

T.C.

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**İNFERTİL ERKEKLERDE SEMİNAL PLAZMA ALFA GLUKOZİDAZ
DÜZEYİ VE
IVF / ICSI SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Biyolog Özge TUTAK SERTKOL

Danışman

Prof. Dr. Tülay İREZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL , 2019

**T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 28/01/2019

Prof. Dr. Tülay İREZ
Biruni Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. İbrahim ÇEVİK
Okan Üniversitesi
Jüri Üyesi

Prof. Dr. İmer OKAR
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Jüri Üyesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Özge TUTAK SERTKOL

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam süresince, deneyimleri ile her zaman yanımda olan, bilgi birikimi ile bize yol gösteren, hoşgörü ve desteğini esirgemeyen Sayın hocam **Prof.Dr.TÜLAY İREZ' e**

Değerli katkılarıyla bana bu yolda ışık olan, mesleğimi bana sevdiren, desteğini her zaman hissettiğim Sayın Embriyolog **R.Rüya GÜLBAYRAK'a** çalışmamı sürdürebileceğim laboratuvar ortamını bana sağlayan **Batı Bahat Hastanesi ÜYTE Ünite Sorumlusu** Sayın ekip doktorum **Dr.Fuat ESEROL' a** ve Başhekimimiz **ÜYTE Müdürü** Sayın hocam **Dr. Reşat BAHAT'a**

Benden yana asla inançlarını yitirmeyen, bana her daim güvenen, sevgilerini daima hissettiğim, yüksek lisansım ve tüm eğitim hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme,

Her zaman yanımda olan, beni her konuda destekleyen sevgili eşim **Serhat SERTKOL'a** ve canım kızım **Ela'ya** teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
TEZ ONAYI	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE ve KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1.ERKEK GENİTAL SİSTEMİ	2
2.1.1 Testis Histolojisi	3
2.1.1.1 Epididimis	4
2.1.1.2 Ductus (Vas) Deferens.....	5
2.1.1.3 Seminal Veziküller	5
2.1.1.4 Prostat Bezi	6
2.1.2 Spermatogenez	6
2.1.2.1 Spermatogonial Evre	9
2.1.2.2.Mayoz Bölünme Evresi	9
2.1.2.3 Spermiyogenez Evresi	10
2.2.ERKEK İNFERTİLİTESİ	12
2.2.1.Semen	12
2.2.2. Semen'in Makroskobik ve Mikroskobik İncelenmesi	13

2.3. SPERM BOYAMA YÖNTEMLERİ	17
2.3.1 Papanicolaou Boyama Yöntemi.....	17
2.3.2 Shorr Boyama Yöntemi	17
2.3.3 Diff Quik (Hızlı Boyama) Yöntemi	17
2.3.4 Spermac Boyama Yöntemi	18
2.4 SPERM MATURASYONU VE KAPASİTASYONU, MOTİLİTE KAZANMASI.....	19
2.4.1 Sperm Kapasitasyonu ve Motilite Kazanması.....	20
2.5 ERKEK İNFERTİLİTESİ VE ALFA GLUKOZİDAZ	21
2.6 FERTİLİZASYON	21
2.6.1. Oosit Aktivasyonu ve Olgunlaşması	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Çalışmaya Alınan Hasta Grupları	26
3.2. Örneklerin Toplanması	26
3.3. Sperm Boyama ve Morfolojik İnceleme	27
3.3.1 Spermac Boyama	27
3.3.2 Anilin Blue Testi.....	27
3.4. Alfaglukozidaz Analizi	28
3.5. Folikül Aspirasyonu (OPU), Denudasyon ve İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) İşlemi.....	29
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA	38

6. SONUÇ	43
7. KAYNAKLAR	44
8. ETİK KURUL ONAYI	48
9. ÖZGEÇMİŞ	49

TABLO DİZİNİ

Tablo-1: Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi	16
Tablo-2: Çalışmada Kullanılan Malzemeler	30
Tablo-3: Gruba İlişkin Ortalamalar ve Karşılaştırmalar	32
Tablo-4: Gebelik Durumuna Göre Ortalamalar ve Karşılaştırmalar	33
Tablo-5: Normospermi Grubunda Gebelik Durumuna Göre Ortalamalar ve Karşılaştırmalar	33
Tablo-6: Astenospermia Grubunda Gebelik Durumuna Göre Ortalamalar ve Karşılaştırmalar	34
Tablo-7: Oligospermia Grubunda Gebelik Durumuna Göre Ortalamalar ve Karşılaştırmalar	35
Tablo-8: Korelasyonlar 1	36
Tablo-9: Korelasyonlar 2	37

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil-1: Erkek Üreme Sistemine Ait Yapıların Şematik Gösterimi	3
Şekil-2: Testis Histolojisi	4
Şekil-3: Spermatogenez	8
Şekil-4: Spermatogenez ve Spermijogenez Evreleri	10
Şekil-5: Spermijogenezin Şematik Gösterimi	12
Şekil-6: Normal Spermin Bölümleri	15

Şekil-7: Fertilizasyonda Basamaklar	23
Şekil-8: Embriyo Bölünmeleri	25
Şekil-9: Elisa Kiti Ölçüm Prosedürünün Özeti	29



SİMGE VE KISALTMALAR

DNA	“ Deoxyribonucleic Acid ” (Deoksiribonükleik Asit)
ET	“ Embryo Transfer ” (Embriyo Transferi)
FIX	“ Fixation ” (Fiksasyon)
HSA	“ Human Serum Albumin ” (İnsan Serum Albumin)
ICSI	“ Intrositoplasmic Sperm Injection ” (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)
IVF	“ In Vitro Fertilization ” (İn Vitro Fertilizasyon)
ml	“ Milliliter ” (Mililitre)
OPU	“ Oocyte pick up ” (Oosit Aspirasyonu)
PBS	“ Phosphate Buffered Saline ” (Fosfatla Tamponlanmış Tuz)
PN	“ Pronucleus ” (Pronükleus)
WHO	“ World Health Organization ” (Dünya Sağlık Örgütü)
µL	“ Microliters ” (Mikrolitre)

ÖZET

Amaç: Epididimisin sperm matürasyonunda, ileri hareket oluşumunda ve fertilizasyon yeteneği kazanmasında önemli rolleri bulunmaktadır. Alfa glukozidaz seminal plazmada biyokimsiyal olarak belirlenen faktörlerden birisidir. Yapılan çalışmalar alfa glukozidaz düzeyinin epididimal fonksiyonu göstermede oldukça önemli olduğunu ileri sürmektedir.

Günümüze kadar epididimal hücre sekresyonları ile birçok çalışma vardır. Bunların çoğu deney hayvanlarında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle çalışmamızda amacımız özellikle nedeni belli olan (normozoospermia, oligozoospermia, astenozoospermia) infertil erkek tiplerinde epididimal alfa glukozidaz düzeyinin araştırılması ve IVF / ICSI sonuçlarına göre fertilizasyon, embriyo gelişimi ve gebelik oranlarının değerlendirilmesidir.

Materyal ve Metot: Özel Batı Bahat Hastanesi Tüp Bebek Merkezine tedavi için başvuran 75 hastanın semen analizleri değerlendirilmeye alındı. Hastaların klinik takibi, semen analizleri, semen morfolojisi ve hareketliliğin özellikleri değerlendirildi. Normozoospermia, astenozoospermia ve oligozoospermia bulunan hasta gruplarında seminal alfa glukozidaz değerleri bir kinetik enzim kiti kullanılarak Eliza yöntemi ile değerlendirildi. Hastaların seminal plazmaları lam üzerine yayılarak anilin blue ile boyanmak üzere formaldehit ile fikse edildi. Bu gruptaki hastaların eşlerinden elde edilen embriyolar takip edildi ve transfer sonrası gebelik durumları değerlendirildi.

Bulgular: Bu çalışma sonucunda elde edilen verilere göre; Seminal Alfa glukozidaz düzeyi (mU/ml) oligospermik olgularda daha yüksek bulundu. Seminal alfa glukozidaz düzeyinin tüm olgularda fertilizasyon ve 2. gün,3.gün embriyo sayısı ile korelasyon gösterdiği bulundu. Seminal alfa glukozidaz düzeyinin sperm motilitesi ile korelasyonu saptanmadı.

Tartışma : Epididimis'den salgılanan nötral alfa glukozidaz enziminin spermatozoa üzerine etkileri halen tartışma konusudur. Sonuçlarımız seminal alfa glukozidaz düzeyinin fertilizasyon, iyi embriyo gelişimi üzerinde etkileri bulunabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Epididimis, Alfa glukozidaz, Normozospermia, Astenozospermia, Oligozospermia



SUMMARY

Objective: Epididymis plays an important role in sperm maturation, advanced movement formation and fertilization ability. Alpha glucosidase is one of the factors that determine male infertility in seminal plasma. Studies suggest that alpha glucosidase levels are important in demonstrating epididymal function.

To date, there are many studies with epididymal cell secretions. Most of these were carried out on experimental animals. Therefore, the aim of our study is to investigate the epididymal alpha glucosidase level in male infertile patients (normozoospermia, oligozoospermia, asthenozoospermia) and to evaluate the embryo development and pregnancy rates according to IVF / ICSI results.

Material&Methods: Semen analysis of 75 patients who applied for treatment at The Batı Bahat Hospital IVF Center were evaluated. Clinical follow-up, semen analysis, semen morphology and mobility were evaluated. Seminal alpha glucosidase values in patients with normozoospermia, asthenozoospermia and oligozoospermia were evaluated by Elisa method using a kinetic enzyme kit. Seminal plasmas of the patients were fixed on the slide, fixed with formaldehyde and stained with aniline blue. The embryos obtained from the spouses of the patients in these groups were followed up and their pregnancy status was evaluated.

Results: According to the results of this study; Seminal alpha glucosidase level (mU / ml) was higher in oligospermic patients ($p = 0.022$, Table 3). Seminal alpha glucosidase level was found to be correlated with the number of embryos on day 2 and day 3 in all cases ($p = 0.027$, $p = 0.046$, Table 8, 9). No correlation was found between seminal alpha glucosidase level and sperm motility.

Discussion : The effects of neutral alpha glucosidase enzyme secreted from epididymis on spermatozoa is still a matter of debate. Our results suggest that seminal alpha glucosidase level may have effects on fertilization, good embryo development.

Key words: Epididymis, Alpha glucosidase, Normozospermia, Asthenozospermia, Oligozospermia

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son 15 – 20 yıldır sperm fonksiyonları üzerine yapılan çalışmalar, erkek infertilitesinin önemini ortaya koymaktadır. Sperm fonksiyon bozukluğu ve idiyopatik (sebebi açıklanamayan) erkek infertilitesini çevresel, fizyolojik, genetik birçok faktör etkilemektedir. İn vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) gibi yardımcı üreme teknikleri bu soruna çözüm bulmaktadır **(1)**. Bu nedenle normal sperm fonksiyonunu etkileyen faktörleri tanımlamak önem arz etmektedir.

Sperm fonksiyonunu değerlendirmek için birçok test geliştirilmiştir. Fakat bu testler uygulaması güç çok detaylı olması nedeniyle her laboratuvarında uygunluk göstermediği gözlenmiştir **(2)**. Geleneksel semen analizi ise detaylı bir morfolojik değerlendirme ile uygulandığında erkek infertilitesi araştırılmasında önemli bir test olarak kullanılmaktadır **(3)**. Ayrıntılı bir değerlendirme yapıldığında sperm fonksiyonları hakkında önemli bilgiler elde edilebilir. Ve yardımcı üreme tekniklerinin kullanımında başarı veya başarısızlık önceden ortaya konulabilir. Semen analizi ile değerlendirilen sayı, hareketlilik ve morfoloji hakkında önemli bilgilere ulaşılmaktadır. Semen analizinde WHO(Dünya sağlık örgütü) kriterleri detaylı bilgi sunmaktadır **(4)**. WHO kriterlerine göre yapılan incelemede spermin sayı, hareketlilik ve morfolojik yapısı dikkate alınmıştır. WHO kriterlerine göre yapılan değerlendirmede sayı 15 milyon / ml ve üzeri, motilite %50 ve üzeri, morfoloji: % 4 ve üzeri bulunması Normospermiyi; sayı 15 milyon / ml ve altı, motilite %50 altında bulunması Oligozoospermiyi; sayı 15 milyon / ml ve üzeri, motilite %30 ve altı, morfoloji: %4 bulunması Astenozoospermiyi tanımlamaktadır **(3)**.

Sperm matürasyonunda, ileri hareket oluşumunda ve fertilizasyon yeteneğinin kazanılmasında epididimisin önemli rolü bulunmaktadır **(4-6)**. Seminal plazmada erkek infertilitesinin belirlenmesinde alfa glukozidaz biyokimyasal olarak etkileyen faktörlerden birisidir. Yapılan çalışmalarda epididimal fonksiyonu göstermede önemli olduğu kanıtlanmıştır. Epididimal fonksiyonun çeşitli belirteçleri mevcuttur.

L-karnitin, gliserilfosfokolin ve a-glukozidaz dahil (a-GLUC) olmak üzere pek çok enzim ve bileşik epididimden salgılanmaktadır, ancak bunların evrensel olarak klinikte kullanımı mümkün olmamıştır **(7)**. Bu durum, mevcut bileşiklerin çeşitliliği ve elde edilen sonuçların karmaşıklığı ve hasta yönetiminin çoğunlukla

testis, hipofizer hormonlar ile sınırlı kalmasından kaynaklanmaktadır. Semendeki α -Glukozidazın, özellikle de nötral izoenzim formunun daha hızlı ve duyarlı olduğu ileri sürülmektedir (7). Semende düşük α -Glukozidaz seviyeleri'nin Epididimit ile ilgili olabileceği, kusurlu sperm maturasyonu ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (8). Ben Ali ve ark seminal alfa glukozidaz düzeyinin spermatozoa'nın oosite bağlanma kapasitesi ile korelasyon gösterdiğini, Milingos ve ark ise intrauterin inseminasyon başarısını artırdığını ileri sürdüler (9,10). Bazı araştırmacılar ise seminal alfa glukozidaz tayininin infertilite pratiğinde bir değeri olmadığını, epididimal obstrüksiyonun bir göstergesi olabileceğini ileri sürmektedirler (11).

Literatür incelendiğinde alfa glukozidaz tayin yöntemlerinde belirli bir standard görülmemektedir. Tayinlerde spektrofotometrik, spektrofurimetrik, radioimmunoassay yöntemi ve eliza yöntemi kullanılmıştır (12). Bazı araştırmacılar Unite /l, bazıları ise ng/ml, bazıları ise ejakülat başına mg değerleri ile sonuçları ifade etmiş, bu konuda standard bir değerlendirme görülmemektedir. Ejakülat volümünün erkeklerde çok değişkenlik gösterdiği bilinmektedir ve buna bağlı olarak seminal alfa glukozidaz düzeyinde bireysel farklılıklar ortaya çıkmaktadır (13).

Bu çalışmada seminal alfa glukozidaz düzeyinin normo, oligospermik ve astenospermik olgularda eliza yöntemi ile analiz etmeyi istedik. Çalışmamızda seminal nötral alfa glukozidaz düzeyinin fertilizasyon ve embriyo gelişimi ile bir ilişkisi bulunup bulunmadığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi haploid erkek gametin (spermatozoon) sürekli üretimi, beslenmesi, geçici olarak depolanmasından, seks hormonlarının sentezlenmesi ve salgılanmasından sorumludur (14).

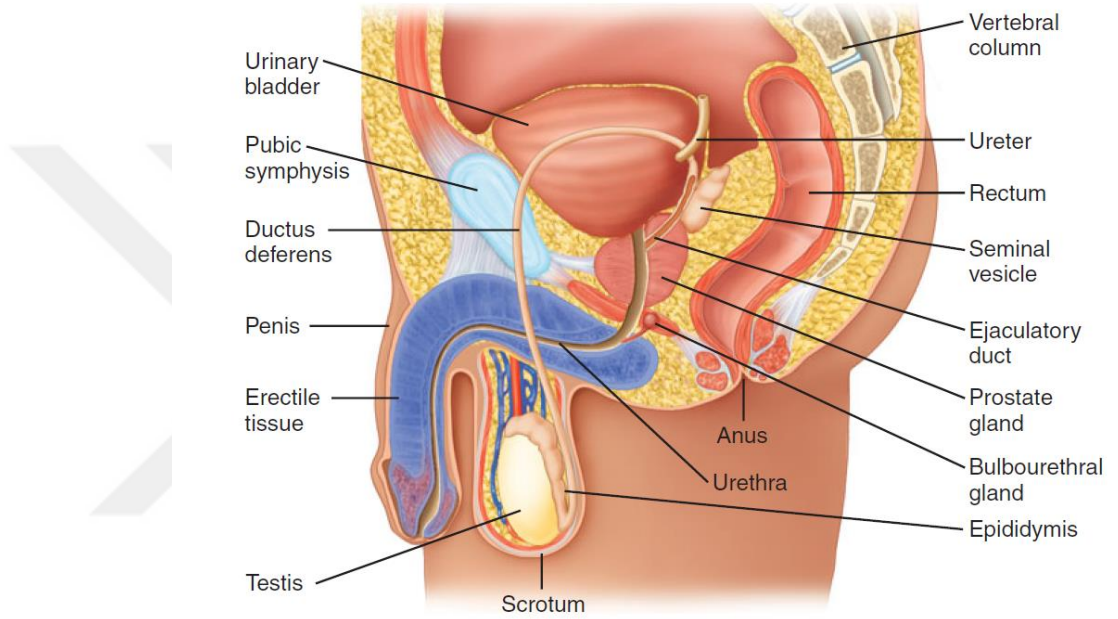
Erkek üreme sistemi dört kısımdan oluşur; Testisler, Genital kanallar, yardımcı bezler ve Penis (15).

