

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**İNSAN SPERMİNDE KROMOZOMAL
YAPI ANOMALİLERİ İLE HÜCRESEL
OLGUNLAŞMANIN İLİŞKİSİ**

Güler Leyla SATI

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2005

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

İNSAN SPERMİNDE KROMOZOMAL YAPI ANOMALİLERİ İLE HÜCRESEL OLGUNLAŞMANIN İLİŞKİSİ

Güler Leyla SATI

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ramazan DEMİR**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2004.02.0122.009)

“ Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir”

Antalya, 2005

ÖZET

Sperm olgunlaşması ve fonksiyonunun biyokimyasal belirteçleri günümüzde önemli bir araştırma konusudur. Sadece olgun spermelerin Hyalüronik Asit'e (HA) bağlanabildikleri önceden ortaya konmuştur. Böylece, klinik uygulama amacıyla, HA'ye bağlanma ile olgun ve normal kromozomal yapılı sperm seçimi, İntra Sitoplazmik Sperm İnjektasyonu (ICSI) için güvenli ve etkili bir çözüm sağlayabilir. Spermatogenetik kusurların, insan spermatozoasında karyotipik değişikliklere ve yapısal kromozom sapmalarına sebep olduğu bilinmektedir. Fertilizasyon yeteneği ve sperm konsantrasyonu düşük olan erkeklerde, anormal karyotipli sperm görülme sıklığı artar ve bu erkekler genellikle ICSI ile tedavi olan kişilerdir. Dolayısıyla bu çalışmada, sperm hialüronik asite bağlanabilme ya da bağlanmama özelliğine dayanarak, farklı yöntemlerle sperm kromatin yapısı, hücresel olgunluğu ve kromozomal yapısı arasındaki potansiyel ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada, normozoospermik ve oligozoospermik örneklerden sperm hazırlanarak ve gerek seçilmemiş gerekse HA ile seçilmiş spermatozoalarda anilin mavisi boyaması ile kromatin, CK-B immünoflorasan boyaması ile hücresel matürasyon değerlendirildi. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) tekniği kullanılarak semen, HA'ye bağlanan ve HA'ye bağlanmayan spermelerin üç boyutlu yapı değişiklikleri incelenerek, bağlanan spermelerin ince yapısı ile hücre membranı bütünlüğü ilişkisi kıyaslandı. Ayrıca hamster ya da fare ovositleri, metafaz aşamasında bulunan insan spermine ait kromozomların değerlendirilmesi için kullanıldı.

Uygulanan farklı teknikler sonucu, HA'ye bağlanma yeteneği ile sperm olgunlaşması arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu görüldü. Bağlanan sperm matür tipte kromatin yapısına sahipken sitoplazmik tutulum göstermedi. Elde ettiğimiz veriler, sperm plazma membranında yer alan HA bağlayıcıları vasıtasıyla hialüronik asite bağlanma özelliğinin, tamamlanmış bir spermiyogenetik olgunlaşmayı ifade ettiği kanaatini vermektedir.

Sonuç olarak, spermiyumun HA'ye bağlanma kapasitesi ile sitoplazmik tutulum (CK-B) düzeyi ve olgunlaşması, dolayısıyla kromatin organizasyonu arasında bir ilişki vardır. Spermiyuma ait RNA'larla ilgili yeni bilgilerden yola çıkarak, fertilizasyondaki kompleks mekanizmaları aydınlatılabilmek için moleküler düzeyde araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sperm matüritesi, fertilizasyon, hialüronik asit sperm seleksiyonu, ICSI, kromozomal anomaliler.

ABSTRACT

Biochemical markers of sperm maturity and function are important research subjects in the last years. It has been concluded that only mature sperm are able to bind to Hyaluronic acid (HA). Thus, HA sperm selection provides a new, safe, and efficient solution for selection of mature, chromosomally normal sperm for clinical application in assisted reproduction. It is well known that spermatogenetic defects may also cause structural chromosomal aberrations, or karyotypic changes in human spermatozoa. Indeed, in men with diminished sperm concentrations and lowered fertility, the frequencies of sperm with abnormal karyotypes are increased and these men are candidates for Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI). Therefore, in the present study it has been purposed to investigate the potential relationship between chromatin maturity, cellular immaturity and chromosomal structure in human sperm by using different techniques based on their ability to bind HA.

In the present study, after preparation of samples originated in oligospermic and normospermic men, the sperm chromatin maturity and cellular maturity were assessed by aniline blue staining and CK-B immunofluorescence staining respectively, in HA-bound and unbound sperm fractions. Three dimensional structural changes were examined by Transmission Electron Microscopy (TEM), and ultrastructural properties and membrane integrity were compared in semen, HA-bound or –unbound sperm fractions. On the other hand, hamster or mouse oocytes were used to see human sperm chromosomes at metaphase stage.

It has been shown that there was a strong relationship between sperm maturity and the ability of HA-binding after application of different techniques. HA-bound sperm showed no cytoplasmic retention having mature chromatin structure. Our data supported the idea of sperm binding to HA via the plasma membrane receptors represents unequivocal evidence of completed spermiogenetic maturation.

As a result, HA-binding capacity and the extent of cytoplasmic retention in individual sperm are related to each other and also to chromatin maturity. Further investigations needs to be done on molecular level based on the recent knowledge on spermatozoal mRNA to highlight the complex mechanisms about fertilization.

Key Words: Human sperm maturity, fertilization, Hyaluronic acid sperm selection, ICSI, chromosomal aberrations.

TEŞEKKÜR

Yazar, bu çalışmanın gerçekleşmesinde katkılarından dolayı, aşağıda adı geçen kişi ve kuruluşlara içtenlikle teşekkür eder.

Sayın Prof. Dr. Ramazan DEMİR ve Prof. Dr. Gabor HUSZAR tezimin gerçekleşmesi için her türlü desteği sağlamışlardır.

Huszar Laboratuvarı tezin maddi desteğinin büyük bir kısmını karşılamıştır ve çalışanları Lynne VIGUE, David BENNETT tezin gerçekleşmesinde önemli katkılarda bulunmuşlardır.

Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Karşılaştırmalı Tıp, Transgenik Hayvan Birimi ile Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji bölümü, IVF Laboratuvarı tez boyunca ihtiyacımız olan her türlü araç-gereç kullanımına müsaade ve yardım etmişlerdir. Birim başkanları Dr. James MCGRATH ve Dr. Denny SAKKAS teknik ve bilimsel açıdan büyük katkılarda bulunmuştur.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanları tezim süresince bir kısmını Yale Üniversitesi'nde tamamlamam için göstermiş oldukları toleranslarıyla ve ihtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olmuşlardır. Çalışanlarından Dr. Çiler Çelik ÖZENCİ ve Arş. Gör. Sevil ÇAYLI tezin her aşamasında çok büyük katkılarda bulunmuştur.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Androloji Laboratuvarı ve TEMGA Ünitesi çalışanları tezimin gerçekleştirilmesi için her türlü imkan ve desteği sağlamışlardır.

Son olarak, sevgili ailem tezimin gerçekleşmesinde maddi ve manevi olarak her zaman destekleyici olmuştur.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii-ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x-xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iii-xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
GİRİŞ ve AMAÇ	1-2
1.1. Hipotezin temeli ve amaç	
TEMEL BİLGİLER VE KAYNAK	3-34
2.1. Tarihsel yaklaşım	3-3
2.2. Testis ve bağlı kanalların gelişimi	3-4
2.3. Testisin genel yapısı	5-6
2.3.1. Seminifer tübüller	6-6
2.3.2. Sertoli hücreleri	6-7
2.3.3. Leydig hücreleri	7-7
2.4. Germ hücreleri ve oluşum süreci	7-7
2.4.1. Spermatogonya	7-7
2.4.2. Spermatozitler	7-8
2.4.3. Spermatidler	8-8
2.5. Nükleustaki değişimler Nükleik asitlerin, proteinlerin sentezi ve haploid gen ekspresyonu	9-9
2.6. Deney modellerinde ve İnsanlarda Spermatogenik siklus	9-10
2.7. Spermatogenezin endokrin ve parakrin kontrolü	10-11
2.8. Spermatogenezin verimliliği	11-11
2.9. Spermiyumun Görevi Fertilizasyon	12-13
2.10. Sperm Ultrastrüktürü ve Programlanmış Görevleri	13-13
2.10.1. Kuyruk	13-13
2.10.1.1. Aksonom	13-14
2.10.1.2. Bağlantı parçası	14-14
2.10.1.3. Dış yoğun fibriller	15-15
2.10.1.4. Orta parça	15-15
2.10.1.5. Esas parça	15-15
2.10.1.6. Terminal parça	15-15
2.10.2. Baş	16-16
2.10.2.1. Akrozom	16-18

2.10.2.2.	Nükleus	18-18
2.10.2.3.	Sitoplazmik damla	19-19
2.10.2.4.	Plazma membranı	19-20
2.11.	Spermatozoanın Kromozomal Özellikleri	20-20
2.11.1.	Kromozom Analizi; Sitogenetik	20-20
2.11.2.	Kromozomların morfolojik özellikleri	20-20
2.11.2.1.	Sentromer (ilksel büzüntü ya da ilksel darlık)	20-21
2.11.2.2.	Sekonder darlık	21-21
2.11.2.3.	Satellit(uydu)	21-21
2.11.2.4.	Kromomer	21-21
2.11.2.5.	Kromatin	21-22
2.11.2.6.	Kromonema	22-22
2.11.3.	Kromozomları adlandırma sistemi	22-23
2.11.3.1.	A Grubu Kromozomlar	23-23
2.11.3.2.	B Grubu Kromozomlar	23-23
2.11.3.3.	C Grubu Kromozomlar	23-23
2.11.3.4.	D Grubu Kromozomlar	23-23
2.11.3.5.	E Grubu Kromozomlar	23-23
2.11.3.6.	F Grubu Kromozomlar	24-24
2.11.3.7.	G Grubu Kromozomlar	24-24
2.11.3.8.	Eşey (“Gonozomal”) Kromozomları	24-24
2.11.4.	Kromozom biçimi	24-24
2.11.5.	Kromozom Düzensizlikleri	24-25
2.11.5.1.	Kromozomlardaki Sayısal Düzensizlikler	25-28
2.11.5.2.	Kromozomlardaki Yapısal Düzensizlikler	28-31
2.12.	İnsan spermatogenezinin genetik bozuklukları	31-32
2.13.	Sperm analizi	32-32
2.14.	Genetik bozukluklar ve yeni nesil	32-33
2.15.	Sperm matürasyonunun biyokimyasal belirteçleri	33-33
2.15.1.	Kreatin-N- Fosfo Kinaz (CK) ve HspA2	33-34
2.15.2.	Anilin Mavisini Boyaması	34-34

GEREÇ VE YÖNTEM 35-42

3.1.	Sperm örneklerinin toplanması	35-35
3.2.	Sperm-Hyalüronik Asit Bağlanması (Sperm HBA testi)	35-36
3.3.	Sperm kromatininin değerlendirilmesi Anilin Mavisini	36-36
3.4.	Sperm hücre matürasyonunun değerlendirilmesi: CK İmmüno Floresan Boyaması	36-36
3.5.	Sperm Ultrastrüktürü için TEM Metodu	36-36
3.5.1.	Sperm İncelemeleri İçin Transmisyon Elektron Mikroskopu (TEM) Protokolü	37-38
3.6.	HA’ye bağlanma özelliği ve Karyotip Analizi	38-38
3.6.1.	Kullanılan teknikler	38-38
3.6.2.	İnsan Sperminin Hazırlanması	38-39

3.6.3.	Dondurulmuş hamster ovositleri	39-40
3.6.4.	Taze Ovosit Toplanması, Sperm ile Ko-inkübasyon	40-41
3.6.5.	Fiksasyon ve Kromozom Yaymalarının Hazırlanması	41-42
3.6.6.	Kromozom bantlarının Analizi: G- Banding	42-42
3.7.	İstatistiksel Analiz	42-42
BULGULAR		43-57
4.1.	HA'ye bağlanma ve kromatin matürasyonu	43-44
4.2.	HA'ye bağlanma ve hücrel matürasyon: CK-B immunofluoresan boyama	44-45
4.3.	TEM Bulguları	46-46
4.3.1.	HA'ye bağlanan spermiler	46-46
4.3.2.	HA'ye bağlanmayan spermiler	46-46
4.3.3.	Semen örneği	46-47
4.4.	HA'ye bağlanma ve yapısal kromozomal anomaliler	52-52
4.4.1.	Metodoloji ve değerlendirmeler	52-52
4.4.1.1.	Dondurulmuş Hamster Ovositleri	52-52
4.4.1.2.	Fare Ovositlerine İnsan Spermisi İnjeksiyonu	53-53
4.4.1.3.	Fare ya da Hamster Ovositlerinin İnsan Spermisi ile İnkübasyonu	53-53
4.4.1.4.	Zona pellusida'nın uzaklaştırılması	53-54
4.4.1.5.	İnkübasyon Medyumu	54-54
4.4.1.6.	İnsan Spermisi- Hamster Ovositisi İnkübasyon Süresi	55-55
4.4.1.7.	Hamster Ovositlerinin Etanol ile Aktivasyonu	55-55
4.4.1.8.	Fiksasyon tekniği	56-57
TARTIŞMA		58-62
SONUÇLAR		63-63
İLERİ ARAŞTIRMA UFKU		63-63
KAYNAKLAR		64-72
ÖZGEÇMİŞ		73-73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AAK	:	Araldit Ana karışımı
AgNO₃	:	Gümüş nitrat
AMH	:	Anti-müllerian hormon
ATPaz	:	Adenozin tri fosfataz
BDMA	:	n-Benzildimetilamin
BSA	:	Sığır serum albümin
BWW	:	Biggers, Whitten, ve Whittingham medyumu
Ca	:	Kalsiyum
CaCl₂	:	Kalsiyum klorür
CK	:	Kreatin-N-Fosfokinaz
CO₂	:	Karbon dioksit
DDSA	:	Dodesenil süksinik anhidrid
DER	:	Düz endoplazmik retikulum
DNA	:	Deoksiribo nükleik asit
DÖFO	:	Döllenmiş fare ovositi
FBS	:	Fetal sığır serumu
FISH	:	Floresan in situ hibridizasyon
FSH	:	Folikül stimulan hormon
hCG	:	İnsan koryonik gonadotropini
HA	:	Hyalüronik Asit
HBA	:	Hyalüronik asite bağlanma Testi
HSA	:	İnsan serum albümini

Hsp-70	:	Isı şoku proteini 70 (fare)
HspA2	:	Isı şoku proteini A2 (insan)
HTF	:	İnsan tubal sıvısı
ICSI	:	İntra sitoplazmik sperm injeksiyonu
IRPA	:	İnjesiyon ilişkili partenogenetik aktivasyon
IVF	:	In vitro fertilizasyon
KCl	:	Potasyum klorür
LH	:	Luteinizan hormon
LDHC4	:	Laktat dehidrogenaz-C4
Mg	:	Magnesium
MIS	:	Müllerian inhibitör madde
mHTF	:	Modifiye edilmiş insan tubal sıvısı
mRNA	:	Haberci ribo nükleik asit
NOR	:	Nükleolar organize edici bölge
PB-suc	:	Sükroz içeren fosfat tamponu
PMSG	:	Pregnant mare serum gonadotropin
PN	:	Pronükleus
PVP	:	Polyvinylpyrrolidone6
PZD	:	Parsiyel zona diseksiyonu
RNA	:	Ribo nükleik asit
rRNA	:	Ribozomal Ribo nükleik asit
SAIM	:	Salin imidazol tuz solüsyonu
SDS	:	Sodyum dödesil sülfat
SRY	:	Seks-belirleyici Y gen bölgesi

SUZI	:	Sub zonal inseminasyon
TALP	:	Tyrodun albumin-lactat-prüvati
TBF	:	Testis belirleyici faktör
TEM	:	Transmisyon elektron mikroskobu
WHO	:	Dünya sağlık örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>Sayfa</u>
1.	Hyalüronik asit ile kaplı Cell-Vu Slaytı	37
2.	Pisum sativum ile boyanmış insan spermleri.	40
3.	Hamster ovositlerinin dondurulduğu ticari kamışlar.	41
4.	Çözülmüş hamster ovositlerinin IVF medyumunda içerisindeki görünümü.	41
5.	Fiksasyon sonrası hamster ovositi içinde görülen insan spermleri.	43
6.	İşlem görmemiş semen ve HA'e bağlanan sperm örneklerinde görülen anilin mavisi boyaması.	44
7.	Semen ve HA'e bağlanan sperm gruplarında Anilin mavisi ile açık, orta veya koyu olarak boyanan sperm yüzdeleri.	45
8.	İşlem görmemiş semen ve HA'e bağlanan sperm örneklerinde görülen CK-B immunofloresan boyanma görüntüleri.	46
9.	Semen ve HA'e bağlanan sperm gruplarında CK-B immunofloresan boyanma yüzdelerinin gösterilmesi.	46
10.	HA'e bağlanan sperm örneklerine ait TEM görüntüleri.	48
11.	HA'e bağlanan sperm örneklerine ait TEM görüntüleri.	49
12.	HA'e bağlanmayan sperm örneklerine ait TEM görüntüleri.	50
13.	HA'e bağlanmayan sperm örneklerine ait TEM görüntüleri.	51
14.	Semende görülen normal ve anormal morfolojideki spermlere ait TEM görüntüleri.	52
15.	Fiksasyon işlemi sonrasında hamster ovositine ait kromozomlar ve kromatin yapısı ile hamster ovositi içerisinde görülen dekondense olmuş sperm başları.	53
16.	ICSI için hazırlanan özel odacık.	54
17.	Hamster embriyolarında gözlenen polispermi durumu	56

- 18.** Fiksasyon tekniğinin değerlendirilmesi için poli-lizin ile kaplanmış ya da kaplanmamış lamaların kullanılması. **57**
- 19.** Dölllenmiş fare ovositinin (DÖFO) fiksasyondan sonra KCl ile farklı inkübasyon sürelerine bağlı kromozom yaymaları. **58**

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>Sayfa</u>
1.	Zona pellusidanın uzaklaştırılması için farklı solüsyonların kullanılması ile elde edilen pronükleus sayıları.	55
2.	Farklı konsantrasyon ve sürede tripsin muamelesi sonucu gözlenen pronükleus sayıları.	55
3.	Etanol ile ovositlerin aktive edilmesi sonucu elde edilen pronükleus sayıları.	56
4.	Farklı çalışmalara ait karyotipleme başarı oranlarının karşılaştırılması.	59

GİRİŞ ve AMAÇ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada, sperm olgunlaşması ve fonksiyonunun biyokimyasal belirteçleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Semenlerinde, yüksek kreatin fosfokinaz B isoformu [1] bulunan erkeklerin fertilité şansı düşüktür, bu semen örneklerindeki spermelerin ise büyük ve anormal şekilli baş morfolojisine sahip olduğu bilinmektedir [2-6]. Spermiyogenezin son evrelerinde gerçekleşmesi gereken fazla sitoplazmanın atılımının doğru şekilde gerçekleşmediği durumlarla (sitoplazmik tutulum), spermde yüksek CK-B aktivitesi arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir [2, 4] Bu tür spermeler, yüksek CK-B konsantrasyonuna ve fazla sitoplazmik tutulumu sahip olup, azalmış olgunlaşma ve fonksiyon gösteren spermelerdir [1, 2, 4, 5, 7]. Son yıllarda, ısı şoku [8] proteini A2 [9] olarak tanımlanan (70 kDa testis – spesifik şaperon protein ailesinin bir üyesi) bir proteinin, sitoplazmik atılım ile eş zamanlı olarak sentezlendiği ve regüle edildiği gösterilmiştir [4]. HspA2'nin varlığı, olgun sperm bir karakteristiğidir ve sperm fertilizasyon kapasitesi hakkında bilgi verir [9]. Bu bilgi, Huszar ve arkadaşlarının “sitoplazmik tutulumu sahip olgun olmayan spermeler, zona pellusidaya yetersiz bağlanma göstermiştir” şeklindeki bulguları ile desteklenmektedir [10].

Daha önce yapılan çalışmalarda, insan spermünde kromozomal anöplidiler ve hücresel olgunluk arasındaki ilişkiyi gösteren sonuçlar bulunmaktadır. Bu temel sonuçlar şöyle özetlenebilir: i) Sperm enzimi laktat dehidrogenaz-C4 (LDHC4), mayotik sürecin başlamasında, gelişen erkek germ hücresinde ifade edilmektedir. Düşük HspA2 proteini oranları ve sitoplazmik tutulumlu sperme sahip erkeklerin yaklaşık %40'ının düşük sperm laktat dehidrogenaz-C24 (LDHC24) konsantrasyonları gösterdiği de ortaya konulmuştur [11]. (ii) Ayrıca insan spermünde, fare Heat-shock proteini70–2 (HSP70–2) şaperon proteininin insan homoloğu olan HspA2'nin tanımlanması oldukça önemlidir. Çünkü insan erkek germ hücrelerindeki HspA2, spermatositlerde ve terminal spermiyogenezde (daha çok uzamış spermatidlerde ve spermelerde) olmak üzere iki önemli noktada ifade edilmektedir [9]. Bu proteinin yokluğunun, hem sitoplazmik atılımın başarısızlığına hem de mayotik sürecin kusurlarına bağlı olabileceği düşünülmektedir. (iii) Kemirici modelde, 70 kDa şaperonun sinaptonemal kompleksin bir parçası olduğu ve HSP70-2 nakavt fare modelinde erkeklerde mayotik sürecin bozulduğu da ileri sürülmektedir [8, 12, 13]. Sperm oluşum sürecinde, mayoz boyunca sinaptik anomaliler, kromozomal anomaliler ve erkek infertilitesi birbirleri ile ilişkilidir. Bu kromozomal anomalilerde temel faktör, büyük bir olasılıkla, HspA2'nin düşük ekspresyonu ve mayotik kusurlarla ilgilidir.

Bu kaynak bilgiler araştırmacıları, olgun ve olgun olmayan spermatozoa'da kromozomal anöplidilerin insidansını araştırmaya yöneltmiştir. Olgun olmayan spermeler, sitoplazmik tutulumun varlığı vasıtasıyla tanımlanmıştır. İki sperm popülasyonunda anöplidiler, üç-renkli (X, Y ve 17 kromozom problemleri) fluoresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile sentrometrik kromozom problemleri kullanılarak belirlenmiştir [14]. Farklı olgunluk aşamasında olan spermelerde, anöplidiler frekanslarının da farklı olduğu ve Y kromozomu üzerinde yapılan çalışmalarda,

sitoplazmik tutulum ile anöploidi frekansı arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur ($r=0.78-0.7$) [14]. Çünkü olgun olmayan spermde sitoplazmik tutulum, sperm şeklinin değişmesine de neden olur. Olgunlaşma geriliği (immaturite) ve kromozomal anöploidiler de sperm morfolojisi ile ilişkili değildir [15].

Spermatogenetik kusurlar, insan spermatozoasında karyotipik değişikliklere ve yapısal kromozom sapmalarına neden olabilir. Fertilizasyon oranı ve sperm konsantrasyonu düşük olan erkeklerde, anormal karyotipli sperm görülme sıklığı artar ve bu erkekler genellikle ICSI ile tedavi olan kişilerdir. Bu yöntemde, kullanılacak olan sperm bir embriyolog tarafından tamamen morfolojik yapısına ve hareketliliğine bakılarak seçilmekte ve direkt ovosit içine injekte edilmektedir. Ancak, bu uygulama şekli ile ICSI yöntemi erkek infertilitesinin ideal bir çözümü olmaktan oldukça uzaktır; çünkü embriyolog tarafından tamamen subjektif kriterlere dayanarak seçilen spermde genetik bozukluklar bulunabilir. Bununla birlikte ICSI yöntemi ile dünyaya gelen çocuklarda, normal yolla dünyaya gelen çocuklardakine göre, 4-5 kat artmış oranda seks kromozomu anomalisi olması ilginç bir tartışmayı gündeme getirmektedir [16].

Sperm maturitesi ve genetik içeriği arasındaki ilişki, ICSI yönteminin klinik uygulanmasında önemlidir. Bu bakımdan FISH yöntemi oldukça güvenilir bir yöntem olmasına rağmen çok zaman alıcıdır; ayrıca, FISH uygulanarak genetik yapısı belirlenen bir sperm ICSI yöntemi için kullanılamaz. Dolayısıyla, sperm seçiminde kullanılabilecek hızlı ve doğru bir yöntem ihtiyacı vardır.

Olgun ve olgun olmayan spermatozoa'nın hyalüronik asite (HA) cevapta uzun-süre hareketli kaldığı ve artmış hız gösterdiği bilinmektedir [4, 17, 18]; muhtemelen bu işlem bir reseptör ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir. Sperm olgunlaşması ve plasma membranının yeniden modellenmesi arasındaki ilişkiye dayanarak, olgun olmayan spermde değil de olgun spermde HA reseptörünün varlığı [19, 20], HA kaplı bir yüzey, ICSI için kromozomal anomaliler bakımından düşük frekansa sahip, olgun bir sperm seçimini kolaylaştırabilir. Gerçekten, HA seçimi, diploidi ve disomili spermleri elimine eder. HA deneylerinde gözlenen seks kromozom disomilerinin 4 kat azalışı, ICSI çocuklarında kromozomal sapmalarda rapor edilen artış ile tutarlıdır. Örnek farklılıklarına karşın, HA-bağlı fraksiyonlarda diploidi ve anöploidi oranları insan zona pellusidasına bağlanan sperm popülasyonu ile karşılaştırılabilir (% 0.04-0.13'lük dar bir aralığa düşmektedir). Bu nedenle, klinik uygulamada HA'ye bağlanma ile sperm seçimi, olgun ve normal kromozomal yapı spermilerin seçimi için güvenli ve etkili bir çözüm sağlayabilir [4, 17]. Bu bilgiler ışığında hipotezimiz insan spermi nukleer materyali anormalileri ile sperm olgunlaşma süreci arasında bir ilişki olabilir. Dolayısıyla amacımız, sperm hyalüronik asite bağlanabilme ya da bağlanamama özelliğine dayanarak, farklı yöntemlerle sperm kromatin yapısı, hücresel olgunluğu ve kromozomal yapısı arasındaki potansiyel ilişkiyi araştırmaktır.

TEMEL BİLGİLER VE KAYNAK

2.1. Tarihsel Yaklaşım

Tüm ileri gelişmiş organizmalarda olduğu gibi, insanlarda da soy sürdürme eşey hücreler aracılığıyla olmaktadır. Soy devamlılığı, erkek ve dişi gametlerin birlikteliğinin -birleşmenin- sonrasında yeni oluşan hücre birimine dayandırılmış bir gizemin başlangıcını ifade eder. Bu bağlamda eşey hücrelerinin varlığı yeni birey oluşumunda temel faktördür. Bu faktörlerden “atak” davranan erkek hücrenin kaynağı, erkek gonad (testis) ile ifadesini bulur. Erkek gonadların görevlerini anlamak için insanoğlu uzun uğraşlar vermiştir. Merak edileni anlamak ve pratikte ne işe yaradığını belirlemek ve ‘bilim-bilgi’ üretme amacına göre bilinmeyi öğrenme isteği, her alanda gelişen bugünkü bilgi düzeyinin hazırlayıcısı olmuştur. İşte insanoğlunun soy devamlılığını sağlayan eşey hücrelerinin gizemliliği ve oluşturdukları yeni oluşumlar, bu bağlamda anlaşılabilmiştir.

Kısırlaştırmanın (kastasyon) etkisi antik çağlarda dahi bilinmesine rağmen [21], testis ve fertilité arasındaki ilişki 17. yüzyıla kadar açık değildi. Aristo, iö 400 yıllarında testiküler anatomiye gösteren oldukça doğru çizimler yapmıştır, fakat testislerin fertilité için gerekliliği bilinmiyordu. De Graaf tarafından yapılan incelemeler sonucunda, testislerin genel yapısı ve fonksiyonu doğru bir şekilde gösterildi [22]. Graaf’ın gözlemlerini takiben 1667 yılında, van Leeuwenhoek spermatozoayı seminal sıvı içerisinde gözlemledi [22]. Von Kölliker’in çalışmalarına değin, spermatozoayı üreten birimler (seminifer tübüller) ve spermatozoanın oluşumu arasındaki ilişki net olarak bilinmiyordu. Bu araştırmacı, spermatozanın seminifer tübüllerde geçirdiği bir seri gelişim süreci sonunda üretildiğini ortaya koydu; spermatozoanın üretimi ile noktalan bu hücresel değişiklikler “spermatogenez” olarak adlandırıldı [23].

Kastasyonun hormonal etkisinin olduğu yine Aristo zamanında bilinmesine rağmen, bu konuya Berthold’un deneysel çalışmaları ışık tuttu [24]. Berthold, horozlarda yaptığı çalışmalarda, kastasyondan sonra ibik yapısında azalma ve ötme eyleminin kaybolmasının, testis transplantasyonu ile geri döndüğünü ve düzeldiğini gösterdi. Bouin ve Ancel adlı araştırmacılar, erkeklik (maskülen) faktörün Leydig hücrelerinden salındığını 1903 yılında ortaya koymasına rağmen [25], testesteronun izole edilmesi ancak 1935 yılında David ve arkadaşları tarafından gerçekleştirildi.

Ondokuzuncu yüzyılın sonlarında mikroskop alanında gerçekleşen ilerlemeler, spermatogenezin özellikleri hakkındaki bilgi dağarcığımızı genişletmiştir. Ayrıca, kromozomların keşfedilmesi, mitoz ve mayoz olaylarının ortaya konulması da erkekte gamet üretimi olayını anlamamızı büyük ölçüde kolaylaştırmıştır.

2.2. Testis ve Bağlı Kanalların Gelişimi

Genetik cinsiyet, fertilizasyon ile sağlanır ve X kromozomuna sahip ovositin X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllenmesine bağlıdır. Gelişmekte olan gonadlar XX veya XY kromozom kompleksine sahip olurlar. Yedinci haftadan önce

gonadların görünümü her iki cinste de birbirine benzer, dolayısıyla “farklanmamış gonadlar” olarak adlandırılırlar. Erkek fenotipinin gelişimi için bir Y kromozomu gereklidir, fakat bu kromozomun yalnızca kısa kolu cinsiyet belirlenmesi için son derece kritiktir. Testis belirleyici faktör (TBF) için gerekli olan SRY geninin, Y kromozomunun-cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleşik olup Y kromozomu, farklanmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir [26-28]. TBF, primer seks kordonlarını uyararak, onların farklanmamış gonadın medulla derinliklerine doğru sokulmasına sebep olur; kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece “rete testis” oluşur. Seks kordonlarının (seminifer kordonlar) kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Tunika albugineanın gelişimi, fetusta testiküler gelişim için çok önemlidir. Gelişen testis, aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozun asılı bağlarından ayrılır ve kendi mezenteri olan “mezorchium” ile asılı hale gelir. Seminifer kordonlar seminifer tübüllere farklanır, onları takip eden tubuli rekti ve rete testis tübül ağı ile bağlantı kurar.

Seminifer tübüller, interstisyel (ara) dokuda yer alan Leydig hücreleri ve destek elemanları oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testesteron ve androstenedione) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genital yolların erkeklik yönünden farklılaşmasını tetiklerler. Testesteron üretimini insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimule eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık dönemde en yüksek değerine ulaşır [28]. Testesterona ek olarak fetal testisler glikoprotein bir hormon olan “antimüllerian hormon” (AMH) veya “müllerian inhibitör madde” (MIS) adı verilen bir hormonu da salgırlar. AMH, destek hücreleri (Sertoli hücreleri) tarafından salgılanır, hormonun salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik (Müllerian) kanalların gelişimini baskılar.

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar, puberteden itibaren lümenleri oluşur. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur:

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

Fötal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, mezonefrik kanalcıklardan türevlenen efferent kanalcıklarla (5-20 adet) devam eder. Bu kanalcıklar, epididimis ile bağlantılıdır. Epididimis distalinde mezonefrik kanal, kalın bir düz kas tabakası kazanır ve deferens kanalını oluşturur. Mezonefrik kanalların kaudal uçlarının lateralinden dışa doğru seminal veziküller gelişir. Bu çift haldeki bezler spermlerin beslenmesini sağlayan salgıyı yaparlar. Seminal veziküllerin kanalı ile uretra arasında kalan mezonefrik kanal bölümü, “ejakulatör” kanal olarak bilinir.

2.3. Testisin Genel Yapısı

Spermatogenez, seminifer tübüllerde gerçekleşen ve sperm üretimi için gerekli olan bir hücrel farklılaşma sürecidir. İnsanlarda, her bir testis genellikle 15-20 ml hacminde, 4 cm uzunluğunda ve 10-15 g ağırlığındadır.

Skrotum içinde, abdomen dışında, bulunan çift testisler, “tunika albuginea” denilen sıkı bir bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Tunika albuginea, ön ve yan yüzlerinde “prosessus vaginalisin” kalıntısı olan tunika vaginalisin, visseral ve pariyetal yaprakları ile kaplanmış [29]. Tunika albugineanın iç yüzeyinden bir bağ dokusu bölmesi (septası) testisin arkasında yer alan “mediastinum” bölgesine doğru uzanır. Bağ dokusundan oluşan bu bölgenin içerisinde anastomozlaşmış bir kanal ağı görünümündeki “rete testis” vardır.

