

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PENTOKSİFİLİN UYGULAMA SONRASI MARUZİYET  
SÜRESİ DİKKATE ALINARAK SPERMATOZOADA  
MEYDANA GELEN ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLER**

**Biyolog Zahide Gözde Babikli**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**



**İSTANBUL, 2014**

**T. C.  
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PENTOKSİFİLİN UYGULAMA SONRASI MARUZİYET  
SÜRESİ DİKKATE ALINARAK SPERMATOZOADA  
MEYDANA GELEN ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLER**

**Biyolog Zahide Gözde Babikli**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Canan Hürdağ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İSTANBUL, 2014**

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Zahide Gözde BABİKLİ



# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEM	5
4.1.1. Testis Histolojisi	5
4.1.1.1. Spermatogenetik Hücreler	7
4.1.1.2. Sertoli Hücreleri	8
4.1.1.3. Spermatogenezis	9
4.1.1.3.1. Spermatositogenezis	10
4.1.1.3.2. Mayoz Bölünme	11
4.1.1.3.3. Spermiyogenez	11
4.1.1.4. Spermatogenez Etkileyen Faktörler	13
4.1.1.5. Spermatozoon Kapasitesi ve Hareket Kazanması	14
4.1.1.6. Akrozom Reaksiyonu	14
4.1.1.7. Olgun Spermatozoon	15
4.1.1.7.1. Spermatozoon Membran Yapısı	17
4.1.2. Semen	18
4.1.2.1. Semen Analizinde Spermatozoonların Mikroskopik İncelenmesi	19
4.1.2.2. Spermatozoon Morfolojisi, Motilitesi ve Konsantrasyonunun Klinik Önemi	20
4.2. PENTOKSİFİLİN	22
4.3. ERKEK İNFERTİLİTESİNDE PENTOKSİFİLİN KULLANIMI	23
5. MATERYAL VE YÖNTEM	26
5.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	26
5.2. SEMEN TOPLANMASI VE ANALİZİ	26
5.3. PENTOKSİFİLİN UYGULAMA PROTOKOLÜ	27

5.4. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) PROTOKOLÜ .....	27
6. BULGULAR .....	29
6.1. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) BULGULARI .....	29
6.1.1. Normospermi Deney Grubunun Elektron Mikroskobu Bulguları .....	29
6.1.2. Pentoksifiline 5 dk Maruz Kalmış Deney Grubunun Elektron Mikroskobu Bulguları.....	32
6.1.3. Pentoksifiline 60 dk Maruz Kalmış Deney Grubunun Elektron Mikroskobu Bulguları.....	39
7.TARTIŞMA .....	47
8.SONUÇ .....	51
9.TEŞEKKÜR .....	52
10.KAYNAKLAR .....	53

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>ABP</b>	Androjen Bağlayıcı Protein
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>ATPaz</b>	ATP'nin defosforilasyonunu sağlayan enzim
<b>cAMP</b>	Siklik Adenozin Monofosfat
<b>cGMP</b>	Siklik Guanizin Monofosfat
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>FSH</b>	Folikül Uyarıcı Hormon
<b>g</b>	Devir
<b>HOS</b>	Hipoosmatik Test
<b>ICSI</b>	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
<b>IVF</b>	İn Vitro Fertilizasyon(Döllenme)
<b>LH</b>	Luteinleştirici Hormon
<b>mg</b>	Miligram
<b>ml</b>	Mililitre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>nm</b>	Nanometre
<b>Os04</b>	Osmium Tetroksit
<b>PAS</b>	Proakrozomal Granüller
<b>PBS</b>	Fosfat tampon
<b>PDE</b>	Fosfodiesteraz
<b>PH</b>	Hidrojenin Gücü
<b>PHSS</b>	Hızlı Hareketli Spermatozoon Sayısı
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türevi
<b>TEM</b>	Geçirimli Elektron Mikroskobu

<b>TNF-alfa</b>	Tümör nekroz faktör- alfa
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>X20-X100</b>	20'lik ve 100'lük Büyütme
<b>°C</b>	Santigrad
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>%</b>	Yüzde
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>2n</b>	Diploit Kromozom
<b>1n</b>	Haploit Kromozom
<b>&lt;</b>	Küçüktür

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 27.11.13 tarih ve 14-84 numaralı karar ile onaylanmıştır.

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 28.03.2014 tarih ve 2014-01/02 proje numarası ile desteklenmesine karar verilmiştir.

**Araştırma Projesi No:** HE/1802013

## 1.ÖZET

Spermatozoon motilite sorunu olan erkeklerde spermatozoon motilitesini arttırmaya yönelik çeşitli farmakolojik ajanlar tanımlanmıştır. Yardımcı üreme tekniklerinde bu ajanlar içerisinde en çok kullanılanı ise pentoksifilindir. Pentoksifilin erkek infertilisinde en yaygın kullanım alanı in vitro spermatozoon motilitesinin stimülasyonudur. Üremeye yardımcı tekniklerde, in vitro dölllenme (IVF) ve intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonunda (ICSI) canlı spermatozoon seçimi önemlidir. Bu seçim de spermatozoon motilitesi ile doğru orantılıdır.

Yardımcı üreme tekniklerinde, motilitenin in vitro fertilizasyon kapasitesinde önemin anlaşılması ile pentoksifilin rutinde kullanımının artması, bu konu üzerine birçok çalışma yapılmasına neden olmuştur. Çalışmamızda farklı maruziyet sürelerinde pentoksifilin uygulanmış normospermi örneklerinin ince yapılarını (ultrastrüktürel) geçirimli elektron mikroskobu (TEM) düzeyinde incelemeyi amaçladık.

Belirlemiş olduğumuz normospermi örnekleri farklı sürelerde pentoksifinle inkübe edildi. Belirlenmiş olan örnekler rutenyum kırmızı boyası uygulanarak spermatozoona ait membran yapısında glikokaliksi belirginleştirdikten sonra geçirimli elektron mikroskobunda spermatozoon ince yapısı karşılaştırılarak incelendi ve bu örnekler kontrol grubu ile de karşılaştırılarak değerlendirildi.

Sonuç olarak çalışmamızda, 5 dakika (dk) pentoksifiline maruz kalan spermatozoon örneklerinin morfolojik yapısında fazla bozulma olmamasına karşın, 60 dakika pentoksifiline maruz kalan spermatozoon örneklerinde ise belirgin morfolojik bozukluklar görüldü. Buna bağlı olarak pentoksifilin süresinin spermatozoon morfolojisi üzerine etkisi gösterilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Pentoksifilin, Spermatozoon, Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), İnfertilite.



## 2.SUMMARY

### Ultrastructural Changes on Spermatozoa Considering the Exposure Period After Pentoxifylline Implementation

Various pharmacological agents have been defined to increase spermatozoon motility on the men whom have spermatozoon motility problem. Pentoxifylline is the most used agent in assisted reproduction technics. The most cummon usage area of pentoxifylline on male infertility is the stimulation of in vitro spermatozoon motility. The live spermatozoon selection is important on intra cytoplasmic spermatozoa injection (ICSI) and in vitro fertilization which are assisted reproduction techniques, this selection is directly proportionate to spermatozoon motility.

In assisted reproduction technics, with the realization of the importance of motility on in vitro fertilization capacity, the pentoxifylline usage in routine increased and it caused to be made of many studies on this issue. In our study, we the ultrastructural of different exposure-term pentoxifylline-treated normospermi samples in transmission electron microscopy (TEM) level.

The normospermi samples that we specified, were incubated with pentoxifylline at different durations. The specified samples were analyzed by comparing the ultrastructural of spermatozoon at TEM level after the glycocalyx in the spermatozoona's membrane structure became clear by implementing the red rutenyum colouring. Then the samples were compared with control group.

As a result, it's seen that while there is not too much distortion on morphological structure of spermatozoon samples that exposed to pentoxifylline for 5 minutes, there occurred significant morphological distortions on the spermatozoon samples that exposed to pentoxifylline for 60 minutes. Accordingly, the effect of pentoxifylline's period on spermatozoon morphology has been shown.

**KEY WORDS:** Pentoxifylline, Spermatozoon, Transmission Electron Microscopy (TEM), Infertility.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Yardımcı üreme teknikleri ile ilgili uygulamalar gelişmiş teknolojiler kullanılarak, 20 yılı aşkın bir süredir başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Tüp bebek uygulamalarında infertilite değerlendirilirken öncelikle erkek faktörü ele alınır (1). Spermatozoonun fertilizasyon kapasitesini etkileyen en önemli iki parametre, morfolojik özelliği ve motilitedir (2). Spermatozoon motilitesi, fertilizasyonda spermatozoonun oosite ulaşması için gerekli en önemli özelliklerinden birisidir (3). Yardımcı üreme tekniklerinde seçilen spermatozoonun canlı olması gerektiğinden hareketsiz spermatozoonların canlı olup olmadıkları klinik açıdan önemlidir (4). Spermatozoon hareketinin in vivo ve in vitro fertilizasyon üzerindeki önemi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucu spermatozoon motilitesini arttırmaya yönelik çeşitli farmakolojik ajanlar tanımlanmıştır. Bu ajanlar içinde en yaygın kullanılan pentoksifilindir (2).

Son zamanlarda, pentoksifilin kullanımının spermatozoon fonksiyonları üzerindeki geliştirici rolü dikkate değer olarak kabul edilmiştir (5). Metilksantin türevi olan pentoksifilin non-spesifik fosfodiesteraz inhibitörüdür. Pentoksifilin fosfodiesterazı inhibe ederek hücre içi siklik adenzin monofosfat (cAMP) konsantrasyonunu arttırdığı bilinmekte ve böylece spermatozoon motilitesinde artışa neden olduğu savunulmaktadır (6, 7). Aynı zamanda cAMP artışı, akrozom reaksiyonunun indüklenmesine neden olur (6, 7, 8). Pentoksifilin, spermatozoonun zona pellicuda'ya bağlanma yeteneğini artırır (6, 8). Spermatozoonların zona pellicuda'ya bağlanma yeteneğinin artması aslında spermatozoonun hız parametrelerinin artışı ile gerçekleşmektedir (6). Ayrıca, pentoksifilin serbest radikaller tarafından oluşan peroksitleri kaldırarak bir antioksidan etkisi yaptığı ve spermatozoon plazma membranını koruduğu düşünülmektedir (5, 9, 10). Pentoksifilin uzun süre uygulandığında (90 dk üzeri) toksik olabileceği ve spermatozoon canlılığında azalmaya yol açabildiği ileri sürülmüştür (11).

Spermatozoon fonksiyonları ve erkek faktör infertilitesinin tedavi sonuçları üzerine pentoksifilin yararlı etkileri bazı çalışmalarda gösterilirken, yine bazı diğer çalışmalarda pentoksifilin spermatozoon fonksiyon ve parametreleri üzerine zararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (1, 5, 9, 11). Bu farklılığının sebebinin çeşitli değerlerin aynı olmadığından kaynaklandığı söylenebilir. Bütün bu bilgiler ışığı altında çalışmamızın amacı, farklı maruziyet sürelerinde pentoksifilin uygulanmış ve uygulanmamış normospermi

örneklerinin ince yapılarını, membran yapısındaki glikokaliksi ortaya çıkaran rutenyum kırmızısını uygulayarak geçirimli elektron mikroskobu (TEM) düzeyinde incelemek, gruplar arası farklılıkları karşılaştırmak ve pentoksifilin spermatozoon üzerindeki etkilerini göstermek, aynı zamanda kullanılan ajanların sperm üzerinde ışık mikroskobu düzeyinde morfolojik bir değişikliğe yol açmadığından dolayı elektron mikroskobu düzeyinde morfolojik bir değişiklik olup olmadığı sorusunu cevaplamaktır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEM

Erkek üreme sistemi; 1) haploid erkek gametin (spermatozoon) devamlı üretimini, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından, 2) erkek seks hormonlarının sentezi ve sekresyonundan sorumludur (12).

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşur. **Testis**, iki yönlü görev olarak hormon ve spermatozoon üretmektedir. **Genital kanallar (epididimis, vaz deferens, ejakülatuar kanal, erkek üretrası) ve yardımcı bezler (seminal vezikül, prostat bezi, bulbo üretral bezler)**, düz kas kasılmalarının yardımı ile spermatozoonları dışarıya gönderen salgıları üretirler. Aynı zamanda bu salgılar, erkek üreme sistemi içinde bulunan spermatozoonlara gerekli besinleri sağlar (13).

Spermatozoonlar ile birlikte genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgısı, **penis** yoluyla dişi üreme sistemine ileten **semen**'i oluşturur (13).

#### 4.1.1. Testis Histolojisi

Embriyoda erkek fetusun normal gelişimi için testiste üretilen androjenler gereklidir. Pubertede testislerden salgılanan testosteron, spermatozoon üretiminin başlamasını ve sekonder seks karakterlerinin gelişimini sağlar. Erişkinlerde de spermatozoon üretiminin devam etmesi, sekonder seks karakterlerinin korunması ve yardımcı bezlerin fonksiyonları, testise bağımlıdır (14).

Testisler, karın boşluğunun dışında skrotum içinde yer alan çift organlardır. Bu yerleşimleri, testislerin vücut ısısından 2-3°C düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34- 35°C gereklidir (15).

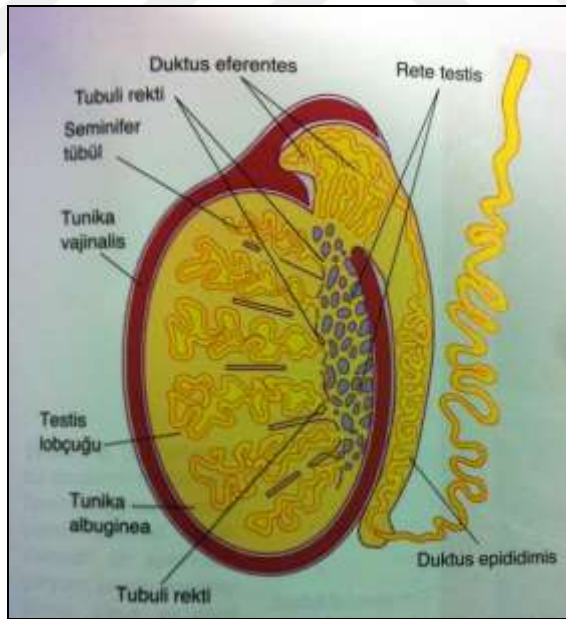
Oval bir bez olan testis, “tunika albuginea” adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsülle sarılır. En dış kısımdaki visseral katman olan “tunika vajinalis” kapsülü dıştan sarar (16).

Testisin arka kenarında kapsül kalın bir katlanma şeklinde içeriye doğru uzanır, bu kısım “mediastinum testis” adını alır. İnce fibröz bölmeler, mediastinumdan ışınsal olarak uzanarak yaklaşık 250 adet lobülü oluşturur (16). Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet, kıvrımlı yapıda, ana işlevi spermatozoon üretimi olan seminifer tübüller bulunur (17). Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarları, sinirler ve Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücreleri içerir. Bu hücreler de testis androjenlerini salgılar (13).

Her bir seminifer tübül iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Rete testis, seminifer epitelyumun ürünlerini toplayan kanallar ağıdır (12).

Seminifer tübül iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümeninden oluşur: (a) somatik Sertoli hücreleri ve (b) spermatogenetik hücreler (12).

Seminifer epitel, bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar, kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrelenmiştir. Miyoid hücreler, hareketsiz spermatozoonları rete testise ileten ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur (12).



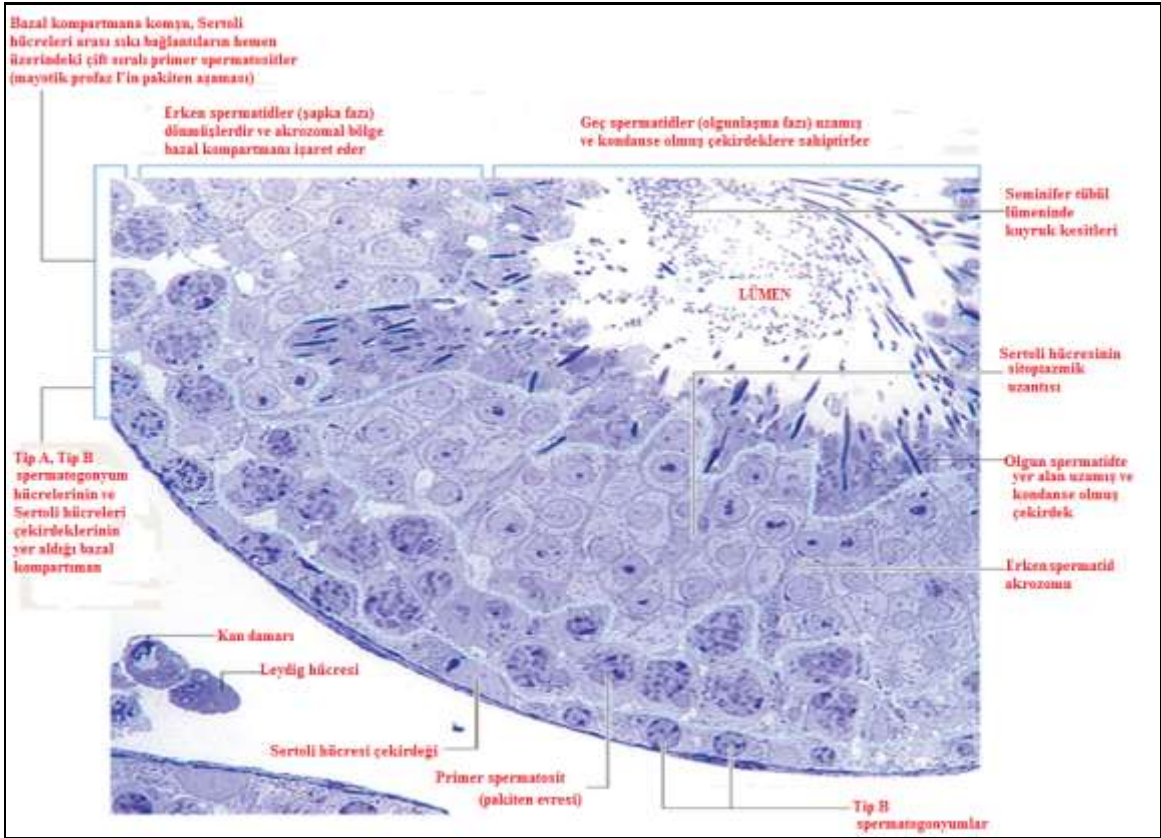
**Şekil 1.** Testis kanalları ve epididim kanalı (13).

#### 4.1.1.1. Spermatogenetik Hücreler

Spermatogenetik hücreler birbiri üzerine sıralanmış farklı gelişim aşamasında olan hücrelerdir (14). Spermatogenez serisinin hücreleri 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir, işlevi spermatozoonları üretmektir (13).

