



T.C

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İNERTİL BİREYLERDE SPERM SAYISI İLE BAĞLANTILI  
SPERM UZUNLUK ÖLÇÜMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ESRA İBİŞ EFETAŞKIN

DANIŞMAN

Dr.Öğretim Üyesi Nazlı Ece Ordueri

İSTANBUL

2019

**Anabilim Dalı:** Histoloji ve Embriyoloji

**Program Adı:** Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

**Öğrencinin Adı Soyadı:** Esra İBİŞ

**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Ece ORDUERİ

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Esra İBİŞ tarafından hazırlanan "İnfertil Bireylerde Sperm Sayısı İle Bağlantılı Sperm Uzunluk Ölçümlerinin Araştırılması" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:03/07/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Ece ORDUERİ

Biruni Üniversitesi

Doç. Dr. Meriç KARACAN

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Erkan ERDEM

Bilgi Üniversitesi

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

## Beyan

Bu tezin bana ait olduğunu tüm aşamalarında etik dışı bir davranışımın olmadığını içinde yer alan tüm bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, kullanmış olduğum bütün bilgilere kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin yürütülmesi ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ESRA İBİŞ EFETAŞKIN



## II. TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumda desteğini esirgemeyen, mesleğim ve hayata dair tecrübelerinden yararlandığım çok değerli danışman hocam Dr. Nazlı Ece Ordueri hocama sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Okul hayatımın ilk başladığı yıldan itibaren benim yanımda olan maddi manevi desteğini esirgemeyen değerli annem Hacer Atlı'ya teőekkürlerimi sunarım.

Maddi manevi benden desteğini esirgemeyen motivasyonumu sürekli yükselten değerli eşim Ozan Efetaşkın'a teőekkürlerimi sunarım.

ESRA İBİŞ EFETAŞKIN

### III. İÇİNDEKİLER

I.Beyan	iii
II.Teşekkür	iv
III.Kısaltmalar Listesi	vii
IV.Tablo Listesi	viii
V.Şekil Listesi	ix
1. ÖZET ve ANAHTAR KELİMELER	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1 Spermatogenez Süreci	4
4.2 Spermiyogenez ve Kan Testis Bariyeri Düzenleyici Proteinleri İlişkisi	6
4.2.1 Kan testis bariyeri düzenleyici proteinleri ilişkisi	7
4.2.2 Ezrin n-kaderin ve sperm morfolojisi ilişkisi	7
4.3 Erkek İnfertilitesi	8
4.4 DSÖ Kriterleri	9
4.5 Sperm Ölçüm Parametreleri	11
4.5.1 Morfometrik Ölçüm Parametreleri	11
4.5.2 Spermiyograma ek Genetik Ölçüm Parametreleri	12
5. GEREÇ ve YÖNTEM	14
5.1 Semen Karakteristik Analizleri	14
5.2 Sperm Morfolojik Analizleri	14
5.3 Sperm Uzunluk Ölçümleri	15
5.4 İmmunofloresan Analizler	16
6. BULGULAR	18
6.1 İnfertil Bireylere ait Semen Hacim ve Karakteristik Sperm Analizleri	18

6.2 Yüksek Semen Hacmine Sahip İnfertil Bireylerde Morfolojik Boyanma Paterni	18
6.3 Semen Analizi ve Uzunluk Ölçümlerinin İstatistiksel Analizi	20
6.4 Yüksek Semen Hacmine Sahip Olan İnfertil Bireylerde N-kaderin Ekspresyonu ve Lokalizasyonu	21
6.5 Yüksek Semen Hacmine Sahip Olan İnfertil Bireylerde Ezrin Ekspresyonu ve Lokalizasyonu	22
7. TARTIŞMA	24
7.1 Spermiyogenez ve sperm uzunluğu arasındaki ilişki	24
7.2 N-kaderin, ezrin ve sperm ilişkisi	25
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	27
9. KAYNAKÇA	28
10. EKLER	30
Ek 1. Etik Kurul Onayı	30
11. ÖZGEÇMİŞ	31
İntihal Raporu	32

#### IV. KISALTMALAR LİSTESİ

ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
BSA	Brovine Serum Albumin Solusyonu
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
G	Gravite
IF	İmmünofloresan
KTB	Kan Testis Bariyeri
LH	Luteinizan Hormonu
MG	Maygrünwald
N-kaderin	Nöral Kaderin
PBS	Fosfat Buffer Salin Solusyon
PFA	Paraformaldehit
TBS	Tris-Buffer Salin

## V. TABLO LİSTESİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablonun İsmi</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1.</b>	Normal Spermiyogram Parametreleri	11
<b>Tablo 2.</b>	İnfertil Bireylere ait Spermiyogram Analizleri	19
<b>Tablo 3.</b>	İnfertil Bireylere ait Sperm Uzunluk Ölçümleri	21





## VI. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Őeklin İsmi	Sayfa No
Şekil 1.	Spermatogenez Süreci	7
Şekil 2.	Normal Sperm Morfolojisi	13
Şekil 3.	Sperm Yayma İşlemi	16
Şekil 4.	Morfolojik boyama protokolü uygulanmış sperm yayma preparatları	20
Şekil 5.	Morfolojik boyama protokolü uygulanış sperm yayma preparatları	20
Şekil 6.	Sperm baş, boyun ve kuyruk ölçümlerinin yoğun hacimli semen örneklerinde incelenmesi	33
Şekil 7.	Yoğun hacimli semen örneklerinde sperm immünofloresan boyamaları kaderin	35
Şekil 8.	Yoğun hacimli semen örneklerinde sperm immünofloresan boyamaları ezrin	36

## 1. ÖZET ve ANAHTAR KELİMELER

İnfertiliteye sebep olan faktörlerin %40-50 si erkek kaynaklı faktörlerdir. Erkek kaynaklı infertilite tanısında semen analizi yapılmaktadır. Semen analizinde değerlendirilen parametreler arasında ejakülat miktarı, sperm hareketi, total sperm sayısı ve sperm morfolojisi gibi parametreler bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda sperm sayısı ve sperm uzunluğunda infertilite üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu proje ile infertil bireylere ait sperm hacim/uzunluk oranları ve spermiyogenezin fizyolojik sürecinde aktin bağlayıcı protein olan ve bir çapraz bağlayıcı olarak kortikal hücre iskeleti ile plazma membran proteinleri arasında bulunan ezrin ile bir transmembran glikoprotein olan N-kaderin lokalizasyonlarının araştırılması hedeflenmiştir. İnfertil bireylerden alınan semen örnekleri sperm yayma ve fiksasyonu işlemi sonrasında boyama yapılarak mikroskop altında incelenmiştir. N= 12 infertil bireyde hacim/uzunluk oranları tespit edildi ve sperm sayımı gerçekleştirilen sperm yayma preparatları Kruger Kriterlerine göre incelendi ve uzunluk ölçümleri gerçekleştirildi. İmmünofloresan boyama ile ezrin ve N-kaderin lokalizasyon ve ekspresyon parametrelerine bakıldı. İstatistiksel analizler ile morfolojik parametreleri benzer olan hastaların sperm uzunluklarının hacim yoğunluklarına oranla azaldığı ve sperm uzunluğunun sperm sayısı ile arasında anlamlı bir korelasyon olduğu tespit edildi. Sperm kuyruk uzunluğu anomalisinin infertilite üzerinde etkin bir durum olduğu ancak ezrin boyun bölgesi ekspresyonlarında infertil bireyler arası şiddetinde fark olduğu tespit edildi. N-kaderin protein ekspresyonu ise yine infertil bireyler arasında farklı ekspresyon derecesine sahip olduğu gözlenmekle orta parçada lokalize olduğu gösterildi. Sperm sayısı/hacim ve sperm uzunluk oranlarının infertil bireylerde spermiyogenezin fizyolojik sürecinde bağlı olarak gelişebileceği ilk kez bu proje ile gösterilmiş olup, sperm morfolojik özelliklerinin semen hacmi ile ilişkili olabileceği ve infertil bireylerde belirli fonksiyonel proteinlerin tespitinin gerçekleşmesine yönelik çalışmaların gerekliliği vurgulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Erkek infertilitesi, semen analizi, sperm uzunluğu, ezrin, n-kaderin

## 2. ABSTRACT

### **Investigation of sperm length measurements related to sperm count in infertility individuals**

Infertility, which is commonly observed today, affects approximately 15% of couples, its incidence is increasing day by day. Infertility are factors that cause 40-50% of the male factors. Semen analysis is performed in the diagnosis of male infertility. The parameters evaluated in semen analysis include criteria such as amount of ejaculate, sperm motility, total sperm count and sperm morphology. As a result of the researches, it was determined that sperm count and sperm length had an effect on infertility. The aim of this project was to investigate the sperm volume/length ratios of infertility individuals and N-cadherin localizations, which are the actin binding protein in the process of spermiogenesis, and ezrin, which are between the cortical cell skeleton and plasma membrane proteins, as a cross-linker. Semen samples taken from infertile individuals examined by microscopy after staining and fixation. The volume/length ratios of the 12 infertile individuals were calculated and semen smears were examined as sperm smear preparations according to Kruger Criteria. Sperm length measurements were performed for each group and localization and expression parameters of ezrin and N-cadherin were examined by immunofluorescence staining. There was a significant correlation between sperm length and sperm count and sperm length was decreased with similar morphological features. Infertility of the sperm tail length anomaly is clearly active, but there is a difference in the severity of infertile individuals in the expression of the neck part of the ezrin. N-cadherin protein expression was shown to be localized in the middle part, which still enjoys different degrees of expression among infertile individuals. It has been shown for the first time that sperm count/volume and sperm length ratios may develop depending on the process of spermiogenesis in infertile individuals, it is emphasized that sperm morphological features may be related to semen volume and necessity of studies for the detection of certain functional proteins in infertile individuals is emphasized.

