

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OLİGOSPERMİDE SPERME AİT YAPISAL PARAMETRELERİN
ARAŞTIRILMASI**

İlay Nur DURAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

KONYA - 2015

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OLİGOSPERMİDE SPERME AİT YAPISAL PARAMETRELERİN
ARAŞTIRILMASI**

İlay Nur DURAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

Prof.Dr. Aydan CANBİLEN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13202025 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA -2015

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

İlay Nur Durak tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Kadir CEYLAN
Selçuk Üniversitesi

Danışman: Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Selçuk Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Pınar KARABAĞLI
Selçuk Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulutarih vesayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. H. Hüseyin DÖNMEZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen, önerileriyle bana rehberlik eden danışmanlarım; Prof. Dr. Ender ERDOĞAN ve Prof. Dr. Aydan CANBİLEN'e, bilgi birikiminden yararlandığım ve manevi desteğini her zaman hissettiğim değerli hocam, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Cengiz ÇOLAKOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Bio. MSc. Özlem ŞAHİN'e, istatistik değerlendirmeleri konusundaki katkıları için Yrd. Doç. Dr. Fatih KARA'ya, yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma, her konuda maddi ve manevi olarak bana destek olan aileme teşekkür ederim.

İlay Nur DURAK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
1. GİRİŞ	1
1.1. Sperm Morfolojisi	2
1.2.Spermatogenezis	2
1.2.1.Testisler	2
1.2.2.Seminifer Tübüller	3
1.2.3.Spermatogenez	4
1.3.Spermin Yapısı	6
1.3.1.Baş	7
1.3.2.Kuyruk	7
1.4.Semen	8
1.4.1.Semen Örneğinin Değerlendirilmesi	9
1.4.2.Semenin Makroskopik Analizi	10
1.4.3.Semenin Mikroskopik Analizi	12
1.4.4.Sperm Hücre İskeleti ve Organelleri	13
1.4.5.Hücre İskeleti ve Organellerinin İşaretleyicileri	23
1.5.Normal Semen Parametreleri	26
1.6. İnfertilite	27
1.6.1.Erkek İnfertilitesi	27
1.6.2.Erkek İnfertilitesinin Nedenleri	28
2. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3. BULGULAR	34
4. TARTIŞMA	41
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	50
6. KAYNAKLAR	51
7. EKLER	55
EK-A Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu	55
EK-B Etik kurul kararı	57
8. ÖZGEÇMİŞ	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP	Androjen bağlayıcı (binding) protein
AKAP4	A-kinase anchor (ağ) proteini
AR	Akrozom reaksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	Adenozin trifosfataz
BSA	Sığır serum albumini
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
DSÖ/WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
FISH	Fluoresan in-situ hibridizasyon
FITC	Fluoresan iso tiyo siyanat (yeşil flüoresan)
GAPDHS	Testise özgü gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
HIR	Ağır İyonize Radyasyon
IUI	İntra Uterin İnseminasyon
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
MAP	Mikrotübül ilişkili protein
ml	Mililitre
mtDNA	Mitokondrial genom (DNA)
μm	Mikrometre
μl	Mikrolitre
ODF	Dış yoğun lifler (outer dense fibres)
PI	Propidyum iyodür

PKA	cAMP bağımlı kinaz
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyon
ROS	Reaktif oksijen ürünleri
SEPT12	Septin 12
TEM	Geçirmeli (transmission) Elektron Mikroskobu
TRITC	Tetrametil izotiyo siyanat (kırmızı flüoresan)
ZP	Zona pelusida

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Oligospermide Sperme Ait Yapısal Parametrelerin Araştırılması

İlay Nur DURAK
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2015

DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü)'nün son raporlarına göre: son yıllarda erkeklerde sperm sayısı giderek azalmaktadır. Günümüzde gittikçe artan erkeğe bağlı infertilitenin en önemli nedenlerinden birisi de sperm sayısının normalden az olması yani oligospermidir. Oligospermide bağlı infertilitede sperme bağlı bazı hücresel yapısal elemanlar (aktin, tübülün) ve yine hücre içinde yer alan organellere ilişkin (mitokondria ve akrozom/lizozom) verilerin daha detaylı analizi ile bu tabloya neden olan nedenlerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi androloji laboratuvarı ile Özel Selçuklu Hastanesi Tüp Bebek Ünitesi'ne başvuran 20 oligospermik, 20 normospermik hastaların spermiyogramları yapıldıktan sonra biyo-atık olarak kalan semen numuneleri çalışmaya dahil edildi. Hastaların en az üç günlük cinsel perhiz sonrası alınan semenleri değerlendirmeye alındı. Alınan spermlerin sayısal ve yapısal analiz sonuçları kaydedildi. İlâveten yapısal parametrelerden aktin ve tübülün gibi hücre iskeleti elemanları ile lizozom ve mitokondrium gibi organellere ilişkin spesifik çeşitli fluoressan işaretlemeler yapıldı. Bu amaçla: canlı mitokondri ve lizozom işaretleyicileri (MitoTracker red FM ve LysoTracker Green FM) kullanıldı. Doğrudan taze semen örneği 50nM konsantrasyonda her iki boyayla 37°C'de 45 dakika inkübe edildi ve daha sonra fluoressan mikroskopla incelendi. Aktin ve tübülün için semen yayma preparatları kullanıldı. Aseton-formaldehit ile fiske edilen preparatlar falloidin paclitaxel ile fluoressan mikroskopide değerlendirildi. Anti-tübülün antikoruna ile indirekt immunofluoressan işaretleme yapılarak fluoressan mikroskopide değerlendirildi. Tüm değerlendirmeler WHO 2010 kriterleri esas alınarak yapıldı.

Yapılan incelemeler sonucunda oligospermik ve normospermik hasta gruplarının arasında anlamlı fark gözlemlendi ($P<0.05$).

Anahtar Sözcükler: Aktin; İnfertilite; Mitokondri; Oligosperm; Tübülün.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Structural Sperm Parameters in Oligospermic Patients

İlay Nur DURAK

Department of Histology and Embryology

MASTER/KONYA-2015

According to last reports of WHO (World Health Organisation), number of spermatozoon in men has been decreasing for last years. One of the most important reasons of gradually increasing infertility connected to men is lacking number of spermatozoon, in other words oligospermia. It is aimed at contributing to be understood reasons which cause this fact by detailed analysis of some cellular structural components (actin, tubulin) connected to spermatozoon in infertility caused by oligospermia and details about organelles (mitochondria and acrosome/lysosome) located within the cell.

After being done spermiyograms of 20 oligospermic and 20 normospermic patients applied to andrology laboratuary of Hospital of Selcuk University Faculty of Medicine and test-tube baby unit of Özel Selcuklu Hospital, remaining bio-additives semen samples were included in study. Semens, taken from patients after least 3 days sexual abstinence, were evaluated. Numerical and structural Analysis results of taken spermatozoon were saved. Additionally spesific various fluorescent markings were made on cytoskeletal elements such as actin and tubulin from structural parameters and organelles such as lysosome and mitochondria. For this reason live mitochondria ve lysosome markers (MitoTracker red-FM and LysoTracker Green-FM) were used. Direct fresh semen samples were incubated in 50nM concentration with to paints at 37°C for 45 minutes and later were examined with fluorescent microscope. Spreading preparats were used for actin and túbülin. Preparats fixed by acetone formaldehyde were assessed in fluorescent microscope with paclitaxel. Making indirect immunofluorescence marking with anti tubulin antibody, it is assessed in fluorescent microscope. All assesments were performed according to WHO 2010 criteria.

As a result of examinations, significant differences were observed between the patient groups' oligospermic and normospermic. (P<0.05).

Key Words: Actin; İnfertility; Mitochondria; Oligospermia;Tubulin.

1. GİRİŞ

İnfertilite genel anlamda sağlıklı popülasyona göre daha az gebe kalabilme kabiliyeti olarak tanımlanırken; özgün anlamda: ‘üreme çağındaki (15-49 yaş) bir çiftin korunmasız bir yıl cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememeleri’ şeklinde tarif edilir. Çiftlerin yaklaşık %10-15 infertilite tanısı almaktadır.

İnfertilitenin en sık nedenleri: tubal-peritoneal patoloji (%30-40), anovülasyon (%15), erkek (male) faktörü (%30-40) ve geri kalan bölümünü de açıklanamamış infertilite grubu oluşturmaktadır.

Normal semen analizi, ovülasyon varlığı, normal uterin kavite ve bilateral tubal açıklık varlığında ‘açıklanamayan infertilite’ tanısı konur. İnsidansı: %10-30 arasında değişmektedir (Üstün 2011).

Günümüzde gittikçe artan erkeğe bağlı infertilitenin en önemli nedenlerinden birisi de sperm sayısının normalden az olması (15 milyon/mL, veya total sayınının 39 milyondan az olması) yani oligospermidir.

Bu çalışmada, normospermik ve oligospermik vakalarda, erkek infertilitesinde etkili spermatozoa morfolojisi, sperm hücre organelleri ve hücre iskeleti yapılarına ait özellikler açısından değerlendirildi.

Oligospermiye bağlı infertilitede sperme bağlı bazı hücresel yapısal elemanlar (aktin, tübülün), ve yine hücre içinde yer alan organellere ilişkin (mitokondria ve akrozom/lizozom) verilerin daha detaylı analizi ile bu tabloya neden olan nedenlerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

1.1. Sperm Morfolojisi

Spermin morfolojik incelemesi, spermatogenez kalitesinin ve fertilitenin, kesin olmamakla birlikte duyarlı bir göstergesidir. Günümüzde çoğu laboratuvar normal spermin tanımlanmasını yaparken kesin kriterler kullanırlar. Sınırdaki formlar ise anormal olarak kabul edilir. Bu kriterleri kullanarak, normal sperm oranı %14'den az ise; İn Vitro Fertilizasyon (IVF) ile fertilizasyon oranı %37, %14'ün üzerinde normal sperm içerenlerde ise %91 bulunmuştur (Kruger ve ark 1986).

Özellikle amorf ve uzamış baş anomalisi taşıyan spermelerin yapısal kromozom anomalisi sıklığı da artmaktadır. Böyle olgularda sperme ait kromozom anomalilerinin fertilizasyon bozukluğundan sorumlu olabileceği önerilmektedir (Lee ve ark 1996).

Spermatozoanın baş, orta ve kuyruğuna ait yapısal bozukluklar infertilite nedeni olabilir. Normal sperm kuyruğunun aksonemi ortada bir adet, etrafında ise 9 adet iki mikrotübül kompleksinin oluşturduğu silindirik bir yapıdan ibarettir. Her tübül diğerine dynein kolları ile tutunmuşlardır. Santral tübüller ise etraf tübüllere radyal kollarla bağlıdır (Sigman ve Jarow 2004).

1.2. Spermatogenezis

1.2.1. Testisler

Normal boyutları 4,5-5 cm ebadında olan testisler septumlarla kompartımanlara bölünmüştür. Bu kompartımanlar içerisinde seminifer tübül yumakları bulunur. Açık olan her iki ucu ile rete testislere bağlanan seminifer tübüller, Leydig hücrelerinin de bulunduğu interstisiyel doku ile çevrelenmişlerdir. Birleşen rete testisler sayıları 10 civarında olan 'duktuli efferentes' aracılığı ile kaput epididimise açılırlar. Testis dışarıdan üç tabaka ile çevrilmiştir. Bunlar dıştan içe doğru; tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vaskülosa'dır (Schlegel ve ark 2007).

1.2.2. Seminifer Tübüller

Sperm üretimi, her iki testis içinde septalarla ayrılmış ve kompartmanlar içine yerleşmiş, interstisyumla çevrili seminifer túbülüslerde meydana gelmektedir. Seminifer túbüller interstisyumdan fibrositlerin oluşturduğu bir adventisyal tabaka ile ayrılmaktadır. Yapı olarak 150-200 µm çapında ve toplam sayısı 1000 kadar olan bu túbüller açık olan her iki uçları ile rete testise açılmaktadırlar. Seminifer túbülleri çevreleyen adventisyal tabakanın hemen altında túbül lümenine doğru kapasiteye sahip oldukları da bildirilmiştir (Schlegel ve ark 2007). Myoid hücre tabakası ile bazal membran arasında iç lamel adı verilen kollajen tabakası bulunmaktadır. En iç tabakayı bazal membran oluşturur. Bazal membrandan lümene doğru var olan çok katlı hücre tabakası içinde iki tür hücre bulunmaktadır. Bunlar; Sertoli ve spermatojenik hücrelerdir.

Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri çeşitli aşamalardaki spermatojenik hücrelerin beslenmesi, korunması ve taşınmasında görevli, düzensiz şekilli, genellikle bazal kesimde olan oval nükleuslu ve belirgin nükleuslu, kan testis bariyerinin oluşumundan sorumlu çok sayıda lateral uzantılara sahip hücrelerdir (Gartner ve Hiatt 2006).

Sertoli hücreleri yavaş bölünen hücrelerdir. Puberteden sonra hücre bölünmesi görülmez ve yaşamın sonuna kadar bu hücreler faaliyetlerini sürdürürler. Sertoli hücrelerinin birçok molekülü sentezleyebildikleri gösterilmiştir. Bunlar arasında; androjen bağlayıcı protein (ABP), kollajen tip I ve V, seruloplazmin, transferin, inhibin, somatomedin benzeri maddeler ve anti-Müllerian hormon (embriyogenez sırasında) gibi birçok madde bulunmaktadır (Brehm ve Steger 2005, Gartner ve Hiatt 2006).

Sertoli hücrelerinin önemli bir görevi de, immün sistem dışında kalan bir alan oluşumunu sağlayan kan-testis bariyerinin meydana getirilmesidir. Bu bariyer dinamik bir yapıdadır ve seminifer túbülü bazal ve adluminal kompartman olmak üzere ikiye ayrılır (Gartner ve Hiatt 2006, Schlegel ve ark 2007).

1.2.3. Spermatogenez

Primordial germ hücrelerinin oluşumu fetal yaşamın erken dönemlerinde görülmektedir. Germ hücreleri yolk kesesinde allantoise yakın bir bölümde endodermal hücrelerden kaynaklanmaktadır. Hücreler buradan intrauterin hayatın 5. haftasından itibaren genital kabartıya doğru göç etmeye başlarlar ve altıncı haftada büyük ölçüde bu bölgeye ulaşmış olurlar (Sadler 2006, Schlegel ve ark 2007).

Olgun spermin oluşumu ile sonuçlanan spermatogenez 64 günde meydana gelmektedir ve genel olarak iki bölümde değerlendirilebilir.

İlk bölümde hücre bölünmelerinin gerçekleştiği aşamalar, ikinci bölümde de hücrenin olgunlaşma aşamaları yer almaktadır.

1- Hücre bölünmeleri ve proliferasyonunun olduğu ilk bölüm kendi arasında ikiye ayrılabilir.

a. Spermatozitoz adı verilen mitoz bölünme aşamasında spermatogonyumlar bölünerek sırasıyla A_s , A_p , A_{al} , A_2 , A_3 , A_4 spermatogonyumlara dönüşürler (Schlegel ve ark 2007). Bir A spermatogonyumun tekrar bölünmesi için 16 gün gereklidir. B spermatogonyumların da mitotik bölünmesi ile primer spermatozitler ortaya çıkar. Bu aşamada mitoz bölünme safhası biter (Jonge ve Barratt 2006, Schlegel ve ark 2007).

b. Primer spermatozitler 22 gün süren mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerek sırasıyla preleptoten, leptoten, zigoten, pakiten spermatozitelere dönüşürler ve birinci mayoz bölünmeyi gerçekleştirerek sekonder spermatozitelere dönüşürler (Brehm ve Steger 2005, Gartner ve Hiatt 2006). Sekonder spermatozitler de mayoz bölünmenin ikinci aşaması sonrası spermatidlere dönüşürler (Brehm ve Steger 2005, Gartner ve Hiatt 2006, Schlegel ve ark 2007)

Sperm hücreleri bölünmeleri sırasında birbirlerinden tam olarak kopmazlar ve sınırlarını oluştururlar. Bu hücresel bağların hücrelerin senkronizasyonlarında görev aldığı ileri sürülmüştür. Bu senkronizasyonun sonucu olarak, seminifer tübüllerde bazaldan lümenine dizilen hücrelerin ilişkileri göz önünde bulundurulduğunda, sabit bir segmentte belirli hücre diziliş aşamalarından basamaklar halinde belirli sürede geçildiği izlenmiştir. Seminifer tübül kesitleri incelendiğinde, insanda 6 farklı

basamak olduğu gözlemlenmiştir. Bu basamakların belli segmentte, belli sürede, bir biri ardınca sırayla izlenmesi seminifer epitel siklusu olarak adlandırılmıştır. Seminifer tübül ardı sıra gelen siklus basamaklarının, tübülün belli bir bölümü boyunca ardı ardına izlenmesi seminifer tübüldeki spermatojenik dalga olarak adlandırılmıştır (Jonge ve Barratt 2006, Schlegel ve ark 2007).

2- Spermatogenezin ikinci aşaması spermatidlerin olgunlaşma aşamasıdır. Bu aşama spermiyogenez olarak da adlandırılmaktadır. 22 gün süren spermiyogenez 4 evrede ele alınmaktadır. S_a, S_{b1}, S_{b2}, S_c, S_{d1}, S_{d2} spermatidler ve son olarak olgun spermatozoonlar (spermatozoa) ortaya çıkmaktadır (Gupta 2005, Schlegel ve ark 2007).

Olgunlaşma evreleri

Golgi evresi

Spermatidler içinde Golgi aygıtı nükleusa yakın bir bölümde yerleşmiştir (bkz. Şekil 1.1). Endoplazmik retikulumda üretilen bir takım enzimler modifikasyon için Golgi aygıtına taşınır. Burada modifiye edildikten sonra Golgi içinde oluşan granüller küçük veziküller halinde trans Golgi ağı ile salınırlar. Birbirleri ile birleşen küçük veziküller spermin ön yüzünü oluşturacak kesimde çekirdek zarına tutunurlar ve akrozomal vezikülü oluştururlar. Bu gelişimle eş zamanlı olarak sentriyoller akrozomal vesikülün aksi yönünde nükleustan uzağa doğru yer değiştirirler. Distal sentriyol aksonem oluşumuna katılırken, proksimal sentriyol bağlantı parçasının oluşuma katkıda bulunur (Gupta 2005, Jonge ve Barratt 2006, Schlegel ve ark 2007).

Başlık evresi

Bu dönemde gelişen akrozomal vezikül, nükleer zarın etrafını sarak akrozoma dönüşür.