Düz kas fibrillerini de içeren sıkı bağ dokusundan oluşmuş, tunika albuginea kapsülü fizyolojik ve farmakolojik uyarılara cevap olarak, kasılmayı sağlar [30]. Tunika albugineanın iç yüzeyi ise, gevşek bağ dokusu karakterinde ve damardan zengin bir bölge olan “tunika vasküloza” ile komşuluk yapar. Testislerin loblanma derecesi türler arasında farklılıklar gösterir; lobçuklar içerisinde spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tübüller vardır. Seminifer tübüller mediastinum testisten sarmallar şeklinde uzanır ve her bir sarmalın iki ucu “tubuli rekti” denilen düz tübüllerle bağlantılıdır [31]. Böylece, her bir sarmalı oluşturan tübül oldukça katlantılı bir yapı göstererek yüzey alanını genişletir. Tübül sarmallarının oluşması “immatür” Sertoli hücrelerinin gelişim sırasındaki mitotik aktivitenin sonucudur [32]. Tübüller arası dokunun düzeni türler arasında oldukça dramatik değişiklikler gösterir; kan damarları, lenfatikler ve sinir liflerini içerir. Tübüller arası dokudaki Leydig hücreleri, damarlarla ve seminifer tübüllerin “lamina propriyası” ile ilişkili olarak gruplar halinde dağılmıştır. Seminifer tübüllerin dışında ise, “miyoid hücreler” denilen modifiye düz kas hücreleri vardır.

Testisler, insanlarda ve diğer bazı memeli türlerinde fetal ya da erken post-natal hayatta “skrotuma” inerler. Birçok omurgalının testisi abdominal bölgede yer aldığından, insanlardaki bu durum oldukça ilgi çekicidir [33]. İnsanlarda testisin skrotumda yer alması, vücut ısısına göre, 2°C’lik bir ısı farkına neden olur. Bir ya da her iki testisin birden abdominal kavitede asılı kalmasına “kriptorşidizm” denir. Bilateral olarak kriptorşidik olan erkekler infertildirler, ancak unilateral kriptorşidik olan bazı erkekler sperm üretebilirler.

“Spermatik kord” testiste gelen ve giden kan damarlarını, “vaza deferens” ise lenfatikleri ve sinirleri içerir. “Pampiniform pleksus” zengin ven kümesinden oluşur; testis üzerinde testiküler arteri çevreler ve bu arterle kaynaşarak spermatik korda uzanır. İnsanlarda ve birçok hayvanda pampiniform pleksus kompleks bir damar sisteminden oluşur ve “termo-regülasyonda” rol oynar. Bu etkin sistem, kanı testise girmeden önce soğutur ve testisten vücuda dönen kanı ise ısıtır. Bu sistem aynı zamanda testise giden arteriyal kan basıncını kontrol etmede rol alır. Testiküler venlerin kapakçıkları vardır ve genellikle “varikoz” haline gelerek, “varikosel” denilen patolojik duruma neden olabilirler. Varikosellerin daha çok sol testiste gözlenmesinin nedeni muhtemelen testiküler venin renal vene katılırken yaptığı “dik açıdan” kaynaklanabilir. Varikosel sonucunda skrotum içi ısının arttığı ve fertilitiyi

etkilediği öne sürülmektedir [34]. Ayrıca varikoselin, testiküler hacimde bir azalmaya ve Leydig hücre salgısında da düşüşe neden olduğu bildirilmiştir.

2.3.1. Seminifer Tübüller

Her evredeki germ hücreleriyle bunları destekleyen Sertoli hücrelerini içerirler. Testis hacminin %85-90'nını oluştururlar. Sertoli hücreleri sayıları değişmeyen, bölünmeyen hücrelerdir. Tübülün bazal membranına otururlar. Birbirlerine sıkı bağları vardır ve böylece kan-testis bariyerini oluştururlar. İmmun sistemin kendiliğinden tanıma “self recognition” döneminden çok sonra pubertede spermatozoa ortaya çıktığından bu bariyer önemlidir. Sertoli hücreleri, gelişen germ hücrelerini beslemenin yanında özüllü olanları fagosite etmekle de görevlidir. Tübül lümenine yaklaştıkça spermatosit ve spermatidler gözlenir. Olgun spermiumlar Sertoli hücreleri ile simbiyotik bir evre yaşarlar. Tübülün bazal membran tarafında ve bazal lamina üzerinde spermatogonyumlar bulunur.

Germinal ya da spermatojenik hücreler bazal membrandan lümenine doğru aşama aşama erişkinleşerek sıralanır. Spermatogonyumlar bazal membran üzerine direkt otururlar. 13 değişik aşama gösteren germ hücreleri lümenine doğru, tübül duvarında segmental olarak gözlenirler. Primitif hücreler (spermatogonya) bölünerek yenilediği gibi sonradan spermatosit olacak olan hücelere de dönüşürler. Spermatositler, bölünerek gelişim aşamasına katılır ve spermatidleri oluşturur. Bu aşamaya kadar olan olayların tümüne “spermatogenez” adı verilir. Spermatidler de değişime uğrayıp spermatozoayı oluştururlar ki bu aşamaya da “spermiyogenez, spermiyohistogenez (ya da spermiyositogenez)” denilir. Bu değişim, çekirdeğin yoğunlaşması, Golgi yıkımı sonucu akrozom belirmesi, sentriyol göçü, sitoplazmanın büyük oranda kaybı, kuyruğun gelişip spermin ortasındaki mitokondriya ile ilişkili hale gelmesi olaylarını kapsar.

2.3.2. Sertoli Hücreleri

Bu hücreler, seminifer tübülün periferinden lümenine doğru uzanan diploid hücrelerdir. Spermatogenez esnasında çok önemli rol oynarlar. En önemli fonksiyonları germ hücrelerinin farklılaşması için gerekli çevreyi sağlamaktır. Bütün germ hücre serisi ile kontakt halindedirler. Sertoli hücrelerinin bazal kısımları, seminifer tübülün bazal laminası ile ilişkidir dolayısıyla sistemik sirkülasyonla gelen maddelere direkt olarak erişebilirler. Spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri gibi bazal lamina üzerinde yer alırken, spermatojenik hücre serisinin diğer hücreleri Sertoli hücreleri tarafından oluşturulmuş kompartımanlar içinde yerleşiktirler.

Sertoli hücrelerinin mikroskobik yapısı oldukça karmaşıktır. Çok miktarda düz endoplazmik retikulum (DER) ve mikroflamanlar kümesi şeklinde belirgin bir hücre iskeletine sahiptirler. En önemli özellikleri ise özelleşmiş bağlantı kompleksleridir. Çeşitli tiplerde bağlantılar kurarlar ve hücre-hücre kontaktlarını sürdürürlerken ayrıca germ hücre serileri ile de iletişim halindedirler. Şüphesiz ki, en önemli bağlantı Sertoli-Sertoli hücresi arasında kurulan sıkı bağlantıdır ve bu bağlantı özelliği hücreleri sıkıca bir araya getirerek, bazı maddelerin geçişine engel olmaktadır. Bu bağlantı kompleksleri, kan-testis bariyerini oluşturur. Dolayısıyla seminifer tübüllerde iki kompartıman mevcuttur: Seminifer tübülün periferinden hücreler arası bağlantı kompleksine kadar olan “bazal” kompartıman ve bağlantı

kompleksinden tübülün lümenine doğru uzanan “adlüminal” kompartıman. Spermatogonya bazal kompartımanda yer alırken ardından gelen spermatogenik hücre serisi ise adlüminal kompartımanda yer alırlar.

2.3.3. Leydig Hücreleri

Seminifer tübüller arasındaki bağ dokusunda bulunurlar ve kan damarları etrafında kümelenirler. Steroid biyo-sentezinde gerekli olan iyi gelişmiş DER, Leydig hücrelerinin tipik bir özelliğidir. Ayrıca, insanlarda büyüklükleri ve şekilleri değişen ve “Reinke kristalleri” olarak adlandırılan sitoplazmik inklüzyonlara sahiptirler. Bu inklüzyonları içermeyen Leydig hücreleri de bulunabilir ve bu durumda bu tür hücreler “immatür” formdaki Leydig hücreleri olarak kabul edilmektedirler [33]. Leydig hücreleri arasında da sıkı bağlantı kompleksleri vardır.

2.4. Germ Hücreleri ve Oluşum Süreci

2.4.1. Spermatogonya

Diploid sayıda kromozoma sahip olan spermatogonyumlar, seminifer tübülün bazal laminası üzerine dayanık şekilde lokalize olmuşlardır ve sürekli mitoz bölünmeler geçirerek, ya diğer spermatogonyumları ya da farklılaşma sürecine giderek primer spermatositleri üretirler. Spermatogonyumlar üç tiptedirler; i) tip A-A0,A1,A2,A3,A4, ii) ara form ve iii) tip B. Spermatogonyumların gösterdikleri mitoz bölünmeler ya rastgele (yani bölünmeler A0 ile sonuçlanır) ya da senkronizedir (yani bölünmeler spermatogenik sıklusa yöneliktir). Her bir bölünme sonrasında, kardeş hücreler arasında sitoplazmik bağlantılar kalır. Tip B spermatogonya ise spermatosite farklılaşan tipteki spermatogonyadır. Spermatogonyumların bu bölünmelerinin mitotik kinetiği oldukça karmaşıktır ve günümüzde hala tartışmalı bir konudur [35, 36].

2.4.2. Spermatositler

Spermatogonyumların bölünmesi sonucu meydana gelen spermatositler mayoz bölünme geçirerek, haploid sayıda kromozom taşıyan dört adet spermatid meydana getirirler. İlk olarak, homolog kromozomların rastgele ayrılması olur, ikinci olarak da, homolog kromozomlar arasında genetik materyalin değiş tokuşu (crossing over) gözlenir. Bu iki olay türlerin yaşaması için gerekli olan çeşitliliği sağlar.

Mayoz bölünmenin profaz aşaması oldukça uzun bir süreçte gerçekleşir; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez olmak üzere bazı safhalar gösterir. Spermatositler birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasına girdiklerinde, seminifer tübülün bazal membranından lümenine doğru hareket ederler. Homolog kromozomların yanyana geldiği zigoten aşamasında ise, bazal membrandan ayrılırlar. Pakiten aşaması, mayozun ve profaz evresinin en uzun aşamasıdır ve bu nedenle geçen bu süreç zarfında spermatositlerin çeşitli hasarlara maruz kalma şansları en çoktur. Spermatosit-I'ler diploid kromozom (2n) ve diploid DNA miktarı (4DNA) taşırlar. Birinci mayoz bölünme sonucunda bu miktarlar yarıya iner. Birinci mayoz bölünme sırasında genetik materyalin değişimi “kiazma” noktalarından gerçekleşir ve her bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatosit oluşturur. Oluşan sekonder spermatositler çok kısa bir süre varlıklarını sürdürürler ve ikinci mayoz bölünmeye giderek, haploid kromozom sayısına sahip olan iki adet spermatid

meydana getirirler. Mayoz bölünme esnasında, seks kromozomlarının DNA replikasyonu, kondenzasyon ve transkripsiyon zamanlamaları, somatik kromozomlardan farklılıklar gösterir. Spermatozoid-II hücreleri, somatik mitoz bölünmeye benzeyen 2. mayoz bölünme geçirirken, kromozomların kromatidlerine eş oluşturmak için 2DNA'nın yarısını bir kromatin, diğerini de ikinci kromatine eş oluşturmak için kullanır.

2.4.3. Spermatozoidler

Mayoz bölünmeler sonucunda meydana gelen spermatozoidlerin gelişmesi, değişmesi ve seminifer tübül lümenine spermium olarak atılması sürecindeki olaya "spermiyogenez" denir. Spermiyogenez oldukça önemli ve eşsiz bir süreçtir. Çünkü; basit bir hücre özelliğinde olan bir spermatozoid, yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal değişikliklere uğrayarak özelleşmiş bir hücre tipi olan spermatozoayı meydana getirir. Bu değişim mekanizması günümüzde hala açıklanamamıştır [37]. Bu süreçte meydana gelen değişiklikler, bu hücelere özgü olaylardır ve diğer hiçbir hücre tipinde gözlenmez. Spermiyogenez süreci oldukça senkronize ve entegredir, dolayısıyla bu süreç sırasında meydana gelen küçük sapmalar bile infertiliteye neden olabilir; ne yazık ki bu sapmaların ya da hataların nedeni henüz açıklanamamıştır.

Spermatozoid, "spermiyogenezin" başında henüz basit bir hücre tipinde iken, spermiumun temel hücre iskeletini oluşturmak üzere pek çok değişim geçirir. Öncelikle, hücre çekirdeği kromatini daha sıkı yoğunlaşma (kondenzasyon) gösterir. Spermatozoidlerin farklılaşma sürecinde, yapısı diğer hücrelerden daha kompleks olan Golgi kompleksinin sistemaları yıkılarak akrozomal vezikülü oluştururlar; çekirdeğin apikaline göç ederek, çekirdeği üstten saran bir kılıf (takke) gibi gelişen bir akrozom sistemini meydana getirirler. Bu yapının iç membranı, çekirdek membranı ile sıkı ilişkidir. Akrozom, salgı görevinde olan ve hücre çekirdeği ile yakın ilişkide bulunan dev "lizozom" gibi düşünülebilir.

Spermatozoidde bulunan iki sentriyol ise, gelişmekte olan akrozoma zıt yönde göç ederler ve bunlardan bir tanesi ışınsal bir düzenleme göstererek gelecekte oluşacak spermium kuyruğunun "aksonom" yapısını meydana getirirken, bu sentriyole 90°C'lik açıyla konumlanan diğer sentriyol ise, kuyruğu çekirdeğe bağlayan bağlantı parçasını oluşturur. Kuyruğun aksonom parçası uzayarak tabanındaki halka (anulus) yapısına tutunur.

Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, spermatozoidde yer alan mitokondriyonlar bölünürler; dış yoğun fibrillerle ilişkiye geçerek tipik çiftli sarmal (heliks) yapısını meydana getirirler.

Spermiyogenez tamamlandığında, spermatojenik hücre serisindeki hücrelerin Sertoli hücreleri ile olan sitoplazmik uzantıları kırılır ve spermiumlar seminifer tübül lümenine salınırlar. Spermiyogenez süreci Sertoli hücrelerinin desteği ile gerçekleşir; bunun için spermatozoid ile Sertoli arasında "simbiyotik" bir yaşam vardır. Olgun bir spermatozoanın sitoplazmasının yaklaşık %70'i geride kalır ve muhtemelen Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir.

2.5. Nükleustaki Değişimler: Nükleik Asitlerin, Proteinlerin Sentezi ve Haploid Gen Ekspresyonu

Mayoz bölünme sırasında, RNA ve protein sentezi maksimum düzeydedir ve erken spermatogenez sırasında oldukça azalarak, neredeyse sıfır seviyesine iner. Spermatogenez esnasında, hücre çekirdeği somatik hücreye benzeyen “nükleozom” yapısını, memeli spermiyumunun “nükleoprotamin” yapısındaki çekirdek yapısına dönüştürür. DNA sarmalı arasında bulunan histonlar önce geçiş proteinleri (transition proteinler) ile yer değiştirirler ve daha sonra bu geçiş proteinleri de yerlerini “arjininden zengin”, küçük bazik proteinlere, yani protaminlere bırakırlar [38]. Protaminlerin temel görevleri, fonksiyonel bir spermiyum için gerekli olan, hücre çekirdeğinin sıkıca paketlenmesi gibi görünmektedir. Spermiyumun DNA’sı, protaminlerle ilişkiye girerek çizgisel, yan yana olan kromatin ışınlarını oluştururken, somatik hücre DNA’sı histonlar etrafında dolanır. Memeli spermiyum DNA’sı en sıkı şekilde paketlenmiş olan ökaryotik DNA olup mitotik kromozomların DNA’sından en az 6 kat daha fazla “kondanze” dir [38].

“Haploid gen ekspresyonu”, spermiyumun genotip yapısının ve fonksiyonunun aydınlanması için önemli bir konudur. Ancak, bir çok ileri düzeyde moleküler biyoloji tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar olmasına rağmen, “spermiyumun haploid gen ekspresyonu” hala tartışmalıdır. Muhtemel bazı haploid gen ürünleri keşfedilmiştir ve günümüzde bunların gerçekten olup olmadığı ve fonksiyonları yoğun bir araştırma konusudur [39, 40].

Haploid gen ekspresyonuna örnek teşkil edebilecek ve muhtemelen en iyi bilinen örnek “T locus fareidir”. Dominant T aleli homozigot olunca farede kısa kuyruk meydana getirirken, heterozigot olunca ölümcüldür. Bazı resessif T allellerinde ise kuyruksuz hayvanlar meydana gelir. Ayrıca t/t spermiyum fareler sperm üretmelerine rağmen, infertildirler [39].

Bu konuda birçok çalışma yapılmasına rağmen, Mendel kurallarına uymayan bu “genetik aktarım” ve “haploid genom” ile olan ilişkisi halâ bilinmemektedir. Genetik olarak birbirlerinden farklı olan spermatidler, hücrelerin senkronize bölünmesini sağlayan lümen boyutundaki hücrelerarası köprülerle adeta bir “sinsisyum” halindedirler. Bu nedenle, bazı spesifik mRNA’nın spermatidden spermatide bu köprüler aracılığıyla geçtiği ve dolayısıyla bütün “post mayotik” genlerin spermatidler arasında eşit olarak dağıtıldığı ileri sürülmektedir [32, 41, 42]. Bu bütün ürünlerin eşit olarak dağıtıldığı ya da paylaşıldığı anlamına gelmez, ancak ileri araştırma isteyen ilginç bir konudur.

Çeşitli testiküler belirteç (marker) proteinlerinin üretim (ekspresyon) zamanı ve varlıkları biyokimyasal çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ancak, erkek germ hücre olgunlaşması hakkındaki bilgimiz henüz oldukça yetersiz ve sınırlı olup, sürekli bir yenilenme halindedir [39, 43].

2.6. Deney Modellerinde ve İnsanda Spermatogenik Siklus

Birçok hayvan türünde, belli başlı spermatogenik hücreler sadece belli başlı diğer hücreler ile ilişki halindedir. Örneğin; farelerde her bir spermatogonyum bir diğeri ile aynı anda gelişir, dolayısıyla herhangi bir zaman aralığında seminifer tübül

kesiti incelenirse, spermatogonyumdan spermiyuma kadar tüm bir hücre serisi bir arada görülebilir. Bu hücre ilişkisine spermatogenik siklus denir. Gelişmeye başlayan her bir spermatogonyumdan potansiyel olarak 64 spermiyum üretilebilir. İnsanda her bir saniyede 20 adet spermatogonyum spermatogenik sürece başlar. Spermatogenik siklus, spermatogonyumdan spermiyumun atılmasına dek dört ya da beş kez tekrarlanır [32]. Türlerde her bir spermatogenik siklusun süresi sabittir ve 8 ile 16 gün arasında değişir (farelerde 9 gün, insanda 16 gün). İnsanlarda tüm evre 64 gündür, artısı ya da eksisi olabilir.

Yukarıda tanımladığımız türdeki seminifer epitel modeli birçok hayvan türünde mevcut iken, insanda bu model bu kadar açık değildir. İnsan seminifer tübül kesitlerinde, birden fazla değişik spermatogenik siklus seviyesinde olan hücre varlığı ya da bazı germ hücrelerinin birbirleriyle olan ilişkisinin varlığı ya da yokluğu gibi birçok düzensizlikler göze çarpar. Bu da, insanda gerçekleşen spermatogenezin daha düzensiz ya da en azından daha az koordine olduğu yönünde varsayımlara yol açar. 1984 yılında, Schulze ve meslektaşları [44], insan seminifer epitelinin düzeni hakkında bazı kanıtlar ortaya koymuşlardır. Spermatogenezin basamaklarının, seminifer tübülün uzun eksenine heliks şeklinde bir uyum gösterdiğini söylemişlerdir. Yani seminifer epitelin organizasyonu, biyolojide büyüme ve farklılaşmanın temel prensibi olan “spiral geometrisi” plânına uyum gösterir. Dolayısıyla, insanlardaki seminifer epitelin yapısı, düzensiz ya da kaotik değildir, aksine kompleks bir organizasyon gösterir. Bu kompleks düzenlenmeyi kontrol eden mekanizmalar tam olarak bilinmese de, parakrin ve otokrin mekanizmaların rolü olduğu tahmin edilmektedir.

2.7. Spermatogenezin Endokrin ve Parakrin Kontrolü

Hipofiz gonadotropinlerinden olan, folikül stimulan hormon (FSH) ve Luteinizan hormon (LH), spermatogenezin önemli düzenleyicileridirler. LH, seminifer tübüllerin arasında yer alan intersitisyel dokudaki Leydig hücrelerini uyararak, androjen üretimini artırır ve bu androjenin primer etki alanı Sertoli hücreleridir. FSH ise, germinal epitel ve Sertoli hücreleri üzerine etki yapar; androjen üretimine sadece küçük oranda direkt etkiye sahiptir. Kaliteli ve tamamlanmış bir spermatogenez için her iki hormonun kontrolü de gereklidir.

Kontrol mekanizmasını genelleyebilmek, türler arasındaki belirgin farklılıklardan dolayı, oldukça zordur. Ayrıca, birçok araştırma deney hayvanlarında yapılmasına karşın insanda yapılabilecek araştırma sınırlıdır. Bütün bunlardan önemlisi, testis biyokimyası ve fizyolojisi homojen bir yapı olarak düşünülemez. Belki de, spermatogenezin endokrin / parakrin kontrolünü anlamamızın daha geçekçi bir yolu, tübülün her bir parçasını bir “mikrokosmos” olarak düşünmek olmalıdır [45].

Seminifer epitelin, eksojen FSH ve LH uyarısına cevabı lokal faktörler tarafından düzenlenir. Endokrin ve parakrin mekanizmalar arasındaki ilişki testisin fonksiyonlarını belirler. Ancak, bu ilişkinin doğası ve mekanizmaları bu konuda bir çok çalışma yapılmasına rağmen hala tartışmalıdır. Çok sayıda potansiyel parakrin faktörler keşfedilmesine rağmen, bu faktörlerin in vivo fizyolojik etkilerine dair direkt deliller oldukça azdır [45-47].

Testisin çeşitli hücre tiplerinin fonksiyonları birbirleri ile bağlantılıdır örneğin; Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron, peritübüler hücrelere ve Sertoli hücreleri üzerine etki yapar; böylece hem germ hücrelerinin gelişimine önayak olur, hem de damar yapısında bir etki meydana getirir. Dolayısıyla, testosteron testis dokusunda endokrin bir etkiden çok parakrin bir ürün olarak görev yapar [48].

Germ hücresi ile Sertoli hücresi arasındaki ilişkiyi düzenleyen mekanizmalar henüz tam anlamıyla açıklanamamış olsa da, pakiten evresindeki spermatositler, Sertoli hücrelerini stimule ederek “androjen bağlayıcı protein” üretimini ve “adenilat siklaz” aktivitesini stimule ederler. Yuvarlak spermatidlerin hiçbir uyarıcı etkileri olmadığından dolayı bu etkiler hücreye özeldir [49]. Sertoli hücreleri ayrıca, testis içi düzenleyiciler olan “transferin” ve “insülin benzeri büyüme faktörünü” de üretirler. Sertoli hücreleri tarafından üretilen parakrin düzenleyicilerin üretimi ve etkileri, seminifer epitel siklusu tarafından kontrol altındadır. Buna örnek olarak, Sertoli hücrelerinin “transferin” üretimi verilebilir [46, 48, 50].

Sonuç olarak, testiküler germ hücrelerinin büyümesi ve farklılaşması, somatik ve germinal elemanlar arasındaki bir seri kompleks ilişkiyi içerir. Bu ilişkiler endokrin, parakrin ve otokrindir. Bu mekanizmalar, testisin normal fonksiyonu için ince bir denge sağlarlar [51].

2.8. Spermatogenezin Verimliliği

Günümüze dek yapılan çalışmalar bütün türlerin ortak bir özelliğini ortaya koyar; spermatogenez esnasında germ hücrelerinin büyük bir çoğunluğu gelişmelerini tamamlayamazlar. Dolayısıyla, gelişmekte olan germ hücrelerinin büyük bir kısmının dejenerasyonu fizyolojik bir fenomendir [52]. Üç kritik aşamada hücrelerin kaybı söz konusudur; spermatogonyal gelişme, mayotik bölünmeler ve spermiyogenez. Sıçanlarda, A1 spermatogonyumlardan teorik olarak üretilmesi gereken preleptoten spermatositlerin sadece %25’inin üretimi meydana gelir. İnsanlarda, daha gelişmiş teknikler kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, mayoz sırasında potansiyel sperm üretiminin %50’si kaybedildiği belirtilmiştir [53]. Spermiyogenez sırasında ise insanlarda, farelerde, sıçanlarda ve sığırlarda çok az sayıda hücre kaybı söz konusudur. Dolayısıyla, spermatogenez çok verimli bir hücre üretimi süreci değildir ve insanlarda bu verim diğer memelilere göre (sıçanlar, primatlar) sadece %25 dolaylarındadır [53].

Erkeklerde, yaşa bağlı olarak günlük sperm üretiminde bir azalma söz konusudur ve bu azalma Sertoli hücrelerinin kaybı ile ilişkilidir [32]. Bu durum daha çok mayoz bölünmenin profaz aşamasındaki germ hücrelerinin dejenerasyonundan yani primer spermatosit kaybından kaynaklandığı ve aynı zamanda Leydig hücrelerinin, seminifer tübüller arasındaki diğer hücrelerin, miyoid hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin de sayıları azalır [32].

2.9. Spermiumun Görevi Fertilizasyon

İnsan gelişimi bir ovositin fertilize olması ile başlar. Fertilizasyon birbiri ile ilişkili karmaşık moleküler olaylar dizisidir [54], sperm ile ovositin teması ile başlar ve tek hücreli embriyo olan zigotun birinci mitoz bölünmesinin metafaz plağında anne-baba kromozomlarının bir araya gelmesi ile son bulur. Bu olaylar sırasında herhangi bir aşamada bozukluk zigotun ölmesine neden olabilir [55]. Gametlerin yüzeyindeki karbonhidrat bağlayıcı proteinler, fertilizasyon sırasında gametlerin birbirini tanıyıp birleşmesinde rol oynar [56]. İnsanlarda fertilizasyon yaklaşık 24 saat sürer [52].

Fertilizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan aşamalar şu şekilde özetlenebilir:

a. Spermiumun ovositin zona pellusidasını çevreleyen korona radiatayı geçmesi

Ovositin zona pellusidasını çevreleyen korona radiatadaki foliküler hücrelerin birbirinden ayrılması sadece spermiumun akrozomundan salınan hyaluronidaz enziminin aktivitesi ile olmaz [57], tubal mukozal enzimler de hyaluronidaza yardım eder. Korona radiatanın delinmesinde spermiumun kuyruk hareketi önemli rol oynar.

b. Ovosit çevresindeki zona pellusidanın delinmesi

Zona pellusidanın spermium tarafından delinmesi fertilizasyon başlangıcı için önemli bir aşamadır. Akrozomdan salınan enzimler zona pellusidadan geçişte de önemlidir. Bir spermium zona pellusidayı geçerse zona reaksiyonu denilen zona pellusidanın özelliklerinde değişiklikler gerçekleşir ve bu şekilsiz (amorf) tabaka diğer spermiumları geçirmez bir hale dönüşür. Buradaki ekstrasellüler glikoprotein örtünün içeriği fertilizasyondan sonra değişir [58]. Zona reaksiyonunun, ovosit sitoplazmasında membrana yakın korteks granüllerinden salınan lizozomal enzimlerin etkisi ile olduğu düşünülmektedir. Perivitellin boşluğa salınan granüller ovosit plazma membranında değişiklikler yapar ve diğer spermiumların geçmesine engel olur [59-61].

c. Ovosit ve spermiumun plazma membranlarının birleşmesi

Ovosit ve spermiumun plazma membranları birleşir, birleşme noktasından yırtılma olur, spermiumun baş ve kuyruğu ovosit sitoplazmasına girer. Ancak sperme ait plazma zarı dışarıda kalır.

d. Ovositin ikinci mayotik bölünmeyi tamamlaması ve dişi pronükleusun oluşması

Spermium girdikten sonra, ikinci mayoz bölünmenin metafazında bekleyen ovosit bölünmesini tamamlar. Olgun bir ovosit ve ikinci polar cisimcik oluşur. Anneden gelen kromozomların dekonduksiyonu (gevşeyip açılması) ile olgun ovositin nükleusu, dişi *pronükleusu* oluşturur.

e. Erkek pronükleusun oluşumu

Ovosit sitoplazması içerisinde spermium çekirdeği genişleyerek *erkek pronükleusu* oluşturur ve spermiumun kuyruğu dejenerer olur. Morfolojik olarak erkek ve

dişi pronükleuslar ayırt edilemezler. Pronükleusların büyümesi sırasında DNA replikasyonu olur. DNA1-n (haploid) 2c (2 kromatid) içerir.

f.Pronükleusların zarlarının parçalanması, kromozomların kalınlaşması ve mitotik hücre bölünmesi için düzenlenme

Döllenmiş ovosit ya da zigot tek hücreli bir embriyodur. Her bir pronükleustaki 23 kromozomun birleşmesi ile 46 kromozomlu bir zigot oluşur.

2.10. Sperm Ultrastrüktürü ve Programlanmış Görevleri

Spermiyum, kompleks fonksiyonlarını yerine getirebilmek için oldukça özelleşmiş bir morfolojiye sahiptir. Temel olarak iki kısımdan oluşur; enerji üretilmesinden ve hareketlilikten sorumlu olan kuyruk ile DNA'yı içeren ve ovositin zona pellusidasını tanıyarak sperm-ovosit birleşmesini sağlayan baş bölgesi. Bu her iki temel bölge de kendi içlerinde fonksiyonlarına göre alt bölgelere ayrılmışlardır.

2.10.1. Kuyruk

Spermiyumun kuyruk bölgesi, enerji üretim bölgesi olup, sperm hareketinden sorumludur. Fertilizasyonun gerçekleşmesi için hareketlilik gerekli bir özelliktir. Spermiyum, ilk olarak ejakulasyon sırasında hareketli hale gelir ve hareketliliğe post-ejakulasyonun erken dönemlerinden başlayıp, servikal mukusu geçmek, utero-tubal birleşimi geçmek ve ovosite ulaşmak için ihtiyaç duyar.

İnsan spermiyumu kuyruğu dört ana bölgeye ayrılabilir; kısa bir bağlantı parçası, orta parça, esas parça ve son (terminal) parça. Her bir bölgenin fonksiyonuna bağlı olarak farklı yapısı vardır. Bu dört bölge, “aksonom” ve “dış yoğun fibriller” denilen iki diğer yapı ile birlikte seyredir. Bu yapılar dört parçanın bazılarında ortak olduklarından dolayı ayrı yapılar olarak değerlendirilirler.

2.10.1.1. Aksonom

Aksonom ya da aksiyel filaman, spermiyumun kuyruğunun dört parçasında da mevcuttur ve kuyruğun motor parçasını oluşturur. Aksonom yapısı, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan silya ve flagellum yapısına benzer; klasik 9+2 yapısını oluşturan iki adet merkezi mikrotübül ve eşit aralıklarla dizilmiş dokuz adet mikrotübül çiftinden oluşur. Bu benzerliğe dayanarak, spermiyumun hareketini anlamak için yapılan çalışmalar daha düşük omurgalıların kuyruk yapısını inceleyerek yapılmıştır. Dokuz adet periferik mikrotübül çifti saat yönünde birden dokuza kadar numaralanır. Bir numaralı çift, merkezdeki iki mikrotübüle dik olarak yerleşen tek tübüldür. Her bir mikrotübül çifti A subünitesi ve serbest uçları ile A subünitesine tutunan B subünitesinden oluşur. B subünitesi enine kesitte C şeklinde görülür.

Bu mikrotübüllerin esas yapı elemanı α ve β olmak üzere iki formdan oluşan, tübülindir [62, 63]. Tübülün molekülleri, protofilamentleri oluşturmak için sıraya dizilirler ve daha sonra yan yana gelerek mikrotübül duvarını oluştururlar. A tübülü 13, B tübülü ise 10 protofilamentten oluşur. Bu iki form arasındaki elektroforetik hareketlilik, aminoasit kompozisyonu ve fosforilasyon bölgeleri farkı, hem mikrotübüllerin kendi içinde, hem de aralarında yüksek düzeyde heterojeniteye neden olur. Komşu mikrotübülün A tübülünden B tübülüne doğru bir çift uzantı (kollar) vardır. Bu kollar, 24 nm'lik aralıklarla dizilirler ve pozisyonlarına göre “iç”

ya da “dış” adını alırlar. Kuyruk hareketi sırasında bu kollar önemli role sahiptirler; mitokondriyonlarda oluşan kimyasal enerjiyi kinetik enerjiye çevirerek hareketi sağlarlar. Bu kolların temel molekülü $Ca^{+2} Mg^{+}$ bağımlı ATPaz izomer proteini olan “dinein”dir. Dinein kolları, komşu tübüllerin birbirine göreceli olarak kaymalarını sağlar ve aynı kas kasılmasında gözlenen kayan filamanlara benzer bir mekanizma ile kuyruk hareketi meydana gelir [62].

