

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NORMAL VE OLİGOSPERMİK
ÖRNEKLERDE BELİRLİ HİSTOKİMYASAL SIVILARIN
SPERM MORFOLOJİSİ DEĞERLENDİRMESİ İÇİN OPTİMİZE
DOZLARININ FLORESAN GÖRÜNTÜLEME YOLUYLA
ARAŞTIRILMASI**

Özlem ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

“Prof Dr T. Murad AKTAN”

KONYA-2013

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NORMAL VE OLİGOSPERMİK
ÖRNEKLERDE BELİRLİ HİSTOKİMYASAL SIVILARIN
SPERM MORFOLOJİSİ DEĞERLENDİRMESİ İÇİN OPTİMİZE
DOZLARININ FLORESAN GÖRÜNTÜLEME YOLUYLA
ARAŞTIRILMASI**

Özlem ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

“Prof Dr T. Murad AKTAN”

KONYA-2013

TEZ ONAY SAYFASI

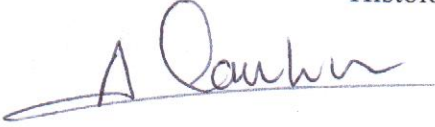
Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Özlem ŞAHİN**'in "**Normal ve Oligospermik Örneklerde Belirli Histokimyasal Sıvıların Sperm Morfolojisi Değerlendirmesi için Optimize Dozlarının Floresan Görüntüleme Yoluyla Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/ 27.06.2013

Tez Danışmanı

Prof. Dr. T. Murad AKTAN

Histoloji ve Embriyoloji A.B.D



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Aydan CANBİLEN

Histoloji ve Embriyoloji A.B.D

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. H. Hasan ESEN

Patoloji A.B.D



Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 11.07.2013 ve 12-47 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neyhan Ergene

Enstitü Müdürü

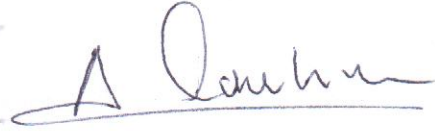


APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**Optimizing The Dosage of Specific Histochemical Solutions of Normal and Oligospermic Samples for Sperm Morphology Evaluation Under Fleurasance İmaging**” by “**Özlem ŞAHİN**” 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 / 27.06.2013

Principal Advisor
Professor T. Murad AKTAN
Department of Histology and Embryology



Examination Committee Member
Professor Aydan CANBİLEN
Department of Histology and Embryology

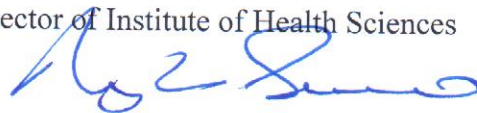
Examination Committee Member
Assistant Professor H. Hasan ESEN

Department of Pathology



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

Professor Neyhan Ergene
Director of Institute of Health Sciences

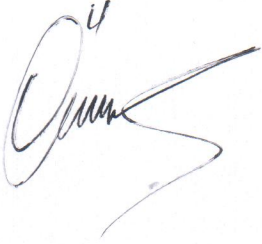


BEYANAT

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.

27.06.2013

Özlem ŞAHİN



ÖNSÖZ

Tüm yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen danışman hocam T. Murad AKTAN'a, 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 ve Prof. Dr. Aydan Canbilen, 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.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgi	1
1.2. Testis Embriyolojisi	1
1.3. Erkek Genital Sistem Anatomi Ve Histolojisi	3
1.3.1. Gonad-Testis	3
1.3.2. Seminifer Tübüller	4
1.3.3. Sertoli Hücreleri	5
1.3.4. Spermatogenik Hücreler (Germ Hücreleri).....	6
1.3.5. Spermatogonyum (Gonosit)	6
1.3.6. Spermatogenezis.....	7
1.3.6.1. Spermatositogenezis.....	7
1.3.6.2. Mayoz.....	7
1.3.6.3. Spermiogenezis	8
1.3.7. Spermin Yapısı.....	8
1.3.8. Testisin Boşaltıcı Duktusları	10
1.3.8.1. Tübüli Rekti.....	10
1.3.8.2. Rete Testis	11
1.3.8.3 Duktuli Efferentes	11
1.3.8.4 Duktus Epidididmis.....	11
1.3.8.5. Duktus Defferens.....	12
1.3.8.6. Ampulla Duktus Deferens	12
1.3.8.7. Ductus Ejakulatoryus	12
1.3.9. Yardımcı Genital Bezler	13
1.3.9.1. Prostat.....	13
1.3.9.2. Seminal Veziküller.....	13
1.3.9.3. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri)	14
1.4. Semen	14
1.4.1. Semen Analizi	15
1.4.2. İlk Makroskobik İnceleme	16
1.4.3. Semen Analizinde Sayısal Analiz	17
1.4.4. Floresan Mikroskopu.....	17
1.5. Boyalar	18
1.5.1. Hematoksilen.....	18
1.5.2. Eozin.....	18
1.5.3. Metilen Mavisi	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3. BULGULAR	22

4. TARTIŞMA	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
6. ÖZET.....	42
7. SUMMARY.....	43
8. KAYNAKLAR.....	44
9. EKLER.....	47
10. ÖZGEÇMİŞ.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR

DMSO: Dimetil sülfoksit

FMB: Foto mikroskopik büyütme

FSH: Folikül uyarıcı hormon

LH: Luteinleştirici hormon

SP : Seminal plasma

SRY: Sex determining region on Y

WHO: Dünya sağlık örgütü

μm : Mikrometre

μl : Mikrolitre

1.GİRİŞ

1.1.Genel Bilgi

Primer infertilite eşlerin istemelerine ve herhangi bir gebeliği önleyici yöntem kullanmamalarına rağmen en az 1 yıl içerisinde çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır (Spira 1986).

İnfertilite nedenleri %40 kadından, % 40 erkekten, % 20 her ikisinden kaynaklanır. İnfertil çiftlerin yaklaşık %10-20'si nedeni açıklanamayan infertiliteye sahiptir. Etyolojisi belirlenememiş tipte çiftlerin 3-5 yıl içinde fertilitte şansı %56'dır. 5 yıldan sonra bu oran %30'a düşer. İnfertilite nedenleri arasında primer infertilite sebeplerinin %55-75, sekonder infertilite sebeplerinin %25-40 olduğu bildirilmiştir (Freidman 1989). Erkek faktörüne bağlı infertilite vakalarının yaklaşık %50'sinde ya spermatozoa konsantrasyon yetersizliği ya da yokluğu göze çarpmaktadır (Anafarta ve ark 2007, Abid ve ark 2008).

İnfertilite teşhis ve tedavisinde son yıllarda büyük gelişmeler olmuş, daha önce çocuk sahibi olması imkânsız gibi görülen pek çok hastanın, yeni yöntemler yardımıyla çocuk sahibi olması mümkün olabilmektedir.

İnfertilite çözümlenmede en önemli kriterlerden biri de semen kalitesidir (Kuster ve ark 2004).

Bu çalışmada erkek fertilitésinin en önemli parametrelerinden biri olan spermatozoa morfolojisi, floresan ışığa veren ve normal de floresan özelliği bilinmeyen rutin histoloji laboratuvarında kullanılan boyalarla (değişik konsantrasyonlarda) normospermik ve oligospermik düzeyde değerlendirildi.

1.2. Testis Embriyolojisi

Kromozomal ya da genetik cinsiyet fertilizasyonda belirlenir. Sekonder oositi döleyen spermatozoanın X ya da Y cinsiyet kromozomu tarafından belirlenir. Y kromozomu farklılanmamış gonadın medullası üzerine, testis belirleyici etkiye sahiptir (Şeftalioğlu 2003, Sadler 2005). Testislerin gelişimi bir seri genin indüksiyonlarının koordinasyonları ile sağlanır (Sadler 2005, Sekido ve ark 2010).

Testis belirleyici faktörü kodlayan Y kromozomu üzerindeki SRY (Sex determining region on Y) geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları testis veya medüller kordonları

oluşturmak üzere, çoğalmaya devam edip medullanın derinliklerine doğru ilerlerler (Sekido 2010).

Ovaryumlar Y kromozom yokluğunda meydana gelir. Böylece fertilizasyonda saptanan cins kromozom kompleksi (XX ya da XY), gonadın tipini belirler. Farklanmamış gonadın testis ya da ovaryuma farklanmasını sağlar (Şeftalioğlu 2003, Sadler 2005, Sekido ve ark 2010).

Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildir. Her iki cinste de genital sistem erken dönemde birbirine benzemektedir. Gelişimin başlangıç periyodu olan bu evre seksüel gelişimin farklanmamış safhası olarak bilinir (Rey ve ark 2011, Young ve Heaty 2000).

Gonadlar, üç kaynaktan köken almaktadır. Bunlar; karın arka duvarını döşeyen mezotel (epitel), altta bulunan mezenkim (bağ dokusu) ve primordial germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri)'dir. Gonadal gelişimin ilk belirtileri mezonefrozun medial bölgesi üzerindeki sölomik epitelyumun çoğalması ve alt kısımdaki mezenkimin yoğunlaşması ile meydana gelir (Moore 2002). Gelişimin 6. haftasına kadar bu genital sırtlar içinde germ hücreleri yoktur (Shalet 2009).

Gelişimin erken evrelerinde sferikal primordiyal germ hücreleri yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler (Sadler 2005, Moore 2002).

Son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada genital sırtları işgal ederler. Eğer bu hücreler genital sırtlara ulaşamazlarsa gonadlar gelişemez. Primordiyal germ hücreleri, gonadların over veya testise farklanmasında indükleyici bir etkiye sahiptir. Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması anında, genital sırtın epiteli proliferer olur ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz kordonları oluştururlar. Embriyoda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadları birbirinden ayırt edilemez. Bu devredeki gonad farklanmamış gonad olarak bilinir (Shalet 2009).

1.3. Erkek Genital Sistem Anatomi Ve Histolojisi

Erkek genital sistem gonadlar (testis), genital boşaltım yolları (duktus efferents, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus, üretra), boşaltım yollarına açılan bezler ve kopyulasyon organı olan penisten oluşur (Junqueira ve ark 1998, Kalaycı 1986).

1.3.1.Gonad-Testis

Testisler funiculus spermaticus'a asılı durumda bulunurlar ve sağlı sollu bir çift olup karın boşluğunun dorsal duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Daha sonra ise spermatik kordonların sonunda skrotum denilen kıvrımlı bir deri kesesi içinde asılı olarak bulunurlar. Testisler yaklaşık olarak 4-5 cm uzunluğunda, 2,5cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve ortalama 15-20 g ağırlığındadır (Weiss 1988).

Testisin medialis ve lateralis olmak üzere iki yüzü vardır; anterior ve posterior olmak üzere iki kenarı, superior ve inferior olmak üzere de iki ucu vardır. Testislerin uzun eksenleri tam vertikal yönde bulunmaz. Üst ucu biraz önde ve dışta, alt ucu biraz arkada ve içte bulunur. Konveks ön kenarı da dışa-aşağı doğru, daha düzgün olan arka kenarı da biraz yukarı-içe doğru bakar. Buna göre uzun eksenini yukarıdan aşağıya, dıştan içe ve önden arkaya doğru açılı olarak bulunur (Kuran 1983).

Testisler ekzokrin endokrin salgı fonksiyonuna sahiptir. Ekzokrin salgısı canlı hücre spermiumdur. Salgılama biçimi aktif holokrindir. Endokrin salgısı özel hücrelerde (Leyding hücreleri) yapılır. Testisler skrotum içinde asılı durumdadır. Skrotum çok ince, melanin pigmenti içerdiğinden kahverengi renktedir. İnce kıllar, yağ bezleri, çok bol ter bezi bulunan, sinir sonlanmalarından zengin bir yapıya sahiptir. Testisin ısısının ayarlanmasında skrotum önemli rol oynar.

Skrotum ile testis dokusu arasında 3 tabakalı testiküler kapsül bulunur. Bunlar;

1. Tunika vaginalis: Karın bölgesinin arka duvarında gelişir, sonradan skrotuma inişi sırasında peritonu skrotum içine sürükler. Bu nedenle Tunika vaginalis 2 yapraklı (parietal ve visseral yapraklar) periton uzantısıdır. Hillus dışında testisin ön ve yan duvarlarını tamamen örter. Tunika vaginalis epiteli yapı olarak peritona benzer. Bağ dokusu üzerine yerleşmiş bir sıra yassı mezotel hücresi bulunur.