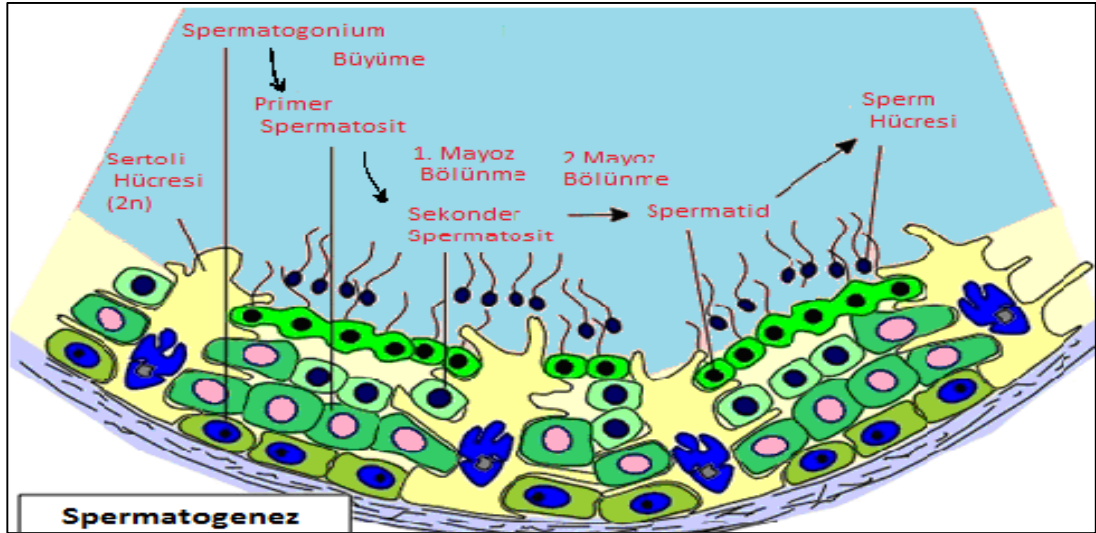
Akrozom evresi

Bu evrede kromozomların daha yoğun bir şekilde katlanmasına paralel olarak çekirdek hacmi azalır ve daha uzun bir hal alır. Birbirine paralel çok sayıda mikrotübülden oluşan manşet adı verilen sperm nükleusundan distale uzanan geçiçi bir yapı ortaya çıkar. Silindir şeklindeki bu yapı uzadıkça beraberinde sitoplâzma

içindeki mitokondriler de uzayan spermatid içinde kuyruk yönünde taşınır. Manşetle birlikte uzayan sitoplâzma gelişme flagelluma ulaştığında, mikrotübüler yapı kaybolur ve bu noktada sperm kuyruğunun orta parçasını esas parçasından ayıran anulus meydana gelir. Sperm kuyruğunun diğer yapıları olan yoğun dış fiberler ve fibröz kılıf oluşumu tamamlanır.

Olgunlaştırma evresi

Olgunlaştırma evresinde gereksiz olan sitoplâzma artık cisim olarak hücreden uzaklaştırılır. Kromozomun kondensasyonu ve stabilizasyonu devam eder. Haricen olgun sperm görünümünde olan hücre sinsityal yapıdan kurtarılarak lümene sevk edilir (Sargın ve Arpalı 2011).

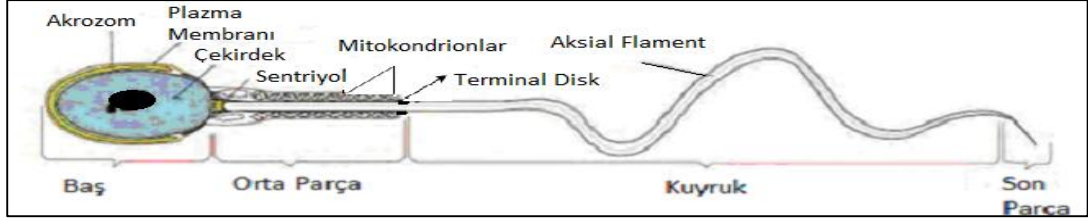


Şekil 1.1. Spermatogenez (Hendry ve ark 1999'dan uyarlanmıştır).

1.3. Spermin Yapısı

Spermatozoa, insandaki en küçük, fakat en çok farklılaşmış hücrelerindedir. İki ana komponenti vardır (Bkz. Şekil1.2). Baş genetik materyali taşıırken, flagellum oosite doğru spermi yönlendiren hareketi sağlar (Francou ve ark 2013).

Seminifer tübüller içindeki germinal epitelden insanda günde 200 milyonu aşabilen sayılarda sperm üretilebilmektedir (Jonge ve Barratt 2006, Schlegel ve ark 2007). Bu sayı türler arasında oldukça farklılık gösterebilmektedir. Ovumla kıyaslandığında çok küçük bir hücre olan sperm 60-65 µm uzunluğunda, dar sitoplazmalı ve hareket kabiliyeti yüksek özel bir hücredir (Gartner ve Hiatt 2006).



Şekil 1.2. Olgun spermin anatomik yapısı (Mariana Ruiz Villarreal çiziminden uyarlanmıştır. (<http://www.urology-textbook.com/testis-histology.html>)

1.3.1 Baş

Spermin baş bölümü akrozomal ve post akrozomal olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Akrozomal kısımda kendi içinde anterior akrozom ve posterior akrozom segment olmak üzere iki kompartmana ayrılmıştır (Gartner ve Hiat 2006, Toshimori 2009). Spermin baş bölgesinde yer alan nükleus, sitoplazmanın büyük bölümünü işgal eder. İçermiş olduğu genetik materyal, Deoksiribonükleik asit (DNA), yoğun bir biçimde katlanmış bir halde bulunmaktadır. Spermatogenez süreci içerisinde genetik materyal proteini olan histonlar, pozitif yüklü protaminlerle yer değiştirmiştir. Spermiler haploid kromozom içeren hücrelerdir.

Erişkin spermde, spermin oosit ile birleşmesi için gereken likit olayları düzenleyen enzimatik etkinliğe sahip birçok proteini içeren akrozom adı verilen plazma membranı ile nükleus zarı arasında yerleşmiş dar bir kesecik bulunmaktadır. Nükleus zarı, hücre zarı ve akrozomal zarlar arasında yer alan sitoplazmik tabakalarda fonksiyonel veya yapısal özelliği bulunan birçok molekül yerleşmiştir. Bu sitoplazma tabakaları subakrozomal, periakrozomal ve postakrozomal tabakalar olarak sıralanabilir. Akrozom ile nükleus zarı arasında kalan bölge subakrozomal bölge olarak isimlendirilir. Bu bölgenin apikal kısmında kalan, yapısal destek özelliği veren dış yüzü perforatorium olarak da adlandırılır. Perforatoriumu doldurulan disülfid bağı ihtiva eden yapısal proteinler, perinükleer teka maddesi veya perinükleer matriks olarak isimlendirilirler (Gartner ve Hiat 2006, Toshimori 2009).

1.3.2. Kuyruk

Sperm kuyruğu spermin hareketini sağlayan bölümdür. En iç kısımda yer alan aksonem tüm kuyruk boyunca uzanım gösterir (Jonge ve Barratt 2006, Toshimori 2009).

Merkezde yerleşmiş bir çift tübül ve onun etrafında bulunan 9 çift mikrotübül yapının esasını oluşturur. Periferdeki tübül çiftlerinin hemen lateralinde kuyruğa sağlamlık ve elastikiyet veren 9 adet yoğun dış fibril bulunmaktadır.

Sperm kuyruğu dört bölümde incelenebilir.

1. Boyun kısmı: Spermin baş kısmını kuyruk kısmına bağlayan alandır. Bu bölümde nükleer zarf fazlalığı, birkaç adet mitokondri ve bağlantı parçası bulunmaktadır. Boyun kısmı baş kısmından bazal plakla ayrılmaktadır.

2. Orta kısım: Boyun kısmından sonra gelen kuyruk segmenti, orta bölüm olarak adlandırılır.

Bu bölümde, mitokondrial kılıf içine yerleşmiş vaziyette bulunan 100 civarında mitokondri helikal bir şekilde aksonemin dışına yerleşmiştir.

3. Esas kısım: Orta kısım, esas kısım adı verilen bölümden anulus olarak adlandırılan yapı ile ayrılır. Esas kısım sperm kuyruğunun en uzun bölümüdür ve fibröz bir kılıfla çevrilidir.

4. Son kısım: Kuyruğun en distal kısmında yer alan plasmalemma ile çevrili aksonem veya tübüler yapılardan ibarettir (Gupta 2005).

1.4. Semen

Ejakulasyon ile dışarı atılan 2-6 ml miktarındaki sıvıdır. Bu sıvı, seminifer tübüllerin, genital boşaltma yolları epitel hücrelerinin salgılarından ve spermden oluşur. Yapısında prostaglandinler, epitel döküntüler, bağ dokusu hücreleri, prostat taşları, lipidler, proteinler ve pigment granülleri bulunur. Ejakulatın %10'undan azını spermler, diğer kısmını da seminal plazma oluşturur. Beyazımsı renkte ve opaktır. Kendine has orta derecede keskin kokusu vardır.

Ereksiyon esnasında Cowper ve Littre bezlerinin salgılarıyla üretra kayganlaşır. Ejakulasyon başlangıcında asit fosfataz ve sitrik asitten zengin prostat salgısı salgılır. Bunun ardından duktus deferens ve duktus epididimis kaslarının kasılmasıyla spermler atılır. Son olarak früktoz ve prostaglandince zengin yoğun kıvamlı seminal vezikül salgısı ejakulata katılır (Şeftalioğlu 1991).

1.4.1. Semen Örneğinin Değerlendirilmesi

Semen örneğinin en az 2 günlük (2-7 gün) bir cinsel perhiz sonrası alınması gerekmektedir. Standardizasyonu sağlamak için 3-4günlük cinsel perhiz süresi uygun olacaktır. Bu perhiz süresinin kısalığı semen hacmi ve yoğunluğunun azalmasına, uzunluğu ise hacminin, yoğunluğunun, ölü, immotil ve morfolojik olarak anormal sperm oranlarının artmasına neden olacaktır. İdeal olanı semenin mastürbasyon ile, önceden spermisit toksisitesinin olmadığı belirlenmiş, steril ve kuru, geniş ağızlı, cam veya plastik bir kaba toplanmasıdır. Bununla birlikte spermisidal ajanlar içermeyen özel olarak üretilmiş silastik kondomların (lateks kondomlar sperm canlılığını ve motilitesini etkiler) yardımı ile ilişki sırasında da toplama yapılabilir. İlişki sırasında geri çekme yöntemi ile toplama, spermın ilk bölümünün kaybına neden olabileceğinden önerilmemektedir. Ejakülasyonun tamamının toplanmasının önemi unutulmamalıdır; çünkü çoğunluğu prostat sıvısından oluşan ilk kısmen yüksek sperm konsantrasyonunu taşır, son kısım ise özellikle veziküler sıvıdır ve semenin büyük bir bölümünü oluşturur. Bu nedenle, semen alınırken kaçırılmamasına ve dökülmemesine dikkat etmek gerekmektedir. Semen toplanması sırasında mikrop, tükürük ve kayganlaştırıcı kontaminasyonlarından kaçınmak gerekir. Toplama öncesinde eller ve genital organlar sabunla iyice yıkanıp su ile tamamen durulanmalıdır (Speroff ve Fritz 2010).

Mastürbasyon sırasında sabun ve kayganlaştırıcı maddeler kullanılmamalıdır. Semen örneğinin; izole edilmiş, özel ve laboratuvarın içinde veya yakınındaki bir ortamda toplanması en uygun yaklaşım olacaktır. Emosyonel stres ve gerilimin semen parametrelerinden özellikle hacim, sayı ve motilite üzerinde olumsuz etkileri olabileceği unutulmamalıdır (Kayıkçı ve ark 2002).

Bu yüzden hastanın kendisini rahat ve huzurlu hissedeceği bir ortamda toplama işleminin yapılmasının önemi akılda tutulmalıdır. Eğer toplama işleminin evde yapılması daha uygun olacaksa semen örneğinin oda veya vücut ısısında muhafaza edilerek hızlı bir şekilde transferi sağlanmalıdır. Toplama yönteminden bağımsız olarak alınan semen örneğinin birkaç saat içinde değerlendirilmesi gerekmektedir (Kayıkçı ve ark 2002).

Semen analizinden sağlıklı sonuç alabilmek için cinsel perhiz süresinin en az iki en fazla beş gün olması gerekmektedir. Bu sürenin kısılması sayı ve hacmi, uzaması ise hareketliliği olumsuz etkileyecektir. Örnek mastürbasyonla ya da spermid içermeyen özel prezervatifler kullanılarak spontan koitus sonrasında toplanabilir. Ancak günümüzde mastürbasyon ile örnek alınması tercih edilmektedir (Gökçe 2011).

1.4.2. Semen Makroskopik Analizi

Taze bir ejakulat visköz, beyaz veya gri-beyaz, opak bir yapıdadır. Kendine özgü bir kokusu vardır. Genellikle 10-20 dakika içinde eriyerek bulanık bir hal alır.

Renk ve koku

Normal semenin görünümü homojen, mat beyaz ve gri-opaktır. Sperm konsantrasyonu düştükçe daha az opak görülür. Cinsel perhiz süresinin uzamasına bağlı olarak renk sarımsı bir hal alabilir. Semen içinde eritrosit varlığında renk kırmızı-kahverengi olacaktır. Kendine özgü kokusunun prostat salgılarından kaynaklanan sperm oksidasyonu sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Kayıkçı ve ark 2002).

Likefaksiyon süresi

Semen ejakülasyon sırasında semenogelin I içeren seminal vezikül salgısı ile koagüle olur ve oda sıcaklığında yaklaşık 20 dakika içinde likefiye olacaktır. Likefaksiyon (erime, sıvılaşma) prostat tarafından salınan proteolitik enzimler (fibronilizin, fibrinokinaz, aminopeptidaz) aracılığı ile meydana gelir. Likefaksiyonun değerlendirilmesinde, ejakulat inkübatöre alınarak 37°C'de muhafaza edilir ve likefiye olması beklenir. Likefaksiyon süresinin 60 dakikayı geçmesi veya olmaması patolojik olup, prostatik enzim eksikliğini veya prostat fonksiyonunun yetersiz olduğunu gösterir (Örmen ve Önvural 2003).

Viskozite

Normal semen visköz kıvamdadır. Viskozitenin artmış olması vezikülo seminalisin hipofonksiyonundan kaynaklanabilir. Yüksek viskozite sperm motilitesini ve konsantrasyonunu etkileyebilir. Viskozitenin artması intrauterin

inseminasyon (IUI) ve IVF başarısını da düşürebilir. Değerlendirmede örnek pipet içerisine çekilir ve yer çekiminin etkisi ile damla damla pipeti terk ettiği gözlenir. Anormal viskozitede örnek pipeti terk ederken iplik gibi uzar. Uzama 2cm'den fazla ise patolojik olarak değerlendirilir. Uzamanın değerlendirilmesi cam çubuk kullanılarak da yapılabilir (Günalp ve ark 2002).

Ejakulat hacmi ve pH

Normal bir ejakulat hacminin 1.5-5.0 ml arasında olması beklenir (Speroff ve Fritz 2010). Hacmin belirlenmesinde örneğin dereceli geniş ağızlı kaba alınması ve gravimetrik yöntemin uygulanması önerilmektedir. Hacmin aspire edilerek ölçümü tavsiye edilmemektedir (0.3-0.9 ml kadar eksik ölçüm). Semen normal pH'sı >7.2'dir. Likefaksiyon sonrası tercihen 30 dakika, en fazla dahir saat içerisinde pH değerlendirmesi yapılmalıdır. Semen içeriğinde bulunan vezikülo seminalis sekresyonları alkali, prostat sekresyonları asidik özelliktedir. Her iki sekresyonun belirli bir dengede olması gerekir. Akut enfeksiyonlarda (prostat, vezikülo seminalis, epididim kaynaklı enfeksiyonlar) semen pH'sının 8.0'a kadar çıkabileceği unutulmamalıdır. Ejakulat hacminin az veya hiç olmaması; başarısız boşalmayı, kısa cinsel perhizi, toplama kusurlarını, vasdeferenslerin konjenital olarak yokluğunu, ejakulatuvar kanal tıkanıklığını, hipogonadizmi veya retrogradejakulasyonu akla getirmelidir. Diğer semen parametrelerinin değerlendirilmesi nedenin ayırımında bize yardımcı olacaktır. Semen hacminin büyük kısmı vas deferens ile aynı embriyolojik kökenden gelişen vezikülo seminalis tarafından oluşturulur. Veziküloseminalisin sekresyonu alkalidir ve früktoz içerir. Konjenital bilateral vas deferensi olmayan erkeklerin çoğunda vezikülo seminalis yoktur veya hipoplastiktir. Bu durumda da semen asidik (pH<7.2), düşük hacimlive fruktozu az veya hiç içermeyen nitelikte olacaktır (Weiske ve ark 2000).

Miktar

Normalde 2-6 ml arasındadır, spermden zengin ejakulatın ilk kısmının kaybedilmesi volüm azlığına neden olduğu gibi özellikle sayı ve motilitenin farklı çıkmasına yol açar. Volüm azlığı seminal kese agenezisi veya ejakulatuvar kanallardaki obstrüksiyonlardan dolayı oluşabilir. Nitekim azospermi vakalarının %10'nunda bilateral vas agenezisi bildirilmektedir (Wagenknecht ve ark 1983).

1.4.3. Semeninin Mikroskopik Analizi

Mikroskopik incelemede sperm sayısı, hareket özellikleri, morfolojik yapı, aglütinasyon olup olmadığı, lökosit ve yuvarlak hücrelerin boyanması ve sayımı, gerekli durumlarda vitalite araştırmaları yapılır (Kayıkçı ve ark 2002). Ayrıca 2010 yılında WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından belirlenen kriterler doğrultusunda hareketsiz spermlerin; hareketli veya hareketsiz spermlere, mukus ipliklerine, sperm dışı hücrelere ve hücresel atıklara bağlanması değerlendirilerek sperm agregasyonu belirlenir (WHO 2010).

Konsantrasyon

Sperm sayısı anlamına da gelen seminal plazmadaki sperm konsantrasyonunun ölçümünde önemli olan noktalar; spermin tam hareketsizliği, örneği seyreltmek için uygun çözeltinin secimi ve örneğin homojen dağılımının sağlanmasıdır. Semeninin seyreltilmesi için kullanılan çözelti sodyum bikarbonat (NaHCO₃) ve formalin içermelidir. Renklendirici olarak tripan mavisi kullanılabilir (WHO 1999).

