



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AQUAPORİN MOLEKÜLLERİ (AQP-3, AQP-7, AQP-8) İLE SPERM PARAMETRELERİ
ARASINDAKİ İLİŞKİNİN FERTİL VE İNFERTİL İNSAN SPERM HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI.

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN AQUAPORIN
MOLECULES(Aq7, Aq8, Aq3) AND SPERM PARAMETERS IN FERTILE AND
INFERTILE HUMAN SPERM CELLS

Veteriner Hekim Arif AKYÖRÜK

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç.Dr. Fikret GEVREK

TOKAT – 2019

T.C.

TOKAT 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.

(.../.../2019)

Tezi Hazırlayan Öğrenci

Adı ve Soyadı

Arif AKYÖRÜK

İmzası

ÖZET

Toplumda kısırlık olarak bilinen infertilite, bir sene süreyle korunmadan uygun zamanda ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik gerçekleşmemesidir. İnfertilite erkek ve kadına bağlı genital problemlerden kaynaklanabilmektedir. Tezimizin amacı insan sperm hücrelerindeki Aquaporin moleküllerinin (Aq-3, Aq-7, Aq-8) infertilite ile ilişkisinin histolojik yöntemler ile araştırılmasıdır.

Çalışmamız 18 yaşını doldurmuş olan 20'si infertil ve 7 tanesi fertil bireylerden oluşan iki grup üzerinde gerçekleştirildi. Fertil ve infertil fertlerden alınan semen örneklerine spermiyogram testleri yapıldı. Kruger strict sperm morfoloji analizleri ve aquaporin moleküllerinin (aqp-3, aqp-7, aqp8) immünohistokimyasal ekspresyonlarının değerlendirilmesi için sperm yayması preparatları hazırlandı. Kruger strict morfoloji analizi için Diff-quick boyama, aquaporin moleküllerinin immünoekspresyonlarının tespiti için yayma preparatlarına uygulanan immünohistokimyasal protokolle immünohistokimyasal boyama işlemleri gerçekleştirildi. Sonra hazırlanan bu preparatlar mikroskopik olarak analiz edildiler.

Beklenildiği gibi spermiyogram ve Kruger strict analiz sonuçlarımız infertil fertlerin semenlerinde sperm hücresi sayısal değerlerin azalmış olduğunu, morfoloji bozuk anomali sperm hücresi değerlerinin yüksek düzeyde olduğunu göstermiştir. İmmünohistokimyasal analiz bulgularımız aquaporin moleküllerinin her birinin immüno ekspresyonunun infertil bireylerde istatistiksel olarak bir anlam ifade etmeyecek düzeyde bir miktar azalmanın varlığını göstermektedir.

Elde ettiğimiz bulgularımıza göre aquaporin moleküllerinin immüno ekspresyonlarındaki azalma anlamlı olmadığı için infertilite ile ilişkisi tespit edilememiştir. Ancak kesin bir karar için ileri üst düzey tekrarlı çalışmalar yapılması gereklidir.

Anahtar Kelimeler: Aquaporinler, Fertil, İnfertil, Sperm, İmmünohistokimya

ABSTRACT

Infertility known as sterility in society is the failure of pregnancy for a year without protection although regular sexual intercourse. Infertility may result from male and female genital problems. The aim of this thesis is histologically to investigate the relationship between aquaporin molecules (Aq-3, Aq-7, Aq-8) in human sperm cells and infertility.

Our study was carried out on two separate groups consisting of 20 fertile and 7 infertile individuals. Spermogram test was performed on semen samples taken from fertile and infertile individuals. Sperm smear preparations were prepared in order to analyze both Kruger strict sperm morphology and immunohistochemical expressions of aquaporin molecules. The slices were stained with Diff-quick stain for Kruger strict morphology analysis and immunohistochemically for immunohistochemical evaluations. These stained preparations were then analyzed microscopically.

As we predicted, The results of spermogram and Kruger strict analysis showed that normal sperm cell numerical values in semen of infertile individuals were decreased but sperm cell values with morphologically abnormal anomalies were high. The results of our immunohistochemical analysis showed that the immune expression of each aquaporin molecules was slightly reduced in infertile individuals respect of fertile ones. But it was not statistically significant.

According to our findings, the association of these aquaporin molecules with infertility could not be determined since the decrease in immuno-expressions was not significant. However, further high-level repetitive studies are required to make an accurate decision.

Key Words: Aquaporins, Fertile, Infertile, Sperm, Immunohistochemistry

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde hem ders hem de tez aşamasında çok önemli katkıları olan ve tez çalışmamı birlikte yaptığım, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Fikret GEVREK'e,
Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımları ve desteği için Sayın Arş. Gör. Seda OCAKLI'ya ve Bil. uzm. Çiğdem Biçer'e,
Çalışmamızı destekleyen TOGÜ BAP Başkanlığı ve personeline,
Yüksek lisans eğitimimin her aşamasındaki katkılarından dolayı TOGÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü ve tüm çalışanlarına,
Her zaman her koşulda yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen akademik hayatımda en büyük motivasyon kaynaklarım eşim Ebru AKYÖRÜK'e, annem Zeynep AKYÖRÜK ve babam İsa AKYÖRÜK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İTHAF

Başarılarımın en önemli kaynağı oğullarım İsa Yusuf AKYÖRÜK ve Mehmet Akif AKYÖRÜK'e..



İÇİNDEKİLER

1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	12
2. GENEL BİLGİLER.....	15
2.1. Erkek Genital Sistem Embriyolojisi.....	15
2.2.Postnatal Testis Gelişimi	16
2.3.Germ Hücrelerinin Gelişimi	16
2.4.Spermatogenez	17
2.4.1. Spermatogenetik Seri Hücreleri	18
2.4.2. Semen.....	20
2.4.3. Testisin Histolojik Yapısı	21
2.5.Fekondasyon	22
2.6.Erkek İnfertilitesinde Etyoloji.....	25
2.7.Morfoloji.....	27
2.8.Sperm Analizi.....	29
2.8.1. Spermilerin Morfolojik Açından Sınıflandırması	30
A- Numune Toplama:.....	31
1-Hazırlama:	31
2-Tanısal veya Araştırma Amacıyla Semen Toplanması:	32
3-Yardımlı Üreme Teknikleri İçin Semen Steril Toplanması:	33
4-Mikrobiyolojik İncelemeler İçin Semen Steril Toplanması:	33
5-Semenin Evde Alınması:	33
6-Semenin Kondomla Alınması:.....	34
7-Numunelerin Güvenli Biçimde İşlenmesi:	34
2.10. Sperm değerlendirme	35
2.10.1. İlk Makroskobik Değerlendirme	35
B- İlk Makroskobik Değerlendirme:	35
C- İlk Mikroskobik Değerlendirme:.....	37
1- Sperm Motilitesi	37
2- Sperm Canlılığı.....	38
3- Sperm Sayımı.....	38
4- Sperm Morfolojisi	39

3. MATERYAL ve METOD	40
1. Spermiyogram Testi	40
Spermiogram Analiz Aşamaları:.....	41
Makler Counting Chamber ile sperm sayımı.....	42
2. Kruger Strict Sperm Morfoloji Analizi	43
Strict Morfoloji Kruger Kriterlerine Göre Normal Sperm Değerlendirmesi:.....	44
Kruger yöntemi ile morfoloji tayinindeki anomaliler	45
Sperm Morfolojisi İçin Papanicolaou, Shorr ve Diff-Quick Boyamalar.....	46
Diff-Quik Boyama Prosedürü (Sperm morfolojisi için hızlı boyama işlemi)	46
Reaktifler	46
Diff-Quik hızlı boyama kiti içindikiler:.....	46
Tespit edilmiş semen sürüntüsünün boyanması.....	47
3.5.İmmünohistokimyasal Çalışmalar	47
3.5.1. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü.....	47
3.6.İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Spermiyogram Testi Sonuçları.....	50
4.2. Kruger Strict Sperm Morfoloji Analiz Bulguları	56
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	66
TARTIŞMA ve SONUÇ	75
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	81