2. Tunika albuginea: En belirgin olan bu tabakadır. Tunika vaginalisin visseral yaprağını içten örter. Kalın fibro-elastik bağ dokusu arasında çok az sayıda da olsa düz kas fibrilleri bulunur.
3. Tunika vasküloza: Tunika albugineanın iç yüzünde yer alır. Damardan zengin gevşek bağ dokusudur. Tunika albugineanın testis içine olan uzantılarının (septum) iç yüzünü de örter, dolayısıyla tunika vasküloza bütün lobülleri dıştan sarar. Gelişimi sırasında processus vaginalis önünde bulunan abdominal duvarın kas tabakasından türeyen ince bir çizgili kas tabakası bulunur (Kalaycı 1986).

Tunika albuginea testisin arka yüzü boyunca kalınlaşır, mediastinum testis adını alır. Mediastinum testisten bez içine giren radier seyirli ince fibröz bölmeler (septum) organı piramit biçimli lobüllere ayırır (200-300 kadar). Yerine göre lobüllerin hacmi değişir. Orta kısımdakiler büyük ve uzundur. Lobüllerin apikal kısımları (piramidin tepesi) mediastinuma doğrudur. Ancak septumlar yer yer kesintili olmasından dolayı lobüller birbirleriyle oldukça sıkı bağlanmıştır. Her lobülde yaklaşık 1-5 kadar sayıda aşırı kıvrımlı tubüler yapılar tubuli kontorti semineri ve tubuller arasını dolduran gevşek bağ dokusu interstisyum bezin stroması bulunur (Junqueira ve ark 1998).

1.3.2.Seminifer Tübüller

Her bir seminifer tubul yaklaşık 15-25 µm çapında ve 30-70 cm uzunluktadır. Karmaşık yapıda çok katlı epitelyum ile çevrilidir. Bir testisteki tubullerin toplam uzunluğu 25000 cm civarındadır. Kıvrımlı tubuller bir şebeke oluştururlar. Bu tubuller kör uçlu veya dallara ayrılmış durumdadır. Her bir tubul sonlanırken lümen daralır ve düz tubuller veya tubuli recti adıyla bilenen kısa segmentler halinde sürer. Bu düz tubuller, rete testis denilen, epitel ile kaplanmış kanalların oluşturduğu labirente seminifer tubüllerin bağlanmasını sağlar. Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete, 10-20 ductuli efferentes ile epididymis'in baş kısmına bağlanmıştır (Junqueira 1998).

Seminifer tubüller interstisyumun mezenkimal hücrelerinden köken alan adventisyal hücre tabakasıyla çevrilmiştir. Seminifer tubuller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, iyi belirgin bir basal lamina ve kompleks bir germinal veya seminifer epitelden oluşur (Fawcett 1994).

Seminifer tubülü saran fibröz tunica propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Düz kas özellikleri gösteren ve bazal laminaya yapışık olarak bulunan bu tabaka yassılaştırmış myoid hücrelerden oluşur (Junqueira 1998).

Myoid hücreler testosteron için yüzey resptörlerine sahiptir ve son bir bulguya göre seminifer tübül epitelindeki destek hücrelerinin sentetik etkinliğini etkileyen bir protein yapmaktadır. Myoid hücre tabakası ayrıca kan-testis bariyerinin önemli bir komponentidir (Cheng ve ark 2012).

Seminifer tubüller spermatogenik ve destek hücrelerini içeren karmaşık çok katlı bir epitelle döşelidir. Sertoli hücreleri destek hücreleridir ve tek tiptir. Spermatogenik hücrelerin morfolojik olarak ayırt edilebilen çeşitli tipleri vardır: spermatogonya, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoa. Bunlar ontogenik olarak farklı hücre tipleri değildir, fakat üreme hücresi farklılaşmasındaki değişik evrelerin temsilcisidirler (Fawcett 1994).

Bazal lamina üzerine oturmuş seminifer epitelde 2 grup hücre vardır:

- 1- Taşıyıcı Elemanlar: Sertoli hücreleri
- 2- Spermatogenik Hücreler: Çoğalıp farklılaşarak spermiyumu oluşturan hücreler serisidir. Gonadta bulunduğundan gonosit terimi de kullanılır. (Fawcett 1994, Kalaycı 1986).

1.3.3.Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış pramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunurlar, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tubulün lümenine bakar. Sertoli hücrelerinin çok sayıda lateral uzantıları spermatogenik serideki hücreleri çevrelediği için, ışık mikroskobunda bu hücrenin sınırları zayıf olarak görülmektedir. Elektron mikroskobunda yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazmik retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondria ile lizozomlar içerdiği gösterilmiştir. Belirgin bir nukleolus, az sayıda heterokromatin ve genellikle üçgen biçiminde olan uzamış nukleusta çok sayıda kıvrılmalar görülür (Heyn ve ark 2001).

Sertoli Hücrelerinin Fonksiyonları

1. Gelişen spermiyumları destekler, besler ve korur.
2. Spermiyogenezde dökülen spermatid sitoplazmasını fagosit ederek ortadan kaldırırlar.
3. Sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgılar.
4. Androjen bağlayan protein ve inhibin salgılar.

5. Anti-Müllerian hormon salgırlarlar. Erkek fetusta Müller kanalının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir.
6. Kan-testis bariyerini oluşturur. Komşu Sertoli hücresleri birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleri ile bağlanarak büyük moleküllerin geçişini engeller. Bu yolla germ hücreleri kan kaynaklı yabancı ajanların hasarlayıcı etkisinden korunur (Eşrefoğlu 2004, Noyan 1993).

Kan-Testis Bariyeri: Testis kapilerleri pencerelidir. Fizyolojik ve morfolojik çalışmalar Sertoli_Sertoli bağlantılı komplekslerinin bir kan_doku bariyeri oluşturduğunu göstermiştir. Kan-doku bariyerleri, beyin, testis, timus gibi çok az bazı dokularda bulunmaktadır. Burada ki amaç immun sistemin etkisinden, yabancı hücre olarak kabul edilen spermi korumaktır (Seçkin ve ark 2008).

1.3.4. Spermatogenik Hücreler (Germ Hücreleri)

Bazal lamina ile lümen arasında bulunan 4-8 katlı hücre serisidir. Bu hücreler birçok kez çoğalıp, farklılaşarak spermiyumları oluşturur. En genç ve bazal lamina üzerine oturan oldukça küçük hücreler spermatogonyumlardır (Kalaycı 1986). Sertoli hücreleri arasında bulunan zonula okludens altında yer alırlar ve bu sebeple de kan testis bariyerinin dışında yer alırlar. Çoğalan spermatogonyumlar baskı yaparak yeni gelişen hücreleri lümeneye doğru yükseltir. Sonuç olarak, lümeneye en yakın olanlar spermiyumları yaparlar (Weiss 1988). Hemen her klasik embriyoloji kitabında aynı gelişim ve ilerleme sırası gözetilerek konu açıklanır, bu geleneğe bağlı olarak açıklamalar yapılmıştır.

1.3.5. Spermatogonyum (Gonosit)

Spermatogonyumlar bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki tıkcayıcı bağlantıların altında yer alırlar ve bu nedenle kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar (Kierszenbaum 2006). Spermatogonyumlar spermatogonyal kök hücreden köken alırlar ve pubertede başlayan başarılı mitotik hücre bölünmeleri geçirirler. Spermatogonyum kendisinden gelişen hücre tipleri ile kıyaslandığında daha küçüktür. Çekirdeğin büyüklüğu, biçimi, kromatin dağılımı ve histokimyasal özelliklerine göre 2 tipe ayrılır:

1- Tip A (Stem cell): Çekirdeği ovaldir. Mitozla çoğalınca yarısı tip A olarak kalır, diğer yarısı büyüyerek tip B'ye dönüşür. Tip A spermatogonyumların kaynağı durumundadır.

2- Tip B: Ana spermatogonyumlardan daha büyük hücrelerdir. Çekirdeği yuvarlak şekildedir ve koyu renkte boyanır. Tip B'nin mitozla çoğalmasıyla oluşan hücrelerin hepsi farklılaşarak primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatosit bazal laminadan uzaklaşır ve hacmi artar (Kalaycı 1986).

1.3.6. Spermatogenezis

Spermatogenezis bir gelişme olgusudur ve farklanmamış ilkel erkek cins hücrelerinin (spermatogonyumlar), ileri derecede farklanmış spermiumlara dönüşmesidir. Spermatogenezis üç safhaya bölünebilir. Spermatositogenezis, mayoz, spermiogenezis (Şeftalioğlu 2003).

1.3.6.1. Spermatositogenezis

Puberteden önce, seminifer tubullerin epiteli, az sayıda Sertoli hücresi barındırır. Pubertede, hipotalamustan salgılanan gonodotropin salgılayıcı hormonun etkisi ile hipofiz ön lobundan, gonodotropik hormonlar salgılanmaya başlar. Bu hormonlar folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH)'dur. Bu hormonların stimülasyonu ile en genç olan spermatogonium Tip A'lar, bir dizi mitoz bölünme geçirerek çoğalırlar ve spermatogonyum A'ları meydana getirirler. Bunların bir kısmı, ileri yaşlara kadar devam eden spermatogeneziste, kaynak ya da ana (stem) hücreler olarak işlev görürler. Diğerleri ise ara (intermediate) spermatogonyumları oluşturduktan sonra spermatogonyum B'lere farklılanırlar. Primer spermatositler spermatogonyum B'lerin mitoz bölünmeleri ile meydana gelir ve primer spermatositler, spermatogenezin, mayoz safhası başlangıcını oluştururlar (Weiss 1988).

1.3.6.2. Mayoz

Primer spermatositleri Tip B spermatogonialar oluşturur. Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler ilk mayotik bölünmenin profaz basamağına girerler. Bu arada primer spermatositin 46 (44+XY) kromozomu vardır ve DNA'sı da 4 N'dir. Bu profazda hücreler; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinesis safhasına ulaşırlar ve burada kromozomlar ayrılırlar. Mayoz safhasında, genlerdeki 'crossing over' oluşur. Daha sonra hücre metafaz safhasına girer. Kromozomlar anafazı takip ederek kutuplara doğru giderler (Jungueria ve ark 1998).

Profaz evresinden sonra, kardeş kromatid çiftleri metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçer ve sekonder spermatositlere dağılırlar. İkinci mayoz bölünme sırasında, profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evreleriyle kardeş kromatidler spermatidlere dağılır (Kierszenbaum 2006).

1.3.6.3 Spermiogenezis

Sekonder spermatositlerin bölünmesi ile spermatidler oluşur. Bunlar, diğer hücrelerden küçük boyutlu, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan çekirdekleri ve seminifer tubulde lümen yakınında yerleşimleri ile tanınırlar. Spermatidler spermiogenezis denilen ve akrozomun şekillenmesini içeren karmaşık bir farklılaşma süreci geçirirler, bunun yanı sıra spermiogenezisde nukleusun yoğunlaştığı ve uzadığı, filagellum oluştuğu ve sitoplazmanın çoğunun kaybolduğu görülür. Sonuçta seminifer tubulun lümenine salgılanan olgun spermatozoon meydana gelir (Jungueria ve ark 1998).

Üç ana olay spermiogenesisi karakterize eder:

1. Flagellumun gelişmesi
2. Akrozom gelişmesi
3. Nuklear yoğunlaşma (Kierszenbaum 2006).

1.3.7. Spermin yapısı

Olgun sperm hareketli olup baş ve kuyruktan oluşur. Baş, babadan oğula geçen tüm genetik özellikleri taşır. Kuyruk, spermiuma hareketlilik sağlar. Bir bağlantı parçası ile baş kuyruğa bağlanır (Kierszenbaum 2006).

Kuyruk üç parçaya bölünmüştür: Orta parça, esas parça, ve son parça. Spermin baş ve kuyruk kısımları bir plazma membranı ile sarılıdır.

Baş: İnsan sperm başı, önden oval görünümlü yandan bakıldığında ise armut biçimindedir. Uç kısma doğru gidildikçe incilir (Şeftalioğlu 2003). Baş akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek yassılaştırmış yoğun bir yapıdır. Çekirdeğin anterior (ön) yarısını akrozom örter ve lizozomlarda sıkça bulunan hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluronidaz, ve yanı sıra nöraminidaz) içerir. Genellikle akrozom, özel bir tip lizozom olarak kabul edilir.