Sperm konsantrasyonunun ölçümü Makler sayım kamarası veya Neubauer hemositometrik metodu ile yapılır. En iyi metodun Neubauer kamarası olduğu kabul edilmektedir. Neubauer kamarası 25 büyük alan içerir.

Motilite

Motilite kuyruk hareketi gösteren sperm yüzdesidir. İdeal olarak ejakulasyondan sonraki ilk 1-2 saat içerisinde ve oda sıcaklığında (18-24⁰C) bakılabilir. 17 C⁰'nin altındaki sıcaklıklar sperm motilitesini olumsuz etkileyeceği için oda sıcaklığı sabit tutulmalıdır. 200 spermatozoayı değerlendirmek için en az beş mikroskopik alanda sistemik değerlendirme yapılır (WHO 1999).

Genelde faz kontrast mikroskobu alanında görülen spermlerin motilitesi WHO kriterlerine göre hareketleri;

(a) Hızlı ileri hareketli,

(b) Yavaş ileri hareketli,

(c) Yerinde hareketli ve

(d) Hareketsiz spermler

Şeklinde sınıflandırılır. Genel olarak sperm hızlı ileri hareketli olarak değerlendirilmesi için saniyede 20 µm'lik yol kat etmelidir ki bu da sperm 1 saniyede yarı uzunluğu kadar mesafe alması olarak düşünülmelidir (WHO 1999).

Aglütinasyon

Spesifik aglutinasyon ve non-spesifik aglutinasyon olarak ikiye ayrılır. Spesifik aglutinasyon sperm antikorlarının varlığına bağlı olabilir. Fazla sayıda baş-baş, kuyruk-kuyruğa motil dimerler görülmesi antisperm antikorlarının bulunduğu işaret eder. Aglutinasyon derecelendirilmesi subjektif bir değerlendirmedir (Helstrom ve ark 1987). Aglutinasyon tipleri de baş-baş, kuyruk-kuyruğa, baş-kuyruğa şeklinde olabilir.

1.4.4. Sperm Hücre İskeleti ve Organelleri

Aktin

Liu ve ark. normal fertil kişilerde motil sperm ortalama: %14 ZP'ya bağlanırken, normozoospermik infertil erkeklerde bu oranın %4 civarında olduğunu rapor etmişlerdir. Kapasitasyon şartlarına göre; sperm-aktin birlikteliği var olduğundan, bu amaçla sperm başına aktin bağlanma oranına yönelik çalışmalarda fertilizasyonun doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır (Liu ve ark 2005).

Kapasitasyon ve AR mekanizmasının bir elemanı olan aktin hücre iskeleti ve hücre mimarisindeki muhtemel değişiklikleri araştırmaya açıktır.

Spermiyogenik hücrelerde aktin filamentleri esasen nukleus ile spermatidin gelişen akrozomu arasında subakrozomal boşluktur. Matür spermatozoada aktin filamentlerinin lokalizasyonu ve yapısı net değildir. Çoğunda aktin birçok memeli türünde filamentöz f-aktin olarak tanımlanmakla birlikte daha çok monomerik formdadır. Aktin içeren sperm bölgeleri akrozomal boşluk, ekvatoryal ve post akrozomal bölgeler kadar kuyruktur. Çoğu türde flagellar hareketteki roller tam

bilinmese de aktin kuyrukta da bulunmuştur. Birçok çalışmada, aktin fertilizasyon süreci için önemli olan sperm başında bulunur.

Ayrıca spermatozoada kapasitasyon ve AR sonrası hücre iskeleti proteinlerinin lokalizasyonlarındaki değişiklikler tam bilinmemektedir. İn vitro kapasitasyonun aktin polimerizasyonunda artışa ve aktin epitoplarının yeniden dağılımına yol açtığı gösterilmiştir (Francou ve ark 2013).

Brener ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada: koç, boğa, fare veya insan spermelerinde akrozom reaksiyonu (AR), follikül penetrasyonu sonrası zonaya bağlanma ve kapasitasyonunda aktin polimerizasyonundaki zamana bağlı rolünü değerlendirmişlerdir. F Aktinin hücre iskeleti içeriğindeki değişiklikleri, FITC veya TRITC-Phalloidin kullanarak florometrik olarak ölçülmüştür. Kapasitasyona sahip hücrelerde akrozom reaksiyonu f-aktin yıkımı ile başlar. Bu yüzden; BSA, metil-B-siklodekstrin, Ca veya bikarbonat gibi kapasitasyon için gerekli maddelerin olmadığı vasatlarla inkubasyon sonrası aktin polimerizasyonunu olduğu kadar kapasitasyonu da engellediği, F-aktin yapımının sitokalazin D ile inhibe edilmesi ile kapasitasyonun bloke olduğu ve IVF döllenme oranlarının azaldığı tespit edilmiştir. Buna göre: sperm kapasitasyonunda aktin polimerizasyonunun önemli bir düzenleyici yolak olduğunu, akrozom reaksiyonundan önce F-aktin yıkımının ortaya çıktığını rapor etmişlerdir.

Memelilerde sperm-oosit etkileşimi ve karşılıklı aktivasyonu glikoprotein kaplama ZP aracılığı ile olur. Spermatozoa ovum kumulus ooforusu'nu penetre ettikten sonra, intakt plazma zarı ile ZP'a bağlanır. ZP'a bağlanma, sperm anterior baş bölgesi üzerinde lokalize olan spesifik reseptörler aracılığı ile olur. ZP bağlanması spermi, dış akrozomal membranın üstteki plazma zarı ile füzyonu şeklinde bir ekzositik olay ile AR'a sokar. Bu multibl füzyon akrozomal içeriğin salınması ve fertilizasyonun ilerlemesi için esansiyel olan yeni membran alanlarının maruziyeti ile sonuçlanır.

AR kapasitasyon olarak bilinen matürasyon sürecini tamamlamış bir sperm varlığında ZP ile bağlanacaktır. Kapasitasyon, invivo sperm dışı genital sistemi ile karşılaştığında veya invitro belli medyumlarla inkubasyondan sonra olur (Brener ve ark 2002).

Dorval ve ark'na göre de aktin filamanları akrozomal boşluk, ekvatorial ve postakrozomal bölgede yer alır. Zona Pelusida (ZP)'da aktin polimerizasyonu ile indüklenen Akrozom Reaksiyonu (AR) gerçekleşir. Sperm protein tirozin fosforilasyonu HCO₃ adenil siklazı uyararak cAMP düzeyini artırır, kadın genital yolundaki EGF, H₂O₂ ve sodyum vanadate ile gerçekleşir ve aktin polimerizasyonunu sağlayarak AR indüksiyonu yapar (Brenner ve ark 2002). Ca⁺²-ATPaz inhibitörü olan Thapsigargin akrozomal bölgede bağlanarak intraselüler Ca⁺² artışı sağlar ve fosfotirozin içeriğini artırarak tirozin fosforilasyonu ile akrozomal ekzositozu sağlar (Dorval ve ark 2003).

Dvorakova ve arkadaşlarının çalışmasında, akrozom reaksiyonu öncesi ve sonrasında akrozom şekil ve boyutu bakımından farklılık gösteren spermatozoada sperm başındaki hücre iskeleti elemanlarının dağılımı karşılaştırılmıştır. İnsan ve rodentlere ait spermatozoa, AR öncesi ve sonrasında invitro olarak tespit edilmiş aktin, spektrin ve alfa tübülün lokalizasyonları immünohistokimyasal incelenmiştir. Özellikle apikal akrozomda ve ekvatorial segmentte ve postakrozomal bölgede değişiklikler olduğu sperm başındaki bu değişiklik paternlerinin tüm türlerde alt kompartımanlardaki farklılıklarla beraber benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre; sperm başı kritik hücre iskeletinin AR sürecinde önemli değişiklikler gösterdiği ve bu proteinlerin fertilizasyon öncesi süreçte yer alan oldukça yüksek dinamik yapılar olduğunu desteklediğini rapor etmişlerdir (Dvorakova ve ark2005).

Tübülün

Mikrotübüller hücre bölünmesi, hücre içi taşıma (intraselüler transport), hücre polaritesinin sağlanması ve flagella ve silier hareket gibi birçok hücresel işlevde rol oynar. Tübülün heterojenitesi ve MAP (mikrotübül asosiye-ilişkili protein) bu farklı mikrotübül işlevlerinden sorumludur. Birçok çalışma yapı ve işlevce farklı alfa ve beta tübülün subunitlerinin mikrotübülü etkileyebileceğini göstermiştir.

Sperm aksonem mikrotübülü, herbiri yaklaşık 50 kD'luk bir moleküler kitleye sahip heterodimerik α ve β tübülün ile polimerize olmuş lineer lif filamentlerine sahiptir.

Flagellada 9+2 düzeninde ve çiftler halinde mikrotübüller bulunmaktadır ve bunlardan gelen hareketin oluşumunu sağlayan temel yapı aksonemdir. Bu yapıda,

dışta 9 adet tübülün dimerleri bulunmaktadır ve A-B alt lifleri sayesinde harekette rol oynar (Bkz. Şekil 1.3). Dıştaki 9 çiftin her biri radyal uzantılarla santral mikrotübüle bağlanır. Santral mikrotübül iki adet A alt lifinden oluşmaktadır ve birbirine çapraz köprülerle bağlanmaktadır. Santral mikrotübül çiftinden aynı zamanda iç kılıf uzantıları çıkmaktadır (Mortimer 1997).

Spermatogenezde mikrotübüller birçok dönemde eksprese edilirler. Mikrotübül filamentleri pakiten safhasında belirgin bir sentrozom yapmaksızın dağınık ağ halindedir. Step 7 spermatidlerinde sperm nükleusu etrafında yoğunlaşır. 8-15 spermatid basamağında: manşet oluşumu şeklinde belirginleşir. Mikrotübül ve aktin içeren geçici bir yapıdır ve nükleer ve baş şekillenmesi ve kuyruk oluşumu için hayatidir. Spermogenez ilerledikçe, alfa ve beta tübülünler sperm kuyruğunu yapmak üzere sentrozomdan uzar ve flagella aksoneminin diğer elemanları ile 9+2 mimarisinde sıkı bir düzenlemeye katılır (Kuo ve ark 2013).

Sınırlı sayıda genlere rağmen, tübülün posttranslasyonel modifikasyonlarla oldukça çeşitlenir ve motilitenin düzenlenimi ile ilgili olduğundan sperm işlevselliğinde önemli bir role sahiptir. Astenozospermik örneklerde tübülün ekspresyonu azalır (Francou ve ark 2013).

İnfertil erkeklerin %30'unda idiyopatik oligoasteno-teratozoospermi söz konusudur. Erkek infertilitesinde motilite merkezi bir role sahiptir dolayısı ile erkek infertilitesini değerlendirmede yüksek oranda zayıf motil ve imotil spermlerin fertilizasyonu yapamayacağı akılda tutulmalıdır (Moretti ve ark 2007).

Erkek infertilitesinde hemen hemen %50'sinde de zayıf sperm motilitesi söz konusudur. Bu kadar yaygın olmakla birlikte sperm hareketini düzenleyen moleküler mekanizmalar hala anlaşılammıştır.

Gen knock-out fare modeli, tek gen defekti ve astenospermide regüle olan farklı proteinlerin proteomiks çalışmaları sperm motilitesinde önemli olduğu sanılan proteinlerin bir listesini ortaya koymuştur. Ancak sperm motilitesinin yönetimi hala net değildir. Proteomiks çalışması ile hücre iskeleti düzeyinde, sperm flagellar motilitesinin aksonemal mikrotübüler proteinler ile dynein motor prteinleri arasındaki özgün ilişkilerin bir sonucu olduğu düşünülmektedir.

Diğer proteinler ile ilişki halindeki flagellar mikrotübüller sperm hareketini kararlı ve organize bir olay yapar. Tübülün mikrotübüllerin ana komponentidir ve 100 kDa moleküler ağırlıklı α ve β heterodimerlerine sahiptir. α ve β tübülünlerin her ikisinde poliglutamilasyon, poliglikasyon, tirozilasyon/detrozilasyon ve asetilasyon/deasetilasyon gibi çeşitli post translasyonel modifikasyonlara uğrar. Asetile/deasetile α tübülünün ayrıntılı işlevi bilinmemektedir.

Astenozoospermide α tübülün isoformlarından TUBA3C ve TUBA8 azalırken TUBA4A artmaktadır. Astenozoospermide flagellum boyunca asetile α tübülün azalmakta iken, normal spermde asetile ve olan ve olmayan tübülün düzenli olarak ifade olur. Astenozoospermide α tübülünde gözlenen bu azalma, spermatozoada doğal bir anomaliye neden olur ki bu da immotil spermatozoalardaki azalmış asetilasyonla ilişkili hareket kaybına neden olabilir (Peknicova ve ark 2007).

Ejakulasyonda sperm yumurtayı hemen dölleme kabiliyeti yoktu. Fakat dışı genital yolunda 'invivo kapasitasyon' olarak bilinen bu özelliği kazanır. Bu süreç invitro spesifik vasatlarla kültürde de uyarılabilir. Kapasitasyon biyokimyasal ve moleküler değişiklikler hiperaktive sperm motilitesini sağlar. Kapasite olmuş sperm, oosite ulaştığında, zonaya bağlanır ve zona reaksiyonunu tetikler. Hidrolitik enzimlerin ekzositozu, spermin zonayı penetre etmesini ve membranın oolemma ile birleşmesini sağlar.

Kapasitasyon ve AR fertilizasyon için hayati olmakla birlikte; bu olaylar esnasındaki değişiklikler tam olarak anlaşılammıştır. Mesela, spermatozoada kapasitasyon ve AR sonrası hücre iskeleti proteinlerinin lokalizasyonlarındaki değişiklikler tam bilinmemektedir. İn vitro kapasitasyonun aktin polimerizasyonunda artışa ve aktin epitoplalarının yeniden dağılımına yol açtığı gösterilmiştir.

Bir çalışmada: α tübülünün flagellum boyunca uniform dağılmadığını immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Bu yüzden bazı spermlerin flagellumunun küçük bir yüzdesi, α tübülün ile işaretlenirken diğerlerinde flagellumun çoğunda bu protein lokalize olur. α tübülün kapasitasyon ve AR sürecindeki yapısal değişikliklerle doğrudan ilişkilidir (Francou ve ark 2013).

Beta tübülün ekspresyonu spermin orta parça ve kuyruğunda gözlenebilir. İrradiye spermlerde tübülün işaretlenmesi azalır ki, bu da doğrudan sperm motilitesi

ile ilişkilidir. Motilite sperm flagellum hareketine bunun işlevi de aksonemdeki hassas mikrotübül organizasyonu bağlıdır (Yann ve ark 2014).

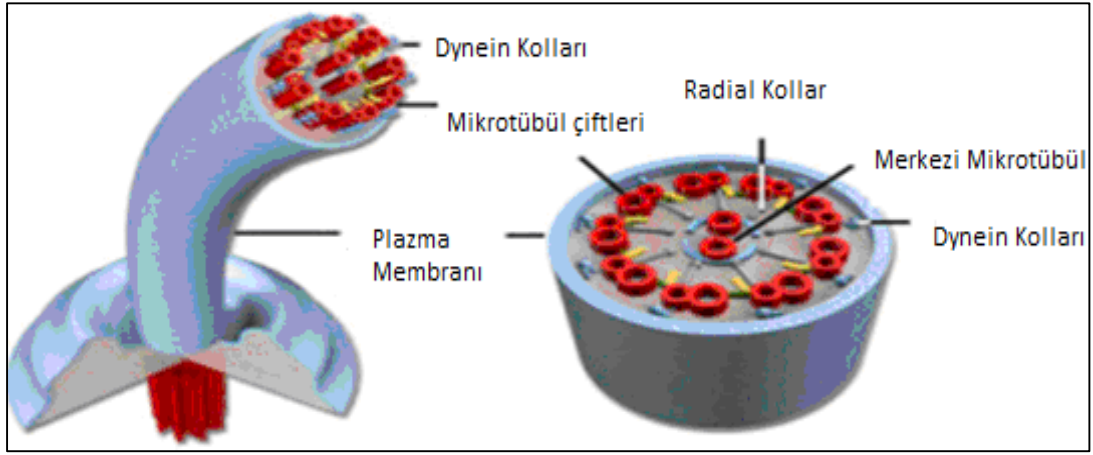
Flagellar sperm yapısına dair çok sayıda çalışmada: aksonemal paterninve periaxonemal yapıların doğru düzenlenimi normal motilitenin sağlanmasında esaslıdır. Son yıllarda dikkat aksonemi çevreleyen hücre iskeleti yapısı olan fibröz kılıf ve flagellumun esas parçası bölgesinde belirgin olan dış yoğun fibrillere yoğunlaşmıştır. Spermiyogenik süreç boyunca kuyruğun distalinden proksimaline uzanan semisirküler fitil tarzında yakın yerleşimli dizilmiş 2 longitudinal kolondan oluşur. Genellikle, fibröz kılıfın sperm flagellumuna mekanik bir destek rolü oynadığı kabul edilir. Fibröz kılıf, flagellar bükülmeyi ayarlar flagellar ritmin şeklini belirler.

Çalışmalar, insan fibröz kılıfında: A-kinaz ağ/ankoring proteininin (AKAP-3 ve 4) en yoğun protein olduğu ve flagellar proteinlerin siklik-AMP (cAMP) bağımlı fosforilasyonunun sperm motilitesinin başlaması ve devamı ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. İkincil mesajcı cAMP spermtaozoada cAMP bağımlı kinaz (PKA) üzerinde hücre içi etkilerini ortaya koyar. PKA'nın hücre içi organizasyonu da AKAP'ları ile ilişkisi ile kontrol edilir. Aksonem ve fibröz kılıfın yapısal karakteristiklerini incelemede geçirimli elektron mikroskopi (TEM) önemlidir. Özetle AKAP4'ün sperm motilitesindeki rolü net olmamakla birlikte; AKAP4 işaretlenmesinin zayıf olması veya olmaması ile sperm motilitesinin zayıf veya olmaması ilişkilidir (Moretti ve ark 2007).

Septin polimerize GTP bağlayan hücre iskeleti proteinleri ailesindedir. Septinler diğer hücre iskeleti elemanları (aktin, myozin II, tübülün) ile etkileşerek, Hücre iskeleti remodelingi, hücre polaritesi, mitoz ve vezikül trafiğinde rol alır. Septin 12 mutant alelli farelerin infertil olduğu gösterilmiştir. Bu farelerin vas deferens'lerinden alınan spermatozoalar anormal morfolojili, düşük sperm sayılı ve immotil spermlere sahiptir.