**Key Words:** Male infertility, semen analysis, sperm length, ezrin, N-cadherin

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite günümüzde yaygın olarak görülen gebelik sağlanamaması durumu olarak tanımlanır. İnfertilite her 6 çiftten 1'ini ilgilendiren önemli bir toplum sağlığı sorunudur. Yapılan istatistiklere göre dünyada yaklaşık 72.4 milyon çiftin fertilité sorunu yaşadığı belirlenmiştir. Vakaların %40-50 oranında sperm kaynaklı olduğu belirlenmiştir. (Lindsay and Vitrikas, 2015).

Erkek infertilitesinin nedenleri konjenital veya edinsel ürogenital anomaliler, genetik ve immünolojik faktörler, endokrin bozukluklar, genital sistem enfeksiyonları ve erektil disfonksiyonu içermektedir. Bu faktörlerin alt gruplandırılmasında ise pretestiküler, testiküler ve posttestiküler nedenler şeklinde sınıflandırma yapılabilir. İlk değerlendirmede ayrıntılı bir anamnez ve çiftin tam fizik muayenesi esastır. Sonraki basamakta ise semen analizi ve görüntölme yöntemi ile hasta değerlendirilmesi yapılır. Erkek infertilitesi çoğunlukla semen yetersizliği ve semen kalitesine bağlıdır. Semen analizi erkek semeninin belirli özellikleri ve semenin içerdii sperm değerlendirir. Semen analizi Dünya Sağlık Örgütünün yayınladığı son parametrelerine göre değerlendirilir.

Semen örneği incelemesi yapılırken; semen rengine, viskozitesine, likefaksiyonuna, yoğunluğu, Ph'ına ve morfolojisi gibi parametreler değerlendirilir. Sperm morfolojisine bakıldığında kuyruk uzunluğu, kuyruk anomalisi, baş anomalisi gibi ölçütler değerlendirilir.

Bu çalışmada amaç infertil bireylerin sperm uzunlukları ile sperm sayısı arasında ki bağlantıyı deneysel olarak kanıtlamaktır. Bu proje ile infertil bireylere ait sperm hacim/uzunluk oranları ve spermiyogenezin fizyolojik sürecinde aktin bağlayıcı protein olan ve bir çapraz bağlayıcı olarak kortikal hücre iskeleti ile plazma membran proteinleri arasında bulunan ezrin ile bir transmembran glikoprotein olan N-kaderin lokalizasyonlarının araştırılması hedeflenmiştir.

## 4. GENEL BİLGİLER

İnfertilite çiftlerin bir yıl süre korunmaksızın düzenli cinsel ilişkide bulunmasına rağmen gebe kalamamasıdır. İnfertilite son yapılan çalışmalara göre evli çiftlerin yaygın bir sorunu haline gelmiştir. Çiftlerin fertilite sorunu değerlendirildiğinde yarısından fazlasının erkek kaynaklı olduğu bilinmektedir. Fertilite sorunu yaşayan bireylerde fiziksel muayene ardından semen analizi yapılmaktadır. Semen analizinde; ejakülat miktarı, total sperm sayısı, yoğunluk gibi parametrelere bakılmaktadır.

Fertilite sorunu yaşayan hastalarda fiziksel muayene ardından semen analizi yapılmaktadır. Semen analizinde; ejakülat miktarı, total sperm sayısı, yoğunluk gibi ölçütlere bakılmaktadır. Bu ölçütler Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği parametrelere göre karşılaştırma yapılarak değerlendirme yapılır.

Semen analizi yapılan hastaların analiz yapılan parametre değerleri beraber değerlendirilerek tanıya varılmaktadır. Bu parametreler arasında bir bağlantı bulunduğu kanıtlanmıştır. Sperm baş, boyun ve kuyruk uzunluklarının sperm sayısı ile arasında zıt bir korelasyon olduğu deneysel olarak belirlendi.

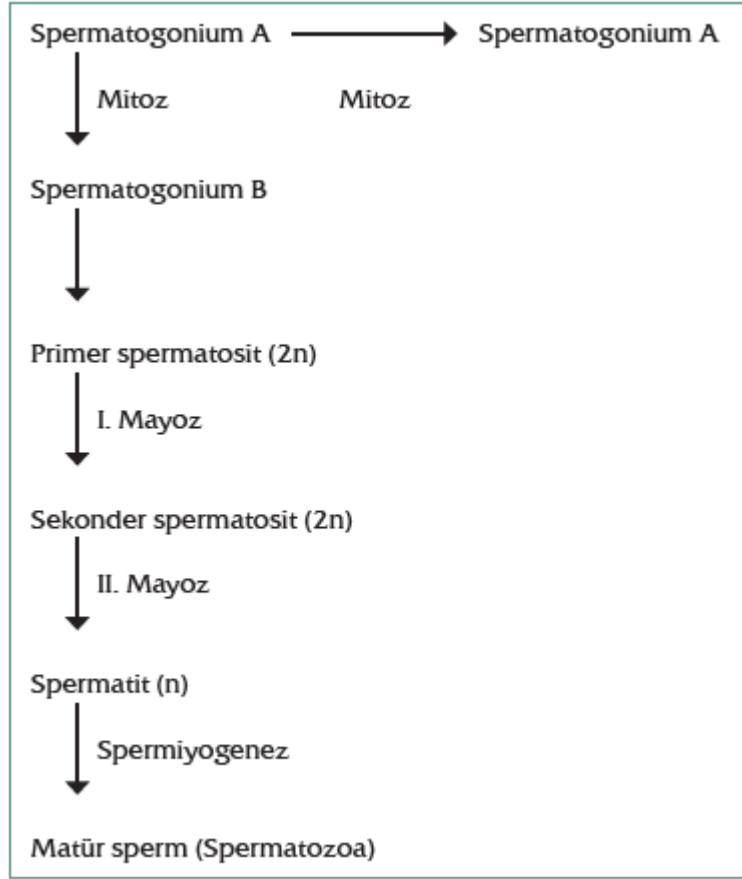
### 4.1 Spermatogenez Süreci

Spermatogenez aktif cinsel yaşam süresince ön hipofiz gonodotropik hormonların uyarısı sonucunda testislerdeki seminifer tüplerde gerçekleşen matür sperm oluşması olayıdır. Spermatogenez puberte ile başlar ve yaşlanma ile birlikte hızı yavaşlar.

Matür sperm spermatogoniumun germ hücrelerinden oluşmaktadır. Bu süreç spermatogoniumların mitoz ile çoğalma aşaması olan spermatositogenez spermatogoniumun mayoz bölünme ile DNA yapısının yarıya düştüğü aşamadan ve spermiyogenezden oluşur. Spermiyogenez spermin matür hale ulaştığı aşamadır. (Hai et al., 2014)

Testiste germ hücreleri ile birlikte peritübüler myleoid hücreler ve Sertoli hücreleri bulunmaktadır. (Vogl et al., 1985)

Spermatogenezde testis hormonu olan testesteron ile hipofiz hormonları olan FSH, LH ve androjen taşıyıcı proteinlerin rolü vardır. FSH spermatogenezin başlatılması, LH ve testesteron hormonu ise sürekliliği için gereklidir. (O'shaughnessy et al., 2010)



Şekil 1. Spermatojeniz Süreci (Doğantekin ve Özcan, 2016)

Spermatojeniz sonucunda oluşan spermatozoidlerin spermatozoonlara dönüşebilmek için geçirdiği değişimlerin tümüne Spermijogenez denir. Spermijogenez sonucunda olgun sperm üretilir. Spermijogenez 4 evrede gerçekleşir. Bu evreler; golgi evresi, şapka evresi, akrozom evresi ve olgunlaşma evresi.

**Golgi Evresi:** Spermatozoidin sitoplazması; golgi cisimciği, mitokondriyonlar, bir sentriol ve düz endoplazmik retikulum tübüllerini içerir. Spermatozoidin endoplazmik retikulumunda üretilen hidrolitik enzimler golgi cisimciğine iletilip, çeşitli değişiklikler geçirerek golgi cisimciğinin trans yüzünden proakrozomal granüller halinde salınır. Bu granüllerin birleşmesiyle oluşan akrozomal veziküller, çekirdek zarına yapışık halde olup, aynı spermın ön kutbunu belirler. Bu evrede sentrioller, çekirdek bölgesinden uzaklaşırlar. Bir tanesi flagellumun aksonemini oluşturmak üzere akrozomal bölgenin karşı kutbunda konumlanır.