Dokuz adet periferik mikrotübül çifti birbirlerine “neksin” proteininden oluşan bağlarla tutunurlar. Neksin bağları mikrotübül çiftlerin boyları boyunca 96nm’lik aralıklarla dizilmiş olup “aksonom” yapısının simetrisini korurlar. Merkezde yer alan iki mikrotübül birbirine düzenli aralıklarla dizili bağlantılarla bağlanırlar ve bu bağlantı noktalarında mikrotübüllere tutunan bir çift spiral fibrille çevrelenirler. Bu spiral fibriller merkezi kılıf denilen yapıyı oluştururlar. Bunlardan periferdeki her mikrotübül çiftinin A subünitesine ulaşan bir seri ışımsal uzantılar uzanır. Merkezi mikrotübül çiftinin ve bununla ilişkide olan merkezi kılıf ve ışımsal uzantıların fonksiyonları henüz net olarak bilinmemektedir; ancak kuyruk hareketinde rolleri olduğu ileri sürülmüştür [64]. Bu duruma göre merkezi kılıfın iki fibrilli zıt periferik mikrotübül çiftine uzanan ışımsal uzantıları destekler ve merkezi kompleks bir şekilde tetiklenerek periferik çiftlerin “asenkrone” (aynı anda olmayan) kaymalarını sağlar, böylece kuyruk hareketi oluşur. Fakat böyle bir asenkrone aktivasyonun mekanizması henüz açık değildir [64].

2.10.1.2. Bağlantı Parçası

Bağlantı parçası, kuyruk ile sperm başı arasında 0.5 μm uzunluğunda kısa bir parçadır. Ana parçaları; “kapitulum (başçık)” denilen sıkı, kubbe şeklinde bir fibröz yapı ile segmentli kolonlardır. Kafa-kuyruk bağlantısı, kapitulum ve nükleusun kuyruğa bakan yüzeyinde uzanan bazal plâk arasında yer alan çeşitli proteinöz filamanlar tarafından sağlanır. Proksimalde yer alan iki parçalı kolon yapısı kaynaşarak, kapitulumu gömülen iki büyük ve beş küçük kolonları meydana getirirken, distaldeki dokuz kolon üst üste gelerek orta parçadaki dış yoğun fibrillere tutunurlar [65].

Bu kolonların üzerinde, birbirleriyle 6,5 nm aralıklarla dizili enine çizgilenmeler vardır. Segmentli kolonların fonksiyonu henüz net olarak bilinmemekle birlikte, bunların adeta bir eklem gibi bir arada olduğu, dolayısıyla spermin boyun bükme hareketlerine kapitulum-bazal plâk bağlantısına zarar vermeden esneklik sağladığı düşünülmektedir [65].

Kapitulum, kuyruğun uzun eksenine dik olarak uzanan proksimal sentriyölü de içerir. Spermiyogenezin son basamaklarında distal sentriyöl gerilediğinden, proksimal sentriyöl geriye kalan bir çift sentriyöldür. Sentriyoller, spermiyogenez sırasında aksonom yapısının oluşmasında rol alırlar, ancak aksonomun doğru fonksiyonu için gerekli olmadıkları bilinmektedir [66]. Sentriyollerin yapısı aksonom yapısına benzerlik gösterir ancak mikrotübüllerin merkezi mikrotübül çiftini içermez ve aksonomdaki tübüller çiftlerinin yerine periferalde yerleşik üçlü yapılardan oluşan mikrotübüllere sahiptirler [65].

2.10.1.3. Dış Yoğun Fibriller

Her bir mikrotübül çifti, bir dış yoğun fibril ile ilişkedir ve bunlar parçalı kolonların distalinden başlayarak esas parça kısmında sonlanırlar. Enine kesitlerde, dış yoğun fibriller gözyaşı damlası şeklinde izlenirler ve yuvarlak, geniş kısımları dışta, daralan kısımları ise aksonom tarafındadır. Her biri içte medulla ve dışta onu saran korteksten oluşur. Korteks kesintilidir; yani sadece dış kısımda mevcuttur ve içte yoktur. Medulla oldukça kararlı bir yapıdır; ancak, korteks az stabil olup Sodyum Dödesil Sülfat (SDS) uygulaması ile çözünür. Her bir dış yoğun fibril farklı uzunluğa sahiptir; 3 ve 8 nolu fibriller (6 µm), 2,4 ve 7 nolu fibriller (17-21 µm) ve 1,5,6,9 nolu fibriller (31-35 µm) uzunluğundadırlar [67].

Bu fibriller, kasılabilir proteinler içermezler ancak ATPaz ya da Ca^{+2} bağlayıcı rolleri nedeniyle hareketliliğin kontrolünde bir rolleri olabileceği, ayrıca, kuyruğun sert yapısını destekleyerek asimetrik dizilimlerinin kuyruğun hareketlerine izin verdiği düşünülmektedir [67].

2.10.1.4. Orta Parça

Kuyruğun 3,5 µm uzunluktaki orta parçası, bağlantı parçasının en distalindeki “anulus” hizasına kadar uzanır. Anulus orta parça ve esas parça arasındaki bağlantıyı işaretleyen çevresel banttır. Orta parçanın en önemli ayırıcı özelliği, çeşitli sayıda sarmal diziliimli mitokondriyonlara sahip olmasıdır. İnsan sperminin mitokondriyonları düzensiz aralıklarla diziliyken, diğer türlerde bu dizilim yüksek bir organizasyon gösterir [68]. Sperm mitokondrisinin dış membranı oldukça stabil bir yapı gösterirken, iç membran yapısı diğer hücrelerdekilere benzer [69, 70]. Bunun nedeni disülfid bağlarının varlığı olabilir. Bu tür bir dış membranın fonksiyonunun kuyruk hareketi sırasındaki gerilmelere dayanıklılık olabileceği düşünülmektedir [65].

2.10.1.5. Esas Parça

Adından da anlaşılacağı gibi, esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır (55µm) ve anulustan terminal parçanın proksimaline kadar uzanır. Karakteristik özelliği, aksonom ve dış yoğun fibrilleri saran sitoiskelet yapısındaki fibröz kılıf içermesidir. Bu kılıf, merkezi mikrotübül çiftinin düzleminde bulunan 2 periferel, longitudinal kolona sahiptir ve bu kolonlar sıkı paketlenmiş filamanlar olan kurdele benzeri yapılarla birbirlerine bağlanırlar. Fibröz kılıfın yapısal proteinleri arasındaki disülfid bağları bütün yapıyı oldukça stabil bir hale getirirler. Görevlerinin aynı dış yoğun fibrillerin de olduğu gibi elastik bir korse yapısını sağlayarak kuyruk hareketini kontrol etmek olduğu düşünülmektedir [65].

2.10.1.6. Terminal Parça

Fibröz kılıfın ilerisinde kuyruğun 3 µm uzunluğundaki terminal parçası yer alır. Bu parçada aksonomun mikrotübül elemanları sonlanır. Önce dinein kolları yok olur ve A subünitesi buğulu bir şekilde izlenir [71]. Ortada yer alan mikrotübül çifti yok olur ve dış mikrotübül çiftlerinden iki tanesi merkeze hareket ederek, 7 adet rastgele dağılmış mikrotübül çifti tarafından sarılır. Çiftler ayrılır ve B tübüleri yok olarak, sadece 1 mikrotübülden oluşan ve yalnızca hücre membranı ile çevrelenmiş yapıyı oluşturur. Dolayısıyla, kuyruğun ucuna doğru gidildikçe kalan tübüllerin mükemmel bir şekilde sonlandırılması gerçekleşir.

2.10.2. Baş

Sperm başının fonksiyonları; DNA'yı içermesi, koruması ve ovositin döllemesi (fertilizasyon) sırasında bu içeriğini ovosite aktarmasıdır. Bunu gerçekleştirmek için; a) DNA erkek pronükleusunun oluşmasına kadar stabil bir formda tutulmalıdır, b) spermium ovositin etrafındaki tabakaları geçmeli ve ovosite ulaşmalıdır, c) sperm ve ovosit tanınması için türe özgü bir mekânizma olmalıdır, d) ovosit membranı ile füzyon yeteneğinde olmalıdır. Sperm başı bu fonksiyonlarını gerçekleştirmek için az sayıda organelle sahiptir, bu organeller nükleus dışında baş bölgesinde bulunan akrozom ve postakrozomal kılıftır. Sperm başının temel organizasyonu bütün memeli spermilerinde ortaktır ancak hem nükleusun hem de akrozomun dolayısıyla sperm başının şekli ve boyutu oldukça farklı ve türe özgüdür. İnsan spermiumunda başın şekli pleomorfik olarak tanımlanır ve bu tanım çok heterojen tipteki sperm şeklini ifade eder; dolayısıyla 'normal' şekil ve boyut tanımını oldukça güçleştirir. Bununla birlikte, normal sperm başının yaklaşık 4–5 µm uzunluğunda ve yaklaşık 3 µm genişliğinde olduğu kabul edilir.

2.10.2.1. Akrozom

Akrozom spermium nükleusunun ön kısmını çevreleyen bir takke benzeri membrana bağlı veziküldür. İnsan spermiumunda akrozom göreceli olarak küçüktür ve nükleusun yaklaşık üçte ikisini kaplar ancak ön kenarının ötesine uzanmaz. Dış akrozomal membran hemen hücre membranı altında uzanır ve akrozom şapkasının arka kenarlarında nükleer kılıfın üzerine uzanan iç akrozomal membran ile devam eder. İki membran birbirine paralel uzanır ve araları dar bir boşluk olan akrozomal matriks ile doludur. Bu matriks çok sayıda çeşitli hidrolitik enzimleri içerir. Bunlardan en önemli iki tanesi ve en iyi tanımlananları "hyaluronidaz" ve "proakrozim" denilen inaktif zimojen formunda bulunan tripsin benzeri proteinaz "akrozim"dir [72]. Bu tür zimojenlerin inaktif formları akrozomal matriksteki özgün (spesifik) inhibitörlerin (baskılayıcıların) kompleks oluşturmasıyla uyarılabilir. Akrozomal matriksteki diğer enzimler ise asit fosfataz, fosfolipazlar, N-asetilglukozaminidaz ve kollajenaz'dır. Bazı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda bu çeşitli enzimlerin akrozomda rastgele dağılmadıkları aksine paketlenmiş bir halde buldukları dolayısıyla sıralı bir aktivasyon mekanizmasıyla salındıkları hakkında kanıtlar vardır [73, 74]. Bu enzimler "akrozom reaksiyonu" denilen temel bir egzositotik bir olayla salınırlar.

Spermiumun belirgin bir özelliği, ekvatoryal bölge denilen akrozomal kılıfın arka sınırında yer alan stabil bölgenin varlığıdır. Ön akrozomun enzim içeren matriks yapısı bu bölgede mevcut değildir. İnsan spermiumunda ekvatoryal bölge aynı zamanda vimentin birikimine sahip bir alandır [75]. Bu özellik sitoskeletal elemanların varlığı ile güçlenen oldukça stabil bir membran yapısını akla getirir. Akrozomal reaksiyonun ardından ekvatoryal bölge bozulmadan kalır. Ön akrozom ve ekvatoryal bölge arasındaki sınırdaki dış akrozomal membran hücre mebranı ile birleşerek akrozomal şapka kaybının ardından hücre bütünlüğünü korur. Ekvatoryal bölgenin üzerini örten plazma membranı bölgesi sperm-ovosit tanınmasının ve füzyonunun gerçekleştiği alandır. Bu nedenle akrozomun ekvatoryal bölgesi bu kritik membran alanında özellikle zona pellusida penetrasyonu sırasında sıkıca stabilize edilmiştir [65].

Ön Akrozomal Bölge

Sperm başının ön bölgesini çevreleyen plazma membranı iki önemli işlemde yer alır; zona pellusidayı tanıma ve bağlanma ile eksositotik akrozom reaksiyonu sırasında alttaki dış akrozomal membranla birleşme. Bu fonksiyonların her ikisi de kapasitasyonla birlikte meydana gelen membran yapısının belirgin özelliklerin değişmesiyle ilişkili olabilir. Zonaya bağlanma muhtemelen bu bölgede yoğun olan membran glikokaliksinde bulunan kompleks glikokonjugatlar aracılığı ile gerçekleşir. Bununla birlikte lektinler, spesifik karbonhidrat kısımlarını tanımları nedeniyle hücre yüzey proteinlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılırlar [76]. Lektin bağlanma şekillerine bakılarak ortaya konan ejakülasyon sırasında oluşturulan glikokaliks kompozisyonu, yeniden bir organizasyona gider ve zona pellusidaya bağlanmadan önce kapasitasyon sırasında kaybolur [77, 78]. Membranın potansiyel füzogenik doğası, membran akışkanlığındaki değişikliklerle, intramembranöz partiküllerin kısmi kaybı ile membran lipid kompozisyonundaki değişimlerle anlaşılır. Akrozomal reaksiyonun başlaması ile plazma membranının bu bölgesinin destabilizasyonu ve dış akrozomal membran ile birleşmesi sağlanır. Akrozom reaksiyonunun başlamasından sonraki ilk gözlemlenebilir değişiklik, matriksin dekonduksiyonu ve şişmesidir. Bunun sonucu olarak dış akrozomal membran dalga benzeri bir şekil alır. Bu olayı, plazma membranı ve dış akrozomal membran arasında noktasal birleşme bölgelerinin meydana gelişi izler. Bu ilk birleşme, plazma membranı ve dış akrozomal membranda bir seri deliklerin meydana gelmesini sağlar. İn vitro koşullarda, yaklaşık yirmi saniye sonra delinme (fenestrasyon) tamamlanır ve noktasal birleşme bölgeleri bir araya gelerek akrozom yüzeyinin karışık veziküllerle kaplanmasıyla sonuçlanır. Bu karışık veziküller hem plazma membranı hem de dış akrozomal membran parçalarından oluşurlar; bu veziküllere “hibrid” veziküller de denir [79]. Bu veziküller çoğunlukla küresel şekilli ve çeşitli boyutlardadırlar. Bu aşamada akrozomal matriks göreceli olarak dağılmamış olmasına rağmen artık membranlarla sınırlı değildir. Üç dakika içinde matriks tamamen kaybolur, membran vezikülleri halâ varlıklarını sürdürürler ve zamanla kademeli dağılıma giderler. Bu noktada iç akrozomal membran spermiyum başının ön bölgesinin sınırlayıcı membranı haline gelir [79].

Dolayısıyla, dış akrozomal membranın stabil bir yapıda olmaması sperm plazma membranı ile birleşmesi için gerekliyken, iç akrozomal membranın kararlı yapısı (stabilitesi) özellikle hücrenin zona pellusidayı geçerken maruz kalabileceği streslere karşı sınırlayıcı bir hücre membranı olması açısından önemlidir [80].

Ekvatoryal Bölge

Ekvatoryal bölge, ovosit ile sperm membranlarının birleşmesinin gerçekleştiği yegâne bölgedir. Bununla birlikte, sperm-ovosit birleşmesi ancak akrosomal reaksiyon tamamlandıktan sonra gerçekleşebilir [81]. Bu durum akrosomal reaksiyon sırasında ekvatoryal bölgede önemli fizyolojik membran değişikliklerinin görüldüğü fikrini doğurabilir, fakat bu fikri destekleyecek önemli bir yapısal değişikliğin membranda olmadığı anlaşılmıştır. Ekvatoryal bölgedeki membran büyük oranda stabildir ve muhtemelen ön ve arka postakrozomal membran bölgeleri arasındaki intramembranöz partikül geçişini önleyen bir bariyer görevi yapar [81].

Perinükleer Materyal

Perinükleer materyal akrozomun hemen altında onu nükleustan ayıran ince bir tabakadır. Bu tabaka disülfid köprüleri ile sağlamlaştırılmış nükleusu örten devamlı bir tabaka oluşturur. Akrozom ve nükleus arasında ‘çimento benzeri’ bir madde olarak rol alır. Akrozomun arka kısmında bu madde postakrozomal kılıfı oluşturur. Yapısı kompleks olmasına rağmen postakrozomal kılıfın fonksiyonu hakkında belirgin bir bilgi henüz bilinmemektedir.

2.10.2.2. Nükleus (Çekirdek)

Sperm nükleusunun kromatini, DNA kompleksi ile arjinin ve sisteinden zengin olan ve protaminler denilen bazik proteinleri içerir. Somatik hücre nükleuslarının histonlarından farklı olarak, sperm nükleoproteinleri türler arasında belirgin farklılıklar gösterirler. Birçok memeli türünde sadece bir adet predominant protamin mevcutken insan ve fare spermlerinde iki adettir [82]. Bu protaminlerin en önemli özelliği DNA’daki fosfat-ester çatısının yükünü nötralize ederek kromatinin çok sıkı paketlenmesini sağlamaktır. Protaminlerin yüksek orandaki sistein içeriği serbest tiyoller arasındaki disülfid çapraz köprülerinin oluşmasına izin verir. Nükleusa oldukça stabil “keratinoid” karakterini veren bu çapraz bağlanma spermiyogenezin geç basamaklarında başlar ancak esasen epididimisten geçiş sırasında tamamlanır. Nükleusun bu yüksek stabilitesi ve bu stabiliteyi bozmak için gerekli olan ciddi uygulamalar kromatin paketlenmesinin düzenlenmesinin anlaşılmasını zorlaştırır. Nükleus haploid sayıda kromozom sayısına sahiptir ve her bir kromozom çiftinin bir tanesini içerir. DNA tamamen inaktiftir ve spermin ovositin içine girmesinden sonra protaminlerin yer değiştirmesine kadar replike olmaz.

Nükleusun şekli, sperm genotipi tarafından belirlenen ve birçok türde tek tip (uniform) olan türe özgü karakterdedir. İnsan spermatozoası ise bu kuralın istisnasını oluşturur. Çünkü uzayarak incelenden, kısa yuvarlak nükleuslara kadar değişen çeşitlilikler gösterir. Bununla birlikte, nükleus şeklinin değişkenliği morfolojik olarak “normal” yani oval şekilli insan sperm çekirdeğini tanımlamayı zorlaştırır. Nükleusun şeklindeki bu değişkenlik kromatin kondanzasyonundaki değişkenliğe bağlanabilir. Çünkü birçok nükleusta çeşitli vakuoller ve zayıf kondanze olmuş kromatin alanları bulunabilir. Ancak bu vakuollerin ve diğer kondanzasyon defektlerinin spermiyumun fertilizasyon kabiliyetini olumsuz yönde etkileyip etkilemediği henüz bilinmemektedir.

Posteriyor halka (çizgili bant), plazma membranı ve nükleus zarı arasındaki çevresel bir bağlantı noktasıdır; küçük membran partiküllerinden oluşan bir seri çizgilenmelerden meydana gelir [83]. Posteriyor halka kuyruğun annulus yapısına benzer olarak membran bölgeleri arasında fiziksel bir bariyer olup, kuyruk ile baş bölgelerini ayıran temel bir bölünme noktası olarak görev yapar. Bu çizgili bantların ön tarafında yer alan ve nükleer delikler içermeyen nükleer kılıf, iç ve dış laminaları arasında daralır [84]. Bu sıra dışı özellikler muhtemelen yüksek oranda kondanze olmuş kromatin yapısı ile sperm nükleusunun kararlı doğasını yansıtır.

2.10.2.3. Sitoplazmik Damla

Sitoplazmik damla, spermiyogenez sırasındaki hücrenin morfolojik olarak yeniden şekillenmesinden sonra, arta kalan (rezidüel) sitoplazma kalıntılarını içerir. Hayvan türlerinin bir çoğunda sitoplazmik damla epididimise geçiş sırasında distale, kuyruğa doğru kayar ve ejakülasyon sırasında da atılır. Bununla birlikte, insan spermiyumu kuyruğun orta parça ve bağlantı parçası çevresinde çok sayıda ribozom ve mitokondri gibi organel fazlalıklarını içeren sitoplazmik bir atkı gibi çeşitli miktarda damla içerir. [84].

2.10.2.4. Plazma Membranı

Birçok hücre tiplerinin aksine yapı ve fonksiyon olarak sperm plazma membranı oldukça heterojendir ve keskin sınırlarla ayrılmış çok sayıda membran bölgesi içerir. Bu bölgesel özelleşme fiziksel kimyasal ve immünojenik parametrelerle kanıtlanmıştır. Membranın hem yüzey özelliklerini hem de üç boyutlu yapısını yansıtır. Ek olarak, erkek üreme yollarından geçiş sırasında oluşturulan membran bölgelerinin bileşenleri ve yapıları sabit değildir; dolayısıyla dişi üreme yollarındaki kapasitasyon sırasında yeniden organize olur.

Sperm yüzeyi beş belirgin membran bölgesine sahiptir, her biri altındaki hücre kompartmanı ile yakından ilişkili olup her biri hücre fonksiyonunun değişik aşamalarında görev alır. Kuyruk orta parçası ve esas parçası üzerinde iki farklı plazma membranı bölgeleri vardır. Baş bölgesinde ise, ekvatoryal bölge, postakrozomal bölge ve akrozomu örten bölge olmak üzere üç belirgin plazma membranı bölgeleri mevcuttur. Bu farklı membran bölgeleri, bitki lektinlerini bağlama afinitelerine göre değişkenlik gösterir [85]. Dolayısıyla glikokaliks yapılarındaki farklılıkları yansıtır. Membran akışkanlığı ve lipid içeriği arasındaki farklılıklar birçok moleküler prob ile gösterilmiştir [86]. Dondurma-kırma preparatları ile yapılan çalışmalar plazma membranındaki partiküllerin dağılım farklılıkları [86] ve özgün monoklonal antikolar için farklı bağlanma özellikleri gösterirler [87]. Ayrıca, membran yüzeyi elektriksel yükleri arasında da farklılıklar vardır [88]. Birbirinden farklı bölgelerin sınırlanması görevini üstlendiği düşünülen ve plazma membranının altında yer alan hücre iskeleti elemanlarının da bölgesel özelleşmeleri olduğu yönünde kanıtlar vardır [88]. Aktin, spektrin ve vimentin dağılımı değişik membran bölgeleri ile ilişkilendirilebilir; vimentin ekvatoryal bölgede sınırlı iken aktin ve spektrin ön akrozom ve esas parçada yer alır [89]. Hücre ölümüne bölgesel yapıların kaybının eşlik etmesi gerçeği, membran bölgelerinin bütünlüğünün devamında en azından kısmen, hücre içindeki aktif bir sürecin rol aldığını gösterir. Özgün bölgesel membran içeriği, kapasitasyon ve hareketlilik gibi bir çok hücresel işlevin aynı anda başarılmasını kolaylaştırır.

Orta Parça Bölgesi

Orta parça plazma membranı, mitokondriyal kılıfa madde geçişine izin vermek zorundadır. Burada oluşan değişikliklerin, kapasitasyon sırasında önemli hücre metabolizması olaylarına aracılık ettiği muhtemel gözükmektedir. Mitokondriyal kılıfı örten membran altta uzanan mitokondriyal sarmalı izleyen membran içi partikül zincirleri içerir ve bunlar mitokondriyalar arasındaki bölgelerde bulunmazlar. Bu bölgelerde membranın mitokondriyal kılıfa çok yakın olduğu gözlenmiştir [65].

Esas Parça Bölgesi

Esas parça spermiyum hareketi için gereken gücü yaratır ve bu fonksiyonun etkili olabilmesi için, aksonemal kompleks bağlanmamış “membran zarfı” içinde kuyruk hareketini oluşturmaktan ziyade, plazma mebranına bağlı olmak zorundadır. Bu bağlantı “fermuar” diye adlandırılan uzunlamasına çift sıralı düzenlenmiş intramembranöz partiküllerden oluşur [89]. Bu partiküller membranı enine katederler ve aynı zamanda mekanik bir bağlantı oluşturarak, kapasitasyon sırasında gözlenen kuyruk vuruş şeklinin değişmesi gibi aksonemal fonksiyonların kontrolünde rolleri olabilir. Bununla birlikte, fibröz kılıfın uzantılarına tutunan fermuar partikülleri, fibröz kılıfın varlığı, partiküller ve aksonom arasındaki dış yoğun fibrillerin varlığı düzenleyici bir fonksiyona zıtlık oluşturur [89].

2.11. Spermatozoanın Kromozomal Özellikleri

2.11.1. Kromozom Analizi: Sitogenetik

Kromozom adı verilen hücre organellerinin işlev ve morfolojilerini inceleyen sitogenetik, sitoloji ve genetik bilimlerinin birleşmesiyle ortaya çıkmıştır.

İnsan kromozomları ilk kez 1857 yılında Virchow tarafından görülmüş fakat kromozom sözcüğü 1888 yılında Waldeyer tarafından kullanılmış ve bu zamana kadar insan kromozomlarından birisinin (“aksesuar kromozom”) her zaman için eşinin olmadığına inanılmıştır. 1905 yılında ise Wilson ve Stevens insan cinsiyet kromozomları eşleşmesini düşünmüşler ve böylece “aksesuar kromozom”un eşi de bulunmuştur. Daha sonra insan kromozomlarını elde etmek için çalışmalar yapılmış ve ilk kez 1917 yılında Wieman tarafından X ve Y kromozomları tanımlanabilmiştir. Ancak insan kromozomlarının kesin sayısını öğrenebilmek için 1956 yılına kadar beklemek gerekmiştir. Çünkü bu yıla kadar her somatik hücrede 48 kromozom bulunduğu inanılmıştır. 1956 yılında Tjio ve Levan, insan fetal akciğer fibroblastlarıyla yaptıkları kültürde, insan kromozom sayısının 46 olduğunu kesin olarak ortaya koymuşlar ve cinsiyet kuruluşunun XX (dişi) ve XY (erkek) biçiminde olduğunu desteklemişlerdir. Daha sonra yapılan çalışmalar, araştırmacıların bulgularının doğru olduğunu kesin olarak ortaya koymuştur. İnsan kromozomlarından cinsiyetin belirlenmesi ile ilişkili olan X ve Y kromozomlarına gonozom geriye kalan 44 kromozoma da otozom adı verilir.

2.11.2. Kromozomların Morfolojik Özellikleri

Kromozomlara ilişkin kalıtsal kusurları iyi anlayabilmek için öncelikle kromozomların morfolojik özelliklerinin ne olduğunun anlaşılması gerekir. Sayıları 23 çift ($2n=46$) olan insan kromozomları ışık mikroskobu kullanılarak mitoz bölünmenin metafaz evresinde incelenirler. Kromozomlar elektron mikroskobu ile incelemek için büyük gelirler ve bu mikroskopta fibrillerden oluştuğu görülür. Kromozomlar ışık mikroskobu altında incelendiklerinde, kimi morfoloji özellikleri hemen dikkati çeker. Bu özellikler şu şekilde özetlenebilir:

2.11.2.1. Sentromer (İlksel Büzüntü ya da İlksel Darlık)

Kromozomun en soluk boya alan kısmı olan sentromer, “kinetokor” adını da alır. Kinetokor terimi fonksiyonel olan sentromeri ya da metafazdaki sentromeri anlatmak üzere kullanılır. Her kromozomda yalnızca bir tane olan ve hücre

bölünmesi sırasında kromozomların iç iplikçiklerine tutunmasını sağlayan sentromerin, “C-banding” gibi sentromer bantlama teknikleri kullanılarak yalnızca kendisi boyanıp izlenebilmektedir.

2.11.2.2. Sekonder Darlık

Sekonder büzüntü, sekonder darlık gibi adlar da verilen bu oluşum, sentromer dışındaki nükleolar (NOR) ya da nükleolar olmayan tüm darlıkları kapsamakta olup sentromerden ayrı özelliklere sahiptir. Sentromerin tüm kromozomlarda bulunmasına karşılık, bu oluşumlar ancak belirli kimi kromozomlarda (özellikle 1, 3, 9 ve 16 numaralı) görülürler ve ayrıca sentromerden daha açık boyanırlar. Kromozomların uzun kolunda olup sentromere bitişiktirler ve uzunlukları farklılıklar göstermektedir. Akrosentrik kromozomlarda görülen sekonder darlık (nükleolar sekonder darlık), yani satelliiti gövdeye bağlayan “sap” ise çekirdekçik oluşumu ile ilgilidir.

2.11.2.3. Satelit (Uydu)

İnce bir sapla belirli kimi kromozomların kısa kollarına bağlanan, yuvarlak düğme biçimindeki kromatin materyaline satelit adı verilmektedir. D(13–15) ve G(21–22) grubu kromozomların hepsinin kısa kollarında bir satelit bulunur ve kimi zaman akrosentrik kromozomların satellitleri birbirine çok yaklaşarak satelit asosiasyonu gösterirler. Bunlar telofaz evresinden sonraki interfaz evresinde çekirdekçiği yeniden oluşturan oluşumlardır.

2.11.2.4. Kromomer

Bir akrosentrik kromozomun kısa kolunda satelit, sap ve heterokromatin kısa kol olmak üzere üç kısım bulunmaktadır. Sap kısmı ribozomal RNA (18S ve 28S rRNA) kodlayan çoklu kopya içermektedir ve rRNA’daki baz sırası hemen hemen tüm akrosentrik kromozomlarda aynıdır. NOR ya da AgNO₃ boyama ile boyanan bu kesime “nükleolar organizasyon bölgesi” de denilmektedir. Işık mikroskobu altında, mayotik ve mitotik profazdaki kromozomların hemen hepsinde yoğunlaşmış kromatid ya da kromozom kesimleri fark edilmektedir ki değişik yoğunlukta boya alan enine bantlar ya da tesbih taneleri şeklinde görülen bu oluşumlara kromomer denmektedir. Fakat kromomerik yapı kromozomların daha kondanase olduğu metafaz ve anafaz evrelerinde hemen kaybolur ancak boyanacak olursa yeniden fark edilebilir. Görevi tam anlaşılacakla birlikte hücre bölünmesinin değişik evrelerinde, aynı genomdaki her kromozomda özel ve sabit bir yapı kazanır. Aynı genomdaki kromozomların mikroskop altında birbirlerinden ayrılmasını sağladıklarına inanılmaktadır. Fakat kromozom bantları ile ilişkili değildir.

2.11.2.5. Kromatin

Genetik maddenin ya da kromozomun interfaz dönemindeki (G₂ ve S) adına **kromatid** denilmektedir. Aynı madde G₁ evresinde “kromatin” adını almaktadır. Yani genetik materyalin interfaz dönemindeki kümeleşmiş ve yumaklaşmış durumuna kromatin denmektedir. Diğer bir deyişle hücrede kromozomu oluşturan DNA ve protein karışımına verilen addır. İki türlü kromatin bilinmektedir: a) Heterokromatin b) Ökromatin. Hücre siklusu boyunca çözülmeden kalan ve bu nedenle koyu olarak boyanan ya da heteropiknoz gösteren kromozom ya da kromozom kesimlerine heterokromatin adı verilmektedir. Kromozomun bu

özelliğinden çok yararlanılmaktadır. Örneğin normal kadında X kromatinini oluşturan X kromozomu heterokromatin özelliği göstermektedir. Kromozomdaki heterokromatin bölgesi genetik olarak inaktiftir. Bunlar ya hiç gen içermezler ya da inaktif genleri taşırlar. Hücre bölünmesinin S evresinde daha kondanse oldukları için ökromatinden daha geç replike olurlar ve iki gruba ayrılırlar:

- 1. Konstitif heterokromatin:** Kromozom çiftlerinin homolog bölgelerinde bulunurlar ve daima inaktiftirler. Örneğin telomerik ve sentromerik heterokromatin bu türdendir.
- 2. Fakültatif heterokromatin:** Kromozomların kondanse olması durumunda inaktif hale gelen genleri taşırlar. Örneğin Barr cisimciği fakültatif heterokromatindir.

Bölünme aşamasında yoğunlaşan fakat telofaz ve daha sonraki interfaz dönemlerinde gevşeyerek çözülen, ultraviyole mikrospektrofotometreyle nükleik asit bakımından daha zengin bulunan ve normal boyanan kromozom kesimlerine “ökromatin” denmektedir. Bunlar genetik yönden aktif olan kromatinlerdir.

2.11.2.6. Kromonema

1896 yılında Wilson tarafından kromozom ve kromatidlerde ışık mikroskobu ile görülebilen en küçük dalları anlatmak üzere kullanılmıştır. Özellikle DNA'nın kromozom olarak paketlenme biçimini açıklamak üzere eskiden beri üzerinde durulan kromonemanın 2, 4 ya da daha çok iplikten oluştuğu ve bunların özel sarmallar yaparak kromatidleri ortaya koyduğu öngörülmektedir. Işık mikroskobunda özel yöntemlerle görülen kromonemanın DNA-histon iplikçiklerinin kendi üzerine katlanmasıyla oluştuğu sanılmakta fakat bu iplikçiğin kromozom içerisinde nasıl paklendiği tüm ayrıntıları ile hala bilinmemektedir.