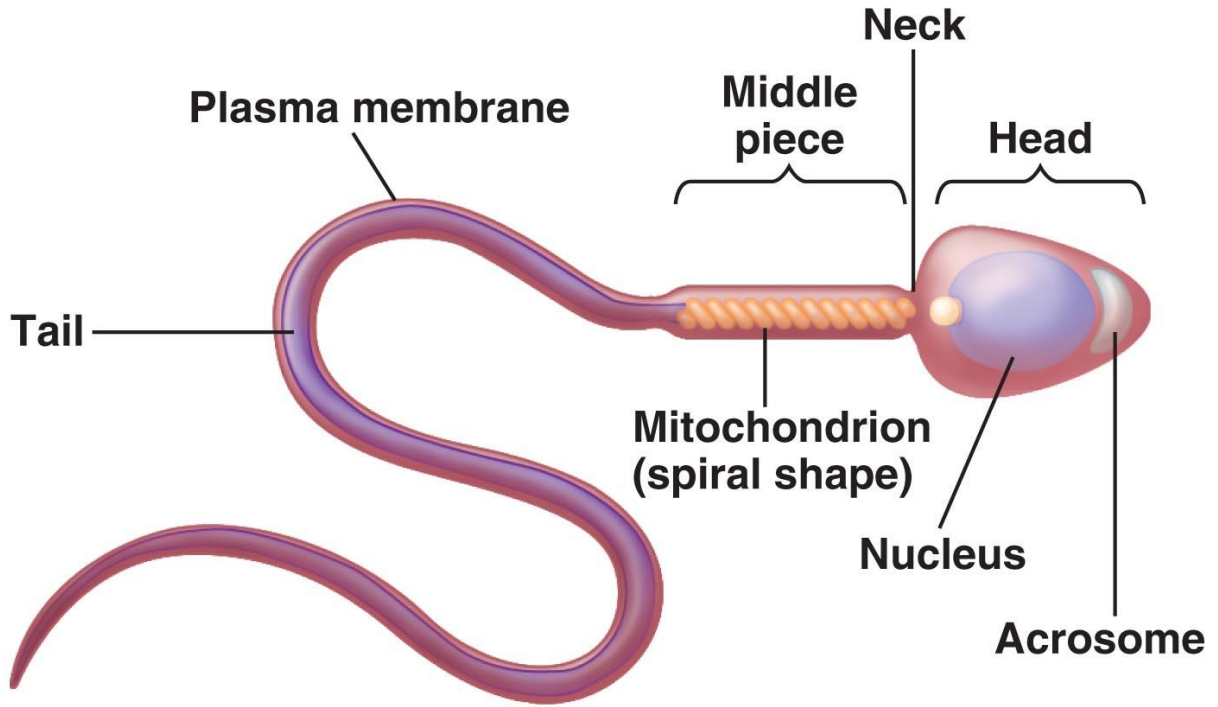
Akrozomal enzimler, ovositi saran korona radyata ve zona pellusida'yı sperm girişini kolaylaştırmak için döllenme anında salınır.

Bağlantı parçası, bir çift sentriyolün bulunduğu dar bir parçadır. Distal sentriyol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonem'e kaynaklık yapar. Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz uzamına seyreden kolonlardan oluşur. Orta parçanın alt sınırı mitokondriyel sarmalın annulus'ta sonlanmasıyla belirgindir.

Esas parça, kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lifçe sarılı (orta parçadaki dokuz liften farklı) merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur.

Fibröz kılıf, eş uzaklıktaki uzamına kolonlardan çıkan dairesel iskelet tarafından oluşturulur. Hem dış yoğun lifler, hem de fibröz kılıf, sperm in öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan proteinler olan keratin içerir.

Son parça, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı, sadece aksonem bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (Kierszenbaum 2006).

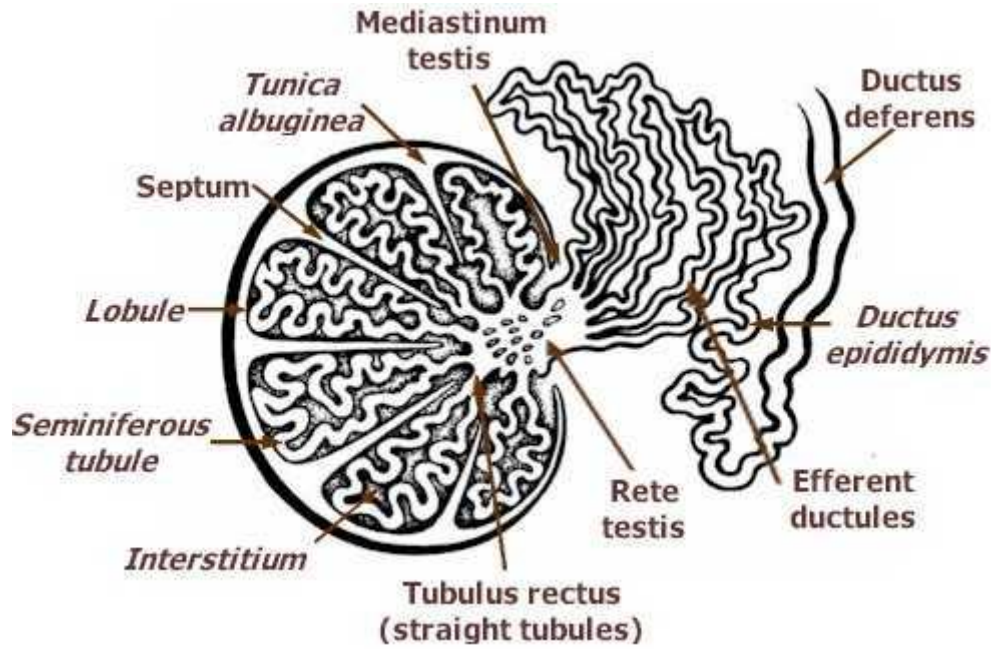


Copyright © 2009 Pearson Education, Inc.

Şekil 1.1. Olgun sperm yapısı (What is the structure of a mature human sperm cell? 2013)

1.3.8. Testisin Boşaltıcı Duktusları

- 1- Tübüli rekti
- 2- Rete testis
- 3- Duktuli efferentes
- 4- Duktus epididymis
- 5- Duktus deferens
- 6- Ampulla duktus deferens
- 7- Duktus ejakulatoryus (Kalaycı 1986, Kuran 1983).



Şekil 1.2. Testis Boşaltıcı Duktusları (Histoloji 2013)

1.3.8.1. Tübüli Rekti

Her lobülün tepesinde seminifer tübüller düz seyirli tübüli rektilele devam eder. Seminifer tübül epiteli tübüli rektilele doğru biraz değişiklik göstermeye başlar; spermatogenik hücreler giderek ortadan kaybolur, sertoli hücreleri ise sayı olarak artar. Sonunda tübüli rektilede

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 (Junqueira ve ark 1998, Kalaycı 1986).

1.3.8.2. Rete Testis

Tunika albuginea'nın kalınlaşmasıyla oluşmuş, damardan çok zengin olan mediastinum içine yerleşmiş, birbirleriyle anastomozlaşan tübüler yapılardır. Böylece tübüs ağı oluştuğundan rete (ağ) terimi uygundur (Junqueira ve ark1998, Kalaycı 1986). Tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitel ile dōşeli düzensiz, anastomozlaşan kanallardır. Epitel hücreleri tek bir apikal silyum ve birkaç mikrovillus içerir. Epitelin yaslandığı bazal membran mediastinumun bol kan damarlı bağ dokusu ile sarılıdır (Eşrefoğlu 2004). Spermiumlar tübüli rekti ve rete testisten hızla geçtiği için, kesitlerde lümende spermiuma çok nadiren rastlanır (Kalaycı 1986).

1.3.8.3. Duktuli Efferentes

Rete testisi epididimise bağlayan kanallardır (Eşrefoğlu 2004). Rete testisten yaklaşık 15-25 adet ductuli efferents çıkar (Junqueira ve ark 1998). Kanalları dōşeyen yalancı çok katlı prizmatik epitel, prizmatik ve kübik hücrelerden oluşur. Epitelyum yüzeyi girintili çıkıntılı görülür çünkü hücre boyları eşit değildir. Uzun boylu prizmatik hücreler genellikle silyalıyken kısa boylu hücreler silya içermez. Bu hücreler çok sayıda mikrovillus, pinositoz vezikülü, membranla sınırlı cisimcik içerir ve endositoz yaparlar. Seminifer tübülden salgılanan sıvının büyük bir bölümü duktuli efferentesin bu hücreleri tarafından reabsorbe edilir. Epitelde lenfositlere de rastlanır. Elastik lif içeren, ince bir sirküler kas tabakası kanalı çepeçevre kuşatır. Silyaların hareketi ve kas tabakası sayesinde spermier bu kanallar boyunca ilerlerler (Eşrefoğlu 2004, Noyan 1993).

1.3.8.4. Duktus Epidididmis

Testisin arka yüzü boyunca uzanan, son derece kıvrımlı, uzun bir kanaldır (Eşrefoğlu 2004). Epididimisi oluşturan kanalın toplam uzunluğu 600 cm'dir (Gökmen 2003). Bu uzun kanal çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları ile epididimisin, kuyruk ve gövdesini oluşturur. Tüpün lümeni silindirik hücrelerden oluşmuş yalancı çok katlı silindirik epitel ve yuvarlak bazal hücreler ile kaplıdır. Düz kas hücreleri ile desteklenmiş bazal lamina, hücreleri

sarmaktadır. Bu düz kasların peristaltik kasılmaları spermin kanallar boyunca ilerlemesine yardım eder, kanallar ve kan kapillerlerinden zengin olan bağ dokusu tarafından çevrelenmişlerdir. Yüzeyleri ise uzun, dallanmış ve sterosilia adı verilen düzensiz mikrovilluslar ile kaplanmıştır. Tüm bu hücreler glycerophosphocholine denilen ve spermatozoanın fertilizasyon için hazırladığı süreci yani capacitation'u inhibe eden bir madde salgılar. Duktus epididimis epitel spermatozogenesis süresince temizlenen artık cisimciklerin sindirilmesine ve ortadan kaldırılmasına katılır (Jungueria ve ark 1998).

1.3.8.5. Duktus Deferens

Duktus epididimis'in genişlemiş olarak devam eden bölümüdür. Tipik olarak dar bir lümeni ve kalın bir kas tabakası vardır. 25- 30 cm uzunluğunda çapı başlangıcında 2 mm, sonlanma yerine yakın 4 mm'dir. Organın lümen çapı ise 0.5 mm'dir. Sterosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile kaplıdır. Mukozası kıvrımlı olup lamina propriası elastik liflerden zengindir. Kalın kas tabakası içte ve dışta longitudinal ortada ise sirkülerdir. Mukoza tabakası ampulla boyunca ejakülatuar duktusun içine kadar devam ederken kas tabakası ampulladan sonra bitmektedir (Gökmen 2003, Junqueira ve ark 1998). Başlangıcından itibaren funikulus spermaticus içindedir (Ozan 2004). Ampulla duktus deferentiste, ejakülasyondan önce bir miktar spermatozoa depolandığı bilinmektedir (Kuran 1983).

1.3.8.6. 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 ağımsı 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).

1.3.8.7. Duktus Ejakulatoryus

Basit prizmatik veya yalancı çok katlı prizmatik epitelium ile döşelidir. Duvarında kas tabakası bulunmaz, epitel fibröz bağ dokusu sarar (Eşrefoğlu 2004).

Ampulla duktus deferentes'in daralmış olan ucu prostata'nın tabanına doğru vesikula seminalis'in kanalı ile birleşerek duktus ejakulatoryus'u oluşturur. Prostatın lobus medius arka sınırı hizasında aşağı ve öne doğru uzanıp, üretra'nın pars prostatikasında kollikulus seminalis'in her iki yanına açılır. Duktus ejakulatoryus yaklaşık 2 cm uzunluğundadır. Dış tabakasında bulunan kas lifleri duktus ejakulatoryus'u sıkıştırarak sürekli kapalı tutarlar. Ejakülasyonun boşalması durumunda kasların tonusunun azalması ile duktus ejakulatoryus açılır. Duktus defferens'in çevresindeki kasların kasılmasıyla spermatozoa büyük bir hızla açılmış bulunan duktus ejakulatoryus'dan geçerek üretra'ya atılırlar (Şeftalioğlu 2003, Gökmen 2003).