Seminifer tübüllerin enine kesitinde spermatogenetik hücreler bazı özellikleri ile birbirlerinden ayırdedilebilirler. İnsanlarda spermatogenez ve spermiyogenez yaklaşık 9 haftalık bir sürede tamamlanır. Herhangi bir tübülde bu dönemde yaşayan bütün aşamaları görmek genellikle mümkün olmaz. Bazal membranın hemen üzerinde yer alan spermatogonyumlar mitoz bölünme ile diğer spermatogenetik hücreleri oluşturan ana hücrelerdir. Spermatogonyum tip A heterokromatik veya ökromatik oval nükleuslu hücrelerdir. Spermatogonyum tip A'nın mitozla bölünmesiyle oluşan Spermatogonyum tip B ise kromatini nükleusun periferinde yoğunlaşmış, yuvarlak nükleuslu, belirgin nükleoluslu hücrelerdir. Her iki spermatogonyum da soluk boyanan az miktarda sitoplazmaya sahiptirler. Heterokromatik nükleuslu tip A spermatogonyumların ana hücreler olduğu düşünülmektedir. Bu hücreler bölünerek ya heterokromatik ya da ökromatik nükleuslu iki spermatogonyum oluştururlar. Heterokromatik nükleuslu hücrelerden oluşan ökromatik nükleuslu tip A spermatogonyumlar ince sitoplazmik uzantılarla birbirlerine bağlı kalırlar. Bu durumu takip eden mitoz ve mayoz bölünmelerde de geçerli olduğundan dolayı, spermatidlerin olgunlaşmalarının son dönemine kadar hücreler birbirlerine bağılıklarını sürdürürler (14). Böylece tek bir spermatogonyum A'ya ait soy, çoğalıp farklanmaları sırasında birbiriyle ilişkisini koruyan bir germ hücre topluluğu halindedir. Ayrıca, spermatogonyum ve spermatidler, gelişme süreleri boyunca Sertoli hücreleri arasındaki derin oyuklar içinde gömülü kalır. Böylece Sertoli hücreleri, germ hücrelerini destekler, korur, beslenmelerine katkıda bulunur; spermatozoonların olgunlaşım serbest kalmalarına yardımcı olur (18).

Bir seri bölünmeden sonra tip A spermatogonyumlardan tip B spermatogonyumlar oluşur. Tip B spermatogonyumlar, mitoz bölünme ile primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositlerden birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositlerden ikinci mayoz bölünme ile spermatidler oluşur. Spermatidler, spermiyogenez olarak bilinen değişim dönemine girerler ve spermatozoonlara dönüşürler (14).



Şekil 2. Seminifer epiteldeki hücrelerin dağılımları (12).

#### 4.1.1.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri bazal membrandan tübül lümenine kadar uzanan prizmatik hücrelerdir. Belirgin bir nükleolus içeren yuvarlak veya üçgen şekilli ökromatik nükleusları bazal sitoplazmada izlenir. Organeller bakımından zengin hücrelerdir (14).

Sertoli hücreleri birçok işlevi yerine getirir. Bunlar:

- 1) Gelişmekte olan spermatozoidlere (spermaditler) destek sağlamak, korumak ve beslenmelerini sağlamak
- 2) Gelişmekte olan spermaditlerdeki fazla sitoplazmanın (artık cisim) fagosite edilmesi
- 3) Olgun spermatozoonların seminifer tübüllerin lümenine atılması, spermiasyon
- 4) Spermatozoonların beslenme ve nakli için gerekli testiküler sıvının salgılanması
- 5) Androjen bağlayıcı protein (ABP) ve inhibin hormonunun üretilmesidir (19).

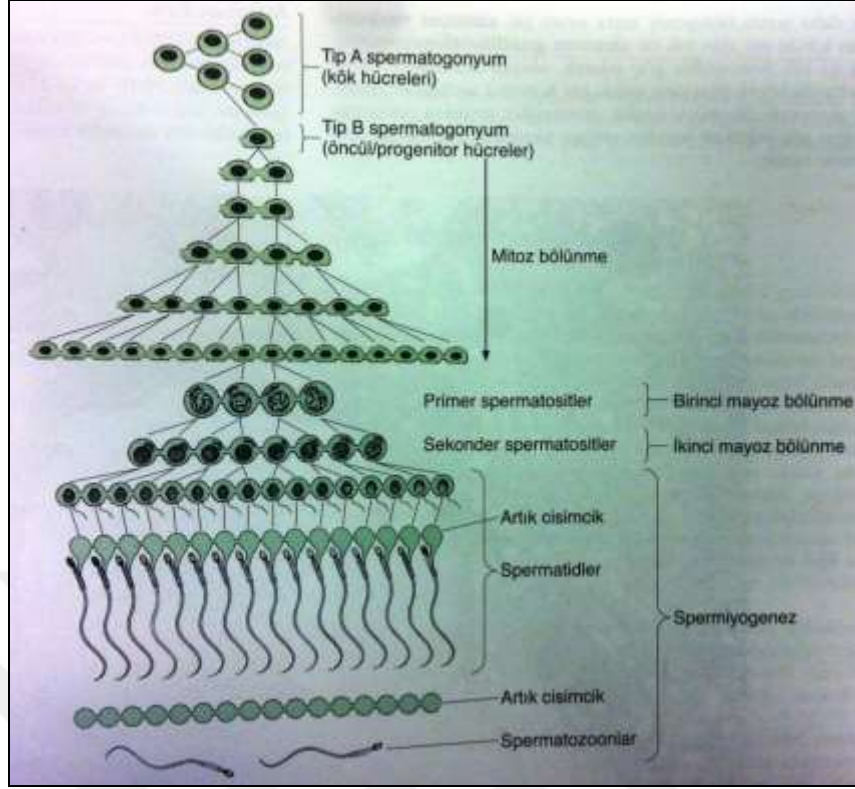
Ayrıca Sertoli hücreleri komşu Sertoli hücreleriyle birlikte okludens bağlantılar oluşturur. Bu bağlantılar gelişmekte olan spermatozidler ve spermatidler otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyeri olarak adlandırılan elemanları belirlerler (12).

#### **4.1.1.3. Spermatogenezis**

Embriyonik ve fetal gelişim döneminde, spermatogonyumlar primordial germ hücrelerinden köken alır. Yeni doğan bir erkek çocuğunda seminifer tübüller, germinal epitelden köken alan Sertoli hücreleri ve daha az olmak üzere spermatogonyumlar tarafından kuşatılmıştır. Puberteye yaklaştıkça spermatogonyumlar artar ve gelişme bununla sınırlı kalır. Puberteden itibaren spermatozoon üretimi başlar, 45 yaşına kadar aktif olarak sürer. Bu yaştan sonra spermatozoon üretimi azalarak tüm yaşam boyunca devam eder (20). Spermatogenezis, luteinleştirici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormonlarının (FSH) kontrolü altında gerçekleşir (17).

Spermatogenezis, tam farklılaşmamış diploid ( $2n$ ) spermatogenetik hücrelerden oldukça özelleşmiş haploid ( $1n$ ) spermatozoonların geliştiği bir olaylar dizisidir. Bu hücrelerin geçirdiği evreler spermatogonyal evre (spermatozoidogenezis), mayoz bölünme evresi ve spermatid evresi (spermiyogenezis) olmak üzere üç evrede gerçekleşmektedir. Spermiyogenezis sürecini tamamlayan spermatidlerin Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasından serbest kalması ise spermiyasyon olarak isimlendirilir (12).





Şekil 3. Spermatogenezis (13).

#### 4.1.1.3.1. Spermatisitogenezis

Erkek üreme hücresi olan spermatogonyumların primer spermatisitlere farklılaşması olayıdır (20).

Puberte döneminden önce, testisteki seminifer tübüllerin epiteli, az sayıda germ hücresine karşılık çok sayıda Sertoli hücresi içerir. Puberteyle beraber çok önemli nörohormonal değişimler olur. Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormonun etkisiyle hipofiz ön lobundan FSH ve LH denilen gonadotropinler salgılanır (20).

FSH ve LH etkisiyle, genç ve ilkel spermatogonyum tip A hücreleri mitoz bölünme ile hızla çoğalarak çok sayıda yeni spermatogonyum tip A jenerasyonlarını oluştururlar (20).

Spermatogonyum tip A hücrelerinin bir kısmı ileri yaşlarda kullanılmak amacıyla rezerv (ana) hücre olarak depo edilirken; diğerleri ara hücelere sonra da spermatogonyum

tip B'lere farklıdır. Spermatogonyum tip B'lerin de mitoz bölünme geçirmesi ile primer spermatisitler oluşur (20).

#### **4.1.1.3.2. Mayoz Bölünme**

Erken evredeki yani preleptoten spermatisitler başlangıçta bazal membrana yakın olarak bulunurlar ve spermatogonyumlarla aynı yapısal özellikleri taşırlar. Birbirine bitişik Sertoli hücrelerinin oluşturduğu bölümde yer alarak gelişim süreci içerisinde lümene doğru ilerlerler (20, 21).

Primer spermatisitler mayoz bölünmeye girerler. Mayoz bölünmenin profaz safhasında izlenen kromatin yoğunlaşması sonucunda bu hücrelerin nükleuslarında kromatin iplikçikleri izlenir. Bu şekilde gözlenen nükleusları ve geniş sitoplazmaları ile primer spermatisitler kolay tanınır (14). Primer spermatisitlerin 1. mayoz bölünmeyi geçirerek meydana getirdikleri yeni hücreler, sekonder spermatisit adını alır. Sekonder spermatisitler çok geçmeden ikinci mayoz bölünmeye girdikleri için, kesitlerde bu hücrelere az rastlanır (21). Sekonder spermatisitler primer spermatisitlere oranla çok küçük hücrelerdir (14). Sekonder spermatisitler, 2. mayoz bölünme ya da ekvatoryal bölünme ile haploid spermatidleri meydana getirirler ve spermiyogenez evresi başlar (21).

Kromozomlar arası gen alış verişi (crossing-over) mayoz bölünme sırasında gerçekleşir (20).

#### **4.1.1.3.3. Spermiyogenez Evresi**

Spermiyogenez, spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin erkek deoksiribonükleik asidini (DNA) ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoona dönüşme sürecidir. Bu evrede hücre bölünmesi gerçekleşmez.

Spermatidler, küçük boyutları, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tübüllerde lümen yakınında yerleşmişlerdir. Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, kamçı gelişmesini ve

sitoplazmanın büyük bir bölümünün kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Sonuçta, seminifer tübül lümenine bırakılan olgun spermatozoon oluşur (13).

Spermiyogenez 3 evreye ayrılabilir:

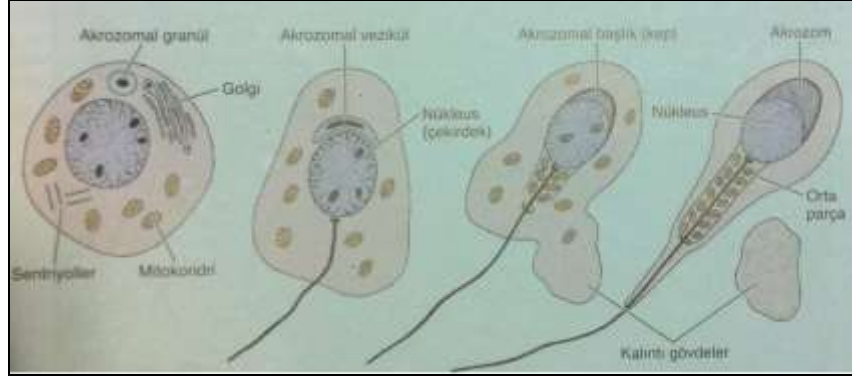
**1) Golgi Fazı:** Spermatidin sitoplazması, çekirdeğin yakınında yer alan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriyumlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum tübüllerini içerir. Proakrozomal granüller olarak adlandırılan PAS (+) küçük granüller, Golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek zarla sınırlı bir akrozom vezikülünün içinde yer alan tek bir akrozom granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek, oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma yerleşirler. Kamçı aksonemi oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden çekirdeğe doğru göç ederken hareket ettikçe aksonem bileşenleri çevresine sarılır (13).

**2) Akrozomal Evre:** Akrozom vezikülü ve granülü, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, (hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer proteaz gibi) bazı hidrolitik enzimler içerir. Bu yüzden akrozom özelleşmiş bir lizozom gibi işlev görür. Bu enzimlerin, oositi çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Spermatozoonlar bir oosit ile karşılaştığında, akrozomun dış zarı birçok bölgede spermatozoonun plazma zarı ile kaynaşarak akrozom enzimlerinin hücre dışına boşalmasını sağlar. Bu işlem 'akrozom reaksiyonu' olarak bilinir. Bu reaksiyon döllenmenin ilk basamaklarından biridir (13).

Spermiyogenezin bu evresinde, spermatid seminifer tübülünün tabanına doğru yönelir ve aksonem lümene doğru uzanır. Ayrıca, çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden biri gelişerek kamçıyı oluşturur. Mitokondriyumlar da kamçının proksimal kısmı etrafında toplanarak 'orta parça' adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge, spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur (13).

Kamçı hareketi, mikrotübüller, Adenozin trifosfat (ATP) ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkilemesi sonucunda oluşur (13).

**3) Olgunlaşma Evresi:** Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine bırakılır. Bu olaya 'spermiasyon' denir (13). Lümeneye verilen spermatozoon hücresi henüz fertilizasyon yeteneğine sahip değildir ve hareket yeteneği yoktur (12).



Şekil 4. Spermioyenez Evresi (13).

#### 4.1.1.4. Spermatojenezi Etkileyen Faktörler

Spermatojenez üzerinde en önemli uyarıcı etkiyi hormonlar yapar. Spermatojenez, hipofizden salgılanan FSH ve LH hormonlarının testis hücreleri üzerindeki etkisine bağlıdır. Bu hormonlar, spermatojenez serisindeki hücrelerin normal gelişimi için gerekli olan testosteron üretimini uyarır. FSH'nin Sertoli hücreleri üzerinde etkili olduğu, cAMP düzeylerini arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca, androjen bağlayıcı protein sentezini ve salgısını da uyarır. Bu protein, testosteronu bağlayarak seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatojenez testosteron aracılığı ile uyarılır, östrojenler ve progesteronlar tarafından baskılanır (13).

Ortalama vücut sıcaklığının (37°C) altındaki sıcaklıklarda gerçekleşen spermatojenezin düzenlenmesinde sıcaklık çok önemlidir. Spermatojenez için 35 °C'lık bir sıcaklık kritiktir. Bu sıcaklık, spermatik arteri saran venlerin oluşturduğu pampiniform pleksus tarafından skrotumda sağlanır ve sıcaklığı dağıtmak için ters yönlü akımla ısı değişimi görevi görür. Sıcaklık 35 °C'nin altına düştüğünde, spermatik kordondaki cremaster kasının ve skrotal kesenin dartos kasının kasılması sıcaklığı arttırmak için testisi karın boşluğuna yakınlaştırır. Spermatik kordon venlerinin anormal genişmesi nedeniyle oluşan varikoselin bir sonucu spermatozoon üretiminde azalmadır (12).

Testisin inişindeki bozukluk olan kriptorşidizm'de testisler 37 °C'de kalır ve spermatojenez inhibe olur (12).

Kanser kemoterapisinde antitümoral ilaçlarla tedavi edilen genç erkek hastalar geçici süreyle aspermatogenik hale gelirler, çünkü spermatogonyal mitoz ve spermatosit mayozu etkilenebilir (12).

Normal spermatogenezis için Y kromozomu çok önemlidir. Bu kromozomdaki mikrolezyonlar spermatogenezisin bozulmasına ve infertiliteye neden olabilir (15).

#### **4.1.1.5. Spermatozoon Kapasitasyonu ve Hareket Kazanması**

Spermatozoon hücreleri epididimisi terk edinceye kadar hareket kazanmazlar. Dışı üreme sistemine geçtikten sonra, spermatozoonlar kapasitasyon geçirir. Böylece döllenme yeteneği kazanır (17).

Spermatozoonun oositi fertilize edebilmesi için kapasitasyon adı verilen bir fertilizasyona hazırlık süreci gereklidir (22). Kapasitasyon; spermatozoon motilitesi (hiperaktivasyon), spermatozoon yüzey değişiklikleri, akrozom reaksiyonu ve oosit-sperm füzyon olayları şeklinde gerçekleşmektedir (22). Spermatozoon membran içeriği ve yapısı büyük oranda değişir. Kapasitasyon sonrası spermatozoonlarda morfolojik değişiklik gözlenmez, ancak daha aktif hale gelirler. Spermatozoonların kapasitasyonu uterus ya da uterin tüplerin içinden geçerken buralardan salgılanan maddeler yardımıyla olur (15).

İnsanda yaklaşık 7-8 saat süren kapasitasyon olayı ile spermatozoonun akrozomal yüzeyini kaplayan plazma membranı üzerindeki glikoprotein kılıfları ve seminal plazma proteinleri tamamen ortadan kaldırıldıktan sonra akrozomal reaksiyon başlar. Kapasitasyonun tamamlanması akrozom reaksiyonu için önemlidir (15).

#### **4.1.1.6. Akrozom Reaksiyonu**

Akrozom reaksiyonu, spermatozoon başını bir kep gibi kaplayan 'akrozom' adındaki organelin membranının eriyerek kaybolmasını içeren bir değişimdir (1). Spermatozoonun oosit ile teması sonucu akrozom reaksiyonu başlamaktadır. Spermatozoon iç ve dış akrozomal membranı arasında akrozomal enzimler yer alır. Oosit plazma membranı ile spermatozoon dış akrozomal membranının birleşmesiyle, ekzositoz sonucu hidrolitik veziküller dış ortama salınır. Serbest bırakılan ilk enzim, hiyalüronidazdır. Hiyalüronidaz

spermatozoonun, korona radiata tabakasını geçmesini sağlarken, akrozin ve tripsin benzeri maddeler zona pellusidayı eriterek, spermatozoonun oosite ulaşmasına olanak verir (22).

