

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK DNA FRAGMENTASYONU VE
GLYCODELİN DAĞILIMININ SPERM MORFOLOJİSİ VE HASTA KLİNİĞİ İLE
İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Emine Esra NAL

DANIŞMAN
Prof. Dr. Sevinç İNAN

Manisa - 2010

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans tez projemin gerçekleşmesini sağlayan ve destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Rektörlüğüne, Tıp Fakültesi Dekanlığına ve Sağlık Bilimleri Enstitüsüne;

Tez konumun belirlenmesi, hazırlanması ve tezimin yazımında olmak üzere her aşamasında bana rehberlik eden, göstermiş olduğu özveri, emek ve değerli katkıların ötesinde, bölüm içi ve bölüm dışında karşılaştığım problemlerin çözümünde desteğini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanım ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Sevinç İNAN hocama,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini en verimli şekilde aktaran, laboratuvar çalışmalarında pratik becerilerimi geliştirmeme katkı sağlayan ve her konuda bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN, Doç. Dr. H. Seda VATANSEVER ve Doç. Dr. M. İbrahim TUĞLU hocalarıma,

Tezimin gerçekleşmesine için olanak sağlayan laboratuvar imkanlarını sağlayan Ege Üniversitesi Aile Planlaması Kısırlık (İnfertilite) Araştırma ve Uygulama Merkezi Başkanı Sayın Prof. Dr. Erol TAVMERGEN'e,

Tüp Bebek Merkezi Androloji laboratuvarında çalışma aşamasında yardımlarını esirgemeyen Androloji laboratuvarı sorumlusu Sayın Günsel UĞRAŞ ve Biyolog Murat ERSÖZ'e,

Tezimin istatistiksel analizlerinin yapılması aşamasında desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Gönül DİNÇ HORASAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım Uzman Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER'e, desteğini her zaman hissettiğim Burcu KARA ve Mahmud ÖZKUT'a ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca sonsuz özveri ve sevgiyle tüm emeklerini harcayarak, beni maddi ve manevi her konuda destekleyen ve bu günlere getiren canım aileme,
Sonsuz Teşekkürler....

ÖZET

Üreme biyolojisinde, sperm DNA yapısı ve kapasitasyon mekanizmaları fertilizasyon ve embriyo gelişimini etkileyen önemli faktörlerdendir. Çalışmamızda, sperm yaymalarında DNA fragmentasyonu ile ilişkili proteinler ve kapasitasyonda önemli rol oynayan Glycodelin'in immunohistokimyasal yöntemle belirlenmesi ve klinik bulgularla moleküler değişikliklerin ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Ege Üniversitesi Aile Planlaması Kısırlık (İnfertilite) Araştırma ve Uygulama Merkezi, Androloji Laboratuvarına başvuran, 100 gönüllü hastadan (23-47 y) hazırlanan sperm yaymalarında değerlendirme yapılmıştır. Hastalardan yaş, meslek, özgeçmiş ve soygeçmiş özellikleri; sigara, alkol, kahve kullanımları; geçirilen hastalıklar, operasyonlarla ilişkili detaylı anamnez alınarak, 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında semen örneklerinin spermiyogram analizleri yapılmıştır. Makler sayım kamarasıyla sperm sayısı, sperm hareketliliği, lökosit, Swim-up sonuçları değerlendirilmiştir. Morfolojik inceleme Kruger kesin kriterleri, DNA fragmentasyonu TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick-End Labeling) yöntemi ve apoptotik süreçte rol oynayan p53, Bcl-X, Fas immunoreaktiviteleri ve transmembran proteinlerinden Glycodelin S immunoreaktivitesi avidin-biyotin-peroksidaz yöntemiyle değerlendirilmiştir. Pozitif boyanan hücreler sayılarak, boyanma şiddeti hafif, orta, şiddetli olarak belirlenmiş ve H-skor sonuçları elde edilmiştir. TUNEL pozitif hücreler % olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler SPSS 15.0 programına girilerek Mann Whitney U testiyle istatistiksel olarak klinik bulgular ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Sperm sayısı ve hareketliliği düşük, anormal morfolojili örneklerde TUNEL pozitif hücrelerin sayıca arttığı, P53 ve Fas immunoreaktivitelerin bu örneklerde artmış olduğu belirlendi. Bcl-X immunoreaktivitesi normal morfolojiye sahip spermelerde hafif olarak değerlendirilirken, anormal morfolojili spermelerde hafif/orta boyanma izlendi. Glycodelin immunoreaktivitesinin; küçük baş anomalili ve immatür spermelerde hafif, normal morfolojiye sahip spermelerde orta, diğer anormal morfolojiye sahip spermelerde artmış olduğu izlendi.

Geçirilen operasyonlar ve meslek gibi faktörlerle sperm sayısının ve hareketliliğinin istatistiksel olarak anlamlı olarak etkilendiği ve bu vakalarda TUNEL pozitif hücrelerin yüzdesinin artmış olduğu saptandı ($p<0,05$).

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu için sperm seçiminde yüksek büyütme mikroskoplarla ve kesin kriterlerle morfolojik olarak iyi spermlerin seçimi, sperm sayısı, DNA fragmentasyonu ve kapasitasyon değerlendirmeleri klinik gebelik şansını etkilemektedir. Özellikle infertil bireylerin, yardımcı üreme teknikleri uygulamalarına başvurdukları dönemde, rutin semen analizlerinin, DNA fragmentasyon sonuçlarıyla karşılaştırılmasının açıklanamayan, tekrarlayan fertilizasyon ve implantasyon başarısızlığında önemli diyagnostik ve prognostik kriter olduğu düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Sperm Morfolojisi, DNA Fragmentasyonu, TUNEL, Immunohistokimya, Erkek Infertilitesi

SUMMARY

In reproductive medicine, sperm DNA integrity and capacitation mechanisms are considered to be important factors that affect both fertilization and embryo development. In this study, our aim was to observe DNA fragmentation and associated proteins and Glycodelin, which play important roles in capacitation, using immunohistochemistry in sperm smears and to evaluate correlation between clinical findings of patients with molecular changes.

Sperm smears were prepared from 100 volunteer patients (aged 23 - 47) who presented to Andrology laboratory of Ege University Family Planning-Infertility Research and Treatment Centre and gave semen samples. History was taken about ages, job, post medical-family history, smoking, alcohol consumption. After 3-5 days of sexual abstinence, sperm count, sperm motility, leucocyte count, swim up scores of semen samples were evaluated with Makler counting chamber. Sperm smears were analyzed morphologically according to Kruger's strict criteria. DNA fragmentation was evaluated by TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick-End Labeling), immunoreactivities of p53, Bcl-x, Fas, which play important roles in apoptotic process and immunoreactivity of Glycodelin S, transmembrane protein, were evaluated by avidin-biotin peroxidase method. Intensities of positive staining cells were determined as mild, moderate or severe and H-score results were obtained. TUNEL positive cells were expressed as per cent. The data were input SPSS 15.0 and Mann Whitney U statistical test was used to compare the clinical findings.

The number of TUNEL positive stained cells increased in the patient samples that had abnormal morphology, low sperm count and motility. Correlation was determined with increased immunoreactivities of p53 and Fas, especially in sperms which had head abnormality. While the immunoreactivity of Bcl-X was evaluated as mild in sperms that had normal morphology, sperms that had abnormal morphology was observed as having mild/moderate staining. While the immunoreactivity of Glycodelin was mild in small head and immature sperms, moderate immunoreactivity was seen in sperms which had normal morphology. Increased immunoreactivity was seen in other abnormalities.

It was observed that patients past operations and affected the statistical sperm counting and motility. These patients had increased TUNEL positive cells. Patients who had normal morphology sperm the TUNEL positive cell counting was decreased .

Clinical-pregnancy outcome is affected by good sperm selection for Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) on morphological aspects by using high magnification microscope, strict criteria's basis, sperm count, chromatin condensation and capacitation. Sperm DNA fragmentation , Glycodelin analysis is potentially valuable diagnostic and prognostic marker as compared to routine semen analysis in revealing paternal origin of some unexplained repeated ICSI failures in terms of fertilization and implantation failures.

Key Words: Sperm Morphology, DNA Fragmentation, TUNEL, Immunohistochemistry, Male Infertility

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ICSI	: Intra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
Gd	: Glycodelin
TUNEL	: TdT-mediated dUTP Nick End Labeling
PGH	: Primordial Germ Hücresi
SRY	: Sex-determining Region on Y
TBF	: Testis Belirleyici Faktör
AMH	: Anti Müllerian Hormon
MİM	: Müllerian İnhibe edici Madde
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropik Hormonu
ADS	: Androjen Duyarsızlık Sendromu
PAS	: Periyodik Asit Shift
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
ATPaz	: Adenozin TriFosfataz
LH	: Luteinizan Hormon
GnHR	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
SHBG	: Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
GTP	: Guanozin Trifosfattan
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
PDE	: Fosfodiesteraz
ZP3	: Zona Pellusida Protein 3
Gd A	: Glycodelin -A
Gd F	: Glycodelin-F
Gd S	: Glycodelin-S
ZP	: Zona Pellusida

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
IgA	: Immunoglobulin A
IgG	: Immunglobulin G
IgM	: Immunglobulin M
MAR	: Mixed Antiglobin Reaction
HOS	: Hipo Osmotik Şişme
SPA	: Sperm Penetration Assay
HZA	: Hemi Zona Assay
EBSS	: Earle's Balanced Salt Solution
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonicacid
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
CO₂	: Karbondioksit
MESA	: Epididimal Sperm Aspirasyonu
ELISA	: Progesteron
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
NGF	: Nöron Büyüme Faktörü
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL-2	: İnterlökin 2
HIV	: Human
Apaf-1	: Apoptotic Protease Activating Factor-1
DNAaz	: Deoksiribonükleaz
AIF	: Apoptosis Inducing Factor
Cys	: Sistein
Asp	: Aspartik Asit
IAP	: Apoptoz Protein İnhibitörleri
C-2	: Sistein-2
C-8	: Sistein-8
C-9	: Sistein-9
C-10	: Sistein-10
C-3	: Sistein-3

C-6	: Sistein-6
C-7	: Sistein-7
ICE	: Interleukin-1 Beta Converting Enzyme
C-4	: Sistein-4
C-14	: Sistein-14
C-5	: Sistein-5
C-11	: Sistein-11
C-12	: Sistein-12
ICAD	: Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz İnhibitörü
CAD	: Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz
TRAIL-R1	: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-R1
TRAIL-R2	: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-R2
TNF-R1	: Tümör Nekroz Faktör Reseptör-1
DR3	: Death Receptor-3
DR6	: Death Receptor-6
PARP	: Poli-ADP-Riboz Polimeraz
DR5	: Death Receptor-5
H1	: Histon 1
H5	: Histon 5
H2A	: Histon 2A
H2B	: Histon 2B
H3	: Histon 3
H4	: Histon 4
TH1	: Testise Spesifik Histon 1
TH2B	: Testise Spesifik Histon 2B
TP1	: Transition Protein 1
TP2	: Transition Protein 2
P1	: Protamin 1
P2	: Protamin 2
H2A.X.	: Histon 2A.X
H2A.Z.	: Histon 2A.Z

-SH	: Thiol
COMET	: Tek Hücreli Jel Elektroforezi
SCSA	: Sperm Kromatin Yapı Analizi
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
ISNT	: In Situ Nick Translation Assay
AOT	: Acridine Orange Test
SCD	: Sperm Kromatin Dağılımı
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
DAB	: Diamino Benzidine
SD	: Standart Deviation
NS	: Normal Spermiler
BA	: Baş Anomalisi
BoA	: Boyun Anomalisi
KA	: Kuyruk Anomalisi
CAT	: Chloramphenicol Acetyltransferase Reporter
YÜT	: Yardımlı Üreme Teknikleri
TRADD	: TNFR-1 associated death domain
FADD	: Fas associated death domain
AC	: Adenilat Siklaz
sAC	: Eriyebilen Adenilat Siklaz
mAC	: Membranöz Adenilat Siklaz
GPCR	: G Protein-Coupled Receptor
FPP	: Fertilization Promoting Peptide
DF	: Dekapasitasyon Faktörleri

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖNSÖZ.....	I
ÖZET	II
SUMMARY.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	X
RESİMLER DİZİNİ.....	XV
TABLOLAR DİZİNİ.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	2
2.2. Erkek Üreme Sistemi Embriyolojisi.....	3
2.2.1. Primordial Germ Hücreleri.....	3
2.2.2. Gonadların Gelişim.....	4
2.2.3. Testislerin Gelişimi.....	6
2.2.4. Genital Kanalların Gelişimi.....	8
2.2.5. Genital Bezlerin Gelişimi.....	10
2.2.5.1. Seminal Vezikül.....	10
2.2.5.2. Prostat.....	11
2.2.5.3. Bulboüretal Bezler.....	11
2.2.6. Dış Genital Organların Gelişimi.....	11
2.2.7. Testislerin İnişi.....	12
2.2.8. Klinik Korelasyon.....	15
2.2.8.1. Kriptorşidizm ya da İnmemiş Testis.....	15
2.2.8.2. Konjenital İnguinal Herni.....	16
2.2.8.3. Hidrosel.....	16
2.2.8.4. Ektopik Testisler.....	16
2.3. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi.....	17

2.3.1. Testis.....	17
2.3.1.1. Seminifer Tübüller.....	18
2.3.1.2. Spermatogenez.....	20
2.3.1.3. Sertoli Hücreleri.....	31
2.3.1.4. İnterstisiyel Doku.....	33
2.3.1.5. Leydig Hücreleri.....	34
2.3.1.6. Testis Histofizyolojisi.....	36
2.3.1.7. Kan-Testis Bariyeri.....	36
2.3.2. Testis İçi Genital Kanallar.....	37
2.3.2.1. Tubuli Rekti.....	37
2.3.2.2. Rete Testis.....	37
2.3.2.3. Duktuli Efferentes.....	38
2.3.3. Genital Boşaltım Kanalları.....	38
2.3.3.1. Duktus Epididimis.....	38
2.3.3.2. Duktus Deferens.....	39
2.3.3.3. Duktus Ejakulatorius.....	39
2.3.4. Yardımcı Üreme Bezleri.....	40
2.3.4.1. Seminal Vezikül.....	40
2.3.4.2. Prostat.....	40
2.3.4.3. Bulboüretal Bez.....	41
2.3.5. Penis.....	41
2.4. Fertilizasyon (Döllenme).....	43
2.4.1. Fertilizasyonun Evreleri.....	44
2.4.2. Oositin Fertilizasyona Cevabı.....	46
2.4.3. Fertilizasyonun Temel Sonuçları.....	47
2.4.4. Glycodelin.....	47
2.5. Erkek İnfertilitesinde Tanıya Yönelik İnceleme Yöntemle.....	49
2.5.1. Semen Analizi.....	49
2.5.1.1. Semen Toplanması.....	49
2.5.1.2. Semen Fiziksel Özellikleri.....	49
2.5.1.3. Mikroskopik Değerlendirme.....	50

2.5.2. Semen Hazırlama Protokolleri.....	55
2.5.3. Ejekulattan Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	56
2.5.3.1. Yıkama.....	56
2.5.3.2. Yüzdürme.....	56
2.5.3.3. Gradient Uygulamaları.....	58
2.5.4. Testiküler Dokudan Sperm İzolasyonu.....	58
2.5.5. Retrograd Ejakulasyon.....	58
2.6. DNA Hasarı / Apoptoz.....	59
2.6.1. Apoptozda Morfoloji.....	60
2.6.2. Apoptozu Saptama Yöntemleri.....	61
2.6.3. Apoptoz Mekanizmaları.....	61
2.6.3.1. Apoptozun Hücre Dışı Uyaranları.....	61
2.6.3.2. Apoptozun Hücre İçi Uyaranları.....	62
2.6.4. Apoptoz Süreci.....	62
2.6.4.1. Kaspazlar ve Apoptoz.....	63
2.6.4.2. Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspaz Aktivasyonu.....	65
2.6.5. DNA Hasarına Genlerin Yanıtı.....	65
2.6.6. Apoptozun İndüklenmesi.....	66
2.6.7. Sperm DNA Hasarı.....	66
2.6.7.1. Sperm DNA Fragmentasyonunun Mekanizması.....	66
2.6.7.2. İnsan Sperminde DNA Paketlenmesi.....	67
2.6.8. Sperm Kromatin Hasarının Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	69
2.6.8.1. COMET Analizi (COMET Assay).....	70
2.6.8.2. TUNEL Boyaması.....	71
2.6.8.3. In Situ Nick Translation Assay (ISNT).....	71
2.6.8.4. Sperm Kromatin Yapı Hasarı Analizi (SCSA).....	72
2.6.8.5. Acridine Orange Test (AOT).....	72
2.6.8.6. Sperm Kromatin Dağılımı (SCD).....	73
3. MATERYAL VE METOD	74
3.1 Hastalardan Örnek Toplanması.....	82
3.2. Sperm Örneklerinin İncelenmesi.....	82

3.2.1. Makler Sayım Kamarası ile Sayım.....	82
3.2.2. Swim-up Yöntemi Uygulaması.....	82
3.2.3. Spermilerin Morfolojik Değerlendirilmesi.....	83
3.2.4. Sperm Yayma Preparatlarının Avidin-Biyotin Peroksidaz Yöntemi ile İndirek İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi.....	84
3.2.5. TUNEL Yöntemi ile DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi.....	87
3.3. İstatistiksel Değerlendirmeler.....	90
4. BULGULAR.....	91
4.1. Hastalara Ait Klinik Bulgular.....	91
4.2. Spermiyogram Sonuçları.....	93
4.3. Sperm Yaymalarının Diff–Quick Boyaması İle Değerlendirilmesi.....	95
4.4.Sperm Yaymalarının İndirek İmmunohistokimyasal Yöntem ile Değerlendirilmesi.....	97
4.4.1.Sperm yaymalarının anti-p53 primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.....	98
4.4.2.Sperm Yaymalarının Anti-Bcl-X Primer Antikoru Kullanılarak İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Değerlendirilmesi.....	99
4.4.3.Sperm Yaymalarının Anti-Fas Primer Antikoru Kullanılarak İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Değerlendirilmesi.....	100
4.4.4.Sperm Yaymalarının Anti-Glycodelin Primer Antikoru Kullanılarak İndirek İmmunohistokimyasal Yöntemle Değerlendirilmesi.....	101
4.5.Sperm Yaymalarının TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick–End Labeling) yöntemi kullanılarak değerlendirilmesi.....	102
4.6. İmmunohistokimyasal ve TUNEL Boyama Sonuçlarının Klinik Korelasyonu.	103
5.TARTIŞMA.....	110
6.YORUM.....	129
7.KAYNAKLAR.....	130

RESİMLER DİZİNİ

	SAYFA
Resim 2.1.1: Erkek üreme sistemi genel yapısı.....	2
Resim 2.2.1: Primordiyal germ hücrelerinin göçü.....	3
Resim 2.2.2: Gonadların gelişimi.....	6
Resim 2.3.1: Testisin genel yapısı.....	18
Resim 2.3.2: Seminifer tübül şematik yapısı.....	19
Resim 2.3.3: Testis, H&E boyalı histolojik yapısı.....	20
Resim 2.3.4: Spermatogenez.....	22
Resim 2.3.5: Spermiyogenez.....	26
Resim 2.3.6: Sertoli hücresi.....	32
Resim 2.3.7: Leydig hücreleri	35
Resim 4.3: Sperm yaymalarının diff-quick boyaması ile değerlendirilmesi	95
Resim 4.4.1: Sperm yaymalarının anti-p53 primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.....	98
Resim 4.4.2: Sperm yaymalarının, anti-Bcl-X primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi	99
Resim 4.4.3: Sperm yaymalarının, anti-Fas primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.....	100
Resim 4.4.4: Sperm yaymalarının, anti-Glycodelin primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi.....	101
Resim 4.5: Sperm yaymalarının, TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick-End Labeling) yöntemi kullanılarak değerlendirilmesi.....	102

TABLOLAR DİZİNİ

	SAYFA
Tablo I : Örnek Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	75
Tablo II : Örnek Anamnez Formu.....	79
Tablo III : Örnek Spermiyogram Formu.....	80
Tablo IV : Örnek İmmunohistokimya Değerlendirme Formu.....	81
Tablo V : Swim –up Değerlendirmesi.....	83
Tablo VI : Sperm Yayma Hazırlanması.....	84
Tablo VII : Diff-Ouick Boyama Protokolü	84
Tablo VIII : İmmunohistokimya Boyama Protokolü.....	86
Tablo IX : TUNEL Boyama Protokolü.....	88
Tablo X: İmmunohistokimya ve TUNEL için Kullanılan kimyasal Malzemeler.....	89
Tablo 4.1: Hastalara Ait Demografik Veriler	92
Tablo 4.2: Hastalara Ait Spermiyogram Ve Swim-Up Sonuçları.....	94
Tablo 4.3: Sperm Morfolojilerinin Kruger Kesin Kriterlerine Göre Değerlendirilmesi.....	96
Tablo 4.4: Sperm Yaymalarının İndirek İmmunohistokimyasal Yöntem İle Değerlendirilme Sonuçları.....	97
Tablo 4.6: İmmunohistokimyasal ve Tunel Boyama Sonuçlarının Klinik Korelasyonu.....	103

1. GİRİŞ

İnfertil çiftlerin değerlendirilmesinde, nedenlerin % 40'nın erkeğe bağlı faktörler ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Sperm DNA (Deoksiribonükleik Asit) içeriği ve kapasitasyon mekanizması fertilizasyon ve embriyo gelişimi için önemli etkenlerdendir. Sperm morfolojisi, DNA fragmentasyonu ve hücre membran yapısı bu süreçte önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada, erkeğe ait faktörlerden sperm yaymalarında DNA fragmentasyonu ve kapasitasyonda önemli rol oynayan Glycodelin adlı proteinin önemi belirtilecektir.

Üreme biyolojisinde, sperm DNA yapısı fertilizasyon ve embriyo gelişimini etkileyen önemli bir faktördür. Sperm DNA fragmentasyonu analizi, intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sürecinde açıklanamayan ve tekrarlayan fertilizasyon ve implantasyon başarısızlığında erkek kaynaklı sorunda değerli bir katkı sağlamaktadır. ICSI için sperm seçiminde yüksek büyütme mikroskopları ile morfolojik olarak iyi spermlerin seçimi, Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi değerlendirmesi, sperm sayısı, kromatin kondensasyonu klinik gebelik şansını etkilemektedir. DNA fragmentasyonun belirlenmesi fertilizasyon ve embriyo gelişim şansının artırılması yönünden önemli görülmektedir (1).

Aynı zamanda, seminal plazma proteinlerinden biri olan Glycodelin (Gd) Lipocalin süperailisinden olan immunomodülatör bir glikoproteindir. Glycodelin erkek fertilitesinde önemli bir tanımlayıcı marker olarak düşünülmektedir. Gd S, erkek üreme sistemindeki hücreler tarafından eksprese edilen ve sperm kolesterol akımını düzenleyen, spermin kapasitasyonunu önleyen doğal bir faktör olarak belirlenmiştir. Servikal mukustan ilerlerken, Gd S ayrılır ve kapasitasyon başlar (2).

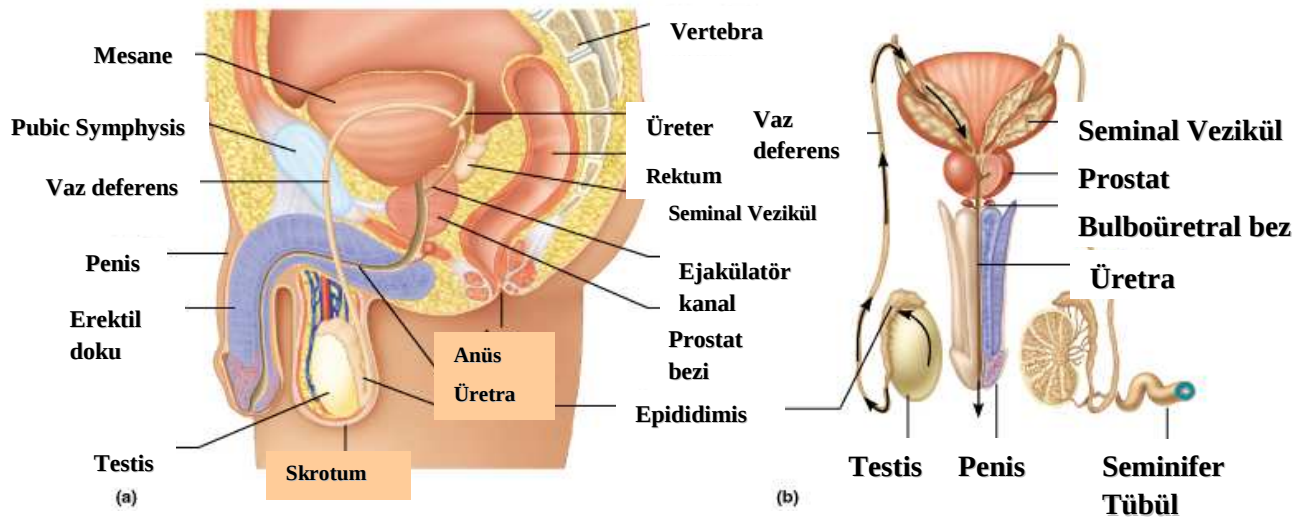
Çalışmada fertilizasyonun moleküler mekanizmaları arasında yer alan, az anlaşılmış olan erkek infertilitesinin nedenleri ve bu nedenleri araştırmada rol alan moleküllerdeki değişikliklerin, hastaların kliniği ile korelasyon gösterip göstermediği araştırılacaktır. Bu şekilde açıklanamayan infertilite olgularında ya da kaliteli sperm seçiminde DNA fragmentasyonunun ve Glycodelin önemli parametreler olarak göz önüne alınmaları sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi; testisler, testis içi genital kanallar (tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes), genital boşaltım kanalları (duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus), yardımcı bezler (prostat, seminal vezikül, bulboüretral bez) ve penisten **(Resim 2.1.1)** oluşmuştur (3,5). Testisin endokrin ve ekzokrin işlevleri bulunmaktadır. Erkek üreme sisteminin gelişimi ile ilgili hormonların üretimi endokrin işlevini, spermiyum (spermatozoon) üretimi ekzokrin işlevini oluşturmaktadır.

Genital kanalların ve yardımcı bezlerin salgısı, düz kas kasılmalarının da yardımı ile spermatozoonları dışarıya doğru iter. Bu salgılar aynı zamanda erkek üreme sistemi içinde bulunan spermatozoonlara gerekli besini sağlar. Genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgısına spermatozoonların eklenmesi ile oluşan semen penis yoluyla dışarı atılır (3).

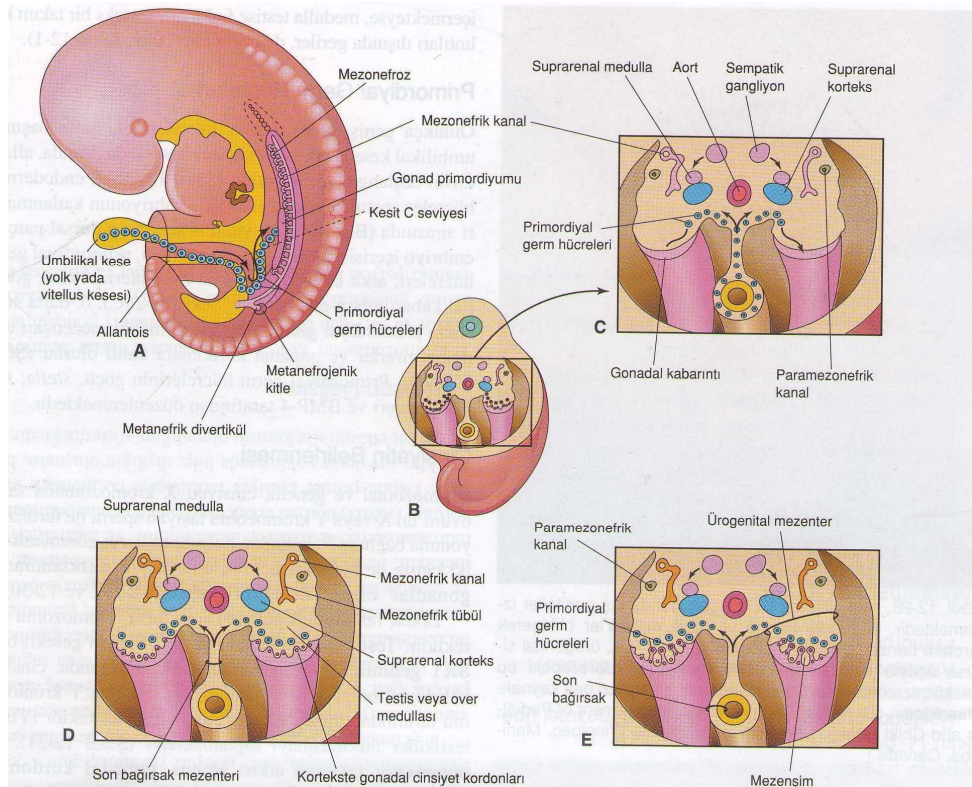


Resim. 2.1.1. Erkek üreme sistemi genel yapısı (5).

2.2. Erkek Üreme Sistemi Embriyolojisi

2.2.1. Primordial Germ Hücreleri

Embriyonik gelişim, erkek gameti sperm ile dişi gameti oositin birleşmesi olayı olan fertilizasyon sonucu zigot oluşumu ile başlar. Gametler embriyonik gelişimin 2. haftası boyunca epiblastın içinde oluşan ve daha sonra allantoisin başlangıç yerine yakın, vitellüs kesesine (yolk kesesi) göç eden oldukça geniş, oval primordial germ hücrelerinden (PGH) köken alırlar. Embriyonun katlanmaları sırasında vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Katlanmalar sürecinde, PGH, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyuna gonadal kabarıntılara göç ederler (**Resim 2.2.1**). 6. hafta sırasında PGH'leri altındaki mezenşim içerisine girerler ve gonadal kordonlara dahil olurlar. PGH'nin göçü, *stella*, *fragilis genleri* ve *BMP-4* tarafından düzenlenmektedir (6,7).



Resim 2.2.1. Primordial germ hücrelerinin göçü (7).

Göç sırasında başlayan mitotik bölünmelerle sayıca artan hücreler, gonadlara ulaştıktan sonra da çoğalmaya devam ederler. Fertilizasyona hazırlık amacıyla germ hücreleri gametogenez sürecine girerler. Gametogenez sırasında mayozla kromozom sayısı yarıya indirgenir. Daha sonra da farklılaşma süreci ile olgunlaşırlar (6).

Cinsiyetin farklanması, otozomal ve cinsiyet ile ilgili çok sayıda genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı kısa kolunda (Yp11) **SRY** genini (Sex-determining Region on Y) taşıyan Y kromozomudur. Yapılan çalışmalarda SRY geninin testiküler farklılaşmanın ilk dönemlerinde rol oynadığı anlaşılmış ve azospermi ya da oligozoospermi durumlarında %10 oranla Y kromozomunun q kolunda kısmi delesyon varlığı saptanmıştır. Bu delesyonlarla Y kromozomu üzerinde etkin 3 ana dizi daha ortaya çıkmıştır; AZFa, AZFb ve AZFc (10). Bu genin protein ürünü cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteini **Testis Belirleyici Faktör (TBF)** olarak bilinir. Bu faktörün varlığıyla fetusun cinsiyeti erkek (XY), yokluğunda da kız (XX) olarak gelişir (6).

Her ne kadar embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu dölleyen sperm çeşidi ile fertilizasyon sırasında belirleniyorsa da erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri, 7. embriyonik haftaya kadar gelişime başlamazlar. Genital sistem erken dönemde her iki cinste de birbirine benzer, bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç dönemine *seksüel gelişimin farklılaşmamış safhası* denir (7).

2.2.2. Gonadların Gelişimi

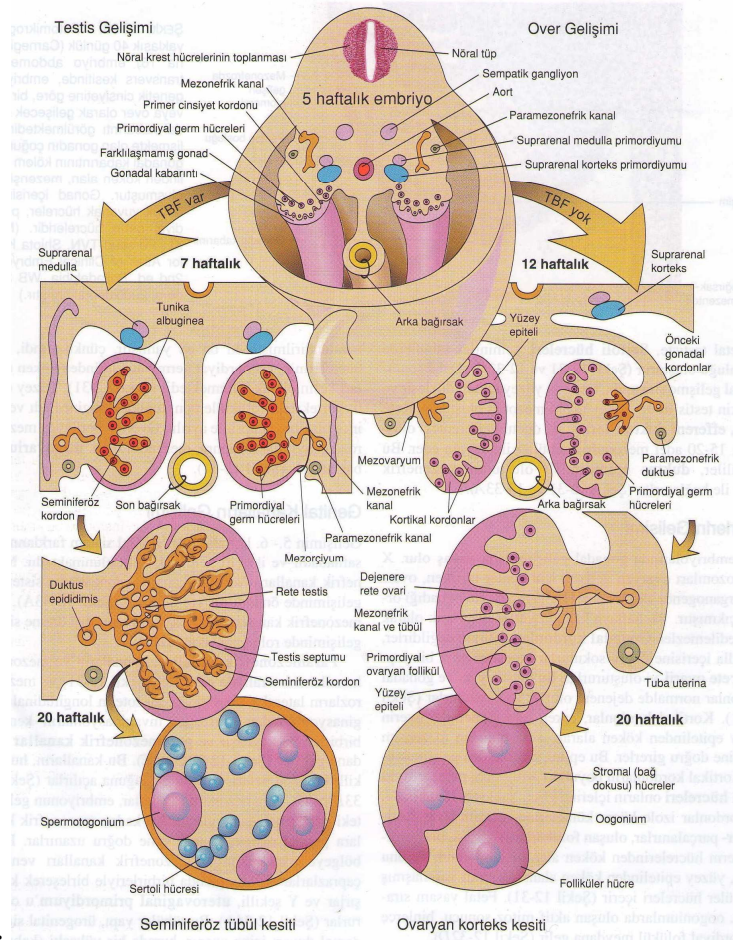
Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken alırlar:

- Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordiyal germ hücreleri

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Kölomik epitel ve altındaki mezenşimin çoğalması ile genital veya gonadal kabarıklık oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal

kordonlar (gonadal kordonlar) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler (7). Gelişimin 6. haftasına kadar bu genital kabarıklıklar içinde germ hücreleri yoktur. Primordiyal germ hücreleri (PGH), 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada genital kabarıklıkları işgal ederler (**Resim 2.2.2.**). PGH'lerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabarıklığın epiteli çoğalır ve epitel hücreleri altlarında yer alan mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada **primitif cinsiyet kordonları** denilen düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Bu hücreler genital kabarıklıklara ulaşamadıkları takdirde gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum veya testise farklanmasında PGH'lerinin indükleyici etkisi vardır (6).

Hem erkek, hem de dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir. Bu devredeki gonad **farklanmamış gonad** olarak bilinir. Farklanmamış gonad, dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulla'dan oluşur. Eğer embriyo XX kromozom yapısına sahipse, farklanmamış gonad'ın korteksi overe farklılaşır, medullası geriler. Embriyo XY kromozom yapısına sahipse, medulla gelişir ve testisin seminifer tübülüslerine farklanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur (6,7).



Resim 2.2.2. Gonadların gelişimi (7)

2.2.3. Testislerin Gelişimi

Erkek fenotipinin gelişimi için bir Y kromozomu gereklidir. Eğer embriyo genetik olarak erkekse, primordiyal germ hücrelerinin cinsiyet kromozomları XY'dir. TBF kodlayan Y kromozomu kısa kolundaki SRY geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları testis veya medulla kordonları'nı oluşturmak üzere, çoğalmaya devam edip medullanın derinliklerine doğru ilerlerler. Bu organizatör faktörün etkisi altında, gonadal kordonlar, seminiferöz kordonlara (seminiferöz tübül primordiyumlarına) farklırlar. Seminiferöz kordonların oluşumu, Sox 9 ve Fgf 9 genlerinin ekspresyonları ile sağlanır (6,7). Bu kordonlar bezin hilusuna doğru, daha sonra rete testis tübüllerini oluşturacak ince hücre sıralarından oluşan bir ağ şeklinde dağılırlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde testis kordonlarının yüzey epiteliyle olan ilişkileri **tunika albuginea** adlı

yoğun fibröz bir bağ dokusunun araya girmesiyle sona erer. Dens tunika albuginea'nın gelişimi, testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenterisi olan, **mezorsiyum** ile asılı hale geçer. Seminiferöz kordonlar, seminiferöz tübüllere, tubuli rekti ve rete testis'e farklılıklar (7).

4. ayda, testis kordonları atnalı şeklini alır ve bu atnalının uçları rete testis ile devam eder. Bu durumda testis kordonları artık PGH ve bezin yüzey epitelinden köken almış **Sertoli** (destek) hücrelerinden meydana gelmiştir (6).

Gonadal sırtın orijinal mezenşiminden köken alan **interstisiyel Leydig hücreleri** testis seminifer kordonlarının arasında bulunur ve bu kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Gestasyonun 8. haftasında, Leydig hücreleri androjenik hormonlar olan testosteron ve androstenedione üretmeye başlarlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genitalin maskülen olarak farklılaşmasını uyarırlar. Testosteron üretimini, insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimüle eder. Hormonun miktarı 8-12 haftalık dönemde en yüksek değerine ulaşmıştır (7). Testisler artık genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini etkileyecek hale gelmiştir. Fetal testisler tarafından üretilen **testosteron**, **dihidrotestosteron** (testosteron metaboliti) ve **Anti Müllerian Hormon (AMH)** veya **Müllerian İnhibe edici Madde (MİM)** normal erkek cinsiyet gelişimini belirlemektedir. AMH, destek hücreleri olan Sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Hormonun salınması puberteye kadar devam eder ve daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, uterus ve tuba uterinalara farklılaşan, paramezonefrik (müllerian) kanalların gelişimini baskılar (6,7).

Puberteye kadar solid halde kalan testis seminifer kordonları pubertede lümenleri açılarak seminifer tübüller haline gelirler. Seminiferöz tübül duvarında iki tip hücre bulunur:

- Sertoli hücreleri, destek hücreleri olan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler.
- Spermatogonia, primordiyal sperm hücreleri olan bu hücreler, primordiyal germ hücrelerinden farklılıklar.

Fetal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki fetal gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur (7). Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübüleriyle birleşir. Rete testis, **duktuli efferentes**'leri oluşturan, 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu tübüller, duktus epididimis'i oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar. Duktus deferens ise rete testis ile *mezonefrik veya Wolffian* kanalları birbirine bağlar (6,7).

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fetusun gelişmesi sırasında göç ederler ve sonuçta spermatik kordonların sonlarında skrotumda asılı olarak bulunurlar (3). Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2°C - 3°C derece düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34°C - 35°C gereklidir. Skrotum, testislerin karın içinden daha düşük bir ısıda saklanmalarından önemli rolü vardır (4).

2.2.4. Genital Kanalların Gelişimi

Gelişimin 5.-6. haftalarında genital sistem farklılaşmamış evrededir ve erkek ve dişi embriyolarda **Mezonefrik (Wolffian) kanallar** ve **Paramezonefrik (Müllerian) kanallar** olarak iki çift genital kanal vardır. Mezonefrik kanallar erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli bir yer tutarken, paramezonefrik kanallar dişi üreme sistemi gelişiminde rol oynamaktadırlar (6,7).

Paramezonefrik kanallar, gonadların ve mezonefrik kanalların lateralinde gelişirler ve mezonefrozların lateral yüzeylerinde, mezotelin longitudinal invaginasyonlarından oluşurlar. İnvaginasyonların kenarları birbirleriyle kaynaşır ve paramezonefrik kanallar meydana gelirler. Bu kanalların, huni şekilli kranial uçları periton boşluğuna açılırlar. Paramezonefrik kanallar, embriyonun gelecekteki pelvik bölgesine ulaşmaya kadar, mezonefrik kanallara paralel olarak, kaudal yöne doğru uzanırlar. Pelvik bölgeye ulaştıklarında, mezonefrik kanalları ventralde çaprazlarlar ve orta planda birbirleriyle birleşerek kaynaşırlar ve Y şekilli, **uterovaginal primordiyum**'u oluştururlar. Bu tübüler yapı, ürogenital sinüsün dorsal duvarı içine uzanır, burada bir yükselti (kabarıntı) olan, **sinüs tüberkülü**'nü oluşturur (7).

Genital Kanalların Gelişiminin Moleküler Düzeni:

Testisin gelişimi üzerinde en temel rolü oynayan SRY geni gonadal sırtı doğrudan, mezonefrik kanalları da dolaylı şekilde etkilemektedir. SRY geni testisten mezonefrik kanal tübüllerinin gonadal sırtı penetre edebilmesini ve testislerin daha ileri gelişimini sağlayan kemotaktik bir madde salgılamaları için uyarmaktadır. Bu tübüller genital sırtı penetre edemedikleri takdirde testisin gelişmesi mümkün değildir. SRY aynı zamanda Sertoli ve Leydig hücrelerinin farklanabilmesi için gerekli olan ve etkisini bir başka transkripsiyon faktörü olan **SOX 9** üzerinden gösteren **steroidogenezis faktörü 1**'in salgılanmasını düzenlemektedir. Sertoli hücreleri tarafından salgılanan MİM veya AMH paramezonefrik (müllerian) kanalların gerilemesini sağlamaktadır (6).

Fetal testisler, maskülinizan hormonlar olan testosteron ve MİM üretirler. Sertoli hücreleri, MİM üretimine 6.-7. haftada başlarlar. İnterstisyel hücreler, testosteron salgılamaya 8. haftada başlarlar. Testosteron üretimi hCG tarafından stimüle edilir. Testosteron, erkeklerde mezonefrik kanallardan erkek genital kanalların oluşumunu uyarırken, MİM paramezonefrik kanalın epiteliyal-mezenşimal dönüşümü ile kaybolmasına neden olur. 8. haftada, fetal testisler tarafından üretilen testosteronun etkisiyle her bir mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı hal alır ve epididimis oluşur. Mezonefroz dejenere olduğunda, mezonefrik kanallardan bazıları kalıcıdır ve efferent duktulileri oluşturular. Bu duktuliler duktus epididimis'e açılırlar. Epididimis distalinde mezonefrik kanal, kalın bir düz kas tabakası kazanır ve duktus deferens oluşur (7).

Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron da hedef dokulardaki hücrelerin içine girip ya öylece kalır ya da **5- α redüktaz** enzimiyle dihidrotestosterona dönüştürülür. Testosteron ve dihidrotestosteron hücre içinde bu hormonlara karşı özel ve yüksek afinitesi olan bir reseptör proteine bağlanırlar. Bu reseptör kompleksi de dokuya özgü transkripsiyon genlerinin ve bu genlerin protein ürünlerinin ortaya çıkabilmesi için DNA'ya bağlanır. Testosteron reseptör kompleksi mezonefrik kanalların virilizasyonunu sağlarken, dihidrotestosteron reseptör kompleksi de erkek dış genital organlarının diferansiye olmalarına yardım eder (6).

Eskiden cinsiyetin dişi yönünde farklanabilmesi için sadece Y kromozomunun bulunmamasının yeterli olduğu ve bu sürecin pasif bir süreç olduğu kabul edilirdi. Ancak son yıllarda primitif gonadın, tıpkı testiste olduğu gibi overe dönüşebilmek için de bazı genlerin varlığına ihtiyaç duyduğu anlaşılmıştır. Örneğin, nükleer hormon reseptör ailesinin bir üyesi olan ve X kromozomunun kısa kolu üzerinde yer alan **DAX 1, SF 1** aktivitesini düzenlemekte ve Sertoli ve Leydig hücrelerinin oluşmasını engellemektedir (6).

Mezonefroz gerilerken, **epigenital tübüller** adı verilen birkaç boşaltım kanalı rete testis kordonlarıyla ilişki kurarak sonunda duktuli efferentesleri oluşturur. Testisin kaudal kutbundaki boşaltım kanallarıysa, **paragenital tübüller**, rete testis kordonlarıyla birleşmez. Bunların kalıntıları topluca **paradidimis** olarak bilinir (6).

Mezonefrik kanallar en kranialdeki kısımları, **apendiks epididim**, dışında ana genital kanalları oluştururlar. Mezonefrik kanallar efferent duktusların giriş yerinin hemen altından itibaren uzayıp, kıvrıntılı bir yapı halini alarak, **duktus epididimisi** oluştururlar. **Duktus deferens** mezonefrik kanalın, epididimin kuyruğundan, seminal vezikül tomurcuğuna kadar, kalın bir kas kılıfına bürünmesiyle oluşur. Duktus deferensin seminal vezikülden sonraki parçasına **duktus ejakulatoryus** denir. Paramezonefrik kanallar erkeklerde kranial uçlarındaki küçük bir kısım dışında (apendiks testis) dejenere olurlar (6).

2.2.5. Genital Bezlerin Gelişimi:

2.2.5.1. Seminal Vezikül

Mezonefrik kanalların, kaudal uçlarının lateralinden, dışa doğru seminal bezler gelişir. Bezler, ejakulat içindeki sıvının büyük kısmını oluştururlar ve spermlerin beslenmesini sağlayan salgı yaparlar. Seminal bezlerin kanalı ile üretra arasında kalan mezonefrik kanalın bölümü ejakulatuar kanal olarak gelişmektedir (7).

2.2.5.2. Prostat

Üretranın prostatik parçasından meydana gelen, çok sayıda endodermal çıkıntı etrafındaki mezenşim içerisine doğru büyür. Prostatın glandüler bez epiteli bu endodermal hücrelerden gelişirken, epitel hücreleriyle ilişkili mezenşimden ise organın stroması ve düz kasları meydana gelmektedir (7).

2.2.5.3. Bulboüretal Bezler

Bezelye şeklindeki bu organlar üretranın spongios parçasından çift halde, dışa doğru büyüyen hücrelerden gelişirler. Düz kas hücreleri ve stroma bölgedeki mezenşimden köken alırlar. Bezlerin salgısı, semenle karışmaktadır (7).

2.2.6. Dış Genital Organların Gelişimi

Farklanmamış evrede, 7. hafta sonuna kadar dış genitallerin gelişimi her iki cinstede birbirine benzer. Cinsiyet farklılaşması 9. haftada ortaya çıkmaya başlar ancak 12. haftaya kadar dış genitallerin farklılaşması tam değildir. Gelişimin 3. haftası sonunda, primitif çizgiden köken alan mezenşim hücreleri çoğalarak, kloakal membranın çevresine **kloakal kıvrım** adı verilen bir çift, hafifçe yüksek bir şişlik oluşturmak üzere göç ederler. Bu kıvrımlar, kloakal membranın kranialinde birleşerek **genital tüberkül**'ü oluştururlar (6,7). Genital tüberkül hızla uzar ve bir **primordiyal fallus** oluşur. 6. haftanın sonunda, ürorektal septum kloakal membran ile birleştiğinde, kloakal membran; dorsalde **anal membrana** ve ventralde **ürogenital membrana** bölünür. Ürogenital membran, **üretal katlantılara** bağlanmış median bir oluk olan **ürogenital oluğun** tabanında yer alır. Anal membran ve ürogenital membran bir hafta sonra yırtılırlar ve sırasıyla anüs ve ürogenital açıklık oluşur. Dişi fetuslarında üretra ve vajina ortak bir boşluk olan **vestibüle** açılırlar (7).

Bu sırada üretal kıvrımların her iki yanında labioskrotal şişkinlikler ve ürogenital katlantılar gelişir. Bunlar, daha sonra erkeklerde **skrotal şişlikleri**, kızlarda da **labia majörleri** oluşturacaklardır.

Farklanmamış dış genitallerin erkek yönünde gelişmeleri, fetal testisler tarafından üretilen testosteron hormonunun etkisiyle olmaktadır. **Fallus** adını almış olan genital

tüberkülün hızlı uzamasıyla penis oluşur. Bu uzama sırasında, fallus penisin ventral yüzeyinde, ürogenital katlantıları öne doğru çekerek ürogenital oluğun lateral duvarlarının oluşmasını sağlar. Bu oluk, uzayan fallusun kaudal kısmına kadar gelir; ancak en uç noktasına, glansa ulaşamaz. Bu oluğun endodermal kökenli epiteli **üretral plağı** oluşturur (6). Üçüncü ayın sonunda, penisin ventral yüzeyi boyunca, ürogenital katlantılar, birbirleriyle birleşerek spongioz (**penil**) üretra'yı oluştururlar. Bu kanal fallusun ucuna kadar uzanmaz. Yüzey ektodermi, penisin median hattında birleşerek penil rafe'yi oluşturur, böylece spongioz uretra penis içerisinde hapsedilir. Glans penisin ucunda, üretranın en distal kısmı 4. ayda ektodermal kökenli içe doğru büyüyen, hücrel bir kordon meydana gelir, bu oluşum penis köküne doğru büyür ve spongioz üretra ile birleşir. Bu hücrel kordon kanalize olarak, daha önce meydana gelen spongioz üretraya bağlanır. Bu şekilde, üretranın terminal parçası tamamlanır ve dış üretral açıklık (**eksternal uretral meatus**) glans penis ucuna açılmış olur (6,7).

12. haftada, glans penisin periferinde, sirküler bir ektodermal içe büyüme meydana gelir. Bu içe büyüme, kanalize olduğunda, örtücü bir deri katlantısı olan, prepus meydana gelir. Penisin, korpus spongiozum ve korpora kaverna kısımları, fallus mezenşiminden gelişir. Erkeklerde skrotal şişkinlikler birbirlerine doğru büyüyerek sonuçta birleşirler ve skrotum meydana gelir. Önce inguinal bölgede yerleşmiştir. Gelişimin daha ileri evrelerinde, kaudal yönde ilerleyerek her şişlik kendi tarafındaki hemiskrotumu oluşturur. İki hemiskrotum birbirinden **skrotal septum** ile ayrılmıştır. Katlantıların birleşme çizgisi, skrotal rafe olarak açıkça görülür. Skrotumun agenezisi (hiç oluşmaması), çok nadir görülen bir anomalidir (6,7).

2.2.7. Testislerin İnişi

2. ayın sonunda testis ve mezonefroz, karın arka duvarına **ürogenital mezenterle** bağlı durumdadır. Mezonefroz dejenere olduktan sonra bu bağlar gonadın mezenteri haline gelir. Bu mezenterin kaudal bir ligament haline gelir ve **kaudal genital ligament** adını alır. Testisin kaudal kutbundan çıkan ve ekstraselüler matriksten zengin, yoğun mezenşimal bir yapı da **gubernakulum** olarak bilinir. Testisin skrotuma inişinden önce, gubernakulum inguinal bölgede, internal ve eksternal abdominal oblik

kasların arasında sonlanır. Testis inguinal halkaya doğru aşağı inmeye başladığında gubernakulumun ekstra abdominal parçası da inguinal bölgeden skrotal şişliğe doğru büyümeye başlar. Testisler inguinal kanaldan geçerken, gubernakulumun ekstra abdominal kısmı skrotumun tabanına temas eder. Testiküler iniş iki aşamada gerçekleşir: transabdominal iniş, tahminen fetal Sertoli hücrelerince üretilen MİM tarafından kontrol edilir, ve inguinal-skrotal iniş, genitofemoral sinir tarafından taşınan kalsitonin gen-ilişkili peptid ile indüklenen androjen salınımı kontrolündedir (4,6).

Testislerin inguinal bölgeden skrotuma inişleri şu faktörlerle ilişkilidir:

1. Testislerin büyümesi ve mezonefrik böbreklerin atrofisi, testislerin posterior abdominal duvar boyunca, kaudal yönde hareketine izin vermektedir.
2. MİM ile uyarılan paramezonefrik kanalların atrofisi, testislerin transabdominal olarak, derin inguinal halkalara doğru hareketini sağlamaktadır.
3. Prosessus vaginalisin büyümesi, testislerin inguinal kanal boyunca skrotuma ilerlemelerinde rehberlik etmektedir (7).

26. haftada, testisler posterior abdominal duvardan, retroperitoneal olarak (peritonun dışında) derin inguinal halkalara doğru inerler. Testislerdeki bu pozisyonel değişiklik, fetal pelvisin genişlemesi ve embriyonun boyutlarında uzama ile birlikte olmaktadır. Testislerin transabdominal hareketleri, büyük oranda rölatif bir harekettir, abdomenin kraniyal parçasının, gelecekteki pelvik bölge olan kaudal parçasından uzaklaşmasına bağlıdır. Testislerin inguinal kanallar boyunca skrotuma inmelerindeki sebepler, çok az oranda bilinmekle birlikte, bu durumun fetal testislerce üretilen androjenlerle kontrol edildiği kabul edilmektedir. Gubernakulum, başlangıçta prosessus vaginalisin, inguinal kanalları oluşturmaları sırasında, prosessus vaginalise, anterior karın duvarı boyunca bir yol oluşturur. Gubernakulum aynı zamanda, testisi skrotuma bağlar ve testisin skrotuma inişinde rehberlik yaptığı kabul edilir (7). İntraabdominal göçün gubernakulumun ekstra abdominal parçasının uzamasıyla gerçekleştiği; organların büyümesinin intraabdominal basıncı artırarak inguinal kanaldan geçişi sağladığı ve gubernakulumun ekstra abdominal kısmının regresyonunun da testisin skrotum içine doğru olan inişini tamamlamasını sağladığı sanılır (6).

Normalde testisler gestasyonun yaklaşık 12. haftasında inguinal bölgeye gelmektedir. İnguinal kanallardan skrotuma inişi, genellikle 26. haftada başlar ve inguinal kanaldan 28. haftada geçerek, skrotuma 33. haftada ulaşmaktadırlar. Testisler, periton ve processus vaginalis dışından geçerler. Testisler skrotuma girdikten sonra, inguinal kanal, spermatik kord etrafında kasılır. Terminde doğmuş yeni doğanların % 97'den fazlasında, her iki testis de skrotum içerisinde bulunur. Doğumdan sonraki ilk 3 ay içerisinde, inmemiş testislerin çoğu skrotuma iner (6,7).

İniş sırasında testisler, aorta tarafından beslenmeye devam ederler ve testiküler damarlar başlangıçtaki posterior abdominal duvar seviyesinde iken oluşurlar, lumbal lokalizasyonlarından skrotum içindeki testislere kadar uzanırlar. Testislerin skrotuma iniş şekli, duktus deferensin niçin ureteri anteriordan çaprazladığını ve testiküler kan damarlarının seyrini açıklamaktadır. Organlar, skrotuma inişi sırasında, duktus deferens ve damarları da beraberinde taşınırlar. Testis ve duktus deferens aşağı indiklerinde, karın duvarının fasiyal uzantıları ile sarılırlar (6,7).

Testislerin aşağı inişinden bağımsız olarak, karın boşluğunu çevreleyen periton da, karın ön duvarının orta hattının her iki yanında cepler meydana getirir. **Vajinal proses** olarak bilinen bu periton cepleri, skrotal şişliğe doğru ilerleyen gubernakulu izlerler. **İnguinal kanal** m.ösküler ve fasiyal tabakalarla birlikte skrotal şişliğe doğru ilerleyen vajinal proses tarafından meydana getirilir (6).

Testisler, inguinal kanaldan ve pubik kemiğin üstünden geçerek bebek doğduğunda skrotuma inmiş olurlar. Skrotum içindeki testis vajinal proses tarafından sarılmış durumdadır. Testisi saran bu peritoneal tabakaya **tunika vajinalisin visseral tabakası**, peritoneal kesenin diğer kısımlarını da **tunika vajinalisin pariyetal tabakası** denir. Vajinal prosesi periton boşluğuna bağlayan bu dar kanal doğumda veya doğumdan kısa bir süre sonra kapanır (6).

Testisler, vajinal proses kökenli peritoneal tabaka dışında, içinden geçtiği karın ön duvarına ait tabakalarla da örtülüdür.

Transversalis fasiyası : internal spermatik fasiyayı; İnternal oblik kas : kremaster kasını ve fasiyasını; Eksternal oblik kas : eksternal spermatik fasiyayı oluşturur.

Transversus abdominis kası bu bölgenin üzerinde arkus yaptığı ve göç yolu üzerinde bulunmadığı için testis ve testise ait yapıların çevresinde bu kasa ait bir tabaka bulunmaz (6).

Skrotum içerisinde, testis, prosessus vajinalisin distal ucu içerisine doğru uzanır. Perinatal dönem sırasında, prosesus vajinalisin bağlayıcı sapı, genellikle oblitere olur ve testisle ilişkili, izole bir peritoneal kese olan tunika vajinalis olarak kalır (7).

2.2.8. Klinik Korelasyon

2.2.8.1. Kriptorşidizm ya da İnmemiş Testis

Erkek bebeklerin % 97'sinde bebek doğduğunda testisler skrotum içine yerleşmiş durumdadırlar. Geri kalanların çoğunluğu da ilk üç ay içinde skrotuma iner. Kriptorşidizm ya da inmemiş testis, gelişim sırasında testisler, skrotal keseye ulaşamaz ve abdominal boşluk veya inguinal kanalda kalır (4,6).

Kriptorşidizm, termde doğan erkek bebeklerin yaklaşık % 3-4'ünde, prematür erkek bebeklerin % 30'undan fazlasında görülmektedir. Ancak bebeklerin % 1'inden daha azında testislerden biri veya ikisi hiçbir zaman skrotuma ulaşamaz (6,7). Testiküler iniş iki aşamada gerçekleşir:

- 1) Fetal Sertoli hücrelerince üretilen MİM tarafından kontrol edilen Transabdominal iniş
- 2) Genitofemoral sinir tarafından taşınan kalsitonin gen-ilişkili peptid ile indüklenen androjen salınımı kontrolünde olan İnguinal-skrotal iniş. Transabdominal iniş bozuklukları sık değildir. Birçok çocukta inmemiş testis inguinal kanalda tespit edilebilir. İnguinal kanaldaki testisler çevredeki ligament ve kemikler tarafından travma ve basıya maruz kalırlar (4).

Kriptorşidizm, tek taraflı veya iki taraflı olabilir ve gelişiminde yetersiz androjen üretimi olduğu düşünülmektedir. Karın boşluğundaki veya inguinal kanal içindeki yüksek ısı nedeniyle olgun spermatozoa üretemez (6,7). Eğer her iki testis de, abdominal kavitede veya onun hemen dışında kalmış ise, normal vücut sıcaklığında

(37°C-38°C) organlar olgunlaşamaz ve sterilite meydana gelir. Kriptorşidizm düzeltilmez ise, özellikle abdominal kriptorşidizmde, bu duruma sahip erkekler, germ hücre tümörlerinin gelişiminde büyük risk altındadırlar. İnmemiş testisler doğumda sıklıkla histolojik olarak normal görünümündedirler fakat 1. yıl sonunda gelişme geriliği ve atrofi görülür. Kriptorşid testisler, abdominal kavitede veya testislerin iniş yollarının herhangi bir yerinde bulunurlar, ancak sıklıkla inguinal kanal içinde yerleşmişlerdir (7). Son araştırmalar, insulin benzeri faktör 3 ve Hoxa-10 genlerindeki mutasyonların bilateral kriptorşidizm ile ilişkili olduğunu göstermiştir (4). Kriptorşidizm % 3-5 sıklığında böbrek anomalileriyle birlikte görülür.

2.2.8.2. Konjenital İnguinal Herni

Karın boşluğuyla skrotum içindeki prosessus vajinalisler arasındaki bağlantı, normalde doğumdan sonra ilk bir yıl içinde kapanmış olur. Eğer tunika vajinalis ve periton boşluğu arasında bağlantı kapanmaz ve devam ederse **kalıcı prosessus vajinalis** oluşur ve barsak kıvrımları bu oluşum boyunca skrotuma inerek **konjenital inguinal herniye** yol açarlar. Duktus deferens veya epididimise benzer embriyonik kalıntılar, sıklıkla bu inguinal fıtık kesesi içinde bulunur. Erkeklerde inmemiş testis varlığında, konjenital inguinal fıtık daha yaygındır. Konjenital inguinal fıtık, ektopik testise sahip erkeklerde ve **androjen duyarsızlık sendromu (ADS)** olan dişilerde de yaygındır (6,7).

2.2.8.3. Hidrozel

Bazen prosessus vajinalisin abdominal ucu açık kalır, fakat barsakların herniasyonu için açıklık son derece dardır. Periton sıvısı, kalıcı prosessus vajinalis içerisine geçer ve **testisin hidroveli** oluşur. Bazen, prosessus vajinalis kısmen kapanır ve geride yolu boyunca küçük kistik boşluklar kalabilir. Prosessus vajinalisin orta parçası açık kalırsa, boşlukların içine salgılanan sıvıyla kistik bir yapı alıp testis ve/veya **spermatik kord hidroveli** oluşur (6,7).

2.2.8.4. Ektopik Testisler

İnguinal kanalların kesişmesinden sonra, testisler normal iniş yolundan farklı, değişik anormal yerleşimlerde bulunabilirler.

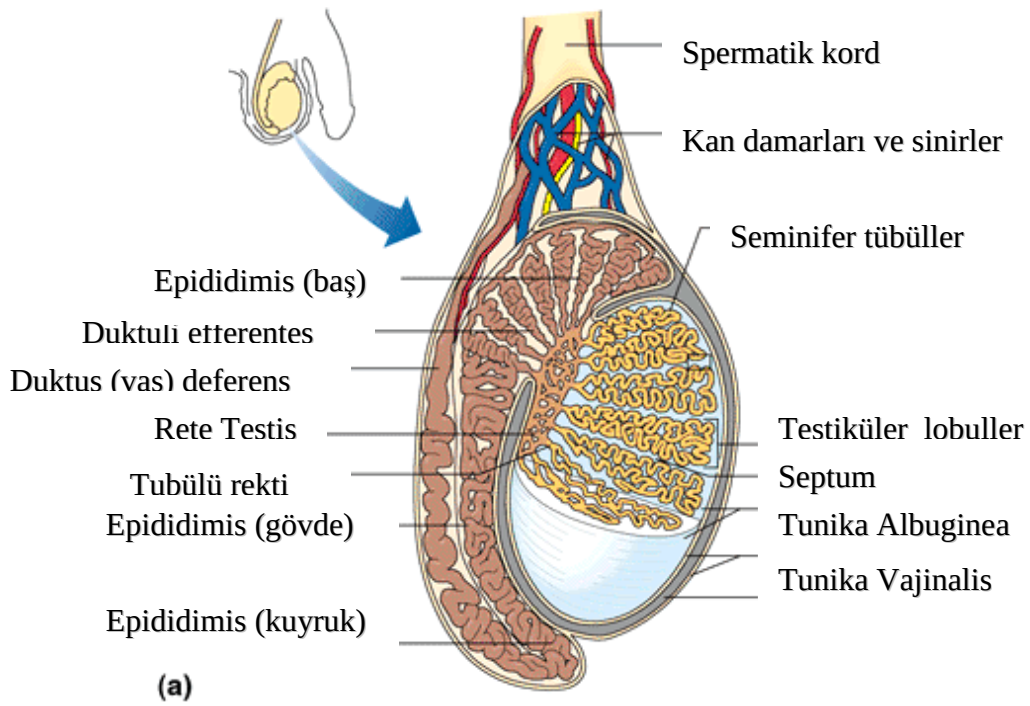
- İnterstisyel (eksternal oblik kas aponevrozu dışında)
- Kalça medialinin proksimalinde
- Penis dorsalinde
- Karşı tarafta (kros ektopi)

Ektopik testislerin bütün tipleri oldukça nadir görülür, fakat en çok rastlanılan tipi interstisyel ektopia'dır. Gubernakulumun bir bölümü anormal bir yerleşim gösterirse, testisler'de bunu izler ve ektopik hale gelirler (7).

2.3. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi

2.3.1. Testis

Testisler skrotumda asılı olarak bulunurlar. Her biri *tunika vajinalis* denen peritondan gelişen seröz kese ile sarılıdır. Tunika vajinalis dışta pariyetal ve içte visseral bir tabakadan oluşarak testisin ön ve yanlarından *tunika albugineayı* sarar. Testis, tunika albuginea denilen kalın, kollajen liflerden oluşmuş bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak *mediastinum testisi* oluşturur. Bu alanda bezin içine ilerleyen fibröz septumlar ile testiküler *lobüller* denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayrılır. Bu septumlar tam değildir, lobüller arasında çoğunlukla iletişim vardır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 *seminifer tübül* yer alır **(Resim 2.3.1)**. Bağ dokusunda bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve interstisyel (Leydig) hücreler bulunur (3,5).



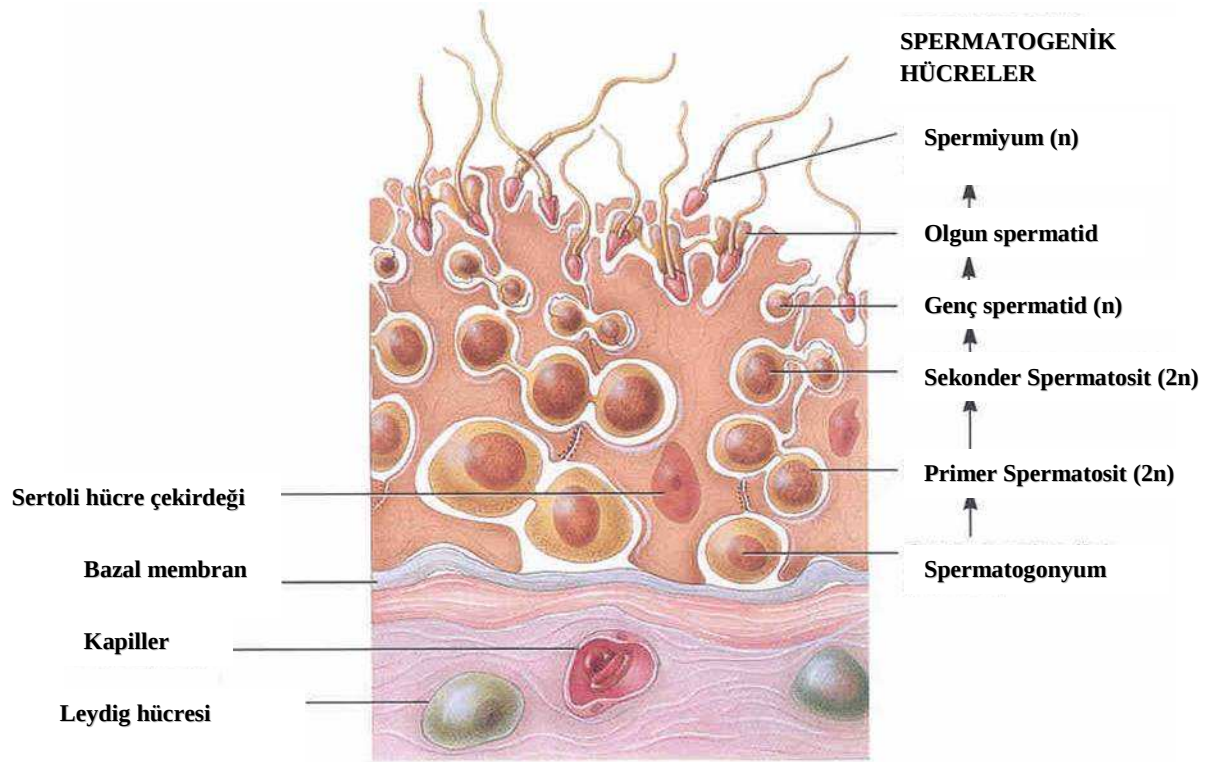
Resim. 2.3.1. Testisin genel yapısı (5)

2.3.1.1. Seminifer tübüller

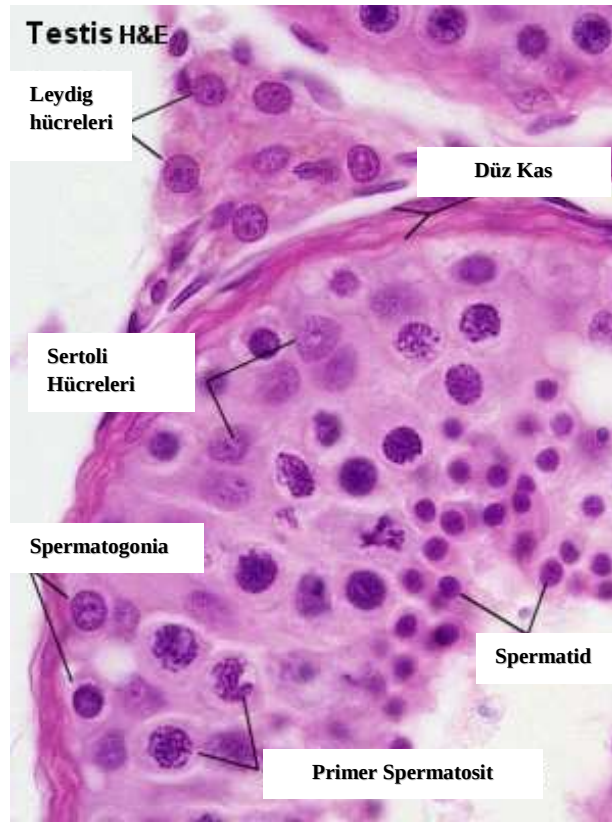
Her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 μm çapında ve 30-70 cm uzunluktadır, karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşelidir. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu 250 m civarındadır. Her tübül başlangıçta kör uçludur ve dallara ayrılır. Her bir tübül sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller ya da *tubuli rekti* adıyla bilinen kısa segmentler halinde sürer. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin *rete testis* denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete, 10-20 *duktuli efferentes* ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır.

Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve çok sıralı germinal ya da seminifer tübül epitelinden oluşur. Seminifer tübülü döşeyen epitel, iki belirgin hücre popülasyonunu (*Sertoli* ya da *destek hücreleri* ile *spermatogenik seriyi oluşturan hücreler*) içeren özelleşmiş bir epiteldir (4). Epiteli oluşturan bu hücreler,

bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir (**Resim 2.3.2, Resim 2.3.3**). Bu hücreler, mitoz ve mayoz bölünmeler sonrasında farklılaşır ve spermiyum'ları oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerde bulunabilirler. Seminifer epitel bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrelenmiştir. Miyoid hücreler hareketsiz spermleri rete testise ilerleten ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur. Spermiyumlar epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri motilite özelliklerini kazanırlar (3).



Resim 2.3.2. Seminifer tübül şematik yapısı (8)



Resim 2.3.3. Testis, H&E boyalı histolojik yapısı (9)

2.3.1.2. Spermatogenez

Erkek germ hücrelerinin oluşmasını, sayılarının artmasını ve olgun spermiyumlara dönüşmesini sağlayan süreçtir. Bu süreç, tek sıra Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seriye ait hücrelerle çevrili, uzun, tübüler bir yapı olan seminifer tübüllerde gerçekleşir. Farklılaşmamış spermatogonyalar oldukça özelleşmiş spermiyumlara evrimleşirler. Seminifer epitelinde birçok hücre jenerasyonunu aynı anda görmek mümkündür. Bu nedenle farklılaşmaya başlamış spermatogonyalardan oluşan en genç hücreler tübülün periferinde bulunurken, spermatidlerin oluşturduğu en yaşlı jenerasyon lümende yer alır (10).

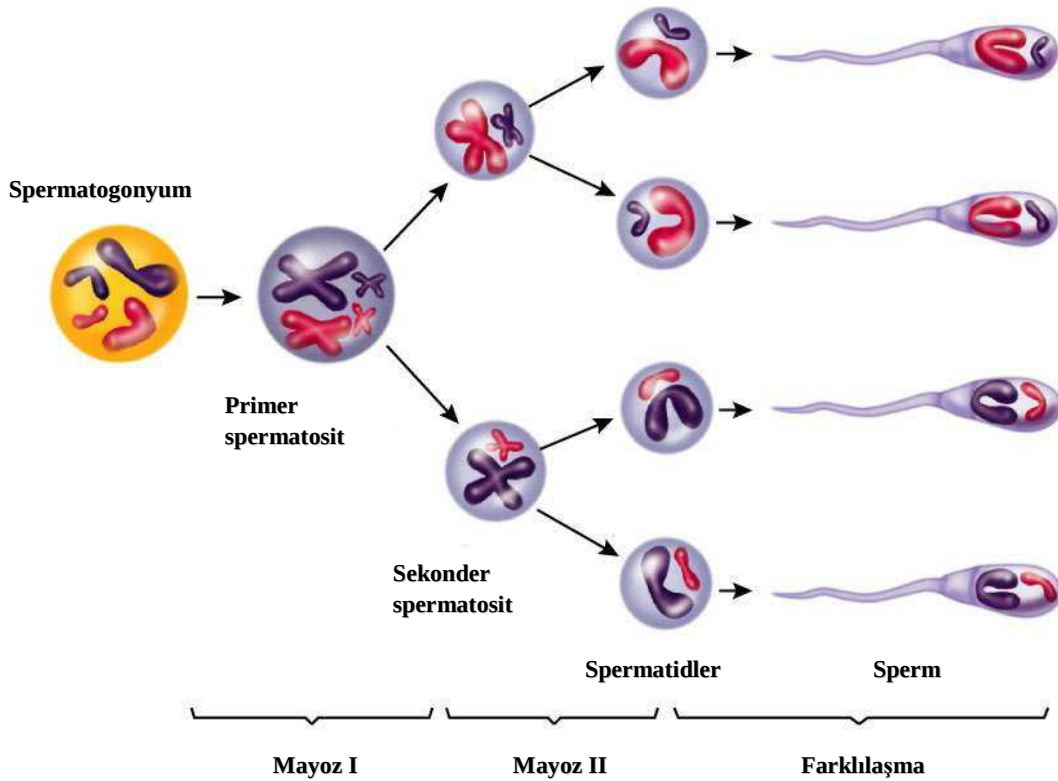
Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan fenomen 3 faza ayrılabilir; **Spermatositogenez** olarak adlandırılan birinci evrede spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA

miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu gerçekleşen ve spermatidlerin oluştuğu ikinci evre **Mayoz** adını alır. Üçüncü evre olan **Spermiyogenez** ise spermatidlerin özel bir hücre farklılaşması süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safhadır (3).

Spermatogenez, bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş germ hücreleri olan, **spermatogonyumlar** ile başlar (**Resim 2.3.4**). Bunlar yaklaşık 12 µm çapında, nispeten küçük hücrelerdir ve çekirdekleri soluk boyanan kromatin içerir. Sertoli hücreleri arasındaki tıkayıcı bağlantıların altında yer alırlar ve bu nedenle kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar. Kan-testis bariyerini geçen spermatositlerde iki olay gerçekleşir;

- 1.Sertoli hücreleri ve spermatositler arasında spermatogenezin sonuna kadar sürecek olan yapısal ve işlevsel bir ilişki gelişir.
- 2.Spermatositlerin mayoz/profaz/pakiten yarı evresinden itibaren yeni yüzey antiijenleri geliştirmeye başlamasıdır (10).

Seksüel olgunlaşmada spermatogonyumlar bir seri mitoz bölünme geçirirler ve yeni oluşan hücreler iki yol izleyebilir; bir ya da daha fazla mitotik bölünmeden sonra farklılaşmamış kök hücreler olan **tip A spermatogonyumlar** olarak devam ederler ya da süregelen mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak **tip B spermatogonyumları** oluştururlar (3).



Resim 2.3.4. Spermatogenez

Tip A spermatogonyumlar spermatogenik serinin kök hücreleridir. Spermatogonyal kök hücrelerin erkek fertilitesinde önemli etkileri vardır. Bu hücreler kısmen sessiz hücrelerdir ve bu nedenle radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler. Mitoz bölünme geçiren spermatogonyumlar, mayoz bölünme geçiren spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatidler kanser kemoterapisine ve radyasyona duyarlıdır. Radyoterapi veya antikanser kemoterapisinin sonlandırılmasından sonra, spermatogonyal kök hücreleri spermatogenik süreci yeniden oluşturabilirler. Mitoz sonrası oluşan Sertoli hücreleri bu tedavilere yüksek oranda dirençlidirler (4). Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlere farklılaşan öncül (progenitor) hücrelerdir. Başarılı mitoz bölünmeler geçirdikten sonra bu hücreler son S fazını (DNA sentezi) tamamladıktan hemen sonra spermatositlerde mayoz hazırlığı başlar ve birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. En son mitozdan sonra primer spermatositler dinlenme evresine girerler (G0). Dinlenme evresindeki spermatositler G1 fazına geçerler ve bu faz 3 gün sürer (10). Birinci mayoz bölünme, yaklaşık 10 gün, süren uzun bir profaz ile karakterizedir. Bu sırada primer spermatositin 46 (44+XY)

kromozomu vardır ve DNA'sı da $4N$ 'dir. N haploid kromozom sayısını ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını belirtmektedir. Bu profaz evresinde, hücreler leptoten, zigoten, pakiten ve diploten şeklinde dört faz geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar ve sonuçta kromozomlar ayrılır. Zigoten-pakiten evresinde homolog kromozomların (otozomlar ve seks kromozomları X ve Y) eşleşmesini ya da sinapsını kolaylaştıran sinaptonemal kompleks oluşumu ve homolog kromozomların eşleşmesi (sinapsis) gerçekleşir. Genlerdeki “crossing over” mayoz bölünmenin bu safhalarında oluşur. Daha sonra hücreler metafaza girer ve kromozomlar takip eden anafazda her bir kutba doğru giderler. Bu bölünmede, profaz evresinin yaklaşık 22 gün sürmesi nedeniyle incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatogenezde en büyük hücreler **primer spermatositlerdir**, bunlar çekirdeklerinde kangal yapma sürecinin değişik safhalarında kromozomların bulunması ile tanınırlar (3,4).

Birinci mayoz bölünmeden sonra **sekonder spermatositler** denilen ve $22+X$ veya $22+Y$ olmak üzere 23 kromozom içeren daha küçük hücreler oluşur. Bu 46 'dan 23 'e sayıca azalma her hücredeki DNA miktarının $4N$ 'den $2N$ 'e şeklinde azalması ile birlikte olur. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan, belirgin bir DNA sentezi olmayan, sadece tamir DNA sentezi meydana gelen ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi **spermatidlerin** oluşmasına yol açar ve bunlar 23 kromozom içerir. Birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında spermatositlerde DNA sentezinin olduğu S fazı görülmediği için, ikinci bölünmeden sonra her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid ($1N$) hücreler meydana gelir. Spermatidlerin oluşmasından sonra bölünmeler devam etmez ve tek bir spermatid tek bir spermatozooya dönüşür. Böylece, mayoz sürecinin sonunda haploid sayıda kromozomlara sahip hücreler oluşur. Hücre bölünmesindeki indirgeyici işlev sebebiyle mayotik süreç kromozom sayısının türler için sabit, belirli bir miktarda kalmasını sağlar (3).

Spermatositler iki başarılı mayoz bölünme geçirirler ve Sertoli hücreleri arasındaki tıkaçıcı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal kompartmanında yer alırlar. Dolayısıyla, mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşir (4).

Spermatidler sekonder spermatositlerin bölünmesi ile oluşan hücrelerdir. Bunlar, diğer hücrelerden 7-8 μm çapındaki küçük boyutları, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan çekirdekleri ve seminifer tübüllerde lümen yakınında adluminal kompartmanda yerleşmeleri ile tanınırlar. Spermatidler Sertoli hücre sitoplazmasının kriptaları içinde gömülüdürler. Spermatidler, **spermiyogenez** denen karmaşık bir farklılaşma süreci geçirirler. Spermiyogenez, spermatidlerin spermiyumlara olgunlaşma sürecidir. En önemli evresi akrozom gelişmesidir. Mikrotübüllerin hareketi ile kuyruk oluşumu, nükleusun oval şekil alması, başlangıçta yaygın olarak bulunan mitokondrilerin oluşan kuyruk bölgesine göç ederek boyun kısmı etrafında spiral şekilde uç uca sıralanmaları ve sitoplazmanın bu farklılaşma sırasında lümene boşaltılması gibi olaylar da bu süreç içine girer. Bu aşamadan sonra baş, spermin genetik bilgisini içeren nükleustan oluşur. Akrozom, yıkıcı enzimle dolu bir veziküldür. Kuyruk, tek sentriolden gelişir. Sperme hareket olanağı verir. Kuyruk hareketi spermin boyun kısmındaki mitokondrilerden sağlanan enerji ile mikrotübüllerin birbiri üzerine kayması ile gerçekleşir (10). Sonuçta seminifer tübülün lümenine salınan olgun **spermiyum** meydana gelir (**Resim 2.3.5**).

Spermiyogenez başlıca üç faza ayrılabilir :

A. Golgi Fazı: Spermatidlerin sitoplazması, çekirdeğin yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriyonlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz yüzölçekli endoplazma retikulumunu içerir. Golgi kompleksinin normalde yerleşim alanı hücre apikal kutbu ve paranükleolar alanıdır. Küçük PAS-pozitif proakrozomal granüller Golgi kompleksinde birikirler ve birleşerek membranla sarılı bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluştururlar (3). Sentrozom önce ikiye bölünür ve akrozomun aksi kutbuna yerleşir. Oluşan sentriyollerden proksimal kısımda anteryör nodül, ikinci parça distal sentriyolden enine disk gelişir (11).

Sentriyoller göç ederek akrozomun oluştuğu bölgenin karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar (3). Flagellum, distal sentriyolden gelişir. Keratin içeren dış yoğun lifler ve bir fibröz kılıf ile çevrili eşmerkezli diziliimli 9+2 mikrotübül çiftleri içeren bir aksoneme sahiptir. Mitokondriyonlar kuyruğun proksimal bölümü çevresinde sarmal şekilde bir kılıf oluşturur (4).

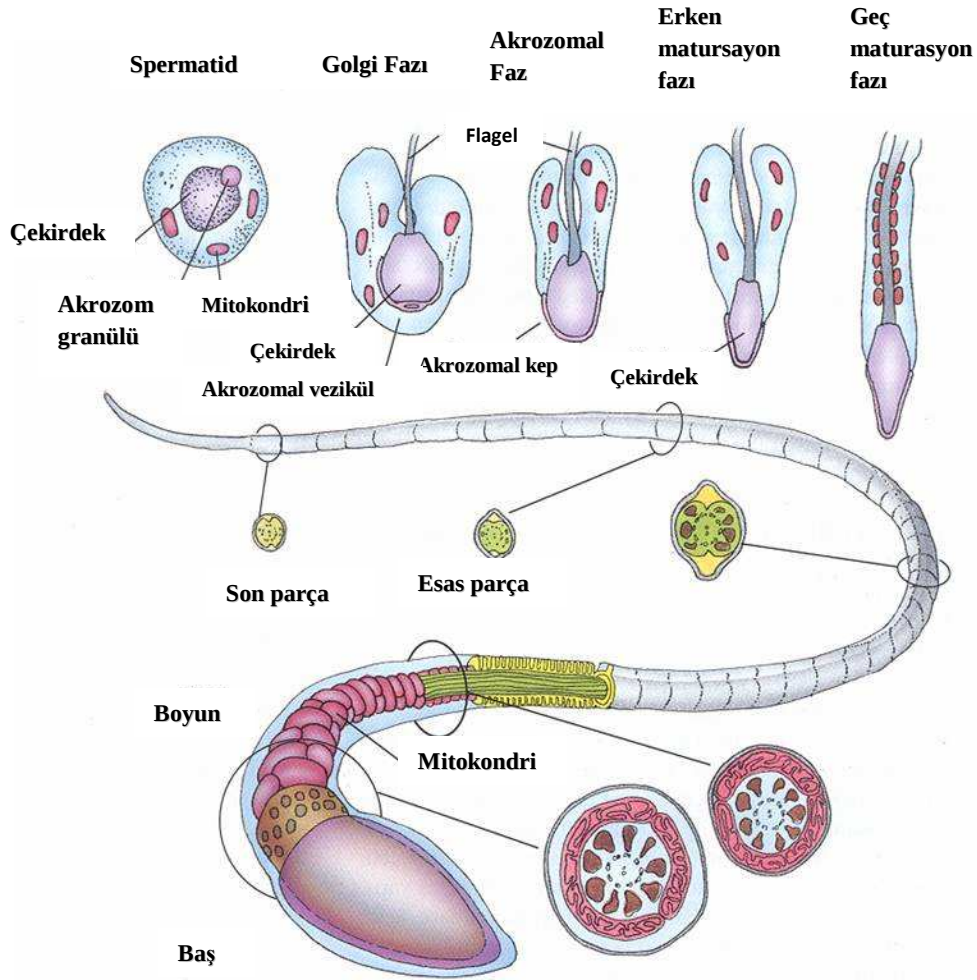
B. Akrozom Fazı: Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra **akrozom** adını alır. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür. Bu enzimlerin, korona radiata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Bunlar henüz ovulasyon ile atılmış sekonder oositi çevreleyen yapılardır. Kapasitasyon işlemini tamamlamış spermiyumlar, sekonder oosit ile karşılaştığında akrozomun dış membranı birçok bölgede plazma membranı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin boşalmasına yol açar. Bu işlem **akrozomal reaksiyon** olarak bilinir ve fertilizasyonun ilk basamaklarından biridir (3).