1.3.9. Yardımcı Genital Bezler

Bu bezler prostat bezi, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerdir (Jungueria ve ark 1998, Kalaycı 1986).

1.3.9.1. Prostat

Asit fosfataz, fibrinolizin ve sitrik asit sentezleyen prostat bezi yardımcı bezlerden en büyük olanıdır . 30-50 adet dallanmış tübüloalveoler bezin oluşturduğu bir topluluktur; bu bezlerin kanalları prostatik üretraya boşalır. Prostat prostatik sıvıyı üretir ve bunun iç kısmında biriktirir. Bu sıvı ejakülasyon sırasında itme gücü için gereklidir. Prostat düz kas liflerinden zengin, fibroelastik bağ dokusundan bir kapsül ile kuşatılmıştır. Kapsülden ayrılan septumlar bezin içine doğru uzanarak lobları oluştururlar. Bezleri saran stroma da kapsülü gibi çok miktarda düz kas lifi içeren fibroelastik bağ dokusudur. Prostaltik bezlerin lümeninde sıklıkla 0.2-2 mm çapında glikoprotein yapısında küçük küresel cisimcikler bulunur. Bunlar prostat taşları ya da korpora amilasea olarak isimlendirilir (Weiss 1988, Noyan 1993, Eşrefoğlu 2004).

1.3.9.2. Seminal Veziküller

Oldukça kıvrımlı seyreden, yaklaşık uzunlukları 15 cm'ye ulaşan bir çift tübüler bezdir (Eşrefoğlu 2004). Kıvrımlı yapıya sahip olan bu tübüloalveolar bezlerin iç kısmında lümenine doğru uzanan salgı epitelinin döşediği bağ dokusu girinti ve çıkıntıları bulunur. Çok incelikli katlar oluşturan mukoza dallı ve birbirine bağlantılar oluşturan petekli bir görünüme sahiptir (Ovale ve Nahımeş 2009). Mukoza kıvrımları salgı granüllerinden zengin, yalancı çok katlı silindirik epitel ile kaplanmıştır (Junqueira ve ark 1998). Prizmatik hücreler protein

sentezleyen hücre özelliği gösterir. Lamina propriya elastik liflerden zengindir (Eşrefoğlu 2004). Seminal veziküllerin visköz sarımsı sekresyonu, spermatozoayı aktivite eden fruktoz, sitrat, inositol, prostaglandinler ve çeşitli proteinlerden zengindir. Bu bezler tarafından üretilen erkek üreme sistemi ile ilgili karbonhidratlar seminal sıvıya salgılanırlar ve sperm motilitesi için enerji kaynağı oluştururlar. Monosakkarid fruktoz bu karbonhidratlar içerisinde en fazla bulunanıdır. İnsan ejakulatının %70'i seminal veziküllerden köken alır. Epitel hücrelerin boyutları ve salgılamadaki aktivitelerinin dereceleri testosterona bağlıdır (Junqueira ve ark 1998).

1.3.9.3. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri)

Çapları 3-5 mm olan ve üretranın membranöz kısmına proksimal olarak yerleşip buraya açılan bezlerdir (Junqueira ve ark 1998). Dış yüzünde iskelet kasları içeren bağ dokusu kapsülü ile kuşatılmışlardır. Bu kapsülden ayrılan septumlar organı lobüllere ayırır. Septumların bağ dokusu elastik liflerden, düz kas ve çizgili kas liflerinden zengindir. Sekretuar bölümü mukus salgılayan tek katlı kübik veya prizmatik epitel ile döşelidir (Eşrefoğlu 2004). Sekresyonu, kaydırıcı olarak görev yapan mukustur (Noyan 1993, Junqueira ve ark 1998). Bu ürün galaktoz, galaktozamin ve siyalik asitten zengindir (Eşrefoğlu 2004).

Sperm hücrelerinin hareketliliğinin sağlıklı olması bu sekresyonların biyokimyasal özelliklerinin yanısıra ozmotik özelliklerinin de sağlanmasına bağlıdır bu da küçük bezlerin salgısına bağlıdır (Rossato ve ark 2002).

1.4. Semen

Ejakülasyon ile dışarı atılan; spermatozoa, epididimis, seminal vesikül, prostat ve bulboüretal bezlerin salgılarından oluşan grimsi opak bir sıvıdır (vesikula seminalis %60, prostat %30, bulboüretal bez %10).

Ayrıca yapısında prostaglandinler, epitel döküntüleri, bağ dokusu gezgin hücreleri, kökeni bilinmeyen yuvarlak hiyalin cisimler, prostat taşları, lipitler, proteinler ve pigment granülleri bulunur.

Semenin sadece %1'ini spermatozoa oluşturur. Geriye kalanlar erkek genital bezlerinden gelen sıvılardır. Bu sıvılar spermatozoayı beslemek için früktoz, spermatozoayı hareketsiz kılan vajina ve üretra ortamındaki asiditeyi nötralize eden alkalın salgı,

spermatozoayı hareketli kılan tamponlayıcı tuzlar ve fosfolipitleri içerir. Semen %90'ı sudur. Ancak pek çok madde de içerir. Bunlardan en göze çarpanı enerji kaynağı olan früktozdur. Ayrıca vitamin C ve inositol gibi vitaminler ile Ca, Zn, Mg, Cu, sülfür gibi iz elementleri de içerir. Vücutta en yüksek prostaglandin konsantrasyonu semendedir. Ereksiyon sırasında bulboüretal bezlerin salgıları ile üretra kayganlaşır. Ejakülasyon başlangıcında asit fosfataz ve sitrik asitten zengin prostat sıvısı, bunun arkasından duktus deferens ve duktus epididimisin distal kısmındaki kasların kontraksiyon gücü ile spermiumlar salınır. En son olarak, früktoz ve prostaglandinlerden zengin, koyu kıvamlı seminal vezikül salgısı ejakülate katılır. (Noyan 1993, Kalaycı 1986, Gökmen 2003, Şeftalioğlu 2003, WHO 2010).

1.4.1. Semen Analizi

Semen analizi yani spermiyogram; spermatozoa konsantrasyonunu, sayısını, şeklini, hareketini, canlılığını değerlendirmeye yönelik bir test olup erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde başvurulacak ilk testtir (Bloom ve Fawcett 1975, Orhon ve ark 1995, Harmankaya ve Özgök 2002, Hasa 2007, Günalp 2004 WHO 2010, Kruger 1986).

Uygun olanı semen örneğinin laboratuara yakın özel bir odada alınmasıdır. Eğer bu mümkün değilse semen örneğinin laboratuara en geç bir saat içinde ulaştırılması gerekir. Spermatozoa motilitesinin azalmasının önüne geçmek için semen 20-22°C sıcaklığında tutulmalıdır.

Spermiyogram tetkiki en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrası yapılmalıdır. Bunun yanı sıra 7 günü aşan cinsel perhiz de motiliteyi etkilemektedir. Ayrıca doğru sonuca ulaşmak için spermiyogramı 1-2 ay aralarla en az 3 defa tekrarlamak gereklidir. Analiz sonuçları birbirine %20 yakınlıkta ise ilave örneklere gerek yoktur, eğer analiz sonuçları arasında belirgin bir farklılık varsa semen analizinin tekrarlanmasında fayda vardır. Ejakülat örneği klinikte verilmelidir. Semen temiz, toksik olmayan, geniş ağızlı ve tercihen polietilen kaplarda toplanmalıdır (Jequer ve Crich 1986, Anafarta ve ark 2007, WHO 2010).

Volüm	1,5 - 5 ml
pH	>7,2
Viskozite	< +2
Spermatozoa konsantrasyonu	≥ 20 milyon/ml
Total spermatozoa sayısı	>40 milyon
Motilite yüzdesi	a+b ≥%50 ya da ≥%25 ileri hızlı hareket
Morfoloji	>%30 WHO, >%14 Kruger Strict
Lökosit	1 milyon/ml

Tablo 1.1. Normal spermatozoa analizi değerleri: (WHO 2010)

1.4.2. İlk Makroskopik İnceleme

Likefaksiyon: Ejakülat ilk çıkarıldığında koagulum halindedir. Semen akıcı özeliğini kazanmasına likefaksiyon denir (Anafarta ve ark 2007, WHO 2010). Semen genellikle ilk 15 dakika içinde likefiye olur. Bazen bu süre 60 dakikaya kadar uzayabilir. Ancak bu süreç 60 dakikayı aşarsa bu durum belirtilmelidir (Kruger 1986, WHO 2010, Vicdan ve ark 1999).

Renk: Normalde semen homojen, gri, opak görünümündedir.

Koku: Semen kendine has bir kokusu vardır. Bu koku prostattan salgılanan spermin denen bir proteine bağlı oksidasyondan kaynaklanır. Semen kokusu testislerde üretilen aminlerden kaynaklanır.

Hacim: Semen hacmi 2 ml ve üstünde olmalıdır.

Viskozite: Viskozite semen akışkanlığına karşı oluşan direnç veya yapışkanlık demektir. Viskozite 5 ml'lik pipete alınan ejakülatın damla damla akıtılarak, damlaların büyüklüğü (kalınlığı) ve uzamalarının gözlemlenmesiyle tahmin edilir. Normal viskoziteye sahip bir semen numunesi pipetten tek tek ve aralıklı damlalar halinde düşer. 1-2 cm'lik bir uzama varsa +1, 2-4 cm'lik bir uzama varsa +2, 4 cm üzerinde bir uzama varsa +3 viskozite değeri kaydedilir. Yüksek viskozite spermatozoa motilitesinin ve konsantrasyonunun

belirlenmesini engelleyebilir. 2 cm'den fazla uzama anormal olarak kabul edilir (Zavos ve ark 1997).

pH: pH kâğıdı ile semen pH' ı ölçülür. Azoospermili olgularda pH: 7' den küçükse ejakulatuar kanallarda tıkanıklık veya konjenital bilateral vaza deferens yokluğu araştırılmalıdır (WHO 2010).

1.4.3. Semen Analizinde Sayısal Analiz

1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından sperm sayımı için özel olarak tasarlanmış Makler sperm sayım kamerası kullanılmaktadır. Bu kameranın lam ve lameli arasında 10 mikro metrelik sabit bir hacim bulunmaktadır. Yüzeyi ise 0.1mm X 0.1mm boyutlarında 100 kareden oluşan bir ağ içerir. 10 küçük kare içerisindeki hücre sayısı sayılarak 1 milyon ile çarpılır. Bu sayı 1 mililitredeki hücre sayısını verir (Christensen ve ark 2005).

Normozoospermi	Normal ejakulat
Oligozoospermi	Sperm konsantrasyonu 20 mil/ml den az
Asthenospermi	Progresif motilitesi olan sperm sayısı %40'dan az
Teratozoospermi	Normal yapıda spermler %50'den az
Azoospermi	Ejakulatta spermatozoa olmaması
Aspermi	Ejakulat olmaması

Tablo 1.2. Sperm analizinde terminoloji (WHO 2002).

İnfertil erkeklerin büyük kısmında söz konusu olan oligospermi bir hastalık değil semptomdur (Dayanç ve ark 1994).

1.4.4. Floresan Mikroskopu

Belli floresan maddeler uygun dalga boyundaki ışık altına tutulduğunda daha uzun dalga boyunda ışık yayarlar. Floresan mikroskopta doku kesitleri, genelde yayılan ışık yelpazesinin görülebilir kısmında yer alacak şekilde mor ötesi ışık altına tutulur. Floresan maddeler karanlık bir zemin üzerinde parlak, ışıltılı parçacıklar şeklinde izlenir. Güçlü bir mor ötesi ışık kaynağının kullanıldığı bir mikroskopta araştırmacının gözlerini korumak için objektif merceklerinden sonra morötesi ışığı süzecek olan güçlü filtreler bulunmaktadır.

A vitamini, B2 vitamini ve porfirinler gibi bazı doğal floresan maddeler hücrenin normal bileşenlerini oluşturmaktadır. Dokulara ve hücrelere afinitesi olan diğer floresan bileşikler ise floresan boyalar olarak kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan akridin oranj'dır (Junqueira ve ark 1998).

