olmak üzere iki sentriyol içermek yerine, bazı TEM fotolarında da gözlemlediğimiz gibi, ikiden daha çok sayıda sentriyol içermektedir. Özellikle, iki vakada saptadığımız bu tür bulgular, fazla sayıda sentriyol içeriğine sahip bir spermatozoon ile döllenmiş olan zigotta, çok kutuplu mitoz mekiği oluşumu sebebiyle, gelişen embriyonun bölünme bozuklukları sergilemiş olabileceğini düşündürmektedir. IM ile normal görünen, ancak, aslında fazla sayıda sentriyol içeriğine sahip bir spermin ICSI için seçilerek kullanılması, zigota ikiden fazla sayıda sentriyol taşınması anlamına gelmektedir. Zigota aktarılan gereğinden fazla sayıda sentriyolün, çok kutuplu mitoz mekiği oluşturabileceği olasıdır (146).

ICSI protokolünde, enjeksiyon için kullanılan spermin spesifik özelliklerine bağlı olarak, başarı oranlarının değişebileceği göz önüne alındığında, özellikle, IM inceleme ile boyun defektleri farkedilen olgular ve açıklanamayan infertilite vakaları için TEM incelemesi planlanması, oluşabilecek embriyo gelişim kusurları hakkında öngörü sağlaması açısından önem taşımaktadır. Bu noktada spermin TEM ile incelenmesi altın standart olma niteliğine sahiptir. Tez çalışmamızda irdelediğimiz ince yapı ölçütleri açısından morfolojik bulgularımızın literatüre katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

Öte yandan, embriyodaki sentrozom biyogenezinin açıklanabilmesi, erken embriyonik gelişim bozukluklarında etiyolojiye yönelik ipuçları sağlamanın ötesinde, yeni teşhis ve tedavi yollarının geliştirilebilmesini olası kılabilen önemli bir araştırma alanı özelliği taşımaktadır. Moleküler araştırma ve görüntüleme tekniklerinde kaydedilen hızlı ilerlemeye koşut olarak ince yapı düzeyindeki değişikliklerin nedenine dönük yeni araştırma önermelerinde, hücrenin moleküler biyolojik dinamiklerine ait yanıtlanmamış soruların ön plana çıkması kaçınılmaz görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Zhong ZS, Zhang G, Meng XQ, Zhang YL, Chen DY, Schatten H, vd. Function of donor cell centrosome in intraspecies and interspecies nuclear transfer embryos. *Exp Cell Res*. 2005;
2. Kahraman S, Tasdemir M, Tasdemir I, Vicdan K, Özgür S, Polat G, vd. Pregnancies achieved with testicular and ejaculated spermatozoa in combination with intracytoplasmic sperm injection in men with totally or initially immotile spermatozoa in the ejaculate. *Hum Reprod*. 1996;
3. Westlander G, Barry M, Petrucco O, Norman R. Different fertilization rates between immotile testicular spermatozoa and immotile ejaculated spermatozoa for ICSI in men Kartagener's syndrome: Case report. *Hum Reprod*. 2003;
4. Sun QY, Schatten H. Centrosome inheritance after fertilization and nuclear transfer in mammals. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2007.
5. Schatten H, Sun QY. The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI. *Molecular Human Reproduction*. 2009.
6. Schatten H, Sun Q-Y. The functional significance of centrosomes in mammalian meiosis, fertilization, development, nuclear transfer, and stem cell differentiation. *Environ Mol Mutagen*. Ekim 2009;50(8):620–36.
7. Manandhar G, Feng D, Yi YJ, Lai L, Letko J, Laurincik J, vd. Centrosomal protein centrin is not detectable during early pre-implantation development but reappears during late blastocyst stage in porcine embryos. *Reproduction*. 2006;
8. Goto M, O'Brien DA, Eddy EM. Speriolin is a novel human and mouse sperm centrosome protein. *Hum Reprod*. 2010;
9. Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: A step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update*. 2003;9(5):405–28.
10. Visco V, Raffa S, Elia J, Delfino M, Imbrogno N, Torrissi MR, vd. Morphological sperm defects analyzed by light microscopy and transmission electron microscopy and their correlation with sperm motility: Original article: Clinical