Testisler sperm üretimi ve testosteron gibi hormonların üretiminden sorumludur (15).

Genital kanallar testisten üretilen spermatozoonları penise taşıyan epididimis, ductus deferans ve üretradan oluşmaktadır (14,15).

Yardımcı bezler sperm aktivitesi için gerekli olan salgıları üreten seminal veziküller, prostat bez ve bulboüretral bezlerdir (14,15).

Penis erektil dokudan oluşmuş çiftleşme organıdır (14,15).

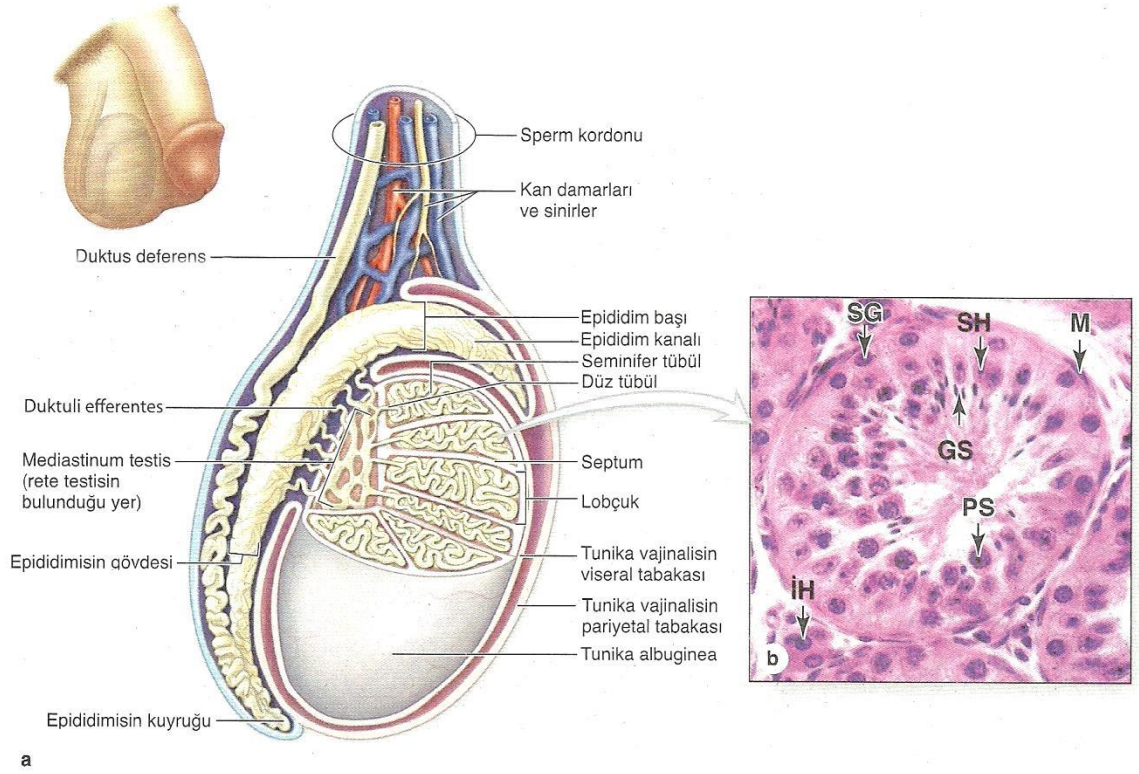


Şekil-1: Erkek Üreme Sistemine Ait Yapıların Şematik Gösterimi (16)

2.1.1 TESTİS HİSTOLOJİSİ

Testisler karın boşluğu dışında skrotum içinde yer alan sağlı sollu bulunan bir çift organdır. Bu yerleşimleri testislerin vücut sıcaklığından 2-3°C düşük olmasını sağlamaktadır. Normal spermatogenez için 34°C ve 35°C sıcaklık gereklidir (14).

Testisler tunika albuginea adı verilen sıkı bağ dokusundan oluşan bir kapsülle çevrilidir. Tunika albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinumdan testiküler dokuya doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250-300 lobçuğa böler. Her lobçuk 1 ila 4 arasında değişen seminifer tübül içerir (14).



Şekilde testis anatomisi gösterilmektedir. (a) testisin kısmi olarak sagittal kesitinin şematik olarak gösterilmektedir. (b) Seminifer tübül enine kesiti; periferde yakın bir noktada spermatogonyumlar

(SG), Sertoli hücreleri (SH), primer spermatositler (PS) ve lümenin yakınında geç spermatidler (GS) ve çevredeki bağ dokusunda bulunan interstisyel hücreler (IH) gösterilmektedir.. X400. H ve E.

Şekil-2: Testis Histolojisi (17)

Seminifer tübüller içerisinde spermatozoonlar üretilirler. Tübüller arasında gevşek bağ dokusu içinde yer alan testiküler androjenleri salgılayan interstisyel hücreler (Leydig Hücreler) yer alır. Testis içi genital kanallar seminifer tübüllerden gelen sıvıyı ve spermatozoonları epididimise taşır. Ejakülasyonda spermi skrotumdan penise doğru taşıyan kanallar epididimis, ductus deferens (vas deferens), üretradır (14).

2.1.1.1 Epididimis

Epididimis yaklaşık 6 metrelik ductus epididimisin bir araya toplanmasıyla oluşan, testislerin arka ve hafifçe yan kenarlarında yer alan yapıdır (18). Bağ dokusu ile çevrelenmiş epididimis skrotum içinde yer alır (19). Üst kısmı kalın alt kısmı daha ince bir yapıdır. Geniş olan üst kısmına baş (caput) epididimis, gövde (corpus) epididimis, dar olan alt parçasına kuyruk (cauda) epididimis denir. Spermiler, bu kanaldan geçerken hareketli hale gelirler, yüzeyleri ve akrozomları son olgunlaşma aşamasına girer. Epididimis içindeki sıvı glikolipid dekapasitasyon

faktörleri sperm hücre zarına bağlanarak akrozom reaksiyonunu durdururlar. Bu şekilde sperm dölleme yeteneği, kadın üreme kanalında gerçekleşecek olan kapasitasyon işleminin bir parçası olarak bu faktörler uzaklaştırılana kadar önlenmiş olur **(19)**.

Epididimis kanalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile örtülmüş ve bu tabaka uzun stereosilyalı prizmatik esas hücreler ile küçük yuvarlak kök hücrelerden oluşur **(19)**. Glikolipid ve glikoprotein esas hücreler tarafından salgılanır ve esas hücreler sertoli hücreleri tarafından uzaklaştırılmayan sitoplazmik atıkların, diğer atıkların uzaklaştırılmasında, suyun geri emiliminde görev alır. Kanal epiteli birkaç düz kas hücresi ile sarılmıştır. Peristaltik kasılmalar sperm kanal boyunca ilerlemesini, gövdenin ve kuyruğun boşalmasını sağlar **(19)**.

2.1.1.2 Ductus (Vas) Deferens

Kalın müköler yapıda, küçük lümenli, yaklaşık 45 cm uzunluğunda boru şeklinde bir organdır **(18)**. Epididimisin kuyruk kısmından başlar ve spermilerin ductus ejaculatorius'a taşınmasından sorumludur **(18)**.

2.1.1.3 Seminal Veziküller

Her biri 15 cm olan seminal veziküller iki adettir. Oldukça kıvrımlı kanallardan oluşur ve bağ dokusu kapsülü ile sarılıdır. Kanal mukozası çok sayıda ve karmaşık katlanmalar içerir. Katlantılar salgılayıcı granüllerle zengin epitel ile örtülüdür. İçeriğinde bulunan kas tabakası, ejakülasyonda bezlerin salgısının boşalmasını sağlar **(19)**. Ekzokrin bez olan seminal veziküllerin yapışkan sarımtırak salgılarının üretimi testosterona bağlıdır. Seminal vezikülden gelen sıvı ejakulatın %70 ini oluşturur. İçeriğinde bulunan früktoz; sperm ana enerji kaynağı, prostoglandin, kadın üreme kanalında sperm etkinliğini uyarır; Fibrinojen, ejakülasyon sonrasında semenin koagülasyonunu sağlar **(19)**.

2.1.1.4 Prostat Bezi

Prostat bezi, uretrayı saran idrar kesesinin altında sıkı bir organdır. Erkek genital sisteminin en büyük bezidir. Ortalama ağırlığı 20 gr kadardır. Fibromusküler stroma içinde gömülmüş bulunan sayıları yaklaşık 30 ila 50 arasında değişen tübüloasinar bezden oluşmaktadır. Tübüloasinar bezler, çeşitli glikoproteinleri, enzimleri ve prostaglandin gibi küçük molekülleri bulunduran sıvıyı üretir **(19)**. Ejakülasyona kadar bunun depolanmasından sorumludur. Klinik önemi olan serin proteaz olan prostat özgül antijeni (PSA) üretir. Bu protein, ejakülasyondan sonra spermin yavaş salınımı için pıhtı şeklinde olan semenin sıvılaşmasına yardımcı olmaktadır. Prostatın yapısı ve işlevi testosteron seviyesine bağlıdır **(18,19)**.

2.1.2 SPERMATOGENEZ

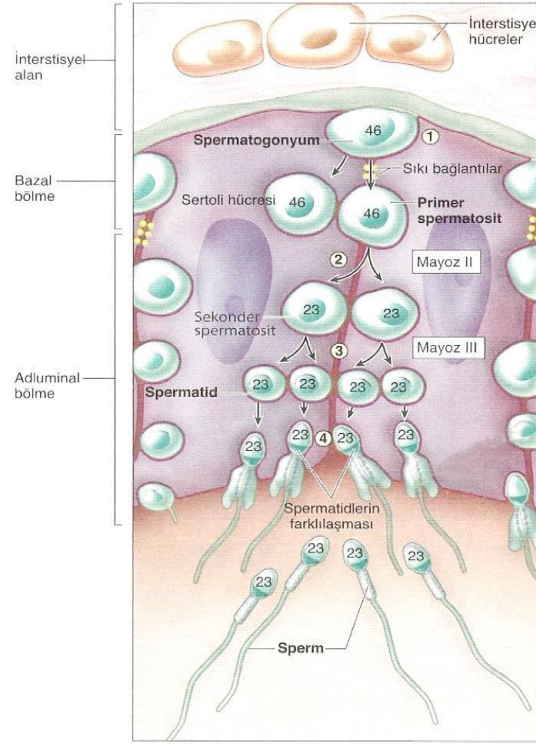
Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerde yaklaşık 2 aylık bir süreçte meydana gelen ve mayoz bölünme siklusu içeren bir işlemdir **(20)**.

Puberte de başlayan spermatogenez, spermatogoniumların spermatozoa haline dönüşmesini sağlayan olayların tamamını kapsayan bir süreçtir. Erkek germ hücreleri, testisin seks kordonları içinde destek hücreleri tarafından çevrelenmiş büyük ve soluk renkli hücreler şeklinde görülmektedir. Tıpkı foliküler hücreler gibi, testisin yüzey epitelinden köken alan destek hücreleri, sertoli hücreleri olarak bilinir **(14)**.

Sertoli hücreleri spermatogenezde yardımcı hücreler olarak görev alır. Kan dolaşım sisteminden tübülleri ayırır, başka bir deyişle kan – testis bariyerini oluşturmakta, germ hücrelerine destek vermekte, mayoz için gerekli olan bileşikleri sentezlemekte ve hipofizi kontrol eden hormonal sinyalleri (inhibin) üretmektedir **(20)**.

Puberteden hemen önce, seks hormonlarının etkisi ile tübüllerin içi boşalarak bir lümen oluşturur ve bu yapılar seminifer tübüller denilir. Aynı zamanda primordial germ hücreleri de spermatogonial kök hücrelere farklıdır. Bu kök hücre

popülasyonundan düzenli aralıklarla ayrılan hücreler tip A spermatogoniumları oluşturur. Tip A spermatogonium üretiminin başlaması spermatogenezin başlamış olduğunu gösterir. Bu hücreler kısıtlı sayıda mitotik bölünmelerle hücre kümeleri meydana getirir. Son bölünme sonucunda da ortaya çıkan hücreye Tip B Spermatogonium denir **(19)**. Tip B Spermatogoniumlar küresel ve soluk çekirdekli dirler. Tip B spermatogoniumun bölünmesiyle de Primer Spermatozoid oluşur. Primer spermatozoidler oldukça uzun süren bir profaz evresinin ardından birinci mayoz bölünmenin hızla tamamlanmasıyla Sekonder spermatozoidlere dönüşür. Bu hücrelerden de ikinci mayoz bölünme sırasında 23 haploid kromozom içeren spermatidler meydana gelir **(21)**. B tipi hücrelerin kök hücre topluluğundan ayrılmasından, spermatidlerin oluşumuna kadar geçen bir seri olay boyunca sitokinezis tamamlanmış olduğundan, ardışık hücre üretimleri stoplazmik köprülerle birbirine bağlı şekildedir. Böylece tek bir spermatogoniuma ait soy çoğalıp farklılaşmaları sırasında birbirleriyle ilişkisini koruyan bir germ hücre topluluğu halindedir. Ayrıca, spermatogonium ve spermatidler gelişim süreleri boyunca sertoli hücreleri arasındaki derin oyuklar içinde gömülü kalır. Böylece sertoli hücreleri germ hücrelerini destekler, korur, beslenmelerine katkıda bulunur; spermatozoonların olgunlaşıp serbest kalmalarına yardımcı olur **(19,21)**.



① ” Spermatogonyum adı verilen spermatogenik öncül hücreler 46 kromozom (23 çift) içeren diploid hücrelerdir. Bu hücrelerin her birinin mitotik bölünmesi sonucunda yeni bir spermatogonyum ve mayozla girecek primer spermatozoid olarak adlandırılan bir hücre oluşur.

② Her yeni primer spermatozoid geçici olarak kan testi bariyerinin sıkı bağlantılarını ayırır ve tübülün bazal bölgesinden adluminal bölgesine hareket eder. Bu hücreler aynı zamanda DNA'larını eşleyerek mayoz I'e girerler ve sinaps oluştururlar. İlk mayotik bölünme sonucu 23 kromozomlu iki haploid sekonder spermatozoid oluşur.

③ Mayoz II hızlı bir biçimde gerçekleşir ve sekonder spermatozoid kromozomlarındaki kromatidler daha küçük iki haploid hücreye dağıtılarak spermatidler oluşur.

④ Spermatidler lümene yakın fakat hala Sertoli hücrelerine gömülü halde iken farklılaşırlar ve fertilizasyon ve hareket yeteneği kazanabilmek için gerekli olan morfolojik değişimleri geçirirler.