2.11.3. Kromozomları Adlandırma Sistemi

1956 yılında Tjio ve Levan tarafından insan kromozomlarının tam sayısı bulunduktan sonra ($2n=46$), ortaya konulan kromozom hastalıklarında da belirgin artma görülmüştür. Fakat kromozomları tanımlayan yayınlar arasında belli bir sisteme uyma durumu olmadığı için giderek karışıklıklar görülmeye başlanılmıştır. Bunun üzerine bulguları standartlaştırmak ve belli ilkeleri saptamak için 1960 yılında Denver'de (A.B.D) genetikçilerin ilk uluslararası toplantısı yapılmıştır. Bu toplantıda kabul edilen sisteme “Denver sistemi” ya da “klasifikasyonu” denir. Ancak ortaya konulan sistemin eksikliklerini tamamlamak üzere daha sonra bir dizi toplantılar yapılmıştır: 1963 Londra, 1966 Chicago, 1971 Paris ve diğerleri. Böylece Denver sistemi daha da geliştirilmiş ve insan kromozomları standardizasyona tabii tutularak ortak bir adlandırma sistemi kabul edilmiştir. Buna göre tüm bilgi bir formül içerisinde toplanmakta; önce total kromozom sayısı yazılmakta sonra cinsiyet kromozomlarının yapısı ve daha sonra da varsa kromozom anomalileri belirtilmektedir.

Kabul edilen sisteme göre insan kromozomları 7 gruba ayrılmakta (A,B,C,D,E,F,G) ve cinsiyet kromozomları dışındaki kromozomlar en büyükten

başlamak üzere 1–22 arasında numaralanmaktadır. Bugün için geliştirilen yeni yöntemler sayesinde (örneğin bantlama) kromozomlar hem gruplarına hem de numaralarına göre kesin olarak ayrılabilirler. Ayrıca hangi kromozomda hangi yapısal ve sayısal değişiklik olmuşsa bu da kesin olarak ortaya konabilmektedir.

Kromozom tanısında 5 esas kriter bulunmaktadır.

- a) Uzunluk; toplam ve ayrı ayrı kol uzunlukları
- b) Sentromer pozisyonu
- c) Sekonder darlığın bulunup bulunmaması ve varsa yeri,
- d) Kromozomların bant özellikleri
- e) Otoradyografik özellikler.

Bu kriterler esas alınarak ayrılan kromozomlar, Denver sistemine göre sıralanarak karyotip hazırlanır. Yani kromozomların belli bir sisteme göre sıralanmalarına “karyotip” denir. Oysa aynı karyotipin şema halinde çizilmesi “idiyogram” adını alır. Bilindiği gibi, insan kromozomlarının toplam sayısı 46 ya da diğer bir deyişle 23 çifttir. Bunlardan iki tanesi cinsiyet kromozomlarıdır. X ve Y. Geride kalanlar ise otozomal kromozomlardır. İşte 1 – 22 arasında numaralanan ve 7 gruba ayrılan kromozomlar otozomal kromozomlardır.

2.11.3.1. A Grubu Kromozomlar: Bunlar 1, 2 ve 3 numaralı kromozomlardır. Sentromerleri ortada ve en büyük kromozomlardan oluşurlar. En büyük median kromozom 1 numaralı kromozomdur. İki numaralı kromozom, 1 numaralı kromozomdan daha küçüktür ve sentromeri biraz merkezden uzaklaştığı için diğer A grubu kromozomlara göre daha submediandır.

2.11.3.2. B Grubu Kromozomlar: Submedian olan bu kromozomlar 4 ve 5 olarak numaralandırılırlar. Bazı merkezlerde 6 numaralı kromozom da bu grup içerisinde düşünülür ve böylece B grubu üç çift kromozomdan oluşur. Normal olarak 4 ve 5. kromozomlar birbirlerinden ayırt edilemezler ve aralarındaki tek fark 5 numaralı kromozomun 4 numaralıdan biraz daha küçük olmasıdır. Fakat bantlama yöntemi ile iki kromozom kolaylıkla birbirinden ayırt edilir.

2.11.3.3. C Grubu Kromozomlar: Submedian ve orta büyüklükteki kromozomlar olup 6 (ya da 7) –12 numaralı kromozomlar arasındaki yedi (ya da altı) çift kromozomdan oluşur. Standart teknikle birbirinden ayrılmaları oldukça güçtür, fakat bantlama yöntemi ile kolaylıkla ayırt edilirler. Ayrıca 9 numaralı kromozomda sekonder darlık görülür.

2.11.3.4. D Grubu Kromozomlar: Diğer gruplardan kolaylıkla ayrılan akrosentrik kromozomlardır. Bu gruptaki 13, 14 ve 15 numaralı kromozomları birbirinden ayırmak çok güçtür, fakat otoradyografi ve bantlama yöntemlerinden yararlanılarak ayırımları kolayca yapılır. Her üç çiftin de kısa kollarında satellit bulunur. Bunlara büyük akrosentrik kromozomlar da denir.

2.11.3.5. E Grubu Kromozomlar: Üç çift kromozomdan oluşan bu grup (16, 17 ve 18 numaralı) küçük ve submedian kromozomlardır. Bununla beraber 16 numaralı kromozom mediana çok yakındır ve uzun kolun proksimalinde sekonder darlık görülür.

2.11.3.6. F Grubu Kromozomlar: İki çift kromozom (19 ve 20 numaralı) içeren bu grubun kromozomları küçük ve median sentromerlidir. Görünüşleri çoğunlukla kelebeğe benzer. Klasik boyama ile iki çifti birbirinden ayırmak oldukça güç olmasına karşın bantlama yöntemleri ile farklılıkları kolayca ve kesin olarak ortaya konur.

2.11.3.7. G Grubu Kromozomlar: Son iki kromozomu, yani 21 ve 22 numaralı kromozomları içeren bu grup en küçük ve akrosentrik kromozomlardan oluşur. Birbirinden ayrılmaları pek güçtür, fakat bantlama yöntemleri kullanılarak ayrımları yapılır. Örneğin, daha önce 21 numaralı kromozom olduğu sanılan Philadelphia kromozomunun, yeni teknikler kullanılarak 22 numaralı kromozom olduğu kesin olarak ortaya konulmuştur.

2.11.3.8. Eşey (“Gonozomal”) Kromozomları: Ayrı bir numarası ve ayrı bir grubu olmayan bu kromozomlar X ve Y kromozomlarıdır. Bunlardan X kromozomu, C grubunun büyük kromozomlarına benzer ve bu grup içerisindeki en median kromozomdur. Büyüklük bakımından 6 numaralı kromozomdan sonra gelir. X kromozomunun karyotipteki yeri henüz kesinlik kazanmamıştır. Kimileri 6 numaralı kromozomdan sonra koyarken, kimileri 12 numaralı kromozomdan sonra koyar ve C grubu içinde yer alır. Kimileri ise Y kromozomu ile birlikte 22 numaralı kromozomdan sonra ayrı bir grupmuş gibi koyar. Eşey kromozomlarının ikincisi olan Y kromozomu G grubu kromozomlara benzemekle birlikte, koyu boyanması ve uzun kollarının birbirine yakın olması nedeniyle G grubu kromozomlardan morfolojik olarak ayrılır. Karyotipteki yeri 22 numaralı kromozomdan sonradır.

2.11.4. Kromozom Biçimi

Kromatin materyalinin en ucundaki küçük terminal oluşuma da uydu (satellit) denir. Denver sınıflandırmasına göre, metafaz ve anafaz kromozomları, sentromer lokalizasyonu ile total ve kol uzunluklarına göre şu şekilde gruplara ayrılır:

a) Metasentrik (median) kromozom

Sentromeri ortada ve iki kolu birbirine eşit olan kromozomlardır.

b) Submetasentrik (submedian) kromozom

Sentromeri merkezden uzak ve iki kolu birbirine eşit olmayan kromozomlara denir.

c) Akrosentrik kromozom

Sentromeri kromozomun bir ucuna çok yakın olan kromozomlara denir.

d) Telosentrik kromozom

Sentromer en uçta bulunur. Normal olarak insanda görülmez.

Bunların dışındaki örnekler genellikle normal sayılmazlar.

2.11.5. Kromozom Düzensizlikleri

Özelliğin kuşaktan kuşağa değişmeden aktarılmasını sağlayan kromozomlar şekil, büyüklük, sayı gibi pek çok bakımdan her canlı türü ve o tür içindeki ait olduğu kişi bakımından sabit ve ayırıcı niteliktedir. Normalde 46 olan ($2n = 46$) insan kromozomları kimi zaman hem sayı, hem şekil ve hem de yapı bakımından değişiklik gösterebilir ki bu durum kromozomal hastalıkların ortaya çıkmasına neden

olur. Toplumdaki her 200 kişiden birinde kendini gösterebilen kromozomal düzensizlikler, kullanılan yeni tekniklerle (bantlama, floresans, otoradyografi, rekombinant DNA, FISH gibi) bugün için kolaylıkla saptanmaktadır.

2.11.5.1. Kromozomlardaki Sayısal Düzensizlikler

Bilindiği gibi, insan eşey hücrelerinde 23 adet kromozom bulunur ve bu sayı insan için haploid (n) sayıdır. Ayrıca, haploid kromozom takımına genom da denir. Fakat genom terimi kimi yazarlarca “herhangi bir insanın genetik kuruluşu” olarak tanımlanır. İnsanın somatik hücrelerindeki sayının ya da haploid kromozom sayısının iki katıdır yani diploid ($2n = 46$) dir. Kromozom sayısındaki artış ya da azalışlar temel kromozom sayısının ($n = 23$ tam katları kadar oluyorsa buna öploidi (“euploidy”) ve sayıya da öploidi (“euploid”) denir. Oysa kromozom sayısındaki temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmeler anöploidi (“aneuploid”) adını alır ve olguya da anöploidi (“aneuploidy”) denir. Poliploidi (“polyploidy”) de bir öploidi durumudur ve temel sayının ikiden daha çok artması durumunda ($3n, 4n, 5n$ gibi) kullanılır. Yani iki tür sayısal düzensizlik sözkonusudur.

i) Öploidi, ii) Anöploidi.

Öploidi (“euploidy”)

Bu durumda hücrelerdeki kromozom sayısı, o organizmada türü için normal olan haploid sayının, yani temel gametik sayının tam katı kadar artmıştır.

Başlıca Öploidi Tipleri

- 1 – Haploidi (“haploidy”) ($n = 23$). Eşey hücrelerindeki temel kromozom sayısının gösterir.
- 2 – Diploidi (“diploidy”) ($2n = 46$). Fertilizasyon sonucu, insan hücrelerinde ulaşılan kromozom sayısıdır ve böyle hücelere diploid denir.
- 3 – Triploid (“triploidy”) ($3n = 69$). Temel kromozom sayısının üç kat artması durumu olup böyle hücelere triploid hücelere denir, yani hücrede 69 adet kromozom bulunmaktadır.
- 4 – Tetraploidi (“tetraploidy”) ($4n = 92$). Hücrede temel kromozom sayısının 4 katı kromozom bulunması durumudur ki böyle hücelere tetraploid hücre adı verilir.
- 5 – Diğer öploidler. Kurumsal olarak temel kromozom sayısını sonsuza kadar artırmak olasıdır, fakat bu ploidler insan için henüz gösterilememiştir.
- 6 – Miksoploidi (“mixoploidy”) ya da mozaikizm (“mosaicism”) Aynı zigottan kaynaklanan organizma ya da herhangi bir dokunun değişik hücrelerinde, değişik kromozom kuruluşuna rastlanması durumudur. Örneğin, bir hücrede $2n$ kromozom bulunurken bir diğerinde $3n$ kromozom bulunmaktadır.

Öploidin Oluş Sebepleri

Öploidi ya da poliploidi hücre ya da organizmalar, ya eşey hücresindeki zaten var olan poliploididen dolayı ya da hücre bölünmesi sırasındaki kusurdan dolayı ortaya çıkar. Örneğin, tetraploid erkeğin spermiumları diploid olarak ve bu eşey hücresi normal kadının ovumu ($n = 23$) ile birleşecek olursa, ortaya çıkacak olan

yavru triploid olacaktır. Hücre bölünmesi sırasındaki kusurlar nedeniyle ortaya çıkan öploid durumları ise aşağıda sıralanmıştır. Öploidide temel kusur, hücrede çekirdek bölünmesi olduğu halde sitoplazma bölünmesinin olmasıdır. Başlıca iki sebeple olur:

- 1. Endomitoz (“endomitosis”)** Hücre bölünmesine hazırlık olarak kalıtsal madde, yani kromozomlar katı kadar çoğalır, mitoz bölünmenin ilk iki evresi (profaz ve metafaz) gerçekleşir, fakat anafaz ve telofaz olmaz, hücre ve sitoplazma bölünmesi oluşmaz. Böylece kromozom sayıları her bölünmede katı kadar artmış olur.
- 2. Endoredüplikasyon (“endoreduplication”)** Endomitozda olduğu gibi diğer bir deyişle kromatidler bölünür, fakat hücre bölünmesi gerçekleşmediği için, sentromerlerinden birbirine tutunmuş durumdaki çok sayıda kromatidden oluşmuş olan (4 – 8 kromatid) kromozomlar ortaya çıkar. İşte bu olgu endoredüplikasyon olgusudur. Bu olguya ilişkin örnekler, insan habis tümör dokularında ve spontan düşük materyalinde bol bol gösterilmiştir. Fakat megakaryositler normalden 8 – 16 kat daha fazla haploid kromozom sayısına sahip oldukları için (128 C değer) insan kemik iliğinde normal olarak görülürler. Buradaki C değeri bir haploid hücredeki DNA miktarını gösterir (haploid hücredeki DNA → 1C, diploid hücredeki → 2C) ve DNA'nın sarmal sayısı ile ilişkili değildir.

Anöploidi (“aneuploidy”)

Temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmelere anöploidi denir. Anöploidi olguları öploid olgularından daha sık görülür ve pek çok kromozomal sendromun oluşmasına neden olur.

Anöploidinin Oluş Nedenleri

Hücrenin bölünmesi sırasında ortaya çıkan kusurlar nedeniyler anöploidiler oluşur ve başlıca iki yolu vardır: 1 – “Nondisjunction”, 2 – “Anaphase lagging”.

1. Kromozom Ayrılmaması (“nondisjunction”)

Bölünmeye hazırlık döneminde kendini iki katına çıkaran kalıtsal madde ya da kromozomlar, metafaz evresinde ekvatoriyal düzlemde toplanırlar, sentromerlerinden uzunlamasına ikiye bölünerek her yarım ayrı bir kutba gider ve bölünme olgusu tamamlanır. Kimi zaman kromozomlar uzunlamasına bölünmez ve bir kutba iki yarım birden giderken diğer kutba kromozom gitmez. İşte kromozom ayrılmasına (“nondisjunction”) denilen durum budur. Bu olay hem mitoz hem de mayoz bölünmede ortaya çıkan sonuç da değişik olur. Örneğin mitoz bölünmedeki kromozom ayrılmaması, döllenmeden sonraki evrelerde olacak olursa, kusurun ortaya çıktığı zamana bağlı olarak, kişinin hücrelerinin kromozom sayısı bir kısımda normalden fazla, bir kısımda normalden az olacaktır. Yani kişinin hücrelerinin bir kısmı monozomik bir kısmı trizomik olacak, dolayısıyla kişi mozaik olacaktır. Kromozom ayrılmamasının bu türüne “mitotik kromozom ayrılmaması” adı verilmektedir.

Kromozom ayrılmamasının çok görüleni ve önemli olanı mayoz hücre bölünmesi sırasında ortaya çıkanıdır. Kromozomun ikiye bölünüp her birinin ayrı

ayrı kutuplara gidememesi sonucu hücrelerden birinde sözkonusu kromozom hiç bulunmazken diğer hücrede bir yerine iki tane bulunur. İki kromozomlu gamet normal kromozomlu gametle birleşecek olursa, ortaya çıkacak kişi ilgili kromozomdan iki yerine üç tane içerecek, yani trizomik olacaktır. Buna karşılık, bölünme kusuru sonucu ilgili kromozomu taşımayan gamet normal gametle birleşecek olursa, o zaman da kişide normalden bir kromozom eksik olacak ki böylelerine de **monozomik** denilmektedir.

2. Kromozomların Anafazda Geri Kalması (“anaphase lagging”)

Anafazda geri kalma, anafaz gecikmesi, anaphase lag ya da anaphase lagging gibi adlar verilen bu olay, aslında kromozom ayrılmamasına benzer. Normal olarak uzunlamasına bölünerek kutuplara çekilmekte olan kromozomlardan biri anafazda geri kalır. Hareket etmekte geç kalan bu kromozom ya özdeşinin bulunduğu kromozom grubuna katılır ya da bölünme sırasında ortadan kaybolur. Eğer özdeşinin bulunduğu hücrede kalacak olursa, bir hücrede aynı kromozomdan bir yerine iki tane bulunurken diğer hücrede hiç bulunmayacağı için sonuç bakımından kromozom ayrılmasına benzer. Fakat sitoplazmanın bölünmesi sırasında kaybolacak olursa, hücrelerden biri normal kromozoma sahipken, diğerinde bir kromozom eksik olacaktır.

Anöploidi Türleri

Anöploidi, kromozomlardaki artma ya da eksilmeye göre ikiye ayrılır: “**hyperploidy**” ve “**hypoploidy**”.

1. Hiperploidi (“hyperploidy”). İnsanlardaki normal diploid sayısından bir ya da daha çok sayıda fazla kromozom bulunması durumudur. Yani diploid sayı artı fazla kromozom demektir. Örneğin, $2n + 1$. Sık rastlanan hiperploidi örnekleri trizomi ve tetrazomilerdir.

a – Trizomi (“trisomy”): İnsan kromozomlarından herhangi birinin iki (bir çift) yerine 3 tane bulunması durumudur, yani $2n + 1 = 47$. Örneğin Down sendromu $47,XX,+21$ ve Klinefelter sendromu $47,XXY$.

b – Tetrazomi (“tetrasomy”): Kromozomlarda gözlenen bu düzensizlik iki şekilde olmaktadır: Ya belli bir homolog kromozom çiftinden iki yerine 4 tane bulunmaktadır. ($2n + m2 = 48;48,XXXX$) ya da iki ayrı homolog çiftin trizomisi vardır. [$2n+2 = 48; 48,XX, (+1;+4)$].

2. Hipoploidi (“hypoploidy”). Karyotipteki diploid kromozom sayısından 1 ya da daha çok kromozom eksilmesidir. (Örneğin, $2n - 1$).

a – Nullizomi (“nullisomy” ya da “nullosomy”). Herhangi kromozom çiftlerinden birinin bulunmaması, yani karyotipten 1 çift kromozomun eksik olması durumudur. ($2n - 2 = 44$) İnsan için nullizominin letal etkisinden dolayı fetus erkenden atılmaktadır.

b – Monozomi (monosomy). Diploid kromozomdan 1 kromozomun eksik olmasına denir. ($2n - 1 = 45$). Yani karyotipte, bir çiftin eş iki üyesinden 1 tanesi bulunmaktadır. Örneğin, Turner ($45,X$) ve monozomi G ($45,XX, G-$) sendromları.

Mozaisizm (mosaicism”)

Aynı zigottan kaynaklanan bir organizmada, kromozom sayıları birbirinden farklı birden çok doku ya da hücre bulunması durumuna “mozaisizm”, böyle kişilere de “mozaik” denir. Mozaisizm nedeni mitoz bölünmedeki kromozom ayrılmaması ya da kromozomların anafaza geri kalmasıdır. Soma hücrelerinde ortaya çıkan bu durum, kişinin hücrelerinin değişik sayıda kromozom içermesine neden olur. Aslında mozaisizm derecesi kişinin yaşıyla da ilişkilidir. Eğer kromozom ayrılmaması ya da anafazda geri kalma olayları zigotun erken evrelerinde ortaya çıkacak olursa mozaiklik derecesi fazla, fakat geç evrelerinde ya da doğumdan sonra ortaya çıkacak olursa mozaiklik derecesi az olur. Yani mozaiklik derecesi kişinin yaşı ile ters orantılıdır.

Sonucu bakımından mozaisizme benzeyen bir başka olgu “kimerizm” (“chimerism”) dir. Kimerizmin mozaisizmden farkı, kromozom yapıları değişik hücrelerin aynı zigottan değil, başka başka zigotlardan kaynaklanmış iki ya da daha çok genotipin ya da hücrenin bulunmasıdır.

Uniparental Dizomi

Uniparental dizomi, fertilize ovumda iki homolog kromozomun bir paternal üyeden, ya anneden ya babadan gelmesidir. İlk tanımlandığından günümüze kadar, 6,7,11,13,14,15,16,21,22 numaralı kromozomlarla XY çiftini ilgilendiren uniparental dizomi olguları bildirilmiştir. Klinikte genellikle normal kromozom kuruluşu ile anomalili fenotip görülür. Buna karşılık 13,21,22 numaralı kromozomları normal fenotipe sahip olgularda vardır. Uniparental dizomiyi en kesin ortaya koyma yolu , α -satellit problemleri gibi DNA markerları kullanarak tanıya gitmektir.

2.11.5.2. Kromozomlardaki Yapısal Düzensizlikler

Sayısal düzensizliklerin oluşmasına neden olan durum hücre bölünmesindeki kusurlardan kaynaklanmaktadır. Oysa yapısal düzensizliklerin nedeni aynı ya da değişik kromozomlardaki kırılma ve yeniden düzenlenmelerdir. Bunların belli başlıları aşağıda belirtilmiştir.

Yer Değiştirme (Translokasyon)

Yer değiştirme ya da translokasyon terimi, bir kromozomdan kopan parçanın, diğer bir kromozoma yerleştiğini ifade eder. Yani, kırılma gösteren heterolog iki kromozomdan birinin kırılan parçasının, diğer kromozomun kırılan parçasının üzerine yapışmasına translokasyon denilir. Translokasyonlar üç grup içerisinde incelenebilir:

- 1- Karşılıklı translokasyon
- 2- Sentrik kaynaşma tipi translokasyon
- 3- İnsersiyonel translokasyon ya transpozisyon.

Karşılıklı Translokasyon (Resiprokal translokasyon)

Bir kırılma sonucu, homolog ya da homolog olmayan kromozomlardan kopan parçaların karşılıklı yer değiştirmesine denir.

Sentrik Kaynaşma (Füzyon) Tipi Translokasyon

Homolog olmayan akrosentrik kromozomlarda görülen özel bir resiprokal traslokasyon tipidir. Bu translokasyonda, kromozomlardan birinde sentromere yakın kısa kolunda, diğesinde ise yine sentromere yakın fakat uzun kolunda birer kırılma olur. Daha sonra iki kromozomun uzun ve kısa kolları birleşerek translokasyon kromozomlarını oluştururlar. Ancak, ortaya çıkan bu anormal kromozomlardan küçük olanı çoğunlukla bir sonraki bölünmede dejenere olarak kaybolup gider. Bu translokasyona Robertson tipi (Robertsonian) translokasyon da denilmektedir.

Gerek resiprokal translokasyonda gerekse sentrik kaynaşma tipinde, translokasyonunun oluşmasını sağlayan kırılmalar büyük bir parça kaybına neden olmamaktadır. Dolayısıyla kişide fazla bir gen kaybı olmayacak ve böyle bir kromozom taşıyan kişinin, genetik yapısında ve fenotipinde bir değışiklik görülmeyecektir. Böyle translokasyonlara dengeli translokasyon (balanced translocation), bu translokasyon kromozomunu taşıyan kişiye de dengeli translokasyon taşıyıcısı (balanced translocation carrier) denmektedir. Bu nokta tıbbi genetik açısından oldukça önemlidir. Çünkü translokasyon taşıyıcısı olan kişinin çocuklarında trizomik ve monozomik bireyler ortaya çıkmaktadır.

İnsersiyonel Translokasyon ya da Transpozisyon

Homolog olmayan iki kromozomdan birinde iki noktada, diğesinde ise bir noktada kırılma olur. İki kırılma olan kromozomdaki parça tek kırılma olan kromozoma gider ve kaynaşır. İşte bu insersiyonel translokasyon ya da transpozisyonudur. Bu kromozomlardan birisinde eksilme ve diğesinde artma söz konusudur. Bu tür dengeli kromozom taşıyıcıları sağlıklı olurlar fakat çocuklarına artma ya da eksilme gösteren kromozomlarını (fakat ikisini birden değıl) aktarabilirler ve onların kromozom anomalisi göstermelerine neden olabilirler.

Eksilme (Deletion)

Eksilme ya da delesyon, bir kırılma sonucu, kromozomun küçük bir parçasının kopması demektir. Kopma iki türlü olabilir; ya bir darbe sonucu kırılan kromozom parçası kopar (terminal delesyon) ya da iki darbe sonucu kopan parça aradan çıktıktan sonra iki parça yeniden kaynaşır (insersiyonel delesyon). Ancak terminal delesyon pek olası değıldir. Çünkü kopan kromozom kolu yapışkan durumda kalır ve yeni bir parçanın buraya eklenmesi beklenir. Oysa delesyondan sonra bir translokasyon görülmemiştir. Yani delesyon iki darbe sonucu kromozom kolundan bir parçanın kopması ve iki parçanın yeniden birbiri ile birleşmesidir. Delesyonun en tipik örneğı, 5p delesyonu sonucu ortaya çıkan kedi miyavlaması (“cri du chat”) sendromudur. Kopan parça sentromersiz olursa hücre bölünmesi sırasında kaybolur gider. Sentromeri olduğı zaman ise, parça ne kadar küçük olursa olsun iğ ipliklerine tutunarak kutuplara çekilir ve hücrede kendini gösterir.

Artma (Duplication)

Homolog iki kromozomdan birinde çift darbe sonucu kopan parça, diğesinde tek darbe sonucu kopan aralığa girerek kaynaşacak olursa artma ya da duplikasyon olgusu ortaya çıkar. Ancak duplikasyon daha çok mayoz bölünmede görülür ve bir kromozom segmentinin iki kopya halinde bulunmasını anlatır. Mayoz bölünme

sırasında bir “eşit olmayan” (unequal) krosing over sonucu ortaya çıkar ve mayotik kromozomlardan birisinde dublikasyon varken diğerinde delesyon görülür. Dublikasyonlar translokasyon, inversiyon ya da izokromozomlu eşlerdeki mayotik olaylar sonucu da çıkabilir. Dublikasyonlar delesyonlardan daha sık görülmelerine daha az zararlıdır. Moleküler seviyedeki küçük bir dublikasyonun evrim açısından gen farklılaşmalarında önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Bu tür gen aileleri ya da kümeleri kimi zaman aynı fonksiyonu (rRNA ya da histon genleri), kimi zaman da benzer fonksiyonu yaparlarken (β -globin kümesi, kollagen genler ya da renkli görme genleri), kimi zaman farklı fonksiyonları yerine getirirler (faktör VIII ve seruloplazmin).Bazen de tamamen fonksiyonsuz hale gelirler (psödogenler).

Homolog kromozomlardaki artmada, gen dublikasyonu olur. Fakat dublikasyon kendini iki tipte gösterir:

- 1- Tandem dublikasyon
Genler ardarda dizilmişlerdir.
- 2- Ters tandem dublikasyon
Artan parça tersine dönerek yeni yerine eklenmiştir.

Ters Dönme (İnversion)

Bir kromozoma iki darbenin gelmesi ve bunun sonucunda kopan parçanın kaybolmadan yani delesyona uğramadan kendi eksenini çevresinde 180° dönerek yine eski yerine yapışmasına ters dönme ya da inversiyon denir. İki türlü ters dönme olmaktadır: 1-parasentrik 2- perisentrik.

1-Parasentrik inversiyon: Sentromerin dışında olan ters dönmelere verilen addır. Kırılma uzun ya da kısa kollarından birinde olur, aradaki parça ters döner. Kromozomun görünüşünün değişmemesine karşın gen sırası değişmiş olur.

2-Perisentrik inversiyon: İki darbe, kromozomun uzun ve kısa kollarına gelir, kırılan aradaki parça kendi çevresinde 180° dönerek eski yerine yapışır perisentrik ters dönme ortaya çıkar. Bu tür ters dönmelerde hem gen sırası hem de kromozom şekli değişir.

Halka (Ring) Kromozom

Bir kromozomun iki ucunda, iki darbe sonucu , iki kırılma olur ve bu kırık uçlara başka bir parça birleşmeden iki uç kaynaşırsa halka şeklinde bir kromozom ortaya çıkar ki buna halka, yüzük ya da ring kromozom adı verilir. Kırılma sonucu kopan parçanın büyüklüğüne göre, ortaya çıkan düzensizliğin de durumu değişir. Halka kromozoma oldukça sık rastlanır ve X-ışınlamasından sonra, tümörlerde, gonadal disgenezisde tarif edilmiştir.

İzokromozom

Metafazda iğ ipliklerine sentromerleriyle tutunan kromozomlar normal olarak boylamasına bölünerek iki kromatide ayrılırlar. Böylece ayrı ayrı kutuplara giderek yeni hücreyi oluşturacak iki kromozom yarımı, hem özgün kromozomun hem de birbirinin özdeşidir. Ancak bir hata sonucu olarak, boylamasına bölünecek olan sentromer, enlemesine de bölünebilir. Bu durumda yavru hücrelerden birisinde yalnızca kromozomun kısa kolları bulunurken diğerinde yalnızca uzun kollar

bulunur. Buna karşılık hücrelerin birinde kısa koldaki, diğerinde uzun koldaki genler hiç bulunmaz ve oluşacak yeni kromozomun iki kolunda da aynı genler bulunur. İşte sentromerin enine bölünmesi sonucu ortaya çıkan median görünümlü kromozomlara izokromozom denir. X kromozomuna ilişkin izokromozom en çok Turner sendromu olgularında (45,X) tarif edilmektedir.

2.12. İnsan Spermatogenezinin Genetik Bozuklukları

İnsan spermatogenezini etkileyen genetik bozuklukların yaklaşık olarak %30 olduğu tahmin edilmektedir. Bu bozukluklar genellikle “azospermi” (semende hiç sperm bulunmaması) ve “idiopatik oligospermi” olarak fenotipe yansır. Spermin ovosit sitoplazması içerisine enjeksiyonu yöntemi (ICSI) ciddi erkek infertilitesinin değerli bir tedavi yöntemi olmasına rağmen bu yöntemle dünyaya gelen bebeğe aşağıdaki sorunları aktarabilir:

- 1-Sterilite (monogenetik mutasyon riski),
- 2-Tekrarlayan düşük (kromozomal anöplidiler),
- 3-Gonadal defektler,
- 4-Dominant gen mutasyonları,
- 5-Bazı hastalıkların poligenik kalıtımı,
- 6-Somatik gen defektleri.

Bu genetik bozuklukların, ICSI ile dünyaya gelen bebeklere aktarılma riski bulunduğundan, bu çiftlerin rutin genetik konsültasyona tutularak genetik bozukluklar hakkında bilgilendirilmeleri gerekir. Buna ek olarak, uzman androloglar seks kromozomu ve otozomal anöplidiler hakkında bilgili olmalıdırlar. Bunlar;

1- Seks kromozom anöplidileri;

- a) X kromozom poliploidisi: 47, XXY Klinefelter sendromu. İnsidans 1/500.
- b) Y kromozom poliploidisi: İnsidans 1/750, fertil olabilirler fakat sık perinatal ölüm ve çocuklarında kromozomal anomaliler gözlenir.
- c) 46, XX karyotipindeki azospermi: İnsidans 1/20000.

2- Otozomal anöplidiler;

- a) Sayısal otozomal anöplidiler: Fertil ve infertil Down sendromu,
- b)Yapısal otozomal bozukluklar: İnfertil erkeklerde 10 kat fazla translokasyonlar ve inversiyonlar mevcuttur.

3-Gen mutasyonları.

Son yirmi yılda infertilitenin tedavisinde dramatik değişiklikler ortaya çıkmıştır. Buna çarpıcı örnekler olarak, özellikle yardımcı üreme tekniklerinden in vitro fertilizasyon (IVF), parsiyel zona diseksiyonu (PZD), sub-zonal inseminasyon (SUZI) ve ICSI yöntemlerinin keşfini verebiliriz [90].

Tahribe uğramış ya da bozuk DNA'ya sahip bir spermin ovositi içine injekte edilmesiyle ne gibi sorunlar ortaya çıkarabilir? Bu soruya yanıt olarak:

1-ovosit spermi reddeder ve fertilizasyon gerçekleşmez,

2-ovosit DNA'yı tamir edebilir ve fertilizasyon tamamlanabilir,
3-DNA'yı tamir etmeye başlar fakat tamiri tamamlayamadan fertilizasyon tamamlanabilir.

İlk iki durumda çok büyük problemler ortaya çıkmayabilir ancak, 3. durum defektif paternal genomun kalıtımına neden olarak, bu etkinin belli aşamalarda ortaya çıkmasını sağlayabilir. Bu aşamalar; gebelik sırasında, doğumda, yavrunun hayatı boyunca ya da ikinci jenerasyonda meydana gelen problemler olabilir[91].

Birçok veriye göre; spermilerin %10'u kromozomal anomaliler taşır, fakat, erkekler arasında kayda değer bir varyasyon söz konusudur. İnfertil erkeklerde %7.1 olan yapısal kromozomal anomalilerden bahsedilirken [92], seks kromozomu anomalilerinin yüksek orandaki görülme sıklığı daha sık rapor edilmiştir [93]. Örneğin, sperm karyotiplendirmesi yapılan 1140 ICSI adayı erkeklerin toplam %4.48'inde kromozomal anomali varlığı ortaya çıkmıştır ve bunlardan %2.96'sı otozomal ve %1.52'si sayısal ya da yapısal seks kromozomu anomalisidir [94].