1.5. Boyalar

1.5.1. Hematoksilen

Hematoksilen hücre çekirdeklerini mavi-siyah renge boyar ve intranükleer detayları iyi gösterir. Eozin ise; sitoplazmayı ve birçok bağ dokusu fibrillerini pembe, turuncu, kırmızının çeşitli renk tonlarında ve yoğunluklarında boyar. Bununla birlikte Hematoksilen, Hematoksilen-Eozin kombinasyonundan daha fazla kullanılır (John ve ark 1990).

Hematoksilenin görünümü kahverengi-kızıl, ve molekül ağırlığı 302,288 gr/mol'dür. Hematein yalnız başına doku kesitlerini çok zayıf boyar. Hemateinle iyi bir boyama için; boya çözeltilerine mordant ilavesi veya boyadan sonra mordantla diferansiyasyon gereklidir (Ekicioğlu ve ark 2005).

1.5.2. Eozin

Eozin rutin laboratuvarlarda bir dokunun genel histolojik yapısını belirlemek için alım hematoksilen boyalarla kombine edilebilen en uygun boyadır. Zayıf asidik bir boyadır ve dokunun katyonik kısmıyla birleşir. Özelliğini kırmızı ve pembenin değişen tonlarında sitoplazmik yapıları boyayarak, farklı hücre tiplerinin sitoplazmalarını, bağ dokusu fibrillerini ve matriksin farklı tiplerini ayırmak için özel farklılaşabilme yeteneginden alır. Sitoplazmik bir boya olarak genellikle saf sudaki ya da alkoldeki %0.5 ile %1'lik solusyonları kullanılmaktadır. EozinY, Etil Eozin, EozinB gibi (John ve ark 1990).

Rutin histolojik boyamada alüminyum hematoxylinlere zıt boya olarak, sitoplazma boyamasında kullanılır. Günümüzde Eosin Y şekli (Eosine Yellowish) kullanılmaktadır. Eosin S ve Eosin B kullanımı sınırlıdır. Eosin Y yeşil-turuncu toz şeklinde, molekül ağırlığı 691.914 gr/mol ve çözünürlük: 40 gr/100 ml su, 2 gr/100 ml etil alkoldür. Eosinle boyamada, nükleusa yaptığı kontrastla beraber parlaklık önemlidir. Normalde sarı-yeşil çözeltisi olan eosine %1 oranında asetik asit ilavesiyle, çözelti kırmızı renge dönüşür. Bu işlem hematoksilenle mavi renge boyanan nükleusa kontrast veren parlak bir zemin oluşturur. Sitoplazmanın yanı sıra bağ dokusu elemanları da eosinle boyanırlar. Eosinin boyama süresi

için internal kontrol kullanılır. Doku kesitlerinde eritrositlerin kiremit kırmızısı renkte olması önerilmektedir (Wittekind 1983, Ekicioğlu ve ark 2005).

1.5.3. Metilen mavisi

Bazofilik bir boyadır. Uzun niteliksel bir prosedür basit olarak asit mukopolisakkaridlerin bazofili kullanımı geleneksel hale gelmiştir. Mast hücre granülleri ve kıkırdağın zemin maddesi pH 2 de metilen mavisini bağlayabilir. pH 3 de trakenin mukusunu, pH 4 de tiroid koloidinin RNA sını bağlayabilir (Raspail 1961). Biyolojik dokularla çok değişik seviyelerde reaksiyonlara girmektedir örneğin Alzheimer hastalığında tedavi için umut bile taşımaktadır (Oz ve ark 2009).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmamızda, Necmettin Erbakan Üniversitesi Tüp Bebek ünitesine Aralık 2012/ Mart 2012 tarihleri arasında infertilite nedeniyle başvuran ve onay veren toplam 80 vaka, 09/27 etik kurul kararınca seçildi.

Çalışmaya alınmama kriterleri;

1. Hastanın gönüllü olmaması
2. Yeterli hacimde ejakulat alınmaması
3. Azospermi görülmesi

Yapılan çalışmada 4 boya (Hematoksilen, Metilen Mavisi, Eosin B, Eosin Y) kullanıldı. Öncelikle boya renklerinin molekül ağırlıklarına göre floresans yansıma veren en düşük derişimleri bulundu.

BOYALAR	MOLEKÜL AĞIRLIKLARI
Hematoksilen	302.288 gr/mol
Metilen Mavisi	319.9 gr/mol
Eosin B	624.0572 gr/mol
Eosin Y	691,914 gr/mol

Tablo2.1. Çalışmadaki histolojik boya renklerinin molekül ağırlıkları

Her boya için moleküler ağırlıklarına göre farklı derişimlerde stok solüsyonlar hazırlandı. Örneğin;

Hematoksilen için ;

Solüsyon A:302.288gr 1L distile su içinde çözündüğünde 1M çözelti elde edilmiş olur.

Solüsyon B: 100 ml (sol A) + 900 ml distile su =1L yani 10^{-1} M elde edildi.

Solüsyon C: 100 ml (sol B) + 900 ml distile su = 1L yani 10^{-2} M elde edildi.

Solüsyon D: 10 ml (sol B) + 990 ml distile su =1L 10^{-4} M elde edildi.

Bu şekilde sırasıyla 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} molaritedeki boya solüsyonları elde edildi.

Sonra rutin spermogram analiz aşamasına geçildi. Normo ve oligospermik vakalar belirlenip gönüllü olanlar çalışmaya alındı. Hastalardan 3 günlük cinsel perhiz sonrasında alınan numuneler steril, toksik olmayan polypropilen bir kaba toplandı ve 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 kamerasının (Sefi - Medical Instruments) ortasına damlatılarak üzerine grid camı kapatıldı. Nikon T1A Input AC ışık mikroskobunda toplamda 20X objektif büyütme altında değerlendirme yapıldı.

Gridin üzerinde iki satır bir sütun veya iki sütun bir satır içerisindeki spermatozoa sayılarak ortalaması alındı ve böylece spermatozoa konsantrasyonu milyon/ml olarak tespit edildi. Aynı zamanda Makler sayım kamerası kullanılarak motilite değerlendirmesi yapıldı. Motilite değerlendirmesi için 100 hücre sayıldı.

Doğrusal hareket göstererek en az 3 kareyi kat eden spermatozoaların motilitesi +4,

Karenin dışına çıkan ancak 1-2 kare sonra geri dönme hareketi gösteren spermatozoaların motilitesi +3,

Bir kare içerisinde yerinde baş veya kuyruk sallama şeklinde hareket eden spermatozoaların motilitesi +2,

Hiç hareket göstermeyen spermatozoaların motilitesi +1 olarak değerlendirildi (Makler 1980, WHO 2010).

Bu işlem sonunda kalan semenden enjektör ile 1ml alınarak tüplere konuldu. Üzerine 2 ml serum fizyolojik (SF) eklendi. Elde edilen 3ml karışımdan 1'er ml alınarak 3 ayrı ependorf tüpe bölündü. Üzerlerine 10 µl boya eklendi. Bu işlemde her bir hasta için ayrı ayrı olmak üzere hematoksilen, Eosin B, Eosin Y, metilen mavisi boyaları kullanılarak boyamalar yapıldı. Son olarak pipeting yapılarak homojen hale geldi ve lamlara 1'er damla damlatılarak floresan mikroskop altında inceleme yapıldı.

3. BULGULAR

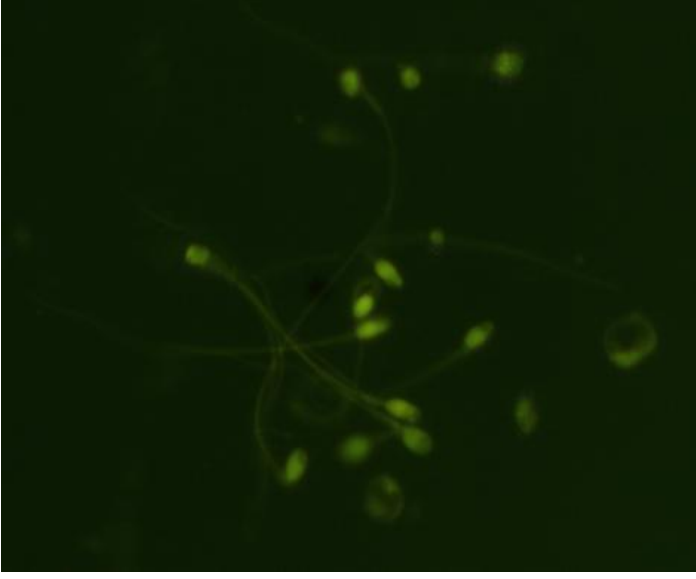
Bu çalışmamızda rutinde kullanılan belirli histolojik boyaların (Hematoksilen, Eosin B, Eosin Y, Metilen mavisi) floresan görüntü verme özelliği araştırıldı. Bu boyaların floresan özelliği olup olmadığı varsa en düşük hangi derişimde ışıma verdiği tespit edildi. Bu boyalar sırasıyla aşağıdaki gibi değerlendirildi.

Çalışma amacımızda özellikle mitokondri organelinin yoğunlaştığı sperm orta parça bölgesinde ışıma yoğunluğunun varlığını tespit etmek, dolayısıyla mitokondriyal bir afiniteyi sorgulamaktı. Ancak çalışmanın ilerlemesiyle beraber mevcut laboratuvar donanımımızdaki mikroskopların bu ayrıntıya uygun destek veremeyeceği ortaya çıktı. Yaptığımız tüm gözlemlerde büyütmenin el verdiği Foto Mikroskopik Büyütme (FMB) 132X olarak hesaplandı ve ışıma sperm hücresi bazında baş bölgesindeki çekirdeğin periferinde yoğunlaştığı gözlendi.

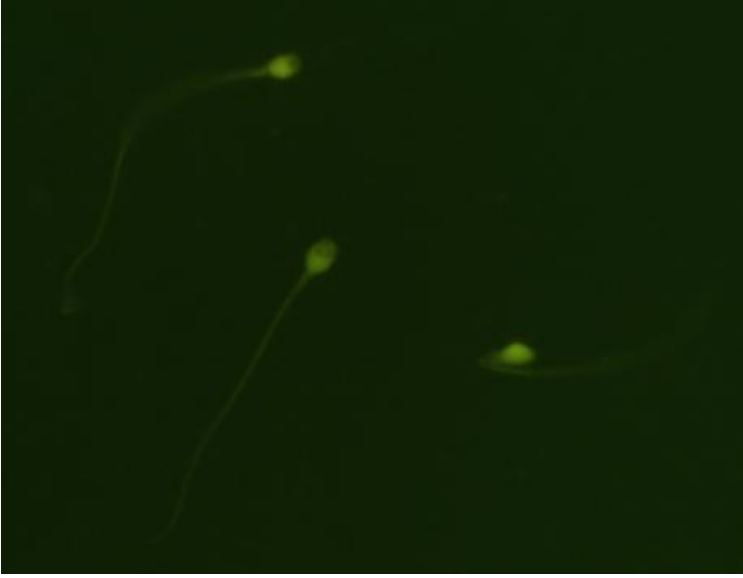
3.1. Eosin B

10^{-1} 'lik derişimlerden başlayarak en düşük hangi derişimde görüntü verdiği bulundu. Sırasıyla 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} derişimlerde boyama yapıldı. Eosin B ile yapılan boyamada 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} derişimlerinde görüntü elde edildi. 10^{-6} derişimde ise görüntü gözlenmedi. En düşük derişim ve dolayısıyla en maliyeti düşük görüntü 10^{-5} derişiminde gözlendi.

Bu işlemler normosperm ve oligosperm üzerine ayrı ayrı uygulandı ve her ikisinde de bir fark gözlenmedi.



Şekil 3.1. Eosin B normosperm 10^{-5} FMB 66X





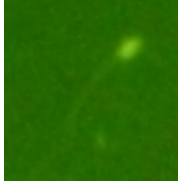
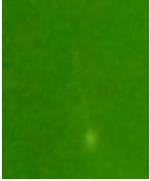






Şekil 3.2. Eosin B normosperm 10^{-5} FMB132X



Şekil 3.3. Eosin B oligosperm 10^{-5} FMB 132X

Her boya konsantrasyonu için Independent-samples T testi uygulandı. Bu test yapılırken tablo 3.1'deki skala gözetilerek değerler verildi.