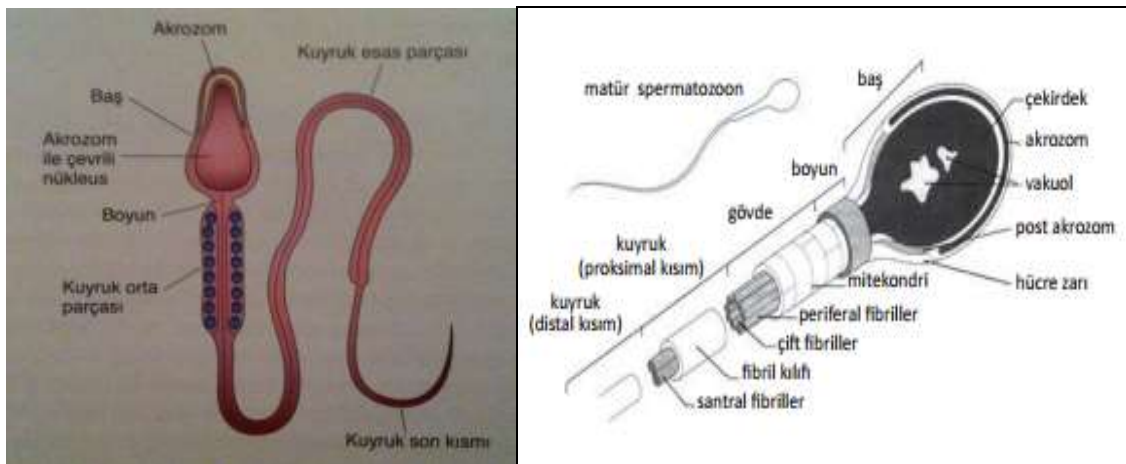
Spermatozoonun kapasitasyonu sonucu oluşan hiperaktivasyon ile oosit membranında meydana gelen penetrasyon yarığında spermatozoon girişi gerçekleşir (22).

#### 4.1.1.7. Olgun Spermatozoon

Baş ve kuyruktan oluşan, serbest yüzebilen, aktif olarak hareketli bir hücredir. Spermatozoonun başı ile kuyruğunun birleştiği yere boyun denir (15). Spermatozoonun baş ve kuyruk kısımlarını bir plazma membranı sarar (12). Döllenme sırasında spermatozoonu saran hücre zarı, sekonder oositin hücre zarı ile bu postakrozom bölgesinden birleşerek erir ve spermatozoonun oosit sitoplazması içerisine geçişi sağlanır (23).

Spermatozoonun başı, spermatozoonun en büyük kısmıdır ve haploid nükleus içerir (15). Spermatozoon başı ortalama 4-5µm uzunlukta, 2,5-3,5µm genişliğindedir (24). Nükleusun 2/3 ön kısmı akrozom ile kaplıdır. Şapka şeklindeki bu kese benzeri yapının içinde birçok enzim vardır. Bu enzimlerden en önemlisi akrozindir. Bu enzimler salındığında spermatozoonun fertilizasyon sırasında korona radiata ve zona pellusidayı geçmesi kolaylaşır (15).

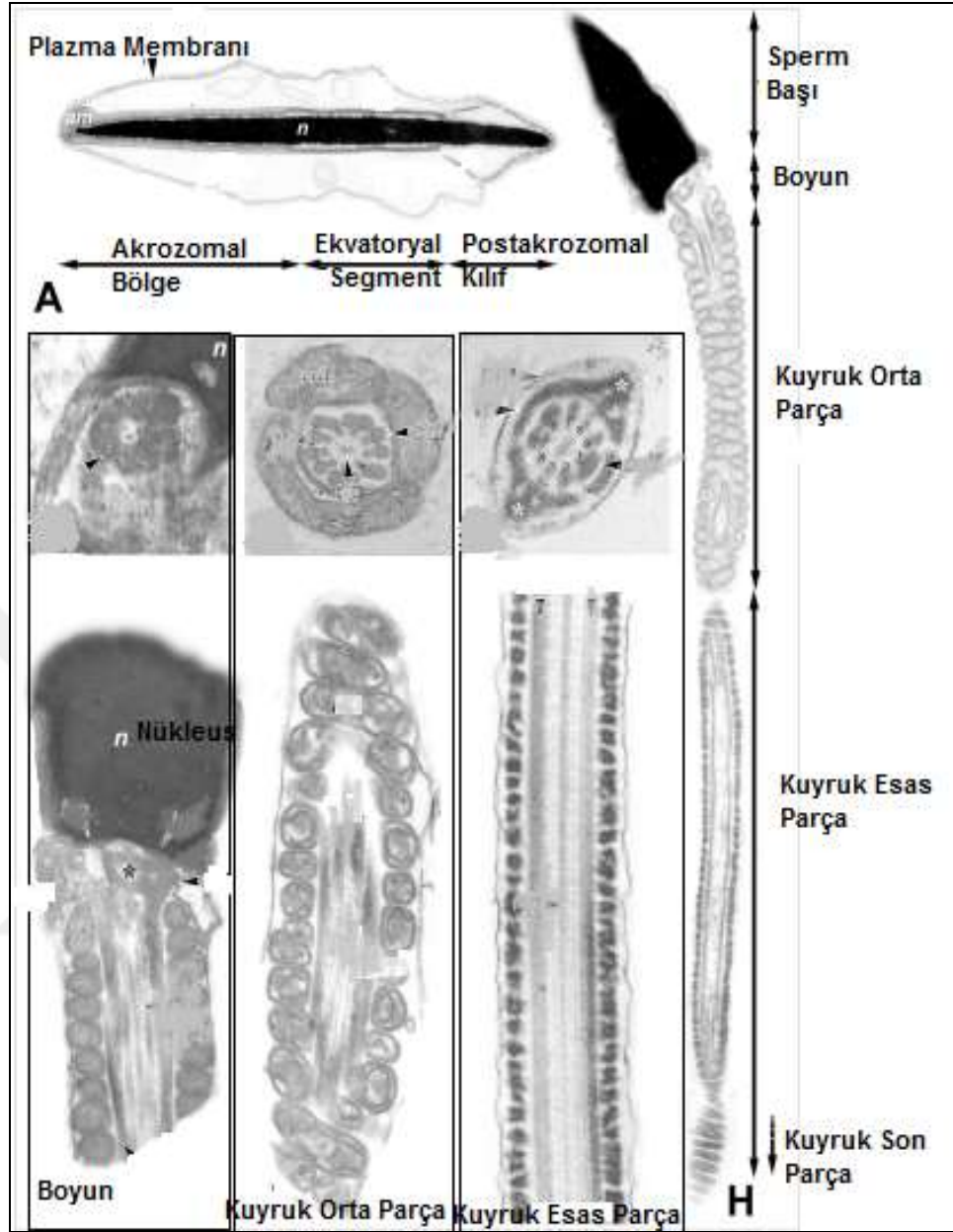
Spermatozoonun boyun kısmı, bağlantı parçası ve proksimal sentriyolün bulunduğu dar bir parçadır (20).



Şekil 5. Olgun Spermatozoon (15,25)

Spermatozoon kuyruğu; orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç bölümden oluşur. Kuyruk spermatozoonun hareketini sağlar ve fertilizasyonun gerekleēeđi bölgeye gitmesine yardım eder. Kuyruđun orta kısmında bulunan mitokondriler hareket için gerekli ATP sağlar (15). Kuyruđun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun liflerden oluşur. Esas parça, kuyruğun en uzun parçası olarak yedi dış yoğun life sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur (12). Dış yoğun lifler ve fibröz kılıf spermatozoonun ne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan keratin proteinlerini bulundurmaktadır (22). Son parça, sadece aksonem bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (12).





Şekil 6. Elektron mikroskopunda Spermatozoon görünümü (26).

#### 4.1.1.7.1. Spermatozoon Membran Yapısı

Spermatozoon membranı; protein, lipid ve karbonhidrat yapısındadır. Lipidlerin esas görevi membran yapısını oluşturarak stabilizasyonunu sağlamak, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit-sperm füzyonunda rol almaktır. İnsan spermatozoonları; yüksek oranda fosfotidil kolin, fosfotidil etanolamin ve sfingomiyelin içerir. Fosfolipidlerle



birlikte kolesterol spermatozoon membranının bütünlüğünü ve impermeabilitesini sağlar. Spermatozoon membranının yapısında, mannoz ve glukoz gibi monosakkaridler ile disakkaridler bulunur. Tirozin, triptofan ve histidin ise esas aminoasit yapısını oluşturmaktadır. Spermatozoonların membranında; spesifik antijenler (tirozin kinaz sp 95, proakrozin, PH-20, PH-30, sp 56, galaktoziltransferaz, spermadezinler, progesteron reseptörü) dışında, hücre-hücre ya da hücre-matriks etkileşimini yürüten nonspesifik proteinler, matriks proteinleri ile (kollajen, fibronektin, laminin, adezyon molekülleri) birlikte, immünoglobülinler, kaderinler, selektinler ve integrinler gibi adezyon moleküllerinin de yer aldığı gösterilmiştir (22).

Memelilerde, testiküler germ hücrelerinin glikoproteinleri, spermatozoon farklılaşması ve spermatogenezde Sertoli hücreleriyle etkileşimde önemlidir. Glikokaliks aynı zamanda, dişi immün sistemine karşı spermatozoon korunmasında, akrozom reaksiyonlarında ve spermatozoonun oositi dölleme yeteneğinde önemli rol oynar (11).

#### **4.1.2. Semen**

Semen sıvısı, spermatozoonun testis ve epididimis salgısının, ejakülasyon sırasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerin salgılarının birleşmesiyle oluşur. Sonuç olarak, oluşan viskozitesi yüksek sıvı “semen” adını alır. Bu salgıda spermatozoon, semen sıvısının %5’ini oluşturur (24). Cinsel birleşme sırasında, spermatozoonları içeren semen, penis aracılığıyla dişi üreme sistemine iletilir (17).

Semen hacmi ortalama 3,5 ml kadardır (2-6 ml arasında) (15). Semen pH sı 7,2- 8,0 arasında değişkenlik gösterir. Pek çok memeliden farklı olarak insan semeni ejakülasyonun hemen sonrasında koagüle olur ve yaklaşık 20 dk içinde yeniden çözülerek likefiye olur (24).

Prostat salgısı, duktus deferens ve dişi üreme yollarının asidik salgılarını nötralize ederek spermatozoonların hareket kazanmasına yardımcı olur. Spermatozoonlar için gerekli enerji seminal veziküllerin fruktozdan zengin salgısından sağlanır (17).

#### 4.1.2.1. Semen Analizinde Spermatozoonların Mikroskopik İncelenmesi

Mikroskopik incelemede spermatozoon sayısı (konsantrasyon), hareketliliği (motilite), morfolojisi değerlendirilir ve aglütinasyon var ise derecelendirilir (27).

##### a) Konsantrasyon

Spermatozoon sayısı, direkt olarak semenin ince bir tabaka halinde lam-lamel arasında Makler, hemositometre, Thoma lamı ve Hoffman sayaçları kullanılarak incelenmesi ile belirlenir. Spermatozoon konsantrasyonu milyon/ml olarak değerlendirilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartlarına göre 20 milyon/ml ve daha fazla olması normal kabul edilmektedir (24).

##### b) Motilite

Spermatozoon sayımı yapılırken, spermatozoon hareketleri 4 sınıfa ayrılır:

- a) +4 hareketli spermatozoonlar; lineer bir şekilde ileri yönde hızlı hareket ederler.
- b) +3 hareketli spermatozoonlar; ileri yönde daha yavaş harekete sahiptirler.
- c) +2 hareketli spermatozoonlar; oldukları yerde hareket ederler.
- d) +1 hareketli spermatozoonlar da immotil şekilde durmaktalar.

Motilite hareketlilik anlamına gelmekte olup +4, +3 ve +2 hareketli spermatozoonların toplam oranıdır. Hızlı hareketli spermatozoon sayısı (PHSS) sadece +4 ve +3 hareketli spermatozoonların oranıdır (24).

##### c) Morfoloji

Bir spermatozoon hücresinin normal olarak kabul edilebilmesi için spermatozoon başı, boynu (orta parça) ve kuyruğu normal olmalıdır. Başın şekli oval olmalıdır. Başın boyu 4,0-5,0µm ve genişliği 2,5-3,5µm olmalıdır. Baş bölgesinin %40-70'ini kapsayan iyi tanımlanmış bir akrozomal bölge olmalıdır. Orta kısım ince uzun ve genişliği 1µm den az, boyu baş uzunluğunun 1,5 katı ve başa aksiyal olarak bağlanmış olmalıdır. Kuyruk düz,

düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve yaklaşık 45µm uzunlukta olmalıdır. Kruger kriterlerine göre %14 ve üzeri normal spermatozoon olmalıdır (24).

#### **d) Spermatozoon Parametreleri**

**Normospermi:** 1 ml semende spermatozoon sayısının 20 milyondan fazla olması.

**Oligospermi:** 1 ml semende spermatozoon sayısının 10-20 milyon arası olması.

**Polispermi:** 1 ml semende spermatozoon sayısının 20 milyondan çok fazla olması.

**Azospermi:** Tüm ejakülatta hiç spermatozoon bulunmaması.

**Aspermi:** Seminal plazma üretiminin olmaması.

**Nekrospermi:** Canlı spermatozoonların olmaması.

**Astenospermi:** Motilitenin düşük (%30'dan daha az) olmasıdır.

**Teratospermi:** Morfolojik olarak anormal spermatozoonların çoğunlukta olması.

**Lökositospermi:** Semende lökositlerin 1 milyon/ml'den daha fazla olması.

**Hiperspermi:** Semen hacminin 6 ml'den daha fazla olması.

**Hipospermi:** Semen 1 ml veya daha az olması.

**Globospermi:** Spermatozoonda akrozom yokluğu (24).

#### **4.1.2.2. Spermatozoon Morfolojisi, Motilitesi ve Konsantrasyonunun Klinik Önemi**

İnfertilitede eğer erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla spermatozoon parametrelerinde bir bozulma ile ortaya çıkar (27). Günümüzde erkeklerde semen özelliklerinin giderek azaldığı gözlenmektedir. Bunlar, konsantrasyon, motilite ve morfolojik bozuklukları kapsamaktadır (20).

Bu parametrelerden spermatozoon morfolojisi, erkeğin çocuk sahibi olabilme potansiyelini en iyi biçimde gösteren ölçütlerden biridir. Spermatozoon morfolojisi ile fertilizasyon potansiyeli arasındaki bağlantı birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (27). Spermatozoon morfolojik incelenmesi spermatogenez kalitesinin ve fertilitenin duyarlı bir göstergesi olduğu ortaya konulmuştur. Spermatozoonların Kruger kriterlerine göre değerlendirilmesinin en önemli avantajı morfolojik olarak normal değerlendirilen

spermatozoon oranı ile in vitro dölleme (IVF) başarısı arasında korelasyon bulunmasıdır. Kruger'e göre normal morfolojinin % 4'ten az olduğu durumlarda oosit başına fertilizasyon oranı % 7,6 iken % 4'ün üzerinde normal morfolojisi olan örneklerde fertilizasyon oranı % 63,9'a ulaşmaktadır (25). Anormal spermatozoon formları baş, ana parça ve kuyruk anomalilerini içerir (28). Kesin kriterlere göre normal morfolojinin <% 4 olduğu ve bunun da büyük kısmını baş anomalisinin oluşturduğu olgularda, intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) başarısı da düşük kalmaktadır. Böyle olgularda spermatozoonla ait kromozom anomalilerinin fertilizasyon bozukluğundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Özellikle amorf ve uzamış baş anomalisi taşıyan spermatozoonların yapısal kromozom anomali sıklığı da artmaktadır. Spermatozoonların genetik yapısındaki bozulma ile infertilite arasında kuvvetli bir birliktelik görülmektedir. Diğer yandan, spermatozoon DNA kalitesi bozulduğunda, IVF oranları düşse bile bu normal fertilizasyonu engellememektedir (29).

Morfolojisi bozuk spermatozoonlarda yüksek oranda sitoplazmik fazlalık bulunmaktadır. Bu sitoplazmik fazlalık, içerisinde reaktif oksijen türevleri (ROS) yapımına neden olan bol miktarda madde içerir. Semende yapılan ROS miktarı motil spermatozoon yüzdesi, semen volümü, oosit penetrasyonu ve fertilizasyon ile ters orantılıdır (29).

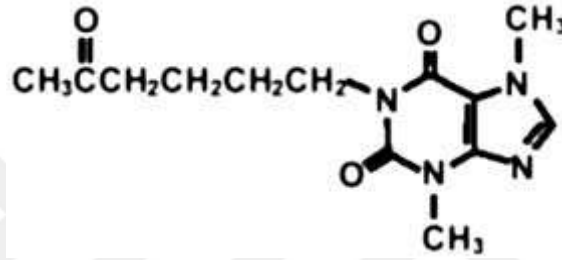
Akrozoma ait ana yapısal defektler spermatozoon penetrasyonunda karşılaşılan problemler olarak görülürken, akrozomun tamamen olmaması ise (globozoospermi) dölleme bozukluğuna sebep olmaktadır (25). Spermatozoon membran yapısında bulunan glikokaliks, glikokonjugatlardan oluşmaktadır. Spermatozoonların glikokonjugat içeriği, fizyolojik ve fertilite özelliklerini işaret eder, glikokaliks yapısındaki defekt erkek infertilitesine neden olabilir (11).

Spermatozoon fertilizasyon yeteneği için motilite kritik özelliktir (30). Spermatozoonun kuyruk kısmında oluşan anomaliler, spermatozoonun motilitesi üzerine olumsuz etki oluşturur. Semende lökosit artışı spermatozoon fonksiyonları ve motilitesinde bozucu etkiye sahiptir (27). Orta parça, mitokondrilerin olduğu önemli bir kısımdır. Buradaki anomaliler, enerji desteğinin noksanlığına neden olmaktadır. Bu durum motiliteyi direkt etkilemektedir (29).

Semendeki total spermatozoon sayısı ve spermatozoon konsantrasyonu, dölleme yeteneği, gebelik oluşumuna kadar geçen süre ve gebelik oranları ile ilişkilidir (4).

## 4.2. PENTOKSİFİLİN

Pentoksifilin, bir metilksantin bileşiği olup kafein ve teofilin ile aynı farmakolojik sınıfa aittir. Kafeine olan üstünlüğü yarı ömrünün daha uzun ve suda çözünürlüğünün daha fazla olmasıdır (1). Anti-enflamatuvar olan bu maddeler tedavi edici olarak kullanılmaktadır (31).



Şekil 7. Pentoksifilinin moleküler yapısı (32).

Pentoksifilin 20 yıldan daha uzun süredir çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Pentoksifilinin güçlü hemoreolojik özelliğinden dolayı son zamanlarda bazı bağışıklık (immün) hücrelerinin fonksiyonu ve sitokinlerin üretimi üzerine etkisi olduğu tespit edilmiştir. İnsan ve hayvan çalışmaları, pentoksifilin ile tedavinin farklı gruptaki insan hastalıklarının tedavisinde önemli olabilecek, hücresel seviyede çok çeşitli fizyolojik değişikliklere yol açtığını göstermiştir (33).

Pentoksifilin vazoaaktif ilaç olarak mikrodolaşım bozukluklarında kullanılmaktadır. Çalışmalar, pentoksifilinin cilt hastalıklarına geniş bir spektrumda etkili olabileceğini göstermiştir (34). Kardiovasküler hastalığı olan kişilerde sistemik tedavisi için kullanılmaktadır (32). Kalp yetmezliği standart tedavilerine pentoksifilin eklenmesinin yararlı etkilerinin olabileceği düşünülmektedir. Pentoksifilin, kanın akış özelliklerini iyileştirmeye çalıştığı düşünülen damar genişletici bir maddedir (35). Kan viskozitesini azaltır ve eritrosit esnekliğini artırarak periferik kan akımını artırır (1, 35). Pentoksifilin, aynı zamanda tümör nekroz faktör-alfa (TNF-alfa) gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin inhibitörüdür ve in vivo, in vitro insanda farklı hücre tiplerinde apoptozu inhibe eder.