ICSI'nin bir sonucu olarak meydana gelebilecek kromozomal anomalilerin dışıdan de kaynaklanabileceği düşünülmektedir[95]. ICSI çiftleri ile yapılan bir çalışmada, yapısal kromozomal anomalilerin artmış frekansı rapor edilmiştir [96]. ICSI ile tedavi edilen 434 çift ile yapılan bir başka çalışmada, çiftlerin %3.7'si yapısal kromozomal anomalilere ve %22.1'i diğer kromozomal bozukluklara sahip oldukları bildirilmiştir [97]. Bu çalışmaların da gösterdiği gibi, ICSI'den faydalanan infertil çiftlerde kromozomal bozuklukların beklenmedik artışı bu hasta popülasyonundaki düşük fertilizasyon oranını açıklayabilmektedir.

2.13. Sperm Analizi

Erkek infertilitesini belirleyebilen anahtar faktörleri bulmak üzere, sperm sayımı, hareketliliği, akrozomal yapısı, hücre membran bütünlüğü, morfolojisi, morfometri ve nükleer kromatin bütünlüğü hakkında bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Ancak, hiçbir laboratuvar testi bir erkeğin total fertilitesi hakkında bilgi veremez [98]. Semen parametrelerinin fertilitite üzerine bütün ya da bireysel etkileri önemli bir araştırma konusudur.

Semen kalitesi konvansiyonel olarak bir ejakülattaki sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisine göre belirlenir [34]. Buna bağlı olarak, genellikle bu semen parametreleri ve fertilizasyon yeteneği arasında bir ilişkinin olduğu kabul edilmiştir [99]. Sperm morfolojisi fertilizasyon oranlarıyla en yakın ilişkili parametre olarak görünmektedir [100]. IVF, SUZI, ICSI gibi yardımcı üreme tekniklerinin keşfi ile spermilerin sayısı, hareketliliği ve morfolojisinin erkeğin fertilitite durumu hakkında gerçek bir belirteç olamayacağı giderek artan bir oranda kabul görmektedir. Benzer semen parametrelerine sahip hastalarda, belirgin farklılıktaki fertilizasyon oranlarının rapor edilmesi daha duyarlı bir teste olan gerekliliği ortaya koymaktadır.

2.14. Genetik Bozukluklar ve Yeni Nesil

Spermatogenez bozuklukları ile ilişkili bir seri sitogenetik anomaliler yetersiz erkek fertilitesi ile sonuçlanır ve oligospermik ya da azospermik erkeklerin tedavisinde ICSI yönteminin kullanılması, yavrulara genetik mutasyonların ya da

kromozomal anomalilerin aktarımı veya yeni varyasyonların ortaya çıkması ile sonuçlanabilir. Azospermik ve oligospermik olan 9766 infertil erkekten yapılan 11 taramanın sonucunda kromozomal anomali insidansının %5.8 olduğu bulunmuştur [101].

ICSI yönteminin güvenilirliği ve yeni nesle olan potansiyel riskleri hakkında bazı endişeler mevcuttur [102, 103]. Bu endişeler genel olarak 4 gruba ayrılabilir: Potansiyel olarak genetik bozukluk taşıyan sperm kullanılması riski, yapısal defektlere sahip spermelerin kullanılma riski, ovosit içine yabancı bir materyalin girişi ile meydana gelebilecek mekanik ve biyokimyasal hasar riski ve doğal seçim yollarını devre dışı bırakan bir yöntemin meydana getirebileceği riskler. Ciddi anormal sperm parametrelerine sahip olan nonobstrüktif ya da obstrüktif azospermili erkeklerdeki artmış anormal kromozomal yapı sperm oranından dolayı ICSI uygulanan erkeklerde bu kromozomal anomalilerin yeni nesillere aktarılması riski büyük bir endişe konusudur [104-107].

Amniyosentezle yapılan 585 gebeliğin prenatal taramasında, %2 anormal karyotip, %1 yeni anomaliler ve %1 yapısal anomalilerin doğrudan baba karyotipinden yeni nesile aktarılmış olduğu belirlenmiştir [106-108].

Üreme, genetik olarak riskli bir süreç olup döllenmede en sık rastlanan sonuç embriyonik ya da fetal ölümün meydana gelmesidir. Bu ölümlerin en büyük nedeni fetal veya embriyonik düşük dokularında gözlenen yüksek orandaki kromozomal anomalilere bağlanmaktadır. Buna ek olarak, canlı doğumların %2-3'ünde majör konjenital malformasyonlar mevcuttur. Bu risklere ek olarak, ICSI yöntemi ile infertilite tedavisi gören hastalar genel popülasyona göre bu tür genetik riskleri yeni nesillere aktarmakta daha fazla şansa sahiptirler.

2.15. Sperm Matürasyonunun Biyokimyasal Belirteçleri

2.15.1. Kreatin-N- Fosfo Kinaz (CK) ve Heat Shock Protein A2 (HspA2)

İnsan spermının fertilizasyon potansiyelinin biyokimyasal bir belirtecin olabileceği ihtimali üzerine çalışmalar devam etmekteyken, sperm enerjisinin üretimi ve kullanılmasında önemli rolü olan kreatin-N-fosfotransferaz enziminin çalışılması sonucunda [109, 110]; normospermik ve oligospermik hastaların sperm konsantrasyonları ve CK-aktiviteleri arasında ters bir ilişkinin ortaya çıkması, üstelik "swim-up" yöntemiyle sadece hareketli sperm seçildiğinde, aynı semen örneğinde bu sperm farklı miktarlarda CK aktivitesi göstermesi, sperm CK aktivitesinin bir ejakülatta değişik sperm subpopülasyonlarını ayırt edebilen bir biyokimyasal sperm matürasyonu belirteci olduğunu ortaya koymuştur [3, 111].

Oligospermik ve normospermik örneklerdeki CK miktarı hesaplandığında, spermdeki CK miktarındaki artışın aynı zamanda diğer sitoplazmik proteinlerin artışı ile de paralel olduğu ortaya çıkmıştır [111]. Bu durum, spermiyogenezin son aşamasında, fazla sperm sitoplazmasının adlüminal alana artık cisimcik şeklinde atılımı esnasında meydana gelen gelişimsel bir sperm defektinin olabileceği ileri sürülmüştür. Dolayısıyla, bir semen örneğindeki artmış sperm CK aktivitesi, o semen örneğinde artmış oranda matürasyon geriliği gösteren sperm olabileceğinin bir

göstergesi olabilir. Ayrıca, spermın tamamlanamayan gelişimi ve atılamayan fazla sitoplazmasının sonucunda, anormal baş morfolojisine sahip spermaların meydana geldiği, artmış CK-aktivitesi ile anormal sperm başı morfolojisi arasında bir ilişki olduğu açıklanmıştır [2]. CK antikorı ile immünohistokimyasal olarak boyanmaları sonucunda spermın anormal şekli ve sitoplazmik tutulum arasında sıkı bir ilişki vardır [2, 111] yani, sperm başının büyüklüğünün ve yuvarlaklığının artması ya da amorf şekilde olması, CK immünopozitif spermeler olarak kendini gösterir [112] Buna ek olarak, CK ile boyanan sperm-hemizone komplekslerinde, zona pellusidaya bağlanan spermeler sitoplazmik tutulumu olmayan matür tipteki spermeler olduğu kanıtlanmıştır [5].

Semende bulunan HspA2 oranının %10'nun altında olması, erkeklerde azalmış fertilitenin bir belirteçidir [9]. Erkekler normospermik ya da oligospermik değil de, HspA2 oranlarına bakılarak çok ya da az matür sperm içermelerine göre sınıflandırıldıklarında; sitoplazmik tutulum derecesi, sperm immatüritesi oranı ve kromozomal anöploidiler arasında istatistiksel olarak belirgin bir korelasyon ($r=0.70-0.78$) olduğu ortaya konmuştur [14].

2.15.2. Anilin Mavisi Boyaması

Bir spermatidin olgun bir spermatozoa haline gelmesi, lizince zengin histonların geçiş (transition) proteinleri ve daha sonra da bunların protaminlerle yer değiştirmesi gibi pek çok yapısal ve kimyasal olaylar dizisini gerektirir. Bu işlem “sperm kromatin kondensasyonu” adını alır ve böylece sperm DNA'sı daha sıkı bir yapı kazanmış olur. Spermatogenez boyunca kromatin kondensasyonu ve sonrasında da decondensasyonu başarılı bir fertilizasyon için de oldukça önemli olaylardır.

Terquem ve Dadoune (1983) asidik anilin mavisi boyaması ile lizince zengin histonların seçici olarak boyanabileceğini göstermiştir [113]. Bu nedenle anilin mavisi boyaması, defektif kromatin kondensasyonuna sahip spermatozoanın teşhisi ile fertilitenin değerlendirilmesinde bir belirteç olarak öne sürülmektedir [114-116]. Bununla birlikte zayıf kromatin paketlenmesinin ICSI sonrasında sperm kondensasyonunun başarısızlığı ile ilişkili olabileceğini belirten çalışmalar da bulunmaktadır [117]. Bu nedenle sperm kromatin yapısındaki değişiklikler, IVF ve ICSI çalışmalarında dikkate alınmaya değer olaylardır.

Spermatid gelişimi boyunca somatik histonların spesifik protaminlerle değişimi [118] ve nukleer kondensasyon nedeniyle, uzamış spermatidler asidik anilin mavisi boyası ile boyanma yeteneklerini yitirirler. Normal matür spermatozoa boyanmadan kalırken, histonların bulunduğu yetersiz kromatin kondensasyonuna sahip spermatozoa boyanma gösterir [119].

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Sperm Örneklerinin Toplanması

Hasta popülasyonu, Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Departmanı, Sperm Fizyolojisi Laboratuvarına semen analizi için başvuran erkeklerden oluşmuştur. Araştırmanın insan materyali boyutu, Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi İnsan Araştırmaları Komitesi (etik kurul) tarafından onaylanmıştır.

Sperm Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) görüntülerinin elde edilmesi için, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Androloji Bilim Dalı'na semen analizi için başvuran erkeklerden alınan semen örnekleri kullanılmıştır. Ayrıca, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulu onayı alınmıştır.

3.2. Sperm-Hyalüronik Asit Bağlanması (Sperm HBA testi)

Sperm-HA bağlanması çalışmaları için bir tarafı kaplanmamış (A odacığı) , diğer tarafı (B odacığı) ise katı formda hyalüronik asit ile kaplanmış Cell-Vu slaytları kullanıldı (Biocoat INC. Fort Washington, PA) (Şekil 1). Bu slaytların yanı sıra kullanılan lameller de özel bir özelliğe sahiptir. Öyleki bu lamellerin üzerinde sperm sayımı yapmaya olanak sağlayan (10x10) =100 kare bulunmaktadır. HA'e bağlanan hareketli sperm yüzdesini belirlemek için şu formül kullanıldı:

$$\text{Semen örneğinin HA'e bağlanma yüzdesi} = 100 - \frac{50XA}{mxc}$$

A: Rastgele 10 karede bağlanmayan sperm sayısı

m: %motilite

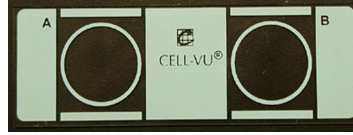
c: konsantrasyon X10⁶

Örneğin sperm konsantrasyonu 20 X10⁶, motilitesi %40 olan bir hastanın A değeri 2 olarak sayılmıştır. Buna göre;

$$\begin{aligned} \text{Semen örneğinin HA'e} \\ \text{Bağlanma Yüzdesi} &= 100 - \left[\frac{50 \times 2}{20 \times 40} \right] \\ &= 100 - \frac{100}{8} \\ &= 100 - 12.5 \\ &= \% 87.5 \text{'tur.} \end{aligned}$$

HA'e-bağlanma ile ilgili çalışmalarda, 7µl işlem görmemiş semen örneği ya da yıkanarak seminal sıvıdan arındırılmış sperm örnekleri HA slaytları kullanılarak değerlendirildi. A odacığında sadece semen örneğindeki hareketli sperm sayısı

hesaplandı. B odacığında ise HA'ye bağlanan spermier seçildi. Bu amaçla 7µl semen HA yüzeyinde oda ısısında 5-10dk. inkübe edildikten sonra, %0.5 Bovine serum albumin (BSA) içeren human tubal fluid (HTF, Irvine Scientific, Irvine, CA) medyumu ile çok dikkatli bir şekilde yıkandı. Böylece HA'ye bağlanmayan spermierin uzaklaştırılması sağlanmış oldu. Daha sonra slaytlar havada kurutuldu ve % 3.7'lik formalin ya da metanol asetik asit ile amaca yönelik olarak fikse edildi.



Şekil 1. A yüzü kaplanmamış, B yüzü hyalüronik asit ile kaplı Cell-Vu Slaytı.

3.3. Sperm Kromatininin Değerlendirilmesi: Anilin Mavisi Boyaması

Elde edilen semen örnekleri, %0.3 BSA ve 30 mM salin (tuz) imidazol (SAIM) içeren solüsyonunda süspanse edildi. Semen örnekleri, 1200 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, sperm peleti tekrar SAIM solüsyonu ile süspanse edildi. HA'ye bağlanan ve bağlanmayan spermier seçildikten sonra; spermier %5'lik Anilin Mavisi (pH=3.5) boyası ile boyanarak, işlem görmemiş semendeki ve HA'ye bağlanan spermierin kromatin yapıları incelendi. İmmatür (olgun olmayan) kromatin yapısına sahip, histonlarca zengin sperm koyu mavi olarak boyandı.

3.4. Sperm Hücresel Matürasyonunun Değerlendirilmesi: Kreatin Kinaz (CK) İmmüno Floresan Boyaması

HA'ye bağlanan spermierin seçimi yapıldıktan sonra, işlem görmemiş semen ve HA'ye bağlanmış sperm fraksiyonları %3.7'lik formaldehit ile 20dk oda ısısında fikse edildi. Formaldehit uzaklaştırılarak sükröz içeren fosfat tamponu (PB-suc) ile slaytlar 3 kez yıkandı. Ardından, spermier %3'lük bovine serum albumin (BSA) solüsyonu ile oda ısısında 1 saat bekletildi. Bloklama aşamasından sonra, slaytlar 1:1000 dilüsyonunda poliklonal anti-CK-B antiserumu (Chemicon Co., Temecula, CA) ile muamele edildi. PB-suc ile tekrarlanan yıkama aşamalarından sonra 1:1000 dilüsyonunda biyotinlenmiş anti-goat sekonder antibadi uygulandı. Ardından, slaytlar 1:200 dilüsyonunda fluorasan Avidin D (Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) ile 30 dk. bekletildi. PB-suc ile 3 kez yıkandıktan sonra Vectashild kapama solüsyonu (Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) ile kapatılarak florasan mikroskopta değerlendirme yapıldı.

3.5. Sperm Ultrastrüktürü için TEM Metodu

Semende, HA'ye bağlanan ve bağlanmayan spermierde, ince yapı ve üç boyutlu yapı değişiklikleri Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) ile incelenerek, bağlanan spermierin ince yapısı ile hücre membranı bütünlüğü ilişkisi kıyaslandı. TEM tekniğinin uygulanması konusunda Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi TEMGA Ünitesi ile iş birliği yapıldı.

3.5.1. Sperm İncelemeleri İçin Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Protokolü

1. Semen en az 2 kat hacminde %4 gluteraldehit fiksatifisi ile oda ısısında karıştırıldı ve 30-60 dk tespit edildi.
2. 600 g'de 10 dk oda ısısında santrifüj edildi.
3. Supernatant uzaklaştırıldı ve eşit hacimde yıkama solusyonu ilave edildi.
4. Bu işlemler (2 ve 3. basamaklar) bir kez daha tekrarlandı.
5. Supernatant uzaklaştırıldı ve postfiksasyon amacıyla semenin ilk hacmiyle eşit hacimde %2'lik OsO₄ ilave edilerek, 60 dk oda ısısında tespit edildikten sonra 600 g'de 10 dk oda ısısında santrifüj edildi.
6. Supernatant uzaklaştırıldı ve oluşan pelet 5 ml distile su ile süspansedildi.
7. 600 g'de 10 dk oda ısısında santrifüj edildi.
8. Bu işlemler (6 ve 7. basamaklar) bir kez daha tekrarlandı.
9. Supernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine toplam hacim 0.3 ml olacak şekilde distile su ilave edildi.
10. 600 g'de 10 dk oda ısısında santrifüj edildi.
11. Supernatant uzaklaştırıldı ve oluşan pelet, 200µl %10'luk BSA solusyonu ile yavaşça süspansedilerek 60 dk oda ısısında bekletildi.
12. 1500 g'de 15-20 dk oda ısısında santrifüj edildi.
13. Supernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine yavaşça 200µl %2.5'lik tamponlanmış gluteraldehit fiksatifisi eklendi. Bu aşamada peletin dağılmasına dikkat edildi ve gece boyu +4°C bekletildi.
14. Ertesi gün, ependorf tüpü bistüri ile kesilerek pelet dikkatlice çıkarıldı ve cam slayt üzerinde pelet 1mm'den küçük parçalara bölündü. Bu aşamada, parçaların kurumamasına özen gösterildi. Parçalar 10 ml'lik cam tüplerde aktarıldı ve üzerlerine 3 ml %1'lik uranil asetat eklenerek 60 dk oda ısısında bekletildi.
15. Uranil asetat uzaklaştırıldı ve yerine 3 ml %80'lik etanol eklenerek 3 kez 10'ar dk oda ısısında bekletildi. Ardından sırayla;
16. 3 ml %90'lık etanol oda ısısında 3 kez 10'ar dk.
17. 3 ml %96'lık etanol oda ısısında 3 kez 10'ar dk.

18. 3 ml %100'lük aseton oda ısısında 3 kez 10'ar dk.
19. %100'lük etanol uzaklaştırıldı ve örnekler 3 ml propilen oksit içerisinde +4°C'de 2 kez 10'ar dk. bekletildi.
20. Stok Araldit Ana Karışımı (AAK) (91 ml araldit ve 84 ml DDSA karışımından oluşur) kullanılarak gömme aşamasına geçildi. Parçalar aşağıdaki karışımda gece boyu rotatorda bekletildi;

(Propilen oksit) + (AAK + BDMA-DY-062).....(1:1)oranında karıştırıldı
21. Gömme solüsyonunun kalan miktarına (50 ml'sine) 1 ml BDMA-DY-062 (plastikleştirici) ilave edildi ve dokular 60°C'de 48 saat bekletildi.
22. Polimerize olan araldit karışımındaki dokulardan önce yarı ince ve ardından ince kesitler ultramikrotom ile alınarak, TEM gözlemleri yapıldı.

3.6. HA'e Bağlanma ve Karyotip Analizi

Projenin diğer bir aşaması olarak HA'e bağlanan ve bağlanmayan spermier seçildikten sonra, spermatozoaların hamster ya da fare ovositlerini döllemesi sağlanılmaya çalışıldı. Amaç; dişi ve erkek pronükleuslarının gözden kaybolmasından sonra, insan spermine ait metafaz aşamasındaki kromozomların analizini yapmaktır.

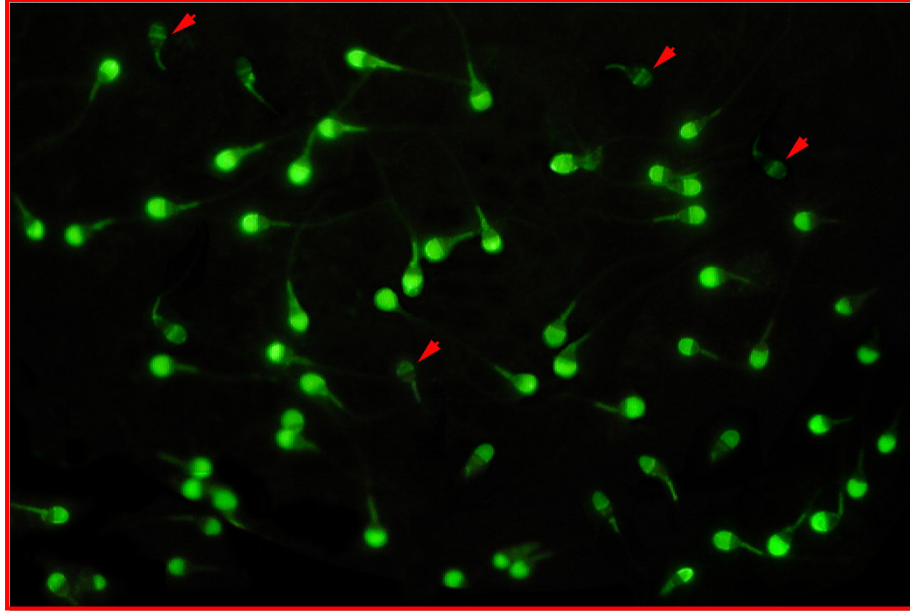
3.6.1. Kullanılan Teknikler

1. Dondurulmuş hamster ovositlerine insan spermierin injeksiyonu (ICSI)
2. Dondurulmuş hamster ovositleri ile insan spermier inkübasyonu (IVF)
3. Taze hamster ovositleri ile insan spermier inkübasyonu (IVF)
4. Taze fare ovositleri ile insan spermier inkübasyonu (IVF)
5. Taze fare ovositlerine insan spermier injeksiyonu (ICSI)

3.6.2. İnsan Spermierin Hazırlanması

1. 0.5-1ml likefiye olmuş semen, %0.3 oranında insan serum albumini (HSA) içeren Biggers, Whitten, and Whittingham (BBW) medyumunu ile 1: 2 oranında dilue edildikten sonra 400X g'de 10 dk santrifüj edildi.
2. Altta kalan 1ml'lik kısım hariç üstte kalan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüp 37°C'de inkübatörde 30dk süreyle bekletildi. Böylece yukarı doğru yüzebilen, hareketli spermierin seçilmesi sağlandı (swim-up yöntemi).
3. Üstte kalan hareketli spermierce zengin 0.5ml'lik süpernatant alındı. Sperm kapasitasyonu için 6mM CaCl₂ ve 6.0µM progesteron resüpsansiyona eklendi.
4. 2-3 saatlik inkübasyon sonrasında, örnek 10 dakika 400xg santrifüj edildi ve sperm peleti %3.5'lük HSA, 6 Mm CaCl₂ ve 3.0 µM progesteron içeren BWW medyumunu içerisinde resüpsansiyona edildi.

5. Bunlara ilave olarak, deneylerden önce, akrozom reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla işlem görmemiş ve inkübe edilmiş sperm örneklerine Pisum Sativum boyaması yapıldı. (Şekil 2).



Şekil 2. Pisum sativum ile boyanmış insan spermleri. Boyanma derecelerindeki farklılıklar dikkati çekmektedir.

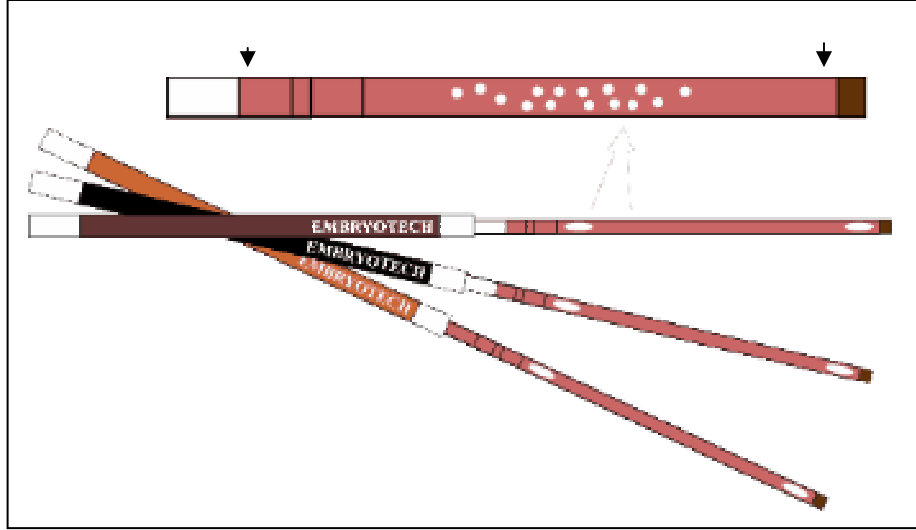
3.6.3. Dondurulmuş Hamster Ovositleri

Dondurulmuş Hamster ovositlerine (Embryotech Laboratories, Wilmington, MA USA) insan sperminin mikroenjeksiyonu Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite bölümü, IVF Laboratuvarı'nda yapıldı. Hamster ovositleri aşağıda belirtilen prosedüre uygun olarak çözüldü.

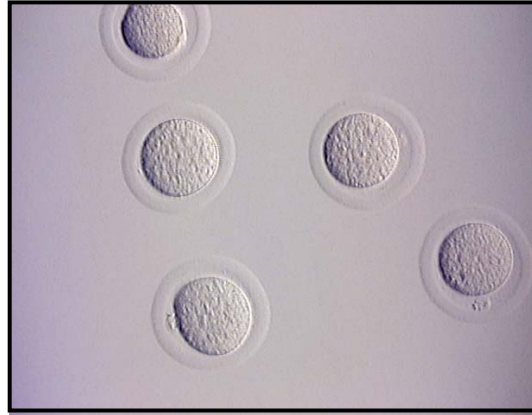
1. Kamış sıvı nitrojen tankından çıkarıldıktan sonra, 2 dk süreyle oda ısısında tutuldu.
2. Oda ısısında inkübasyondan sonra, kamış 37⁰C'lik su banyosunda en az 1 dk süreyle bekletildi.
3. Su banyosundan çıkarılan kamış hafifçe silindikten sonra şekil 3'te ok ile belirtilen yerlerden bir makas yardımıyla kesildi.
4. Kamışın içeriği oda ısısında çok dikkatli bir şekilde steromikroskop altında M2, (pH=7.0-7.4) medyumuna (Embryotech Laboratories, Wilmington, MA USA) aktarıldı. Medyum içerisinde 10 dk rehidrate edilen ovositler kullanıma hazır oldu.

Semen örneğine enjeksiyon öncesinde, motiliteyi azaltmak amacıyla 10%'luk polivinylpyrrolidone (PVP;Irvine Scientific) ilave edildi.Enjeksiyon sonrası ovositler M16 kültür medyumuna içerisinde inkübe edildi (Şekil 4). Deneyler süresince embriyo ve doku kültüründe kullanılan yağ solüsyonu (SAGE-In vitro Fertilization, CT, USA) içerisinde çalışıldı.

İnkübasyon sonrasında, ertesi gün, zona pellusida asit tyrode (pH 2.1-2.5; Irvine Scientific) ile uzaklaştırıldı. Daha sonra, embriyolar aşağıda belirtilen fiksasyon tekniğine göre fikse edildi.



Şekil 3. Hamster ovositlerinin dondurulduğu ticari kamışlar.



Şekil 4: Dondurulmuş hamster ovositlerinin çözöldükten sonra, insan sperm i injeksiyonu sonrasında IVF medyumu içerisindeki durumu.

3.6.4. Taze Ovosit Toplanması, Sperm ile Ko-inkübasyon

1. Dişi Syrian golden hamsterleri postöstrus vajinal akıntılarının göröldüğü sabah, 30IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) ve bunun 60 saat ardından 30IU human koryonik gonadotropin (HCG) injeksiyonu ile süperovule edildi.

Fare ovositlerinin elde edilmesi için ise 7.5IU PMSG ve bunun 48 saat ardından 7.5IU HCG injeksiyonu yapıldı.

2. HCG injeksiyonundan 16.5–17 saat sonra hamsterler, 14 saat sonra da fareler öldüröldü. Oviduktları izole edilerek PBS solusyonuna aktarıldı. Diseksiyon

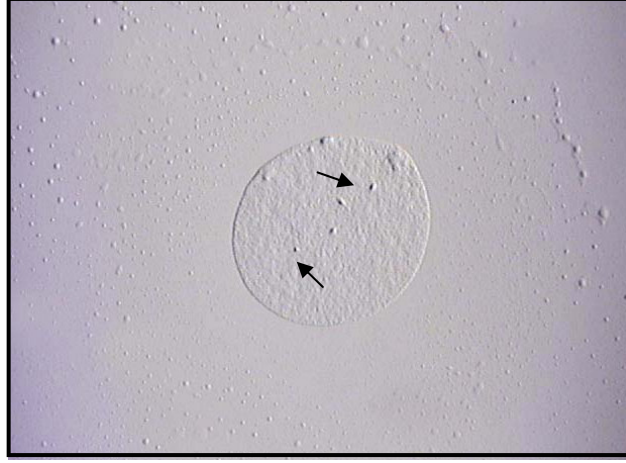
mikroskobu altında, oviduktlar hyalüronidaz içeren HEPES tamponlu kültür medyumunu içerisinde parçalandı. Hamster başına, ortalama, 30-60 ovosit elde edildi.

3. Ovositler HEPES tamponlu M2 kültür medyası ile yıkandı ve %0.1'lik tripsin solüsyonu ile zona pellusida uzaklaştırıldı.
4. Ovositler BWW-%3.5 HSA medyası ile yıkandı ve %5 oranında CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde bekletildi.
5. Ortalama 5 000-10 000 hareketli sperm içeren 2-5µl'lik sperm süspansiyonu bu damlacığın içine eklendi ve inkübasyona devam edildi.
6. 1-3 saat sonra ovositler, plasma membranlarına tutunmuş spermleri uzaklaştırmak için %20 fetal bovine serum (FBS) içeren HAM's F10 medyumunu ile yıkandı. Deneyleerin bir kısmında HAM's F10 medyumunun dışında BWW-%3.5 HSA ya da M2 kültür medyumları ile de inkübasyon yapıldı.
7. 12-13 saat süreyle inkübasyona devam edildi. Bu süre zarfında ovositler kontrol edilerek, pronükleusların oluşup oluşmadığı tespit edildi. Pronükleusların görüldüğü ovositler, 0.4µg/ml kolsemid (Gibco) içeren HAM's F10/FBS medyasına alındı. Tek veya daha fazla pronükleusa sahip embriyolar da birbirinden ayrıldı.
8. 2-24 saat süreyle kolsemid inkübasyonu boyunca, 1'er saat arayla yapılan kontrollerle embriyolarda pronükleusların kaybolması için gözlem yapıldı.

3.6.5. Fiksasyon ve Kromozom Yaymalarının Hazırlanması

Normal morfolojiye sahip ovositler kromozomal analiz için kullanıldı. Bu amaçla Mikamo ve Kamiguchi tarafından tarif edilen gradual- fiksation/air drying tekniği kullanıldı [120].

1. Ovositler oda ısısında, hipotonik solüsyon (75mM KCl) içerisinde 10dk inkübe edildi.
2. Fiksatif I (metanol: asetik asit:H₂O, 5:1:4)'de 5 dk beklenildi.
3. Ovositler fiksatif I'den alınarak temiz lamlar üzerine aktarıldı ve Fiksatif II (metanol: asetik asit,3:1) kaplandı.
4. Fiksatif II'den 2-3 dakika sonra 1 dakika süreyle fiksatif III (metanol: asetik asit:H₂O, 3:3:1 ile muamele edildi (Şekil 5).
5. Ardından lamlar havada kurutuldu ve fikse edilmiş preparasyonlar Wright boyası ile boyandı.
6. İlerleyen çalışmalarda fikse edilmiş slaytlar üzerinde G-banding boyama yöntemi uygulandı.



Şekil 5. Mikroinjeksiyondan sonra fikse edilen hamster ovositi ve içinde yer alan insan spermi.

3.6.6. Kromozom Bantlarının Analizi: G- Banding

Embriyoların yaşlanma sürecini gerçekleştirmek için lamlar G-banding öncesinde 80⁰C’de 30 dk inkübe edildi. Bu süreç sonrasında soğumaları için oda ısısında birkaç dakika bekledikten sonra, 8 dk 56⁰C’lik su banyosunda phydrion tamponu ile muamele edildi. Ardından tripsin damlatıldı. Bunu takip eden basamakta ise Giemsa boyası ile 40 saniye boyandı. G- banding için en kritik aşama tripsin aşamasıdır. Çünkü tripsin süresi, ortamın ısısından nemine kadar pek çok faktör tarafından değişebilmektedir. Bu nedenle her boyama için ortamın ısısı ve neminin bilinmesi, bir sonraki boyamada rehber olarak kullanıldı.

