

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OLİGOSPERMİ VE NORMOSPERMİ SEMEN ÖRNEKLERİNDE
SWİM UP SONRASI SPERMATOZOA MİTOKONDRIASININ
MİTOTRACKER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Seda ÇETİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Aydan CANBİLEN

KONYA – 2013

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OLİGOSPERMİ VE NORMOSPERMİ SEMEN ÖRNEKLERİNDE
SWİM UP SONRASI SPERMATOZOA MİTOKONDRIASININ
MİTOTRACKER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Seda ÇETİNKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Aydan CANBİLEN

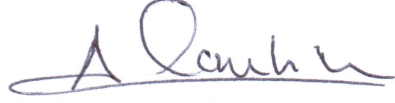
Bu proje Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 131318005 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA – 2013

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Seda ÇETİNKAYA**'nın "**Oligospermi ve Normospermi Semen Örneklerinde Swim Up Sonrası Spermatozoa Mitokondriasının Mitotracker İle Değerlendirilmesi**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/ 05.06.2013



Tez Danışmanı

Prof.Dr.Aydan CANBİLEN

Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.

Jüri Üyesi

Prof.Dr.Tahsin Murad AKTAN

Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.

Jüri Üyesi

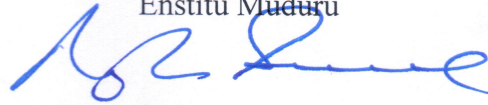
Prof.Dr.K.Esra Nurulloğlu Atalık

Farmakoloji A.B.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11.07.13 ve 12 / 45 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neyhan Ergene

Enstitü Müdürü



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “*Evaluating of spermatozoa mitochondria with mitotracker within the samples of oligospermic and normospermic semen after swim up technique*” by “*Seda ÇETİNKAYA*” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “*Histology and Embryology*”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan

Konya, Turkey / 05 . 06.2013



Principal Advisors

Professor Aydan CANBİLEN

Department of Histology and Embryology

Examination Committee Member

Professor Tahsin Murad AKTAN

Department of Histology and Embryology

Examination Committee Member

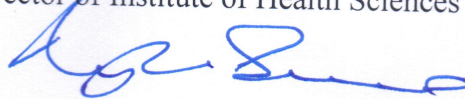
Professor K.Esra Nurulloğlu Atalık

Department of Pharmacology

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Professor Neyhan Ergene

Director of Institute of Health Sciences



BEYANAT

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

05.06.2013

Seda ÇETİNKAYA



ÖNSÖZ

Tüm yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Hasan Cüce'ye, Öğretim Üyesi hocalarım Prof. Dr. Serpil Kalkan, Prof. Dr. Selçuk Duman , Prof. Dr. Murad Aktan ve Yrd.Doç.Dr. Gökhan Cüce'ye,

Laboratuar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyolog Hüseyin Akbulut'a, yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım. Çalışmalarım boyunca manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İç Kapak.....	i
Tez Onay Sayfası.....	ii
Approval.....	iii
Tez Beyan Sayfası	iv
Önsöz ve/veya Teşekkür.....	v
İçindekiler.....	vi
Simgeler ve Kısaltmalar Listesi.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Erkek Genital Sistemi	1
1.2. Testis Anatomisi	1
1.3. Testisin Damarları.....	2
1.4. Testislerin Embriyolojisi.....	2
1.5. Testis Histolojisi	3
1.5.1. Testiküler Kapsül	4
1.5.2. Tübüli Seminiferi Kontortiler (Seminifer Tübüller)	4
1.5.3. Sertoli Hücreleri	5
1.5.4. İnterstisyel Doku.....	6
1.5.5. Spermatogenezi Uyarıcı Hormonal Faktörler	7
1.6. Spermatogenez	8
1.6.1. Spermatogonial Evre.....	8
1.6.2. Mayoz veya Spermatozoon Evresi.....	10
1.6.3. Spermiojeniz.....	10
1.6.3.1. Golgi Evresi	11
1.6.3.2. Başlık (Cap) Evresi	11
1.6.3.3. Akrozomal Evre	12
1.6.3.4. Olgunlaşma Evresi	12
1.7. Spermiojeniz.....	12
1.8. Spermiojeniz (Spermatozoon)	13
1.8.1. Baş Bölgesi	13
1.8.1.1. Akrozom	13
1.8.1.2. Peri-Nükleer Madde	14
1.8.1.3. Çekirdek	14
1.8.1.4. Son Halka ve Bazal Plaka	14
1.8.2. Boyun Bölgesi.....	14
1.8.3. Kuyruk Bölgesi	15
1.9. Boşaltım Yolları	16
1.9.1. Testisin Boşaltıcı Duktusları	16
1.9.2. Tübüli Rekti	16
1.9.3. Rete Testis.....	17
1.9.4. Duktuli Efferentes	17
1.9.5. Duktus Epididimis.....	17
1.9.6. Duktus Deferens.....	18
1.9.7. Ampulla Duktus Deferens.....	18
1.9.8. Duktus Ejakulatoryus	19

1.10. Yardımcı Üreme Bezleri	19
1.10.1. Seminal Vesiküllerin Fonksiyonu	19
1.10.2. Prostat Bezinin Fonksiyonu	20
1.10.3. Semen.....	20
1.11. Semen Analizi (Spermiyogram).....	21
1.11.1. Sperm Örneğinin Alınması	21
1.11.2. Semen Örneğinin Değerlendirilmesi.....	22
1.11.3. Semen'in Makroskopik İncelemesi	22
1.11.3.1. Likifikasyon (Semen'in Çözünürlüğü).....	22
1.11.3.2. Görünüm	22
1.11.3.3. Volüm.....	23
1.11.3.4. pH.....	23
1.11.4. Semen'in Mikroskopik İncelemesi.....	23
1.11.4.1. Konsantrasyon.....	23
1.11.4.2. Motilite.....	24
1.11.4.3. Morfoloji	24
1.12. İnfertilitenin Değerlendirilmesi.....	26
1.12.1. Erkek'te İnfertilite Nedenleri	26
1.12.2. Erkek İnfertilitesinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Rolü.....	27
1.12.3. Antioksidan Korumalar	28
1.12.4. Oligospremi ve İnfertilite.....	28
1.13. Sperm'in Fertilizasyonu İçin Yıkama Yöntemleri.....	29
1.13.1. Swim-up tekniği	29
1.13.2. Swim – down tekniği	30
1.13.3. Gradient yöntemi.....	30
1.13.4. Percoll yöntemi	30
1.14. Sperm Mitokondrisi	31
1.14.1. Mitokondriyal Kılıf.....	31
1.14.2. Sitoplazmik droplet	31
1.14.3. Mitokondri	32
1.14.4. Mitokondri yapısı	32
1.14.5. Mitokondriyal Fonksiyonlar.....	33
1.14.6. Mitokondride Elektron Transportu ve Oksidatif Fosforilasyon ile Enerji Oluşumu	34
1.15. Mitokondri Kitleri	36
1.15.1. Mitotracker Problarının Özellikleri.....	36
1.15.2. Turuncu –Kırmızı ve Kızılötesi Floresan MitoTracker Boyaları.....	36
1.15.3. MitoTracker Green FM Probe.....	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3. BULGULAR	40
4. TARTIŞMA	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	55
6. ÖZET.....	57
7. SUMMARY	58

8. KAYNAKLAR	59
9. EKLER.....	69
10. ÖZGEÇMİŞ.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP: Androjen bağlayıcı protein

ADP: Adenozin difosfat

ATP: Adenozin trifosfat

ATPaz: Adenozin trifosfataz

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

FAD: Flavin adenin dinükleotid

FMN: Flavin mononükleotit

FSH: Folikül uyarıcı hormon

GIFT: Gamete intrafallopian transfer

GnRH: Gonad hormonlarını salgılatan hormon

ICSI: Intrasitoplazmik sperm injeksiyonu

IUI: Intrauterin inseminasyon

IVF: In vitro fertilizasyon

LH: Luteinize edici hormon

mRNA: Haberci ribonükleik asit

mtDNA: Mitokondriyal DNA

NAD(P)H: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş)

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotid

NAD⁺: Nikotinamid adenin dinükleotid (okside)

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş)

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

ODF: Outer dense fibers

ROS: Reaktif oksijen türleri

WHO: Dünya sağlık örgütü

YÜT: Yardımcı üreme teknikleri

ZIFT: Zygota intrafallopian transfer

ZP3: ZP3 Zona pellucida glikoprotein 3

µm: Mikrometre

1. GİRİŞ

Son yıllarda in vitro fertilizasyon (IVF) teknolojisinin ve bu teknolojik gelişmenin bir parçası olan artifisyonel inseminasyon, sperm hazırlama tekniklerinin gelişmesiyle gündeme gelmiş ve tüpleri açık olan kadınlarda diğer yardımcı üreme tekniklerine (YÜT) göre daha ekonomik bir yöntem olarak karşımıza çıkmıştır. Bu özelliği nedeniyle birçok merkezde IVF, gamete intrafallopian transfer (GIFT), zygoteintra fallopian transfer (ZIFT) gibi pahalı yöntemlerden önce uygun olan hastalar belirli bir süre inseminasyon programına alınmakta, şayet sonuç alınmaz ise diğer yöntemlerin denenmesine geçilmektedir.

İnfertilite tedavisinde önemli bir yere sahip olan intrauterin inseminasyon (IUI), uygun fertil hastalarda uygulandığında hem sonuçları açısından hem de maliyeti açısından oldukça başarılı bir tedavi yöntemidir (Gezginç ve ark 2004).

Bu çalışmada IUI için hazırlanan semen örneğinden swim up işlemi sonrası hangi dakikalarda daha kaliteli sperm elde edilebileceği araştırıldı.

1.1. Erkek Genital Sistemi

Erkek genital sistemi iki gonaddan (testisler), genital boşaltım yolları ile bu yollara açılan aksesuar bezler ve penisten oluşur. Genital boşaltım yolları, tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus ve hem genital hem de idrar boşaltım yolu olarak kullanılan uretradan oluşur. Bu yollara salgısını döken aksesuar bezler, vesikula seminalis, prostat ve glandula bulboüretalidir (Erkoçak 1990).

1.2. Testis Anatomisi

Testisler skrotum içinde funikulus spermatikus ile asılı duran, birbirinden septum skroti ile ayrılmış bir çift bileşik tübüler bezlerdir. Biçimleri iki yandan biraz basık oval olup, dış ve iç iki yüzü, ön ve arka iki kenarı, üst ve alt iki de ucu vardır. Her biri 4-5 cm uzunluğunda, 2,5-3,5 cm genişliğinde ve 2-2,5 cm kalınlığındadır. Uzun eksen vertikale yakın fakat öne doğru biraz eğiktir. Testisin ön kenarı ile yan yüzleri çift yapraklı bir seröz zar, tunika vaginalis testis ile örtülüdür. Tunika vaginalis testisin iç yaprağı (lamina visseralis) ile dış yaprağı (lamina parietalis)

arasında periton boşluğuna bağlı bir seröz boşluk (kavitas serosa) bulunur (Tekelioğlu 2002).

Skrotum, epidermisi çok pigmentli ince bir deri tabakasıdır, erişkinde kıllara bağlı olmayan serbest yağ bezleri, merokrin ve apokrin ter bezleri ve seyrek kıllar içerir (Erkoçak 1990, Tekelioğlu 2002).

1.3. Testisin Damarları

Testisler arterlerini aorta abdominalisten alırlar. Arteria testikularis testisin arka kenarından bezin içine sokulur ve mediastinum testiste birçok dallar verir. Bu dallar septula testisleri izleyerek bezin her tarafına dağılırlar. Testisler kansızlığa karşı çok duyarlıdırlar ve bu nedenle kansız kaldıklarında harap olurlar. Venler duktus deferensin etrafında pleksus pampiniformis denilen bir ven ağı meydana getirirler. Bu ağdan evvela iki, sonra birer tane vena testikularis meydana gelir. Vena testikularis dekstra, vena kava inferior'a; vena testikularis sinistra, vena renalis'e dökülür. Pleksus pampiniformisi yapan venlerin genişlemesi varikozel denen hastalığı meydana getirir (Erkoçak 1990, April 1998, Snell 1998, Dere 1999).

1.4. Testislerin Embriyolojisi

İlkel cinsiyet hücreleri büyük, yuvarlak şekilli ilkel üreme hücreleri olup, en erken olarak 4. haftanın başında allantoisin çıkış noktasının yakınında bulunan vitellüs kesesinin endoderm hücreleri arasında görülür. Embriyonun katlanması sırasında vitellüs kesesinin dorsal kısmı embriyo içinde kalır. Bu olurken ilkel cinsiyet hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. Altıncı haftada ilkel cinsiyet hücreleri alttaki mezenkime girer ve primer cinsiyet kordonlarına ulaşır. Burada germ kordonlarını yaparlar ve böylece artık farklılaşmamış evre sona erer (Carlson 1996, şeftalioğlu 1998, Moore ve Persaud 2002, Hassa 2003, Sadler 2005).

Gonadlar, üç kaynaktan köken almaktadır:

*Karın arka duvarını döşeyen mezotel (epitel)

*Altta bulunan mezenkim (bağ dokusu)

*Primordial germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri)

Gonadal gelişimin ilk belirtileri mezonefrozun medial bölgesi üzerindeki sölomik epitelyumun çoğalması ve alt kısımdaki mezenkimin yoğunlaşması ile meydana gelir (Carlson 1996, Şeftalioğlu 1998, Moore ve Persaud 2002, Hassa 2003, Sadler 2005).

İnsanda vitellus kesesi duvarında bulunan endodermal primordial germ hücrelerinin 3. haftada allantoisi aşarak bağırsağın arka kısmındaki mezenter kökünün (Radix mesenterii) sağında ve solunda mezonefrozun medialinde mezoteldeki gonadal kabartı (Plica genitalis) içine girmesi ve burada bulunan hücreleri indüklemesi (5. hafta başı) ile gonad taslakları gelişmeye başlar (Moore ve Persaud 2002). Beşinci haftada ortaya çıkan bu çoğalma ürünü, genital kabartı olarak bilinir. Parmağa benzer şekilde alt mezenkime doğru inen epitelooid kordonlar henüz yeni gelişen primer seks kordonlarını andırır haldedirler. Farklılaşmamış gonad yapısında dışta korteks, iç kısımda ise medulla bulunur. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahipse, farklılaşmamış gonadın korteksi overe differensiyel olur. Medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içeriyorsa medulla testise farklılaşır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenerel olur (Carlson 1996, Gürsoy ve Koptagel 1997, Şeftalioğlu 1998, Sadler 2005, Kayalı ve ark 2002, Moore ve Persaud 2002, Hassa 2003).

Yedinci haftadan itibaren embriyonun erkeklik ya da dişilik yönünde gelişmeye başlaması gerçekleşir. Erkeklerde ya da dişide plika içinde bulunan mezodermal hücreler primordial hücrelerin etrafını sarar. Mezodermal hücrelerden destek hücreleri (erkeklerde sertoli hücreleri, dişide ise folikül hücreleri) gelişir. Seks kromozom kompleksinde Y kromozomu taşıyan embriyolarda testisler gelişir (Moore ve Persaud 2002).

1.5. Testis Histolojisi

Testisler ekzokrin ve endokrin fonksiyonlu birleşik tübüler bezlerdir (Kalaycı 1986). Ekzokrin salgısı, spermium ve testis sıvısı, endokrin salgısı ise steroid yapılı olan testosteron hormonudur. Dolayısıyla, testisler üreme ve hormon salgılama gibi iki önemli işleve sahiptirler (Kayalı ve ark 1992, Kaloğlu ve Gürsoy 1997).

1.5.1. Testiküler Kapsül

Skrotum ile testis dokusu arasında 3 tabakalı testiküler kapsül yerleşiktir:

1- Tunika vaginalis: Karın bölgesinin arka duvarından gelişir, daha sonra skrotuma inişi sırasında peritonu skrotum içine sürükler. İki yapraklı (parietal ve visseral yapraklar) periton uzantısıdır. Hilus dışında testisin ön ve yan duvarlarını tamamen örter. Visseral yaprak tunika albugineaya yapışır, parietal yaprak ise skrotumun iç yüzüne dayanır. Tunika vaginalis epiteli, peritona benzer yapıdadır.

Bağ dokusu üzerine oturmuş bir sıra yassı mezotel hücresi bulunur.

2- Tunika albuginea: En belirgin tabakadır. Tunika vaginalis'in visseral yaprağını içten örter. Kalın fibro elastik bağ dokusu arasında çok az sayıda düz kas fibrilleri bulunur.

3- Tunika vasküloza: Tunika albuginea'nın iç yüzünde yer alan ve damardan zengin olan bağ dokusudur. Tunika albuginea'nın testis içine doğru olan uzantılarının (septum) iç yüzünü de örter, dolayısıyla tunika vasküloza bütün lobülleri dıştan sarar.

Testiküler kapsülün görevi; periyodik kasılmalar yaparak testisin hacmini düzenlemek ve duktus sistemine masaj etkisi yaparak, spermiumların dışı doğru hareketinde yardımcı olmaktır (Kalaycı 1986).

1.5.2. Tübüli Seminiferi Kontortiler (Seminifer Tübüller)

30-70 cm uzunluğunda, 150-200 µm genişliğinde çok kıvrıntılı kanalcıklardır. Her iki testiste yaklaşık 1000 kadar seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller, epitel ve altında tip I kollagen ile fibroblastların bulunduğu bağ dokusundan (tunika propriya) oluşur. Bunlar, mediastinuma doğru birbirine yaklaşarak seyreder ve tubuli seminiferi rektiyi yaparlar. Seminifer tübüller çok sıralı bir epitel tabakası ile döşelidirler. Bu epitele tohum epiteli (epitelyum seminalis) denir. Tohum epiteli ince bir bazal membran üzerine oturur (Moore ve Dalley 1995, Günalp 2004).

Seminifer tübüllerin epiteli spermatogenik ve destek hücrelerini içeren 4-8 katlı karmaşık bir epiteldir. Destek hücreleri tek tiptir ve sertoli hücreleri olarak bilinir. Tohum hücreleri değişik gelişim basamaklarını gösterecek şekilde çok

sayıdadır. Bazaldan çoğalarak yavaş yavaş yukarıya lümene hareket ederken farklılaşır ve sonuçta spermatozoonlara dönüşürler. Spermatogenik hücrelerin biçimleri farklı olduğundan tübül lümeni düzensiz görünümlüdür.

Spermatogenik hücreler seminifer tübül (tübüli semiferi kontorti) duvarını döşeyen epiteldeki hücrelerin çoğunluğunu oluşturur. Bunlar belirli bir düzenle birbirini izleyen hücre jenerasyonlarından ibaret birçok sıralar halinde düzenlenmiştir. Hücreler olgunlaştıkça kanalcığın periferinden lümenine doğru yer değiştirdikleri için, hücre jenerasyonlarının en genci bazal membranın hemen üzerindedir ve lümene doğru gelişmekte olan hücreler yer alır. Sonuçta, seminifer tübül lümeninde olgun spermatozoonlar bulunur (Gartner ve Hiatt 2001, Özdamar ve ark 2002).

1.5.3. Sertoli Hücreleri

Bazal laminadan lümene doğru uzanan çok yönlü hücrelerdir. Yan yüzleri tohum hücrelerine uyum sağlayacak şekilde girintili çıkıntılıdır. Enine kesitlerde zor seçilirler.

Eozinofilik sitoplazmaları bazala yerleşmiş bir iki çentikli oval çekirdekleri vardır, çekirdekçik belirgindir (Erkoçak 1990, Tekelioğlu 2002).

Sertoli hücreleri iyi bir hücre iskeletine sahiptir ve tohum hücrelerine göre daha dayanıklıdır. Sertoli hücrelerinin mitotik aktiviteleri yoktur, bu nedenle çoğalamazlar. Komşu sertoli hücrelerinin uzantıları birbirlerine sıkı bağlantılarla bağlanmıştır. Bu bağlantılar kan-testis bariyerini oluştururken epitel tabakayı bölmelere (kompartman) ayırır. Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve büyük moleküllerin geçişi için uygundur. Seminifer epitelin bazal kompartmanında olan spermatogonyumlar kanda dolaşan moleküllerle ilişki kursalar bile bu hücreler testiste daha önce bulunduğundan organizma tarafından yabancı olarak kabul edilmezler (Hendry ve ark 1973, Cockett ve ark 1984, Lund ve Nielsen 1996).

Sertoli hücreleri;

Sertoli hücreleri aralarındaki sıkı bağlantılarla immünolojik koruma sağlar, tohum hücrelerinin beslenmesinde görev alır, mekanik destek vererek hücrelerin lümenine doğru hareketine aktif olarak katılır ve gelişen eşey hücrelerinden arta kalan sitoplazma parçalarını fagosite ederler (Erkoçak 1990, Tekelioğlu 2002).

Androjen bağlayıcı protein (ABP) sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronu bağlayarak seminifer tübül lümenine oradan da epididimise iletilmesine yardımcı olur (Gartner ve Hiatt 2001, Waart ve ark 2001).

İnhibinin üretiminde ve salgılanmasında görevlidirler. Testiküler transferrin üretimi ve salgılanması yaparlar.

Fruktozdan zengin, spermatozoonları besleyici ve taşınmasını kolaylaştırıcı salgıyı üretirler (Erkoçak 1990, Tekelioğlu 2002).

