



T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

APOPİTOZİS YOLAK PROTEİNLERİ İLE İNFERTİLİTE ARASINDAKİ  
İLİŞKİNİN İNSAN SPERM HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI.

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN APOPİTOZİS PATHWAY  
PROTEINS AND INFERTILITY IN HUMAN SPERM CELLS.

Arş. Gör. Kasım GÜNEŞ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Fikret GEVREK

TOKAT – 2017

T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(.../.../2017)

Tezi Hazırlayan Öğrenci

Adı ve Soyadı

KASIM GÜNEŞ

İmzası

## ÖZET

İnfertilite, bir yıl süre ile korunmaksızın uygun zamanda ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin gerçekleşmemesidir. İnfertilite reproduktif çağıdaki çiftlerin %10-15'ini etkilemekte olup bunun %50'si erkeğe bağlı sorunlardan kaynaklanır. Bu çalışmanın amacı apoptozis yolak proteinlerin (Acas-3, Bax, Bcl-2) insan sperm hücrelerindeki immün ekspresyonları ile infertilite arasındaki ilişkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmamızda 20'si infertil (test) ve 5'i fertil (kontrol) olmak üzere 25 birey dahil edildi. Her grupta her bir bireyden alınan semen örneklerinde androloji laboratuvarımızda spermiyogram analizleri yapıldı. Kruger strict morfoloji ve immünohistokimyasal analizler için santrifüj işlemi sonrası sperm yayması preparatları hazırlandı. Sonrasında sperm morfoloji analizler için Diff-quick boyam protokolüne, immün ekspresyon analizleri için immünohistokimyasal protokole tabi tutuldular. Sonrasında mikroskopik analiz gerçekleştirildi.

Spermiyogram ve morfoloji analizler beklenildiği gibi infertil bireylerde normal sperm hücrelerinde azalma ve anomalili sperm hücrelerinde artış olduğunu gösterdi. İmmünohistokimyasal analizlerde apoptotik proteinlerin (Acas-3, Bax) ekspresyonlarının belirgin olarak artmış olduğunu tespit edildi. Ancak istatistiksel olarak anlamlılık sadece Acas-3' mevcuttu. Antiapoptotik protein (Bcl-2) ekspresyonu ise infertil bireylerde belirgin olarak düşüktü.

Mevcut bulgularımız infertil bireylerin sperm hücre apoptozisinin Bax' tan ziyade Acas-3 ve Bcl-2 yolakları üzerinden gerçekleştiğine işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** İnfertilite, Sperm, Bax, Bcl-2, Acas-3

## ABSTRACT

Infertility is the inability to achieve pregnancy despite regular and appropriate timely sexual intercourse without being protected for a year. Infertility affects 10-15% of reproductive age couples, of which 50% is due to male related problems. The aim of the study is to investigate the relationship between the immun expression of the apoptosis pathway proteins in human sperm cells and infertility

Twenty-five people, including 5 fertile (control) and 20 infertile (test), were included in the study. Spermogram analyzes were performed on semen samples taken from each individual in our andrology laboratory. Sperm preparations were made after centrifugation for Kruger strict morphology and immunohistochemical analyses. Subsequently, the Diff-quick staining protocol for sperm morphological analysis and the immunohistochemical protocol for immun-expression analysis. Then microscopic analyses were performed.

Spermogram and morphology analysis revealed that decreased in normal sperm cells and increased in sperm anomaly in infertility as we expected. In immunohistochemical analysis of apoptotic proteins (Acas-3 and Bax) we observed an increase of immun expression in both of them but there was only significant increase in Acas-3. While anti-apoptotic protein Bcl-2 expression was found significantly lower in infertile human.

Our current findings indicate that sperm cell apoptosis in infertility occurs via Acas-3 and Bcl-2 pathways rather than Bax.

**Key Words:** Infertility, Sperm, Bax, Bcl-2, Acas-3

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin hem ders hem de tez aşamasında çok büyük katkıları olan ve tez çalışmamı birlikte yaptığım, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Fikret GEVREK'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımları ve desteği için Sayın Arş. Gör. Seda OCAKLI'ya

Çalışmamızı destekleyen GOÜ BAP Başkanlığı ve personeline.

Her zaman her koşulda yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen akademik hayatımda en büyük motivasyon kaynaklarım çok değerli annem Adalet GÜNEŞ'e babam Duran GÜNEŞ'e ve kardeşim Rumeysa Gülsüm GÜNEŞ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İTHAF

Başarılarımın en büyük emektarı olan Annem'e...



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>İTHAF</b>	<b>iv</b>
<b>TABLolar LİSTESİ</b>	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>viii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>viii</b>
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2. Erkek Genital Sistem Embriyolojisi	4
2.1.Postnatal Testis Gelişimi	5
2.3.Germ Hücrelerinin Gelişimi	5
2.4.Spermatogenez	6
2.4.1.Spermatogenetik Seri Hücreleri	8
2.4.2. Semen	10
2.5.Fekondasyon	12
2.6.Erkek İnfertilitesinde Etyoloji	15
2.7.Sperm Analizi	19
2.8.1. Spermilerin Morfolojik Açıdan Sınıflandırması	20
<b>3.MATERYAL ve METOD</b>	<b>30</b>
3.1. Numune Toplama	22
3.1.1. Tanısal veya Araştırma Amacıyla Semen Toplanması:	22
3.1.2. Numunelerin Güvenli Biçimde İşlenmesi	25
3.2. İlk Makroskobik Değerlendirme	25
3.3.İlk Mikroskobik Değerlendirme	28
3.3.1 Sperm Motilitesi	28
3.3.2. Sperm Canlılığı	28
3.3.3. Sperm Sayımı	28
3.4 Sperm Morfolojisi	28
3.4.1. Spermiyogram Testi	30
3.4.2. Makler Counting Chamber ile sperm sayımı	32
3.4.3. Sperm Yayma Protokolü	33
3.4.4. Kruger Strict Sperm Morfoloji Analizi	34
3.4.5. Strict Morfoloji Kruger Kriterlerine Göre Normal Sperm Değerlendirmesi	35
3.4.6. Diff-Quik Boyama Prosedürü (Sperm morfolojisi için hızlı boyama işlemi)	35
3.4.7.Reaktifler	36
3.4.7.1. Diff-Quik hızlı boyama kiti içindikiler	36
3.5.İmmünohistokimyasal Çalışmalar	37
3.5.1. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü	37
3.6.İstatistiksel Analiz	35
<b>4.BULGULAR</b>	<b>39</b>
4.1. Spermiyogram Testi Sonuçları	51
4.2. Kruger Strict Sperm Morfoloji Analiz Bulguları	44
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	39
<b>5.TARTIŞMA VE SONUÇ</b>	<b>57</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>65</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>69</b>

## TABLOLAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.1.</b> Erkek infertilitesi nedenleri	<b>15</b>
<b>Tablo 2.2.</b> Sperm morfolojisinin gebelik oranlarına etkisi	<b>18</b>
<b>Tablo 2.3.</b> Semen terminolojisi	<b>18</b>
<b>Tablo 3.5.1.</b> İmmünohistokimyasal boyama protokolü	<b>35</b>
<b>Tablo 4.1.1.</b> Fertil bireylere ait spermiyogram testi sonuçları	<b>37</b>
<b>Tablo 4.1.2.</b> İnfertil bireylere ait spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçları	<b>38</b>
<b>Tablo 4.1.3.</b> Spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçların grup ortalama değerleri	<b>39</b>
<b>Tablo 4.1.4.</b> Fertil bireylere ait spermiyogram testi makroskopik analiz sonuçları	<b>40</b>
<b>Tablo 4.1.5.</b> İnfertil bireylere ait spermiyogram testi makroskopik analiz sonuçları	<b>40</b>
<b>Tablo 4.2.1.</b> Fertil bireylere ait Kruger Strict Morfoloji analizi bulguları	<b>41</b>
<b>Tablo 4.2.2.</b> İnfertil bireylere ait Kruger Strict Morfoloji analizi bulguları	<b>43</b>
<b>Tablo 4.2.3.</b> Kruger strict morfoloji analizlerin grup ortalama değerleri	<b>43</b>
<b>Tablo 4.3.1.</b> Fertil bireylere ait sperm hücreleri apoptoz yolak proteinleri immünohistokimya analiz sonuçları H-skor değerleri	<b>50</b>
<b>Tablo 4.3.2.</b> İnfertil bireylere ait sperm hücreleri apoptoz yolak proteinleri immünohistokimya analiz sonuçları	<b>50</b>
<b>Tablo 4.3.3.</b> Acas-3, Bcl-2 ve Bax proteinleri immünohistokimyasal boyanma şiddetleri H-skorları ağırlıklı grup ortalama değerleri	<b>51</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.4.1.</b> Sperm Oluşumu (Spermatogenez)	<b>9</b>
<b>Şekil 2.4.2.</b> Normal sperm morfolojisi	<b>10</b>
<b>Şekil 2.8.</b> Anormal sperm şekilleri	<b>17</b>
<b>Şekil4.1.1.</b> Spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçları grup ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı görünümü.	<b>39</b>
<b>Şekil4.1.2.</b> Spermiyogram testi makroskopik analiz sonuçları grup ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı görünümü	<b>40</b>
<b>Şekil4.2.1.</b> Sperm hücrelerinin baş, boyun ve kuyruk anomalileri grupların ortalama değerlerinin karşılaştırmalı grafiksel görünümü.	<b>44</b>
<b>Şekil4.2.2.</b> Anomalili ve normal sperm yüzdelerinin grup ortalaması değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı görünümü.	<b>45</b>
<b>Şekil 4.2.3.</b> Fertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick)	<b>46</b>
<b>Şekil 4.2.4.</b> Fertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick)	<b>46</b>
<b>Şekil 4.2.5.</b> İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick)	<b>47</b>
<b>Şekil 4.2.6.</b> İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick)	<b>47</b>
<b>Şekil 4.2.7.</b> İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü	<b>48</b>
<b>Şekil 4.2.8.</b> İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü	<b>48</b>
<b>Şekil 4.3.1.</b> Acas-3, Bax, Bcl-2 İHK boyanma şiddeti H-Skorları grupların ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması.	<b>51</b>
<b>Şekil 4.3.2.</b> Fertil birey sperm hücresi Acas-3 immün ekspresyonu	<b>52</b>
<b>Şekil 4.3.3.</b> İnfertil birey sperm hücresi Acas-3 immün ekspresyonu	<b>52</b>
<b>Şekil 4.3.4.</b> Fertil birey sperm hücresi Bax immün ekspresyonu	<b>53</b>
<b>Şekil 4.3.5.</b> İnfertil birey sperm hücresi Bax immün ekspresyonu	<b>53</b>
<b>Şekil 4.3.6.</b> Fertil birey sperm hücresi Bcl-2 immün ekspresyonu	<b>54</b>
<b>Şekil 4.3.7.</b> İnfertil birey sperm hücresi Bcl-2 immün ekspresyonu	<b>54</b>

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

aa	:	Aminoasit
Acas	:	Active caspaze
ATP	:	Adenosin 5'-trifosfat
Bax	:	Bcl-2 associated x protein
Bcl-2	:	B-cell lymphoma 2
BSA	:	Sığır serum albumin
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
FSH	:	Folikül stimulan hormon
ICSI	:	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	:	İn vitro fertilizasyon
İF	:	İnfertil
İHK	:	İmmünohistokimya
NaCl	:	Sodyum klorit
NHS	:	Normal at serumu
PBS	:	Fosfat buferli tuz
PFA	:	Paraformaldehit
pH	:	$-\log c[H^+]$
ROS	:	Reaktif oksijen radikalleri
SCOS	:	Sertoli cell-only sendromu
TSK	:	Tubulus seminiferus kontortiyus
TSR	:	Tubulus seminiferus rektus
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, bir yıl süre ile korunmaksızın uygun zamanda ve düzenli cinsel ilişkiye (haftada iki gün) girilmesine rağmen gebeliğin gerçekleşmemesidir. İnfertilite, daha önce hibrid uyumsuzluk, sterilite ve türleşme ile ilişkili lokuslar içerdiği bilinen X kromozom üzerinde geniş bir bölge ile ilişkilendirildi (Wang ve ark., 2015). İnfertilite reproduktif çağdaki çiftlerin %10-15'ini etkilemektedir. Yardımlı üreme tekniklerinin gelişmesi ve giderek yaygınlaşması ile çiftlerin çocuk sahibi olma olasılığı her geçen gün artmaktadır. Ayrıca yardımcı üreme teknikleri hakkında gerek basın, gerek uzmanlar tarafından bilgilendirilen çiftlerin sayısı arttıkça toplumda infertilite konusunda yardım arayışı içinde olanların üremeye yardımcı tedavi merkezlerine başvurularında da ciddi bir artış olduğu görülmektedir. Gerçekte ise infertil çiftlerin toplumdaki prevalansında dramatik bir artış olmamıştır (Aanesen ve ark., 2014).

Erkeklerde kaliteli sperm üretimi 20-30 yaşlarında pik yapar, 40 yaşından sonra hafif azalır ve ileri yaşlara kadar devam eder. Amerikan Fertilité Cemiyeti erkeklerde semen donörü olabilmek için 50 yaş sınırı getirmiştir (Plas ve ark., 2000). Erkek infertilitesindeki artış; konjenital ya da kazanılmış ürogenital bozukluklardan, genital sistem enfeksiyonlarından, skrotal ısı artımından (varikozel), endokrin bozukluklardan, genetik hastalıklardan, immünolojik faktörlerden kaynaklanabildiği gibi son zamanlarda elektromanyetik dalgalar ve bir takım kimyasallara maruz kalma gibi bazı çevresel etkenlerden de kaynaklanabilmektedir. Olguların %60- 75'inde infertiliteden sorumlu bir faktör bulunmaz (idiyopatik erkek infertilitesi). Böyle erkekler fertilité problemiyle ilgili olabilecek geçmişe ait bir hikaye vermeksizin, normal fizik muayene bulguları ve endokrin laboratuvarsonuçlarına sahip olabilirler. Ancak semen analizinde spermatozoa

sayısında azalma (oligozoospermi), motilite azalması (astenozoospermi) ve morfolojik incelemede çok sayıda anormal form (teratozoospermi) görülür. Genellikle bu bozukluklar bir arada bulunur ve oligo-asteno-teratozoospermi (OAT) sendromu şeklinde tanımlanır. (Dickey ve ark., 1999).

Erkek infertilitesi ile ilgili olarak primer spermatogenik yetmezlik; hipotalamo-pitüiter hastalıklar dışında herhangi bir neden ile meydana gelen spermatogenik değişiklikler olarak tanımlanır. Primer spermatogenik yetmezliğin ciddi formları, değişik etiyolojileri bulunmasına rağmen klinik olarak nonobstrüktif azospermi olarak ortaya çıkabilirler. Genel popülasyonda azospermi prevalansı %2 olarak tahmin edilmekte olup erkek infertilite kliniğindeki insidansı ise %10-20 gibi yüksek oranlarda bulunabilmektedir.

Bir takım etkilere bağlı olarak testiküler histoloji, tübüler hasardan hipospermatogeneze kadar çeşitli derecelerde farklı spermatogenik değişiklikler gösterir. Mesela, Sertoli cell-only sendromunda (SCOS) bile çeşitli derecelerde spermatogenez içeren seminifer tübüller bulmak olasıdır. Sürecin ciddiyetine bağlı olarak, folikül stimulan hormon (FSH) seviyesi yükselebilir ve testislerin boyutu ve/veya kıvamı azalabilir. Diğer bir ciddi bozukluk ise; normal Leydig ve Sertoli hücresi, spermatogonia ve spermatozoid popülasyonunun bulunması ancak spermatid ve spermatozoanın bulunmaması ile karakterize spermatozoid seviyesinde komplet spermatogenik duraklamadır. Maturasyonu duraklaması nadiren spermatogonia ya da round (yuvarlak) spermatid evresinde de görülebilir. Bu durumlarda matür ya da elongated (uzamış) spermatidler bulunmaz. Spermatogenik bozuklukların daha az ciddi formları hipospermatogenez (tüm spermatogenik hücrelerde orantılı azalma), parsiyel maturasyon duraklaması, fokal SCOS ve karışık formlardır (Delilbaşı ve ark., 2008).

Özellikle erkek infertilitesi vakalarında yardımcı üreme tekniklerinden intra üterin inseminasyon (IUI), in vitro fertilizasyon (IVF) veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulanmaktadır. Sperm parametrelerine bakarak önceden gebelik sonuçlarını tahmin etmek oldukça zor olmakla birlikte, bu parametrelere bakarak IUI ile gebe kalamayacak veya gebelik oranı oldukça düşük grubu tespit etmek hem ekonomik hem de hasta psikolojisi açısından kritiktir. Sperm morfolojisi, sperm hazırlık yöntemleri, inseminasyon sırasındaki sperm sayısı ve motilitesi IUI ile gebelik oranlarını etkileyebilecek önemli parametrelerdir. Bu yöntemle düşük sperm sayısı, zayıf motilite, zayıf penetrasyon yeteneği ve servikal immünite bozukluklarında daha fazla motil spermin fertilizasyon sahasına ulaşması sağlanmaktadır. Oligospermi ve/veya astenozoospermi görülen erkeğe bağlı infertilite vakalarında konsepsiyon şansını arttırmak için IUI kullanılmaktadır (Erhan ve ark., 2013).

Özetle infertilite, günümüz evli çiftlerin %10 kadarını etkileyen uzun süren, maliyetli bir tedavi protokolü gerektiren ve giderek artan sağlık sorunudur. Muhtemel etki faktörlerinin ve mekanizmalarının belirlenmesi durumunda farklı çözüm yöntemleri ve alternatiflerin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Sonuçta birçok infertilite hastasının küçük müdahalelerle IVF ve ICSI gibi pahalı, daha girişimsel ve morbiditesi daha yüksek olan yardımcı üreme tekniklerine gerek kalmaksızın bebek sahibi olabilmeleri sağlanabilecektir (Gökçe ve ark., 2011). Bu nedenlerden dolayı sperm kaynaklı üreme sorunlarının tedavisine yönelik katkı sağlaması amacıyla sperm hücrelerinde apoptotik (Bax, Acas-3) ve antiapoptotik (Bcl-2) yolak proteinleri ile infertilite arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmayı amaçladık. Erkek infertilitesiyle ilgili çalışmalara bir katkı sağlayacağı için önemli olduğunu düşünüyoruz.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek Genital Sistem Embriyolojisi

Gonadlar posterior abdominal duvar mezoteli altındaki mezoderm, altındaki mezenşim dokusu ve primordiyal germ hücrelerinden köken alarak gelişirler. Erkek ve dişi morfolojik özellikleri, embriyonik 7. haftaya kadar gelişmeye başlamaz. Genital sistem, erken dönemde her iki cinste de birbirine benzer. Bundan dolayı, genital sistemin gelişiminin başlangıç dönemi, cinsel gelişimin farklılaşmamış safhası olarak adlandırılır.