**Şapka Evresi:** Akrozomal vezikül genişleyerek büyür, çekirdekle temas ettiği yerden başlayarak, çekirdeğin ön kısmını yarıya kadar bir başlık gibi sarar. Akrozomal vezikül son büyüklüğüne ulaştığında hidrolitik enzimleri içeren akrozom adını alır.

**Akrozom Evresi:** Özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom içerisinde hyalürodinaz, akrozin, nöraminidaz, asit fostataz ve tripsin benzeri proteazlar gibi hidrolitik enzimler yer alır. Oosit plazma membranı ile sperm dış akrozomal membranının birleşmesiyle ekzositoz sonucu hidrolitik veziküller dış ortama salınır.

Hyalüronidaz, spermin korona radiata tabakasına geçmesini sağlarken, akrozin ve tripsin benzeri proteazlar ise zona pellusidayı eriterek, akrozom reaksiyonu olarak bilinen fertilizasyonun ilk basamağının gerçekleşmesini sağlar. Çekirdeğin distalinde ki sentriolden çıkan mikrotübüller, flagellumu oluşturacak olan aksonemi meydana getirir. Mitokondriyonların, flagellum proksimal parçasını çevrelemesiyle, spermatozoon hareketliliğini sağlayan sperm orta parçası oluşur.

**Olgunlaşma Evresi:** Spermatidlerin arasındaki protoplazmik köprülerin ortadan kalkmasıyla oluşan atık cisimcik adı verilen fazla sitoplazmik kısımlar, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler. Spermatitteki değişiklikler sonucu; seminiferöz tübül lümenine atılan ancak hareket ve dölleme yetenekleri olmayan, türe has genetik özellikleri taşıyan olgun spermatozoonlar gelişir (Zülfikaroğlu vd., 2010)

#### **4.2 Spermijenez ve Kan Testis Bariyeri Düzenleyici Proteinleri İlişkisi**

Spermijenez olgun sperm üretme evresidir. Bu işlem için önce spermatozoon gövdesinin ve nükleer maddenin olgunlaşması gerekir. Spermatozoonun olgunlaşması, orta parçanın kalınlaşması ve mikrotübül ile aksonem gelişimi ve hücrenin sentiyollerden birinden flagellum oluşumunu içerir. Spermijenez aşamasında birçok görevli molekül vardır.

Kan-doku bariyeri vücuttaki otoimmünojenik ya da yabancı antijenlerin immün cevapları indüklemeye tolere edilmesini sağlamaktadır. Bu bariyerlere örnek olarak; kan-beyin bariyeri, kan-oküler bariyeri, kan-timus bariyeri, gastrointestinal bariyer, kan-testis bariyeri ve kan-epididimis bariyeri verilebilir. (Franca et al., 2013)

Testisin immünolojik olarak ayrıcalıklı olmasının nedeninin, olgunlaşan germ hücrelerini korumak olduğu düşünülmektedir. Çünkü olgunlaşan germ hücreleri yeni oluşan yüzey antijenlerine sahiptir ve bu hücreler immün sistem tarafından

saptandıkları takdirde yok edilebilirler. Kan-testis bariyeri seminifer tübüllerde immünolojik olarak ayrıcalıklı bir ortamın oluşmasına katkıda bulunur. Bu bariyeri yalnızca epitelial sıkı bağlantı bileşeninin oluşturduğu bilinmektedir (Cheng and Mruk, 2012)

Epididimis gibi testiküler olmayan kutuplaşmış epitel hücrelerinde sıkı bağlantılar apikal yüzeye yakın plazmalemma kısmında çevresel bir kuşak şeklinde oluştururlar. Fakat sıkı bağlantılar seminifer tübül epitelinde Sertoli hücreleri arası bazal membrana yakın çevresel bir kuşak şeklinde oluşmaktadır (Wong and Cheng., 2009)

#### **4.2.1 Kan testis bariyeri düzenleyici proteinleri ilişkisi**

ERM ailesi (ezrin/radixin/marlin) yakından ilgili 3 proteinden oluşur. Ezrin bir çapraz bağlayıcı olarak kortikal hücre iskeleti ile membran proteinleri arasında bulunur ve ERM ailesinin en önemli üyesi olarak tanımlanır. Ezrin plazma membranı altında yoğun paketlenmiş bölgeleri içeren aktin filamentler ve hücresel yapı, mikrovilli, hücre-hücre adezyon bölgelerine özgü olduğu belirlenmiştir (Wang et al., 2010).

Kaderinler hücre-hücre adezyon molekül ailesine ait Ca bağımlı adezyon ve sinyalizasyona etkili transmembran glikoproteindir. Klasik kaderinler başlangıçta memelilerde izole edildi ve köken aldıkları dokuya göre isimlendirildi. Bunlar; epitel kaderin (e-kaderin) ve nöral kaderin (n-kaderin). N-kaderin ilk olarak nöral hücrelerde ifade edilen hücre adezyon molekülü olarak tespit edildi fakat aynı zamanda çeşitli dokularda da bulunduğu kanıtlandı. Klasik kaderinlere benzer şekilde N-kaderin; embriyonik gelişim, implantasyon, doku oluşumu ve doku bütünlüğüne dahil olduğu belirlendi. N-kaderin ekspresyonu insan reproduktif dokularında, ovaryum, uterus, oviduct, meme bezinde, testiste varlığı kanıtlanmıştır (Marin-Briggiler et al., 2010).

#### **4.2.2 Ezrin n-kaderin ve sperm morfolojisi ilişkisi**

Ezrin bir çapraz bağlayıcı olarak kortikal hücre iskeleti ile plazma membran proteinleri arasında bulunur ve membran yüzey yapısına katkıda bulunur. Yapılan çalışmalar insan testisinde ezrin ekspresyonunun varlığını göstermiştir. Ezrin plazma zarının yeniden şekillenmesi ile görevli olarak proteindir ve insan spermde bulunup kapasitasyonda görevlidir (Wang et al., 2010).

N-kaderin kalsiyum bağımlı hücre-hücre yapışması ve hücre içi sinyalde görevli transmembran glikoproteindir. İnsan gonad ve gametlerinde n-kaderin ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalarda n-kaderin sübselüler lokalizasyonu ve dölleme ile



ilişkisi belirlenmiştir. N-kaderin gamet etkileşimi ile ilgili hücresele bölgelerde lokalize edilmiş testis kökenli bir sperm proteini olarak belirlenmiştir. Görev olarak sperm-zona pellisuda etkileşimine katılmaz ancak sperm-oolemma adezyon ve füzyon olaylarında görevlidir (Marin-Briggiler et al., 2010).

### **4.3 Erkek İnfertilitesi**

Fertilite sorunu yaşayan çiftlerin %50 sinden fazlası erkek kaynaklıdır. Reprodüktif yaşta ki erkeklerin %6 'sında fertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Bu olguların yaklaşık %90'ında bozulmuş spermatogenez vardır. Normalde fertil bir erkek günde 120 milyon sperm üretmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından evli infertil çiftler üzerinde, infertilite nedenine göre yapılan bir çalışmada %41 oranında kadın, %24 oranında erkek, %24 oranında kadın ile erkek beraber infertilite nedeni iken %11 inde de bir neden gösterilememiştir. Burada da anlaşılacağı gibi evli infertil çiftlerin %48 inde mutlaka erkek faktörü bulunmaktadır.

Erkek infertilitesi değerlendirilirken tıbbi ve üreme öyküsü, bir ürolog ya da bu konuda uzman kişi tarafından yapılmış fizik muayene ve en az iki semen analizi gereklidir. Sonuca göre ek testler istenilebilir. Bu testler; semen analizi, idrar analizi, ultrasonografi, sperm ile ilgili özel testler ve genetik tarama testleridir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün parametrelerine göre standart semen analizi yapılmaktadır. Semen analizinin sonuçlarını etkileyen bazı faktörler bulunmaktadır. Bu faktörler; ejakülatın toplanması, aksesuar bezlerinin aktivitesi, cinsel perhiz süresi ve testis boyutları gibi faktörlerdir (Barrat et al., 2017).

Semen analizi için örnek en az 2 günlük cinsel perhiz sonrasında alınmalıdır ancak cinsel perhiz süresi 7 günü geçmemelidir.

Semen analizi yapılırken ilk aşama alınan örneğin likefiye olması için inkübatöre ya da tezgaha yerleştirilmelidir. Daha sonrasında 30-60 dakika arasında; semen görünümünün ve likefaksiyonuna değerlendirilmesi, semen hacminin ölçülmesi, semen pH'ının ölçülmesi, sperm canlılığının değerlendirilmesi, sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için preparat hazırlanması, sperm sayısının değerlendirilmesidir (Gu, 2014).