Akrozom fazı sırasında hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir. Buna ek olarak çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriyonlar da flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak **orta parça** adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge spermiyumların hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir.

Mitokondriyonların bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ve yüksek enerji tüketimi ile ilgili olan bölgelerde toplanmasına iyi bir örnek teşkil eder. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dynein adı verilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur (3,4).

C. Olgunlaşma Fazı: Spermatid olgunlaşma fazının sonuna doğru, mitokondriyonlar gelişen flagellum boyunca dizilmelerini tamamlar; flagellum keratin içeren dış yoğun liflerle sarılı bulunan merkezi bir aksonemden oluşur. Çekirdek uzar ve yoğunlaşır, manşet distal yöne doğru göç eder. Bu evre, çekirdek uzamış ve yoğunlaşmış şeklini aldığı anda, manşet dağılmaya başladığında ve dış yoğun lifler tamamen organize olduğunda tamamlanır. **Kuyruk** iki ana parçadan oluşur: mitokondriyonların sarmal şekilde bulunduğu **orta parça**, ve kuyruğun fibröz bir kılıfla sarılı olduğu **esas parça**. Bir son halka şeklinde annulus sperm kuyruğunun orta parça ve ana parça geçişinin sınırlarını belirler (3).

Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir ve spermiyumlar tübülün lümenine doğru salınırlar.



Resim 2.3.5. Spermiyogenez (5)

Somatik histonların arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirmesi olayı ve çekirdek yoğunlaşması spermiyogenezin son basamağını oluşturur. Bu histon değişimi sperm genomik DNA'sını stabilize eder ve korur (4).

Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek

bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatosit, spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli rol oynarlar. Bu ayrıntı seminifer epitel siklusunu anlamakta önemli bir yer tutmaktadır. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur (3).

İnsanda spermatogonyum safhası ile spermiyum oluşumu arasındaki sürenin yaklaşık **64 gün** olduğu gösterilmiştir. Sürecin yavaş olmasının yanı sıra, spermatogenez, eş zamanlı olarak her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez; bu olay bir dalgalanma biçiminde olur. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermiyumların bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitel siklusu germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan olgunlaşma değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklaşık 16+1 gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter (3).

Seminifer tübüllerde oluşan spermiyumlar belli bir fizyolojik döngü içinde etkilenecek gelişirler. Bu etkileme mekanizmasını oluşturan temel faktörler hipotalamustaki yönlendirici faktörlerdir. Bunların etkisiyle hipofiz hormonları devreye girer ve testisteki Sertoli ve Leydig hücrelerini etkileyerek hipotalamus-testis arasında bir feed-back sistemi oluşturur. Sonuçta, sperm gelişmesi, hipotalamus-hipofiz-testis zinciri üzerinde, bir sistem içinde gerçekleşir (11).

Testiste otheregülasyonu sağlayan temel hormonlar, spermiyositogenez olayında esas rolü üstlenirler. Spermatogonyumdan gelişen spermatosit serilerin yanısıra hipofiz ve testis orijinli hormonların etkisiyle hücrelerarası dönüşümler de gerçekleşir.

Klasik spermatogenez regülasyon modeline göre testosteron biyosentezi için en önemli faktör, hipotalamus etkisi altında olan hipofiz Luteinizan hormonudur (LH). Hipofizden LH salgısı, hipotalamik Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) etkisi altında meydana gelir. Testosteron, GnRH-atılım-frekans ve amplitüdüne negatif etki

yapar. Klasik bir endokrin hormon olarak bilinse de testosteron, aynı zamanda parakrin etkilidir ve tüm vücut üzerine etki yapabilir. Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, tubulus elemanları ile interstisiyel doku arasında ileri derecede etkileşme olduğunu göstermiştir. Sertoli ve Leydig hücrelerin, bugüne kadar bilinmeyen birçok hormon reseptörüne sahip oldukları bulunmuştur ve bu faktörlerin bir kısmının testiste lokal olarak görev yaptığı belirtilmiştir (11).

FSH, spermatogenezin en etkili faktörüdür. GnHR tarafından kontrol edilen FSH, bu hormon reseptörlerine sahip Sertoli hücrelerini etkiler ve özellikle spermatogenezin ilk evrelerini stimüle eder. FSH da LH gibi negatif feedback mekanizması ile regüle olur. Sertoli hücreleri tarafından sağlanan bu etkili mekanizma “**inhibin**” olarak ifade edilir. İnhibin sadece endokrin değil aynı zamanda parakrin etki de yaptığı gösterilmiştir. Spermatogenez sadece FSH stimüle etmez; testosteron üzerinden serbestlenen LH da stimüle eder (11).

Olgun spermiyum, baş ve kuyruk olmak üzere iki yapıdan oluşur: Boyun parçası ile baş kuyruğa bağlanmıştır. Baş, akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek heterokromatik, oval bir yapıdadır. Çekirdeğin ön yarısını akrozom örter ve lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hyaluronidaz ve yanı sıra nöraminidaz) içerir. Genellikle akrozom, özel bir tip lizozom olarak kabul edilir. Akrozomal enzimler, oositi saran korona radiata ve zona pellucida’yı sperm girişini kolaylaştırmak için döllenme anında salınır (4).

Bağlantı parçası, bir çift sentriyolün bulunduğu dar bir parçadır. Distal sentriyol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonem’e kaynaklık yapar.

Kuyruk orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç parçada incelenir: Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz uzunlamasına seyreden kolonlardan oluşur. Orta parçanın alt sınırı mitokondriyel sarmalın annulus’ta sonlanmasıyla belirgindir (4).

Esas parça, kuyruğun en uzun parçasıdır. Orta parçadaki 9 liften farklı olarak 7 dış yoğun lifçe sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Fibröz kılıf, eş

uzaklıktaki uzunlamasına kolonlardan çıkan dairesel iskelet tarafından oluşturulur. Hem dış yoğun lifler, hem de fibröz kılıf, spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan proteinler olan keratin içerir (4). Son parça, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı, sadece aksonem bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır.

Spermiumlar seminifer tubuluslardan salındıktan sonra intra testiküler ve ekstra testiküler kanallardan, depo edildikleri yer olan epididimisin kuyruk kısmına ulaşırlar. Buradan duktus deferensin kalın kas kılıfının peristaltik kasılmalarıyla hızla üretraya atılırlar. Spermiumlar duktus deferens ve üretradan geçerken spermi taşıyan sıvı içine yardımcı cinsiyet bezleri olan seminal vezikül, prostat ve bulboüretral bez salgıları katılır (7).

Cinsel ilişki sırasında, vajinanın forniksinde ve serviksin dış ağzı çevresinde 200-600 milyon kadar sperm birikir. Spermier kuyruk hareketleri yardımıyla servikal mukus içerisinde yavaşça servikal kanaldan geçerler. Seminal vezikülden üretilen *vezikülaz enzimi* bir kısım semeni koagüle ederek, vajinal bir plak oluşturur. Bu plak semenin vajinaya doğru geri akmasını önler. Servikal mukusun ovulasyon sırasında miktarı artar ve viskozitesi azalır böylece spermin geçişi kolaylaşır (7).

Spermierin ejakülasyon refleksi 2 faza ayrılabilir:

Emisyon (birikme, depolanma) : Semen, veziküla seminalis ve duktus deferensin peristaltik hareketleri sonrası duktus ejakülatoryus içinden geçerek üretranın prostatik parçasına getirilir. Emisyon sempatik bir yanıttır.

Ejakülasyon: Mesane boynundaki vezikal sfinkter kapanmasının ardından bulbospongioz ve üretral kasların kasılması ile semen üretranın dış ağzına doğru atılır.

Uterus ve uterin tüplerden spermin geçişinde bu organların duvarlarındaki kasların kasılması önemli rol oynar. Semen içindeki *prostoglandinler* uterus hareketlerini uyarak spermierin uterus ve uterin tüpleri geçerek fertilizasyon bölgesi olan tüplerin ampullasına gelmesine yardım eder. Semen içindeki seminal vezikülden salınan fruktoz, spermier için bir enerji kaynağıdır (7).

Spermatogenezi etkileyen patolojik durumlar

1. Sıcaklık : Spermatogenez için 35°C kritik bir sıcaklıktır. Bu sıcaklık, spermatik arteri saran venlerin oluşturduğu pampiniform pleksus tarafından skrotumda sağlanır ve sıcaklığı dağıtmak için ters yönlü akımla ısı değişimi görevi görür. Sıcaklık 35°C'nin altına düştüğünde, spermatik kordondaki kremaster kasının ve skrotal kesenin dartos kasının kasılması sıcaklığı artırmak için testisi karın boşluğuna yakınlaştırır (4).

2. Kriptorşidizm : Kriptorşidizm' de, gelişim sırasında testis skrotal keseye ulaşamaz ve abdominal boşluk veya inguinal kanalda kalır. Bu durumlarda, normal vücut sıcaklığı spermatogenezi önler ve durum çift taraflıysa sterilite oluşur. Testiküler tümörlerin büyük bir çoğunluğu tedavi edilmemiş kriptorşid testis ile ilişkilidir. Hormonal tedavi (koryonik gonadotropin uygulaması) testiküler inişi uyurabilir. Bu başarısız olursa cerrahi tedavi uygulanır (4).

3. Kanser Kemoterapisi : Antitümoral ilaçlarla tedavi edilen genç erkek hastalar geçici süreyle aspermatogenik hale gelirler, çünkü spermatogonyal mitoz ve spermatosit mayozu etkilenebilir. DNA sentezi ve hücre bölünmesine katılmamış kök hücreler, antikanser kemoterapi kesilmesinden itibaren seminifer epitelde tekrar çoğalabilirler (4).

4. Kabakulak : Kabakulak, postpubertal erkeklerde %20-30 akut orşit ile görülen sistemik viral bir enfeksiyondur. Genellikle, kabakulak nedeni ile oluşan orşit ardından spermatogenik fonksiyonda değişiklikler gözlenebilir (4).

5. Spermatik kordon torsiyonu : Spermatik kordonun torsiyonu, testise gelen arteriyel kan akımını ve testisten venöz drenajı bozabilir. Bu durum genellikle fiziksel bir travma veya tunika vajinalis içinde anormal testis hareketi nedeniyle oluşur. Torsiyon hemen tedavi edilmezse, hemorajik enfarkt oluşur ve tüm testisin nekrozu ile sonuçlanır (4).

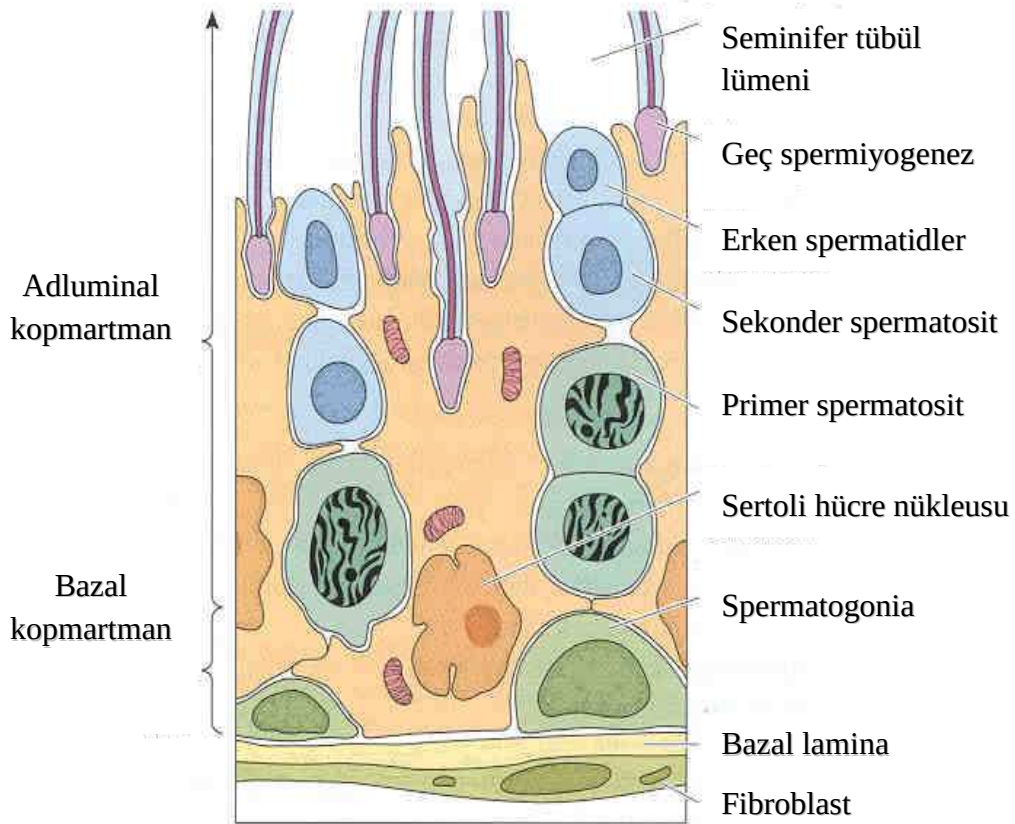
6. Varikosel : Bu durum spermatik kordon venlerinin anormal dilatasyonu nedeniyle oluşur. Varikosel sonucu sperm üretiminde bir azalma (oligospermi) görülür. Spermatik kordon venlerinin, spermatik arter ile ters yönlü akım ısı değişimi mekanizması sayesinde testiküler ısının 35°C'de tutulmasında önemli bir rol oynamaktadır (4).

2.3.1.3. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, puberteye kadar seminifer tübül epitelinin baskın hücre tipidir. Puberteden sonra ise, seminifer tübüleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatogenik hücre popülasyonu düştüğü zaman Sertoli hücreleri tekrar epitelin ana elemanı haline gelir (4).

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopta, Sertoli hücrelerinin sınırları belirsiz olarak görülür, çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır (**Resim 2.3.6**). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, hücrelerin düz yüzlü endoplazma retikulumu, granüler endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriyon ile lizozomlar, lipid damlacıkları ve vimentin, aktin, mikrotübüller gibi zengin bir hücre iskeleti içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdekte çok sayıda kıvrılmalar, belirgin bir çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin görülür. Bu hücreye özgü Charcott-Bottcher kristaloidleri izlenir (3,4).

Birbirine komşu Sertoli hücreleri, birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Spermatogonyumlar, kan yoluyla gelen materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhalarındaki hücreler, kandan gelen ürünlerden kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur. Spermatositler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe, Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklinde görülürler. Sertoli hücreleri iletişim bağlantıları (gap junction) aracılığı ile de ilişki kurarlar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanmış olur. Bu da seminifer epitel siklusunun koordinasyonunda önemli rol oynar (3,4)



Resim 2.3.6. Sertoli hücresi (12)

Sertoli hücrelerinin başlıca işlevleri:

- 1. Gelişmekte olan spermiyumların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi:** Spermatogenik seri hücreleri birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmışlardır. Bu hücreler fiziksel olarak, yaygın sitoplazmik Sertoli hücre dallanmaları ile desteklenir. Spermatositler, spermatidler ve spermiyumlar kan-testis bariyeri ile kan desteğinden ayrıldıkları için, bu spermatogenik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alıp verilmesinde, Sertoli hücrelerinin aracılığına gereksinim duyarlar. Sertoli hücre bariyeri gelişen spermiyumları immunolojik saldırıdan da korurlar (3).
- 2. Fagositoz:** Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dökülür. Bu sitoplazmik parçacıklar fagosit edilir ve Sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılırlar (3).

3. Salgilama: Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgılarlar. *Androjen-bağlayıcı protein* (ABP) salgılanması Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testesteron kontrolü altında gerçekleştirilir. ABP, testesteron ve dihidrotestesteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesinde olan bir salgısal proteindir (4). Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testesteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testesteronu östradiol haline çevirebilirler (3). Bu hücreler aynı zamanda, *inhibin* ve *aktivin* için α ve β alt üniteleri salgılarlar. İnhibinin $\alpha\alpha$ heterodimeri hipotalamustan ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve FSH üzerine negatif feedback etki gösterir. Aktivinin $\alpha\alpha$ veya $\beta\beta$ homodimeri FSH salınımı üzerine pozitif feedback etki gösterir.

Sertoli hücreleri, puberteden sonra postmitotiktir. Erişkin testisinde mitoz hücre bölünmesi gözlenmez (4).

4. AMH üretimi: Müllerian-inhibe edici hormon olarak da isimlendirilen bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta *Müller (paramezonefrik)* kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testesteron ise *Wolf (mezonefrik)* kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar.

5. Kan –Testis bariyerini oluşturmak : Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar, özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını radyasyonu gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdırlar. Bu zararlı etkiler karşısında spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha dayanıklıdırlar. Memelilerde spermiyumların salınımı hücre hareketlerinin bir sonucudur; bu hareketler Sertoli hücresinin apeksinde bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentler ile sağlanır (3).

2.3.1.4. İnterstisiyel Doku

Testisin seminifer tübülleri arasındaki boşluklar bağ dokusu birikintileri, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine izin verirler. İnterstisyel

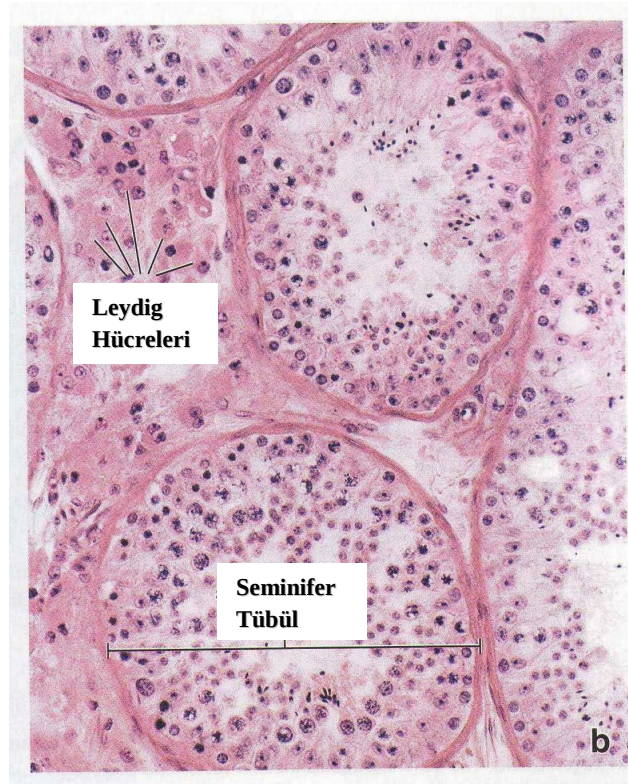
alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır (4).

Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Puberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir, yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir çekirdek ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan hücredir. Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin **interstisyel** ya da **Leydig hücreleridir**. Bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan *testesteronu* üretirler. Testesteron sentezi mitokondri ve düz yüzlü endoplazma retikulumunda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası işbirliğine bir örnek oluşturur (3).

İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen *plasental gonadotropik hormon* maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonlar embriyonik farklılaşmada erkek üreme sisteminin gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 4,5 ayına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testesteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden salınan LH uyarımı altında testesteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar.

2.3.1.5. Leydig Hücreleri

Leydig hücre toplulukları, kan damarları ve lenfatik kanal veya sinüzoidler yakınında, intertübüler alanda yerleşmiştir (**Resim 2.3.7**). Birçok steroid-üreten hücre gibi, Leydig hücreleri lipid damlacıkları, karakteristik tübüler kristal mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş düz yüzlü endoplazma retikulumu içerir. Bu hücrelere özgü Reinke kristalleri sitoplazmada izlenir (4).



Resim 2.3.7. Leydig hücreleri (7)

Puberteden sonra, siklik adenozin monofosfat (cAMP) aracılı mekanizma tarafından LH ile uyarılmanın ardından, Leydig hücreleri, 5α -redüktaz enzimi ile dihidrotestosteron'a dönüştürülebilen, *testosteron* üretir. Serumda bulunan testosteronun yaklaşık % 95'i seks hormon-bağlayıcı globulin (SHBG) ve diğer proteinlere tutulmuş halde Leydig hücreleri tarafından sentezlenir; kalan testosteron adrenal korteks tarafından üretilir.

Testosteron başta yağ dokusu olmak üzere, birçok dokuda östrojenlere aromatize edilebilir. Folikül Stimüle edici Hormon (FSH) uyarımından sonra Sertoli hücrelerince üretilen ABP, gelişen spermatogenik hücrelerin çevresinde yüksek bir testosteron yoğunluğu sağlar (3).

2.3.1.6. Testis Histofizyolojisi

37°C olan vücut içi sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin düzenlenmesinde ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35°C'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki krameter kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir (3).

Kötü beslenme, alkolizm ve bazı ilaçların etkisi ile spermatogonyumlarda değişiklikler ve sonuçta sperm yapımında bir azalma ortaya çıkar. X-ışını radyasyonu ve kadmiyum tuzları spermatogenik seri hücreleri için oldukça toksiktirler ve bu hücrelerin ölümüne sebep olarak steriliteye yol açarlar.

Spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi endokrin faktörler oluşturur. Spermatogenez, hipofizin FSH ve LH hormonlarının testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. *LH* interstisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testesteron yapımını stimüle eder. *FSH* ise Sertoli hücrelerine etkiyerek adenilat siklaz yapımını stimüle eder ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açarak ve aynı zamanda ABP'nin sentez ve salgılanmasını sağlar. Bu protein testesteron ile bağlanır ve bunu seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testesteron ile uyarılır ve östrojenler ve progestojenlerle inhibe edilir.

Spermiumlar, epididmise, uygun bir ortam olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testesteronla birleşmiş ABP içerir.

2.3.1.7. Kan-Testis Bariyeri

Kan ile seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması, testiküler sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini sağlar. Yan yana Sertoli hücreleri arasındaki *tıkayıcı bağlantılar*, kan- testis bariyerini oluşturur. Bariyer proteinlerin, antikorlar dahil, gelişmekte olan spermatogenik hücrelere ulaşmasını engeller.

Ters yönde ise, gelişmekte olan spermatogenik hücrelerden protein sızmasını ve bir immün cevabı tetiklemesini engeller. Kan-testis bariyeri, kan-beyin bariyerinin benzeri olup, tek fark sonrakinin ana elemanını kapiller endotel hücrelerin tıkayıcı kavşakları oluşturur. Tıkayıcı bağlantılar mirengi noktasıdır; çünkü seminifer epiteli **bazal kompartman** ve **adluminal kompartman** olmak üzere bölerler. Spermatogonyumlar bazal kompartmanda yerleşmiştir ve spermatositler ve spermatidler adluminal pozisyonu doldurur. Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve büyük moleküllerin serbest olarak geçişine izin verirler. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemlidir (3,4).

2.3.2. Testis İçi Genital Kanallar

Testis içi genital kanallar *tubuli rekti*, *rete testis* ve *duktuli efferentestis*.

2.3.2.1. Tubuli Rekti : Seminifer tübüllerin çoğu kangal biçimindedir, bunların her iki ucu rete testise *tubuli rekti* olarak bilinen düz tübüllerle bağlanır. Tubuli rekti, testisin mediastinumunda yer alır. Spermatogenik hücrelerin giderek ortadan kaybolduğu bu tübüllerin başlangıç bölümünde duvarı sadece Sertoli hücreleri oluşturur. Bu başlangıç bölümü sıkı bağ dokusu kılıfı ile desteklenen ve kübik epitel'den oluşan yapı ile devam eder.

2.3.2.2. Rete Testis : Tubuli rekti rete testisin içine boşalır. Rete testis tunika albugineanın kalınlaşması ile oluşmuş mediastinum içinde bulunur. Rete testis kübik epitel ile döşeli ve oldukça fazla anastomozları olan bir kanallar ağıdır. epitel hücrelerinin apikal yüzeyi mikrovilluslar ve tek bir sil içerir. Fibroblastlar ve miyoid hücreler tarafından oluşturulan duvar, büyük Leydig hücresi kümelerine eşlik eden kan damarları ve geniş lenf kanalları ile kuşatılmıştır. Sertoli hücreleri tarafından üretilen ABP, androjenleri bağlar. Bu protein-steroid kompleksi, rete testisin lümeninde ve epididimin başlangıç parçasında bulunur. Sonuç olarak rete testis, arteriyel kandan daha fazla konsantrasyonda androjenleri içerir. Lümen içindeki androjenler, epididim başının normal fonksiyonunu destekliyor görünmektedir. Rete testiste toplanan spermiler, kuyrukta zayıf bir titreşim hareketi gösterir.

2.3.2.3. Duktuli Efferentes : Rete testisten 10-20 adet duktuli efferentes çıkar. Bunlar epididimis yönüne doğru hareket sağlayan kinosilyalı hücrelerle değişimli olarak silyasız kübik hücre gruplarından oluşan bir epitele sahiptir. Bu, epitele karakteristik tarak şeklindeki görünümünü verir. Silyasız hücreler seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğunu absorbe ederler. Silyalı hücre aktivitesi ve sıvı abzorbsiyonu, spermiyumların epididimise doğru süpürülmesini sağlayan bir sıvı akımı sağlar. Epitelin bazal laminasının dışında dairesel olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşan ince bir tabaka vardır. Duktuli efferentes giderek birleşip epididimisin duktus epididimisini oluşturur (3,4).

2.3.3. Genital Boşaltım Kanalları

Testiste üretilen spermiyumları penil yollara doğru taşıyan kanallar **duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve duktus ejakulatoryus'**dur.

2.3.3.1. Duktus Epididimis : Duktus epididimis yaklaşık 4-6 m uzunluğunda, içinde spermiyumların olgunlaştığı , döllenme yetenekleri için gerekli olan ileriye doğru hareket etme özelliğini kazandıkları, tek ve oldukça kıvrıntılı tubuler bir yapıdır. Bu uzun kanal, çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları ile birlikte epididimisin kuyruk ve gövdesini oluşturur. Epididim kanalı üç ana segmente ayrılır ; **baş , gövde ve kuyruk**. Epididim kanalının son kısmında toplanan spermler, ileri doğru hareket gösterir. Yuvarlak bazal hücreler ve prizmatik esas hücrelerden oluşmuş stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Bu hücreler, düz kas hücreleri ve kan kapillerlerinden zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bir bazal lamina üzerine oturur. Bu düz kasların peristaltik kasılmaları spermin kanallar boyunca ilerlemesine yardım eder. Prizmatik esas hücrelerinin yüzeyleri ise stereosilya adını alan uzun ve dallanmış düzensiz hücre yüzey farklanmaları ile kaplanmıştır. Epididimin baş bölgesinde stereosilya uzundur ve dallanmalar yapar. Kuyruk bölgesinde stereosilyanın yüksekliği azalır. Esas hücreler, epididim lümenine **karnitin, siyalik asit, glikoproteinler ve gliserilfosforilkolin** salgılar. Bu hücreler iyi gelişmiş Golgi aygıtı, lizozom ve veziküller sergiler. Testiküler sıvının yaklaşık % 90'ı eferent kanalcıklarda ve epididimde esas hücreler tarafından emilir. Bazal hücreler ise esas hücrelerin

farklılaşmamış öncülleri olarak dikkate alınır. Diğer hücre tipleri, mitokondriyondan zengin ve epididim başında belirgin olan **apikal hücreler** ve epididim kuyruğunda belirgin olan **berrak hücrelerdir**. **İntraepitelyal lenfositler** epididim boyunca yayılmıştır ve epididim immunolojik bariyerinin önemli bir bileşeni olabilirler. Epitel yüksekliği epididim kanalının bölümü ile ilgili olarak değişir. Epitel baş bölgesinde daha uzun ve kuyruk bölgesinde daha kısadır. Buna zıt şekilde, epididim kanalının lümeni, baş bölgesinde dar ve kuyruk bölgesinde daha geniştir. Duktus epididimis epiteli spermatogenez süresince atılan artık cisimciklerin ortadan kaldırılması ve sindirilmesine katılır (3).

2.3.3.2. Duktus Deferens : Epididimisten kalın müküler duvarlı düz bir tüp olan vas deferens devam ederek, prostatik üretraya açılır. Bu kanalın tipik olarak dar bir lümeni ve kalın bir düz kas tabakası vardır. Mukozası uzanlamasına kıvrımlar oluşturur; yüzeyi stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Lamina propria elastik liflerden zengin bir bağ dokusu tabakasıdır. Kalın kas tabakası, içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler tabakalardan oluşmuştur. Duktus deferens spermatik kordonun bir parçasını oluşturur. Bu kordon testiküler arter, pampiniform pleksus ve sinirleri içerir. Prostata girmeden önce duktus deferens genişler ve *ampulla* denilen bölümü oluşturur. Bu alanda epitel kalınlaşır ve oldukça fazla kıvrımlar yapar. Ampullanın son kısmında seminal veziküller duktusa katılırlar (3).

2.3.3.3. Duktus Ejakulatorius : Duktus deferens prostata girer ve prostatik üretraya açılır. Prostata giren segmente *ejakülatuvar duktus* denir. Duktus deferensin mukoza tabakası ampulla boyunca ejakülatuvar duktusun içine kadar devam ederken, kas tabakası ampulladan sonra sonlanır

2.3.4. Yardımcı Üreme Bezleri

Bu bezler, **seminal veziküller, prostat bezi ve bulboüretral bezler**'dir. Seminal veziküller ve prostat, seminal sıvının çoğunu üretir ve onların fonksiyonu androjenler tarafından düzenlenir (3).

2.3.4.1. Seminal Vezikül : Seminal veziküller, androjene bağımlı ve uzunlukları 15 cm olan iki adet oldukça kıvrıntılı tübüler yapıdaki bezlerdir. Organdan kesitler alındığında aynı tüp farklı yönlerde gözlenebilir. Salgı granüllerinden zengin tek katlı kübikten, yalancı çok katlı prizmatikçe doğru değişen bir epitel ile döşeli olup katlantılı mukoza kıvrımları içermektedir. Bunların ince yapı düzeyindeki özellikleri protein sentezleyen hücrelere benzer. Lamina propria elastik liflerden zengindir. Orta tabaka, dairesel ve uzunlamasına düz kas tabakaları ile çevrilidir. Seminal veziküllerin visköz sarımsı salgısı, spermiyumları aktive eden *fruktoz, sitrat, inositol, prostaglandinler ve çeşitli proteinlerden* zengindir. Erkek üreme sistemi ile ilişkili bu bezler tarafından üretilen karbonhidratlar seminal sıvıya salgılanırlar ve sperm motilitesi için enerji kaynağını oluştururlar. Fruktoz, bu karbonhidratlar içerisinde en fazla bulunan monosakkariddir ve ejakülasyonla atılan spermin ana enerji kaynağıdır. İnsan ejakülatının % 70'i seminal veziküllerden kaynaklanır. Epitel hücrelerinin boyutları ve salgılama sürecinin aktivitesinin derecesi testesterona bağımlıdır (3).

2.3.4.2. Prostat : Prostat, en büyük yardımcı üreme bezidir ve 30-50 adet dallanmış tübüloalveoler bezin oluşturduğu bir topluluktur; bu bezlerin kanalları prostatik üretraya açılır. Prostatik bezler üç bölgede düzenlenmiştir; *periüretral mukozal bezler, periüretral submukozal bezler* ve esas bezler olarak adlandırılan *periferik birleşik bezler*. Bezler tek katlı ya da yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Prostat, prostatik sıvıyı üretir ve bunu iç kısmında biriktirir; bu sıvı ejakülasyon sırasında itme gücü için gereklidir. Prostat düz kaslardan zengin bir fibroelastik kapsül ile çevrilmiştir. Kapsülden çıkan septumlar bezin içine doğru uzanırlar ve bezi loblara ayırırlar; bu loblar erişkin erkekte kolayca seçilemez. Bezleri ayrıca zengin bir fibromusküler stroma çevreler (3,4).

Prostatta üç belirgin bölge bulunur: birincisi santral zon denilen *merkezi bölge*. Yalancı çok katlı bir epitelidir ve bezin hacminin % 25'ini oluşturur. Bezin % 70'ini *periferik bölge* oluşturur. Bu bölgenin epitelidir daha düzgündür ve burası prostat kanserinin geliştiği başlıca bölgedir. Üçüncü bölge olan *geçiş bölgesi*, tıpta oldukça önemlidir çünkü burası benign prostat hiperplazilerinin büyük bir bölümünün kaynaklandığı bölgedir (3).

Prostatik bezlerin lümeninde sıklıkla 0.2-2 mm çapında glikoproteinden zengin ve bazen kalsiyum birikme alanı olan küçük yuvarlak cisimcikler bulunur. Bunlar *prostat taşları* ya da *korpora amilasea* olarak isimlendirilir. Bu cisimcikler çoğunlukla kalsifiye olmuştur. İşlevleri tam olarak bilinmemekle beraber, sayıları yaşla birlikte artmaktadır. Hücreler bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksine sahiptir. Salgı ürünleri *prostat-spesifik asit fosfataz*, *prostat-spesifik antijen*, *amilaz* ve *fibrinolizin* içerir. Prostatın salgısı asidiktir (pH 6,5). Semen likefaksiyonunda rol alan fibrinolizin içerir. Semene salgılanan prostatik sıvıda yüksek konsantrasyonlarda *sitrik asit*, *çinko*, *amilaz*, *prostat-spesifik antijen* ve *asit fosfataz* vardır (3,4).

2.3.4.3. Bulboüretal Bez: Bulboüretal bezler (Cowper bezleri), çapları 3-5 mm olan ve üretranın membranöz kısmının proksimalinde yerleşerek buraya açılan bezlerdir. Mukus salgılayan tek katlı kübik epitele sahip tübüloalveoler bezlerdir. İskelet ve düz kas hücreleri her bir bezi loblara ayıran septumlarda bulunurlar. Oldukça *bol galaktoz* ve *ortalama miktarda siyalik asit içeren salgı*, penil üretraya boşaltılır. Bu salgı kayganlaştırıcı bir fonksiyona sahiptir ve penil üretra boyunca dışarı çıkan semenin önünde gider.

2.3.5. Penis

Penis başlıca üç silindirik erektile doku kitlesi ile üretrayı içermekte olup, dıştan deri ile sarılmıştır. Bu yapılardan ikisi olan *korpus kavernoza penis*'ler dorsal olarak yerleşmiştir. Diğerisi ise *korpus kavernoza üretra* ya da *korpus spongiyozum* adını alır, ventral olarak yerleşerek üretrayı çevreler. Bu yapı en sonda genişleyerek *glans penisi* oluşturur. Korpus kavernoza, tunika albuginea denilen ve sıkı bağ dokusundan oluşan dirençli bir tabaka ile sarılıdır. Korpus kavernoza ve korpus spongiyozum, bir

arterle beslenen ve venöz kanallarla boşaltılan düzensiz ve birbirleriyle bağlantılı kan boşlukları, ya da *sinüzoidler* içerir. Ereksiyon sırasında, arteriyal kan sinüzoidleri doldurur, sinüzoidler genişler ve kanı boşaltacak olan venöz kanallara bası yaparak onları sıkıştırır. Penisin ve üretranın korpus kavernozumları erektile dokudan oluşmuştur. Erektile doku, penceresiz endotel hücreleri ile döşeli ve bağ dokusu ile düz kas hücrelerinden oluşan trabekülalarla ayrılan venöz boşluklardır (3).

Nitrik oksit ve **fosfodiesteraz** olarak iki kimyasal madde ereksiyonu kontrol eder. Beyin korteksi ve hipotalamus aracılığıyla oluşan ve spinal korddan aşağıya penisteki otonom sinirlere taşınan cinsel uyarı, pudental sinirin en uç noktası olan dorsal sinirin dallarının *nitrik oksit* üretmesine sebep olur. Nitrik oksit molekülleri kan sinüzoidlerini kuşatan düz kas hücrelerinin oluklu bağlantılarından geçerek hızlı bir şekilde yayılır. Düz kas hücrelerinin içinde, nitrik oksit molekülleri *guanozin trifosfattan (GTP)*, *siklik guanozin monofosfat (cGMP)* üretmek için *guanilat siklazı* aktive eder. cGMP, hücre içindeki depolama alanlarında Ca^{++} 'un tutulmasını indükleyerek sinüzoidleri kuşatan düz kas hücre duvarını gevşetir. Düşürülmüş Ca^{++} konsantrasyonları düz kas hücrelerinin gevşemesini belirler, bu da dorsal ve kavernoöz arterlerden gelen hızlı arteriyal kan akışıyla sinüzoidlerde kan birikmesine yol açar. Kanla dolan sinüzoidler penisten kanı boşaltan küçük venlere bası yapar ve penis sertleşir. Fosfodiesteraz (PDE) enzimi cGMP'yi yıkmak ve ereksiyonu sonlandırmak için üretilir. PDE aktivitesinin bloke edilmesiyle, cGMP düzeyleri yüksek tutulur ve penis ereksiyon halinde kalır (3).

Prepusyum (sünnet derisi), içinde düz kaslar ile bağ dokusu içeren retraktile bir deri katlantısıdır. Yağ bezleri, glansı çevreleyen deride ve katlantı içinde bulunurlar.

Penil üretranın büyük bölümü yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir; glans peniste bu, çok katlı yassı epitele dönüşür. Mukus salgılayan Littre bezleri penil üretra boyunca bulunurlar.

Penisin arteriyel desteği internal pudental arterlerden gelir, bunlardan da penisin derin arterleri ve dorsal arterleri çıkar. Derin arterler besleyici ve helisin arterleri oluşturmak üzere dallara ayrılırlar. Bunlardan ilki yani besleyici olanlar trabekülalara gerekli oksijen ve besin maddelerini sağlarken ikincisi yani helisin arterler doğrudan

erektil dokular olan kavernöz boşluklara açılırlar. Helisin arterler ve derin dorsal venler arasında arteriyovenöz şantlar vardır (3).

2.4. Fertilizasyon (Döllenme) :

Fertilizasyon, sperm ile oositin teması ile başlayan birbiri ile ilişkili karmaşık moleküler olaylar dizisidir. Tek hücreli embriyo olan zigotun birinci mitoz bölünmesinin metafaz plağında anne-baba kromozomlarının bir araya gelmesi ile son bulur. Bu olaylar sırasında herhangi bir aşamada bozukluk zigotun ölmesine neden olabilir (7). Fertilizasyon, yaklaşık olarak 24 saat sürer ve uterus tüplerinin ampulla bölgesinde gerçekleşir. Bu bölge tüpün en geniş kısmıdır ve overe yakındır. Eğer oosit burada fertilize olmazsa, tüplerden uterusu doğru yavaşça ilerler ve burada dejenere olarak ortadan kaldırılır. Fertilizasyon tüpün diğer parçalarında olabilir ancak uterusda olmaz. Spermiler dışının üreme kanallarında 72 saat canlı kalabilmektedir (6,7).

Vajene dolan spermilerin yaklaşık % 1'i serviksten geçebilir. Buraya ulaşabilen spermiler canlılıklarını saatlerce koruyabilirler. Spermiler serviksten uterus tüpleri içine öncelikle kendi hareketleriyle, bir ölçüde de sıvıların epitel hücrelerinin silyaları tarafından dalgalandırılmasıyla ulaşırlar. Spermiler bu mesafeyi en çabuk 2 ile 7 saat arasında kat ederler. İstmusa ulaştıklarında motiliteleri azalır ve hızları düşer. Ovulasyonla birlikte oositi çevreleyen kümülüs hücreleri tarafından salgılanan kemotaksik maddelerin etkisiyle kapasitans olmuş sperme oositi bulması için yol gösterir (6,7).

Dişi genital üreme kanalları içine giren spermiler başlangıçta oositi fertilize edecek yetenekte değildir. Fertilizasyon yeteneğine kavuşmak için sperm önce **kapasitasyon** ve **akrozom reaksiyonu** adı verilen değişimleri geçirmek zorundadır (6).

Kapasitasyon, spermilerin dişi üreme kanallarındaki salgıların etkisiyle bu süreci tamamlaması ve fertilizasyon için uygun hale gelmesi dönemidir ve bu dönem insanlarda yaklaşık 7 saat sürmektedir. Spermle uterus tüpünün iç yüzünü döşeyen mukoza hücreleri arasında epitelyal bir etkileşimi gerektiren kapasitasyonun büyük bir kısmı uterus tüpleri içinde gerçekleşir (6). Kapasitasyon spermelerde yapısal bir değişikliğe neden olmayan ve genellikle akrozom reaksiyonunun tamamlanması için

gerekli bir olgunlaşma sürecidir. Bu süre içinde spermin akrozomal bölgesini örten plasma membranı üzerindeki glikoprotein kılıfı ve seminal plasma proteinleri ortadan kaldırılır. Ayrıca sperm plazma membranındaki intramembranöz partiküllerin yer değiştirdiği gözlenir, intrasellüler kalsiyum ve sodyum seviyesi yükselir. Yapısal bir değişiklik gözlenmese de; kapasite olan spermelerde intrasellüler iyonların reorganizasyonu gerçekleşir ve metabolik değişiklikler olur. Moleküler düzeyde ise adenilat siklaz/protein siklaz aktivitesi yeniden düzenlenir ve çekirdek proteinlerinde değişiklikler meydana gelir. Sadece kapasitasyonunu tamamlamış bir sperm korona hücrelerinin arasından geçebilir ve akrozom reaksiyonuna girebilir (10).

Akrozom reaksiyonu kapasitasyonun aksine spermelerde yapısal değişikliğe neden olan bu olay spermin zona pellusidaya bağlanmasının ardından oluşur ve zona proteinleri tarafından başlatılır. Bu reaksiyon, zona pellusidanın penetrasyonu için gerekli olan, aralarında tripsin-benzeri maddelerin ve akrozinin de bulunduğu bazı enzimlerin salgılanmasıyla en üst noktaya ulaşır. Akrozomal reaksiyon spermelerin oositle karşılaştıkları dönemde geçirdikleri bir süreçtir, öncesinde akrozom reaksiyonunu tamamlayan spermeler kumulus-korona hücreleri arasında ilerleyemez veya ilerleseler bile zona pellusidaya tutunarak penetre olamazlar (6,10).