3. haftanın sonuna doğru genital organlara ait ilk hücresel elemanlar oluşmaya başlar. Embriyo dışında allantoisin başlangıcına yakın yerde, vitellusu döşeyen endoblastik hücreler arasında; küre şekilli hücreler belirir. Bunlara primordiyal germ hücreleri adı verilir. Bu hücreler epiteliden ayrılarak bitişikteki mezoblasta geçerler. Sonrasında bağırsağın dorsal mezenteri boyunca devam ederek 5. haftanın başında gonadlara ulaşırlar ve 6. haftada da genital kabarıklıklara yerleşmiş olurlar. Eğer kabarıklıklara ulaşamazlarsa gonadlar gelişemez. Çünkü primordiyal germ hücrelerinin gonadların farklılaşmasında uyarıcı etkisi vardır. Üç haftanın sonunda, mezonefroz ve dorsal intestinal mezenter arasındaki sölom epiteli prolifer olmaya başlar ve stria genitalis meydana gelir. Altındaki mezoblastın birikmesiyle burada genital çıkıntılar ortaya çıkar ve buna crista genitalis adı verilir. Fakat bünyesinde germ hücresi bulunmaz. Beşinci haftada, gonad taslağının kölom epiteli, proliferasyonuna devam eder. Bu epitel hücreleri, altındaki mezoblast içine girerler ve burada primitif seksüel kordonlar denilen düzensiz şekilli birincil kordonları oluştururlar. Bu kordonlar, yüzey epiteline bağlıdır. Primordiyal germ hücreleri gonad taslağına yerleşmeye başlarlar. Gonad taslağının ön dış yüzünde ventral bir girinti meydana gelir ve oyulur. İki tarafın tıkanmasıyla kanal olur, sölom epiteliyle alakasını kaybeder. Bu yapıların hepsi dişi genital yollarını meydana

getiren Müller Kanalları adını alırlar. Dördüncü haftada yolk kesesi duvarındaki endoderm hücreleri arasında primordiyal germ hücreleri ortaya çıkar. Beşinci haftada mezonefrozun mediyalinde kölomik epitel ve alt tarafında mezenşim proliferasyonu ile genital çıkıntılar oluşur. Primordiyal germ hücreleri son barsağın dorsal mezenteri boyunca ameboik hareketlerle ileri doğru yönelir ve genital kabarıklığa ulaşır. Bu hücreler ulaşmadan önce genital sırt epiteli proliferer olur ve mezenşim içine doğru primitif sex kordonları meydana gelir. Farklanmamış gonad adını alır. Dışta korteks ve içte de medulladan oluşur. Embriyo XX cinsiyet kromozomuna sahip olduğunda, farklanmamış gonadın korteksi over yönünde değişim gösterir ve medulla geriler. Embriyo XY cinsiyet kromozomuna sahipse, medulla testise farklılaşır ve korteks, birtakım kalıntılar dışında gerilemeye başlar (Moor ve Persaud, 2009).

## **2.2.Postnatal Testis Gelişimi**

Postnatal testis gelişimi; proliferasyonu, farklılaşmayı ve germ hücrelerinin, Sertoli hücrelerinin, miyoid hücrelerin ve intertisyel Leydig hücrelerinin apoptotik ölümünü kontrol eden, çok iyi organize olmuş parakrin iletişimi içerir. Erişkin testislerinin normal fonksiyon görebilmesi için testiküler hücrelerin uygun bir şekilde gelişimine ihtiyaç vardır (Nurmio ve ark., 2009).

## **2.3.Germ Hücrelerinin Gelişimi**

Yetişkin testisi, kök spermatogonya, farklılaşan spermatogonya, primer ve sekonder spermatositler ve spermatidleri içerir. Spermatogonyumlar, bazal membranın bitişiğinde yerleşmiştir. Tübüler lümene doğru giderken, spermatogonyumlar, spermatoditlere ve son olarak da spermatidlere farklılaşır. Bu süreç üç aşamaya

bölünebilir; spermatogoniyanın bir seri mitotik bölünmeye gittiği spermatogonyal çoğalma, ilk mayotik bölünmenin sekonder spermatositleri oluşturduğu ikinci mayotik bölünme esnasında spermatidlerin olduğu mayoz bölünme ve spermatidlerin sperm benzeri olgun spermatidlere dönüştüğü spermiyogenez (Heller ve ark., 2004; Amann ve ark., 2008). Spermatogenik hücreler, tübüllerde birbirlerini dalgalı biçimde izleyen belirgin hücresel ortaklık içinde şekillenmiştir. Bunlar seminifer epitelyal döngünün aşamaları olarak bilinir.

#### **2.4.Spermatogenez**

Erkeklerde germ hücre serisini oluşturan spermatogonyumdan, spermatozoon (sperm) oluşuncaya kadar geçen olayların hepsine spermatogenez denir. Testislerde meydana gelen sperm, erkek genital yollarından geçerek buraya açılan yardımcı bezlerin salgılarını alarak penisten atılır.

Testislerin görevlerini spermatozoon denilen erkek gametleri oluşturmak, erkek seks hormonu olan testosteronu üretmek ve salgılamak olarak sıralayabiliriz. Genital kanallar spermatozoonu semen içinde taşır. Yardımcı bezler ise hem spermatozoonu besler hem de spermatozoonun dışı genital yollara girişine aracılık eden semenin nonsellüler kısmını oluşturur. Penis semeni dışı genital yollara verme ve idrarı vücut dışına atmakla görevlidir.

Erkeklerde, primordiyal germ hücrelerinin farklılaşması pubertede başlayıp andropoza kadar aktif olarak devam eder. Puberteden hemen önce seks kordonları içinde lümen oluşur ve seminifer tübüller haline gelir ve aynı zamanda primordiyal germ hücreleri de spermatogoniumlara dönüşür. Bu olayın meydana geldiği yer testislerin tubulus seminiferus kontortiyus duvarıdır. Testis lobüllerden meydana gelmiştir. Her



testis lobülünde 1-4 sayıda seminifer tübül bulunur. Bunlar, 30-40 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapında içi boş kıvrım yapmış tübüllerdir ve bunlara tubulus seminiferus kontortiyus (TSK) denir. Testisteki bu tübüllerin toplam uzunluğu 250 m. civarındadır. Bu tübüllerin sonuna doğru lümen daralır, düzleşerek tubulus seminiferus rektus (TSR) meydana getirir. Bu düz kanallar, genital kanalların ilk kısmını meydana getirir ve rete testis denilen bir labirente bağlanır. Bu da 10-20 adet duktuli efferentes ile duktus epididimisin baş kısmına bağlanır. Seminifer tübüller arasındaki bağ dokuda Leydig hücreleri bulunur. Leydig hücrelerinin görevi testosteron salgılamaktır. Seminifer tübüller ise spermatozoonları üretmekle görevlidir. Seminifer tübülün duvarı, ince bir bağ doku tabakası üzerine oturmuş çok katlı kübik epitelden meydana gelmektedir ve bunlar birbirinden bazal lamina ile ayrılırlar.

Germinal epitel destek hücreleri olarak bilinen Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seri hücreleri olarak iki çeşit hücreden meydana gelir. Sertoli hücreleri mezenşimal kökenlidir ve yüksek piramidal hücrelerdir. Spermatogenetik seriye göre daha az sayıda bulunurlar, ancak hacimce onlardan daha büyüktürler. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya oturur, apikal uçları tübül lümenine uzanır ve germ hücrelerini sararlar. Işık mikroskopunda sınırları belirsiz görülür, çünkü spermatogenetik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Üçgen biçiminde olan uzamış bir nükleus ve belirgin bir nükleolus içerir. Gelişen germ hücrelerine destek verme, koruma, beslenme, salgılama, fagositoz gibi fonksiyonları bulunur (Moor ve Persaud, 2009; Junqueira ve Carneiro, 2009).

### 2.4.1. Spermatojenetik Seri Hücreleri

Bazal lamina ile lümen arasında 4-8 tabaka olarak gözlenen hücre serileridir. Bu germinal serinin en genç olanları spermatogonyumlardır ve bazal laminaya yerleşmiş şekilde bulunurlar. Sırayla belirtilecek olursa; spermatogonyum, spermatosit-1, spermatosit-2, spermatid, spermatozoondan oluşur.

Bir spermatogonyumdan, spermatozoon oluşuncaya kadar geçen olaylar serisine spermatogenez denir ve 3 evrede incelenir.

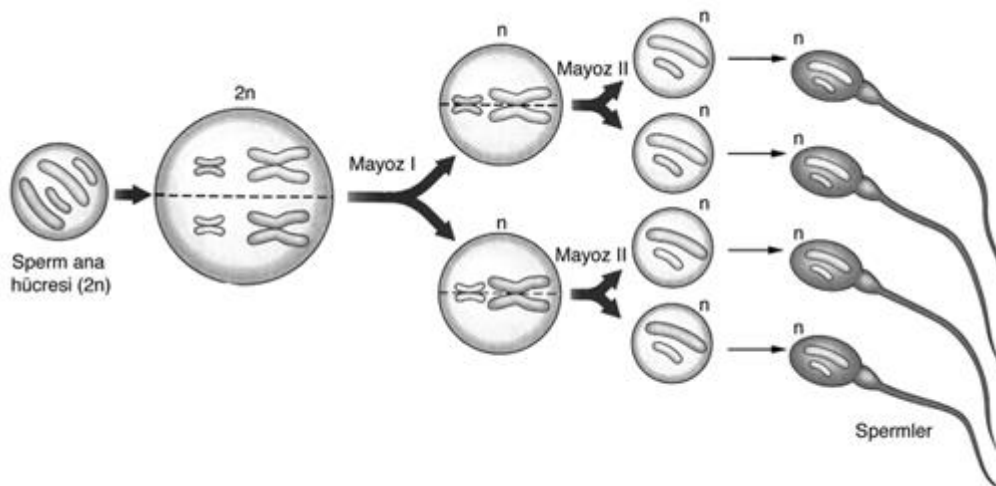
1) Spermatositogenez evresinde spermatogonyumlar bölünerek, spermatositleri oluştururlar.

2) Mayoz evresinde spermatositler,  $n$  kromozomlu ve  $n$  DNA'lı spermatidleri meydana getirirler.

3) Spermiyohistogenez evresinde ise spermatidler spermatozoonları meydana getirmek için farklılaşırlar.

Spermatogonyumlar embriyonal dönemde oluşuktan sonra puberteye kadar inaktif olarak kalır. Pubertenin başlamasından itibaren hipotalamustan salgılanan gonadotropin releasing hormon (GnRH) etkisi ile hipofiz ön lobundan salınan gonadotropik hormonlar folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) sayesinde çoğalmaları başlar. Bütün spermatogonyumlar diploittir ve mitoz bölünmelerle çoğalırlar. Bir mitozun arkasından ortaya çıkan spermatogonyumlar ya farklılaşacak (B spermatogonyumları) ya da primitif spermatogonyum kaynağını (A spermatogonyumları) meydana getirecektir. A spermatogonyumları ikiye ayrılır; koyu boyanmış olanlar tip A dark spermatogonyum, soluk boyanmış olanlar tip A pale spermatogonyum adını alırlar. Tip A dark spermatogonyumlar, gerçek kaynak hücrelerdir. Tip A pale spermatogonyumlar, tip B spermatogonyumları oluşturmak üzere bölünürler. Tip B

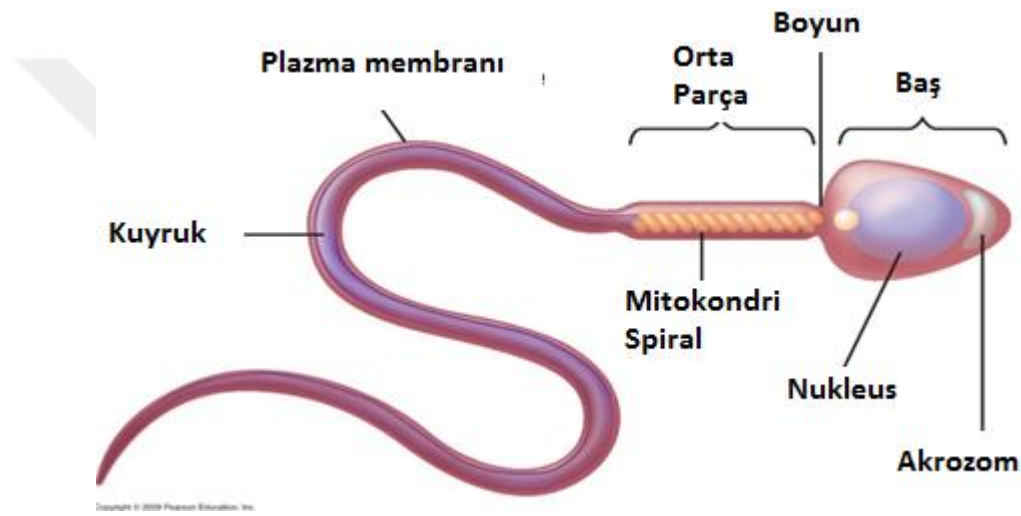
spermatogonyumlar da mitoz geçirek spermatozot-I'leri ( $2n$ ) verirler. Bunlar mayoz safhasının başlangıcını meydana getirirler. Spermatozot-I'ler  $2n$  kromozom sayısına ve  $2n$  DNA'ya sahiptirler. Oluştuktan sonra 1. mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler. DNA'ları replike olur ve iki katına çıkarak  $4n$  olur. Böylece spermatozot-I'ler;  $2n$  kromozom (her biri 2 kromatidli) ve  $4n$  DNA sahip olurlar. Bu hücreler mayozun redüksiyonel bölünmesiyle her biri 23 kromozom ve diploid hücrelerin DNA miktarına sahip 2 adet spermatozot-II meydana gelir (kromozom sayısı  $23=n$ , DNA= $2n$ ). Spermatozot-II'ler de DNA'larını replike etmeden, mayozun 2. fazı olan eşit mitoz bölünmeyle 23 kromozomlu ikişer haploid spermatozid meydana gelirler. Yani 1 spermatozot-I'den 4 adet  $n$  kromozomlu,  $n$  DNA'lı spermatozid meydana gelir. Bunların ikisi  $22+X$ , diğer ikisi ise  $22+Y$  kromozom düzenine sahiptir. Yani 1 spermatozot-I'den 4 adet  $n$  kromozomlu,  $n$  DNA'lı spermatozid meydana gelir. Bunların ikisi  $22+X$ , diğer ikisi ise  $22+Y$  kromozom düzenine sahiptir (Moor ve Persaud, 2009;Junqueira ve Carneiro, 2009).



**şekil 2.4.1.**Sperm Oluşumu (Spermatogenez)

### 2.4.2. Semen

Ejakülasyon ürünü olup 2-6 ml hacimde bulunan, viskoz, karakteristik kokusu olan bir sıvıdır. Ancak bu sıvının %10'unu spermiler oluşturur. Sperma sıvısının; %60'ı glandula vezikülozadan, %30'u prostattan, %10'u da cowper bezleri kaynaklıdır. Her ml'de 50-100 milyon arasında sperm bulunur. 15 milyonun altında sperm sayısı oligospermi olarak adlandırılır (Moor ve Persaud, 2009).



Şekil2.4.2. Normal sperm morfolojisi

### 2.4.3. Testisin Histolojik Yapısı

Testisler, yan kısımları yassılaştırmış, 4-5 cm uzunlukta, 2,5 cm genişlikte, 2-2,5 cm kalınlığında ve 20-30 gram ağırlığında bir çift olmak üzere erkek üreme organıdır. Testisler tunika albuginea adındaki kalın fibröz kapsül sarmıştır. Altında tunika vasküloza adlı damardan zengin bir bağ dokusu tabakası vardır. Bu tabaka testisin seminifer tübüllere destek sağlayan stromasına katılır. Seminifer tübüller, uzun ve aşırı derecede

kıvrımlı tübüllerden oluştuğu için çeşitli kesit düzlemlerinde kesite uğramış olarak görünürler. İçleri, ince bir bazal membran üzerinde duran çok katlı ve son derece özelleşmiş kompleks bir epitelde sarıdır. Seminifer tübülün epitel hücreleri iki kategoride incelenir: Sertoli hücreleri destek hücreleri olarak adlandırılan ilk tiptir. Spermatojenik hücreler bazal lamina ile lümen arasında bulunan 4-8 katlı hücre serileri olup bunlar farklı hücre tipleri değildir. Farklılaşarak gözle görülür yapılar olup morfolojik değişiklik gösterirler. Sertoli hücreleri bazal lamina üzerine yerleşmiş, seminifer epitelin bütün kalınlığına uzanan yüksek boylu piramit şekilli hücrelerdir. Germ hücreleri arasında oldukça düzenli yerleşmişlerdir. Işık mikroskopunda sitoplazmaları saydam, hücre sınırları düzensiz olduklarından dolayı zor ayırt edilir. Çekirdekleri ince uzun ve hücrenin uzun eksenine paralel konumlanırlar. Çekirdekçik ise kromatince az sayıda bir yapı olmasından dolayı bariz olarak seçilir ve kolayca teşhis edilebilir. Elektron mikroskopik araştırmalarda 9-12 mikron büyüklüğündeki çekirdekleri, düzensiz, kromatinden fakir, bir ya da iki tane özel yapıdaki bariz çekirdekçik bulundurlar. Sitoplazmalarında mitokondri, agranüler endoplazmik retikulum, ribozomlar, mikrofibril ve mikrotübüller tanınabilir. Ayrıca çok sayıda yağ damlacıkları, lipofuksin pigment granülleri, sadece insanda görülen 10-25 mikron uzunluğunda silindirik mekik şekilli Gharcot-Bottcher kristalleri de bulundurlar. Sitoplazmasının apikal yüzünde spermiyumların konumlanmasına uygun girintiler bulunur, yan uzantılarla ise spermatogonyum ve spermatositler arasına uzanır. Lizozomların çok bulunması fagositik aktivitenin bir göstergesidir. Birbirlerine zonula okludensler aracılığı ile bağlanarak tübüleri kuşatan bir hücre tabakası oluştururlar. Sadece sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar bazal laminaya yerleşmiş haldedir. Aralarında zonula okludenslerin de bulunuşu nedeniyle ekstratübüler aralıktan lümeneye

makro moleküllerin geçmesine engel olur, bu şekilde germ hücrelerinin proteinlerine karşı antikor yapılması önlenir. Peritübüler doku ile Sertoli hücrelerinin temelini oluşturduğu bu yapıya kan-testis bariyeri denir. Sertoli hücreleri gelişen germ hücrelerine mekanik destek sağlarlar, onların otoimmün reaksiyonlardan korunmasına ve beslenmesine yardımcı olurlar (Moor ve Persaud, 2009; Junqueira ve Carneiro, 2009; Ovalle ve Nahirney, 2009). Sıcağa, iyonize radyasyona ve spermatojenik hücreleri kolayca haraplayan toksik ajanlara karşı çok yüksek dirençlere sahiptir. Seminifer tübüllerin arasını areolar bağ dokusu doldurur.

## **2.5.Fekondasyon**

Erkek ve dişi gametlerin birleşip zigot oluşturmaya fekondasyon denir. Bu olay, tuba uterinanın ampulla bölgesinde meydana gelir. Erkek ve dişide fekondasyon öncesi bir seri olaylar oluşmaktadır.

1) Erkekte spermatozoonların genital yollardan geçişi: Testiste oluşan spermatozoonlar, genital kanallardan geçerken yardımcı bezlerin de salgılarını kendilerine katarak spermayı meydana getirirler. Duktus epididimisten geçerken fekondasyon özelliklerini kaybettiği için spermatozoonların dekapasitasyonu adı verilir.

2) Dişide gametlerin karşılaşması: Bir cinsel ilişkide genellikle 200-600 milyon spermatozoon, vaginanın arka forniksine bırakılır ve servikte toplanır. Spermatozoonlar serviksi kuyruklarının hareketi sayesinde uterusu pasif olarak geçerler.

Bu sayede spermatozoonların fertilizasyon sahasına ulaşmaları 5-45 dk. arasında meydana gelir. Fertilizasyonun gerçekleşeceği bölgeye ancak 300-500 sayıda spermatozoon gelebilir. Geri kalanlar; uterus, serviks ve vajinada değişikliğe uğrarlar.

Spermatozoonlar, dişi genital kanallarda ortalama 1 gün canlı kalabilirler. Siklus ortasında dişi genital kanallarda spermatozoonun yaşamını kolay hale getirmek için bazı değişiklikler meydana gelir. Ovulasyondan birkaç gün önce serviks bezleri, koyu müköz bir salgı yaparak spermatozoonları vagina asiditesine karşı korumaya alır. Bu sayede spermatozoonun hareketi kolaylaşır. Vaginaya bırakılan spermatozoonlar, dölleme kapasitesine sahip değildir. Uterus ya da tüplerde, salgı maddelerinin etkisi ile kapasitasyon özelliklerini kazanırlar. Kapasitasyonda, spermatozoonda morfolojik değişim olmaz. Fakat daha aktif olurlar. Akrozom üzerindeki glikoprotein örtü ve seminal plazma proteinleri ortadan kalkar. Spermatozoonlar tuba uterinalardan geçerken akıntıya karşı hareket etmeleri gerekir. Buna pozitif reotaksis özelliği denir. Ovum da tuba uterinanın fimbriya ovarikası tarafından yakalanıp yaklaşık 25 dakikada ampullaya ulaşır. Döllenme 12-24 saat içinde gerçekleşir. Eğer olmazsa ovum tüplerden uterusu geçer ve dejenere olur.