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.1. Erkek infertilitesi sebepleri	26
Tablo 2.2. Semen terminolojisi	29
Tablo 3.5.1. İmmünohistokimyasal boyama protokolü	48
Tablo 4.1.1. Fertil bireylere ait spermiyogram testi sonuçları	51
Tablo 4.1.2. İnfertil bireylere ait spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçları	52
Tablo 4.1.3. Spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçların grup ortalama değerleri	52
Tablo 4.1.4. Fertil bireylere ait spermiyogram testi makroskopik analiz sonuçları	54
Tablo 4.1.5. İnfertil bireylere ait spermiyogram testi makroskopik analiz sonuçları	55
Tablo 4.2.1. Fertil bireylere ait Kruger Strict Morfoloji analizi bulguları	59
Tablo 4.2.2. İnfertil bireylere ait Kruger Strict Morfoloji analizi bulguları	59
Tablo 4.2.3. Kruger strict morfoloji analizlerin grup ortalama değerleri	59
Tablo 4.3.1. Fertil bireylere ait sperm hücreleri aquaporin molekülleri immünohistokimya analiz sonuçları H-skor değerleri	67
Tablo 4.3.2. İnfertil bireylere ait sperm hücreleri aquaporin molekülleri immünohistokimya analiz sonuçları	68
Tablo 4.3.3. Aqp-3, Aqp-7, Aqp-8 moleküllerin immünohistokimyasal boyanma şiddetleri H-skorları ağırlıklı grup ortalama değerleri	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.4.1. Sperm Oluşumu (Spermatogenez)	20
Şekil 2.4.2. Normal sperm morfolojisi	20
Şekil 2.8. Anormal sperm şekilleri	28
Şekil4.1.1. Spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçları grup ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı görünümü.	53
Şekil4.1.2. Spermiyogram testi makroskopik analiz sonuçları grup ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı görünümü	56
Şekil4.2.1. Sperm hücrelerinin baş, boyun ve kuyruk anomalileri grupların ortalama değerlerinin karşılaştırmalı grafiksel görünümü.	60
Şekil4.2.2. Anomalili ve normal sperm yüzdelerinin grup ortalaması değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı görünümü	61
Şekil 4.2.3. Fertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick) .	62
Şekil 4.2.4. Fertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick)	64
Şekil 4.2.5. İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick)	65
Şekil 4.2.6. İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskopik görüntüsü (Diff-quick)	66
Şekil 4.3.1. Aqp-3, Aqp-7, Aqp-8 moleküllerinin immunhistokimyasal boyanma şiddeti H-Skorları grupların ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması.	68
Şekil 4.3.2. Fertil birey sperm hücresi Aqp-3 immün ekspresyonu	69
Şekil 4.3.3. İnfertil birey sperm hücresi Aqp-3 immün ekspresyonu	70
Şekil 4.3.4. Fertil birey sperm hücresi Aqp-7 immün ekspresyonu	71
Şekil 4.3.5. İnfertil birey sperm hücresi Aqp-7 immün ekspresyonu	72
Şekil 4.3.6. Fertil birey sperm hücresi Aqp-8 immün ekspresyonu	73
Şekil 4.3.7. İnfertil birey sperm hücresi Aqp-8 immün ekspresyonu	74

SİMGELER ve KISALTMALAR

aa	:	Aminoasit
AQP	:	Akuaporin
ATP	:	Adenosin 5'-trifosfat
BSA	:	Sığır serum albumin
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
FSH	:	Folikül stimülan 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
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, düzenli ve korunmasız bir cinsel ilişkiye rağmen bir sene sonunda gebeliğin elde edilememesi olarak tanımlanır. Bu olay çok ciddi bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir [1-3]. İnfertil çiftlerin %30'unda erkek faktörü, %20'sinde ise hem erkek hem de kadına ait faktörlerden kaynaklanmaktadır [3-5].

İnfertilitenin etiolojisinde erkek faktörlerin direkt veya indirekt olarak katkısı %50 oranındadır [6]. Erkek infertilitesi ile ilgili yapılan çalışmaların çoğu doğal olarak primer etken olan sperm hücreleri üzerinde odaklanmaktadır [3]. Erkek infertilitesinde bilinen faktörler varikosel, inmemiş testis, infeksiyon, çevresel ve genetik nedenler olsa da %70'e yakını idiyopatikdir. Bu idiyopatik etkenler sperm hücrelerinde henüz çalışılmamış, keşfedilmemiş veya yeterli düzeyde inceleme ve araştırma yapılmamış olan bazı moleküllerden kaynaklı olabilir. Bu moleküller sperm hücrelerinin hayati fonksiyonlarını devam ettirilmesi ve fonksiyonlarını tam olarak yerine getirebilmesi için gerekli ve uygun düzeylerde bulunması ve ifade edilmesi gerekiyor olabilir.

Sperm hücrelerinin hem canlılığını devam etmesi hemde fertilizasyon kapasitesi hücrenin kendisi tarafından üretilen aquaporinlerinde içinde olduğu birçok moleküle bağlı olabilmektedir. Aquaporinler (AQP), suyun ve bazı durumlarda küçük eriyiklerin membranlardan geçişini sağlayan kanallar olarak görev yapan integral membran proteinleridir. Bitkiler, bakteriler ve hayvanlarda bulunmaktadır. AQP'ler membranlardaki major intrinsik protein (MIP) süperalesine dahil edilmektedirler. MIP'ler, membran su geçirgenliğinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Canlı organizmalarda 450'den fazla MIP tanımlanmıştır. Bunlardan 13'ü (AQP 0 – AQP 12) omurgalılarda bulunur. Memeli aquaporinlerinin geçirgenlik özellikleri temel alınarak, iki alt grup tanımlanmıştır. AQP-0, 1, 2, 4, 5, 6 ve 8 suya geçirgen grubu oluştururken, AQP 3, 7 ve 10 suyun yanında gliserole, AQP-9 ise gliserol dışında daha büyük eriyiklere geçirgendir [7].

AQP'lerin 13 izoformu vardır ve bu proteinlerden 11 tanesi hem erkek hem de kadın üreme sisteminde eksprese edilir. Birçok çalışmada AQP'lerin su-tuz dengesi, epidermal hidrasyon ve ekzokrin sıvı sekresyonunda önemli fizyolojik rolleri olduğu gösterilmiş, ayrıca hipergliseminin bazı dokularda AQP ekspresyonunu azalttığı kaydedilmiştir [5]. Aquaporin 3, Aquaporin 7 ve Aquaporin 8 molekülleri sperm hücrelerinin plazma zarlarında bulunan su moleküllerinin geçişini sağlayan proteinlerdir [8]. Bu moleküller spermin canlılığı ve hareketi ile doğrudan ilgilidirler [9, 10].

Aquaporin 7 molekülü eksikliği erkeklerde infertilite mekanizmasının sebebi olabilir. Çalışmalarda fertil erkeklerde Aquaporin-7 molekülünün olduğunu infertil erkeklerde ise Aquaporin-7 molekülünün olmadığı tespit edilmiştir [11]. Tedavi esnasında ve sonrasında bu aquaporin moleküllerinin de normal yapılarını kazanıp tekrardan sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneklerine olumlu yönde katkı yapabileceği normalde beklenen bir durumdur. Aquaporinlerin obezite ve gliserol metabolizmasında da etkin rol aldıkları bildirilmiş olup spermatoonların fertilizasyon yetenekleri üzerine negatif yönde bir etkisinin olduğu ileri sürülmüştür [12, 13].

Günümüzde insidansı gittikçe artan ve önemli bir sorun haline gelen infertilitenin nedenleri ve tedavisine yönelik çalışmalar önem arz etmektedir ve bu konuda çok sayıda yoğun bir şekilde araştırmalar yapılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nce sadece bir semen analizi kişinin semen kalitesini değerlendirmek için yeterli olmayacağı, özellikle ilk semen analizi anormal olanlarda temel verileri elde etmek için iki veya üç örnek incelenmesinin yararlı olacağı bildirilmiştir [14, 15]. Bu nedenle bir bireye ait örnekler üzerinde farklı en az iki analiz yapılacak şekilde çalışmamız planlanmış ve sperm hücreleri ile ilişkili olarak literatürde sınırlı sayıda çalışma olması nedeniyle aquaporin moleküllerinin fertilizasyonla ilişkisi immünohistokimyasal olarak analiz edilmiştir.

Bu tez çalışmamızın amacı; Aquaporin molekülleri ile sperm parametreleri arasındaki ilişkinin fertil ve infertil insan sperm hücrelerinde araştırılarak erkek infertilite nedenleri ve tedavisi ile ilgili çalışmalara katkı sağlamaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sistem Embriyolojisi

Gonadlar posterior abdominal duvar mezoteli altındaki mezoderm, altındaki mezenşim dokusu ve primordiyal germ hücrelerinden oluşarak gelişirler. Erkek ve dişi morfolojik özellikleri, embriyonik 7. haftadan sonra gelişmeye başlar. Genital sistem, erken dönemde her iki cinsten de birbirine benzerlikler gösterir. Bundan dolayı, genital sistemin gelişiminin başlangıç dönemi, cinsel gelişimin farklılaşmamış safhası olarak isimlendirilir.

Üçüncü haftanın sonuna doğru genital organlara ait ilk hücreler oluşur. Embriyo dışında allantoisin başlangıcına yakın yerde, vitellusu döşeyen endoblastik hücreler arasında; küre şekilli hücreler oluşmaktadır. Bu oluşumlara primordiyal germ hücreleri denir. Bu hücreler epitelden ayrılarak hemen bitişikteki mezoblasta geçerler. Sonrasında bağırsağın dorsal mezenterini boyunca devam ederek 5. haftada gonadlara geçerler ve 6. haftada da genital kabarıklıklara yerleşmiş olurlar. Eğer kabarıklıklara ulaşamazlarsa gonadların gelişmesi mümkün değildir. 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 şekillendirirler. 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 Kanallarıdır. Dördüncü haftada yolk kesesi duvarındaki

endoderm hücreleri arasında primordiyal germ hücreleri oluşur. 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 kadar ulaşırlar. 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.

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 şekilde organize olmuş parakrin iletişimi içerir. Erişkin testislerinin normal fonksiyon görebilmesi için testiküler hücrelerin düzenli bir şekilde gelişimine ihtiyaç vardır [16].