2.4.1. Fertilizasyonun evreleri

Evre 1- Korona radiatanın delinip geçilmesi

Evre 2- Zona pellusidanın delinip geçilmesi

Evre 3- Oosit ve sperm hücre zarlarının kaynaşması

Evre 1- Korona radiatanın delinip geçilmesi : Dişi üreme kanallarında biriken 200-300 milyon spermden ancak 300 ile 500 tanesi döllenme bölgesine erişebilir. En sonunda da spermelerden sadece biri sekonder oositi döller. Diğer spermelerin fertilizasyona girmesi, oositin salgılanan faktörler ve zona pellusidanın reseptör yapısının değişmesi ile engellenir. Spermin akrozomundan salınan hyaluronidaz enziminin aktivitesi ile oosit korona radiatasındaki folliküler hücreler birbirinden ayrılarak zona pellusidanın ortaya çıkmasını sağlarlar. Bu olayda tubal mukozal

enzimler de hyaluronidaza yardım eder (7). Kapasitasyonunu tamamlamış olan sperm, korona hücrelerinin arasından serbestçe geçer (6).

Evre 2- Zona pellusidanın delinip geçilmesi : Zona pellusida, insanda yaklaşık 13-15 µm. kalınlığında, oositi çepeçevre saran ve spermilerin ovuma bağlanmalarını kolaylaştıran ve akrozom reaksiyonunu başlatan glikoprotein yapısında bir kılıf olarak tanımlanabilir. Hem spermilerin oosite bağlanması, hem de akrozom reaksiyonu **ligand Zona Pellusida Protein 3 (ZP3)** adı verilen bir zona proteini aracılığıyla gerçekleşir. ZP3 molekülünün: sperm hücre zarındaki integral proteinleri tanıyan sperm reseptörü ve akrozom reaksiyonunu tetikleyen, sperm başındaki reseptör proteinlerine bağlanan bölge olarak iki bölgesi vardır (1). Akrozomdan salınan *esteraz, akrozin, hyalüronidaz, asit proteinaz, ariminidaz, fosfataz, aril sülfataz, kollajenaz, fosfolpaz C, α-glukorinidaz* ve *nöraminidaz* enzimleri zona pellusidayı eritir, böylece spermin oosit içine gireceği bir yol oluşur. Bu enzimlerin en önemlisi proteolitik bir enzim olan **akrozindir** (7). Zona pellusidanın geçirgenliği, sperm başının oositin yüzeyine temas etmesiyle değişikliğe uğrar. Buradaki ekstrasellüler glikoprotein örtünün içeriği fertilizasyondan sonra değişir. Bu temas ile, oositin plazma membranını döşeyen kortikal granüllerden lizozomal enzimlerin salgılanır. Bu enzimler de, sperm penetrasyonunu engellemek ve zona yüzeyinde sperm için türe özgü reseptör bölgelerinin inaktivasyonunu sağlamak üzere, zona pellusidanın özelliklerinde bazı değişikliklerin meydana gelmesine neden olur ve **zona reaksiyonu** denir. Zona pellusida içinde gömülü başka spermilere de rastlanmasına rağmen, bunlardan ancak bir tanesi oositin içine girebilir (6,7).

Evre 3- Oosit ve spermin plazma membranlarının kaynaşması : Spermin oosite yapışması başlangıçta kısmen oositin yüzeyindeki integrinlerle spermin yüzeyindeki ligandin ve disintegrinlerin karşılıklı etkileşimleriyle gerçekleşir. Sperm oosite yapışır yapışmaz her iki plazma membranı birbiriyle kaynaşır. Spermin akrozomal başını çevreleyen hücre zarı akrozom reaksiyonu sırasında kaybolduğundan, füzyon oositin membranıyla, spermin başının arka kısmını çevreleyen membran arasında olur. İnsanlarda, spermin başı ve kuyruğu oositin sitoplazması içine girer; ancak plazma membranı oositin yüzeyinde kalır (6).

2.4.2. Oositin Fertilizasyona Cevabı

1. Kortikal ve zona reaksiyonları. Lizozomal enzimler içeren kortikal oosit granüllerin serbest kalmasıyla, oosit membranı diğer spermilerin girişini önleyecek biçimde delinmez hale gelir, zona pellusida spermilerin oosite yapışmasını ve penetrasyonunu önlemek amacıyla yapı ve kompozisyonunu değiştirir. Böylece oositin içine birden çok sperm girmesi olan polispermi önlenmiş olur (6).

2. İkinci mayoz bölünmenin tamamlanması. Oosit, sperm sitoplazmasına girmesinin hemen ardından 2. mayoz bölünmenin metafazında bekleyen oosit bölünmesini tamamlar. Bölünme sonucu oluşan hücrelerden hemen hemen hiç sitoplazmaya sahip olmayan **ikinci polar cisim**, diğeri de **kalıcı oosit** olarak bilinir. Bu hücrenin kromozomları $22+X$ **dişi pronükleus** adı verilen veziküler bir çekirdek içinde yeniden düzenlenirler (6,7).

3. Oosit metabolik aktivasyonu. Aktive edici faktörler, oositin içine büyük bir olasılıkla sperm tarafından taşınırlar. Oositin füzyon sonrası aktivasyonu, erken embriyogenezis ile ilgili ilk hücrel ve moleküler olayların tümü şeklinde tanımlanabilir.

Bütün bu değişimler sırasında, sperm de dişi pronükleusunun yakınına gelene kadar ilerlemesini sürdürür. Kuyruğu ayrılıp dejenere olurken, sperm çekirdeği genişleyerek **erkek pronükleusunu** oluşturur. Birbirine iyice yaklaşan dişi ve erkek pronükleuslarının çekirdek zarları da kaybolduğundan bu safhadan sonra dişi ve erkek pronükleusların morfolojik olarak birbirinden ayırt edilmesi da olanaksız hale gelir. Her ikisi de haploid sayıda kromozom içeren erkek ve dişi pronükleusları büyümeleri sırasında kendi DNA'larını replike etmek zorundadırlar. Bunu yapmadıkları takdirde, iki hücreli evrede zigotun her hücresi, normalde olması gereken DNA miktarının yarısı kadar DNA'ya sahip olacaktır. Kromozomlar DNA sentezinin hemen ardından normal mitotik bölünmeye hazırlık olarak iğ üzerinde organize olurlar. Anneden gelen 23 ve babadan gelen 23 kromozom çifti sentromerden uzunlamasına ayrılır ve yavru kromatidler, zigotun her hücresi normal diploid sayıda kromozom ve DNA içerecek şekilde karşı kutuplara doğru kayarlar. Yavru kromatidlerin bu hareketi sırasında, hücrenin yüzeyinden başlayarak zamanla derinleşip sitoplazmayı iki parçaya bölen derin bir yarık belirir (6,7).

2.4.3. Fertilizasyonun Temel Sonuçları :

1. Yarısı anneden, diğer yarısı da babadan gelen **kromozomların diploid sayısının restorasyonu**. Zigot böylece, anne ve babadan farklı bir kromozom kombinasyonuna sahip olur.
2. **Yeni bireyin cinsiyetinin belirlenmesi**. X taşıyan sperm, dişi bir embriyo (XX), Y taşıyan da erkek bir embriyo (XY) oluşmasını sağlar. Yani embriyonun kromozomal cinsiyeti döllenmeyle belirlenmiş olur.
3. **Yarıkılanmanın (cleavage) başlatılması**. Döllenmeyen oosit genellikle 24 saat içinde dejenere olur (6).

2.4.4. Glycodelin

Glycodelin (Gd), Lipocalin süperailisine ait, immün düzenleyici bir glikoprotein olup başlıca 3 formu bulunmaktadır : Amniotik sıvı glycodelini (glycodelin-A, Gd A), folliküler sıvı glycodelini (glycodelin-F, Gd F) ve seminal plazma glycodelini (glycodelin-S, Gd S) (1,13). Gd A'nın immunsupresif aktivitesinin, fetomaternal savunma sisteminde önemli bir rol oynadığı; Gd F'in, spermin ZP'ya bağlanmadan önce prematur akrozom reaksiyonundan koruduğu; Gd S'in ise erkek fertilitesinde kapasitasyonda ve fertilizasyonda önemli bir marker olarak rol oynadığı düşünülmektedir (14,15).

Glycodelinin üç tane bilinen izoformu özdeş protein omurgasına sahiptir, fakat glikolizasyon profilleri farklıdır. Gd S yaklaşık 1700 nM konsantrasyonda seminal plazmada bol miktarda bulunan glikoproteindir. Gd A ve Gd F'in aksine Gd S sperm-ZP bağlanmasını etkilemez. Gd S alışılmışın dışında fukozdan zengin glikanlara sahiptir ve esas kompleks tip glikan yapısı Lewis X ve Lewis Y'dir. Gd S'in glikolizasyonu, salgılanan insan glikoproteinleri arasında olağan dışıdır çünkü sialik asid glikanlara sahip değildir. Asn-28, Asn-63 ve Asn-85 olarak kabul edilen üç tane N-glikolizasyon bölgesi vardır ki bunlardan ilk ikisi glikolizlenmiştir. Asn-28 bölgesi sadece yüksek mannoz yapıları içermektedir. Asn-63 bölgesi ise yalnızca kompleks tip glikanları içerir (15).

Glycodelin A ve F'in glikolizasyon formu Gd S'den farklılık göstermektedir. Gd S'den farklı olarak Gd A ve Gd F, spermiyum/zona pellusida bağlanmasını inhibe

ederek kontraseptif aktivite gösterirken, glikolizasyon gösteren formları ise inhibitör aktivite göstermektedir. Glycodelin, progesteron ile indüklenen akrozom reaksiyonunun baskılanmasını sağlayarak, erken akrozom reaksiyonunu önlemektedir. Servikal mukusta, Gd S spermiyumun baş kısmından ayrılarak kapasitasyonun başlamasını sağlar (15). Erken akrozom reaksiyonu, fertilizasyon olayı başlamadan önce kumulus hücreleri tarafından uzaklaştırılmış olan ve tubal sıvıdan gelen Gd F tarafından önlenir (1).

Başarılı bir fertilizasyon için sperm kapasitasyonunun sıkı bir şekilde kontrolü önemlidir. Gd S, seminal plazma içerisinde bol miktarda bulunan bir glikoprotein olmakla birlikte fertilizasyondaki işlevi belirsizdir. Bağlanma kinetiği ile ilgili deneyler, insan sperminde Gd S'in iki çözünebilir ve tersinir bağlanma bölgelerinin varlığını tanımlamıştır. İndirek immunofloresan boyama ile Gd S'in spermin baş kısmında belirgin olarak immunoreaktivitesinin varlığı ortaya konulmuştur. Bu immunoreaktivitenin, servikal mukus ile etkilenen spermelerde azaldığı belirlenmiştir. Fizyolojik konsantrasyonlardaki Gd S adenilat siklaz/ protein kinaz A/ trozin kinaz sinyal yolağının azalması yani aşağı regülasyonu ve kolesterol akımı ile indüklenen siklodekstrin ve bovine serum albuminin azalması kapasitasyonun baskılanmasına yol açmaktadır. Deglikolizasyon, Gd S'in bovin serum albumin aracılığıyla indüklenmiş kapasitasyona etkisini ve Gd S bağlanmasını ortadan kaldırmaktadır. Bu da Gd S'in karbonhidrat kısmının molekülün fonksiyonu için önemli olduğunu göstermektedir (15).

Seminal plazmada bulunan Gd S insan sperminin kapasite olmamış halinde bulunmaktadır. Taze ejakülat içinde bulunan spermeler doğrudan oositi fertilize etme yeteneğine sahip değildirler. Spermeler tam tanımlanmamış süreç olarak adlandırılan kapasitasyon ile fertilizasyon yeteneklerini kazanırlar. Normalde spermelerin dişi genital sistemindeki sperm göçü sırasında kapasitasyon ile spermi fertilize etme yeteneği kazanırlar. Kapasitasyon sonrasında spermeler, ZP proteinleri ve progesteron ile stimülasyon ile akrozom reaksiyonunu sürdürebilirler, böylece ZP penetrasyonu için akrozomal enzimler salınır. Kapasitasyonunu tamamlamış insan spermi, invitro olarak sadece 50-240 dakika ZP aracılığıyla indüklenmiş akrozom reaksiyonuna duyarlı olur (16). Böylece kapasitasyon zamanlamasının sıkı kontrolü, fertilizasyon sürecindeki olayların uygun biçimde sıralanmasının oluşmasını sağlaması açısından önemlidir.

Erkek yardımcı cinsiyet bezleri seminal plazma içerisine protein, glikoprotein, peptid, glikopeptid ve prostoglandinleri içeren kompleks karışımı salgırlar. Seminal plazma, spermin kapasitasyona uğramamış halde korunmasını sağlar. Bu spermin fertilizasyon bölgesine göçünden önce kapasitasyona başlamamasını sağlamak için gereklidir. Seminal plazma, kapasite olmuş spermlerin baş kısımlarına bağlanarak onların korunmasını sağlar (15).

2.5. Erkek İnfertilitesinde Tanıya Yönelik İnceleme Yöntemleri

Üreme çağındaki çiftlerin, bir sene boyunca düzenli cinsel ilişki sonrasında ancak %85'inde gebelik oluşması, çiftlerin %15'inde infertilite sorunu olduğunu göstermektedir. Bu fertil çiftlerin % 30'unda infertiliteye neden olan erkek faktörleri saptanmıştır. %20'sinde de erkek ve kadın faktörlerin birlikte rol oynadığı bildirilmiştir (17,18).

2.5.1. Semen Analizi

Uygun koşullarda hazırlanmış Androloji laboratuvarlarında yapılması gerekmektedir.

2.5.1.1. Semen Toplanması

Standardizasyonu sağlamak açısından cinsel perhiz süresi iyi ayarlanmalıdır. Semen analizinden sağlıklı sonuç alabilmek için cinsel perhiz süresinin en az 2 en fazla 8 gün olması gerekmektedir. Sürenin kısa olması sayı ve volümü, uzun olması ise hareketliliği olumsuz etkiler. Örneğin, hiçbir ek madde kullanılmadan kuru masturbasyonla verilmesi söylenmelidir. Örnek kapları ağız geniş, non-toksik, spermisid etkisi olmayan steril kaplar olmalıdır (10).

2.5.1.2. Semen Fiziksel Özellikleri

Örneğin verilmesinden itibaren ejakulatın 5-30 dk. içerisinde likefiye olması gerekir. Semen koagüle olmasına neden olan faktörler seminal vezikül, likefiye olmasını sağlayan proteolitik enzimler prostat kaynaklıdır (10).

Hastalardan örnek kapları içerisinde alınan semen örnekleri, kaplara hastaların numaraları yazılarak, 37 °C ayarlı inkübatörde 15 dk. likefiye olmaları için bekletilir. Örneğin viskozitesi likefaksiyon sonrasında mutlaka değerlendirilmelidir. Olağan dışı renk, koku gibi durumları kaydedilmelidir.

Yeterli süre içerisinde likefiye olmayan visköz örnekler bu sürenin sonunda enjektör ile çekilip, damla damla tekrar kaplarına filtre edilerek homojen bir görünüme ve daha sıvı hale getirilebilir. Örneğin viskozitesi ve filtre edildiği not edilir.

Likefaksiyonunu tamamlamış örnekten 10 µl alınarak faz kontrast mikroskopta X20 büyütme kullanılarak makler sayım kamerasında sayım yapılır. 10 X 10= 100 kare içeren bu kamarada, 10'luk sütun ve satırlardan, 3'lü kombinasyonlar halinde karelerde görülen toplam sperm sayılır ve 3x10 karenin ortalaması alınır. Bulunan değer 10^6 sabiti ile çarpılarak sperm konsantrasyonu belirlenir (10).

Sayım yaparken sperm hareketlilik oranları da % olarak belirlenir.

Alanda gözlenen sperm dışı hücrelerin sayısı kaydedilir.

İdeal bir örnek;

Sıvılaşma süresi : < 20 dak.

Görünüm: gri-opak, homojen

Miktar: 2-5 cc (< 0.5 ve > 6cc ise sorunlu)

Viskozite: normal, ejakülat damlalar halinde dökülmeli

pH: 7.2-8.0, durumlarına sahip olmalıdır.

2.5.1.3..Mikroskobik Değerlendirme

Faz kontrast mikroskoplar kullanılarak, X20 büyütmede değerlendirme yapılır.

A. Sperm sayımı (Spermiyogram)

İnfertilite sorunu ile gelen erkeklere ilk yapılması gereken yöntemdir. Sperm sayımı için hemisitometre, microcell, CellVU, Standart Count, Makler gibi çeşitli sayım kamaraları tanımlanmış ve en yaygın olarak kullanılan Makler sayım kamerasında hareketli ve hareketsiz spermler birlikte değerlendirilir. Spermlerin hepsi immobilize edilerek de sayım yapılabilir. Makler sayım kamerasına konulan ejakülat miktarı 10 µl'yi geçmemeli, kamara sıcaklığı analiz öncesi 37°C olmalıdır. Kamaradan alınan sonuç ml başına düşen sperm sayısıdır ve bu sperm konsantrasyonunu ifade eder, ejakülatdaki total sayı ile karıştırılmamalıdır. İyi bir örnekte sperm sayısı 20×10^6 'nın üzerinde olmalıdır (10).

B. Sperm Hareketliliği (Motilite)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yayınlanan ve semen analizini standardize etmeye yönelik laboratuvar kılavuzu sperm hareketliliğini 4 kategoride değerlendirir;

3° ve 4° : Hızlı, progressive ve hareketlilik. ($>25 \mu\text{m/sn}$ hız)

2° : Yavaş ya da duraklayarak hareket eden spermmler

1° : Yerinde hareketlilik ($5 \mu\text{m/sn}$ hız)

0° : Hareketsiz spermmler

Sağlıklı sonuç verebilmek için, 2 ayrı incelemede en az 200 sperm hücresinin hareket özellikleri değerlendirilmesi ve 2 sonuç arasındaki fark $> \% 5$ olmamalıdır.

İyi bir örnekte grade 2-3-4 $> \%50$ olmalıdır (10).

C. Morfoloji Değerlendirmesi

Semen analizinde çok önemli bir kriterdir. Bu değerlendirmede 1987 yılından itibaren *Kruger ile kesin kriterler* kavramı kullanılmaya başlanmıştır (10). Fertilizasyon ve gebelik oranları ile spermin morfolojik özellikleri arasında bir ilişkiden söz edilebilir. Sperm morfolojisi ile yapılan çalışmalar özellikle zona pellusidaya bağlanan spermmlerin morfolojik değerlendirilmesi sonrasında tanımlanmıştır. Morfolojik değerlendirme lam üzerine ince bir şekilde yayılıp boyanmış preparatlarda immersiyon objektifi ile yapılmalıdır. Bazal örnekte sperm sayısı > 20 milyon/ ml. ise örnekten $5 \mu\text{l}$, daha az ise $10\text{-}20 \mu\text{l}$. damla alınarak 45 derecelik açı ile lama yayılıp kurutulduktan sonra boyanmalıdır. 10×40 büyütmede incelendiği zaman spermmlerin düzgün yayılım göstermesi, kümeleşme olmaması ve her sahada yaklaşık 40 spermin görülmesi yaymanın başarı kriterleridir. Özellikle visküz örneklerde, yayma çok daha dikkatli yapılmalı ya da ejakülat kültür vasatı ile dilüe edildikten sonra yayılmalıdır. Morfolojik değerlendirmeler için kullanılan farklı boyama yöntemleri vardır. Diff Quik yönteminde fiksasyon ve boyama işlemi kısa sürdüğünden spermmler gerçek boyutlarına yakın görünür ancak; Papanicolau ya da Spermac ile yapılan boyamalarda daha küçük boyutta sperm hücreleri ile karşılaşılır (10,19).

Diff Quick boyamada, Swim-up işlemi esnasında yayması yapılan örnekler kuruduktan sonra ilk olarak 3 dk. fiksasyon işlemi için metil alkolde bekletilir. Fiske olan preparatlar 2 dakikalık eşit sürelerde önce orange, daha sonra da bromofenolblue

boyada bekletilip yıkanır. Kuruyan örnekler immersiye objektifinde (X100) bakılır ve morfolojileri değerlendirilir. Normal, baş, boyun, kuyruk sırası ile % verilir (10).

Normal morfolojiye sahip bir sperm;

Kruger: >%4 , WHO: >%30

Baş: 2-3 μ m en, 4-5 μ m boyda, konturları düzgün, oval, akrozom başın %40-%70'ini kaplayacak şekilde olmalı ve vakuol içermemelidir. Baş anomalileri küçük, büyük, yuvarlak, uzamış, amorf, vakuollü olarak sınıflandırılabilir, bu anomalilere tek tek rastlanabileceği gibi birkaçı bir arada da bulunabilir (10).

Boyun: 4-5 μ m uzunluğunda düzgün olmalı ve başın alt kısmına axiller konumda bağlanmalıdır. Boyun bölgesindeki sitoplazmik droplet başın yarısından daha büyük olmamalıdır. Kalın ya da irregüler boyun anomalileri görülebilir (10).

Kuyruk: 50-55 μ m uzunlukta, tek, düzgün kıvrımlı, boyun kısmından daha ince olmalı ve son kısma doğru giderek incelmelidir. Kısa, kırık, birden fazla kuyruk, kendi eksenini etrafında kıvrılmış, kalın küt görünümlü kuyruklar kuyruk anomalilerine işaret eder (10).

Erkek infertilitesinde en önemli parametre sayının ve morfolojinin beraber değerlendirilmesidir. Morfolojik değerlendirmede spermier yanı sıra yaymada gözlenen sperm dışı hücreler ve immatür germ hücreleri de değerlendirilmelidir (10).

Sperm Dışı Hücreler: Ejakülat içinde sperm hücrelerinin dışında yuvarlak hücreler olarak adlandırılan ürogenital sisteme ait epitel hücreleri, prostata ait hücreler, spermatogenetik seriye ait hücreler ve lökositler olmak üzere değişik hücreler de görülebilir. Lökositler; çoğunlukla nötrofil olmak üzere semende sık rastlanmakla birlikte 4-5 milyon üzerinde enfeksiyona ve sperm kalitesinde bozukluklara neden olmaktadır (10).

İmmatür Germ Hücreleri : Özellikle sperm sayısının çok düşük olduğu olgularda ya da azospermide bu hücrelerin varlığının değerlendirilmesi, spermatogenetik işlevin varlığının kanıtı olmaktadır (10).

D. Agglütinasyon

Agglütinasyon, hareketli sperm hücrelerinin baş, boyun ve kuyruklarının tek tek veya değişik kombinasyonlarda birbirine yapışması anlamına gelir. Bu duruma ilişkin değerlendirme sayım kamarasının sayım alanında değil, her alanda yapılmalıdır.

Hareketsiz sperm hücrelerinde kümelenmeler, sperm hücrelerinin semendeki döküntülere yapışması ya da tam likefiye olmamış semendeki yapışıklıklar spesifik olmayan agregasyon olarak değerlendirilir. Bunlar agglütinasyon olarak tanınmamalıdır. Agglütinasyon gösteren örneklerde antikor kaplı spermiler önemlidir. Semende bulunan sperm antikorları IgA veya IgG klinik olarak önem taşır. IgM antikorları daha büyük moleküler yapıya sahip olduğundan nadiren görülürler. Bu antikorları saptamak için mixed antiglobin reaction (MAR) testi uygulanmaktadır (10,20).

Agglutinasyon gösteren örneklerde, sayı da yeterli ise MAR ile IgG bakılır. Bunun için lam üzerinde 1 damla latex ve 1 damla SpermMar ile 1 damla örnek karıştırılır ve bakılır. MAR pozitif durumunda spermilerin boyun kısımlarında dizili küçük boncuk şeklinde agglütinasyonlar görünür. Bu yapıya sahip olan spermiler % olarak belirtilir ve MAR yüzdesi verilir (10).

E. Vitalite

Semen analizinde hareketsiz görünen spermilerin ölü olduğu düşünülmemelidir. Yüksek oranda hareketsiz sperm içeren örneklerde boyama teknikleri ya da hipoosmotik şişme (HOS) testi yardımı ile canlı sperm oranı saptanabilir. Sperm membran bütünlüğünün tayini amacı ile yapılan HOS testi, hipo-ozmotik ortama alınan sperm hücrelerinin hücre içerisine giren su nedeniyle şişmesi sonucunda hacminde artış ve özellikle kuyruk kısmında düzleşme ve şişmenin saptanması esasına dayanır. Eosin boyama sıklıkla kullanılan canlılık tayin yöntemidir. Sayısı yüzbinde olan, oldukça az sperm konsantrasyonlarında lam-lamel ile bakılarak her alanın gözlenmesi uygun olur. Böylece bulunan sayının da doğruluğu onaylanmış olur (10, 21).

Hareketsiz spermilerin % 50 ve üzerinde olduğu durumlarda canlı-ölü sperm oranını saptayabilmek adına Eosin boyama yapılır. Bunun için lam üzerine 1 damla eosin – 1 damla örnek alınarak lamel ile kapatılır. Ölü hücreler boyayı sitoplazmalarına aldıkları için eosin ile boyanıp renk verirler. Bu sayede ölü hücreler mikroskop altında kırmızı renkte boyanmış görülür. Boyalı (ölü) ve boyasız (canlı) hücrelerin toplam sayıya göre oranı verilir ve bu oranı canlı hücrelerin oranını belirtir (10).

Mikroskopik incelemelerle aşağıdaki sonuçlara rastlanabilir;

-Kriptozoospermi: Santrifüj sonrası sperm var

-Oligozoospermi: Sayı $10 \times 10^6 - 20 \times 10^6$ arasında

-Polizoospermi: $>250 \times 10^6$

-Normospermi: $\Rightarrow 20 \times 10^6$

-Astenoooligospermi: Hareket ve sayı az

-Azospermi: Hiç sperm hücresi yok

-Teratospermi: Şekil bozukluğu

F. Fonksiyon Testleri

Erkek yardımcı üreme organlarındaki bozukluk ya da yetersizlikler, bu organlara ait salgıların araştırılması ile ortaya konabilir.

Prostat; Semendeki çinko, sitrik asit ve asit fosfataz prostat salgısında bulunur ve ölçülen değerleri prostatın işlevi konusunda bilgiler verir.

Seminal Vezikül; Seminal fruktoz düzeyi organın işlevselliği konusunda belirleyicidir.

Epididimis; L-karnitin, glukofosfokolin ve α -glukosidaz epididimis fonksiyonlarını göstermekle birlikte, klinikte sık kullanılan ve diagnostik değeri en yüksek olan α -glukosidazdır (10).

Erkek infertilitesi tanısı almış bireylerde ek olarak günümüze kadar tanımlanmış, Sperm Penetration Assay (SPA), Hemi Zona Assay (HZA), Zona-free Hamster Assay, Hipo Ozmotik Şişme testi gibi birçok test yapılabilir. Bu testlerin klinik değeri; semen analizi ile tanımlanamayan sperm fonksiyonlarındaki yetersizliği gösterebilmeleridir (10).

Fertilizasyonun gerçekleşmesi için sperm çekirdeğinde DNA bütünlüğünün korunması gerekir. Bu nedenle sperm DNA'sı ile ilgili bozukluklarda ;

a) DNA zincir kırıkları kromozomal paketlenme hatalarına neden olabilir

b)Yüksek oranda DNA hasarları, embriyoner gelişim duraksamaları, apoptozis, implantasyon bozuklukları ve erken gebelik kayıplarına neden olabilir (22).

DNA zincir kırıkları ileri yaşla birlikte sperm sayısı ve hareketliliğinin azaldığı olgularda görülmektedir.

Sperm DNA hasarının saptanması için tanımlanmış ve yaygın olarak kullanılan testler şunlardır;

Commet Assay; Agaroze jel üzerine yayılan spermelerde hücre elektroforezi ile DNA migrasyonu değerlendirilir.

Acridine Orange: Spermlerdeki kromatin yapısını tanımlayan testlerden biridir, floresan mikroskopu ile yapılan çalışmalarda sonuçların değerlendirilmesinde yanlış pozitif sonuçlara dikkat edilmesi gerekir.

Halosperm: DNA kırıklarının saptanması için sperm asit ile denatüre edilir ve nükleer proteinlerin çıkmasından sonra gelişen halo değerlendirilir (10).

TUNEL test (TdT-mediated dUTP nick End Labeling): DNA kırıklarındaki tek ve çift sarmal kırıkların saptanması için en yaygın kullanılan testtir (23).

2.5.2. Semen Hazırlama Protokolleri

İnsan spermlerinin in vitro koşullardaki fertilizasyon yeteneği, semen içerisindeki enzimler ve sperm hücresi testis dokusundan izole ediliyorsa, in vivo koşullar ile doğru orantılıdır. Koitus sonrası vajinaya bırakılan semen içerisindeki sperm hücreleri servikal mukus tarafından süzülür ve fertilizasyon yeteneği en yüksek olan sperm fertilizasyonun gerçekleşeceği uterus tüplerine ulaşır. İn vitro koşullarda bu süreç sperm hazırlama protokolleri ile gerçekleştirilir (10).

Bu protokoller içerisinde en sık kullanılanlar **yıkama, hareketli sperm izolasyonu (swim-up, swim-down), gradient uygulamaları (cam yününden filtrasyon) yöntemleridir** (10).

Tüm yöntemlerdeki ortak amaç seminal plazmanın, sperm dışı hücrelerin, biyokimyasal ajanların uzaklaştırılıp; fertilizasyon yeteneği en yüksek sperm ayrıştırılması ve toplanmasıdır. Sperm hücrelerinin inseminasyon için hazırlanması sırasında mümkün olduğunca az hasar görmesi gerektiğinden in vivo koşullara yakın özellikteki kültür vasatı içerisine alınmalıdır. Kültür ortamlarının temelini Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) gibi tuz solüsyonları oluşturmaktadır. Sperm hazırlama protokolleri sırasında spermelerin içinde bulunduğu sıvılar laboratuvar ortamında uzun süre açıkta kalacağından HEPES tamponlu olanlar tercih edilmelidir (10).

Dilüsyon, santrifüj hızı ve süresi ve ısı değişiklikleri hazırlama protokollerinin başarısını etkileyeceğinden vasatların içeriğindeki protein bileşimi nedeniyle dilüsyonu yavaş yapılmalıdır. Hazırlama protokollerindeki en önemli aşama ise santrifüj

aşamasıdır. Bu aşamada semen içerisinde bulunan ölü hücreler ve debris, ayrıca santrifüj işleminin kendisi **reaktif oksijen radikallerinin (ROS)** açığa çıkmasına ve sperme zarar vermesine neden olacaktır. WHO'nun 1999 yılındaki son düzeltmelerinde normal sperm sınır değerleri; sayı: $20 \times 10^6/\text{ml}$, motilite: %30, kesin kriterlere göre morfoloji: %15 olarak belirtilmiştir. Sperm hazırlama protokollerinin tümü bu normal değerler ve üstü için kullanılabilir. Ancak Yardımcı Üreme Teknikleri laboratuvarları için esas problem bu değerlerin altında olan vakalarda normal morfolojiye sahip motil spermlerin seçiminin sağlanmasıdır. Semen analizi sırasında sperm hücrelerinin görülmediği azospermik olgularda da testis dokusundan yapılan aspirasyonlar ya da biopsi materyalleri olan Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) laboratuvarında incelenir ve sperm hücreleri ayrıştırılarak inseminasyon ya da mikroenjeksiyon için hazırlanır. Yapılacak olan işleme, spermleri kalitesine göre yumurta hücreleriyle birlikte değerlendirdiğinde hekim kararı gerekir (10,24).

2.5.3. Ejekulattan Sperm Hazırlama Yöntemleri :

2.5.3.1. Yıkama

2.5.3.2. Yüzdürme

2.5.3.3. Gradient uygulamaları

Bu üç teknik bazı olgularda tek başlarına, bazı olgularda birlikte kullanılır ve başarılı sonuçlar alınır. Sperm hazırlama tekniklerinin belirlenmesi ml'deki sperm sayısı, % motilite, % normal morfoloji, motil spermin total sayısı ve sperm dışı hücreler gibi faktörlere bağlıdır.

2.5.3.1. Yıkama

Spermlerin mümkün olduğunca küçük hacimlerde toplanmasını sağlamak amacıyla 14 ml hacimli konik steril tüpler kullanılır. Ejakulat 1/ 2 hacim oranında kültür vasatı ile sulandırılır. 1000 rpm' de 5 dak santrifüj edildikten sonra, dipte kalan pelet bozulmayacak şekilde üstteki sıvı yavaşça pipetle alınır. Pelet üzerine 3 ml kültür vasatı konur ve pelet ile yavaşça karıştırılarak tekrar santrifüj edilir. Santrifüj sonrası üst kısım pipet ile atılır ve tüpün dibinde kalan pelet 0.5 ml kültür vasatı ile sulandırılır (25).

2.5.3.2. Yüzdürme

Swim-up yöntemi, yıkama ile elde edilen total motil sperm sayısının belirlenmesi ve tüm hücreler içerisinde inseminasyon ya da mikroenjeksiyon için gerekli olan: motil ve

morfolojik olarak normal spermlerin izole edilmesidir. İşlemde yıkama sonucu elde edilen örneğe kültür vasatı sızdırılarak iki ayrı katman elde edilmelidir. Alt ve üst katmanlar birbirine kesinlikle karışmamalıdır (10).

Örnekler kaplarından her örneğin numarasına göre numaralandırılmış 14 ml. hacimli konik dipli tüplere alınır, volümleri ölçülür ve kaydedilir. Üzerlerine volümün 2 katı kadar besiyeri eklenir. 1000 rpm’ de 5 dak. santrifüj edilir. Dibe çöken pelletin üzerindeki kültür vasatı, yavaşça pipet ile uzaklaştırılır. Her bir tüpe sabit olarak 2 ml besiyeri eklenir. Tüpler tekrar 1000 rpm’de 5 dak. santrifüje alınır. Üst faz, tüpleri fazla sarsmadan alınır. Her bir tüpte 0.5 ml kültür vasatı yavaş bir şekilde sızdırılır. İstenilen kalitedeki spermlerin yukarıya yüzebilmeleri için ortamın daha uygun olması açısından 45° eğim sağlanarak 37° C ‘de 1 saat inkübe edilir. 1 saat sonunda hareket yeteneği fazla olan spermler pipet ile üst kısımlardan çekilir ve maklerde sayım yapılır. Sonuç sperm sayısı x volüm olarak Swim-up sonucu kaydedilir (10).

Eğer örnek aynı gün herhangi bir işlem için kullanılacaksa % 5 CO₂ inkübatörde bir saat bekletilmelidir. Bir saat sonunda örneğin kullanılacak olan üst kısmı, alttaki pelete değmeden pipetle çekilir ve steril bir tüpe aktarım yapılır. Bu işlem sonrasında azospermi vakalarına pipetaj ve lam-lamel ile bakılarak dipte ve elde edilen yaymada sperm araması yapılır.

Yüzdürme protokollerinden bir diğeri de **swim-down**’dur. Konik tüpler içerisine konulan 1 ml. kültür vasatı üzerine semen örneği katmanlandırılıp inkübe edilir ve dipteki sıvının 3/4 ‘ ü alınarak sayım yapılır ve inseminasyon için kullanılır.

Total motil sperm sayısı çok düşük ve/veya morfolojinin % 5’in altında olduğu olgularda yüzdürme yöntemlerinin başarısı kısıtlıdır. Bu nedenle özellikle intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulanacak vakalarda yıkama sonrası elde edilen sperm hücrelerini içeren pelet 0.3 ml. kültür vasatı ile dilüe edildikten sonra ufak petri kaplarının ortasına yerleştirilir. Kenarlara koyulacak 20 ml. temiz kültür sıvılarından uzantılar hazırlanır ve kültür kabı parafin yağı ile kapatılarak % 5’lik CO₂ inkübatörüne yerleştirilir. 1 saatlik inkübasyon sonrasında temiz sıvılara doğru yüzen spermler, ince çekilmiş pasteur pipeti ya da ICSI pipetleri ile toplanarak inseminasyon için kullanılır (10).

2.5.3.3. Gradient uygulamaları

En sık kullanılan yöntemdir. Teknik kısaca; Percoll, albumin, Nycodenz, Ficoll ve sükröz polimerleri gibi malzemelerle gradientler oluşturup sperm hücrelerinin santrifüj yardımı ile sıvı kolonlardan süzdürülmesidir (26).

Kollodial silika partikülleri içeren solüsyonlar kullanılarak uygulanan bir yöntemdir. Sperm hücreleri santrifüj ile bu sıvılar içerisinde süzdürülür. Gradient uygulamalarında iki katman kullanılır. Bu uygulamada fonksiyonel olan spermler daha yoğun yapıya sahip olduklarından dibе çökeceklerdir dolayısıyla alt katmanın konsantrasyonu yüksek tutulmalıdır. Uygulamalarda genellikle % 90 gradient konsantrasyonu tercih edilir. Steril 14 ml konik dipli tüpe yüksek konsantrasyonda 1 ml solüsyon koyulur. Üzerine yine aynı miktarda fakat daha az konsantrasyonda solüsyon tüp kenarından yavaşça aktararak eklenir ve tabakalar oluşturulur. En fazla 2 ml olmak üzere semen eklenerek 20 dakika santrifüj edilir. Üst faz alınır, bu esnada dipteki pelete dokunmamaya dikkat edilmelidir. Dipte kalan semen 3 ml. besi vasatı ile yıkanır. Yıkamadaki amaç; silika partiküllerinin uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Bu işlemlerde plazma volümünün uterusu verilebilecek miktara kadar azaltılması sağlanır (10).

2.5.4. Testiküler Dokudan Sperm İzolasyonu

Erkek infertilitesinde zor vakalar azospermilerdir. Bu vakalarda sperm elde etmek için *testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE)*, *epididimal sperm aspirasyonu (MESA)* , gibi cerrahi yöntemler uygulanır.

Alınan materyaller içerisinde uygulamada sperm elde etmek için parçaların dikkatli bir şekilde diseksiyonu ve canlı spermlerin ayrıştırılması gerekmektedir. MESA’da spermler epididimal sıvı içerisinde olduklarından TESE’deki gibi ayrıştırmaya gerek kalmaz (27).

2.5.5. Retrograd Ejakulasyon

Ejakülasyona ait duyuların olmasına rağmen ejakülasyonun gerçekleşmediği durumlarda ejakulat mesaneye boşalarak idrar ile karışır; bu nedenle bu olgularda tanı, mastürbasyonun hemen sonrasında alınacak idrar örneğinin değerlendirilmesi ile konur. İdrarın asit ortamı sperm canlılığını tehlike altına alır. Alkali ortamda canlı spermle değerlendirme yapılması gerektiğinden hastaya örnek vermeden daha bir gece önce 1 gr. sodyum bikarbonat verilir ve bunu test yapılmadan önce tekrarlaması sağlanmalıdır.

Böylece idrar asiditesi düşürülüp ejakülatın alkalen ortama geçmesi sağlanmış olur. Retrograd ejakülasyon örneklerinin çalışılmasındaki en önemli özellik; sperm hücrelerinin mümkün olan en kısa sürede motilite ve kapasitasyon özelliklerini kazanmaları için gereken uygun ortama geçişinin hızlı bir şekilde gerçekleştirilmesidir (28).

2.6. DNA Hasarı / Apoptoz

Apoptoz, programlı hücre ölümü, hücre intiharı ile eş anlamlı olup, Yunanca'da apo (ayrı) ve -ptosis (düşen) kelimelerinden (yaprak dökümü) oluşmuştur. Apoptoz, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynamaktadır. Hücrenin yaşam döngüsü boyunca yapım ve yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar (29).

Apoptoz ilk olarak 1842 yılında **VOGT** tarafından hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak tanımlanmıştır ve ardından 1972 yılında **KERR ve arkadaşları** tarafından kullanılmıştır (28). Genetik ve moleküler mekanizmaları 1980'lerin sonunda bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'da tam olarak çıkarılmıştır (4).

Apoptozun Başlıca Aşamaları Şunlardır:

- Apoptozun indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom c'nin salıverilmesi
- Apoptozom oluşumu (sitokrom c + Apaf-1 + kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyelin değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüzüne transloke olması
- DNAaz'ın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internükleozomal DNA fragmentasyonu)
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi (29).

2.6.1. Apoptozda Morfoloji

Ana morfolojik olay, **çekirdek kondansasyonu** ve daha sonra DNA fragmentasyonu olarak isimlendirilen **parçalara ayrılmasıdır**. Kromatin, normalde daha diffüz görünümündedir. Apoptozda kromatin çekirdek zarı altında ay şeklinde kresentrik görünüm oluşturur. Apoptoz tek bir hücrenin, büzüşmesi ve çevre hücrelerle olan bağlantılarını kaybetmesi ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni, hücre zarında bulunan Na, K, Cl iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulması sonucunda, hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır (30). Hücreler mikrovillus gibi özelleşmiş yüzey farklanmalarını kaybeder ve bir kaç dakikada hacimlerinin üçte birini kaybederler. Apoptotik hücreler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler etrafında açık bir parlama şekli izlenmektedir (29).

Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, hücre zarındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre zarının iç tabakasında olan **fosfatidil serin**, *aminofosfolipid transferaz* enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (29).

Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle hücre zarının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapı 'zeiosis' olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (30).

Fleuresan boyamada DNA parçacıklar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180-200 bp büyüklüğünde parçalara ayrılması olup **DNA fragmentasyonu** apoptozun en önemli işaretidir. İmmun elektroforez yapıldığında '**ladder pattern**' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılırken, apoptozda yaklaşık 300000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (29).

2.6.2. Apoptozu Saptama Yöntemleri

Apoptoz biyokimyasal, histokimyasal, immunohistokimyasal, morfolojik ve ultrastrüktürel incelemeler ile saptanabilir. Bunlar:

1. Sitoplazmik değişikliklerinin saptanması (kaspaz aktivitesinin, hücreye kalsiyum akışının veya mitokondri disfonksiyonunun ölçülmesi),
2. Membran değişikliklerinin saptanması (membran geçirgenliğinin değişmesi),
3. Apoptozda görevli çeşitli proteinlerin kanda veya dokuda düzeyinin ölçülmesi (Bcl2 / Bax oranı)
4. DNA parçalanmasının çeşitli özel immünohistokimyasal boyalarla saptanması
5. Işık ve elektron mikroskop altında morfolojik olarak değerlendirmeler ile apoptoz saptanabilir.