Şekil-3: Spermatogenez (17)

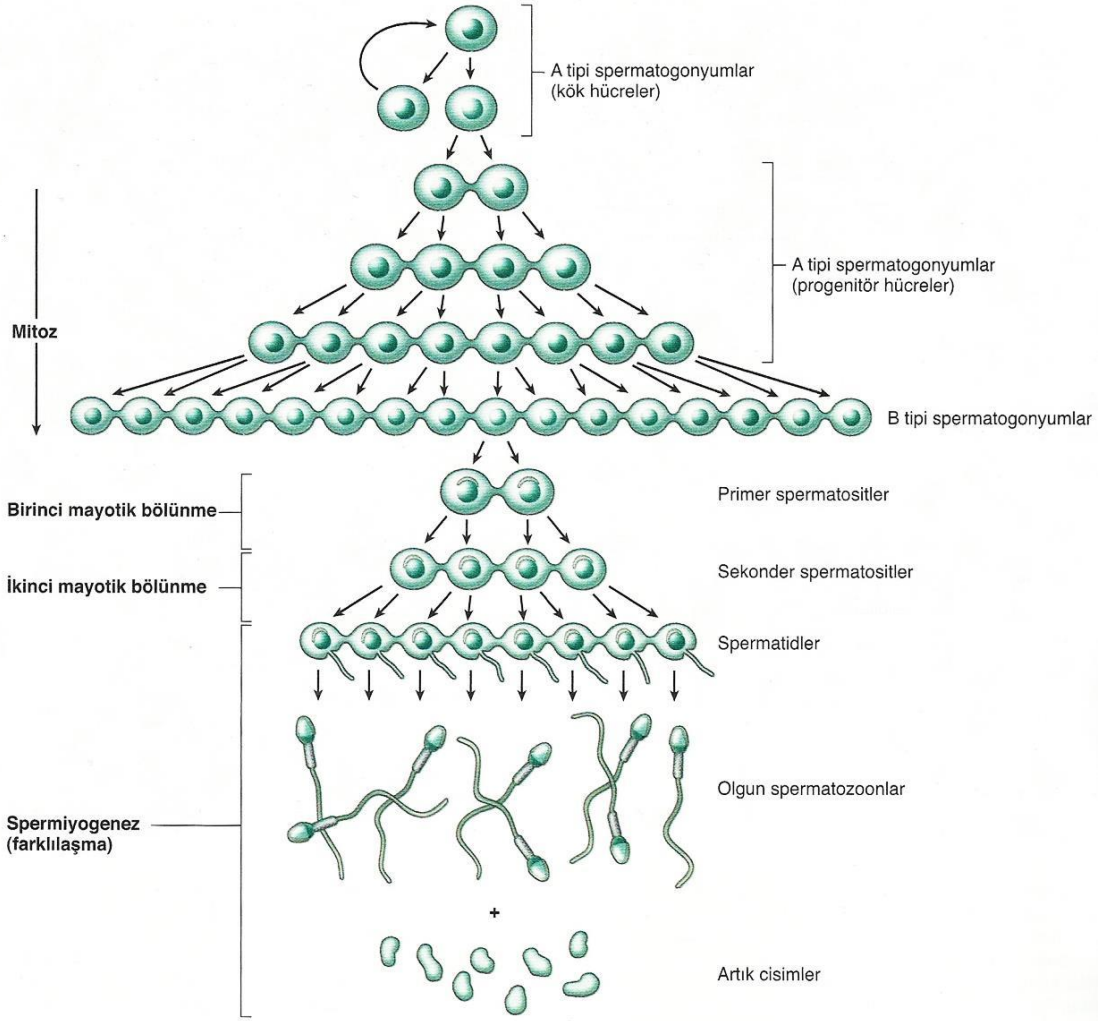
Özetle, Spermatogenez, tam farklılaşmamış diploid (2n) spermatogonik hücrelerden özelleşmiş haploid (n) spermatozoidlerin geliştiği olaylardır. Bu hücrelerin geçirdiği aşamalar spermatogonik evre (spermatogenezis), mayoz bölünme evresi ve spermatid evresi (spermiogenezis)'dir.

2.1.2.1 Spermatogonial evre

Seminifer epitelin bazal membranı üzerinde bulunan diploid spermatogoniumlar mitotik aktivite ile çoğalır. Bu çoğalma sonucu ile spermatogenezis için yeterli miktarda hücre sağlanır. Bu hücrelerin bir bölümü de kök hücre olarak işlev görür. Kök hücrelerin erkek infertilitesinde önemli yeri vardır, yaşam süreleri oldukça uzundur **(14)**.

2.1.2.2 Mayoz Bölünme Evresi

Tip B spermatogoniumların son mitotik bölünmesinden sonra ortaya çıkan yavru hücreler, DNA sentezler (S fazı), G2 fazına ilerler ve 4N DNA içerikleri ile birinci mayoz bölünmeye başlarlar. Bunlar primer spermatositlerdir. Birinci mayoz bölünme sonucunda iki yavru hücre meydana getirirler. Oluşumlarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu aşama 10 günden fazla sürdüğü için, testis kesitlerindeki spermatositlerin çoğu bu aşamada olacaktır **(15)**. Uzamış profaz evresinden sonra, kardeş kromatit çiftleri metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçerek yavru hücrelere (sekonder spermatositlere) ayrılırlar. Sekonder spermatositler testis kesitlerinde zor gözlenir. Bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve çabuk ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir. İkinci mayoz bölünme sırasında profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evreleri kardeş kromatitleri spermatitlere ayırır. Birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı (DNA sentezi) olmadığından ikinci mayoz bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (n) hücreler meydana gelir **(14,19)**.



Şekil-4: Spermatogenez ve Spermiyogenez Evreleri (17)

2.1.2.3 Spermiyogenez Evresi

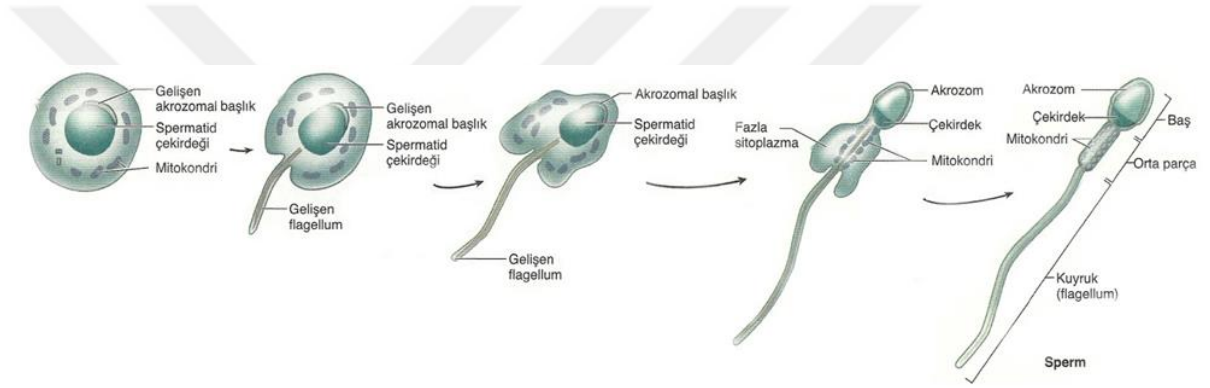
Haploid spermatidler, seminifer tübül lümenüne yakın adluminal kompartmanda yerleşmişlerdir. Spermatidler, spermiyogenez denilen farklılaşma sürecine girerler. Spermiyogenez, spermatozoon üretiminin sıcaklığa duyarlı ve son aşamasıdır. Spermatidlerin erkek DNA sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoonlara dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre

bölünmesi meydana gelmez ve spermatogenezdeki gibi, hücreler sertoli hücreleri ile ilişkilidir **(15)**.

Haploid olan spermatidler küçüktür ve seminifer tübülüne yakındırlar. Üç ana olay spermiyogenezi karakterize eder.

1. **Kamçının gelişmesi**; kamçı distal sentriolden gelişir. Keratin içeren dış yoğun lifler, fibröz kılıf ile çevrili bir aksoneme (9+2 mikrotübül çiftleri) sahiptir. Mitokondriyonlar kuyruğun proksimal bölümünde sarmal bir kılıf oluştururlar **(19,22)**.
2. **Akrozom gelişmesi**; döllenme için gerekli olan hidrolitik enzimlerin (hiyaluronidaz, akrozin, asit fosfataz, proteaz, nöraminidaz, N asetilglukozamidaz, arilsülferaz) sentezinin gerçekleştiği ve depolandığı akrozomal keseyi içerir. Akrozom gelişimi 4 ardışık evreden oluşur **(14)**.
 - a) **Golgi fazı**: Spermatidler içinde golgi aygıtı nükleusa yakın kısma yerleşmiştir. Endoplazmik retikulumda üretilen bazı enzimler golgi aygıtına taşınır. Hidrolitik enzimler golgi aygıtından akrozomal veziküle aktarılır. Sentriol çifti akrozomal vezikülün zıt kutuplarına doğru göç eder. Distal sentriol aksonem, proksimal sentriol bağlantı parçasının oluşumuna katılır **(18,19)**.
 - b) **Kep (Başlık fazı)**: akrozomal başlık yoğunlaşan çekirdeğin yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve akrozoma dönüşür **(18)**.
 - c) **Akrozomal faz**: Akrozom çekirdeğin üst 1/3 lük kısmını örter ve sarmaya devam eder. Çekirdek hacmi azalır ve daha uzun bir hal alır. Çok sayıda mikrotübül içeren manşet adı verilen sperm nükleusundan distale uzanan geçici bir yapı oluşur. Distal sentriol 9+2 eş merkezli dizilmiş mikrotübül çiftlerinden oluşan aksonemi meydana getirir. Mitokondriyonlar gelişen aksonem boyunca ilerler **(14)**.
 - d) **Olgunlaşma fazı**: Spermatozoondan geriye kalan artık sitoplazma hücreden uzaklaştırılır. Mitokondriyonlar orta parçada dış yoğun liflerin çevresine dizilirler. Olgun fakat işlevsel olamayan spermatozoon tübül lümenine salınır **(15)**.

3. Nükleer yoğunlaşma; somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizince zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nükleer yoğunlaşma meydana gelir. Somatik histonları protaminlere dönüşmesinden sonra nükleozomlar kaybolur **(14)**. Çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yanyana dizilir. Olgunlaşma aşamasından sonra belirgin bir RNA sentezi yoktur. Olgunlaşma işlemi, çekirdek uzamış, yoğunlaşmış şeklini aldığı anda, manşet dağılmaya başladığında, dış yoğun lifler organize olduğunda tamamlanır. Lümene verilen sperm hücresi fertilizasyon yeteneğine sahip değildir. Ayrıca hareket yeteneği de yoktur **(14,18,19)**.



Şekil-5: Spermijenezin Şematik Gösterimi (17)

2.2 ERKEK İNFERTİLİTESİ

2.2.1 Semen

Seminal sıvı testis ve epididimis salgısının, ejakulasyon sırasında seminal veziküller, prostat ve bulboüretal bezlerin katkısıyla oluşur. Her organın sekresyonu farklıdır ve sekresyonlar sıralı bir şekilde salınır **(23)**. İlk kısmı sperm ve prostatik salgıdan, ikinci kısmı seminal vezikül ve komponentlerinden zengindir. Ejakulasyonda bu fonksiyonların birleşmesi gerekir **(23)**.

Ejakulatın sperm içeriği toplam hacminin %3-5 i kadardır. Kalan kısmını epididimis, vas deferensin (%5-10), seminal veziküllerin (%50-70), prostat bezinin (%15-30) salgıları ve az miktarda müköz ve bulboüretal bezlerin salgılarını (%3-5) içerir **(24)**.

Semende bulunan protein, amin, karbonhidrat, lipid ve elektrolitlerin bir kısmı genital kanalın belirli kısımlarına özgü olup, seminal plazmadaki biyokimyasal yapılar ve erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde önemlidir **(24)**. Semende enerji kaynağı olarak görev yapan kreatin fosfokinaz enzimi (CPK), adenosin trifostat

(ATP) ile mitokondriyon indeks aktiviteleri sperm konsantrasyonu, motilitesi ve fertilizasyon kapasitesi ile bağlantı göstermektedir **(24)**. Aksesuar genital bezler olan seminal vezikül, prostat ve epididimin fonksiyonlarını değerlendirmede ve obstrüksiyonların saptanmasında früktoz, alfa-glukozidaz, asitfosfataz, prostat spesifik antijen (PSA) ve karnitin düzeyleri önemli biyokimyasal belirteçlerdir **(24)**.

2.2.2. Semen'in Makroskopik ve Mikroskopik İncelenmesi

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesi ve saptanmasında spermatozoonların incelenmesi önemli bir testtir. Uygun bir tedavi yönteminin saptanmasında kullanılır. Semen hacminin büyük bir kısmını seminal vezikül salgıları oluşturmaktadır. Semen'in ortalama pH'ı 7.5'tur **(24)**.

Semen analizinden sağlıklı sonuç almak için cinsel perhiz süresinin en az 2, en çok 7 gün olması gerekmektedir. Bu sürenin kısalması sayı ve volümü, uzaması ise hareketliliği olumsuz etkileyebilmektedir **(25)**. Pek çok laboratuvar cinsel perhiz süresini standart olarak 3-4 gün kabul etmektedir. Semen örnekleri 2-7 günlük cinsel perhizden sonra mastürbasyonla temiz, kuru, plastik steril bir kaba toplanmalıdır. Hastalar semen örneğinin verilmesi sırasında kondom, sabun ve krem kullanmamaları konusunda uyarılmalıdır. Semen değerlendirme kriterleri likefaksiyon, görünüm, volüm, pH, viskozite, mikroskopik incelemelerdir **(24,25)**.

a) Konsantrasyon

Sperm sayımı için hemositometre, mikrosel, selvu, standart count, thoma lamı, makler ve hoffman gibi çeşitli sayım kameraları kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak makler sayma kamerası kullanılmaktadır **(25)**.

Spermatozoon konsantrasyonu milyon/ml olarak değerlendirilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartlarına göre sperm sayısını 15 milyon/ml ve daha fazla olması normal kabul edilmektedir **(4,25)**.

b) Sperm Motilitesi

Isı sperm motilitesini etkileyen önemli bir faktör olması nedeniyle sayım kameraları, hareketlilik değerlendirmesinden önce 37°C tutulmasına dikkat edilmelidir **(25)**.

WHO kurallarına göre **(3)** spermatozoon sayımı yapılırken spermatozoon hareketleri 4 sınıfa ayrılır.

- i) +4 hareketli spermatozoonlar: Hızlı, progresif hareketliliktir. Lineer bir şekilde ileri yönde ileri hareket eder.

- ii) +3 hareketli spermatozoonlar: İleri yönde daha yavaş ya da duraklayarak hareket eden spermleri tanımlar.
- iii) +2 hareketli spermatozoonlar: Yerinde hareketlilik olarak tanımlanır.
- iv) +1 hareketli spermatozoonlar: Hareketsiz bir şekilde durmaktadırlar.

Motilite hareketlilik anlamına gelmekte olup +4, +3 ve +2 hareketli spermatozoonların toplam oranıdır.

c) Morfoloji Değerlendirmesi:

Sperm morfolojisi ilk kez mikroskopun Antony Van Leuwenhook tarafından keşfedilmesiyle tanımlanmıştır. Daha sonra WHO 1980 yılında spermlerin morfolojik sınıflandırmasını yapmıştır. WHO'nün önceleri %50, daha sonra %30 olarak verdiği normal sperm morfolojisine ait alt sınıra karşılık, kruger kriterleri ile değerlendirmede bu sınır %4 olarak ortaya konmuştur **(23)**.

Morfolojik sınıflandırma semen analizinde değerlendirilen en önemli kriterdir. Morfolojik değerlendirme, lam üzerine semenin ince bir şekilde yayılıp boyanmış preparatlarda immersiyon objektifi ile (10x100) yapılmalıdır. Morfoloji preparatların hazırlanmasında yaymanın kalınlığı sonuçları doğrudan etkilemektedir bu yüzden sperm örneğini yaymada dikkatli olmak gerekir **(22,23)**.

Morfolojik değerlendirmeler lam üzerine fikse edilmiş örneklerin Papanikolaou, Diff Quik ya da Shorr boyalar ile yapılmalıdır. Kullanılan boyama yöntemine göre spermler farklı boyutlarda görülebilir. Çünkü boyama öncesi yapılan fiksasyon sırasında spermler biraz büzülebilir. Diff Quik yönteminde fiksasyon ve boyama işlemi kısa sürdüğünden spermler gerçek boyutlarına yakın görünmekteyken, Papanikolaou' ya da Spermac boyamada daha küçük görünmektedir **(26)**. Normal morfolojiye sahip olan spermlerin kriterleri;



Şekil-6: Normal Spermin Bölümleri (27)

Baş ; 2 – 3 μm en ve 4 – 5 μm boyda, konturları düzgün, oval akrozom başın %40 - %70 kaplayacak şekilde olmalı, vakuol içermemeli ve ekvatoryal segment konturlara uygun olmalıdır. Spermatidin golgi cisimciğinden oluşan akrozomal yapı, fertilizasyon için gerekli hyaluronidaz ve proakrozin gibi hidrolitik enzimler içermektedir. Baş anomalileri küçük, büyük, yuvarlak, uzamış, amorf, vakuollü olarak sınıflandırılabilir (23,25,28).

Boyun ; 4 – 5 μm uzunluğunda ve düzgün olmalı ve başın alt kısmına, aksiller konumda bağlanmalıdır. Boyun kısmında bulunan sitoplazmik cisim başın yarısından büyük olmamalıdır. Boyun anomalileri kalın ve irregüler olarak görülebilir (23,25,28).