- investigation. Int J Urol. 2010;
11. WHO. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. İçinde: World Health Organisation Geneva. 2010.
 12. Kierszenbaum AL, Tres LL. Histology and cell biology: an introduction to pathology.
 13. Ross MH, Pawlina W. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 984 s.
 14. Online EB. Reproductive system, human: male structure [Internet]. [kaynak 02 Ağustos 2019]. Available at: <http://www.britannica.com/EBchecked/media/48173/Organs-of-the-male-reproductive-system>
 15. Kuran Orhan. Sistematik Anatomi. 1983.
 16. Seçkin İsmail. Embriyoloji Ders Kitabı. İ.Ü. yayınları; 2008.
 17. Sadler TW (Thomas W., Langman J, Sadler TW (Thomas W). Langman's essential medical embryology. Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
 18. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology - Keith L. Moore, T. V. N. Persaud, Mark G. Torchia - Google Books. 2016.
 19. Sadler TW (Thomas W). Langman's Medical Embryology. 2012. 243–249 s.
 20. Mescher AL. Junqueira's basic histology: text and atlas. 544 s.
 21. Testis [Internet]. [kaynak 12 Haziran 2019]. Available at: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/MaleRepro/malerepro.htm#LabTestes>
 22. Sperm [Internet]. [kaynak 18 Temmuz 2018]. Available at: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sperm_Dutch_text.png
 23. Fawcett DW. Sperm Flagellum. Cell. 1966;604–24.
 24. Lodish H, Berk A, Zipursky SL et al. Molecular Cell Biology 5th Ed. W.H. Freeman. 2000.
 25. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Cilia and

- Flagella: Structure and Movement. 2000;
26. Alkan E. BMM. Sperm motilite bozukluklar: Terminoloji, etiyoloji ve tedavide yenilikler (Derleme). *Androl Bull.* 2014;16(58):186–90.
 27. Chemes HE. Ultrastructural analysis of testicular tissue and sperm by transmission and scanning electron microscopy. *Methods Mol Biol.* 2013;
 28. Sathananthan AH. Ultrastructure of human gametes, fertilization and embryos in assisted reproduction: A personal survey. *Micron.* 2013;44(1):1–20.
 29. Zhu WJ. Transmission electron microscopy analysis of the origin and incidence of sperm intranuclear cytoplasmic retention in fertile and teratozoospermia men. *Andrology.* 2018;6(2):317–24.
 30. Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Di Cairano, G., Gambera, L., Moretti, E. et al. Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum Reprod* 16. 2001;16:1365–1371.
 31. Dam AHDM, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJT, Kremer JAM. Globozoospermia revisited. *Human Reproduction Update.* 2007.
 32. Vicari E. Globozoospermia is associated with chromatin structure abnormalities: Case report. *Hum Reprod.* 2002;
 33. Chemes HE, Alvarez Sedo C. Tales of the Tail and Sperm Head Aches Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian Journal of Andrology.* 2012.
 34. BACCETTI B, BURRINI AG, COLLODEL G, PIOMBONI P, RENIERI T. A “Miniacrosome” Sperm Defect Causing Infertility in Two Brothers. *J Androl.* 1991;
 35. Baccetti B, Burrini AG, Collodel G, Magnano AR, Piomboni P, Renieri T, vd. Crater defect in human spermatozoa. *Gamete Res.* 1989;
 36. Chemes HE, Brugo Olmedo S, Zanchetti F, Carrere C, Lavieri JC. Dysplasia of the fibrous sheath: an ultrastructural defect of human spermatozoa associated with sperm immotility and primary sterility. *Fertil Steril.* 1987;
 37. Rawe VY, Galaverna GD, Acosta AA, Brugo Olmedo S, Chemes HE. Incidence