Dişi gamet haploid sayıda kromozoma sahiptir ve 2. mayoz bölünmenin metafaz aşamasında bloke olmuştur. Gametlerin karşılaşmasında sırasıyla; spermatozoonların korona radyatayı ve zona pellüsidayı geçmeleri, oosit ve spermatozoonun hücre zarlarının kaynaşması gerçekleşir (Moor ve Persaud, 2009; Junqueira ve Carneiro, 2009; Ovalle ve Nahirney 2009). Korona radyata tabakasını geçtikten hemen sonra spermatozoonlar, zona pellüsidaya tutunurlar ve onun içine girmeye çalışırlar. Akrozomlarından salgılanan akrozin ve nöraminidaz enzimlerinin litik etkisiyle zona pellüsidadada geçit yolları açarak, bu yollardan sekonder oosite ulaşmaya başlarlar.

İlk oluşan spermatozoon, zona pellüsidayı geçtikten hemen sonra, burada zona reaksiyonu adı verilen ve diğer spermatozoonların geçişine izin vermeyen bir olay ortaya çıkar. Zona reaksiyonunda, yapısal ve fizikokimyasal değişimler ortaya çıkarak zona

pellüsidanın diğer spermatozoonlara karşı geçirgenlik özelliğini kaybetmesine neden olur. Bu olay, sekonder oositin sitoplazmasındaki kortikal granüllerden salgılanan lizozomal enzimlerin etkisiyle meydana gelir. Bu enzimler de spermatozoon penetrasyonunu engellemek ve zona pellüsida yüzeyinde spermatozoon için bulunan türe özgü bir değişikliğin ortaya çıkmasını sağlar. Spermatozoon, oosit hücre zarına dokunduktan hemen sonra her iki plazma zarı da birleşir. Spermatozoonun oosit sitoplazması içine girmesine, oosit 3 ayrı şekilde tepki verir; Lizozomal enzimlerin kortikal oosit granüllerinden serbest kalmasıyla oosit membranı başka bir spermatozoon girişini engelleyecek şekilde farklılaşır. Büyük olasılıkla bu değişim, zona pellüsidanın spermatozoonlar için özgü reseptör alanlarını ortadan kaldırmasıdır. Polispermi böylelikle önlenmiş olur. Sekonder oosit, 2. mayoz bölünmesini, spermatozoon içeri girdikten hemen sonra bitirir. Erişkin dişi germ hücresi ovum ile 2. kutup hücresini oluşturur. Ovum nükleusu dişi pronükleus olarak isimlendirilir. Sperm kuyruğu dejenere olduktan sonra da onun nükleusuna erkek pronükleus adı verilir. Erkek ve dişi pronükleus morfolojik olarak birbirinden ayrılamaz. Her iki pronükleustaki haploid sayıda kromozomlar duplike olur. Eğer olmazsa, iki hücreli evrede zigotun her hücresi, normal DNA miktarının yarısına sahiptir. DNA sentezinden sonra, iki pronükleus ovumun merkezinde birbirlerine yakınlaşırlar ve daha sonra birleşirler, zarları erir. 23 anneye ve 23 babaya ait çift yapılmış kromozomlar birbirlerine karışır. Dolayısıyla tek hücreli zigot oluşur. Çift yapılmış kromozomlar karşı kutuplara kayarken hücrenin yüzeyinde sitoplazmayı iki parçaya ayıran derin bir yarık meydana gelir.

Fekondasyonun sonucu olarak haploid sayıda iki üreme hücresinin bir araya gelmesiyle diploid sayıda anne ve babanınkinden farklı bir kromozom kombinasyonuna sahip bir zigot oluşur. Embriyonun cinsiyeti belirlenir. X taşıyan sperm dişi embriyo



(XX), Y taşıyan sperm erkek embriyo (XY) meydana gelmesine sebep olur. Segmentasyon oluşumu başlar. Her segmentasyon sonrasında meydana gelir ve bu hücrelere blastomer adı verilir. Ancak döllenmeyen oosit 24 saat içinde dejenere olur (Moore ve Persaud, 2009; Junqueira ve Carneiro, 2009; Ovalle ve Nahirney, 2009).

## **2.6. Erkek İnfertilitesinde Etyoloji**

İnfertilite çiftlerde korunma olmaksızın 1 yıllık düzenli bir şekilde cinsel ilişkiye rağmen gebelik durumunun olmama halidir. İnsidansı %15 olarak verilmekteyken bu oran son yıllarda giderek artmaktadır. Dünyada ortalama 80 milyondan fazla çiftte rastlanmaktadır. Çiftlerin 1/4'ü subfertil, 1/8'i ilk gebelikte sorun yaşamakta, 1/6 sı sonraki gebelik isteminde sorun yaşamakta, %3 çift tamamen çocuksuz, %6 çift ise istediği sayıda çocuk sahibi olamamaktadır. Son 50 yıl içerisinde sperm sayısında giderek bir gerileme olduğu saptanmıştır. Bu alanda yapılan pek çok çalışma vardır fakat evli erkeklerde bu durum büyük bir problem olarak devam etmektedir. Çünkü subfertil erkeklerin yaklaşık %25'inde bir neden gösterilememektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 7273 evli infertil çift üzerinde infertilite nedenini belirlemek için yapılan bir çalışmada infertiliteden sorumlu olarak %41 oranında kadın faktörü, %24 oranında erkek faktörü, %24 kadın ile erkek faktörü birlikte tespit edilmiştir ve %11 çiftte de herhangi bir neden gösterilememiştir (Tournaye, 2006). Buradan da anlaşılacağı gibi evli infertil çiftlerin %48'inde mutlaka erkek faktörü ön plana çıkmaktadır.

**Tablo 1.1.** Erkek infertilitesi nedenleri

<b>Erkek infertilitesinde etioloji</b>	<b>(%)</b>
Cinsel faktörler	1.7
Ürogenital enfeksiyonlar	6.6
Konjenital anomaliler	2.1
Varikozel	12.3
Endokrin bozukluklar	0.6
İmmünolojik faktörler	3.1
Diğer hastalıklar	3.0
İdiyopatik semen bozuklukları	75.1

Dünya Sağlık Örgütü'nün infertil çiftlerin standardize edilmiş araştırma ve teşhisi ile ilgili el kitabında erkek faktörünün etiyolojik grupları yukarıdaki gibi sıralanmaktadır. Burada sayılan gruplar içerisindeki idiyopatik semen bozuklukları grup %75 gibi büyük ölçüde bir yer kaplamaktadır. İşte amacımız bu grubu ileri sperm fonksiyon testleri ile mümkün olabildiğince tespit ederek, sperm sorunlarını tespit edebilmek ve yardımcı üreme teknolojileri ile bu gruptaki hasta çiftlerin çocuk sahibi olabilmelerine yardımcı olmaktır.

Genel tedavi planlaması için bir diğer sınıflama şeklindeyse infertil erkek 3 ana grup altında sıralanmaktadır.

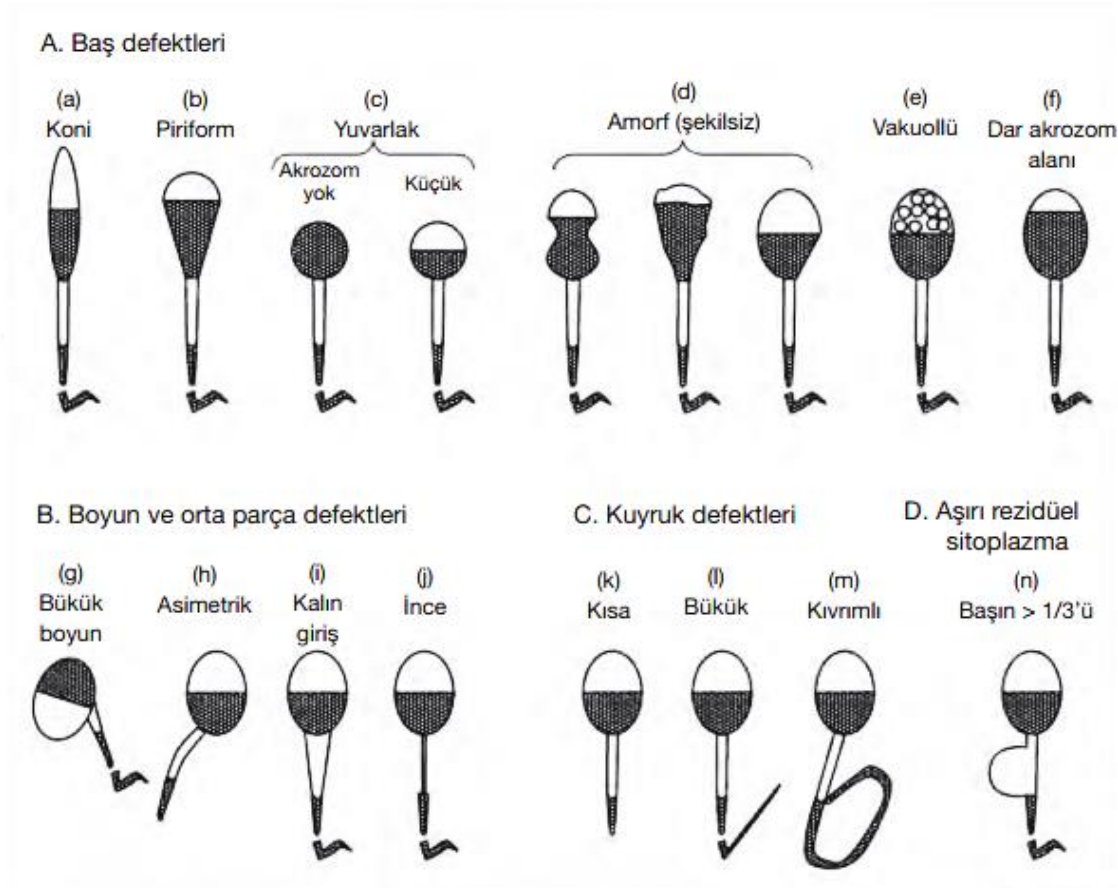
Sayılan bütün bu nedenlere karşı eğer yerine konulabilecek bir tedavi yöntemi olursa bu hayata geçirilebilir. Fakat sebebi tespit edilemeyen populasyon için bugüne kadar ampirik tedavi yöntemlerine başvurulmuştur. Bu tedavilere örnek olarak;

gonadotropinler, anti östrojenler, aromataz inhibitörleri, androjenler, testosteron rebound tedavisi, antibiyotikler, antiinflamatuvar ajanlar, çeşitli vitaminler, kallikreinler, kaptopril ve tiroksin hormonu verilebilir. Gene son yıllarda pure FSH tedavisinin IVF'te fertilizasyon oranlarını arttırdığını kanıtlayan yayınlar vardır (WHO 1993). Bu tedavinin etki mekanizmasının nasıl olduğuna dair rutinde bakılan bir parametre henüz sahip değiliz. Yardımcı üreme teknolojileri işte bu idiyopatik hasta grubunda yeni bir çığır açarak IVF endikasyonları içine erkek faktörü ve açıklanamamış infertilite olgularını da eklemiştir. Son olarak da ortaya çıkan mikroenjeksiyon teknikleri ile eskiden imkansız olarak belirlenen olgularda da fertilizasyon ve sonrasında gebelik meydana gelmektedir. Bunlara örnek olarak; Sertoli cell only sendromu, kriptospermi, kartagener sendromu (immotil silya), %0 motilite ve %0 morfoloji grupları ile tüm obstrüktif azospermiler verilebilir.

Sonuç olarak idiyopatik olgularda invitro ortamda oluşan spermin fertilizasyon kapasitesinin dikkatle ölçülerek değerlendirilmesi, fertilizasyon sürecinin hangi aşamasında defekt olduğunun belirlenmesi ve sonrasında da bu defekti düzeltecek veya by-pass edecek bir yöntemle fertilizasyonun başarılması gerekmektedir.

## **2.7.Morfoloji**

Spermin fertilite kapasitesinin morfolojik inceleme ile etkin bir indeks olarak değerlendirilmesi 1951 yıllarına kadar süregelmiştir. Kruger tarafından strict kriterler ile morfoloji değerlendirilmesinin tanımlanmasıyla bu parametre gittikçe artan bir önem kazanmıştır. Bu yöntem ilk defa 1986 yılında yayınlanmış ve 1990 yılında Menkveld ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir. Kısa süre sonra rutin incelemede yerini alan bu yöntemin, Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre morfoloji değerlendirilmesi yöntemine olan üstünlüğü kanıtlanmıştır.



Şekil 2.8. Anormal sperm şekilleri (WHO 2010)

**Tablo2.2.** Sperm morfolojisinin gebelik oranlarına etkisi

Normal Form	Gebelik Oranları
%4' den az	% 7,6
%4 ile % 14 arası	% 49,4
%14' ün üzerinde	% 88,3

**Tablo2.3.** Semen analizi terminolojisi

Semen Terminolojisi	
Normospermi	Tüm parametreler normal
Oligospermi	Sperm sayısının azalması →5-15 mil/ml, ağır →<5 mil/ml
Astenospermi	Azalmış motilite
Teratospermi	Anormal morfolojili formların artması
Oligoastenoteratospermi	Tüm parametreler subnormal
Azospermi	Semende sperm yok
Aspermi	Ejekülat yok
Lökositospermi	Semende artmış lökositler (>1 mil/ml)

## 2.8.Sperm Analizi

Semen analizi hem tedavi amaçlı hemde bilimsel araştırmalarda infertiliteyi teşhis etme kriterlerinden birisidir. Bu analiz için en az 2 günlük (insan için) cinsel perhizden sonra alınan taze semen makroskobik ve mikroskobik incelemeye tabi tutulur. Bu analiz

sonucunda spermin sayısı, hareketliliği ve morfolojisi belirlenerek sonuçlar ortaya çıkar. Semen analizi, infertil erkek bireyin değerlendirilmesinde ve fertilité durumunu belirlemede önem arz etmektedir. Klinikte tedavinin belirlenmesinde ve alınan cevabın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bilimsel araştırmalarda spermin hareketliliği, sayısı veya şekli ile ilgili detaylı morfolojik çalışmalar kullanılmaktadır (Carrell, 2000; Irvine, 2000). Geleneksel semen analizinde, ejakulat alındıktan sonra en fazla 60 dakikaya kadar likefiye olması için beklenir ve daha sonra analiz kısmına geçilir. WHO (World Health Organization, 2010) 'un manüel olarak değerlendirdiği semen analizi için referans aralıkları aşağıdaki gibidir.

Hacim:  $\geq 1,5$  ml

Likefikasyon süresi: 30 - 60 dk içinde

Ph:  $\geq 7,2$

Canlılık %58 veya daha fazla

Lökosit: ml'de 1 milyondan daha az

Sperm konsantrasyonu: ml'de  $\geq 15$  milyon

Hareketlilik: 30 ve 60 dk sonra hareketlilik oranı sırasıyla,  $\geq \%50$ ,  $\geq \%25$

Lökosit: ml'de 1 milyondan daha az

Normal morfoloji: en az  $\geq \% 14$

### **2.8.1. Spermilerin Morfolojik Açıdan Sınıflandırması**

İnsan spermilerinin morfolojik olarak diğer memelilere kıyasla yapı ve büyüklük açısından büyük farklılık gösterirler. Normal fertil ejakulatta dahi spermatozoonlar arası şekil, büyüklük, baş ve akrozom şekli yönünden değişik yapıda bulunur. Fertil erkeklerin ejakulatında da nüklear vakualizasyon, sitoplazmik damlacıkların varlığı, kuyruk

anomaliliği görülebilir (Ombelet ve ark., 1995). Bir spermatozoonun anormal veya normal olduğunu belirleyen özellikleri standardize etmek için pek çok uygulama yapılmıştır (Guzick ve ark., 2005). Son zamanlara kadar sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde pek çok yöntem uygulanmıştır. İlk Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organisation, 1980) sınıflaması, sperm morfolojisinin değerlendirilmesi yönünde büyük bir adım olmuştur. Arkasından Hofmann ve Haider, Dusseldorf sınıflaması adı altında yeni bir morfoloji sınıflaması ortaya koymuştur (1985). Bu sınıflamada spermatozoonun uzaması ve akrozom hasarları üzerine daha fazla önem verilmiştir. 1987'deki ikinci WHO kılavuzu ile semen analiz kriterleri yeniden revize etmiştir. 1992'deki üçüncü WHO sınıflamasında ise sperm morfolojisinin değerlendirilmesi daha ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Morfolojik olarak normal grubun yanı sıra 4 sınıf halinde anomaliler sınıflandırılmış ve teratozoospermi indeksi hazırlanmıştır.

Bu sınıflandırmada spesifik infertilite nedenlerinin ayrıca belirtilmesi gerekmektedir. Bu son sınıflamada normal morfolojiye sahip olma sınırı %50'den %30'a indirilmiştir. Kruger ve Menkveld, sperm morfolojisine yönelik kesin Tygerberg kriterlerini tanımlamıştır (Aydos, 2005). Bu sınıflandırmada, spermatozoon bir bütün olarak incelenir ve morfolojileri düzensiz sınır hatları ve hafifçe anormal sperm başlarının hepsi anormal olarak değerlendirilir. Tygerberg kriterlerine göre, morfolojik değerlendirmenin sonuçları üç kategoride ele alınabilir: 1. Normal morfolojiye sahip grup (%14'den fazla normal form mevcut), 2. İyi prognozlu grup (%4-14 arası normal form mevcut), 3. Kötü prognozlu grup (%4'den az normal form mevcut) (Aydos, 2005).

## 2.9. Numune Toplama

-Semenin ortam sıcaklığındaki değişikliklere maruziyetini kısıtlamak, numunenin alınmasıyla analizi arasındaki zamanı kontrol etmek amacıyla numunenin laboratuvarın yakınındaki özel bir odada verilmesi gerekir.

-Numune en az iki en çok yedi günlük cinsel perhizden sonra alınmalıdır. İlâve numune gerekirse, her defasında cinsel perhiz süresi mümkün olduğu kadar sabit tutulmalıdır.

-Kişiyeye semen numunesinin alınmasıyla ilgili anlaşılır yazılı ve sözlü bilgilendirme yapılmalıdır. Semen numunesinin tamamının toplanması ve numunenin herhangi bir kısmının ziyan olması halinde durumun ilgiliye bildirilmesi gerektiği vurgulanmalıdır.

-Rapor formuna aşığıdaki bilgiler kaydedilmelidir kişinin adı, doğum tarihi, kişisel kod numarası, cinsel perhiz süresi, numunenin alındığı gün ve saat, numunenin eksiksiz olup-olmadığı, numunenin elde edilmesindeki herhangi bir zorluk, numunenin alınmasıyla semen analizine başlanması arasında geçen süre.

### 2.9.1. Tanısal veya Araştırma Amacıyla Semen Toplanması

-Numune masturbasyonla elde edilmeli, ejakülat spermatozoa için toksik olmadığı doğrulanmış cam veya plastikten temiz ve geniş ağızlı bir kap içine alınmalıdır.

-Ejakülasyondan sonra spermatozoayı olumsuz etkileyebilen geniş çaplı ısı değişikliklerinden kaçınmak için, numune kabı 20°C ilâ 37°C arasındaki ortam sıcaklığında tutulmalı, kabın üzerine erkeğin adı, kod numarası, numunenin alındığı tarih ve saatin yazılı olduğu bir etiket yapıştırılmalıdır.



-Semen likefiye olurken numune kabı laboratuvar sehpaı üzerinde veya bir inkübatörde (37°C) bırakılır.

-Semen numunesi tam değilse, özellikle ilk, yani spermden zengin fraksiyonu eksikse, bu durumu raporda bildirin. Numune eksikse, 2-7 gün arasında bir cinsel perhiz döneminden sonra ikinci bir numune alınmalıdır.

### **2.9.2. Yardımlı Üreme Teknikleri İçin Semen Steril Toplanması**

-Tanı amaçlı toplamada olduğu gibi uygulanır, ancak numune kapları, pipet uçları ve karıştırma için kullanılan pipetlerin steril olması gereklidir.