2.3. Germ Hücrelerinin Gelişimi

Yetişkinlerin testisi, kök spermatogonya, farklılaşan spermatogonya, primer ve sekonder spermatositler ve spermatidleri içerir. Spermatogonyumlar, bazal membranın bitişiğine yerleşmiştir. Tübüler lümene doğru ilerlerken, spermatogonyumlar, spermatoditlere ve son olarak da spermatidlere farklılaşır. Bu süreç üç aşamaya bölünebilir;

Spermatogoniyanın bir seri mitotik bölünmeye gittiği spermatogonyal çoğalma, ilk mayoz bölünmenin sekonder spermatositleri oluşturduğu ikinci mayotik bölünme esnasında spermatidlerin olduğu mayoz bölünme ve spermatidlerin sperm benzeri olgun spermatidlere dönüştüğü spermiyogenez [17, 18]. Spermatogenik hücreler, tübüllerde

birbirlerini dalgalı biçimde izleyen belirgin hücresel ortaklık içinde şekillenmiştir. Bunlar seminifer epitelyal döngünün basamaklarını oluşturmaktadır.

2.4. Spermatogenez

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

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

Erkeklerde, primordiyal germ hücrelerinin farklılaşması puberteden başlayıp andropoza kadar aktif olarak devam etmektedir. Puberteden hemen önce seks kordonları içinde lümen oluşmakta ve seminifer tübüller haline gelmekte ve aynı zamanda primordiyal germ hücreleri de spermatogoniumlara dönüşmektedir. Bu olayın meydana geldiği yere testislerin tubulus seminiferus kontortiyus duvarı denir. Testis lobüllerden oluşmaktadır. 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 denir. Testisteki bu tübüllerin toplam uzunluğu 250 m. civarındadır. Bu tübüllerin sonuna doğru lümen daralır ve düzleşerek tubulus seminiferus rektus 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

birincil görevi testosteron salgılamaktır. Seminifer tübüller ise spermatozoonları üretmekle görevlidirler. Seminifer tübülün duvarı, ince bir bağ doku tabakası üzerine oturmuş çok katlı kübik epitelden meydana gelmektedir ve bunlar birbirinden bazal lamina ile ayrılırlar.

Germinal epiteli destek hücreleri olarak bilinen Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seri hücreleri olarak iki çeşit hücreden oluşmaktadır. 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 [19, 20].

2.4.1. Spermatogenetik 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.

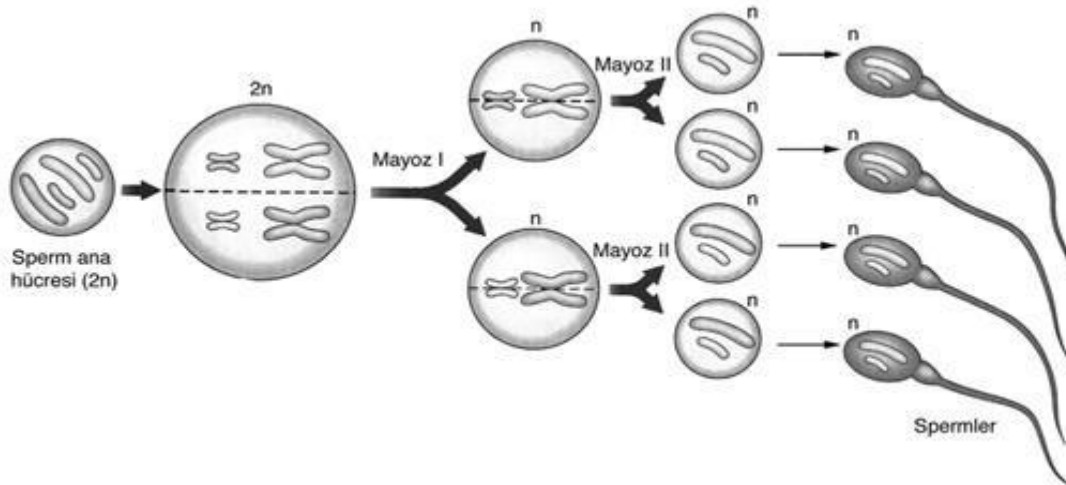
Bir spermatogonyumdan, spermatozoon oluşuncaya kadar geçen olaylar serisine spermatogenez denir ve 3 evrede incelenir.

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.

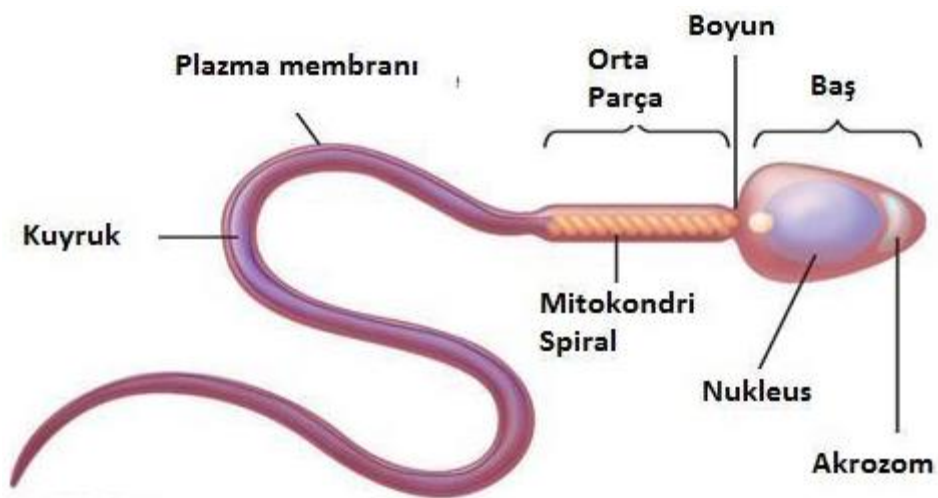
Spermatogonyumlar embriyonal dönemde oluştuktan sonra puberteye kadar inaktif olarak kalır. Pubertenin başlamasından itibaren hipotalamustan salgılanan gonadotropin releasing hormon (GnRH) etkisi ile hipofiz ön lobundan salınan gonadotropik hormonlar folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinizan hormon (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 geçirerek spermatosit-I'leri ($2n$) verirler. Bunlar mayoz safhasının başlangıcını meydana getirirler. Spermatosit-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 spermatosit-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 spermatosit-II meydana gelir (kromozom sayısı $23=n$, DNA= $2n$). Spermatosit-II'ler de DNA'larını replike etmeden, mayozun 2. fazı olan eşit mitoz bölünmeyle 23 kromozomlu ikişer haploid spermatid meydana gelirler. Yani 1 spermatosit-I'den 4 adet n kromozomlu, n DNA'lı spermatid meydana gelir. Bunların ikisi $22+X$, diğer ikisi ise $22+Y$ kromozom düzenine sahiptir. Yani 1 spermatosit-I'den 4 adet n kromozomlu, n DNA'lı spermatid meydana gelir. Bunların ikisi $22+X$, diğer ikisi ise $22+Y$ kromozom düzenine sahiptir [19, 20]



Şekil 2.4.1.Sperma Oluşumu (Spermatogenezis)

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 [21].



Şekil2.4.2. Sperm morfolojisi- Normal

2.4.3. Testisin Histolojik Yapısı

Testisler, yan kısımları yassılaştırılmış, 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 epitel ile sarılıdır. 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 kalınlığınca 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 konumlandıklarıdır. 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 bulundurulur. 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 bulundurulur.

Sitoplazmasının apikal yüzünde spermiyumların konumlanmasına uygun girintiler bulunur, yan uzantılarla ise spermatogonyum ve spermatozoidler 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 lümene 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 [19, 20, 22]. 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 muköz bir salgı yaparak spermatozoonları vagina asiditesine karşı korumaya alır. Bu sayede spermatozoonun hareketi kolaylaşır. Vajinaya 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 uterinallardan geçerken akıntıya karşı hareket etmeleri gerekir. Buna pozitif reotaksis özelliği denir. Ovum da tuba uterinanın fimbriya ovarikası tarafından yakalanıp yaklaşık 25 dakikada ampullaya ulaşır. Dölleme 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 [19, 20, 22]. 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 ayrılmaz. 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 yapılı kromozomlar birbirlerine karışır. Dolayısıyla tek hücreli zigot oluşur. Çift yapılı 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 hücelere blastomer adı verilir. Ancak döllenmeyen oosit 24 saat içinde dejenere olur [19, 20, 22].

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 [23]. Buradan da anlaşılacağı gibi evli infertil çiftlerin %48'inde mutlaka erkek faktörü ön plana çıkmaktadır.

Tablo 1.1. Erkek infertilitesi nedenleri

Erkek infertilitesinde etiyoloji	(%)
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 olduğunca 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

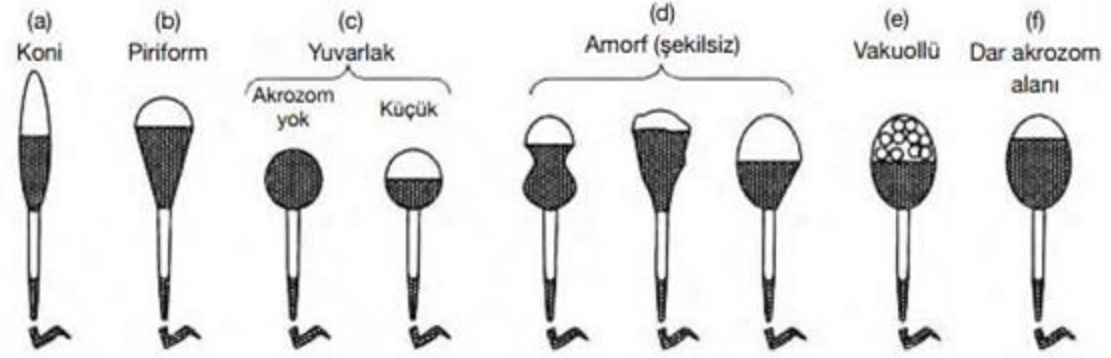
tedavisi, antibiyotikler, antiinflamatuvar ajanlar, çeşitli vitaminler, kallikreinler, kaptopril ve tiroksin hormonu verilebilir. Gene son yıllarda pure FSH tedavisinin IVF'te fertilizasyon oranlarını arttırdığını kanıtlayan yayınlar vardır [24]. Bu tedavinin etki mekanizmasının nasıl olduğuna dair rutinde 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.