Kuyruk ; 50 – 55 μm uzunluğunda, düzgün kıvrımlı, boyun kısmından daha ince olmalı ve son kısma doğru giderek incelmelidir. Sperm kuyruğunda hareketi sağlayan temel yapı aksonemdir ve mikrotübüler çiftlerden oluşmaktadır. Mikrotübül'ler dinein olarak bilinen yapısal bir proteinden oluşmaktadır. Aksonem kendilerine karşılık gelen periferel çiftlere eşlik eden 9 ince silindirik yapıdan oluşan yoğun dış fiberler ve fibröz kılıf ile çevrelenmektedir. Yoğun dış fibriller sperm kuyruğunun %60 ını oluşturur. Kısa, kırık, birden fazla kuyruk, kendi eksenini etrafında kıvrılmış, kalın küt görünümlü kuyruklar kuyruk anomalileri olarak sayılır (23,25,28).

Normal sperm şeklinin tanımlanması postkoidal servikal mukustan ya da zona pellusida yüzeyinden alınan spermlerin incelenmesiyle yapılmıştır (23,25,26,28).

Tablo-1: Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi (26)

Baş	Uzunluk 5 - 6 mikron Genişlik 2.5 – 3.5 mikron
Akrozom	Başın %40 - %70'ini oluşturmalı
Orta parça	Genişlik 1 mikron Uzunluk 1.5x baş uzunluğu
Kuyruk	Boyu yaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış Kırık içermeyen
Sitoplazmik damlacık	Baş alanının %30-70'inden az Sadece orta parçada lokalize

d) **Terminoloji (3)**

Normospermi = ml ' deki spermatozoon sayısı 15 milyon / ml veya daha fazladır.

Oligospermi = ml ' deki spermatozoon sayısı 15 milyon / ml' den daha azdır.

Polispermi = ml ' deki spermatozoon sayısı 15 milyon / ml' den çok fazla (yüksek konsantrasyon , > 200 M / ml)

Azospermi = Tüm semende hiç spermatozoon bulunmamasıdır.

Aspermi = Seminal plazma üretiminin olmamasıdır.

Nekrospermi = Spermatozoonların ölü olmasıdır.

Astenospermi = Motilitenin düşük (%40 'dan daha az) olmasıdır. < % 40 grade (A+B) veya < %32 grade A

Teratospermi = Morfolojik olarak anormal spermatozoonların çoğunlukta olmasıdır. < % 4 normal spermatozoa.

Lökospermi = Semende lökositlerin 1 milyon / ml ' den daha fazla olmasıdır.

Hiperspermi = Semen hacminin 6 ml'den daha fazla olmasıdır.

Hipospesmi = Semen 1 ml veya daha az olmasıdır.

Globozoospermi = Spermatozoonda akrozom yokluğudur.

Hematospermi = Semende eritrositlerin bulunması.

2.3 SPERM BOYAMA YÖNTEMLERİ

Semen numuneleri bir lam üzerine yayılıp kurutulduktan sonra, spermin ayrıntılı bir şekilde tanımlanması için fikse edilip boyanmaktadır. Bunun için;

Papanicolaou

Shorr

Diff Quik

Spermac boyaları kullanılmaktadır (4,29).

2.3.1 Papanicolaou Boyama Yöntemi (4)

Papanicolaou boyasıyla spermiler ve diğer hücreler iyi boyanmaktadır. Bununla; sperm başının, akrozom ve post akrozom bölgesi, artık sitoplazma, orta ve anaparça boyanır. Tanımlanan bu modifiye boyama tekniğinin; sperm morfolojisinin analizi, immatür germ hücreleri ve sperm dışı hücrelerin incelenmesinde yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Bu boyama yöntemi kullanılarak boyanan lamalar, tespit sıvısıyla muamele edilerek ileride iç kalite programlarında kullanılmak üzere saklanabilir.

2.3.2 Shorr Boyama Yöntemi (4,30)

Shorr boyaması Papanicolaou boyamasına benzer oranda normal formların görülmesini sağlamaktadır. Shorr başlıca smearler için kullanılır. Papanicolaou tarafından tanımlanan boyama yöntemine oranla daha basittir ve daha çabuk yapılır. Çeşitli hücre tiplerinde sitoplazma ayrımını güzel belirttiğinden hormonal durumların saptanmasında uygundur.

2.3.3 Diff Quik (Hızlı Boyama) Yöntemi (4,24)

Hızlı boyama yöntemleri, özellikle analiz günü sonuç verilmesi gereken laboratuvarlar için uygundur. Birkaç farklı boyama setleri bulunmaktadır. Diff Quik boyası üç basamaklı bir sperm boyasıdır.

1. Solüsyon fiksatif
2. Solüsyon Sitoplazma boyası
3. Solüsyon ise nukleus boyasıdır.

2.3.4 Spermac Boyama Yöntemi (29,31,32)

Spermac boyama genellikle erkek üreme sisteminde morfolojik olarak spermlerin normal ve anormal yapısını tespit etmede kullanılır. Bu yöntem erkek kısırlığında tanı belirlemede yardımcı olabilir. Testte gerekli malzemeler;

Stain A= Kırmızı boya 50 ml ya da 250 ml

Stain B= Açık yeşil 50 ml ya da 250 ml

Stain C= Koyu yeşil 50 ml ya da 250 ml

Fix= Fixative 50 ml ya da 250 ml

Semen örneği temizlenmiş lamın üzerine 45 derecelik açıyla lamel yardımıyla smear şeklinde yayılmaktadır ve kurutulmaktadır. Kurutulan örnek 5 dakika fiksativde tutulup, 37°C'de tekrar kurumaya bırakılmaktadır. Kurutulan örnek Stain A da 2 dakika bekletilip distile su ile yıkanarak kurumaya bırakılır. Örnek kurutulduktan sonra Stain B de 1 dakika bekletilip distile su ile yıkanıp tekrar kurutulur. Son olarak kurutulan örnek Stain C de 1 dakika bekletilip distile su ile yıkanıp kurutulmaktadır. Gözlem yapmak için ışık mikroskobunda 1000 kat büyütmede immersiyon yağı kullanılarak aşağıdaki yapılar gözlenir **(29,31,32)**.

Akrozom=Koyu yeşil

Nükleus=Kırmızı

Ekvatorial bölge= Açık yeşil

Orta parça ve kuyruk= Yeşil

100 ya da 200 sperm sayılarak normal ve anormal sperm defekleri tespit edilmektedir. WHO kriterlerine göre %4 ve fazlası normal yapıya sahip olan spermatozoonlar normal kabul edilmektedir **(29)**.

2.4 SPERM MATURASYONU VE KAPASİTASYONU, MOTİLİTE KAZANMASI

Testislerde, seminifer túbülde üretilerek lümende serbest kalan sperm gelişimleri boyunca değişiklikler geçirirler. Gelişimlerinin son döneminde yuvarlak ve iri olan spermatitlerden küçük, hareketli sperm meydana gelir. Fakat bu aşamada sperm fertilizasyon için gerekli olan oositi tanıma, bağlanma ve penetre olabilmek için yeteneğini kazanmamışlardır. Bu özelliğini epididimisten geçerken kazanmaktadırlar. Bu olaya Epididimal Maturasyon adı verilmektedir **(33)**. Epididimal maturasyon sırasında bir takım değişiklikler gözlenir. Motilitede gözlenen değişiklikler; epididimal kanallardan geçen spermelerde meydana gelen en çarpıcı değişim sperm kuyruğunu hareket ettirecek potansiyeli kazanmasıdır. Sperm fertilizasyon kapasitesine sahip olabilmesi için ileri hızlı hareketli olmaları gerekmektedir. Sperm caput epididimisten itibaren hareket yeteneklerini yavaş yavaş artırır ve kauda epididimisten ayrıldıklarında oositi fertilize etmek için gerekli hareket özelliğine ulaşırlar **(33)**.

Epididimal maturasyonda motilite değişikliği kadar önemli olan bir diğer özellik de sperm oositi tanıyarak ona bağlanma yeteneği kazanmalarıdır. Epididimal kanalın ilk parçasından ve caput bölgesinden elde edilen sperm oosite bağlanmazken kauda epididimis kaynaklı sperm oosite bağlanıp penetre olabilirler **(33)**.

Epididimal maturasyon sürecinde sperm hücre zarında biyokimyasal değişiklik, sperm çekirdeği ve sperm kuyruğunda da değişiklikler gözlenmektedir. Testiküler sperm zayıf hareketli olması plazma zarının immatür olmasından kaynaklanmaktadır. Sperm epididimis boyunca ilerlerken farklı bölgelerden geçerken farklı bileşimli sıvılarla karşılaşmaktadır. Bu da sperm hücre membranını farklı şekilde etkilemektedir. Sperm testisten ayrıldıklarında baş bölgelerindeki plazma membranı üzerinde çok sayıda antijenik özelliği olan molekül bulunmaktadır **(33)**. Maturasyon sırasında bu markomoleküller değişikliğe uğrar ve kaybolurlar. Sperm plazma zarında meydana gelen bu değişimler fertilizasyon sırasında sperm oositi tanıyıp bağlanması için gereklidir. Epididimal maturasyon sırasında sperm çekirdeğindeki kromatin stabilize olur ve çekirdeğin sağlam bir yapı kazanarak sperm zona pellusidaya penetrasyonunu kolaylaştırır **(33)**.

Spermiler epididimisten geçerken kompozisyonları değişen lüminal sıvı ile karşılaşılır. Epididim sıvısında bulunan bileşiklerin sperm maturasyonunda rolü bulunmaktadır **(24)**. Epididim sıvısının hiperosmotik bir yapısı bulunmaktadır. L-karnitin, glutamat, taurin, gliserolfosforin, sialikasit, laktat gibi steroidler içermektedir **(24)**. Lümeninde ise sodyum, potasyum, klor, bikarbonat gibi iyonlar yer almaktadır **(24)**. Epididim sıvısı hafif asidik (pH 6.5 – 6.8) özellik taşımaktadır. Çok sayıda protein (transferin, albümin, immobiline gibi) ile çeşitli enzimler (glikozil transferaz, glikozidaz, glutatyon peroksidaz) bulunur. Bu proteinlerin birçoğunun sperm maturasyonu ve sperm yumurta ilişkisinde rolü bulunmaktadır. Epididim, spermilerin korunması ile toksinlerden etkilenmemesinden de sorumludur **(24,33)**.

2.4.1 Sperm Kapasitasyonu ve Motilite Kazanması

Epididimal matürasyonlarını tamamlamış spermiler henüz fertilizasyon yeteneğini kazanmamışlardır. Spermilerin dişi genital sistemi içinde akrozom reaksiyonunu tamamlayabilme ve fertilizasyon yeteneğini kazanmaya yönelik geçirdiği değişim sürecine kapasitasyon denmektedir **(33)**. Kapasitasyon spermilerin fertilizasyon sırasında oosite ulaşmak için aşmak zorunda olduğu kumulus hücreleri, zona pellusida tabakasına karşı yanıt olarak başlayan bir olgudur **(33)**.

Kapasitasyon, spermelerde yapısal bir değişikliğe sebep olmamaktadır. Genellikle akrozom reaksiyonunun tamamlanması için gerekli bir olgunlaşma evresi olarak kabul edilir. Kapasitasyonun sperm üzerine olan etkileri; sperm motilitesi, yüzey değişiklikleri, akrozom reaksiyonu ve aktivasyonudur **(34)**.

Kapasitasyon, dişi genital kanallarında başlar ve tamamlanır. Genellikle servikste başlar, uterusu devam ederek tuba uterinallarda tamamlanır **(33)**. Spermilerin vajinadan tuba uterinallara geçişi sırasında geçen sürece yayılan kapasitasyon sırasında spermilerin plazma membranlarında değişiklikler gözlenir;

- Akrozom kep bölgesindeki plazma membranından, seminal plazma membranı uzaklaştırılır.
- Sperm plazma membranındaki intramembranöz partiküllerin yer değiştirdiği gözlenir.
- Hücre içi kalsiyum ve sodyum seviyesi yükselir **(34)**.

Kapasitasyon sürecinde epididimal matürasyonda spermlerin hücre yüzeyine yerleşen yapılar uzaklaşır ve akrozomal kep bölgesi hücre zarı yüzeyinde bulunan tabaka da ayrılır **(33)**. Bu olayların gerçekleşmesinden sonra spermlerin reseptör bölgelerinin oosit reseptörleriyle karşılaşması ve oositten gelen uyarıları alabilmeleri kolaylaşır. Kapasitasyon süreci tamamlandığında spermler akrozom reaksiyonunu geçebilecek özellik kazanırlar **(33)**.

Kapasitasyon sürecini tamamlayan spermlerin motilite kinetiği değişir ve hiperaktive olurlar. Hiperaktivasyon, spermatozoon kuyruk hareketlerindeki açılanmanın ve ileriye doğru olan hızının artması olarak tanımlanır. Hiperaktivasyon kazanan spermatozoonlar güçlü kuyruk hareketleriyle oositi çevreleyen hücresel yapıları daha kolay aşarak ilerler **(33-35)**.

2.5 ERKEK İNFERTİLİTESİ VE ALFA GLUKOZIDAZ

Esas kaynağı epididimdir. Epididimis spermatozoanın olgunlaşmasında, hareketlilik kazanmasında ve dölleme kapasitesinin işleyişinde önemli rol oynar **(36)**. Alfa glukozidaz epididimal epitelden salgılanmaktadır ve sperm matürasyonunda gerekli optimal enerjinin sağlanmasında gerekli bir enzimdir. Seminal plazmada alfa glukozidazın iki izoformu bulunmaktadır. Nötral olan alfa glukozidaz sadece epididimde bulunmaktadır. Asidik olan prostatta bulunur. Asit izoenzim selektif olarak inhibe edilerek sadece epididimal fonksiyonu yansıtan nötral alfa glukozidaz ölçümü yapılabilmektedir **(23)**. Normal düzeyi ejakülat başına > 20 mIU dir **(37)**. Azospermi, tıkanıklığa bağlı ya da testislerden mi kaynaklandığının belirlenmesinde iyi bir biyokimyasal markerdir. Distal kanal tıkanıklıklarında alfa glukozidaz değeri anlamlı şekilde azalır. Rete testis seviyesindeki bir tıkanıklıkta seminal plazmadaki alfa glukozidaz aktivitesi normal sınırlar içerisinde bulunabilir **(23,24)**.

2.6. FERTİLİZASYON

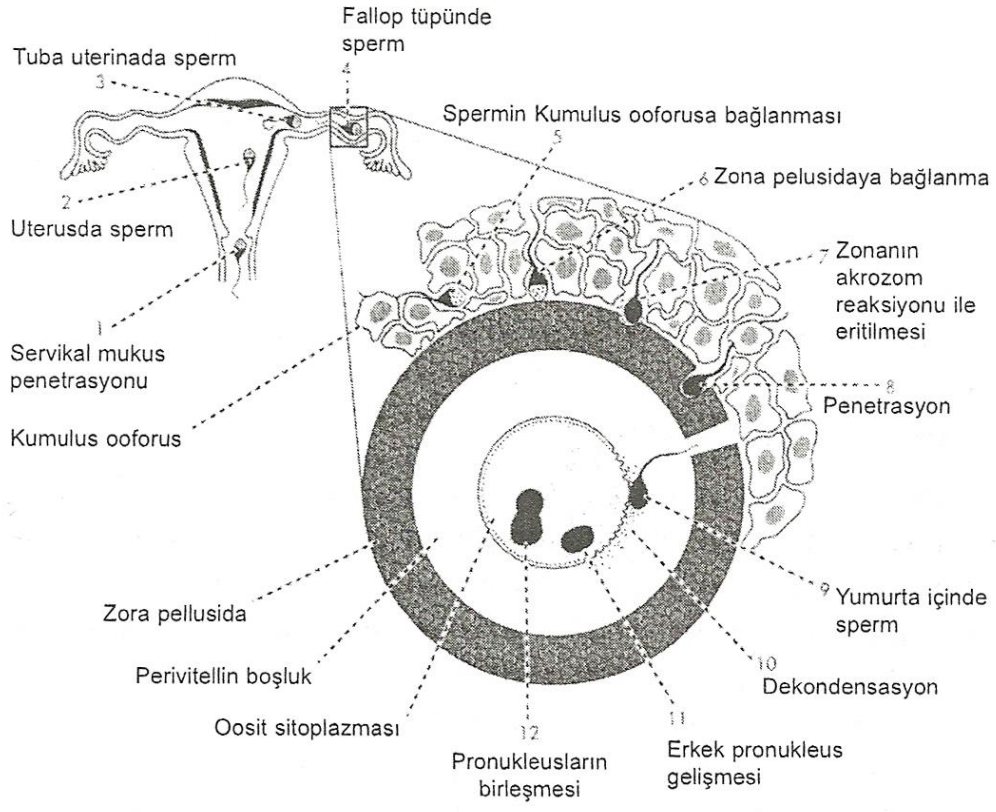
Fertilizasyon, spermin yumurta sitoplazmasına girerek nükleusların birleşmesiyle yeni bir organizma oluşturmasıdır. Fertilizasyon sırasında 3 ana olay meydana gelmektedir;

- Akrozom reaksiyonu
- Zona pellusida (ZP)' nın bir proteini olan ZP3' e spermatozoonun bağlanması
- Spermatozoon – oosit füzyonu dur.