3.7. İstatistiksel Analiz

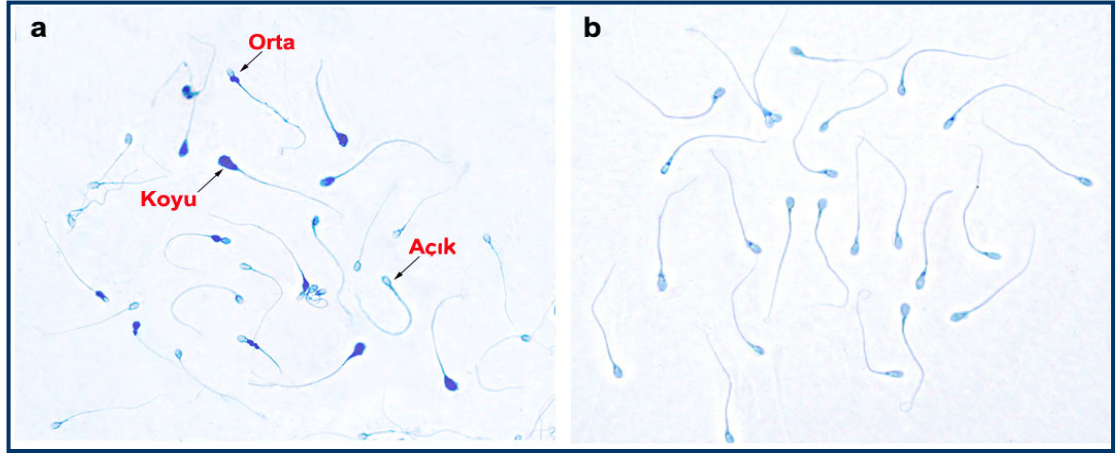
Sperm parametreleri SigmaStat (Version 2.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) programı kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi ($p < 0.05$) olarak alındı.

BULGULAR

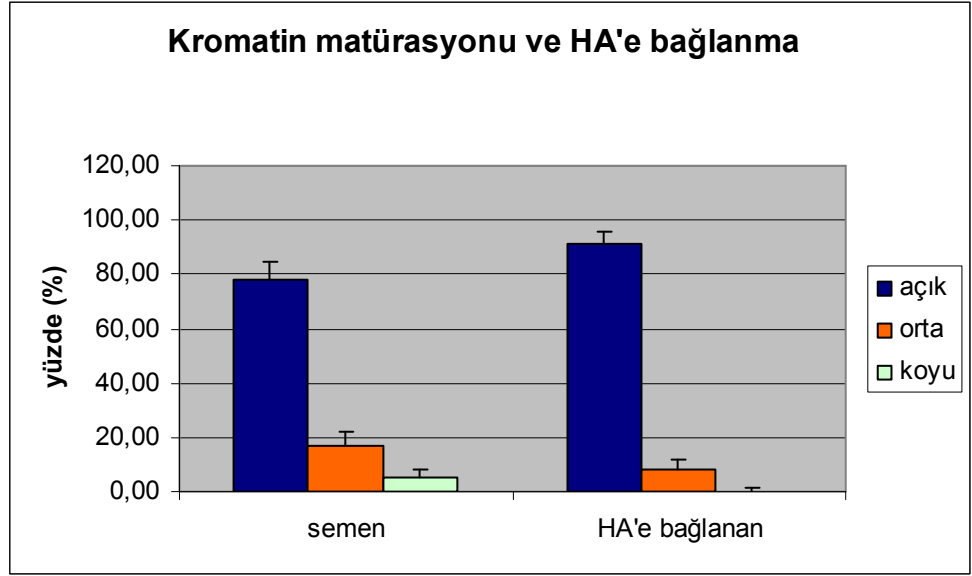
4.1. HA'e Bağlanma ve Kromatin Matürasyonu

Sperm kromatin matürasyonu ile sperm HA'e seçici olarak bağlanması arasındaki potansiyel ilişkiyi ortaya koyabilmek için, işlem görmemiş semen ve HA'e bağlanmış sperm grupları anilin mavisi ile boyanarak iki grup birbiri ile karşılaştırıldı. Anilin mavisi, seçici olarak immatür spermde mevcut histonları boyamaktadır. Bununla birlikte matür spermde histonlar protaminlerle yer değiştirdiği için, bu sperm anilin mavisi ile açık mavi renkte boyanırlar. Buradan yola çıkarak, boyanma yoğunluğuna göre sperm 3 ayrı grup altında sınıflandırıldı: açık mavi boyanan ya da hiç boya almayan (matür sperm), orta derecede mavi boyanan (ara formda sperm) ve koyu derecede mavi boyanan (immatür sperm). (Şekil 6a,b).

İşlem görmemiş semen ve HA'e bağlanan gruplar için her hastadan 200 sperm değerlendirildi. Elde edilen veriler şekil 7'de gösterilmiştir. Buna göre, açık renkte boyanan matür sperm oranının HA'e bağlanan grupta daha fazla olduğu görüldü (semen: %78±7; HA'e bağlanan: %91±5) (n=30, konsantrasyon=34.8±22.9 x10⁶, motilite= %53±12, P<0.001) (Şekil 6b). Dolayısıyla, HA'e bağlanan grup, matürasyonu az olan sperm eliminasyonu bakımından başarılı olmuştur.



Şekil 6. İşlem görmemiş semen örneği (a) ve HA'e bağlanan sperm örneklerinde (b) görülen anilin mavisi boyaması. Kromatin olgunlaşması (matürasyonu) düzgün olarak gerçekleşmiş olan spermelerin anilin mavisi ile açık renkte boyandıkları gözleniyor.

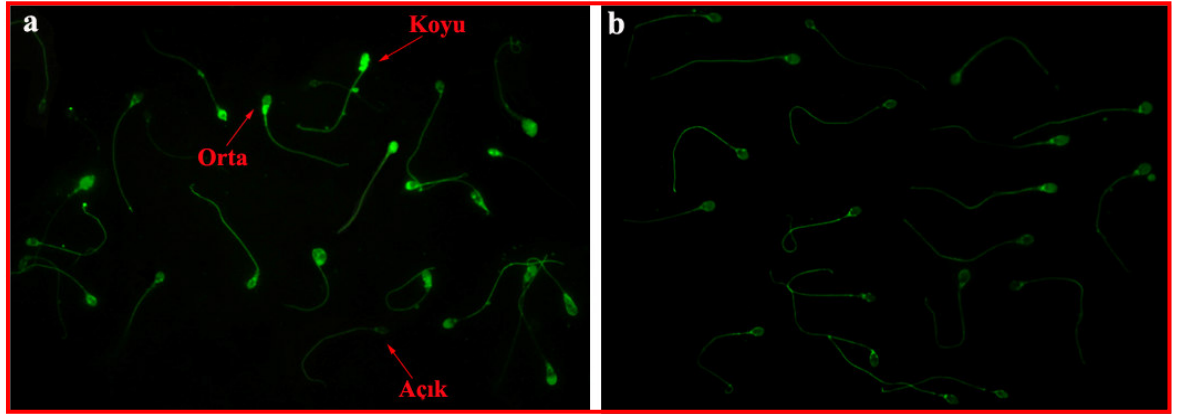


Şekil 7. Anilin mavisi boyası sonrasında semen ve HA'e bağlanan sperm gruplarında açık (matür), orta (intermediate) ve koyu (immatür) boyanan sperm yüzdelerini gösteren histogram.

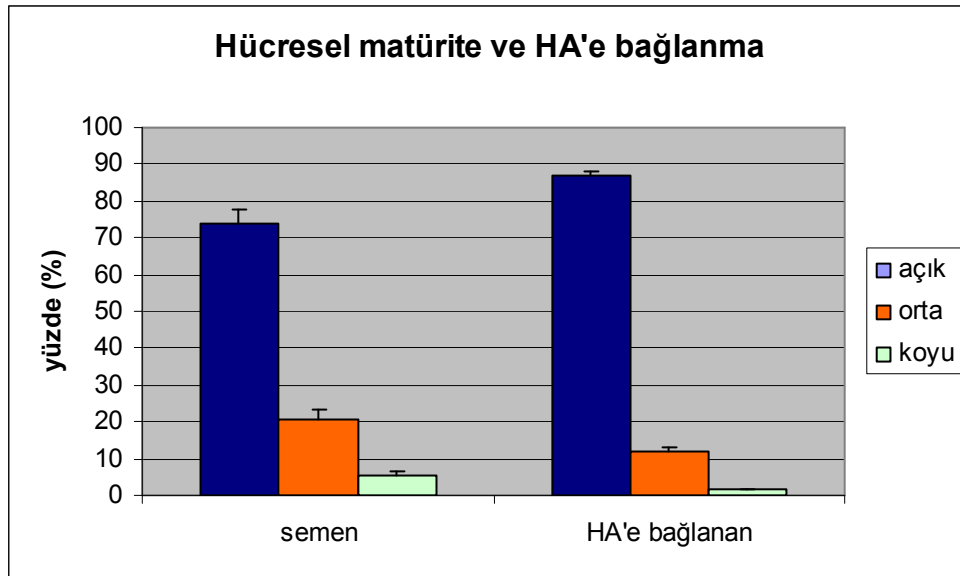
4.2. HA'e Bağlanma ve Hücresel Matürasyon: CK-B İmmunofluoresan Boyama

Matür bir spermi, matür olmayan bir spermde ayıran primer görsel özellik, sitoplazmik bir protein olan CK-B ile immuno boyama sonrasında bu spermde sitoplazmik tutulumun varlığı ya da yokluğudur. Mevcut çalışmada, HA'e bağlanma ve anilin mavisi çalışmasında kullanılan deneysel mantığa benzer bir şekilde, sperm matürasyonu ve HA'e bağlanma arasındaki ilişkiyi değerlendirdik. Bu amaca uygun olarak işlem görmemiş ve HA'e bağlanan sperm grupları formaldehit ile fikse edilerek immunofluoresan boyama yapıldı (n=13, konsantrasyon= $36.4 \pm 22.6 \times 10^6$, m= 52.2 ± 15.6). Semen ve HA'e bağlanan gruplar için her hastadan 200 sperm değerlendirildi. Anilin mavisi boyamasında olduğu gibi, immunofluoresan boyama sonrasında da 3 farklı boyanma grubu gözlemlendi: açık ya da boya almayan (matür sperm), orta dercede immünofloresan gösteren (ara formda sperm) ve koyu dercede immünofloresan gösteren (immatür sperm) (Şekil 8a,b).

Semen grubunda Anilin mavisi ile ilgili çalışmalarda elde edilen sonuçlarla tutarlı olarak, sitoplazmik tutulumuna sahip koyu (5 ± 1) ve intermediate (21 ± 3) renkte boyanmış sperm oranı HA'e bağlanan gruba göre daha fazla idi (sırasıyla 1.4 ± 0.2 ; 12 ± 1 , $P < 0.001$) (Şekil 9).



Sekil 8. Normal ve anormal morfolojideki spermelerin Kreatin Fosfokinaz (CK) immunoflorasan ile gösterilmesi. Sitoplazmik tutulumu olan spermeler, CK antikorunu ile fazla sitoplazmalarından dolayı pozitif olarak boyanırlar Buna karşılık matürasyonu düzgün olarak gerçekleşmiş olan ve fazla sitoplazma içermeyen spermeler ise CK antikorunu ile negatif olarak boyanırlar.(a) İşlem görmemiş semen örneği (b) HA'e bağlanan semen örneği.



Şekil 9. CK-B immunofluoresan boyama sonrasında semen ve HA'e bağlanan sperm gruplarında açık (matür), orta (intermediate) ve koyu (immatür) boyanan sperm yüzdelerini gösteren histogram.

4.3. TEM Bulguları

Ultrastrüktürel bulgu olarak gözlenen çarpıcı özellikler her üç gruptaki sperm morfolojisi bağlamında kıyaslanarak belirlendi. Özellikle sperm nükleusu, nükleus kromatini, akrozom, orta parçadaki mitokondriyal düzen ve kuyruk parçasındaki tübül yapı ile fibriller düzeni kıyaslandı. Gözlemler aşağıdaki şekilde özetlendi.

4.3.1. HA'e Bağlanan Spermiler

Akrozomal vezikül normal görünümde olup içerikleri homojen bir yapı gösterdi. Bazı spermelerde plasmalemma ve akrozomal vezikül membranları birbirine uyumlu olarak dalgalanmalar gösterdi. Genel görünümü ile oval şekilli veya fuziform görünümlü bazen sivri uçlu olabilecek bir yapı düzeninde, düzgün bir baş ve ardından düzgün bir orta parça gösteren, uzun kuyruklu spermiler yaygın olarak gözlemlendi (Şekil 10a-d).

Bu grupta, sitoplazmik tutulumu sahip spermiler çok nadir gözlemlendi. Ancak bazı örneklerde akrozomal vezikül ve plasmalemma çok hafif ayrılmalar gösterirken kuyruk bölgesindeki fibriller elemanlar, eksen mekiği, 9+2 tübül sistem ve çevredeki dış yoğun fibril kolonları net olarak gözlemlendi (Şekil 11a-c). HA'e bağlanmayanlarda görülen ileri derecedeki kromatin granülleşme özelliği gözlemlenmedi. Akrozomal vezikül ve 9+2 yapısındaki aksonem yapısında herhangi bir bozukluk görülmedi.

4.3.2. HA'e Bağlanmayan Spermiler

Yaygın şekilde sitoplazmik tutulum vardı. Düzgün görünümlü matür sperm sayısı azdı. İleri derecede şekil bozuklukları ile akrozomal vezikül ve sperm başı tam olgunlaşmamış görüldü (Şekil 12a). Nükleusta yer yer multiveziküler elemanların olması, plasma membranındaki ondülasyon ve nükleus ile akrozom vezikülü arasında herni oluşturmuş yoğun materyal mevcuttu (Şekil 12b). En önemli özellik ise nükleer kromatinin heterokromatik özellikte olup ileri düzeyde granülleşme ve yoğun partiküller haline dönüşme özelliği göstermesi idi (Şekil 12c).

İleri düzeyde sitoplazmik tutulumun görüldüğü uzamış ve yuvarlak immatür spermatidlerle birlikte, kuyruk bölgesinde de sitoplazmik kitlelerin varlığı karakteristik bulgular olarak gözlemlendi (Şekil 13a).

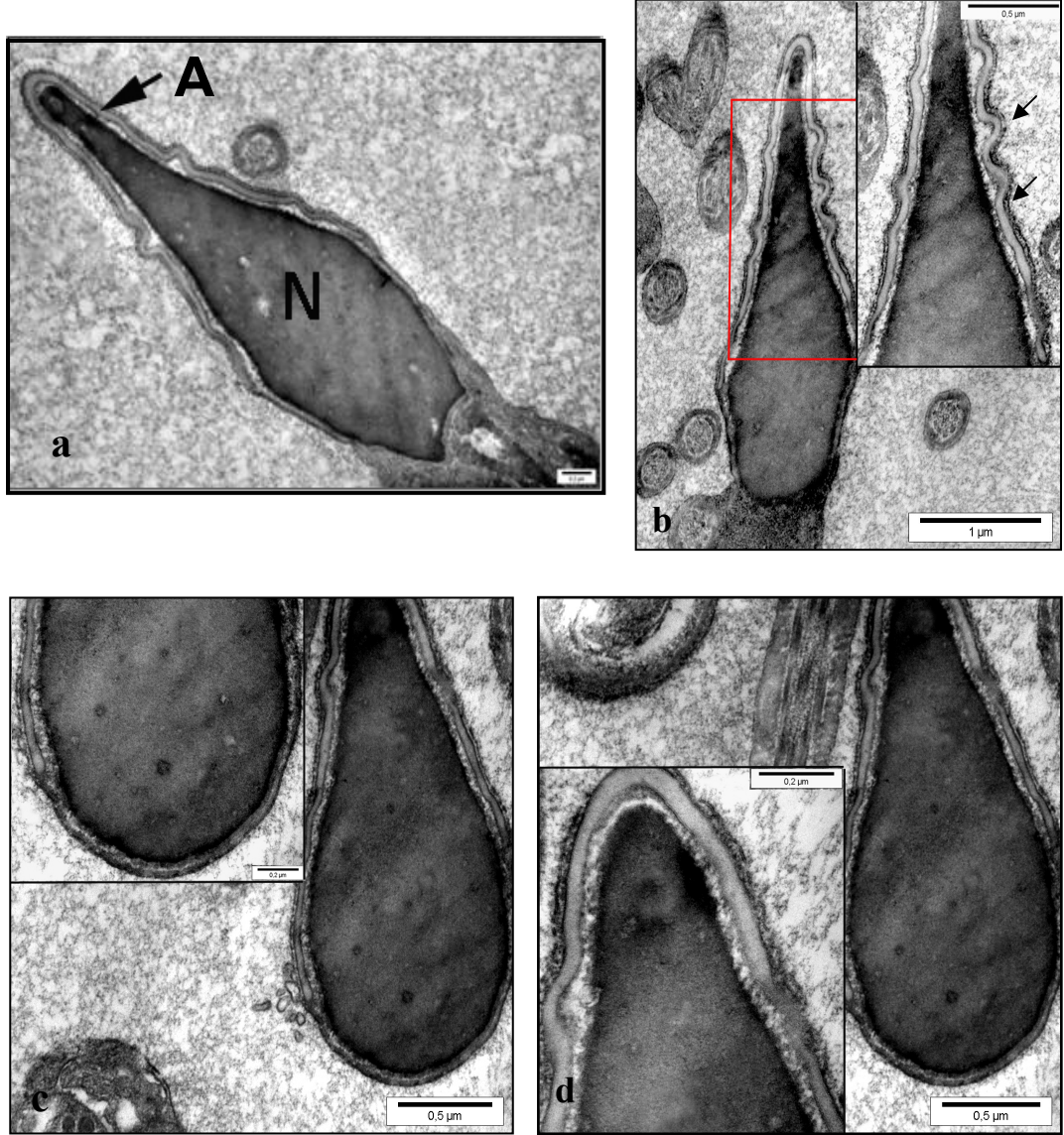
Anormal baş görünümlü spermilerin, genellikle vakuol, elektron yoğun yapılarıyla sitoplazmik elemanlar, membran şişkinlikleri, bölgesel sakülasyonlar dikkat çekiyordu (Şekil 13b).

Sitoplazmik artıkları taşıyan örneklerde, özellikle mitokondriyal spiral bölgede yapı düzeni bozulmuş, organel sistemleri ile karmaşa gösteren tübulo fibriller elemanlar yoğundu (Şekil 13a-c).

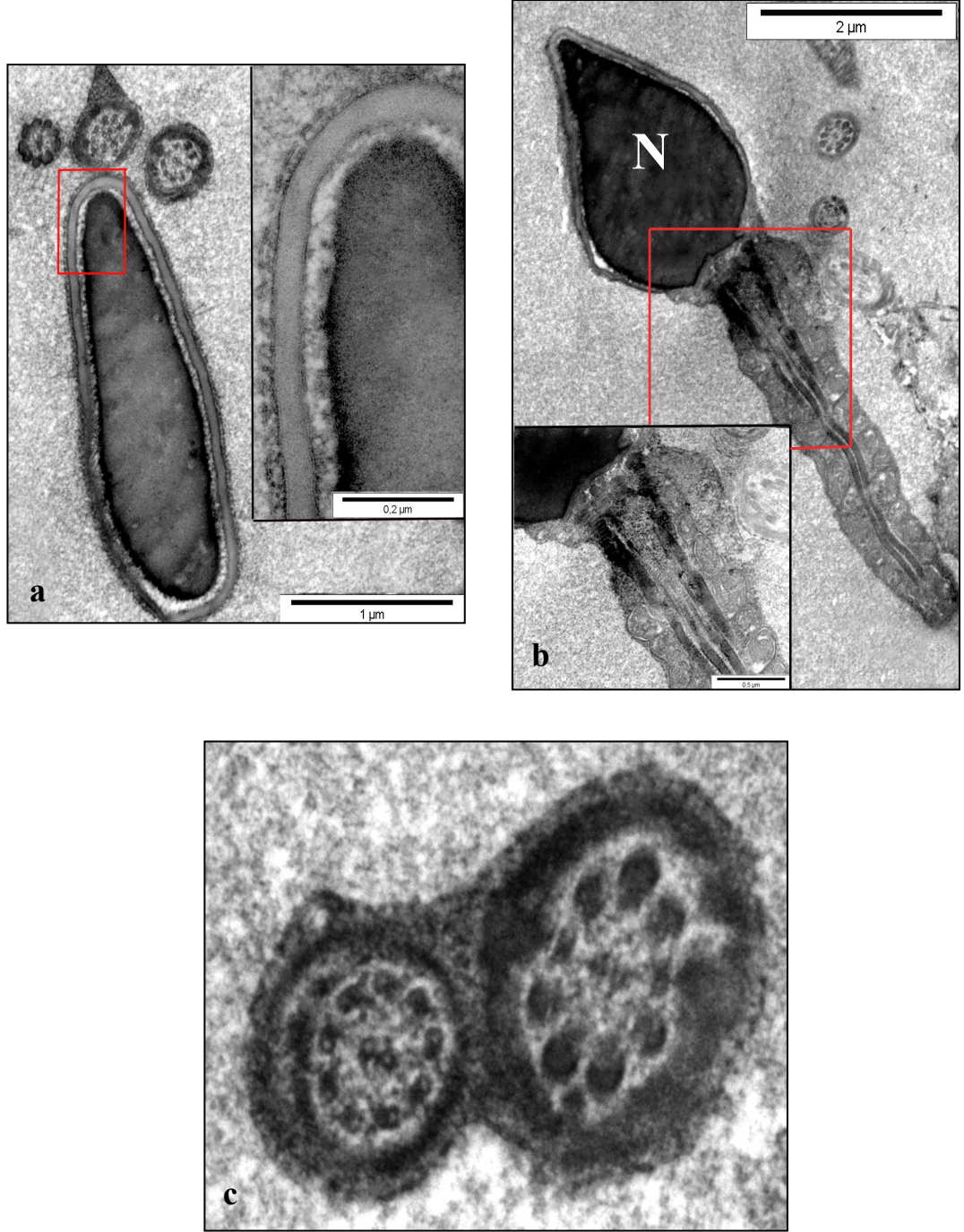
4.3.3. Semen

Beklendiği gibi her türlü değişkenliğe açık sperm tipleri ve yapı elemanları birlikte gözlemlendi. Orta parçadaki spiral mitokondriyal yapılar, fibriller elemanlar ve kuyruk esas parçasındaki 9+2 tübül sistem ile bunların

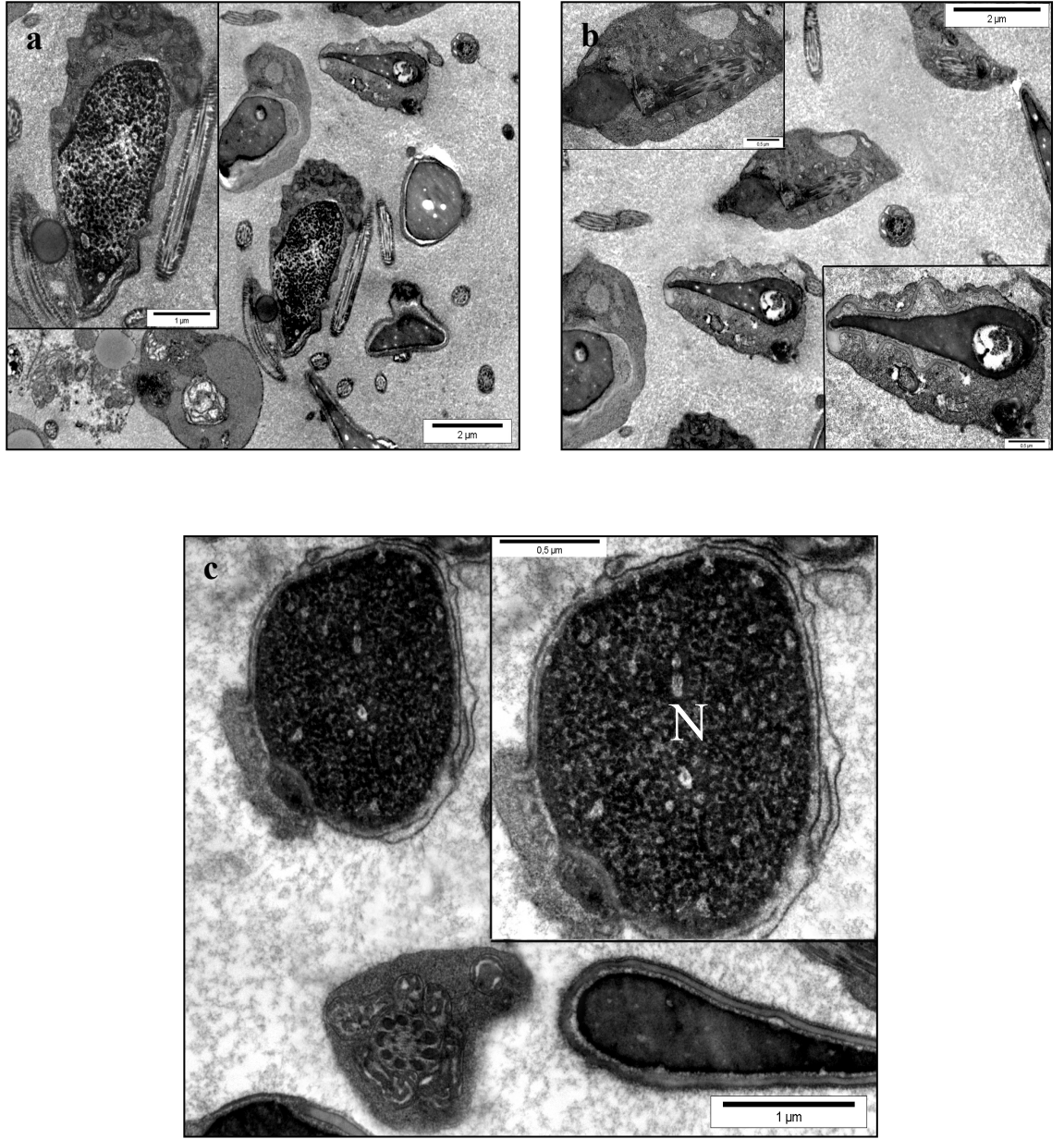
çevresindeki dış yoğun fibril yapısını açık olarak gösteren spermiyum örneklerinin yanında, baş ve orta parçadaki dejenere yapılar ve yoğun sitoplazmik tutulum ile karakterize şişkin akrozomal kesecikler ve düzensiz nükleer yapı özelliği taşıyan spermiyum tipleri de yaygındı (Şekil 14a-d).



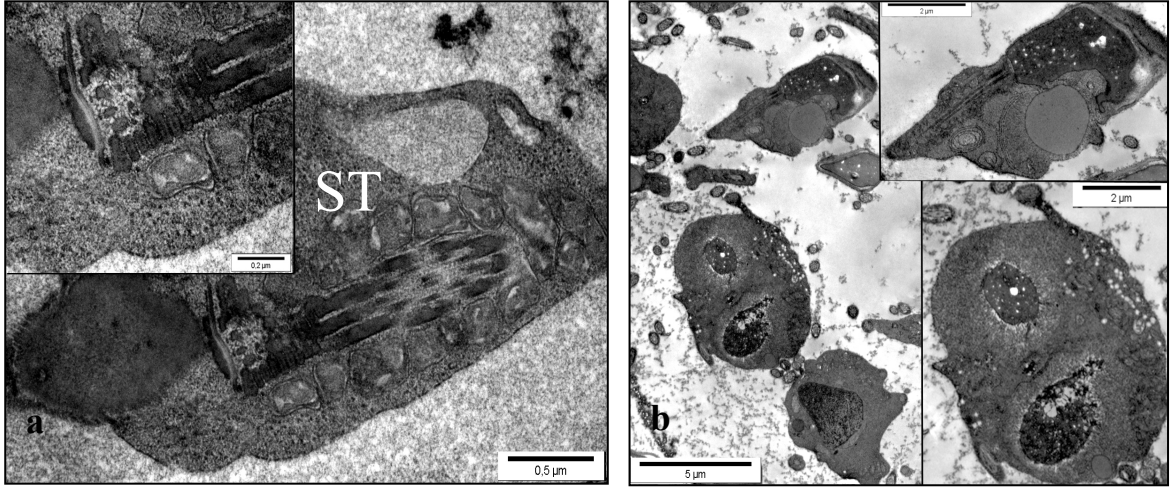
Şekil 10. (a) Tipik sperm başı ve elemanlarını gösteren spermiyumun plazmalemma, homojen içerikli akrozomal vezikül (A) ve nükleer kromatin, boyun bölgesindeki mitokondriyal düzen ve bağlantı parçası gözleniyor.(b) Plazmalemma ve akrozomal vezikül membranlarının uyum gösterdiği dalgalanma (normal spermiyum yapısında olmayan) dikkat çekiyor (siyah oklar) (c,d) Bu mikrograflar; akrozomal vezikül ve nükleer kromatinin homojen bir dağılım yansıttığını gösteren spermiyumun ön baş ve arka baş kısımlarının detaylı görüntülerini göstermektedir. N: nükleus.



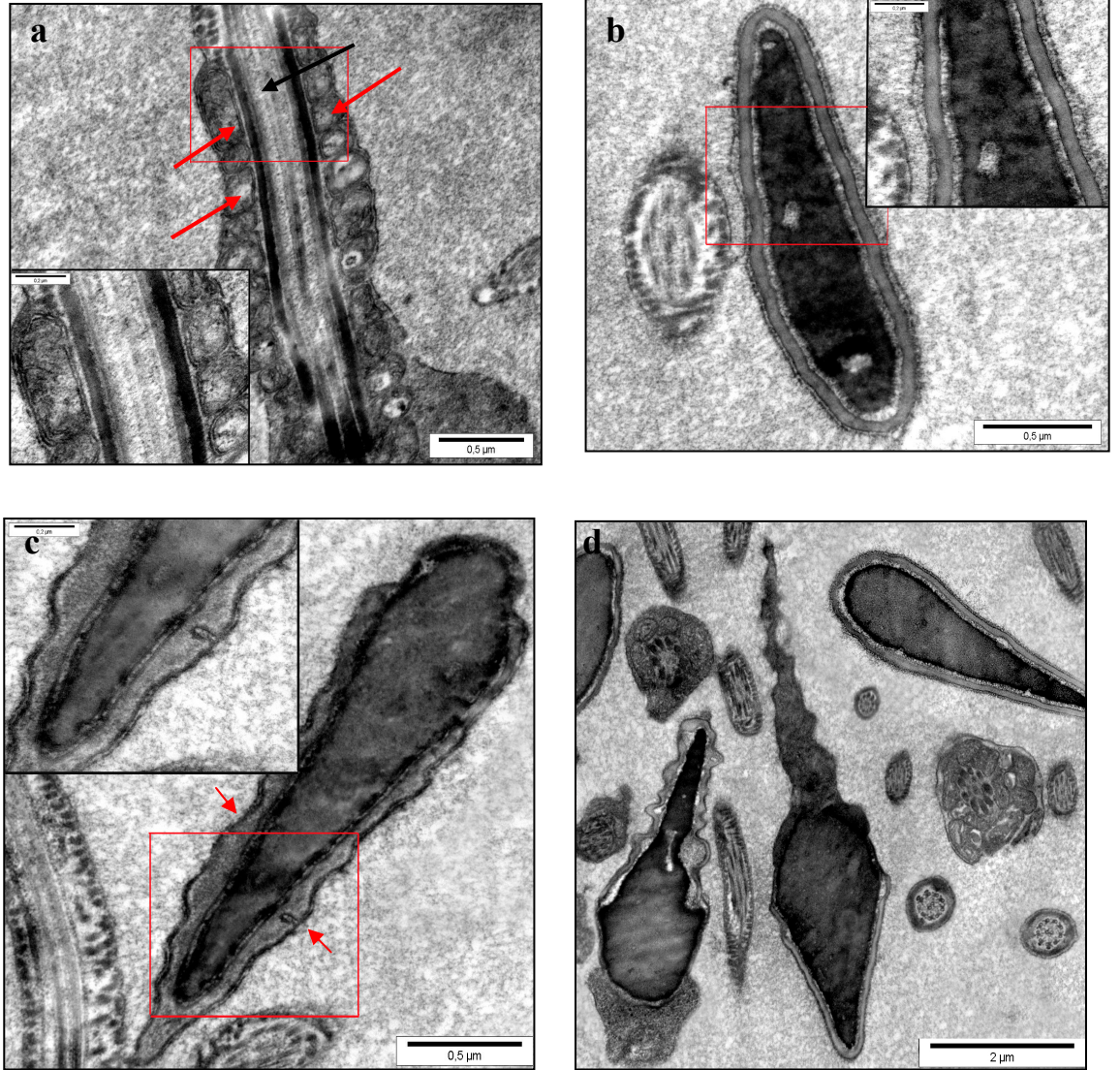
Sekil 11. a) Plazmalemma ve akrozomal vezikül ilişkisinde çok hafif ayrılmalar gözlenmesine karşın akrozomal vezikül membranı ve plazmalemma düzgün bir ahenk göstermektedir. Spermiumun baş, boyun kısımlarında herhangi bir sitoplazmik tutulumun görülmemesi dikkati çekicidir. (b) Kuyruk bölgesindeki fibril elemanları ve eksen mekiği, mitokondriyal düzen net olarak görülüyor. (c) 9+2 yapısını taşıyan kuyruk bölgesinden geçen enine kesitte, düzgün aksonem yapısında herhangi bir bozukluğun olduğunu gösteren anomali gözlenmiyor. N: Nükleus.



Şekil 12. Hyalüronik asite bağlanmayan spermlerin ince yapı görüntüleri. (a) Şekilce anormal görünümlü spermlerin ince yapılarında da birçok anormal elemanlar dikkat çekiyor. Sitoplazmik fazlalıklar ve nükleusta multiveziküler birikimler gözleniyor. (b) Normal olmayan bir nükleus ile sitoplazmik inklüzyonların bir arada bulunduğu, plazma membranındaki ondülasyon ile anormal yapıdaki akrozomal vezikül yapıları bu grubun belirgin özellikleriydi. (c) Nükleer kromatinin ileri derecede granüllü ve elektron yoğun yapılar içermesi ilginç bir bulgudur. N: nükleus.