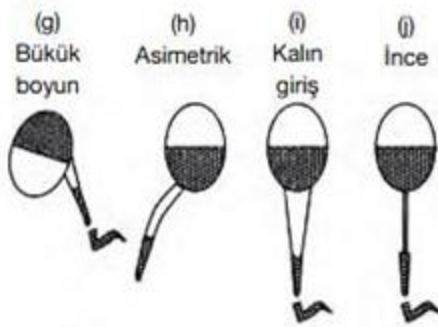
2.7.Morfoloji

Spermin fertilitate 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 [25].

A. Baş defektleri



B. Boyun ve orta parça defektleri



C. Kuyruk defektleri



D. Aşırı rezidüel sitoplazma

(n)
Başın > 1/3'ü



Şekil 2.8. Anormal sperm şekilleri [14].

Tablo2.3. Semen analizi terminolojisi

Semen Terminolojisi	
Normospermi	Tüm parametreler normal
Oligospermi	Sperm sayısının azalması \square 5-15 mil/ml, ağır \square <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 oraya çıkar. Semen analizi, infertil erkek bireyin değerlendirilmesinde ve fertilitte 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 [26-28]. 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 [14].

Hacim: $\geq 2,0$ ml

Likefikasyon süresi: 60 dk içinde

Ph: $\geq 7,2$

Sperm konsantrasyonu: ml'de ≥ 20 milyon

Total sperm sayısı: ejakülatta ≥ 40 milyon

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

Canlılık: $\geq \%75$ veya daha fazla canlı

Lökosit: ml'de 1 milyondan daha az

Normal morfoloji: en az $\geq \%30$

2.8.1. Spermilerin Morfolojik Açıdan Sınıflandırması

İnsan spermelerinin morfolojik olarak diğer memelilere kıyasla yapı ve büyüklük açısından büyük farklılık gösterirler. Normal fertil ejakülatta 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 [29]. Bir spermatozoonun anormal veya normal olduğunu belirleyen özellikleri standardize etmek için pek çok uygulama yapılmıştır [30-32]. 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 [33]. Arkasından Hofmann ve Haider, Dusseldorf sınıflaması adı altında yeni bir morfoloji sınıflaması ortaya koymuştur. 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 [34]. Bu sınıflandırmada, spermatozoon bir bütün olarak incelenir ve morfolojileri düzensiz sınır hatları ve hafifçe anormal sperm başlarının hepsi anormal olarak değerlendirilir [34, 35]. 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).

A- Numune Toplama:

1- Hazırlama:

-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 aşağıdaki 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- Tanısal veya Araştırma Amacıyla Semen Toplanması:

- Numune mastürbasyonla 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 sehпасı 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.

3- 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.

4- Mikrobiyolojik İncelemeler İçin Semen Steril Toplanması:

Bu durumda, semen dışı kaynaklardan gelen kontaminasyondan (örn. 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 peçeteye kurulamalı.
- Steril bir kap içine boşalmalıdır.

5- Semen Evde Alınması:

Klinikte mastürbasyonla 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 6nceden tartılmış, 6zerinde adı ve tanıtım 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.

6- Semen in Kondomla Alınması:

Mast6rbasyonla numune alınamayan istisnai durumlarda, cinsel birleşme sırasında kondom içine numune alınabilir.

Semenin alınması amacıyla tasarlanmış ve toksik olmayan 6zel kondomlar kullanılmalıdır; bu kondomlar piyasada bulunmaktadır. Kişiye kondom 6reticisi tarafından kondomun kullanımı, ağzının kapatılması, laboratuvara g6nderilmesi veya g6t6r6lmesi 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 6zel bir kondom kullanılarak alındığı kaydedilmelidir. Not: Spermatozoanın hareketliliğini bozan maddeler içerdiği için, sıradan lateks kondomlar semen alınması amacıyla kullanılmamalıdır [36].

7- Numunelerin G6venli Biçimde İşlenmesi:

Semen numuneleri tehlikeli enfeksiyon etkenleri (6rn: insan imm6nyetmezlik vir6s6 [HIV], hepatit vir6sleri veya herpes simpleks vir6s6) 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 [37].

2.10. Sperm değerlendirme

B- 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. Likefaksiyon sırasında örneğin düzenli olarak karıştırılması 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 viskozitelerde 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 silindirine boşaltılması tavsiye edilmemektedir [38, 39]. Semen hacmi için en düşük referans değeri 1.5 ml'dir.

Düşük semen hacimleri, ejakülatuvar kanal obstrüksiyonu veya seminal vazikül gelişiminin yetersiz olduğu konjenital bilateral vas deferens agenezisinin karakteristiğidir [40, 41]. 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 vas deferens agenezisi akla gelmelidir [40, 41]. 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

C- İlk Mikroskopik Değerlendirme:

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 spermelerin 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 gratikülle belirlenmiş çizgilerin sınırladığı alanda ya da sperm sayısı azsa tüm alanda sperm hücreleri sayılarak motilite değerlendirilir.

2- 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 spermelerin sayısını aşmamalıdır. Normalde canlı hücrelerin sayısı motil hücrelerden fazladır.

3- 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 [42, 43]. 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 [44, 45]. Seminal vezikül ve prostat salgılarının miktarından etkilenebilen sperm konsantrasyonu ise fertilizasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir ancak testis fonksiyonunu değerlendirmek için özgün değildir [46]. Sperm sayımı için 100 µm derinlikte hemositometre sayma kamaraları tavsiye edilmektedir

4- Sperm Morfolojisi

Sperm morfolojik değerlendirmesi řu aşamalardan oluşur:

- Semen smear preparatlarının hazırlanması
- Preparatı havada kurutma, fiksasyon ve boyama
- Eğer uzun süre saklanacaksa lamın üzerini lamelle kapatma
- Parlak alan objektifi ile 1000 büyütmede immersiyon yağı kullanarak preparatın incelenmesi
- Normal ve anormal formdaki spermleri değerlendirebilmek için yaklaşık 200 spermin sayılması
- Sayım hatalarını azaltmak için iki kez sayım yapmak.

Sonuçlar karşılaştırıldığında kabul edilebilir fark varsa devam edilir ama öyle değilse yeniden sayım yapılmalıdır. Boyama yöntemi olarak Papanicolaou, Shorr ve Diff-Quick boyaması tavsiye edilen yöntemlerdir.

3. MATERYAL ve METOD

Çalışmamızda Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Androloji laboratuvarına gelen insanlardan alınan semen numuneleri üzerinde yapılmıştır. Numunelerin alınması, alınan numunelerin spermiyogram analizleri, sperm yayma preparatların hazırlanması, Kruger Strict sperm morfoloji analizleri Tokat 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 (yirmi) (Bir sene boyunca düzenli ve korunmasız bir cinsel yaşamı olan ve bebek sahibi olamayan bireyler) ve fertil 7 (yedi) olmak üzere toplam 27 birey dahil edildi.

Çalışmamızın semen örneklerinin toplanmasına Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İnsan deneyleri Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 17.01.2017 Tarihli 2017-01/22 Sayılı kararı ile alınan izinden sonra başlandı.

1. Spermiyogram Testi

Erkek infertilitesinin saptanması ve değerlendirilmesinde en önemli ve o ölçüde de basit olan 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. Yapılan perhiz sonrası konusunda uzmanlaşmış androloji laboratuvarlarında ayrılan özel sperm verme odalarında mastürbasyon yöntemi ile herhangi bir kayganlaştırıcı madde (krem, tükürük, vs.) kullanılmadan steril bir kaba tam bir boşalma gerçekleşmelidir.

Spermiogram Analiz Aşamaları:**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
- Semen pH'nın ölçümü
- Mikroskopik inceleme, sperm sayısı ve motilitesini değerlendirebilmek için dilüsyon ve ıslak preparatın hazırlanması
- Sperm canlılığının değerlendirilmesi (motil spermelerin oranı düşük ise)
- Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için semen yaymasının hazırlanması
- Sperm konsantrasyonunu değerlendirmek için semenin dilüsyonu
- 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:

- Gerekirse 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)

Makler Counting Chamber ile sperm sayımı

Isı ayarlı santrifüj ile 1800 Rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra 36°C de likefiye olacak kadar beklenir.

Makler sayım aleti ile likefiye olmuş semen hiç bir muameleye tabi tutulmadan direk değerlendirilir. Makler Chamber ile faz-kontrast ışık mikroskopunda sayım yapılır. Güvenilir bir değerlendirme için ideal olan, Makler sperm sayım aletindeki 100 karedeki spermli saymaktır. Alete bağımlı olarak, Makler sperm sayım aletinde toplam 10 adet karedeki sperm sayısı temel alınıp sayım sonucu $\times 10^6$ /ml olarak ifade edilir.

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 spermli 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 spermli sayılır
- Sayım sonunda bulunan değer mililitredeki milyon adet sperm olarak değerlendirilir
- Sonuçlar kaydedilir.