- of tail structure distortions associated with dysplasia of the fibrous sheath in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2001;
38. Chemes HE, Morero JL, Lavieri JC. Extreme asthenozoospermia and chronic respiratory disease: a new variant of the immotile cilia syndrome. *Int J Androl*. 1990;
 39. Baccetti B, Burrini AG, Capitani S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, vd. *Notulae seminologicae*. 1. New combinations of Kartagener's syndrome. *Andrologia*. 1993;
 40. Baccetti B, Bruni E, Gambera L, Moretti E, Piomboni P. An ultrastructural and immunocytochemical study of a rare genetic sperm tail defect that causes infertility in humans. *Fertil Steril*. 2004;
 41. Moretti E, Sutura G, Collodel G. The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic research. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2016.
 42. Baccetti B, Fraioli F, Paolucci D, Selmi G, Spera G, Renieri T. High prolactin level and double spermatozoa. *Gamete Res*. 1979;
 43. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl*. 2002;
 44. Fekonja N, Štrus J, Tušek Žnidarič M, Knez K, Vrtacnik Bokali E, Verdenik I, vd. Clinical and structural features of sperm head vacuoles in men included in the in vitro fertilization programme. *Biomed Res Int*. 2014;
 45. Kacem O, Sifer C, Barraud-Lange V, Ducot B, De Ziegler D, Poirot C, vd. Sperm nuclear vacuoles, as assessed by motile sperm organellar morphological examination, are mostly of acrosomal origin. *Reprod Biomed Online*. 2010;
 46. Gatimel N, Léandri RD, Foliguet B, Bujan L, Parinaud J. Sperm cephalic vacuoles: new arguments for their non acrosomal origin in two cases of total globozoospermia. *Andrology*. 2013;
 47. Shucheng Zhang, Ning Wang, Bin He, Jie Cheng, Shui Xi, Shang-ming Wang YG& JW. Sperm Head Vacuoles—Light Microscopic and Ultrastructural Observations: A Case Report. *Ultrastruct Pathol*. 2012;36(3):185–183.

48. Zamboni, L. , Zemjanis, R. and Stefanini M. The fine structure of monkey and human spermatozoa. *Anat Rec.* 1971;169:129–53.
49. Bartoov B, Eltes F, Weissenberg R LB. Morphological characterization of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy. *Arch Androl.* 1980;Dec(5(4)):305-22.
50. Baccetti BM, Bruni E, Capitani S, Collodel G, Mancini S, Piomboni P, vd. Studies on varicocele III: Ultrastructural sperm evaluation and 18, X and Y aneuploidies. *J Androl.* 2006;
51. Alvarez Sed C, Rawe VY, Chemes HE. Acrosomal biogenesis in human globozoospermia: Immunocytochemical, ultrastructural and proteomic studies. *Hum Reprod.* 2012;
52. Zeyneloglu HB, Baltaci V, Duran HE, Erdemli E, Batioglu S. Achievement of pregnancy in globozoospermia with Y chromosome microdeletion after ICSI. *Hum Reprod.* 2002;
53. Sermondade N, Hafhouf E, Dupont C, Bechoua S, Palacios C, Eustache F, vd. Successful childbirth after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection without assisted oocyte activation in a patient with globozoospermia. *Hum Reprod.* 2011;
54. Karaca N, Yilmaz R, Kanten GE, Kervancioglu E, Solakoglu S, Kervancioglu ME. First successful pregnancy in a globozoospermic patient having homozygous mutation in SPATA16. *Fertil Steril.* 2014;
55. Dam AH, Ramos L, Dijkman HB, Woestenenk R, Robben H, Van Den Hoven L, vd. Morphology of partial globozoospermia. *J Androl.* 2011;32(2):199–206.
56. Fetic S, Yeung C-H, Sonntag B, Nieschlag E, Cooper TG. Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *J Androl.* 27(2):294–301.
57. Chemes HE, Carizza C, Scarinci F, Brugo S, Neuspiller N, Schwarsztein L. Lack of a head in human spermatozoa from sterile patients: a syndrome associated with impaired fertilization. *Fertil Steril.* Şubat 1987;47(2):310–6.
58. Rawe VY. Sperm ubiquitination in patients with dysplasia of the fibrous sheath.