Fertilizasyon öncesi dişi genital kanalda sperm kapasitasyonu ve hiperaktivasyonu gerekir **(24)**. Dişi genital kanalındaki salgılar kapasitasyona neden olmaktadır. Akrozom reaksiyonu kapasitasyon ve hiperaktivasyon sonrası oositin dış yüzeyinde bulunan spesifik ligandlar ile sperm yüzeyindeki reseptörlerin etkileşimi sonucu meydana gelen ekzositotik bir işlemdir **(24)**. Akrozomal ekzositoz sonrası hidrolitik ve proteolitik enzimler ortaya çıkmaktadır. Bu proteolitik enzimler sperm zona pellusidayı delerek yumurtanın sitoplazmik membranına ulaşmasını sağlamaktadır. Zona pellusida 3 proteinden oluşmaktadır: ZP1, ZP2, ZP3 isimleri ile tanımlanmaktadır **(14)**.

ZP3 glikoproteini sperm zona bağlanmasında primer reseptör olarak rol oynar. ZP2 sperm penetrasyonunda sekonder reseptör olarak, ZP1 diğer glikoproteinler arasında bağlayıcı olarak görev yapar **(24)**. Sperm zona pellusidaya bağlanması ve penetrasyonu sonrası yumurta sitoplazmasını aktive ederek, kortikal reaksiyonu başlattığı bilinmektedir. Kortikal reaksiyonun başlaması intrasellüler Ca^{+2} salınımı sonucu gerçekleşmektedir **(24)**.

Sperm – oosit füzyonu, oosit plazma membranında depolarizasyona yol açmaktadır. Bunun sonucunda da oosit sitoplazması içinde Ca^{+2} dalgası oluşmaktadır. Ca^{+2} konsantrasyonundaki artış, depolarizasyon sinyallerini artırır. Oosit hücre bölünmesine devam etmesi ile mayoz II bölünmeyi tamamlayarak 2. kutup cisimciğinin privitellin aralığına atılmasını ve erken embriyogenezi tetikler **(14)**.



(Tripp and Gagnon, 1997)

Şekil-7: Fertilizasyonda Basamaklar (Tripp ve Gagnon,1997)

2.6.1. Oosit Aktivasyonu ve Olgunlaşması

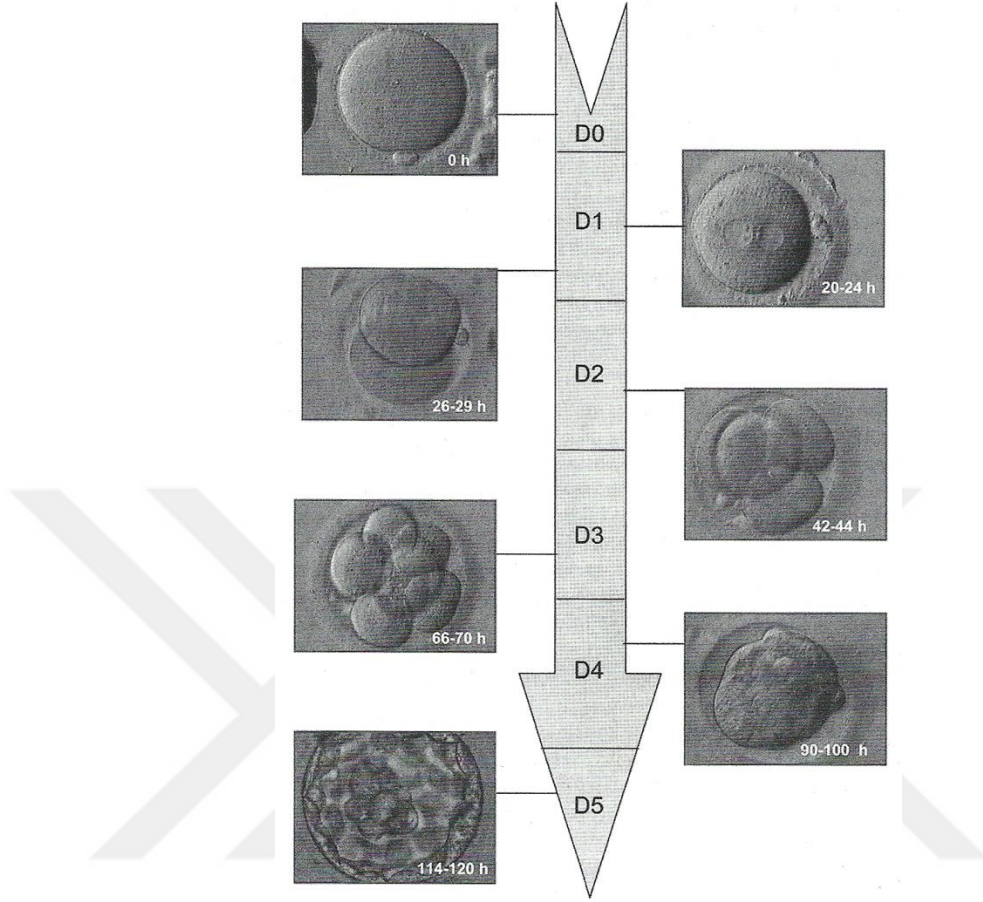
Spermin yumurta ile bağlanarak birleşmesi metabolik olarak inaktif olan yumurtayı aktif zigota dönüştürür. Fertilizasyonda intrasellüler kalsiyum iyon konsantrasyonundaki artış, aktivasyon sinyalini yönlendiren merkezi bir haberci olarak görev yapar. Yumurta zarında sperm glikoproteinleri için reseptör bulunmaktadır. Sperm yumurta zarında oluşturduğu sinyaller vasıtasıyla yumurtayı aktive eder (24).

Yumurta aktivasyonu ile zona pellusida özellikleri değişir. Zona pellusida daha fazla spermatozoon penetrasyonuna karşı dirençli hale getiren kortikal reaksiyonu tetikler (38). Yumurta aktivasyonu II. Mayozun metafazında geçici olarak durmuş olan hücre siklusunu başlatır ve yeni oluşmuş embriyoyu mitotik hücre siklusuna girmesi için hazır eder (39).

Her iki pronükleus oosit sitoplazmasında yan yana gelene kadar sürekli yaklaşırlar. Dişi ve erkek nüklear zarlar parçalanır ve nüklear metaryelleri birleşip, bütünleşir. Bu nüklear singamidir. Bundan sonra ilk embriyonik hücre bölünmesi başlar **(40)**.

IVF veya mikroenjeksiyon işleminden 20-24 saat sonra döllenme kontrolü yapılır. Fertilizasyon için 2 pronukleus, birinci ve ikinci kutup cisimciği gözlenmesi gerekir. Bu evrede PN boyutu, büyüklükleri, nüklear öncü cisimciklerin sayısı ve simetrisi, sitoplazmada halo varlığı değerlendirilir **(39)**.

Döllenmeden yaklaşık 26-29 saat sonra ilk mitotik bölünme gerçekleşerek iki hücreli embriyo meydana gelmektedir. Zigot iki hücreye ulaştıktan sonra da bir seri mitotik bölünmeye girerek hücre sayısını artırır. Her yarıklanma bölünmesi sonrasında hacmi giderek küçülen bu hücrelere blastomer denmektedir. Blastomerler sekiz hücre evresine kadar gevşek hücre kümesi halinde, üçüncü yarıklanmadan sonra birbiriyle daha sıkı bağ kurarak kompakt bir hücre kümesi haline gelirler. Bölünme zamanlamasına göre embriyonun sahip olduğu blastomer sayısı günün beklenen limitleri arasında ise normal gelişen bir embriyo, sayı düşükse yavaş gelişen bir embriyo olarak değerlendirilir. Normal kabul edilen embriyo 26-29. saatte iki hücre, 42-44. saatte (2.gün) üç-dört hücre, 66-70. saatte (3.gün) altı-sekiz hücre ve 4. günde birleşme işaretlerine bağlı olarak on ve üzerinde hücreye sahip kompakt embriyodur. Kompakt halindeki embriyo morula haline gelir ve morula evresinden sonra giderek genişleyen hücreler arası boşlukların birleşmesiyle blastosel denilen tek bir boşluk oluşur. Bu embriyoya da blastosist denmektedir **(39)**.



Şekil-8: Embriyo Bölünmeleri (39)

Eşit blastomer büyüklüğüne sahip, granülasyon göstermeyen %0-5 oranında fragmantasyon içeren embriyo **1. kalite** olarak değerlendirilir. Eşit blastomer büyüklüğüne sahip, %5-10 oranında fragmantasyon içeren veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo **2. kalite**, blastomerler birbirinden hafifçe farklı, %10 üzerinde fragmantasyona sahip veya granülasyon işaretleri gösteren embriyo **3. kalite**, blastomer sayısı net sayılamayan, %30'dan fazla fragmantasyona sahip, blastomerler birbirinden belirgin derecede farklı veya ileri derecede granülasyon gösteren embriyo **4.kalite** olarak değerlendirilir **(41)**.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Çalışmaya Alınan Hasta Grupları

Bu çalışma yaşları 22-44 arasında değişen Batı Bahat Hastanesi infertilite merkezine başvurmuş olan Normozoospermi (sayı >15 milyon / ml ,, motilite >% 40 , morfoloji:>% 4), Oligozoospermi (<15 milyon / ml , motilite > %40 , morfoloji:>%4) ve Astenozoospermi (>15 milyon / ml ve üzeri, motilite <%40 , morfoloji:>%4) olmak üzere 3 grup semen örneği toplanmıştır. Örnek toplanan gruplarda eşlerinin normal olması gözönüne alınmıştır

Çalışma prospektif kontrollü olarak planlanmış ve 17.06.2016 tarih ve 2016/25 sayı ile İstanbul S.B.Ü. Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabibliği Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile yapılmıştır.

3.2. Örneklerin Toplanması

Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle kliniğe gelen hastalardan, hastanın adının ve soyadının yazılı olduğu steril kaplara mastürbasyon yöntemiyle alındı. Mastürbasyon öncesi semen verecek olan hastaya semen verme tekniği ayrıntılı olarak anlatıldı. Semen alındığı saat not edildi. Oda ısısında likefiye olması için 20-30 dakika bekletildi. pH kâğıdı ile(Merck) pH (7,5-8,0) değerlendirmesi yapıldı. Cinsel perhiz süresi, viskosite (normal), hacim (2-6 ml), renk (opak) ve hastaya özel likefaksiyon zamanı kaydedildi. Mililitredeki sperm sayısını belirlemek üzere Makler sayma kamerasına (Counting Chamber Makler, Sefi Medical Instruments, İsrail) küçük bir damla semen örneği konuldu. Toplam sperm sayısı ve progresif hareketli ve immotil sperm sayısı ile motilite değerlendirmesi yapıldı.

Sperm konsantrasyonu, motilite ve morfolojisi için standart manuel teknikler uygulandı. Motilite ve konsantrasyon ışık mikroskobunda X20 büyütmede WHO (World Health Organization) kriterlerine göre en az 100 sperm sayılarak yapıldı. Makler sayma kamerasına 10 µl semen koyularak ve X20 büyütme altında 10 kare sayılarak konsantrasyon ve motilite belirlendi.

Morfolojik skorlama için lam üzerine yayılarak hazırlanan semen preparatları Spermac boyama yöntemiyle boyandı. Morfoloji, faz kontrast mikroskopta, X100 büyütmede Kruger kriterlerine göre değerlendirildi.

3.3. Sperm Boyama ve Morfolojik İnceleme

Morfoloji incelemek için lam üzerine bir damla semen örneği damlatıldı ve başka bir lam yardımıyla ince ve homojen bir yayma yapıldı. Aynı işlem iki özdeş lam için tüm örneklerle yapıldı. Açık havada ve oda ısısında kurutuldu. Lamlar spermac boyama ve anilin blue testi için hazırlandı.

3.3.1 Spermac Boyama

Lam üzerine yayılıp kurutulan preparatlar, fiksasyon (FIX) solüsyonuna alınıp 10 dakika bekletildi. Fiksasyondan çıkarılıp çok yavaş ve az miktarda akan suda yıkanarak lam üzerindeki su süzdürüldü. Daha sonra sırasıyla solüsyon A'da 2 dakika bekletilip, ardından yıkama ve suyu süzdürme tekrar yapıldı. Solüsyon B ve C'de 1 dakika bekletilip, ardından yıkama ve suyu süzdürme tekrar yapıldı. Boyanmış lamlar kurumayı için oda sıcaklığında bekletildi. Kurutulan preparatlar için daha sonra immersiyon yağı kullanılarak X100 büyütmede incelendi. Morfoloji değerlendirmesi yaparken 100 sperm dikkate alındı. Her anomali ayrı ayrı not edildi (29,31,32).

3.3.2. Anilin Blue Testi

Semen örneğinin yayılarak kurutulan diğer preparatlar %1 formaldehit ile 30 dk fikse edildi. %5'lik anilin mavisi (aniline blue) pH 2,5 olan PBS'de hazırlandı. Preparatlar 5 dk anilin blue solüsyonunda tutuldu ve PBS ile yıkandı. Havada kurumaya bırakıldı. 100X büyütmede immersiyon objektifinde incelendi. İmmatür sperm (Histon pozitif) anilin blue boyasını almış olarak gözlemlendi. Normal sperm ise boya almadı. 200 sperm sayarak % olarak immatürite belirlendi (24). Bu test ile spermiyohistogenez hataları belirlenmektedir. Sperm kromatin yapısının normal oluşu başarılı bir fertilizasyon sağlamaktadır.

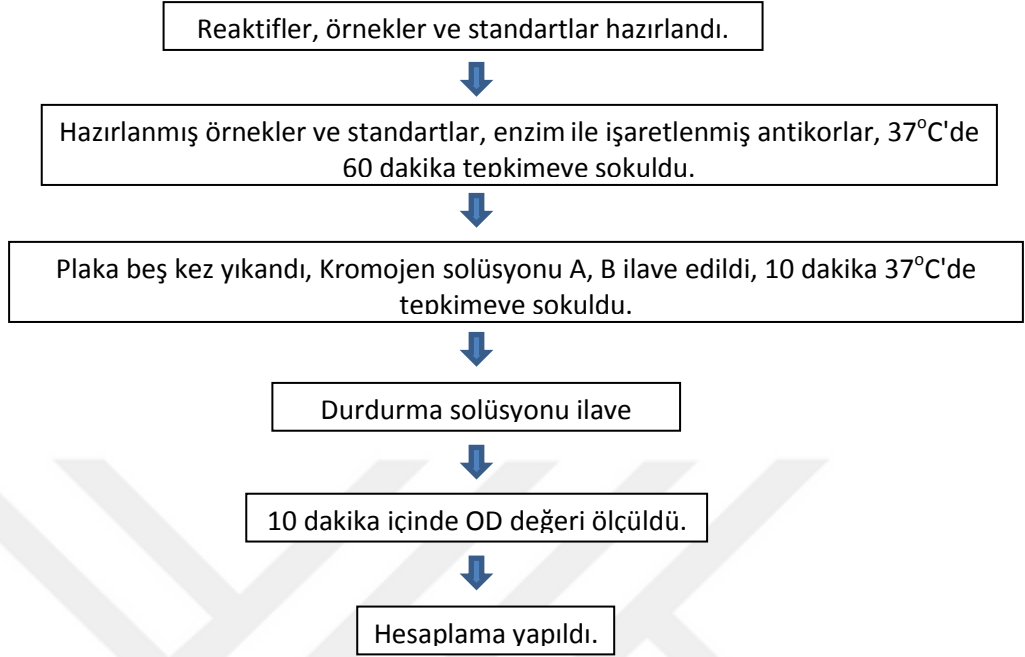
3.4. Alfaglukozydaz Analizi (42)

Semen örneklerinden 1 'er ml 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatanlar alınarak -20 °C de donduruldu.

Örneklerdeki alfaglukozydaz seviyelerinin tespiti için Elisa kiti kullanıldı. Elisa (Enzime-linked immunosorbent assay), belli bir enzim ile işaretlenmiş test maddesini kullanarak spesifik antijen ya da antikorunu belirlemek için laboratuvarında uygulanan çok duyarlı bir kantitatif ölçüm yöntemidir. ELISA teknikleri, antijen ve antikor saptamak için tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır.