2. 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 sınırdaki 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 ayrımı 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.

Strict Morfoloji Kruger Kriterlerine Göre Normal Sperm Değerlendirmesi:

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

Spermin Boyun Kısmı: İmplantasyonu başın uzun ekseni 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.

Bu yapıların dışındaki tüm ara formdaki spermeler anormal olarak değerlendirilmelidir.

Kruger yöntemi ile morfoloji tayinindeki anomaliler:

Şekil Anomalileri

Tapered, Elonge, Piriform, Yuvarlak
 Makrosefali, Mikrocefali
 Diadem defekti
 Nükleus içine doğru invaginasyon (genellikle ekvatoryal bölgede)
 Nükleus vaküolleri
 Nükleus Büyüklüğü Anomalileri
 Sitoplazmik Droplet
 İnkomples spermatid seperasyonu
 Genellikle çift nükleuslu, diploid, triploid
 Duplikasyon

Akrozom bölümünde olabilecek anomaliler:

Primer (Gelişme ve diferensiyasyon aşamasında ortaya çıkan)
 İrregüler akrozomal dağılım
 Akrozomal kist
 Nipple, Santral
 Aberan akrozomal yapı
 Sekonder (Eksternal faktörler, yaşlılık)
 Akrozomal içerik azalması (açık renk boyanma)
 Akrozomal içerik total kaybı
 Akrozomal membran anomalileri
 Akrozom ayrılması
 Komplet, İnkomples

Mid-piece'de olabilecek anomaliler :

Sitoplazmik droplet
 Bend Mid-piece
 Kinked Mid-piece
 Amorf Mid-piece
 Non-aksiyel Mid-piece
 Mitokondrial aplazi
 Komplet, Segmental
 Pseudodroplet
 Kopuk baş

Kuyruk kısmında olabilecek anomaliler:

Dag defekti
 Coiled tail
 Duplikasyon

Yukarıda tanımlanan anomaliler dışında olabilecek diğer anomaliler:

Multipl anomaliler
 Sınıflandırılmayan formlar
 İnkomples seperasyon (adezyon)

Sperm Morfolojisi İçin Papanicolaou, Shorr ve Diff-Quick Boyamalar.

Bu boyalarla baş akrozomal bölgede soluk mavi, post-akrozomal bölgede koyu mavi boyanır. Orta kısım bir miktar kırmızı boyanma gösterebilir. Kuyruk kısmı mavi ya da kırmızımsı boyanır.

Sitoplazmik artıklar genellikle başın arkasında ve orta kısım etrafında bulunur Papanicolaou Boyası ile pembe veya kırmızı, Shorr Boyası ile kırmızımsı-turuncu boyanır. Papanicolaou Boyaması sperm ve diğer hücrelerin iyi boyanmasını sağlar. Shorr Boyaması normal formlar için Papanicolaou Boyaması'na yakın sonuçlar verir. Diff-Quick Boyaması klinik laboratuvarlarda özellikle aynı gün sonuç verilebilmesinden dolayı kullanışlıdır.

Diff-Quik Boyama Prosedürü (Sperm morfolojisi için hızlı boyama işlemi)

Hızlı boyama yöntemleri, özellikle gün içerisinde kısa zamanda sonuç verdiği için tercih edilmektedir. Birkaç farklı boyama setleri mevcuttur [47]. 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.

Reaktifler

Diff-Quik hızlı boyama kiti içindekiler:

- Fiksatif reaktifi (metanol içinde çözülmüş triarilmetan boyası (fast green; soluk yeşil))
- Boyama çözeltisi 1 (eozinofilik ksanten: fosfat tampon içinde eozin-G; kırmızı)
- 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.

Havada kurutulmuş semen sürüntüsünün fiksasyonu

Lamları triarilmetan tespit çözeltisi içinde (Diff-Quik kitiyle sunulduğu gibi veya yukarıda hazırlandığı gibi) 15 saniye veya yalnızca % 95 metanol içinde 1 saat kadar tutun. Her aşamada lamları emici filtre kâğıdı üzerine dikerek fazla çözeltiyi akıtın.

Tespit edilmiş semen sürüntüsünün boyanması

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 (Aqp-3, Aqp-7, Aqp-8) 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 Prosedürü

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

3.6. İstatistiksel Analiz

Analizler sonucunda elde edilen verilerin istatistik analizleri IBM SPSS-20 Windows İstatistik paket programı ile gerçekleştirildi. Tüm veriler ortalama \pm standart error mean (SEM) olarak ifade edildi.

Spermiyogram değerler; Tests of Normality (Kolmogorov-Smirnov) sonrası Independent Samples Test ile ancak normal dağılım göstermediği için Total sperm sayısı ve Total motil sperm sayısı ortalama değerlerin karşılaştırılması Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

Kruger strick sperm anomali değer sonuçları: Tests of Normality (Kolmogorov-Smirnov) sonrası Independent Samples Test ile, yüzde anomali ve yüzde normal sperm değerlerin karşılaştırılması Mann-Whitney U Testi analizi ile yapıldı.

Aqp moleküllerin immünohistokimyasal ekspresyonları H-skor değerleri Independent Samples Test analizi ile yapıldı.

Gerçekleştirilen istatistiksel analizler sonucunda p değerinin 0.05'den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Spermioyogram Testi Sonuçları

Anabilim dalımız Androloji laboratuvarına başvuran fertil ve infertil bireylerden alınan semen rneklarine öncelikli olarak rutin olarak gerçekleştirilen spermioyogram analizi testleri gerçekleştirildi. Spermioyogram analizi protokolüne göre gerçekleştirilen testler sonucunda bu şahıslardan spermioyogram anlizleri sonuçlarımız Tablo 4.1.1,2,3,4,5,6; şekil 4.1.1,2 de gösterilmiştir.

Beklenildiği gibi tüm mikroskopik spermioyogram parametrelerin sayısal ifadeleri infertil bireylerde belirgin bir şekilde düşük fertil bireylerin değerleri ise yüksekti. Bu değerlerin grup ortalamalarının karşılaştırmalarında istatistiksel anlamlı farklılık bulundu ($p<0.01$).

Spermioyogramın makroskopik parametreleri açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlemlenmedi ($p>0.05$).

Tablo 4.1.1. İnfertil bireylere ait spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçları (İF: İnfertil)

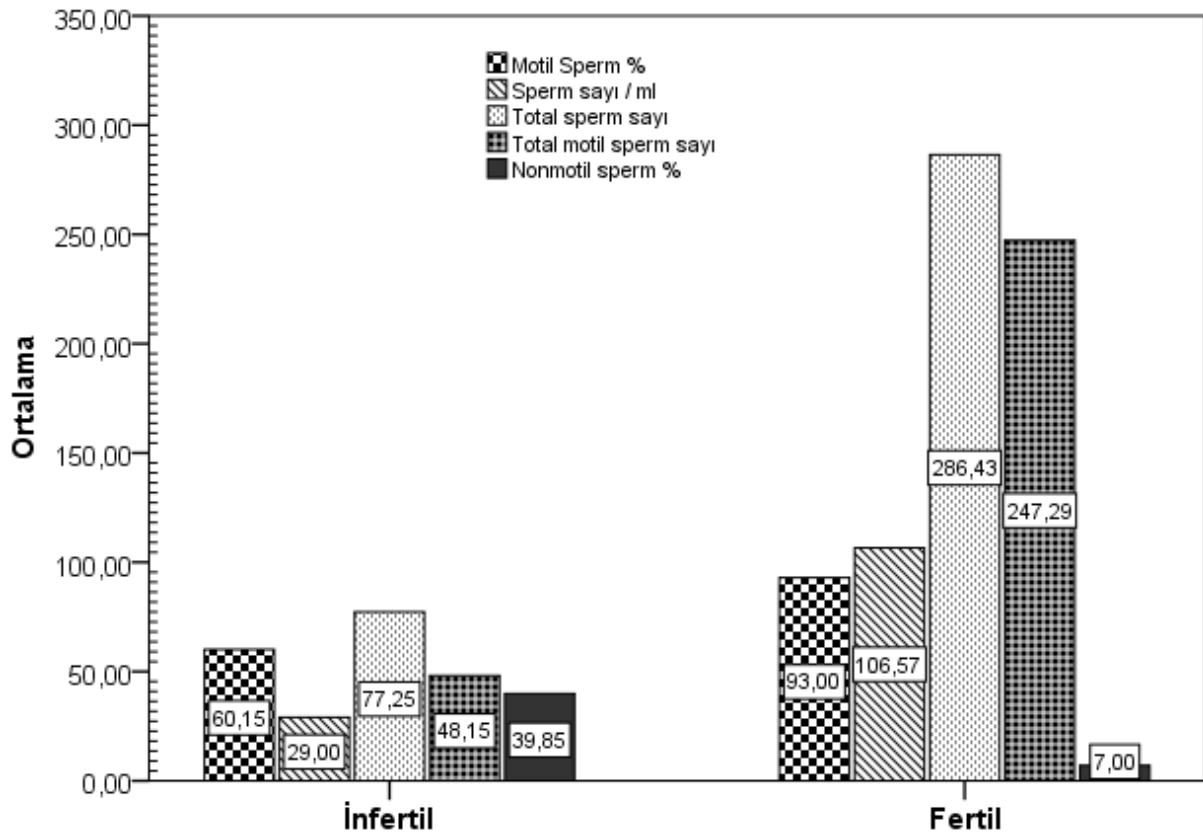
İF	Motil Sperm %'si			Sperm sayısı/ml x (10 ⁶)	Total Sperm Sayısı x (10 ⁶)	Total-motil sperm sayısı x (10 ⁶)	Non-motil sperm %'si
	A ileri	b yerinde	a+b				
1	75	0	75	16	64	48	25
2	45	9	54	11	22	10	46
3	36	9	45	11	33	12	55
4	41	9	50	34	102	42	50
5	11	0	11	19	95	10	89
6	58	11	69	53	79	46	31
7	54	5	59	22	88	48	41
8	59	5	64	80	115	118	36
9	88	6	94	34	119	105	6
10	60	2	62	58	377	227	38
11	15	6	11	34	10	1	89
12	50	0	50	2	10	5	50
13	87	6	93	16	40	35	7
14	33	5	38	42	84	28	62
15	71	0	71	7	21	15	29
16	60	20	80	10	20	12	20
17	75	2	77	62	99	75	23
18	60	4	64	23	57	35	36
19	50	0	50	2	5	3	50
20	84	2	86	44	105	88	14

Tablo 4.1.2. Fertil bireylere ait spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçları (K: Kontrol).