Dış yoğun iplikçikler 'Outer Dence Fibers' (ODF) flagellumun %60'ını oluşturur. ODF santralde medulla ve ince korteksten oluşur. ODF ve fibröz kılıf yoğun disülfid bağları nedeniyle iyonik deterjanlarla çözülmeye dirençlidir. Bu şekilde izolasyonu ve biyokimyasal analizi daha kolaydır. Çinko, ODF proteinlerinin

yapısında bulunur ve disülfid bağlarının düzenlenmesinde görev alır (Hargreave 1993).



Şekil 1.3. Sperm kuyruğunda silia ve flagella yapısı (Michael W.Davidson 2008'den değiştirilerek alınmıştır).

İyonize radyasyon spermatogenezini bozar ve germ hücrelerinde mutasyonlara sebep olur. Radyoterapi kanser tedavisinde etkili iken, hastalar sıklıkla azospermi ve infertiliteden şikâyet eder. Araştırmalar epididimal sperme kısa ve uzun süreli İR etkisi ve radyasyon tedavisi sonrası bu olumsuz etkisi üzerine yoğunlaşmıştır.

Radyasyon spermatogonya ve spermatozoidlerin kromozomal bozulmayı indükler ve bu spermatozoata aktarılabilir bazen kalıcı da olabilen astenospermi, hipospermi ve teratospermiye neden olur. Bu bozulmaların moleküler mekanizmaları, kaudal spermaların proteinleri proteomiks ile araştırılmıştır. Kontrol ve iradiye edilen grupta 6 farklı protein tespit edilmiş olup bu proteinler iradiye grupta azalmıştır. Bunlar: skint 6 isoform b, ısı şok proteini 70-2, fosfolipaz-C alfa, testise özgü gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDHS), tübülün beta 4b, Gpx4'dür. İnsan ve farede, tübülün isotoplarının kodlanmasıyla ilgili 7 alfa ve 6 beta geni vardır. Beta tübülün ifadesinin azalması flagellar aksonemin relatif kayma kapasitesini sınırlar. ROS'da artış sperm glikolizi inhibe ederek flagellar aksonem hareketi için enerjiyi sağlayacak ATP miktarında yetersizliğe sebep olur ki, bu da sperm motilitesinde azalmaya sebep olur. GAPDHS ifadesinde azalma da sperm motilitesini azaltır (Yan li ve Zhang 2013).

İyon radyasyonuna bağlı infertiliteğin sebebi, iyonize radyasyonun sperm yüzme davranışını bozmasına bağlı düşük sperm motilitesi ile ilişkili olabilir. İyonize

radasyonun insanda total sperm sayısını ve motil sperm sayısını azalttığı gösterilmiştir. Erkek infertilitesi, esasen düşük sperm motilitesinin bir sonucudur. Bununla birlikte; radyasyonla uyarılan spermin patolojik durumu ile túbülin değişiklikleri arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Túbülinin insan sperm patolojisinde sperm kuyruğunun yapısal durumunu etkilediği bildirilmiştir. Pubertedeki farelerde ağır iyonize radyasyondan (HIR) sonra düşük sperm motilitesi ile β túbülin ekspresyonunda azalma arasında ilişki olduğunu desteklemektedir. Bu türden bir ilişki üreme sağlığına HIR etkisini değerlendirmede bir ölçek olarak kullanılabilir. Bu çalışmanın sonuçlarının gelecekteki uzay çevresel radyasyondan korunma ve HIR kaser tedavisine katkısı olabileceği düşünölmektedir.

Bu çalışmada radyasyona maruz bırakılan infant (0-5 hafta) farelerden 5,5 hafta sonra epididim kaudasından alınan sperm motiliteleri hesaplanmış ve viyabiliteleri de akridin oranđ ve PI (propidyum iyodür) ile nukleusları boyanarak değerlendirilmiş. Ayrıca anti-túbülin antikoru ile boyanarak konfokal mikroskopta incelenmiştir. Pubertede (5-7 hafta) vücut ölçüleri, organ gelişimi ve sperm motilitesi artışı diğer dönemlere göre daha fazladır. Spermatogenez 35. gün başlar ve 5,5 haftada artmaya başlar. Sperm viyabilitesi ve motilitesi azalmıştır. Bartoov ve ark (1999) radyasyona maruz kalan işçilerde sperm motilitesinde düşme rapor etmişlerdir.

Ejakulat önemli bir yüzdede ölü spermatozoa gösterir. Genellikle bu ölü hücreler, hücre nekrozisin bir sonucu olarak değerlendirilir ve infertil bireylerden alınan sperm örneklerinde önemli bir yüzde gözlenen yağın bir patolojidir. Aynı hastadan farklı ejakulatlarında %100 kalıcı nekrozoosperminin olması nadirdir.

Sperm viyabilitesini değerlendirmede supravital eosin boyası kullanılır ancak spermdeki nekrozisin ultrastrüktürel özelliklerinin belirlenmesi gerekir. Sperm nekrozisi, epididimal pasaj esnasında olduğu düşünölmektedir. Veya konakta bir yörede depolanması, mortalite artışı ve ejakulat sperminin zayıf motilitesinden sorumlu olabilir. 1988'de daha önce erkek infertilitesinin tanımlanmamış türüne epididimal nekrospermi terimini önermiştir. Son çalışmalar endokrin sistem ve özellikle TRH degrade enzimleri ve enkefalin degrade enzimleri nekrospermi ile ilişkili olabilir.

%100 nekrozoospermili ve normal karyotipli bir infertil erkekten alınan spermde ultrastrüktürel, fonksiyonel ve kromozomal analizleri yapıldı. Sperm ölümü ve motilite yokluğunu konfirme etmek için eosin boyaması ve sperm kuyruğundaki iki önemli protein immunohistokimyasal olarak lokalize edildi. Tübülün esasen aksonemal yapıda bulunur, AKAP4 fibröz kılıfın bir majör komponentidir.

Nekrozoospermide mitokondriler genellikle şişmiş ve periaksonemal bir sarmalda yer almaz. Sperm hücrelerinin yaklaşık %60'ı kıvrık kuyruğa sahiptir. %95 vakada spermler 9+2 aksonemal paterne rağmen, aksesuar lifler ve fibröz kılıf yer değiştirmiştir. Total motilite kaybında nekrozise bağlı şiddetli kuyruk hasarı AKAP4 ve tübülün histokimyası ve TEM ile araştırıldı. Bulgulara göre; infeksiyon ve/veya inflamasyon testiküler düzeyde kromatidlerin ayrılmasına ve/veya karyoskeleton ve sitoskeletona spermiyogenez esnasında kromatin remodelingi ile ilgili olarak negatif etkileri olabilir (Moretti ve ark 2006).

Mitokondri

Mitokondriler pleomorfik organellerdir. Oksidatif fosforilasyon ve lipid oksidasyonu ile enerji üretiminde dolayısı ile de germ hücrelerinin gelişimi ve fertilizasyon sürecindeki kritik metabolik olaylarda kilit role sahiptir. Spermatozoa farklı fiziko-kimyasal durumlarda işlevlerini sürdürerek fertilizasyon sürecini tamamlamak için gereken kimyasal enerjiyi mitokondrilerinde üretir. Bu süreçte en önemli ihtiyaç motilitenin sağlanmasıdır. Astenoazoospermik vakalardaki azalmış motilite ile sperm mitokondriumlarında yapısal ve işlevsel değişiklikler saptanmıştır. Dolayısı ile de erkek fertilitésinin en önemli unsurlarından birini oluşturur (Piomboni ve ark, 2012) .

Sperm motilitesi ile bazı mitokondrial solunumsal zincir enzim aktiviteleri arasında ilişki saptanırken, mitokondrial hacim belirteçlerinden olan sitrat sentaz enzimleri ise bir ilişki saptanamıştır. Bu bulguların idiyopatik astenoazoospermi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Ruiz-Pesini ve ark 1998).

Sağlıklı döner spermlerinde mitokondrial aktivite heterojen bulunmuştur (Paula Sousa ve ark 2011).

Spermatozoada orta kısımda, aksonem etrafında sıkı şekilde yerleşerek ve sarmal yaparak (helikal) ovoid bir band (kılıf) oluşturur.

Spermatozoadaki mitokondri:

1. Hipotonik ortam

2. Yetersiz Ca^{2+} girişi

3. Laktatif oksidatif substrat olarak kullanabilme yeteneği ile diğer hücrelerdeki mitokondrilerden ayrılır.

Motilitenin moleküler düzenlenmesi

Mikrotübül duvarı longitudinal ve lineer olarak yerleşmektedir ve tübüler alt üniteler α ile β adını almaktadır. Her bir tübül komplet A ve inkomplet B mikrotübüllerden oluşmaktadır (Playan ve ark 2006). Aksonem, komşu mikrotübüler çiftlerin B alt lifleri ile çapraz köprüler oluşturur ve ATP hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyle harekete dönüşerek etki eder. Hücre hareketinden sorumlu enzimatik mekanizma iç ve dış kollarda yer almaktadır. Flagella ve silya hareketini sağlayan itici güç kaynağı yani spermatozoonun güç motoru, mikrotübüler çiftlerin kollarında bulunan Mg bağımlı adenzin trifosfatazdır. Kimyasal enerji kinetik enerjiye çevrilir (Mortimer 1997).

Kuyruğun hareketi dynein kollar aracılığı ile iletilir ve bu şekilde aksonemal mikrotübüllerin birbirleri üzerinden kayması sağlanır. Ara parçada, aksonem ve dıştaki yoğun fibriller helikal şekilde organize olmuş mitokondrilerden meydana gelen bir kılıf ile sarılmıştır. Flagellar hareket için ATP'ye ihtiyaç vardır. ATP, fruktoz veya glikozun glikoliz yoluyla laktata yıkılmasıyla ve sitrik asit siklusunda ATP rejenerasyonunun mitokondriyal oksidasyon substratlarının kullanılmasıyla sağlanır. Bu ATP, magnezyum varlığında dynein kollarındaki ATPaz aktivitesi sayesinde hidrolize olur (Sale ve Satir 1977, Liu ve ark 1987, Mosher ve Pratt 1991, Dohle ve ark 2002).

Akrozom

Akrozom spermium nükleusunun ön kısmını çevreleyen bir takke benzerimembrana bağlı veziküldür. İnsan spermiumunda akrozom göreceli olarak küçüktürve 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 iyi tanımlanan, en önemli iki tanesi; ‘hyalüronidaz’ ve ‘proakrozin’ denilen inaktif zimojen formunda bulunan tripsin benzeri proteinaz ‘akrozin’dir (Siegel ve ark 1987). Bu tür zimojenlerin inaktif formları akrozomal matriksteki özgün inhibitörlerin kompleks oluşmasıyla uyarılabilir.

Akrozomal matriksteki diğer enzimler ise; asit fosfataz, fosfolipazlar, N-asetil glikozaminidaz ve kollajenazdır. 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 (Holt 1979, Morales ve ark 2004).

Bu enzimler ‘akrozom reaksiyonu’ denilen temel biregositik bir olayla salınırlar. Spermiyumun belirgin bir özelliği, ekvatoryal bölge denilen akrozomal kılıfın arka sınırında yer alan kararlı bölgenin varlığıdır. Ön akrozomun enzim içeren matriks yapısı bu bölgede mevcut değildir. İnsan spermiyumunda ekvatoryal bölge aynı zamanda vimentin birikimine sahip bir alandır (Virtanen ve ark 1984). Bu özellik hücre iskeleti elemanlarının varlığı ile güçlenen oldukça kararlı bir membran yapısını akla getirir. Akrozomal reaksiyonun ardından ekvatoryal bölge bozulmadan kalır.

Ön akrozom ve ekvatoryal bölge arasındaki sınırdaki dış akrozomal membran hücre membranı ile birleşerek akrozomal şapka kaybının ardından hücre bütünlüğünü korur. Ekvatoryal bölgenin üzerini örten plazma membranı bölgesi sperm-oosit tanınmasının ve füzyonunun gerçekleştiği alandır. Bu nedenle akrozomun ekvatoryal bölgesi bu kritik membran alanında özellikle zona pellusida penetrasyonu sırasında sıkıca stabilize edilmiştir (Curry ve ark 1995).

1.4.5. Hücre İskeleti ve Organellerinin İşaretleyicileri

Aktin işaretleyicileri

Fallotoksinler, Amanita falloides mantarından elde edilen bisiklik peptidlerdir. Suda çözünür, fibriler F-aktine nanomolar konsantrasyonlarda bağlanır. Ancak floresan bağlılar hücreye geçemez. Kas ve kas olmayan hücrelerde mikrofilamentlere bağlanır ama G-aktine nonspesifik bağlanmazlar. Monomerlerden çok polimerlere bağlanır. Sitokalazınla bu bağlanma inhibe edilebilir.

Alexa fluor, oregon green falloidin (çabuk solar), BODIPY (daha fotostabil, dar emisyon spektrumlu).

Rodamin falloidin (568 konfokal için uygun) kırmızı fluoeran olarak işaretler (Capani ve ark 2001).

Tübülin işaretleyicileri

- GFP ve RFP işaretli tubulinler: otofluoresan proteinlerin beta tubulin veya mikrotübül ilişkili protein (MAP4) N-terminaline bağlanması ile.
- Paklitaksel propları: eskiden taxol olarak bilinen antimitotik ve sitotoksik etkili bir antineoplastik bir ajandır. Tübülin ile kararlı bileşikler oluştururlar.
- Vinblastin (Molekuler probes) Beta túbülin işaretlemesi ve ilaç-transport mekanizmalarını araştırmak için uygun bir antikanser ilaçtır. Mikrotübül uçlarını kapatarak hücre proliferasyonunu inhibe ederek mitotik iğ dinamiğini baskılar. Diğer bir derivatı olan vinblastine 4'-anthranilate ise beta túbülinin merkezi kısmına bağlanarak polimerizasyonunu bozar (Manfredi ve Horwitz 1984).
- Anti alfa-túbülin monoklonal antikoları

Mitokondri işaretleyicileri

Sperm mitokondrial fonksiyonu; MitoTracker Red FM, MitoTracker Orange ve MitoTracker Green gibi flüoresan boyalar kullanılarak analiz edilebilir. Bu analiz insan sperm örnekleri fonksiyonel ve işlevsel sperm sunmanın yanı sıra her bir örnek aktif mitokondri ile sperm yüzdesini belirleme de önemlidir (Ramalho Santos ve ark 2007).

Mitokondri boyaları mitokondri işlev ve yapısını yansıtır. Lokalizasyonu, sayısı (çokluk) ve bazı farmakolojik ajanların etkisi gösterilir. Boya alımı mitokondri potansiyeline bağlıdır (Nonylacridineorange, Mitotracker Green, Mitofluor Red, Mitogreen potansiyel bağımlı değildir). Aldehit fiksatifler mitokondri enerji düzeyini değiştirir (Poot ve ark 1996).

Redox sensör Red CC1 boyası, hücreye pasif girer oksidizasyon yeri proliferasyonda mitokondri, inhibe hücrede ise lizozomlardır (Chen ve Gee 2000).

JC1 ve JC9, çiftli (dual) emisyon, potansiyel duyarlı problemlerdir. Canlı hücrede mitokondri potansiyeli araştırmada kullanılır. İlaç etkileri, ensefalomyopati, apoptotik mitokondri değişiklikleri, zehirlenme ve anoksi araştırmalarında kullanılır (Smiley ve ark 1991).

Mitokondri selektif rodamin ve rozaminler grubunda Rhodamin 123, Tetrabromorhodamin 123, TMRE ve carbocyanin boyaarı düşük konsantrasyonda mitokondrieleri, yüksekte ise ER boyar. Nonyl-akridinoranj canlı hücrelerde 10 güne kadar kalabilir (Chen 1989).

MitoTracker

Hücre zarını (pasif) geçebilir. Aktif mitokondride birikir. Mitotracker orange (MTMRos), red fluorX rosamin (Red CMXRos) ve Red580, Deep Red 633 erken apoptoz belirlenmesinde, bazı nöronlarda subselüler Ca²⁺ kanallarını incelemede Mitotracker Green FM canlı ve fikse dokuda da kullanılabilir. Aköz solüsyonlarda nonfluoresan, lipid ortamda ise fluoresandır. Background (arka plan-zemin) sinyal düşüktür, yıkama gerekmez ve mitokondri membran potansiyelinden bağımsızdır, fotostabil ve parlaktır (Chen ve Cushion 1994).

Lizozom işaretleyicileri

Lysosensor problemler: asidik organel özgün hücreye geçebilen problemlerdir. Canlı hücrede lizozom işlevi, dinamik çalışmalarda yapı asidikse fluoresan, asidik değilse non-fluoresandır.

Lysosensor yellow/blue DND160: asidikse: sarı, daha az asitse: mavi (dual) emisyon yapar (Tarasova ve ark 1997).

DAMP N-3(2-4 dinitrofenil aminopropil N (3 aminopropil) metilamid dihidroklorit) canlı hücre asidik organellerince alınan bir bazik amindir. DAMP alternatifi lysotracker ve lysosensor dinamik çalışmalarda tercih edilir. Redoks sensör red CC1 boyası, önce lizozomda sonra mitokondride birikir. Diğer lizozomotropik problemler:

- BODIPY FL: Histamin düşük konsantrasyonda lizozomları boyar.
- DAPOXYL: Sperm akrozomu boyar.

- Akridine Orange: Bir DNA boyasıdır.
- Neutral Red: (Anderson ve ark 1984).

LysoTracker

LysoTrackerzayıf bazik aminler seçici olarak düşük pH'lı bölgelerde toplanırlar. Canlıda nanomolar (50nm) konsantrasyonlarda çalışır. LysoTracker Gren saniyeler içinde hücreye alınır, alkalileşme nedeni ile lizozomal pH artar ve 5. dakika içinde biter (Thomas ve ark 1997).

1.5. Normal Semen Parametreleri

Normal semen parametreleri baş, orta parça ve kuyruğa ait morfolojik kriterleri içerir.

Normal spermlere ait bu kriterler DSÖ'nün 1999 ve 2010 kitapçıklarında tespit edilmiştir.

DSÖ 1999 ve 2010 kriterleri Çizelge 1.1'de ve bu analizleri yorumlanmasında kullanılan normal ve patolojik durumları adlandıran terminoloji Çizelge.1.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. DSÖ'nün 1999 ve 2010 yıllarında belirlediği normal sperm morfolojisi kriterleri (WHO 2010, WHO 1999).

PARAMETRELER	DSÖ 1999	DSÖ 2010
Baş		
Genişlik	2.5-3.5 µm	2.8 µm
Uzunluk	4.0-5.0 µm	4.1 µm
Boy/en	1.5-1.75	1.5
Akrozomal bölge	%40-70'ini kaplamalıdır.	
Boyun ve orta parça		
Genişlik	<1.0 µm	0.6 µm
Uzunluk	Baş uzunluğunun 1.5 katı	4.0 µm
Sitoplazmik atıklar	Normal baş alanı < 1/3	
Kuyruk		
Uzunluğu	~45 µm	
Genişliği	< orta parça	

Çizelge 1.2. Sperm analizinde terminoloji (WHO 2010).