Bütün bu yöntemler içinde en sık kullanılan yöntemler, DNA'daki değişikliklere dayalı olan; **DNA agaroz jel elektroforezi** ve **TUNEL (Terminal Deoxytransferase Mediated bio-dUTP Nick End Labeling)** boyası ile formalinde fikse edilmiş materyalde yapılan mikroskopik incelemelerdir. Son dönemde kullanılan önemli ve güvenilir bir başka metot ise Annexin-V boyası uygulaması ve ELISA' dır (29).

2.6.3. Apoptoz Mekanizmaları

Hücresinin kendi biyolojik saatini belirleyen genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptoz primer ya da sekonder olarak başlamaktadır (31).

2.6.3.1. Apoptozun Hücre Dışı Uyaranları:

- Tümör nekroz faktörü (TNF)
- Nöron büyüme faktörü (NGF)
- İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)
- IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması
- Radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler olabilir.

Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen **Fas/FasL, sFas proteinleri**, virüsler hücreyi apoptoza götürmektedir. Virüs örneğinde HIV gp120 proteini ve influenza virüsü: TNF reseptörü üzerinden, adenovirüs de hücre genetik yapısını bozarak apoptosis yapar. Sitoplazmik Ca^{+2} miktarında hafif artış **c-fas, c-myc, sıcak şok proteini (Heat shock protein, HSP)** gibi yeni mRNA basamaklarını harekete geçirir.

Ayrıca, apoptozda etkili **endonükleaz, transglutaminaz** gibi enzimleri de aktive eder. Bunlar da kromatinde parçalanmaya, hücre iskeletinde ve sitoplazmik proteinlerde değişikliklere neden olur (29).

2.6.3.2. Apoptozun Hücre İçi Uyarıları :

Büyüme faktörleri, onkogenler ve tümör supressör genlerdir.

2.6.4. Apoptoz Süreci

DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre zarı tarafından Fas ligandı aracılığı ile ölüm sinyallerinin alınması ve granzim denen hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi olmak üzere 3 farklı şekilde gelişebilir. Bu süreçte belli başlı 3 anahtar bileşen rol oynamaktadır. Bunlar; **B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinleri, proteolitik enzimler olarak kaspazlar ve Apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1)** proteinidir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı parçalanması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (32).

Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda **kaspazlara bağlanıp** onları aktive ederler ve kaspazlar aktive olan DNAaz aracılığı ile DNA yıkımına neden olurlar.

Apoptozun Düzenlenmesi

Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları antiapoptotik denen apoptoz inhibitörüdür, bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır (33). Apoptotik sinyalin alınmasından sonra proapoptotik olan Bax proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve Apoptosis Inducing Factor (AIF) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanan çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptozom' olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (29).

2.6.4.1. Kaspazlar ve Apoptoz

Apoptoz sırasında kromozomal DNA, genelde nükleozomlar tarafından kesilerek parçalara ayrılır. Kromatin yoğunlaşır ve çekirdek küçük parçalara bölünür.

Son olarak, hücre büzülür ve apoptotik cisimler olarak tanımlanan zarla çevrili parçalara ayrılır. Apoptotik parçalar hem makrofajlar hem de komşu hücreler tarafından kolayca tanınır ve fagosit edilir. Memelilerde apoptoz çok çeşitli uyaranlar tarafından indüklenmektedir ve tanımlanan genler korunumlu efektör ve düzenleyicilerini temsil eden proteinleri kodladıkları bulunmuştur (34).

Bir düzineden fazla proteazı içeren, aktif bölgelerinde sistein (Cys) içerdiği ve substratı olan proteinleri aspartik asitten (Asp) sonra kestiği için **kaspazlar** olarak bilinen aile, apoptozda önemli rol oynamaktadır. Kaspazlar programlı hücre ölümünün en son efektörleridir. Kaspazların ana hedefleri arasında bir DNAaz inhibitörü yer alır ve aktive edildiği zaman DNA'nın parçalanmasından sorumludur. Ek olarak nükleer laminleri keserek, çekirdeğin parçalanmasına yol açar ve hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre iskeletinin bozulmasına, hücre zarının tomurcuklanmasına ve hücre parçalanmasına neden olur (29).

Kaspazlar, inaktif öncüller olarak sentezlenir ve genellikle diğer kaspazlar tarafından katalizlenen proteolitik kesim ile aktif şekle dönüşür. Başlatıcı kaspazın aktivasyonu böylece aşağı yöndeki diğer prokaspaz aktivasyonunu ve hücre ölümünü sağlayan bir zincirleme reaksiyonu başlatır. Bu nedenle kaspazların düzenlenmesi hücre sağ kalımının belirlenmesi için yaşamsaldır. Apaf-1 kaspazlara bağlanır ve onların aktivasyonunu uyarır. **Bcl-2** ailesi olarak adlandırılan bir protein kodlanır. *Bcl-2* ailesinin bazı üyeleri, *Bcl-2*'de dahil, kaspaz aktivasyonu ve programlanmış hücre ölümü inhibitörleri olarak işlev görürler. *Bcl-2* ailesinin diğer üyeleri kaspaz aktivasyonunu uyarır ve programlanmış hücre ölümünü başlatır. Kaspazlarda **apoptoz protein inhibitörleri (IAP)** denilen, apoptozu baskılayan bir protein ailesi tarafından düzenlenir (34).

Apoptozu Başlatanlar; C-2, C-8, C-9, C-10 iken

Apoptozu Yürütenler; C-3, C-6, C-7 'dir.

Sitokin Aktivasyonu Yapanlar; C-1, İnterleukin-1 beta converting enzim (ICE), C-4, C-14, C-5, C-11, C-12'dir.

Başlatıcı kaspazlardan birisi **kaspaz-9** aktive edilir. **Apaf-1** ile kompleks oluşturur. Bu kompleksin oluşumu, apoptozu tetikleyen uyarılar ile mitokondriden salınan **sitokrom c**'ye ihtiyaç duyar.

Hücre sağ kalımının normal koşulları altında, sitokrom c mitokondri zarları arasında boşlukta yerleşmiş iken **apaf-1** ve **kaspaz-9** sitozolde bulunur, böylece **kaspaz-9** inaktif kalır. **Bax proteinleri** sitoplazmada bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının '*permeabilite geçiş poru*'na doğru yönlendirilir ve buraya bağlanırlar. Ancak hücre ölümünü tetikleyen DNA hasarı, büyüme faktörü yoksunluğu gibi birçok uyarı, mitokondride hasara yol açar ve **sitokrom c** ve **AIF (Apoptosis Inducing Factor)**, sitozole salınır. AIF doğrudan kromatin yoğunlaşmasının ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki **sitokrom c** apoptozun en son basamağında görev alır. **Sitokrom c** bir sitoplazma proteini olan **Apaf-1**'e bağlanması **kaspaz-9**'u aktive eder ve oluşan bu kompleks '**apoptozom**' olarak isimlendirilir. Aktif kaspaz-9 efektör kaspazlardan **kaspaz-3**'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (**ICAD**) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (**CAD**) serbestleşir ve bu da apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna neden olur (34).

Bcl-2 ailesi üyeleri programlanmış hücre ölümünün kontrolünde merkezi bir rol oynar. **Bcl-2 ailesi** üyeleri, mitokondri zarında, mitokondrinin bütünlüğünü ve sitokrom c salınımını düzenleyici rol oynarlar. **Bcl-2** ailesinin apoptozu baskılayan üyeleri sitokrom c salınımını engeller, buna karşı **Bcl-2** 'nin hücre ölümünü uyarıcı üyeleri, mitokondri hasarını, sitokrom c salınımını ve kaspaz aktivasyonunu uyararak etki gösterirler. Mitokondri hasarı yalnızca sitokrom c'nin değil, apoptozu uyarıcı diğer moleküllerin de salınımı ile sonuçlanabilir. Bu moleküller **second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/Diablo)** denilen Apoptoz Protein İnhibitörleri IAP'lerin etkisini engelleyerek, kaspaz aktivitesini uyarıcı bir proteini içerir.

2.6.4.2. Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspaz Aktivasyonu

TNF reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri **ölüm alanı** adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve **adaptör proteinlere** bağlanırlar. Ölüm reseptörleri; Fas (APO-1/CD95), TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) –R1, TRAIL-R2, TNF-R1, Death Receptor-3 (DR)3, DR6'dır. Aktive edilmiş reseptörler tarafından salgılanan, hedef hücrelerde apoptozu direk olarak uyaran bazı polipeptitler, programlanmış hücre ölümü sinyalleridir. Bu hücre ölüm sinyalleri **TNF reseptör ailesine** üye olan polipeptitlerdir. Bunlar TNF reseptör ailesi üyelerine bağlanırlar ve çok çeşitli hücre tiplerinde apoptozu uyarabilirler.

Bu ailenin en iyi tanımlanmış üyelerinden birisi, bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden, **Fas (APO-1/ CD95)** denilen hücre yüzey reseptörüdür. Bir ligand, **Fas ligandı**, **Fas reseptörüne** bağlanarak kaspaz -8 ile apoptozu başlatır. Fas üç polipeptit zinciri içerir. Kaspaz-8 adaptör molekülleri aracılığıyla reseptöre bağlanır ve otokesimini aktive eder. Bu da aşağı yöndeki kaspazların aktivasyonuna yol açar. Sonuçta da hücre ölümünün gerçekleşeceği bir kaspaz yolağı başlar.

Kaspazlar **poli-ADP-riboz polimeraz (PARP)** ve **DNA protein kinaz** denilen iki DNA tamir enzimini yıkar ve kromatinde sınırlanamayan kırılmalar görülür. Ek olarak Kaspaz 8 diğer kaspazları kesmekle kalmaz, *Bcl-2* ailesinin **Bax** denilen bir üyesini de keser. **Bax**, *Bcl-2* ailesinin apoptozu uyaran bir üyesidir. Normalde, sitozolde inaktive durumdadır. Ancak, kaspaz-8 tarafından kesimi *Bax*'ın, mitokondriye geçişine ve zarı parçalayarak sitozole sitokrom c salınmasına olanak sağlar. Bu kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar ve sonunda hücre ölür (34).

2.6.5. DNA Hasarına Genlerin Yanıtı

İnsanda apoptozun düzenlenmesi, **p53** ile başlayan ve **kaspazlara** kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpressör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptozu yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir. p53 apoptozisi indüklemesi ile

Bax'ın ekspresyonunun artırması ve böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Papillom virüsü ve adenovirüs tip 12 gibi bazı virüsler ya p53'ü inaktive ederek ya da Bax'a bağlanarak apoptozu bloke ederler, böylece bu virüsler karsinogeneze bu yolla katkıda bulunurlar. Apoptozu Baskılayan genler: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, A1, Nr-13, Ced-9 iken apoptozu indükleyen genler ise; Bax, Bak, Bok, Bcl-xs, Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa'dır (34).

2.6.6. Apoptozun İndüklenmesi

Apoptoz, çeşitli faktörlerin uyarılması yoluyla indüklenmektedir. *Bunlar:*

Apoptoz klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile uyarılmaları sonucu başladığı gibi, genotoksik ajanların etkisiyle oluşan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozu başlatır (29).

p53, Bax'ın indüksiyonu dışında ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozu başlatabilir.

Apoptoz, reaktif oksijen radikallerinin hem mitokondri, hem hücre zarı, hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak ve büyüme faktörlerinin ortamdan eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütölen hücreler eğer serum açlığına maruz bırakılırlarsa apoptoz nedeniyle öölürler.

Bir proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenememesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi yoluyla da gerçekleşir.

Apoptozu başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen granzim B'lerin hedef hücrede kaspaz sistemini aktifleştirmesidir (34).

2.6.7. Sperm DNA Hasarı

2.6.7.1. Sperm DNA Fragmentasyonunun Mekanizması

Spermdeki DNA hasarı hem mitokondriyal, hem de nükleer DNA'yı etkileyebilmektedir. Bu, sperm hücrelerinin taşınımı ya da üretim sürecinde meydana gelir ve spermatogenez süreci boyunca apoptoz gözlenir.

Spermatogenez sürecinde sperm kromatinin yeniden biçimlendirilmesi sırasında DNA zincir kırıkları üretilir. Post-testiküler DNA fragmentasyonu çoğunlukla, seminifer tübüller ve epidimis aracılığıyla sperm taşınımı sırasında hidroksil radikali ve nitrik oksit içeren oksijen radikalleri tarafından; endojen kaspazlar ve endonükleazlar tarafından; çevresel toksik maddeler, radyoterapi ve kemoterapi tarafından indüklenebilmektedir.

Bu altı mekanizmadan sperm DNA fragmentasyonu için esas rol oynayan birisi, spermilerin epididimise taşınması sırasındaki post-testiküler hasardır. DNA fragmentasyonu, testiküler spermier ile karşılaştırıldığında kaudal epididim ve ejakülasyon spermierinde daha yüksektir (35).

2.6.7.2. İnsan Sperminde DNA Paketlenmesi

Olgun sperm oluşumu; mitoz bölünme, mayoz bölünme, sitoplazmik değişimler, topolojik düzenlenme, transkripsiyon değişiklikleri, histonların geçiş proteinleri ile yer değişimi ve son olarak protaminlerin ilavesi ile oldukça yoğun, çözünmeyen ve stabil kromatin serilerinin oluşumunu içermektedir. Sperm kromatini bu haliyle, erkek ve dişi üreme sistemleri arasında paternal genomun transportu sırasında genetik bütünlüğünü korur (36).

Hücre çekirdeğindeki proteinler, asidik özellikte "histon olmayan" ve bazik özellikte "histon" tipi proteinlerdir. **Histon tipi proteinler**, çoğunlukla ökaryotik hücrelerde bulunan, küçük moleköl ağırlıklı proteinlerdir. Lizin ve arginin içeriklerine göre, H1 (H5), H2A, H2B, H3, H4 ve arkeal histonlar olmak üzere 6 tiptir (37).

Spermatogenez ve spermiyogenez sırasında kromozomal proteinler üzerinde yapılan çalışmalar, spermatosit ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde somatik histonların ve testise spesifik TH1 ve TH2B histonların bulunduğunu, ileri evre spermatidlerde geçiş proteinleri (TP) olan TP1 ve TP2 daha ileride ise artık protamin (P) P1 ve P2 proteinlerinin yer aldığını göstermiştir.

TP1 eksikliğinde sperm motilitesi bozulur ve fertilizasyon kapasiteleri azalır. Transition proteinlerinin spermiyogenezde önemleri büyüktür. Yapılan çalışmalar TP1 ve TP2 transition proteinlerinin DNA'nın bütünlüğünü koruyarak, protaminlerin kromatin üzerinde daha sağlam yerleşmelerini sağladığını ortaya çıkarmıştır (37).

Kromatin Kondansasyonu

Normal spermiyogenezde spermatidlerde histonların uzaklaştırılması sırasında, bir endonukleaz olan topoizomerez-II, DNA iplikçiklerinden birini keserek aradan bir parçayı çıkarır. TP1 bu araya girer ve DNA'nın fosfat gruplarıyla etkileşerek açıklığı doldurur. Bu sırada bir DNA ligaz enzimi de TP1'in iki ucunun orijinal DNA iplikçiğine bağlanmasını sağlar. Daha sonra ortama gelen protaminler de TP1 üzerine tutunurlar. Yan yana gelen kromatinler üzerindeki protaminler arasında disülfid bağları oluşarak, kromatin iplikçiklerinin birbirlerine yaklaşmasını ve neticede kondansasyonu gerçekleştirirler (37).

Protaminler; P1, sperm DNA'sına bağlı protaminlerin başlıca komponentidir. P2, sistein rezidülerinden yoksundur ve TP, histonların yerini almasından önce spermatidlerde eksprese edilir. TP'ler histon yer değişim sürecinde aracı rol oynarlar.

İnsan sperm kromatini % 15 histon içerir. Nükleoproteinler ise daha az kompakt nükleozom yapısına neden olur. Sperm kromatinindeki histonlar, somatik kromatindeki histonların alt gruplarıdır ve spermdeki nükleozomlar somatik hücrelerde bulunanlardan daha sıkı paketlenmiştir (37).

Spermelerde; Histon H1 bulunmaz, H2 iki minör varyant form içerir; H2A.X ve H2A.Z. H3 ve H4 büyük ölçüde asetillenmiştir. Histon H1'in bulunmaması ve histonların asetilasyonu aktif kromatinin belirteçidir. Spermdeki histonlar; erken gelişim sırasında aktive olmuş gen takımlarını belirtir. Bu nedenle histonlar fertilizasyondan sonra ilk transkripsiyonal genleri etkiler

Spermatogenez ve epididimal geçiş sırasında nükleer histonlar arjinin /sisteince zengin protaminler tarafından yer değiştirilir. Sistein rezidülerinin thiol (-SH) grupları, sperm DNA'nın stabilitesi ve kompaktlığını sağlayan disülfid bağları tarafından oksitlenir. Protaminler ayrıca başarılı bir fertilizasyon için gereklidir. Protamin seviyesindeki herhangi bir anormallik sperm DNA'da hasara ve fertilizasyonun etkilenmesine neden olur (37).

2.6.8. Sperm Kromatin Hasarının Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Sperm kromatin yoğunlaşması, spermatogoniadan, olgun sperm oluşmasına kadar geçen spermatogenezde, çoğalma ve hücre farklılaşmalarının olduğu kompleks ve dinamik bir süreçte meydana gelmektedir (38). Spermatogenez, mitoz bölünme, mayoz bölünme, sitoplazmik yapıdaki değişiklikler, yuvarlak spermatidlerde haploid geçiş proteinleri ile somatik histonların yer değişimi ve takiben geçiş proteinleri ile protaminlerin uzamış spermatidde yer değişimi olaylarını içermektedir. Pozitif yüklü protamin ve negatif yüklü DNA iskeleti arasında, moleküller arası kuvvetli etkileşim DNA'nın bazik karakterli protamine bağlanmasını kolaylaştırarak kromatin yoğunlaşmasına neden olur (39).

Normal spermatogenezin gelişimi ve kontrolü için programlanmış hücre ölümü gereklidir. Ancak ağır testiküler germ hücre apoptozu, yardımla üreme tekniklerinden elde edilecek başarıyı düşürmektedir. Hasarlı spermlerin apoptozun göstergesi olduğu bilinmektedir. Anormal kromatin organizasyonu infertil erkeklerde, fertil erkeklere göre daha sık görülmektedir (38). Sperm kromatin hasarının oluşmasını sağlayan üç mekanizma olduğu düşünülmektedir:

1. Spermatogenez süresince oluşan defektif kromatin yoğunlaşması, yani protamin gen kompleksindeki değişiklikler,
2. Artan apoptoz,
3. Reaktif oksijen türleri

Sperm kromatin hasarının belirlenmesinde DNA kromatin olgunlaşmasına / DNA bütünlüğüne bakılmaktadır (39). Bu işlem için geliştirilmiş olan testlerin temelini kromatin yapısındaki defektlerin DNA yapısındaki kararlılığı arttırarak bozmasına ve denatürasyona yol açan strese olan duyarlılığın artmasına sebep olmaktadır. İnfertil erkeklerde sperm anormalileri, kötü paketlenen DNA, artan DNA zincir kırıkları ve asitle indüklenen DNA denatürasyonuna olan duyarlılık fertil erkeklerin spermlerinden daha fazladır.

İnsan spermlerinde DNA defektlerini belirlemek için birçok teknik geliştirilmiştir. Sperm kromatin paketlenmesindeki defektleri saptamak için; anilin blue, toluidin blue ile chromomycin A3 kullanılır. Sperm DNA'nın sağlamlığı; TUNEL, COMET, AOT, ISNT ya da SCSA teknikleri ile değerlendirilir (37).

2.6.8.1. COMET Analizi (COMET Assay)

Sperm DNA analizinde kullanılan en yeni tekniklerden biri COMET analiz yöntemidir (40). **Tek hücre jel elektroforezi olan** Comet analizi, tek ve çift zincirdeki hasarın belirlenmesinde kullanılan elektroforetik bir testtir (38). Fragmente olmuş DNA içeren hücrenin kuyruklu yıldıza benzer görünümü; bu tekniğe “COMET” adının verilmesine neden olmuştur (40). Ostling ve Johanson tarafından radyasyonla indüklenen sağlam hücrelerde oluşan DNA kırıklarını değerlendirmek için geliştirilmiştir (41). Bu teknikte; tek tek hücrelerin yanıtları ölçülür. Sperm DNA’ya bağlanan boya ile boyanır ve ortaya Comet yani kuyruklu yıldız çıkar.

Comet’in yorumlanmasında nükleus çapı ve kuyruk uzunluğu esastır. Çift DNA zincirindeki kırıklar Comet’in baş kısmında yoğunlaşırken, çift ve tek DNA zincirindeki kırıklar Comet’in kuyruğunda yoğunlaşarak uzama gösterir (42).

Hücre topluluğu içindeki heterojeniteyi çalışmaya olanak tanır ki, bu diğer tekniklerle mümkün değildir. Bu yöntemin kısıtlayıcı tarafı ise analizde RNA’nın oluşturduğu zeminden dolayı DNA hasarının fazla değerlendirilmesi ya da elektroforez sırasında fragmanların akımını engelleyen proteinler yüzünden az algılanabilmesidir (37). Comet pahalı olmamasına karşın, hassas ve DNA hasarı belirlenmesinde güvenilirliği olan bir yöntemdir. Bazı çalışmalara göre sperm DNA kırıklarının incelenmesinde **Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)** ve TUNEL’e göre daha duyarlı bir analiz yöntemidir (38).

2.6.8.2. TUNEL Boyaması

TUNEL tekniği apoptotik olduğuna inanılan semendeki spermilerin tanımlanması için ilk defa Gorczya ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır (38). TUNEL, DNA kırık sayısındaki artışlar ile sinyal oluşturmak için tek ve çift iplik kırıklarında biotinlenmiş deoxy uridin trifosfat (dUTP)’i 3’OH ile birleştirir (37). DNA kırıklarının 3’-OH ucu reaksiyonunu katalizleyen rekombinant terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) enzimi bağlanarak işaretlenir ve tek ve çift DNA zincir kırıkları bu kısma dUTP bağlanarak biotinlenir. Biotinlenmiş DNA streptavidin ile birleşerek suda çözünmeyen renkli bir ürün ortaya çıkarır (43). TUNEL yöntemi COMET analizinden farklı olarak aynı anda *tek ve çift iplik kırıkları* belirler ki, her iki tip iplik kırılmalarını çalışmak için farklı protokol gerekir. Bu yöntemin kısıtlamaları ise; hücrelerdeki DNA hasarının

düzeyi belirlenemez sadece topluluktaki DNA hasarlı hücrelerin sayısını ortaya çıkarır. Analizden sonra, DNA hasarlı olanlar boyalı hücreler ve DNA hasarı olmayanlar boyasız hücrelerin ışık mikroskobu ile incelenmesini gerektirir. Art alan boyanması analizin etkinliğini azaltmaktadır (37).

TUNEL sonuçları ile IVF sonuçları arasında korelasyon bulunmuştur. Bunun yanında TUNEL analizi ile sperm konsantrasyonu, motilitesi ve normal morfoloji yüzdesi arasında da yüksek olmamakla beraber korelasyon mevcuttur (38).

2.6.8.3. In Situ Nick Translation Assay (ISNT)

TUNEL'in modifiye formudur. Bu analiz, DNA polimeraz 1 enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonda Single-stranded DNA'ya (ssDNA) dUTP eklenmesidir. TUNEL'den farklı olarak TdT kullanılmaz. ISNT yalnızca tek iplik kırıklarını belirlemede kullanılır. Bu yöntemin avantajı; endojen DNA hasarının kayda değer seviyelerinin ve çelişkili spermlerin saptanmasını sağlamak iken, kısıtlayıcı tarafı diğer analizlerle kıyaslandığında duyarlılıktan yoksun olmasıdır (37).

Klinik olarak kullanımı kısıtlıdır ve in vitro fertilizasyon sonuçları ile ISNT sonuçları arasında korelasyon bulunmamaktadır. ISNT yöntemi ile yapılan nükleer bütünlük değerlendirmesindeki sonuçlar ile sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi arasında net bir ilişki olduğu görülmüştür (38).

2.6.8.4. Sperm Kromatin Yapı Analizi

SCSA, akış sitometrik bir yöntemdir. Normal sperm kromatini denaturasyon induksiyonuna oldukça duyarlıdır . Isı ya da asit muamelesi sonrasında denatüre olan DNA, metakromik bir boya olan Acridin orange ile çift zincirli DNA şelat oluşturarak yeşil floresan (normal DNA-Acridine orange, dsDNA) yerine tek zincirli DNA kırmızı floresan (hasarlı DNA- Acridine orange, ssDNA) vermektedir. Yöntemin basit ve insan sperm analizleri için az zaman harcanması avantajı iken, spermlerdeki DNA hasarının boyutu hakkında fazla bilgi vermemesi kısıtlayıcı tarafıdır (37,38).

2.6.8.5. Acridine Orange Test (AOT)

SCSA'nın basitleştirilmiş mikroskobik metodudur. Akış sitometri gerektirmez ve spermlerin görsel canlandırmalarına güvenilir. Önceden işleme alınmış sperm örnekleri Acridine orange ile boyanır, yıkanır ve lamel ile kapatılır. Floresan mikroskop altında dsDNA'lı spermler yeşil parlarken ssDNA'lı spermler ise kırmızı parlamaktadır.

Pahalı olmayan ve iyi yetişmiş bir teknisyene gerek olmayan bir yöntemdir. Yöntemin kısıtlayıcı tarafları; Acridine orange boyaması sonrası spermatozoanın yorumlanması ve mikroskopik incelenmesi sırasında renklerin çabuk solması, floresan parlaklığını çabucak yitirmesi ve heterojen boyanmalarda yorumlamanın zorluğudur (37,38).

Bazı laboratuvarlar AO testini erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde kullanmaktaysa da, elde edilen sonuçlar tartışmalıdır. Buna rağmen bu yöntemin klinik önemi AO test ile TUNEL sonuçları arasında pozitif bir korelasyon olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca sperm motilitesi ve AO testi arasında negatif bir korelasyon da vardır (42).

2.6.8.6. Sperm Kromatin Dağılımı (Sperm Chromatin Dispersion - SCD)

Son zamanlarda tanımlanan bu yöntem, DNA fragmentasyonu için basit ve pahalı olmayan bir tekniktir. Testin temeli, kırıklı DNA'ya sahip spermilerin asit denatürasyonu sonrası ve nükleer proteinlerin açığa çıkmasını takiben aköz agarozda karakteristik bir halo vermesidir (42). Oluşan bu halonun küçüklüğü veya yokluğu yoğun DNA fragmentasyonunu göstermektedir.

3. MATERYAL VE METOD

Çalışma, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Araştırma Etik Kurulu'nun 28.09.2009 tarihli 09-7.1/114 nolu karar onayı ile yapılmıştır. Çalışma için gerekli kimyasal ve histokimyasal sarf malzemeleri Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) SAĞBE / 084 nolu proje kapsamında sağlanmıştır.

Çalışmada, Ege Üniversitesi Aile Planlaması Kısırlık (İnfertilite) Araştırma ve Uygulama Merkezi Androloji Laboratuvarına başvuran ve çalışma için gönüllü olan hastalardan elde edilen sperm yayma preparatlarında indirek immunohistokimya ve TUNEL yöntemi ile skorelama yapılarak, hastaların klinik bulguları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirme yapılmıştır.

Ege Üniversitesi Aile Planlaması Kısırlık (İnfertilite) Araştırma ve Uygulama Merkezi Androloji Laboratuvarına başvuran ve semen örnekleri veren 100 gönüllü erkek hastaya çalışmamız hakkında detaylı bilgiler açıklandıktan sonra bilgilendirilmiş gönüllü olur formları imzalatılmıştır. Örnek bilgilendirilmiş gönüllü formu **Tablo I**'de gösterilmiştir. Hastalardan yaş, özgeçmiş ve soygeçmiş özellikleri, sigara ve alkol kullanımları, geçirmiş oldukları hastalıklar ve operasyonlar ile ilişkili detaylı anamnez alınmıştır. Hastaların sigara kullanımları haftada paket sayısı olarak ve ayda tükettiği standart içki birimi 360 ml bira, 120 ml şarap, 30 ml rakı = 1 ünite olarak hesaplanmıştır. Örnek anamnez formu **Tablo II**'de gösterilmiştir.

Hastalardan 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında alınan semen örnekleri Makler sayım kamerası ile sperm sayısı, sperm hareketliliği, lökosit sayısı, ve swim-up sonuçları değerlendirilmiştir. Bu örneklerden hazırlanan yayma preparatları Diff Quick boyası ile boyanarak morfolojik olarak Kruger kesin kriterlerine göre değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular **Tablo III**'de gösterilen örnek spermiyogram formuna kaydedilmiştir. Hasta örneklerinin immunohistokimyasal olarak primer antikolar ile değerlendirilmesinden elde edilen H-Score sonuçları **Tablo IV**'de gösterilen formlara kaydedildikten sonra değerlendirme yapılmıştır.

TABLO I. ÖRNEK BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı: İmmunohistokimyasal olarak DNA fragmentasyonu ve Glycodelin dağılımının Sperm morfolojisi ve Hasta kliniği ile ilişkisi”

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Kısırlığın erkek faktörü ile ilişkili bir çalışma yapmaktayız. Araştırmanın ismi 'İmmunohistokimyasal olarak DNA fragmentasyonu ve Glycodelin dağılımının sperm morfolojisi ve hasta kliniği ile ilişkisi''dir. Ege Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi Androloji polikliniğine başvuran hastaların spermiyogram örneklerinde, spermin hücre yapısını oluşturan çekirdek bozulması ve hücre membran proteinlerinin dağılımı ile hasta kliniği arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmaktadır.

Spermiyogram örneklerinde DNA fragmentasyonunu belirtmek için TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick –End Labeling) yöntemi kullanılacaktır. Ayrıca apoptotik süreçte rol oynayan p53, Bcl-X, Fas ve glycodelin S immunohistokimyasal değişikliklerin hasta kliniği ile ilişkisi incelenecektir. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Bu çalışmaya dahil edilebilmeniz için Ekim 2009 ve Ekim 2010 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Aile Planlaması Kısırlık (İnfertilite) Araştırma ve Uygulama Merkezi Androloji Polikliniğine spermiyogram analizi için başvuru yapmış olmanız gerekir. Kendinizde bir şikayet olmasa bile katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir. Araştırmaya katılacak gönüllü sayısı 100 'dür.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Tüp Bebek Merkezine başvuru yapan ve bu işlem için semen örneği veren hastalardan, kullanılan materyal dışında kalan, atılacak olan semen örnekleri çalışmada kullanılacaktır. Sizin için gerekli olan tüm değerlendirmeler bittikten sonra artan semen örneklerinden yapılacak yayma preparatları incelemeye alınacaktır. İnceleme sperm yüzeyinde bulunan protein yapıdaki antijenik yapıların uygun incelemelerden geçirildikten sonra ışık mikroskopla incelenmesi ile yapılacaktır. Bu örneklerden yapılacak incelemede elde edilecek sonuçlar hastaların neden bebek sahibi olamamalarına erkek yönünden moleküler düzeyde bir açıklama sağlamış olacak ve ileride ilgili diğer araştırmaların yapılmasına yol açacaktır.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Araştırma ile ilgili olarak üstlenilmesi gereken ek bir sorumluluk bulunmamaktadır. 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında normal spermiyogram örneği verilmesi dışında bir ilaç kullanımı gerekli değildir. Sperm örneği verilmesi sırasında su, sabun ve kayganlaştırıcı madde kullanmadan, verilen steril kaba semenin tamamının aktarılması çalışma için uygundur. İlaç kullanımı halinde hekimin bilgilendirilmesi gereklidir. Bu koşullara uymadığınız durumlarda uygulama dışı bırakabilirsiniz.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı Androloji Polikliniğine spermiyogram yaptırmak üzere başvuran 100 erkek hastadır.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 12 aydır.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu araştırmada sizin için beklenen yararlar aynı zamanda bu konuda tüp bebek merkezine başvuran diğer hastaların da yararına olacaktır. Bebek sahibi olmak için tetkikler yaptıran hastalarda erkeğe ait kısırlık nedenlerinin araştırılması önemlidir. Bu çalışma ile sperm örneklerinde yüzey antijenleri araştırılacak olup, bu antijenlerin fazla ya da az olmasının yaratacağı problemler tartışılacaktır. Sperm yaymalarının moleküler düzeyde araştırılması ile elde edilecek bilgiler bu güne kadar aydınlatılmamış bir bozukluğu gösterebilir. Bu da size ve benzer durumdaki diğer hastalara tıbbi yarar sağlayabilir. Bu antijenlerin ortama eklenmesi yada azaltılmasına yönelik yapılacak ilaç uygulamaları ile tıbbi yardımlar girişimsel tedavi gerekmeden kısa, zahmetsiz olarak sorunun çözülmesini sağlayabilecektir. **İmmunohistokimyasal olarak DNA fragmentasyonu ve Glycodelin dağılımının sperm morfolojisi ve hasta kliniği ile ilişkisi**”Bu tıbbi yarar kısa sürede kullanılamasa bile uzun dönemde bu tip araştırmaların artmasıyla tedavi için insanlık yararına kullanılmasında fayda sağlayacağı bir gerçektir

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Size bu araştırmada Tüp Bebek Merkezinde Androloji Polikliniğinde her zaman uygulanan işlemler uygulanacaktır. Bu uygulama ile ilgili gözlenebilecek istenmeyen etki bulunmamaktadır. İncelenmesi planlanan materyal hastadan alınan ve tüm işlemler bittikten sonra atılan semen örnekleridir. Bu araştırma ile ilgili hastaya yönelik herhangi bir girişim yapılmayacaktır. Çalışmanın neden olabileceği olası bir risk yoktur. Çalışma sonunda artan materyal çalışma dışındaki örneklerde uygulandığı gibi imha edilecektir.

HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?

Bu çalışmaya dahil olmak istememeniz, çıkmak istemeniz durumunda araştırmadan çıkarılabilirsiniz. İstenen semen örneğini uygun koşullarda vermemeniz durumunda, çalışma programını aksatmanız, veya bir yan etkiye maruz kalmanız vb. nedenlerle doktorunuz sizin izniniz olmadan sizi çalışmadan çıkarabilir.

DİĞER TEDAVİLER NELERDİR?

Bu çalışma için akut olarak uygulanabilecek herhangi bir tedavi bulunmamaktadır.

HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK/

SORUMLULUK KİMDEDİR VE NE YAPILACAKTIR?

Bu çalışmada hastaya ait zararlanma söz konusu değildir. Hastanın Tüp Bebek uygulaması için verdiği semen örneklerinden uygulama bittikten sonra atılacak olan materyal üzerinde çalışıldığı için hastaya zarar gelmeyecektir. Bu konuda herhangi bir sorumluluk olduğunda sorumluluk örnekleri toplayan Doç. Dr. Seviç İnan’dadır. Hastaya bilgilendirme yapılacaktır.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Uygulama süresi boyunca, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için Tüp Bebek Merkezi Androloji polikliniğine başvurabilirsiniz. Bu konudaki herhangi bir sorun için araştırma için örnekleri toplayan ve immunohistokimyasal değerlendirmeyi yapacak olan **Doç. Dr. Sevinç İnan'ı (0532 6360392)** arayabilirsiniz.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Bu çalışma için laboratuvar işlemleri için gerekli kimyasal maddelerin alımı Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (CBÜ- BAP) Komisyonu tarafından desteklenecektir. Sizden tetkikler sonunda alınacak sperm örnekleri dışında hiçbir maddi beklenti bulunmamaktadır.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR ?

Çalışma için gerekli kimyasal malzemeler Celal Bayar Üniversiteleri Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında yüksek lisans tez projelerini destekleme kapsamında sağlanacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Elde edilecek sonuçlar bilimsel yarar için kullanılacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmacı, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız vb. nedenlerle isteğiniz dışında ancak bilginiz dahilinde sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda da sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmanın sonuçları sadece bilimsel amaçla kullanılacaktır, hasta kimliği gizli kalacaktır.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Form 11)

Araştırmanın Adı: İmmunohistokimyasal olarak DNA fragmentasyonu ve Glycodelin dağılımının Sperm morfolojisi ve Hasta kliniği ile ilişkisi”

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 3 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum. Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

AÇIKLAMALARI YAPAN ARAŞTIRICININ		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

RIZA ALMA İŞLEMİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

TABLO II. ÖRNEK ANAMNEZ FORMU

Çalışma Adı:“ İmmunohistokimyasal olarak DNA fragmentasyonu ve Glycodelin dağılımının Sperm morfolojisi ve Hasta kliniği ile ilişkisi”

Olgu No :	
Tarih :	
Hastanın Adı ve Soyadı Başharfleri :	
Protokol No :	
Yaşı :	
Kan Grubu :	
Mesleği :	
Kaç Yıldır evli :	
Korunma Süresi :	İnfertilite süresi :
İnfertilite çeşiti :	
Primer :	Sekonder :
Özgeçmiş :	
Geçirmiş olduğu operasyonlar :	
Travma :	
İnguinal Herniorafi :	
Hidroselektomi :	
Varikoselektomi :	
Vazektomi :	
Diğer :	
Geçirmiş olduğu hastalıklar:	
Ateşli Hastalıklar :	
Kabakulak :	
Spinal kord yaralanması :	
Tümoral Hastalık :	
Radyoterapi :	
Diğer :	
Sistemik Hastalıklar :	
Diabetes mellitus :	
Multiple Sclerosis :	
Tuberculozis :	
Diğer :	
Alışkanlıkları :	
Alkol : Günde	
Sigara : Adet/gün.....yıl	
Kahve : gün	
Diğer :	
Soygeçmiş :	
Kistik fibrozis :	Y kromozomu Delesyonu :
Diğer :	

TABLO III. ÖRNEK SPERMİYOGRAF FORMU

Çalışma Adı: “İmmunohistokimyasal olarak DNA fragmentasyonu ve Glycodelin dağılımının Sperm morfolojisi ve Hasta kliniği ile ilişkisi”

Olgu No :
Tarih :
Hastanın Adı Soyadı Başharfleri :
Spermiyogram :
Cinsel perhiz süresi :
Hacim :
Renk :
pH :
Viskosite :
Likefaksiyon :
Sperm sayısı :
Hareketsiz % :
1° Yerinde (Pandüler) hareketli % :
2° İlerleme hızı olan % :
3° İleri hareketli % :
4° Çok hızlı hareketli % :
Morfoloji (KRUGER) :
Normal Sperm % :
Baş Anomalisi % :
Boyun Anomalisi % :
Kuyruk Anomalisi % :
Swim-up :
Sperm-MAR :

TABLO IV. ÖRNEK İMMUNOHİSTOKİMYA DEĞERLENDİRME FORMU

Çalışma Adı: “İmmunohistokimyasal olarak DNA fragmentasyonu ve Glycodelin dağılımının Sperm morfolojisi ve Hasta kliniği ile ilişkisi”

Olgu No :
Tarih :
Hastanın Adı Soyadı :
Sperm Yaymalarının İmmunohistokimyasal Sonuçları :
p53
Boyanmayan hücre Sayısı % :
+ (Minimal) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
++ (Orta) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
+++ (Şiddetli) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
Bcl-X
Boyanmayan hücre Sayısı % :
+ (Minimal) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
++ (Orta) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
+++ (Şiddetli) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
Fas
Boyanmayan hücre Sayısı % :
+ (Minimal) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
++ (Orta) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
+++ (Şiddetli) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
Glycodelin
Boyanmayan hücre Sayısı % :
+ (Minimal) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
++ (Orta) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :
+++ (Şiddetli) Pozitif Boyanan Hücre sayısı % :

3.1. Hastalardan Örnek Toplanması:

Hastalara numara sırası verilerek 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası kuru şekilde steril kaplara sperm örnekleri verilmesi istenmiştir. Örneğin, hiçbir ek madde kullanılmadan kuru mastürbasyonla verilmesi söylenerek, örnekler ağzı geniş, non-toksik, spermisid etkisi olmayan steril kaplara alınmıştır.

3.2. Sperm Örneklerinin İncelenmesi :

3.2.1. Makler Sayım Kamarası İle Sayım :

Alınan steril kaplardaki sperm örnekleri renk ve koku bakımından değerlendirildikten sonra likefaksiyon işlemi için 37°C inkübatörde 15-20 dakika bekletilmiştir. Likefaksiyon işlemi sonucunda homojen görünüme ulaşan örneklerden 10 µl alınarak Makler sayım kamarasına konulur ve 10X10 kareli olan işaretli sayım kamarasında 3 sütun sayılarak ortalamaları alınır ve sperm sayısı ile hareketliliği değerlendirilir. Elde edilen veriler formlara yazılmıştır. Hareketlilik aşağıda belirtilen kriterlere göre değerlendirilmiş ve yüzde olarak belirtilmiştir.

4° : Çok hızlı hareketlilik

3° : Hızlı, ilerleyici hareketlilik

2° : Yavaş ya da duraklayarak hareketlilik

1° : Yerde hareketlilik

0° : Hareketsiz sperm

Sperm örneklerinin sayımları tamamlandıktan sonra swim up yöntemi için hazırlanmıştır ve hacim ölçümü yapılarak kaydedilmiştir.

3.2.2. Swim-up Yöntemi Uygulaması

Ejekulat hacmi ölçülerek kaydedildikten sonra, hacmin yaklaşık 2 katı kadar 37°C'de ısıtılmış F12 besiyeri eklenerek 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan kısım döküldükten sonra, pelet üzerine 2 ml besiyeri eklenerek tekrar 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan kısım pelet sarsılmadan döküldükten sonra hasta örneğine göre yaklaşık 0.5 ml besiyeri eklenerek 37°C'de, 45° eğim ile 1 saat inkübe edilmiştir. 1 saat sonunda pelet kısmı sarsılmadan, üstten alınan örneklerde sperm hareketliliği ve sayısı değerlendirilerek swim-up skoru mikroskopik inceleme ile hesaplanmıştır (*Tablo V*).