- Hum Reprod. 2002;
59. Terada Y, Schatten G, Hasegawa H, Yaegashi N. Essential roles of the sperm centrosome in human fertilization: developing the therapy for fertilization failure due to sperm centrosomal dysfunction. *Tohoku J Exp Med*. Nisan 2010;220(4):247–58.
 60. Manandhar G, Schatten H, Sutovsky P. Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol Reprod*. Ocak 2005;72(1):2–13.
 61. Sathananthan AH. Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. *J Assist Reprod Genet*. Mart 1998;15(3):129–39.
 62. Bragina EE, Bocharova EN. Ultrastructure of Spermatozoa from Infertility Patients. İçinde: *Spermatozoa - Facts and Perspectives*. 2018.
 63. Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, Oses R, Carizza C, Leisner M, vd. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: Association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod*. 1998;13(9):2521–6.
 64. Baccetti B, Collodel G, Marzella R, Moretti E, Piomboni P, Scapigliati G, vd. Ultrastructural studies of spermatozoa from infertile males with Robertsonian translocations and 18, X, Y aneuploidies. *Hum Reprod*. 2005;
 65. Schatten H, Sun QY. The significant role of centrosomes in stem cell division and differentiation. *Microscopy and Microanalysis*. 2011.
 66. Bettencourt-Dias M, Glover DM. Centrosome biogenesis and function: Centrosomics brings new understanding. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007.
 67. Bornens M. The centrosome in cells and organisms. *Science*. 2012.
 68. Chen C, Inaba M, Venkei ZG, Yamashita YM. Klp10A, a stem cell centrosome-enriched kinesin, balances asymmetries in *Drosophila* male germline stem cell division. *Elife*. 2016;
 69. Stinchcombe JC, Griffiths GM. Communication, the centrosome and the immunological synapse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 05 Eylül 2014;369(1650).

70. Arquint C, Gabryjonczyk A-M, Nigg EA. Centrosomes as signalling centres. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 05 Eylül 2014;369(1650).
71. Bornens M, Azimzadeh J. Origin and evolution of the centrosome. *Adv Exp Med Biol.* 2007;607:119–29.
72. Hoyer-Fender S. Centrosomes in fertilization, early embryonic development, stem cell division, and cancer. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2012;
73. Schatten H. The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochemistry and Cell Biology.* 2008.
74. Schatten H, Sun Q-Y. The role of centrosomes in fertilization, cell division and establishment of asymmetry during embryo development. *Semin Cell Dev Biol.* Nisan 2010;21(2):174–84.
75. Nigg EA, Holland AJ. Once and only once: mechanisms of centriole duplication and their deregulation in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Mayıs 2018;19(5):297–312.
76. Godinho SA, Pellman D. Causes and consequences of centrosome abnormalities in cancer. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 05 Eylül 2014;369(1650).
77. Maniswami RR, Prashanth S, Karanth AV, Koushik S, Govindaraj H, Mullangi R, vd. PLK4: a link between centriole biogenesis and cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 2018.
78. Avidor-Reiss T, Fishman EL. It takes two (centrioles) to tango. *Reproduction.* 2019.
79. Wang G, Jiang Q, Zhang C. The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitotic spindle. *J Cell Sci.* 2014;
80. Salisbury JL. Centrosomes: Sfilp and Centrin Unravel a Structural Riddle. *Current Biology.* 2004.
81. Schatten H, Sun QY. Centrosome-microtubule interactions in health, disease, and disorders. İçinde: *The Cytoskeleton in Health and Disease.* 2015.
82. Schatten H, Sun QY. Centrosome and microtubule functions and dysfunctions in meiosis: Implications for age-related infertility and developmental disorders.

- Reproduction, Fertility and Development. 2015.
83. Bornens M. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* Şubat 2002;14(1):25–34.
 84. McIntosh JR, Euteneuer U. Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: An analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J Cell Biol.* 1984;
 85. Mennella V, Agard DA, Huang B, Pelletier L. Amorphous no more: Subdiffraction view of the pericentriolar material architecture. *Trends in Cell Biology.* 2014.
 86. Paintrand M, Moudjou M, Delacroix H, Bornens M. Centrosome organization and centriole architecture: Their sensitivity to divalent cations. *J Struct Biol.* 1992;
 87. Mazo G, Soplop N, Wang W-J, Uryu K, Tsou MFB. Spatial Control of Primary Ciliogenesis by Subdistal Appendages Alters Sensation-Associated Properties of Cilia. *Dev Cell.* 2016;39(4):424–37.
 88. Carvalho-Santos Z, Machado P, Branco P, Tavares-Cadete F, Rodrigues-Martins A, Pereira-Leal JB, vd. Stepwise evolution of the centriole-assembly pathw... [*J Cell Sci.* 2010] - PubMed result. *J Cell Sci.* 2010;
 89. Hodges ME, Scheumann N, Wickstead B, Langdale JA, Gull K. Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *J Cell Sci.* 2010;
 90. Hatch E, Stearns T. The life cycle of centrioles. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2010;
 91. Nigg EA, Stearns T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nature Cell Biology.* 2011.
 92. Arquint C, Nigg EA. The PLK4–STIL–SAS-6 module at the core of centriole duplication. *Biochem Soc Trans.* 2016;
 93. Meraldi P, Lukas J, Fry AM, Bartek J, Nigg EA. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol.* Haziran 1999;1(2):88–93.