Normozoospermi	Referans değerlerle tanımlanan normal ejakulat
Oligozoospermi	Sperm konsantrasyonunun $15 \times 10^6/m^3$ 'den az olması veya toplam sperm sayısının $39 \times 10^6/ml$ 'den az olması
Şiddetli oligozoospermi	Sperm konsantrasyonunun $5 \times 10^6/ml$ 'den az olması
Astenospermi	Progresif motil sperm sayısının %32'den az olması
Teratozoospermi	Normal morfolojiye sahip spermelerin %4 'ten az olması
Oligoastenoteratozoospermi	Hem hareket hemde morfolojik yapı yönünden normal değerlerin altında olan sperm örnekleri için kullanılır.
Azoospermi	Ejakulatta hiç sperm olmaması
Aspermi	Ejakulat olmaması
Astenooligozoospermi	Ejakülatta hem sperm sayısının hem de hareketinin normal değerlerin altında olması
Oligoteratozoospermi	Ejakülatta hem sperm sayısının hem de spermin morfolojik yapısının normal değerlerin altında olması
Lökospermi	Ejakulatta lökosit sayısının $1 \times 10^6/ml$ 'den fazla olmasıdır.

1.6. İnfertilite

İnfertilite, çiftlerin bir yıl korunmasız, vajinal yoldan ve normal sıklıkla cinsel ilişkilerine rağmen gebelik oluşturamamasıdır (WHO 2001). Evli çiftlerin yaklaşık %15'inde görülen infertilite, üreme sağlığı sorunu olup olguların yarısı erkektir (Kretser 1997).

1.6.1. Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilite, bir erkeğin üreme açısından herhangi bir patolojisi bulunmayan bir kadınla evli olduğu halde korunmasız cinsel ilişkiye rağmen, bir yıl sonunda konsepsiyon meydana gelmemesi veya çocuk sahibi olamamasıdır. Evli çiftlerde yaklaşık olarak %10-15 oranında infertilite görülmektedir (Greenhall ve Vessey 1990). Bu çiftlerin de yaklaşık %50'sinde erkek üreme sistemi disfonksiyonuna rastlanmaktadır (Mosher ve Pratt 1991).

Erkek infertilitesi çoğunlukla birden fazla faktöre bağlı olmakla birlikte, normal spermatogenezin oluşumunda endokrin sistemin rolü büyüktür (Sigman ve Howards 1998, Sokal 1999). Ancak bu mekanizmanın henüz tam anlamıyla

çözülemediği olması, bu konuda yapılan güncel çalışmaların önemini artırmaktadır. Hipotalamik, hipofizer, adrenal, tiroid ve testiküler patolojilerde, hipotalamus-hipofiz-testis aksı bozularak spermatogenezi inhibe etmektedir. Bu aksın kontrolü santral sinir sistemindeki bazı merkezler, hipotalamus, hipofiz ve testisin endokrin germinal kompartmanları tarafından feedback mekanizma ile sağlanmaktadır (Sigman ve Howards 1998, Sokal 1999).

1.6.2. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 7273 evli infertil çift üzerinde, infertilite nedenine göre yapılan bir çalışmada %41 oranında kadın, %24 oranında erkek, %24 kadın ile erkek beraber ve %11'inde de bir neden gösterilememiştir. Buradan da anlaşılacağı gibi evli infertil çiftlerin %48'inde mutlaka erkek faktörü işin içine girmektedir.

DSÖ'ün el kitabında yer alan nedenler Çizelge 1.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.3.Dünya Sağlık Örgütü'nün 'infertil çiftlerin standardize edilmiş araştırma ve tanısı' ile ilgili el kitabında erkek faktörünün etiyolojik grupları.

Seksüel / Ejakülatuar disfonksiyon	Aksesuar bezlerin enfeksiyonu
İmmünolojik nedenler	Endokrin nedenler
Neden belirlenememiş grup	İdiopatik oligozoospermi
İzole seminal plazma anormallikleri	İdiopatik astenozoospermi
İyatrojenik nedenler	İdiopatik teratozoospermi
Sistemik nedenler	Obstrüktif kriptozoospermi
Konjenital anomaliler	Obstrüktif azoospermi
Akkiz testiküler hasar	İdiopatik azoospermi
Varikosel	

Erkek infertilitesindeki etiyolojik grupları testislere göre başka bir sınıflandırmaya tabi tutulacak olursa: Pretestiküler, testiküler ve posttestiküler olarak sınıflandırılır.

Pretestiküler kaynaklı nedenler Çizelge 1.4'de sınıflandırılmıştır.

Çizelge 1.4. Erkek infertilitesindeki pretestiküler nedenler.

Pretestiküler Nedenler	
Kromozomal	Klinefelter Sendromu
Hormonal	Hipogonadotropik hipogonadizm
	Hiperprolaktinemi
Koital nedenler	Eretil disfonksiyon (Psikoseksüel)
	Endokrin / Nöral
	Diabetik nöropati
	Parapleji
	İlaç nedenli
	Ejakülatuar yetersizlik
	Psikoseksüel
	Genito-üriner cerrahi
	Nöral
	İlaç nedenli
	Koital sıklık

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Androloji Laboratuvarı ile Özel Selçuklu Hastanesi Tüp Bebek ünitesine Nisan 2014-Haziran 2014 ayları arasında başvuran; 20 oligospermik, 20 normospermik olmak üzere toplam 40 hastaya ait semen örneği üzerinde yapıldı. Sperm sayıları 15 milyon/mL ve toplam olarak da 39 milyondan az olanlar oligospermi olarak kabul edildi. Çalışmaya katılmayı kabul eden bireyler bilgilendirilerek 'bilgilendirilmiş gönüllü olur formu' dolduruldu (Bkz.Ek-A). Çalışma Selçuk Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 2013/59 sayılı karar ile onay almıştır (Bkz. EK-B).

Semen örnekleri üç günlük cinsel perhiz sonrasında, steril kaplara mastürbasyon yöntemiyle alınmıştır. Alınan semen örnekleri, 37⁰C'de 30 dakika likefiye olduktan sonra laboratuvarında analiz edildi. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ/WHO 2010) kriterlerine uygun olarak; sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi gibi analizleri yapıldı.

Bu çalışmada; hücre iskeleti (aktin, tübülün) ve organellerine (mitokondri, lizozom) özel 4 tip kit kullanıldı. Bunlar: (MitoTraker RedTM ve LysoTracker Green FMTM, F Actin ve Tübülün). Prosedürde flüoresan konjüge antikolar ile flüoresan işaretleme kullanıldığından; işaretleme-boyama işlemleri karanlık ortamda gerçekleştirildi. Kullanılan kimyasallar ve kitlelere ait teknik katalog bilgileri Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2'de sunulmuştur.

MitoTraker RedTM ve LysoTracker Green FMTM ile organel işaretlemelerinde -bu iki kit yeşil, kırmızı iki farklı renkte flüoresan boya içerdiğinden- her preparat için aynı anda sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Öncelikle likefiye olmuş örnekten 200 µL semen ependorf tüpe alındı.
2. 1000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası ependorf tüp içerisindeki semenin pellet kısmı ayrı bir tüp içine alındı.
4. Oda sıcaklığında bekletilen PBS (Fosfat tamponlu tuz solüsyonu: Phosphate Buffer Saline) ile MitoTraker RedTM ve LysoTracker Green FMTM boya solüsyonlarının her birinden 100'er µL pellet üzerine koyuldu.

5. Ependorf tüpler ışıktan koruma için alüminyum folyo ile sarılıp; 1,5 saat süreyle 37⁰C de, %5 CO₂'li inkübatörde (HERA Cell) bekletildi.

6. Süre sonunda inkübatörden çıkartılan örneklerden 20 µL alınıp poly L-lysine'le kaplanmış lamlara yayma yapıldı.

7. Preparatlar DAPI'li lam kapama solüsyonu ile kapatıldı.

Tübülün boyamaları için aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulandı.

1. Poy L-lysine'li lama yapılan semen yaymaları soğuk asetonla (+4⁰C) 5 dakika tespit edildi.

2. 2 kere ikişer dakika soğuk PBS ile yıkandı.

3. PBS'de: %1 BSA (sığır serum albumini: Bovine Serum Albumine) + %10 keçi serumu (goat serum) ile hazırlanan blok solüsyonu ile 30 dakika bloklama işlemi yapıldı.

4. 30 dakika sonunda %1 BSA içeren anti-Tübülün primer antikor solüsyonundan 100 µL lam üzerine damlatılıp bir gece boyunca +4⁰C'de bekletildi.

5. Ertesi gün; 3 defa 5'er dakika PBS ile yıkandı.

6. Sekonder antikor (Texas Red konjuge, Goat Anti Rabbit IgG)'dan 100 µL damlatıldı ve yaklaşık 3 saat kadar oda ısısında bekletildi.

7. Tekrar PBS ile 5'er dakika ara ile 3 defa yıkandı.

8. Preparatlar DAPI içeren kapatma solüsyonu ile kapatıldı

9. Lamel kenarları hızlı kuruyan, şeffaf tırnak cilası ile sabitlendi.

Tüm preparatlar Olympus BX51, flüoresan ataşmanlı trinoküler mikroskopta incelenerek, DP72 dijital kamera ile dijital mikroskobik görüntüler elde edildi.

Bu görüntüler Olympus DP2BSW dijital görüntü yazılımı programında değerlendirildi.

Elde edilen görüntüler flürosean işaretlenme yoğunluğuna göre aşağıda şekilde semikantitatif olarak skorlandı.

0: boyanma/işaretlenme yok

1: Çok zayıf

2: Orta dereceli

3: Kuvvetli

4: Çok kuvvetli

Çizelge 2.1. Kullanılan işaretleyicilere ait katalog bilgileri.

Adı	Kod	Firma	Dilüsyon
Mito Tracker Red FM	M22425	Molecular Probes	
LyosoTracker Green FM	A6112138	Abcam	
Anti Tübülin Antikoru	Ab52866	Abcam	1/250
Falloidin Paclitaxel (F actin Histological marker)	Ab112125	Abcam	1/250
Goat Anti Rabbit Ig G (Texas Red)	Ab 6719	Abcam	1/250

Çizelge 2.2. Kullanılan malzeme ve kimyasallara ait bilgiler.

Adı	Kod	Firma
PBS	SIP4417	Sigma
DAPI’li kapama solüsyonu	Ab104139	Abcam
Triton X 100	SC-29112	Santa Cruz Biot.
BSA (Bovine-sığır serum albumini)	A9418-50G	Sigma
Goat (Keçi) serumu	Ab7481	Abcam
Poly-L lysine kaplı lam	631-0108	Super Frost Plus

Aktin filamentleri değerlendirilmesi için f-aktin flüoresan histokimyasal işaretleyici fallodin paclitaxel (CytoPainter F-actin Staining Kit- Green Fluorescence, Abcam, Ab112125) kullanıldı.

1. Semen örneklerinden Poly L-lysine’li lama doğrudan yayma preparatı hazırlandı.

2. Yayma preparatları %4’lük formaldehit ile oda sıcaklığında 15 dakika süreyle tespit edildi.

3. Preparatlar 2-3 kez PBS ile 5'er dakika süreyle, nazikçe yıkandı.
4. Permeabilizasyonu artırmak için PBS'de hazırlanan %0,1 Triton X-100 solüsyonu ile 5 dakika muamele edildi.
5. Yine PBS ile 2-3 kez 5'er dakika süreyle nazikçe yıkandı.
6. Daha önceden hazırlanan %0,1'lik F Actin boya solüsyonundan preparatların merkezi kısmına 50-100 µL koyulup, 30 dakika boyunca bekletildi.
7. 30 dakika sonunda 2-3 kez PBS ile 5'er dakika yıkandı.
8. Preparatlar DAPI'li kapama solüsyonu (mounting medium) ile kapatıldı
9. Lamel kenarları hızlı kuruyan, şeffaf tırnak cilası ile sabitlendi.
10. İncelenecekleri güne kadar alüminyum folyo ile kapatılarak +4°C'de bekletildi.
11. Nikon A1+™ konfokal mikroskopta IR ve yeşil flüoresan dalga boyunda lazerler kullanılarak incelendi ve 2D, 3D dijital görüntüleri alındı.
12. Nikon NIS Elements-CT™ yazılımı ile değerlendirildi.

İstatistik

Bu skorlamalar sonucu elde edilen sayısal Veriler medyan (min-max) olarak özetlendi. İki grup arası karşılaştırma Mann-Whitney U testi ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi 0.05 olarak alındı.

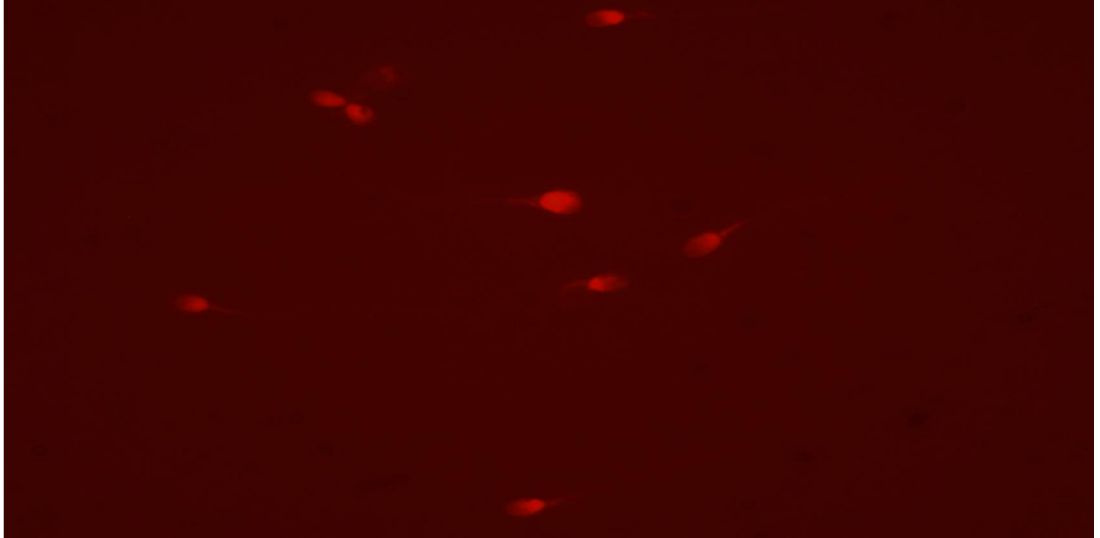
3. BULGULAR

Çalışmaya katılan oligospermik hastaların yaş ortalaması: 29,5 iken; normospermik hastaların yaş ortalaması: 28,6'dır.

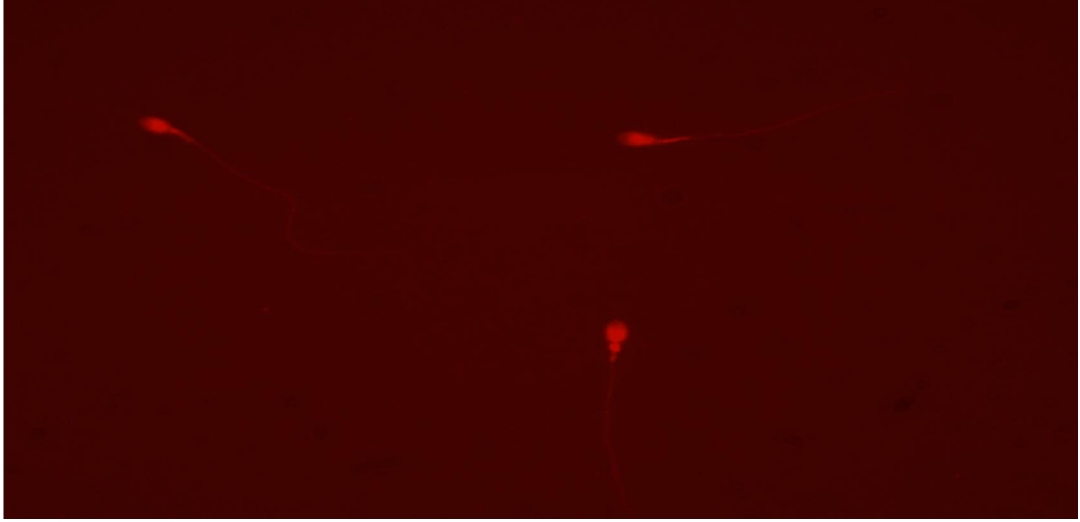
Mitokondri

Mitokondriler mitotracker ile kırmızı flüresan olarak işaretlenmektedir. Fluoresan işaretlenme yoğunluğuna göre değerlendirildi. Normospermik grupta: mitotracker skor ortalaması: 1,93 iken; bu vakalarda en düşük skor: 0,6 en yüksek skor: 4 arasında değişmekteydi (standart sapma: 0,91168). Oligospermik grupta ise; mitotracker skor ortalaması: 1,7025 iken, bu vakalardaki en düşük skor: 0,75, en yüksek skor: 3 arasında değişmekteydi (standart sapma: 0,70887). Bu iki grup karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulundu (P: 0,476). Bu sonuçlara ilişkin veriler, Çizelge 3.1'de, istatistiksel karşılaştırmalara ilişkin veriler de Çizelge 3.3'de özetlenmiştir.

Her iki gruba ait mitotracker işaretlenmesine dair mikrofotograflar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de sunulmuştur.



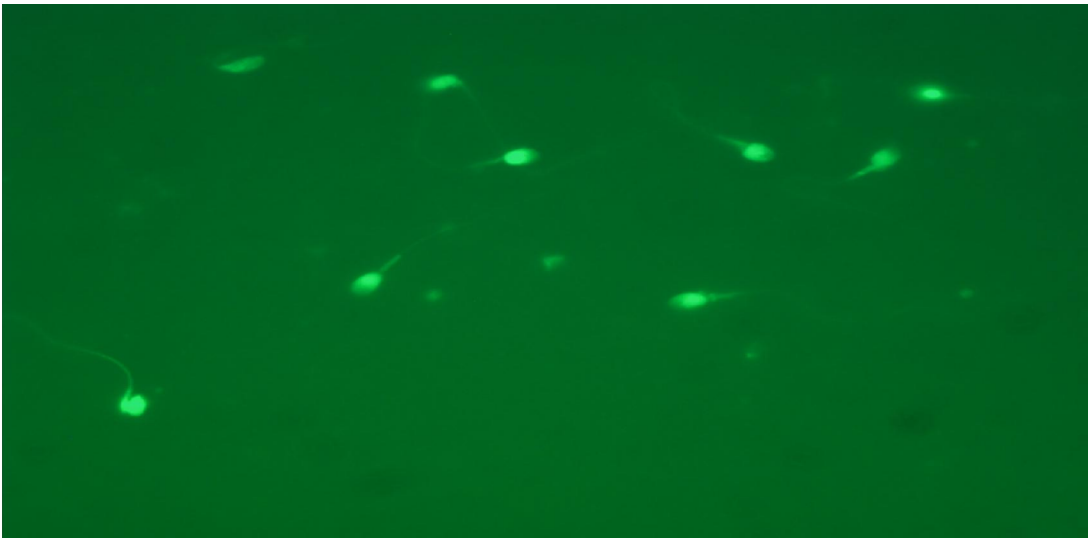
Şekil 3.1: Normospermik semen örneğinde Mitotracker Red ile işaretlenmiş spermatozoonlar.