TABLO V. SWİM-UP DEĞERLENDİRME AŞAMALARI PROTOKOLÜ

İşlem	Süre
Ejakülat hacminin 2 katı kadar besiyeri ilavesi	
1000 rpm	5 dakika
Süpernatant alınır	
Pelet üzerine 2 ml besiyeri ilave edilir	
1000 rpm	5 dakika
Süpernatant tüpler sarsılmadan alınır	
Pelet üzerine 0.5 ml besiyeri sızdırılarak verilir.	
45° eğim sağlanarak 37° C’de inkübe edilir	1 saat
İnceleme	

3.2.3. Spermilerin Morfolojik Değerlendirilmesi

Gönüllü hastalardan elde edilen sperm örnekleri swim-up işlemi esnasında yayma yapılarak havada kurutulduktan sonra Diff Quick boyası ile boyanmışlardır (**Tablo VI**). 2 dakika metanol ile tespit edilen preparatlar, önce Orange boyasında 2 dakika bekletilmiş, daha sonra ise Bromofenolblue boyasında 2 dakika bekletildikten sonra akarsu altında yıkama işlemi yapılmıştır (**Tablo VII**).

Örnekler 37°C sıcaklıkta etüve kaldırılarak kurumaları sağlanmıştır. Kuruyan örnekler immersiyon objektifinde (X100) incelenmiş ve morfolojileri değerlendirilmiştir. Baş, boyun, ve kuyruk anomalileri değerlendirilerek % olarak belirtilmiştir.

TABLO VI. SPERM YAYMA HAZIRLANMASI

İşlem	Süre
Lam üzerine 1 damla sperm örneği damlatılır ve yayılır	5 dakika
Havada kurutulur	2 dakika

TABLO VII. DİFF QUICK BOYAMA PROTOKOLÜ

İşlem	Madde	Süre
Tespit	Metanol	2 Dakika
Boyama	Orange	2 Dakika
Boyama	Bromofenolblue	2 Dakika
Yıkama	Akarsu	
Kurutma	37°C Etüv	
İnceleme	X 100 immersiyon objektifi ile – Olympus mikroskobu	

3.2.4. Sperm Yayma Preparatlarının Avidin-Biyotin Peroksidaz Yöntemi ile İndirek İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Hastalardan elde edilen semen örneklerinden hazırlanan yayma preparatlar 1 saat oda ısısında kurutmaya bırakıldıktan sonra metanol ile 30 dakika tespit edilmiştir (**Tablo VIII**). Tespit sonrası kesitler fosfat tampon solusyonuna (PBS) alınmıştır. Pap-pen ile çevrelenerek kuyucuklar oluşturulan preparatlara 10 dakika %3 hidrojen peroksit uygulaması yapılarak endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edilmiştir. PBS ile yıkanan preparatlara 1 saat non-immun serum uygulanmıştır. Daha sonra preparatlara primer antikörler uygulanarak (anti p53, anti Bcl-X, anti FAS, anti Glycodelin) 18 saat (bir gece boyunca) +4°C’de nemli ortam hazırlanarak inkübe edilmiştir.

PBS ile yıkanan örnekler 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikör uygulanmıştır. PBS ile yıkanan örnekler 30 dakika HRP-streptavidin uygulanmıştır (Histostain plus kit). PBS ile yıkanan örnekler DAB (Diaminobenzidin) ile 10 dakika inkübe edildikten sonra distile su ile yıkanarak Mayer’s hematoksilen ile artalan boyaması yapılmıştır.

Etil Alkol ve ksilenden geçirilen preparatlar entellan ile kapatılarak ışık mikroskop altında incelenmiştir. İmmunohistokimya boyama protokolü **Tablo VIII'de** gösterilmiştir.

Pozitif boyanan hücreler ile immunoreaktivite şiddetleri değerlendirilmiştir. İmmunoreaktivite şiddetleri semi-kantitatif yöntemle +: hafif boyanma, ++: orta şiddette boyanma; +++: şiddetli boyanma olarak değerlendirilmiştir.

H-Skor : $\sum$ % boyanan hücre sayısı X (immun boyanma şiddeti+1) formülü ile hesaplanmıştır. Her bir antikor ile hastalardan elde edilen değerlendirme sonuçları bulunmuştur.

Ek kesitler TUNEL boyaması için hazırlanmış olup, TUNEL boyama protokolü **Tablo IX'da**, immunohistokimyasal ve TUNEL boyama yöntemlerinde kullanılan kimyasal malzemeler **Tablo X'da** gösterilmiştir.

TABLO VIII. İMMUNOHİSTOKİMYA BOYAMA PROTOKOLÜ

İşlem	Madde	Süre
Tespit	Metanol	30 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	5 Dakika
Havuzcuk Oluşturma	Pap Pen	
Yıkama	PBS	3×5 Dakika
Peroksidaz Blok	% 3 Hidrojen Peroksit	10 Dakika
Yıkama	PBS	3×5 Dakika
Bloklama	Non-İmmun Bloklama Solüsyonu	1 Saat
Primer Antikorlar	Anti- P53, Anti-Bcl-X, Anti-Fas Anti-Glycodelin	18 Saat +4°C Nemli ortamda
Yıkama	PBS	3×5 Dakika
Sekonder Antikor	Biotinle İşaretli Sekonder Antikor	30 Dakika
Yıkama	PBS	3×5 Dakika
Sekonder Antikor	Streptavidin	30 Dakika
Yıkama	PBS	3×5 Dakika
Boyama	DAB (Diamino Benzidine)	10 Dakika
Yıkama	Distile Su	3×5 Dakika
Artalan Boyama	Mayer's Hematoksilen	30 Saniye
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
Dehidratasyon	% 80 ve 95 Etil Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 Dakika
Kapama	Entellan	
İnceleme	Olympus Marka Işık Mikroskobu	

3.2.5. TUNEL Yöntemi ile DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi

Ek yayma preparatları DNA fragmentasyonunu göstermek amacıyla TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick –End Labeling) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Semen yaymalarında TUNEL pozitif boyanan hücre sayıları belirlenerek sonuçlar % olarak belirtilmiştir.

Preparatlar Millipore TUNEL protokolüne uygun olarak metanol ile 20 dakika tespit edildikten sonra PBS ile 3X5 dakika yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında Pap-Pen ile belirlenen kuyucuklara %0.3 'lük H₂O₂ 5 dakika uygulanıp, 2 kez 5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra, dengeleme (equilibration) tampon solüsyonu ile 10 saniye yıkanan örnekler TdT-enzimi solüsyonu ile 37°C de 1 saat inkübe edilmiştir. 10 dakika Working-Strength, Stop/Wash tampon solüsyonu uygulanan preparatlar 3 kez 1 dakika PBS ile yıkama yapıldıktan sonra, örnekler anti-digoxigenin conjugate ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 4 değişim 2 dakika PBS ile yıkandıktan sonra, preparatlar diaminobenzidine (DAB) ile boyanmıştır. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlanan örnekler distile su ile yıkanarak %80 ve %95' lik alkollerde dehidratasyon ve 15 dk. ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatılmıştır. Sperm yayma örneklerinin TUNEL boyama protokolü **Tablo IX**'de gösterilmiştir.

Elde edilen boyanmış yayma preparatları Olympus X40 ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. TUNEL yöntemi ile boyanan preparatlarda boyanan hücre sayıları % olarak belirtilmiştir.

İndirek immunohistokimyasal yöntem sonucunda elde edilen H-Skor değerleri ve DNA fragmentasyonunu göstermek üzere yapılan TUNEL boyama sonuçlarından elde edilen % TUNEL pozitif hücre değerleri SPSS 15.0 programına kaydedilmiştir. Hastaların yaş, infertilite süreleri, spermiyogram sonuçları, alkol ve sigara kullanımları, geçirilmiş enfeksiyonlar, özgeçmiş ve soygeçmiş özellikleri ile istatistiksel yöntemle karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

TABLO IX. TUNEL BOYAMA PROTOKOLÜ

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	Methanol	20 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
Havuzcuk Oluşturma	Pap-Pen	
Peroksidaz Blok	% 0.3 Hidrojen Peroksit	5 Dakika
Yıkama	PBS	2x5 Dakika
	Equilibration Tampon Solüsyonu	10 Saniye
	Tdt-Enzimi Solüsyonu	1 Saat 37°C Nemli
	Working-Strength, Stop/Wash Tampon Solüsyonu	10 Dakika
Yıkama	PBS	3x1 Dakika
	Anti-Digoxigenin Conjugate	30 Dakika + 24 °C
Yıkama	PBS	4x2 Dakika
Boyama	DAB (Diamino Benzidine)	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	3x5 Dakika
Artalan Boyama	Mayer's Hematoksilen	30 Saniye
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
Dehidratasyon	% 80 ve % 95 Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	15 Dakika
Kapama	Entellan	
İnceleme	Olympus Marka Işık Mikroskobu	

TABLO X. İMMUNOHİSTOKİMYA VE TUNEL İÇİN KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

MALZEME	FİRMA	KAT. NO	ÜLKE
Mini PAP-PEN	Beckman Coulter	IM3580	FRANCE
Anti- Glycodelin	Santa Cruz	sc-59549 Mouse Monoklonal	CA/USA
Anti-Bcl-x	Santa Cruz	sc-8392 Mouse Monoklonal	CA/USA
Anti-Fas	Santa Cruz	sc-8009 Mouse Monoklonal	CA/USA
Anti- p53	Santa Cruz	sc-81168 Mouse Monoklonal	CA/USA
Sekonder Antikor Histostain Plus Kit	İnvitrogen	85-9043	CA/USA
Mayer's hematoxilen	Scytek	HMM999	UTAH/USA
DAB	İnvitrogen	00-2020	CA/USA
Apoptag Plus Peroxidase in situ apoptosis detection kit	Millipore	S7101	USA

3.3. İstatistiksel Değerlendirmeler

Her bir antikör için elde edilen H-Skor ve TUNEL pozitif boyanan hücrelerin % değerleri SPSS 15.0 programına işlenmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler hastaların anamnez, özgeçmiş, soygeçmiş bulguları, spermiyogram sonuçları ve Kruger yöntemi ile belirtilen morfolojik değerlendirme sonuçları ile istatistiksel olarak Mann Whitney U testi ve Spearman's rho korelasyon testi ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmada Ege Üniversitesi Aile Planlaması Kısırlık (İnfertilite) Araştırma ve Uygulama Merkezi Androloji laboratuvarına başvuran ve spermiyogram örnekleri veren 100 gönüllü erkek hastadan hazırlanan sperm yayma preparatları, indirek immunohistokimya ve TUNEL yöntemleri ile incelenmiştir ve klinik bulgular ile karşılaştırmalı olarak değerlendirme yapılmıştır.

4.1. Hastalara Ait Klinik Bulgular

Hastalardan, yaş, meslek, evlilik süreleri, daha önceden korunma öyküleri, infertilite tipi (primer, sekonder), sigara, alkol ve kahve tüketimleri, daha önceden geçirilmiş enfeksiyon (kabakulak, vb.) ve operasyon (inguinal herni, varikosel, orşiektomi, vb.) öyküleri, ve soygeçmiş özelliklerini içeren detaylı anamnez alınmıştır. Hastaların yaş ortalamaları $33,48 \pm 5,09$, (23-47 yaş) ve evlilik süresi ortalamaları $6,4 \pm 4,52$ olarak belirlenmiştir. Hastalar %72 primer, %28 sekonder infertiliteye sahip olup, %62'sinin korunmadığı, %38'inin (%24<1 yıl ; %14>1 yıl) daha önceden korunmuş olduğu saptanmıştır. Hastaların %5'i inguinal herni, %17'si varikosel, %1'i orşiektomi operasyonu geçirmiş olup; %2'si antidepresan kullanımı, %14'ü kabakulak geçirme öyküsüne sahiptir. Hastaların %43'ünün sigara kullanmadığı, %32'sinin 0,1-4,9 paket/hf, %10'unun 5,1-9,9 paket/hf, %15'inin >10 paket/hf sigara kullandıkları saptanmıştır. %68'inin alkol kullanmadığı, %24'ünün 1 ünite/ay, %6'sının 2 ünite/ay, %2'sinin 3 ünite/ay alkol kullandığı belirlenmiştir. Hastaların %86'sının kahve kullanmadığı, %10'unun 1 bardak/gün, %3'ünün 2 bardak/gün, %1'inin 10 bardak/gün kahve tükettikleri saptanmıştır. Hastalara ait demografik veriler **Tablo 4.1.**'de belirtilmiştir.

TABLO 4.1. HASTALARA AİT DEMOGRAFİK VERİLER

Yaş	33,48 ± 5,09 (23-47)		% 25	% 50	% 75
	(Ort. ± SD) (min-maks)		30	33	36
Evlilik Süresi	6,4 ± 4,52 (0,5-23)		% 25	% 50	% 75
	(Ort. ± SD) (min-maks)		3	5	9
İnfertilite Tipi	% 72 Primer		% 28 Sekonder		
Korunma	% 62 korunmuyor		% 38 korunuyor		
			< 1 : % 24		
			>1 : % 14		
Geçirilmiş operasyon/ enfeksiyon/ ilaç kullanımı	-		+		
İnguinal Herni	% 95		% 5		
Varikosel	% 83		% 17		
Orşiektomi	% 99		% 1		
Kabakulak	% 86		% 14		
Antidepresan Kullanımı	% 98		% 2		
Alkol Kullanımı	Kullanmıyor	1 ünite/ay	2 ünite/ay	3 ünite/ay	
	% 68	% 24	% 6	% 2	
Sigara Kullanımı	Kullanmıyor	0,1-4,9 paket/hafta	5,1-9,9 paket/hafta	>10 paket/hafta	
	% 43	% 32	% 10	% 15	
Kahve Kullanımı	Kullanmıyor	1 bardak/ gün	2 bardak/ gün	10 bardak/ gün	
	% 86	% 10	% 3	% 1	

4.2. Spermiyogram Sonuçları

Hastalardan detaylı anamnez alındıktan sonra, 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında toplanan semen örnekleri incelenmiştir. Örnekler alındıktan sonra 15 dakika 37°C'de likefiye olmaları için bekletilerek, renk, koku, pH, likefaksiyon süreleri ve hacim özellikleri yönünden değerlendirilmiştir. Likefaksiyon süresi sonunda çözünmeyen örnekler 1 ve 2 visköz olarak değerlendirilerek, enjektör ile filtrasyon yapılarak incelenmiştir. Likefaksiyon süresi sonunda damla olarak akan örneklerden 10 µl alınarak, Makler sayım kamarası kullanılarak, X20 objektif ile mikroskop altında sperm sayısı (10^6 /ml) ve sperm hareketliliği (1°, 2°, 3°, 4°) değerlendirilmiştir.

Spermiyogram sonuçları elde edildikten sonra, "Swim up" yöntemi ile yukarı doğru yüzen hareketli spermilerin sayısı belirlenmiştir. Örnekler önce hacimlerinin iki katı kadar 37°C sıcaklıktaki Ham's F10 besi vasatı ile 1000 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Daha sonra dipte kalan örnekler üzerine, 2 ml besi vasatı eklenerek 2. kez aynı devir ve sürede santrifüj edilmişlerdir. Süpernatant atıldıktan sonra, spermier üzerine yavaş bir şekilde 0,5-1 ml besi vasatı eklenerek 45° eğimle 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Makler sayım kamarası ile üst kısımdan alınan örneklerde sperm sayısı ve sperm hareketliliği belirlenmiştir.

Hastaların % 35'inin cinsel perhiz süresi 3 Gün, % 52'sinin 4 gün, % 13'ünün 5 gün olduğu belirlenmiştir. Sperm viskoziteleri % 71'inde Normal olarak bulunmuş olup, % 15'inde 1 artmış, % 14'ünde ise 2 artmış olarak değerlendirilmiştir. Ortalama olarak spermiyogram değerleri hacim $3,14 \pm 1,53$; sperm sayısı $59,95 \pm 51,20$; hareketsiz sperm yüzdesi $30,21 \pm 20,33$; 1° hareketli sperm yüzdesi $20,29 \pm 10,28$; 2° hareketli sperm yüzdesi $39,15 \pm 13,76$; 3° hareketli sperm yüzdesi $10,05 \pm 8,18$; swim-up yüzdesi $25,24 \pm 35,36$ olarak belirlenmiştir.

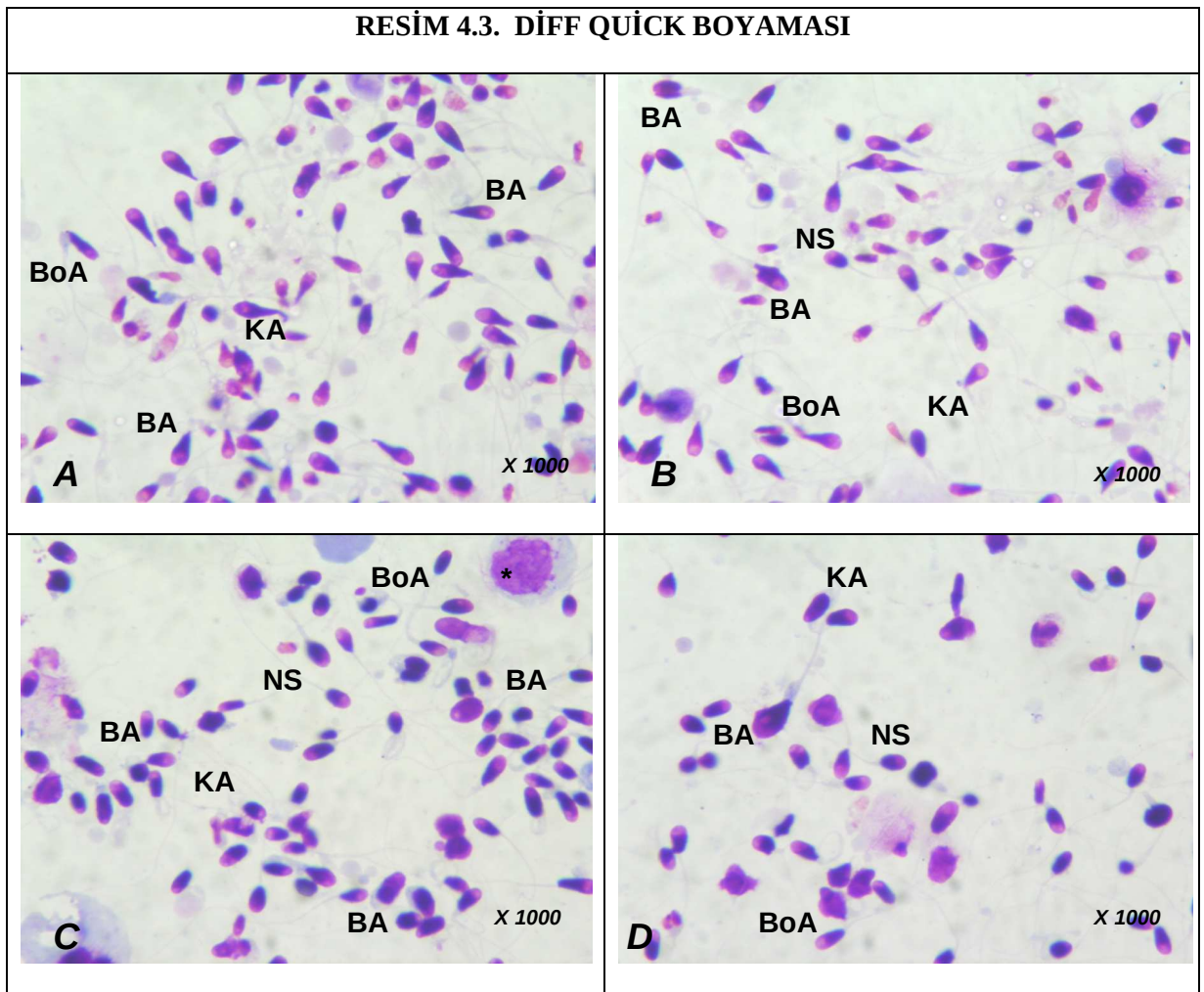
Hastalardan elde edilen Spermiyogram ve Swim-up sonuçları **Tablo 4.2.**'de gösterilmiştir.

TABLO 4.2. HASTALARA AİT SPERMİYOGRAM VE SWİM-UP SONUÇLARI

Cinsel Perhiz Süresi	3 gün	4 gün	5 gün	
	% 35	% 52	% 13	
Viskozite	Normal	1 ↑	2 ↑	
	% 71	% 15	% 14	
Hacim	3,14 ± 1,53 (0.5 - 10,10)	% 25	% 50	% 75
	(Ort. ± SD) (min- maks)	2,20	2,95	4,00
Sperm Sayısı	59,95 ± 51,20(3,00-260,00)	% 25	% 50	% 75
	(Ort. ± SD) (min- maks)	21,00	44,00	81,75
Hareketsiz Sperm %	30,21 ± 20,33 (5,00-98,00)	% 25	% 50	% 75
	(Ort. ± SD) (min- maks)	15,00	25,00	40,00
1° Hareket %	20,29 ± 10,28 (0-50,00)	% 25	% 50	% 75
	(Ort. ± SD) (min- maks)	10,00	20,00	30,00
2° Hareket %	39,15 ± 13,76 (0-65,00)	% 25	% 50	% 75
	(Ort. ± SD) (min- maks)	30,00	40,00	50,00
3° Hareket %	10,05 ± 8,18 (0-40,00)	% 25	% 50	% 75
	(Ort. ± SD) (min- maks)	5,00	10,00	15,00
Swim-up	25,24 ± 35,36 (0-170,00)	% 25	% 50	% 75
	(Ort. ± SD) (min- maks)	3,00	8,00	29,50

4.3. Sperm Yaymalarının Diff–Quick Boyaması İle Değerlendirilmesi

SpermİYogram değeriendirme sonucunda örneklere hazırlanan yayma preparatları Diff Quick boyama protokolüne uygun olarak boyanarak, spermier **Kruger** kesin kriterlerine göre morfolojik olarak değeriendirilmiştir (**Resim 4.3.**). Hazırlanan sperm yaymalarında, normal morfolojiye sahip spermier ile baş, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip spermier Kruger kesin kriterlerine göre % olarak belirlenmiştir. Sperm morfolojilerinin değeriendirme sonuçları **Tablo 3.3.**'de gösterilmiştir.



Resim 4.3. Hastalara ait sperm yaymalarının Diff Quick boyama yöntemi ile elde edilen görüntülerin ışık mikroskop altında değeriendirilmesinde, Normal morfolojiye sahip spermier (NS), Baş Anomalisi (BA), Boyun Anomalisi (BoA) ve Kuyruk anomalisi olan (KA) spermier ve Sperm dışı yuvarlak hücreler (*) izlenmektedir. X 1000 (A-D)

TABLO 4.3. SPERM MORFOLOJİLERİNİN KRUGER KESİN KRİTERLERİNE GÖRE DEĞERLENDİRİLMESİ

Normal Morfoloji %	3,16 ± 2,75 (0-13,00) (Ort. ± SD) (min-maks)	% 25	% 50	% 75
		1,00	2,00	5,00
Baş Anomalisi %	90,44 ± 5,48(72,00-100,00) (Ort. ± SD) (min-maks)	% 25	% 50	% 75
		87,00	91,00	95,00
Boyun Anomalisi %	3,82 ± 2,40 (0-12,00) (Ort. ± SD) (min-maks)	% 25	% 50	% 75
		2,00	4,00	5,00
Kuyruk Anomalisi %	2,60 ± 2,07 (0-10,00) (Ort. ± SD) (min-maks)	% 25	% 50	% 75
		1,00	2,00	3,75
		3,00	8,00	29,50

Sperm örneklerine ait görüntülerin A-D şeklinde sıralanması normal morfolojiye sahip spermlerden anormal morfolojiye sahip olanlara doğru gidiş şeklinde gösterilmiştir. A resmi daha normal spermilere, B ve C resimleri orta dereceli , D resmi ise daha morfolojisi bozuk örneklere ait olarak düzenlenmiştir.

4.4. Sperm Yayımlarının İndirek İmmunohistokimyasal Yöntem İle Değerlendirilmesi

Sperm yayımları poli-lizin ile kaplı lamalar üzerine alındıktan sonra indirek immunohistokimyasal olarak, avidin-biyotin- peroksidaz yöntemi ile anti-p53, anti-Bcl-X, anti-Fas ve anti-Glycodelin primer antikorları kullanılarak değerlendirilmiştir.

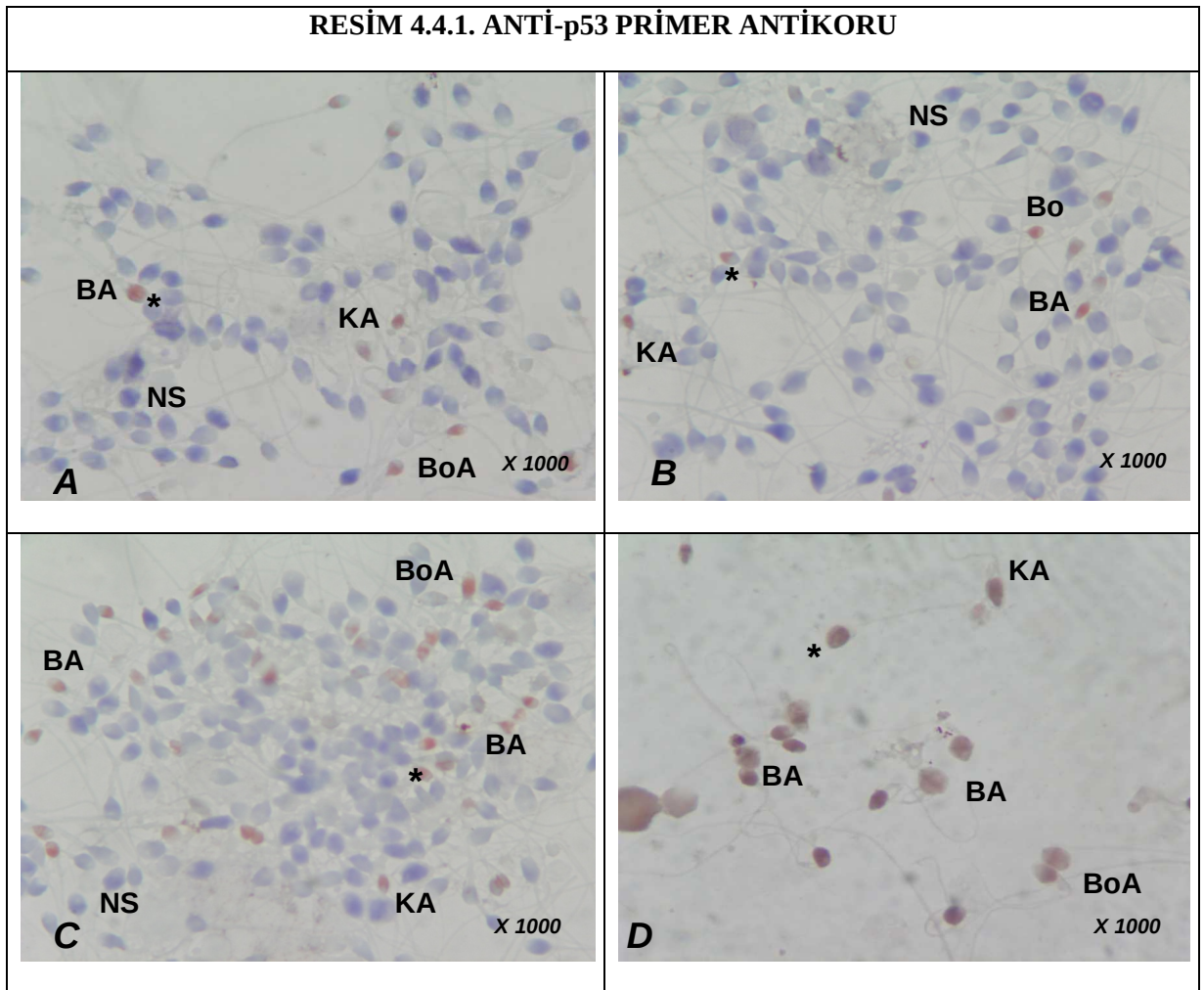
Her hastadan elde edilen preparatlarda pozitif boyanan hücreler ve boyanma yoğunlukları yarı-kantitatif yöntemle hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilmiştir. H-skor (Σ boyanan hücre % X boyanma şiddeti +1) elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar **Tablo 4.4.**'de gösterilmiştir.

TABLO 4.4. SPERM YAYIMLARININ İNDİREK İMMUNO-HİSTOKİMYASAL YÖNTEM İLE DEĞERLENDİRİLME SONUÇLARI

p 53	19,76 ± 16,92 (2,00-88,00)	% 25	% 50	% 75
H-Skor	(Ort. ± SD) (min- maks)	6,00	15,00	26,00
Bcl-X	78,72 ± 80,81 (3,00-356,00)	% 25	% 50	% 75
H-Skor	(Ort. ± SD) (min- maks)	23,25	40,00	120,00
Fas	98,44 ± 80,62 (4,00-328,00)	% 25	% 50	% 75
H-Skor	(Ort. ± SD) (min- maks)	36,00	71,00	150,50
Glycodelin	76,55 ± 76,39(6,00-330,00)	% 25	% 50	% 75
H-Skor	(Ort. ± SD) (min- maks)	24,50	44,50	98,75
TUNEL	12,19 ± 9,66 (1,00-50,00)	% 25	% 50	% 75
%	(Ort. ± SD) (min-maks)	6,00	9,50	17,00

4.4.1. Sperm yaymalarının anti-p53 primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi;

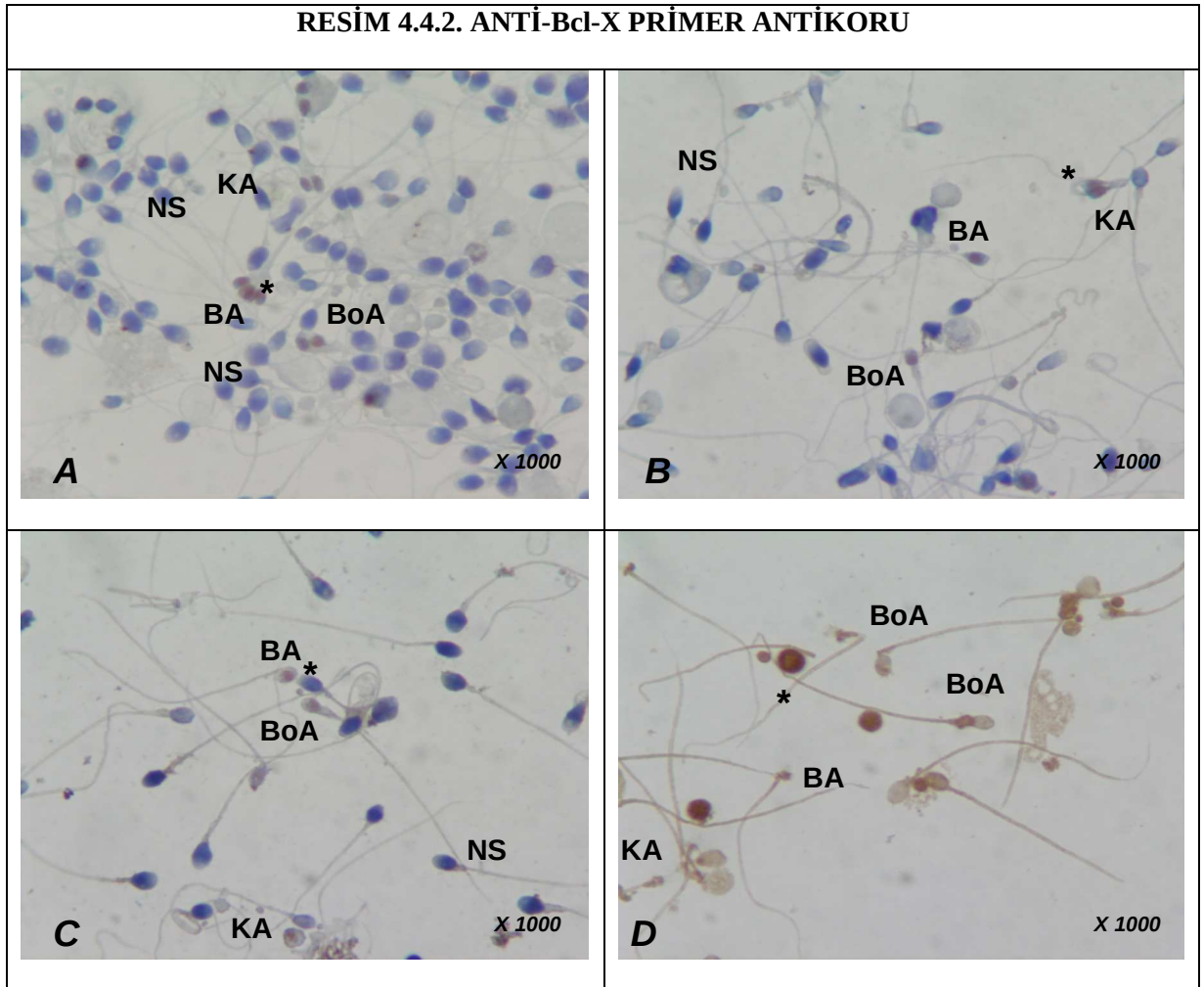
Normal morfolojiye sahip olan spermelerde (-/+) immunoreaktivite izlenirken, baş, boyun ve kuyruk anomalisi olan spemlerde immunoreaktivitenin (++,+++) ve pozitif boyanan sperm sayısının artmış olduğu izlendi (**Resim 4.4.1.**). **H-skor** $19,76 \pm 16,92$ olarak saptandı.



Resim 4.4.1. Hastalara ait sperm yaymalarının anti-p53 primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemle boyanması ile elde edilen görüntülerin ışık mikroskop altında değerlendirilmesinde, normal morfolojili spermelerde (NS) hafif (-/+), Baş Anomalisi (BA), Boyun Anomalisi (BoA) ve Kuyruk anomalisi olan (KA) spermelerde artmış (++,+++) immunoreaktivite (*) izlenmektedir. Kromojen: DAB, X 1000

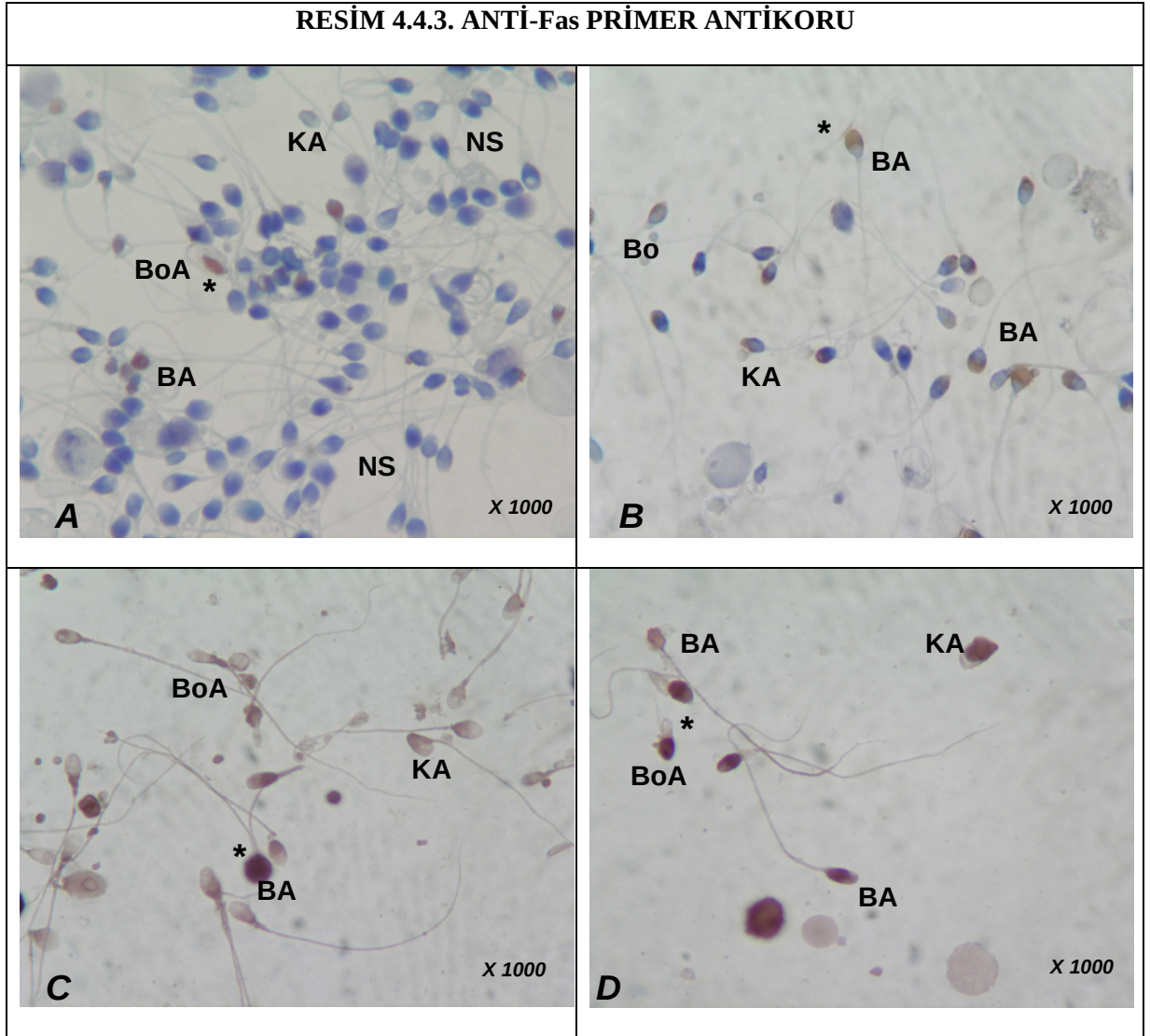
4.4.2. Sperm yaymalarının, anti-Bcl-X primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi;

Normal morfolojiye sahip olan spermelerde hafif (+) immunoreaktivite izlenirken, baş, boyun ve kuyruk anomalisi olan spemlerde immunoreaktivitenin hafif/orta (+/++) olduğu izlendi (**Resim 4.4.2.**). **H-Skor** $78,72 \pm 80,81$ olarak saptandı.



Resim 4.4.2. Hastalara ait sperm yaymalarının anti-Bcl-X primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemle boyanması ile elde edilen görüntülerin ışık mikroskop altında değerlendirilmesinde, normal morfolojili spermelerde (NS) hafif, Baş Anomalisi (BA), Boyun Anomalisi (BoA) ve Kuyruk anomalisi olan (KA) spermelerde hafif/orta immunoreaktivite (*) izlenmektedir. Kromojen:: DAB, X 1000 (A-D)

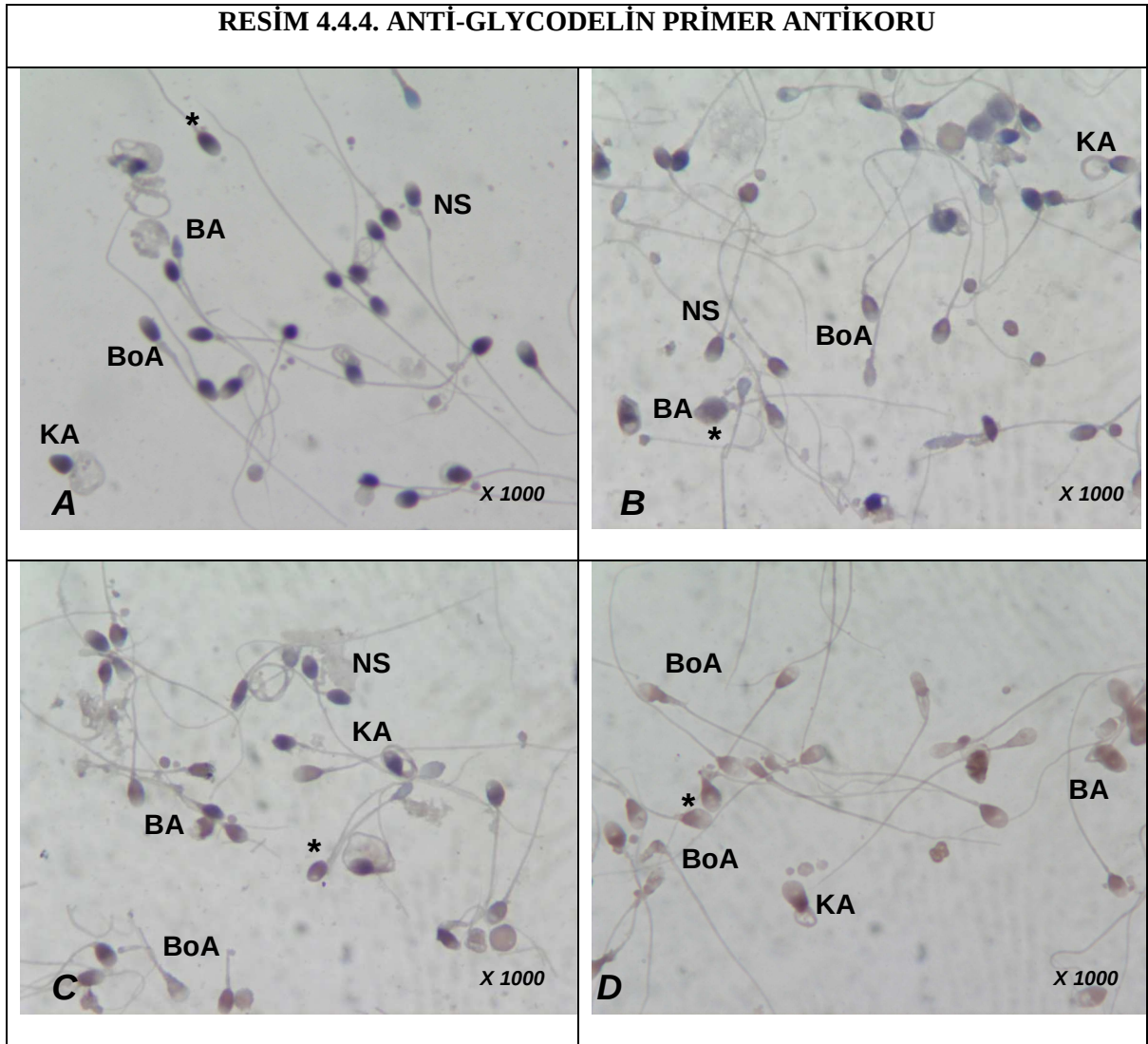
4.4.3. Sperm yaymalarının, anti-Fas primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi; Normal morfolojiye sahip olan spermelerde boyanma izlenmezken, baş, boyun ve kuyruk anomalisi olan spermelerde immunoreaktivitenin (+++) ve pozitif boyanan sperm sayısının artmış olduğu izlendi (**Resim 4.4.3.**) . **H-skor** $98,44 \pm 80,62$ olarak saptandı.