94. Shukla A, Kong D, Sharma M, Magidson V, Loncarek J. Plk1 relieves centriole block to reduplication by promoting daughter centriole maturation. *Nat Commun.* 2015;
95. Mottier-Pavie V, Megraw TL. *Drosophila* Bld10 Is a Centriolar Protein That Regulates Centriole, Basal Body, and Motile Cilium Assembly . *Mol Biol Cell.* 2009;
96. Zheng X, Gooi LM, Wason A, Gabriel E, Mehrjardi NZ, Yang Q, vd. Conserved TCP domain of Sas-4/CPAP is essential for pericentriolar material tethering during centrosome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 Ocak 2014;111(3):E354-63.
97. Stinchcombe JC, Randzavola LO, Angus KL, Mantell JM, Verkade P, Griffiths GM. Mother Centriole Distal Appendages Mediate Centrosome Docking at the Immunological Synapse and Reveal Mechanistic Parallels with Ciliogenesis. *Curr Biol.* 21 Aralık 2015;25(24):3239–44.
98. Brooks ER, Wallingford JB. Multiciliated cells. *Curr Biol.* 06 Ekim 2014;24(19):R973-82.
99. Salisbury JL. A mechanistic view on the evolutionary origin for centrin-based control of centriole duplication. *Journal of Cellular Physiology.* 2007.
100. Avasthi P, Scheel JF, Ying G, Frederick JM, Baehr W, Wolfrum U. Germline deletion of *Cetn1* causes infertility in male mice. *J Cell Sci.* 2013;
101. Zhang Y, He C. Centrins in unicellular organisms: functional diversity and specialization. *Protoplasma*, - Springer. 2012;249,:459–467.
102. Wolfrum U, Gießl A, Pulvermüller A. Centrins, A Novel Group Of Cat2,2+-Binding Proteins In Vertebrate Photoreceptor Cells. İçinde 2011.
103. Geimer S, Melkonian M. Centrin Scaffold in *Chlamydomonas reinhardtii* Revealed by Immunoelectron Microscopy . *Eukaryot Cell.* 2005;
104. Salisbury JL, Baron A, Surek B, Melkonian M. Striated flagellar roots: Isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle. *J Cell Biol.* 1984;
105. Salisbury JL, Baron AT, Coling DE, Martindale VE, Sanders MA.

- Calcium-modulated contractile proteins associated with the eucaryotic centrosome. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1986;
106. Baron AT, Greenwood TM, Bazinet CW, Salisbury JL. Centrin is a component of the pericentriolar lattice. *Biol Cell*. 1992;76(3):383–8.
 107. Errabolu R, Sanders MA, Salisbury JL. Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. *J Cell Sci*. Ocak 1994;107 (Pt 1):9–16.
 108. Paoletti A, Moudjou M, Paintrand M, Salisbury JL, Bornens M. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J Cell Sci*. Aralık 1996;109 (Pt 13):3089–102.
 109. Wright RL, Adler SA, Spanier JG, Jarvik JW. Nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas*: evidence for a role in basal body segregation and against essential roles in mitosis or in determining cell polarity. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1989;14(4):516–26.
 110. Taillon BE, Adler SA, Suhan JP, Jarvik JW. Mutational analysis of centrin: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol*. Aralık 1992;119(6):1613–24.
 111. Hart PE, Glantz JN, Orth JD, Poynter GM, Salisbury JL. Testis-specific murine centrin, *Cetn1*: Genomic characterization and evidence for retroposition of a gene encoding a centrosome protein. *Genomics*. 1999;
 112. Friedberg F. Centrin isoforms in mammals. Relation to calmodulin. *Mol Biol Rep*. 2006;
 113. Avasthi P, Scheel JF, Ying G, Frederick JM, Baehr W, Wolfrum U. Germline deletion of *Cetn1* causes infertility in male mice. *J Cell Sci*. 15 Temmuz 2013;126(Pt 14):3204–13.
 114. Tachibana M, Terada Y, Murakawa H, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Dynamic changes in the cytoskeleton during human spermiogenesis. *Fertil Steril*. 2005;
 115. Manandhar G, Simerly C, Salisbury JL, Schatten G. Centriole and centrin degeneration during mouse spermiogenesis. *Cell Motil Cytoskeleton*.