Skala

A grubu			
B grubu			
C grubu			
D grubu			

Tablo 3.1. Sperm görüntü skalası

Eosin B Histokimyasalının Azaltılan Konsantrasyonlardaki Boyama Özelliği

NORMOSPERMİ 10 ⁻³	A	B	C	D
01	43	34	23	0
02	60	25	15	0
03	45	30	25	0
04	42	40	18	0
05	53	27	20	0
06	50	35	15	0
07	46	34	20	0
08	49	30	21	0
09	52	33	15	0
10	54	30	16	0
OLİGOSPERMİ 10 ⁻³				
01	46	34	20	0
02	57	27	16	0
03	53	32	15	0
04	45	30	25	0
05	52	34	14	0
06	43	34	23	0
07	42	40	18	0
08	60	25	15	0
09	49	34	27	0
10	52	41	7	0
Normospermi Ortalama±SD	49.4±5.5	31.8±4.3	18.8±3.5	
Oligospermi Ortalama±SD	49.9±5.9	33.1±5.2	18.0±5.9	
P değeri	0.718	0.827	0.203	

Tablo3.2. Eosin B boyasının 10⁻³ derişimli oligosperm ve normosperm üzerindeki ışımaya verileri

Independent-samples T testi değerlerine göre;

Yapılan çalışmalarda p değeri 0,005'den yüksek çıkmıştır. Oligospermi ve normospermi çalışan floresan boyaların arasında fark olmadığı gözlenmiştir.

NORMOSPERMİ 10 ⁻⁴	A	B	C	D
01	45	36	29	0
02	52	33	15	0
03	48	40	12	0
04	55	35	10	0
05	54	30	16	0
06	43	34	23	0
07	49	34	27	0
08	50	40	10	0
09	42	38	20	0
10	47	41	12	0
OLİGOSPERMİ 10 ⁻⁴				
01	50	35	15	0
02	46	34	20	0
03	52	33	15	0
04	48	40	12	0
05	45	35	20	0
06	49	31	20	0
07	51	28	21	0
08	53	37	10	0
09	40	35	25	0
10	40	34	26	0
Normospermi Ortalama±SD	48.5±4.4	36.1±3.5	17.4±6.9	
Oligospermi Ortalama±SD	47.4±4.6	34.2±3.2	18.4±5.2	
P değeri	0.842	0.440	0.255	

Tablo 3.3. Eosin B boyasının 10⁻⁴ derişimli oligosperm ve normosperm üzerindeki ışına verileri

Independent-samples T testi değerlerine göre;

Yapılan çalışmalarda p değeri 0,005'den yüksek çıkmıştır. Oligospermi ve normospermi çalışan floresan boyaların arasında fark olmadığı gözlenmiştir.

NORMOSPERMİ 10 ⁻⁵	A	B	C	D
01	55	30	15	0
02	52	35	23	0
03	49	36	15	0
04	48	40	12	0
05	45	35	20	0
06	42	40	18	0
07	60	25	15	0
08	46	34	20	0
09	49	30	21	0
10	50	35	15	0
OLİGOSPERMİ 10 ⁻⁵				
01	49	31	20	0
02	51	28	21	0
03	53	37	10	0
04	48	40	12	0
05	45	35	20	0
06	42	40	18	0
07	50	36	14	0
08	52	34	24	0
09	40	35	25	0
10	49	36	15	0
Normospermi Ortalama±SD	49.6±5.1	34.0±4.6	17.4±3.5	
Oligospermi Ortalama±SD	47.9±4.2	35.2±3.6	17.9±5.0	
P değeri	0.774	0.515	0.243	

Tablo3.4. Eosin B boyasının 10⁻⁵ derişimli oligosperm ve normosperm üzerindeki ışına verileri

Independent-samples T testi değerlerine göre;

Yapılan çalışmalarda p değeri 0,005'den yüksek çıkmıştır. Oligospermi ve normospermi çalışan floresan boyaların arasında fark olmadığı gözlenmiştir.

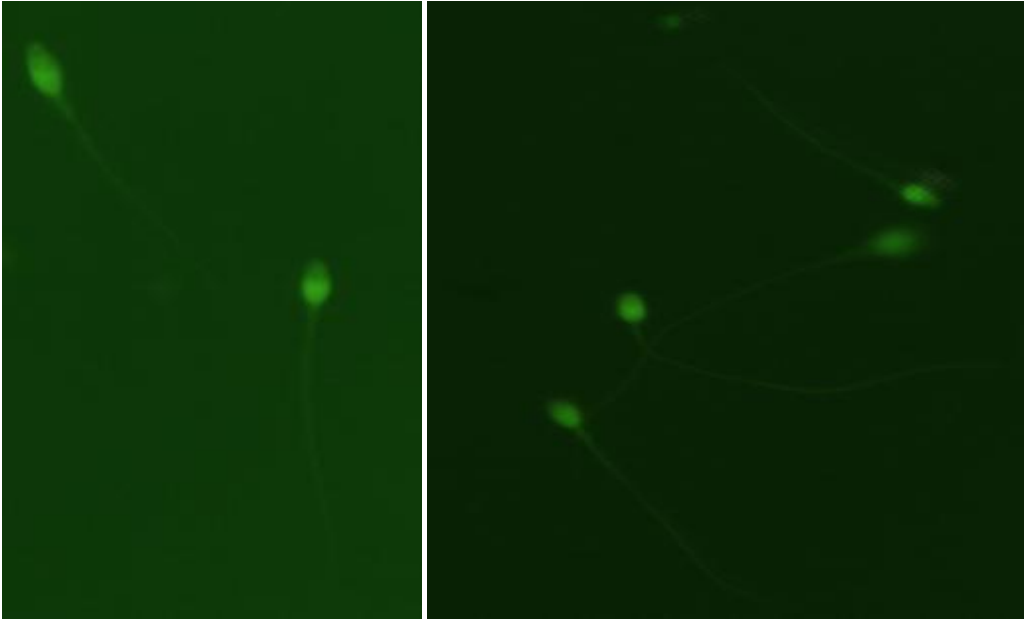
NORMOSPERMİ 10 ⁻⁶	A	B	C	D
01	0	0	0	100
02	0	0	0	100
03	0	0	0	100
04	0	0	0	100
05	0	0	0	100
06	0	0	0	100
07	0	0	0	100
08	0	0	0	100
09	0	0	0	100
10	0	0	0	100
OLİGOSPERMİ 10 ⁻⁶				
01	0	0	0	100
02	0	0	0	100
03	0	0	0	100
04	0	0	0	100
05	0	0	0	100
06	0	0	0	100
07	0	0	0	100
08	0	0	0	100
09	0	0	0	100
10	0	0	0	100

Tablo3.5. Eosin B boyasının 10⁻⁶ derişimli oligosperm ve normosperm üzerindeki ışına verileri

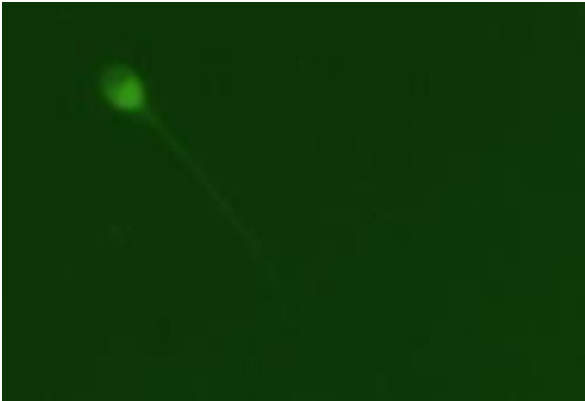
3.2. Eosin Y

10^{-1} 'lik derişimlerden başlayarak en düşük hangi derişimde görüntü verdiği bulundu. Sırasıyla 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} derişimlerde boyama yapıldı. Eosin Y ile yapılan boyamada 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} derişimlerinde görüntü elde ettik. 10^{-5} derişiminde görüntü elde edilemedi. En düşük derişim ve dolayısıyla en maliyeti düşük görüntü 10^{-4} derişiminde gözlemlendi.

Bu işlem normosperm ve oligosperm üzerine ayrı ayrı uygulandı ve her ikisinde de bir fark gözlenmedi.



Şekil 3.4. Eosin Y normosperm 10^{-4} FMB 132X



Şekil 3.5. Eosin Y oligosperm 10^{-4} FMB 132X

Eosin Y Histokimyasalının Azaltılan Konsantrasyonlardaki Boyama Özelliği

NORMOSPERMİ 10 ⁻³	A	B	C	D
01	70	20	10	0
02	65	20	15	0
03	66	24	10	0
04	55	30	15	0
05	50	30	20	0
06	60	25	15	0
07	75	15	10	0
08	72	18	10	0
09	59	16	25	0
10	60	30	10	0
OLİGOSPERMİ 10 ⁻³				
01	60	25	15	0
02	65	20	15	0
03	59	25	16	0
04	72	18	10	0
05	70	20	10	0
06	55	30	15	0
07	60	30	10	0
08	58	32	10	0
09	58	30	12	0
10	60	26	14	0
Normospermi Ortalama±SD	63.2±7.8	22.8±5.8	14.0±5.1	
Oligospermi Ortalama±SD	61.7±5.5	25.6±4.9	12.7±2.5	
P değeri	0.219	0.394	0.098	

Tablo3.6. Eosin Y boyasının 10⁻³ derişimli oligosperm ve normosperm üzerindeki ışına verileri

Independent-samples T testi değerlerine göre;

Yapılan çalışmalarda p değeri 0,005'den yüksek çıkmıştır. Oligospermi ve normospermi çalışan floresan boyaların arasında fark olmadığı gözlenmiştir.

NORMOSPERMİ 10 ⁻⁴	A	B	C	D
01	75	15	10	0
02	72	18	10	0
03	70	16	14	0
04	60	25	15	0
05	65	25	10	0
06	55	30	15	0
07	74	16	10	0
08	55	30	15	0
09	60	30	10	0
10	58	32	10	0
OLİGOSPERMİ 10 ⁻⁴				
01	60	25	15	0
02	75	15	10	0
03	72	18	10	0
04	65	25	10	0
05	55	30	15	0
06	74	16	10	0
07	58	32	10	0
08	58	30	12	0
09	70	20	10	0
10	70	16	14	0
Normospermi Ortalama±SD	64.4±7.8	23.7±6.8	11.9±2.4	
Oligospermi Ortalama±SD	65.7±7.4	22.7±6.5	11.6±2.2	
P değeri	0.826	0.824	0.305	

Tablo3.7. Eosin Y boyasının 10⁻⁴ derişimli oligosperm ve normosperm üzerindeki ışına verileri

Independent-samples T testi değerlerine göre;

Yapılan çalışmalarda p değeri 0,005'den yüksek çıkmıştır. Oligospermi ve normospermi çalışan floresan boyaların arasında fark olmadığı gözlenmiştir.

NORMOSPERMİ 10 ⁻⁵	A	B	C	D
01	0	0	0	100
02	0	0	0	100
03	0	0	0	100
04	0	0	0	100
05	0	0	0	100
06	0	0	0	100
07	0	0	0	100
08	0	0	0	100
09	0	0	0	100
10	0	0	0	100
OLİGOSPERMİ 10 ⁻⁵				
01	0	0	0	100
02	0	0	0	100
03	0	0	0	100
04	0	0	0	100
05	0	0	0	100
06	0	0	0	100
07	0	0	0	100
08	0	0	0	100
09	0	0	0	100
10	0	0	0	100

Tablo3.8. Eosin Y boyasının 10⁻⁵ derişimli oligosperm ve normosperm üzerindeki ışına verileri

3.3. Hematoksilen

10^{-1} derişimden başlayarak 10^{-6} derişime kadar boyama yapıldı. Çalışılan derişimlerde boyama gözlenmedi. Çalışma amacımız düşük konsantrasyonlar üzerine yapıldığı için üst derişimler değerlendirilmeye tabi tutulmadı. Dolayısıyla bu boyanın floresan özelliği olmadığı sonucuna varıldı.

Bu işlem normosperm ve oligosperm üzerine ayrı ayrı uygulandı ve her ikisinde de bir fark gözlenmedi.