Resim 4.4.3. Hastalara ait sperm yaymalarının anti-Fas primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemle boyanması ile elde edilen görüntülerin ışık mikroskop altında değerlendirilmesinde, normal morfolojili spermelerde (NS) boyanma izlenmezken, Baş Anomalisi (BA), Boyun Anomalisi (BoA) ve Kuyruk anomalisi olan (KA) spermelerde artmış (+++) immunoreaktivite (*) izlenmektedir. Kromojen: DAB, X 1000 (A-D)

4.4.4. Sperm yaymalarının, anti-Glycodelin primer antikoru kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi;

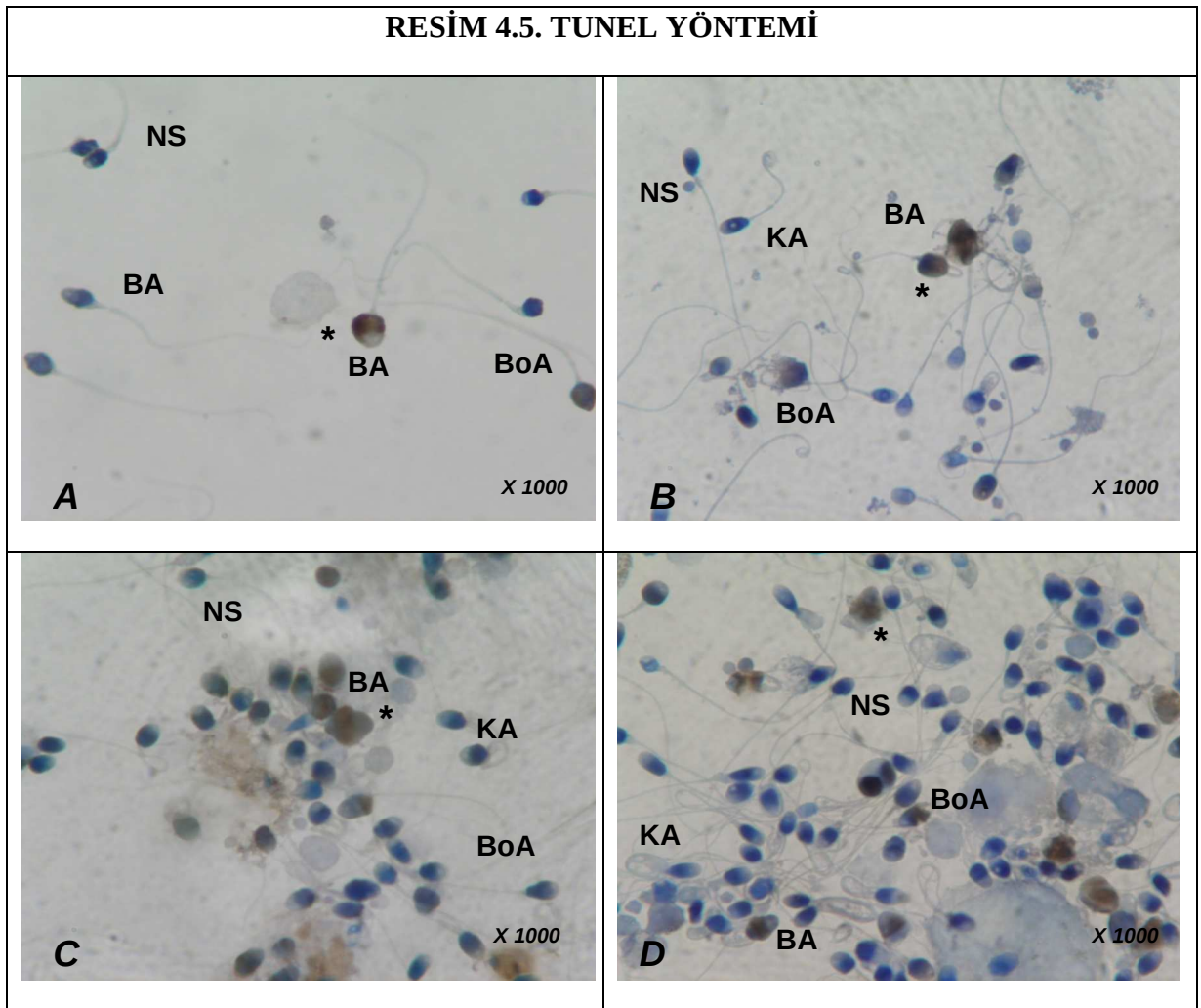
Normal morfolojiye sahip spermelerde orta (++), küçük başlı ve immatür spermelerde hafif (+), boyun ve kuyruk anomali olan diğer spermelerde immunoreaktivitenin artmış olduğu (+++) izlendi (**Resim 4.4.4.**). **H-skor** : $76,55 \pm 76,39$ olarak saptandı.



Resim 4.4.4. Hastalara ait sperm yaymalarının anti-Glycodelin primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemle boyanması ile elde edilen görüntülerin ışık mikroskop altında değerlendirilmesinde, normal morfolojili spermelerde (NS) orta, Baş Anomalisi (BA) olan ve immatür spermelerde hafif, Boyun Anomalisi (BoA) ve Kuyruk anomali olan (KA) spermelerde artmış immunoreaktivite (*) izlenmektedir. Kromojen : DAB, X 1000 (A-D)

4.5. Sperm yaymalarının TUNEL (Terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP Nick–End Labeling) yöntemi kullanılarak değerlendirilmesi;

TUNEL boyaması ile, DNA fragmentasyonu olan hücrelerin pozitif olarak boyandıkları izlendi. Sperm sayısı ile hareketliliği az, baş, boyun ve kuyruk anomalisi olan örneklerde TUNEL pozitif hücrelerin sayıca arttığı izlendi. Yaş, sigara, alkol kullanımı, meslek olarak sıcak (fırıncı) ortama ve kimyasalara maruz kalanlarda (laborant, kimyager) ve sperm sayısı ile hareketliliğin az olduğu vakalarda TUNEL pozitif hücrelerin artmış olduğu gözlemlendi (**Resim 4.5.**). TUNEL% :12,19±9,66 olarak saptandı.



Resim 4.5. Hastalara ait sperm yaymalarının TUNEL yöntemi ile boyanması ile elde edilen görüntülerin ışık mikroskop altında değerlendirilmesinde, Baş Anomalisi (BA), Boyun Anomalisi (BoA) ve Kuyruk anomalisi olan (KA) spermelerde TUNEL pozitif boyanma(*) izlenmektedir. Kromojen : DAB, Artalan Boyaması : Mayers Hematoksilen, X 1000 (A-D)

4.6. İmmunohistokimyasal ve TUNEL Boyama Sonuçlarının Klinik Korelasyonu

Androloji laboratuvarına başvuran hastaların immunohistokimyasal ve TUNEL boyama yöntemi ile elde edilen sonuçları, hasta kliniği ve spermiyogram sonuçları ile karşılaştırıldığında elde edilen istatistiksel sonuçlar **Tablo 4.6.**'da gösterilmiştir.

TABLO. 4.6. İMMUNOHİSTOKİMYASAL ve TUNEL BOYAMA SONUÇLARININ KLİNİK KORELASYONU

1. Yaş ile, İHC ve TUNEL sonuçları arasında istatistiksel farklılık olmadığı, saptandı, $p>0,05$.					
	P53 Ort. $\pm$SD (Min-Maks)	Bcl-X Ort. $\pm$SD (Min-Maks)	Fas Ort. $\pm$SD (Min-Maks)	Glycodelin Ort. $\pm$SD (Min-Maks)	TUNEL Ort. $\pm$SD (Min-Maks)
Yaş<35 (n:64)	20,96 $\pm$ 18,52 (2,00-88,00)	80,62 $\pm$ 85,18 (6,00-356,00)	99,65 $\pm$ 86,41 (4,00-328,00)	83,01 $\pm$ 82,56 (6,00-330,00)	11,70 $\pm$ 10,12 (1,00-50,00)
Yaş $\geq$35 (n:36)	17,61 $\pm$ 13,61 (2,00-54,00)	75,33 $\pm$ 73,43 (3,00-282,00)	96,27 $\pm$ 70,28 (6,00-302,00)	65,05 $\pm$ 63,43 (8,00-283,00)	13,05 $\pm$ 8,85 (2,00-48,00)
Total Σ (n:100)	19,76 $\pm$ 16,92 (2,00-88,00)	78,72 $\pm$ 80,81 (3,00-356,00)	98,44 $\pm$ 80,62 (4,00-328,00)	76,55 $\pm$ 76,39 (6,00-330,00)	12,19 $\pm$ 9,66 (1,00-50,00)
$p>0,05$ Mann Whitney U test	0,724	0,991	0,635	0,464	0,175
Yaş<40 (n:87)	19,16 $\pm$ 17,27 (2,00-88,00)	78,51 $\pm$ 81,97 (3,00-356,00)	99,32 $\pm$ 81,76 (4,00- 328,00)	79,62 $\pm$ 76,98 (6,00-330,00)	12,01 $\pm$ 10,03 (1,00-50,00)
Yaş$\geq$40 (n:13)	23,76 $\pm$ 14,30 (9,00-54,00)	80,07 $\pm$ 75,61 (18,00-282,00)	92,53 $\pm$ 75,32 (22,00-262,00)	56,00 $\pm$ 71,68 (11,00-283,00)	13,38 $\pm$ 6,92 (3,00-25,00)
Total Σ (n:100)	19,76 $\pm$ 16,92 (2,00- 88,00)	78,72 $\pm$ 80,81 (3,00-356,00)	98,44 $\pm$ 80,62 (4,00- 328,00)	76,55 $\pm$ 76,39 (6,00- 330,00)	12,19 $\pm$ 9,66 (1,00- 50,00)
$p>0,05$, Mann Whitney U test	0,084	0,580	0,967	0,209	0,234
2. İnfertilite çeşiti ile, İHC ve TUNEL sonuçları arasında istatistiksel farklılık olmadığı saptandı, $p>0,05$					
	P53 Ort. $\pm$SD (Min-Maks)	Bcl-X Ort. $\pm$SD (Min-Maks)	Fas Ort. $\pm$SD (Min-Maks)	Glycodelin Ort. $\pm$SD (Min-Maks)	TUNEL Ort. $\pm$SD (Min-Maks)
Primer (n:72)	19,98 $\pm$ 16,31 (2,00-66,00)	77,15 $\pm$ 76,31 (3,00-296,00)	95,55 $\pm$ 76,70 (4,00-302,00)	69,25 $\pm$ 65,03 (6,00-290,00)	12,54 $\pm$ 10,17 (1,00-50,00)
Sekonder (n:28)	19,17 $\pm$ 18,71 (2,00-88,00)	82,75 $\pm$ 92,77 (10,00-356,00)	105,85 $\pm$ 91,03 (18,00-328,00)	95,32 $\pm$ 98,82 (10,00-330,00)	11,28 $\pm$ 8,29 (2,00-30,00)
Total Σ (n:100)	19,76 $\pm$ 16,92 (2,00-88,00)	78,72 $\pm$ 80,81 (3,00-356,00)	98,44 $\pm$ 80,62 (4,00-328,00)	76,55 $\pm$ 76,39 (6,00-330,00)	12,19 $\pm$ 9,66 (1,00-50,00)
$p>0,05$, Mann Whitney U test	0,631	0,963	0,905	0,514	0,617

3. Sperm kalitesini etkileyebilecek herhangi bir operasyon geçirme öyküsü ile, TUNEL ile istatistiksel anlamlılık olduğu $p<0,05^*$, diğer İHC sonuçları arasında istatistiksel farklılık olmadığı $p>0,05$ saptandı.

	P53 Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	Bcl-X Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	Fas Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	Glycodelin Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	TUNEL Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)
Yok (n:79)	19,25 $\pm$ 17,13 (2,00-88,00)	76,36 $\pm$ 83,27 (3,00-356,00)	97,86 $\pm$ 85,46 (4,00-328,00)	72,64 $\pm$ 77,09 (6,00-330,00)	11,21 $\pm$ 9,11 (1,00-50,00)
Var (n:21)	21,66 $\pm$ 16,39 (2,00-66,00)	87,57 $\pm$ 71,93 (12,00-282,00)	100,61 $\pm$ 60,71 (18,00-262,00)	91,23 $\pm$ 73,62 (14,00-283,00)	15,85 $\pm$ 10,97 (2,00-48,00)
Total Σ (n:100)	19,76 $\pm$ 16,92 (2,00-88,00)	78,72 $\pm$ 80,81 (3,00-356,00)	98,44 $\pm$ 80,62 (4,00-328,00)	76,55 $\pm$ 76,39 (6,00-330,00)	12,19 $\pm$ 9,66 (1,00-50,00)
$p<0.05$, Mann Whitney U test	0,418	0,223	0,264	0,101	0,037

4. Sperm kalitesini etkileyebilecek herhangi bir hastalık geçirme öyküsü ile İHC ve TUNEL sonuçları arasında istatistiksel farklılık olmadığı saptandı, $p>0,05$.

Kabakulak öyküsü	p53 Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	Bcl-X Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	Fas Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	Glycodelin Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	TUNEL Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)
Yok (n:86)	20,27 $\pm$ 17,69 (2,00- 88,00)	82,45 $\pm$ 85,45 (3,00- 356,00)	104,20 $\pm$ 83,77 (4,00- 328,00)	81,88 $\pm$ 80,31 (6,00- 330,00)	12,31 $\pm$ 9,72 (1,00- 50,00)
Var (n:14)	16,57 $\pm$ 11,04 (2,00- 44,00)	55,78 $\pm$ 36,46 (8,00- 122,00)	63,00 $\pm$ 45,19 (4,00- 160,00)	43,78 $\pm$ 30,33 (11,00-112,00)	11,42 $\pm$ 9,62 (2,00- 37,00)
Total Σ (n:100)	19,76 $\pm$ 16,92 (2,00- 88,00)	78,72 $\pm$ 80,81 (3,00- 356,00)	98,44 $\pm$ 80,62 (4,00- 328,00)	76,55 $\pm$ 76,39 (6,00- 330,00)	12,19 $\pm$ 9,66 (1,00- 50,00)
$p>0.05$, Mann Whitney U test	0,862	0,854	0,112	0,124	0,702

5. Sigara içme öyküsü ile fas arasında sınırda istatistiksel anlamlılık saptanırken $p=0,05$ diğer İHC ve TUNEL sonuçları arasında istatistiksel farklılık olmadığı $p>0,05$ saptandı.

	p53 Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	Bcl-X Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	Fas Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	Glycodelin Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)	TUNEL Ort. $\pm$ SD (Min-Maks)
Hiç içmemiş (n:43)	17,74 $\pm$ 16,62 (2,00-88,00)	80,74 $\pm$ 71,93 (3,00-282,00)	98,25 $\pm$ 72,44 (6,00-302,00)	74,60 $\pm$ 75,96 (8,00-284,00)	11,48 $\pm$ 8,55 (2,00-48,00)
0,1-4,9 paket yıl (n:10)	18,90 $\pm$ 16,61 (2,00-48,00)	26,90 $\pm$ 14,07 (13,00-58,00)	45,60 $\pm$ 21,25 (20,00-84,00)	35,60 $\pm$ 21,30 (6,00-64,00)	16,60 $\pm$ 14,69 (2,00-50,00)
5,1-9,9 paket yıl (n:15)	27,33 $\pm$ 21,07 (4,00-66,00)	69,13 $\pm$ 64,48 (18,00-218,00)	84,26 $\pm$ 80,94 (18,00-262,00)	73,26 $\pm$ 79,06 (10,00-256,00)	14,53 $\pm$ 11,61 (1,00-36,00)
>10 paket yıl (n:32)	19,18 $\pm$ 15,03 (2,00-54,00)	96,68 $\pm$ 103,25 (6,00-356,00)	121,84 $\pm$ 94,85 (4,00-328,00)	93,50 $\pm$ 83,74 (9,00-330,00)	10,65 $\pm$ 7,96 (2,00-37,00)
Total Σ (n:100)	19,76 $\pm$ 16,92 (2,00-88,00)	78,72 $\pm$ 80,81 (3,00-356,00)	98,44 $\pm$ 80,62 (4,00-328,00)	76,55 $\pm$ 76,39 (6,00-330,00)	12,19 $\pm$ 9,66 (1,00-50,00)
$p=0.05$, Mann Whitney U test	0,419	0,085	0,050*	0,115	0,612

6. Kahve içme öyküsü ile İHC ve TUNEL sonuçları arasında istatistiksel farklılık olmadığı $p>0,05$ saptandı.

	p53 Ort. ±SD (Min-Maks)	Bcl-X Ort. ±SD (Min-Maks)	Fas Ort. ±SD (Min-Maks)	Glycodelin Ort. ±SD (Min-Maks)	TUNEL Ort. ±SD (Min-Maks)
Yok (n:86)	20,50±17,62 (2,00-88,00)	78,31±82,84 (3,00-356,00)	95,88±79,92 (4,00-328,00)	74,33±75,31 (6,00-330,00)	12,59±10,06 (1,00-50,00)
Var (n:14)	15,21±11,23 (2,00-40,00)	81,21±69,67 (23,00-260,00)	114,14±86,19 (4,00-270,00)	90,14±84,36 (24,00-290,00)	9,71±6,46 (2,00-21,00)
Total Σ (n:100)	19,76±16,92 (2,00-88,00)	78,72±80,81 (3,00-356,00)	98,44±80,62 (4,00-328,00)	76,55±76,39 (6,00-330,00)	12,19±9,66 (1,00-50,00)
$p>0.05$, Mann Whitney U test	0,435	0,328	0,490	0,237	0,403

7. Sperm sayısı ile (<50 milyon /ml, 50,1-100,1 milyon /ml ve > 100 milyon /ml karşılaştırıldığında) Fas ve TUNEL sonuçları arasında istatistiksel farklılık olduğu ($p<0,05$), diğer İHC sonuçları arasında istatistiksel farklılık olmadığı $p>0,05$ saptandı.

	p53 Ort. ±SD (Min-Maks)	Bcl-X Ort. ±SD (Min-Maks)	Fas Ort. ±SD (Min-Maks)	Glycodelin Ort. ±SD (Min-Maks)	TUNEL Ort. ±SD (Min-Maks)
50 milyon /ml < (n:53)	20,52± 17,74 (2,00-88,00)	98,13±89,59 (6,00-356,00)	117,67±81,66 (4,00-328,00)	92,92±83,94 (6,00-330,00)	14,00±10,42 (1,00-50,00)
50,1- 100 milyon /ml (n: 25)	17,20±15,12 (4,00-60,00)	57,16±65,83 (8,00-260,00)	90,28±76,51 (18,00-302,00)	62,48±70,78 (8,00-290,00)	12,28±8,74 (2,00-35,00)
>100,1 (n:22)	20,81±17,30 (2,00-60,00)	56,45±62,72 (3,00 -270,00)	61,36±70,63 (4,00-292,00)	53,09±53,36 (10,00-210,00)	7,72±7,40 (2,00-36,00)
Total Σ (n:100)	19,76±16,92 (2,00-88,00)	78,72±80,81 (3,00-356,00)	98,44±80,62 (4,00-328,00)	76,55±76,39 (6,00-330,00)	12,19±9,66 (1,00-50,00)
$P<0.05$, Mann Whitney U test	0,708	0,120	0,002	0,032	0,008*

8. Sperm sayısı ile, (<100 milyon /ml ve >100 milyon /ml karşılaştırıldığında) Fas ve TUNEL sonuçları arasında istatistiksel farklılık olduğu ($p<0,05$), diğer İHC sonuçları arasında istatistiksel farklılık olmadığı $p>0,05$ saptandı.

	p53 Ort. ±SD (Min-Maks)	Bcl-X Ort. ±SD (Min-Maks)	Fas Ort. ±SD (Min-Maks)	Glycodelin Ort. ±SD (Min-Maks)	TUNEL Ort. ±SD (Min-Maks)
100 ≤ (n:78)	19,46±16,92 (2,00 -88,00)	85,00±84,51 (6,00-356,00)	108,89±80,58 (4,00 -328,00)	83,16±80,77 (6,00-330,00)	13,44±9,89 (1,00-50,00)
100 ≥ (n:22)	20,81±17,30 (2,00 -60,00)	56,45±62,72 (3,00 -270,00)	61,36±70,63 (4,00 -292,00)	53,09±53,36 (10,00 -210,00)	7,72±7,40 (2,00-36,00)
Total Σ (n:100)	19,76±16,92 (2,00 -88,00)	78,72±80,81 (3,00-356,00)	98,44±80,62 (4,00-328,00)	76,55±76,39 (6,00-330,00)	12,19±9,66 (1,00-50,00)
$P<0.05$, Mann Whitney U test	0,659	0,136	0,002	0,100	0,003*

10. Hastaların Spermiyogram Sonuçlarının Sperm Sayılarına Göre Karşılaştırılmasında, Sperm Sayısının >100 milyon/ml Olması, 3° hareketlilik %, Normal Morfoloji ve Swim up % si ile istatistiksel olarak çok anlamlı olduğu saptandı (p<0,000).									
Sperm sayısı n:100	Hareketsiz %	1° %	2° %	3° %	Normal %	Baş %	Boyun %	Kuyruk %	Swim-up %
100 milyon /ml ≤ (n:78)	32,06±21,52 (5,00-98,00)	20,56±10,70 (0,00-50,00)	38,52±14,79 (0,00-65,00)	8,46±7,52 (0,00-40,00)	2,61±2,50 (0,00-13,00)	90,88±5,74 (72,00-100,00)	3,89±2,61 (0,00-12,00)	2,62±2,15 (0,00-10,00)	13,93±21,69 (0,00-115,00)
100,1 milyon /ml ≥ (n:22)	23,63±13,81 (5,00-70,00)	19,31±8,76 (10,00-35,00)	41,36±9,15 (10,00-50,00)	15,68±8,06 (0,00-30,00)	5,09±2,79 (2,00-11,00)	88,86±4,20 (80,00-96,00)	3,54±1,47 (1,00 -7,00)	2,50±1,84 (0,00-6,00)	65,36±44,81 (4,00-170,00)
Total Σ (n:100)	30,21±20,33 (5,00-98,00)	20,29±10,28 (0,00-50,00)	39,15±13,76 (0,00-65,00)	10,05±8,18 (0,00-40,00)	3,16±2,75 (0,00 -13,00)	90,44±5,48 (72,00-100)	3,82±2,40 (0,00-12,00)	2,60±2,07 (0,00-10,00)	25,24±35,36 (0,00-170,00)
p>0.05,Mann Whitney U test	0,103	0,649	0,403	0,000	0,000	0,075	0,843	0,952	0,000

5. TARTIŞMA

Sperm DNA yapısı ve kapasitasyonun moleküler mekanizmalarının anlaşılması, başarılı fertilizasyon ve embriyo gelişimi için önemlidir. Sperm morfolojisi, hücre membran yapısı ve DNA içeriği bu süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada DNA fragmentasyonu ve kapasitasyon mekanizmalarının, erkek infertilitesindeki önemini göstermek üzere, sperm yaymalarında indirek immunohistokimyasal ve TUNEL yöntemleri kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. Apoptotik süreçte rol oynayan p53, Bcl-X ve fas moleküllerinin ve kapasitasyonda önemli rol oynayan transmembran proteini olan Glycodelin'in sperm yaymalarındaki dağılımları avidin-biotin peroksidaz yöntemi ile incelenmiştir. DNA fragmentasyonu ise TUNEL yöntemi ile değerlendirilmiştir. Bu moleküllerdeki dağılımların hastaların klinik bulguları ile karşılaştırmalı korelasyonları yapılmış olup, açıklanamayan infertilite olgularında ve kaliteli sperm seçiminde DNA fragmentasyonunun ve Glycodelin'in önemli parametreler olduğu belirlenmiştir.

Sperm DNA bütünlüğünün korunmuş olması; başarılı bir gebelik ve genetik materyalin sonraki kuşaklara taşınması açısından büyük önem taşır. Birçok çalışma; üremeye yardımcı tekniklerin kullanımının ardından tekrarlayan başarısızlıklarda erkek faktörünün önemini ortaya koymuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sperm kromatin yapısı ve DNA bütünlüğünün fertilizasyonun gerçekleşmesindeki rolü gösterilmiştir (40). Ejekulatta DNA hasarlı sperm oranının artması (>%30-40) ve spermin genetik yapısındaki bozulma erkek infertilitesinde önemli rol oynamaktadır (44,45). Denatüre ve fragmente DNA taşıyan spermiyum oranlarının sperm parametrelerindeki bozulma ile anlamlı bir ilişki gösterdiği (43,44), idiopatik infertilite vakalarının yaklaşık % 20'sinde yüksek oranda sperm DNA fragmentasyonu olduğu bildirilmiştir. İnfertil erkeklerde sperm kromatin defekti ve DNA kırıklarının fertil hastalara göre daha fazla olduğu da gösterilmiştir (37,40).

Aynı zamanda, tekrarlayan düşükler gözlenen hasta gruplarında yüksek oranda sperm DNA kırıkları saptanmıştır (46,47).

Fertilizasyon, yarıklanma, implantasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarının çeşitli indeksleri ile de DNA hasarının dereceleri arasında olumsuz ilişkinin çok yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir (37). Sperm DNA hasarının belirlenmesi, fertilite oranının saptanmasında ve embriyonun karşılaşacağı risklerin belirlenmesinde önem kazanmaktadır.

Sperm DNA hasarının saptanmasının embriyo oluşum ve gelişiminin belirlenebilmesindeki önemini gösteren farklı çalışmalar mevcuttur (48,49). DNA bütünlüğü korunmamış bir sperm ile oositin fertilizasyonunun gerçekleşebileceği, hatta gebelik oluşabileceği; ancak gebeliğin devamının gerçekleşme olasılığının çok düşük olduğu bilinmektedir. Bu nedenlerle; erkek infertilitesi tanı ve tedavisinde sperm DNA hasarının olup olmadığının değerlendirilmesi önem taşımaktadır (40).

Yardımcı Üreme Yöntemlerinden in vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında, DNA hasarı olan sperm oranı $> \%4$ olduğunda, fertilizasyon oranlarının %58'den %38'e düştüğü bildirilmiştir ($p<0.05$) (49). IVF programına alınan erkeklerde sperm sayısı, hareketliliği gibi semen parametreleri ile DNA fragmentasyonu arasında negatif korelasyon bulunmaktadır (51). İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulamalarında ise, DNA hasarlı spermiyum ile fertilizasyonun gerçekleşebildiği ve embriyonun genetik yapısının bu hasarla oluşumunun sağlandığı bildirilmiştir (52,53). ICSI' nin özellikle erkek faktörüne bağlı olarak sperm kalitesinin bozuk olduğu olgularda önerildiği dikkate alınırsa, DNA hasarlı spermiyum ile fertilizasyon riski de artacaktır. Lopes, DNA hasar sıklığı ile ICSI sonrası fertilizasyon oranları arasında anlamlı ölçüde negatif bir ilişkinin varlığına dikkat çekmiştir (52).

Fertilizasyon oranı %20' nin altında kalan olguların %75'inde spermler ileri derecede ($>\%25$) DNA kırığı içermekteyken, fertilizasyon arttıkça ($>\%80$) hasarlı sperm taşıyan olgu sayısı da azalmaktadır (%0). Yüksek oranda DNA hasarlı sperm içeren semen örnekleri kullanılarak yapılan ICSI olgularında, morfolojisi normal sperm kullanılırsa, fertilizasyon ve gebelik oranlarının DNA hasarlı sperm oranları ile ilişkili olmadığı da bildirilmiştir (50).

Çalışmamızda hastalardan elde edilen spermiyogram sonuçları ile DNA hasar mekanizmasında rol oynayabileceği düşünülen faktörler (p53, Bcl-X, Fas) karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Yaş, evlilik süresi, infertilite tipi, korunma süresi, sigara, alkol ve kahve tüketimi, geçirilmiş enfeksiyonlar ve operasyonlar ile belirtilen antikorlar ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. İnfertilite kliniğine başvuran ve gönüllü 100 erkek hastadan alınan sperm örneklerinin değerlendirmelerinde, yaş, sperm kalitesini etkileyecek hastalık geçirme öyküsü, kahve içme öyküsü ile immunohistokimyasal ve TUNEL boyamaların istatistiksel olarak anlamlılık göstermediği ($p>0,05$); buna karşın, sperm kalitesini etkileyecek operasyon geçirme öyküsü ile TUNEL yüzdesi ve sigara içimi ile Fas immunoreaktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı arttığı izlenmiştir. Sperm sayısının düşük olduğu örneklerde ise TUNEL yüzdesi ve Fas immunoreaktivitesinin anlamlı olarak artmış olduğu, sıcak ortamlarda çalışan, kimyasal maddelere maruz kalan ve stresli mesleklerde çalışanlarda TUNEL yüzdesi artmış olarak izlenmiştir.

Çalışmanın yapıldığı yaş aralığında (23-47 y), evlilik ve korunma süresi, infertilite tipi ve tüketilen alkol, kahve ve ilaç kullanımları ile DNA hasarında rol oynayan faktörler arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunamamış olmasının, çalışmanın kısıtlı sayıda hasta üzerinde yapılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. İnfertilite polikliniğine başvuran hastaların yaş aralığı, çocuk sahibi olmak istenen bir yaş aralığı olduğundan, daha ileri yaşlardaki bireylerden elde edilecek sperm örneklerinde yaşa bağlı olarak DNA hasarlarının gözlenebileceği düşünülmüştür. Geçirilmiş varikosel, tek taraflı orşiektomi ve inguinal herni operasyon öyküsü olanlarda TUNEL pozitif hücrelerin artışının ($p<0,05$) ve DNA hasarının gözlenmesi, bu operasyonların infertilite açısından önem taşıdığını düşündürmektedir. Kabakulak öyküsü bulunan hastalarda TUNEL pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bunun nedeninin kabakulak geçirme öyküsü olanlarda, orşit hikayesinin bulunmaması olarak düşünülmüştür. Özellikle ileri yaşta kabakulak geçirenlerde komplikasyon olarak orşit olması durumunda sperm parametrelerinin etkilenebileceği düşünülmüştür.

Spermde DNA hasarlarının hangi nedenlerle olduğu tam olarak saptanamamıştır. Ancak çeşitli çalışmalarda anormal hücre metabolizması, oksidatif stres, inflamasyon, genetik ve çevresel faktörler, uzun süren cinsel perhiz, ileri yaş, sigara kullanımı, testislerin anormal sıcaklığa maruz kalması, varikozel varlığı, hava kirliliği gibi nedenlerin sperm DNA bütünlüğünün korunmasını bozarak DNA kollarında hasara neden olabileceği gösterilmiştir. Serbest oksijen türevlerinin (ROS) spermiyumda kromatin kondansasyonunu engelledikleri bildirilmiştir (51). Kromatinde yeterli kondansasyon oluşmaz ise sperm DNA'sı kırık oluşmasına duyarlı hale gelmektedir (54). DNA hasarı oluşan sperm, DNA tamir mekanizmalarını kullanabilir; mekanizmalardan kaçarak hasarlı olarak çoğalmasına devam edebilir; maturasyon duraklaması şeklinde herhangi bir spermatogenez seviyesinde duraklayabilir; ya da hücre ölür. Sperm DNA yapısındaki hasarlar, fertilizasyon başarısızlığı, embriyo gelişiminin durması, kötü veya yavaş embriyo gelişimine neden olarak gebelik şansını olumsuz yönde etkileyebilmektedir (54).

Memelilerde spermiyogenez akrozom gelişimi; dinamik bir aksonemden oluşan kuyruğun organizasyonu ve çekirdek yoğunlaşması ile karakterizedir. Spermatogenez seri hücrelerinin kromatin yapısında gelişim, diğer somatik hücrelerden farklı olarak izlenmektedir. Spermiyogenezin başlangıcında haploid spermatidler tipik nukleozomal kromatin yapısı gösterirler. Bu evrede düşük ribozomal olmayan RNA transkripsiyon aktiviteleri vardır. Ancak, spermiyogenez ilerledikçe, kromatin yapısı düz kromatin haline dönüşür ve artık transkripsiyon yapmazlar (55). Spermatogenez ve spermiyogenez sırasında, çekirdek kondansasyonu olaylanırken DNA yapısındaki histon proteinleri yerine, daha stabil olan protamin proteinleri geçer (56). Spermatosit ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde somatik histonların ve testise spesifik TH1 ve TH2B histonların; ileri evre spermatidlerde TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin; daha ileri evrede ise protamin P1 ve P2 proteinlerinin yer aldığını gösterilmiştir (57). Memeli spermindeki kromatinin oldukça sıkı ve stabil yapısından sorumlu ana faktör; protaminler içindeki ve arasındaki disülfid bağlarına çapraz bağlanmadır (58).

TP1 eksikliğinde sperm motilitesi bozulmakta ve fertilizasyon kapasiteleri azalmaktadır. TH1 ve TP1 proteinlerinin kromatin kondansasyonunda ve genin

inaktivasyonunda rollerinin kısıtlı olduğunu ve geçiş proteinlerinin spermiyogenezde önemlerinin büyük olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmalar TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin DNA'nın bütünlüğünü koruyarak, protaminlerin kromatin üzerinde daha sağlam yerleşmelerini sağladığını ortaya çıkarmıştır. TP2 geninin regülatör bölümü spermatidlerde CAT (chloramphenicol acetyltransferase reporter) genini etkileyerek mRNA translasyonunu geçici olarak 6 gün geciktirmektedir. Bu süreç içerisinde konfigürasyonundaki değişiklikler nedeniyle kromatinin dış faktörlere hassasiyeti artar. Transkripsiyondaki bu duraklama sayesinde, DNA'da meydana gelebilecek hasarlar da engellenmiş olmaktadır (59).

Diğer yandan, TP1'in de DNA kırıklarında tamir edici rolü bulunduğu gösterilmiştir (60). Normal spermiyogenezde spermatidlerde histonların uzaklaştırılması sırasında, bir endonukleaz olan topoizomerez-II, DNA iplikçiklerinden birini keserek aradan bir parçayı çıkarır. TP1 bu araya girer ve DNA'nın fosfat gruplarıyla etkileşerek açıklığı doldurur. Bu sırada bir DNA ligaz enzimi de TP1'in iki ucunun orijinal DNA iplikçiğine bağlanmasını sağlar. Daha sonra ortama gelen protaminlerde TP1 üzerine tutunurlar. Yan yana gelen kromatinler üzerindeki protaminler arasında disülfid bağları oluşarak, kromatin iplikçiklerinin birbirlerine yaklaşmasını ve kondensasyonu gerçekleştirirler. Bu mekanizma, TP1 eksikliğinde oluşan kromatin kondensasyon bozulmasını açıklamakta ve geçiş proteinlerinden TP1'in DNA tamirinde önemli rol oynadığını göstermektedir.

İnflamasyon, sigara ve serbest oksijen türevleri spermde kromatinin kondanse hale geçmesini engeller. Kromatinde yeterli kondansasyon gelişmez ise sperm DNA'sı da kırılmaya karşı hassaslaşır. Protaminlerdeki anomali veya eksiklik kromatinin paketlenmesini bozarak sperm kalitesini ve fertilizasyon kapasitesini azaltmaktadır (58).

İnsan sperminde DNA içerik çalışmaları ve sperm DNA kalitesinin değerlendirilmesi IVF ve ICSI gibi Yardımlı Üreme Tekniklerinin (YÜT) kullanımının artışı ile gerekli hale gelmiş ve önem kazanmıştır. Sperm DNA hasarı, rutin sperm parametrelerine (sayı, motilite ve morfoloji) ek olarak değerlendirilmesi önemlidir. Germ hücreleri üzerinde hafiften orta dereceye kadar olan genotoksik ve sitotoksik etkiler apoptozu

indüklemektedir. Somatik hücrelerden farklı olarak ejakülat sperminin apoptoza uğrama kapasitesi tam olarak bilinmemektedir (61,62). Erkek infertilitesi apoptotik belirteçleri yüksek olan spermiler ile artan düzeyde pozitif ilişkili görülmektedir (62,63). Ejekulat sperminde immatür sperm varlığının, artan apoptotik belirteç düzeyleri ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (62). Programlı hücre ölümü olan apoptozun DNA hasarlanması ile ilişkisi olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (64). Hasarlı DNA'sı olan spermilerin seçimini belirleyen bir mekanizma olduğu düşünülse de apoptozla elenemeyen hasarlı sperm ile fertilizasyon gerçekleşebilmektedir (61).

İnfertiliteye neden olan ROS, çevresel toksinler ya da hormonal faktörler, intrinsek ve ekstrinsek mekanizmaları tetikleyerek apoptoza yol açmaktadır. Ekstrinsek yolla, tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör ailesinin üyeleri olan reseptörler görev alır. Apoptoz, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ve tümör nekroz faktörün (TNFR-1) ilgili ligandları (FasL ve TRAIL) ile etkileşime girmesi sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı alınmış olduğundan bir seri protein: protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD ("TNFR-1 associated death domain") ve FADD ("Fas associated death domain") ile ilişkiye girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktive ederek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatır. İntrinsek yolla ise mitokondri rol oynar. DNA hasarı, radyasyon gibi stres koşullarında mitokondriden sitokrom c salınır. Sitokrom c, kaspazlar için muhtemel bir aktivatördür. Daha sonra devreye efektör kaspazların da girmesiyle apoptoz başlar (65,66). Sperm DNA'sındaki hasarın ve apoptozun belirlenmesi, erkek infertilitesinin potansiyel ve kullanışlı belirleyicileri olarak kabul edilmektedir. Apoptoz ile ortaya çıkan, germ hücre kaybı spermatogenez sırasında oluşan dominant bir süreçtir ve p53, p21, kaspaz, Bcl-2 ve Fas düzeylerince değişik yollarla ayarlanır. Spermiyogram sonuçları normal olan örneklerde Fas ekspresyonlu sperm sayısı düşük, fakat anormal parametrelili örneklerde yüksek bulunmuştur (61). Ejakülatındaki DNA hasarlı spermilerin değişken oranda yüzdesi Fas, fosfotidilserin, p53, Bcl-X gibi apoptotik markerlerin saptanması ile gösterilebilir ve bu

faktörlerin semen örneklerinden apoptotik olmayan spermilerin seçilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir (42,67).

Çalışmamızda anti-p53, anti-Bcl-X ve anti-Fas primer antikorları kullanılarak yapılan indirek immunohistokimyasal değerlendirmede, p53 immunoreaktivitesinin TUNEL pozitif hücre yüzdeleri ile; Bcl-X immunoreaktivitesinin Fas, Glycodelin ve hareketsiz sperm yüzdeleri ile istatistiksel olarak anlamlı korelasyon gösterdiği izlendi. Fas immunoreaktivitesinin, sperm sayısı düşük, hareketliliği az, morfolojisi bozuk örneklerde artmış olduğu izlenirken, normal spermiyogram örneklerinde düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,01$).

p53, DNA bağlayıcıdır ve transkripsiyon aktivasyon alanı tümör baskılayıcısı içermektedir. P53 büyümenin durdurulması ve stres sinyallerine yanıt olarak apoptoz ile ilgili genlerin artmasını sağlar. Böylece programlanmış hücre ölümü, hücre farklılaşması ve hücre siklus kontrol mekanizmalarını etkilemektedir. Bcl-X, Bcl-2 ailesinin üyesidir ve apoptozis inhibisyonu ile hücrelerin canlı kalmasını düzenler (68).

Fas, Fas ligand ile etkileşime girerek spermde apoptozun ekstrensek yolakla aktivasyonunu sağlamaktadır. Hücre içi düzenleyici kaspazların aktivasyonu ve sonrasında efektör kaspazların aktivasyonunu sağlayarak, hücrede DNA fragmentasyonu oluşumunu arttırmaktadır. Rutin spermiyogram örneklerinin anti-Fas primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi spermin DNA içeriği hakkında bilgi vermesi açısından önemli olduğu düşünülmüştür.

p53, Bcl-X ve Fas immunoreaktivitelerinin anormal sperm örneklerinde artmış olarak bulunması, sperm normal yapısının bozulduğunu ve DNA hasarının oluştuğunu göstermektedir. Çalışma sonuçlarımız apoptozun indüklenmesinde intrinsek mekanizmaların yerine, daha çok ekstrensek mekanizmaların aktif olarak çalıştığı ve ekstrensek yolak aktivasyonu ile hücrede DNA hasarının oluştuğunu düşündürmüştür. DNA hasarı oluşuktan sonra DNA hasar mekanizmalarının aktivasyonu gerçekleşmekte, ancak tamir mekanizmalarının yetersiz kaldığında apoptoz geri dönüşümsüz olarak tetiklenmektedir.

Spermatogenez sürecinde, Sertoli hücreleri tüm germ hücreleri mayoz I'e girdiğinde %50-60 olarak apoptozun indüksiyonundan sorumludur. Bu hücreler fas tipi apoptotik markerlar ile tanımlanırlar ve Sertoli hücreleri tarafından fagositozla elimine edilirler. Fakat bu mekanizma her zaman etkili biçimde işlemez ve bu defektif germ hücreleri değişen yüzde oranlarda spermatogenez sırasında spermin yeniden yapılandırma süreçlerini geçer ve ejakülatta görülebilir. Burrello ve ark. germ hücrelerindeki genomik kalite bakımından hücreler arasında bir ayrılma olduğunu ve bu ayrılmanın spermatogenez süreçleri sırasında, spermin yeniden yapılandırmasında oluştuğunu bildirmiştir (69). Germ hücresinin çekirdeği apoptoz ya da anöploidi ile bozulmuş olabilir ancak, bu durumda sperm hala normal morfolojili olarak görülebilir. Rutin morfoloji incelemelerinde ayırt edilemeyen DNA hasarların anti-fas primer antikoru ile indirek immunohistokimyasal yöntemi ile değerlendirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür (35).

Spermde DNA hasarının tespit edilmesi için kullanılan diğer bir yöntem TUNEL testidir. TUNEL pozitifliği apoptoz ile eş anlamlı değildir, ancak hidroksi radikalleri veya iyonize radyasyon tarafından indüklenme sonucu oluşan DNA fragmentasyonu TUNEL testi ile pozitif bir test sonucu olarak tespit edilebilir. TUNEL yöntemi ile yapılan bazı çalışmalarda infertil erkeklerin ejakülat spermelerinde yüksek oranda DNA fragmentasyonu saptanmıştır. Fragmente DNA içeren sperm yüzdesinin IVF ve ICSI'de fertilizasyon oranlarıyla negatif ilişki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda da endojen DNA hasarları olan ejakülat sperm yüzdesi, ile fertilizasyon oranlarının yüzdesinde azalma, fertilité başarısızlığı ile ilişkili bulunmuştur (61,70).