α -Glucosidase (a-Glu)(Sun Red Biotechnology Co.) isimli Elisa kiti kullanarak tüm örneklerde alfaglukozydaz değerleri ölçüldü ve kaydedildi. Kitin kullanımı ve ölçüm prosedürü aşağıdaki gibidir **(42)**:

Örneklerdeki alfaglukozydaz seviyesini analiz etmek için çift antikor sandviç yöntemi kullanıldı. Alfa Glukozydaz (a-Glu) monoklonal antikor ile önceden kaplanmış monoklonal antikor Enzim kuyusuna α -Glukozydaz (a-Glu) eklenir, inkübasyon yapılır. Daha sonra, biotin ile işaretlenmiş alfaglukozydaz antikorları eklenir ve immün kompleks oluşturmak için Streptavidin-HRP ile birleştirilir. Ardından inkübasyon yapılır ve kombine olmayan enzimi uzaklaştırmak için tekrar yıkama işlemi yapılır. Daha sonra Kromojen Solution A, B'yi eklenir. Sıvının rengi maviye dönüşür ve asitin etkisiyle, renk sonunda sarı olur. Renk kromatografisi ve numunenin Substance α -Glucosidase (alu) konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon görülür. İşlem prosedürünün özeti Şekil-9'da gösterilmiştir.



Şekil-9: Elisa Kiti Ölçüm Prosedürünün Özeti (42)

3.5. Folikül Aspirasyonu (OPU), Denudasyon ve İntrastoplazmik SpermEnjeksiyonu (ICSI) İşlemi

Oosit aspirasyonundan sonra foliküllerden elde edilen kümülüs oosit kompleksleri G-MOPS kültür ortamında yıkayıp, G-IVF kültür ortamına alınarak 2 saat %6 CO₂ , %5 O₂ ve 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatörde bekletildiler. Süre tamamlandıktan sonra denudasyon işlemi için G-Gamete içerisinde G-MOPS ile 1:10 oranında hazırlanan hiyalüronidaz ayıklama pipetine çekilip, oositler alınarak mekanik pipetleme gerçekleştirildi. Bu işlem sonunda oositler 4 hazneli kültür kabınının 1. gözündeki G-IVF solüsyonuna alınarak 60 dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra ICSI işlemi için ICSI petrisinde hazırlanan G-Gamete (GMOPS içeren ortam) kültür ortamına alındı. Mikroenjeksiyon işlemi, X400 büyütmede Narishige inverted mikroskop altında G-Gamete mediumu içerisinde yapıldı. ICSI sonrasında oositler G-Gamete kültür ortamı içeren damlacıklardan alınarak, dört hazneli kültür kabınının 2. ve 3. gözünde bulunan G1 kültür ortamında sırasıyla yıkandı. Yıkanan oositler Nunc kültür kabında G1 (Vitrolife) mediumu ile hazırlanan damlacıklara bir oosit gelecek şekilde yerleştirildiler ve inkübatördeki yerine kaldırıldılar. Fertilizasyondan 3. gün sabahına kadar embriyolar G1 (Vitrolife) kültür ortamında her gün değiştirilerek muhafaza edildi. Her gün hazırlanan kapların

üzerine hastanın adı-soyadı, protokol numarası yazıldı. 3. gün sabahında kontrol edilen embriyolar G2 (Vitrolife) kültür ortamına alındı ve inkübatöre kaldırıldı. Takip edilen embriyolar 3. gün veya 4. gün hastaya transfer edildi. 3. gün transfer için hastanın embriyolarından uygun olanı seçildi, 4lü kültür kabının 4. gözünde bulunan G2 (Vitrolife) kültür ortamına alındı ve transfer edildi. 4. güne ilerletilen embriyolar tekrar G2 (Vitrolife) kültür ortamı içeren damlacıklara alınarak takip edildi. Transfer günü dörtlü kabın 4. gözünde bulunan G2 kültür ortamına alındı ve transfer edildi. Hastaların gebelikleri takip edilerek not edildi.

Sıra No	Malzeme	Üretici	Ülke
1	Falcon grubu tamamı pipetler tüpler	B.D.Bionsciences	USA
2	Medium	Vitrolife Scentific	USA
3	Nunc kültür kabı	Thermo Scientific	DANİMARKA
4	Nunc fourwell (4lü kültür kabı)	ThermoScientific	DANİMARKA
5	Hamilton enjektör	Hamilton Company	USA
6	Ependorf steril pipetler	EppendorfGmbh	ALMANYA
7	Laminar flow	Heto-Holten A/S	DANİMARKA
8	Laminar flow içindeki mikroskop	Nikon	JAPONYA
9	Mikromanipülator	Narishige ScientificInt.Lab.	JAPONYA
10	ICSI iğnesi	Sunlight	USA
11	Incubator	Labotect	ALMANYA
12	Santrifuge	LaboGene APS	DANİMARKA
13	Opu toplama seti	Vitrolife Sweden AB	İSVEÇ
14	Cam pipetler		
15	100 lük pipetör	EppendorfGmbh	ALMANYA
16	20 mikrolitrelik pipetör	EppendorfGmbh	ALMANYA
17	Streril sperm toplama kabı	Fırat Med	TURKİYE
18	Vial	Grainer Bio-One GmbH	ALMANYA
19	Steril eldiven	Beybi Plastik	TURKİYE
20	Makler sperm sayma kamerası	SefiMedical	ISRAİL
21	Sperm sayımında kullanılan mikroskop	Nikon	JAPONYA
22	Hyalurınıdase	Vitrolife Scentific	USA
23	Pvp	Vitrolife Scentific	USA
24	Oil	Vitrolife Scentific	USA
25	Transfer kateteri	Kitazato	JAPONYA
26	Sıvı Azot	Lindegaz	TURKIYE

4. BULGULAR

Seminal Alfa glukozidaz düzeyi (mU/ml) oligospermik olgularda daha yüksek bulundu ($p=0,022$, Tablo 3). Normospermik olgular ile astenospermik ve oligospermik olguların semen volümü, sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve normal morfoloji parametrelerinde istatistiki anlamlılık saptandı ($p=0,020, p=0,001, p=0,001, p=0,001$, Tablo 3). 3. gün iyi kaliteli embriyo sayısının oligospermik olgularda daha düşük olduğu gözlemlendi ($p=0,038$, Tablo 3). Sperm kromatin kondansasyon değerlerinin gruplarda farklı olmadığı gözlemlendi. Tüm olgular gebelik pozitif ve negatif olarak incelendiğinde kromatin kondansasyon değerinin gebe olan olgularda daha yüksek olduğu ancak bu değer istatistiki anlamlılık düzeyine ulaşmadığı görülmüştür ($p=0,079$, Tablo 4). Gruplarda seminal alfa glukozidaz değerinin gebeliği pozitif olan grupta farklı olmadığı görüldü (Tablo 5,6,7). Oligospermik ve astenospermik gruplarda 3. gün ve 2. gün iyi kaliteli embriyo sayısının gebe olan grupta daha yüksek sayıda olduğu gözlemlendi ($p=0,049, p=0,044$, Tablo 6,7). Seminal alfa glukozidaz düzeyinin tüm olgularda fertilizasyon ve 2. gün, 3. gün embriyo sayısı ile korelasyon gösterdiği bulundu ($p=0,027, p=0,046$, Tablo 8,9).

Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan veri ve istatistikler aşağıdaki gibidir:

Tablo-3: Üç Gruba İlişkin Ortalamalar ve Karşılaştırmalar

	Normospermi			Astenoşpermi			Oligospermi			p*
	Ortalama	Std. Sapma	n	Ortalama	Std. Sapma	n	Ortalama	Std. Sapma	N	
alfaglukozidaz	3,59	1,85	24	4,32	1,18	26	4,69	1,03	25	0,022
Seminal volüm	3,31	0,66	24	2,88	0,57	26	3,40	0,82	25	0,020
Sperm konsantrasyonu	41,13	12,56	24	26,50	11,79	26	9,00	5,22	25	0,001
Sperm motilitesi	52,50	6,26	24	33,08	7,22	26	45,00	4,79	25	0,001
Normal Morfoloji	4,79	1,44	24	3,08	1,20	26	2,44	1,29	25	0,001
Oosit sayısı	20,33	8,79	24	17,15	9,64	26	14,16	7,48	25	0,052
Fertilize oosit	12,63	5,75	24	9,65	6,40	26	9,04	5,14	25	0,076
Fert oranı	64,35	18,38	24	58,29	16,94	26	64,50	14,47	25	0,321
2. gün emb. sayısı	12,04	6,02	24	9,46	6,15	26	8,72	5,04	25	0,114
2. gün grade I	5,08	3,97	24	4,65	5,05	26	3,00	2,81	25	0,170
3. gün emb. sayısı	12,42	5,77	24	8,96	6,71	26	8,76	5,28	25	0,061
3. gün grade I	5,75	3,88	24	4,12	4,58	26	2,80	3,21	25	0,038
BHCG	70,08	150,59	24	48,69	75,67	26	82,36	86,90	25	0,535
Anilin pozitif	37,31	13,79	13	32,67	11,09	15	34,12	12,38	17	0,607
Anilin negatif	53,08	14,41	13	57,13	12,09	15	50,41	18,57	17	0,476
Anilin hafifpozitif	9,62	2,43	13	10,20	3,78	15	9,59	7,85	17	0,942

*ANOVA –one way

Tablo-4: Gebelik Durumuna Göre Ortalamalar ve Karşılaştırmalar

	Gebelik						p**
	Negatif			Pozitif			
	Ortalama	Std. Sapma	n	Ortalama	Std. Sapma	n	
alfaglukozidaz	4,13	1,47	34	4,28	1,44	41	0,657
seminalvolüm	3,07	0,64	34	3,29	0,77	41	0,189
spermkonsantasyonu	28,40	17,68	34	22,82	15,45	41	0,149
spermmotilitesi	44,41	10,50	34	42,32	9,82	41	0,376
normalmorfoloji	3,71	1,80	34	3,17	1,45	41	0,158
Oosit sayısı	17,29	9,85	34	17,07	8,23	41	0,916
Fertilize oosit	10,26	6,62	34	10,51	5,37	41	0,859
Fert oranı	60,97	16,64	34	63,40	16,85	41	0,533
2. gün emb. sayısı	9,56	6,39	34	10,44	5,42	41	0,521
2. gün grade1	3,68	4,13	34	4,71	4,08	41	0,282
3. gün emb. sayısı	9,53	6,83	34	10,39	5,51	41	0,547
3. gün grade1	3,38	3,74	34	4,88	4,25	41	0,114
Anilin pozitif	33,32	13,80	22	35,74	10,75	23	0,514
Anilin negatif	57,55	14,52	22	49,48	15,46	23	0,079
Anilin hafifpozitif	9,14	4,11	22	10,43	6,35	23	0,422

**Bağımsız gruplarda t Testi.

Tablo-5: Normospermi Grubunda Gebelik Durumuna Göre Ortalamalar ve Karşılaştırmalar

	Gebelik						p***
	Negatif			Pozitif			
	Ortalama	Std. Sapma	n	Ortalama	Std. Sapma	n	
alfaglukozidaz	3,41	1,83	12	3,76	1,92	12	0,908
seminalvolüm	3,17	0,62	12	3,46	0,69	12	0,232
spermkonsantrasyonu	43,50	12,88	12	38,75	12,31	12	0,326
Spermmotilitesi	53,75	6,08	12	51,25	6,44	12	0,271
normalmorfoloji	5,17	1,80	12	4,42	0,90	12	0,282
Oosit sayısı	19,42	8,40	12	21,25	9,44	12	0,583
Fertilize oosit	12,83	6,22	12	12,42	5,52	12	0,908
Fert oranı	65,46	15,76	12	63,23	21,33	12	0,817
2. gün emb. sayısı	11,67	6,71	12	12,42	5,52	12	0,685
2. gün grade1	5,50	5,21	12	4,67	2,31	12	0,705
3. gün emb. sayısı	12,42	6,26	12	12,42	5,52	12	0,931
3. gün grade1	5,75	4,77	12	5,75	2,96	12	0,504
Anilin pozitif	34,33	17,72	6	39,86	10,11	7	0,475
Anilin negatif	57,00	17,88	6	49,71	10,98	7	0,391
Anilin hafifpozitif	8,67	2,16	6	10,43	2,51	7	0,210

*** Mann-Whitney Test

Tablo-6: Astenospermia Grubunda Gebelik Durumuna Göre Ortalamalar ve Karşılaştırmalar

	Gebelik						p***
	Negatif			Pozitif			
	Ortalama	Std. Sapma	n	Ortalama	Std. Sapma	n	
alfaglukozidaz	4,32	1,10	14	4,32	1,31	12	0,979
seminalvolüm	2,96	0,60	14	2,79	0,54	12	0,522
spermkonsantrasyonu	26,50	13,75	14	26,50	9,62	12	0,757
spermmotilitesi	35,00	7,84	14	30,83	5,97	12	0,262
normalmorfoloji	3,07	1,27	14	3,08	1,16	12	0,936
Oosit sayısı	16,64	12,36	14	17,75	5,45	12	0,303
Fertilize oosit	8,86	7,74	14	10,58	4,52	12	0,101
Fert. oranı	57,55	19,66	14	59,14	13,91	12	0,897
2.gün embriyo sayısı	8,50	7,30	14	10,58	4,52	12	0,102
2. gün grade I	3,29	3,71	14	6,25	6,05	12	0,127
3.gün embriyo sayısı	7,57	8,05	14	10,58	4,52	12	0,102
3.gün grade I	2,57	2,65	14	5,92	5,73	12	0,049
Anilin pozitif	30,89	13,72	9	35,33	5,35	6	0,288
Anilin negatif	60,00	13,91	9	52,83	7,91	6	0,287
Anilin hafifpozitif	9,11	3,66	9	11,83	3,66	6	0,173

*** Mann-Whitney Test

Tablo-7: Oligospermia Grubunda Gebelik Durumuna Göre Ortalamalar ve Karşılaştırmalar

	Gebelik						p***
	Negatif			Pozitif			
	Ortalama	Std. Sapma	n	Ortalama	Std. Sapma	n	
alfaglukozidaz	4,87	1,01	8	4,61	1,06	17	0,620
seminalvolüm	3,13	0,79	8	3,53	0,82	17	0,257
spermkonsantrasyonu	9,08	6,04	8	8,97	4,98	17	0,639
spermmotilitesi	46,88	3,72	8	44,12	5,07	17	0,195
normalmorfoloji	2,63	1,19	8	2,35	1,37	17	0,564
Oosit sayısı	15,25	6,98	8	13,65	7,85	17	0,465
Fertilize oosit	8,88	4,09	8	9,12	5,68	17	0,884
Fert. oranı	60,19	11,74	8	66,53	15,49	17	0,336
2.gün embriyo sayısı	8,25	3,28	8	8,94	5,76	17	0,860
2.gün grade1	1,63	1,19	8	3,65	3,14	17	0,044
3.gün embriyo sayısı	8,63	3,89	8	8,82	5,93	17	0,792
3.gün grade1	1,25	1,04	8	3,53	3,64	17	0,085
Anilin pozitif	35,57	11,76	7	33,10	13,32	10	0,695
Anilin negatif	54,86	13,99	7	47,30	21,36	10	0,434
Anilin hafifpozitif	9,57	6,08	7	9,60	9,22	10	0,922

*** Mann-Whitney Test

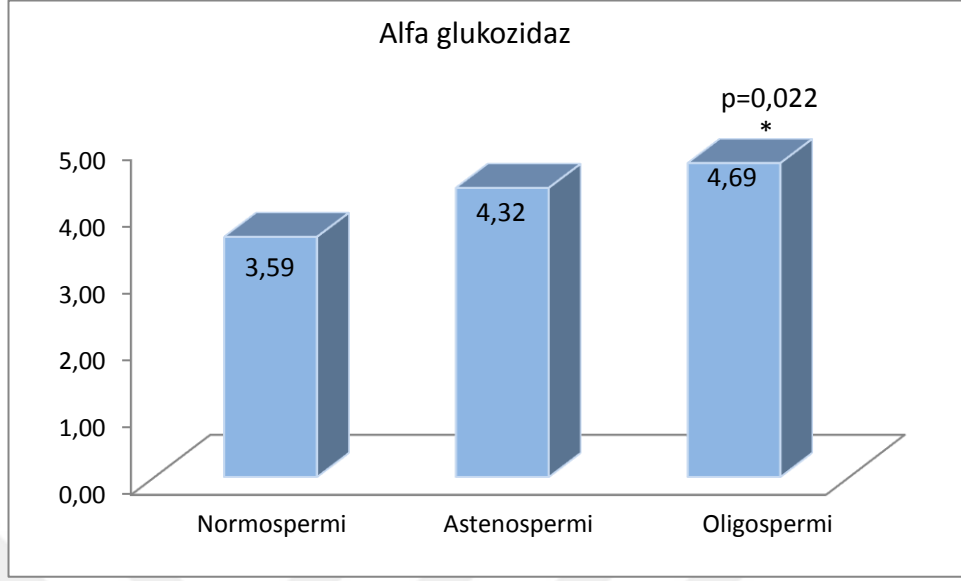
Oligospermi grubunda 2.gün grade1embriyo sayısı gebelerde daha yüksektir (p=0,044)