K	Motil Sperm %'si			Sperm sayısı/ml x (10 ⁶)	Total Sperm Sayısı x (10 ⁶)	Total-motil sperm sayısı x (10 ⁶)	Non-motil sperm %'si
	a ileri	b. yerinde	a+b				
1	85	10	95	118	354	294	5
2	81	7	88	108	324	297	12
3	63	27	90	125	250	220	10
4	74	21	95	99	297	246	5
5	81	12	93	101	404	344	7
6	88	12	100	125	250	220	0
7	87	3	90	70	126	110	10

Tablo 4.1.3. Spermiyogram testi mikroskopik analiz sonuçların grup ortalama değerleri (Sayıx10⁶).

Grup	% Motil Sperm	Sperm /ml	Total Sperm	Total Motil Sperm	% Non-moti Sperml
İnfertil	60,15±5,11	29,00±4,88	77,25±17,99	48,15±12,13	39,85±5,11
Fertil	93,00±1,54	106,57±7,30	286,43±33,91	247,29±28,60	7,00±1,54
P<	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05



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

Tablo 4.1.4. İnfertil bireylere ait spermiyogram testi makroskopik analiz sonuçları

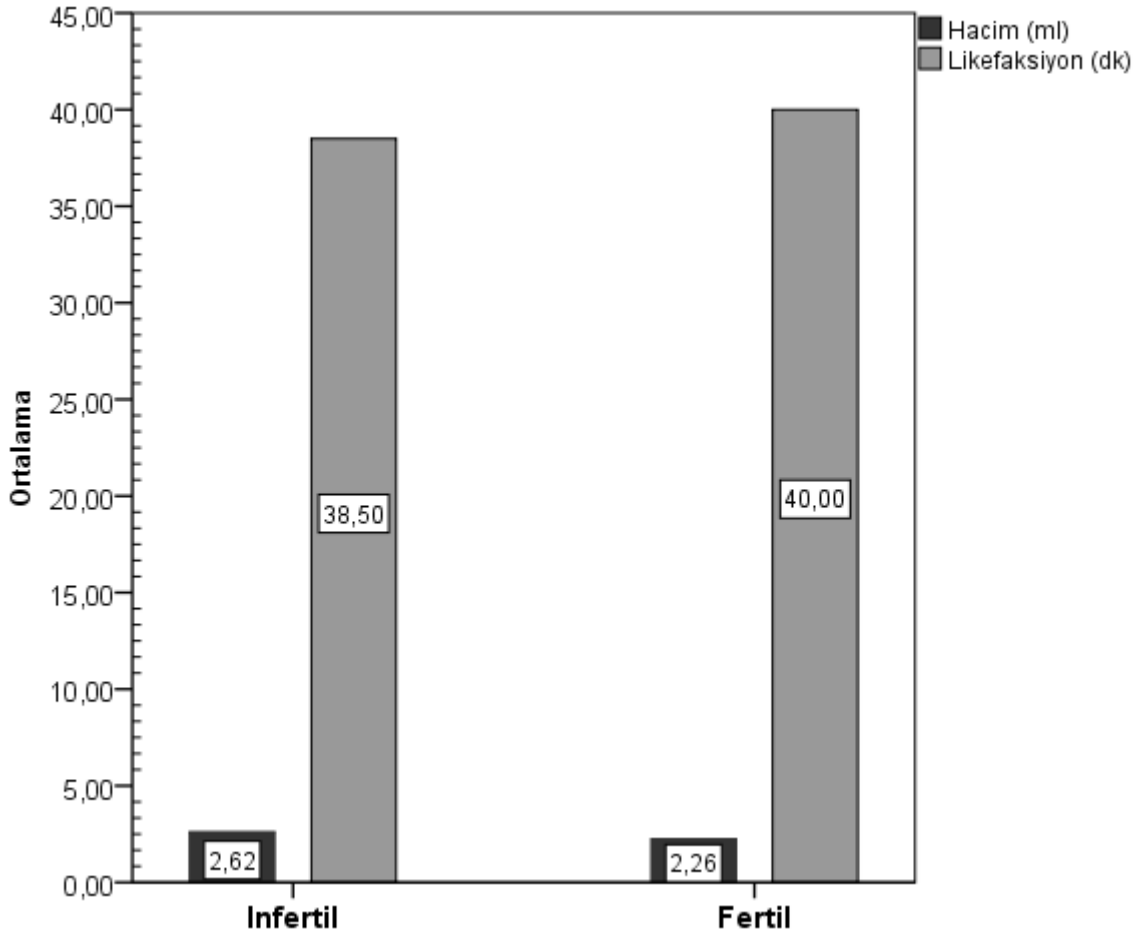
İF	Volüm (ml)	Viskozite	Likefaksiyon Süresi (dak)
1	3	Akıcı	40
2	3	Akıcı	40
3	2	Akıcı	40
4	4	Akıcı	60
5	1,5	Akıcı	40
6	1,5	Akıcı	30
7	4	Akıcı	40
8	2,2	Akıcı	40
9	3,5	Akıcı	30
10	4,5	Akıcı	30
11	0,3	Akıcı	40
12	4	Akıcı	40
13	2,5	Akıcı	40
14	2	Akıcı	40
15	3	Akıcı	60
16	2	Akıcı	30
17	1,6	Akıcı	30
18	2,5	Akıcı	30
19	2,8	Akıcı	40
20	2,4	Akıcı	30

Tablo 4.1.5. Fertil bireylere (Kontrol) ait spermiyogram testi makroskopik analiz sonuçları

K	Volüm (ml)	Viskozite	Likefaksiyon Süresi (dak)
1	2,5	Akıcı	40
2	2	Akıcı	30
3	2,5	Akıcı	40
4	2	Akıcı	50
5	2,5	Akıcı	50
6	2,5	Akıcı	40
7	1,8	Akıcı	30

Tablo 4.1.6. Spermiyogram testi makroskopik analiz sonuçları grup ortalama değerleri

Grup	Volüm (ml)	Likefaksiyon süresi (dk)	Viskozite
Infertil	2,62± 0,23	38,50±1,96	Akıcı/Yoğun
Fertil	2,26± 0,12	40,00±3,09	Akıcı
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 semen ejakülatı sperm hücrelerinin morfolojik şekilleri hakkında bilgi veren bu analizimiz sonucunda infertil ve fertil bireylerden alınan semen örneklerden Diff-quick boyama protokolü ile boyanarak sperm hücreleri Kruger strict kriterlerine göre mikroskobik olarak şekilsel anomli açısından analiz edildi (Tablo 4.2.1,2,3). Çalışmaya dahil edilen infertil ve fertil bireylere ait semen yayması preparatların mikroskobik görüntülerine ait resimler Şekil 4.2.1,2,3,4,5’de gösterilmiştir.

Beklenildiği gibi normal morfolojili sperm hücresi sayılarının fertil grubu bireylerde infertil grubun bireyelerine göre anlamlı bir şekilde yükselmiş olduğu tespit edildi. Dolayısıyla da anomalili sperm hücrelerinin sayısı infertil gruba ait bireylerde fazla idi.

Her iki grupta ta kuyruk anomalili sperm hücrelerli diğer anomalilerden daha yüksek oranda idi. infertil bireylerde fertil bireyler ile karşılaştırıldıklarında kuyruk anomalisinin daha yüksek oranda artış göstermiş olduğu gözlemlendi (Tablo 4.2.1)

Kuyruk anomlisiden sonra sperm hücrelerindeki anomli artışı en fazla sperm hücrelerinin boyun bölgesinde olduğu tespit edildi. İnfertil bireylerde bu artış istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek orada idi (Tablo 4.2.2)

Sperm hücrelerindeki baş bölgesi anomlisi diğer hücre bölgesindeki anomalilerine göre daha az oranda olduğu tespit edildi. Baş anomalili spermlerin sayısının infertil grubunda fertil bireylerdekine göre istatistiksel anlamlı olacak şekilde yüksek olduğunu bulundu Tablo 4.2.3)

Özetle kruger strikt sperm morfoloji analizin tüm ana parametreleri açısından infertil grupta fertil gruba göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde belirgin bir artışı olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$).