Pentoksifilin damar genişletici, anti-enflamatuvar ve anti-apoptik özellikleri kalp yetmezliğinin tedavisi için kullanılmaktadır (35).

Pentoksifilin, immünmodülatör özelliğine sahiptir. Böylece periferik damar hastalıklarının tedavisinde önemli rol oynar (36). Bununla beraber pentoksifilin, alkolsüz karaciğer yağlanması tedavisi için de kullanılabilirliği düşünülmüştür (37) ve yine kan akışına yardımcı olduğundan dolayı, venöz bacak ülser tedavisinde kullanılmaktadır (38). Vitrin hastalığı da denilen kronik tıkaçıcı arter hastalıklarının tedavisinde de pentoksifilin kullanılmaktadır (39). Ayrıca pentoksifilin geniş spektrumda böbrek koruyucu etkisi vardır. Anti-proteinürik madde olarak pentoksifilin kullanımı bir bilimsel temel sağlar (40). Tümörlü ve normal dokularda, radyasyon reaksiyonlarının ilerlemesinde sitokinlerin rolü vardır. Bu nedenle tedavi edici oranları arttırmak amacıyla iyonize radyasyonla pentoksifilin kombine kullanılması önerilir (41).

Pentoksifilin spesifik olmayan fosfodiesteraz inhibitörüdür. Bilinen 7 tane fosfodiesteraz ailesi bulunmaktadır. Fosfodiesteraz 1 (PDE1) ve fosfodiesteraz 4 (PDE4)'ün insan spermatozoonunda bulunduğu gösterilmiştir. Tip 4 PDE ailesi cAMP-spesifiktir ve fosforilasyonla düzenlenir. Tip 1 PDE ailesi kalsiyum ve kalmodulin bağımlıdır ve siklik guanizin monofosfat (cGMP) için yüksek afiniteye sahiptir aynı zamanda cAMP'yi azaltır. Çünkü kalsiyum akımı akrozom reaksiyonunun başlaması için gereklidir. PDE1' in spermatozoon fonksiyonunda önemli bir modülatör olduğu düşünülmektedir (32, 42).

Bu gruba ait ajanların fosfodiesterazı inhibe ederek hücre içi cAMP düzeylerini arttırdığı bilinmekte ve bu yolla spermatozoon motilitesinde artışa neden olduğu savunulmaktadır (43). cAMP'nin motilite ve akrozom reaksiyonlarında düzenleyici (2.cil haberci) rolü bulunmaktadır (42,43). Bununla birlikte pentoksifilin testiste mikrosirkülasyonu artırarak spermatozoon parametreleri üzerinde olumlu etki yapması beklenmektedir (1).

### **4.3.ERKEK İNFERTİLİTESİNDE PENTOKSİFİLİN KULLANIMI**

İnfertilite, üreme fonksiyonunun yerine getirilememesi olarak tanımlanabilir. Genel olarak gebelikle ilgili herhangi bir korunma önlemi olmaksızın bir yıl düzenli ilişkiye rağmen çocukları olmayan çiftler için infertilite söz konusudur. İstatistiksel olarak, evli

çiftlerin %15'inde infertilite problemi bulunmaktadır. Çalışmalarda infertil çiftlerde sebebin; %30-35 kadar vakada sadece erkeğe, %25-30 oranında ise kadına ait olduğu anlaşılmıştır (28).

Erkek infertilitesi kendini çoğunlukla oligospermi (sayı azlığı), astenospermi (motilitede azalma) ve teratospermi (normal morfoloji yüzdesinde azalma) olarak gösterir (1). Astenospermi ve teratospermi çoğunlukla erkek infertilitesinden sorumlu olmasına rağmen tam anlamı ile anlaşılamamıştır. Erkek infertilitesinin sebebi halen pek çok bireyde belirsizliğini korumaktadır. Sayısız hasta idiyopatik erkek infertilitesinden muzdariptir. Son zamanlardaki gelişmeler, spermatozoonlarda görülen genetik anomalilerin erkek infertilitesinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. İskandinav ülkelerin 1970 yıllarının ortasındaki klasik tanımlamasına göre şiddetli astenosperminin sebebi, spermatozoonlarda moleküler mekanizmalarda rol oynayan dinein (ATPaz aktivitesi ile ilgili yapısal bir protein) protein eksikliğidir. Ayrıca kistik fibrozis, Y kromozomu uzun kolu üzerindeki mikrolezyonlar erkek infertilitesinden sorumlu olabilmektedir (44).

Spermatozoon patolojileri, rutin semen analizleri veya fonksiyonel testler ile belirlenememektedir. Bu testler, patolojilerin altında yatan sorunu açığa çıkaramamaktadır. Elektron mikroskobu, ışık mikroskobunun kısıtlı inceleme imkanına kıyasla daha iyi çözüm sunabilmektedir ve spermatozoon patolojileri ile ilgili çok iyi gözlem imkanı sağlamaktadır. Elektron mikroskobu incelemeleri, spermatozoon bileşenlerinin içyapısal ve konumsal organizasyonun detaylarını görünebilir kılmaktadır (44).

Şiddetli astenospermi çoğu kez flagellanın yapısal değişimine sebep olmaktadır ve %70 infertil erkekte motilite kaybının sebebinin oluşturmaktadır (44).

Erkek infertilitesinde gerek medikal gerekse cerrahi pek çok tedavi yöntemi denenmişse de günümüzde en etkin tedavi yöntemi yardımcı üreme tekniklerinin kullanımınıdır (1). 1978 yılında Louis Brown' nun doğumundan bu yana, 5 milyondan fazla bebek bu teknoloji ile dünyaya gelmiştir (45).

Spermatozoon motilitesi ve morfolojisi spontan gebelik oranlarını sağlamada önemli parametreler olarak tespit edilmiştir (25). Spermatozoonların hareketliliğini arttırmaya yönelik çeşitli farmakolojik ajanlar tanımlanmıştır. Spermatozoon hareketliliği üzerine pozitif etkisi kesin olarak saptanan tek siklik nükleotid, cAMP olup bu ajanların hemen hepsi hücre içi cAMP konsantrasyonunu arttırmaktadır. Bu ajanlar içinde en yaygın kullanım alanı pentoksifilindir (2).

Pentoksifilin yardımcı üreme tekniklerinde en yaygın kullanımı, in vitro spermatozoon motilitesinin uyarımı içindir. Yapılan çalışmaların çoğu in vitro kullanımda spermatozoon hareketlilik yüzdesinde belirgin artışlar olduğunu göstermektedir, fakat kullanım sonrası fertilizasyon ve gebelik oranlarına pozitif etkisi tartışmalıdır (1). Pentoksifilin gibi fosfodiesteraz inhibitörleri laboratuvarında semene eklendiğinde, hücre içi cAMP düzeyini, glikolizisi ve ATP yapımını arttırarak motil spermatozoon oranını yükseltmekte ve aynı zamanda canlı ama immotil spermatozoonlarda da motiliteyi başlatmaktadır (22,30). Pentoksifilin, lipid peroksidasyonunu arttırarak spermatozoonların membran akışkanlığını etkilemektedir (22). Uzun zamandır kullanılan pentoksifilin, akrozom reaksiyonu ve motilite gibi spermatozoon fonksiyonlarını uyarır (32,42). Aynı zamanda pentoksifilin, spermatozoonun zona pellisuda'ya bağlanmasını arttırır (45).

Androloji laboratuvarlarında pentoksifilin kullanımı, özellikle astenospermik olan hastalarda, hem dondurularak saklanmış hem de taze örneklerde spermatozoonların motilitesinin geliştirilmesiyle ilişkilidir (45).

Spermatozoon fonksiyonları ve erkek faktör infertilitesinin tedavi sonuçları üzerine pentoksifilin yararlı etkileri bazı çalışmalarda gösterilirken yine bazı diğer çalışmalar da pentoksifilin spermatozoon fonksiyon ve parametreleri üzerine zararlı etkileri olduğunu gösterilmiştir (1, 5, 9, 11). Bu farklılığının sebebinin çeşitli değerlerin farklılığından kaynaklanabildiği söylenebilir.

İmmotil silya sendromu, mikrotübüllerin hareket engelli ve üst solunum yolu problemlerine yol açmaktadır. Ayrıca üreme fonksiyonları da etkileneceğinden infertiliteye de neden olur. Bu sebeplerden pentoksifilin kullanımı ile spermatozoon hareketlerinin geri getirilebildiği savunulmaktadır (46).

Yardımcı üreme tekniklerinde en önemli hususlardan biri, çalışma sırasında aşırı serbest radikallerin üretimi sonucu spermatozoon örneklerinin oksidatif strese maruz kalmasıdır ve özellikle düşük seviyede antioksidana maruz kaldıklarında spermatozoonlar oksidatif hasara karşı hassaslaşırlar. Araştırmalarda, hücre membranı bileşenlerinde reaktif oksijen türlerinin etkisi gösterilmiştir. Spermatozoon uyarıcılarından pentoksifilin, reaktif oksijen temizleyicidir (11).



## **5. MATERİYAL VE YÖNTEM**

### **5.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI**

Normospermi olan semen örneklerinden elde edilen 25-55 yaş aralığındaki olgular çalışmaya dahil edildi. Bu çalışmada yer alan her erkek grubunun %50 motilite, 20 milyon üzeri sperm sayısı ve en az % 4 Kruger'e göre normal morfoloji görülen normospermik olarak değerlendirildi. Yaş, sigara kullanımı, meslek etkileri, ilaç kullanımı gibi özellikler dikkate alınmadı. Rutin morfolojik preparatlarda üçlü boyamaları kullandığımız taktirde çekirdek, akrozom ve boyun kuyruk kısmında bariz değişiklikleri belirleyebilmekteyiz. Ayrıca rutin tedavilerde spermiyogram testi haricinde aşılama ve mikroenjeksiyon uygulamalarına hazırlanan spermelerde morfoloji değerlendirilmemektedir. Ancak çalışmamızda dahil edilen her örneğin bazal değerleri dikkate alındı. Farklı maruziyet sürelerinde (5 ve 60 dk) pentoksifilin uygulanan örnekler, rutenyum kırmızısı uygulanarak TEM'de takip edildi. Pentoksifilin uygulanmayan kontrol grubu örnekleri de aynı işlemlere tabi tutuldu.

### **5.2 SEMEN TOPLANMASI VE ANALİZİ**

Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle kliniğe gelen hastalardan, hastanın adının, soyadının yazılı olduğu steril kaplara, mastürbasyon yöntemi ile alındı. Semen alındığı saat not edildi. Oda ısısında yarım saat likefiye olması için bekletildi. Turnusol kağıdı ile pH (7,2-8,0) değerlendirmesi yapıldı. Cinsel perhiz süresi, vizkosite (normal), hacim (2-6ml), renk (opak) ve hastaya özel likefaksiyon zamanı (30 dk) kaydedildi. Mililitredeki spermatozoon sayısını belirlemek üzere, Makler sayma kamarasına küçük bir damla semen örneği konuldu. Toplam spermatozoon sayısı ve progresif hareketli, immotil spermatozoon sayısı ile motilite değerlendirme yapıldı (21).

Spermatozoon konsantrasyonu, motilite ve morfolojisi için standart manuel teknikler uygulandı. Motilite ve konsantrasyon ışık mikroskopunda X20 büyütmede WHO (World

Health Organization) kriterlerine göre en az 100 spermatozoon sayılarak yapıldı. Makler sayma kamarasına 10µl semen koyularak ve X20 büyütme altında 10 kare sayılarak konsantrasyon ve motilite belirlendi (21).

Morfolojik değerlendirme için bir lama bir damla semen örneğinden damlatıldı. Damlatılan semenin miktarı spermatozoon sayısına bağlı olarak ayarlandı. İkinci bir lam aracılığı ile bu damla slayt üzerine yayılıp hava ile kurutuldu. İstenilen boyama, Spermac boyama (Ferti Pro NV, Industriepark Noord, Belçika) yöntemi ile boyandı.

Lam üzerine yayılıp kurutulan preparatlar, fiksatif solüsyonunda 10 dk bekletildi. Fiksatif su ile arandıktan sonra suyu süzülerek A,B,C (Ferti Pro NV, Industriepark Noord., Belçika) solüsyonlarından 1,5 dk olacak şekilde sırayla boyama işlemi yapıldı. Kuruması için beklendi. İmmersiyon yağı kullanılarak x100 büyütmede incelendi. Morfoloji değerlendirmesi yaparken 100 spermatozoon dikkate alındı. Her anomali ayrı ayrı not edildi.

### **5.3. PENTOKSİFİLİN UYGULAMA PROTOKOLÜ**

Tüm sistem bileşenleri ve örnek oda sıcaklığına ya da 37°C'ye getirildi. Steril santrifüj tüpüne silika density solüsyonu ile gradient hazırlandı. Üzerine 2 ml likefiye olmuş spermatozoon eklenerek 350-400 g'de 15-20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında gözle görülür pellet yok ise prosedüre 5 dk'lık ikinci santrifüj ile devam edildi. Spermatozoon yıkama medyumunda pentoksifilin ile (1 mg/ml) stok solüsyon hazırlandı. Süpernatant atılıp süspansiyon edilen pellete 1 ml stok pentoksifilin eklendi. Son konsantrasyonun 1,76 mM olması sağlandı. 37°C'de 5 ve 60 dk'lık inkübasyon sonrasında 300 g'de 8-10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellete 4 ml spermatozoon yıkama medyumu eklendi. 300 g'de tekrar 8-10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak üzerine uygun medyum eklendi.

### **5.4. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) PROTOKOLÜ**

Fosfat tampon ile hazırlanmış % 2,5 glutaraldehit ile 2 saat fikse edilen spermatozoon hücreleri fosfat tampon (PBS) ile yıkandıktan sonra 4:1 oranında % 1'lik

osmiyum tetroksit (OsO<sub>4</sub>) karışımı: rutenyum kırmızısı ile 1 saat süresince post-fikse edildi. PBS ile yıkanan hücreler 1 saat boyunca 4:1 oranında distile su ile hazırlanmış %2'lik uranil asetat: rutenyum kırmızısı içinde bekletilerek boyanmaları sağlandı.

Yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek suyu alınmış, propilen oksitten geçirildi. Propilen oksit + Epon (1:1) karışımında 20 dakika, propilen oksit + Epon (1:2) karışımında 1 gece ve Epon da 3 saat muamele edildi. Epona gömülen örnekler, 60 °C'lik etüvde 24 saat bekletildi. Ultramikrotomda (Reichert, Supernova ultramicrotome) cam elmas bıçakla alınan yarı ince kesitler (1 µm) toluidin mavisi ile boyandı. Yarı ince kesitlerin bölgeleri belirlendikten sonra bakır gridler üzerine alınan yaklaşık 60 nm kalınlığındaki ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. İnce kesitler, JEOL 1011 TEM ile incelenip fotoğraflandı.

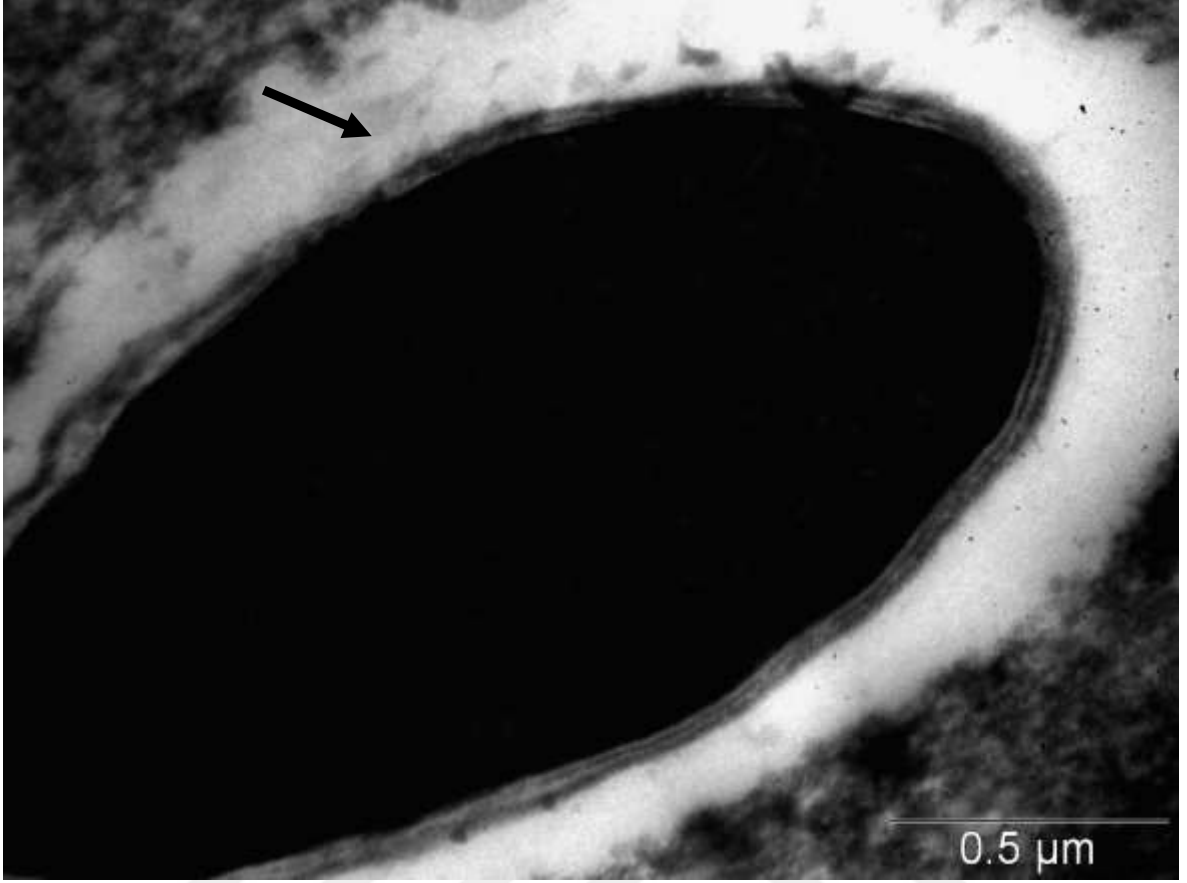
## **6. BULGULAR**

Çalışmamızda 20 gönüllüden alınmış olan normospermi semen örnekleri değerlendirmeye alındı. Bu gruba ait spermatozoonlar pentoksifilin uygulanmayan kontrol örneklerin (n=6) ve farklı maruziyet sürelerinde 5 dk (n=7) ve 60 dk (n=7) pentoksifilin uygulanan örneklerin ince yapısal özelliklerini incelemek amacıyla TEM'de değerlendirildi.