Embriyogenez sırasında Anti-Müllerian hormonu üretirler. Müller kanalının oluşumunu baskılayarak embriyonun erkek olarak gelişmesi sağlanmış olur (Gartner ve Hiatt 2001).

1.5.4. İnterstisyel Doku

Testis kütlelerinin yaklaşık %25-30'unu gevşek bağ doku oluşturur, bu ara doku içerisinde Leydig hücreleri, fibroblastlar, mast hücreleri, farklılaşmamış mezenşim hücreleri, bol kılcıl damarlar, lenf damarları ve sinirler bulunur.

Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasındaki üçgenlerde gruplanırlar, Testosteron hormonu üretimi ve salgılanmasından sorumludurlar. Nöroendokrin fonksiyonları da vardır. Parakrin olarak oksitosin, substans-P, β -endorfin gibi maddeleri salgırlar. İki çekirdekli olabilirler. İyi gelişmiş Golgi kompleksi, tübüller tip kristal mitokondriyonlar ve asidofil sitoplazmalarında yağ damlacıkları içerirler. Çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulumu sahiptirler. Bu hücrelerde salgı granülü bulunmaz, üretilen testosteron ihtiyaca göre sentezlenir ve bekletilmeden kana verilir (Erkoçak 1990, Tekelioğlu 2002).

Leydig hücreleri testislerin testosteron salgılamadığı çocukluk döneminde hemen hemen hiç görülmezler. Bunun yanında, yeni doğan erkek çocukta yaşamın ilk birkaç ayında ve puberte sonrası erişkin dönemde bol miktarda testosteron salgırlar. Testis tümörlerinin geliştiği durumlarda ise, interstisyel Leydig hücrelerinden çok fazla miktarda testosteron salgılanır. Son olarak testisin germinal epiteli, X-ışınlarıyla tedavi sırasında ya da aşırı sıcak nedeniyle haraplandığında, kolay haraplanmayan Leydig hücreleri testosteron üretimine devam eder (Guyton 2001).

1.5.5. Spermatogenezi Uyarıcı Hormonal Faktörler

Gonad Hormonlarını Salgılatan Hormon (GnRH): Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve Luteinize edici hormon (LH) hormonlarının salgılanmasını sağlar. Beyinde hipotalamustan salgılanır.

FSH: Testisteki sertoli hücrelerini uyararak sperm üretimini sağlar. Hipofiz bezinden salgılanır.

LH: Leydig hücrelerinde testosteron sentezlenmesini ve sperm üretiminin devamlılığını sağlar. Hipofiz bezinden salgılanır.

Prolaktin: LH'ın Leydig hücreleri üzerindeki etkisini artırır. Hipofiz bezinden salgılanır.

Testosteron: Sperm üretiminin devamlılığını sağlar. Testisteki Leydig hücrelerinden salgılanır.

Estradiol: LH sentezini kontrol eder. Karaciğer, kas ve yağ dokusunda testosteronun metabolize edilmesi ile oluşur. %20-25'i Leydig hücrelerinden salgılanır.

İnhibin: FSH salınımını engeller. Sertoli hücrelerinden salgılanır.

Aktivin: FSH salınımını artırır. Leydig hücrelerinden salgılanır (Leventerler 2005).

1.6. Spermatogenez

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

3 tip spermatogonyum vardır :

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

Birinci mayoz bölünmeyle sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler 2. mayoz bölünmeyi tamamladıklarında spermatid denilen haploid hücreyi oluştururlar. Bu haploid hücre adluminal kompartmanın üst bölümlerinde olgun erkek üreme hücresine veya spermiyuma dönüşür.

Spermatogenezis 3 ana evreye ayrılabilir:

- Spermatogonial evre; spermatogonyumların bölünerek kendini yenilemesi ve sonrasında primer spermatositlere farkanmasıdır.
- Mayoz veya spermatosit evresi; primer spermatositlerin 2. mayoz bölünme ile hem kromozom sayılarını hem de DNA miktarlarını yarıya indirerek haploid spermatidleri oluşturmasıdır.
- Spermiyogenez evresi; spermatidlerin biçim değiştirerek olgun spermlere dönüşmesindeki evreleri tanımlar (Mortimer ve ark 1986, Dunphy ve ark 1989, Bar-Chama ve Lamb 1994).

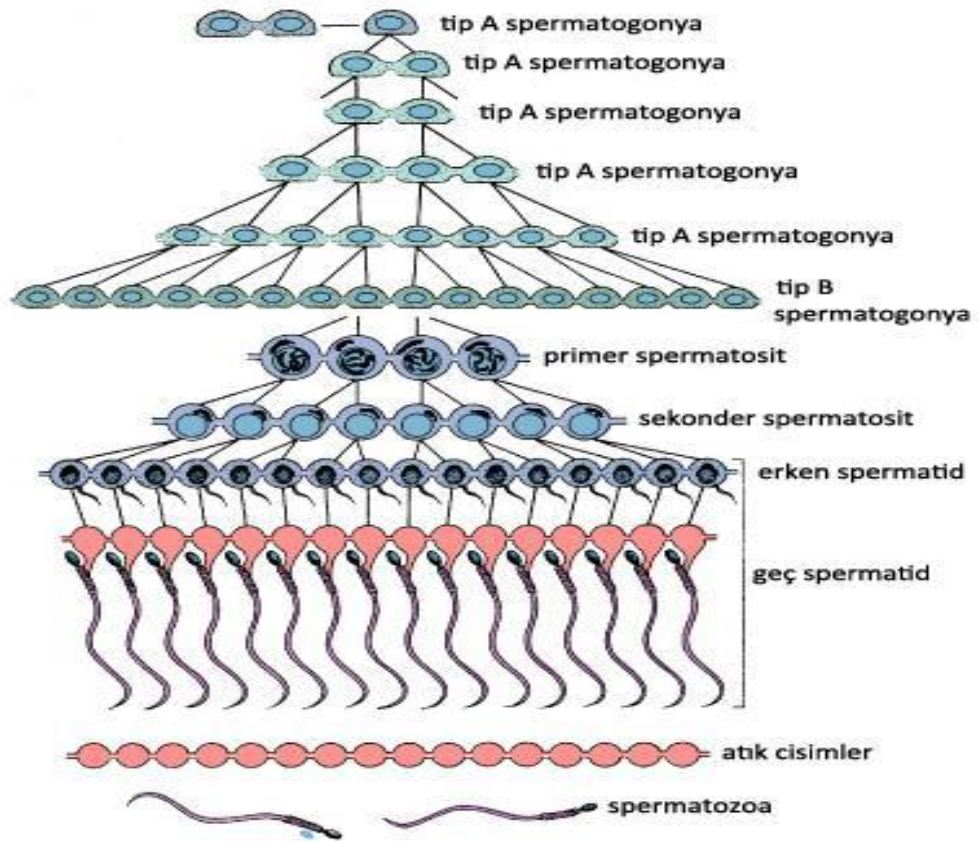
1.6.1. Spermatogonial Evre

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

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

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

Tip B spermatogonyum; tip B spermatogonyumlar yuvarlak çekirdekleriyle ayırt edilirler. Bu özelliği dışında kendilerini oluşturan Tip A açık spermatogonyumlara benzerler. Bu hücreler mitozla bölünerek primer spermatisitleri oluştururlar (Bilgiç 2007).



Şekil 1.1. Spermatogonik hücre serisinin şematik gösterimi (Ross ve Romrell 2006).

1.6.2. Mayoz veya Spermatozit Evresi

Tip B spermatogonyumlar bölünerek primer spermatozitleri oluştururlar ve hemen 1. mayoz bölünmenin profazına girerler. Primer spermatozitler kromozomlarını eşlerler (diploid $2n$ kromozom) ve $4n$ DNA içerirler. Primer spermatozitler seminifer tübüllerdeki gelişmekte olan germ hücrelerinin en iri olanıdır.

Çekirdekleri yoğunlaşmakta olan kromozomları nedeniyle iyi ayırt edilir. Birinci mayoz bölünmenin profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatozitlerin çoğu bu aşamada olacaktır. Primer spermatozitler oluşur oluşmaz, bazaldan adluminal kompartmana geçerler. Komşu sertoli hücreleri arasından geçişleri sırasında, kan-testis bariyerinin bozulmasını önlemek üzere sertoli hücreleri ile aralarında geçici bağlantılar kurarak yukarıya doğru hareket ederler. Birinci mayoz bölünmede DNA, $2n$ DNA olarak paylaşılır ve her yavru hücre haploid (n) sayıda kromozom içerir. İkinci mayoz bölünmede ise hücrelerdeki DNA miktarı yarıya inerek haploid (n) olarak yavru hücrelere aktarılır. Ancak kromozom sayıları haploid olarak kalır (Bilgiç 2007).

1.6.3. Spermioyenez

Spermioyenez DNA miktarı ve kromozom sayısı yarıya inmiş spermatidlerin olgun spermioyum (sperm, spermatozoon) haline dönüşmek üzere geçirdiği hücrel farklanma süreci olarak tanımlanır. Spermatidler küçük boyutları (7-8 μm çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren çekirdekleri ile ayırt edilebilirler. Spermatidler granüllü endoplazmik retikulumdan ve mitokondriadan zengin hücrelerdir ve iyi gelişmiş bir Golgi kompleksleri vardır. Seminifer tübüllerde lümen yakınında (juktaluminal) yerleşmişlerdir. Spermioyenez spermatidlerin sertoli hücresi sitoplazması içine yuvalanması, akrozom oluşumu, kromatinin yoğunlaşması ve çekirdeğin yassılaşip her iki yana doğru uzayarak bilinen yapısını kazanması, flagellum veya kuyruğun gelişmesi ve mitokondriumların göç ederek orta parçadaki yerlerini almaları sitoplazmanın çoğunun artık materyal olarak kaybolmasını içeren bir hücrel değişim sürecidir. Sonuçta seminifer tübül lümenine salınan olgun spermioyum (spermatozoon ya da sperm) oluşur (Makler 1980, Rogers ve ark 1983, Yıldırım 1994).

Spermiyogenezis 4 evreden oluşur; (Makler 1980, Rogers ve ark 1983, Yıldırım 1994).

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

1.6.3.1. Golgi Evresi

Spermiyuma farklanmanın ilk işareti çekirdeğe bitişik yerleşmiş Golgi kompleksinin trans yüzünde ufak, membranla sınırlandırılmış preakrozomal granüllerin belirmesidir. Gelişme ilerledikçe granüller birbirleriyle birleşerek “akrozomal vezikül” denen geniş tek bir granülde toplanır. Bu erken dönemde bile akrozom içeriğindeki hidrolitik enzimler ayırt edilebilir. Akrozomal vezikül çekirdeğin ön kutbuna yerleşmiştir. Bu dönemde vezikülü sınırlayan membran ise çekirdek zarına dayanmıştır. Akrozomal vezikülün tepe noktası yaklaşık sperm çekirdeğinin uç noktasını gösterecek şekildedir. Golgi kompleksi akrozomal vezikül yüzeyi ile yakın ilişkide kalır ve yeni preakrozomal granüller oluşturarak gelişmeye devam eder. Akrozomal vezikülün hacmi arttıkça çekirdek dış zarına dayanan akrozomal membran başlangıç noktasından ayrılarak yarım daire halini almaya başlar. Akrozomal veziküllerin oluşmasıyla eş zamanlı olarak sentrioller çekirdek yakınındaki yerleşimlerinden ayrılarak karşı kutba yönelirler ve birbirlerine dik olarak yerleşirler. Distal sentriolden kuyruğu oluşturacak olan mikrotubuluslar gelişmeye başlar. Bu mikrotubuluslar daha sonra aksonemi oluşturacaklardır (Schlesinger ve ark 1994, Chiou ve ark 1997).

1.6.3.2. Başlık (Cap) Evresi

Bu süreçte akrozomal vezikül hacimce büyümeye başlar. Akrozomal vezikül membranı çekirdek dış zarını çevrelercesine bir yol izleyerek her iki yana doğru uzar ve çekirdeğin ön yüzünü yarım daire şeklinde kaplamaya başlar. Bu süreç içinde henüz akrozomal vezikül içeriği yukarıda tanımlanan şekilde yayılmış akrozomal

alanın tümünü kapsayacak şekilde gelişmesini tamamlamamıştır. Başka bir deyişle akrozomal vezikül oluştuğu ilk bölgede belirgin olarak izlenir (Bilgiç 2007).

1.6.3.3. Akrozomal Evre

Bu evre spermiyogenezisin en önemli evresi olup, sperm başının normal yapısını kazanmasıyla sonuçlanır. Başlık evresinde henüz akrozomal bölgeyi doldurmamış olan akrozomal içerik tümüyle iç ve dış akrozomal membranlar arasında yayılarak akrozomu biçimlendirir. Çekirdek kromatin kondanse olmaya ve çekirdek yassılaşıp sperm başı uzamaya başlar ve mitokondriyonlar daha önce tanımlandığı şekilde, orta parçadaki normal yerleşim bölgelerine doğru göç ederler. Çekirdek hacmi küçülmüştür ve çekirdek yassılaştıkça sperme özgü yapısal özellikleri belirgin olmaya başlar. Akrozomal vezikül ve granül yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri etkisi olan bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür (Chiou 1997).

1.6.3.4. Olgunlaşma Evresi

Spermatidin fazla sitoplazması kuyruk yönünde uzar ve koparak seminifer tübül lümenine atılır. Bu parçalar sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler. Spermiyumlar sertoli hücrelerinden ayrılıp lümenine geçerler. Bu arada diğer spermatidlerle olan bağlantıları da kopar. Yeni oluşan bu spermiyumlar hareketsizdirler ve dölleme yeteneklerini ve hareket özelliklerini epididimal olgunlaşma ve dişi genital yollarındaki kapasitasyondan sonra kazanırlar (Bilgiç 2007).

1.7. Spermiasyon

Spermiasyon seminifer tübülün germinal epitelinden spermiyumların salınmasını tanımlar. Bu süreç sertoli hücreleri tarafından kontrol edilir. Sertoli hücrelerin ara filamanlarının ve sitoplazmik mikrotübüllerinin işbirliğiyle gerçekleşir.

Spermatidler farklandıkça yeni germ hücrelerinin üretilmesiyle yavaşça seminifer tübül lümenine doğru hareket ederler. Gelişimlerinin son evrelerinde

kuyrukları lümene uzar. Çekirdek ve akrozomu içeren baş ise karşı tarafta sertoli hücrelerinin yüzeyindeki girintilerin içinde yer alır. Spermiumların salınması sırasında, başı sertoli hücresinden aktif olarak çıkar ve sitoplazması spermiumu serbestleştirecek şekilde bunu izler (Bar-Chama ve Lamb 1994).

1.8. Spermium (Spermatozoon)

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

Spermium temel olarak 3 kısımdan oluşur:

- Baş
- Boyun
- Kuyruk

Toplam uzunluğu yaklaşık 60 µm kadar olan spermatozoon baş kısmının boyu 3-5 µm, eni 2-3 µm dir. Başın esas görevi;

DNA materyalini taşımak ve korumaktır. Baş bölgesi, lizozomal organelin bulunduğu akrozom, fertilizasyon için oosite tutunma bölgesi olan ekvator bölgesi ve akrozom sonrası bölgeyi içerir (WHO 1999).

Kuyruk bölgesi ise histolojik yapısına göre 3 kısma ayrılır:

- Orta parça
- Esas parça
- Son parça

1.8.1. Baş Bölgesi

1.8.1.1. Akrozom

Plazma zarının hemen altında bulunan akrozom zarı arkaya doğru ilerler, orada bir katlantı yapıp tekrar ön tarafa gelir. Bu paralel gibi duran iki zar arasında

birçok hidrolitik enzimin paketlenmiş olarak beklediği yer olan akrozomal matriks bulunur. Çekirdeğin üçte ikisini kaplar. Buradaki esas iki enzim hyaluronidaz ve akrozindir. Bunun dışında nöraminidaz, aril sülfataz, asit ve alkalın fosfotaz, glikosidaz, β -N-asetilgalaktosaminidaz, β -N-asetilglukosaminidaz (NAG), β -galaktosidaz, β -glukosidaz, β -glukuronidaz enzimleri bulunur. Akrozın, proakrozın adı verilen inaktif zimojenlerde tutulan tripsin benzeri bir proteinazdır. Akrozın; spermatozoonun zonayı geçmesini sağlar.

Spermatozoonun içerdiği diğer zimojen enzim sperminojendir. Bu enzimler akrozom reaksiyonunda salgılanırlar (Mack ve ark 1983, Ross ve ark 2003).

1.8.1.2. Peri-nükleer madde

Akrozomun altında onu çekirdekten ayıran ince tabakaya perinükleer madde denir. Disülfid köprüleriyle sağlamlaştırılmış bu madde, akrozomla nükleus arasında sert bir yapı olup kesintisiz bir tabaka yaparak çekirdeğin üzerini kaplar. Akrozomun arkasındaki bu madde, post akrozom kılıfını oluşturur (Ross ve ark 2003, Kierszenbaum 2006).

1.8.1.3. Çekirdek

Spermatozoon DNA'sı arginin ve sisteinden zengin, oldukça bazik proteinler olan protaminlerle bir kompleks halinde bulunur. Sistein miktarı nedeniyle disülfid β çarpaz bağları fazladır. Bu, çekirdeğe sağlamlık ve dayanıklılık kazandırır. Çekirdek haploid sayıda kromozom içerir ve oosite girmeden ve protaminler ayrılmadan DNA aktive olamaz (Gartner ve Hiatt 2001, Ross ve ark 2003).

1.8.1.4. Son halka ve bazal plaka

Kuyruğu baş bölgesinden ayıran yapıdır. Burada çekirdek zarı porlara sahiptir. Bu bölgede elektronca yoğun bir maddenin oluşturduğu bazal plaka yer alır.

1.8.2. Boyun Bölgesi

Uzunluğu yaklaşık 0,3 μ m olup, yapısında segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriol bulunur. Proksimalde iki çift bölünmüş sütun 2 major ve 2 minör sütun oluşturup başın alt kısmında birleşirler. Distal sentriyol ise

spermiogenezin ileri evrelerinde ortadan kalkmaktadır. Bunlar aksonemin oluşumu sırasında önemli bir rol oynar. Proksimal sentriyol 9 adet üçlü dış mikrotübül içerir. Ortada ise mikrotübül çifti yoktur (Gartner ve Hiatt 2001, Ross ve ark 2003).

1.8.3. Kuyruk Bölgesi:

Enerji üretimi ve hareketlilikten sorumlu oldukça gelişmiş bir bölgedir. Aksonem, 9 dış çift mikrotübül yapısı ve ortada bir çift mikrotübülden oluşan kuyruğun önemli bir bileşenidir.

Bu mikrotübüllerin ana yapısında tübülün proteini bulunur ve kendi içinde α ve β olmak üzere 2 formdadır. A mikrotübülünde ve ortadaki merkezi tübüllerde 13 adet protofilaman varken, B tübülü 10 adet protofilamandan oluşur. Her A tübülünden B tübülüne doğru Ca-Mg bağımlı ATPaz izomeri protein olan dynein kolları kuyruğun hareket etmesini sağlar. Her 9 dış çift, komşu çiftlerle neksin adlı bir protein aracılığıyla bağlanır ve elastik yapılarıyla aksonemin simetrisini korur (Gartner ve Hiatt 2001, Ross ve ark 2003). Bir diğer önemli yapı spermatozoon aksonem etrafında kuyruğun sertliğinde rolü olabileceği düşünülen dış yoğun liflerdir. Esas parçanın %60'ına kadar uzanır ve 3 kısma ayrılır: 2 kısa lif: 6-8 μm , 3 orta boylu lif: 17-21 μm , 4 uzun lif: 31-35 μm 'dir. Lifler sisteinden zengin keratin benzeri protein ve yaygın disülfid çapraz bağları içerir. Bu liflerin ileri derece kaybında esas parçanın eğriliği meydana gelmektedir (Kierszenbaum 2006).

Spermatozoon kuyruğu orta parça, esas parça ve son parça olarak üçe ayrılır.

Orta parça; 3,5 μm uzunluğundadır. Orta parçanın en önemli özelliği, sarmal biçiminde aksonemin çevresini saran, türe özgün sayıda mitokondriyonun arka arkaya dizildiği mitokondri kılıfının varlığıdır. Bu sarmalın 11-15 döngüsü vardır ve her dönemece ortalama 2 mitokondri denk gelir.

Esas parça; esas parçanın yapısında aksonem, çevresinde kalın dış fibriller, fibröz kılıf ve plazma membranı bulunur. En uzun parçadır, çapı yaklaşık 0,5 μm ve uzunluğu 40 μm 'dir. Kılıf iki periferik yarım daire sütun şeklindeki fibröz kılıfla sarılır. Fibröz kılıf sıkı şekilde bir araya gelmiş filamanlardan oluşur. Uzunlamasına sütunlar 2 küçük dış yoğun lifleri kaplar ve birleşir. Fibröz kılıf, disülfid bağlarından

zengin yapısıyla sıkı ve oldukça dayanıklı bir bölgedir. Fibröz kılıf kuyruk hareketlerini kısıtlar ve kontrol eder.