Şekil 3.2: Oligospermik semende Mitotracker Red ile işaretlenmiş spermatozoa.

Lizozom

Lizozomal işaretlenme akrozom ve ostakrozomal bölgede yeşil flüoresan yoğunluğuna göre değerlendirilmiştir. Normospermik grupta: lysotracker skor ortalaması: 2,3350 iken, bu vakalarda en düşük skor: 1, en yüksek skor: 4 arasında değişmektedir. Standart sapma ise 0,73826 olarak bulundu. Oligospermik grupta ise; lysotracker skor ortalaması: 2,0525 iken, bu vakalarda en düşük skor 0,5, en yüksek skor 3,25 arasında değişmekteydi. Standart sapma ise; 0,83893 olarak bulundu. Bu iki grup karşılaştırıldığında istatistikî olarak anlamlı bir fark bulundu (P: 0,453). Bu işaretlenmeye ait mikroskobik görüntüler Şekil 3.3 ve 3.4’de ve bunlara ait skorlamalar Çizelge 3.1’de sunulmuştur.



Şekil 3.3: Normospermik semende Lysotracker Green ile işaretlenmiş spermatozoonlar.



Şekil 3.4: Oligospermik semen örneğinde Lysotracker Green ile işaretlenmiş spermatozoonlar.

Çizelge 3.1. Normospermik ve oligospermik hastalarda mito-tracker ve lyso-tracker ile işaretlenme skorlamaları.

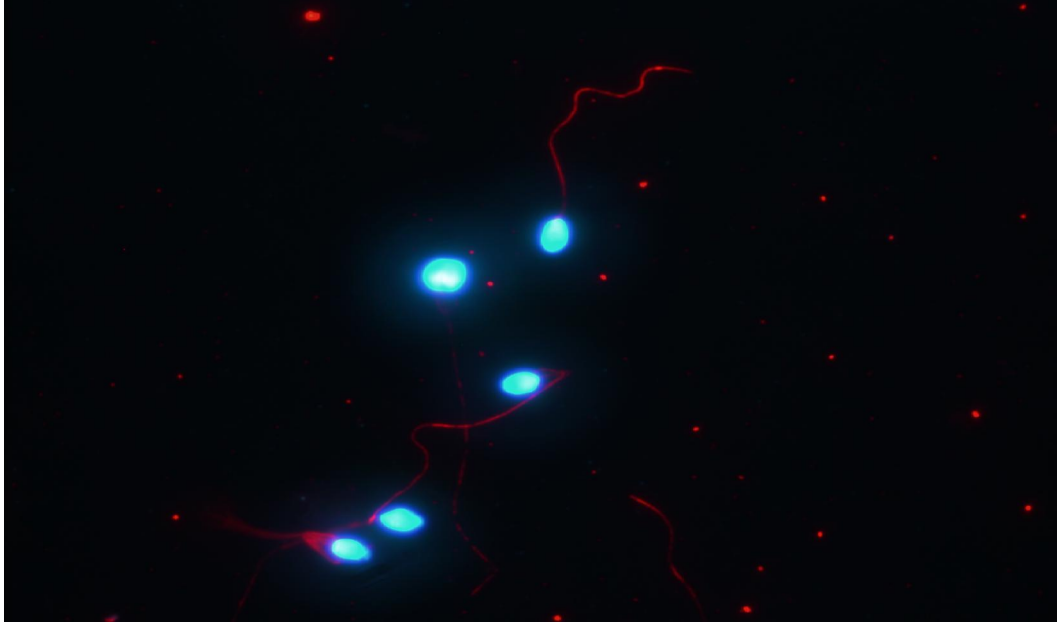
Vaka No	Normo (Mito)	Normo (Lyso)	Oligo (mito)	Oligo (Lyso)
1	1	2,3	3	3,25
2	2,3	1,6	2	2
3	2	2	2	3
4	3,75	2,75	1,6	2,3
5	2	2	0,75	1,75
6	1,6	2	2	2,3
7	1,6	2,3	1,25	2,25
8	2,5	2,75	1,75	0,5
9	1	2,3	1,6	2,3
10	1	2	2	3
11	0,6	1	1,1	2,8
12	1,25	2,5	1	1
13	1,6	2,3	1	2,3
14	2,75	3,25	1	1
15	4	4	2	1,3
16	2	3,45	2	1
17	3	2,2	3	1
18	2	3	3	3
19	1,25	2	1	2
20	1,4	1	1	3
Ort	1,93	2,33	1,70	2,05

Tübülin

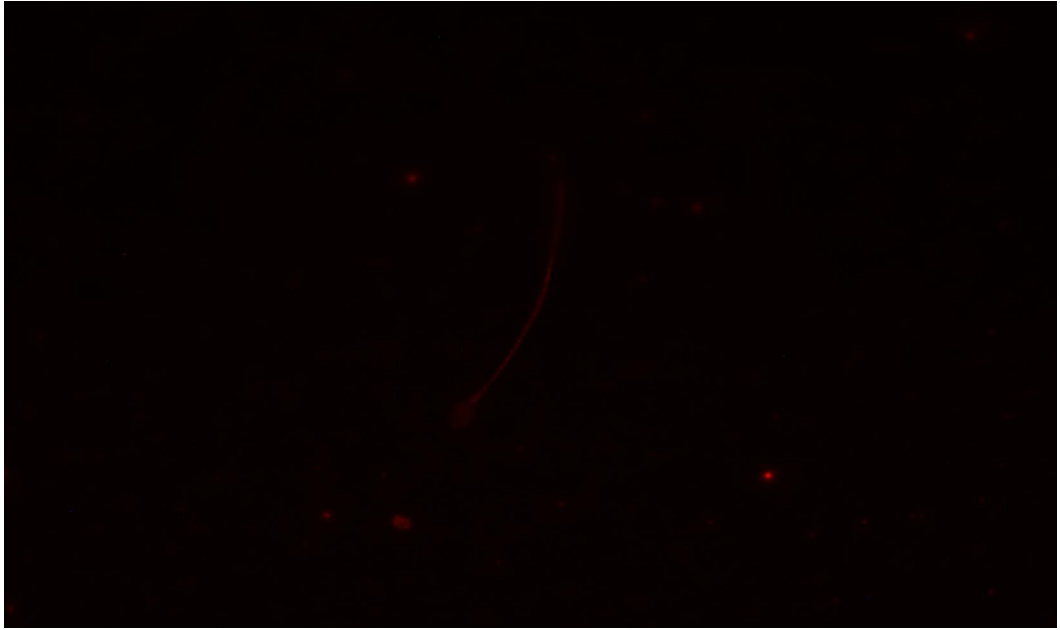
Normospermik grupta: tübülin skor ortalaması: 1,6525 iken bu vakalarda en düşük skor: 0,40, en yüksek skor: 3,30 arasında değişmektedir. Standart sapma ise; 0,75837 olarak bulundu. Oligospermik grupta ise; tübülin skor ortalaması 1,3325 iken, vakalarda en düşük skor: 0, en yüksek skor: 3,50 arasında değişmektedir. Standart sapma ise;1,02164 olarak bulundu. Bu iki grup karşılaştırıldığında: istatistiki olarak anlamlı bir fark bulundu (P 0,353). Tübülin işaretlemelerine ilişkin mikroskopik fotoğraflar Şekil 3.5 ve 3.6'da ve bunlara ait skorlamalar Çizelge 3.2'de, tüm verilere dair genel istatistiksel veriler ise Çizelge 3.3'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2: Normospermik ve oligospermik hastalarda tübülin skorlaması.

Vaka	Normo (Tübülin)	Oligo (Tübülin)
1	1,5	0
2	2	3,5
3	0,6	2,6
4	3,3	0,6
5	1,6	0,6
6	1,6	0,3
7	1	2
8	2	2
9	2	2
10	0,4	2
11	1	1,5
12	3,3	2
13	1,6	0
14	1,3	0,6
15	1,6	0,3
16	2,25	2,4
17	1	2,25
18	2	1
19	2	0
20	1	1
Ort	1,65	1,33



Şekil 3.5: Normospermik semen örneğinde Anti-Tübülin ile işaretlenmiş spermatozoonlar.



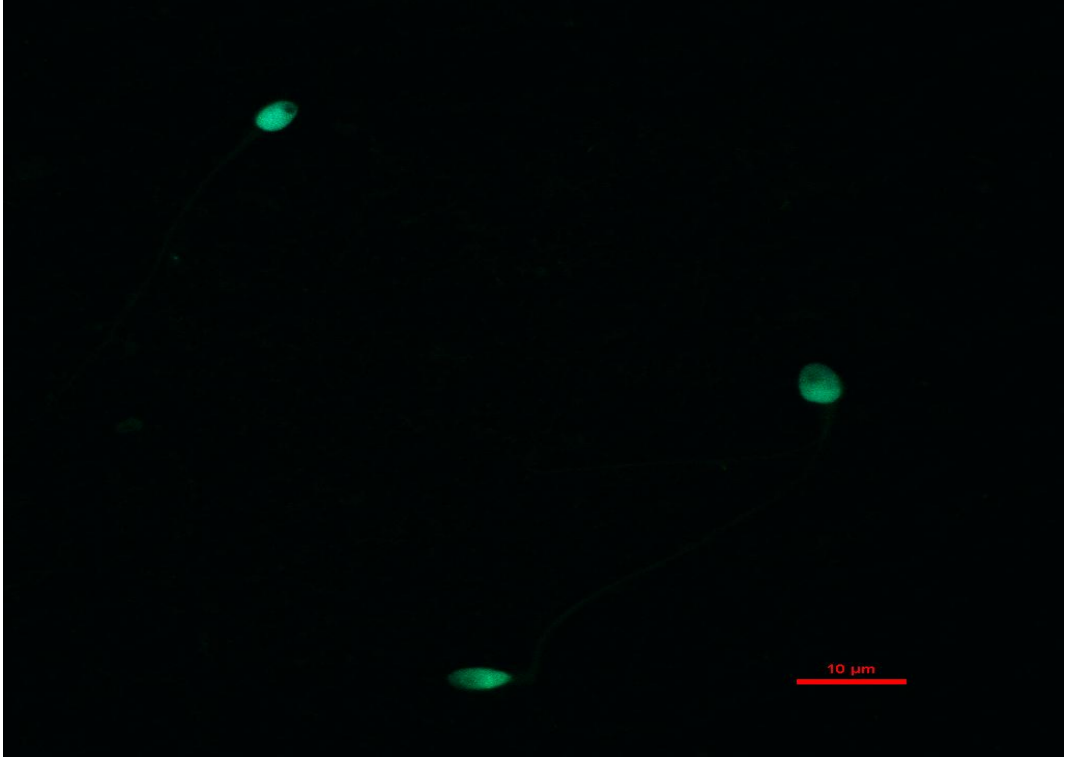
Şekil 3.6: Oligospermik semen örneğinde anti-tübülin ile işaretlenmiş spermatozoonlar.

Çizelge 3.3. Oligospermik bireylere ait semen örneklerinde mitokondria, lizozomlar ve tübülün skorlamalarının normospermik örneklerle kıyaslamalarına dair istatistiksel Mann-Whitney U testi verileri (anlamlılık seviyesi: P <0.05).

Grup		Mitotracker	Lysotracker	Tübülün
Normo	Ortalama (Mean)	1,9300	2,3350	1,6525
	N	20	20	20
	Std. Deviation	,91168	,73826	,75837
	Median	1,8000	2,3000	1,6000
	Minimum	,60	1,00	,40
	Maximum	4,00	4,00	3,30
Oligo	Mean	1,7025	2,0525	1,3325
	N	20	20	20
	Std. Deviation	,70887	,83893	1,02164
	Median	1,6750	2,2750	1,2500
	Minimum	,75	,50	,00
	Maximum	3,00	3,25	3,50
P		0,476	0,453	0,353

Aktin

Aktin ile ilgili rhodamin falloidin işaretlenmesine ait incelemeler konfokal laser mikroskopunda yapılmış olup; işaretlenme, akrozomal ve postakrozomal bölgelerde belirgin olarak izlenmiştir. Oligospermik ve normospermik vakalar arasında işaretlenme lokalizasyonu ve derecesi bakımından belirgin bir fark gözlenmemiştir. Aktin işaretlemesine ilişkin mikroskopik fotoğraflar Şekil 3.7 ve 3.8'de sunulmuştur.



Şekil 3.7: Normospermik semen örneğinde Rhodamin-falloidin ile aktin işaretleme yapılmış spermatozoonların konfokal mikroskopik görüntüsü.



Şekil 3.8: Oligospermik semen örneğinde rhodamin-falloidin ile aktin işaretleme yapılmış spermatozoonların konfokal mikroskopik görüntüsü.

4. TARTIŞMA

Sperm insandaki en küçük fakat en çok farklılaşmış hücrelerindedir. 2 ana komponenti vardır. Baş genetik materyali taşıırken, flagellum oosite doğru spermi yönlendiren hareketi sağlar.

İnfertil erkeklerin %30'unda idiyopatik oligospermi söz konusudur. Erkek infertilitesinde motilite merkezi bir role sahiptir dolayısı ile erkek infertilitesini değerlendirmede yüksek oranda zayıf motil ve inmotil spermlerin fertilizasyonu yapamayacağı akılda tutulmalıdır (Moretti ve ark 2007).

Çalışmamıza ait verilere göre: oligosperimik grupta túbülün işaretlenmesi istatistiksel olarak önemli derecede azalmış idi. Bu sonuçlar, erkek infertilitesi ile sperm motilitesi arasında ve sperm motilitesi ile de sperm túbülün arasındaki doğrudan ilişkiyi destekleyen birçok araştırma ile uyumludur.

Pekcinova ve arkadaşlarına göre de: erkek infertilitesinde hemen hemen %50'sinde zayıf sperm motilitesi söz konusudur. Bu kadar yaygın olmakla birlikte sperm hareketini düzenleyen moleküler mekanizmalar hala anlaşılammıştır (Peknicova ve ark 2007).

Gen knockout fare modeli, tek gen defekti ve astenospermide regüle olan farklı proteinlerin proteomiks çalışmaları sperm motilitesinde önemli olduğu sanılan proteinlerin bir listesini ortaya koymuştur. Ancak sperm motilitesinin yönetimi net değildir. Proteomiks çalışması ile, hücre iskeleti düzeyinde, sperm flagellar motilitesi aksonemal mikrotübüler proteinler ile dynein motorları arasında spesifik ilişkilerin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Diğer proteinler ile ilişki halindeki flagellar mikrotübüller sperm hareketini kararlı ve organize bir olay yapar. Túbülün mikrotübüllerin ana komponentidir ve 100 kDa moleküler ağırlıklı α ve β heterodimerdir. α ve β túbülünlerin her ikisinde poliglutamilasyon, poligkisilasyon, tirozilasyon/detrozilasyon ve asetilasyon/deasetilasyon gibi çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlara uğrar. Asetile/deasetile α túbülünün ayrıntılı işlevi bilinmemektedir. Astenozoospermide α túbülün isoformlarından TUBA3C ve TUBA8 azalırken TUBA4A artmaktadır. Astenozoospermide flagellum boyunca asetile α túbülün azalmakta iken normal spermde asetile ve olan ve olmayan túbülün düzenli olarak ifade olur. Astenozoospermide α túbülünde gözlenen bu azalma,

spermatozoada doğal bir anomaliye neden olur ki, bu da immotil spermatozoalardaki azalmış asetilasyonla ilişkili hareket kaybına neden olabilir (Peknicova ve ark 2007).

Sınırlı sayıda genlere rağmen, tübülün posttranslasyonel modifikasyonlarla oldukça çeşitlenir ve motilitenin regülasyonu ile ilgili olduğundan sperm işlevselleğinde önemli bir role sahiptir. Astenozospermik örneklerde tübülün ekspresyonu azalır (Francou ve ark 2013).

Ejakulasyonda spermin yumurtayı hemen dölleme kabiliyeti yoktur. Fakat dişi genital yolunda invivo kapasitasyon olarak bilinen bu özelliği kazanır. Bu süreç invitro spesifik vasatlarla kültürde de uyarılabilir. Kapasitasyon biyokimyasal ve moleküler değişiklikler hiperaktive sperm motilitesini sağlar. Kapasite olmuş sperm, oosite ulaştığında, zonaya bağlanır ve zona reaksiyonunu tetikler. Hidrolitik enzimlerin ekzositozu, spermin zonayı penetre etmesini ve membranının oolemma ile birleşmesini sağlar. Kapasitasyon ve AR fertilizasyon için hayati olduğundan bu olaylar esnasındaki değişiklikler tam olarak anlaşılammıştır. Mesela, spermatozoada kapasitasyon ve AR sonrası hücre iskeleti proteinlerinin lokalizasyonlarındaki değişiklikler tam bilinmemektedir. İn vitro kapasitasyonun aktin polimerizasyonunda artışa ve aktin epitoplalarının yeniden dağılımına yol açtığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada: α tübülünün flagellum boyunca uniform dağılmadığını immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Bu yüzden bazı spermlerin flagellumunun küçük bir yüzdesi, α tübülün ile işaretlenirken diğerlerinde flagellumun çoğunda bu protein lokalize olur. α tübülün kapasitasyon ve AR sürecindeki yapısal değişikliklerle doğrudan ilişkilidir (Francou ve ark 2013).

Bu çalışmalara göre: tübülün alt birimleri ve isoformlarının moleküler düzeyde daha fazla araştırmaya ihtiyacı vardır.