İlk mikroskopik incelemede likefaksiyondan hemen sonra ya da ejakülasyondan sonra ki 30 dakika ile 1 saat içerisinde semenin gözlemlenmesi ile analize başlanmalıdır. Sperm morfolojisi değerlendirilmesi ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ya da farklı boyama teknikleri kullanılarak yapılmaktadır. Semen analizi yapılırken sperm hücrelerinin hangi bölgesine spesifik olarak gözlemlenmek isteniyorsa, spesifik olarak o bölgeyi boyayan boya kullanılmalıdır. Bu boyama teknikleri Giemsa, Hematoksilen boya, Toluidin blue-pironin, Maygrünwald ve Nigrosin-eosin gibi tekniklerdir.

Semen analizinde renk, koku, pH, viskozite, aglütinasyon, ileri hızlı hareketli, yerinde hareketli, hareketsiz, normal, baş anomalisi, gövde anomalisi, kuyruk anomalisi, volüm, likefaksiyon, tüm ejakülat, yuvarlak hücre gibi kriterler değerlendirilir. Bu parametreler değerlendirilmesi yapıldıktan sonra hastanın tedavisi için yol izlenir (Rothmann et al., 2013).

#### **4.4 DSÖ Kriterleri**

Fertilite sorunu yaşayan bireylere semen analizi yapıldıktan sonra, spermatazoanın morfolojik tespiti için birkaç parametre kullanılmaktadır. Bu parametreler arasında en çok kullanılan DSÖ parametreleridir.

Semen incelemelerinin standardizasyonuna duyulan ihtiyaç nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü ilk kez 1980 ' den başlayarak belirli aralıklarla insan semeni ve insan semeni servikal mukus etkileşimlerinin incelenmesi için bir laboratuvar el kitabı yayınlamıştır. Fertilite sorunu yaşayan çiftlere uygulanan semen analizinin en önemli kısmı mikroskopik incelemeyi oluşturmaktadır. Mikroskopik değerlendirme sonucunda spermogram DSÖ parametrelerine göre değerlendirilir (WHO, 2010).

**Tablo 1.** Normal Spermiyogram Parametreleri

Parametreler	Normal Değer
Semen yoğunluğu (ml)	1.5
Total sperm sayısı	39 milyon
Sperm konsantrasyonu	15 milyon /ml
Total motilite	40 (%)
Progressive motilite	32 (%)
Vitalite	58 canlı sperm (%)
Sperm morfolojisi	4 normal formlar (%)
Ph	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit	<1.0 milyon/ml
MAR testi	<50 (%)
Immunobead test	< 50 (%)
Seminal çinko	>2.4 (umol/ejakülat)
Seminal fruktoz	>13 (umol/ejakülat)
Seminal nötral glikozidaz	29 (mU/ejakülat)

Mikroskopik inceleme sperm sayısı, hareketliliği, yuvarlak hücre sayısı, aglütinasyon varsa derecelendirilmesi, morfoloji ve yuvarlak hücrelerin sınıflandırılmasını içerir. Sperm morfoloji incelemesi yapılırken Kruger ve DSÖ parametrelerine göre yorumlanır. DSÖ parametrelerine göre spermin en az %30'unun morfolojisinin normal olması gereklidir. Morfolojik değerlendirme için en az 100 sperm hücresi en fazla 200 sperm hücresine bakılıp analizi yapılmalıdır. İmmersiyon merceği kullanılmalıdır, anormal sperm formları baş, ana parça ve kuyruk anomalilerini içerir. (Gökçe, 2011)

#### **4.5 Sperm Ölçüm Parametreleri**

Fertilite sorunu yaşayan bireylerde fiziksel muayene ardından spermiyogram yapılmaktadır. Spermiyogramda semene ait karakteristik özelliklere bakılır ve sorunun bu parametrelere bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini belirler. İnfertilite temeli morfoloji veya genetik kaynaklı olabilir.

##### **4.5.1 Morfometrik Ölçüm Parametreleri**

Rutin semen analizinde morfoloji spermın fiziksel özelliklerinin görsel olarak değerlendirilmesidir. Sağlıklı bir bireye ait sperm hücresi baş, boyun ve kuyruk olarak 3 bölümden oluşur.

Baş bölgesi akrozom, hücre zarı ve nükleus bulunur. Boyun bölgesinde sentrioller ve mitokondri bulunur. Sperm morfolojisi değerlendirilirken incelecek olan bölgelere özgül boya kullanılması önerilmektedir. Normal bir spermın morfoloji özellikleri Kruger ve DSÖ parametreleri ile belirlenmiştir. DSÖ parametrelerine göre spermın en az %30'unun morfolojisinin iyi olması gereklidir. Belirlenen parametrelere göre baş uzunluğu 5-6 um genişliği ise 2,5-3,5 mikron olmalıdır. Akrozom başın %40-70 ini oluşturmaktadır. Orta parçanın genişliği 1 mikron uzunluğu ise 1.5x baş uzunluğu olmalıdır. Kuyruk boyu yaklaşık 45 mikron metre

Orta parçadan daha ince, kıvrılmış, kırık içermeyen boyun yaklaşık 45 mikron olmalıdır. (Erdemir vd., 2011)



Şekil 2. Normal Sperm Morfolojisi

#### 4.5.2 Spermiyograma ek Genetik Ölçüm Parametreleri

Erkek infertilitesi etiolojisinde hormonal bozukluklar, ürogenital bozukluklar, cinsel problemler, spermatogenez sürecinde ki bozukluklar ve genetik nedenler temel rol oynar.

Genetik faktörler 4 ana başlık altında toplanabilir. Sperm fonksiyonlarını bozan genetik hastalıklar;

- 1) Doğumsal duktus agnezi yapan kistik fibroz gen mutasyonları
- 2) İzole spermatogenez defekti yapabilen Y kromozom mikrolelesyonları
- 3) İzole spermatogenez defekti yapabilen Y kromozom mikrolelesyonları
- 4) İzole spermatogenez defekti yapabilen Y kromozom mikrolelesyonları (Kalaycı Yiğın ve Gökçe, 2016).

Spermatogenez primordial germ hücrelerinden sperm üretimiyle sonuçlanan kompleks bir süreçtir. Bu süreçte hem kromozomal seviyede meydana gelen ve yapısal bozukluklar hem de gen düzeyinde oluşan mutasyonlar infertiliteye sebep olabilir. Bunların arasında Y kromozomunu etkileyen germ hücrelerinin gelişimi ve devamlılığının düzenlenmesinde sorumlu olduğu temel rol oynar (Lahn and Page, 1997).

Genetik hastalıkların dışında herhangi bir genin normalden fazla ya da az olarak eksprese edilmesi sperm ölçüm parametrelerini etkileyerek infertiliteye sebep olmaktadır.

Bu durumlar göz önünde bulundurulduğunda fertilite sorunu yaşayan bireylerin infertilite nedeni genetik kaynaklı olabilmekte genetik analiz yapılması önerilmektedir.



## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

Materyal ve yöntem semen karakteristik analizleri, sperm uzunluk ölçümleri, sperm morfolojik analizleri ve immüno Floresan analizler olarak gerçekleştirilmiştir.

### 5.1 Semen Karakteristik Analizleri

Üzerinde çalışılan 12 hastaya semen analizi gerçekleştirilmiş ve karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Bu analizler; renk, koku, pH, viskozite, aglütinasyon, ileri hızlı hareketli, yerinde hızlı hareketli, hareketsiz, normal, baş anomalisi, gövde anomalisi, kuyruk anomalisi, yoğunluk, likefaksiyon, tüm ejakülat, 1 cc ve yuvarlak hücre parametreleri her hasta için analiz edilmiştir

### 5.2 Sperm Morfolojik Analizleri

#### Kullanılan malzemeler

- Karıştırıcı
- Mikropipet
- Lam
- Lamel
- Pastör Pipeti
- Maygrünwald boyası
- Giemsa boyası
- Saf su

Semen morfolojik değerlendirilmesinde sperm yayma ve boyama işlemi yapılır. İlk aşama sperm yayma aşamasıdır daha sonra ki aşama ise boyama işlemidir.

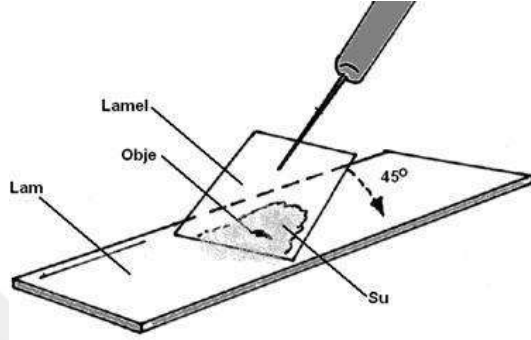
Sperm yayma işlemi şu şekilde yapılır;

1) Numune soğukta bekletildiyse işleme başlamadan önce semen örneği eritildi. Eritme işlemi tamamlandıktan sonra semen örneği karıştırıldı.

2) Karıştırılan numunedan sperm konsantrasyonuna göre 5-10 ul lam üzerine alındı.

3) 45 derecelik açı ile en az iki yayma yapıldı.