### **2.9.3. Mikrobiyolojik İncelemeler İçin Semen Steril Toplanması**

Bu durumda, semen dışı kaynaklardan gelen kontaminasyondan (Ör: deriden gelen ortakçı mikroorganizmalar) kaçınılmalıdır. Kişi:

- İdrarını yapmalı.
- Deriden gelen ortakçı mikroorganizmalarla bulaşma olasılığını azaltmak için ellerini ve penisini sabunla yıkamalı.
- Sabunu iyice durulamalı.
- Ellerini ve penisini yeni bir tek kullanımlık peçeteyle kurulamalı.
- Steril bir kap içine boşalmalıdır.

### **2.9.4. Semen Evde Alınması**

Klinikte masturbasyonla numune verilemediği veya laboratuvar yakınında uygun bir mekânın mevcut olmadığı istisnai durumlarda, semen numunesi evde alınabilir.

Kişiye, semen numunesinin alınmasına ilişkin anlaşılır yazılı ve sözlü bilgilendirme yapılmalıdır. Bilgilendirmede; semen numunesinin, spermden zengin ilk bölümü de içerecek şekilde tam olması gerektiği, numunenin herhangi bir kısmının ziyan olması halinde durumun ilgiliye bildirilmesi gerektiği vurgulanmalıdır. Numune tam değilse, bu durum raporda bildirilmelidir.

Kişiye daha önceden tartılmış, üzerinde adı ve tanıtm kod numarası yazılmış bir kap verilmelidir. Kişi, semeni verdiği zamanı kaydetmeli ve numuneyi laboratuvara bir saat içinde getirmiş olmalıdır.

Laboratuvara taşınma sırasında numune 20°C ilâ 37°C arasında muhafaza edilmelidir. Raporda numunenin evde veya laboratuvar dışında başka bir yerde alındığı belirtilmelidir.

#### **2.9.5. Semen'in Kondomla Alınması**

Mastürbasyonla numune alınamayan istisnai durumlarda, cinsel birleşme sırasında kondom içine numune alınabilir.

Semen'in alınması amacıyla tasarlanmış ve toksik olmayan özel kondomlar kullanılmalıdır; bu kondomlar piyasada bulunmaktadır. Kişiye kondom üreticisi tarafından kondomun kullanımı, ağzının kapatılması, laboratuvara gönderilmesi veya götürülmesi konularında bilgi verilmelidir.

Kişi, semeni verdiği zamanı kaydetmeli ve numuneyi laboratuvara bir saat içinde getirmiş olmalıdır. Laboratuvara taşınma sırasında numune 20°C ilâ 37°C arasında muhafaza edilmelidir.

Raporda, numunenin evde veya laboratuvar dışında başka bir yerde, cinsel birleşme sırasında özel bir kondom kullanılarak alındığı kaydedilmelidir. Not:

Spermatozoanın hareketliliğini bozan maddeler içerdiği için, sıradan lateks kondomlar semen alınması amacıyla kullanılmamalıdır (Jones ve ark., 1986).

### **2.9.6. Numunelerin Güvenli Biçimde İşlenmesi**

Semen numuneleri tehlikeli enfeksiyon etkenleri (Ör: insan immünyetmezlik virüsü [HIV], hepatit virüsleri veya herpes simpleks virüsü) içerebildiğinden, biyolojik açıdan riskli maddeler olarak ele alınmalıdır.

Numune; biyolojik analiz, intrauterin inseminasyon (IUI), in vitro fertilizasyon (IVF) veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için işlemlerden geçirilecekse veya semen kültürü yapılacaksa steril malzemeler ve teknikler kullanılmalıdır. Laboratuvarın güvenliği için iyi laboratuvar pratiği gereklidir (WHO, 2010).

## **2.10. Sperm değerlendirme**

### **2.10.1. İlk Makroskopik Değerlendirme**

Semen analizi, likefaksiyondan hemen sonra basit inspeksiyonla (gözle muayene) başlamalıdır. Dehidratasyon veya ısı değişikliğinin semen kalitesini olumsuz etkilemesinden kaçınmak için, ejakülasyondan sonra tercihen 30 dakika, en fazla bir saat içinde analiz yapılmalıdır.

Toplama kabına ejakülasyonun hemen ardından semen, tipik olarak yarı katı koagüle kitle şeklindedir. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde genellikle likefiye olmaya (incelmeye) başlar. Bu sırada sıvı içinde heterojen topaklardan oluşan karışım görülecektir. Likefaksiyon devam ederken semen daha homojen ve hemen hemen su gibi bir hale gelir. Son evrelerde yalnızca küçük koagülasyon alanları kalır. Numunenin tümü

oda sıcaklığında genellikle 15 dakika içinde likefiye olur, bu durum nadiren 60 dakika veya daha uzun zaman alabilir.

Likefaksiyondan hemen sonra ya da ejakülasyondan sonraki 30 dakika ile bir saat içinde semenin gözlenmesi ile analize başlanmalıdır. Likefaksiyon genellikle ilk 15 dakika içinde görülmesine karşın normal semenin likefaksiyonu oda sıcaklığında 60 dakikada tamamlanır. Tam likefaksiyon 60 dakikada oluşmazsa bildirilmelidir.

Homojen bir örnek elde edilmesine yardımcı olabilir. Nadiren likefaksiyon oluşmayarak semen değerlendirmesini zorlaştırır. Bu tür vakalarda mekanik karıştırma veya enzim ile çözme gerekebilir. Bu uygulamalar seminal plazma biyokimyasını, sperm motilitesini ve morfolojisini etkileyebileceklerinden dolayı raporda belirtilmelidir. Likefaksiyondan sonra geniş ağızlı (yaklaşık 1.5 mm) plastik pipete örneği dikkatlice çekerek ve yerçekiminin etkisiyle damlamasını bekleyip damla ile pipet arasında oluşan ince ipliğin uzunluğu gözlenerek viskozitesi ölçülebilir.

Normal bir örnek pipeti küçük ayrı damlalar şeklinde terk eder. Anormal viskozitelere bu uzunluk 2 cm'den daha uzundur. Yüksek viskozite sperm motilitesini, konsantrasyonunu, spermin antikora kaplanmasını ve biyokimyasal ölçümleri etkileyebilir. Viskoziteyi azaltma yöntemleri gecikmiş likefaksiyonda kullanılanla aynıdır. Likefiye olmuş normal bir örnek homojen ve gri-opelasan bir görünüme sahiptir. Sperm konsantrasyonu çok düşükse örnek daha az opak görünür. Renk, örneğin eritrosit varsa (hemospermi) kırmızı-kahverengi, hastanın sarılığı varsa veya bazı vitaminlerin ve ilaçların kullanımı ile sarı olabilir. Ejakülatın hacminin oluşumuna ağırlıklı olarak seminal vezikül, prostat salgıları, az bir oranda bulboüretal bezler ve epididim katkıda bulunur. Total sperm hücresi ve sperm olmayan hücrelerin sayısının hesaplanmasında kullanılacağı için hacmin hassas bir şekilde ölçülmesi gerekir. Hacim en iyi şekilde

örneğin içine verildiği kabın ağırlığı tartılarak ölçülebilir. Dansite 1gr/ml olarak varsayılır. Hacmin 0.3-0.9 ml daha düşük hesaplanmasına neden olabileceğinden, örneğin pipete veya enjektöre çekilmesi veya ölçme silindire boşaltılması tavsiye edilmemektedir (Auger ve ark.,1995; Iwamoto ve ark.,2006). Semen hacmi için en düşük referans değeri 1.5 ml'dir. Düşük semen hacimleri, ejakülatuar kanal obstrüksiyonu veya seminal vezikül gelişiminin yetersiz olduğu konjenital bilateral vasdeferens agenezisinin karakteristiğidir (Taille ve ark., 1998; Eckardstein ve ark.,2000).Hacmin düşük olması aynı zamanda örnek toplama problemi, parsiyel retrograd ejakülasyon ve androjen eksikliğini de gösterebilir. Yüksek semen volümleri aksesuar bezlerin aktif inflamasyonunda gözlenen aktif eksudasyonun bir yansıması olabilir. Semen pH'sı esas olarak alkali özellikteki seminal vezikül sekresyonu ile asidik prostatik sekresyon olmak üzere aksesuar bezlerin sekresyonları arasındaki dengeyi yansıtır. pH likefaksiyondan sonra o laboratuvar için belirlenmiş standart bir zamanda, tercihen 30 dk içinde ölçülmelidir. Normal örnekler için aralığı 6.0 ile 10.0 arasında olan Ph kağıdı kullanılmalıdır. Semen örneği iyice karıştırıldıktan sonra bir damla semen pH kağıdı üzerine eşit olarak yayılır, 30 saniyeden uzun olmamak koşulu renk değişimi beklenir ve kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırılarak pH okunur. Semen pH'sı için alt referans değeri 7.2 olarak kabul edilmiştir. Düşük hacimli ve sperm sayısı az olan bir örnekte eğer pH 7.0'dan küçükse ejakülatuar kanal obstrüksiyonu veya seminal vezikül gelişiminin yetersiz olduğu konjenital bilateral vasdeferens agenezisi akla gelmelidir (Taille ve ark.,1998; Eckardstein ve ark.,2000). Semen pH'sı doğal tamponlama azaldıkça zamanla artabilir. Bu nedenle yüksek pH değerleri klinik olarak az miktarda yararlı bilgi verir.

## **2.10.2.İlk Mikroskopik Değerlendirme**

### **2.10.2.1 Sperm Motilitesi**

Ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde, tercihen likefaksiyondan sonraki 30 dakikada motilite değerlendirilmelidir. Taze hazırlanmış preparatların stabil hale gelmesi için yaklaşık bir dakika bekletilir. Motilite değerlendirmesi faz kontrast mikroskopta 200-400 büyütmede yapılır. Sperm motilitesi 37°C’de ısıtılmış tabla üzerinde veya oda sıcaklığında bakılabilir. Farklı motilite kategorilerindeki spermilerin oranlarını hesaplayabilmek için en az beş mikroskopik alanda en az 200 sperm hücresinin değerlendirilmesi gerekir. Aynı semen örneğinden hazırlanmış başka bir preparatta tekrar 200 sperm sayılıp birbirinden bağımsız bir şekilde motilite yüzdeleri kıyaslandığında kabul edilebilir farklılık oranları varsa işleme devam edilir. Büyük farklar varsa bu durumda yeni preparat hazırlamak gerekir. Fokal bir mikroskop düzleminde belirlenmiş çizgilerin sınırladığı alanda ya da sperm sayısı azsa tüm alanda sperm hücreleri sayılarak motilite değerlendirilir.

### **2.10.2.3. Sperm Canlılığı**

Sperm canlılığı hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranının %40’dan az olduğu durumlarda özellikle önemlidir. Aynı zamanda bu testle hareketlilik değerlendirmesinin doğru yapıp yapılmadığı da kontrol edilebilir. Canlı olmayan hücrelerin sayısı hareketsiz olan spermilerin sayısını aşmamalıdır. Normalde canlı hücrelerin sayısı motil hücrelerden fazladır.

### **2.10.2.4. Sperm Sayımı**

“Total sperm sayısı” ve “sperm konsantrasyonu” terimleri aynı değildir. Sperm konsantrasyonu her bir ünite semen volümü başına düşen sperm sayısını ifade ederken

totalsperm sayısı tüm ejakülattaki sperm sayısını ifade eder. Total sperm sayısı semen analizi sırasında hesaplanan sperm konsantrasyonundan elde edilir. Ejakülattaki total sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu dölleme yeteneği, gebelik oluşumuna kadar geçen süre ve gebelik oranları ile ilişkilidir (Slama ve ark., 2002; Larsen ve ark., 2000). Normal bir erkekte obstrüksiyon yoksa ve cinsel perhiz süresi çok uzun değilse total sperm sayısı testis volümü ile koreledir ve bu da testislerin sperm üretme yeteneğini ve yolun sağlamlığını gösterir (MacLeod ve Wang 1979; Handelsman ve ark.,1984). Seminal vezikül ve prostat salgılarının miktarından etkilenebilen sperm konsantrasyonu ise fertilizasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir ancak testis fonksiyonunu değerlendirmek için özgün değildir (Eliasson ve ark., 1975). Sperm sayımı için 100 µm derinlikte hemositometre sayma kamaraları tavsiye edilmektedir.

### 3. MATERYAL ve METOD

Çalışmamız Gaziosmanpaşa Üniversitesi Androloji laboratuvarına gelen bireylerden alınan semen numuneleri üzerinde yapıldı. Numunelerin alınması, alınan numunelerin spermiyogram analizleri, sperm yayma preparatların hazırlanması, Kruger Strict sperm morfoloji analizleri Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalımız Androloji Laboratuvarında ve immünohistokimyasal uygulamalar ile mikroskopik analizler Anabilim dalımız araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışmamıza infertil 20 (Bir yıl boyunca düzenli ve korunmasız bir cinsel yaşamı olan ve bebek sahibi olamayan bireyler) ve fertil 5 olmak üzere toplam 25 birey dahil edildi.

Çalışmamızın semen örneklerinin toplanmasına Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İnsan deneyleri Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 27.09.2016 Tarihli 2016-09/11 Nolu kararı ile alınan izinden sonra başlandı.

#### 3.4.1. Spermiyogram Testi

Erkek infertilitesinin saptanması ve değerlendirilmesinde en önemli test Semen Analizi (Spermiyogram)'dir. Spermiyogram testi bir yıl boyunca düzenli ve korunmasız bir cinsel yaşamı olan çiftlerin, bebek sahibi olamamaları durumunda erkeklerden istenen testtir. Sperm testi (Spermiyogram, Sperm tahlili) yaptırmadan önce 2-7 günlük cinsel perhiz yapılmalıdır. Bu 2-7 günlük dönemde hiç bir şekilde boşalma (uyku vb.) olmamalıdır. 3 günlük cinsel perhiz sonrası androloji laboratuvarlarında ayrılan özel sperm verme odalarında mastürbasyon yöntemi ile herhangi bir kayganlaştırıcı madde



(krem, tükürük, vs.) kullanılmadan steril bir kaba tam bir boşalma ile semen örnekleri alındı.

**İlk 5 dakika:**

- Alınan örneğin likefiye olması için inkübatöre (37°C) ya da tezgaha yerleştirilmesi.

**30-60 dakika arasında:** • Semen görünümü ve likefaksiyonun değerlendirilmesi

- Semen hacminin ölçülmesi
- Mikroskopik inceleme, sperm sayısı ve motilitesini değerlendirebilmek için dilüsyon ve ıslak preparatın hazırlanması
  - Sperm canlılığının değerlendirilmesi (motil spermlerin oranı düşük ise)
  - Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için semen yaymasının hazırlanması
  - Sperm sayısının değerlendirilmesi
  - Gerek duyulursa MAR (mixed antiglobulin reaction) testinin yapılması
  - Yuvarlak hücreler varsa peroksidaz pozitif hücrelerin değerlendirilmesi
  - Immunobead testi için sperm hücrelerinin hazırlanması (gerek duyulursa)
  - Semen santrifüje edilmesi (biyokimyasal belirteçler çalışılacaksa)

**Üç saat içinde:**

- Gerekliyorsa örneklerin mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmesi

**Dört saatten sonra:**

- Morfolojik değerlendirilme için preparat hazırlanması

**Aynı gün içinde daha sonraki dönemde** (örnek dondurulmuşsa sonraki gün):

- Aksesuar bez belirteçlerinin ölçülmesi (gerekirse)
- İndirekt immunobead testinin yapılması (gerekirse)

**3.4.2. Makler Counting Chamber ile sperm sayımı**

Likefiye olmuş semen hiç bir muameleye tabi tutulmadan direk Makler Chamber ile faz-kontrast ışık mikroskopunda 20 x'lik objektif altında değerlendirildi. Güvenilir bir değerlendirme için ideal olan, Makler kamarada 100 karedeki spermeleri saymaktır. Ancak Makler sperm sayım aletinde toplam 10 adet karedeki sperm sayısı temel alınıp sayım sonucu  $\times 10^6$  /ml olarak ifade edildi.

Makler sperm sayma kamarası ile sayım şöyle değerlendirilir:

-Bir damla semen kamaranın merkezine damlatılıp üzerine lamel (kapak camı) kapatılır.

-Aletin kaide kısmında bulunan 4 adet kuvarz bacak sayesinde spermeler 10 mikron derinlikte yüzerler.

-10 mikronluk derinliğe ancak bir adet sperm başının sığabileceği için bir hat üzerinde yapılacak sayım 20 x objektifle hassas olarak yapılabilir.

-Kamaranın kapak camı üzerinde her biri 0.1 mikronkare olan 100 adet kare içinden herhangi bir hat üzerinde 10 adet kare içinde bulunan spermeler sayılır

-Sayım sonunda bulunan değer mililitredeki milyon adet sperm olarak değerlendirilir

-Sonuçlar kaydedilir. WHO 2010 kriterlerine göre sayım yapılan semen örneklerinde spermler A ileri hareketli, B yerinde hareketli ve C hareketsiz olarak sınıflandırıldı, konsantrasyon ve motil sperm sayıları elde edildi.

Eğer inseminasyon yapılacak ise numune alındıktan hemen sonrasında ağzı kapalı steril kapl içerisinde 36C de likefiye olması için bekletilir. Bu esnada medyumlar da steril falkon tüpleri içerisinde aynı ortama konularak vücut ısısına getirilir. Likefiye olmuş olan ejakulat falkon tüplerindeki medyumlar üzerine konularak ısı ayarlı santrifüj ile 1800 Rpm'de 36°C de 10 dakika santrifüj edilir. Üstte kalan sıvı uzaklaştırılır altta kalan sperm hücresi yoğunluklu pelet üzerine yıkama medyumu 1-1,5ml kada ilave edilir. Pipetaj ile homojen karışım sağlanır. Mikroskopta kontrol edilip sayısal konsatrosyonuna bakılır her hangi bir problem yok ise etüvde 5-10 dakika beklerileri ve kullanıma hazır hale getirilmiş olur.

### **3.4.3. Sperm Yayma Protokolü**

Ejakulattan yaklaşık 2 ml alındı ve üzeri 10 ml'e kadar PBS'le tamamlandı.

Santrifüj edilip altta kalan pelletin durumuna göre üstte kalan süpernatant atıldı.

Kalan kısım pipetlenerek lam üzerinde yayma işlemi yapıldı.

Bu lamlar yaklaşık 15 dk oda sıcaklığında kurutuldu.

Kuruyan lamlar %4'lük formaldehitte 10 dk fikse edildikten sonra distile suda yıkandı, dokuların üzerine BSA damlatılır. 45 dk bekletilir.

Sonra BSA hazırlanması; (%3'lük) 0.075 BSA 2.5'a kadar PBS ile tamamlandı.

BSA yıkandıktan sonra (tercihen PBS ile) muamele edilip 1 gece oda sıcaklığında inkübe edildi.

### 3.4.3. Kruger Strict Sperm Morfoloji Analizi

"Kruger Strict Kriterleri" özellikle spermdeki şekil bozukluklarını (morfolojik anomali) göz önüne alan mikroskopik bir değerlendirme metodudur. Kruger' in morfoloji değerlendirmesinde dikkate aldığı yapısal özellikler aynıdır. Sadece diğerlerinin sınırda kabul ettiği spermleri Kruger anormal olarak kabul etmektedir.