Şekil 13. (a) Sitoplazmik tutulum (ST) gösteren spermiyumlarda patolojik yapı yansıtan nükleus ile değişik hücresel elemanların yer aldığı orta ve kuyruk bölgesinde sitoplazmik kitlelerin varlığı dikkat çekiyor. (b) Vakuol ve elektron yoğun yapıların gözlendiği anormal baş yapıları ile (c) organel sistemlerinin karmaşa gösterdiği, nükleer düzenin bozulduğu immature sperm yapısı bu grubun (HA' e bağlanmayan) yaygın görüntüleridir.



Şekil 14. (a) Orta parçadaki mitokondriyal yapılar (kırmızı oklar) ve fibriller elemanlar (siyah ok) normal bir düzende gözleniyor. (b) Homojen görümlü nükleer kromatin ve akrozomal vezikül içeriği gösteren sperm yapısı; (c) genel görünümü itibariyle plazmalemma ve akrozomal vezikülde yapısal düzensizliğin görünümü, ondülasyonlar (kırmızı oklar) ile karakterize anormal bir sperm yapısı; (d) sperm popülasyonunun çeşitliliğini yansıtan normal ve anormal görümlü spermelerin bir arada bulunması.

4.4. HA'e Bağlanma ve Yapısal Kromozomal Anomaliler

4.4.1. Metodoloji ve Değerlendirmeler

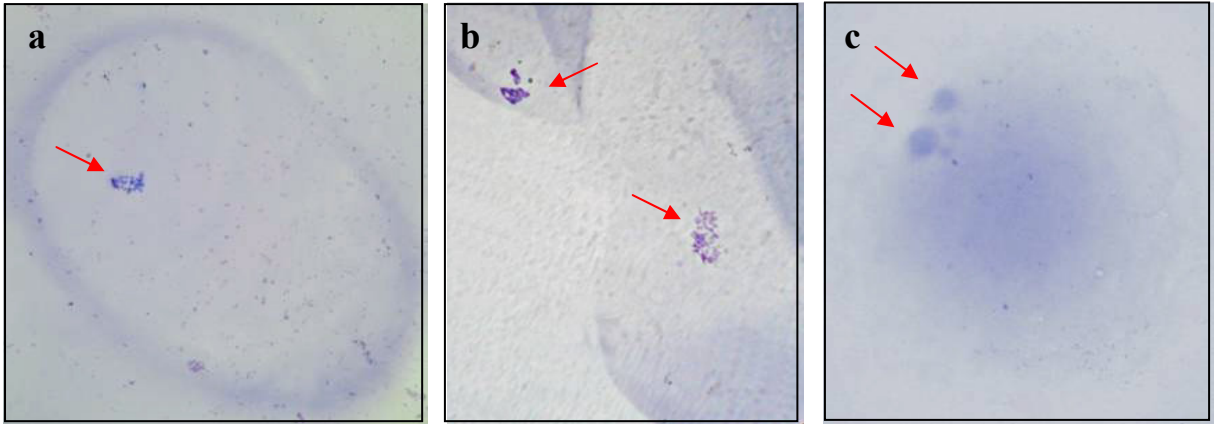
Üreme biyolojisi üzerinde yapılan pek çok çalışmada Syrian Golden Hamster ovositleri çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte çok düzenli ve senkronize bir şekilde birbirini takip eden dört gün süren östrus döngüsüne sahiptirler [121, 122]. Zona pellusidalarının uzaklaştırılmaları ile insan dahil çeşitli memeli türlerine ait spermler ile kaynaşabilirler [123]. Bu özellikleri nedeniyle insan sperm fonksiyonları [124-126] ve kromozom komplementlerinin [127-129],[120, 130] elde edilmesinde kullanılabilirler.

4.4.1.1. Dondurulmuş Hamster Ovositleri

Mevcut literatür bilgileri doğrultusunda çalışmamızda öncelikle dondurulmuş hamster ovositleri kullanıldı. Bu ovositlere insan spermi injeksiyonu gerçekleştirilerek, insan spermine ait kromozom yaymaları elde edilmeye çalışıldı (n=93 ovosit). Dondurulmuş hamster ovositlerinin çözülme prosedürü ve partenogenetik aktivasyonunu da sadece medyumun injekte edildiği mock-injeksiyon ve hiçbir injeksiyonun yapılmadığı sadece çözülmüş ovositlerden oluşan kontrol grubu ile test edildi.

Çözme işlemi sonrasında ovositlerin mikroskopik olarak değerlendirmesi yapıldı. İnkübasyon süresi sonrasında bazı embriyolar dejenere olmuştu. İnkübasyonu takibeden fiksasyon işlemi sonrasında slaytlar boyandığında, embriyoların bir kısmında sadece hamster kromozomları mevcut iken (Şekil 15a), bir kısım embriyoda sadece kromatin yapısı görünüyordu (Şekil 15b). Bununla birlikte embriyoların çoğu dekondense olmuş sperm başlarına sahip idi (Şekil 15 c). Ancak fiksasyon sırasında hücrelerin büyük oranda kaybı söz konusu olmuştur.

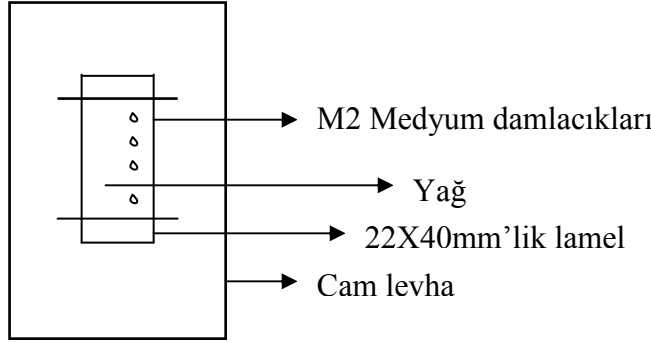
Dondurulmuş hamster ovositleri üzerinde yapılan çalışmalarda, inkübasyon sonucunda embriyo gelişimi belli bir aşamadan sonra tamamlanamamaktaydı. Bunun nedeni muhtemelen kullanılan ovositlerin dondurulmuş ovositler olması olarak değerlendirildi (Dr. Gerald Shatten, Department of Obstetrics, Gynecology & Reproductive Sciences, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA. kişisel görüşme). Dolayısıyla daha sonraki deneyler için taze hamster ovositleri kullanıldı.



Şekil 15. (a) Fiksasyon işlemi sonrasında hamster ovositine ait kromozomlar;
(b) kromatin yapısı;
(c) hamster ovositi içerisinde dekondense olmuş sperm başları görülmektedir.

4.4.1.2. Fare Ovositlerine İnsan Spermi İnjesiyonu

Fare ovositlerine insan spermi mikroenjeksiyonu için 146 fare ovositi kullanıldı. İnjesiyon işlemi için hazırlanan küçük odacıklar şekil 16 'da gösterilmiştir. Gerek injesiyon tekniği ve kullanılan mikromaniplatör, gerekse fare ovositlerinin kolay aktive olması nedeniyle çok olumlu sonuçlar alınamadı.



Şekil 16. Fare ovositlerine insan spermi injesiyonu için kullanılan odacık.

4.4.1.3. Fare ya da Hamster Ovositlerinin İnsan Spermi ile inkübasyonu

Fare ya da hamster ovositlerinin insan spermi ile in vitro fertilizasyonu (IVF) üzerinde yapılan denemeler sonucunda fare ovositlerinin insan spermi ile in vitro fertilizasyonu sonucunda döllenme belirtisi gözlenemezken hamster ovositleri bu amaca uygun olarak görüldü. 16 dondurulmuş hamster ovositi ile 35 adet fare ovositi aynı deney koşullarında insan spermi ile inkübe edilerek bu değerlendirme yapıldı. Toplam 65 dondurulmuş hamster ovositinin insan spermi ile inkübasyonu gerçekleştirildi.

Taze hamster ovositlerinin eldesi için hayvanların vajinal akıntıları her gün kontrol edilmek suretiyle sikluslarının ilk günü belirlenerek hayvanlar superovule edildi. Toplam 395 taze hamster ovositi ile insan spermi inkübasyonu gerçekleştirildi. Bazı slaytlarda hamstere ait kromozomlar ve decondense olmuş sperm başları görülse de insan kromozomlarına rastlanılmadı.

Zona pellusida tamamen uzaklaştırılmadan, üzerinde değişik çaplarda delikler açılmak suretiyle deneyler yapıldı. Çünkü zona pellusida tamamen uzaklaştırıldığında fiksasyon sürecinde embriyolar çok kırılgan hale gelmekteydi. Kısa ve uzun süreli (gece boyu) kolçisin inkübasyonu da karşılaştırılarak en uygun inkübasyon koşulları belirlenmeye çalışıldı. Çünkü kolçisinin insan sperminde kromozom anomalilerini artırdığına dair çalışmalar bulunmaktadır [131]. Bu nedenle de kültür ortamındaki kolçisinin uzun ya da kısa süreli varlığı embriyonal gelişimi etkileyebilir.

4.4.1.4. Zona Pellusida'nın Uzaklaştırılması

Sperm ve ovosit pronükleuslarının elde edilmesindeki sorunları çözebilmek için farklı solüsyonlar kullanılarak deney sonuçları değerlendirildi. Bu amaçla, ilk olarak zona pellusidanın uzaklaştırılmasında kullanılan farklı solüsyonlar ile deneyler yapılarak, bunların içinden en uygun olanı seçildi (n=70 ovosit). Görülen pronükleus (PN) sayısına göre veriler aşağıda tabloda sunulmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. Zona pellusidanın uzaklaştırılması için farklı solüsyonların kullanılması sonucu elde edilen pronükleus sayıları.

	0 PN	1 PN	2PN	Dejenere embriyo
Asit tyrode-PVP solüsyonu; Zona (-)	5	8	-	3
%0.1 Tripsin-BWW solüsyonu; Zona (-)	5	23	5	-
Tripsin-mHTF solüsyonu; Zona (-)	5	3	-	-
Zona pellusidada delikler; Zona (+)	9	4	-	-

Elde edilen sonuçlara bağlı olarak daha sonraki deneylerde %0.1 Tripsin-BWW solüsyonu kullanılmıştır.

Tripsinin zona pellusidayı aşırı miktarda eritmesi de ovositlerin fertilizasyon kapasitesini etkilemektedir. Çünkü bu işlem sırasında pek çok plasma membran reseptörünün sindirimi de gerçekleşebilir. Bunu önleyebilmek amacıyla farklı tripsin konsantrasyonlarının yanı sıra düşük bir tripsin konsantrasyonu ile çalışılıp farklı süreler denenerek zona pellusidanın eritilmesi işlemi gerçekleştirildi. Veriler tablo 2’de sunulmuştur. Ayrıca tripsin uygulamasından sonra, mevcut tripsin aktivitesini ve böylece devam eden sindirimi önlemek amacıyla tripsin muamelesinden sonra tripsin inhibitörü (Sigma) kullanıldı.

Tablo 2. Farklı tripsin konsantrasyon ve sürede tripsin muamelesi sonucu gözlenen pronükleus sayıları.

	Süre (saniye)	0 PN	1 PN	2 PN
%0.05 Tripsin(n=8 ovosit)	28	5	2	1
%0.05 Tripsin (n=7 ovosit)	57	2	5	-
%0.05 Tripsin (n=10 ovosit)	65	5	4	1
%0.05 Tripsin (n=10 ovosit)	150	3	3	3
%0.01 Trpsin (n=8 ovosit)	390	5	4	1

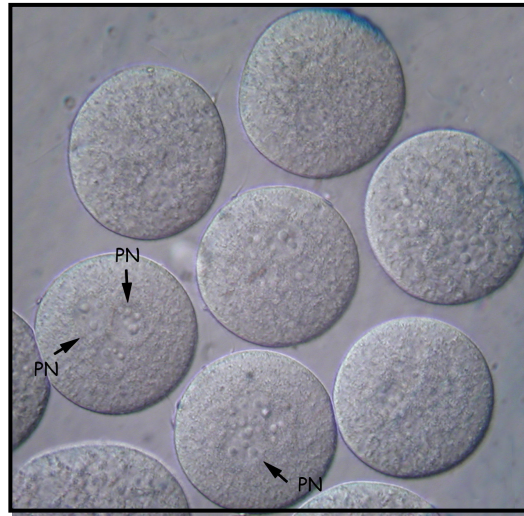
Ancak farklı sürelerde tripsin uygulamasına karşın yapılan preparasyonlarda insan spermine ait herhangi bir kromozoma rastlanılmadı.

4.4.1.5. İnkübasyon Medyumu

Embriyo gelişimi açısından, embriyonun içinde bulunduğu medyum büyük önem taşımaktadır. Çalışmamızda literatür bilgileri doğrultusunda, sperm ve ovosit ko-kültürü için kullanılan farklı inkübasyon medyumları da değerlendirilmiştir. Ayrıca, farklı konsantrasyonlar da birbiri ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla %3.5 HSA-BWW (n= 50 ovosit), %3.5 BSA-BWW (n=56 ovosit), %0.3 HSA-BWW (n=27), %50 HSA/BSA-BWW (n=30 ovosit), HAM’S F10-20% fetal bovine serum (FBS) (20 ovosit) , %0.3 BSA-TALP (Tyrode’s albumin-lactat-prüvat) (n=30 ovosit) kullanıldı. Farklı medyumların denenmesine karşın, fiksasyon sonrası, slaytlarda hamstera ait kromozomlar görülse de, hiçbirinde insan spermine ait kromozomlara rastlanılmadı.

4.4.1.6. İnsan Spermi-Hamster Ovositi Ko-inkübasyon Süresi

İnsan spermi ile hamster ovositlerinin inkübasyon süresi, ovosit aktivasyonu ve polispermi durumlarının oluşabilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, inkübasyondan önce sperm kapasitasyonunun gerçekleşmesi gerekir. Bu nedenle, deneylerimizde sperm hazırlanması mümkün olduğunca erken saatlerde gerçekleştirilmiş, CaCl₂ ve progesteron içeren BWW gibi sperm kapasite olmasını kolaylaştıran bir solüsyon tercih edilmiştir. Gametlerin ko-inkübasyonu için, sperm motilitesine de bağlı olarak 2.5 (n= 28 ovosit) ve 5 (n= 31 ovosit) saatlik farklı inkübasyon süreleri de birbiri ile karşılaştırılmıştır. Fiksasyon sonrasında 5 saat süreyle inkübasyonun gerçekleştiği grupta polispermi oranı daha yüksek bulunmuştur (Şekil 17). Ancak oluşan pronükleusların kaybolması ve metafaz kromozomlarının eldesi yine de mümkün olamamıştır.



Şekil 17: İnsan spermi ile inkübasyon sonrasında Hamster embriyolarında gözlenen polispermi durumu. PN: pronükleus.

4.4.1.7. Hamster Ovositlerinin Etanol ile Aktivasyonu

Pronüklear aşamadan sonra gelişimin durması nedeniyle etanol (HAM'S F10 medium +%8 etanol) ile hamster ovositleri aktive edilmeye çalışıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Etanol kullanılmak suretiyle ovositlerin aktive edilmesi sonucu elde edilen pronükleus sayıları.

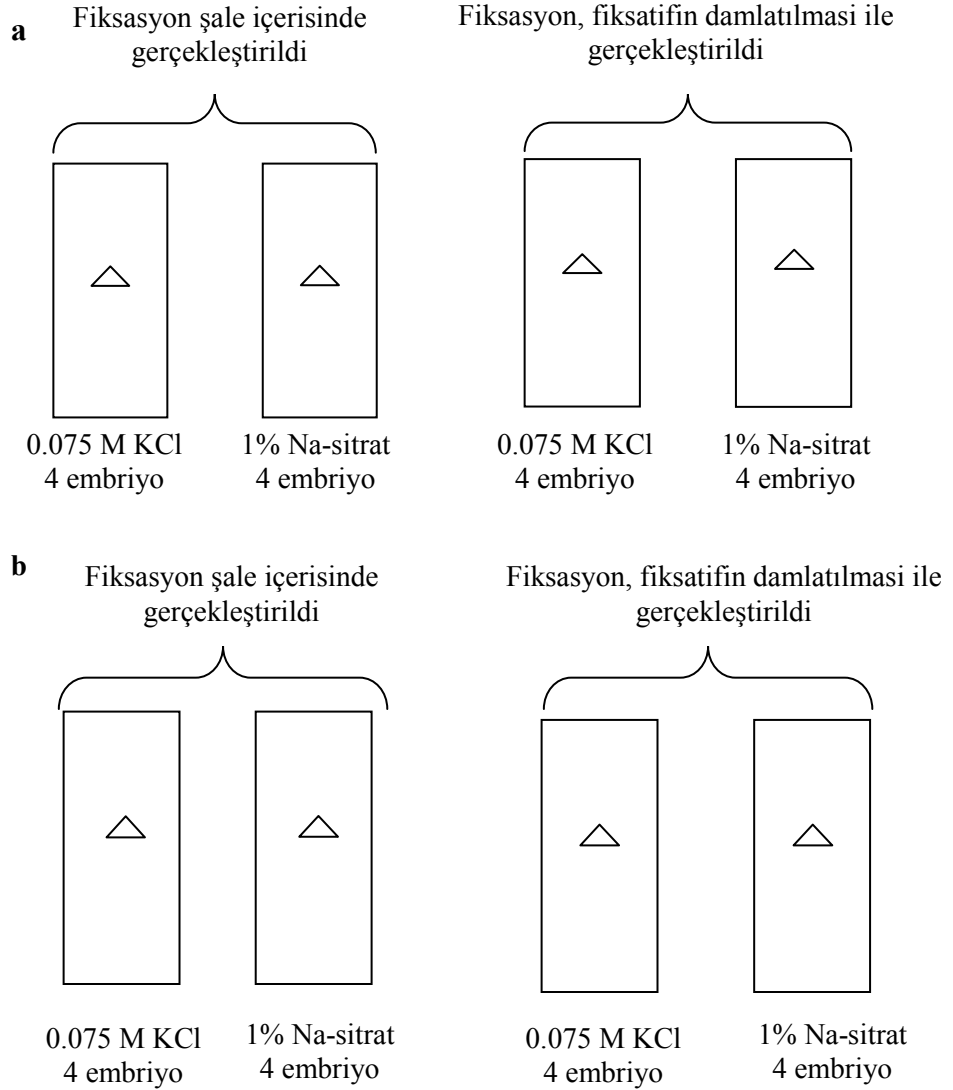
Etanol muamele süresi	0PN	1PN	2PN
3 dakika	5	2	5
5 dakika	7	3	2

2 pronükleusa sahip embriyolar görülmesine karşın fiksasyon işlemi sonrasında yapılan boyamada herhangi bir insan kromozomuna rastlanılmadı.

4.4.1.8. Fiksasyon Tekniği

Fiksasyon tekniğinden kaynaklanabilecek embriyo kaybını en aza indirmek üzere bu teknik üzerinde bazı değerlendirmeler yapıldı.

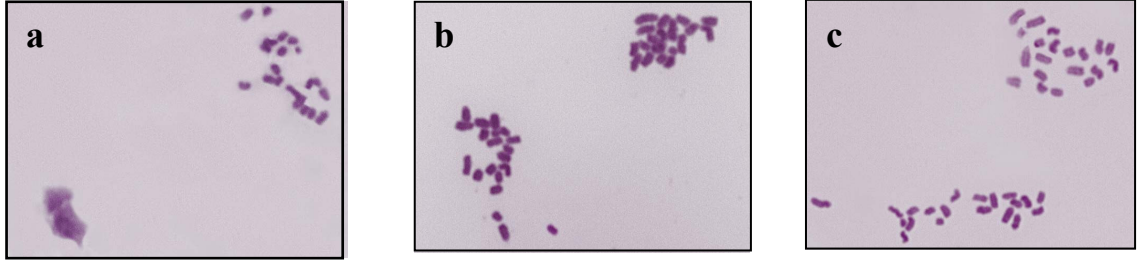
1. Bu amaçla, bazı deneylerde zona pellusida lazer yardımıyla uzaklaştırıldı. Az da olsa kalan zona pellusida parçaları embriyonun lama yapışmasına yardımcı olabilirdi.
2. Bunlara ek olarak, teknik sorunun kullanılan hipotonik solüsyondan kaynaklanabileceği gündeme geldi ve 2 farklı hipotonik solüsyon kullanılarak aralarında fark olup olmadığı görülmeye çalışıldı.
3. Ayrıca, bir grup lam poli-lizin ile kaplandıktan sonra kullanıldı.
4. Diğer bir değerlendirme ise, fiksasyon işleminin şale içerisinde ya da damlatılmak suretiyle yapılması şeklinde oldu. Hazırlanan lamlar şekil 18 a ve b'de ifade edilmiştir.



Şekil 18. a) Poli-lizin kaplanmamış lamlar **b)** Poli-lizin kaplanmış lamlar

Boyama sonuçlarımıza göre fiksatif olarak kullanılan metanol-asetik asitin damlatılarak muamele edildiği ve hipotonik solüsyon olarak ise 0.075M KCl 'in

kullanıldığı grup daha iyi sonuç verdi. Bununla birlikte farklı KCl süreleri de birbiri ile karşılaştırıldı (Şekil 19a, b, c).



Şekil 19. Dölllenmiş fare ovositinin (DÖFO) fiksasyondan sonra potasyum klorür (KCl) ile farklı sürelerdeki inkübasyon sonuçları arasında farklılık gözlemlendi.
a) DÖFO'nun fiksasyonda KCl ile 9 dakikalık inkübasyonu
b) DÖFO'nun fiksasyonda KCl ile 12 dakikalık inkübasyonu
c) DÖFO'nun fiksasyonda KCl ile 15 dakikalık inkübasyonu

Dolayısıyla aşağıdaki sonuçlara varıldı:

1. Pronükleus oluşumu açısından taze hamster ovositlerinin kullanılması daha iyi sonuçlar verdi. Bununla birlikte, inkübasyon sonrasında embriyo gelişimi belli bir aşamadan sonra ilerlememekteydi. Bu nedenle, yapılan preparasyonlarda insan spermine ait kromozomlara rastlanılmadı.
2. Zona pellusidanın uzaklaştırılması için kısa sürelerde tripsin muamelesi (Dr. Barry Bavister, Department of Biological Sciences, University of New Orleans, New Orleans, USA. kişisel görüşmeler) ya da zona pellusidada delikler açarak sperm penetrasyonunun gerçekleştirilmesi, gerek fertilizasyon gerekse fiksasyon için daha uygun görüldü. Böylelikle polispermi olasılığı da azaltılmış oldu.
3. İnkübasyon için HSA ya da BSA kullanılması pronükleus oluşumunu etkilemedi.
4. Teknik ile ilgili olarak, kısa süreli kolçisin uygulaması gece boyu inkübasyona göre daha sağlıklı kromozom yaymaları elde etme şansı tanıdı.
5. Fiksasyon için uzun süreli KCl uygulaması daha iyi sonuçlar verdi.

Tablo 4: Farklı çalışmalara ait karyotipleme başarı oranlarının karşılaştırılması.

Grup	Verici sayısı	Semen örnekleri sayısı	Analiz edilen sperm sayısı	
			Deney başına	Toplam
Rudak ve ark.	1	?	> 10	60
Martin ve ark.	18	18	13.3	240
Martin ve ark.	33	33	30.3	1000
Brandriff ve ark.	11	56	44.1	2468

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada, sitoplazmik atılım ve HspA2 şaperon protein ekspresyonu gibi sperm maturasyonunda anahtar rol oynayan moleküler belirteçler üzerinde yoğunlaşmıştır [2, 3, 6, 11, 132, 133]. Spermiyogenezde sitoplazmik atılım ile eş zamanlı olarak sperm plazma membranında da yeniden düzenlenmeler olur. Bu değişiklikler, zona pellusida ve HA'e bağlanma alanlarının oluşumunu kolaylaştırır [1]. HA ile ilgili çalışmalarda, sperm HA'e çok sıkı bir şekilde bağlandığı gösterildi [4]. Bununla birlikte, aynı semen örneğindeki bütün spermelerin aynı derecede HA'e bağlanma yeteneğine sahip olmadığı ortaya konuldu [17, 18]. Bu nedenle bu çalışmamızda, sperm hyalüronik asite bağlanabilme ya da bağlanmama özelliğinin, sperm kromatin yapısı, hücresel olgunluğu ve kromozomal yapısı ile ilişkisini ortaya koymaya çalıştık. Bunlara ek olarak sperm ultrastrüktürü ve hücresel maturasyon arasında ilişki irdelendi. Elde ettiğimiz veriler bu ilişkinin geçerliliğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, sperm matürite ve fonksiyonunun çeşitli biyokimyasal belirteçleri kullanılarak HA'e bağlanan sperm ile böyle bir seçimin yapılmadığı semen grubundaki spermelerin özellikleri de karşılaştırıldı.

Çeşitli belirteçlerle yapılan çalışmalara ilişkin veriler, HA'e bağlanmanın sperm matüritesi ile ilişkili olduğu fikrini desteklemektedir. Daha önceki çalışmalarda sitoplazmik tutulumun görülmediği sadece matür spermelerin zona pellusidaya bağlandığı ve bununla birlikte HA'e bağlanan sperm hemi-zona'ya bağlanan olgun sperm şekil özelliklerini taşıdığı ortaya konmuştur [5, 134]. HA'e bağlanmayan immatür sperm, CK-B gibi sitoplazmik tutulum belirteci olan bir protein ile koyu olarak boyanmıştır. Bununla birlikte hemi-zona deneylerinde olduğu gibi, HA'e bağlanan sperm, sitoplazmik tutulum olmadığı simetrik oval baş görünümüne sahip matür spermelerdir [5].

Sitoplazmik yapının yanı sıra, çalışmamızda anilin mavisi boyası ile sperm nükleusundaki kromatin yapısı da değerlendirildi. Anilin mavisi, protaminlerle yer değiştirmemiş olan histonları tespit etmektedir. Bilindiği üzere olgun bir spermde histonlar protaminlerle yer değiştirirler [118]. Anilin mavisi ile koyu boyanmış sperm insidansının, anormal sperm morfolojisi, DNA'nın gecikmiş dekondansasyonu ve erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [135-137]. Bizim çalışmamızda işlem görmemiş semen grubunda, spermelerin çeşitli matürasyon özelliklerinin bir göstergesi olarak, anilin mavisi ile değişik boyanma yoğunluğuna sahip pek çok sperm bulunmakta idi. Buna karşın, HA'e bağlanan grupta, açık mavi boyanan baş yapısına sahip, yüksek oranda matür sperm boyanması gözlenmesi ilginç bir sonuçtur. Bulgularımıza göre, işlem görmemiş semen ve HA'e bağlanan sperm gruplarında, gerek sitoplazmik tutulum gerekse kromatin matürasyonuna dayanan veriler, matür ve immatür sperm karakterlerinin çok net bir şekilde birbirinden farklı olduğu göstermiştir.

Sperm matüritesi ve fonksiyonu hakkında bilgi veren, CK ve HspA2 gibi çeşitli objektif biyokimyasal belirteçler kullanılarak erkek fertilitésinin değerlendirilmesi yeni bir yaklaşımdır [9, 112, 133]. Sperm CK matürite eksikliği gösteren spermlerdeki sitoplazmik tutulumu gösteren bir ölçüyken, 70 kDa moleküler ağırlığındaki HspA2 şaperon proteini ise sperm gelişimi ve matürasyonunu gösteren bağımsız bir ölçüt olarak kabul edilmektedir. Diğer şaperon proteinler gibi HspA2 da sperm yeniden şekillenmesi için gerekli olan yapısal proteinler ile DNA tamir enzimleri ve protaminler gibi çok çeşitli proteinlerin taşınmasında rol oynamaktadır [13, 132, 138]. Gerçekte, HspA2 mayoz bölünme sırasında oluşan sinaptonemal kompleksin bir parçası olduğundan, HspA2'nin yetersiz ekspresyonu anöploidiler gibi mayotik defektlere de neden olmaktadır [132]. Ayrıca, HspA2'nin terminal spermiyogenezle aynı zamanda yani sitoplazmik atılım sırasında ikinci kez temel bir ekspresyon göstermesi önemlidir [132]. Böylece, HspA2 sitoplazmik atılımın doğru bir şekilde gerçekleşmesini sağlayarak anormal sperm morfolojisinin ortaya çıkmasını engellemektedir [132].

Bu araştırmada uygulanan anilin mavisi ve immunofluoresan boyama ile HA-bağlanması deneylerinden şu temel sonuçlar çıkarılabilir: Her bir spermdeki anilin mavisi boyaması ve aşırı sitoplazmik tutulum birbiriyle ve sperm HA-bağlanma yeteneğiyle ilişkilidir. Hyalüronikasite bağlanan sperm sitoplazmik tutulum ve anilin mavisi boyamasından yoksundur. Bu nedenle HA'e bağlanma matür sperm popülasyonunu için geçerli bir ayıraç olarak kabul edilmelidir. Sperm HA'e bağlanması plazma membran HA reseptörleri üzerinden gerçekleştiğinden akrozomal reaksiyonu olmuş sperm HA-bağlanma yeteneğini kaybedebilir.

Nitekim bu sonuçlara destek veren TEM bulgularımız, HA'e bağlanan spermelerin bağlanmayan spermelere kıyasla daha homojen bir yapı gösterdiği ve daha düzgün bir morfolojiye sahip olduğunu ortaya koydu. Semen grubunda ise TEM sonuçları değerlendirildiğinde beklendiği üzere, farklı görüntüler sperm popülasyonunun morfolojik çeşitliliğini yansıttı. Normal görünümlü baş, boyun, orta parça ve kuyruk yapısı ile dikkat çeken spermelerin yanı sıra, küt veya yuvarlak başlı, şişkin orta bölge, anormal görüntülerle karakterize sperm tiplerini bir arada görmek mümkün oldu. Bununla birlikte HA slaytlarından bağlanan spermelerin toplanması işleminin sperme zarar vermediği sonucunun gözlenmesi önemli bir bulgudur. Çünkü bu sonuç aynı zamanda HA'e bağlanan bir sperm için mikroyeksiyon pipeti ile alınarak çok rahat bir şekilde ICSI'de kullanılabileceği anlamına da gelmektedir. Bu bakımdan klinik anlamda çok büyük anlam ve önem taşımaktadır. HA'e bağlanan sperm popülasyonu içerisinde kromatin yapısı bozuk olduğu birkaç sperm görülmesi ise HA' bağlanan spermelerin toplanması sırasında kontaminasyondan kaynaklanabileceği olasılığını akla getirmektedir.

Üreme biyolojisi üzerinde yapılan pek çok çalışmada Syrian Golden Hamster ovositleri çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte çok düzenli ve senkronize bir şekilde birbirini takip eden dört günlük bir östrus çevrimine sahiptirler [121, 122]. Zona pellusidalarının uzaklaştırılmaları ile insan gibi çeşitli memeli türlerine ait sperm ile kaynaşabilirler [123]. Bu özellikleri nedeniyle insan sperm fonksiyonları [124-126] ve kromozom komplementlerinin [120, 127-130] elde edilmesinde kullanılabilirler. Zonası uzaklaştırılmış (zona-free) hamster ovositleri

kullanılarak insan spermine ait karyotiplerin elde edilmesindeki başarı büyük oranda spermatozoanın dölleme kapasitesine bağlıdır [139]. Bu nedenle sistem, hareketli ve akrozomal reaksiyonu olmuş milyonlarca sperm gerektirir. Ayrıca konsantrasyon, motilite, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi çeşitli sperm parametreleri birbirinden bağımsız düşünülmemelidir [120, 140]. Bu nedenle böyle durumlarda sperm kromozom komplementlerinin eldesinde alternatif bir metoda ihtiyaç vardır.

Böyle bir alternatif metod ise, spermin mikroinjeksiyonu ile elde edilebilir. Literatüre bakıldığında hamster ovositlerine insan sperminin mikroinjeksiyonu sonucu karyotiplerin elde edilmesi çok zor bir teknik olmakla birlikte bu konu ile ilgili çok az başarılı rapor bulunmaktadır [127-129, 140, 141]. Bununla birlikte injekte edilen ovosit sayısına kıyasla elde edilen karyotip başarı oranı oldukça düşüktür. Kamiguchi ve Mikamo (1986) literatürde belirtilen raporlarında gerçek oranların belirtilmemiş olmasıyla birlikte kullanılan ovositlerin sadece % 5 – 10'nun kromozom analizi için kullanıldığını ifade etmektedir [120]. Ayrıca, bu çalışmalarda belirtilen metafaz resimlerinde kromozom yayma ve fiksasyonunun yetersiz kalitede olduğu belirtilmektedir. Farklı gruplar tarafından yapılan karyotip başarı oranları kıyaslanarak belirtilmiştir (Tablo 4).