4) Yayma havada 20 dakika kurutulur ve daha sonra boyama işlemine geçildi.



**Şekil 3.** Sperm Yayma İşlemi

Lama yayılan semenin tamamen kurduğundan emin olduktan sonra boyama işlemine geçilir. Sperm boyama işlemi şu şekilde gerçekleşir;

- 1) Lamda kuruyan semen üzerine Maygrünwald boyası pastör pipetiyle damlatıldı. 4 dakika bekletildi
- 2) Preparat çeşme suyunda eğik bir şekilde tutularak hafifçe yıkandı.
- 3) Giemsa boyası aynı şekilde preparatlar üzerine damlatıldı ve 7 dk bekletildi.
- 4) Eğik bir şekilde çeşme suyu altında tekrar yıkandı.

### 5.3 Sperm Uzunluk Ölçümleri

#### Kullanılan cihaz ve malzemeler

- Nikon ışık mikroskobu
- Nikon DSL programı



Boya işleminden sonra preparatlara 40X' te görüntüleme yapıldı. Mikroskop altında görüntülemesi yapılan hücrelerin; baş, boyun ve kuyruk uzunlukları ölçüldü ve bu uzunlukların DSÖ Kriterlerinin belirlediği referans değerlerine göre analizi yapıldı.

#### 5.4 İmmüno Floresan Analizler

##### Kullanılan malzemeler

- Mikropipet
- Ependorf (1.5 ml)
- Saf su
- Santrifüj Makinesi
- PBS (1X)
- Tris Buffer (1X)
- Proteinaz k
- BSA
- %4'lük formaldehit
- % 0.4'lük Triton-X
- Ezrin antikoru
- N-kaderin antikoru

Semen örneklerinde ezrin ve N-kaderin immünolokalizasyonuna bakmak için immüno floresan analiz yapıldı. Semen örneklerini oda ısısında beklettikten sonra aşağıda verilen protokol uygulandı.

- 1) Alınan semen örneklerine eritme işlemi uygulandıktan sonra ependorfa 150 ul örnek ve 150 ul 1:1 oranında PBS eklenerek 800 g ' de 5 dk. Santrifüj edildi.
- 2) Süpernatant atıldıktan sonra oluşan pelletler 100 ul PBS ile tekrar süspanse edildi.
- 3) 100 ul PBS ile süspanse edilmiş pelletler lama sperm yayma metoduyla lamel yardımı ile yayıldı. Hazırlanan preparatlar kuruması için 1 saat bekletildi.
- 4) Preparatlar 1X Tris Buffer içerisinde bekletilen 10 mM proteinaz k ile nemli ortamda 2 saat inkübe edildi.
- 5) Nemli ortamda inkübe edilen slaytlar %4 formaldehit ile 1 saat fikse edildi

- 6) 2 ml triton 0.1 ml BSA damlatılarak 15 dk bekletildi.
- 7) Preparatlarda bölgeler işaretlenerek hazırlanan antikorlarda 1 gece boyunca bekletildi. (ezrin, n-kaderin)
- 8) Preparatlar PBS ile yıkandı 2% Triton X-100 damlatılarak 15 dakika bekletildi.
- 9) Oda ısısında 2 saat inkübe edildi.
- 10) Hazırlanan preparatlar mikroskopta incelendi.
- 11) İmmünofloresan mikroskop ile fotoğraflandı (Poplonska et al., 2007)



## 6. BULGULAR

### 6.1 İnfertil Bireylere ait Semen Hacim ve Karakteristik Sperm Analizleri

Semen analizleri gerçekleştirilen infertil bireylerde DSÖ parametrelerine göre hacimsel ve morfolojik özellikleri izlenen ve yoğun hacimdeki hastaların değerlendirildiği sayısal değerler Tablo 2 'de sunulmuştur. Örneklerden 8,10,11 ve 12 'de diğer infertil bireylere göre 1 cc 'de olması gerekenden daha yüksek hacim tespit edilmiştir. (\*:  $p<0.05$ )

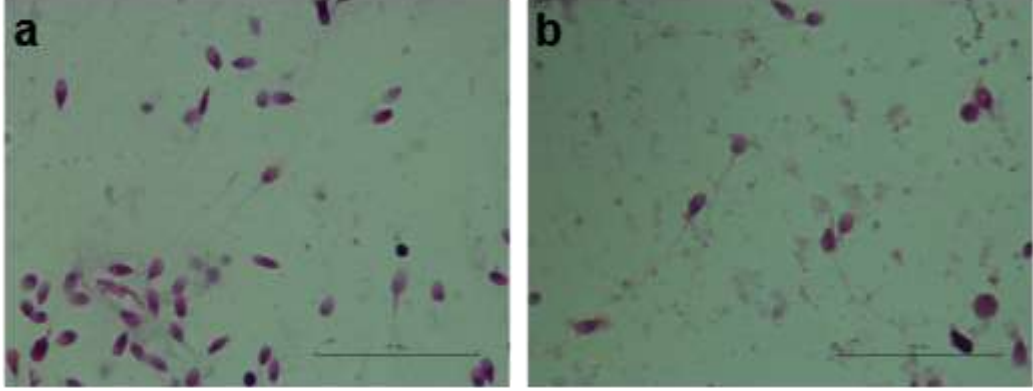
**Tablo 2.** İnfertil Bireylere ait Spermiyogram Analizleri

Örnek numaraları	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Parametreler												
Renk	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak
Koku	Özgün	Özgün	Özgün	Özgün	Özgün	Özgün	Özgün	Özgün	Özgün	Özgün	Özgün	Özgün
Ph	8	7,5	7	8	8,5	8	7	8	8,5	8	8	8
İleri Hızlı Hareketli	50	4	37	54	33	62	75	53	55	55	30	54
Yerinde Hareketli	10	3	12	1	15		1	1	7	1	2	1
Hareketsiz	40	93	51	45	52	37	24	46	38	43	68	45
Normal	2	1	1	46	37	35	58	40	25	50	45	36
Baş Anomalisi	78	92	81	32	19	26	22	40	65	34	15	43
Gövde Anomalisi	8	5	12	10	9	13	7	8	3	10	10	9
Kuyruk Anomalisi	12	2	6	12	35	26	13	22	7	16	30	12
Volüm	4	4,5	9	2,5	1	2,5	7	3	3	2	5	1,5
Likefaksiyon	45	30	-	35	35	40	25	40	-	-	-	40
Tüm ejakülat	192	13,5	153	137,5	35	75	476	249	135	240	355	130
1 cc	48	3	17	55	35	30	68	83*	45	120*	71*	87*

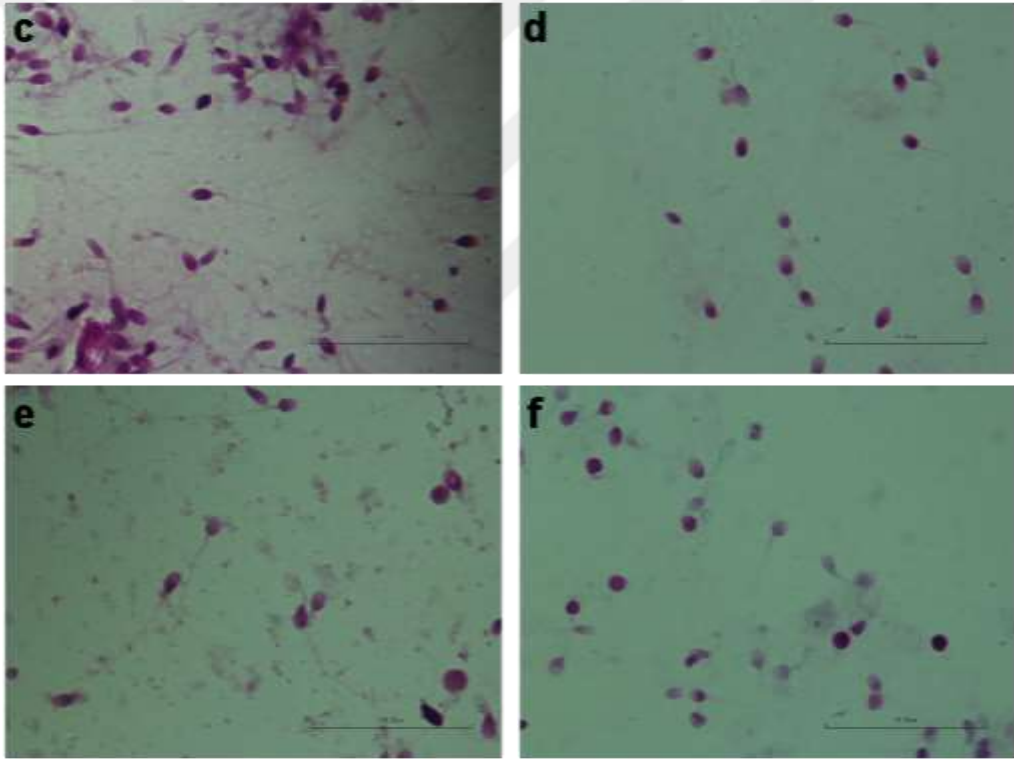
### 6.2 Yüksek Semen Hacmine Sahip İnfertil Bireylerde Morfolojik Boyanma Paterni