Spermlerin morfolojik incelenmesinde öncelikle yapısal olarak normal spermin tanımının yapacak olursak: Sperm baş, orta parça ve kuyruk bölümlerinden meydana gelmiştir. Baş 4-6 µm. uzunluğunda, 2-4µm.genişliğindedir. Orta parça 4-5µm ve kuyruk kısmı da 50-55µm uzunluğunda olmalıdır. Sperm başı yukarıda belirtilen büyüklükte yassı, oval ve sınırları düzgün olmalıdır. Başın %40 ile 70'ini akrozomal kep kaplamalıdır. Böylece çekirdek-akrozomal kep oranı, akrozomal kepin irregüler görünümü veya hücre sınırlarının düzgün olmayışı incelenerek normal ve anormal ayırımı yapılmalıdır. Fertilizasyon sırasında sperm postekvatoriyal bölgeden oolemma ile birleşeceğinden, bu bölgenin de dikkatlice incelenmesi gerekir. Bu incelemenin yanı sıra başın normalden büyük veya küçük oluşu, çift oluşu veya şeklinin irregüler olması gibi kolayca gözlenebilen yapısal özellikleri not edilmelidir. Orta parça uzunluğu ve genişliği yönünden incelendikten sonra sitoplazmik artık (droplet) içerip içermediği kontrol edilmelidir. Spermiyogenezis sırasında sitoplazmanın çoğunluğu atılarak hücre son şeklini alır. Orta parçada gözlenen sitoplazmik artıklar büyüklüklerine göre değerlendirilmelidir. Sperm kuyruğu giderek incelen yapısı, uzunluğu, kalınlığı ve kıvrıklığı yönünden incelenir. Ayrıca çift kuyruklu spermler varsa bunlar da belirtilmelidir. Özel bir boyama yöntemi sonrası sperm şekil (morfoloji) özellikleri incelenerek sperm örneğinin fertilizasyon kapasitesi belirlenir. Normal morfolojinin %14'ün altında ve üstünde olduğu durumlardaki fertilizasyon oranları karşılaştırılmıştır.

ve buna göre normal morfolojinin %14'ün üzerinde olduğu durumlarda fertilizasyon % 88 oranında gerçekleşirken %14'ün altında %49'a kadar düşebilmektedir.

#### **3.4.4. Strict Morfoloji Kruger Kriterlerine Göre Normal Sperm Değerlendirmesi**

**Spermin Başı:** Düzgün oval yapıda, akrozom başın ön kısmının %40-70'ini oluşturmali başın uzunluğu ortalama 3-5 mikron eni 2-3 mikron civarlarında olmalı.

**Spermin Boyun Kısmı:** İmplantasyonu başın uzun eksenini boyunca ve intakt olmalıdır.

**Spermin Orta kısmı:** Eni yaklaşık 1 mikron boyu ise başın uzunluğunun 1,5 misli olmalıdır.

Stoplazmik artık mevcudiyeti başın ½ sini geçmemelidir.

**Spermin kuyruğu:** Düzgün yapıda ve orta kısmından biraz daha ince, kıvrım ve bükülme olmayan 45mikron civarında uzunluğa sahip yapıda olmalıdır.

#### **3.4.5. Diff-Quik Boyama Prosedürü (Sperm morfolojisi için hızlı boyama işlemi)**

Hızlı boyama yöntemleri, özellikle gün içerisinde kısa zamanda sonuç verdiği için dolaylı terci edilmektedir. (Kruger ve ark.,1987). Hızlı yöntemlerle boyanan bazı sürüntülerde arka plan çok koyu boya tutması olabileceği için Papanicolaou boyamasına göre çok önemli olmayacak düzeyde daha düşük kalitede sonuçlar alınabilmektedir.

### 3.4.7.Reaktifler

#### 3.4.7.1. Diff-Quik hızlı boyama kiti içindekiler

a) Fiksatif reaktifi (metanol içinde çözülmüş triarilmetan boyası (fast green; soluk yeşil)

b) Boyama çözeltisi 1 (eozinofilik ksanten: fosfat tampon içinde eozin-G; kırmızı)

c) Boyama çözeltisi 2 (bazofilik tiazin: fosfat tampon içinde thiazine boya; mavi).

Fiksatif: 1000 ml % 95 (v/v) metanolde çözülmüş 1,8 mg triarilmetan, isteğe bağlı.

Fiksatif: metanol % 95 (v/v), isteğe bağlı.

#### 3.4.7.2. Boyama prosedürü

Lamları triarilmetan tespit çözeltisi içinde (Diff-Quik kitiyle sunulduğu gibi veya yukarıdahazırlandığı gibi) 15 saniye veya yalnızca % 95 metanol içinde 1 saat kadar tutuldu.

1. Hızlı boyama çözeltisi 1 (eozinofilik ksanten, kırmızı) 10 saniye

2. Hızlı boyama çözeltisi 2 (bazofilik tiazin, mavi).5 saniye

3. Akan musluk suyu 10–15 kez (fazla boyayı atmak için)

Her aşamada lamları emici filtre kâğıdı üzerine dikerek fazla çözelti akıtıldı.

Boyalı semen sürüntüsü entellan damlatılıp lamelle kapatılarak mikroskopik değerlendirmeler için hazır hale getirildi.

### **3.5.İmmünohistokimyasal Çalışmalar**

#### **3.5.1. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü**

Sperm yayması yapılmış olan lamlarda fertil ve infertil bireylerin sperm hücrelerinde apoptozis yolak proteinlerin immünohistokimyasal ekspresyonlarını tespit etmek için yayma preparatlarda indirekt immünohistokimya protokolü uygulandı. İmmünohistokimyasal boyamaya başlamadan önce aynı lam üzerinde birden fazla parametrenin (Bax, Bcl-2 ve Acas) çalışılmasını sağlamak için lam üzerinde üç farklı örneklem alanı pap pen (hidrofobik kalem) ile sınırlandırıldı. Böylece aynı lam üzerinde farklı örneklem alanları oluşturulup farklı antikorlar ile işaretlenmesini sağlanmaya çalışıldı.

Bazı lamlarda kontrol amacıyla her antikor için primer antikor yerine örnek alanlara serum fizyolojik damlatılarak takip eden aşamalara geçildi. İmmünohistokimyasal boyama işlemleri için uygulanan protokol Tablo 3.5.1'deki gibidir.

**Tablo 3.5.1.**İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

<b>1</b>	Sperm yayması yapılmış lamlarda önce örneklem alanlarının etrafı hidrofobik kalem (pap pen) ile sınırlandırıldı.
<b>2</b>	Sperm yayma preparatları 5-15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu.
<b>3</b>	5 dakika %4'lük formalinde bekletildikten sonra tekrar kurumaya bırakıldı.
<b>4</b>	PBS'de yıkanan preparatlar % 0,0025'lik Triton X solüsyonunda yıkandıktan sonra tekrar PBS' de yıkandı.
<b>5</b>	%1'lik BSA çözeltisinde oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi
<b>6</b>	Preparatlar PBS ile yıkandıktan sonra her bir örneklem alanlarına sırası ile Bax, Bcl-2, Acas-3primer antikoları (1:50) damlatıldı.
<b>7</b>	Preparatlar +4 <sup>0</sup> C' de bir gece karanlık nemli ortamda bekletildi.
<b>8</b>	PBS ile oda sıcaklığında yıkamadan sonra sırayla biotinli sekonder antikolar ve peroksidaz-işaretili streptavidin ile toplam 50 dakika inkübe edildi.
<b>9</b>	Peroksidaz aktivitesi, DAB kromojeni ile inkübasyon sonucu görünür hale getirilip slaytlar entellan ile kapatıldı.
<b>10</b>	Boyanan kesitler ışık mikroskopuyla incelendi.

### 3.6.İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS 20 Windows İstatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm veriler ortalama  $\pm$  standart error mean (SEM) olarak ifade edildi. Fertil ve İnfertil guruplarının apoptozis yolak proteinlerin immünohistokimyasal ekspresyonları H-skorumları ağırlıklı grup ortalama değerlerinde anlamlı farklılıkların olup olmadıkları non parametrik Mann-Whitney U Testi analizi ile yapıldı. Gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda p değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Spermiyogram Testi Sonuçları

Çalışmamız dafertil ve infertil bireylerden aldığımız sperm numunelerine öncelikle androloji laboratuvarında rutin olarak bakılan spermiyogram analizi yapıldı. Spermiyogram testi protokolüne uygun olarak gerçekleştirilen analizler sonucunda fertil ve infertil bireylerden elde edilen sonuçlar (Tablo 4.1.1,2,3,4,5,6) gösterilmektedir.

Beklenildiği gibi tüm mikroskopik spermiyogram parametrelerinde fertil ve infertil bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu tespit edildi ( $p < 0.01$ ). Makroskopik parametreler açısından ise gruplar arasında istatistiksel farklılık tespit edilmedi.

**Tablo 4.1.1.** Fertil bireylere ait spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçları (K: Kontrol)

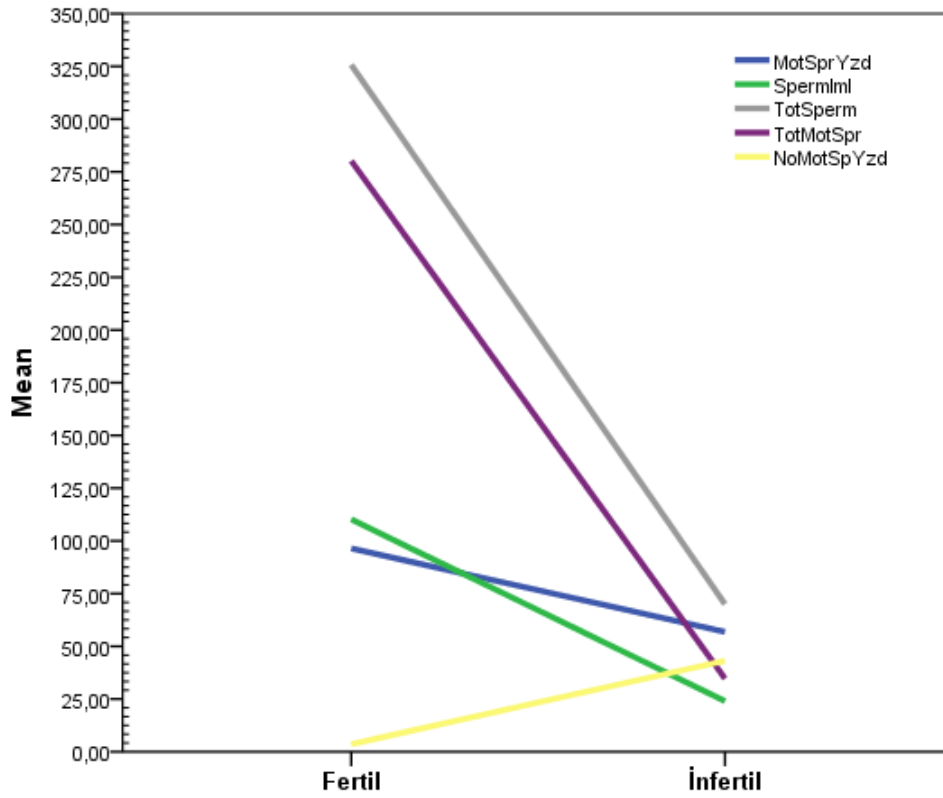
K	Motil Sperm %'si			Sperm sayısı/ml x (10 <sup>6</sup> )	Total Sperm Sayısı x (10 <sup>6</sup> )	Total-motil sperm sayısı x (10 <sup>6</sup> )	Non-motil sperm %'si
	a ileri	b. yerinde	a+b				
1	83	9	92	118	354	294	8
2	91	8	99	108	324	297	1
3	88	12	100	125	250	220	0
4	82	14	96	99	297	246	4
5	85	10	95	101	404	344	5

**Tablo 4.1.2.** İnfertil bireylere ait spermogram testi mikroskopik analiz sonuçları (İF: infertil)

İF	Motil Sperm %'si			Sperm sayısı/ml x (10 <sup>6</sup> )	Total Sperm Sayısı x (10 <sup>6</sup> )	Total-motil sperm sayısı x (10 <sup>6</sup> )	Non-motil sperm %'si
	A ileri	b yerinde	a+b				
1	10	5	15	42	126	12	85
2	58	5	63	19	76	44	37
3	71	5	76	38	135	135	24
4	39	2	41	51	280	110	59
5	11	0	11	19	95	10	89
6	34	10	44	58	160	55	56
7	43	4	47	28	70	30	53
8	36	0	36	11	22	8	64
9	82	4	86	67	134	110	14
10	57	0	57	7	32	18	43
11	64	7	71	45	45	29	29
12	50	0	50	2	10	5	50
13	38	0	38	8	28	10	62
14	75	8	83	40	60	45	17
15	25	25	50	8	16	4	50
16	43	0	43	7	21	9	57
17	86	0	86	7	24	21	14
18	69	8	77	13	39	27	23
19	100	0	100	2	3	3	0
20	38	25	63	8	24	9	37

**Tablo 4.1.3.** Spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçlarının grup ortalama değerleri (Sayı x10<sup>6</sup>).

Grup	% Motil Sperm	Sperm /ml	Total Sperm	Total Motil Sperm	% Non-moti Sperml
Fertil	96,40±1,44	110,20±4,97	325,8±25,97	280,20±21,61	3,60±1,44
İnfertil	56,85±5,32	24,00±4,56	70,00±15,32	34,70±8,76	43,15±5,32
P	0.002	0.001	0.001	0.001	0.002



**Şekil 4.1.1.** Spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçları grup ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı görünümü.

**Tablo 4.1.4.** Fertil bireylere (Kontrol) ait spermiyogram testi makroskobik analiz sonuçları

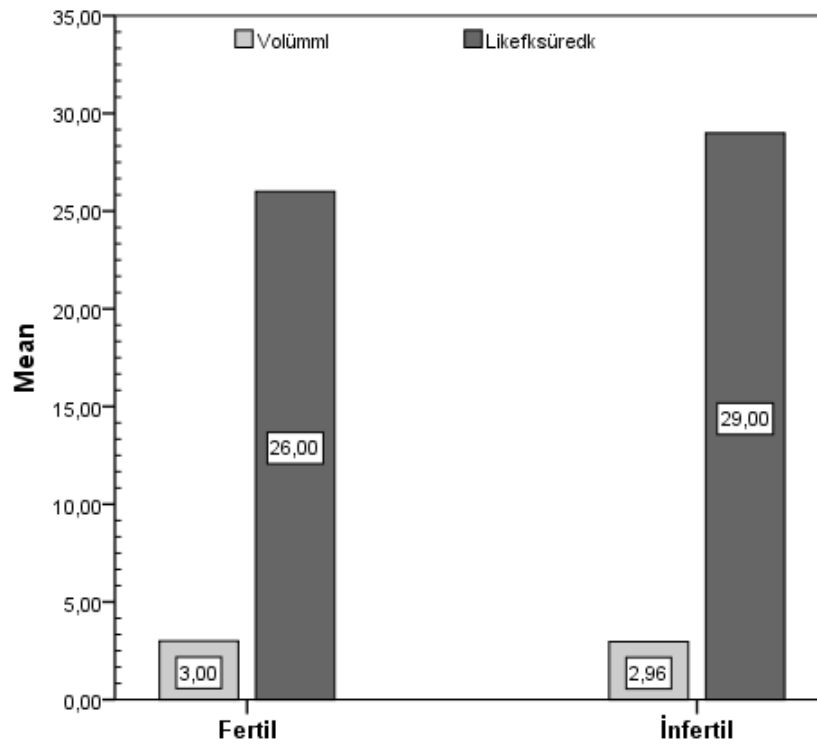
<b>K</b>	<b>Volüm (ml)</b>	<b>Viskozite</b>	<b>Likefaksiyon Süresi (dak)</b>
1	3	Akıcı	20
2	3	Akıcı	30
3	2	Akıcı	30
4	3	Akıcı	30
5	4	Akıcı	20

**Tablo 4.1.5.** İnfertil bireylere (Deney) ait spermiyogram testi makroskobik analiz sonuçları

<b>İF</b>	<b>Volüm (ml)</b>	<b>Viskozite</b>	<b>Likefaksiyon Süresi (dak)</b>
1	3	Yoğun	40
2	4	Akıcı	20
3	5	Akıcı	40
4	3	Akıcı	20
5	5	Akıcı	20
6	2,75	Akıcı	20
7	2,5	Akıcı	20
8	2	Akıcı	20
9	2	Akıcı	30
10	4,5	Akıcı	60
11	1	Akıcı	30
12	5	Akıcı	30
13	2	Yoğun	20
14	3	Akıcı	60
15	2	Akıcı	30
16	2	Akıcı	20
17	2,5	Akıcı	30
18	3	Akıcı	30
19	3	Akıcı	20
20	2	Akıcı	20

**Tablo 4.1.6.** Spermiyogram testi makroskobik analiz sonuçları grup ortalama değerleri

Grup	Volüm (ml)	Likefaksiyon süresi (dk)	Viskozite
Fertil	3,00± ,32	26,00±2,45	Akıcı
İnfertil	2,96± ,26	29,00±2,80	Akıcı/Yoğun
P	>0.05	>0.05	

**Şekil 4.1.2.** Spermiyogram testi makroskobik analiz sonuçları grup ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı görünümü

## 4.2. Kruger Strict Sperm Morfoloji Analiz Bulguları

İnsan ejakülatındaki sperm hücrelerinin morfolojik durumları hakkında bilgi veren bu analizimiz sonucunda infertil ve fertil bireylerden aldığımız semen örneklerden Diff-quick boyama ile boyanarak sperm hücreleri Kruger strict kriterlerine göre mikroskopik olarak analiz edildi (Tablo 4.2.1.). Çalışmamıza ait infertil ve fertil bireylere ait sonuçların mikroskopik görüntü fotoğrafları aşağıda (Şekil 4.2.1,2,3,4,5,6) gösterilmiştir.

Normal sperm sayılarının infertil bireylerde kontrol grubundaki bireylere göre anlamlı bir şekilde düşük olduğu görüldü.

Baş anomalili spermlerin sayısının kontrol grubuna göre infertil bireylerde istatistiksel anlamlı olacak şekilde yüksek olduğunu tespit edildi (Şekil 4.2.2,3).

Boyun anomalisine sahip olan spermlerin sayısının infertil hastalarının spermlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde yüksek olduğu tespit edildi. (Şekil 4.2.1.)

İnfertil hasta grubunda, kuyruk anomalisine sahip olan spermatozoon sayısı kontrol grubuna göre fazlalığı istatistiksel olarak da anlamlı idi. (Şekil 4.2.5.)

Anomaliler total olarak değerlendirildiklerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktaydı. İnfertil hastalardan oluşan grupta total anomalinin kontrol grubuna göre belirgin olarak yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.2.7,8).

Kısaca özetleyecek olursak tüm parametreler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak belirgin farklılıklar tespit edildi ( $p < 0.05$ ).