Son parça; fibröz kılıfın distal ucundan sonra son parça başlar. 3 µm uzunluğundadır. Kuyruğun son kısmında kalın fibriller ve fibröz tabaka kaybolur. Bu bölgede önce dynein kolları yok olur, daha sonra merkezdeki mikrotübül çiftleri kaybolur ve dıştaki çiftlerin ikisi ortaya hareket ederken kalan 7'si onların etrafını sarar. Bu sırada B tübüleri de açılarak kaybolur. Kuyruğun ucuna gelindikçe aksonemin mikrotübüler yapısı sona erer (Gartner ve Hiatt 2001, Ross ve ark 2003).

1.9. Boşaltım Yolları

1.9.1. Testisin Boşaltıcı Duktusları

- 1- Tübüli rekti
- 2- Rete testis
- 3- Duktuli efferentes
- 4- Duktus epididimis
- 5- Duktus deferens
- 6- Ampulla duktus deferens
- 7- Duktus ejakulatoryus

1.9.2. Tübüli Rekti

Her lobülün tepesinde seminifer tübüller düz seyirli tübüli rektilerle devam eder. Seminifer tübül epiteli tübüli rektilere doğru biraz değişiklik göstermeye başlar; spermatogenetik hücreler giderek ortadan kaybolur, sertoli hücreleri ise sayı olarak artar. Sonunda tübüli rektilerde sadece yapısı biraz değişmiş olan (sitoplazmasında çok fazla yağ bulunduğundan çok vakuollü, çekirdek kromatini yoğunlaşmış) sertoli hücreleri bulunur. Tübüli rektiler çok kısa yapıdadır. Epiteli tek katlı kübiktir. Çevresinde mediastinum bağ dokusu bulunur (Kalaycı 1986, Junqueira ve ark 1998).

1.9.3. Rete Testis

Tunica albuginea'nın kalınlaşmasıyla oluşmuş, damardan çok zengin olan mediastinum içine yerleşmiş, birbirleriyle anastomozlaşan tübüler yapılardır. Böylece tübülüs ağı oluştuğundan rete (ağ) terimi uygundur (Kalaycı 1986, Junqueira ve ark1998).

Epitel basit kübik ya da yassıdır. Bu nedenle lümenler düzensiz olarak izlenir. Bazı epitel hücreleri tek bir sil taşır. Nukleusları çok koyu boyanır. Bazal membran altında spesifik bir lamina propria bulunmaz, tübüller mediastinum bağ dokusuyla kuşatılmıştır. Spermiumlar tübüli rekti ve rete testisten hızla geçtiği için, kesitlerde lümende spermiuma çok nadiren rastlanır (Kalaycı 1986).

1.9.4. Duktuli Efferentes

Testisin arka kenarının üst kısmında 8-15 kadar sayıda spiral seyirli efferent duktuslar, rete testisi izler. Her biri konik biçimli epididimis lobülünü yapar. Lobüllerin apeksleri mediastinum testise yöneliktir. Tüm duktuli efferentesler ortak bir bağ dokusu ile kuşatılarak epididimisin başını oluşturur. Her bir duktus yaklaşık 2 cm uzunluktadır.

Epitel; bunlar epididimis yönüne doğru hareketi sağlayan silyalı hücrelerle değişimli olarak silyasız kübik hücre gruplarından oluşan bir epitele sahiptir. Bu, epitele tarak şeklindeki karakteristik görünümünü verir. Silyasız hücreler seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğunu absorbe eder. Silyalı hücre aktivitesi ve sıvı abzorbsiyonu spermatozoonların epididimise doğru süpürülmesini sağlayan bir sıvı akımı sağlar (Junqueira ve ark 1998).

Tüm duktus sisteminde hareketli sil sadece duktuli efferenteslerdedir. Spermiumların epididimise geçmelerine yardımcı olur. Epididimis içinde spermiumlar henüz hareketlilik kazanmamıştır (Kalaycı 1986).

1.9.5. Duktus Epididimis

4-6 m uzunlukta, aşırı kıvrımlı tek bir duktustur. Çevresindeki damardan zengin bağ dokusu ile birlikte epididimisin korpus ve kuyruk kısımlarını oluşturur. Çok kıvrımlı olduğu için enine kesitlerde tek tübül yerine çok sayıda kesitine

rastlanır. Duktuli efferenteslerden ayırmada en önemli kriter hem dış hem de iç sınırlarının düzgün oluşudur (lümeni düzgün) (Kalaycı 1986, Junqueira ve ark 1998).

Epitel; psödostrafie'dir. Bazal hücreler; bazal membrana oturmuş fakat lümeneye kadar erişmeyen hücrelerdir. Konik ya da yuvarlak biçimli olan bazal hücreler açık renkli boyanırlar.

Silindirik hücrelerin; hepsi aynı boydadır ve lümeneye kadar ulaştığından lümen düzgündür. Streosillia (hareketsiz sil) taşır. Duktus epididimis epitel spermatojenesis süresince atılan artık cisimlerin ortadan kaldırılması ve sindirilmesine katılır (Junqueira ve ark 1998).

Spermiler epididimis içinden çok yavaş geçmektedir (6 hafta gibi uzun süre). Silindirik hücrelerde salgı yapımı da gerçekleşir. Salgısı, spermium maturasyonuna etkilidir; spermium hareketlilik kazanması, yaşamını sürdürmesi ve fertilizasyon yeteneğinin artırılmasında rol alır. Spermiumlar ilk epididimis içinde hareket etmeye başlarlar (Kalaycı 1986).

1.9.6. Duktus Deferens

Duktus epididimisin kuyruk kısmından sonra duktus deferens devam eder. Testisin arka kenarı boyunca aşağıya inen duktus deferens, kanalis inguinalisi katederek pelvisin yan duvarları boyunca üretraya doğru ilerler, üretranın prostatik kısmında sonlanır. Prostata girmeden hemen önce iğ biçimli bir genişleme yapar (ampulla duktus deferens). Ampulla daralarak ince duktus ejakulatoryusu oluşturur. İki duktus ejakulatoryus prostat içinde seyrederek ve utrikulus prostatikusun iki yanından üretraya açılırlar. Tam gergin duruma getirilmiş duktus deferens yaklaşık 0,5 m uzunluktadır. Başlangıç bölümü çok kıvrımlıdır (Kalaycı 1986). Kalın müköler duvarlı, lümeni dar, tübüler bir yapıdır (Junqueira ve ark 1998).

1.9.7. Ampulla Duktus Deferens

Duktus deferens prostata girmeden önce ampulla denen kısmı oluşturur (Junqueira ve ark 1998). Bu kısmın duktus deferense göre lümeni daha geniş, epitel daha kalın, mukozada kıvrımlar daha fazladır. Enine kesitte epitel kıvrımlarının birbirleriyle kaynaşmalar, dallanmalar yapmaları nedeniyle, lümen üçgenimsi gözenekleri olan ağimsi bir yapı şeklindedir (Kalaycı 1986). Burada epitel kalınlaşır

ve oldukça fazla kıvrımlar yapar (Junqueira ve ark 1998). Kübik ya da silindirik salgılayıcı tiptedir. Sitoplazmasında bol salgı granülü ve sıklıkla sarı renkli pigment bulunur. Tunika muskularis; duktus deferense kıyasla daha incedir (Kalaycı 1986).

1.9.8. Duktus Ejakulatoryus

Ampulladan sonra duktus deferens prostata girer ve prostatik üretraya açılır. Prostata giren kısım duktus ejakulatoryus kısmıdır (Junqueira ve ark 1998). Yaklaşık 2 cm uzunlukta olan duktus ejakulatoryusun mukozası çok incedir ve çok ince kıvrımlar yapar. Ampulladakine benzer kriptalar oluşturur. Epiteli; psödostratifiye ya da basit silindirikdir. Üretraya yakın bölümü üretra epiteline (transizyonel) değişir. Epiteli salgılayıcı tiptir (Kalaycı 1986).

1.10. Yardımcı Üreme Bezleri

Vezikula seminalisler kıvrıntılı uzunlamasına divertiküllerle lümeni labirent şeklinde izlenen bir çift bezdir. İnsanda ejakulatın %70'lik bölümü bu bezin salgısıdır. Salgı, visköz ve sarımsıdır, semenin rengini verir (Agarwal 1980, Aksoy 1988).

Prostat bezi erkek üreme sisteminin en büyük ve tek olan bezidir. Bileşik tubülo-alveolar bir bezdir. Mesanenin hemen altında üretrayı çevreler. Bez, salgısını kendi boşaltım kanallarıyla prostatik üretraya boşaltır (Aksoy 1988, Kierszenbaum 2006).

Bulboüretal bezler (Cowper bezleri), 1 cm'den küçük bileşik tubülo-alveolar bir çift bezdir, üretranın lümenini kayganlaştırmak üzere mukus salgısı yapar (Abou-Seif ve Youssef 2004, Kierszenbaum 2006).

1.10.1. Seminal Veziküllerin Fonksiyonu

Her seminal vezikül kıvrımlı, bölümlü tübüler bir yapıya sahiptir. Tüp boyunca uzanan sekretuar epitel hücrelerinden mukoid bir sıvı salgılanır. Sıvı bol miktarda fruktoz, sitrik asit ve diğer besin maddeleri ile birlikte büyük miktarda prostaglandinler ve fibrinojen içerir. Emisyon ve ejakülasyon sırasında, vas deferensin spermi boşaltmasından kısa bir süre sonra, her seminal vezikül içeriğini ejakülatör kanala verir. Böylece, ejaküle edilen semene büyük bir kitle eklendiği

gibi, seminal sıvıda fruktoz ve diğer besleyici maddelerin artması ile ejakülattaki sperm ovumu döllemesine kadar geçen süreç içinde beslenmesi sağlanır.

Prostaglandinlerin fertilizasyona iki yoldan yardımcı oldukları düşünülmektedir: (1) Servikal mukusla reaksiyona girerek sperm hareketleri için uygun bir ortam oluştururlar ve (2) sperm ovuma ulaşması için uterus ve fallop kanallarının zıt yönde peristaltik kasılmalarını sağlarlar (5 dakikalık süre içinde fallop tüplerinin üst ucuna ulaşan sperm sayısı çok azdır) (Guyton 2001).

1.10.2. Prostat Bezinin Fonksiyonu

Prostat bezi kalsiyum, sitrat iyonu, fosfat iyonu, pıhtılaşma enzimi ve fibrinolizin içeren ince, süte benzer bir sıvı salgılar. Emisyon sırasında, prostat bezinin kapsülü, vas deferensle eşzamanlı olarak kasılır. Böylece ince, sütümsü prostat sıvısı, semen kitlesine eklenir. Prostat sıvısının hafif alkalik özelliği, ovumun başarılı bir şekilde döllemesi için çok önemli olabilir. Çünkü, vas deferens sıvısı sperm metabolik ürünleri ve sitrik asit varlığında, göreceli olarak asidik özelliktedir. Bu nedenle, sperm fertilite özelliği baskılanabilir. Ayrıca, kadının vajinal salgıları da asidiktir (pH = 3,5 – 4,0). Sperm, ortam pH'sı 6,0 ile 6,5'a ulaşana kadar optimal hareketliliğini göstermez. Sonuç olarak, prostat sıvısının, diğer ejakülat sıvılarının asiditesini nötralize etmesi ve bu yolla sperm hareket ve fertilizasyon yeteneğini artırması olasıdır (Guyton 2001).

1.10.3. Semen

Erkeğin seksüel aktivitesi sırasında ejakülasyonla atılan semen, vas deferensden (yaklaşık %10 kadar), seminal vesikülden (yaklaşık %60), prostat bezinden (yaklaşık %30) gelen sıvı ile spermleri içerir. Ayrıca az miktarda mukus bezlerinden ve özellikle bulboüretal bezlerden gelen sıvıları içerir. Sonuç olarak, semen kitlesinin büyük bir bölümü seminal vezikülden gelmektedir. Ejakülasyon sırasında en son olarak atılan bu sıvı, ejakülatör kanalları ve üretradaki spermleri yıkayarak uzaklaştırır. Semen hafif asit sıvıları, alkalik prostat sıvısı ile nötralize edilerek, semen bileşiminde ortalama pH'nın yaklaşık 7,5 olması sağlanır. Seminal vezikül ve mukus bezlerinden gelen sıvılar semene mukoid bir kıvam verirken, prostat sıvısı süt görüntüsü kazandırır. Bunun yanında, prostat sıvısında bulunan bir pıhtılaşma enzimi, seminal vezikülden gelen fibrinojeni etkileyerek zayıf bir pıhtı

oluşturur. Bu olay uterus serviksinde, vajinanın derinliklerinde semenin tutulmasına yardım eder. pH sonraki 15-30 dakika içinde prostattan gelen profibrinolizinden oluşan fibrinolizinlerle çözünür ve eritilir. Ejakülasyon sonrası ilk dakikalar içinde, belki de pıhtının viskozitesi nedeniyle, spermeler giderek hareketsiz kalırlar. Pıhtının çözülmesiyle birlikte spermelerin yeniden yüksek hareketlilik kazandığı görülür.

Spermeler erkek genital organında haftalarca canlı kalabildikleri halde, semenle atıldıktan sonra vücut ısısında maksimal 24-48 saat yaşayabilirler. Bunun yanında, düşük ısıda semen belki de haftalarca depolanabilir ve -100 °C'nin altındaki ısılarda dondurularak yıllarca saklanabilir (Guyton 2001).

1.11. Semen Analizi (Spermiyogram)

İnfertil çiftlerde yarıya yakın bir oranda erkekte problem olduğu belirlenmiştir. Erkeklerde anatomik, endokrin, immünolojik bir bozukluk veya enfeksiyon, infertilite nedeni olabilecektir. Bu nedenle erkek faktörünü ortaya koyan en basit test spermiyogramdır (Delilbaşı 1997).

1.11.1. Sperm Örneğinin Alınması

Hastalar ile yapılan ilk görüşmede örnek vermek için gelecekleri gün 3-5 günlük bir cinsel perhiz süresine uymaları tavsiye edilir. 2-7 gün arasındaki cinsel perhiz süresi yeterli görülürse de kısa süreli cinsel perhizde semendeki sperm sayısı az, uzun süreli cinsel perhizde de (erkek faktörü mevcut ise) sperm sayısı yeterli olsa bile motilitenin düşük olduğu gözlenmiştir. Yapılan araştırmalarda uzun süreli cinsel perhizin spermelerin akrozin içeriğinde de azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Önerilen cinsel perhiz süresine uyulduğunda, dikkatli bir şekilde yapılan semen analizi testislerin spermatogenik ve steroidogenik aktivitesiyle aksesuar bezlerin çalışması hakkında sağlıklı bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır (Delilbaşı 1997, WHO 2002).

Hastalara steril şartlarda steril kutular verilerek bu amaçla düzenlenmiş sperm verme odasını kullanmaları sağlanır. Hastalar mastürbasyonla örnek vermeleri gerektiği konusunda bilgilendirilir, kullandıkları kutuların üzerine isimleri etiketle yapıştırılır.

Örnek verme esnasında nelere dikkat etmeleri gerektiği önceden hazırlanmış bir bildiri ile kendilerine açıklanmalıdır ve örnek toplanması esnasında krem ya da kayganlaştırıcı bir madde kullanmaması, örnek toplanan kutuya su ya da başka bir madde kaçırmaması söylenir. Semen toplama kabı olarak daha önceden yapılan kimyasal ve biyolojik testlerle toksik olmadığı ispatlanmış kutular satın alınmalıdır. Hastanın örneğini aldıktan sonra kendi eli ile laboratuvardaki ilgili biyologlara teslim etmeleri gerektiği izah edilmelidir (Delilbaşı 1997, WHO 2002).

1.11.2. Semen Örneğinin Değerlendirilmesi

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasında ilk basamak semen analizidir. Bu inceleme esnasında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirtilen kriterler esas alınmaktadır. Semen analizi makroskopik ve mikroskopik incelemeden oluşur (WHO 2002, Rrumbullaku 2005).

1.11.3. Semen Makroskopik İncelemesi

Makroskopik incelemede semen içeriği likefikasyon, görünüm, volüm ve pH özellikleri yönünden değerlendirilmektedir (Lens 1996, WHO 2002, Rrumbullaku 2005).

1.11.3.1. Likefikasyon (Semenin Çözünürlüğü)

Ejakülasyon sırasında akıcı olan semen koagüle olur. Prostattan salgılanan amilaz ve proteolitik enzimler 10-30 dakika içerisinde semenin likefiye olmasını (çözünürlük kazanmasını) sağlar. Laboratuvara ulaşan semen örneği 37°C'de (etüvde) likefiye olana kadar bekletilir, sonra incelemeye alınır. Bu süreyi aşan örnekler viskoz olarak kabul edilir (WHO 1992, Lens 1996, Rrumbullaku 2005).

1.11.3.2. Görünüm

Normalde semen sarı-gri renkte, parlak ve homojendir. Prostat bezinden salgılanan spermin oksidasyonundan kaynaklanan kendine özgü bir kokusu vardır. Semende eritrositlerin bulunması halinde renk kırmızı-kahverengidir. Uzun süreli cinsel perhizlerde ve lökositospermide renk sarıya dönüşür (WHO 1992, Lens 1996, Rrumbullaku 2005).

1.11.3.3. Volüm

WHO kriterlerine göre semen hacmi 2 ml veya daha fazla olmalıdır. 1 ml'den az olması durumu, hipospermik olarak isimlendirilip toplama sırasında örneğin dökülmüş olabileceği, kısa cinsel perhiz süresi, retrograd ejakülasyonu veya ejakülatör kanalda darlık gibi nedenler düşünülebilir. Miktarı 6 ml'den fazla olan semen içeriği hiperspermik olarak adlandırılır, bu durumda cinsel perhiz süresi uzun veya seminal sıvı fazladır (Delilbaşı 1997, WHO 2002, Rrumbullaku 2005).

1.11.3.4. pH

Normal pH değeri 7,2 – 8,0 arasındadır. Akut enfeksiyonlarda pH değeri 8'in üzerine çıkabilir. pH'nın düşük olması sperm salınımının yetersizliği ve bu nedenle ejakülatın daha çok asidik prostat sıvısından oluştuğunu gösterebilir (Male Factor Infertility 2000, WHO 2002, Rrumbullaku 2005).

1.11.4. Semen Mikroskopik İncelemesi

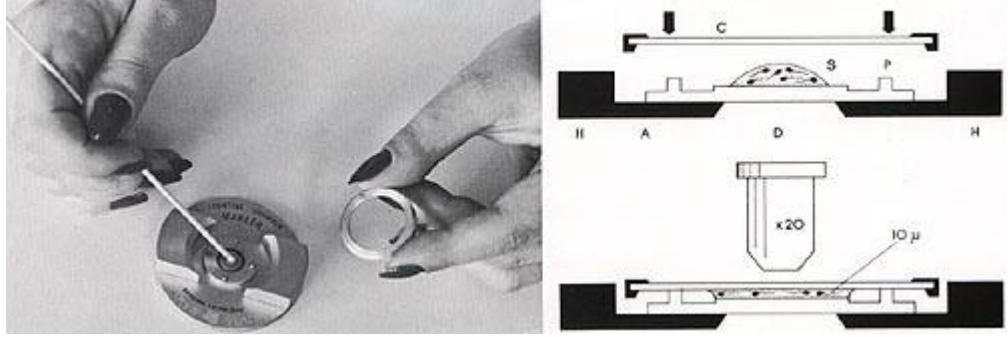
Mikroskopik incelemede semen içeriği; sperm konsantrasyonu, hareketliliği (motilite), morfolojisi, yuvarlak hücre sayısı ve bu hücrelerin sınıflandırılması yönünden incelenmektedir (WHO 2002, Rrumbullaku 2005).

1.11.4.1. Konsantrasyon

Sperm sayımı için günümüzde en fazla kullanılan aletlerden biri "Makler Sperm Sayım Kamarası" dır . 1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından sperm sayımı için özel olarak tasarlanmıştır. Semen örneğinin incelendiği kamaranın 10 µm derinliğinde olması spermatozoanın tek bir düzlemde serbest hareketine olanak sağlamaktadır. Makler kamarası ile spermlerin hareketlilik yüzdeleri daha kesin olarak saptanabilmektedir (Duru 1998, Makler Counting Chamber 2005, Semen Evaluation 2005).

Güvenilir bir değerlendirme için ideal olan Makler sperm sayım aletindeki 100 karedeki spermleri saymaktır. Sayım şu şekilde gerçekleştirilir. Bir damla semen (5 µl) kamaranın merkezine damlatılıp üzerine grid camı kapatılır. Dört adet kuartz bacak sayesinde spermler, 10 µm derinlikte yüzeceklerdir. Bu derinlikte ancak bir adet sperm başı sığabilir. Bu sebeple bir hat üzerinde yapılacak sayım 20X büyütme

altında 10 karede motil ve non-motil sperm sayılır ve 10^6 ile çarpılarak mililitredeki ($\times 10^6/\text{ml}$) sperm sayısı belirlenir. Normal sperm konsantrasyonu $>20 \times 10^6/\text{ml}$ ve totalde 40×10^6 'dır (Duru 1998).



Şekil 1.2. Konsantrasyon Ölçümü (Midatlantic diagnostics 2009).

1.11.4.2. Motilite

Motilite değerlendirilirken konsantrasyon sayımında olduğu gibi 20X büyütme altında ve 10 karede yapılır. Motil spermelerin, toplam sperm sayısına oranı yüzde olarak motiliteyi verir (Duru 1998, Makler Counting Chamber 2005, Rrumbullaku 2005).