Tablo 2' de tespit edilen infertil bireylerde hacimsel analizlere ek olarak DSÖ parametrelerine özgün morfolojik değişimler izlenmiş ve kontrol bireylere göre (Şekil 4a-4b) olarak izlenen hacimsel yoğunluğun olduğu semen örneklerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

(\*:  $p<0.05$ )



**Şekil 4.** Morfolojik boyama protokolü uygulanmış sperm yayma preparatları. a ve b; kontrol grup. (fertil birey)

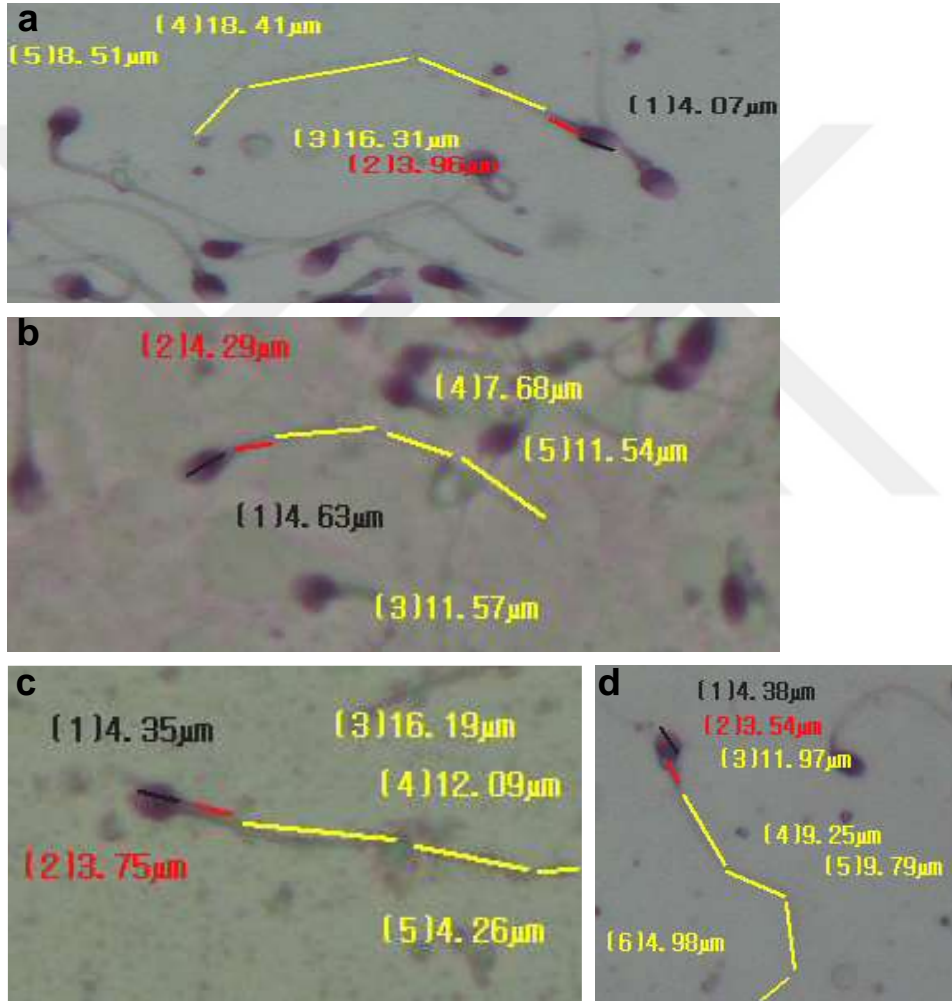


**Şekil 5.** Morfolojik boyama protokolü uygulanmış sperm yayma preparatları c; örnek 8, d; örnek no 10, e; örnek no 11, d; örnek no 12.

Fotoğraflar 40x büyütme ile gösterilmektedir. Skala bar: 50 um.

### 6.3 Yüksek Semen Hacmine Sahip İnfertil Bireylerde Sperm Uzunluk Ölçümleri

Şekil 3’de sperm yayma tekniği ile tespit edilen sperm genel morfolojilerine ek olarak infertil bireylerde sperm uzunluk ölçümleri gerçekleştirilmiş (Şekil 6) ve sayısal değerleri Tablo 3’de sunulmuştur. Kontrol bireylere göre (Şekil 6a ve 6b) olarak izlenen hacimsel yoğunluğun olduğu sperm uzunluklarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (\*;  $p < 0.05$ )



Şekil 6. Sperm baş, boyun ve kuyruk ölçümlerinin yoğun hacimli semen örneklerinde incelenmesi a; örnek no;8, b; örnek no;10, c; örnek no;11, d; örnek no;12. Fotoğraflar 40x büyütme ile gösterilmektedir.

#### 6.4 Semen Analizi ve Uzunluk Ölçümlerinin İstatistiksel Analizi

Hacim yoğunluğu tespit edilen infertil bireylerde sperm sayısı ve iyi morfolojide ki sperm uzunlukları arasında zıt korelasyon olduğu tespit edildi. Sperm sayısı fazla olan bireylerde sperm uzunluklarının daha kısa olduğu tespit edildi. Sperm olgunlaşma sürecinde önemli olduğu bilinen boyun ve kuyruk uzunluklarının yüksek hacimli semen analizlerinde düşük olduğu tespit edildi. (\*;  $p < 0.05$ ).

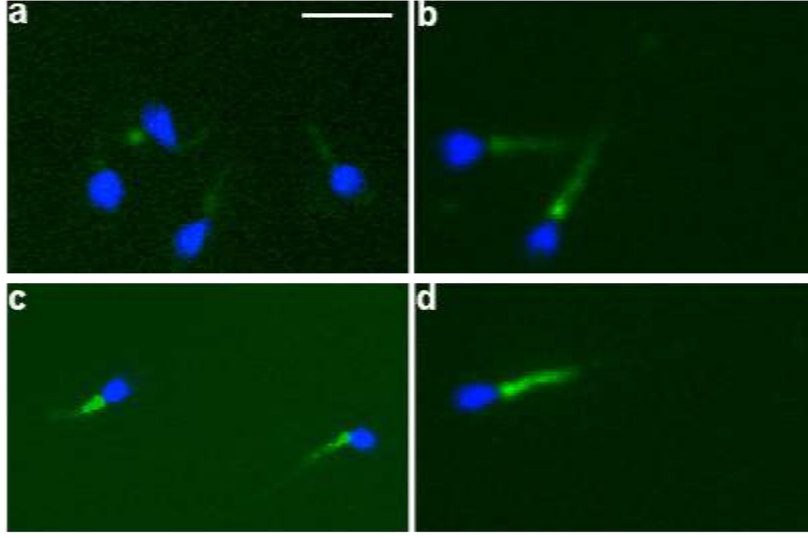
**Tablo 3.** İnfertil Bireylere ait Sperm Uzunluk Ölçümleri

Sperm/Ejakülat	Hasta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Referans Aralık
Baş uzunluğu (um)	12	4,05	1,12	3.46-5.11
Boyun uzunluğu (um)	12	3,96*	2,43	1.62-2.63
Kuyruk uzunluğu (um)	12	25,18*	2,56	36.18-49.75
Total sperm uzunluğu(um)	17	36,26	11,93	40.45-54.04
Sperm konsantrasyonu(milyon)	12	3,75	2,34	1.2-243
Motil sperm konsantrasyonu (milyon/ml)	12	4,90	5,20	0.075-121.91
Total sperm (milyon)	12	170	141	3-891
Baş anomalisi(%)	12	45,5	26,5	2.5-16

#### 6.5 Yüksek Semen Hacmine Sahip Olan İnfertil Bireylerde N-kaderin Ekspresyonu ve Lokalizasyonu

Şekil 4 ve 5 te gözlenen morfolojik özelliklere ek olarak sperm ölçümlerinde düşük uzunluk tespiti gözlenen hacimsel olarak yoğun semenlere ait sperm analizlerinde sperm orta parçada lokalize N-kaderin ekspresyonu gösterilmiştir. (Şekil 7). Ekspresyon şiddetinde örnek 8 ile örnek 10, 11 ve 12 arasında ekspresyon şiddetinde fark olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7a,b,c ve d.)