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

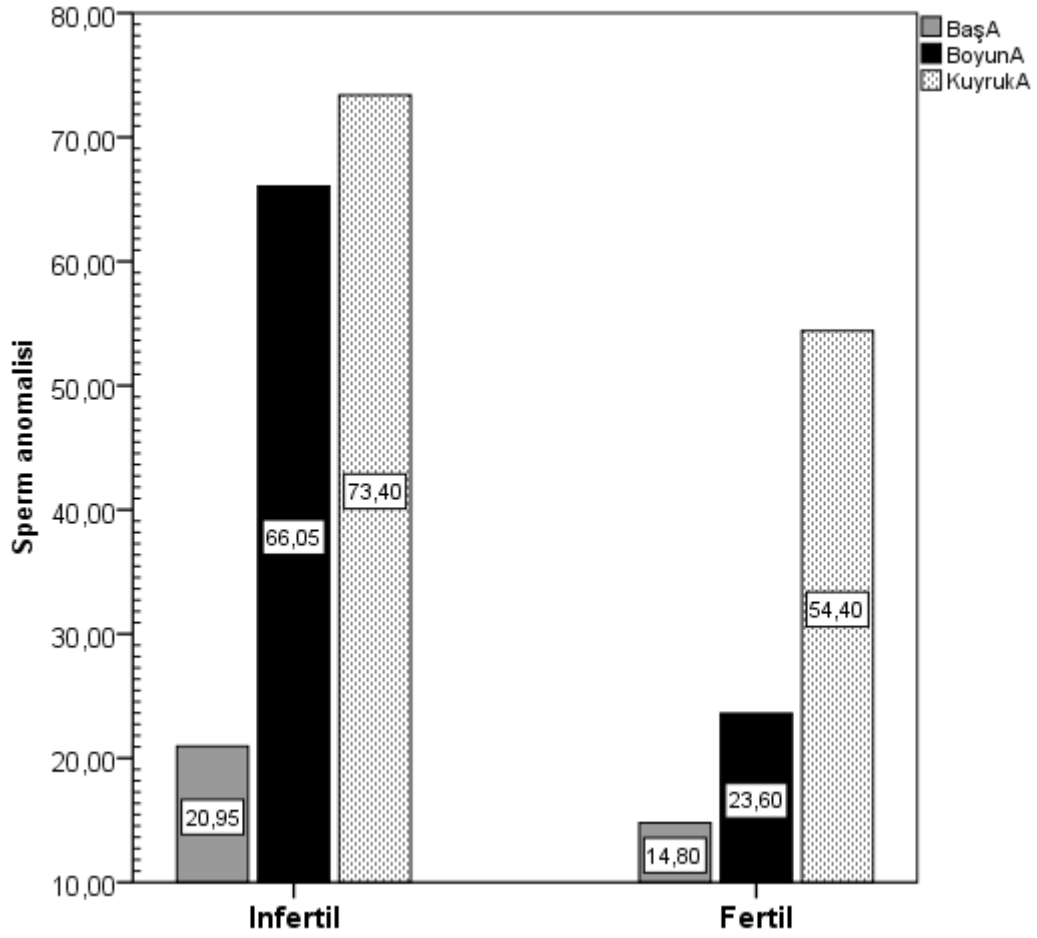
İF	Baş A	Boyun A	Kuyruk A	% A	% N
1	23	68	82	86,5	13,5
2	15	75	76	83	17
3	22	66	82	85	15
4	24	72	83	85,5	14,5
5	22	60	57	69,5	30,5
6	23	67	75	82,5	17,5
7	22	72	74	84	16
8	21	66	76	81,5	18,5
9	23	59	60	71	29
10	22	62	70	77	23
11	23	79	76	89	11
12	26	62	56	72	28
13	21	56	71	74	26
14	19	76	79	83	17
15	23	52	69	72	28
16	18	78	69	82,5	17,5
17	19	61	82	81	19
18	19	66	77	81	19
19	16	54	75	72,5	27,5
20	18	70	79	83,5	16,5

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

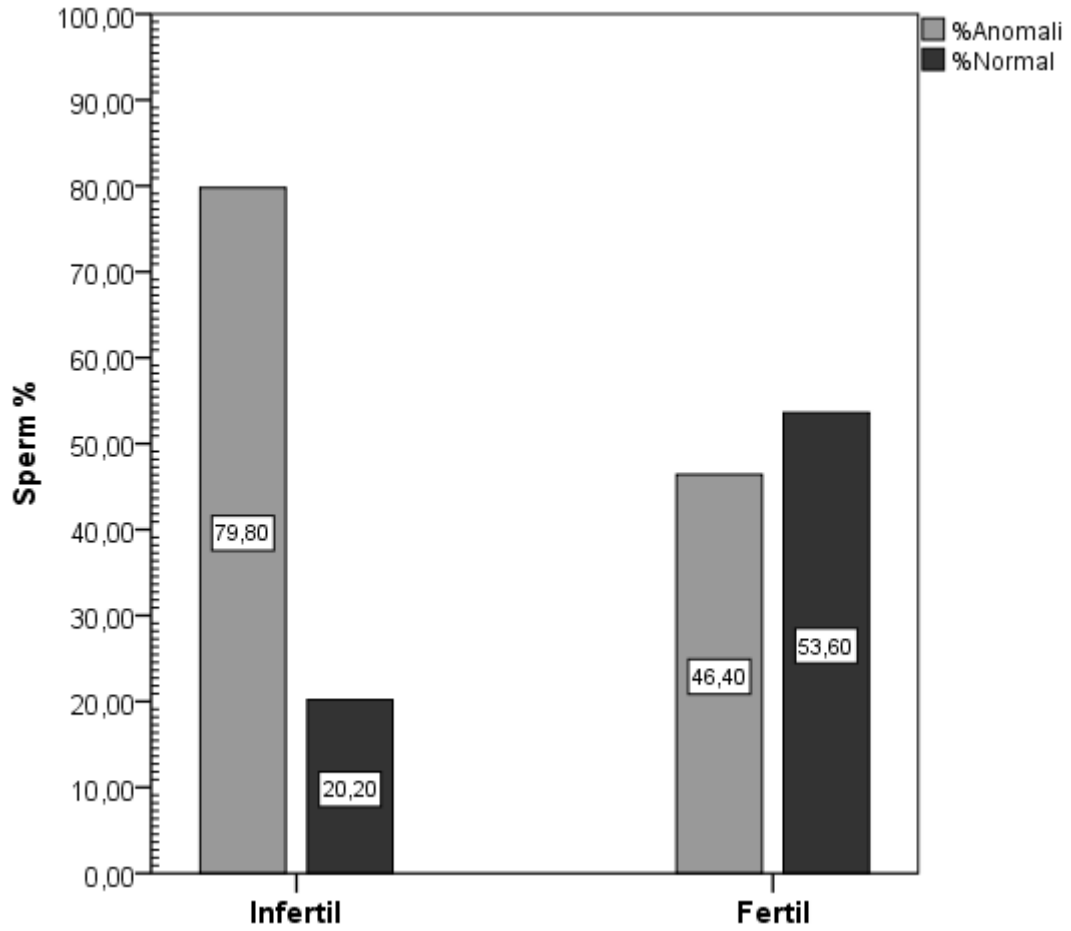
K	Baş A	Boyun A	Kuyruk A	%A	%N
1	9	19	59	43,5	56,5
2	13	28	57	49	51
3	15	27	54	48	52
4	19	26	49	47	53
5	18	18	53	44,5	55,5

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

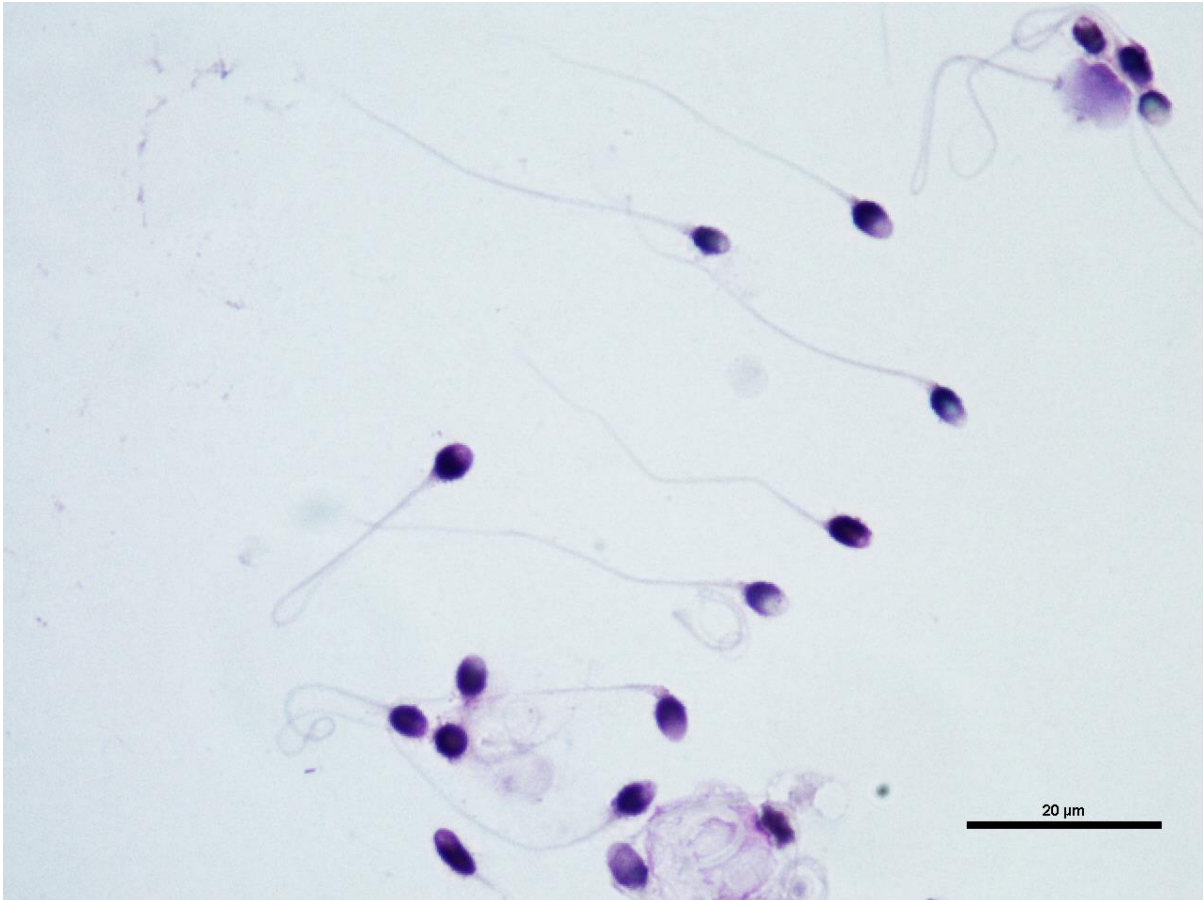
Grup	Baş A	Boyun A	Kuyruk A	Yüzde A	Yüzde N
İnfertil	20,95 \pm ,63	66,05 \pm 1,75	73,40 \pm 1,79	79,80 \pm 1,32	20,20 \pm 1,32
Fertil	14,80 \pm 1,80	23,60 \pm 2,11	54,40 \pm 1,72	46,40 \pm 1,04	53,60 \pm 1,04
P<	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005