1.11.4.3. Morfoloji

Morfolojik değerlendirmede WHO veya Kruger'in strict kriterleri kullanılmaktadır. WHO kriterlerine göre normal değer $>30\%$ iken Kruger strict kriterlerine göre 14% olmalıdır. Morfolojik değerlendirmede sperm baş, boyun ve kuyruk anomalileri yönünden dikkatle incelenmelidir. Sperm morfolojisi değerlendirilirken önce lam üzerine yayma yapılarak seçilen boya ile boyama yapılır (WHO için Papanicolaou ve Kruger strict kriterleri için Diff-Quick veya Spermac). Değerlendirme immersiyon yağ altında yapılır tercihen 100 veya 200 sperm incelenerek % normal cinsinden sonuç verilir (Duru 1998, Işık ve Vicdan 1999).

WHO kriterlerine göre normal sperm morfolojisi;

Hacim: 2.0 - 6.0 ml

Sperm Konsantrasyonu: > 20 milyon / ml

Total sperm sayısı: >40 milyon / ejakulat

Hareket: >%50 (ileri hareketli) veya ilk 1 saatte > %25 hızlı hareketli

Morfoloji : >%30, kruger kriterlerine göre > % 14 normal

Vitalite (canlılık): >%75

Lökosit: < 1 milyon / ml

pH: 7.2-8.0 (Kayıkçı ve ark 2002)

Ejakulat Değerlendirmesinde Terminoloji;

Aspermia: Ejakulatın olmaması

Azoospermia: Ejakulatta sperm olmaması

Normozoospermia: Normal semen parametreleri

Hematospermia: Ejakulatta kan olması

Lökositospermia: Ejakulatta normalin üzerinde lökosit bulunması

Hipospermia: Ejakulat volümünün <1 ml olması

Hiperspermia: Ejakulat volümünün >6 ml olması

Oligozoospermia: Normalden az sperm konsantrasyonu(<20 milyon/ml)

Polizoospermia: Normalden fazla sperm konsantrasyonu(>250 milyon/ml)

Astenozoospermia: Zayıf motilite (a+b) veya zayıf ileri doğru (a) hareketlilik

Teratozoospermia: Normal morfoloji yüzdesinin azalmış olması

Nekrozoospermia: Tüm spermilerin ölü olması

Globozoospermia: Yuvarlak başlı, akrozomsuz sperm hücrelerinin bulunması
(Makler 1980, WHO 2002)

1.12. İnfertilitenin Değerlendirilmesi

Bir yıl içerisinde korunma yöntemi olmadan sürdürülen düzenli bir cinsel yaşama rağmen (ortalama haftada iki kez beraberlik düzenli cinsel yaşam olarak kabul edilir) gebelik oluşmamasına infertilite adı verilir. Hiç gebelik oluşmaması durumu primer infertilite; daha önce mevcut bir gebeliğin ardından gebelik elde edilmemesi ise sekonder infertilite olarak tanımlanır. Gebelik için hiçbir şansa sahip olmama durumu sterilite olarak ifade edilir. Yapılan araştırmalarda, toplumlarda infertilite oranının % 10-15 dolayında olduğu bildirilmiştir (Andrology 2005, Infertility 2005, Male Factor Infertility 2005) .

Erkek infertilitesi, infertil çiftlerin %10-30'unda tek neden, %15-30'unda ise kadındaki probleme ek olarak karşımıza çıkmakta, dolayısı ile vakaların yaklaşık %50'sinde görülmektedir (Andrology 2005, Male Factor Infertility 2005).

1.12.1. Erkekte İnfertilite Nedenleri

- Sperm ile ilgili problemler

Düşük sperm sayısı, sperm üretiminde bozukluk (defektif sperm sayısında artış), oligospermi (sperm sayısının düşük olması), azospermi (sperm bulunmaması), seminal kanallarda tıkanıklık, seminal sıvı bozuklukları

- Isı ile sperm potansiyelinin azalması

Kronik yüksek ateş

- Sperm kalitesi ya da sayısında düşmeyi genellikle etkileyen nedenler

Alkol, ilaçlar (bazı mide ilaçları, depresyon ilaçları, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar), esrar, nikotin, pestisitler, kurşun

- Belirli hormonal bozukluklar sperm kalitesini etkiler

Hipofiz bozuklukları, feminizasyon

- Testiküler bozukluklar sperm üretimini etkiler

Testiküler ven varikozu, testiküler hasar, testiküler tümör, varikozel, testikül anomali, inmemiş testis (çocuklukda başarılı şekilde müdahale edilmemiş), testiküler burulma, kabakulak, radyasyona maruz kalma

- Testiküler kanalın bloke olması (sperm salınımını etkiler)

Testiküler kanalda kızıl (scarring), cinsel yolla bulaşan hastalıklar, gonera, klamidya, genital kanal anomalisi

- Retrograd ejakülasyonu (mesaneye ters ejakülasyon-çeşitli nedenlerden dolayı oluşabilir)

Prostat cerrahisi,

- Ejakülasyonun oluşmaması (çeşitli nedenlere bağlı olabilir)

İktidarsızlık (impotens), erektil disfonksiyon, diyabet, prostat cerrahisi, üretra cerrahisi, kan basıncı ile ilgili uygulamalar

- Bazı kromozom bozuklukları
- XXY erkekler (Causes of Male Infertility 2005).

1.12.2. Erkek İnfertilitesinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) Rolü

Spermatozoa tarafından ROT üretimi, sperm kapasitasyonunun regülasyonu, akrozom reaksiyonunun kolaylaştırılması, sperm-oosit etkileşimi ve sinyal transdüksiyon mekanizmalarında önemli bir mediyatör olarak hizmet eden, normal fizyolojik bir olaydır. Yapılan birçok çalışmada; ROT' un düşük miktarlarının spermin kapasitasyonunu, hiperaktivasyonunu, akrozom reaksiyonunu ve oosit füzyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Agarwal ve ark 2003, Koksall ve ark 2003, Kumar ve ark 2003).

Normal durumda ROT, spermin bu fonksiyonlarını gerçekleştirmesine yetecek düzeyde tutulmak üzere sürekli olarak antioksidan mekanizmalar tarafından süpürülmektedir (Agarwal ve ark 2003, Kumar ve ark 2003). Ancak ROT'un aşırı üretimi, spermatozoa ve seminal plazmanın antioksidan kapasitesinin bozulması ile sonuçlanan oksidatif stres olarak adlandırılan bir duruma yol açmaktadır. Ayrıca

yüksek seviyedeki ROT, mitokondri iç ve dış membranlarını da bozar (Kumar ve ark 2003, Novotný ve ark 2003, Aitken 2006).

Spermatazoanın, mitokondriyal membranlardan zengin olan orta parçası ROT'un primer hedefidir. Aksonemal hasara neden olan hücre içi adenozin trifosfattaki (ATP) hızlı kayıp ile sperm motilitesinde azalma ROT'un majör etki şekli olarak göz önüne alınmaktadır (Sikka 2001).

1.12.3. Antioksidan Korumalar

Semende oluşan hücresel hasar, ROT oluşumu ve antioksidan koruma arasındaki dengenin sağlanamamasından kaynaklanmaktadır. Gonadlar ve seminal sıvıda antioksidan koruma süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz ve redüktaz sistemi ile sağlanmaktadır. Bu denge oksidatif stres düzeyi (OSD) olarak tanımlanıp sperm hasarı ve infertilitede önemli rol oynayabilmektedir. SOD, süperoksit anyonunu O_2^- ve H_2O_2 'e ve katalaz da H_2O_2 ' i H_2O ve O_2 ' e dönüştürür (Sikka 1996).

1.12.4. Oligospermi ve İnfertilite

İnfertil erkeklerin büyük kısmında söz konusu olan oligospermi bir hastalık değil semptomdur. WHO tarafından sperm sayısının 20 milyon/ml nin altında olabileceği belirtilmektedir (Mac ve Gold 1951, Zukerman 1977).

Fertilizasyonu tek sperm sağladığı göz önüne alındığında canlı spermi olan tüm erkekler fertil kabul edilebilir. Sadece sperm ovuma ulaşmasının yeterli olabileceği fikri invitro fertilizasyon ve artifisyel inseminasyondaki gelişmeleri doğurmuştur (Eckerling 1960). Spermilerin fertilizasyon için hazırlanmasında yıkama, yüzdürme, çöktürme, kafeinle muamele edilmesi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Spermilerin yıkanması yeni bir yöntem olmayıp 1970'li yıllarda spermeleri daha küçük hacimde konsantre etmek amacı güdülmüştür. Günümüzde ise inseminasyon öncesi daha kaliteli sperm örnekleri elde etmek amaçlanmaktadır. Sperm kalitesini arttırmak üzere sıklıkla albumin ve perkol gradientleri kullanılmaktadır (Kogan 1988).

Bu yöntem için en uygun adaylar sperm-mukus ilişkisi zayıf olan çiftlerdir. Diğer uygun adaylar varikozel gibi anatomik bozukluğu olanlar ile idiopatik oligoastenospermililerdir (Ronald 1986).

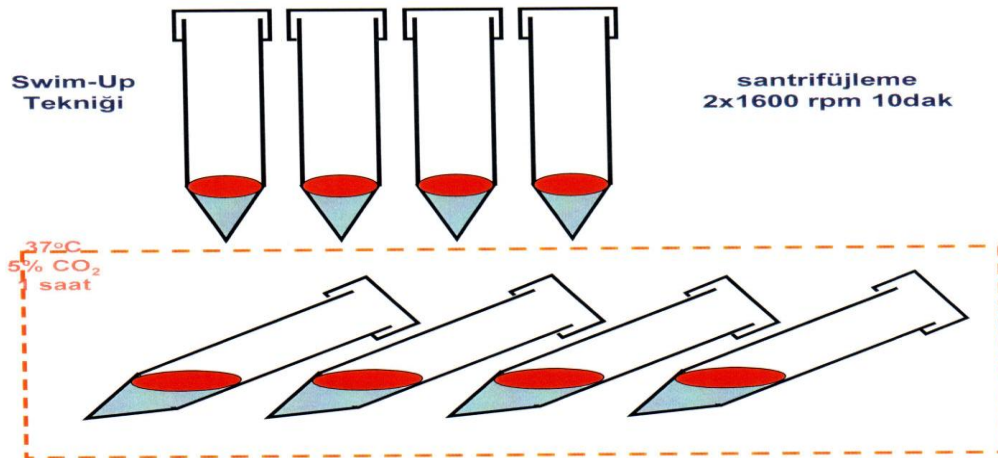
1.13. Spermilerin Fertilizasyonu İçin Yıkama Yöntemleri

Spermin yıkanarak hazırlanmasında sıklıkla dört metod kullanılır:

1. Swim-up (yüzdürme) tekniği
2. Swim-down tekniği
3. Gradient tekniği
4. Percoll yöntem

1.13.1. Swim-up tekniği

Tüm ejakülat 0,5-1 ml'lik fraksiyonlar halinde ayrı ayrı konik tüplere konur. Üzerlerine sperm yıkama medyumu eklenir. Tüpler 37°C de 1-2 saat süreyle %5 karbondioksitli ortamda 45° eğimli pozisyonda inkübe edilir. İnkübasyon sonunda üstteki 1 ml'lik kısım pipetle alınarak kullanılır. Swim-up ile bol miktarda progresif hareketli sperm elde edilebilmesine rağmen sperm sayısında önemli ölçüde düşüş olur. Bu yöntemin dezavantajı ileri derecede oligospermi ya da astenozoospermi vakalarında yeteri kadar sperm elde edilememesidir, bu nedenle şiddetli erkek infertilitesinde kullanımı kısıtlıdır (Nilsson ve ark.1979).



Şekil 1.3. Swim-Up Tekniği (Aktaş 2007)

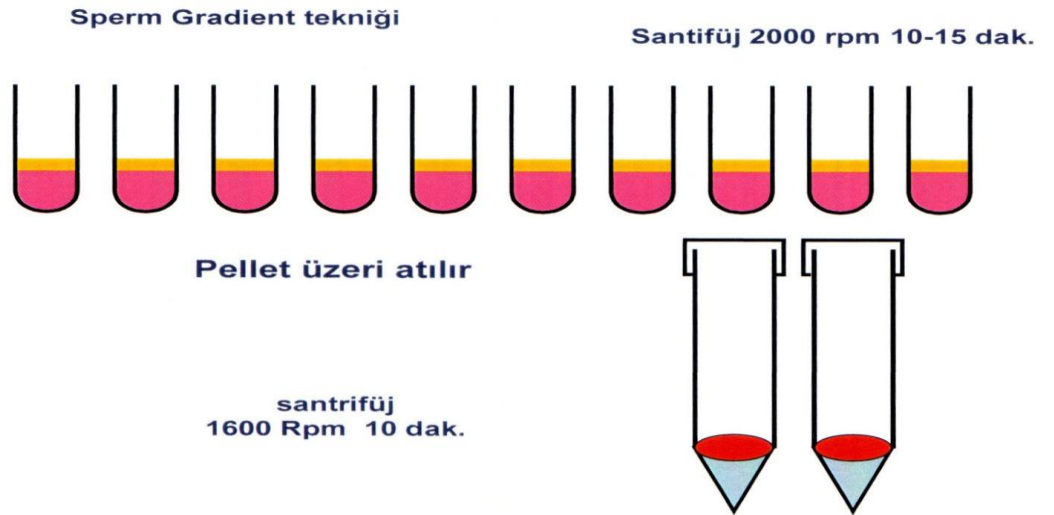
1.13.2. Swim – down tekniği

Ejakülat, dansitesi seminal sıvıdan daha fazla olan bir solüsyon üzerine konarak 30 – 60 dakika 37°C de 45° eğimle %5 karbondioksitli ortamda inkübe edilir. Tüpün en altındaki 0,5 ml aspire edilerek YÜT’ de kullanılır. Bu yöntemle progresif hareketli sperm elde etme şansı çok azdır. Ancak basit olması ve santrifüj kullanılmaması bu yöntemin avantajıdır.

1.13.3. Gradient yöntemi

Bu yöntemde silika partiküller içeren medyumlar kullanılır. 15 ml lik konik tüp içine aşağıdan yukarıya doğru her birinden 1 ml olacak şekilde %90, %70 ve %50’ lik gradient solüsyonları üst üste konarak üç tabakalı yıkama oluşturulur. En üstteki tabakanın üzerine her bir gradient tabakası için 1 ml olacak şekilde 3 ml likefiye olmuş ejakülat bırakılır, 200 – 500 g da 10 – 20 dakika santrifüj edilir.

Sonrasında alttaki fraksiyon geride bırakılarak üstteki süpernatant kısım bir pipetle aspire edilerek dışarı atılır. Dipte bırakılan kısım 1:1 volüm medyum ile karıştırılarak yıkanır (Baker 1985).



Şeki 1.4 Sperm gradient tekniği (Aktaş 2007)

1.13.4. Percoll yöntemi

Percoll; polivinil piralidon ile kaplanmış koloidal silika partiküllerini içeren bir yöntemdir. İşlem sırasında semen percoll gradientinin üzerinde katmanlandırılır,

en sık kullanılan gradientler % 45 - %90 gradientleridir. Hazırlanan bu süspansiyon santrifüj edildiğinde, spermier santrifüj hareketi doğrultusunda birbirine paralel ve baş aşağı dizilirler. Normal morfolojiye sahip progresif hareketli spermier ejakülat içerisinde en fazla dansiteye sahip olanlardır. Bundan dolayı santrifüj sonrası tüpün en altında normal morfolojiye sahip ve motilitesi en yüksek olan spermier toplanır. Gradient yöntemlerinde, spermier partiküllerin arasında aşağıya doğru yüzerek dipte toplanırlar, yani sadece dansite değil, spermier kendi motilitesi de spermier seçiminde etkili olur. Ayrıca bu yöntemde, akrozom membranı üzerine olan mekanik etkinin de fertilizasyonu arttırıcı etkisi bulunduğu ileri sürülmektedir. İmmatür hücrelerin ve lökositlerin de ortamdan uzaklaştırılmaları, bunlardan açığa çıkabilecek serbest oksijen radikallerini azaltarak, fertilizasyonu düzeltiyor da olabilir (Aktaş 2007).

1.14. Sperm Mitokondrisi

1.14.1. Mitokondriyal Kılıf

Spermier orta kısmı mitokondriden zengindir. Helikal ve sıkı şekilde yerleşen yapı, mitokondriyaların etrafındaki kılıftır. Mikrotübül duvarı longitudinal ve lineer olarak yerleşmektedir ve tübüler alt ünitler ile adını almaktadır. Her bir tübül komplet A ve inkomplet B mikrotübüllerden oluşmaktadır (Playán ve ark 2006).

Aksonem, komşu mikrotübüler çiftlerin B alt lifleri ile çapraz köprüler oluşturur ve adenosin trifosfat (ATP) hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyle harekete dönüşerek etki eder. Hücre hareketinden sorumlu enzimatik mekanizma iç ve dış kollarda yer almaktadır. Flagella ve silya hareketini sağlayan itici güç kaynağı yani spermatozoonun güç motoru, mikrotübüler çiftlerin kollarında bulunan magnezyum (Mg) bağımlı ATPaz'dır. Kimyasal enerji kinetik enerjiye çevrilir (Mortimer 1997).

1.14.2. Sitoplazmik droplet

Seminifer tübül tarafından salgılanan spermatozoa içindeki küçük sitoplazmik kitle olup lizozomal enzimlerden zengindir. Epididim boyunca spermier hareketi sırasında esas yerinden hareket ederek bağlantı parçasından orta parçanın sonuna doğru ilerler. Ejakülatta dropletlerin varlığı, ODF (Outer Dense Fibers) ve fibröz kılıf gibi yapıların eliminasyonuna bağılı epididimal fonksiyon bozukluğu ve fertilizasyonun azalması ile birliktelik gösterir (Mancini ve ark 2003).

1.14.3. Mitokondri

Mitokondri; Yunanca, mitos (iplik) ve chondros (tane, buğday) kelimelerinden oluşmaktadır. Bazı ilkel protozoa ve memeli eritrositleri hariç, oksijenli solunum yapan tüm hücrelerde bulunur. Boyları 0.2 - 5 µm arasında olan, farklı şekil ve sayıdaki yapılardır. Bazı hücrelerde uzun, hareketli ve/veya zincirler şeklinde bulunurken, sperm hücrelerinde aksonem etrafında sıralanmış olarak yer alırlar (Scheffler1999, Kato 2001).

1.14.4. Mitokondri yapısı

Kalınlığı 70 Å, görünümü oval veya yuvarlak olan dış zar, mitokondriyi korumakla görevlidir. İçteki zar, iç yüzeyin artırılması için yaklaşık 200 Å'lık aralıklarla birçok kıvrım meydana getirmiştir; bu kıvrımların tarak şeklinde olanlarına "krista", tüp şeklinde olanlarına da "tubulus" denir.

Mitokondriler enerji metabolizması ile ilgili hücre içi organellerdir. Esas fonksiyonu elektron transport zinciri ile iç ve dış membran arasında proton gradienti oluşturarak ATP üretimini sağlamaktır. Ayrıca mitokondrinin sitrik asit siklusu ve lipid metabolizmasını ilgilendiren enzim sistemleri bulunmaktadır (Scheffler1999, Kato 2001).

Kendine özgün deoksiribonükleik asit (DNA) molekülüne sahip mitokondrilerin, her bir hücredeki sayıları 500-1000 arasında değişmektedir. Bu sayı yumurta hücrelerinde, embriyogenez öncesinde replikasyon olmaması ve daha fazla enerjiye ihtiyaç duyulması nedeniyle 100.000' lere ulaşmaktadır (Mak ve ark 2000).

1- Dış zar: Bir taşıyıcı protein olan porin sayesinde 10 000 dalton veya daha küçük moleküllerin geçişine izin verilir. Ayrıca özellikle lipid sentezinde görevli çeşitli proteinleri de taşır.

2- İç zar: Birçok kıvrım (krista) ve katlantıyla yüzeyini daha da artırır. İç zarın sahip olduğu proteinler üç farklı fonksiyon için gereklidir.

3- Zarlar arası alan: 40-80 Å genişliktedir.

4- Matriks: Sitrik asit siklusu, yağ asitleri ve piruvatın oksidasyonu için gerekli enzimleri içerir. Ayrıca, mitokondrial DNA (mtDNA), mitokondrial ribozomlar, transfer ribonükleik asitler (tRNA) ve mitokondrial genlerin ekspresyonunda görevli enzimleri de bulundurur (Güneş 2003).

1.14.5. Mitokondriyal Fonksiyonlar

Mitokondriler, organik materyallerin ATP olarak hücrel enerjiye dönüştürülmesi dışında, birçok metabolik görevlerde önemli rol oynar. Örneğin;

- Apoptoz (programlı hücre ölümü)
- Hücrel proliferasyon (hücre çoğalması)
- Hücrel redoks durumunun düzenlenmesi
- Hem sentezi
- Steroid sentezi

Enerji üretimi fazla olan hücrelerde krista sayısı fazladır. İç membranda 3 tip protein bulunur:

- 1) Elektron transport zincirinin oksidasyon reaksiyonlarını gerçekleştiren proteinler (enzimler, sitokromlar)
- 2) Matrikste ATP yapımını gerçekleştiren ATP sentetaz
- 3) Metabolitlerin matrikse giriş çıkışını düzenleyen permeaz adı verilen transport proteinleri.