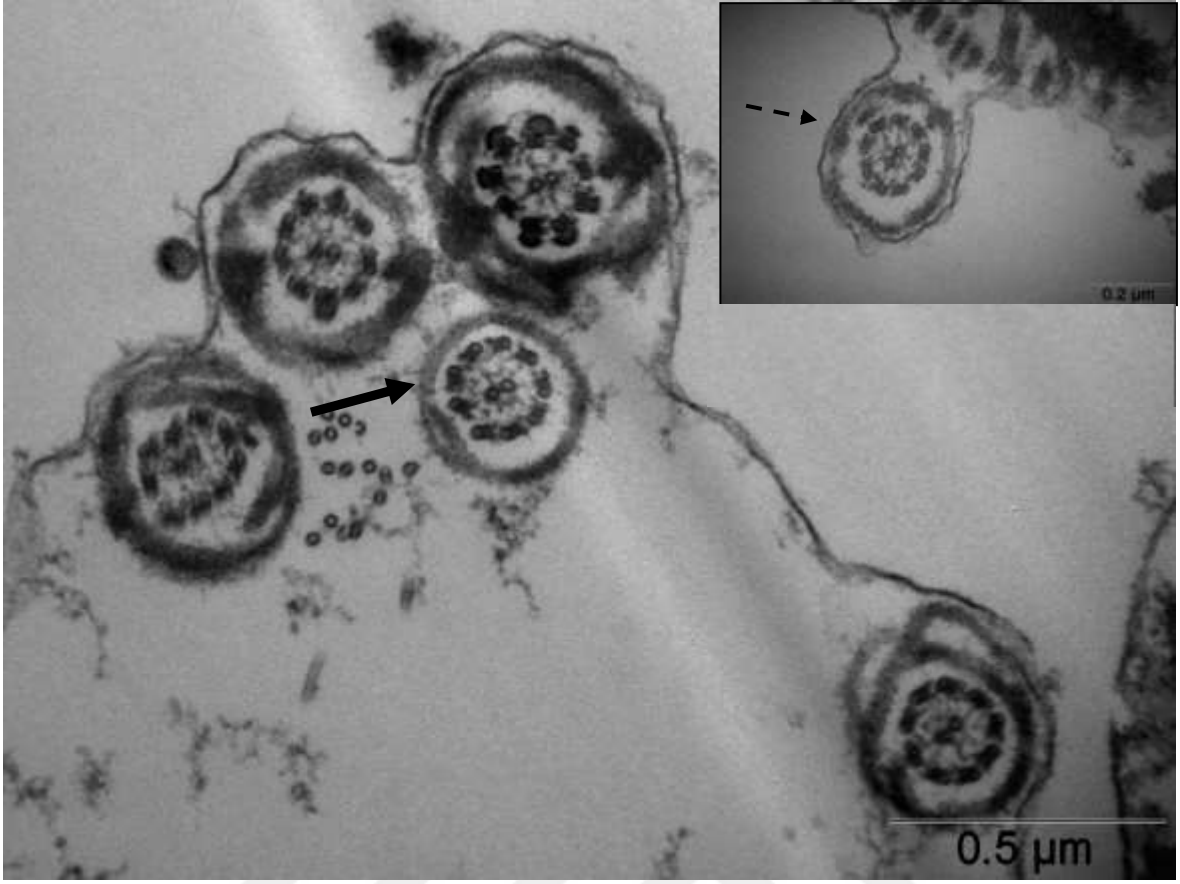
### **6.1. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) BULGULARI**

#### **6.1.1. Normospermi Deney Grubunun TEM Bulguları**

TEM çalışmamızda normosperminin pentoksifiline maruz kalmamış kontrol grupları ve pentoksifiline maruziyet süreleri 5-60 dk olan örnekler incelendi. Bu örneklerimiz spermatozoonda baş ve kuyruk olmak üzere 2 kısmı değerlendirildi. Normospermi kontrol grubunda, spermatozoonların baş kısmındaki nükleusun ve plazma membranının korunmuş olduğu (Resim 1) görüldü. Normospermi kontrol grubundaki örneklerimizin, orta parçasında yer alan 9+2 aksonem ve fibröz örtü yapısının bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi (Resim 2-3).

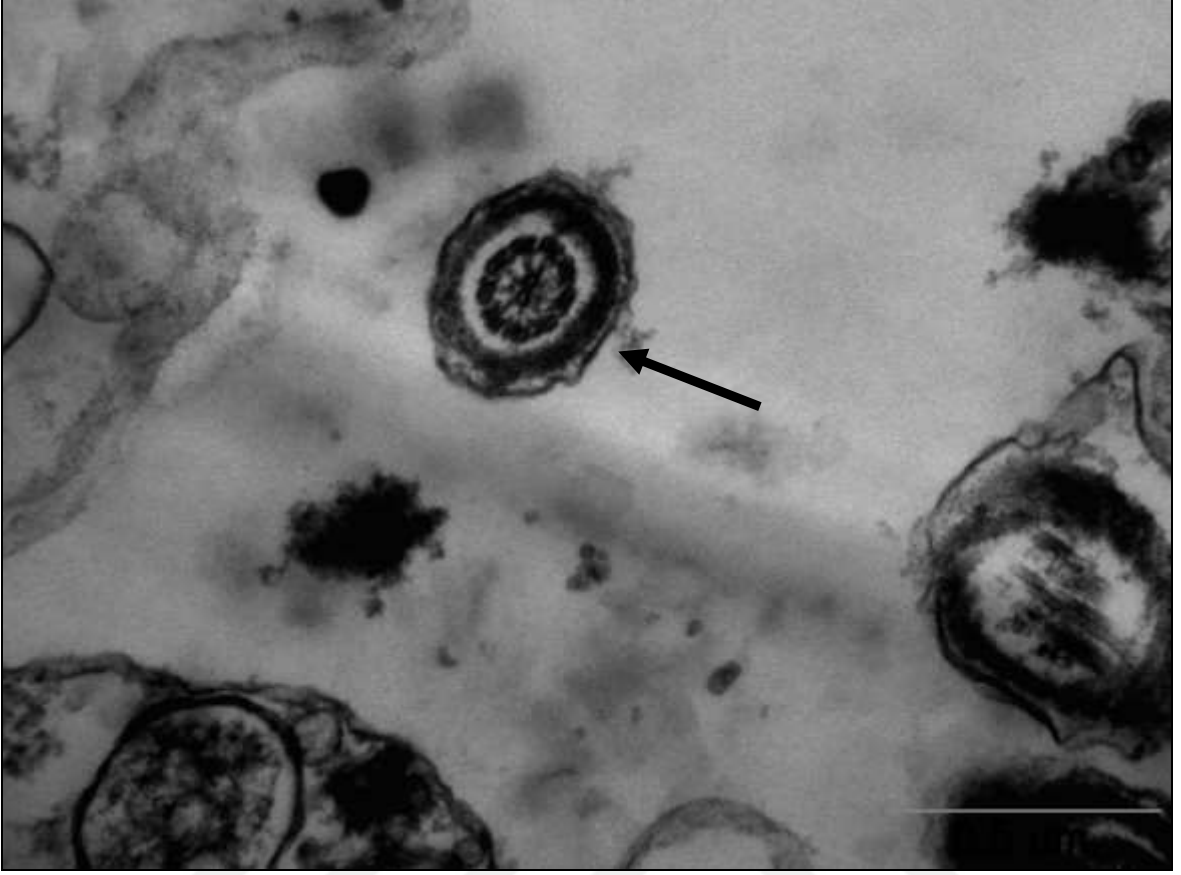


**Resim 1.** Normospermi grubunda; plazma membranı ve nükleus bütünlüğü korunmuş normal spermatozoon baş görüntüsü ( —→). Büyütme: X60000.



**Resim 2.** Normospermi grubunda; flagella'nın esas parçasında normal fibröz örtü ve düzgün aksonem yapısı (—→), flagellada düzgün aksonem yapısı (- -→).

Büyütme: X60000, İnet Büyütme: X120000.



**Resim 3.** Normospermi grubunda; flagella'nın esas parçasında normal fibröz örtü ve düzgün aksonem yapısı (→). Büyütme:X60000.

### **6.1.2. Pentoksifiline 5 dk Maruz Kalmış Deney Grubunun TEM Bulguları**

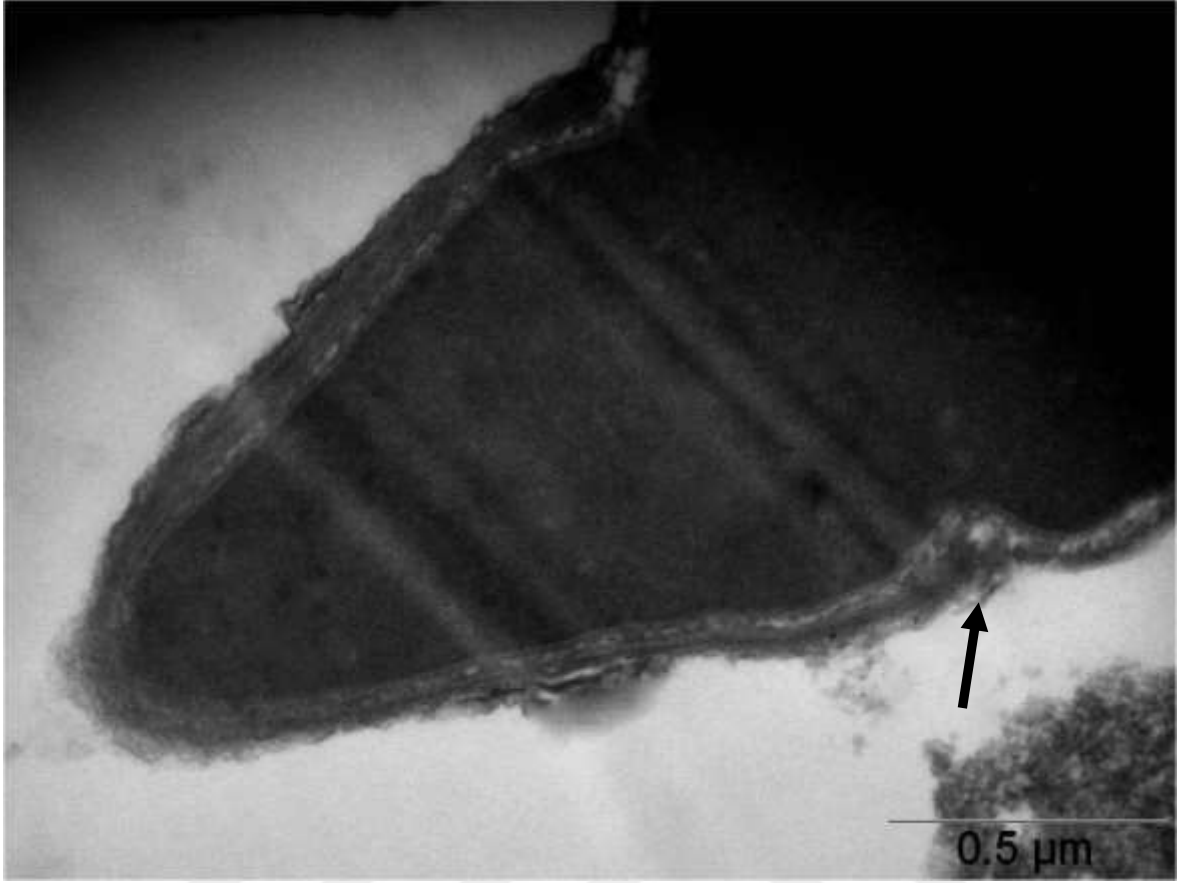
Pentoksifiline 5 dk maruz kalmış gruptaki spermatozoonların baş kısmının plazma membran yapısının (glikokaliks) normale yakın bir korunma olduğu (Resim 4-5 ) vakuollü ve granüllü bir kromatin yapısına sahip olduğu (Resim 4-7 ) görüldü. Bunun yanı sıra bazı örneklerde elonge başlı spermatozoonların olduğu gözlemlendi (Resim 6). Bu grup spermatozoonların kuyruk kısmının orta parçasında, motilitede önemli rol oynayan 9+2 aksonem yapısındaki merkezi çiftin ve fibröz örtünün düzgün olduğu ve belirgin olan neksin bağların olduğu görüldü (Resim 8-9-10 ).



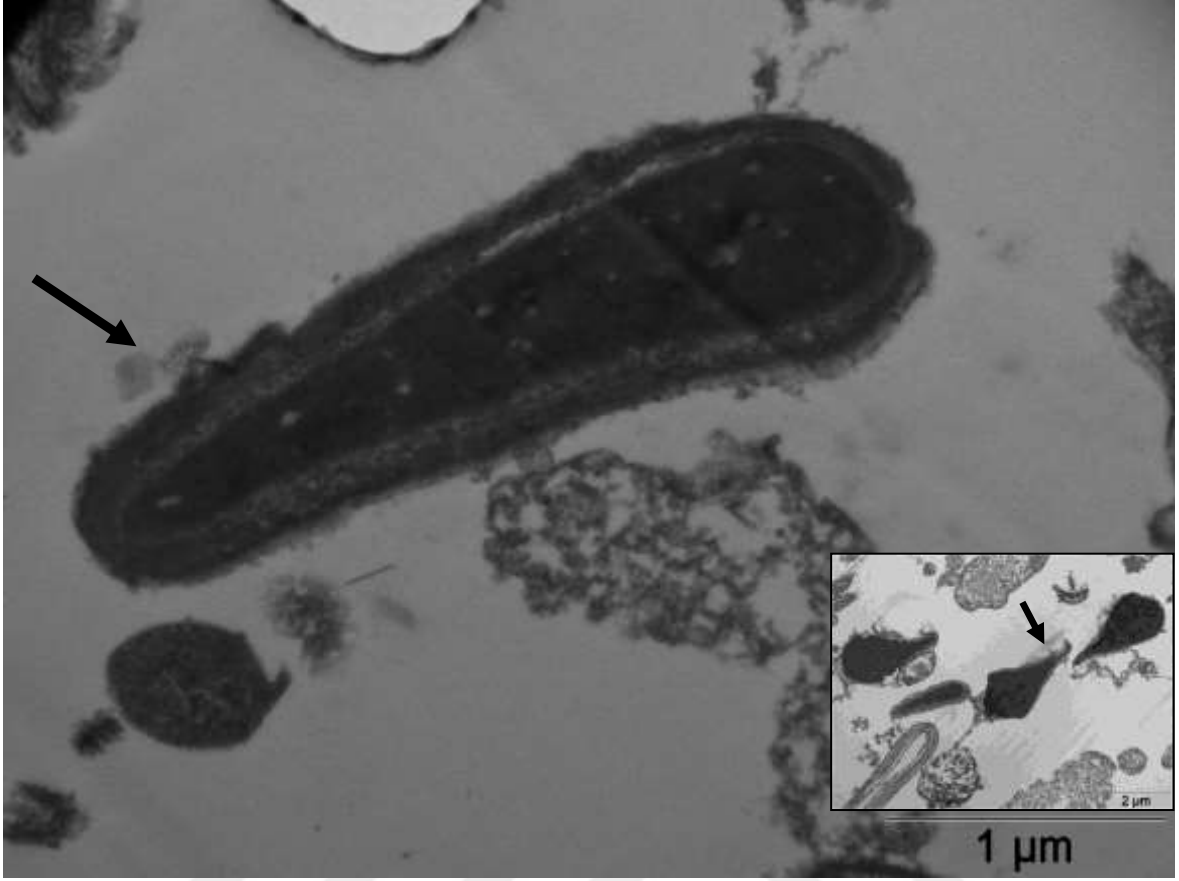
**Resim 4.** Pentoksifiline 5 dk maruz kalan grupta; spermatozoon başı membran yapısında yer yer bozulmalar (→) ve kromatinde granüler yapı görüntüsü (- -▶).

Büyütme: X30000.