- 1999;43(2):137–44.
116. Simerly C, Castro C, Hartnett C, Lin CC, Sukhwani M, Orwig K, vd. Post-Testicular Sperm Maturation: Centriole Pairs, Found in Upper Epididymis, are Destroyed Prior to Sperm's Release at Ejaculation. *Sci Rep*. 2016;
 117. Manandhar G, Schatten G. Centrosome reduction during rhesus spermiogenesis: γ -Tubulin, centrin, and centriole degeneration. *Mol Reprod Dev*. 2000;
 118. Hinduja I, Zaveri K, Baliga N. Human sperm centrin levels & outcome of intracytoplasmic sperm injection (ICSI)--a pilot study. *Indian J Med Res*. Kasım 2008;128(5):606–10.
 119. Dantas TJ, Daly OM, Morrison CG. Such small hands: the roles of centrins/caltractins in the centriole and in genome maintenance. *Cell Mol Life Sci*. Eylül 2012;69(18):2979–97.
 120. Moretti E, Pascarelli NA, Belmonte G, Renieri T, Collodel G. Sperm with fibrous sheath dysplasia and anomalies in head–neck junction: focus on centriole and centrin 1. *Andrologia*. 2017;
 121. Moretti E, Gambera L, Stendardi A, Belmonte G, Salvatici MC, Collodel G. Characterisation of three systematic sperm tail defects and their influence on ICSI outcome. *Andrologia*. 2018;
 122. Page AM, Hieter P. The Anaphase-Promoting Complex: New Subunits and Regulators. *Annu Rev Biochem*. 2002;
 123. Peters J-M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell*. Mayıs 2002;9(5):931–43.
 124. Wade Harper J, Burton JL, Solomon MJ. The anaphase-promoting complex: It's not just for mitosis any more. *Genes and Development*. 2002.
 125. Goto M, Eddy EM. Speriolin is a novel spermatogenic cell-specific centrosomal protein associated with the seventh WD motif of Cdc20. *J Biol Chem*. 2004;
 126. Barroso G, Valdespin C, Vega E, Kershenovich R, Avila R, Avendaño C, vd. Developmental sperm contributions: fertilization and beyond. *Fertil Steril*. 2009;
 127. Sathananthan AH, Ratnam SS, Ng SC, Tarín JJ, Gianaroli L, Trounson A. The

- sperm centriole: Its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Hum Reprod.* 1996;
128. Crozet N, Dahirel M, Chesne P. Centrosome inheritance in sheep zygotes: Centrioles are contributed by the sperm. *Microsc Res Tech.* 2000;
 129. Avidor-Reiss T, Khire A, Fishman EL, Jo KH. Atypical centrioles during sexual reproduction. *Front cell Dev Biol.* 2015;3:21.
 130. Fawcett DW, Phillips DM. The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anat Rec.* 1969;
 131. Sathananthan AH, Kola I, Osborne J, Trounson A, Ng SC, Bongso A, vd. Centrioles in the beginning of human development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 01 Haziran 1991;88(11):4806–10.
 132. Ounjai P, Kim KD, Lishko P V., Downing KH. Three-Dimensional Structure of the Bovine Sperm Connecting Piece Revealed by Electron Cryotomography1. *Biol Reprod.* 2012;
 133. Ross L, Normark BB. Evolutionary problems in centrosome and centriole biology. *J Evol Biol.* May15 2015;28(5):995–1004.
 134. Fishman EL, Jo K, Nguyen QPH, Kong D, Royfman R, Cekic AR, vd. A novel atypical sperm centriole is functional during human fertilization. *Nat Commun.* 2018;9(1):2210.
 135. Palazzo RE, Vogel JM, Schnackenberg BJ, Hull DR, Wu X. Centrosome maturation. *Curr Top Dev Biol.* 2000;49:449–70.
 136. Blachon S, Cai X, Roberts KA, Yang K, Polyanovsky A, Church A, vd. A proximal centriole-like structure is present in drosophila spermatids and can serve as a model to study centriole duplication. *Genetics.* 2009;
 137. Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: A step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update.* 2003.
 138. Perdrix A, Travers A, Chelli MH, Escalier D, Do Rego JL, Milazzo JP, vd. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Hum Reprod.* 2011;

139. Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod.* 2006;
140. Skowronek MF, Alciaturi J, Casanova G, Capurro A, Montes JM, Sapiro R. Value of quantitative ultramorphological sperm analysis in infertile men. *Reprod Biol. Temmuz* 2010;10(2):125–39.
141. Wang J, Cheng H, Shen L, Wang G, Shi Y, Li H, vd. Morphological characteristics and phenotypic analysis of multiple morphological abnormalities in sperm flagella. *Natl Med J China.* 2017;
142. Tang S, Wang X, Li W, Yang X, Li Z, Liu W, vd. Biallelic Mutations in CFAP43 and CFAP44 Cause Male Infertility with Multiple Morphological Abnormalities of the Sperm Flagella. *Am J Hum Genet.* 2017;
143. Garanina AS, Alieva IB, Bragina EE, Blanchard E, Arbeille B, Guerif F, vd. The Centriolar Adjunct–Appearance and Disassembly in Spermiogenesis and the Potential Impact on Fertility. *Cells.* 2019;
144. Avasthi P, Scheel JF, Ying G, Frederick JM, Baehr W, Wolfrum U. Germline deletion of *Cetn1* causes infertility in male mice. *J Cell Sci.* 2013;
145. Nakamura S, Terada Y, Rawe VY, Uehara S, Morito Y, Yoshimoto T, vd. A trial to restore defective human sperm centrosomal function. *Hum Reprod.* 2005;
146. Kalatova B, Jesenska R, Hlinka D, Dudas M. Tripolar mitosis in human cells and embryos: Occurrence, pathophysiology and medical implications. *Acta Histochemica.* 2015.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 47

Tarih : 06.01.2014

Konu : Prof.Dr.Seyhun SOLAKOĞLU

Sayın, Prof.Dr.Seyhun SOLAKOĞLU
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İlgi :23/12/2013 tarihli yazınız.

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi İlkay ÖZDEMİR 'in yürüteceği 2013/789 dosya numaralı "Erken Embriyonik Gelişimde Sentrozomun Rolünün Işık Ve Elektron Mikroskopik Düzeyde Değerlendirilmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 05/07/2013 gün ve 13 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuştur.

Anılan çalışmanın ilgi yazınızda belirtilen araştırma yöntemleri değişiklikleri kurulumuzun 27/12/2013 gün ve 22 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ERKEN EMBRİYONİK GELİŞİMDE SENTROZOMUN ROLÜNÜN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOPİK DÜZEYDE DEĞERLENDİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%2	%0	%0	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Fırat Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
3	apps.who.int İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
7	aves.akdeniz.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	İlkay	Soyadı	Özdemir
Doğ.Yeri	Aydın	Doğ.Tar.	15.02.1969
Email	ilkcozdemirty@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü	1992
Lise	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Laborant Lisesi	1987

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Laborant	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	2012-2019
2.	Laborant	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	2009-2012
3.	Laborant	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	1987-1989

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) İngilizce Puanı
İngilizce	İyi	İyi	Orta		67,5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
ALES Puanı	79	81	80

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office, Word, Excel	İyi
Power Point	İyi

YAYINLANAN MAKALELER

- Arslan AH, Özçakır Tomruk C, Güzel Meydanlı E, Özdemir İ, Duygu Çapar G, Kütan E, Yılmaz A, Yalçın Ülker GM. Histopathological evaluation of the effect of systemic thymoquinone administration on healing of bone defects in rat tibia. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 2016; 31(1); 175-181