## N-kaderin/DAPI

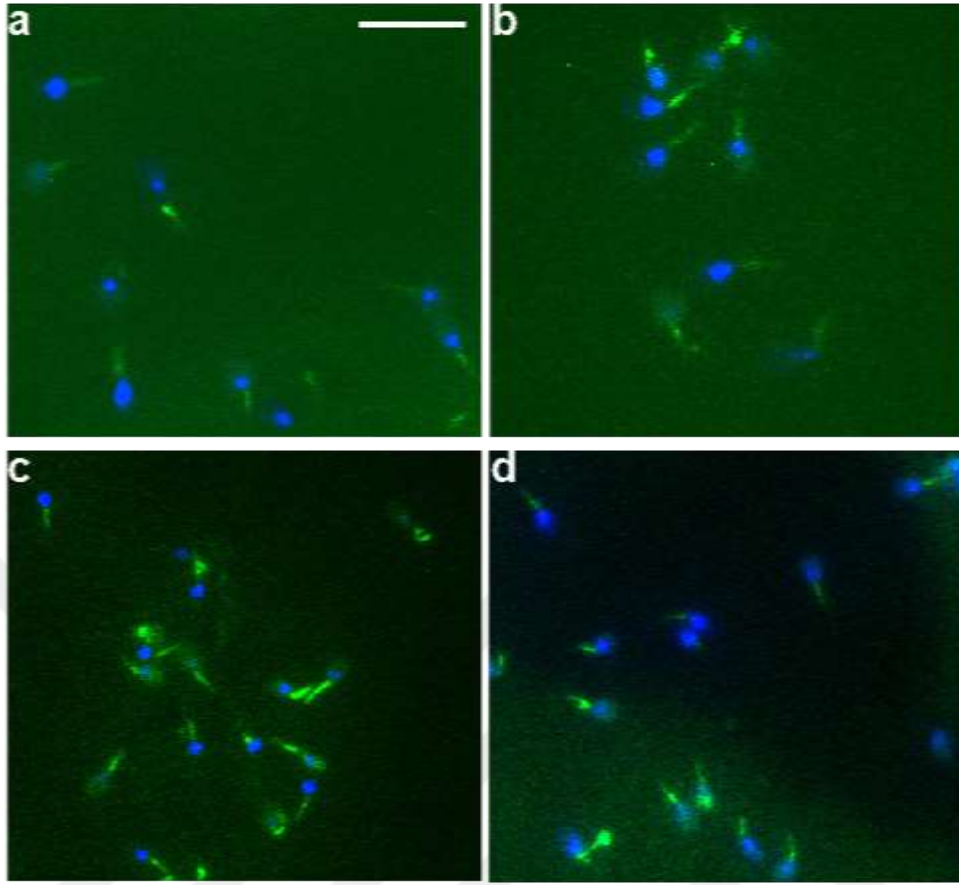


**Şekil 7.** Yoğun hacimli semen örneklerinde sperm immünofloresan boyamaları a; örnek no 8, b; örnek no 10, c; örnek no 11, d; örnek no 12. Fotoğraflar 40x büyütme ile gösterilmektedir. N-kaderin (FITC), Nükleus boyası (DAPI)

### 6.6 Yüksek Semen Hacmine Sahip Olan İnfertil Bireylerde Ezrin Ekspresyonu ve Lokalizasyonu

Detaylı morfolojik sperm ölçümlerinde düşük uzunluk tespiti gözlenen hacimsel olarak yoğun semenlere ait sperm analizlerinde boyun bölgelerinde ezrin ekspresyonu gösterildi (Şekil 8.) Seçilen örnek semenlere ait boyun bölgesindeki lokalizasyonu tespit edildi ve infertil bireyler arası ekspresyon şiddetinde fark olduğu tespit edildi.

## Ezrin/DAPI



**Şekil 8.** Yoğun hacimli semen örneklerinde sperm immüno Floresan boyamaları a; örnek no 8, b; örnek no 10, c; örnek no 11, d; örnek no 12. Fotoğraflar 40 x büyütme ile gösterilmektedir. Ezrin ( FITC), Nükleus boyası (DAPI).



## 7. TARTIŞMA

### 7.1 Spermiyogenez ve sperm uzunluğu arasındaki ilişki

Spermatogenez ve daha spesifik olarak spermiyogenez sırasında kuyruk uzaması Sertoli ve germ hücrelerinden oluşan seminifer tübüllerin germinal epitelinde ortaya çıkar bununla birlikte Sertoli hücre fonksiyonu başarılı sperm gelişimi ve spermatogenezin tamamlanmasını belirler (Poplonska et al., 2007). Sperm bileşenlerinin toplam uzunluklarını, ve ejakülat içindeki değişkenlik dereceleri semen analizinde elde edilen karakteristik özellikler ile etkileşimdedir. Benzer şekilde daha düzgün sperm uzunluğu ölçümlenen spermin hareketli olma olasılığı daha yüksektir . CASA verileri PC1 tarafından değerlendirildiği üzere toplam uzunluk ölçümlerinin başka bir bileşenle etkisi yoktur (Cheng and Mruk, 2011). İnsan sperm uzunlukları ile hacimsel yoğunluk arasında fazla bir bilgi yoktur ve semen karakteristik özelliklerinin karşılaştırıldığı herhangi bir çalışma yoktur. Bu çalışma ile sperm bileşenlerinin uzunluklarının ölçümleri belirlenmiş ve önemli regülatör proteinlerin immünohistokimyasal analizleri yapılmıştır.

Bu çalışma ile ilk kez, infertil bireylerde daha yüksek sperm konsantrasyonunun ortalamasının altında flagellum ölçütlerine sahip olduğu gösterilmiştir ve bu durumun ejakülat içeriğine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı testislerdeki farklı sperm ölçütlerinin ejakülat içeriğine bağlı olarak değişiminin ve sperm gelişimindeki testise-özgün önemli motor proteinler arasındaki ilişkinin saptanması olarak kurgulanmıştır. Bulgularımıza göre farklı semen analizine sahip farklı sperm ölçütleri olduğu tespit edilmiştir.

DSÖ parametrelerine göre hareketlilik değişiklikleri için flagellum ortalama uzunlukları ve toplam sperm uzunluğu ile pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Hem flagellum hem de toplam uzunluk arasında anlamlı bir ilişki belirlenmiştir. Ortalama sperm uzunlukları ve sperm karakteristik özellikleri arasında bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (Ben et al., 2019). Bulgularımıza göre, infertil bireylerde ortalama sperm baş ve kuyruk uzunluğunun yoğun konsantrasyonlu semende düşük olduğu tespiti yapılmıştır. Bu durumun spermiyogenezin fizyolojik süreciyle ve Sertoli-germ hücre bağlantı kompleksleri etkileşimiyle olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma ile birlikte sperm uzunluğu ile sperm gelişimi arasında bir bağlantı olduğu belirlenmiş sperm morfolojik ölçütleri analiz edilmiştir. Bu ölçütler istatistiksel olarak belirlenmiştir ve sperm hücre

fonksiyonu ile bağlantısı olabileceğini düşündürmektedir. Sperm konsantrasyonu ve sperm aktin bağlayıcı proteinler ile Sertoli ilişkili proteinler incelenmiş buna ek olarak sperm kuyruk ölçümlerinin bağlantılı olduğu belirlenmiştir.

Ortalama flagellum ve total sperm uzunlukları tüm semen özellikleri ile fertil bireylerde pozitif yönde anlamlı olarak ilişkisi olduğu bilinmekte iken infertil bireylerde protein regülasyonunun etkisi gözlenmiştir. Sperm konsantrasyonu ile protein eksprezyon ve lokalizasyonlarında anlamlı bir fark gözlenememekle birlikte birlikte sperm bileşenlerinin uzunluklarındaki değişikliklerin farklı regülatör proteinleri etkisinde olabileceğini düşündürmektedir.

## **7.2 N-kaderin, ezrin ve sperm ilişkisi**

Kaderinler Ca-bağımlı memeli gametlerinde bulunan adezyon molekülleridir, ancak fertilizasyondaki rolü tamamen araştırılmamıştır. Bir çalışmada epitelyal kaderinin (E-kaderin) hem insan spermatozoa hem de oositlerde eksprese edildiği ve sperm-ZP ve sperm-oolemma etkileşimlerinde yer aldığı gösterilmiştir (Cheng and Mruk, 2012). Bu çalışmamızda, klasik kaderin ailesinin başka bir üyesi olan N-kaderinin, insan semen konsantrasyonuna bağlı olarak, morfolojik lokasyonu ve ekspresyonu belirlenmiştir. İnsan testis ve spermatozoasında N-kaderin transkripti için yapılan çalışmalarda testis ve sperm N-kaderinin somatik hücrelerdeki ile %98 sekans özdeşliği olduğu bulunmuştur (Lu et al., 2010). Hayvan modellerinde N-kaderinin mRNA ekspresyonu testis gelişiminin tüm aşamalarında 21 günlük farelerde ve 42 günlük sıçanlarda maximum seviyede eksprese edildiği ve bu ekspresyonun hormonal kontrolde olduğu gösterilmiştir (Nakagawa and Takeichi, 1998).