Şekil 3.6. Hematoksilen FMB 132X

Hematoksilen Histokimyasalının Azaltılan Konsantrasyonlardaki Boyama Özelliği

NORMOSPERMİ $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3},$ $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	A	B	C	D
01	0	0	0	100
02	0	0	0	100
03	0	0	0	100
04	0	0	0	100
05	0	0	0	100
06	0	0	0	100
07	0	0	0	100
08	0	0	0	100
09	0	0	0	100
10	0	0	0	100
OLİGOSPERMİ $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3},$ $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$				
01	0	0	0	100
02	0	0	0	100
03	0	0	0	100
04	0	0	0	100
05	0	0	0	100
06	0	0	0	100
07	0	0	0	100
08	0	0	0	100
09	0	0	0	100
10	0	0	0	100

Tablo3.9. Hematoksilen boyasının $10^{-1,2,3,4,5,6}$ derişimli oligosperm ve normosperm üzerindeki ışımaya verileri

3.4. Metilen Mavisi

10^{-1} derişimden başlayarak 10^{-6} derişime kadar boyama yapıldı. Çalışılan derişimlerde boyama gözlenmedi. Çalışma amacımız düşük konsantrasyonlar üzerine yapıldığı için üst derişimler değerlendirilmeye tabi tutulmadı. Dolayısıyla bu boyanın floresan özelliği olmadığı sonucuna varıldı.

Bu işlem normosperm ve oligosperm üzerine ayrı ayrı uygulandı ve her ikisinde de bir fark gözlenmedi.



Şekil 3.7. Metilen Mavisi FMB 132X

Metilen Mavisi Histokimyasalının Azaltılan Konsantrasyonlardaki Boyama Özelliği

NORMOSPERMİ $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3},$ $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$	A	B	C	D
01	0	0	0	100
02	0	0	0	100
03	0	0	0	100
04	0	0	0	100
05	0	0	0	100
06	0	0	0	100
07	0	0	0	100
08	0	0	0	100
09	0	0	0	100
10	0	0	0	100
OLİGOSPERMİ $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3},$ $10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$				
01	0	0	0	100
02	0	0	0	100
03	0	0	0	100
04	0	0	0	100
05	0	0	0	100
06	0	0	0	100
07	0	0	0	100
08	0	0	0	100
09	0	0	0	100
10	0	0	0	100

Tablo3.10. Metilen Mavisi boyasının $10^{-1,2,3,4,5,6}$ derişimli oligosperm ve normosperm üzerindeki ışıma verileri

4.TARTIŞMA

Bu çalışmanın sonucu rutin histokimyada eldesi kolay ve yaygın olan boyalarla floresan çalışmaların yapılabileceğini ortaya koyduk. Ancak bu bulgularımızın, her türlü optimizasyon, iyileştirme ve değişik modifikasyonlarla daha anlamlı ışımaya görüntülerinin elde edilebileceği, daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği ortaya konulmuştur. Ülkemizin yüksek maliyetlerle ithalat yaparak ve dolayısıyla da dış ülkelere bağımlı olduğu bu konuda oldukça düşük maliyetlerle floresan boyalarının da olduğu ortaya konulmuştur. Optimizasyon konusunda kimyasalın maruziyet süresi, pH, ortam ısısı ve membran geçirgenliği üzerine etkili ajanların kombinasyonları (Dimetil sülfoksit (DMSO) gibi) ile pratik ve ekonomik şartlarda laboratuvarların floresan boyalara kendi imkanlarıyla kavuşabilecekleri tartışmaya açıktır.

Bu çalışmada sperm hücrelerinin seçilmesi kolay elde edilen canlı hücre olmasındandır. Ayrıca normal ve patolojik parametrelere karşılık gelebilecek normo ve oligospermik vakalar çalışıldı ve boya açısından farklı sonuç olmadığı ortaya konularak hem histolojik hem de patolojik vakalarda boyaların eşit çalıştığı ortaya konuldu. Seçilen boyaların floresan teknikler için standardizasyona uygun olup olmadığının araştırılması çalışma amaçları arasında idi ve standardizasyona uygun olduğunu göstermek daha ileri çalışma ve optimizasyonlara da uygun olduğunu ortaya koymuştur.

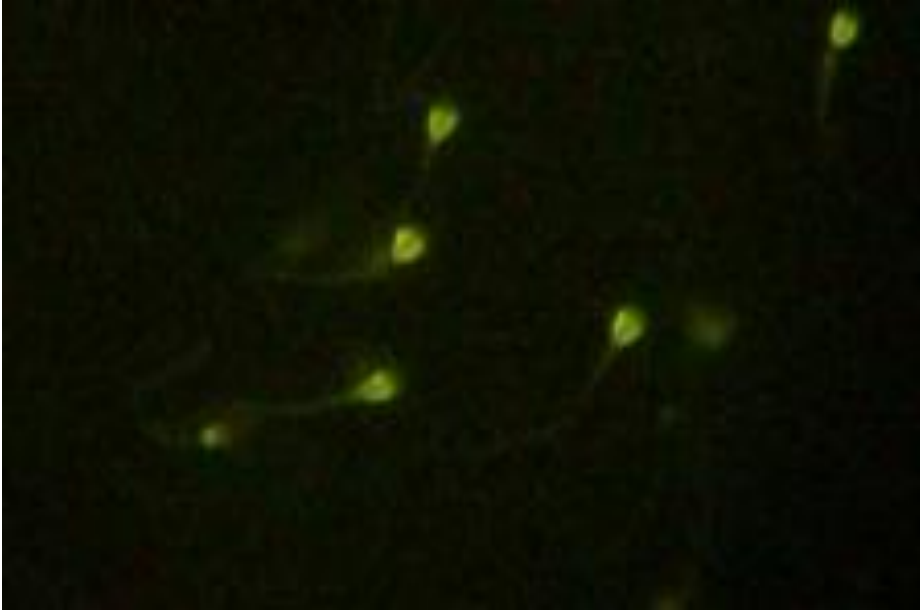
Çalışmadaki amaç en ekonomik değerdeki (derişimin en düşük olduğu) floresan ışımaya özelliğinin tanımlanmasıdır. Boyanın 100 kat sulanmış olmasının ışımaya parlaklığına etkisi olmadığı bulundu. Örneğin Eosin B 10^{-3} konsantrasyonunda (hem normo hem oligospermilerde) %50'ye yakın A ışımaya kalitesinde görüntü verirken 10^{-5} değerinde de yine %50 'ye yakın A ışımaya kalitesinde görüntünün elde edilmesine etmemize imkan tanıdığı bulundu. Bunun ekonomik yansıması aynı gram boyanın 100 kat fazla preparatı da oluşturmada kullanılabileceğinin tanımlanmış olmasıdır.

Rashid ve ark 1991'de yaptığı çalışmada düşük konsantrasyonlu histokimyasalların floresan ışımaya özelliği veren çalışmasında mitokondri için özel bir afinitesi olduğunu göstermiştir. Ancak Rashid ve ark in vitro şartlarda ve zenginleştirilmiş medium özel in vitro şartlarındaki bir ortamda kültür fibroblastlarını kullanarak bu sonuca varmıştır (Rashid ve ark 1991).

Bu çalışmada in vivo şartlara olabilecek en yakın yani sadece SF ile muamele edilmiş canlı ve hareketli bir hücre olan spermin, en kısa süredeki özellikleri değerlendirilmiştir. Rashid ve ark'nın yaptığı çalışmayla bir diğer önemli farkımız büyütme farkındandır. Örneğin Eosin B'nin 1900 fotomikroskopik büyütmedeki değerlendirilmesinde mitokondrilere atf

yapmaktadır. Bu çalışmada mitokondrinin daha büyük büyütme altında görüleceğini zaten biliniyordu. Ancak boyanın bu organel bölümü (orta parça) içerisinde yoğunlaşmasından (afinite) dolayı düşük büyütme hızlarında çalışma ve imaj verme özelliğini araştırmak istedik. Laboratuvar mikroskoplarının büyütme gücü olanakları çerçevesinde bu hedeflerimize ulaşamadık. Yüksek molarite (10^{-1} , 10^{-2}) değerlerinde yine orta parçaya ait özel bir yoğunlaşma görüntüsü elde edilemedi. Çalışmadaki çekim parametresi gereği, en hızlı ışımaya süresi gözetilerek çekim yapıldı. Yani görüntüyü ilk kez elde ettikten sonra floresan ışığa maruz bırakıp takipleri yapılamadı. Ancak Rashid ve ark'nın 1991'de yaptığı yayında mitokondrilerin perinuklear yani çekirdeğin etrafındaki alanda yoğunlaşmış daha kuvvetli ışımaya imajları tespit edildi (Rashid ve ark 1991).

Rashid ve ark yaptıkları çalışmada floresan ışımaya veren görüntünün kısa bir süre sonra söndüğünü rapor etmiştir (Rashid ve ark1991). Bu çalışmada bu boyaların sadece geçici görüntü vermediği, takip eden günlerde de ışımaya özelliğini koruduğu (stabilizasyon optimizasyonuna uygun) hatta 3 gün sonra bile karanlık ortamda saklandığı sürece ışımaya özelliğini koruduğu görüldü.



Şekil 4.1. Eosin B 3. Gün görüntüsü FMB 66X

Floresan ışımaya veren Eosin B ve Eosin Y'nin ışımaya özelliğini açıklamak için membran geçirgenliği konusunda birçok parametre vardır. En önemli parametre olarak lipofili değerlendirildiğinde pubmed taraması bu konuda destek olabilecek herhangi bir çalışma vermedi. Bu çalışma ile bu boyaların membran lipofili özelliğinin çalışılmamış bakir bir konu

olduğunu yeni araştırmacıların gündemine taşımak istiyoruz. Eosin Y'nin hücresele seviyede nereye bağlandığı halen araştırma konusudur (Havlikova ve ark 2013).

Eosin grubu boyalar sitoplazma içindeki pozitif yüklü proteinleri bağlar. Bunu en iyi pH 3.5 ortamında yaparlar ama bu çalışma canlıdakini hedeflediğimiz için bu değerde boyama yapılamadı.

Literatürde Eosin Y ve Eosin B'nin floresan özelliklerinin canlı hücrelerde kullanımı hakkında Rashıd ve ark'nın çalışması dışında bu çalışma ile örtüşen bir dökümana rastlanmadı.

Rashıd ve ark'nın yaptığı çalışma hematoksilenin de floresan ışımaya verdiğini göstermektedir (Rashıd ve ark1991). Bunun aksine bu çalışmada hematoksilen floresan ışımaya vermemektedir. Rashıd ve ark'nın yaptığı çalışmada Earle mediumuna L-glutamine, foetal calf serum,% 1 penisillin/streptomisin, sodium bikarbonat ilave etmiştir. Bu önemli bir fark olabilir ve ileri araştırmalarda ancak cevabı bulunabilir.

Hematoksilen boyasında moleküler konfigürasyon veya boyanın yük dağılımının değişmesi ile kültür ortamındaki boyanın çözülme özelliğinin değişmesi söz konusudur.

Hematoksilendeki bu zıtlığa rağmen Rashıdve ark'nın çalışmasında da bizim çalışmamızda da metilen mavisi floresan ışımaya göstermedi.

Yapılan bu çalışmada floresan mikroskop filtre ilavesinin görüntüye bir katkısı bulunamadı. Yeşil, kırmızı filtre denendi herhangi bir fark, katkı veya eksiklik olmadığını gözlemlendi. Bu nedenle çalışmada filtre kullanımının gereksiz olduğu kanaatine varıldı.

Basit boyaların optimizasyonu ile çok etkili sonuç veren ve özellikle spermlerle çalışılmış dökümanlar bulunmaktadır. Valle ve ark yaptıkları bir çalışmada basit eosin nigrosin boyası ile hızlı ve etkili akrozom bütünlük çalışmasının yapılmasını ortaya koymuştur (Vale ve ark 2008).

Rutinde kullanılan boyalar basit optimizasyonlarla farklı amaçlarda kullanılabilir. Örneğin Collins ve ark yaptıkları çalışmada propidium iodide (PI), boyasını küçük optimizasyonlarla arı spermi canlılık testi olarak kullanılacak böyle etkili bir proba dönüştürmüşlerdir (Collins ve ark 1998).

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonucu rutin histokimyada eldesi kolay ve yaygın olan boyalarla (Eosin B ve Eosin Y) floresan çalışmaların yapılabileceği, normosperm ve oligospermin boyanmaları arasında bir fark olmadığı ortaya koyuldu. Eosin B boyası ile yapılan boyamalarda en düşük derişim 10^{-5} , Eozin Y boyası ile yapılan boyamalar da ise en düşük derişimin 10^{-4} olduğu gözlemlendi. Hematoksilen ve metilen mavisi ile yapılan boyamalarda ise herhangi bir görüntü elde edilemedi. Ancak bu bulguların, her türlü optimizasyon iyileştirme ve değişik modifikasyonlarla daha anlamlı ışına görüntülerinin elde edilebileceği, daha ileri çalışmalarla desteklenmesi gerektiği ortaya konulmuştur.