Matriks, iç membranın çevrelediği alandır. Çok miktarda protein, çeşitli reaksiyon enzimleri, mtDNA, ribozomlar ve tRNA bulunur. Enzimlerin en önemli fonksiyonları pirüvat ve yağ asitlerinin oksidasyonu ve sitrik asit döngüsüdür. Sitolde gerçekleşen glikoliz olayı sırasında nikotinamid adenin dinükleotid (indirgenmiş) (NADH) ve sonunda pirüvat oluşur. Pirüvattan, yağ asitlerinin ve amino asitlerin karbon iskeletinin yıkımından oluşan asetil-CoA, mitokondri matriksinde sitrik asit döngüsüne girer ve böylece NADH ve flavin adenin

dinükleotid (indirgenmiş) ($FADH_2$) oluşturur. Oluşan NADH ve $FADH_2$ 'ler, iç membranda bulunan elektron transport zincirine aktarılırlar (Scheffler1999, Kato 2001).

1.14.6. Mitokondride Elektron Transportu ve Oksidatif Fosforilizasyon ile Enerji Oluşumu

ATP enerjiyi taşıyan bir moleküldür. Bu enerji ise hücrenin fonksiyonunu görmesi için kullanılır. ATP enerji naklini, yapısında bulunan fosfat ile gerçekleştirir. ATP, bu fosfatı alıp, bir başka düşük enerjili moleküle taşıyarak orada bırakır. Fosfat, içine girdiği molekülde, taşıdığı enerji ile reaksiyonu gerçekleştirir.

Spermatozoada da fruktoz ve yağ asitleri metabolize olurlar ve bu sırada ara ürün olarak açığa çıkan elektronlarını (H^+ şeklinde) NAD ve FAD'a verirler. Sonuçta $NADH^+$ ve $FADH^+$ şeklinde enerjiden zengin moleküller oluşur. Bu moleküller ise elektronlarını, yani hidrojenlerini, elektron taşıyıcı moleküllere verirler. Bu işleme "elektron transport zinciri" adı verilir (Aitken ve ark 1997) .

Elektronların verildiği moleküller ise oksijen bileşikleridir. Elektronların transportu sırasında bu elektronlar enerjilerini kaybederler. Kaybedilen bu enerjinin, ADP' ye fosfat bağlanmasında ve sonuç olarak ATP oluşumunda kullanılmasına oksidatif fosforilizasyon denir. ATP oluşması için gereken elektron transportu zinciri, mitokondrinin iç zarında meydana gelir. Mitokondrinin iç zarı son derece kıvrımlıdır. Bu sayede geniş bir yüzey oluşturulur. Elektron transportu ve oksidatif fosforilizasyonda görev alan proteinler bu membran üzerinde bulunarak, mitokondri matriksine doğru uzanırlar. Matriks içerisinde ise pirüvat ve yağ asitlerinin oksidasyonu ile sitrik asit siklusunda kullanılan; NAD, FAD, ADP ve P molekülleri yer almaktadır. İç zar 5 ayrı enzim kompleksinden oluşur: I, II, III, IV ve V. I ve IV arasındaki kompleksler elektron transportunda, V. kompleks ise ATP sentezinde rol alır (Kent-First ve ark 1999).

Elektronları taşıyan enzimler koenzim Q ve sitokrom a, b, c molekülleridir. Koenzim Q ve sitokrom C mobil halde bulunurken, diğer enzimler iç membrana tutunmuşlardır (Özdiler ve Aydos 2000).

Taşıyıcı bu enzimler elektronları alır ve bir sonraki komplekse verirler. Elektronlar bu komplekslerde oksijen ve protonlar ile birleşir ve neticede su oluşur. İşte bu nedenle oksijene gerek vardır ve vücutta en fazla oksijen tüketimi burada gerçekleşir.

Kompleks I'de, önce NAD'den NADH^+ , daha sonrada bu NADH^+ 'nin NAD'ye dönüşümü sırasında hidrojenini flavin mononükleotid (FMN)'e vererek FMNH_2^+ (indirgenmiş) oluşur. Kompleks II'de ise doğrudan FAD'dan FADH_2 oluşur. NADH^+ ve FADH_2^+ oluşumu sitrik asit siklusu sırasında olmaktadır. Oysa kompleks I ve II'deki reaksiyonlarda FMNH_2^+ ve FADH_2^+ in taşıdıkları elektronlar koenzim Q'ya aktarılırlar, neticede hidrojenlerini kaybederek FMN ve FAD geride kalırken, bu hidrojenleri alan koenzim QH meydana gelir. Koenzim Q, spermatozoada ATP üretiminde önemli role sahiptir (Tur-Kaspa ve ark 1994).

Elektronların taşıyıcı enzimlere aktarılmaları koenzim Q'ya hidrojen atomları şeklinde, sitokromlara ise elektronlar şeklinde gerçekleşir. Her aktarım sırasında ADP ile P birleşerek ATP açığa çıkar. Bu birleşme ve ATP oluşma işlemi kompleks V'de ve mitokondri matriksinde gerçekleşir. Aslında enzimler iç membrana bağlı yerleşmişlerdir. Açığa çıkan elektronlar ise iç ve dış membran arasındaki boşluğa geçerler. Buradan da kompleks V'in içinden, matrikse girerler. Matrikste de ATP sentetaz enzimi sayesinde $\text{ADP} + \text{P}$ reaksiyonu ile ATP üretimini sağlarlar.

Matrikste ATP'yi oluşturacak olan ADP, hücrenin sitoplazmasından mitokondrinin matriksine bir adenin nükleotid taşıyıcısı tarafından taşınır. NADH ise mitokondri içerisine giremez. Bu nedenle elektronlarını FMN'ye vererek elektron transportuna sokar.

Normal sperm motilitesinin hücresel temeli (motilite oluşumu) sperm başına bir bağlantı parçası ile tutunmuştur. Bu parça, çekirdeğin implantasyon fossasını (boşluk) aksonem gelişimi için kalıp görevi yapan bazal plaka ile birleştirir. Baş, çekirdeğin implantasyon fossasını kaplayan bazal plakanın konkavitesine uyum göstermektedir. Baş kısmından geriye doğru uzanan dokuz adet parçalı kolon, skuyruk bölgesinin dokuz yoğun lifine (dense fibers) bağlanmıştır. Böylece bağlantı parçası yoğun dış lifler ile devamlılık gösterir. Spermin kuyruğu boyunca aksonem dokuz yoğun dış lif ile çevrilidir. Yoğun dış lifler şekil ve kesit alanı olarak

birbirinden farklıdır. Bu liflerde kasılma veya enzimatik aktivite bulunmaması bunların aktif motor eleman içermeme olasılığını artırmaktadır (Fawcett 1998).

1.15. Mitokondri Kitleri

1.15.1. Mitotracker Problemlerinin Özellikleri

Mitokondri problemleri hafif bir tiol reaktif klorometil parçası içeren hücre-geçirgen mitokondria seçici boyalardır. Klorometil gruplarının tespit sonrası mitokondria ile ilgili boya tutmaktan sorumlu olduğu görülmektedir.

Mitokondrileri etiketlemek için hücreler plazma membranından pasif difüzyonla geçen ve aktif mitokondrilerde biriken mitotracker problemlerinin submikromolar konsantrasyonlarında kolayca inkübe edilir. Mitokondrileri bir kere işaretlenen hücrelerin daha ileri işlemine izin vermek için aldehite dayalı fiksatiflerle muamele edilebilir. Mitotracker green dışında soğuk asetonla permeabilize edildikten sonra mitotracker boya problemlerinin boyama düzenlerinde bozulma görülmemiştir.

Moleküler problemler spektral karakteristikli, oksidasyon durumu ve fiksatiflerde farklılıkların olduğu yedi farklı mitotracker belirteci sunmaktadır (Molecular-Probes 2013).

1.15.2. Turuncu –Kırmızı ve Kızılötesi Floresan MitoTracker Boyaları

Turuncu floresan tetrametilrosamin, kırmızı floresan X rosamin hem de yeni türevleri MitoTracker Red 580 ve MitoTracker Deep Red 633 problemleri vardır. MitoTracker Red CMXRos, MitoTracker Red 580 ve MitoTracker Deep Red 633 problemleri yeşil floresan boya problemlerinin floresanlarında daha iyi çözünen uzun dalga boylu floresan üretirler ve bu kitler çok renkli etiketleme deneyleri için uygundur. Buna ek olarak tetrametilrosamin (MitoTracker Orange CM-H2TMRos, M-7511) ve X-rosamin (MitoTracker Red CM-H2XRos, M-7513) Mitotracker problemlerinin kimyasal olarak indirgenmiş formları da mevcuttur.

MitoTracker Orange CMTMRos and MitoTracker Red CMXRos'un aksine bu problemlerin indirgenmiş versiyonları, floresan mitokondri seçici problemlere okside oldukları ve sonra mitokondri içinde ayrıldıkları aktif solunum yapan bir hücreye girene kadar floresan özelliği göstermezler (Molecular-Probes 2013).

1.15.3. MitoTracker Green FM Probe

MitoTracker Green FM patentli (Invitrogen M-7514) nanomolar konsantrasyonla boyanan mitokondri hücreleri parlak yeşil ışığa gösterir.

MitoTracker Green FM probunun mitokondri çevresindeki lipidlerde birikir birikmez ışığa yaptığı, sulu çözeltilerde ise ışığa yapmadığı bilinmektedir. Araştırmacılar yıkama basamağı olmaksızın boyanın ilave edilmesinden hemen sonra canlı hücrelerde mitokondrileri gözlemişlerdir.

MitoTracker Orange CMTMRos and MitoTracker Red CMXRos'un aksine bazı hücre tiplerinde mitokondriyal membran potansiyeline bakılmaksızın tercihen mitokondride biriktiği görülen MitoTracker Green FM probu mitokondriyal kütle tespiti için olası bir araç olarak kullanılır.

Buna ek olarak MitoTracker Green FM boyası düşük konsantrasyonda daha parlak mitokondri seçici sinyal üretir ve yaygın olarak kullanılan rodamin 123 boyasına göre daha fotostabildir (Molecular-Probes 2013).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne Haziran 2012- Ağustos 2012 tarihleri arasında başvuran hastalardan WHO 2010 kriterlerine göre seçilen 20 oligospermi ve 20 normospermi olmak üzere toplam 40 hasta materyalinde 2012/08 no' lu etik kurul kararı ile yapıldı.

Bu hastaların 3 günlük cinsel perhiz sonrasında alınan numuneleri steril, toksik olmayan polypropilen bir kaba toplandı ve ortalama 25 dk'lık likefaksiyon süresinin ardından semen analizleri yapıldı.

Semen analizlerinde ilk önce fiziksel muayene yapılarak koku, renk, volüm ve viskozite yönünden değerlendirildi. Daha sonra mikroskopik incelemeleri yapmak için semenden alınan 10 µl örnek, derinliği 0.01 mm olan Makler sayım kamarasının (Sefi - Medical Instruments) ortasına damlatılarak üzerine grid camı kapatıldı. Nikon T1A Input AC ışık mikroskopunda toplamda 200X büyütme altında değerlendirme yapıldı.

Gridin üzerinde iki satır bir sütun veya iki sütun bir satır içerisindeki spermatozoonlar sayılarak ortalaması alındı ve böylece spermatozoa konsantrasyonu milyon/ml olarak tespit edildi.

Aynı zamanda Makler sayım kamarası kullanılarak motilite değerlendirmesi yapıldı. Motilite değerlendirmesi için 100 hücre sayıldı. Doğrusal hareket göstererek en az 3 kareyi kat eden spermatozoonların motilitesi +4, karenin dışına çıkan ancak 1-2 kare sonra geri dönme hareketi gösteren spermatozoonların motilitesi +3, bir kare içerisinde yerinde baş veya kuyruk sallama şeklinde hareket eden spermatozoonların motilitesi +2, hiç hareket göstermeyen spermatozoonların motilitesi +1 olarak değerlendirildi (Makler 1980, WHO 2010).

Viabilityyi değerlendirmek için lama bir damla likefiye olmuş semen üzerine bir damla %1 sulu Tripin mavisi boyası damlatıldı ve lamelle kapatıldı. 400X büyütmede en az 200 hücre sayıldıktan sonra boya alan spermatozoonlar nonviabl, boya almayan spermatozoonlar ise viabl olarak değerlendirildi ve viabilite oranı yüzde olarak kaydedildi.

Morfolojik değerlendirme için WHO 2010 kriterleri kullanıldı. Kontrol grubuna viabilitesi çok düşük immotil sperm ve +2 lökositli semen örneği, çalışma grubuna ise oligospermi (10-20milyon/ml) ve normospermi sınıfına girenler dahil edildi.

Mito Tracker Red 580 kit hazırlanışı;

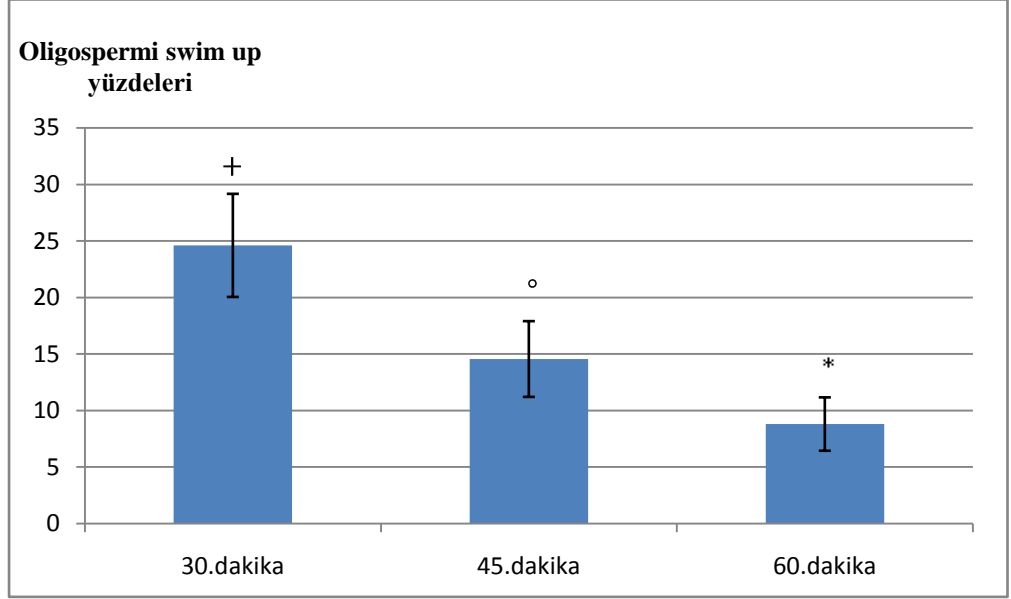
Mito Tracker Red 580 kiti canlı hücre seçenekleri için çok uygundur. Flakon açılmadan önce oda sıcaklığına ulaşabilmesi için 10-15 dakika beklendi. Stok solüsyonu hazırlamak için, yüksek kalite susuz DMSO da liyofilize mitotracker product çözündürüldü. Son konsantrasyon 1mM olacak şekilde ayarlandı (moleköl ağırlığı 724.0dan hesaplanarak). Çalışma solüsyonu 10X PBS ile 5 kat sulandırılarak hazırlandı.

Alınan semen örneği toplam hacim 3 ml olacak şekilde 1:1 oranında medyum homojenize edildi. Homojenize edilen karışımdan 1'er ml 3 ayrı ependorfa konuldu. Üzerlerine 100 µl sperm yüzdürme medyumu eklendi. Tüpler 37°C'da 30, 45, ve 60 dakika süreyle %5 karbondioksitli ortamda 45° eğimli pozisyonda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda üstteki 100 µl'lik kısım mikropipetle alınarak santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dibe çöken spermler 50 mikrolitre Mito Tracker Red 580 kiti ile boyanarak poly-lizinli lama yayıldı. 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonra florasan mikroskopunda karanlık ortam koşullarında incelendi.

Çalışmada elde edilen veriler SPSS 18.0 istatistik paket programında değerlendirildi. İlişkili örneklemler için bağımlı t testi uygulandı ve $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Oligospermi ve normospermi örneklerin karşılaştırılmasında ise bağımsız iki grup arası t testi uygulanmıştır.

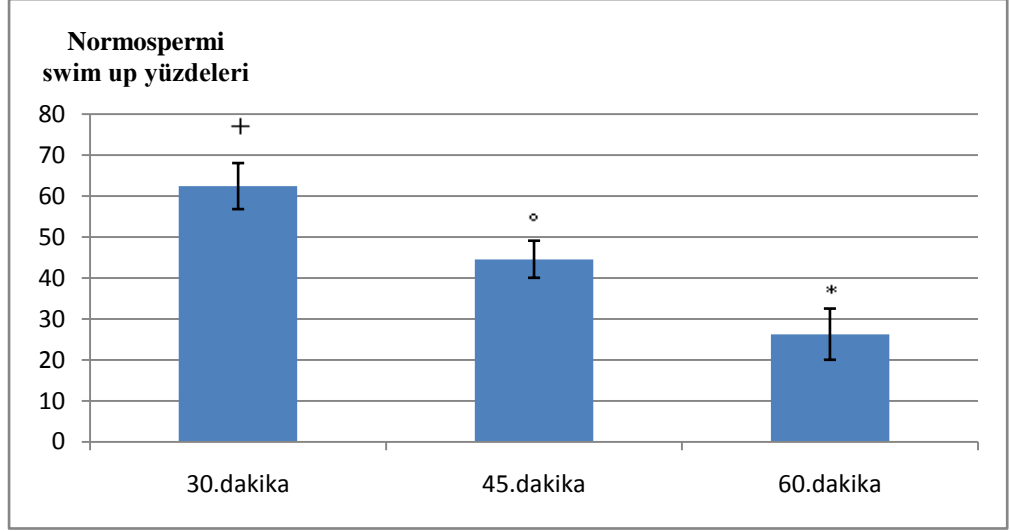
3. BULGULAR

Semen kalitesi WHO kriterlerine göre sperm sayısı 10 ile 20 milyon arası oligospermi, 20 milyon ve üzeri normospermi olarak adlandırılmaktadır. Oligospermi ve normospermi kişilerle gerçekleştirilen bu çalışmada; semen örneklerinin swim up sonrası 30., 45. ve 60. dakikalarda Mito Tracker Red 580 kiti ile sperm mitokondrileri ve sayılarındaki değişim gözlenmeye çalışıldı.



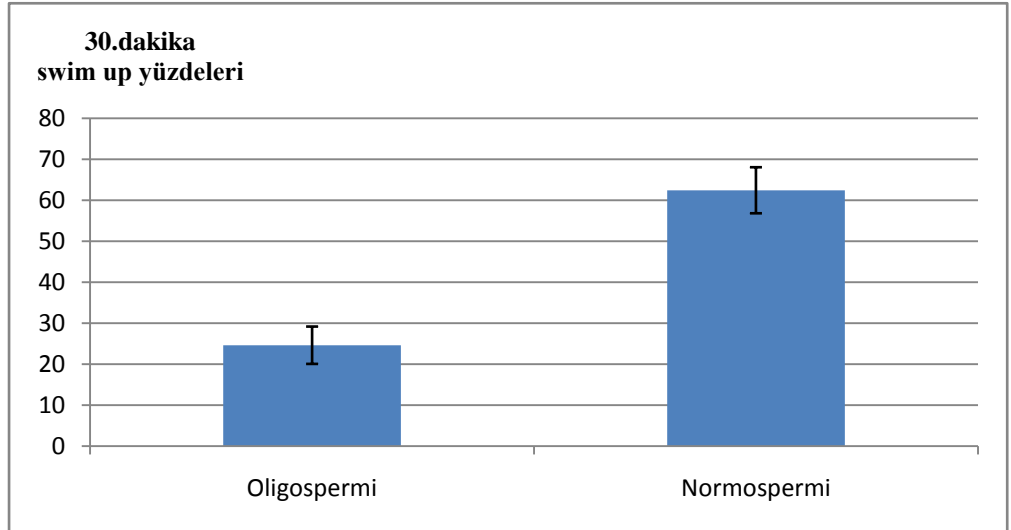
Grafik 3.1. Bağımlı t testi uygulanan oligospermi örneklerde 30., 45. ve 60. dakikalarda swim up yüzdeleri (+: 30.- 45. dakikalar arası istatistiksel anlamlılık, °: 45.- 60. dakikalar arası istatistiksel anlamlılık, *: 30.- 60. dakikalar arası istatistiksel anlamlılık).

Oligospermi örneklerin 30. - 45., 45. - 60. ve 30. - 60. dakikalardaki karşılaştırılmalarında bağımlı t testi uygulandı. Dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görüldü ($p < 0,001$).