Western blot analiz ile anti n-kaderin antikoru kullanılarak, insan sperm protein özütlerinde 15 kda protein formu saptanmıştır (Cheng and Mruk, 2012) İmmunohistokimyasal analizlerimize göre, N-kaderininin, ejaküle spermatozoalarda boyun ve kuyruk lokalizasyonu olduğu gösterilmiştir ve ejaküle sperm boyun bölgesinde N-kaderin immunoreaktivitesi aktin bağlayıcı protein olan ezrin (Franca et al., 2013) proteini gibi yapışma kompleks üyelerinin lokalizasyonu ile tutarlıdır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sitoskeletal ağın sperm kapasitasyonu üzerindeki rolüne odaklıdır. Yapılan çalışmalar sperm kapasitasyonu sırasında aktin polimerizasyonu olduğunu ve F-aktin inhibisyonunun sitokalsin D kapasitesinin bloke ettiğini kanıtlamıştır. *In vitro* kültür çalışmalarında aktinin kapasitasyon

sırasında sperm baş yüzeyine hareket ettiği gösterilmiştir bu işlem sırasında membran modifikasyonu rolü olabileceği belirlenmiştir (Franca et al., 2013).

Önceki çalışmalarda, F-aktinin sperm kapasitasyonu üzerinde ki etkisi araştırılsa da bazı proteinler kapasitasyon sırasında aktin polimerizasyonunun rolünü F-aktinin oluşumunu düzenlediğini ve F-aktinin sperm zarında olan modifikasyonların ana düzenleyicisi olduğu belirlenmiştir. Western blot analizi kullanılarak kapasitasyondan sonra Thr567 üzerinde ki ezrin fosforilasyonu gözlemlenmiş, ezrin aktif formunda artış belirlenmiştir (Franca et al., 2013). Aktive edilmiş ezrinin sperm kapasitasyonunu regüle ettiği ezrin-Rho-GD11 in membran protein ağı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. İki yolun aktin polimerizasyonunun ezrin ve ezrin ile ilişkili proteinler ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir (Franca et al., 2013). Çalışmamızda yukarıda belirtildiği üzere sperm kapasitasyonunun gerçekleştiği ejakülat spermde gözlenen ve aktive olduğu bilinen ezrinin sperm uzunluk parametrelerinde hacimsel olarak yoğun seçilen semen analizlerindeki lokalizasyonu ve ekspresyonu araştırılmış, infertil bireyler ve kontrol grubu arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Bu çalışmaya ek olarak infertil bireylerdeki sperm regülatör proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin ve fonksiyonel rolünün insanlarda kanıtlanması için ekstra çalışmalar gerekmektedir.

Sonuçlarımızda ezrinin özellikle boyun ve kuyruk bölgesinde ekspresyonu gösterilmiştir. Böylece ezrin lokasyonu ile semen analizlerinin ilişkisi kurgulanmış ve ileri çalışmalar için semen hacim, sperm uzunluk, ve regülatör protein ekspresyonlarının araştırılmasına olanak sağlanacağı düşünülmüştür.

## 8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Belirli morfolojik özelliklere sahip spermin fertilizasyonu sağladığı ancak ejakülat içeriğine bağlı olarak morfolojik özelliklerinin normalden düşük seyrettiğinin gözlenmesi, spermiyogenez sırasında belirli düzenleyici proteinlerin de rolleri olduğunu düşündürmekte ve spermiyogenez fiziolojisi odaklı, ejakülat spermdeki rollerinin araştırılması ön görülmektedir (Cheng ve Mruk, 2011)



## 9. KAYNAKÇA

Barratt, C.L.R., et al., The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*, 2017. 23(6): p. 660-680.

Ben, M.R., et al., Genetic aspects of male infertility: From bench to clinic. *Gynecologie, obstetrique, fertilité & senologie*, 2019. 47(1): p. 54-62.

Cheng, C.Y. and D.D. Mruk, Actin binding proteins and spermiogenesis: Some unexpected findings. *Spermatogenesis*, 2011. 1(2): p. 99-104.

Cheng, C.Y. and D.D. Mruk, The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, 2012. 64(1): p. 16-64.

Erdemir, F., F. Fırat, and Y. Gençten, Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Turk Urol Sem*, 2011. 2: p. 11-7.

Franca, L.R., et al., Blood-tissue barriers, in *Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers*. 2013, Springer. p. 237-259.

Gökçe, A., Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. *Turk Urol Sem*, 2011. 2: p. 1-7.

Gu, Y.Q., [Variation trend of male fertility and semen parameters]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2014. 20(12): p. 1059-62.

Hai, Y., et al. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2014. Elsevier.

Kalaycı Yiğın, A. and A. Gökçe, Y kromozomu mikrodelsyonları ve erkek infertilitesi. *Androloji Bülteni*. 18(65): p. 126-129.

Lahn, B.T. and D.C. Page, Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*, 1997. 278(5338): p. 675-680.

Lindsay, T.J. and K.R. Vitrikas, Evaluation and treatment of infertility. *Am Fam Physician*, 2015. 91(5): p. 308-14.

Lu, J.-C., Y.-F. Huang, and N.-Q. Lü, WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: its applicability to andrology laboratories in China. *Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology*, 2010. 16(10): p. 867-871.

Marín-Briggiler, C., et al., Neural cadherin is expressed in human gametes and participates in sperm–oocyte interaction events. *International journal of andrology*, 2010. 33(1): p. e228-e239.

Nakagawa, S. and M. Takeichi, Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development*, 1998. 125(15): p. 2963-2971.

Organization, W.H., WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.

Orhon, E., E. Enginsu, and S. Günalp, Sperm morfoloji atlası. Türkiye infertilite vakfı yayınları, 1995: p. 17-29.

O'shaughnessy, P., et al., Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction*, 2010. 139(1): p. 177-184.

Popłońska, K., et al., Cytochemical and immunocytochemical studies of the localization of histones and protamine-type proteins in spermatids of *Chara vulgaris* and *Chara tomentosa*. *Folia histochemica et cytobiologica*, 2007. 45(4): p. 367-374.

Rothmann, S.A., et al., Sperm morphology classification: a rational method for schemes adopted by the world health organization. *Methods Mol Biol*, 2013. 927: p. 27-37.

Sağlığı, E.Ü., Çevresel etkenler ve spermatogenez.

Vogl, A., L. Soucy, and V. Foo, Ultrastructure of sertoli-cell penetrating processes found in germ cells of the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*). *American journal of anatomy*, 1985. 172(1): p. 75-86.

Wang, L., et al., The role of ezrin-associated protein network in human sperm capacitation. *Asian journal of andrology*, 2010. 12(5): p. 667.

Wong, E.W. and C.Y. Cheng, Polarity proteins and cell–cell interactions in the testis. *International review of cell and molecular biology*, 2009. 278: p. 309-353.

Zülfikaroğlu, G., H. Özgür, and S. Polaturkey, Kapasitasyonun moleküler temelleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2010. 19(1): p. 12-24.

## 10.EKLER

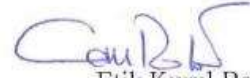
### Ek 1. Etik Kurul Onayı

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

24.01.2019

*Sayın* Dr.Öğr.Üyesi.Nazlı Ece ORDUERİ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda planladığı“İnfertil Bireylerde Sperm Sayısı İle Bağlantılı Sperm Uzunluk Ölçümlerinin Araştırılması” isimli araştırmanızın kurulumuzun 24.01.2019 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.



Etik Kurul Başkanı  
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN



## 11. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Esra İbiş Efetaşkın

**Doğum Tarihi ve Yeri:** 21.02.1994 İstanbul

**Mail Adresi:** esraibis@gmail.com

**Unvanı:** Biyolog

**Öğrenim Durumu:** Lisans

<b>Okulun Adı ve Bölümü</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2016
Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Klinik Embriyoloji Bölümü	2019

## İNFERTİL BİREYLERDE SPERM SAYISI İLE BAĞLANTILI SPERM UZUNLUK ÖLÇÜMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

<b>%21</b> BENZERLİK ENDEKSİ	<b>%17</b> İNTERNET KAYNAKLARI	<b>%0</b> YAYINLAR	<b>%8</b> ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
---------------------------------	--------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<b>dergipark.ulakbim.gov.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%9</b>
<b>2</b>	<b>Submitted to TechKnowledge Turkey</b> Öğrenci Ödevi	<b>%3</b>
<b>3</b>	<b>library.cu.edu.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%2</b>
<b>4</b>	<b>docplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>5</b>	<b>www.uroturk.org.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>6</b>	<b>acikerisim.baskent.edu.tr:8080</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>7</b>	<b>Submitted to Selçuk Üniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	<b>%1</b>
<b>8</b>	<b>slideplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>9</b>	<b>Submitted to Gaziantep Aniversitesi</b> Öğrenci Ödevi	<b>%1</b>

11	<a href="http://www.eurasianbiochem.org">www.eurasianbiochem.org</a> İnternet Kaynağı	<%1
12	<a href="http://www.link-ekle.net">www.link-ekle.net</a> İnternet Kaynağı	<%1
13	<a href="http://otoprzetargi.pl">otoprzetargi.pl</a> İnternet Kaynağı	<%1
14	<a href="http://www.turkpsikiyatri.com">www.turkpsikiyatri.com</a> İnternet Kaynağı	<%1
15	Submitted to Istanbul Kultur University Öğrenci Ödevi	<%1
16	<a href="http://polen.itu.edu.tr">polen.itu.edu.tr</a>	<%1