KONGRE/SEMPOZYUM BİLDİRİ KİTAPLARINDA YER ALAN TEBLİĞLER

- Yılmaz A., Tomruk C., Ozen F., Guzel E., Ozdemir İ. Histological evaluation of *Nigella Sativa* containing collagen membrane on bone healing. 12th International Iaoms- Açbid Joint Congress, 2018, Antalya (Sözlü Sunum).
- Kotil T., Erdoğan A., Özdemir İ., Mutlu H.S., Sarioğlu T., Tapul L., "The Effects of Retinoic Acid on Renal Cells in Mice", 18th International Microscopy Congress, Prag, Cek Cum., 7-12 Eylül 2014 (Poster Sunumu)
- Kotil T., Erdoğan A., Teyyareci Özdemir İ., Mutlu H.S., Tapul L., "Effects of Retinoic Acid on Mice Skin", 18th International Microscopy Congress, Prag, Cek Cum., 7-12 Eylül 2014 (Poster Sunumu)
- Özdemir İ., Karaca N., Babalıoğlu B., Gül C., Solakoğlu S., Kervancioğlu M. E. Globozoospermi olgularında sperm morfolojisinin ince yapı özellikleri. *Türk Elektron Mikroskopi Derneği 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi 2013 Mersin* (Poster Sunumu).
- Emre E, Katre B, Altintas Ö, Sarman Z, Efendi H, Özkan B, Akalin D, Solakoglu S, Cilingir ÖT, Özdemir İ, Yıldız K. Ratlarda deneysel yetişkin monoküler deprivasyon ambliyopisi modelinde intraperitoneal olarak uygulanan rolipramın vizüel kortikal plastisite üzerine etkisi. 47. *Türk Oftalmoloji Derneği Ulusal Kongresi* , 2013 Antalya
- Koç N., Mengi M., Başar M., Özdemir İ., Uslu F.E., Tunalı H., "Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) oluşturulmuş deneysel sıçan modelinde bazı endojen vazokonstriktör ve vazodilatör maddelerin düzeyleri üzerine defibrotid'in etkisi", 38. *Ulusal Fizyoloji Kongresi* , Trabzon, Türkiye, 25-29 Eylül 2012 (Sözlü Sunum).
- Özdemir İ., Başar M., Tokay E., Durmazkeser B., Koç N., Mengi M., et al., "Kronik alkol tüketimine bağlı oluşan böbrek hasarında PARP1'in rolü", 20. *Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası Katılımlı)*, Antalya 25-28 Ekim 2011 (Sözlü Sunum).
- Koç N., Mengi M., Başar M., Özdemir İ., Uslu F.E., Tunalı H., "Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı oluşturulmuş deneysel sıçan modelinde bazı endojen vazokonstriktör ve vazodilatör maddelerin düzeyleri üzerine Defibrotid'in etkisi", *TÜSAD 33. Ulusal Kongresi*, İzmir, Türkiye, 15-19 Ekim 2011

- Koç N., Özdemir İ., Birdal S., Başar M., Kucur M., Tunalı H., "Kronik alkol alımı akciğerlerde bulunan damarların endotelinde apoptozise neden olur", TÜSAD 32. Ulusal Kongresi, Antalya, Türkiye, 20-25 Ekim 2010 8Sözlü sunum)
- Aşar G. , Dindar S., Kotil T., Teyyareci Özdemir İ., Solakoğlu S. , "İmmunohistochemical Evaluation Of Odontogenic Differentiation Potential Of Human Buccal Tissue Fibroblasts In Vitro.", World Stem Cell Summit 2013 (WSCS13), San Diego, California, ABD, 4-6 Aralık 2013

KİTAPLARDA BÖLÜM YAZARLIĞI

- Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap , "Solakoğlu S.", Ed., Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul (Bölüm çevirisi)
- Genel Embriyoloji ve Histoloji Uygulama/ Teknikler Kitabı , "Leyla Tapul" Nobel Tıp Kitabevi (Bölüm yazarlığı)

KONGRE KATILIMLARI

- 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 2016 Çeşme
- Multinational Congress on Microscopy, Eger, MACARISTAN, Ağustos 2015
- 18th International Microscopy Congress, Prag, CEK CUM., 7-12 Eylül 2014
- Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi 2013 Mersin
- Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, ANTALYA 25-28 Ekim 2011

ÖDÜLLER

- TEMD Prof. Dr. Yener Aytekin Türkçe Bilim Dili İkincilik Ödülü 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi 2013 Mersin
- 47. Türk Oftalmoloji Derneği Ulusal Kongresi En iyi Araştırma Birincilik Ödülü

SERTİFİKALAR

- Çalışma ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Güvenliği Uzmanlığı Belgesi (C sınıfı)
- Western Blot Uygulamalı Eğitim Sertifikası

ÖZEL İLGI ALANLARI :

- Seyahat etmek
- Resim yapmak
- Dezavantajlı grupların eğitimi