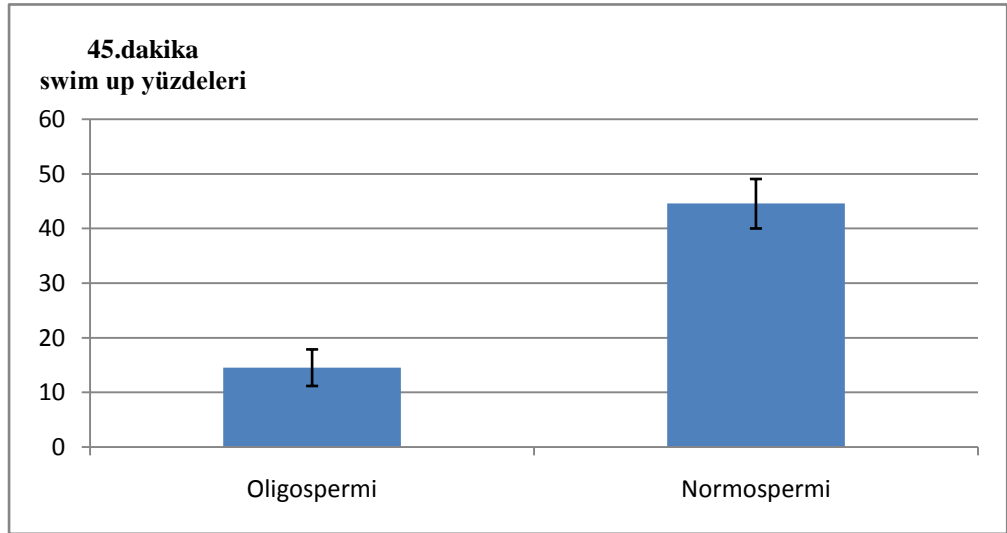
Grafik 3.2. Bağımlı t testi uygulanan normospermi örneklerde 30., 45. ve 60. dakikalarda swim up yüzdeleri (+: 30.- 45. dakikalar arası istatistiksel anlamlılık, °: 45.- 60. dakikalar arası istatistiksel anlamlılık, *: 30.- 60. dakikalar arası istatistiksel anlamlılık).

Normospermi örneklerin 30. - 45., 45. - 60. ve 30. - 60. dakikalardaki karşılaştırılmalarında bağımlı t testi uygulandı. Dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş olduğu görüldü ($p < 0,001$).



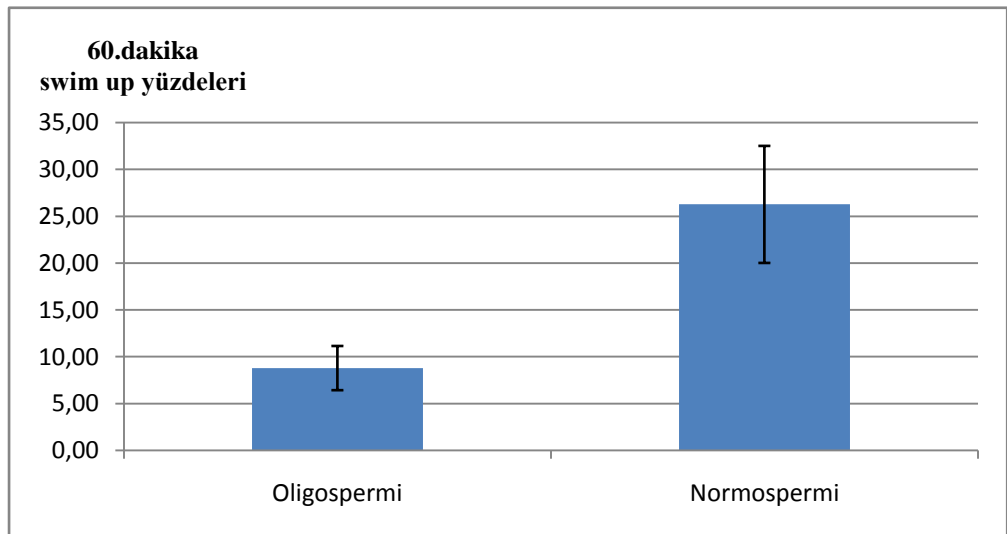
Grafik 3.3. Bağımsız t testi uygulanan oligospermi ve normospermi örneklerde 30. dakika swim up yüzdeleri.

Oligospermi ile normospermi örneklerin 30. dakikaları karşılaştırılmalarında bağımsız t testi uygulandı. Oligospermi ve normospermi örneklerin 30. dakikalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$).



Grafik 3.4. Bağımsız t testi uygulanan oligospermi ve normospermi örneklerde 45. dakika swim up yüzdeleri.

Oligospermi ile normospermi örneklerin 45. dakikaları karşılaştırılmalarında bağımsız t testi uygulandı. Oligospermi ve normospermi örneklerin 45. dakikalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$).



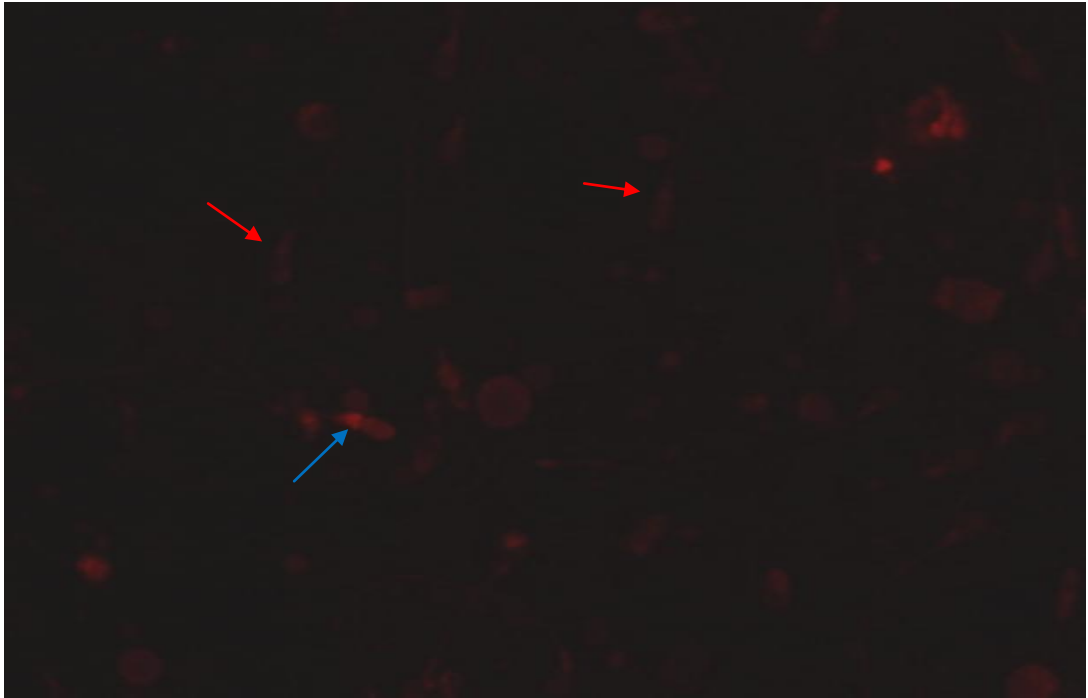
Grafik 3.5. Bağımsız t testi uygulanan oligospermi ve normospermi örneklerde 60. dakika swim up yüzdeleri.

Oligospermi ile normospermi örneklerin 60. dakikaları karşılaştırılmalarında bağımsız t testi uygulandı. Oligospermi ve normospermi örneklerin 60. dakikalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0,001$).

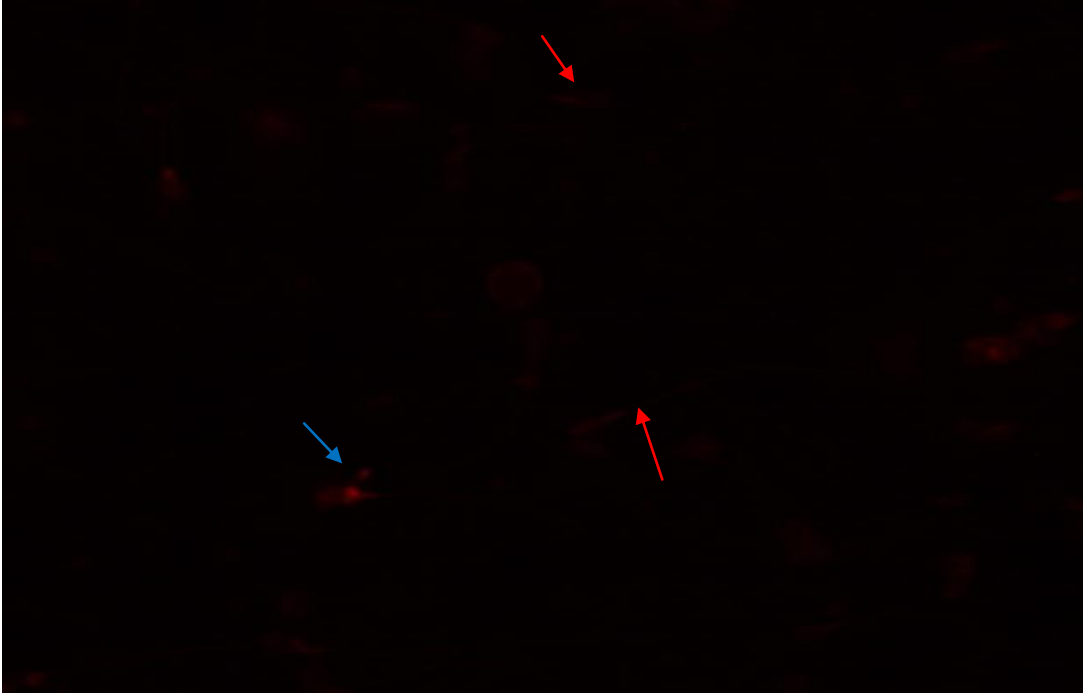
Oligospermi ve normospermi örneklerin swim up sonrası sperm sayılarında 30., 45. ve 60. dakikalarının karşılaştırılmalarında anlamlı farklılık bulundu.

Oligospermi kişilerin 30., 45. ve 60. dakikalardaki sperm mitokondrilerinin Mito Tracker Red 580 kiti ile muamelesinde bir ışımaya farkı gözlenmemiştir. Normospermi kişilerin 30., 45. ve 60. dakikalardaki sperm mitokondrilerinin Mito Tracker Red 580 kiti ile muamelesinde bir ışımaya farkı gözlenmemiştir. Ancak normospermi kişiler ile oligospermi kişilerin sperm mitokondrilerinin Mito Tracker Red 580 ile muamelesinden sonra ışımaya farkı gözlenmiştir. Swim up sonrası normospermi örneklerin sperm mitokondrilerindeki ışımaya farkı oligospermi örneklere göre daha fazla olduğu yani mitokondriyal aktivitenin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Ayrıca kontrol amacı ile uygulanan Mito Tracker Red 580 kiti, immotil semen örneği ve +2 lökositli semen örneklerinde sperm mitokondrilerinin ışımaya yapmadığı yani mitokondriyal aktivitenin olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3.1. Mito Tracker Red 580 ile boyanmış +2 lökositli semen örneğindeki spermler. Fotoğraf büyütme mikroskopisi (FBM) 66X (mavi ok boya almış sperm hücrelerini, kırmızı ok boya almamış sperm hücrelerini göstermektedir).



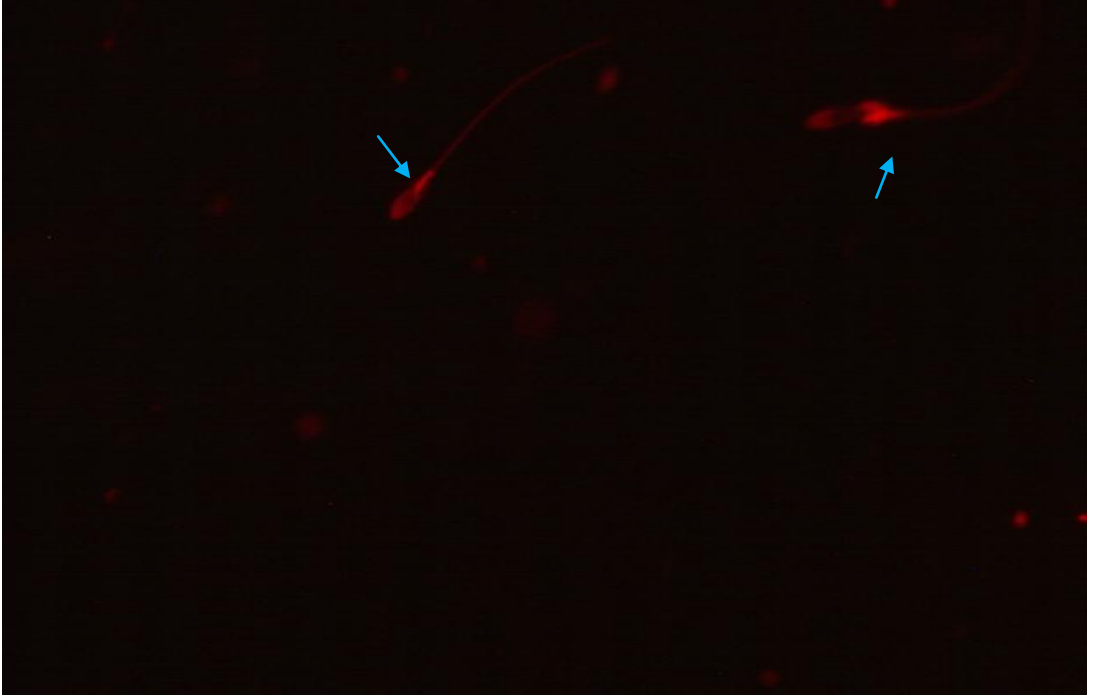
Şekil 3.2. Mito Tracker Red 580 ile boyanmış immotil semen örneği FBM 66X (mavi ok boya: almış sperm hücrelerini, kırmızı ok: boya almamış sperm hücrelerini göstermektedir).



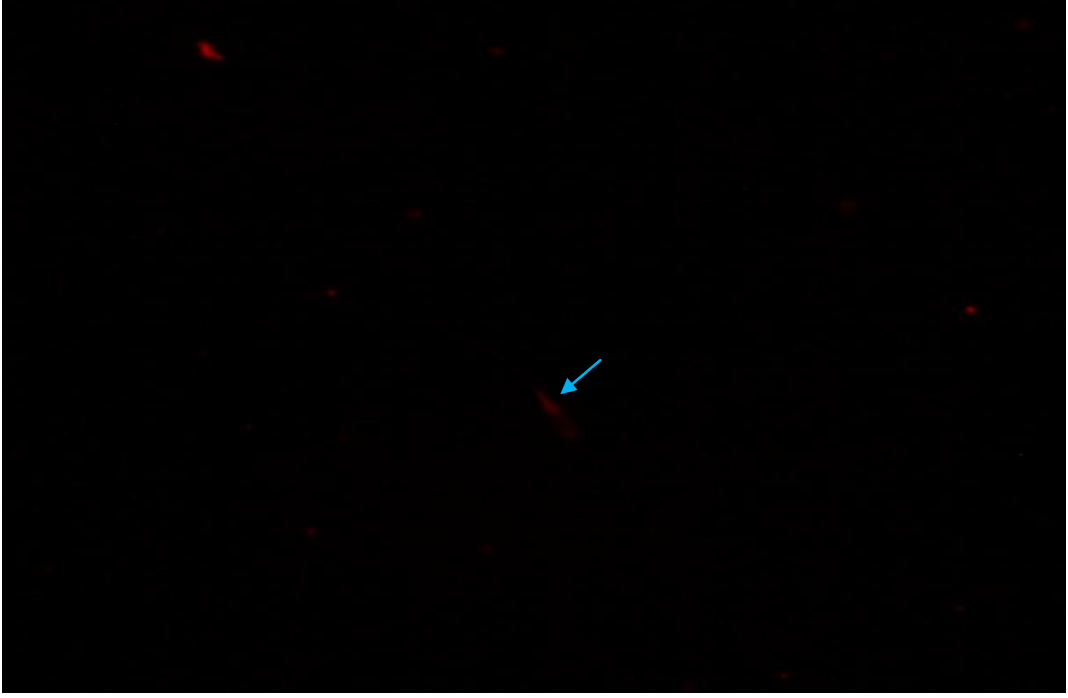
Şekil 3.3. Mito Tracker Red 580 ile boyanmış normospermi semen örneğinin swim up sonrası 30. dakikası FBM 66X (mavi ok: boya almış sperm hücrelerini göstermektedir).



Şekil 3.4. Mito Tracker Red 580 ile boyanmış normospermi semen örneğinin swim up sonrası 45. dakikası FBM 66X (mavi ok: boya almış sperm hücrelerini göstermektedir).



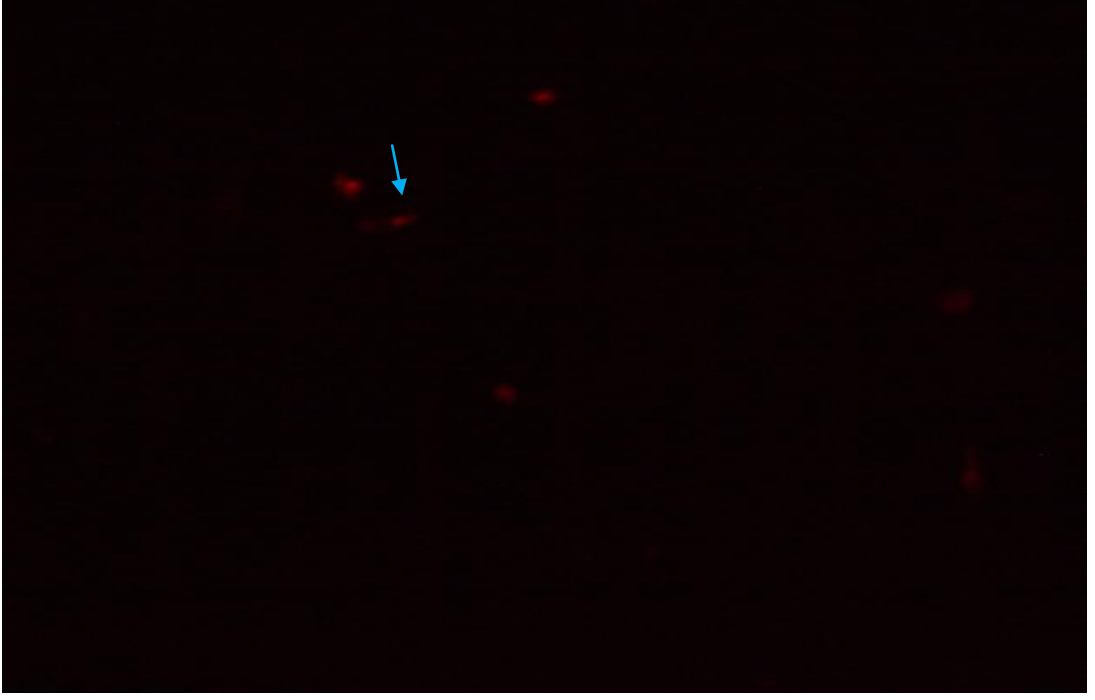
Şekil 3.5. Mito Tracker Red 580 ile boyanmış normospermi semen örneğinin swim up sonrası 60. dakikası FBM 66X (mavi ok: boya almış sperm hücrelerini göstermektedir).



Şekil 3.6. Mito Tracker Red 580 ile boyanmış oligospermi semen örneğinin swim up sonrası 30. dakikası FBM 66X (mavi ok: boya almış sperm hücrelerini göstermektedir).



Şekil 3.7. Mito Tracker Red 580 ile boyanmış oligospermi semen örneğinin swim up sonrası 45. dakikası FBM 66X (mavi ok: boya almış sperm hücrelerini göstermektedir).



Şekil 3.8. Mito Tracker Red 580 ile boyanmış oligospermi semen örneğinin swim up sonrası 60. dakikası FBM 66X (mavi ok: boya almış sperm hücrelerini göstermektedir).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, sperm motilitesinin fertilizasyonda önemli bir parametre olması ve sperm motilite süresinin uzunluğu fertilizasyon potansiyelini belirten önemli bir parametre olmasından dolayı, swim up sonrası dakikalara göre sperm mitokondri aktivitesi ve sayısının nasıl etkilendiği değerlendirildi. Ayrıca Haziran 2013 te pubmed sitesinde böyle bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Erkek infertilitesinde fertilite potansiyelini değerlendirmede semen analizinin motilite değerlendirilmesi güncelliğini korumaktadır. Ancak henüz tek başına fertilite potansiyelini gösteren bir test üzerinde uzlaşamadığı gibi yeni önerilen pahalı metotların fertilite potansiyelini yeterince göstermediğini iddia eden yayınlar bulunmaktadır (Byrd ve ark 1994).

Sperm motilitesinin servikal mukusu geçmede, buna bağlı olarak da ovuma ulaşmada ve fertilizasyonda önemli bir parametre olduğu vurgulanmıştır (Mortimer ve Temptation 1982, Mortimer 1994).

Sperm motilite süresinin uzunluğunun fertilizasyon potansiyelini belirten önemli bir gösterge olduğu ve testin 24 saatlik bir zamanda ve uygun kültür ortamında yapılması gerektiği yayınlanmıştır (Branigan 1999). Farklı kliniklerden kaynaklanan söz konusu tartışmaları en aza indirme amacı ile WHO belirli aralıklarla çıkardığı kitapçıklarda semen analizi normal parametrelerini tanımlamıştır (WHO 1999).