Flagellar sperm yapısına dair çok sayıda çalışmada: aksonemal paterninve periaksonemal yapıların doğru düzenlenimi normal motilitenin sağlanmasında esastır. Son yıllarda dikkat aksonemi çevreleyen hücre iskeleti yapısı olan fibröz kılıf ve flagellumun esas parçası bölgesinde belirgin olan dış yoğun fibrillere yoğunlaşmıştır. Spermiyogenik süreç boyunca kuyruğun distalinden proksimaline uzanan semisirküler fitil tarzında yakın yerleşimli dizilmiş 2 longitudinal kolondan oluşur. Genellikle, fibröz kılıfın sperm flagellumna mekanik bir destek rolü oynadığı kabul edilir. Fibröz kılıf, flagellar bükülmeyi ayarlar flagellar ritmin şeklini belirler.

Çalışmalar, insan fibröz kılıfında: A-kinaz ağ/ankoring proteininin (AKAP-3 ve 4) en yoğun protein olduğu ve flagellar proteinlerin siklik-AMP (cAMP) bağımlı fosforilasyonunun sperm motilitesinin başlaması ve devamı ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. İkincil mesajcı cAMP spermtaozoada cAMP bağımlı kinaz (PKA) üzerinde hücre içi etkilerini ortaya koyar. PKA'nın hücre içi organizasyonu da AKAP'ları ile ilişkisi ile kontrol edilir. Aksonem ve fibröz kılıfın yapısal karakteristiklerini incelemeye geçirimli elektron mikroskobu (TEM) önemlidir. Özetle AKAP4'ün sperm motilitesindeki rolü net olmamakla birlikte; AKAP4 işaretlenmesinin zayıf olması veya olmaması ile sperm motilitesinin zayıf veya olmaması ilişkilidir (Moretti ve ark 2007).

İyonize radyasyon spermatogenezi bozar ve germ hücrelerinde mutasyonlara sebep olur. Radyoterapi kanser tedavisinde etkili iken, hastalar sıklıkla azospermi ve infertiliteden şikâyet eder. Araştırmalar epididimal sperme kısa ve uzun süreli İR etkisi ve radyasyon tedavisi sonrası bu olumsuz etkisi üzerine yoğunlaşmıştır. Radyasyon spermatogony ve spermatositlerin kromozomal bozulmayı indükler ve bu spermatozoata aktararak bazen kalıcı da olabilen astenospermi, hipospermi ve teratospermiye neden olur. Bu bozulmaların moleküler mekanizmaları, kaudal spermlerin proteinleri proteomiks ile araştırıldı. Kontrol ve iradiye edilen grupta 6 farklı protein tespit edilmiş olup bu proteinler iradiye grupta azalmıştı. Bunlar: skint 6 isoform b, ısı şok proteini 70-2, fosfolipaz-C alfa, testise özgü gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDHS), tübülün beta 4b, Gpx4'dür. İnsan ve farede, tublinin isotoplarının kodlanmasıyla ilgili 7 alfa ve 6 beta geni vardır. Beta tübülün ifadesinin azalması flagellar aksonemin relatif kayma kapasitesini sınırlar. ROS'da artış sperm glikolizi inhibe ederek flagellar aksonem hareketi için enerjiyi sağlayacak ATP miktarında yetersizliğe sebep olur bu da sperm motilitesinde azalmaya sebep olur. GAPDHS ifadesinde azalma da sperm motilitesini azaltır (Yan li ve Zhang 2013).

İyon radyasyonuna bağlı infertiliterin sebebi, iyonize radyasyonun sperm yüzme davranışını bozmasına bağlı düşük sperm motilitesi ile ilişkili olabilir. İyonize radyasyonun insanda total sperm sayısını ve motil sperms sayısını azalttığı gösterilmiştir. Erkek infertilitesi, esasen düşük sperm motilitesinin bir sonucudur. Bununla birlikte; radyasyonla uyarılan spermin patolojik durumu ile tübülün değişiklikleri arasındaki ilişki tam olarak anlaşılamamıştır. Tübülünün insan sperm patolojisinde sperm kuyruğunun yapısal durumunu etkilediği bildirilmiştir.

Pubertedeki farelerde ağır iyonize radyasyondan (HIR) sonra düşük sperm motilitesi ile β tübülün ekspresyonunda azalma arasında ilişki olduğunu desteklemektedir. Bu türden bir ilişki üreme sağlığına HIR etkisini değerlendirmede bir ölçek olarak kullanılabilir. Bu çalışmanın sonuçlarının gelecekteki uzay çevresel radyasyonundan korunma ve HIR kaser tedavisine katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada radyasyona maruz bırakılan infant (0-5 hafta) farelerden 5,5 hafta sonra epididim kaudasından alınan sperm motiliteleri hesaplanmış ve viabiliteleri de akridin oranj ve PI (propidyum iyodür) ile nukleusları boyanarak değerlendirilmiştir. Ayrıca anti-tübülün antikoru ile boyanarak konfokal mikroskopta incelenmiştir. Pubertede (5-7 hafta) vücut ölçüleri, organ gelişimi ve sperm motilitesi artışı diğer dönemlere göre daha fazladır. Spermatogenez 35. gün başlar ve 5,5 haftada artmaya başlar. Sperm viyabilitesi ve motilitesi azalmıştır. Bartoov ve ark (1999) radyasyona maruz kalan işçilerde sperm motilitesinde düşme rapor etmişlerdir. B tübülün ekspresyonu spermin orta parça ve kuyruğunda gözlenebilir. İrradiye spermelerde tübülün işaretlenmesi azalıyor ve bu da doğrudan sperm motilitesi ile ilişkilidir. Motilite sperm flagellum hareketine bunun işlevi de aksonemdeki hassas mikrotübül organizasyonu bağlıdır (Yann ve ark 2014).

Tübülün immunohistokimyasal biflagellat spermindeki aksonemlerin bağlantılı uzunluklarını tespit etmek için yararlı ve uygun bir araçtır (Jomini ve Justine 1997).

Plathelminthes'teki tübülün çalışmalarının amacı metazoa gelişiminde anahtar bir role sahip olan filyum gruplarındaki çeşitli transkripsiyon sonrası modifikasyonlarının varlığını/yokluğunu tespit etmek ve sadece yüksek Plathelmintheslerin spermelerinde bulunan sıra dışı yapı olan 9+1 aksonemler hakkındaki bilgimizi arttırmaktadır (Mollaraet ve Justine 1997).

Septin polimerize GTP bağlayan hücre iskeleti proteinleri ailesindedir. Septinler diğer hücre iskeleti elemanları (aktin, myozin II, tübülün) ile etkileşerek, Hücre iskeleti remodelingi, hücre polaritesi, mitoz ve vezikül trafiğinde rol alır. Septin12 mutant alelli farelerin infertil olduğu gösterilmiştir. Bu farelerin vas deferens'lerinden alınan spermatozoalar anormal morfolojili, düşük sperm sayılı ve immotil spermelere sahiptir.

Spermatogeneziste mikrotübüller birçok dönemde eksprese edilirler. Mikrotübül filamentleri pakiten safhasında belirgin bir sentrozom yapmaksızın dağınık ağ halindedir. Step 7 spermatidlerinde sperm nukleusu etrafında yoğunlaşır. 8-15 spermatid basamağında: manşet oluşumu şeklinde belirginleşir. Mikrotübül ve aktin içeren geçici bir yapıdır ve nukleer ve baş şekillenmesi ve kuyruk oluşumu için hayatidir. Spermiyogenez ilerledikçe α ve β tübülünler sperm kuyruğunu yapmak üzere sentrozomdan uzar ve flagella aksoneminin diğer elemanları ile 9+2 mimarisinde sıkı bir düzenlemeye katılır (Kuo ve ark 2013).

Kısaca: çalışmamızda elde edilen lokalizasyon ve işaretlenme yoğunluğuna dair veriler oldukça kaba veriler olup; moleküler düzeyde tetkikler ile (elisa, PCR gibi) desteklenmesine ihtiyaç vardır. Ancak bu çalışmalar ile hangi tubulin alt biriminin ne kadar etkilendiği daha iyi anlaşılabilir.

Diğer bir yaklaşım da tübülün ifadesinin olmadığı, knock-out ve irradiye fare fare modellerinde sperm yapısının detaylı (immünohistokimyasal, insitu hibridisasyon, flow sitometrik ve TEM) incelenmesi yanı sıra bu örneklerde tubulin yapımının kontrolüne ilişkin genetik yapının ortaya konulacağı sitogenetik çalışmalar ve epigenetik çalışmalar gerekir.

Çalışmamızda aktin filamentleri değerlendirilmesi için; f-aktin flüoresan histokimyasal işaretleyici olarak fallodin paclitaxel (CytoPainter F-actin Staining Kit-Green Fluorescence) kullanıldı ve hazırlanan preparatlar konfokal laser mikroskopunda incelendi.

Aktin işaretleyicileri olarak kanser kemoterapisinde kullanılan ajanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Flüoresan işaretlenme doğrudan flüoresan veya konfokal mikroskopta incelenebileceği gibi, florometrik ve akım sitometrik incelemeler de yapılabilir. Çalışmamızda aktin lokalizasyonunu değerlendirmek için mikroskobik inceleme tercih edilmiştir. Zira diğer değerlendirmeler her ne kadar kantitatif veya semi kantitatif veriler sağlasa da yerleşime dair bir veri sağlayamazlar.

Brener ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada: koç, boğa, fare veya insan spermalarında akrozom reaksiyonu (AR), follikül penetrasyonu sonrası zonaya bağlanma ve kapasitasyonunda aktin polimerizasyonundaki zamana bağlı rolünü değerlendirmişlerdir. F Actinin hücre iskeleti içeriğindeki değişiklikleri, FITC veya TRITC-Phalloidin kullanarak florometrik olarak ölçülmüştür (Brener ve ark 2002).

Florometrik incelemeler bu çalışmada olduğu gibi zamana bağlı temporal analiz imkanı sağlamaktadır.

Çalışmamızda konfokal laser mikroskobunda yapılan incelemelerde: aktin, sperm başında akrozomal ve postakrozomal bölgelerde belirgin olarak izlenirken, oligospermik ve normospermik vakalar arasında işaretlenme lokalizasyonu ve derecesi bakımından belirgin bir fark gözlenmemiştir.

Kapasitasyon ve AR mekanizmasının bir elemanı olan aktin hücre iskeleti ve hücre mimarisindeki muhtemel değişiklikler araştırmaya açıktır.

Brener ve ark. aktin filamentlerinin spermiyogenik hücrelerde esasen nükleus ile spermatidin gelişen akrozomu arasında subakrozomal boşlukta yer alırken, matür spermatozoada lokalizasyonu ve yapısının net olmadığını bildirdiler.

Yine Brener ve ark.'na göre; birçok memeli türünde aktin, filamentöz f-aktin olarak tanımlanmakla birlikte daha çok monomerik formdadır. Aktin içeren sperm bölgeleri bizim çalışmamızla da korele olarak; akrozomal boşluk, ekvatoryal ve post akrozomal bölgeler kadar kuyruktur. Çoğu türde flagellar hareketteki roller tam bilinmese de aktin kuyrukta bulunmuştur. aktin fertilizasyon süreci için önemli olan sperm başında bulunur (Brener ve ark 2002).

Dvorakova ve arkadaşlarının bir çalışmasında ise, akrozom reaksiyonu öncesi ve sonrasında akrozom şekil ve boyutu bakımından farklılık gösteren spermatozoada sperm başındaki hücre iskeleti elemanlarının dağılımı karşılaştırılmıştır. İnsan ve rodentlere ait spermatozoa, AR öncesi ve sonrasında invitro olarak tespit edilmiş aktin, spektrin ve alfa tübülün lokalizasyonları immünohistokimyasal incelenmiştir. Yine çalışmamızla benzer olarak, özellikle apikal akrozomda ve ekvatoryal segmentte ve postakrozomal bölgede değişiklikler olduğu sperm başındaki bu değişiklik paternlerinin tüm türlerde alt kompartımanlardaki farklılıklarla beraber benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre; sperm başı kritik hücre iskeletinin AR sürecinde önemli değişiklikler gösterdiği ve bu proteinlerin fertilizasyon öncesi süreçte yer alan oldukça yüksek dinamik yapılar olduğunu desteklediğini rapor etmişlerdir (Dvorakova ve ark2005).

Çalışmada kullanılan konfokal mikroskop, konvansiyonel flüoresan mikroskoba göre avantajlara sahiptir. Normale göre daha kalın kesitlerde veya daha büyük hücrelerde optik kesitler alınarak sonrasında 3 boyutlu (3D)

rekonstrüksiyonlar yapılabilmektedir. Bu da işaretlenen hücrene ve bu hücrenin alt yapı ve moleküllerin üç boyutlu şekil ve lokalizasyonuna dair ayrıntılı ve önemli bilgiler vermektedir.

Bu çalışmalardan yola çıkarak; aktinin sperm kalitesi ve kapasitasyonundaki rollerini değerlendirmek için özellikle azospermik vakalarda da aktin lokalizasyonunu, pozisyonlarını ve miktarını değerlendirmekte fayda vardır.

Çalışmamızda mitokondri işaretlemesi için mitotracker kiti kullanılmıştır. Sperm mitokondrial fonksiyonunu göstermek için birçok alternatif mevcuttur. MitoTracker Red FM, MitoTracker Orange ve MitoTracker Green gibi flüoresan boyalar kullanılarak analiz edilebilir. Bu analiz insan sperm örnekleri fonksiyonel ve işlevsel sperm sunmanın yanı sıra her bir örnek aktif mitokondri ile sperm yüzdesini belirleme de önemlidir (Ramalho Santos ve ark 2007).

Mitokondri boya ları mitokondri işlev ve yapısını yansıtır. Lokalizasyonu, sayısı (çokluk) ve bazı farmakolojik ajanların etkisi gösterilir. Boya alımı mitokondri potansiyeline bağlıdır (Nonylacridineorange, Mitotracker Green, Mitofluor Red, Mitogreen potansiyel bağımlı değildir). Aldehit fiksatifler mitokondri enerji düzeyini değiştirir (Poot ve ark 1996). JC1 ve JC9, çiftli (dual) emisyon, potansiyel duyarlı problemlerdir. Canlı hücrede mitokondri potansiyeli araştırmada kullanılır (Smiley ve ark 1991). Mitokondri selektif rodamin ve rozaminler grubunda Rhodamin 123, Tetrabromorhodamin 123, TMRE ve carbocyanin boya ları düşük konsantrasyonda mitokondrileri, yüksekte ise ER boyar. Nonyl-akridinoranj canlı hücrelerde 10 güne kadar kalabilir (Chen 1989).

Mitotracker, en yaygın kullanılan mitokondri işaretleyicilerinden olup; hücre zarını (pasif) geçebilir. Aktif mitokondride birikir. Mitotracker orange (MTMRos), red fluorX rosamin (Red CMXRos) ve Red580, Deep Red 633 erken apoptoz belirlenmesinde, bazı nöronlarda da subselüler Ca²⁺ kanallarını incelemede Mitotracker Green FM canlı ve fikse dokuda da kullanılabilir. Aköz solüsyonlarda nonfluoresan, lipid ortamda ise fluoesandır. Background (arka plan-zemin) sinyal düşüktür, yıkama gerekmez ve mitokondri membran potansiyelinden bağımsızdır, fotostabl ve parlaktır (Chen ve Cushion 1994).

Bu özelliklerinden dolayı çalışmamızda da mitotracker tercih edilmiştir.

Sağlıklı döner spermalarında mitokondrial aktivite heterojen bulunmuştur (Paula Sousa ve ark, 2011).

Spermatozoada orta kısımda, aksonem etrafında sıkı şekilde yerleşerek ve sarmal yaparak (helikal) ovoid bir band (kılıf) oluşturur.

Mitokondriler pleomorfik organellerdir. Oksidatif fosforilasyon ve lipid oksidasyonu ile enerji üretiminde dolayısı ile de germ hücrelerinin gelişimi ve fertilizasyon sürecindeki kritik metabolik olaylarda kilit role sahiptir. Spermatozoa farklı fiziko-kimyasal durumlarda işlevlerini sürdürerek fertilizasyon sürecini tamamlamak için gereken kimyasal enerjiyi mitokondrilerinde üretir. Bu süreçte en önemli ihtiyaç motilitenin sağlanmasıdır. Astenoazoospermik vakalardaki azalmış motilite ile sperm mitokondriumlarında yapısal ve işlevsel değişiklikler saptanmıştır. Dolayısı ile de erkek fertilitésinin en önemli unsurlarından birini oluşturur (Piomboni ve ark, 2012) .

Sperm motilitesi ile bazı mitokondrial solunumsal zincir enzim aktiviteleri arasında ilişki saptanırken, mitokondrial hacim belirteçlerinden olan sitrat sentaz enzimleri ise bir ilişki saptanamıştır. Bu bulguların idiyopatik astenoazoospermi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Ruiz-Pesini ve ark, 1998).

Çalışmamızda da bu çalışmalarla uyumlu olarak: oligospermik vakaların sperm mitokondrilerinde işaretlenme normospermik vakalara göre istatistiki olarak anlamlı olarak azalmıştı (P: 0,476).

Dolayısı ile oligoastenozoospermi ve bununla ilişkili infertiliterde mitokondrial işlevin sorgulanması da önemlidir. Bu parametre ile motilite parametresi de doğrudan ilişkilidir.

Kumar ve Sangeetta (2009) sperm hareketliliğinin büyük ölçüde mitokondrial kılıf oksidatif fosforilasyon ile ATP'ye bağlı olduğunu ve fertilizasyonun erken fazında flagellar hareket için enerji gereksinimi olduğunu dolayısı ile sperm işlevi ile mitokondriler ve mitokondrial genomun (mtDNA) önemli olduğuna işaret etmişlerdir. Ayrıca, astenozoospermi ve oligoastenozoospermi ile ilişkili erkek fertilitésinin mtDNA nokta mutasyonu ve multibl delesyonları ile ilgili mtDNA bozukluklarıyla ilgili olabileceğini ve bu bozuklukların doğrudan sperm motilitesini ve dolaylı olarak da fertiliteyi etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Yine semen kalitesi ile sperm mitokondrilerindeki respiratuvar zincir işlevi ile ilişki de söz konusudur.

İnsan sperm mtDNA molekülü oksidatif hasar ve mutasyondan etkilenebilir ve bu da erkek infertilitesinde rol oynar. Sperm örneklerinde %85'e varan oranlarda mtDNA delesyonları tespit edilmekle beraber, bu sadece o bireyi ilgilendiren bir sorundur. Zira mtDNA sadece anneden kalıtılmaktadır. Tek ve çok nokta mutasyonları ile sperm motilitesi ve sperm disfonksiyonu arasında ilişki bulunmuştur. mtDNA tüm sperm mutasyonları içinde aysbergin görünen ucudur. Çünkü fertilizasyon sürecinde ovidukta ulaşmak için yeteri kadar hızlı yüzmesi için gerekli enerjiye ihtiyacı vardır ve bu mitokondrilerin bu biyoenerjetik işlevi erkek infertilitesinde kritik role sahiptir.