Tablo-8: Korelasyonlar 1

		seminal volüm	Sperm konsantrasyon	Sperm motilitesi	Normal morfoloji	Oosit sayısı	Fertilize oosit	Fert.	secondary embry
Alfaglukozid az	r	-0,009	-0,213	-0,088	-0,067	-0,154	-0,255(*)	-0,198	-0,231(*)
	p	0,941	0,067	0,452	0,567	0,186	0,027	0,089	0,046
	n	75	75	75	75	75	75	75	75
Seminalvolü m	r		-0,056	0,271(*)	-0,012	-0,172	-0,190	0,080	-0,155
	p		0,634	0,019	0,922	0,140	0,102	0,494	0,184
	n		75	75	75	75	75	75	75
Spermkonsan trasyon	r			0,442(**)	0,602(**)	0,205	0,230(*)	0,075	0,204
	p			0,000	0,000	0,078	0,048	0,525	0,079
	n			75	75	75	75	75	75
spermmotilite si	r				0,450(**)	0,101	0,215	0,269(*)	0,188
	p				0,000	0,387	0,064	0,020	0,106
	n				75	75	75	75	75
Normalmorfo loji	r					0,091	0,051	-0,049	0,017
	p					0,439	0,662	0,677	0,887
	n					75	75	75	75
Oosit sayısı	r						0,846(**)	-0,203	0,819(**)
	p						0,000	0,081	0,000
	n						75	75	75
Fertilize oosit	r							0,310(**)	0,977(**)
	p							0,007	0,000
	n							75	75
Fert.	r								0,315(**)
	p								0,006
	n								75

Tablo-9: Korelasyonlar 2

		2.gün grade1	3.gün embriyo	3.gün grade1	BHCG	Anilin pozitif	Anilin negatif	Anilin hafifpozitif
alfaglukozidaz	r	-0,116	-0,246(*)	-0,156	-0,020	0,079	-0,042	-0,168
	p	0,321	0,033	0,181	0,866	0,608	0,782	0,271
	n	75	75	75	75	45	45	45
seminalvolum	r	-0,142	-0,164	-0,078	0,110	0,002	-0,155	-0,056
	p	0,223	0,161	0,504	0,346	0,991	0,311	0,716
	n	75	75	75	75	45	45	45
spermkonsantrasyonu	r	0,227(*)	0,229(*)	0,339(**)	-0,074	0,131	0,064	0,132
	p	0,050	0,048	0,003	0,528	0,392	0,677	0,389
	n	75	75	75	75	45	45	45
Spermmotilitesi	r	0,056	0,227(*)	0,171	0,012	0,195	-0,092	0,000
	p	0,635	0,050	0,142	0,920	0,200	0,546	1,000
	n	75	75	75	75	45	45	45
Normalmorfoloji	r	0,114	0,046	0,167	-0,132	0,172	0,104	0,024
	p	0,329	0,694	0,153	0,258	0,257	0,496	0,874
	n	75	75	75	75	45	45	45
Oosit sayısı	r	0,498(**)	0,829(**)	0,477(**)	0,094	-0,082	0,179	0,018
	p	0,000	0,000	0,000	0,421	0,591	0,238	0,905
	n	75	75	75	75	45	45	45
fertilizeosit	r	0,659(**)	0,984(**)	0,618(**)	0,057	-0,027	0,107	0,016
	p	0,000	0,000	0,000	0,627	0,859	0,485	0,916
	n	75	75	75	75	45	45	45
Fert	r	0,308(**)	0,312(**)	0,307(**)	-0,017	0,110	-0,124	-0,057
	p	0,007	0,006	0,007	0,883	0,473	0,418	0,710
	n	75	75	75	75	45	45	45
2.gün embriyo	r	0,690(**)	0,972(**)	0,640(**)	0,083	-0,072	0,134	0,012
	p	0,000	0,000	0,000	0,477	0,638	0,378	0,937
	n	75	75	75	75	45	45	45
2.gün grade1	r		0,671(**)	0,911(**)	0,016	-0,058	0,174	-0,022
	p		0,000	0,000	0,889	0,706	0,253	0,887
	n		75	75	75	45	45	45
3.gün embriyo	r			0,642(**)	0,081	0,008	0,071	0,013
	p			0,000	0,488	0,958	0,644	0,935
	n			75	75	45	45	45
3.gün embriyo	r				0,209	0,075	0,084	-0,076
	p				0,072	0,624	0,582	0,621
	n				75	45	45	45
BHCG	r					0,202	-0,164	0,274
	p					0,183	0,280	0,068
	n					45	45	45
Anilin pozitif	r						-0,479(**)	0,284
	p						0,001	0,058
	n						45	45
Anilin negatif	r							-0,304(*)
	p							0,042
	n							45



Grafik-1: Gruplarda Alfa glukozidaz Ortalamaları, * gruplar normospermi ile karşılaştırılmıştır, $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

İstatistiksel Yöntemler:

Bu çalışmada ikiden çok grup karşılaştırması için ANOVA –one way, iki grup karşılaştırması için Bağımsız gruplarda t Testi ve Mann-Whitney Test, Pearson Korelasyon Analizi uygulanmıştır.

5. TARTIŞMA

Epididimisin sperm matürasyonunda, ileri hareket oluşumunda ve fertilizasyon yeteneği kazanmasında önemli rolleri bulunmaktadır (43). Epididimisten salgılanan Alfa glukozidaz enziminin spermatozoa üzerine etkileri tartışma konusudur (43). Laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalar sperm nükleus kromatin yapısındaki protaminasyonun epididimde tamamlandığı gösterilmiştir (43). Bu salgılarla sperm membranlarının stabilizasyonu ve sperm motilitesinin kazanılması gerçekleşmektedir. Epididimal fonksiyonu göstermede Alfa

glukozidaz düzeyinin oldukça önemli olduğu yapılan çalışmalar tarafından ileri sürülmektedir **(7)**. Bizim çalışmamızda seminal alfa glukozidazın sperm maturasyonu ile yani anilin mavisi negatif sperm oranı arasında bir ilişki bulunamadı. Alfa glukozidaz seminal plazmada erkek infertilitesini biyokimyasal olarak belirleyen faktörlerden birisi olduğu ileri sürülmektedir. Zöpfggen ve arkadaşları 2000'de yaptıkları bir çalışmada infertil erkeklerde normal popülasyona kıyasla seminal plazma Alfa glukozidaz, früktoz, sitrat epididimal belirteçler kullanarak karşılaştırma yapmışlar ve infertil kişilerde epididimal Alfa glukozidaz düzeyinin %50 azaldığını göstermişlerdir **(44)**. Qui Z. Ve arkadaşları spektrofotometrik yöntem ile seminal alfa glukozidaz düzeylerini normal subfertil ve infertil erkeklerde incelediler ve normal kişilerde anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu gösterdiler **(45)**. Bizim çalışmamızda normospermi, oligospermi ve astenospermik olgularda seminal alfa glukozidaz düzeylerinin karşılaştırıldığında oligospermik olgularda değerlerin biraz daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu sonuç diğer çalışmalardan farklı görülmektedir. Ancak literatür incelendiğinde hiçbir fark bulunmayan olgular da görülmektedir **(10)**. Çalışma grupları arasında seminal volüm sperm konsantrasyonu ve sperm motilitesi açısından farklılık gözlenmemekte idi. Bu sonuç literatürü desteklemektedir **(3)**. Yine sperm morfolojisinin ve embriyo kalitesinin normospermik grupta daha yüksek olduğunu gösterdik, bu sonuç da literatürü desteklemektedir **(46)**.

Seminal alfa glukozidaz değerinin fertilize oosit sayısı, 2. gün embriyo sayısı, 3. gün embriyo sayısı ile negatif korelasyon gösterdiği çalışma sonuçlarımıza göre saptandı. Ancak gebe olan ve olmayan hasta gruplarında seminal alfa glukozidaz değerlerinin benzer olduğunu saptadık. Bu da seminal alfa glukozidaz düzeyinin gebeliği öngörmediği şeklinde düşünülebilir.

Vivas-Acevedo G. ve arkadaşları varikozel olgularında sperm nötral alfa glukozidaz aktivitesine baktılar ve Varikozel 'in, hem membran hem de sperm çekirdeği hasarı ve seminal parametrelerde bir azalma ile ilişkili olan epididim tarafından NAG aktivitesinde bir azalmaya neden olduğunu gösterdiler NAG seviyeleri ile sperm membranının ve nükleusun kalitesi arasında bir korelasyon gördüler **(47)**. Said L. Ve arkadaşları infertil ve normal kişilerde semen analizi sonuçlarını incelediler, çalışmanın amacı, normospermik kontrollerde ve infertil hastalarda erkek aksesuar bezlerinin salgı fonksiyonu ile sperm parametrelerinin korelasyonu arasındaki ilişkiyi araştırmaktı **(48)**. Yüz elli dokuz erkek araştırıldı: iki

gruptan oluşuyordu: normospermik (n = 37) ve infertil (n = 122) erkeklerde değişik sperm özellikleri vardı. Bu infertil erkekler aşağıdaki gruplara ayrıldı: astenozoospermi (n = 38), teratozoospermi (n = 40) ve astenoteratozoospermi (n = 44). Hastalara semen analizi ve fruktoz, nötr alfa-glukozidaz ve sitrik asit ölçümleri yapıldı (48). Fruktoz seviyesi astenozoospermik dönemde anlamlı olarak azalmış ve astenoteratozoospermik erkeklerde artmıştı. Çalışmada semen hacmi, sperm sayısı, motilite ve morfoloji ile anlamlı korelasyon gösterdi. Seminal alfa-glukozidaz düzeyleri semen hacmi ve pH ile anlamlı olduğu ve sitrik asit pH ile anlamlı olarak köreleydi (48). Bu nedenle, alfa-glukozidaz ve sitrik asit seviyeleri, sperma pH'sı ile ilişkiliydi. Semen parametreleri, aksesuar bezleri ve epididimal fonksiyonlar arasındaki anlamlı korelasyon, semen ve normal genital sistem fonksiyonu arasındaki ilişkiyi vurgulamaktadır. Veriler, varikozel sırasında erkeklerde fertilizasyon kapasitesindeki azalmanın, hem testis hem de epididime zarar verebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada gruplarda alfa glukozidaz düzeylerinde sperm motilitesi açısından anlamlı farklılık saptanmadı, korelasyon görülmedi.

Elzanaty S.yaptığı çalışmada artan erkek yaşının gebelik oranlarında anlamlı bir azalma ile ilişkili olduğunu buldu (49). Bu çalışmada, yaş, epididimal ve aksesuar cinsiyet bezlerinin işlevi ile sperm motilitesi arasındaki ilişkiyi araştırdı. İnfertilite için değerlendirilen 498 erkekte alınan ejakülatlar WHO [1999] kılavuzlarına göre analiz edildi. Epididimal (nötr alfa-glukozidaz (NAG)), prostatik (prostat spesifik antijen (PSA) ve çinko) ve seminal vezikül fonksiyonunun (fruktoz) seminal belirteçleri ölçüldü (49). Araştırmacı yaşlarına göre dört grup tanımladı: G1 (21-30 yıl), G2 (31-40 yıl), G3 (41-50 yıl) ve G4 ((51-66 yıl). Yüzde progresif motilite G4 (> 50) G1 (21-30) ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşüktü. G1 (21-30) ile karşılaştırıldığında G4 (> 50) 'de NAG, PSA, çinko ve fruktoz anlamlı olarak daha düşüktü. Çoklu regresyon analizi modelinde, NAG ve PSA, progresif motilite yüzdesi ile pozitif anlamlı ilişki gösterdiği bulundu. Çinko ile ilgili ters eğilim bulundu. Fruktoz ile yüzde ilerici motilite arasında ilişki bulunamadı. Bu kesitsel çalışmada, 50 yaşın üzerindeki erkeklerde görülen azalmış sperm motilitesi, epididimal ve aksesuar cinsiyet bezi fonksiyonundaki yaşa bağlı değişikliklere bağlı olabileceği ileri sürüldü (49). Roliah ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada klinik varikozeli olan ve olmayan infertil oligoastenozoospermik erkeklerde seminal alfa-1,4-glukozidaz aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır (50). Seksen erkek çalışma kapsamında araştırıldı.

Gruplar üçe ayrıldı: grup 1 (n = 20), fertil normozoospermik erkekler; 2. grup (n = 30), varikoseli olan oligoastenozoospermi; ve 3. grup (n = 30), varikoseli olmayan oligoastenozoospermi hastalarını içermektedir. Hastalara medikal öykü, klinik muayene, konvansiyonel semen analizi ve seminal plazma alfa-1,4-glukosidaz aktivitesinin, radio-immünoassay yöntemiyle çift ışın spektrometresi yöntemi ve serum testosteronu analizi yapıldı. İnfertil erkeklerde kontrollere kıyasla ortalama seminal alfa-1,4-glukosidaz aktivite düzeylerinde anlamlı bir düşüş vardı (ortalama +/- SD; 7.66 +/- 0.433, 2.088 +/- 0.565, 5.384 +/- 0.85 mU ml) **(50)**. Ortalama serum testosteron seviyeleri, çalışılan gruplar arasında anlamlı fark olmadığını gösterdi. Seminal alfa-1,4-glukosidaz aktivitesi düzeyleri, varikozel grubunda oligoastenozoospermide sperm sayısı, sperm motilite yüzdesi ve serum testosteronu ile anlamlı korelasyon göstermiş ve diğer gruplarda anlamlı olmayan bir korelasyon gösterdiği bulundu. Çalışma sonucuna göre varikozel kaynaklı hipoksinin hem oligoastenozoospermiye hem de azalmış seminal alfa-1,4-glukozidaz seviyelerine neden olan yan etki olduğu sonucuna varılmıştır **(50)**. Biz çalışmamızda sperm motilitesi ve seminal alfa glukozidaz düzeyi arasında bir ilişki bulamadık.

Corrales ve arkadaşları 2002 de yaptıkları çalışmada asidik beta-glukuronidaz, alfa-manosidaz, alfa-glukosidaz, alfa-galaktosidaz, beta-galaktosidaz ve beta-N-asetilglukosaminidaz aktivitelerini varikoselli 26 erkek ve normal fertil 36 erkekte seminal plazma ve spermatozoada incelediler **(51)**. Non-obstrüktif azoospermisi olan on erkekte alınan semen örnekleri, spermanın diğer bileşenlerini içeren kontrol örnekleri olarak kullanıldı. Spermatozoa, çözünebilir ve çözünür olmayan fraksiyonları elde etmek için hem fiziksel (homojenizasyon) hem de kimyasal (Triton-X100) yöntemlerle çözüldürüldü. Hem seminal plazma hem de spermatozoada ölçülen birkaç glikozidazın aktiviteleri, önceki çalışmaların doğrulandığı, spermatozoa ve sperm motilitesi ile doğrudan ilişkili olduğu gösterildi **(51)**. Varikoseli olan bazı infertil hastalar normal semen parametrelerine sahipken, diğerleri az sayıda spermatozoa ve düşük sperm motilitesine sahipken, varikozel hastalar prospektif olarak iki gruba ayrıldı: biri (n = 15) normal spermiyogramlı ve diğeri (n = 11) anormal spermiyogram ile. Varikoseli normozoospermik infertil hastalarının seminal plazmasında alfa-mannosidaz, beta-galaktosidaz ve beta-N-asetilglukosaminidaz mU ml (-1) olarak ifade edilen aktiviteler, fertil kontrollerden anlamlı olarak daha yüksek bulundu, fakat 10^8 spermatozoa başına değerlendirildi **(51)**. Anormal spermiyogramlı varikozel hastalarında 10^8 spermatozoa başına ünite

eksprese edildiğinde seminal plazmada beta-glukuronidaz, alfa-mannosidaz, beta-galaktosidaz ve beta-N-asetilglukosaminidaz aktiviteleri normal doğurganlıktaki erkeklere göre anlamlı derecede yüksekti. 10^8 spermatozoa başına ünite (U) olarak ifade edilen sperm homojenatlarının çözünebilir fraksiyonundaki alfa-mannosidaz aktivitesi, varikozel ve anormal spermiogramlı infertil hastalarda kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksekti. Varikozelli infertil hastalardan spermatozoanın çözünmeyen fraksiyonunda, fertil deneklerden spermatozoa fraksiyonuna kıyasla beta-galaktosidaz ve beta-N-asetilglukosaminidaz aktivitesinin ekspresyonunda bir artış olmuştur. Özetle, varikozeli olan infertil hastalar, seminal plazmada aşırı miktarda alfa-mannosidaz, beta-galaktosidaz ve beta-N-asetilglukosaminidaz aktiviteleri gösterdiler ve bu glikozidazlar memeli fertilizasyonunda önemli bir rol oynadığından spermatozoada fonksiyonel defektler ile ilişkili olabileceği ileri sürüldü.