Günümüzde IUI diğer yardımcı üreme tekniklerine (YÜT) göre daha ucuz, daha basit ve daha az invazif olması özellikleriyle infertilite tedavisinde sıklıkla başvurulan yöntemlerden birisidir. Hasta seçim kriterleri, çeşitli kadın infertilite faktörlerinin varlığı, ovulasyon indüksiyonu metodlarının ve monitorizasyonunun farklılığı, uygulanan siklus sayısı ve sperm parametrelerindeki farklılıklar IUI başarısını etkileyen faktörler olarak dikkat çekmektedir. Özellikle erkek infertilitesi vakalarında IUI ile IVF veya intrasitoplasmik injeksiyon (ICSI) arasında tercih yapmak klinisyen açısından oldukça önemlidir. Sperm parametrelerine bakarak önceden gebelik sonuçlarını tahmin etmek oldukça zor olmakla birlikte, bu parametrelere bakarak IUI ile gebe kalamayacak veya gebelik oranı oldukça düşük grubu tespit etmek ekonomik ve hasta psikolojisi açısından kritiktir. Sperm

morfolojisi, sperm hazırlık yöntemleri, inseminasyon sırasındaki sperm sayısı ve motilitesi IUI ile gebelik oranlarını etkileyebilecek önemli parametrelerdir. Ancak literatürlere bakıldığında bu parametrelerle, elde edilen gebelik oranları arasında oldukça ciddi farklılıklar göze çarpmaktadır (Lindheim ve ark 1996). Ekiplerin sperm hazırlama yöntem ve tekniklerinde geniş farklılıklar vardır. Standartlaşmış bir uygulamadan bahsetmek çok zordur. Bu durum da sonuçlar arasında ciddi farklılıklara yol açmaktadır.

Lindheim ve arkadaşları (1996) yaptıkları çalışmada Kruger kriterlerine göre tespit edilmiş izole teratospermi vakalarında gebelik oranlarını %1 olarak, Spiessens ve arkadaşları (2003) ise %17 olarak bulmuşlardır. IUI programında sperm hazırlık işlemlerinden sonra insemine edilmesi gereken minimum sperm sayısı da farklı çalışmalarda $0,8$ ile 10×10^6 arasında değişkenlik göstermektedir (Horvath ve ark 1989, Wainer ve ark 2004).

Sperm hazırlık yöntemlerinin değerlendirildiği bir meta analizde gradient, swim-up ve yıkama-santrifugasyon yöntemlerinden herhangi birini tercih etmek için yeterli randomize kontrollü çalışma olmadığı sonucuna varmıştır. Semen parametrelerinin karşılaştırıldığı çalışmaların sonuçlarına göre gradient yönteminin önerilebileceği ancak bu konuda daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu yorumu yapılmıştır (Boomsma ve ark 2004). Ancak swim up yöntemi kliniklerde yoğun bir şekilde uygulanmakta ve oturmuş bir teknik olarak rutinde kullanılmaktadır.

Spermin çeşitli yöntemlerle inseminasyona hazır hale getirildikten sonra kullanımının gebelik başarısı üzerinde etkili olduğu bilinen bir gerçektir. Goldenberg ve arkadaşlarının (1992) çalışmasında işlenmemiş sperm ile karşılaştırıldığında işlenmiş sperm ile uygulanan IUI' da daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir. Ancak bazı literatürlerde sperm hazırlama tekniklerinin başarısı ile ilgili olarak farklı veriler de sunulmuştur.

Karşılaştırmalı bir çalışmada hareketli sperm sayısının yeterli olduğu kişilerde spermin sadece basit yıkama ile etkili biçimde hazırlanabileceği, ancak semen kalitesinin düşük olduğu olgularda kesintili gradient santrifüj yönteminin daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır (Depypere ve ark 1995). Diğer bir çalışmada

gradient yöntemiyle hazırlanan spermlerin swim-up yöntemine göre daha kaliteli olduğu rapor edilmiştir (Allamaneni ve ark 2005).

Percoll gradient ve swim up tekniğinin karşılaştırıldığı çalışmalarda ise swim up metodunun normal semeni hazırlamak için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır (Erel ve ark 2000).

Sperm hazırlığında santrifüjlü ve santrifüzsüz iki yöntemin denendiği bir çalışmada, santrifüzsüz yöntemde daha fazla motil spermatozoa ve zamandan tasarruf elde edilmiştir. Ayrıca santrifüjün oluşturduğu stresin sperm canlılığını etkilediği belirtilmiştir (Sills ve ark 2002). Tekrarlayan santrifüj yöntemlerinin spermatozoa hazırlamada kullanılmaya devam edilmesi halinde stratejilerin DNA hasarını en aza indirmeye yönelik olması gerektiği önerilmektedir (Twigg ve ark 1998).

Sperm hazırlama yöntemlerinden en sık kullanılanları yüzdürme ve gradient teknikleridir. Bu ikisini karşılaştıran çok sayıda araştırma olmasına rağmen sonuçları çok farklıdır. Smith ve arkadaşları (1995) iki teknik arasında bir fark bulamamış, Palomo ve arkadaşları (1999) ise yüzdürme tekniğinin üstün olduğunu rapor etmişlerdir. İki ayrı çalışmada ise Percoll gradient yönteminin daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır (Ding ve ark 2000, Somfai ve ark 2002). Söderlund ve Lundin (2000) Percoll yerine silika kaplı partiküller kullanarak gradient tekniğini uygulamışlardır. Bu teknikle yüzdürme tekniğini karşılaştırdıklarında bir fark bulamamışlardır. Ancak medyumlar dışında herhangi bir kimyasal ajanın kullanılmaması nedeni ile yüzdürme tekniğinin tercih edilmesi tavsiye edilmiştir.

Her iki yöntemde de kullanılan santrifüj işleminin spermler üzerine hasar verici etkisinin bilinmesi nedeni ile Garcia-Lopez ve arkadaşları (1996) santrifüjün kullanılmadığı dekstran/yüzdürme tekniği geliştirmişlerdir.

Marti ve arkadaşları (2006), dekstran/yüzdürme, Percoll gradient, sukrozla yıkama ve filtrasyon tekniklerini çok yönlü olarak karşılaştırmışlar, en kaliteli spermleri dekstran/yüzdürme tekniği ile en fazla kapasite olmuş spermleri de Percoll/gradient yöntemi ile elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Henkel ve Schill (2003), genital sistem enfeksiyonları varsa ya da hastada ROT miktarının yüksek olduğu saptanmışsa klasik yüzdürme metodunun uygulanmaması gerektiğini, bunun yerine gradient-cam yünü ya da migrasyon-sedimentasyon yöntemlerinden birinin tercih edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Hazırlama yöntemlerine sperm hareketini artıracak bazı kimyasalların eklenmesi konusunda da çalışmalar vardır. Bu amaçla kafein, pentoksifilin, 2 deoksiadenozin, bikarbonat, metal şelatörleri ve trombosit aktive edici faktör kullanılmıştır. Trombosit aktive edici faktör ilave edilmesinin ardından yapılan aşılama ile gebelik olduğu rapor edilmiştir (Henkel ve ark 2003).

Monqaut ve arkadaşları (2011), örneğin kullanılma amacına göre (IUI, IVF ya da ICSI) sperm hazırlama metodunun seçilmesini tavsiye etmektedirler. Swim-up tekniği kullanılmasından sonra seçilen spermelerde daha az vakuolizasyon saptamışlardır.

Bu ve benzeri çalışmalar; tüm yöntemlerin birbirlerine göre avantajları ve dezavantajları olduğunu göstermektedir. Kesin sınırlarla bir yöntemin uygulanmasının daha iyi olabileceği söylenememektedir. Hastaya göre ve yapılacak uygulamaya göre yöntem seçmenin, yine hastaya göre bu yöntemlerde modifikasyonlar yapmanın iyi sperm seçiminde en uygun yöntem olduğu görülmektedir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda görüldüğü gibi metodların hepsi birbirlerinden farklı özellikleri ile üstündür.

Bu çalışmada, günümüzde ICSI ve IUI da en çok kullanılan yöntem olduğu için swim up tekniği kullanılarak dakikalara göre sperm sayısı ve mitokondriası değerlendirilmeye çalışıldı.

Semenin fiziksel ve mikroskopik incelenmesi sonucu, sayı ve motilite açısından iyi olan semen örneklerinde, kişisel özellikleri nedeni ile, swim up işlemi sonrası sperm elde etme oranının çok düşük olduğu vakalarla da karşılaşılmaktadır. (Nadalini ve ark 2009, Souza ve ark 2010)

Bu çalışmada da oligospermi kişilerin semen örneklerinin mikroskopik incelenmesi sonucu motilite açısından iyi olan semen örneklerinin, swim up sonrası motil sperm miktarının daha az görüldüğü vakalara da rastlandı.

Spermiler fertilizasyonun erken döneminde flagellar hareketleri için ATP kullanırlar. Memeli sperminin orta bölgesinde bulunan mitokondri spermatogenez sırasında birtakım morfolojik değişmelere ve subsellüler reorganizasyonlara uğrar (Chen ve ark 2004, Schwartz ve 2004, Moonis ve ark 2008).

Mitokondriyal biyoenerji sperm motilitesi için gerekli olduğundan mitokondrideki kalitatif ve kantitatif değişiklikler spermatozoadaki hücresel fonksiyonları etkiler. Ejakülasyon sonrası spermiler süratli hareket için fazla enerjiye gerek duyarlar. Erkek infertilitesinde mitokondrinin yeterli biyoenerjik fonksiyonu kritik bir noktadır (Tombes ve Shapiro 1985, Chen ve ark 2004).

Bu çalışma, normospermi ve oligospermi örneklerde Mito Tracker Red 580 kiti ile swim up sonrası 30., 45. ve 60. dakikalardaki mitokondriyal aktivite ve yüzen sperm sayısını değerlendirmeye yönelik ilk çalışmadır. Çalışmadaki normospermi ve oligospermi örneklerde mitokondriyal aktiviteye bağlı olarak floresan ışımaları değerlendirildiğinde normospermi örneklerde oligospermi örneklere göre floresan ışımının daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Widlansky ve arkadaşlarının (2010) mitotracker probu kullanarak yaptıkları çalışmada, iskelet kasında diyabetik koşullar altında mitokondria kütlelerindeki azalmalar gözlenmiş ve hücre kültürü çalışmalarında da ATP üretiminin ve hücre büyümesinin azalması, mitokondride reaktif oksijen türlerinin aşırı artması sonrasında mitokondri fisyonunun arttığı gösterilmiştir.

Bu çalışmadaki oligospermi örneklerde normospermi örneklere göre ışımının daha az olması; oligospermi örneklerde reaktif oksijen türlerinin artmasıyla mitokondria fisyonunun arttığını ve mitokondriada kütle birikiminin azalmasına bağlı olarak ışımının azaldığını düşündürmektedir.

Mitokondrileri boyadığı bilinen Rodamin 123 ve tetrametilrosamin gibi floresan boyalarının, aktif mitokondriaya kolayca geçebilir olmasına rağmen hücreler yıkandıktan sonra mitokondriyal membran potansiyellerini kaybetmeleri nedeniyle

boyanma özelliklerini de kaybettikleri bildirilmiştir. Bu özellik mitokondrilerin enerji durumunu etkileyen diğer ajanlar veya aldehite dayalı fiksatiflerle muamele edilmesi gereken deneylerde kullanımı sınırlar. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için hücre fiksasyonu boyunca boyanın iyi tutulması ve mitokondriyal aktivite aracılığıyla yoğunlaşan bir seri mitokondri seçici boyalar, mitotracker problemleri (MitoTracker Orange, MitoTracker Red 580 ve MitoTracker Deep Red) geliştirilmiştir. Bu problemlerin avantajı permeabilizasyon, yıkama, elektron mikroskopisi, in situ hibridizasyon, ve immunohistokimya için işlem basamakları sırasında canlı hücrelerin floresan boyanma özelliğini korumasıdır (Molecular-Probes 2013).

Bu çalışmada, yukarıda bahsedilen özellikler göz önünde bulundurularak çalışmanın amacına en uygun olduğu düşünülen MitoTracker Red 580 kiti tercih edildi.

Jayaraman'ın yaptığı bir çalışmada mitokondriye özgü boyalar olan TMRE, H2-CMX-Ros ve MitoTracker Red 580, apoptozis sırasında insülin salgılayan beta hücre serilerinden NIT-1 ve T hücresi, lökomi hücre serisi Jurkat hücrelerindeki potansiyel mitokondri değişikliklerini ölçmek için seçilmiştir. Fiksatif uygulamadan TMRE floresan boyası ile muamele edilen Jurkat ve NIT-1 hücrelerinin mitokondrilerindeki potansiyel hassasiyetin zayıf olarak sergilendiği ancak bu hücreler formaldehit ve paraformaldehit ile muamele edildikten sonra TMRE floresan boyası ile boyanan her iki hücrede de mitokondriyal potansiyelin bağımsız olarak ortadan kalktığı, MitoTracker Red 580 formaldehit fiksasyonu ve hücre geçirgenliği sonrasında da Jurkat hücrelerinin değerlendirilebileceği bildirilmiştir (Jayaraman 2005).

YÜT' de immatür ve anormal spermatozoon, lökosit kontaminasyonu, in vitro spermatozoon hazırlama işlemlerinin (yüksek santrifüj, kriyoprezervasyon vb.) yüksek ROT üretimine neden olduğu, bununla birlikte serum, seminal plazma, spermatozoon hazırlama solüsyonlarındaki antioksidan sistemlerin düşük olmasının oksidatif strese sebep olduğu rapor edilmiştir (Sikka 2004).

Woren ve arkadaşları (1987) yaptıkları çalışmalarında tekrarlanan santrifüj nedeniyle spermatozoon yıkanması sırasında ROT seviyesinin 20-50 kat artabildiğini ve spermatozoon fonksiyonları üzerine zararlı etkisinin olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada, MitoTracker Red 580 kitinin düşük mitokondriyal aktivite durumlarında nasıl ışığa yaptığını gözlemek için kontrol grubu olarak sperm hareketini olumsuz etkilediği bilinen +2 lökositli semen örneklerine Mito Tracker Red FM kiti uygulandığında, spermün boyun kısmının boyanmadığı yani mitokondriyal aktivitenin olmadığı gözlemlendi.

Bu sonuçlar, Ferramosca ve arkadaşlarının (2012) sperm hareketindeki varyasyonlar ile oksijen tüketiminin poligrafik yöntem aracılığıyla değerlendirerek, sperm mitokondriyal solunumuyla bağlantı kurdukları bir çalışmayla paralellik göstermektedir; astenospermi numuneyi normospermi numune ile karşılaştırdıklarında, mitokondriyal solunumda önemli bir azalma tespit etmişlerdir.

Sperm hazırlama teknikleri ile amaç motil ve morfolojik olarak normal spermleri ayırmak, prostoglandin, ölü sperm ve enfeksiyöz ajanları uzaklaştırarak sperm kapasitesini ve dolayısıyla gebelik oranlarını arttırmaktır (Ghanem ve ark 2011).

Literatür taramalarında, sperm hazırlama ve IUI arasındaki intervalin gebelik oranları üzerine etkisinin incelendiği 102 hastayla yapılan tek retrospektif çalışmada gebelik oranlarının 30 dk ve 31 - 60. dakikalar arasında yapılması arasında fark olmadığı belirtilmiştir (Yavas ve Selub 2004).

Bu çalışmadaki bulgular da 30., 45. ve 60. dakikalardaki mitokondriyal aktivitede bir değişimin gözlenmemesi 30. ve 60. dakikalarda yapılan aşılamanın gebelik oranları üzerinde de değişiklik göstermeyeceğini fakat düşük sperm sayısının gebelik oranlarını etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, YÜT'de kullanılan IUI işlemleri için uygulanan swim up yönteminde 30., 45. ve 60. dakikalarda yüzen spermlerin mitokondriyal aktivitelerinde belirgin bir değişiklik olmadığı ancak 45. ve 60. dakikalara göre 30. dakikadaki yüzen sperm sayısındaki fazlalığın IUI da önemlilik arz edeceği görüşüne varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Artifisyonel inseminasyon 200 yıldan beri bilinip uygulanan bir yöntemdir. Yeterli cinsel ilişkiyi önleyen anatomik, fizyolojik ve psikolojik bozukluklar yanında yetersiz ve kalitesiz semen, kötü servikal mukus ve immünolojik infertilite gibi kısırlık nedenlerinin çözümü için bu yüzyılın ortalarından beri tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır.

Semenin uterusu direkt injeksiyonu ile seminal sıvıdaki prostoglandinler ciddi uterus kramplarına, bakteriler ise pelvik enfeksiyona neden olabileceğinden IUI, yıkanmış sperm kullanma zorunluluğu vardır (Sigman ve Howards 1998).

Üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinin hızla artan kullanımı çeşitli sperm hazırlama yöntemlerinin gelişimini sağlamıştır. Seminal plazma spermi oksidatif stresten korumaktadır. Bununla birlikte ölü veya anormal sperm, lökosit, epitel hücreleri, debris ve zararlı mikroorganizmaları da içerisinde barındırmaktadır. Bu nedenle sperm hazırlama tekniklerinin hepsinde temel amaç;

1) Seminal plazmayı spermden hızlı ve etkili bir şekilde uzaklaştırmak suretiyle, spermin fertilizasyon ve kapasitasyon yeteneklerini inhibe eden antifertilite faktörlerini ortadan kaldırmak,

2) Sperm konsantrasyonunu, motilitesini ve fertilizasyon gücünü artırmak,

3) İleri harekete sahip spermleri konsantre etmek ve bunların sayısını arttırmaktır.

IUI'da sperm hazırlanması için en çok kullanılan yöntemlerden birisi swim up yöntemidir. Swim up sonrası hangi zaman aralığında sperm sayısının ve motilitesinin en iyi olduğunun saptanması için mitokondri önem taşımaktadır. (Mortimer 2000, Yavas ve Selub 2004).

Oligospermi ve normospermi kişilerle gerçekleştirilen bu çalışmada; semen örneklerinin swim up sonrası 30., 45.ve 60. dakikalarda Mito Tracker Red 580 kiti ile sperm mitokondriyal aktiviteleri ve sayılarındaki değişimin gözlenmesi amaçlandı.

Çalışmada oligospermi ve normospermi örneklerin swim up sonrası sperm sayısındaki azalmanın 30 - 45. ve 45 - 60. ve 30 - 60. dakikalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu saptandı. Swim up sonrası oligospermi ve normospermi örneklerin 30., 45. ve 60. dakikaları arasında mitokondriyal aktivitede bir değişim olmadığı gözlemlendi. Fakat oligospermi ve normospermi örneklerin mitokondriyal aktiviteleri kıyaslandığında, normospermi örneklerin mitokondriyal aktivitelerinin daha yüksek olduğu saptandı.

Sonuç olarak elde edilen bulgular ışığında mitokondri ile hareket 30., 45. ve 60.dakikalarda tam ilişkili değildir ve mitokondri aktivitesi dışındaki mekanizmalara yönelmesi gerektiği düşünülmektedir.

6. ÖZET

İnfertilite sorunu evli çiftlerin yaklaşık %15' inde görülmektedir ve bunların yaklaşık %50' si erkek faktörlü infertilitedir.

Sperm hareketliliğinde, sperm mitokondrisi önemli rol oynamaktadır. Sperm morfolojisi, sperm hazırlık yöntemleri, inseminasyon sırasındaki sperm sayısı ve motilitesi IUI ile gebelik oranlarını etkileyebilecek önemli parametrelerdir.

Bu amaçla 20 oligospermi ve 20 normospermi numune çalışma kapsamına alınmıştır. Bu oligospermi ve normospermi numunelere swim up uygulanıp, 30.,45. ve 60. dakikalarda Mito Tracker Red 580 kiti ile sperm mitokondrileri ve sayılarındaki değişim gözlenmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada oligospermi ve normospermi örneklerin 45. ve 60. dakikalara göre 30. dakikadaki yüzen sperm sayısının daha fazla olduğu saptandı. Oligospermi ve normospermi örneklerin swim up yöntemi sonrası 30., 45. ve 60. dakikalarda yüzen spermlerin mitokondriyal aktivitelerinde belirgin bir değişiklik olmadığı saptandı.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular 30.,45. 60. dakikalara göre yüzen sperm sayılarında azalmaların olduğu ancak sperm mitokondriyal aktivitelerinde ise değişiklik olmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Sperm; swim-up yöntemi; Mitotracker Red 580.

7. SUMMARY

Infertility problem is seen in nearly 15 % of the married couples and almost 50 % of these are male factor infertility.

Sperm mitochondrion plays an important role in sperm motility. Morphology of sperm, sperm preparation techniques, number and motility of sperm during insemination are important parameters which effect the rates of pregnancies with intrauterin insemination (IUI).

For this purpose, 20 oligospermic and 20 normospermic samples were included to this study. The swim-up techniques was applied to these oligospermic and normospermic samples and changes in sperm mitochondria and number at 30 th, 45 th and 60 th minutes were observed using the Mito Tracker Red 580.

In our study, the swimming sperm numbers of oligospermic and normospermic samples were determined to be higher at minute 30, compared to minutes 45 and 60. No marked changes were detected in the mitochondrial activities of swimming sperms of oligospermic and normospermic samples at minutes 30, 45 and 60 after the swim-up.

In conclusion, our findings demonstrated that a reduction was present in the number of swimming sperms at these minutes, but no changes were seen in the mitochondrial activities of sperms.

Key words: Sperm; swim-up method; Mitotracker Red 580.