Ülkemizin yüksek maliyetlerle ithalat yaparak ve dolayısıyla da dış ülkelere bağımlı olduğu bu konuda oldukça düşük maliyetlerle floresan boyaların varlığı ortaya konulmuştur. Bu boyalar üzerinde daha ileri çalışmalar yapılarak prob özelliği olan floresan mikroskop boyası elde edilebilir.

6.ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tüp Bebek Ünitesine infertilite ön tanısı ile gelen hastaların spermiyogramları yapıldıktan sonra atık olan hastanın semen numuneleri çalışmaya alındı. Alınan 1 ml seminal plazma örneği üzerine 2 ml SF eklendi. Elde edilen 3ml karışımdan 1'er ml alınarak 3 ayrı ependorfa bölündü. Üzerlerine 10 µl boya eklendi. Son olarak pipeting yapılarak homojen hale geldi ve lamlara 1 damla damlatılarak floresan mikroskop altında inceleme yapıldı. Yapılan çalışmada 4 boya µl (Hematoksilen, Metilen Mavisi, Eosin B, Eosin Y) kullanıldı. Öncelikle boya molekül ağırlıklarına göre molarite hesabı yapıldı ve floresans yansıma veren en düşük derişimleri araştırıldı.

Yapılan incelemeler sonunda Eosin B ve Eosin Y boya floresan ışımaya verirken metilen mavisi ve hematoksilen boya floresan ışımaya görülmedi. Eosin B için en düşük derişim ve dolayısıyla en maliyeti düşük görüntü 10^{-5} derişiminde gözlemlendi. Eosin Y için en düşük derişim ve dolayısıyla en maliyeti düşük görüntü 10^{-4} derişiminde gözlemlendi. Bu işlem normosperm ve oligosperm üzerine ayrı ayrı uygulandı ve her ikisinde de bir fark gözlemlenmedi.

Öneriyoruz ki bu boya üzerinde yapılacak daha ileri araştırmalarla laboratuvar floresan boya çalışmalarına daha ekonomik bir çözüm getirilecektir.

Anahtar kelimeler: Sperm, Eosin B, Eosin Y, Hematoksilen, Metilen Mavisi, Floresan mikroskop

7.SUMMARY

In this study seminal plasma (SP) samples obtained from patients who attended to Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty with preliminary diagnosis of infertility was included. The studied samples were biomedical waste status. To 1 ml SP 2 ml saline physiologic was added, this final 3 ml cell suspension was divided to 3 ependorfs as 1 ml samples. To these samples 10 µl staining chemicals were added. After gentle pipetting the stain to homogenate it, 1 drops were placed to the slides for fluorescence microscopic inspection. Four stains, Eosin B, Eosin Y, Hematoxylin, Methylene Blue were studied to find the lowest staining concentrations according to molecular weight molarity calculations.

It is observed that Eosin B and Eosin Y stains gave fluorescent radiance while the two other stains did not. The lowest fluorescence radiance for Eosin B was obtained at 10^{-5} M and for Eosin Y 10^{-4} . There was no any difference between normo and oligospermic patients sperm staining properties.

It is suggested that by further search this stains can bring economic solutions for fluorescent staining laboratory work.

Key Word: Sperm, Eosin B, Eosin Y, Hematoxylin, Methylene Blue, fluorescence microscope.

8.KAYNAKLAR

- Abid S, Maitra A, Meherji P, Patel Z, Kadam S, Shah J, Shah R, Kulkarni V, Baburao V, Gokral J. Clinical and laboratory evaluation of idiopathic male infertility in a secondary referral center in india. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2008;38:22-29.
- Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N. *Temel Üroloji*, 3.baskı. Günes Kitabevi 2007; 967-990.
- Bloom W, Fawcett DW. *A Textbook of Histology*, Tenth Edition, Saunders, 1975:805-855.
- Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev.* 2012 Jan;64(1):16-64. doi: 10.1124/pr.110.002790. Epub 2011 Oct 28
- Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*. 2005 1;63(4):992-1003.
- Collins AM, Donoghue AM. viability assessment of honey bee, *apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*. 1999 ;51(8):1513-23.
- Dayanç M, Gökalp A, Özkök Y, Yılmaz Y, Karademir K, Harmankaya Ç. Oligospermik hastalarda sperm kalitesinin invitro olarak artırılması. *Türk üroloji dergisi*, 1994; 20(2):185-189.
- Ekicioğlu G, Özkan N, Şalvaazar E. Hematoksilen-Eozin (hematoxylin-eosin) (H&E). *Aegean Pathology Journal* ,2005;2: 58–61.
- Eşrefoğlu M. *Genel ve özel histoloji*, 1. Baskı. Malatya, Pelikan yayıncılık, 2004;305-315.
- Fawcett, D. W. : *A textbook of Histology*, in: *Male reproductive system*, pp:768-815. Twelfth edition, Chapman ve Hall, NY-USA, 1994.
- Freidman T. Infertility and assisted reproduction. *Bailiere's Clinical Obst. And Gyne. Scandinavica*, 1989;66:517-521.
- Gökmen FG. *Sistematik Anatomi*. İzmir Güven Kitabevi,2003; S: 549-560.
- Günalp S. Kadın doğum hekiminin erkek faktörünün araştırılması ve değerlendirilmesindeki yaklaşımı ne olmalıdır? *TJOD Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi*, 2004;7:129-140.
- Harmankaya AÇ, Özgök iY. *İnfertilite*, 2. Baskı. Ankara, GATA Basımevi, 2002; 197-223.
- Hasa H. *infertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvarı*,1. Baskı, Eskişehir, 2007;127-132.
- Havlíková M, Huličiak M, Bazgier V, Berka K, Kubala M. Fluorone dyes have binding sites on both cytoplasmic and extracellular domains of Na,K-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(2):568-76.
- Heyn R, Makabe S, Motta PM. Ultrastructural morphodynamics of human Sertoli cells during testicular differentiation. *Ital J Anat Embryol*. 2001;106(2 Suppl 2):163-71.
- John D Bancroft, Alan Stevens. *Teory and Practice of Histological Techniques*. Third Edition, 1990
- Jequier AM, Crich JP. *Semen Analysis*. Blackwell Scientific Publications, USA;1986:1-145. 7
- Junqueira LC, Carneiro J, RO Kelley. Çev Ed AYTEKİN Y. *Temel Histoloji*. Barış Kitabevi İstanbul,1998; 407-422
- Kalaycı Ş. *Histoloji Bursa*, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986.

- Keith L. Moore, TVN Persaud. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Çev Mehmet Yıldırım. 6. baskı, Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul 2002: 323-334.
- Kierszenbaum A L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi (Türkçe Çeviri). 1.Baskı,Ankara,Palme Yayıncılık, 2006
- Kruger TF Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van ZYL JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril, 1986;46(6):1118-1123.
- Kuran O. Sistemik Anatomi, 1. Baskı. İstanbul, Filiz Kitabevi ,1983;512-530.
- Kuster C, Singer R, Althouse G. Determining sample size for the morphological assessment of spermatozoa. Theriogenology, 2004;61:691-703.
- Makler A. The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. Fertil Steril, 1980;33(3):337-338.
- Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte fizyoloji. 1.baskı, Ankara, Meteksan, 1993:1106-1158.
- Orhon EÜ, Enginsu E, Günalp S. Sperm Morfoloji Atlası, 3. Baskı, Ankara, Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları, 1995; 8-41.
- Ovale WK, Nahımeı PC. Netter Temel Histoloji. 1. Baskı, Ankara, Güneş Tıp Yayınevleri, 2009:377-398
- Ozan H. Anatomi. 1. Baskı, Ankara Nobel Kitabevi,2004;S: 304-312.
- Oz M, Lorke DE, Petroianu GA. Methylene blue and Alzheimer's disease. Biochem Pharmacol,2009; 78 (8): 927-932.
- Rashid F, Horobin RW. Accumulation of fluorescent non-cationic probes in mitochondria of cultured cells: observations, a proposed mechanism, and some implications. Journal of Microscopy, 1991; 233-241.
- Raspail FV. Histochemistry theoretical and applied. Second edition, Boston, J.and A. Churchill Ltd, 1961: 255-259.
- Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011;25(2):221-38.
- Rossato M, Balercia G, Lucarelli G, Foresta C, Mantero F. Role of seminal osmolarity in the reduction of human sperm motility. Int J Androl. 2002;25(4):230-5.
- Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Çev A.Can Basaklar.9.baskı, Ankara, Palme yayıncılık, 2005: 328-343.
- Sekido R. SRY: A transcriptional activator of mammalian testis determination. Int J Biochem Cell Biol. 2010;42(3):417-20.
- Shalet SM. Normal testicular function and spermatogenesis. Pediatr Blood Cancer. 2009;53(2):285-8.4
- Spira A. Epidemiology of Human Reproduction. Hum Reprod. 1986; 1: 111-115.
- Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, 4. Baskı, Ankara, Alp Ofset Matbaacılık, 2003:335-388.
- Seçkin İ, Ertürkoğlu AŞ, Taşyürekli M, Arda O, Alkan F, Oktar H. Özel Histoloji. 1.Baskı, İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi, İstanbul, 2008:155-172.
- Testis Boşaltıcı Duktusları. Erişim: <http://instruction.cvhs.okstate.edu/histology/mr/himrp2.htm> Erişim tarihi: 27.05.2013

- Valle RR, Valle CM, Nichi M, Muniz JA, Nayudu PL, Guimarães MA. Validation of non-fluorescent methods to reliably detect acrosomal and plasma membrane integrity of common marmoset (*Callithrix jacchus*) sperm. *Theriogenology*. 2008;70(1):115-20.
- Viedan K, Isik AZ. *In Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar*. Birinci baskı. Ankara: Çağdas Medikal Kitabevi; 1999:79, 82-99.
- What is the structure of a mature human sperm cell? Erişim: http://www.biology.lifeeasy.org/95/what-is-the-structure-of-a-mature-human-sperm-cell#.UaRU_kDvhvk Erişim tarihi: 27.05.2013
- Weiss L. *Cell and Tissue Biology A Textbook of Histology*. Ch. 29 The Human Placenta. Padykula HA, Urban&Schwarzenberg Inc., Munchen, 1988:925-27
- Wittekind DH. On the nature of Romanowsky--Giemsa staining and its significance for cytochemistry and histochemistry: an overall view. *Histochem J*, 1983;15(10):1029-47.
- World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of Human Semen*. Cambridge University Press. Fifth Edition, 2010.
- WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeni ve sperm-servikal mukus etkilesimi değerlendirilmesi, çev. ed. Günalp S. Dördüncü baskı. Ankara: Tıp Teknik Kitabevi; 2002: 4-33, 76.
- Young B, Heaty JW. *Wheater's Functional Histology A Text Atlas*; Forty edition, 2000.
- Zavos PM, Correa JR. Effect of treatment of seminal viscosity difficulties with chymotrypsin on the recovery of spermatozoa for assisted reproductive technologies: comparison between the SpermPrep TM filtration and Percoll gradient centrifugation methods. *Middle East Fertility Society Journal*. 1997; (3):223-29.

9. EKLER

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2012/12

Toplantı Tarihi : 27.11.2012

) **Karar Sayısı 2012/205** N.E.Ü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. T.Murad AKTAN'ın, "Normal ve Oligospermik Örneklerde Belirli Histokimyasal Sıvıların Sperm Morfolojisi Değerlendirilmesi için Optimize Dozlarının Floresan Görüntüleme Yoluyla Araştırılması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 14.11.2012 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr. T.Murad AKTAN'ın, "Normal ve Oligospermik Örneklerde Belirli Histokimyasal Sıvıların Sperm Morfolojisi Değerlendirilmesi için Optimize Dozlarının Floresan Görüntüleme Yoluyla Araştırılması" adlı araştırmanın kabulüne oy birliği ile karar verildi.



10. ÖZGEÇMİŞ

1987 yılı Ankara doğumludur. İlköğrenimini 2002 yılında Demirlibahçe ilköğretim okulunda tamamladıktan sonra lise eğitimini Tuzluçayır Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesinde tamamladı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı.2011 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesinde Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.