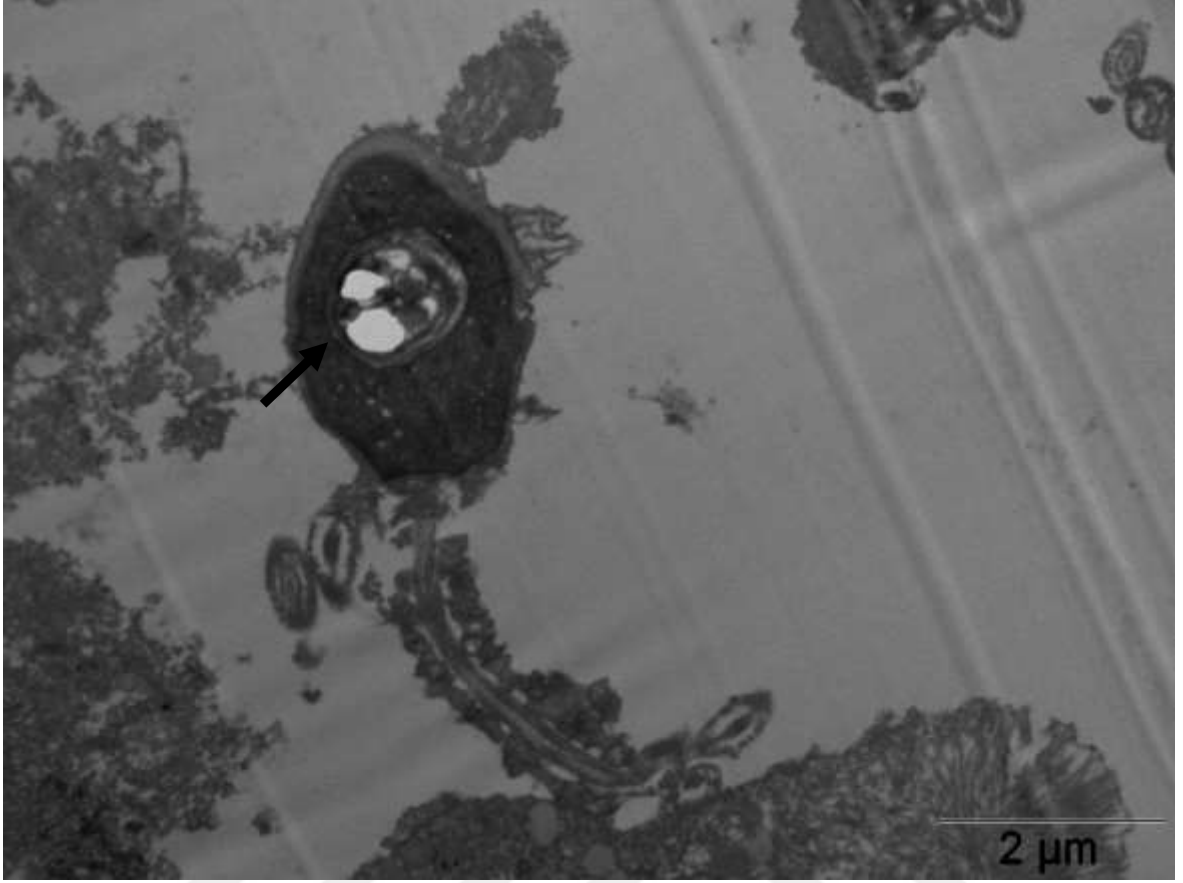




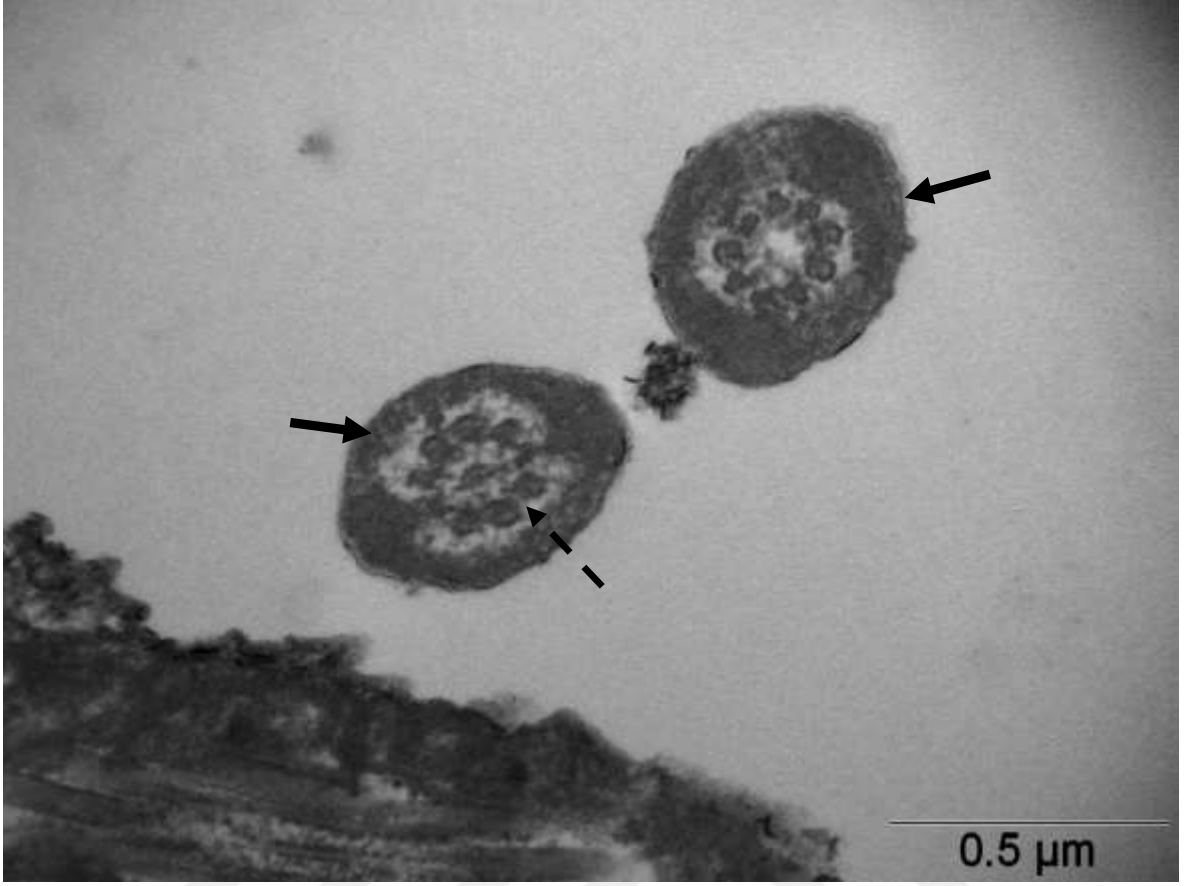
**Resim 5.** Pentoksifiline 5 dk maruz kalan grupta; spermatozoon başı membran yapısında yer yer bozulmalar (→). Büyütme: X60000.



**Resim 6.** Pentoksifiline 5 dk maruz kalmış grupta; spermatozoonda elonge baş (→). Büyütme: X30000, İnet Büyütme: X12000.



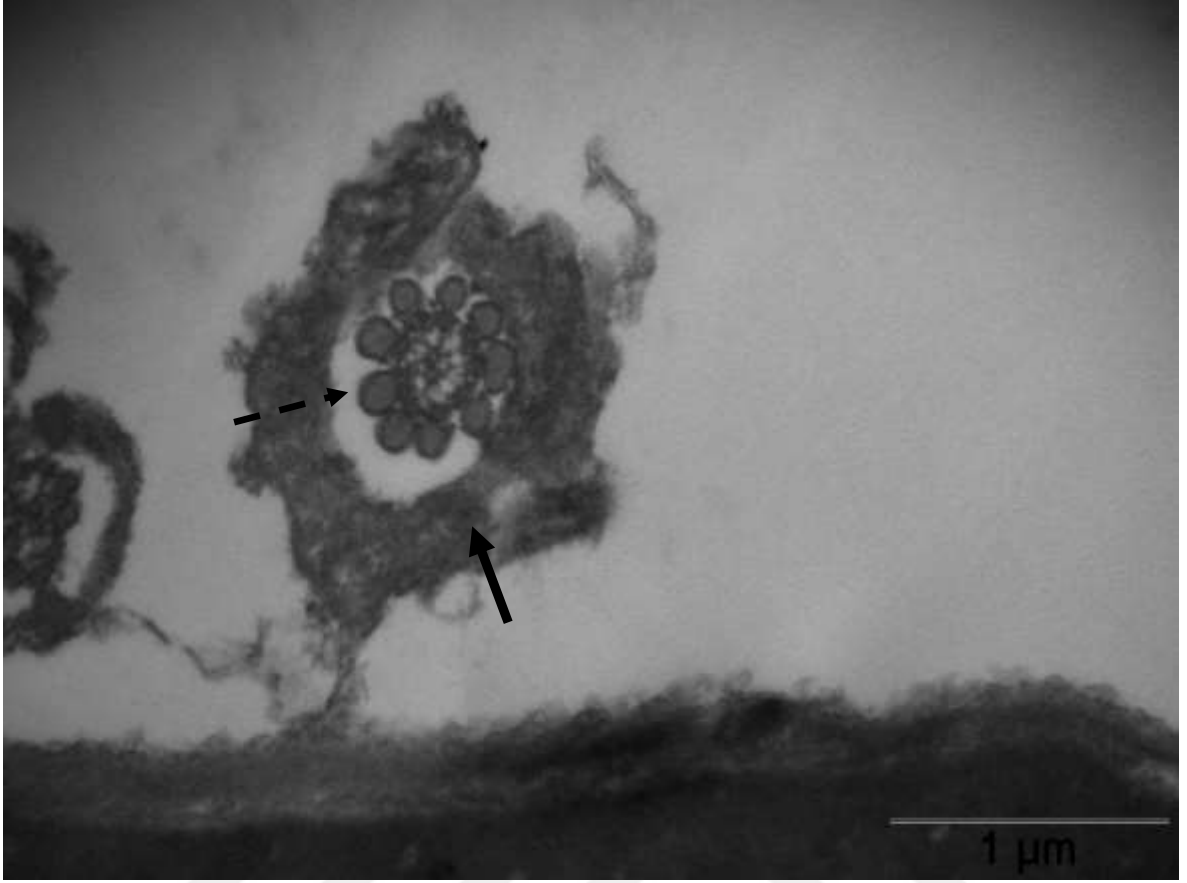
**Resim 7.** Pentoksifiline 5 dk maruz kalan grupta; spermatozoon başı kromatinde şiddetli vakuoler bozukluk ( →) Büyütme: X12000.



**Resim 8.** Pentoksifiline 5 dk maruz kalan grupta; bütün bir spermatozoonda düzgün fibröz örtü ( —→ ) ve aksonem yapısı ( - -→)Büyütme: X60000.



**Resim 9.** Pentoksifiline 5 dk maruz kalan grupta; bütün bir spermatozoonda düzgün fibröz örtü ( → ). Büyütme: X60000.

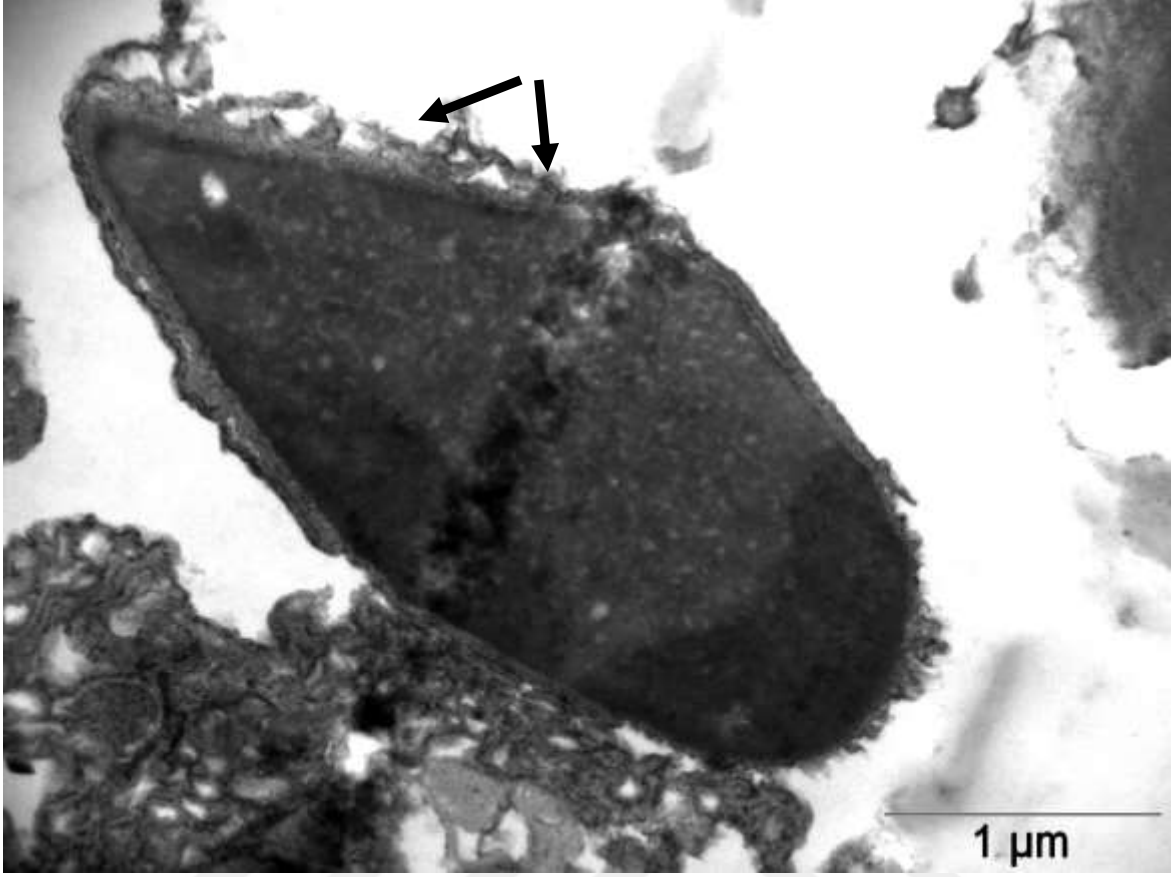


**Resim 10.** Pentoksifiline 5 dk maruz kalan grupta; bütün bir spermatozoonda fibröz örtü (→) ve belirgin bir aksonem yapısı (- ->). Büyütme: X30000.

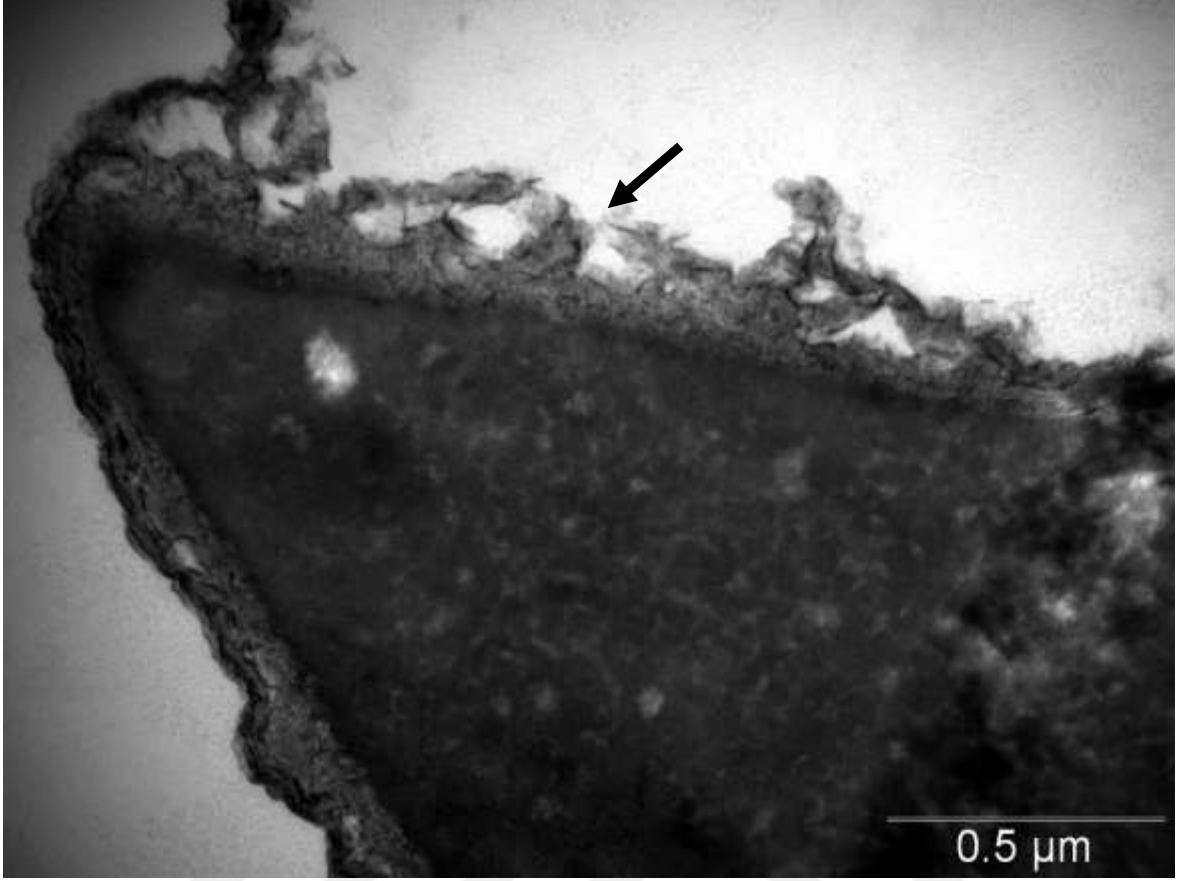


### 6.1.3. Pentoksifiline 60 dk Maruz Kalmış Deney Grubunun TEM Bulguları

Pentoksifiline 60 dk maruz kalmış gruptaki spermatozoonların baş kısmının plazma membran yapısının bozulduğu (Resim 11-12-13-14-16-17) vakuollü ve granüllü bir kromatin yapısına sahip olduğu (Resim 13-14-16) görüldü. Bu grup spermatozoonların kuyruk kısmının orta parçasında mitokondriyon dağılımının düzensizliği, dağılmış bir fibröz örtüsünün bulunması, motilitede önemli rol oynayan (9+2) aksonem yapısındaki yarı çiftin yer almadığı görüldü (Resim 15).

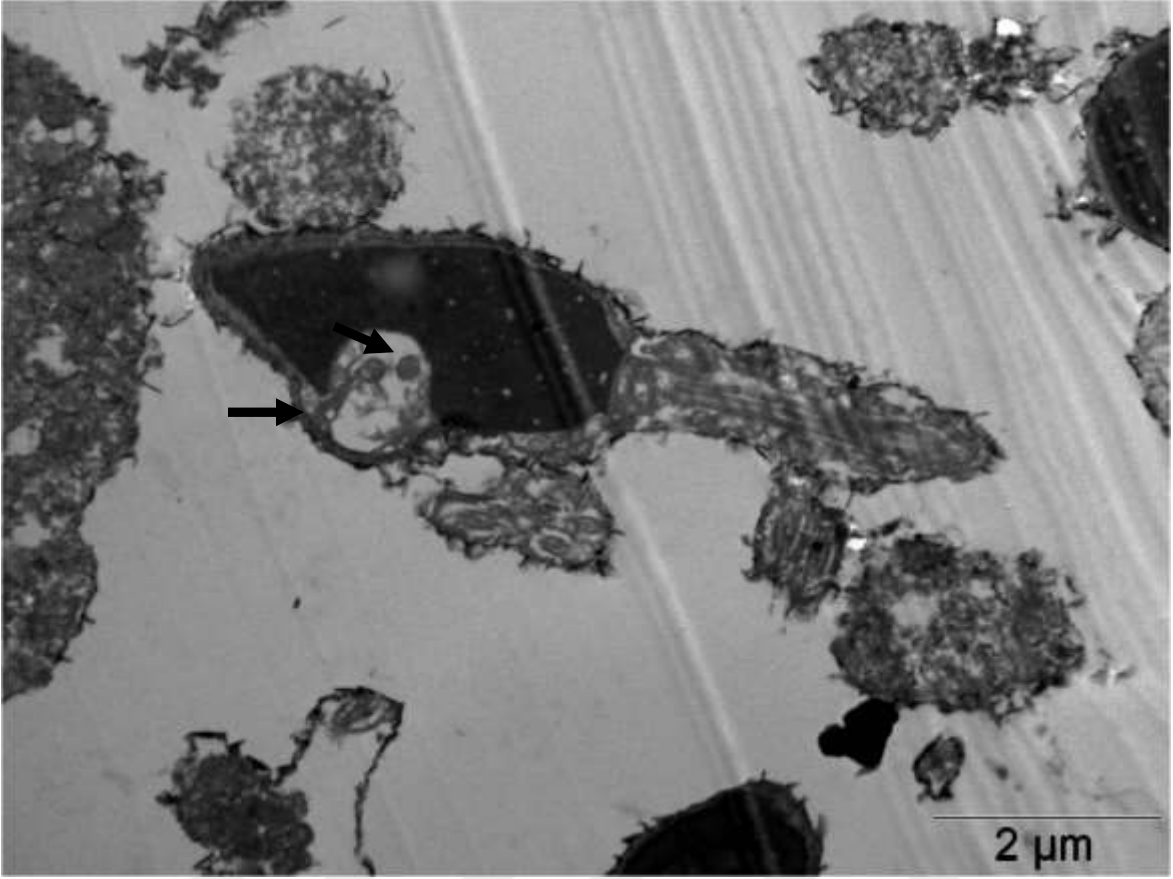


**Resim 11.** Pentoksifiline 60 dk maruz kalan grupta; spermatozoon baş kısmındaki membran yapısında yer yer bozulmalar (→). Büyütme: X30000.