Hamster ovositleriyle yapılan mikroinjeksiyonun düşük başarı oranı nedeniyle insan sperminin fare ovositlerine mikroinjeksiyonu da denenmiştir.[142, 143]. Bununla birlikte fare ovositlerinin mikroinjeksiyon prosedürü ile çok daha kolay hasar görmeleri dikkate alınmalıdır [144, 145]. Diğer taraftan hamster ovositleri çok sert mikroinjeksiyon metotlarında bile hayatta kaldıklarından [146, 147], ICSI sonrasında insan sperm örneklerinin karyotip analizi daha uygun görülür. Mevcut literatür bilgileri doğrultusunda çalışmamıza öncelikle dondurulmuş hamster ovositlerine insan sperminin mikroinjeksiyonu ile başlanılmıştır. Dondurulmuş hamster ovositlerinin çözülme prosedürü ve partenogenetik aktivasyonunu da sadece injeksiyonunun yapıldığı ancak spermin aktarılmadığı, mock-injeksiyon ve hiçbir injeksiyonun yapılmadığı sadece çözülmüş ovositlerden oluşan kontrol grubu ile test edilmiştir. Buna rağmen insan spermine ait kromozomların elde edilememesi nedeniyle taze hamster ovositleri ile çalışmaya devam edilmiştir. Ancak, hamster ovositleri ile ICSI sonucunda karyotip tayini mümkün olamamıştır.

Hamster ovositlerinin insan spermi ile inkübasyonu ya da injeksiyonu sonrasında içeriye giren spermatozoonun, kromatin dekondeksasyonu, pronükleus oluşumu, DNA replikasyonu ve kromozom kondensasyonu aşamalarını geçerek mitotik metafaza girmesi beklenir. Bu aşamalardan herhangi birindeki zayıflık fizyolojik olmayan koşullar altında gerçekleşebilir. Bu nedenle bu aşamaların sistematik olarak değerlendirilmesi literatürde rapor edilen düşük sperm karyotip oranına neden olan faktörleri tanımlamaya yardımcı olabilir. Bu faktörlerden birisi, yukarıda belirtilen aşamaları etkileyebilen kültür koşulları olabilir [148]. Bu mantıkla yola çıkarak çalışmamızda kültür medyumları üzerinde değerlendirmeler yapıldı. %3.5 HSA-BWW, %3.5 BSA-BWW, %0.3 HSA-BWW, %50 HSA/BSA-BWW, HAM'S F10-20% fetal bovine serum (FBS) , %0.3 BSA-TALP (Tyrode's albumin-lactat-prüvat) gibi değişik konsantrasyonlarda farklı solüsyonlar kullanılarak deneyler gerçekleştirildi. Ancak buna rağmen bazı slaytlarda hamstere ait kromozomlar ve dekondeks olmuş sperm başları görülse de insan kromozomlarına

rastlanılamamıştır. Bununla birlikte fiksasyon sırasında hücrelerin büyük oranda kaybı söz konusu olmuştur.

Sperm dekontensasyonunu etkileyebilecek diğer bir faktör de mikroinjeksiyon tekniği olabilir [149]. Günümüzde ICSI oldukça etkili bir terapötik yaklaşım olarak erkek faktörüne bağlı infertilite tedavisinde kullanılmaktadır. Sperm defekti ne olursa olsun hem fertilizasyon hem de gebelik oranlarında yüksek başarı ortaya koyarak ilk raporların cesaretlendirici sonuçları tıp uzmanlarını ideal bir çözüm buldukları düşüncesine sevk etmiştir. Ancak aynı zamanda ICSI'nin tedavi olarak kullanıldığı durumlarda gelecek nesillere aktarılabilecek olan negatif genetik kompozisyon hakkında bir tartışma ve endişeyi de beraberinde getirmiştir [103]. Doğada, insan üreme sürecinde meydana getirilmiş olan evrimsel sperm seçim mekanizmalarını atladığı bilinmesi bu yardımcı üreme tekniğine daha da endişe ile bakılmasına neden olmuştur. ICSI'nin insan üremesine uygulanması, diğer memeli türleri ile çalışmalar yapmaktansa insanlardan elde edilen sonuçlar deneysel kayıtları oluşturmuştur.

Sperm karyotiplerinin elde edilme başarısını etkileyen üçüncü faktör ise ovositlerin partenogenetik aktivasyonu olabilir. Hamster ovositlerinin partenogenetik aktivasyonu injeksiyon prosedürü (injeksiyon–ilişkili partenogenetik aktivasyon, IRPA) ya da postovülütör yaşlanma nedeniyle olabilir [147, 150, 151]. Partenogenetik olarak aktive olmuş ovositler IVF ya da ICSI sonrasında erkek pronükleusu oluşturamazlar [152-154]. Örneğin fare ovositlerine insan spermi mikroinjeksiyonu ile ilgili çalışmalarımızda gerek injeksiyon tekniğinden gerekse fare ovositlerinin kolay aktive olması nedeniyle çok olumlu sonuçlar alınmamıştır. Bu noktada kullanılan mikromaniplatörün özelliği de büyük önem kazanmaktadır. Çünkü literatürde fare ovositlerine insan spermi injeksiyonu için “Piezo drive” denilen özel mikromaniplatörlerin kullanıldığı belirtilmektedir. Bu bakımdan teknik şartlar da oldukça önemlidir.

Literatürde belirtilmemiş olmasına rağmen çalışmamızda fare ovositleri ile insan sperminin inkübasyonu da denendi. Fakat herhangi bir dölllenme belirtici gözlenmedi. Bu değerlendirmemiz hamster ovositlerinin insan sperminin penetrasyonuna izin veren tek grup olduğu hakkındaki literatür bilgisini de desteklemektedir [123, 124].

Akrozomal reaksiyonun gerekliliği spermiyumun geniş kumulus kütle ve zona pellusidaya penetrasyon sırasında hidrolitik enzimlerin salınmasıyla detaylı bir şekilde anlaşılmıştır. Ancak bu gözlemi dikkate aldığımızda çok sayıda açık anormallikler vardır. Eğer akrozomun içeriği spermin zona yüzeyine ulaşması için kumulus matriksini geçmekte kullanılıyorsa zona pellusida penetrasyonunu kolaylaştıracak hiçbir enzim kalmayacaktır. Bu problemin üstesinden gelmek için iç akrozomal membrana bağlı akrozomin varlığı öne sürülmüştür. Ancak, hayvan türlerinde dikkatlice incelenen akrozom reaksiyonunu geçirmiş spermiyumda bu tür enzimin varlığı gösterilememiştir [155]. Ek olarak, akrozomu sağlam spermler kumulus hücre kitlesini geçebilme ve zona yüzeyine ulaşabilme kapasitesindedirler. Akrozomal enzimlerin zona penetrasyonu sırasındaki rolleri de açık değildir; spermiyum tarafından oluşturulan oldukça dar, keskin sınırlı olarak tanımlanan

penetrasyon aralığı zonanın enzimatik sindirimi ile ilişkili görünmemektedir. Bu nedenle hiperaktif motilite ile güçlendirilen mekanik bir penetrasyonun varlığı tartışılmaktadır. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda spermiyumun zonayı sadece güç kullanarak geçmesi mümkün gibi görünmemektedir, enzimlerin ve ileriye doğru hamle kombinasyonunun penetrasyon aralığının oluşmasını sağladığı öne sürülmüştür [156]. Çalışmalarımızda da sperm örneği kullanılmadan önce kapasitasyonunu kolaylaştıran CaCl_2 ve progesteron içeren BWW solusyonu içerisinde inkübe edilmiştir. Bunlara ilave olarak deneylerden önce, hiçbir işlem yapılmadan önce (initial) ve inkübasyon sonrasında sperm örnekleri üzerinde akrozom reaksiyonunu kontrol etmek için pisum sativum boyaması da yapıldı.

SONUÇLAR

Çalışmamızda objektif biyokimyasal parametreler kullanarak, sperm seçimi için yeni ve umut verici bir yöntem olan HA'e bağlanma metodu değerlendirildi. ICSI tekniğinin uygulanması sırasında sperm seçilirken daha güvenilir ve tutarlı bir yöntemin gerekliliği, bu yolla dünyaya gelen çocukların emniyeti açısından oldukça önemlidir. HA'e başarılı bir şekilde bağlanan ya da bağlanmayan sperm özelliklerini gösteren veriler ile sperm olgunlaşması arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu göstermektedir. Bağlanan sperm matür tipte kromatin yapısına sahipken sitoplazmik tutulum göstermedi. Elde ettiğimiz veriler, sperm plazma membranında yer alan HA bağlayıcıları vasıtasıyla hyalüronikasite bağlanma özelliğinin, tamamlanmış bir spermiyogenetik olgunlaşmayı ifade ettiği kanaatini vermektedir. Sonuç olarak, spermiyumun HA'e bağlanma kapasitesi ile sitoplazmik tutulum (CK-B) düzeyi ve olgunlaşması, dolayısıyla kromatin organizasyonu arasında bir ilişki vardır. Spermiyuma ait RNA'lardan yola çıkarak, bu ilişkinin moleküler düzeyde araştırılması gerektiği kanısı oluşmuştur.

İleri Araştırma Ufku

Yapılan tüm değerlendirmeler sonucunda, insan spermine ait kromozomların elde edilememesi döllenme mekanizmasının tahmin edilenden çok daha komplike olduğu sonucunu da doğurmaktadır. İnsan spermının "genetik parmak izi" tanımlanmış olsa da, bunun fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi üzerindeki rolü hala pek çok bilinmeyen içermektedir. Örneğin son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, fertilizasyonda sperme ait paternal RNA'ların ovosite transferi ortaya konulmuştur [157]. Bu RNA'ların bir kısmı degrade olurken, bazıları fertilizasyon ve erken embriyonik gelişimde rol alırlar. Bununla birlikte lipid taşınması, membran dinamiği, stres, proteinlerin stabilizasyonu, apoptoz indüksiyonu-inhibisyonu ve fertilite oranının artırılması gibi önemli olaylarda rol oynayabilirler. Bu bilgiler ışığında sperm RNA'sının gen imprinting (gen inaktivasyonu) işlemine de yardımcı oluyor olabileceği gündeme gelebilir. Belki de sperme ait RNA'ların ovosite aktarımı, hamster ovositi-insan spermi sisteminde de önemli roller üstlenmektedir ve literatürde elde edilen düşük karyotip oranına bir cevap oluşturmaktadır. Belki de elde edilen bu kromozomlara ait spermlerdeki gen inaktivasyonu, hamster ovositine ait genler ile uyuşmakta ve genomik imprinting nedeniyle gelişim mitotik metafaza kadar devam etmektedir. Bu ve bunun gibi pek çok konu yeni bir araştırma alanı oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Huszar, G., et al., Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod*, 1997. 56(4): p. 1020-4.
2. Huszar, G. and L. Vigue, Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev*, 1993. 34(3): p. 292-8.
3. Huszar, G., M. Corrales, and L. Vigue, Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normospermic and oligospermic men. *Gamete Res*, 1988. 19(1): p. 67-75.
4. Huszar, G., et al., Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*, 2003. 79 Suppl 3: p. 1616-24.
5. Huszar, G., L. Vigue, and S. Oehninger, Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertil Steril*, 1994. 61(1): p. 136-42.
6. Huszar, G., L. Vigue, and M. Corrales, Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile oligospermic men. *J Androl*, 1990. 11(1): p. 40-6.
7. Sidhu, R.S., R.K. Sharma, and A. Agarwal, Relationship between creatine kinase activity and semen characteristics in subfertile men. *Int J Fertil Womens Med*, 1998. 43(4): p. 192-7.
8. Allen, J.W., et al., HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma*, 1996. 104(6): p. 414-21.
9. Ergur, A.R., et al., Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. *Fertil Steril*, 2002. 77(5): p. 910-8.
10. Huszar, G., Jakap A, Ozenci CC, Sakkas D, Kovacs T and Vigue L., Sperm Testing by Hyaluronic acid binding: Andrologic Laboratory assesment and sperm selection., in *Biotechnology of Human Reproduction*. 2002, Parthenon Publishing Group: NY. p. 149-157.
11. Lalwani, S., et al., Biochemical markers of early and late spermatogenesis: relationship between the lactate dehydrogenase-X and creatine kinase-M isoform concentrations in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 1996. 43(4): p. 495-502.
12. Eddy, E.M., Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod*, 1999. 4(1): p. 23-30.
13. Dix, D.J., et al., Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(8): p. 3264-8.
14. Kovanci, E., et al., FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod*, 2001. 16(6): p. 1209-17.

15. Celik-Ozenci, C., et al., Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. *Biol Reprod*, 2003. 69(4): p. 1347-55.
16. Bonduelle, M., et al., Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1998. 13(4): p. 781-2.
17. Huszar, G., M. Willetts, and M. Corrales, Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril*, 1990. 54(6): p. 1127-34.
18. Sbracia, M., et al., Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum Reprod*, 1997. 12(9): p. 1949-54.
19. Ranganathan, S., A.K. Ganguly, and K. Datta, Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Mol Reprod Dev*, 1994. 38(1): p. 69-76.
20. Kornovski, B.S., et al., The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertil Steril*, 1994. 61(5): p. 935-40.
21. Steinach, E., *Forty Years of Biological and Medical Experiments*. 1940, New York: Viking Press.
22. Graaf, R.D., *On the human reproductive organs*, translated by ND Jocelyn and BP Setchell. *J Reprod Fertil*, 1972((Suppl 17)).
23. Kölliker, R.V., *Bertrage zur Kenntniss der Geschlecht-versaltsmisse und der Samen-flussigkeit wirbelloser Thiere und die Bedeutung de sogenannten Samenthiere*. 1841, Berlin.
24. Berthold, A., *Transplantation der Hoden*. *Arch Anat Physiol Wiss Med*, 1849. 16: p. 42-46.
25. Bouin, P., *Recherches sur les cellules interstitielles der testicule des mammiferes*. *Arch Zool (Stockh.)*, 1903. 1: p. 437-523.
26. Berta, P., et al., Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 1990. 348(6300): p. 448-50.
27. Thompson MW, M.R., Willard HE, Thompson & Thompson *Genetics in Medicine*. 1991, Philadelphia: WB Saunders.
28. DiGeorge, A., *Hermaphroditism* In: Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM (eds). *Nelson Textbook of Pediatrics*. 1996, Philadelphia: WB Saunders.
29. Leeson, T.S. and L. Adamson, The mammalian tunica vaginalis testis: its fine structure and function. *Acta Anat (Basel)*, 1962. 51: p. 226-40.
30. Holstein, A.F. and C. Weiss, [On the effect of the smooth musculature in the tunica albuginea in the testes of rabbits; measurement of the interstitial pressure]. *Z Gesamte Exp Med*, 1967. 142(4): p. 334-7.
31. Hermo, L., M. Lalli, and Y. Clermont, Arrangement of connective tissue components in the walls of seminiferous tubules of man and monkey. *Am J Anat*, 1977. 148(4): p. 433-45.
32. Barrat, C., Spermato-genesis. In: Grudzinkas JG and Yovich JL (eds): *Gametes- the spermatozoon*. 1995, Cambridge University Press. p. 250-267.
33. Glower TD, B.C., Tyler JJP, *Human male fertility and semen analysis*. 1990, London Academic Press. p. 247.

34. WHO, WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. 1992, Cambridge University Press: Cambridge. p. 1-107.
35. De Rooij, D.G., F.M. Van Dissel-Emiliani, and A.M. Van Pelt, Regulation of spermatogonial proliferation. *Ann N Y Acad Sci*, 1989. 564: p. 140-53.
36. Ehmcke, J., D.R. Simorangkir, and S. Schlatt, Identification of the starting point for spermatogenesis and characterization of the testicular stem cell in adult male rhesus monkeys. *Hum Reprod*, 2005. 20(5): p. 1185-93.
37. Hamilton DW, W.G., Cellular and molecular events in spermiogenesis. Scientific basis of fertility regulation., in World Health Organization. 1990, Cambridge University Press. p. 334.
38. Ward, W.S. and D.S. Coffey, DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*, 1991. 44(4): p. 569-74.
39. Hecht, N.B., Regulation of 'haploid expressed genes' in male germ cells. *J Reprod Fertil*, 1990. 88(2): p. 679-93.
40. Tanaka, H. and T. Baba, Gene expression in spermiogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 2005. 62(3): p. 344-54.
41. Wrobel, G. and M. Primig, Mammalian male germ cells are fertile ground for expression profiling of sexual reproduction. *Reproduction*, 2005. 129(1): p. 1-7.
42. Miller, D., RNA in the ejaculate spermatozoon: a window into molecular events in spermatogenesis and a record of the unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. *Mol Hum Reprod*, 1997. 3(8): p. 669-76.
43. Ivell, R., 'All that glitters is not gold'--common testis gene transcripts are not always what they seem. *Int J Androl*, 1992. 15(2): p. 85-92.
44. Schulze, W. and U. Rehder, Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell Tissue Res*, 1984. 237(3): p. 395-407.
45. De Kretser DM, S.Y., Drummond AE, Gonzales GF, Robertson DM, Riosberbriger GP. In: Asch RH, Balmaceda JP, Johnson I (eds), in *Serono Symposia*. 1990: USA. p. 19-30.
46. Bellve, A.R. and W. Zheng, Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *J Reprod Fertil*, 1989. 85(2): p. 771-93.
47. Skinner, M.K., Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev*, 1991. 12(1): p. 45-77.
48. Sharpe, R.M., Intratesticular control of steroidogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1990. 33(6): p. 787-807.
49. Djakiew, D. and M. Dym, Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function. *Biol Reprod*, 1988. 39(5): p. 1193-205.
50. Sharpe, R.M., Monitoring of spermatogenesis in man--measurement of Sertoli cell- or germ cell-secreted proteins in semen or blood. *Int J Androl*, 1992. 15(3): p. 201-10.
51. Sharpe, R., Regulation of spermatogenesis, in *Physiology of Reproduction*, N.J.e. In: Knobil E, Editor. 1994, Raven Press: New York.
52. Obregon, E.B. and O. Ramirez, Ageing and testicular function in *Octodon degus*. *Andrologia*, 1997. 29(6): p. 319-26.

53. Johnson, L., Spermatogenesis and aging in the human. *J Androl*, 1986. 7(6): p. 331-54.
54. Acosta, A.A., Process of fertilization in the human and its abnormalities: diagnostic and therapeutic possibilities. *Obstet Gynecol Surv*, 1994. 49(8): p. 567-76.
55. Asch, R., et al., The stages at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Hum Reprod*, 1995. 10(7): p. 1897-906.
56. Boldt, J., et al., Carbohydrate involvement in sperm-egg fusion in mice. *Biol Reprod*, 1989. 40(4): p. 887-96.
57. Carlson, B., *Human Embryology and Developmental Biology*. 1994, St.Louis: Mosby.
58. Moos, J., et al., Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization. *Hum Reprod*, 1995. 10(9): p. 2467-71.
59. Chen, C. and A.H. Sathananthan, Early penetration of human sperm through the vestments of human eggs in vitro. *Arch Androl*, 1986. 16(3): p. 183-97.
60. Bercegeay, S., et al., Composition of human zona pellucida as revealed by SDS-PAGE after silver staining. *Mol Reprod Dev*, 1995. 41(3): p. 355-9.
61. Wassarman, P.M., The biology and chemistry of fertilization. *Science*, 1987. 235(4788): p. 553-60.
62. Farrell, K.W., Purification and reassembly of tubulin from outer doublet microtubules. *Methods Cell Biol*, 1982. 24: p. 61-78.
63. Van Blerkom, J., et al., Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod Update*, 1995. 1(5): p. 429-61.
64. Pedersen, H., Observations on the axial filament complex of the human spermatozoon. *J Ultrastruct Res*, 1970. 33(5): p. 451-62.
65. Curry MR, W.P., Sperm structure and function, in *Gametes- the spermatozoon*, I.G.J.a.Y.J. (eds, Editor. 1995, Cambridge University Press. p. 45-69.
66. Woolley, D.M. and D.W. Fawcett, The degeneration and disappearance of the centrioles during the development of the rat spermatozoon. *Anat Rec*, 1973. 177(2): p. 289-301.
67. Serres, C., D. Escalier, and G. David, Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibres. *Biol Cell*, 1983. 49(2): p. 153-61.
68. Phillips, D., Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J Ultrastruct Res*, 1970(58): p. 144-154.
69. Keyhani, E. and B.T. Storey, Oxidation rates of Krebs cycle carboxylic acids by the mitochondria of hypotonically treated rabbit epididymal spermatozoa. *Fertil Steril*, 1973. 24(11): p. 864-71.
70. Bedford, J.M. and H.I. Calvin, Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species. *J Exp Zool*, 1974. 187(2): p. 181-204.
71. Pedersen, H., Further observations on the fine structure of the human spermatozoon. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 1972. 123(3): p. 305-15.

72. Siegel, M.S., et al., Partial purification and characterization of human sperminogen. *Biol Reprod*, 1987. 36(4): p. 1063-8.
73. Holt, W.V., Development and maturation of the mammalian acrosome. A cytochemical study using phosphotungstic acid staining. *J Ultrastruct Res*, 1979. 68(1): p. 58-71.
74. Morales, P., et al., Extracellular localization of proteasomes in human sperm. *Mol Reprod Dev*, 2004. 68(1): p. 115-24.
75. Virtanen, I., et al., Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol*, 1984. 99(3): p. 1083-91.
76. Elgavish, S. and B. Shaanan, Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends Biochem Sci*, 1997. 22(12): p. 462-7.
77. Cross, N.L. and J.W. Overstreet, Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro. *Gamete Res*, 1987. 16(1): p. 23-35.
78. Baker, S.S., M. Thomas, and C.D. Thaler, Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. *J Androl*, 2004. 25(5): p. 744-51.
79. Yudin, A.I., W. Gottlieb, and S. Meizel, Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid. *Gamete Res*, 1988. 20(1): p. 11-24.
80. Huang, T.T., Jr. and R. Yanagimachi, Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. *Am J Anat*, 1985. 174(3): p. 249-68.
81. Yanagimachi, R., Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD et al., (eds), in *The Physiology of Reproduction*. 1988, Raven Press: New York. p. 135-185.
82. Kolk, A.H. and T. Samuel, Isolation, chemical and immunological characterization of two strongly basic nuclear proteins from human spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*, 1975. 393(2): p. 307-19.
83. Pedersen, H., The postacrosomal region of the spermatozoa of man and *Macaca arctoides*. *J Ultrastruct Res*, 1972. 40(3): p. 366-77.
84. Bedford JM, H.D., The mammalian spermatozoan: morphology, biochemistry and physiology, in In: Lamming GE (ed) *Marshall's Physiology of Reproduction*. 1990: Edingurgh:Churchill Livingstone. p. 379-568.
85. Koehler, J.K., Lectins as probes of the spermatozoon surface. *Arch Androl*, 1981. 6(3): p. 197-217.
86. Friend, D.S., Plasma-membrane diversity in a highly polarized cell. *J Cell Biol*, 1982. 93(2): p. 243-9.
87. Villarroya, S. and R. Scholler, Regional heterogeneity of human spermatozoa detected with monoclonal antibodies. *J Reprod Fertil*, 1986. 76(1): p. 435-47.
88. Yanagimachi, R., et al., The distribution of negative surface charges on mammalian spermatozoa. *Am J Anat*, 1972. 135(4): p. 497-519.
89. Friend, D.S. and D.W. Fawcett, Membrane differentiations in freeze-fractured mammalian sperm. *J Cell Biol*, 1974. 63(2 Pt 1): p. 641-64.
90. Palermo, G., et al., Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992. 340(8810): p. 17-8.

91. Sakkas, D., et al., Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*, 1999. 4(1): p. 31-7.
92. Retief, A.E., et al., Chromosome studies in 496 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet*, 1984. 66(2-3): p. 162-4.
93. De Braekeleer, M. and T.N. Dao, Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*, 1991. 6(2): p. 245-50.
94. Scholtes, M.C., et al., Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection: influence on implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril*, 1998. 70(5): p. 933-7.
95. Meschede, D., et al., Genetic risk in micromanipulative assisted reproduction. *Hum Reprod*, 1995. 10(11): p. 2880-6.
96. Peschka, B., et al., Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1999. 14(9): p. 2257-63.
97. Montag, M., et al., Success of intracytoplasmic sperm injection in couples with male and/or female chromosome aberrations. *Hum Reprod*, 1997. 12(12): p. 2635-40.
98. Amann, R.P., Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J Androl*, 1989. 10(2): p. 89-98.
99. Kruger, T.F., et al., Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1986. 46(6): p. 1118-23.
100. Oehninger, S., et al., Corrective measures and pregnancy outcome in in vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertil Steril*, 1988. 50(2): p. 283-7.
101. Johnson, M.D., Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril*, 1998. 70(3): p. 397-411.
102. Patrizio, P., Intracytoplasmic sperm injection (ICSI): potential genetic concerns. *Hum Reprod*, 1995. 10(10): p. 2520-3.
103. Cummins, J.M. and A.M. Jequier, Treating male infertility needs more clinical andrology, not less. *Hum Reprod*, 1994. 9(7): p. 1214-9.
104. In't Veld, P., et al., Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, 1995. 346(8977): p. 773.
105. Bonduelle, M., et al., Comparative follow-up study of 130 children born after intracytoplasmic sperm injection and 130 children born after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1995. 10(12): p. 3327-31.
106. Bonduelle, M., et al., Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod*, 1996. 11 Suppl 4: p. 131-55; discussion 156-9.
107. Bonduelle, M., et al., Prospective follow-up study of 423 children born after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1996. 11(7): p. 1558-64.
108. Wisanto, A., et al., Obstetric outcome of 904 pregnancies after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1996. 11 Suppl 4: p. 121-9; discussion 130.

109. Tombes, R.M. and B.M. Shapiro, Metabolite channeling: a phosphorylcreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell*, 1985. 41(1): p. 325-34.
110. Wallimann, T., et al., Creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *J Muscle Res Cell Motil*, 1986. 7(1): p. 25-34.
111. Huszar, G., L. Vigue, and M. Corrales, Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variablespermic, and oligospermic men. *Biol Reprod*, 1988. 38(5): p. 1061-6.
112. Huszar, G. and L. Vigue, Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 1990. 25(3): p. 258-62.
113. Terquem, A.a.D.J., Aniline blue staining of human sperm chromatin:evaluation fo nuclear maturation., in *The sperm cell*. 1983, Martinus Nijhoff: London.
114. Auger, J., et al., Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl*, 1990. 13(6): p. 452-62.
115. Foresta, C., et al., Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl*, 1992. 15(4): p. 330-7.
116. Hammadeh, M.E., et al., Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl*, 2001. 46(2): p. 99-104.
117. Sakkas, D., et al., Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1996. 11(4): p. 837-43.
118. Meistrich, M.L., et al., Nuclear protein transitions during spermatogenesis. *Fed Proc*, 1978. 37(11): p. 2522-5.
119. Dadoune, J.P.a.A.M.F., Ultrastructural and cytochemical changes of the head components of human spermatids and spermatozoa. *Gamete Res*, 1986. 14: p. 33-46.
120. Kamiguchi, Y. and K. Mikamo, An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am J Hum Genet*, 1986. 38(5): p. 724-40.
121. Orsini, M.W., The external vaginal phenomenon characterizing the stages of the estrous cycle, pregnancy, pseudopregnancy, lactation and the anestrous hamster, *Mesocricetus auratus*. *Proc Animal Care Panel*, 1961. 11: p. 193-206.
122. Bavister, B.D., A consistently successful procedure for in vitro fertilization of golden hamster eggs. *Gamete Res*, 1989. 23(2): p. 139-58.
123. Yanagimachi, R., Zona-free hamster eggs: their use in assesing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res*, 1984. 10: p. 187-232.
124. Yanagimachi, R., H. Yanagimachi, and B.J. Rogers, The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 1976. 15(4): p. 471-6.
125. Rogers, B.J., et al., Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil Steril*, 1979. 32(6): p. 664-70.

126. Aitken, R.J., Assessment of sperm function for IVF. *Hum Reprod*, 1988. 3(1): p. 89-95.
127. Rudak, E., P.A. Jacobs, and R. Yanagimachi, Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, 1978. 274(5674): p. 911-3.
128. Martin, R.H., et al., Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: preliminary results from 18 normal men. *Am J Hum Genet*, 1982. 34(3): p. 459-68.
129. Brandriff, B., et al., Chromosomal abnormalities in human sperm: comparisons among four healthy men. *Hum Genet*, 1984. 66(2-3): p. 193-201.
130. Alvarez, R., et al., Hamster origin of metaphases with multiple chromosome rearrangements in first cleavage human-hamster embryos. *Hum Reprod*, 1997. 12(10): p. 2176-82.
131. Marquez, C., et al., Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm. *Cytogenet Cell Genet*, 1996. 72(2-3): p. 164-70.
132. Huszar, G., et al., Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod*, 2000. 63(3): p. 925-32.
133. Huszar, G., L. Vigue, and M. Morshedi, Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1992. 57(4): p. 882-8.
134. Gergely, A., et al., Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. *Hum Reprod*, 1999. 14(8): p. 2007-14.
135. Mortimer, D., *Practical laboratory andrology*. 1994, New York: Oxford University Press. 209-212.
136. Aitken, J., C. Krausz, and D. Buckingham, Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev*, 1994. 39(3): p. 268-79.
137. Franken, D.R., et al., Normal sperm morphology and chromatin packaging: comparison between aniline blue and chromomycin A3 staining. *Andrologia*, 1999. 31(6): p. 361-6.
138. Tsunekawa, N., et al., The Hsp70 homolog gene, Hsc70t, is expressed under translational control during mouse spermiogenesis. *Mol Reprod Dev*, 1999. 52(4): p. 383-91.
139. Johnson, A.R., et al., Conditions influencing human sperm capacitation and penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril*, 1984. 41(4): p. 603-8.
140. Brandriff, B., et al., Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. *Hum Genet*, 1985. 70(1): p. 18-24.
141. Martin, R.H., et al., The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. *Hum Genet*, 1983. 63(4): p. 305-9.
142. Rybouchkin, A., et al., Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of human spermatozoa. *Hum Reprod*, 1995. 10(5): p. 1130-5.

143. Lee, J.D., Y. Kamiguchi, and R. Yanagimachi, Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod*, 1996. 11(9): p. 1942-6.
144. Markert, C.L., Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *J Exp Zool*, 1983. 228(2): p. 195-201.
145. Kimura, Y. and R. Yanagimachi, Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod*, 1995. 52(4): p. 709-20.
146. Uehara, T. and R. Yanagimachi, Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod*, 1976. 15(4): p. 467-70.
147. Uehara, T. and R. Yanagimachi, Activation of hamster eggs by pricking. *J Exp Zool*, 1977. 199(2): p. 269-74.
148. Ogura, A. and R. Yanagimachi, Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes from pronuclei and participate in syngamy. *Biol Reprod*, 1993. 48(2): p. 219-25.
149. Jonhson, R.C.a.L., Factors related to successful microinjection of hamster eggs: the effect of sperem species, technical experience, needle dimensions and incubation medium on egg viability and sperm decondensation following microinjection. *Theriogenology*, 1988. 30: p. 447-460.
150. Austin, C.R., Activation of eggs by hypothermia in rats and hamster. *J. Exp.Biol.*, 1956. 33: p. 338-347.
151. Yanagimachi, R. and M.C. Chang, Fertilizable life of golden hamster ova and their morphological changes at the time of losing fertilizability. *J Exp Zool*, 1961. 148: p. 185-203.
152. Komar, A., Fertilization of parthenogenetically activate mouse eggs. I. Behaviour of sperm nuclei in the cytoplasm of parthenogenetically activated eggs. *Exp Cell Res*, 1982. 139(2): p. 361-7.
153. Jedlicki A, B.C., Salgado AM, Effects of in vivo oocyte aging on sperm chromatin decondensation in the golden hamster. *Gamete Res*, 1986. 14: p. 347-354.
154. Rybouchkin, A., De Sutter, P. and Dhont, M, Influence of the mode of oocyte activation on the quality of fertilization after ICSI. *J.Reprod. Fertil.*, 1996.
155. Harrison, R.A., J.E. Flechon, and C.R. Brown, The location of acrosin and proacrosin in ram spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1982. 66(1): p. 349-58.
156. Green, D.P., Sperm thrusts and the problem of penetration. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 1988. 63(1): p. 79-105.
157. Ostermeier, G.C., et al., Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, 2004. 429(6988): p. 154.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Kars'ta doğdu. İlköğrenimini 1991 yılında Antalya Emekevler İlkokulunda, Orta öğrenimini 1994 yılında Antalya Yenimahalle İlköğretim Okulu'nda ve Lise öğrenimini 1998 yılında Antalya İngilizce ağırlıklı Karatay Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini, 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, Fakülte ve Biyoloji Bölümü birincisi olarak tamamladı. Bu ödüllere ek olarak yine 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi tarafından İhsan Doğramacı Üstün Başarı Ödülü ve Öğrenci Başarı Ödülü'nü kazandı. 2002-2003 Eğitim-Öğretim yılı güz döneminde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na bağlı Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans Programı'na giriş sınavlarını kazanarak, burada Yüksek Lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans tezinin bir kısmını Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Reprodüktif Endokrinoloji Bölümü Sperm Fizyolojisi Laboratuvarı'nda tamamladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Güler Leyla SATI'nın, Science Citation Index'e kayıtlı 2 makale ve 1'i ulusal 5'ü uluslararası kongrelerde olmak üzere 6 kongre bildirisi vardır.