**Tablo 4.2.1.** Fertil bireylere ait Kruger Strict Morfoloji analizi bulguları (K: kontrol, A anomali, N: normal)

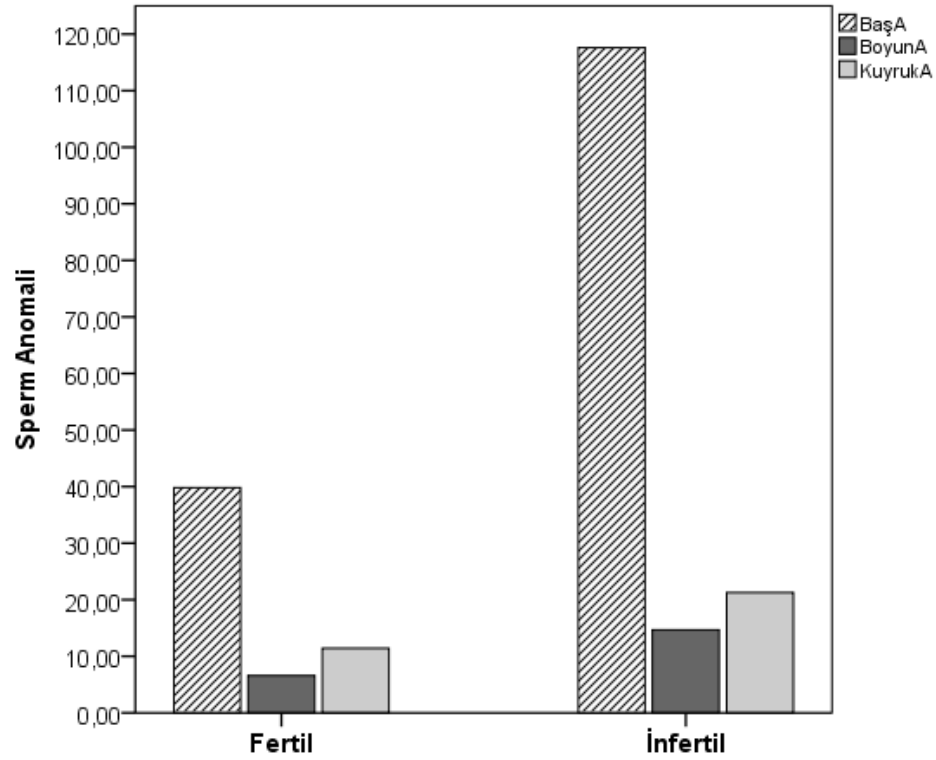
K	Baş A	Boyun A	Kuyruk A	%A	%N
1	53	8	8	32	68
2	42	8	10	30	70
3	32	5	13	25	75
4	36	5	10	26	74
5	36	7	16	29	71

**Tablo 4.2.2.** İnfertil bireylere ait Kruger Strict Morfoloji analizi bulguları (K: kontrol, A anomali, N: normal)

İF	Baş A	Boyun A	Kuyruk A	% A	% N
1	114	17	29	80	20
2	138	8	14	80	20
3	122	7	34	83	17
4	84	20	22	72	28
5	131	17	16	83	17
6	97	21	48	83	17
7	121	9	30	80	20
8	136	19	15	85	15
9	120	17	14	76	24
10	107	18	31	76	24
11	123	10	7	74	26
12	116	20	20	76	24
13	116	19	11	77	23
14	120	17	31	77	23
15	122	5	24	76	24
16	121	16	15	77	23
17	107	9	21	73	27
18	116	20	13	75	25
19	119	13	16	76	24
20	122	11	14	75	25

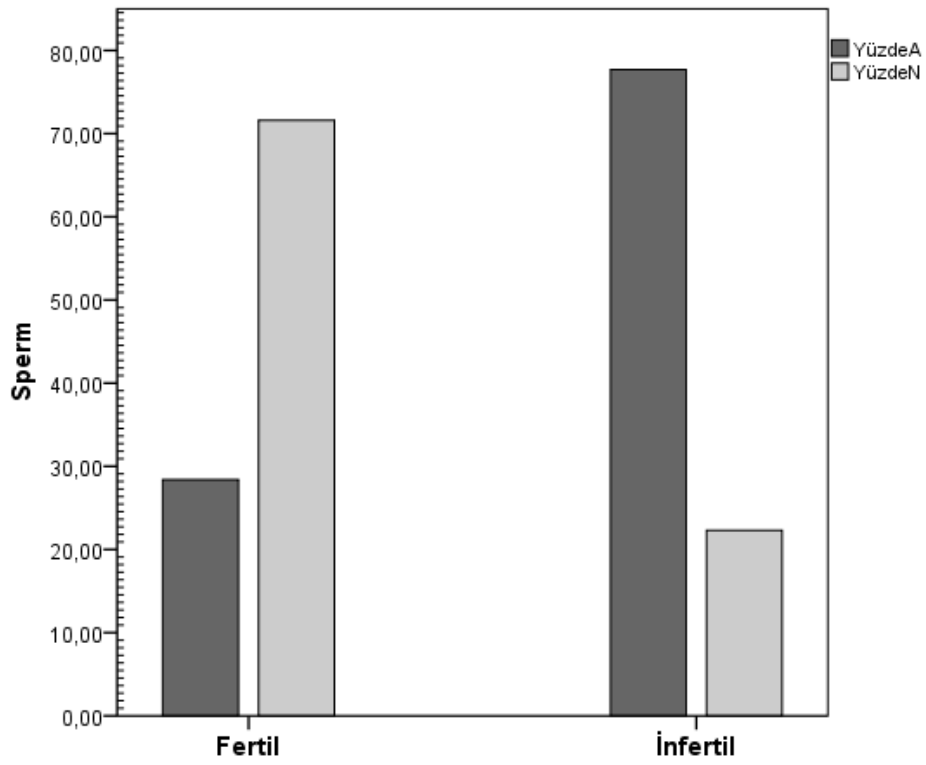
**Tablo 4.2.3.** Kruger strict morfolojik analizlerin grup ortalama değerleri ( $\pm$ : SEM,A: anomali, N: normal)

Grup	Baş A	Boyun A	Kuyruk A	Yüzde A	Yüzde N
Fertil	39,80±3,67	6,60±,68	11,40±1,40	28,80±1,46	71,40±1,44
İnfertil	117,60±2,74	14,65±1,14	21,25±2,23	77,65±,80	22,45±,79
P	0.001	0.004	0.016	0.001	0.001

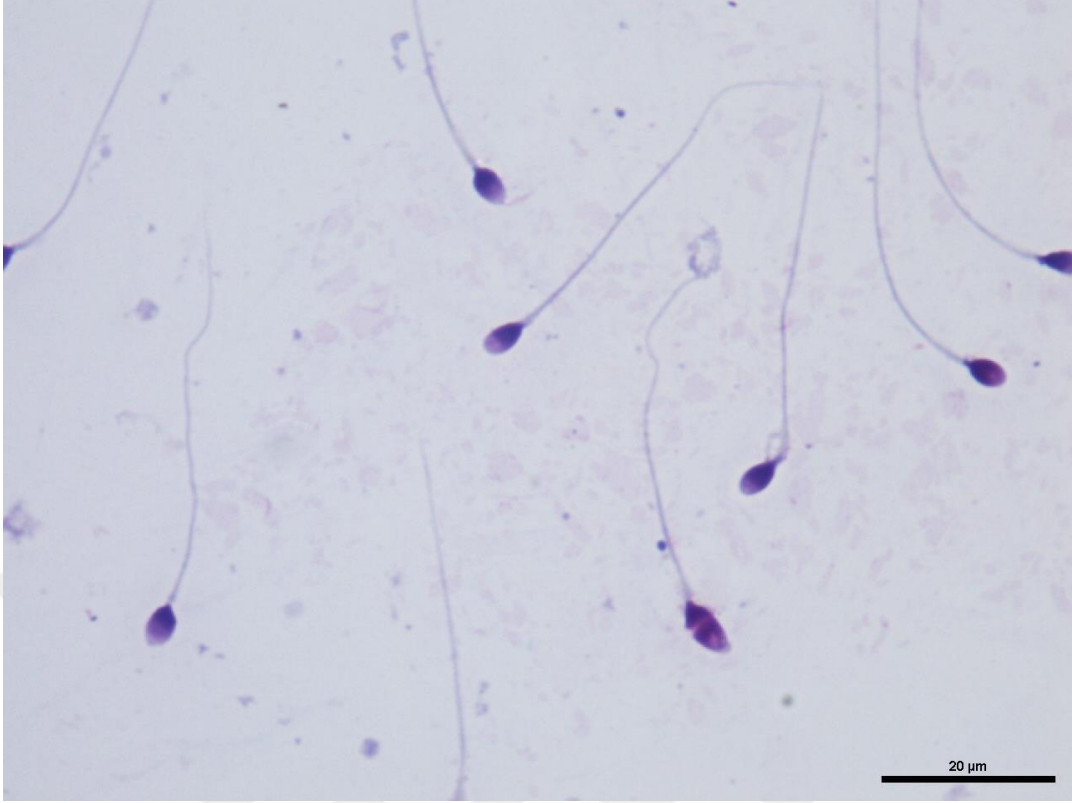


**Şekil 4.2.1.** Sperm hücrelerinin baş, boyun ve kuyruk anomalilerinin grupların ortalama değerlerinin karşılaştırmalı grafiksel görünümü.

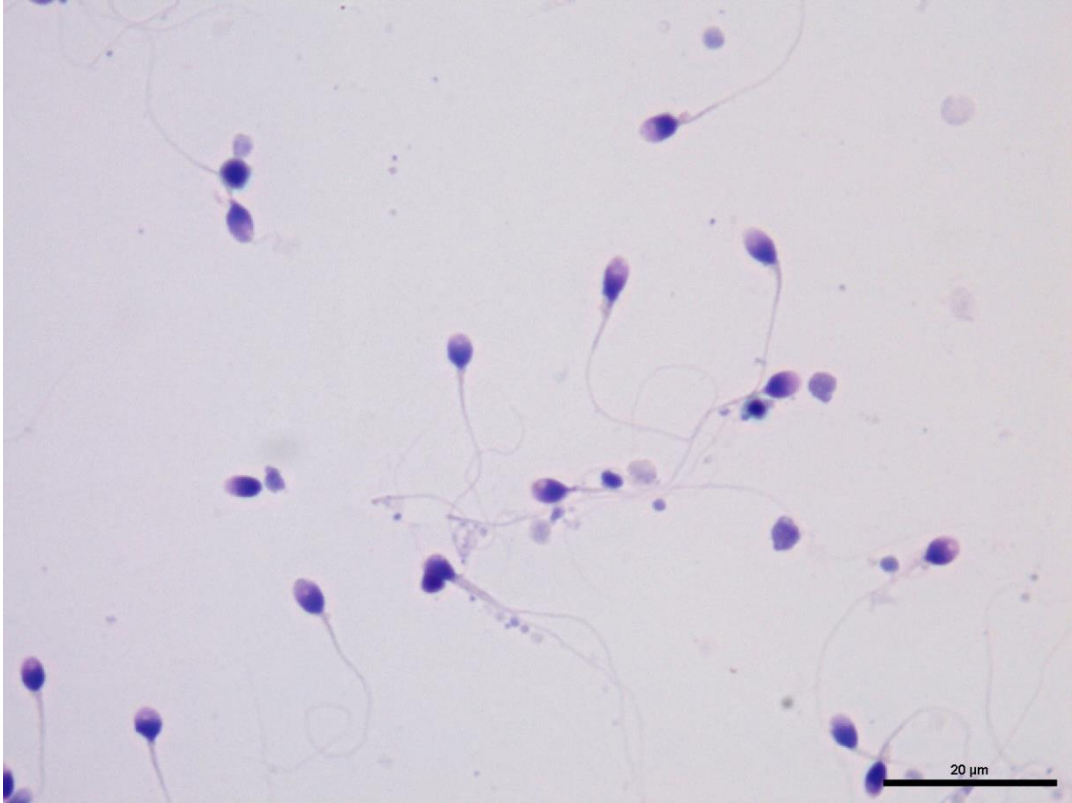




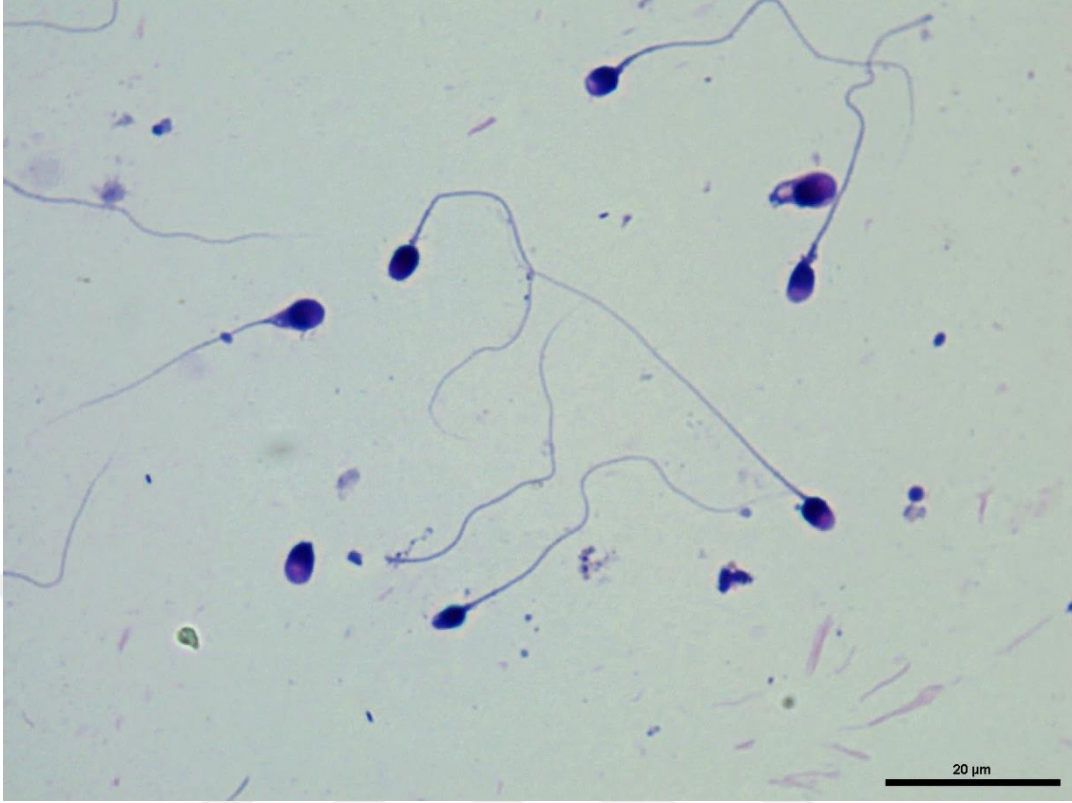
**Şekil4.2.2.** Anomalili ve normal sperm yüzdelerinin grup ortalaması değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı görünümü.



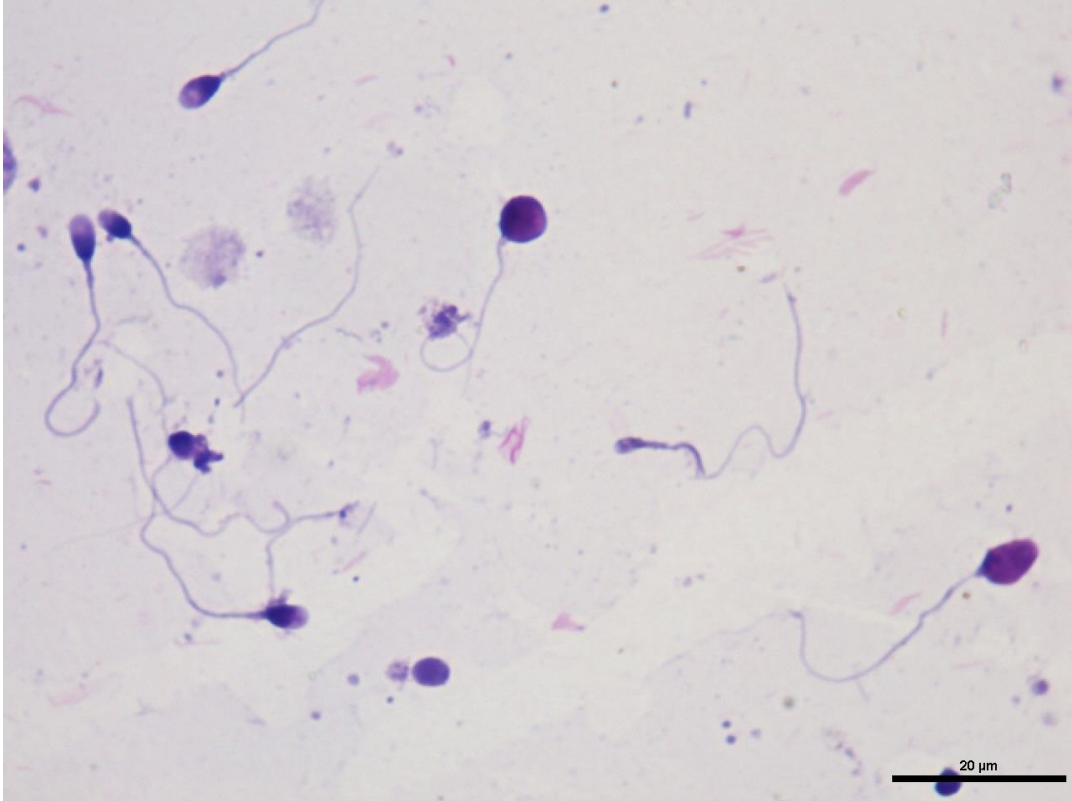
**Şekil 4.2.3.** Fertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quik, 100xObj, Bar:20 µm)



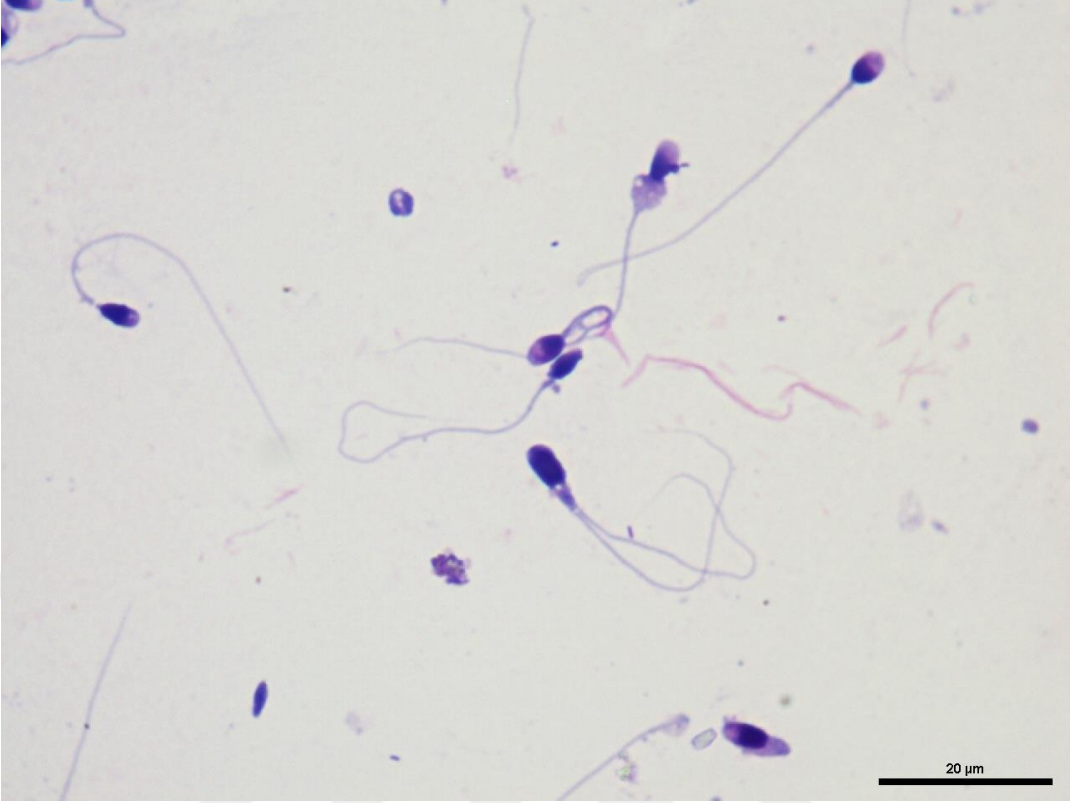
**Şekil 4.2.4.** Fertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quik, 100xObj, Bar:20 µm)



**Şekil 4.2.5.** İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quik, 100xObj, Bar:20 µm)



**Şekil 4.2.6.** İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quik, 100xObj, Bar:20 µm)



**Şekil 4.2.7.** İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quik, 100xObj, Bar:20 µm)



**Şekil 4.2.8.** İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quik, 100xObj, Bar:20 µm)

### 4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda infertil ve fertil bireylerin preparatlarında semen örneklerinden hazırlanan yayma hücre apoptozis yolak proteinlerinden apoptotik, Bcl-2 ve antiapoptotik proteinler olan Acas-3 ve Bax proteinlerinin immünohistokimyasal ekspresyonları ışık mikroskobu altında boyama şiddetine göre değerlendirilerek immünreaksiyon aktiviteleri tespit edildi. Sonuçlar H-Skorlama sistemine dönüştürülerek semi kantitatif olarak derecelendirildi. Elde edilen sonuçları ağırlıklı grup ortalama değerleri istatistiksel karşılaştırmaları yapılarak her bir protein bakımından gruplar arasında farklılıkların olup olmadığı tespit edildi.

Kontrolle karşılaştırıldığında infertil hasta grubunda apoptotik Acas-3 protein immün reaktivitesinin belirgin olarak yüksek olduğu ( $p<0.05$ ) Bax proteini immün reaktivitesinin ise bir miktar fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ) tespit edildi. Anti apoptotik protein Bcl-2 immün reaktivitesinin infertil bireylerde fertil bireylere göre belirgin olarak düşük ( $p<0.05$ ) olduğu tespit edildi.

Her grupta her bir bireyden elde edilen sonuçların sayısal verileri Tablo 4.3.1,2,3'da gösterilmektedir. İmmünohistokimya H-skorları ağırlıklı grup ortalama değerlerin karşılaştırmalı grafiksel görüntüsü Şekil 4.3.1'de gösterilmektedir. Gruplardan her bir parametre için temsili mikroskobik görüntüler Şekil 4.3.2,3,4,5,6,7'de gösterilmektedir.