8. KAYNAKLAR

- Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of Some Biochemical Changes in Diabetic Patients. Clin Chim Acta. 2004; 346: 161-170.
- Agarwal MK. Streptozotocin: mechanisms of action: proceedings of a workshop held on 21 June 1980, Washington, DC. FEBS Lett. 1980; 120 (1):1-3.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertil Steril. 2003; 79: 829-43.
- Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. Mol Cell Endocrinol. 2006; 250: 66-9.
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. Mol Reprod Dev. 1997; 47: 468-482.
- Aksoy T. Karbonhidrat Metabolizması, Diabetes Mellitus. İstanbul. Alemdar Ofset. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları. 1988; 24-88.
- Aktaş H. Derin teratozoosperminin ICSI'de gebelik sonuçları üzerindeki etkisi. İstanbul. Süleymaniye Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi. 2007;1-37
- Allamaneni SS, Agarwal A, Rama S, Ranganathan P, Sharma RK. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. Asian J Androl. 2005; 7: 86-92.
- Andrology: Causes, symptoms, treatment for male infertility, impotence. The Male Factor Infertility. Erişim://www.andrology.com/maleinfertility.htm Erişim tarihi: 19.4.2005.
- April EW. NMS Klinik Anatomi, In: Yıldırım M.editor. Erkek Genital Sistemi. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1998 . p . 425-461.
- Avendano C, Oehninger S. DNA Fragmentation in Morphologically Normal Spermatozoa: How Much Should We be Concerned in the ICSI Era? J Androl. 2011;32(4):356-63.
- Baker HW, Burger HG, de Kretser DM, Hudson B, Rennie GC, Straffon WG. Testicular vein ligation and fertility in men with varicoceles. Br Med J. 1985; 291: 1678-1680.
- Bar-Chama N, Lamb DJ. Evaluation of sperm function. What is available in the modern andrology laboratory? Urol Clin North Am. 1994; 21: 433-46.

- Bilgiç E. Normal normospermik fertil erkeklerde spermiyumun antijenik yapısı ve bu yapının varikoselli hastalardaki değişiminin incelenmesi ışık mikroskobu düzeyinde immunositokimyasal çalışma. Ankara. Hacettepe Üniversitesi. Uzmanlık Tezi. 2007; 1-23.
- Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(3):CD004507.
- Branigan EF, Estes MA, Muller CH. Advanced semen analysis: A simple screening test to predict intrauterine insemination success. *Fertil Steril.* 1999;71(3): 547-51.
- Byrd W, Drobnis EZ, Kutteh WH, Marshburn P, Carr BR. Intrauterine insemination with frozen donor sperm: A prospective randomized trial comparing three different sperm preparation techniques. *Fertil Steril.* 1994; 62(4): 850-6.
- Carlson BM. Patten's Foundations of Embryology. Sixth edition. New York. McGraw-Hill, Inc. 1996; 135-143.
- Causes of Male Infertility Erişim://www.andrologyaustralia.org/infertility/causes.htm Erişim tarihi:20.4.2005
- Chen GF, Chan FL, Hong BF, Chan LW, Chan PS. Mitochondrial DNA mutations in chemical carcinogen-induced rat bladder and human bladder cancer. *Oncology Reports.* 2004; 12: 463-472.
- Chiou RK, Anderson JC, Wobig RK, Rosinsky DE, Matamoros AJR, Chen WS, Taylor RJ. Color doppler ultrasound criteria to diagnose varicoceles: correlation of a new scoring system with physical examination. *Urology.* 1997; 50: 953-956.
- Cockett ATK, Takihara H, Constantino MJ. The varicocele. *Fertil Steril.* 1984; 41: 5-11.
- Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon Laboratuvar Yöntemleri. Birinci baskı. Ankara. Güneş Tıp Kitabevleri. 2008; 229-255.
- Depypere H, Milingos S, Comhaire F. Intrauterine insemination in male subfertility: A comparative study of sperm preparation using a commercial Percoll kit and conventional sperm wash. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1995; 62: 225-229.
- Dere F. Anatomi Atlası ve Ders Kitabı. 3. Baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. Adana. 1999; 987-1008.
- Ding DC, Liou SM, Huang LY, Liu JY, Wu GJ. Effects of four methods of sperm preparation on motion characteristics and nitric oxide concentration in laboratory-prepared oligospermia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2000; 63: 822-827.

- Dunphy BC, Kay R, Barrat CLR. Quality during the conventional analysis of semen, an assential exercises. *Journal of Andrology*. 1989; 10: 378-85.
- Duru NK. Subfertil ve İnfertil Sperm Parametreleri. GATA Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Notları Ankara. 1998.
- Eckerling B. Sterility due to oligospermia and hypokinesis of the sperm. *Fertil Steril*. 1960;11: 475-479.
- Erel CT, Senturk LM, Irez T, Ercan L, Elter K, Colgar U, Ertungealp E. Sperm-preparation techniques for men with normal and abnormal semen analysis. A comparison. *J Reprod Med*.2000; 45: 917-22.
- Erkoçak A. Özel Histoloji. 2. Baskı. Ankara. Ankara üniversitesi tıp fakültesi yayınları. 1990;166-194.
- Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol*. 1975;44(2):394-436.
- Ferramosca A, Provenzano SP, Coppola L, Zara V. Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology*. 2012;79: 809-814.
- García-López N, Ollero M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J. A dextran swim-up procedure for the separation of highly motile and viable ram spermatozoa from seminal plasma. *Theriogenology*. 1996; 46: 141-151.
- Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook Histology*. 2. Baskı. New York. W.B. New York Saunders Company. 2001;487-508.
- Gezginç K, Çiçek MN, Çolakoğlu M, Çelik Ç, Çapar M, Akyürek C. İntrauterin inseminasyon uygulama zamanı ve sayısının gebeliğin oluşumuna etkisi. *Kadın doğum dergisi*. 2004;2(4):253-257
- Ghanem ME, Bakre NI, Emam MA, Al Boghdady LA, Helal AS, Elmetwally AG, Hassan M, Albahlol IA, Elzayat MM. The effects of timing of intrauterine insemination in relation to ovulation and the number of inseminations on cycle pregnancy rate in common infertility etiologies. *Hum Reprod*. 2011; 26(3): 576- 83.
- Goldenberg M, Rabinovici J, Bider D, Lunenfeld B, Blankstein J, Weissenberg R. Intrauterine insemination with prepared sperm vs unprepared first split ejaculates. A randomized study. *Andrologia*. 1992; 24: 135-140.
- Guyton AC, John EH. Erkekçe üreme ve hormonal fonksiyonlar. In: Çavuşoğlu H. *Tıbbi Fizyoloji*. 1. Baskı. Yüce yayınları & Nobel Tıp. 2001; 916-928.

- Günel S. Kadın Doğum Hekiminin Erkek Faktörünün Araştırılması ve Değerlendirilmesindeki Rolü Ne Olmalıdır? Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi. 2004;7(29):129-140.
- Güneş HV. Moleküler Hücre Biyolojisi. 1. Baskı. Eskişehir. Kaan kitabevi. 2003;52-63.
- Gürsoy E, Koptagel E. Embriyoloji Atlası. 1.Baskı. Esnaf ofset matbaacılık. 1997; 16-18.
- Hassa H, İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuar Uygulamaları. Eskişehir. Osmangazi Üniversitesi Basımevi. 2003; 5-23.
- Hendry WF, Sommerville IF, Hall RR, Pugh RC. Investigation and treatment of the subfertile male. Br J Urol. 1973; 45: 684-692.
- Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol. 2003; 1: 108.
- Horvath PM, Bohrer M, Shelden RM, Kemmann E. The relationship of sperm parameters to cycle fecundity in superovulated women undergoing intrauterine insemination. Fertil Steril. 1989;52(2):288-294.
- Infertility: Infertility Causes Infertility Testing and Infertility Treatment
Erişim:<http://www.advabcedfertility.com/infert.htm> Erişim tarihi: 20.4.2005
- Işık AZ, Vicdan K. İn Vitro Fertilizasyon Uygulamalarında Laboratuar. 1.Baskı. Ankara. Çağdaş Medikal. 1999;14: 1013-21.
- Jayaraman S. Flow cytometric determination of mitochondrial membrane potential changes during apoptosis of T lymphocytic and pancreatic beta cell lines: comparison of tetramethylrhodamineethyl ester (TMRE), chloromethyl-X-rosamine (H2-CMX-Ros) and MitoTracker Red 580 (MTR580). J Immunol Methods. 2005; 30;306(1-2):68-79.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Erkek üreme sistemi. In: Aytakin Y, Solakoğlu S, Ahışalı B. editors. Temel Histoloji. 8. Baskı. İstanbul. Barış Kitabevi. 1998 .p. 407-422.
- Kalaycı Ş. Histoloji. Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986; 374-377.
- Kaloğlu C, Gürsoy E. Sıçanlarda gonadların gelişimi ve testiküler farklılaşma. İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 1997; 18: 243-251.
- Kato T. The other, forgotten genome: mitochondrial DNA and mental disorders. Molecular Psychiatry. 2001;6: 625-33.
- Kayalı H, Satiroğlu G, Taşyürekli G. İnsan Embriyolojisi. 7. Baskı. İstanbul. Alfa Basım Yayım Dağıtım. 1992; 250-261.

- Kayıkçı MA, Çam HK, Akman Y, Erol A. Erkek İnfertilitesini Değerlendirmede Semen Analizinin Özellikleri ve Rolü. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002; 4(3): 35-38.
- Kent-First M, Muallem A, Shultz J. Defining regions of the Ychromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev*. 1999; 53: 27-41.
- Kierszenbaum AL. Spermatogenez. In: Demir R. editor. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Ankara, Palme Yayıncılık. 2006; 531-550.
- Kogan BA. Disorders of the ureter and ureteropelvic junction. In: Tanagho, E.A., and McAninch, J.W., Eds. *Smith's General Urology*. 12th Ed. Los Altos: Appleton-Lange; 1988 .p. 538-551.
- Koksal IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl*. 2003; 5: 95-9.
- Kumar M, Sharma MK, Saxena PS, Kumar A. Radioprotective effect of Panax ginseng on the phosphatases and lipid peroxidation level in testes of Swiss albino mice. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26: 308-12.
- Lens JW. The Spermatozoon. In: Bras M, Lens JW, Piederiet MH editors. *Ivf lab-Laboratory aspects of in vitro fertilization*. Organon pres.1996;220-240.
- Leventerler H. Fertil ve infertil semen örneklerinde enerji üretiminde görev alan bazı sitozolik ve mitokondriyal enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. Adana Çukurova Üniversitesi. Uzmalık Tezi. 2005;1-9.
- Lindheim SR, Barad DH, Zinger M, Witt B, Amin H, Cohen B, Fisch H, Barg P. Abnormal sperm morphology is highly predictive of pregnancy outcome during controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *J Assist Reprod Genet*. 1996;13 (7):569-572.
- Lund L, Nielsen KT. Varicocele testis and testicular temperature. *Br J Urol*. 1996;78: 113-115.
- Mack S, Bhattacharyya AK, Joyce C, Van der Ven H, Zaneveld LJ. Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol Reprod*. 1983;28(5):1032-42.
- Macleod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility and in 1000 case of infertile marriage. *J Urol*. 1951;66(3): 436-449.
- Mak V, Jarvi K, Buckspan M, Freeman M, Hechter S, Zini A. Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa. *Urology*. 2000;56(3):463-466.
- Makker K, Agarwal A, Sharma RK. Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction. *Indian J Exp Biol*. 2008;46(7):491-7.

- Makler A. The improve ten mikrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril.* 1980;33-337.
- Makler Counting Chamber Erişim:http://sepalreproductivedevices.com/template_products.cfm?classID=50www.zdinc.com/maklercc.htm Erişim tarihi: 21.4.2005.
- Male Factor Infertility Erişim://uuhsc.utah.edu/healthinfo/adultmen/infertil.htm Erişim tarihi: 19.4.2005.
- Mancini A, Milardi D, Conte G, Bianchi A, Balercia G, De Marinis L, Littarru GP. Coenzyme Q10: another biochemical alteration linked to infertility in varicocele patients? *Metabolism.* 2003;52:(4)402-406.
- Martí E, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. *J Androl.* 2006; 27(6):746-53.
- Midatlantic Diagnostics. Makler Chamber. Erişim tarihi 13 Ekim 2009. Erişim adresi URL: <http://www.midatlanticdiagnostics.com/products/sperm/makler.htm>.
- Molecular-Probes , Erişim: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html> Erişim tarihi: 2013.
- Moonis BS, Rakesh K, Audesh B, Rajeev K, Narmada PG, Das TK, Rima D. Mitokondrial DNA mutation in etiopathogenesis of male infertility. *Indian J Urol.* 2008;24(2):150-4
- Moore KL, Dalley AF. *Clinically Oriented Anatomy. Sixth edition. USA. Williams & Wilkins.* 1995; 278- 281, 307-313.
- Moore KL, Persaud TVN. Ürogenital Sistem. In Yıldırım M. editor. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Birinci baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi.* 2002;323-344.
- Mortimer D, Shu MA, Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. *Human Reproduction.* 1986;1: 299-303.
- Mortimer D, Temptation AA. Sperm transport in the human female reproductive tract in relation to semen analysis characteristics and time of ovulation. *J Reprod Fertil.* 1982; 64(2):401-8.
- Mortimer D. *Practical Andrology Laboratory. Oxford University Pres.* 1994;234-260.
- Mortimer D. Sperm preparation methods. *J Androl.* 2000;21(3):357-65.
- Mortimer ST. Critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reprod.* 1997;3: 403-39.

- Nadalini M, Tarozzi N, Distratis V, Scaravelli G, Borini A. Impact of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection on assisted reproduction outcome: a review. *Reprod Biomed Online*. 2009;19(3): 45-55.
- Nilsson S, Edvinsson A, Nilsson B. Improvement of semen and pregnancy rate after ligation and division of the spermatic vein: Fact or fiction? *Br J Urol*. 1979; 591- 596.
- Novotný J, Oborná I, Brezinová J, Svobodová M, Hrbác J, Fingerová H. The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2003; 147(2): 173-6.
- Özdamar S, Çetin N, Sorkun H. Genel Embriyoloji. 2. Baskı. Kayseri E.Ü.T.F Yayınları. 2002:4-15.
- Özdiler E, Aydos K. Klinik Androloji. 1.Baskı Ankara. A.Ü. Basımevi. 2000; 253-284.
- Paasch U, Grunewald S, Wuendrich K, Jope T, Glander HJ. Immunomagnetic removal of cryo-damaged human spermatozoa. *Asian J Androl*. 2005;7: 61-69.
- Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007; 65: 515-25.
- Palomo M, Izquierdo D, Mogas T, Paramio M. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. 1999; 51: 927–940.
- Playán A, Solano A, Manuel J. López-Pérez, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(9-10):1179-89.
- Rogers BJ, Bentwood BJ, Campen H. Sperm morphology assessment as an indicator of human fertilizing capacity. *J Androl*. 1983; 4: 119-125
- Ronald L. Modern concepts of male infertility. *Urol Clin Nsorth Am*. 1986; 13: 455-65.
- Ross HM, Kaye G, Pawlina W. *Histology, a text and atlas*. 4th edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. 2003; 690-96
- Ross HM, Romrell JL. *Histology: a text and atlas*. Section 21: Male reproductive system. 2nd edition. 2006; 603-625.
- Rrumbullaku L. Semen Analysis.Erişim: <http://Semen Analysis.htm> Erişim tarihi: 19.4.2005
- Sadler TW. Ürogenital sistem. In: Başaklar AC editor. *Langman's Medikal Embriyoloji*. 9. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005. p. 3-30.

- Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Baumann T, Kriegel C, Li L, Agarwal A. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10(6):740-6.
- Said TM, Agarwal A, Zborowski M, Grunewald S, Glander HJ, Paasch U. Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl*. 2008; 29(2):134-42.
- Scheffler IE. *Mitochondria*. 2. Baskı. New York. Wiley-Liss. 1999;37-55.
- Schlesinger MH, Willets IF, Nagler HM. Treatment outcomes after varicocelectomy. A critical analysis. *Urol Clin Nort Am*. 1994; 21: 517-29.
- Schwartz F, Duka A, Sun F, Cui J Manolis A, Gavras H. Mitochondrial Genome Mutations in Hypertensive Individuals. *American Journal of Hypertension*. 2004; 17: 629–635
- Semen Evaluation Erişim:<http://www.zdline.com/maklercc.htm> Erişim tarihi: 21.4.2005
- Shamsi MB, Kumar R, Bhatt A, Bamezai RN, Kumar R, Gupta NP, Das TK, Dada R. Mitochondrial DNA Mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian J Urol*. 2008; 24(2):150-4.
- Sigman M, Howards SS. Male infertility; in Campbell's Urology. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED jr, Wein AJ. editors. Seventh edition. Saunders Comp. 1998;43(2): 1287-1330.
- Sikka SC. Oxidative Stress and Role of Antioxidants in Normal and Abnormal Sperm Functions. *Front Biosci*. 1996; 1;1:78-86.
- Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem*. 2001; 8: 851-62.
- Sikka CS. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl*. 2004;25(1):5-18.
- Sills E, Wittkowski KM, Tucker MJ, Perloe M, Kaplan CR, Palermo GD. Comparison of centrifugation and noncentrifugation-based techniques for recovery of motile human sperm in assisted reproduction. *Arc Androl*. 2002; 48: 141-5.
- Smith S, Hosid S, Scott L. Use of postseparation sperm parameters to determine the method of choice for sperm preparation for assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. 1995; 63: 591-597
- Snell RS. Tıp Fakültesi Öğrencileri için Fonksiyonel Anatomi. In: Yıldırım M. editor. 2. Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri ve Yüce Yayımcılık. 1998;316-320,357-361.
- Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp A, Ivancsics J, Baranyai B, Gocza E, Kovacs A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Domest Anim*. 2002; 37: 285–290.

- Souza Setti A, Ferreira RC, Paes de Almeida Ferreira Braga D, de Cássia Sávio Figueira R, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Intracytoplasmic sperm injection outcome versus intracytoplasmic morphologically selected sperm injection outcome: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2010; 21(4):450-5.
- Söderlund B, Lundin K. The use of silane-coated silica particles for density gradient centrifugation in in-vitro fertilization. *HumanReproduction*. 2000; 15(4): 857-860.
- Spiessens C, Vanderschueren D, Meuleman C, D'Hooghe T. Isolated teratozoospermia and intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2003; 80: 1185-1189.
- Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3.Baskı. Ankara. Tıp Ve Teknik Yayıncılık Ltd. Şti. 1998;8-40.
- Tarin JJ, Brincs J, Cano A. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve hum reprod? Debate antioxidants may protect against infertility. *Hum Reprod*. 1998; 13(6):1415–24.
- Tekelioğlu M. Özel Histoloji. 1. Baskı. Ankara. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 2002;231-244.
- Tombes RM, Shapiro BM. Metabolite channeling: a phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell*.1985; 41: 325-34.
- Tur-Kaspa I, Maor Y, Levran D, Yonish M, Mashiach S, Dor J. How often should infertile men have intercourse to achieve conception? *Fertil Steril*. 1994; 62: 370-75.
- Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod*. 1998; 4: 439-45.
- Waart JV, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Human Reproduction Update*. 2001;7(5):495-500.
- Wainer R, Albert M, Dorion A, Bailly M, Bergere M, Lombroso R, Gombault M, Selva J. Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. *Hum Reprod*. 2004;19(9):2060- 2065.
- WHO: World Health Organization Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Sperm-Cervical Mucus İntraction. 4th Ed. New York: Cambridge University Press: Cambridge.1999.
- WHO Laboratuvar el kitabı. In: Günalp S. Editor. İnsan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi. 4. Baskı. Ankara: Tıp Teknik Kitabevi; 2002 .p. 76.

Widlansky ME, Wang J, Shenouda SM, HagenTM, Smith AR, Kizhakekuttu TJ, Kluge MA, Weihrauch, Gutterman DD, Vita JA. Altered Mitochondrial Membrane Potential, Mass, and Morphology in the Mononuclear Cells of Humans with Type 2 Diabetes. *Transl Res.* 2010 ; 156(1): 15-25.

Yavas Y, Selub MR. Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. *Fertil Steril.* 2004; 82(6): 1638- 47.

Yıldırım M, Kronik infertilite. *Türk Fertilite Dergisi.* 1994; 2: 15-24.

Zukerman Z, Rodriguez-Rigau LJ, Smith KD, Steinberger E. Frequency distribution of sperm counts in fertile and infertile males. *Fertil Steril.* 1977;28(12):1310-3.

9.EKLER

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARI

Toplantı Sayısı:02

Toplantı Tarihi: 02.03.2012

Karar Sayısı:2012/08:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aydan CANBİLEN' in "Oligospermi semen örneklerinde swim up öncesi ve sonrasında spermatozoa mitokondriasının mitotracker ile değerlendirilmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 15.02.2012 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aydan CANBİLEN' in sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin Fakültemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

ASLI GİBİDİR
02.03.2012

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:20

Toplantı Tarihi: 01.03.2013

Karar Sayısı:2013/370: Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Aydan CANBİLEN' in "Oligospermi semen örneklerinde swim up öncesi ve sonrasında spermatozoa mitokondriasının mitotracker ile değerlendirilmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 26.02.2013 tarihli dilekçesi görüşüldü, çalışma başlığının "Oligospermi ve normospermi semen örneklerinde swim up sonrası spermatozoa mitokondriasının mitotracker ile değerlendirilmesi" olarak değiştirilmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

ASLI GİBİDİR
01.03.2013

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı



10. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılı İstanbul doğumludur. İlköğrenimini 2002 yılında Demirgöl İlköğretim okulunda tamamladıktan sonra lise eğitimini Antalya Gazi Lisesi'nde tamamladı. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2010 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesinde Histoloji - Embriyoloji (Tıp) Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.