Krause W, ve Bohring C yaptıkları çalışmada alfa-Glukosidaz düzeyinin 653 semen numunesindeki değerlendirdiler **(52)**. Normal parametre değerlerine sahip numunelerde normal aralık (ortalama +/- 2 SD), 7.2-46.4 mU ml⁻¹ idi. Azoospermili hastalarda obstrüktif azoospermide ortalama 7.7 +/- 9.5 mU ml⁻¹ ve nonobstrüktif azoospermide ortalama 15.8 +/- 11.5 mU ml⁻¹ saptandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi, çünkü obstrüksiyon varlığına ilişkin tespitin duyarlılığı sadece 0.66 ve özgüllük 0.83 idi. Log sperm sayısı ile alfa-glukozidaz aktivitesinin anlamlı bir korelasyonu ($r = 0.34$) gözlemlendi. Ortalama alfa-glukozidaz aktivitesi, sperm motilitesine göre oluşturulan gruplarda lökosit sayımına göre veya semen hacmine göre anlamlı olarak farklı bulmadılar. Araştırma sonucuna göre, alfa-glukosidaz aktivitesinin belirlenmesi, diğer klinik araştırmaların ya da semen analizinin parametrelerinininkinden daha fazla olan fertilitate durumu hakkında ilave bilgi vermediğini ileri sürdüler. Bizim çalışmamızda Seminal Alfa glukozidaz düzeyi (mU/ml) oligospermik olgularda daha yüksek bulundu. Ancak sperm motilitesinin düşük olduğu astenospermi olgularında bir fark bulamadık.

Fourie MH ve arkadaşları, Seminal plazmada alfa glukozidaz aktivitesini belirleyen iki yöntem ile çalıştılar **(53)**. Standardı, epididim spesifik yöntem olup, epididim tarafından özel olarak üretilen nötr izo-enzim ölçen toplam alfa-glukozidaz aktivitesini (nötr iso-enzim ve prostattan kaynaklanan asit izo-enzimi) belirleyen bir kit olan episcreen kiti enzimatik ölçüm yapmaktadır. Diğer yöntem ise epididimal spesifik yöntemle ölçülen alfa-glukozidaz aktivite değerlerinin, rutin klinik ortamda

nötr izo-enzim spesifik yönteminin yerine konması için güvenilir sonuçlar verilip verilmediğini belirlemek amacıyla karşılaştırmaktı. Her iki yöntemle göre nötr izo-enzim aktivitesi, 23 post-vazektomi ve 24 normozoospermik hastanın seminal plazmasında ölçüldü. Her iki yöntemle göre ölçülen aktiviteler arasında anlamlı fark bulundu ($P < 0.05$), ancak bu farklar çoğunlukla klinik olarak anlamlı olmayan yüksek değerlere (> 40 mU ejakülat-1) ulaştığı anlaşıldı **(3)**.

Çalışmamızda Seminal alfa glukozidaz düzeyinin tüm olgularda fertilizasyon ve 2. gün, 3. gün embriyo sayısı ile korelasyon gösterdiği bulundu. Bu sonuçlar seminal alfa glukozidaz aktivitesinin sperm maturasyonu, ya da motilitesi dışındaki parametrelerle ilişkisinin araştırılması gerektiğini göstermektedir.

6. SONUÇ:

Bu çalışmada seminal alfa glukozidaz düzeyinin klinik gebelikleri ile ilişkisi tespit edilmedi. Ayrıca sperm motilitesi ve alfa glukozidaz aktivitesi arasında bir korelasyon bulunmadı. Oosit fertilizasyon ve iyi kalite embriyo gelişimi ile seminal alfa glukozidaz düzeyinin ilişkisi anlaşılmıştır. Ayrıca bakılan parametrelerden embriyo kalitesi ve sperm maturasyon oranlarının gebelik pozitif olgularda negatiflere kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R, Oates RD, van der Poel S, St John B, Sigman M, Sokol R, Tournaye H The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*. 2017 Nov 1;23(6):660-680. doi: 10.1093/humupd/dmx021.
2. Oehninger S, Franken DR, Ombelet W Sperm functional tests. *Fertil Steril*. 2014 Dec;102(6):1528-33. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.044. Epub 2014 Oct 24.
3. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Laboratuvar El Kitabı: İnsan Semeni ve SpermServikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi. Çeviri Editörü: Günalp S. Ankara, Tıp Teknik Kitapevi, 2002.
4. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Laboratuvar El Kitabı: İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi. Çeviri Editörü; Kadioğlu A. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi,2010
5. Trevor G. Cooper, Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem.*Asian J Androl*. 2007 Jul;9(4):533-9
6. Gail A. Cornwall New insights into epididymal biology and function *Hum Reprod Update*. 2009 Mar-Apr; 15(2): 213–227.Published online 2009 Jan 8. doi: [10.1093/humupd/dmn055] PMID: PMC2639084 PMID: 19136456
7. Cooper T .G., Ching-Hei Y., Dorothee N., Eberhard N., *Journal Andrology*, 1988; :9 ,91-101
8. von der Kammer H, Scheit KH, Weidner W, Cooper TG .The evaluation of markers of prostatic function.*Urol Res*. 1991;19(6):343-7
9. Ben Ali H, Guerin JF, Pinatel MC, Mathieu C, Boulieu D, Tritar B. Relationship between semen characteristics, alpha-glucosidase and the capacity of spermatozoa to bind to the human zona pellucida *Int J Androl*. 1994 Jun;17(3):121-6
10. Milingos S, Comhaire FH, Liapi A, Aravantinos D The value of semen characteristics and tests of sperm function in selecting couples for intra-uterine insemination *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996 Jan;64(1):115-8.
11. Peña P, Risopatrón J, Villegas J, Miska W, Schill WB, Sánchez R. Alpha-glucosidase in the human epididymis: topographic distribution and clinical application. *Andrologia*. 2004 Oct;36(5):315-20.
12. Casano R, Orlando C, Caldini AL, Barni T, Natali A, Serio M.Simultaneous measurement of seminal L-carnitine, alpha,1-4-glucosidase, and glycerylphosphorylcholine in azoospermic and oligozoospermic patients. *Fertil Steril*. 1987 Feb;47(2):324-8

13. Mahmoud AM, Geslevich J, Kint J, Depuydt C, Huysse L, Zalata A, Comhaire FH. Seminal plasma alpha-glucosidase activity and male infertility. Hum Reprod. 1998 Mar;13(3):591-5.
14. Abraham L. Kierszenbaum. Çeviri Editörü: Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye giriş. Ankara, Palme Yayıncılık,2006; 531-589
15. Anthony L. Mescher Çeviri Editörü: Solakoğlu S. Junqueira Temel Histoloji Atlas Kitap. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2015; 430-447
16. Michael D. Johnson Weill Cornell Medical College in Qatar, Human Biology Concepts and Current Issues Sixth Edition, Pearson 2012; p.379
17. Junqueira JC, Carneiro J. Çev. Ed.Solakoğlu S. Aytekin Y. Erkek Üreme Sistemi. Temel Histoloji, Text & Atlas. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009
18. Çelik Ö. Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Adana Nobel Kitabevi, 2011
19. Anthony M.L. Çeviri Editörü: Solakoğlu S. Junqueira Temel Histoloji Atlas Kitap.İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2016
20. İrez T. , Kucur M. , İşman F.K. Androloji Laboratuvarı El Kitabı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, Bölüm:1-1,2007
21. Sadler T.W. Çeviri Editörü: Başaklar A.C. Medikal Embriyoloji. Ankara, Kilciler Palme Yayıncılık, 2011; 27-30
22. Oehninger C. Sergio, Kruger F. Thinus Çeviri Editörü: Doç. Dr.Kilciler M. Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi. Ankara, Habitat Yayıncılık, 2009
23. Örmen M. Önvural B. Clinical Biochemical Approach to Semen, Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2003; 3: (155-161)
24. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri, Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri,2008
25. Erdemir F. Fırat F. Gençten Y. The Evaluation and Clinical Significance of Sperm Morphology, Türk Üroloji Seminerleri, 2011; 2: 11-7
27. Orhan E. Sperm Morfoloji Atlası. Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları, 1995, 17-29
28. Elder K. And Dale B. Çeviri Editörü: Prof.Dr. İrez T. İn Vitro Fertilizasyon. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2013; 139- 143
29. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition, WHO, 2010
30. Aksoy E. , Erkek Germ Hücrelerinin Morfolojisinin Farklı Histolojik Boyalarla Işık Mikroskobu Düzeyinde Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Konya, 2008; p.42

31. Menkveld R, Kruger TF. Atlas of human morphology, Williams and Wilkins, Baltimore,1991
32. Menkveld R, Stander FSH , The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria, Human Reproduction ,1990, 5(5): 286-292
33. Delilbaşı L. Balaban B. Ayaş B. Gametler (Sperm/Oosit) Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim. Serono Yayınları,2000
34. Delilbaşı L. İn vitro Fertilizasyon Laboratuvar Yöntemleri, İstanbul Güneş Tıp Kitapevleri, 2008; 66-80
35. Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. Fertil Steril, 1981,35(6);662-665
36. Mahmoud M. Ahmed, Geslevich Joel, Kint Jos, Depuydt Christophe, Huysse Lieven, Zalata A. and Comhaire H. Frank Seminal plasma alfa glucosidase activity and male infertility. Human Reproduction 1998,vol.13 no.3 pp.591-595
37. Önvural B. Önvural A. Seminal plazma biyokimyası ve klinik değerlendirilmesi, İzmir, 1995
38. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In:Knobil E. ,Neill JD. Eds. The Physiology of Reproduction, 2nd ed New York; Raven Press, 1994: 189-317
39. Gardner David K. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Pratik Yaklaşım. Çeviri Editörü: Serdaroğlu H. Prof.Dr. Doğan Tıp Kitapevi 2009.
40. Sadler T.W. Çeviri Editörü: Başaklar A.C. ,Medikal Embriyoloji, Ankara, Palme Yayınları, 2011; 36-43
41. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum Reprod. 2011;26(6):1270–83. doi: 10.1093/humrep/der037
42. (a-Glu)ELISA Kit Instruction, Catalogue No:201-11-0090
43. Cornwall G. A. Human Reproduction Update 2009, :15, 2 :213-227
44. Zöpfggen A. , Priem F. Ve arkadaşları. Human Reproduction 2000; Bölüm:15 No:4 Syf.840-845
45. Qiu Z, Chu Q, Zhang W, Luo C, Quan S. Level of neutral alpha-1,4- glucosidase in seminal plasma of Chinese men. Andrologia. 2018 Apr;50(3). doi: 10.1111/and.12948. Epub 2017 Dec 28
46. Zanetti BF, Braga DPAF, Provenza RR, Figueira RCS, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Sperm morphological normality under high magnification is correlated to male

infertility and predicts embryo development. *Andrology*. 2018 Feb 18. doi: 10.1111/andr.12473.

47. Vivas-Acevedo G, Lozano-Hernández R, Camejo MI. Varicocele decreases epididymal neutral α -glucosidase and is associated with alteration of nuclear DNA and plasma membrane in spermatozoa. *BJU Int*. 2014 Apr;113(4):642-9. doi: 10.1111/bju.12523.

48. Said L, Galeraud-Denis I, Carreau S, Saâd A Relationship between semen quality and seminal plasma components: alpha-glucosidase, fructose and citrate in infertile men compared with a normospermic population of Tunisian men. *Andrologia*. 2009 Jun;41(3):150-6. doi: 10.1111/j.1439-0272.2008.00906.x.

49. Elzanaty S Association between age and epididymal and accessory sex gland function and their relation to sperm motility. *Arch Androl*. 2007 May-Jun;53(3):149-56.

50. Roaiah MM, Mostafa T, Salem D, El-Nashar AR, Kamel II, El-Kashlan MS alpha-1,4-Glucosidase activity in infertile oligoasthenozoospermic men with and without varicocele. *Andrologia*. 2007 Feb;39(1):28-32.

51. Corrales JJ, Burgo RM, Galindo P, Muñoz-Barroso I, Miralles JM, Villar E Abnormal expression of acid glycosidases in seminal plasma and spermatozoa from infertile men with varicocele. *Reproduction*. 2002 Mar;123(3):411-7.

52. Krause W, Bohring C Why do we determine alpha-glucosidase activity in human semen during infertility work-up? *Andrologia*. 1999 Sep;31(5):289-94.

53. Fourie MH, Bornman MS, Viljoen E A comparative study of the EpiScreen kit and a conventional method for the determination of seminal alpha-glucosidase activity. *Andrologia*. 1998 May-Jun;30(3):133-9.

54. Parrish RF, Fair WR. Reduced glutathione is not required for measurement of alpha-D-glucosidase in human seminal plasma. *Clin Chem*. 1981 Apr;27(4):64



30036818862

T.C.
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İstanbul Çekmece Bölgesi Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
S.B.Ü. Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Baştabipliği
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı: 2016/25

Konu No: KAEK/2016.25.31

17.06.2016

Syn Prof.Dr.Tülay İREZ

Kurulumuz çoğunluğunun katılımı ile klinik araştırmalar etik kurulu toplantısı yapılmış olup; Yürütücüsü olduğunuz "İnfertil erkeklerde seminal Plazma Alfa-Glukozidaz Düzeyi ve IVF ICSI Sonuçlarının Değerlendirilmesi "konulu araştırma dosyası klinik araştırmalar etik kurulunca görüşülüp oy birliği ile uygun olduğuna karar verilmiştir.

Gereği bilgilerinize sunulur.

Doç. Dr. Gökhan YILDIRIM
Etik Kurulu Başkanı

ÖZGE TUTAK SERTKOL

KİŞİSEL BİLGİ

Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri : Edirne
Doğum Tarihi : 11/02/1987

EĞİTİM

- Uzunköprü Yabancı Dil Ağırlıklı Lise / 2001-2005
- Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi-Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Böl / 2007-2011

İŞ DENEYİMLERİM

- 12.2011 – Halen Özel Batı Bahat Hospital
 - Androloji laboratuvarında sperm hücrelerinin varlığını, hareketliliğini, morfolojisini tespit etme, aşılama ve OPU için sperm hazırlama; Embriyoloji laboratuvarında hazırlık yapma, opu esnasında yumurta toplama ve ICSI için hazırlık yapma
- 09.2011- 11.2011 Özel Ataköy Hastanesi
 - Biyokimya, mikrobiyoloji, kültür laboratuvar testlerini hazırlamak ve raporlarını çıkarmak.
 - Kan alma bölümünde çalıştım.
- 07.2011-09.2011 Özel Bahçelievler Medicana Hastanesi
 - Mezuniyet sonrası stajyer kadrosunda androloji ve embriyoloji laboratuvarında görev aldım. Androloji laboratuvarında sperm yıkama ve spermin morfolojik değerlendirmesi hakkında bilgi edindim. Embriyoloji laboratuvarında aşılama, tese, oosit toplama, mikroenjeksiyon, embriyo işlemlerine gözlemci olarak katıldım.
- 06.2009-07.2009 Özel Bahçelievler Medicana Hastanesi
 - Stajyer kadrosunda androloji ve embriyoloji laboratuvarında görev aldım. Androloji laboratuvarında sperm yıkama ve spermin morfolojik değerlendirmesi hakkında bilgi edindim. Embriyoloji laboratuvarında aşılama, tese, oosit toplama, mikroenjeksiyon, embriyo işlemlerine gözlemci olarak katıldım.
- 06.2008-07.2008 Dr. Mazhar Osman Ruh ve Sinir Hastalıkları Hastanesi
 - Laboratuvarda bulunan makinaların ve testlerin nasıl yapıldığı hakkında bilgi edindim. Ayrıca kan alma biriminde görev aldım. Kültür bölümünde gram pozitif gram negatif boyama, gayta testi ve gebelik testi yaptım. Biyokimya ve toksikoloji laboratuvarında görev aldım.

YABANCI DİL

- İNGİLİZCE

ÜYE OLDUĞUM BİLİMSEL KURULUŞLAR

- Klinik Embriyoloji Derneği

KATILDIĞIM EĞİTİM VE SEMİNERLER

- 3. Günöbirlik Klinik Embriyoloji Derneği Sempozyumu / 12.2018
- TSPF Expermed Congress 2nd International Expermed Congress / 04.2017
- Kitazato-Dibimed Hands-On Vitrification Workshop / 04.2017
- 2. Günöbirlik Klinik Embriyoloji Derneği Sempozyumu / 12.2016
- ESHRE Special Interest Group Embryology – Cryopreservation. IVF in the frozen state / 03.2015
- Kitazato – Dibimed Hands On Vitrification Workshop /01.2015
- Alpha 2014 10th BIENNIAL CONFERENCE /05.2014
- ISO 17025 Laboratuar Teknik Yeterlilik Eğitimi / 05.2010
- 1.Uluslararası Geleceğin Liderleri ve Vizyon Sempozyumu / 03.2010
- ISO 9001 Kalite Yönetim Sistemi / 03.2010
- İş Dünyasında Liderlik Seminer Programı /11.2009
- Türkiye'de Biyoteknoloji Sektörü ve Kariyer Fırsatları Sempozyumu /05.2009