**Tablo 4.3.1.** Fertil bireylere ait sperm hücreleri apopitoz yolak proteinleri immünohistokimya analiz sonuçları H-skor değerleri (K: Kontrol)

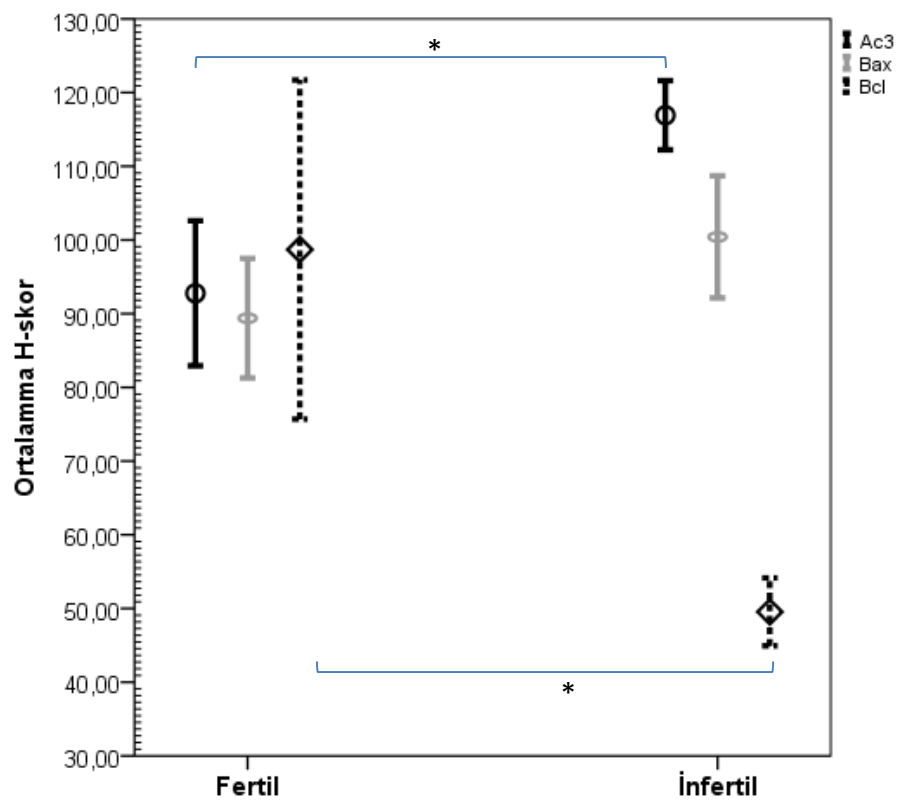
<b>K</b>	<b>Acas-3</b>	<b>Bax</b>	<b>Bcl-2</b>
1	89,20	85,93	131,29
2	105,49	88,65	89,55
3	90,03	100,75	93,51
4	84,65	87,11	85,42
5	94,51	84,50	93,72

**Tablo 4.3.2.** İnfertil bireylere ait sperm hücreleri apopitoz yolak proteinleri immünohistokimya analiz sonuçları H-skor değerleri (İF: İnfertil)

<b>İF</b>	<b>Acas-3</b>	<b>Bax</b>	<b>Bcl-2</b>
1	115,56	141,40	60,80
2	107,30	116,45	41,95
3	103,57	66,67	35,33
4	134,11	99,10	67,55
5	132,54	99,83	41,91
6	112,10	89,59	55,97
7	102,69	101,65	37,53
8	123,08	85,67	52,84
9	110,00	82,81	60,94
10	120,10	107,60	39,02
11	129,29	112,05	52,24
12	110,97	102,93	45,59
13	121,02	89,70	62,53
14	122,80	98,81	39,04
15	106,39	102,36	43,52
16	122,40	129,31	57,05
17	124,21	122,45	46,11
18	104,42	81,88	59,43
19	108,26	89,44	53,05
20	127,61	88,66	38,42

**Tablo 4.3.3.** Acas-3, Bcl-2 ve Bax proteinleri immünohistokimyasal boyanma şiddetleri H-skorları ağırlıklı grup ortalama değerleri( $\pm$ : sem).

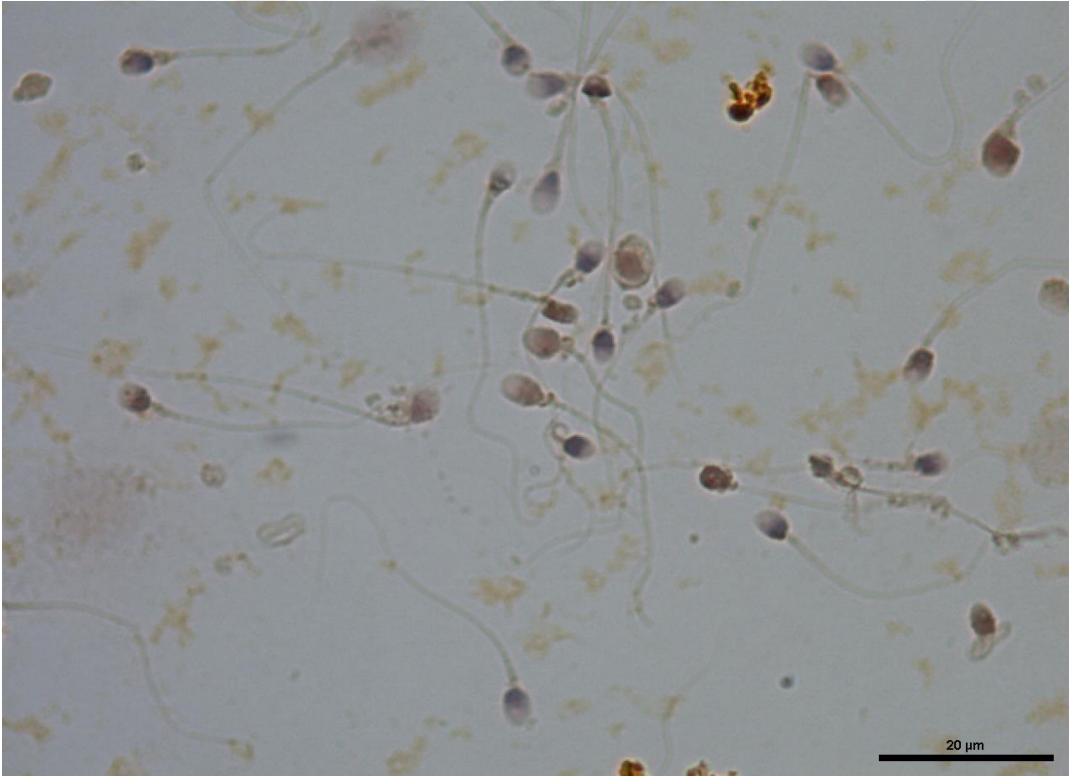
Grup	Acas-3	Bax	Bcl-2
Fertil	92,78 $\pm$ 3,54	89,39 $\pm$ 2,92	98,70 $\pm$ 8,29
İnfertil	116,92 $\pm$ 2,24*	100,42 $\pm$ 3,96	49,54 $\pm$ 2,20*
P	0.001	0.103	0.001



**Şekil 4.3.1.** Acas-3, Bax, Bcl-2 İHK boyanma şiddeti H-Skorları grupların ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması.\*:p=0.001

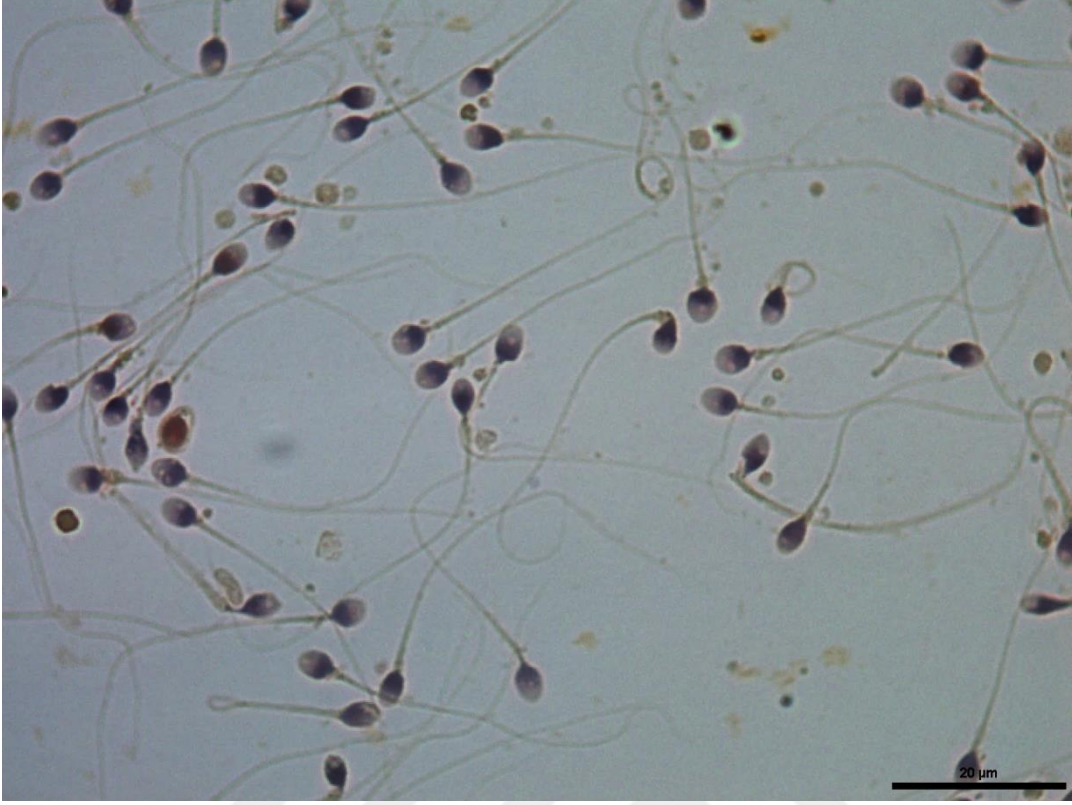


**Şekil 4.3.2.** Fertil birey sperm hücresi Acas-3 immün ekspresyonu (İHK-DAB, 100 Obj, Bar:20 µm)

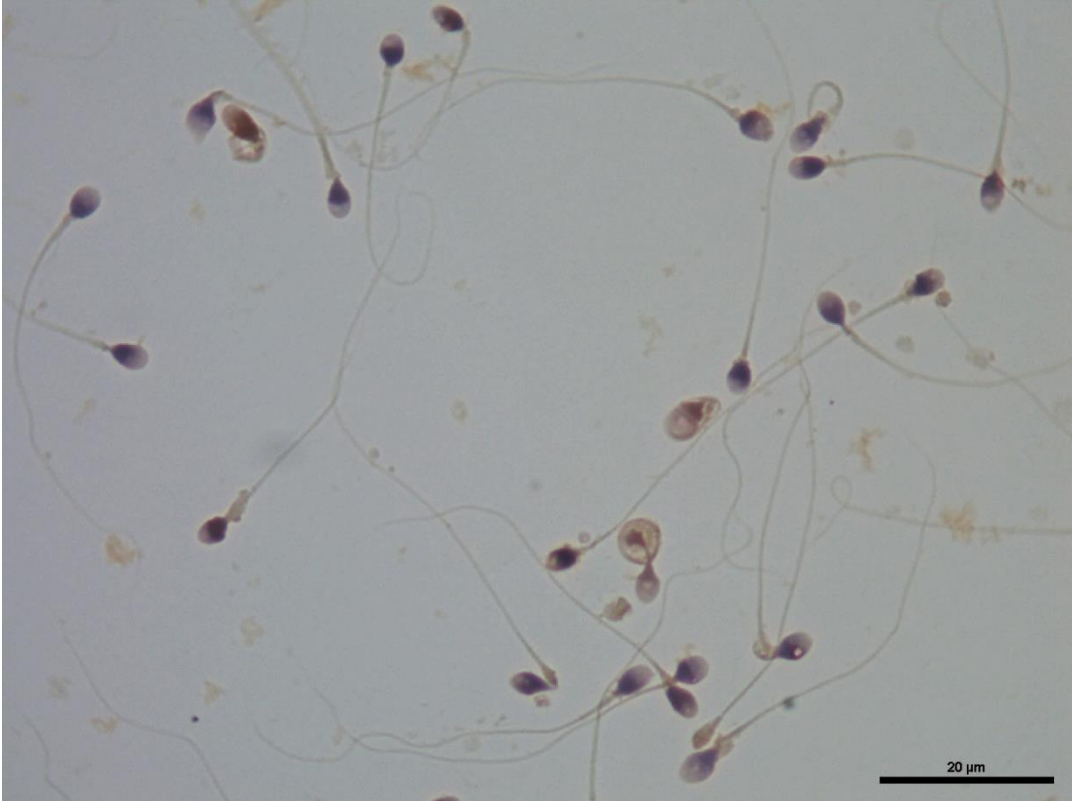


**Şekil 4.3.3.** İnfertil birey sperm hücresi Acas-3 immün ekspresyonu (İHK-DAB, 100 Obj, Bar:20 µm)

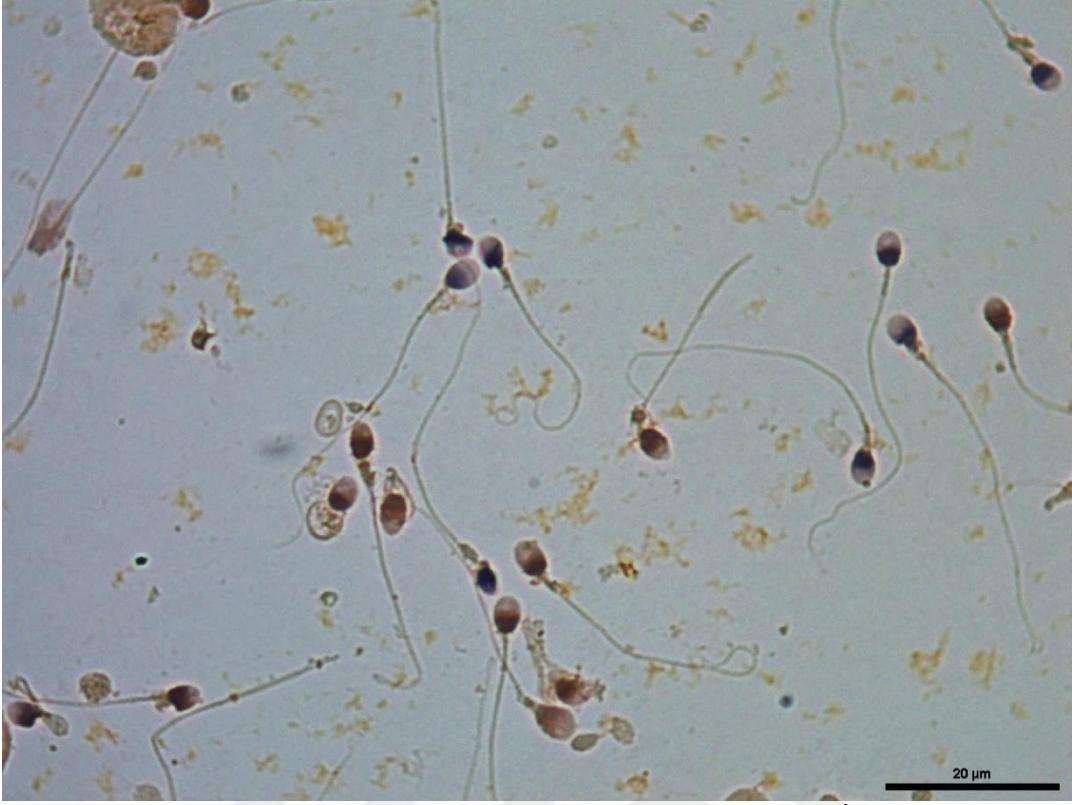




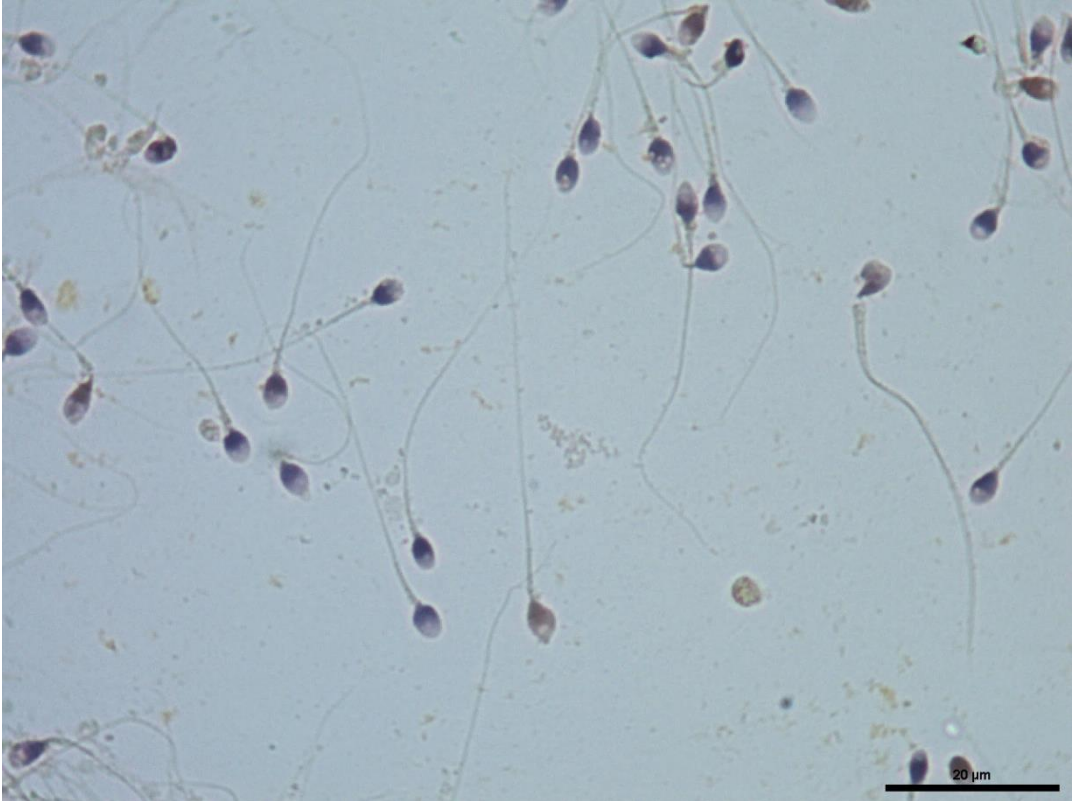
Şekil 4.3.4. Fertil birey sperm hücresi Bax immün ekspresyonu (İHK-DAB, 100 Obj, Bar:20 µm)



Şekil 4.3.5. İnfertil birey sperm hücresi Bax immün ekspresyonu (İHK-DAB, 100 Obj, Bar:20 µm)



**Şekil 4.3.6.** Fertil birey sperm hücresi Bcl-2 immün ekspresyonu (İHK-DAB, 100 Obj, Bar:20 µm)



**Şekil 4.3.7.** İnfertil birey sperm hücresi Bcl-2 immün ekspresyonu (İHK-DAB, 100 Obj, Bar:20 µm)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Erkek fertilitesinde azalma; konjenital ya da kazanılmış ürogenital bozukluklardan, genital sistem enfeksiyonlarından, skrotal ısı artımından (varikosel), endokrin bozukluklardan, genetik nedenlerden, immünolojik faktörlerden kaynaklanabildiği gibi elektromanyetik alanlara gibi bazı çevresel ve kimyasal ajanlara maruziyet ile de olabilir. Olguların %60-75'inde infertiliteden sorumlu bir faktör bulunmaz ve bu durum idiyopatik erkek infertilitesi olarak tanımlanır. Böyle erkekler fertilitte problemiyle ilgili olabilecek geçmişe ait bir hikaye vermeksizin, normal fizik muayene bulguları ve endokrin laboratuvar sonuçlarına sahip olabilirler. Semen analizinde spermatozoon sayısında azalma (oligozoospermi), motilite azalması (astenozoospermi) ve morfolojik incelemede çok sayıda anormal formda spermatozoon (teratozoospermi) görülür. Bazan bu anomaliler bir arada bulunur ve oligo-asteno-teratozoospermi (OAT) sendromu olarak tanımlanır (Dickey ve ark., 1999).