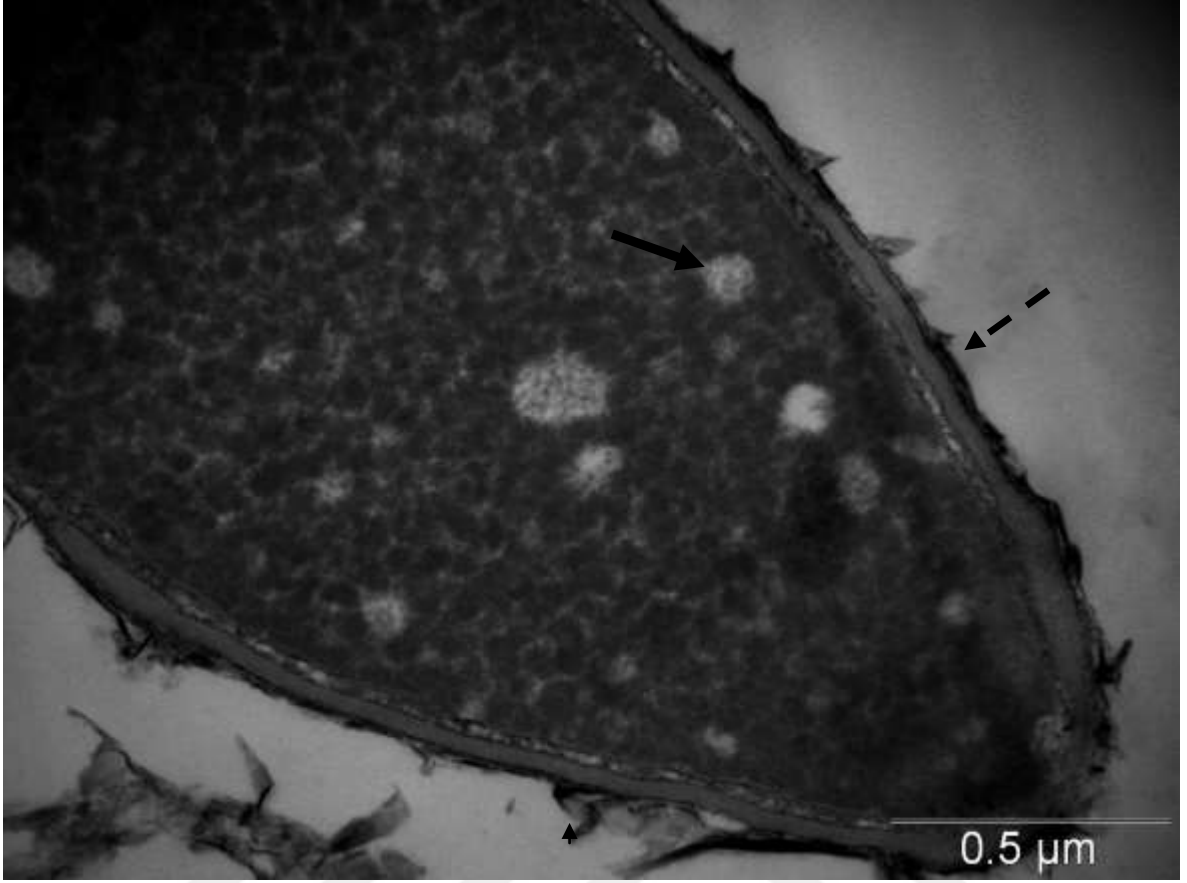


**Resim 12.** Pentoksifiline 60 dk maruz kalan grupta; spermatozoon baş kısmındaki membran yapısında yer yer bozulmalar (→). Büyütme: X60000.

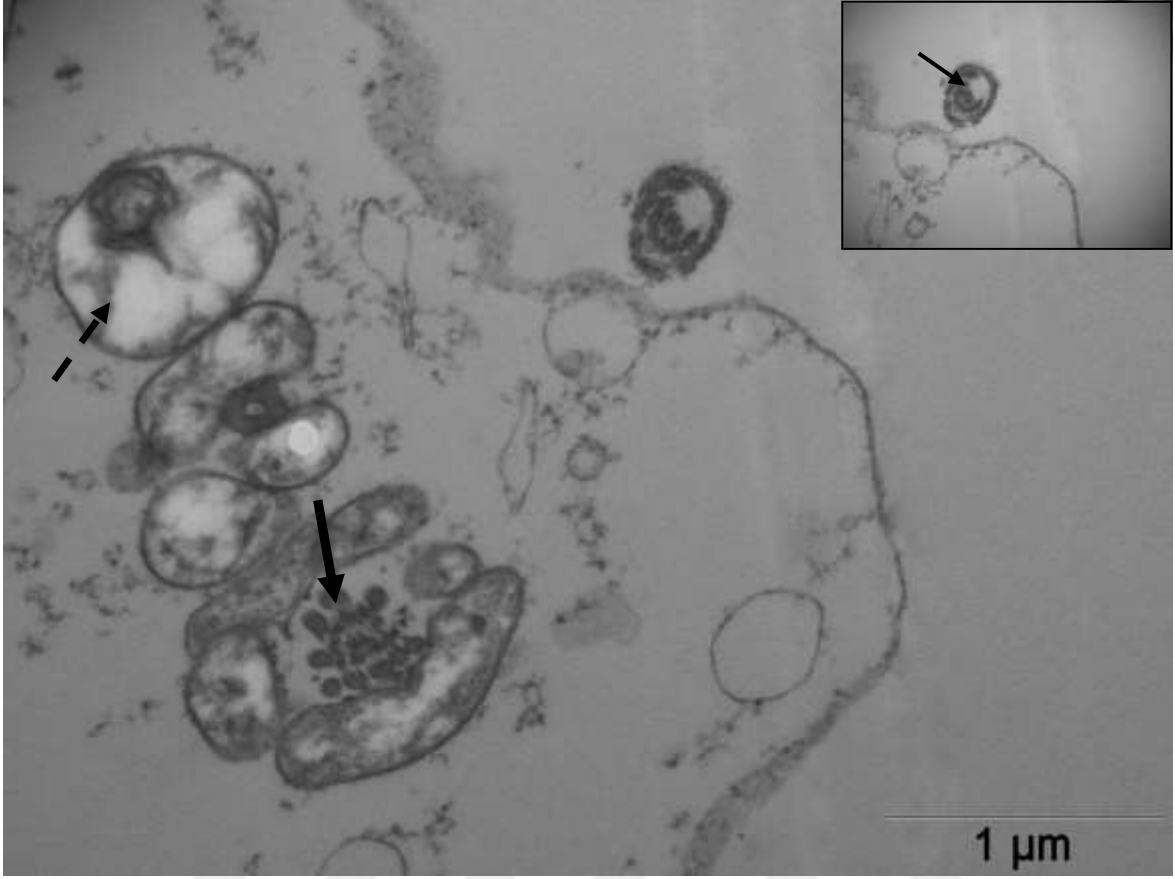




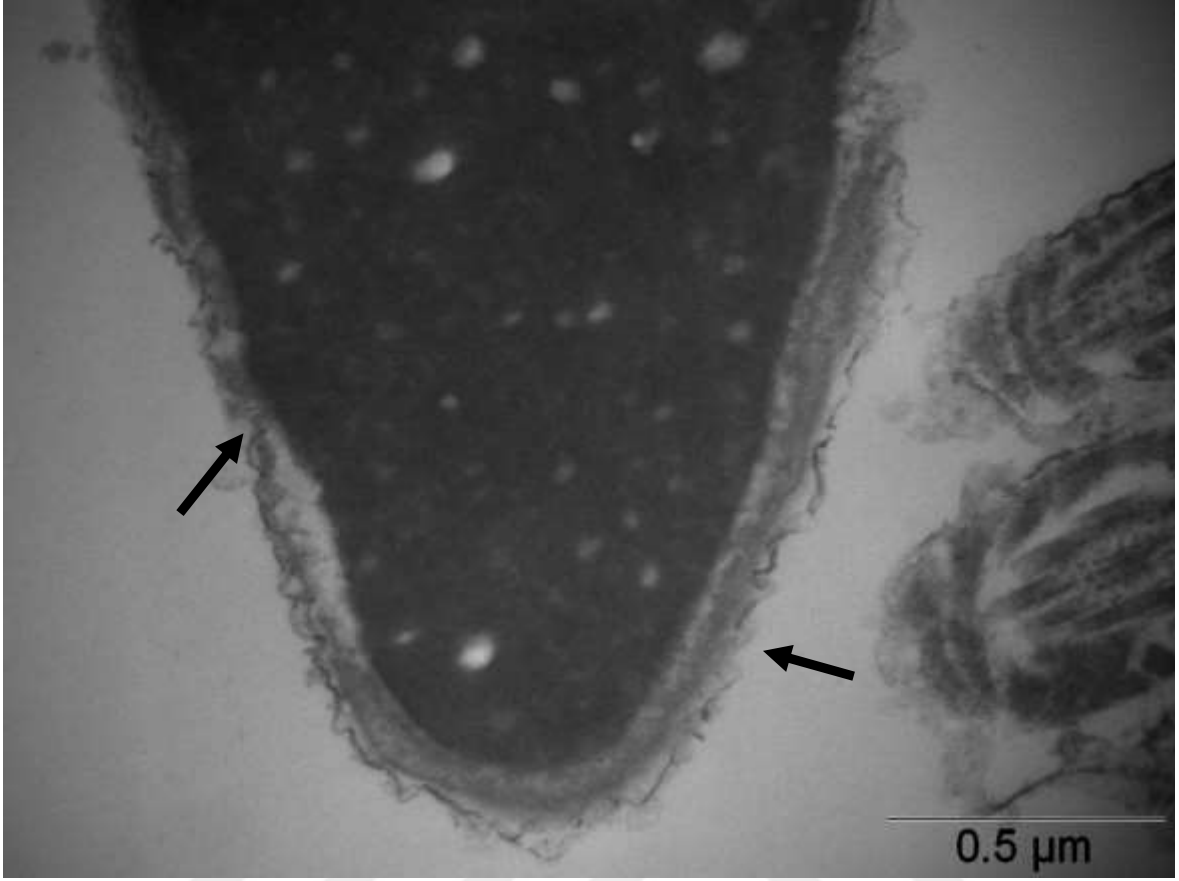
**Resim 13.** Pentoksifiline 60 dk maruz kalan grupta; spermatozoon baş kısmında aşırı vakuolleşme ve membran yapısının bütünlüğünde bozulmalar ( → ). Büyütme: X12000



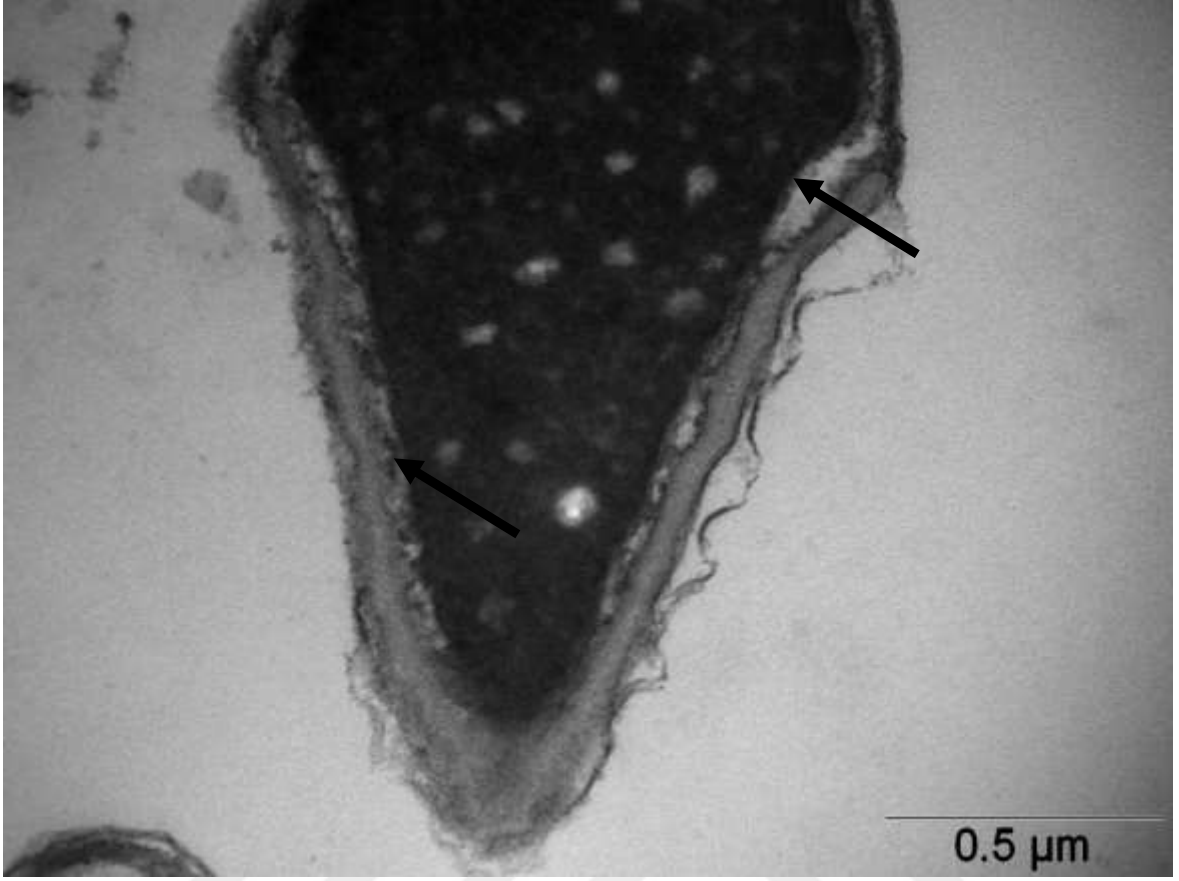
**Resim 14.** Pentoksifiline 60 dk maruz kalan grupta; spermatozoon başındaki kromatinde şiddetli vakuoler bozukluk ( —→), granüler kromatin, normalden farklı plazma membranı görüntüsü(- →). Büyütme: X60000.



**Resim 15.** Pentoksifiline 60 dk maruz kalan grupta; spermatozoonun aksonem yapısındaki (9+2) bütünlüğünün bozulması ( —→ ) ve mitokondriyumlardaki vakuolleşmenin varlığı ( - → ). Büyütme: X30000, İnet Büyütme: X60000.



**Resim 16.** Pentoksifiline 60 dk maruz kalan grupta; spermatozoon başındaki kromatinde şiddetli granüler kromatin, normalden farklı plazma membranının glikokaliks yapısında bozulmaların görüntüsü (→). Büyütme: X60000.



**Resim 17.** Pentoksifiline 60 dk maruz kalan grupta; plazma membranda meydana gelen bozulmalar ( → ). Büyütme: X60000.

## 7. TARTIŞMA

İnfertilite, en az bir yıl korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalınmaması durumu olarak tanımlanır. Genelde gebeliğin başarısızlığı, dişi bireyden kaynaklanan faktörlere bağlı olduğu düşünölmekle birlikte aslında, erkek genital fonksiyonunun da en az %50 oranında etkili olduğu görölmektedir (47).

Son zamanlarda, pentoksifilin spermatozoon fonksiyonlarını geliştirici rolü dikkate değeri olarak kabul edilmiştir (5). Yaygın olarak IVF laboratuvarlarında motilite arttırıcı olarak kullanılan pentoksifilin spermatozoon morfolojisi üzerine etkisini araştırmak amacıyla bu çalışmayı gerçekleştirdik.

Spermatozoonun fertilitite kapasitesinin morfolojik inceleme ile etkin bir indeks olarak değerlendirilmesi, 1951 yıllarına kadar uzanır. Kruger ve arkadaşları tarafından Strict kriterler ile morfoloji değerlendirilmesinin tanımlanmasıyla bu parametre giderek artan bir önem kazanmıştır. Bu yöntem ilk kez 1986 yılında yayınlanmış ve 1990 yılında Menkveld ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir. Kısa süre içerisinde rutin incelemede yerini alan bu yöntemin, WHO kriterlerine göre morfoloji değerlendirilmesi yöntemine olan üstünlüğü de gösterilmiştir. Morfolojinin IVF' teki gebelik oranları üzerine prediktif etkisi olduğu ve diğeri spermatozoon parametrelerine olan üstünlüğü bildirilmiştir (1, 25, 27).

Spermatozoon membran yapısında bulunan glikokaliks; glikoprotein, glikolipit, proteoglikan gibi glikokonjugatlardan oluşmaktadır. Memelilerde, testiköler germ hücrelerinin glikoproteinleri, spermatozoon farklılaşması ve spermatogenezde Sertoli hücreleriyle etkileşim de önemli rol oynarlar. Glikokaliks aynı zamanda, dişi immün sistemine karşı spermatozoon korunmasında, akrozom reaksiyonlarında ve spermatozoonun oositi dölleme yeteneğinde önemli rol oynar. Erkek infertilitesinin bazı durumları spermatozoon yüzeyindeki glikokonjugatların değerişikliği sonucu olabilir (11).

Pentoksifilin uygulama sonrası spermatozoon morfolojisinde baş kısmı; akrozom, nükleer kısım ve membran yapısı, boyun kısmı, kuyruk kısmı olmak üzere spermatozoon ince yapısı TEM'de ayrıntılı şekilde incelendi. Elektron mikroskobunda spermatozoon ince yapısını inceleyen bu araştırmamızda karşılaştırma yapabilmek için daha önceden yapılmış yeterli sayıda çalışma bulamadık.

Pentoksifilin ile spermatozoon plazma membran bütünlüğünün korunabildiği ama pentoksifilin uzun süre uygulandığında (90 dakika gibi) toksik olduğu ve spermatozoon canlılığında azalmaya yol açabildiği ileri sürülmüştür. Yapılan çalışmada pentoksifilinin spermatozoon glikokonjugatlarının dağılımını değiştirmedeği, spermatozoon kapasitasyon indüklenmesi ve akrozom reaksiyonları üzerine olumsuz etkisinin olmadığı gösterilmiştir (11).

Çalışmamızda 5 dk pentoksifiline maruz kalmış gruptaki spermatozoonların baş kısmındaki plazma membran yapısının (glikokaliks) normale yakın bir korunma olduğu vakuollü ve granüllü bir kromatin yapısına sahip olduğu gözlemlendi. Bunun yanı sıra bazı örneklerde elonge başlı spermatozoonların olduğu gözlemlendi. Pentoksifiline 60 dk maruz kalmış gruptaki spermatozoonların baş kısmının plazma membran yapısının bozulduğu, vakuollü ve granüllü bir kromatin yapısına sahip olduğu gözlemlendi.