Ejekulat spermatozoaları özellikle infertil bireylerde, somatik hücrelerde apopitozis, Fas ekspresyonu, reaktif oksijen ürünleri (ROS) yapımı, kaspazların aktivasyonu, mitokondrial membran potansiyelinde azalma, plazma zarında fosfatidilserin translokasyonu ve permeabilitede artış gibi çeşitli özellikler gösterirler. Sperm mitokondrial yapısal ve özellikle de kapsül proteinlerinin bozulması normal sperm morfolojisine rağmen motiliteyi ciddi oranda etkilediği rapor edilmiştir (Kumar ve Sangeetta, 2009).

Bu çalışmalar mitokondrial genomun mitokondrial işlevlerdeki önemini ortaya koymuş olup; oligospermi ve azospermi etiyolojisinde mitokondrial genoma ait genetik ve bu genotipin kalıtılmasında maternal/paternal etkinin irdelenmesi için de epigenetik daha ileri çalışmalara olan gereksinimi de göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Oligospermik bireylerde bir hücre olarak sperm morfolojisinin daha detaylı araştırılması gerekliliği de öne çıkmaktadır.

Bu çalışmamızda elde edilen lokalizasyon ve işaretlenme yoğunluğuna dair veriler oldukça global olup; moleküler düzeyde tetkikler ile (elisa, PCR gibi) desteklenmesine ihtiyaç vardır. Ancak bu çalışmalar ile hangi hücre iskeleti alt biriminin ne kadar etkilendiği daha iyi anlaşılabilir.

Diğer bir yaklaşım da her bir hücre iskeleti ve organeli ifadesinin olmadığı, knock-out ve irradiye fare fare modellerinde sperm yapısının detaylı (immünohistokimyasal, insitu hibridisasyon, flow sitometrik ve TEM) incelenmesi yanısıra bu örneklerde tübülün yapımının kontrolüne ilişkin genetik yapının ortaya konulacağı sitogenetik çalışmalar ve epigenetik çalışmaları gerekir.

Bu bağlamda hücre iskeleti elemanları ve hücre organelleri olmak üzere belli başlı hücresel morfolojik yapıların ve bu yapıları oluşturan alt birimlerin detaylı analizleri bu tablonun patogenezi veya patolojik gelişim süreci hakkında yeni ipuçları verebilir.

6. KAYNAKLAR

- Anderson RG, Falck JR, Goldstein JL, Brown MS. Visualization of acidic organelles in intact cells by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(15):42-4838.
- Bhagwat S, Dalvi V, Chandrasekhar D, Matthew T, Acharya K, Gajbhiye R, Kulkarni V, Sonawane S, Ghosalkar M, Parte P. Acetylated α -tübülün is reduced in individuals with poor sperm motility. *Fertil Steril*. 2014;10:95-104.
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation. *Biol Reprod*. 2002;(68):45-837.
- Brehm R, Steger K. Regulation of Sertoli Cell and Germ Cell Differentiation. Berlin Heidelberg: Springer Verlag. 2005;181:1-10.
- Capani F, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bushong E, Bobik M, Martone ME. Phalloidin-eosin followed by photo-oxidation: a novel method for localizing F-actin at the light and electron microscopic levels. *J Histochem Cytochem*. 2001; 49(11):61-1351.
- Chen LB. Fluorescent labeling of mitochondria. *Methods Cell Biol*. 1989;29:23-103.
- Chen F, Cushion MT. Use of fluorescent probes to investigate the metabolic state of *Pneumocystis carinii* mitochondria. *J Eukaryot Microbiol*. 1994;41(5):79.
- Chen CS, Gee KR. Redox-dependent trafficking of 2,3,4,5, 6-penta fluoro dihydro tetramethyl rosamine, a novel fluorogenic indicator of cellular oxidative activity. *Free Radic Biol Med*. 2000;15;28(8):78-1266.
- Curry MR. Sperm Structure and Function, in Gametes- the Spermatozoon. Cambridge University Press. 1995:45-69.
- Colledel G, Baccetti B, Capitani S, Moretti E. Necrosis in human spermatozoa II Ultrastructural features and FISH study in semen from patients with uro-genital infections. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2005;37:67-73.
- Dohle GR, Halley J, VanHemel O, Pieters H, Weber F, Govaerts LC. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human Reproduction*. 2002;17:13-16.
- Dorval V, Dufour M, Leclerc P. Role of tyrosine phosphorylation in the thapsigargin-induced intracellular Ca store depletion during human sperm acrosome reaction. *Mol Hum Reprod*. 2003;(9):31-125.
- Dvorakova K, Moore HD, Sebkova N, Palecek J. Cytoskeleton localization in the sperm head prior to fertilization. *Reproduction*. 2005;130(1):9-61.
- Francou MM, Ten J, Bernabeu R, De Juan J. Capacitation and acrosome reaction changes α -tübülün immunodistribution in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2014; 28(2):50-246.
- Fredricsson B, Bjork G. Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretions and its clinical significance. *Fertil Steril*. 1977;28:841-845.
- Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Saunders Elsevier. 2006;3:490-500.
- Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: A review of the current confusion and a report of 2 new studies. *Fertil Steril*. 1990;54: 978-983.
- Gupta GS. Proteomics of spermatogenesis. Springer Science. Business Media. 2005:3-13.
- Gökçe A. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. *Turk Urol Sem*. 2011;2:1-7.
- Günalp S, Aktan E, Yücel A. WHO laboratuvar el kitabı: insan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi. 4. baskı, Ankara, Tıp Teknik Kitapevi, 2002;2:4-32.
- Hargreave TB. Varicocele-a clinical enigma. *Br J Urol*. 1993;72(4):401-408.
- Helstrom WS, Overstreet JW, Moore SM, Samuels SL, Chang RJ, Lewis EL. Antisperm antibodies bind with different patterns to sperm of different men. *J Urol*. 1987;138:895-898.
- Hendry VF, Sommerville IF, Retal HR. Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol*. 1999;45:684-692.

- Holt WV. Development and maturation of the mammalian acrosome. A cytochemical study using phosphotungstic acid staining. *J Ultrastruct Res.* 1979;68(1):58-71.
- Jomini C, Justine J. Spermogenesis and spermatozoon of *Echinostoma caproni* (Platyhelminthes, Digenea): transmission and scanning electron microscopy and tubulin immunocytochemistry. *Tissue Cell.* 1997;2:107-118.
- Jonge DC, Barratt C. The sperm cell, production, maturation, fertilization, regeneration. Cambridge University Press. 2006:1-25.
- Katz DF, Overstreet JW, Samuels SJ, Niswander PW, Bloom TD, Lewis EL. Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *J Androl.* 1986;7:203-210.
- Kayıkçı MA, Çam HK, Akman Y, Erol A. Erkek infertilitesini değerlendirmede semen analizinin özellikleri ve rolü. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi.* 2002; 4:8-35.
- Kretser DM. Male infertility. *Lancet.* 1997;349(9054):90-787.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46:23-1118.
- Kuo PL, Chiang HS, Wang YY, Kuo YC, Chen MF, Yu IS, Teng YN, Lin SW, Lin YH. SEPT12-microtubule complexes are required for sperm head and tail formation. *Int J Mol Sci.* 2013;14(11):16-22102.
- Kumar DP, Sangeetha N. Mitochondrial DNA mutations and male infertility. *Indian J Hum Genet.* 2009;15(3):93-97.
- Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod.* 1996;11:6-1942.
- Li HY, Zhang H. Proteome analysis for profiling infertility markers in male mouse sperm after carbon ion radiation. *Toxicology.* 2013;306:85-92.
- Liu DY, Clarke GN, Baker HW. Exposure of actin on the surface of the human sperm head during in vitro culture relates to sperm morphology, capacitation and zona binding. *Hum Reprod.* 2005; 20(4):999-1005.
- Liu DY, Baker HW. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that fail to fertilize in vitro. *J Reprod Fertil.* 1992;94:71-84.
- Liu OY, Jennings MG, Baker HG. Correlation between defective motility (asthenospermia) and ATP reactivation of demembrated human spermatozoa. *J Androl.* 1987;8(5):53-349.
- Manfredi JJ, Horwitz SB. Taxol: an antimetabolic agent with a new mechanism of action. *Pharmacol Ther.* 1984;25(1):83-125.
- MacLeod J. Seminal cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril.* 1965;16:735-757.
- Molaret I, Justine L. Tubulin in monogenean spermatogenesis. *Tissue Cell.* 1997;29(6):699-706.
- Morales P, Pizarro E, Kong M, Jara M. Extracellular localization of proteasomes in human sperm. *Mol Reprod Dev.* 2004;68(1): 24-115.
- Moretti E, Baccetti B, Capitani S, Collodel G. Necrosis in human spermatozoa. Ultrastructural features and FISH study in semen from patients with recovered uro-genital infections. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2005;37:63-73.
- Moretti E, Baccetti B, Scapigliati G, Collodel G. Transmission electron microscopy, immunocytochemical and fluorescence in situ hybridisation studies in a case of 100% necrozoospermia: case report. *Andrologia.* 2006;38(6):8-233.
- Moretti E, Scapigliati G, Pascarelli NA, Baccetti B, Collodel G. Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. *Asian J Androl.* 2007; 9(5):9-641.
- Mortimer D, Leslie EE, Kelly RW, Kelly RW, Templeton AA. Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil.* 1982;64:391-399.

- Mortimer ST. Critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reprod.* 1997; 3:39-403.
- Mosher WD, Pratt WK. Fecundity and infertility in the United States: Incidence and trends. *Fertil Steril.* 1991;56:192-193.
- Örmen M, Önvural B. Semene klinik biyokimyasal yaklaşım. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2003;3:155-61.
- Peknicova J, Pexidrova M, Kubatova A, Koubek P, Tepla O, Sulimenko T, Draber P. Expression of beta-tübül epitope in human sperm with pathological spermogram. *Fertil Steril.* 2007;88:1120-8.
- Piomboni B, Focarelli R, Stendarti A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for sperm motility. *Int J Androl.* 2012; 35: 109-124.
- Playán A, Solano A, Manuel J. López-Pérez, Montoya J, Ruiz-Pesini E. Mitochondrial DNA transcription and diseases: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2006;1757, 1179–1189.
- Poot M, Zhang YZ, Krämer JA, Wells KS, Jones LJ, Hanzel DK, Lugade AG, Singer VL, Haugland RP. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.* 1996;44(12):1363-72.
- Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa AS, Rodrigues AS, Martins L, Baptista M, Mota PC, Tavares R, Amaral S, Gamboa S. Modern Research and Educational Topics in Microscopy. 2007; 394-402.
- Ruiz-Pesini E, Dize C, Lapena AC, Perez-Martoz A, Montoya J, Alvarez E, Arenas J, Lopes-Peres MJ. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry.* 1998; 44:1616-1620.
- Sadler TW. *Langman's Medical Embryology.* 10. Baskı. Lippincott Williams Wilkins, 2006:25-28.
- Sale WS, Satir P. Direction of active sliding of microtübules in Tetrahymena cilia. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1997;74:2045-49.
- Sargin SY, Arpalı E. Spermatogenez. In: Çelik Ö. Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. 1. Baskı. Adana: Adana Nobel Kitapevi; 2011: 63-57.
- Schlegel PN, Hardy MP, Goldstein M. Male Reproductive Physiology. In: Alan W. Partin, Craig A. Peters editors. *Campbell- Walsh Urology.* 9th edition: Saunders Elsevier. 2007 ;581-600.
- Sigman M, Jarow JP. Male infertility. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editors. *Campbell's Urology.* 8th edition. Philadelphia: Saunders; 2004:1475-1531.
- Siegel M.S, Bechtold DS, Willand JL, Polakoski KL. Partial purification and characterization of human sperminogen. *Biol Reprod.* 1987;36(4):8-1063.
- Sigman M, Howards SS: Male infertility. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editors. *Campbell's Urology.* Seventh edition. Philadelphia, Saunders. 1998:1287-1330.
- Speroff L, Fritz MA. "Male infertility, Chapter 30", *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* 8th. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2010: 1266.
- Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Campo PC, Peregrin PC, Freitas A, Paiva A, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *PlosOne.* 2011;6:1-11.
- Sokol RZ. Endocrinology and male infertility. *Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America.* In : Werthman PE, editor. Philadelphia, Saunders. 1999;3:427-434.
- Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(9):5-3671.
- Şeftalioğlu A, Genel İnsan Embriyolojisi, Ankara Üniversitesi Basımevi, 1991, 1. Cilt, Ankara, p: 33-35.
- Tarasova NI, Stauber RH, Choi JK, Hudson EA, Czerwinski G, Miller JL, Pavlakis GN, Michejda CJ, Wank SA. Visualization of G protein-coupled receptor trafficking with the aid of the green

- fluorescent protein. Endocytosis and recycling of cholecystokinin receptor type A. *J Biol Chem.* 1997 ;272(23):24-14817.
- Thomas CA, Garner DL, DeJarnette JM, Marshall CE. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 1997;56(4):8-991.
- Toshimori K. Dynamics of the mammalian sperm head. Berlin Heidelberg: Springer Verlag 2009:1-17.
- Üstün YE. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi. In: Çelik Ö, Editor. Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. 1th ed. Adana: Adana Nobel Kitapevi; 2011. p.129-136.
- Virtanen, I, Badley RA, Paasivuo R, Lehto VP. Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells. *J Cell Biol.* 1984; 99(3):91-1083.
- Yan LH, Xuan HY, Hong Z, Yuan LY, Ying MG, Yue ZQ. Carbon ion irradiation induces reduction of β -tubulin in sperm of pubertal mice. *Biomed Environ Sci.* 2014;27(2):130-133.
- Wagenknecht LV, Lotzin CF, Sommer HJ, Schirrenc. Vas deferns aplasia: Clinical and anatomical features of 90 cases. *Andrologia.* 1983;15:605-613.
- Weiske WH, Salzler N, Schroeder-Printzen I, Weidner W. Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Andrologia.* 2000;32:8- 13.
- Wilton LJ, Temple-Smith PD, Baker HW, de Kretser DM. Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil Steril.* 1988;49(6):8-1052.
- World Health Organization: WHO Laboratory Manuel for The Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, England,Cambridge University Press, 1999.
- World Health Organization. Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. *Ann Ist Super Sanita.* 2001;37:1-123.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
- <http://www.urology-textbook.com/testis-histology.html>) Son erişim tarihi: 12.01.2015.

7. EKLER

Ek-A: Hasta bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

ARAŞTIRMANIN ADI :Oligospermide sperme ait yapısal parametrelerin araştırılması.

Gönüllünün Baş Harfleri <<.....>>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?:

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar vererseniz imzalanmanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Eğer isterseniz, bu çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

WHO (Dünya Sağlık Örgütü)'nün son raporlarına göre: son yıllarda erkeklerde sperm sayısı giderek azalmaktadır. Günümüzde gittikçe artan erkeğe bağlı kısırlıklar yani infertilitenin en önemli nedenlerinden birisi de sperm sayısının normalden az olması yani oligospermidir. Oligospermideye bağlı infertilitede sperme bağlı bazı hücresel yapısal elemanlar (aktin, tübülün), ve yine hücre içinde yer alan küçük mikroskopik organcıklar yani organellere ilişkin (mitokondria ve akrozom/lizozom) verilerin daha detaylı analizi ile bu tabloya neden olan nedenlerin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Çalışmada spermioqram için gelen hastalardan rutin incelemeler sonrası biyo-atık olarak arta kalan sperm örnekleri kullanılacaktır. Alınan spermilerin spermioqram ile alınan sayısal ve yapısal analiz sonuçlarına ilaveten sperme ait bazı hücresel yapısal elemanlar (aktin, tübülün), ve yine hücre içinde yer alan küçük mikroskopik organcıklar yani organelleri (mitokondrionlar ve akrozom/lizozom) mikroskopta inceleyebilmek için ileri işlemleryapılacaktır. Bu amaçla: organcıklar için canlı mitokondri ve lizozom işaretleyicileri

kullanılacak ve daha sonra floresan mikroskopla incelenecektir. Aktin ve tübülün hücre sel yapıları için ise semen yayma preparatları kullanılacaktır. Hazırlanan camlar, bu yapılar için geliştirilen özel boyalar ile işaretlenecek ile özel floresan mikroskopta değerlendirilecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIM NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Çalışmamızda sizin rutin spermiyogram incelemesi sonrası artan biyo-atık konumundaki sperm örneklerinize yer verilecektir. Bu nedenle herhangi bir yan etki,risk veya rahatsızlık teşkil etmemektedir. Size ait şahsi tıbbi bilgileriniz asla paylaşılmayacak olup; sadece elde edilen veriler analiz edilecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Güncel, giderek artan ve önemli bir problemin nedenlerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacak bilimsel bir araştırmaya destek olmak,

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışma amacıyla yapılan normal muayeneniz sırasında istenilen rutin tetkikleriniz dışındaki tüm ileri laboratuvar testleri çalışma destekleyicisi tarafından karşılanacak; size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Yukarıdaki bilgileri doktorumla ayrıntılı olarak tartıştım ve kendisi bütün sorularımı cevapladı. Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllü / Hastanın Adı Soyadı:

İmzası

Tarih

Rıza alım işlemine başından

Sonuna kadar tanıklık eden

Adı Soyadı

Görevi

İmzası

Tarih

Açıklamaları yapan araştırmacının

Adı Soyadı

İmzası

Tarih

Ek-B: Etik kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

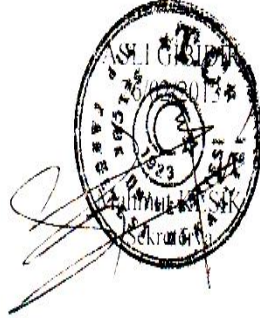
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2013/02

Toplantı Tarihi : 26.02.2013

Karar Sayısı 2013/59 S.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Ender ERDOĞAN'ın, "Oligospermide Sperme Ait Yapısal Parametrelerin Araştırılması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 19.02.2013 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr. Ender ERDOĞAN'ın, "Oligospermide Sperme Ait Yapısal Parametrelerin Araştırılması" adlı araştırmanın kabulüne, BAP desteği alındıktan sonra protokolün dosyaya ilave edilmek üzere Etik Kurul sekretaryasına teslim edilmesine oy birliği ile karar verildi.



8. ÖZGEÇMİŞ

1988 yılı İstanbul doğumludur. İlköğrenimini 2002 yılında İstanbul Faruk Timurtaş ilköğretim okulunda, lise eğitimini ise Yedikule Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2011 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.