Glander ve Schaller'in, 1999 yılında yaptıkları çalışmada ejakülattaki apoptotik sperm yüzdesi ile motilite arasında pozitif bir ilişki (70), Oosterhuis ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı çalışmada ise apoptotik sperm ile hem sperm motilitesi hem de konsantrasyonu arasında negatif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (71,72). IVF için kullanılan spermelerin DNA fragmentasyon değerleri TUNEL ile ölçüldüğünde, gebelik oluşumu ile anlamlı olarak korelasyon saptanmıştır (Borini et al. (73). Ancak Bungum ve ark. SCSA ile ölçülenlerde anlamlı korelasyon bulunmadığını bildirmiştir (74).

Çalışmamızda, infertilite polikliniğine başvuran hastalardan elde edilen anamnez, özgeçmiş ve soygeçmiş değerlendirmeleri ile spermiyogram sonuçları karşılaştırıldığında, TUNEL pozitif hücre sayısının sperm sayısının ve hareketinin az olduğu vakalarda, önceden geçirilmiş varikosel, orşiektomi gibi operasyon geçiren kişilerde daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, sigara kullanımı, meslek gruplarından ısıya maruz kalanlarda (fırıncılık, aşçı, pideci, demirçelik işçisi vs.), kimyasal ve toksik madde ile çalışanlarda (laborant, boyacı, temizlik personeli, ayakkabı imhalat, mobilya, tekstil, işçi, madenci vs.), stresli işte çalışanlarda (üst düzey yönetici, uzman çavuş, öğretmen, polis, memur, çiftçi, işçi vs.) TUNEL pozitif hücre sayısının arttığı gözlenmiştir. Sperm oluşumu süreci içinde testis içerisinde vücut ısısından 1-2° düşük ısıda gelişimlerini sürdüren spermilerin devamlı yüksek ısıya maruz kalmaları sonucunda sayıca olmasa da DNA hasarı yönünden olumsuz yönde etkilendiği düşünülmüştür. Sperm örneğinin krem rengi yerine sarımsı olarak gözlenmesi TUNEL pozitif hücrelerin artışı ile beraberlik göstermiştir. Sarı renk oluşumuna neden olabilecek enfeksiyon varlığının ve burada oluşan reaktif oksijen bileşiklerinin varlığının DNA hasarına yol açtığı düşünülmüştür.

Fertilizasyon potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, standart sperm analizi sonuçlarına ek olarak TUNEL ve immunohistokimyasal yöntemlerle DNA hasarı olan spermilerin belirlenmesinin önemli olduğu düşünülmüştür.

YÜT aracılığıyla genetik hastalıkların aktarımı hakkında artan ilgi nedeniyle spermin genomik bütünlüğü araştırma konusu olmuştur. Normalde infertil çiftlerde, genetik anomalilerin geçişi yoktur, ancak YÜT uygulamaları ile bu anomaliler çocuğa geçmekte ve manipülasyonlar sonucu infertil popülasyonu artmaktadır. Bu teknolojilerin; birden çok doğum oranları, düşük doğum ağırlıkları, hipospadias, nöral tüp defektleri ve diğer konjenital olmayan anomaliler gibi birtakım major ya da minor konjenital anomaliler ilişkili olduğu bilinmektedir. Anormal spermlerdeki DNA hasarına karşı artmış olan duyarlılık, başarısız kromatin kondansasyonundan kaynaklanır ve bu da DNA'yı hasara karşı daha açık hale getirir. Bu yüzden ejakulatta DNA fragmentasyonlu sperm bulunması sonucunda spermatogenezdeki defektler nedeniyle fertilite engellenir. Fertilizasyon süresi ve spermatogenez sırasında kromatin/DNA sağlamlığının önemli

rol oynadığını gösteren birçok kanıt bulunmaktadır. Çalışmalar sonucunda, DNA bütünlüğünün, sperm işlevinin objektif marker'ı olduğu öne sürülmüştür. DNA bütünlüğünü değerlendirme çalışmalarının, infertil erkeklerin YÜT'lerin tercih etmesi için önemli diagnostik ve prognostik bir role sahip olduğu düşünülmüştür (37).

Spermilerin DNA hasarına rağmen etkin bir şekilde oositi fertilize edebileceği bildirilmiştir. Sperm DNA'sının kalitesi artan paternal yaş ile bağlantılıdır ve ileri yaştaki kadınlarda gebelik oranının azalmasını da arttırdığı gözlenmiştir (75).

Sperm DNA hasarının, testis seminifer tübüllerinden elde edilen spermelerde, duktus epididimisin kauda kısmında ya da ejakülatta bulunan sperme göre anlamlı olarak düşük olduğu gösterilmiştir. Uzun süreli infertilite veya belirli bir sebep olmadan YÜT ile tekrarlayan gebelik başarısızlıklarında, sperm DNA fragmentasyonu bir faktör olarak düşünülebilir ve sperm DNA fragmentasyonu düşük olan testiküler sperm kullanımı ile fertilizasyon başarısızlıklarının önlenebileceği düşünülmektedir (35).

Semen örneğinin yoğunluk gradient santrifügasyon ile izolasyonu sonrasında, oda sıcaklığı yada 37°C ile inkübasyonunun sperm DNA fragmentasyon seviyelerinin artışına neden olduğu gösterilmiştir (76,77).

Metafaz II oositin, DNA hasarlı sperm ile fertilizasyonu embriyo gelişiminde defektlere, implantasyon başarısızlıkları ya da düşük oranlarında artışa sebep olmaktadır. DNA tamir mekanizmaları işlevsel olan olgun oositler, orta dereceli sperm DNA hasarlarını tamir edebilme yeteneğindedir. Bununla birlikte DNA tamir mekanizmaları, endojen (serbest radikaller) veya eksojen (radyasyon, çevresel toksik maddeler) faktörler tarafından hasar görmüş oositlerde tamir mekanizmaları işlevsel olmamaktadır (35).

Testislerde spermi üretimi ve olgunlaşması Sertoli hücrelerinin desteği ile gerçekleşmektedir. Bu olayın sağlıklı devamlılığı, Sertoli hücrelerinin sayısı ile spermatogonia sayısı arasındaki belirli orana bağlıdır. Çünkü zaten çoğalma kapasitesi olmayan Sertoli hücreleri sadece belirli sayıdaki spermatogoniumları destekleyebilir. Yani, mayoz bölünmeye girecek spermatogonium sayısı sınırlıdır.

Eğer spermatogonia sayısı, Sertoli hücrelerinin destek kapasitesini aşarsa, fazla hücreler apopitoz ile parçalanır (50).

Deneysel çalışmalarda germ hücrelerinin apopitozunda testosteronun da etkili olduğu bildirilmiştir (78). Spermatogenez sırasında apopitozun başlatılmasında etken bir başka faktör ise germ hücreleri ve lökositlerden kaynaklanan ROS yapımı ve miktarı ile ilişkilidir (64,79). İnsan spermi ile yapılan çok sayıdaki çalışmada hücre ölümü ile ROS üretimi arasında sıkı ilişki bulunduğu vurgulanmıştır (80,81). İnflamasyon hücreleri salgıladıkları sitokinler ile apopitozu başlatabilir (82). Çalışmamızda, sarı renkli olarak elde edilen ve enfeksiyon yönünde değerlendirilen semen örneklerinde TUNEL pozitif hücrelerin çok sayıda olduğu ve bu örneklerde as immunoreaktivitesinin artmış olduğu gözlenmiştir.

DNA hasarlı sperm kullanılarak başarılan fertilizasyonun uzun süreli klinik sonuçları bilinmemektedir. İnfertil erkeklerde DNA hasarlı spermiyum sayılarının anlamlı ölçüde artması, YÜT kullanılarak doğal bariyerler atlandığı için, oldukça önem kazanmaktadır. Doğal yolla fertilizasyon olduğunda, tuba uterinalara tutunan spermlerin, tutunmayanlara göre daha fazla oranda sağlam DNA'ya sahip bulunduğu bildirilmiştir (83). Doğal olarak gelişen fertilizasyon sırasında, DNA'sı sağlam spermin seçildiğini göstermektedir.

IVF/ICSI uygulamaları sırasında sperm seçimi yapıldığı için ve özellikle semen değerleri bozuk olan erkeklerde hasarlı genetik materyal taşıyan hücre sıklığı da artmış olacağından, bunlarda DNA hasarlı hücre kullanma riski de ortaya çıkmaktadır. DNA üzerinde yapılan testlerden elde edilen sonuçlar fertilizasyon ve sonrası olaylar hakkında sadece tahmini fikir vermektedir. Çünkü, her ne kadar laboratuvar çalışmalarında güvenilirliği yüksek testler kullanılarak bu hasarlar gösterilebilse de, fiksasyon, denatürasyon ve boyama işlemleri sırasında hücrede kalıcı dejenerasyon oluşturdıklarından, IVF/ICSI'de kullanılmak üzere seçilen spermde bunu göstermek mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla, ÜYT'de kullanılacak semen örneğinin sadece bir kısmında araştırma yapılmakta ve burada saptanan DNA hasar oranı tüm semene yorumlanmaktadır.

Sperm DNA kalitesi bozulduğunda IVF oranlarının düşmesine rağmen, normal fertilizasyonu engellemediği bildirilmiştir. DNA hasarı için, fertilizasyonun gerçekleşebildiği, ancak embriyo gelişiminin bozulabildiği bir eşik değerin bulunabileceği önerilmektedir (48,49). Sperm, DNA hasarlarını tamir etme kapasitesine sahip endonukleaz aktivitesi içermektedir (84). Ancak DNA hasarlı spermin yetersiz ya da yanlış tamiri, de novo genetik mutasyonların gelişmesi ile de sonuçlanabilir (85).

Son zamanlarda yapılan bilimsel çalışmalar ile sperm başı içerisinde gözlenen vakuol oluşumlarının DNA hasarı ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir. İnfertilite tedavisinde uygulanan klasik mikroenjeksiyon yöntemi ile spermiler şekilsel olarak değerlendirilmekle birlikte sperm başı içerisindeki vakoul oluşumu görülememektedir. Ancak yüksek büyütmede sperm seçimi yaparak bu yapıları tespit etmek mümkündür. Yüksek mikroskopik büyütme ile normal yada normale en yakın yapıda olduğu saptanan spermin mikroenjeksiyonu işlemi intracytoplasmic morphology selected sperm injection (IMSI) ile gerçekleştirilebilmektedir. Sperm DNA hasarı yüksek olan hastalarda klasik mikroenjeksiyon yerine yüksek büyütmeli mikrokoplar kullanılarak sperm DNA hasarı daha az olan spermiler ile işlem yapılması daha başarılı sonuçlar elde edilebilmesini sağlanabileceği düşünülmüştür.

McPherson ve Longo ejakülat sperminde DNA kırıklarının bulunmasının spermatogenez sırasında tamamlanmamış kapasitasyonu belirttiğini bildirmiştir (35).

İlk kez 1952 yılında Austin, spermin fertilizasyon yeteneğini gerçekleştirebilmek için, zamana bağlı fizyolojik değişikliklere uğraması gerektiğini tanımlamak için “*kapasitasyon*” terimini ortaya atmıştır. Kapasite olmuş bir spermin plazma membranı, fertilize olmamış bir oositin zona pellusidası ile temas ettiği zaman akrozom reaksiyonu gerçekleşir. Bu reaksiyon, spermin zona pellusidaya penetrasyonu ve oosit sitoplazması içine girebilmesi için gereklidir (86).

Kapasitasyon 50 yıl önce tanımlanmış olmasına rağmen, moleküler olayların temelini oluşturan, başarılı bir kapasitasyon ve fertilizasyon için gerekli olan bikarbonat, kalsiyum ve serum albumini gibi moleküllerin önemi son zamanlarda anlaşılmaya başlanmıştır (86).

Ejekülat içindeki spermier, fertilizasyon için servikal mukusu geçerek dişi üreme sisteminin üst kısımlarına ulaşmak zorundadır. Servikal mukusun; sperm taşınımının düzenlenmesi, spermierin morfoloji ve hareketlerine göre seçilmeleri, endoservikal epitelin bakteri invazyonu ve sıvı kaybına karşı korunmaları ve kapasitasyonun başlatılması gibi birçok işlevleri bulunmaktadır (15).

Kapasitasyon, genellikle Zona Pellusida veya progesteron gibi fizyolojik indükleyicilere yanıt olarak akrozom reaksiyonuna uğramış spermierin yeteneği olarak değerlendirilmiştir. Kapasitasyon, dişi üreme sisteminde başlar ve akrozom reaksiyonu bu süreçlerin tamamlandığını gösterir. Seminal plazmanın bazı bileşenleri, ejekülatta bulunan spermierin yüzeyine tutunmuştur. Bu bileşenlerin çoğu spermierin uterus tüplerine ulaşmaları sırasında uzaklaştırılmaktadır ve bu kapasitasyon için gereklidir.

Sperm yalnızca ejekülasyondan sonra, seminal plazmada bulunan kapasitasyon faktörlerine maruz kalır. Sperme, kapasitasyonda rol oynayan bu faktörlerin hızlı bağlanması ejekülat spermierinin vajinada kapasite olmamış durumda kalmasını sağlamak için önemlidir. Öte yandan bu faktörlerin spermierin servikal mukusu geçişi sırasında kaldırılabilmesi kapasitasyonun başlatılmasına olanak sağlar (15).

Sperm yüzeyine Glycodelin S' (Gd S) in hızlı bağlanması ve ayrılması kapasitasyon mekanizması ile uyumludur (13). Seminal plazmada bulunan Gd S düzeyleri farklı dağılım göstermektedir. Yüksek seminal plazma Gd S düzeyleri, yüksek sperm yüzey Gd bağlanma sonuçları ile ilişkili değildir. Seminal plazma Gd S'i bilinen semen analizinin diğer parametreleri ile korele bulunmamıştır. Fertilizasyon için gerekli olan, kapasitasyonun baskılanmasında Gd S'nin önemi bilinmesine rağmen, seminal plazmadaki Gd S seviyeleri ve hücreye bağlı Gd S seviyeleri kesin olarak hala bilinmemektedir (2).

Yaptığımız çalışmada, sperm yaymalarında indirek immunohistokimyasal yöntemle GdS immunoreaktivitesinin değerlendirilmesinde morfolojik olarak normal izlenen spermierde orta derecede immunoreaktivite izlenirken, morfolojik olarak baş, boyun ve kuyruk anomalisi gösteren spermierde artmış immunoreaktivite, küçük baş ve immatür spermierde ise hafif immunoreaktivite izlenmiştir. Bu bulgular Gneist ve ark.

çalışmaları ile uyumlu olarak bulunmuştur (2). Gd S immunoreaktivitesi Fas ve Bcl-X immunoreaktiviteleri ile istatistiksel olarak korelasyon gösterdiği saptanmıştır ($p<0,01$). Hastaların klinik bulguları ile karşılaştırıldığında Glycodelin immunoreaktivitesi sperm hareketliliği ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkili olduğu izlenmiştir ($p<0,05$). Normal morfolojili spermelerde daha az gözlenen Gd S immunoreaktivitesinin başarılı fertilizasyon süreci için gerekli olduğu, Gd S immunoreaktivitesinin artmış olarak izlendiği anormal morfolojili spermelerin fertilizasyon alanına ulaşamayacakları ve kapasitasyon işlevi ve ardından akrozom reaksiyonu geçiremeyecekleri düşünülmüştür. Küçük baş ve immatür spermelerde ise immunoreaktivitenin az olarak saptanmasının sentez bozukluğu ile ilişkili olabileceği ve sperm işlevinin etkilenmiş olduğu düşünülmüştür.

Hücrelerde farklı olarak izlenen Gd S immunoreaktivitesi, tek hücre düzeyinde Gd S'in bağlanma yeteneklerinin farklı olduğunu göstermektedir. Morfolojik olarak normal spermelerde gözlenmesi erkek infertilitesinde Gd S'in sperm kapasitasyon mekanizmasının düzenlenmesinin önemli rolü olduğu ve sperm servikal mukus bariyerinin geçişi ve sperm-oosit etkileşiminde önemli olduğu düşünülmüştür. Morfolojik olarak anormal spermelerde artmış Gd S immunoreaktivitesi, sperm kapasitasyonunu başarılı bir şekilde gerçekleştirmesini engelleyebileceği düşünülmüştür (2).

Chiu ve ark. sperm servikal mukusu geçişi sonrasında immunoreaktivitenin azalması nedeniyle Gd'in önemli olduğunu bildirmiştir. Çoğunlukla farklı yüzey özellikleri olan sperm arasında, fertilizasyon için en uygun sperm serviksi geçebilmektedir. Servikal mukusu geçişi sonrası, Gd S'in kaldırılması ile sperm Gd F'in bağlanması prematür akrozom reaksiyonunu önlemektedir. Kumulus hücreleri de, sperm fertilizasyon yeteneğini yapılandırmak için Gd F'i kaldırılmasında önemlidir (13).

Sperm Gd S immunoreaktivitesi, servikal mukusu penetrasyonu sonrasında büyük ölçüde azaltılmış olur. Yapılan çalışmalar, Gd S'in kapasitasyon faktörü olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar sperm ve servikal mukus arasındaki etkileşimin

dekapasitasyon faktörlerinin kaybı ile sonuçlanması bulgularıyla uyumludur. Gd S, servikal mukus tarafından kapasitasyonun başlatılması için bir moleküler temel sağlar ve seminal plazma faktörlerinin kaldırılması. yani spermin kapasitasyon sürecinde önemli rol oynar (15).

Biyolojik olarak, kapasitasyonun düzenlenmesi ve akrozom reaksiyonu çok önemlidir, çünkü az sayıda sperm in vivo koşullarda fertilizasyon bölgesine ulaşabilir. Ayrıca oosit atılımı için bekleyebilirler ve bu sürede fertilizasyon potansiyellerini muhafaza etmek için akrozom bütünlüğüne ihtiyaç duyarlar (86).

Adenilat siklazlar (AC) / cAMP değişimi ile, plazma membran yapımı ve protein fosforilasyonunda önemli olduklarından, bu moleküller spermde; sitoplazmik ve plazma membran değişimlerini düzenlerler, böylece hücreler kapasitasyonunun tamamlanmasında ve akrozom reaksiyonunda ve fertilizasyonda önemli rol oynarlar.

Spermelerde eriyebilen AC (sAC)'un, sadece flagellumda, çoğunlukla da orta parça ve annulus kısmında yerleşik olduğu düşünülmektedir. Membranöz (mAC)'in bilinen düzenleyicileri spermelerin kapasitasyonunu desteklemektedir. Uygun reseptör varlığında sperm mAC aktivitesi çok sayıda G Protein-Coupled Receptor (GPCR) tarafından düzenlenir. Bu GPCR'ler adonezin, kalsitonin, adrenerjik ve odoran reseptörleri içermektedir.

sAC aktivasyonu cAMP'nin hızlı artışına yol açar ve Protein Kinaz A (PKA) bağımlı protein fosforilasyonu; ve daha sonrasında protein tirozin fosforilasyonunda artış gerçekleşebilir. Bu değişimler fosfolipid tabakasında karışıklığa yol açar, membranın iç ve dış yüzü arasına giren bir enzim plazma membranının fosfolipid asimetrisinde hızlı değişikliklere neden olur (86).

Spermde fosfolipid tabakaları arasında bulunan bir enzim olan scramble aktivasyonu iç yüzde yer alan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolaminin dış yüze geçmesine ve böylece membran stabilitesinin azalmasına neden olur. Dış yüzdeki lipidlerin görünümü, esas olarak akrozomal bölgede görülür, buna karşılık sAC flagellumun orta parçasında saptanmıştır. Bu scramble ile başlayan dengenin bozulumu membrandan

kolesterolün ayrılmasını kolaylaştırır ve kolesterolün kaybının kapasitasyon için önemli olduğu bilinmektedir

Kapasitasyonun en erken olayları sAC aktivasyonu tarafından başlatılan plazma membran yapısındaki değişiklikleri içermektedir. Bu membran değişiklikleri GPCR ve mAC gibi membran ile ilişkili proteinlerin konfirmasyonlarının değişimi aracılığıyla çok önemli “ana” işlevi sağlayabilir ve böylece ligand bağlayıcı bölgeler ve G protein bağlayıcı bölgeler ulaşılabilir hale gelir (86).

İn vivo olarak bikarbonat konsantrasyonları, spermin depolandığı epididimide genel vücut sıvılarına göre daha düşüktür. Sperm dişi üreme sistemine girdiği zaman, yüksek bikarbonat düzeyine maruz kalması spermi aktive edebilir ve sAC tarafından cAMP üretiminin devamlılığını sağlar. Buna karşın, mAC fonksiyonu adenozin, kalsitonin ve fertilization promoting peptide (FPP) gibi ilk haberci moleküller tarafından düzenlenmektedir. Bu moleküllerin seminal plazma ve dişi üreme sıvılarındaki konsantrasyonlarının in vitro fizyolojik olaylar için anlamlı olduğu gösterilmiştir (86).

İn vitro deneyler, ilk habercilerin spermdeki total cAMP üretimini anlamlı olarak değiştirdiği, başlangıçta cAMP üretiminin stimülasyonunu ve böylece kapasitasyonu hızlandırdığı, daha sonra cAMP üretimini ve spontan akrozom reaksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. mAC işlevinin düzenleyicileri, in vivo olarak memeli sperm işlevini düzenleyebilmektedir. Bu işlev, sağlam akrozomlu, kapasite olmuş bir spermin oluşumu ile sonuçlanır (86).

cAMP'in, AC tarafından sentezi ve fosfodiesterazlar (PDE) tarafından 5'AMP'ye metabolik yıkımı arasında denge bulunmaktadır. Şimdiye kadar memeli hücrelerinde toplam 11 PDE izoformu tespit edilmiştir ve her birinin yapısı, substrat seçimi, kinetikleri ve inhibitörlere yanıtları farklıdır. Çeşitli çalışmalar PDE 1 ve 4'ün sperm işlevinde rol oynadığını göstermiştir. Fisch ve ark. PDE 1'in spesifik inhibitörünün insan sperm süspansiyonlarında önemli derecede akrozom reaksiyonunu stimüle ettiğini belirtmiştir. Baxendale ve Fraser; PDE 1 ve 4 için spesifik inhibitörler kapasite durumda olmayan sperm süspansiyonları ile muamele edildiği zaman, cAMP düzeylerinde önemli bir artışa neden olduğunu, yalnızca PDE 4 inhibitörünün önemli derecede

kapasitasyonun hızlanmasına sebep olduğunu belirtmiştir. Böylece PDE lokalizasyonu ve kapasitasyonla ilgili fizyolojik fonksiyonlar arasında bir korelasyonun olduğu görülmektedir (86).

Kapasitasyon için kolesterol akseptörü olarak albuminin rol oynadığı gösterilmiştir. Sperm süspansiyonlarına eksojen kolesterol sülfat eklenmesi sonrasında, protein tirozin fosforilasyon inhibisyonu ve albümin azalması gözlenmiştir (87), Albümin içermeyen kültür ortamına yüksek yoğunluklu lipoprotein gibi kolesterol akseptörlerinin inklüzyonu ve β -siklodekstrinler, protein tirozin fosforilasyonu, progesterona yanıt olarak akrozom reaksiyonları in vitro fertilizasyonda başarıyla kapasitasyonu desteklemektedir (88). Yalnızca kapasite olmuş spermler zona pellusida glikoproteinlerine yanıt oluşturmak için akrozom reaksiyonuna uğramaktadırlar (89).

Son zamanda yapılan çalışmalarda, kapasitasyon sırasında spesifik kinazların tirozin fosforilasyonun düzenlenmesinde doğrudan rolleri olmamasına rağmen memeli sperminde birkaç tirozin kinazın mevcut olduğu gösterilmiştir. Aldolazlar gibi bazı tirozin kinazların fosfoproteinlerinin kapasitasyon sırasında glikolizde önemli rol oynayabilecekleri gösterilmiştir (86).

Plazma membran yapısındaki ilk sAC bağımlı değişiklikler; sperm yüzeyindeki moleküllerin ortadan kalkması, açığa çıkması ya da yeniden düzenlenmesi biçiminde ortaya çıkmaktadır. Kaybolan moleküller genellikle “dekapasitasyon faktörleri (DF)” olarak adlandırılır. Kapasitasyon kazanmış sperm “dekapasite” biçimine dönüşebilir ve kapasitasyonu tersine çevirebilir. Bu durum spermi infertil duruma getirir. Zamanla, sperm tekrar kapasite olabilir ve yeniden fertilite yeteneği kazanabilir. Bu, kapasitasyonun kendi kendine geri dönüşümlü olduğunu göstermektedir.

DF'nin kalsiyum ve ATPaz'ı aktive ettiği gösterilmiştir. Bu nedenle kapasitasyon sırasında DF kaybı ile ATPaz aktivitesi azalır ve hücre içi kalsiyumu yükselir. Kapasitasyon sırasında, hücre içi kalsiyumunda hafif bir artış meydana geldiği bilinmektedir (90).

Son zamanlarda, membran lipidlerinin rastgele dağıtılmadığı, ancak farklı alanlarda yığınlar olarak gruplandığı açıkça belirlenmiştir. Çok sayıda proteinin, bu kolesterol ve

sfingolipidden zengin yığınlarda yerleşim gösterdiği ve sinyal iletim yollarında aracılık ettiği gösterilmiştir (91). Kapasitasyonda sperm membran yığınlarındaki marker proteinlerinin dinamik organizasyonu sonucu gibi görünmektedir.

İn vivo koşullarda birkaç sperm fertilizasyon alanına ulaşabilmektedir. Kapasitasyon ve sonrasında oosit ile karşılaşana kadar akrozom bütünlüğünün bozulmaması sperm hücreleri için önemlidir. Böylece in vivo olarak bulunan GPCR ligandları, kapasite hücrelerdeki mAC kontrollü cAMP üretimini inhibe edebilir ve spontan akrozom reaksiyonunu önler (86).

Kapasitasyon normalde kalsiyum, bikarbonat ve albuminin fizyolojik konsantrasyonla bulunduğu dişi üreme sisteminde gerçekleşir. Çok sayıda endojen ve eksojen molekül, kapasitasyonu ve fertilizasyon yeteneğinin kazanılmasını düzenler ve sonrasında spontan akrozom reaksiyonunu önler. Bikarbonat ve kalsiyum tarafından dişi üreme sisteminde aktive edilen sAC, spermin kapasitasyona başlaması için en erken olayların kaskadının başlatılmasında rol oynamaktadır. Bu olay, çeşitli sperm GPCR'lerini aktive eder, böylece mAC stimüle edilir ve cAMP üretimi gerçekleşir, sonuç olarak DF molekülleri hızla ortadan kalkar. DF moleküllerinin kaybı sperm plazma membran yapısını değiştirmekte ve bunun sonucunda GPCR'lerin fonksiyonelliği değişmektedir. Sonuçta mAC / cAMP'nin ve spontan akrozom kaybının inhibisyonu ile fertilizasyon kapasitesi korunmaktadır. Bu zaman boyunca sAC işlevi devam ederken cAMP'nin son konsantrasyonunun etkisiyle mAC ve PDE'ler sperm fonksiyonunun düzenlenmesini sağlar (86). Chiu et. al., Gd'in insan ejakülat sperminin membran yüzeyine bağlandığını belirtmişlerdir (15). İstatistiksel anlamlı olarak morfoloji ile ilişkili glycodein bağlanmasının olduğunu gözlemlemişlerdir ($p < 0.05$). Baş, orta parça ve kuyruk yapılarının değerlendirildiği insan sperm hücrelerinin morfolojik incelenmesinde, normal morfolojiye sahip spermelerde, anormal spermelere göre Gd bağlanmasının minimal ya da daha az olduğu gösterilmiştir (25). Normal ve anormal spermeler arasındaki Gd dağılımının anlamlı farklılığı, yüzey örtüsünün erkek infertilitesi için önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Gd bağlanmasının fertilizasyon yeteneği için pozitif ya da negatif faktör olarak ele alınıp alınmayacağı hala tartışma konusudur. Bazı çalışmalarda spermin genetik içeriği ve sperm morfolojisi

arasındaki potansiyel ilişki araştırılmış ve morfolojik olarak anormal spermilerin genetik bozukluklar için artmış riskli oldukları bildirilmiştir (1). Glycodelin immunoreaktivitesinin swim-up sonrasında elde edilen spermilerin tüm baş bölgesinde lokalize olduğunu gösteriştir (15). Glycodelin konsantrasyonu ve sperm motilitesi arasında negatif korelasyon olduğu bildirilmiştir (92). Ancak, invitro fertilizasyon oranı ve seminal plazmada bulunan total Glycodelin immunoreaktivitesi arasında lineer bir ilişki bulunmamıştır (93).

Anormal spermilerin yüzeyine aşırı GdS bağlanması, Gd'nin immunoreaktivitesi nedeniyle servikal mukustan geçişin en az olduğunu göstermektedir. Chiu ve ark. glycodelin immunoreaktivitesinin spermin tüm baş kısmında lokalize olduğunu bulmuşlardır (15). Normal morfolojiye sahip spermelerde servikal mukustan geçişin optimal olması için azalmış Gd immunoreaktivitesi göstermektedir. Bu bulgular, çalışmamızda elde ettiğimiz Glycodelin immunoreaktivite sonuçları ile uyumlu olarak bulunmuştur. Spermelerde GdS'in seçici bağlanmasının fertilizasyon için uygun olacak erkek gametlerin seçiminde immun-düzenleyici mekanizma olabileceği ve kapasitasyon mekanizmalarının değerlendirilmesinin YÜT için kullanılacak olan spermilerin seçiminde önemli olduğu düşünülmüştür (2).

6. YORUM

Elde edilen veriler, infertilite olgularında sperm DNA fragmentasyonu ve kapasitasyon mekanizmalarının önemli faktörler olduğunu göstermektedir. Fertilite sorunu olan bireylerin, yardımcı üreme teknikleri uygulamalarına başvurdukları dönemde, rutin semen analizlerinin yanı sıra, DNA fragmentasyon ve kapasitasyon mekanizmalarında rol oynayan moleküler yolların değerlendirilmesinin açıklanamayan ve tekrarlayan fertilizasyon ve implantasyon başarısızlıklarında önemli olacağı düşünülmüştür.

DNA hasarlı sperm kullanımı ile defektif genetik materyalin embriyoya aktarılması olasılığı bulunmaktadır. Günümüzde erkek faktörü olan infertilite olgularında sıklıkla önerilen ICSI ile, seçici bir çok bariyer atlanılarak fertilizasyon gerçekleştirilmekle birlikte, IVF yapıldığında DNA hasarlarının embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin gözlenmesi, böyle hastaların tedavisinde başka önlemlerin alınması ve tedavi alternatiflerinin geliştirilmesinin gerekli olduğunu düşündürmektedir. Erkek infertilitesinde, yardımcı üreme tekniklerinde, ICSI için sperm seçiminde yüksek büyütme mikroskopları ile morfolojik olarak iyi spermilerin seçimi, sperm morfolojisi incelenmesi, sperm sayısı, DNA fragmentasyonu ve kapasitasyon değerlendirmelerinin klinik gebelik şansını etkileyeceği düşünülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menezo YJR, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M. Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertil Steril* 2008;1-5.
2. Gneist N, Keck G, Zimmermann A, Trinkaus I, Kuhlisch E, Distler W. Glycodelin binding to human ejaculated spermatozoa is correlated with sperm morphology. *Fertil Steril* 2007;88(5):1358-1365.
3. Junqueira LC, Carneiro J, RO Kelley. *Temel Histoloji Çev Ed Aytekin Y. Barış Kitabevi, İstanbul, 1998, 8. Basım, 407- 422.*
4. Kierszenbaum A L (Ed): *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Follikül gelişimi ve Menstrual döngü (siklus) Çev. Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006; 566-572.*
5. Ross MH, Pavlina W, *Histology ; A text and atlas. Fifth Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 2006; 728-770.*
6. Sadler TW, Langman's Medikal Embriyoloji, Çev. A.C Başaklar, K Sönmez, 7. basım, Palme yayıncılık. İstanbul, 2007; 1-20.
7. Moore K L, Persaud T.V.N. , *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi, Çev. Ed. Dalçık H., Yıldırım M., 8. İngilizce baskıdan çeviri, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009 ; 262-284.*
8. Cummings Benjamin, *An imprint of Addison Wesley Longman, 2001*
9. Eroschenko VP. di Fiore *Histoloji Atlası: Fonksiyonel İlişkileriyle, 9. Baskıdan çeviri, Çev. Ed. Prof. Dr. Demir R., Palme Yayıncılık, Ankara, 2001; 300-309.*
10. Delilbaşı L. *İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008; 61-83.*
11. Demir R. *İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi, Palme Yayıncılık, 1995; 17-34.*
12. Cruickshank B, Dodds TC, Gardner DL. *Human Histology, Edinburgh: E.&S. Livingstone Ltd. 2003.*
13. Chiu PC, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF, Yeung WSB. Zona-binding inhibitory factor-1 from human follicular fluid is an isoform of glycodelin. *Biol Reprod* 2003;69:365-72.

14. Yeung WS, Lee KF, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Ho PC, Chiu PC. Glycodelin: a molecule with multi-functions on spermatozoa. *Reprod Fertil* 2007; 63:143-51.
15. Chiu PC, Chung MK, Tsang HY, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF, Yeung WSB. Glycodelin-S in human seminal plasma reduces cholesterol efflux and inhibits capacitation of spermatozoa. *J Biol Chem* 2005; 280:25580-9.
16. Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S, Eisenbach M. Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92(24); 11039–11043.
17. MacLeod J. Human male infertility. *Obstet Gynecol Surv.* 1971, 25:315.
18. Simmons FA. Human Infertility, *N Eng J Med.* 1956, 225:1440.
19. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49:112-17.
20. Kremer J, Jager S. Characteristics of anti-sperm antibodies responsible for the shaking phenomenon, with special regard to immunoglobulin class and antigen-reactive sites. *Int J Androl* 1980; 3:143-52.
21. Enginsu ME, Dumoulin JCM, Pieters MHEC. Comparison between the hypoosmotic swelling test and the morphology using strict criteria predicting in vitro fertilization (IVF). *J Assist Reprod Genet* 1992;9:259-264.
22. Morris ID, Ilott SD, Dixon L, Brinson DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell electrophoresis (Comet Assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17:990-998.
23. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; 27(1):53-9.
24. Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failure of in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1991; 6: 173-176.
25. WHO, laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions: Cambridge University Press, Cambridge 4th edition, 1999. pp 60-61.

26. Baker HWG, Ng FLH, Liu DY. Preparation and analysis of semen for ivf/gift. In Trounson A, Gardner DK Handbook of In Vitro Fertilization, CRC Press 1993; 33-56.
27. Ord T, Patrizio P, Marcello E, Balmaceda JP, Asch RH. Mini Percoll : A new method for semen preparation for IVF in severe male infertility. Hum Reprod, 1990; 5: 987-989.
28. Nikolettos N, Al-Hasani S, Baukloh V.et al. The outcome of intracytoplasmic sperm injection in patients with retrograde ejaculation. Hum Reprod, 1999; 14: 2293-2296.
29. Akşit H, Bildik A. Apoptozis, İnfertilite YYÜ Vet Fak Derg 2008;19(1):55-63.
30. Tomatır A G Apoptoz; programlı hücre ölümü. T. Klin. J. Med. Sci. 2003; 23: 499-508.
31. Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi, 2003; 4:165-174.
32. Staley K, Blaschke A J, Chun J . Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. Cell Death and Differentiation, 1997; 4: 66 -75.
33. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell. 1997; 88:355-365.
34. Cooper GM, Hausman RE, Çev. Ed. Sakızlı M, Atabey N. Hücre moleküler yaklaşımlar, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir, 2006, 3. Baskı , 579-584.
35. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. Fertil Steril; 2010.
36. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod Update 2003, 9: 331-45.
37. Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproductive 2008:127;115-123.
38. Aktan G, Şanlı Ö, Kadioğlu A. Sperm kromatin hasarının tespit edilmesinde kullanılan yöntemler, Derleme, İnfertilite, 305-308.
39. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U, Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Reviews of Reproduction 1999;4:31-7.
40. Aktaş RG, Özdemir A. Sperm DNA yapısı: Önemi ve değerlendirme teknikleri. Derleme, İnfertilite, 207-209.

41. Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res.* 1997 ;236(1):231-7.
42. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi T, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Bio Reprod* 2002; 66:1061–1067.
43. Agarwal A, Said MT. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod* 2003;9(4): 331-45.
44. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14(4):1039-49.
45. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73(1):43-50.
46. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004; 81:1289–1295.
47. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl.* 2003; 49: 49 -55.
48. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET and Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2003; 80: 895-902.
49. Lewis SEM, O'Connell M, Stevenson M, Thompson-Cree L and McClure N .An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2004; 19: 1385-1394.
50. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 1 :79(7):559-63.

51. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56(3):602-7.
52. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69(3):528-32.
53. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999;284(6):696-704.
54. Jurisicova A, Lopes S, Meriano J, Oppedisano L, Casper RF, Varmuza S. DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1cgamma gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999;5(4):323-30.
55. Kierszenbaum AL, Tres LL. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J Cell Biol* 1975;65(2):258-70.
56. Brugh VM, Matschke HM, Lipshultz LI. Male factor infertility : Evaluation and management *Endocrinol Med Clin North Am* 2004;88:367-385.
57. Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev* 2001;58(4):357-8.
58. Aksoy E, Aktan TM, Duman S, Dursunoğlu D, Cüce G. Farklı semen parametrelerinde ışık mikroskobu düzeyinde spermatozoa morfolojisi ve nükleer kondansasyon değerlendirmesi *Zeynep Kamil Tıp Bülteni* 2009;40(3):111-117.
59. Nayernia K, Bohm D, Topaloglu O, Schluter G, Engel W. Rat transition nuclear protein 2 regulatory region directs haploid expression of reporter gene in male germ cells of transgenic mice. *Mol Reprod Dev* 2001;58(4):368-75.
60. Caron N, Veilleux S, Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol Reprod Dev* 2001;58(4):437-43.
61. Ok E, Öz ZS. Sperm hücrelerinde apoptoz Derleme, *İnfertilite*: 215-218.
62. Zuying C, Russ H, Alexander M, Trbovich Jan L et al. Shifren. The relationship between human sperm characteristics and sperm apoptosis: A pilot Study. *Journal of Andrology* 2006 ; 27(1).
63. Paasch U, Grunewald S, Fitzl G, Glander HJ. Deterioration of plasma membrane is associated with activated caspases in human spermatozoa. *J Androl* 2003;24: 246 -252.

64. Vinatier D, Dufour P, Subtil D. Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;67(2):85-102.
65. Kabsch K, Alonso A. The Human Papillomavirus Type 16 E5 Protein Impairs TRAIL and FasL-Mediated Apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *Journal of Virology* 2002; 12162- 12172.
66. Shehata M. Rel/Nuclear factor-kappa B apoptosis pathways in Human cervical cancer cells. *Cancer Cell International* 2005; 5 (10):1-13.
67. Oehninger S, Morshedi M, Weng SL, Taylor S, Duran H, Beebe S. Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003;7:469–76.
68. Morales E, Ferrer C, Zuasti A, Garcia-Borron JC, Canteras M, Pastor LM. Apoptosis and molecular pathways in the seminiferous epithelium of aged and photoinhibited syrian hamsters. *J Androl* 2007;28:123-135.
69. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, Asero P, Di BD, De PA, et al. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligoasthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Hum Reprod* 2004;19:2298–302.
70. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human reproduction* 2002;17: 2665-2672.
71. Glander HJ, Schaller J. Binding of Annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol. Hum. Reprod* 1999; 5:109–115.
72. Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg, E, Lambalk CB et al. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil. Steril* 2000;74: 245–250.
73. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006;21: 2876–81.

74. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174–9.
75. Belloc S, Cohen-Bacrie P, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, De MJ, Hazout A, et al. Effect of maternal and paternal age on pregnancy and miscarriage rates after intrauterine insemination. *Reprod Biomed Online* 2008;17:392-7.
76. Gosalvez J, Cortes-Gutierrez EI, Nunez R, Fernandez JL, Caballero P, Lopez-Fernandez C, et al. A dynamic assessment of sperm DNA fragmentation versus sperm viability in proven fertile human donors. *Fertil Steril* 2008.
77. Dalzell LH, McVicar CM, McClure N, Lutton D, Lewis SE. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril* 2004;82:1443–5.
78. Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update* 1996;2(2):103-17.
79. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59(5):1037-46.
80. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl 1:15-21.
81. Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999;20(6):718-23.
82. Higuchi M, Singh S, Chan H, Aggarwal BB. Protease inhibitors differentially regulate tumor necrosis factor-induced apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, cytotoxicity, and differentiation. *Blood* 1995;86(6):2248-56.
83. Ellington JE, Evenson DP, Wright RW Jr, Jones AE, Schneider CS, Hiss GA, Brisbois RS. Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro. *Fertil Steril* 1999;71(5):924-9.
84. Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA Cell Biol* 1997;16(9):1087-97.

85. Kuchino Y, Mori F, Kasai H, Inoue H, Iwai S, Miura K, Ohtsuka E, Nishimura S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 1987;327(6117):77-9.
86. Fraser LR. The “Switching on” of mammalian spermatozoa: molecular events involved in promotion and regulation of capacitation. *Mol Reprod Dev* 2010;77:197-208.
87. Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. Beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J Biol Chem* 1999; 274:3235–3242.
88. Visconti PE, Ning X, FornesMW, Alvarez JG, Stein P, Connors SA, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: Cholesterol release signals an increase in protein tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Dev Biol* 1999 ;214:429–443.
89. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*, Vol. I, 2nd edition. New York: Raven Press, 1994. pp 189–317.
90. Florman HM. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca^{2+} are initiated by the zona pellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol* 1995; 165:152–164.
91. Pike LJ. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res* 2009; 50:323–S328.
92. Julkunen M, Wahlstrom T, Seppala M, Koistinen R, Koskimies A, Stenman UH, Bohn H. Detection and localization of placental protein 14-like protein in human seminal plasma and in the male genital tract. *Arch Androl.* 1984;12(suppl):59–67.
93. Koistinen H, Koistinen R, Hyden-Granskog C, Magnus Q, Seppala M. Seminal plasma glycodefin and fertilization in vitro. *J Androl* 2000;21:636-640.