Pentoksifilin güçlü antioksidandır. Hücre seviyesinde oksidatif stresi azaltır. Safarinejat çalışmasında seminal plazma antioksidan kapasitesi üzerine pentoksifilinin yararlı etkisini, seminal plazma katalaz-benzer ve SOD-benzer aktivitesinin artışı ile belgelemiştir (5).

Pentoksifilinin erken embriyo gelişimi üzerine etkisi bilinmemekle birlikte; cAMP oranındaki artışın oosit maturasyonu üzerine olumsuz etkisi olduğu bilinmektedir (2). Terriou P. ve ark.'nın yaptığı çalışmada; semen parametreleri ve spermatozoon fonksiyonları üzerine pentoksifilinin yararlı etkisi gösterilemezken (48), varikoselli hastalar üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise pentoksifilinin yararlı etkisi gösterilmiştir (49).

24 haftalık oral pentoksifilin tedavisi ile semen parametrelerinin (motilite, morfoloji, konsantrasyon ve akrozom reaksiyonları) önemli derecede arttığı belirlenmiştir (5). Motilite uyarıcıların dondurulmuş-çözülmüş köpek semeni üzerine yapılan çalışmada motiliteyi arttırdığı için kullanılabilirdiği gösterilmiştir (3). Başka çalışmalarda da pentoksifilinin motiliteyi arttırdığı rapor edilmiştir (50, 51, 52), fakat bazı çalışmalarda kullanım sonrası fertilizasyon ve gebelik oranlarına pozitif etkisinin tartışmalı olduğu rapor edilmiştir (53, 54, 55).

Mangoli V. ve ark.'nın yapmış olduğu bir çalışmada, pentoksifiline ve hipoosmatik testle (HOS) seçilen canlı spermatozoonların karşılaştırılmasına göre, pentoksifilinli

seçilen spermatozoonların daha yüksek fertilizasyon ve doğum oranlarının olduğu gösterilmiştir (7).

Hattori H.ve ark. kartagener sendromlu kişiler üzerinde yaptıkları çalışmada, elektron mikroskobu bulgularında neredeyse tüm spermatozoonların anormal morfoloji göstermesine rağmen normal morfolojili birkaç spermatozoonun pentoksifiline pozitif tepki gösterdiğini rapor etmişlerdir (56).

Yapılan çalışmalarda astenospermi örneklerde progresif motil spermatozoon sayısı ve motilite artışı önemli bulunmuş ancak normospermilerde etki bulunamamıştır (6, 9). Domuz spermatozoonlarıyla yapılan bir çalışmada, pentoksifilin donma sırasında kullanılması ile motilite ve canlılık parametrelerini (akrozom bütünlüğü ve akrozom reaksiyonu), fertilizasyon oranlarını ve fertilizasyon verimliliğini azalttığı gösterilmiştir. Çözme sırasında pentoksifilin uygulanması durumunda motilite ve vitalite özelliklerinde, akrozom bütünlüğünde ve fertilizasyon kalitesinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir, sadece oosit fertilizasyonu artmıştır. Ayrıca her iki grupta da yüksek konsantrasyonda akrozom reaksiyonunun arttığı rapor edilmiştir (10).

İmmotil testiküler spermatozoon olan örneklerde pentoksifilin uygulanması sonrası (30, 60, 90 dk) spermatozoon motilitesi önemli ölçüde artmıştır (57).

Çalışmamızda, 5 dk pentoksifiline maruz kalan spermatozoonların kuyruk kısmının orta parçasında, motilitede önemli rol oynayan 9+2 aksonem yapısındaki merkezi çiftin düzgün olduğu ve belirgin olan neksin bağlarının olduğu gözlemlendi. 60 dk pentoksifiline maruz kalan grup spermatozoonların kuyruk kısmının orta parçasında mitokondriyon dağılımının düzensizliği, dağılmış bir fibröz örtüsünün bulunması, motilitede önemli rol oynayan 9+2 aksonem yapısındaki yarı çiftin yer almadığı gözlemlendi.

Pentoksifilin toksik olarak kabul edildiğinden kullanımı tartışılmalıdır (52, 58, 59). Başka bir çalışmada ise, spermatozoonun pentoksifilin ile kısa inkübasyon süresinde, embriyonik gelişim ile ilgili olarak negatif etkisinin olmadığı bildirilmiştir (60).

5 dk pentoksifiline maruz kalan örnekler ile kontrol gruplarımız arasında spermatozoon morfolojisi üzerine belirgin farklılıklar gözlenmedi fakat 60 dk pentoksifiline maruz kalan örneklerin kontrol gruplarıyla karşılaştırılması sonucunda ciddi morfolojik bozukluklar gözlemlendi. Spermatozoon membran yapısı ve nükleus yapısında oluşan bozukluk, oosit dölleme düşüklüğü ve akrozom reaksiyonlarında azalmaya neden



olabilir. Spermatozoon morfolojisinin özellikle fertilizasyonda önemini göz önünde bulundurursak bu bozukluğun infertilite sebebi olabileceğini düşünmekteyiz.

Rutinde motilite üzerine kullanılan pentoksifilin özellikle uzun süre maruziyet sonucu kuyruk yapısındaki mitokondriyal, aksonem ve fibröz örtü yapıları üzerindeki defekt oluşturması motilite üzerinde azalmaya sebep olacaktır.

Uzun süre uygulanan (60 dk) pentoksifilin hem spermatozoon motilitesi hem de morfolojisi üzerine etkisi olduğundan, pentoksifilin IVF laboratuvarlarında kullanımının çok dikkatli olması gerektiğini düşünmekteyiz.

Bu bağlamda, IVF laboratuvarında spermatozoon motilitesi üzerine kullanılan diğer farmakolojik ajanlarla ilgili olarak da gelecekteki yapılacak olan çalışmaların bu ajanların etkilerini aydınlatmasının faydalı olacağına inanıyoruz.

## 8.SONUÇ

Normospermi (sayı 20 milyon/ml ve üzeri, motilite %50 ve üzeri, n=20) olan semen örneklerinden elde edilen 25-55 yaş aralığındaki olgular çalışmaya dahil edildi. Her hastanın temel bulguları ve ajanlar ile muamele sonrası bulguları değerlendirildiğinde bir kıyaslama çalışması olduğu için diğer etkilerin sonuca yansıma ihtimali gündeme gelmedi.

Bu gruba ait spermatozoonlar pentoksifilin uygulanmayan kontrol örneklerin (n=6) ve farklı maruziyet sürelerinde 5 dk (n=7) ve 60 dk (n=7) pentoksifilin uygulanan örneklerin membran yapısındaki glikokaliks yapısı rutenyum kırmızısı boyasıyla belirginleştirildikten sonra ince yapısal özelliklerini incelemek amacıyla TEM'de değerlendirildi.

Normospermi kontrol grubunda, spermatozoonların baş kısmındaki nükleusun ve plazma membranının ve orta kısım ve kuyruk kısmındaki mitokondriyal, aksonem ve fibröz örtü yapılarının korunmuş olduğu görüldü.

Pentoksifiline 5 dk maruz kalmış gruptaki spermatozoonların baş kısmının plazma membran yapısının (glikokaliks) normale yakın bir korunma, kuyruk kısmının orta parçasında, aksonem yapısının ve neksin bağlarının düzgün olduğu görüldü.

Pentoksifiline 60 dk maruz kalmış gruptaki spermatozoonların baş kısmının plazma membran yapısının bozulduğu, kuyruk kısmının orta parçasında mitokondriyon dağılımının düzensizliği, dağılmış bir fibröz örtüsünün bulunması, motilitede önemli rol oynayan 9+2 aksonem yapısındaki yarı çiftin yer almadığı görüldü.

Sonuç olarak, pentoksifiline 5 dk maruz kalan örneklerin morfolojisinde belirgin bozulmalar gözlenmezken, pentoksifiline 60 dk gibi uzun süre maruz kalan örneklerin ince yapısında spermatozoonların fertilizasyonunu etkileyecek baş ve kuyruk yapılarında belirgin derecede morfolojik bozukluklar meydana gelmiştir.

İleriki çalışmalarda spermatozoon motilitesi için kullanılan diğer farmakolojik ajanların, spermatozoon morfolojisindeki etkisini daha iyi anlayabilmek adına araştırılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz.

## 9.TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam süresince, bilgi birikimini paylaşan, katkılarını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, tezimi hazırlama döneminde deneyimleri ve desteği ile her zaman yanımda olan çok sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Canan HÜRDAĞ'a,

Çalışmamda örnek teminatında elinden gelen tüm özveriye gösteren sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Evrim ÜNSAL'a,

Laboratuvar çalışmalarım süresince yanımda olan, yardımını ve bilgisini benimle paylaşan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yasemin Ersoy ÇANILLIOĞLU'na,

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında yardım ve hoşgörüsünü esirgemeyen sevgili bölüm arkadaşlarıma ve bana çalışmamda yardımcı olan hayat arkadaşım Furkan BİÇAN'a,

Her zaman yanımda olan, desteğini ve sevgisini her daim hissettiren, üzerimde sonsuz bir emeğe sahip sevgili annem, sevgili babam ve kardeşime minnetti borç bilirim.

## 10. KAYNAKLAR

1. Demirel E. İntrauterin inseminasyon uygulanan hastalarda sperm parametrelerinin gebelik oranlarına etkileri. Doktora yeterlik tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Süleymaniye Kadın Hastalıkları ve Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 2006.
2. Ed. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008.
3. Milani C, Fontbonne A, Sellem E, Stelletta C, Gerard O, Romagnoli S. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'- deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen- thawed dog semen. *Theriogenology*. 2010, 74:153-164.
4. Gökçe A, Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. *Turk Urol Sem*. 2011; 2:1-7.
5. Safarinejat M.R. Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones, and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Int Urol Nephrol*. 2011, 43: 315-328.
6. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 14:108.
7. Mangoli V, Mangoli R, Dandekar S, Suri K, Desai S. Selection of viable spermatozoa from testicular biopsies: a comparative study between pentoxifylline and hypoosmotic swelling test. *Fertil Steril*. 2011, 95: 631-633.
8. Mirshokraei P, Hassanpour H, Mehdizadeh A, Taheri A. Pentoxifylline induces capacitation and acrosome reaction and improves quality of motility in canine ejaculated spermatozoa. *Elsevier*. 2011, 91: 281-284.
9. Negri P, Grechi E, Tomasi A, Fabbri E, Capuzzo A. Effectiveness of pentoxifylline in semen preparation for intrauterine insemination. *Hum Reprod*. 1996, 11: 1236–1239.
10. Gil Maria A, Hernandez M, Roca J, Alminana C, Lucas X, Cuello C, Vazquez J M, Martinez E A. Pentoxifylline added to freezing or post-thaw extenders does not improve the survival or in vitro fertilising capacity of boar spermatozoa. *Society for Repro. and Fertility*. 2010, 139: 557-564.

11. Aliabadi E, Karimi F, Talaei- Khozani T. Effects of L-Carnitine and Pentoxifylline on Carbohydrate Distribution of Mouse Testicular Sperm Membrane. *Iran J Med Scii.* 2013, 38 (2): 107-115.
12. Abraham L. Kierszenbaum. Çev. Ed. Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006; 531-544.
13. Junqueira LC, Carneiro J. Çev. Ed. Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji Text&Atlas. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2006.
14. Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. Malatya, Pelikan Yayıncılık, 2004.
15. Keith L. Moore. T.V.N. Persaud. İnsan Gelişiminin Başlangıcı. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Ed. Dalçık H. Yıldırım M. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009.
16. Ovalle WK, Nahirney PC. Çev. Ed. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. Netter Temel Histoloji. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2009.
17. Gartner LP, Hiatt JL. Çev. Ed. Dağdeviren A, Müftüoğlu FS, Karabay G. Renkli Histoloji Atlası. Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2009.
18. T.W.Sadler. Çev. Ed. A.Can Başaklar. Medikal Embriyoloji. Ankara, Palme Yayıncılık, 2005; 26-29.
19. Victor P. Eroschenko. Çev. Ed. Demir R. Histoloji Atlası, Fonksiyonel İlişkileriyle. Ankara, Palme Yayıncılık, 2001.
20. Karagöz E. Özel Histoloji. Isparta, SDÜ Basımevi, 2002.
21. Green DP. Mammalian fertilization as a biological machine: a working model for adhesion and fusion of sperm and oocyte. *Hum Reprod.* 1993, 8(1):91-6.
22. Zülfikaroğlu G, Özgür H, Polat S. Kapasitasyonun moleküler temelleri. *Arşiv.* 2010, 19:12.
23. Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 1951, 168(4277):697-8.
24. Çev. Ed. Günalp S. WHO ( Dünya Sağlık Örgütü) Laboratuvar El Kitabı: İnsan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi. Ankara, Tıp Teknik Kitapevi, 2002.
25. Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Turk Urol Sem.* 2011, 2:11-7.
26. Christopher J. De Jonge, Christopher L. R. Barratt. The Sperm Cell-Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. UK, Cambridge University Press, 2006.

27. Satar DA, Gençdal S. Sperm değerlendirmesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2013;22(4): 532-542.
28. Kayıkçı MA, Çam HK, Akman Y, Erol A. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde semen analizinin özellikleri ve rolü. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002; 4(3): 35-38.
29. Klinik Androloji, Sperm Morfoloji Bozuklukları. (t.y.). Erişim: 10.01.2014, <http://www.kaanaydos.net/ders notlari.php>.
30. Calogero AE, Fishel S, Hall J, Ferrara E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burrello N, Thornton S, D' Agata R. Correlation between intracellüler cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoksifilin. *Hum Reprod*. 1998, 13 (4); 911-915.
31. Rao FV, Andersen OA, Vora KA, DeMartino JA, Aalten D. Methylxanthine Drugs Are Chitinase Inhibitors: Investigation of Inhibition and Binding Modes. *Chemistry & Biology*. 2005, 12; 973–980.
32. Aktan G. Sperm hazırlama yöntemleri ve sperm hareketliliğini arttıran yöntemler. İÜ Tıp Fakültesi. Androloji Laboratuvarı, Derleme Yayını, (t.y.), 291-294.
33. Paradowski PT, Zeman K. [Pentoxifylline].[Article in Polish]. *Postepy Hig Med Dosw*. 1995;49(2):201-20.
34. Çakmak SK, Çakmak A, Gönül M, Kiliç A, Gül Ü. Pentoxifylline use in dermatology. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012,11(6):422-32.
35. Batchelder K, Mayosi BM. Pentoxifylline for heart failure: a systematic review. *SAMJ*. 2005, 95 (3);171-175.
36. Shaw SM, Shah MKH, Williams SG, and Fildes JE. Immunological mechanisms of pentoxifyllin in chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 2009, 11; 113–118.
37. Wenjun Li, Liu Zheng, Chunjun Sheng, Xiaoyun Cheng, Liu Qing, Shen Qu. Systematic review on the treatment of pentoxifylline in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease*. 2011, 10: 49.
38. Jull AB, Arroll B, Parag V, Waters J. Pentoxifylline for treating venous leg ulcers (Review). *The Cochrane Library*. 2007, 3; 2-42.
39. Zargari O. Pentoxifylline: a drug with wide spectrum applications in dermatology. *Dermatol Online J*. 2008, 15;14(11):2.

40. Badri S, Dashti-Khavidaki S, Lessan-Pezeshki M, Abdollahi MJ. A review of the potential benefits of pentoxifylline in diabetic and non-diabetic proteinuria. *Pharm Pharm Sci.* 2011;14(1):128-37.
41. Nieder C, Zimmermann FB, Adam M, Molls M. The role of pentoxifylline as a modifier of radiation therapy. *Elsevier.* 2005, 31; 448–455.
42. Fisch JD, Behr B, Conti M. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by typespecific phosphodiesterase inhibitors. *Hum Reprod.* 1998, 13(5);1248–1254.
43. Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Jr and Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist –induced acrosome reaktion rate. *Hum Reprod.* 1998, 13(12); 3384-3389.
44. Chemes HE. Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men. *Journal of Andrology.* 2000, 21(6): 799-808.
45. Mehta A, Sigman M. Identitication and preparation of sperm for ART. *Urol Clin N Am.* 2014, 41; 169–180.
46. Yildirim G, Ficicioglu C, Akcin O, Attar R, Tecellioglu N, Yencilek F. Can pentoxifylline improve the sperm motion and ICSI success in the primary ciliary dyskinesia?. *Arch Gynecol Obstet.* 2009, 279(2):213-5.
47. Agarwal A, Allamaneni SS. Free Radicals and Male Reproduction. *J Indian Med Assoc.* 2011, 109(3):184-7.
48. Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach L, Salzmänn J, Urrutia V, Roulier R. Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2009, 17:194–199.
49. Oliva A, Dotta A, Multigner L. Pentoxifylline and antioxidants improve sperm quality in male patients with varicocele. *Fertil Steril.* 2009, 91: 1536–1539.
50. Kadiođlu TC, Ziylan O, Çayan S, Özcan F, Nane İ, Tellalođlu S. İntrauterin inseminasyon için sperm hazırlama tekniğinde pentoksifilin etkisi. İ.Ü. Tıp Fakültesi, Üroloji ABD, (t.y.).
51. Sikka SC, Hellstrom WJ. The application of pentoxifylline in the stimulation of sperm motion in men undergoing electroejaculation. *J. Androl.* 1991, 12: 165-170.

52. Shilo L, Archer and W. E. Roudebush. Enhancement of Sperm Motility Using Pentoxifylline and Platelet-Activating Factor. *Spermatogenesis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2013, 927 (21):241-245.
53. Taşdemir M, Taşdemir I, Kodama H et al: Pentoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization in vitro. *Hum Reprod*. 1993, 8: 2102 -2107.
54. Tesarik J, Mendoza C: Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency. *Fertil Steril*. 1993, 60: 141.
55. Tournaye H, Janseens R, Camus M: Pentoxifylline is not useful in enhancing sperm function in cases with previous in vitro fertilization failure. *Fertil Steril*. 1993, 59: 210.
56. Hattori H, Nakajo Y, Ito C, Toyama Y, Toshimori K, Kyono K. Birth of a healthy infant after intracytoplasmic sperminjection using pentoxifylline-activated sperm from a patient with Kartagener's syndrome. *Fertil Steril*. 2011, 95:2431.e9-e11.
57. Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S. Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 1998, 15: 90–2.
58. Patrizio P, Liu Y, Sonek GJ, Berns MW, Tadir Y. Effect of pentoxifylline on the intrinsic swimming forces of human sperm assessed by optical tweezer. *J. Androl*. 2010, 21: 753-756.
59. Centola GM, Cartie RJ, Cox C. Differential responses of human sperm to varying concentrations of pentoxifylline with demonstration of toxicity. *J Androl*. 1995, 16:136–142.
60. Lacham-Kaplan O, Trounson A. The effects of sperm motility activators 2-deoxyadenosine and pentoxifylline used for sperm microinjection on mouse and human embryo development. *Hum Reprod*. 1993, 6: 945-952.