Primer spermatogenik yetmezlik; hipotalamo-pitüiter hastalıklar dışında herhangi bir neden ile meydana gelen spermatogenik değişiklikler olarak tanımlanır. Primer spermatogenik yetmezliğin ciddi formları, değişik etiyojileri bulunmasına rağmen klinik olarak nonobstrüktif azoospermi olarak ortaya çıkabilir. Genel popülasyonda azoospermi prevalansı %2 olarak tahmin edilmekte olup erkek infertilite kliniğindeki insidansı ise %10-20 gibi yüksek bulunabilmektedir.

İnfertilite durumlarında bir takım etkenlere bağlı olarak testiküler histoloji, tübüler hasardan hipospermatogeneze kadar çeşitli derecelerde farklı spermatogenik bozukluklara sebep olabilir. Mesela, Sertoli cell-only sendromunda (SCOS) çeşitli derecelerde spermatogenez içeren seminifer tübüller bulmak olasıdır. Sürecin ciddiyetine

bağlı olarak, folikül stimulan hormon (FSH) seviyesi yükselebilir ve testislerin boyutu ve içeriğinde değişiklikler olabilir. Diğer bir ciddi bozukluk ise; normal Leydig, Sertoli, spermatogonia ve spermatozoid popülasyonunun bulunması ancak spermatid ve spermatozoanın bulunmaması ile karakterize spermatozoid seviyesinde komplet spermatogenik duraklamadır. Nadiren maturasyon duraklaması spermatogonia ya da round (yuvarlak) spermatid evresinde de görülebilir. Bu durumlarda matür ya da elongated (uzamış) spermatidler bulunmaz. Spermatogenik bozuklukların daha az ciddi formları olan hipospermatogenez (tüm spermatogenik hücrelerde orantılı azalma), durumunda parsiyel maturasyon duraklaması fokal SCOS ve karışık formlardır (Delilbaşı ve ark., 2008).

Apoptozis, *invivo* ve *invitro* ortamda önceden birikmiş ölüm prosesleri tarafından tetiklenen, ilgili genlerce düzenlenen bir hücre ölüm sürecidir. Hücrelerin aktif intihar davranışını indüklemek için, bazı hücre içi genlerin transkripsiyonu ve ekspresyonu hücre dışı faktörler tarafından aktive edilebilir. Normal testiküler hücre apoptozisi testis gelişiminin temel olağan süreci olarak düşünülmektedir. Germ hücrelerinin apoptozisi hasarlı hücrelerinin eliminasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının dengeli ve düzenli bir şekilde gerçekleşmesinde önemli bir olaydır. Testiküler gelişimin kritik döneminde, apoptozun inhibisyonu spermatogonia olgunlaşmasını etkiler, ancak artmış apoptoz testiküler spermatogenik işlevin bozukluğu ve infertiliteye yol açabilir (Baccetti ve ark., 1996).

Mitokondri, ATP sentezine ve ROS üretimine katılmakla kalmayıp aynı zamanda germ hücrelerinin proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozunda önemli rol oynayan kompleks organeldir. Mitokondriyal fonksiyon sadece nükleer DNA (nDNA) tarafından

kodlanan mitokondrial moleküllere bağlı değildir, aynı zamanda mitokondri DNA (mtDNA) tarafından kodlanan moleküllere de bağlıdır (Lasserre ve ark., 2015).

Germ hücrelerinin apoptozisi üzerine yapılan çalışmaların çoğunluğu, ATP üretimi, ROS düzeyi, Bcl-2 ve kaspaz gibi mitokondriyal disfonksiyon veya apoptozis markerlerinin tespiti üzerine yoğunlaşmıştır. Shaoping ve arkadaşları disfonksiyon ve mitokondrial proteinlerden etkilenen germ hücrelerinin apoptozisi bağlantısının olduğunu işaret etmişlerdir (Shaoping ve ark., 2016).

Bir takım çalışmalar, iskemik durumlar sonrasında protein ubiquitasyon, birikiminin ve proteazom aktivitesinin arttığını ve bu durumunun hücre bileşenlerine hasar verme, inflamatuvar yanıtlara aracılık etme, lökosit infiltrasyonu ve apoptozis ile sonuçlandığını bildirmiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda active caspase 3, caspase 9 ve Bax ekspresyonunda kademeli olarak artış gözlenirken, Bcl-2 ekspresyonunun giderek azaldığı tespit edilmiştir (Caldeira ve ark., 2014; Huanget ve ark., 2012; Meller 2009). Bu çalışmalara uyumlu olarak bizim çalışmamızın sonucunda da benzer şekilde infertil bireylerde active caspase 3 immünoaktivitesinde belirgin bir şekilde artış gözlenirken, Bcl-2 immünoaktivitesinde anlamlı bir azalma görülmüştür. Bu verilere dayanarak iskemik durumlar haricinde infertiliteye yol açan diğer sebeplerin de apoptozis yolları üzerinden sperm hücrelerinin apoptozisine neden olduğunu söylebiliriz.

Spermatogenesis, hem normal hem de patolojik koşullarda günlük milyonlarca spermatozoanın gelişmesine neden olan proliferatif bir süreçtir ve fertil veya infertil erkeklerde nihai sperm üretimini belirler (Irvine ve ark., 2000). Spermatogenesis, spermatogonial kök hücrelerin proliferasyonunu/çoğalmasını, farklılaşmasını, spermatositlerin mayozlaşmasını ve spermiyogenezi içerir. Bu süreç, germ hücrelerinin proliferasyonu ve apoptozisi arasındaki hassas denge ile karakterizedir. Zalata ve

arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada; infertil erkeklerin ejakülatında spermlerin % 10'una kadarının, fertil erkekler arasında ise spermlerin % 0.1'inin apoptotik olduğu bildirilmektedir (Zalata ve ark., 2011).

Taymour ve arkadaşları, varikoselli infertil erkeklerde seminal Bax' de belirgin bir artış ve seminal Bcl-2'de belirgin bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Buna paralel olarak seminal Bax; sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve sperm normal formları ile anlamlı negatif korelasyon göstermekle birlikte seminal Bcl-2; bu parametrelerle anlamlı pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir (Taymour ve ark. 2009). Bu çalışmaya paralel olarak bizim çalışmamızın sonucunda da infertil gruplarda anti-apoptotik protein Bcl-2 seviyesinin azaldığı görüldü, apoptotik bir protein olan Bax seviyesinde artış tespit edildi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Güçlü bir apoptozis inhibitörü olan Bcl-2 sitokrom-c' nin sitoplazmaya salınmasını baskılar. Bcl-2'nin mitokondri ile bu ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve oksidatif stresin neden olduğu apoptozu baskılayabildiği düşünülürse infertil bireylerde Bcl-2 seviyesinin azalması son derece anlamlıdır (Liebermann, 1998).

Spermatojenik hücrelerde, apoptosise bağlı Bcl-2 ve Bax genlerin ekspresyonu üzerine varikoselin etkisinin değerlendirildiği bir hayvan deneyi çalışmasında ;kontrollerle karşılaştırıldığında, yetişkin sıçanların varikoselli testisteki Bcl-2 ekspresyonun düşük olduğu tespit edilmiştir (Roshdy ve Mostafa, 2009). Testiküler apoptozisin spermatojenik işlev bozukluğuna bağlı olarak fertil veya infertil varikoselli erkeklerde arttığı bildirilmiştir. Sperm konsantrasyonu, motilitesi, akrosin aktivitesi, doğrusallık indeksi, doğrusal hız, sperm anormal formların varlığı, sperm DNA parçalanması ile hücre atıklarının ve apoptozun temizlenmesiyle ilişkili hetero dimerik bir protein olan seminal klusterin negatif ilişkisinin olduğu bildirilmektedir. Ayrıca

infertil ve fertil erkeklerin seminal plazmasında apoptoz inhibitörü survivin proteininin spermatogenezis ve sperm motilite süreçleriyle ilişkili olduğu da bildirilmektedir (Roshdy ve Mostafa, 2009).

Yüksek skrotal sıcaklık, testislerde bozulmuş spermatogenez ve steroidogenez için en önemli faktörlerden biridir. İnfertil erkeklerde meydana gelebilecek ek apoptotik yollar; androjen yoksunluğu, testosteron seviyesindeki düşüklük ve intratestiküler testosteron düzeylerindeki ani düşüşlerdir. İmmunohistokimyasal analizle, deneysel varikoselde proapoptotik protein Bax'ın artmış olduğu antioksidan enzim olan malondialdehid doku düzeyi seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte aynı zamanda seminal Bax anlamlı olarak artmış ve seminal Bcl-2, varikosel ile ilişkili infertil erkeklerde anlamlı olarak azalmıştır (Onur ve ark., 2004).

İnfertil hastalarda spermatozoal disfonksiyon çok faktörlü olabilir. Bu faktörlerden birinin oksidatif stres kaynaklı olduğu bildirilmektedir. Barbieri ve arkadaşları varikosel ile ilişkili koşullarda artmış seminal ROS ile sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve normal sperm yüzdesi arasında negatif korelasyon bulunduğunu tespit etmişlerdir (Barbieri ve ark., 2004).

Farklı araştırmacılar, sıçan ve insan çalışmalarında ortaya çıkan artmış germ hücresi apoptozunun oligozoosperminin gelişiminde önemli bir rol oynadığını ileri sürdüler (Caruso ve ark., 1999). Oligoozospermide, Sertoli ve spermatid haricindeki tüm germ hücrelerinde en düşük seviyelerde caspaz-3, tespit edilmiş olmasına rağmen hipospermatojenik hastalarda seminifer tübülde hiçbir hücre tipinde caspaz-3 pozitifliği tespit edilmemiştir. Bazı ek bulgular, intrinsek apoptotik faktörlerin neden olduğu germ hücresi ölümünün ve spermatogenez sırasında işlevsiz mayoz bölünmenin, azalmış sperm üretiminin nedeni olabileceğini düşündürmektedir (Almeida ve ark., 2011). Bizim

çalışmamızda infertil bireylerde artan güçlü bir kaspaz 3 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. Bilindiği gibi aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir, böylece ICAD'ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, caspaseactivated deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonu ile oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Nicholson 1999; Thornberry ve Lazebnik, 1998). Bu bilgiler ışığında, apoptozu uygulayan ve/veya sonlandıran aktif kaspaz 3 seviyesinin infertil bireylerde artmış olması infertilitede güçlü bir apoptotik yolak olduğuna işaret ettiğini söyleyebiliriz

Hücre sağ kalımı ile ilişkili faktörlerden Bcl-2 ekspresyonunun maternal DBP'ye (di-n-butyl phthalate) maruz bırakıldıktan sonra embriyonik testiste arttığı gözlemlenmiştir. Bir proto-onkojen olarak, Bcl-2'nin yüksek ekspresyonu, pro-apoptotik faktörlerin yol açtığı apoptozisi inhibe edebilir. Geç embriyonik dönemde, germ hücrelerinin azalmış apoptozisi spermatogonia olgunlaşmasını inhibe edebilir ve bu da spermatositlerin ve spermatidlerin gelişimini etkileyerek spermatojenik olumsuzluklara neden olabilir (Shultz ve ark., 2001). DBP'ye maruz bırakılan sıçan testislerinde gözlenen sitoplazmik vakuolizasyon ise apoptotik olmayan programlanmış hücre ölümü olarak adlandırılan başka bir hücre ölümü olabilir (Klee ve ark., 2005). Bu bulgularla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da Bcl-2 seviyesinin infertil bireylerde fertil bireylere göre belirgin olarak düşük olduğu tespit edildi.

Germ hücrelerin desteklenmesi ve germ hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli rolü olan Sertoli hücrelerinin artmış apoptozisi pubertal evredeki germ hücresi gelişimini etkileyebilir. Bu da germ hücrelerinin apoptozisine neden olup doğrudan



spermatojenik işlev bozukluğuna yol açabilir (Shultz ve ark., 2001). Sertoli hücrelerinin apoptozu şüphesiz kan testis bariyerinin bozulmasına da neden olabilir. Bunun sonucunda da spermatojenik olumsuzluklar ve apoptozisin görülmesi muhtemeldir (Morrow ve ark., 2016).

Sperm DNA hasarları da dahil olmak üzere semen parametrelerinden bağımsız olarak sperm kalitesi; sperm kromatin dispersiyonu, sperm kromatin yapı testleri (SCSAs) ve terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick-end etiketleme (TUNEL) (Zini ve ark., 2001) ve bu çalışmada uyguladığımız gibi apoptozis yolak proteinlerinin ekspresyonlarının analizleri gibi çeşitli testlerle ölçülebilir.

Bahsedilen tüm bu literatür çalışmalarındaki bilgilerinden de anlaşılacağı gibi infertilite genetik, kaynaklı olabileceği gibi daha çok dış ve iç çevresel faktörlerdeki olumsuzluktan kaynaklanabilmektedir. Bu olumsuz durumlar sperm oluşumunun değişik aşamalarındaki spermatojenik seri hücrelerinde hem de sperm hücrelerinin morfolojik maturasyonları sırasında spermatozoalar üzerinde direkt ve/veya indirek etkili olabilmektedir. Nihayetinde sperm hücrelerinde morfolojik, sayısal ve fonksiyonel yetersizlik veya kusurlar olarak kendisini göstermektedir. Bu olumsuzlukların belli kritik değerlerin üzerinde olması ise yetişkin erkek bireylerde halk arasında kısırlık olarak bilinen infertiliteye yol açmaktadır.

Bu çalışmamızda, infertil bireylerin sperm hücrelerinin kalitesini tespitine yönelik yaptığımız analizlerdeliteratür bilgilerine uygun olarak infertil bireylerde, sperm hücrelerinin hem sayısal hem de morfolojik ve fonksiyonel olarak olumsuz yönde etkilenmiş oldukları tespit edildi. Sperm hücrelerindeki apoptozis markerlerinin immunohistokimyasal analizlerinde yine literatür verilerindekine benzer şekilde infertiliteye neden olan olumsuz koşulların apoptotik Bax ve Acas-3 protein

expresyonlarının artışına, anti apopitotik Bcl-2 protein expresyonunun ise azalmasına neden olmuş olabileceği tespit edildi. Ancak Bax proteinindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmaması, sperm hücre apopitozisinin Bax protin yolağından ziyade Acas-3 ve Bcl-2 yolakaları üzerinden gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak infertilite hastaların spermiyogram bulgularındaki motil ve total sperm sayısındaki azalma ile sperm morfoloji analiz bulgularındaki anomalili spermlerin belirgin olarak artmış olan parametrelerine apopitotik yolak proteinlerinden Acas-3'ün seviyesindeki artışın da eşlik ettiğini ayrıca apopitotik süreci engelleyecek olan Bcl-2 expresyonunun ise yetersiz gerçekleşmesi suretiyle infertiliteye dolaylı olarak katkı sağlanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

**KAYNAKLAR**

1. Almeida C, CunhaM, Ferraz L, Silva J, BarrosA, SousaM. Caspase- 3 detection in human testicular spermatozoa from azoospermic and non-azoospermic patients. *Int J Androl.* 2011;34:e407–14.
2. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* 1995; 332: 281-5.
3. Baccetti B, Collodel G and Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28: 587–596.
4. Barbieri ER, Hidalgo ME, Venegas A, Smith R, Lissi EA (1999) Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. *J Androl* 20:713–717.
5. Caruso A, Walsh R, Ross L, et al. Experimental varicocele inducestesticular germ cell apoptosis in the rat. *J Urol.* 1999;161:280-285.
6. Eckardstein S, Cooper TG, Rutscha K, Meschede D, Horst J, Nieschlag E. Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2000;73: 1226-31.
7. Eliasson R: Analysis of semen. In: Behrman SJ KR, eds. *Progress in Infertility.* NY, Little, Brown: 691-713. 1975.
8. Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil Steril* 1990; 54(6): 978-983.
9. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *Int J Androl* 1984;7:369-82.

10. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, et al. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000;21:33-44.
11. Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T et al. Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod* 2006; 21: 760-5.
12. Jones DM et al. (1986). Immobilization of sperm by condoms and their components. *Clinical Reproduction and Fertility*, 4:367-372.
13. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur Urol* 2012; 62 (2): 324-332.
14. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod* 2000;15:1562-7.
15. Lasserre JP, Dautant A, Aiyar RS et al. Yeast as system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis Model Mech.* 2015;8:509–526.
16. Liebermann DA. Normal development, oncogenesis and programmed cell death. *Oncogene.* 1998; 17(10):1189-94.
17. MacLeod J, Wang Y. Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertil Steril* 1979; 31: 103-16.
18. Moretti E, Terzuoli G, Mazzi L, Iacoponi F, Collodel G. Immunolocalization of aquaporin 7 in human sperm and its relationship with semen parameters. *Syst Biol Reprod Med.* 2012 Jun;58(3):129-35. doi: 10.3109/19396368.2011.644385.

19. Moore K., Persaud T.V.N.,(Çeviri Editörleri: Yıldırım M., Okar İ., Dalçık H.), İnsan Embriyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2002.
20. Moore, K.L., 2003, The developing human clinically oriented embryology, the beginning of human development: first week, Seventh edition, 15-41 p.
21. Moore, K.L., Agur, A.M.L., 2006, Temel klinik anatomi, (Çev.: Elhan, A.), 2. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara.
22. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death..Cell Death Differ. 1999; 6(11):1028-42.
23. Nelson SM, Fleming R. To examine the impact of obesity and potential intervention upon human reproduction in the domain of fertility, fertility treatment, pregnancy and its complications. Curr Opin Obstet Gynecol.2007; 19(4):384-9.
24. Payseur et al. 2004; Storchova et al. 2004; Good et al. 2008, 2010; Mihola et al. 2009; Wang et al. 2015; Balcova et al. 2016
25. Roshdy N, Mostafa T. Seminal plasma survivin in fertile and infertile males. J Urol. 2009;181:1269-1272
26. Ross HM., Kaye GI. and Pawlina W.: Histology: A text and atlas. Section 21: Male reproductive system. 4nd edition. Syf: 683-710, 2003.
27. Ross, M.H., Pawlina, W., 2006, Histology- a text and atlas with correlated cell and molecular biology, 5. Edition, Lippincott W&W, Philadelphia.
28. Saito K, Kageyama Y, Okada Y, Kawakami S, Kihara K, Ishibashi K, Sasaki S. Localization of aquaporin-7 in human testis and ejaculated sperm: possible involvement in maintenance of sperm quality. J Urol. 2004; 172 (5): 2073-6.

29. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A et al. Time to pregnancy and semen parameters: across-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod* 2002;17:503-15.
30. Standard Semen Analysis Criteria of World Health Organization-2010
31. Onur R, Semercioz A, Orhan I, et al. The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urol Res.* 2004;32: 204-208.
32. Taille A, Rigot JM, Mahe P, Gervais R, Dumur V, Lemaitre L et al. [Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens]. *Prog Urol* 1998; 8: 370-6.
33. Taymour M, Laila R, Nashaat N, and Rania A. Seminal Bax and Bcl-2 Gene and Protein Expressions in Infertile Men With Varicocele
34. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.* 1998; 281(5381):1312-6.
35. Yeung CH, Callies C, Tüttelmann F, Kliesch S, Cooper TG. Aquaporins in the human testis and spermatozoa - identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance. *Int J Androl.* 2010; 33(4): 629-41. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.00998
36. Zalata A, El-Mogy M, Abdel-Khabir A, et al. Sperm caspase-9 oligoasthenoteratozoospermic men with and without varicocele. *Fertil Steril.* 2011;96:1097-1099.
37. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 2001;75(4):674

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Kasım GÜNEŞ

**Doğum Tarihi:** 11/04/1989

**Medeni Hali:** Bekar

**Öğrenim Durumu:**

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Gaziosmanpaşa Fen-Edb.Fak.	2013
Y. Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Gaziosmanpaşa Üniv. Tıp Fakültesi	2013/2017

**Görevler :**

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Araştırma Görevlisi	Sakarya Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD, Sakarya, Türkiye	2014 ,.....