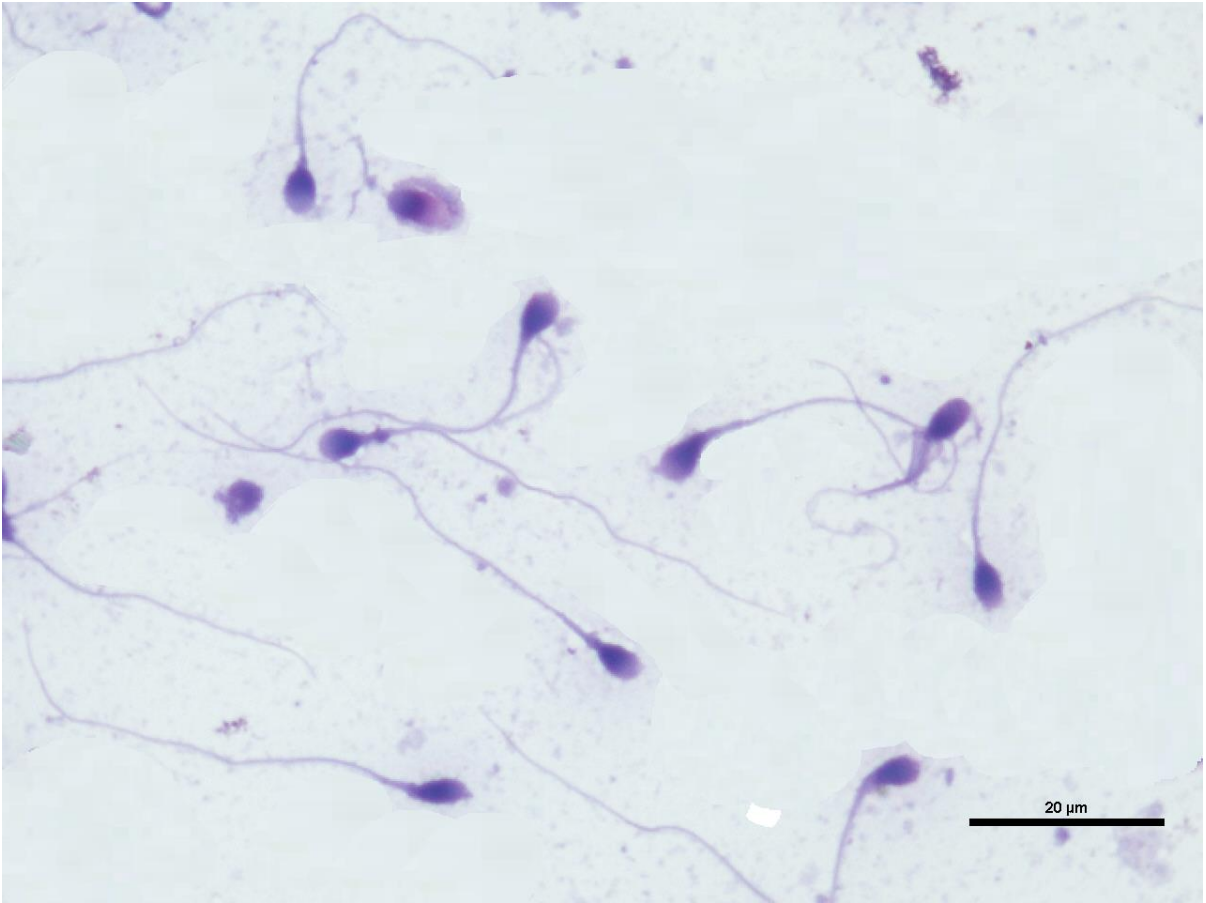
Şekil 4.2.1.Sperm hücrelerinin baş, boyun ve kuyruk anomalilerinin grupların ortalama değerlerinin karşılaştırmalı grafiksel görünümü.



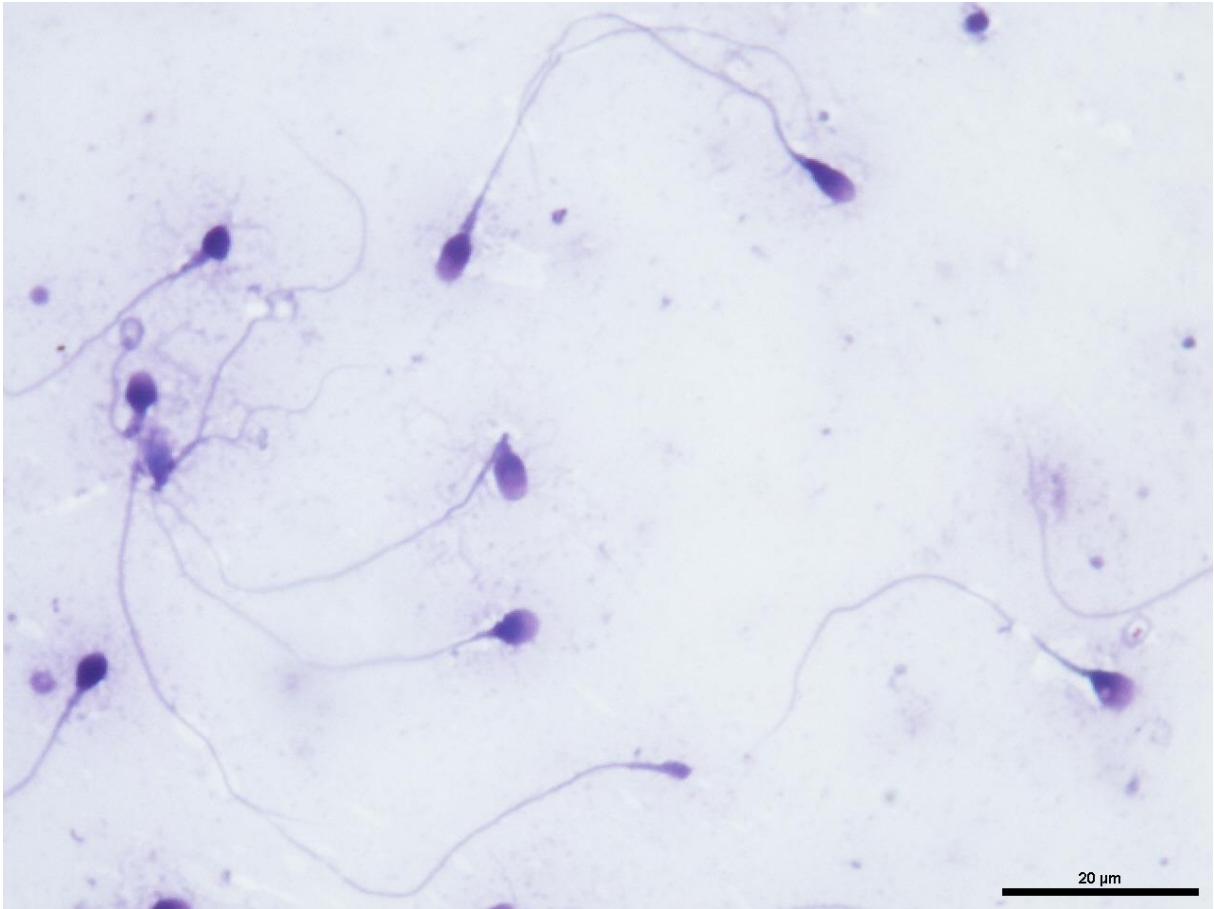
Şekil4.2.2. Anomalili ve normal sperm yüzdelerinin grup ortalaması değerlerinin grafiksel karşılaştırmalı



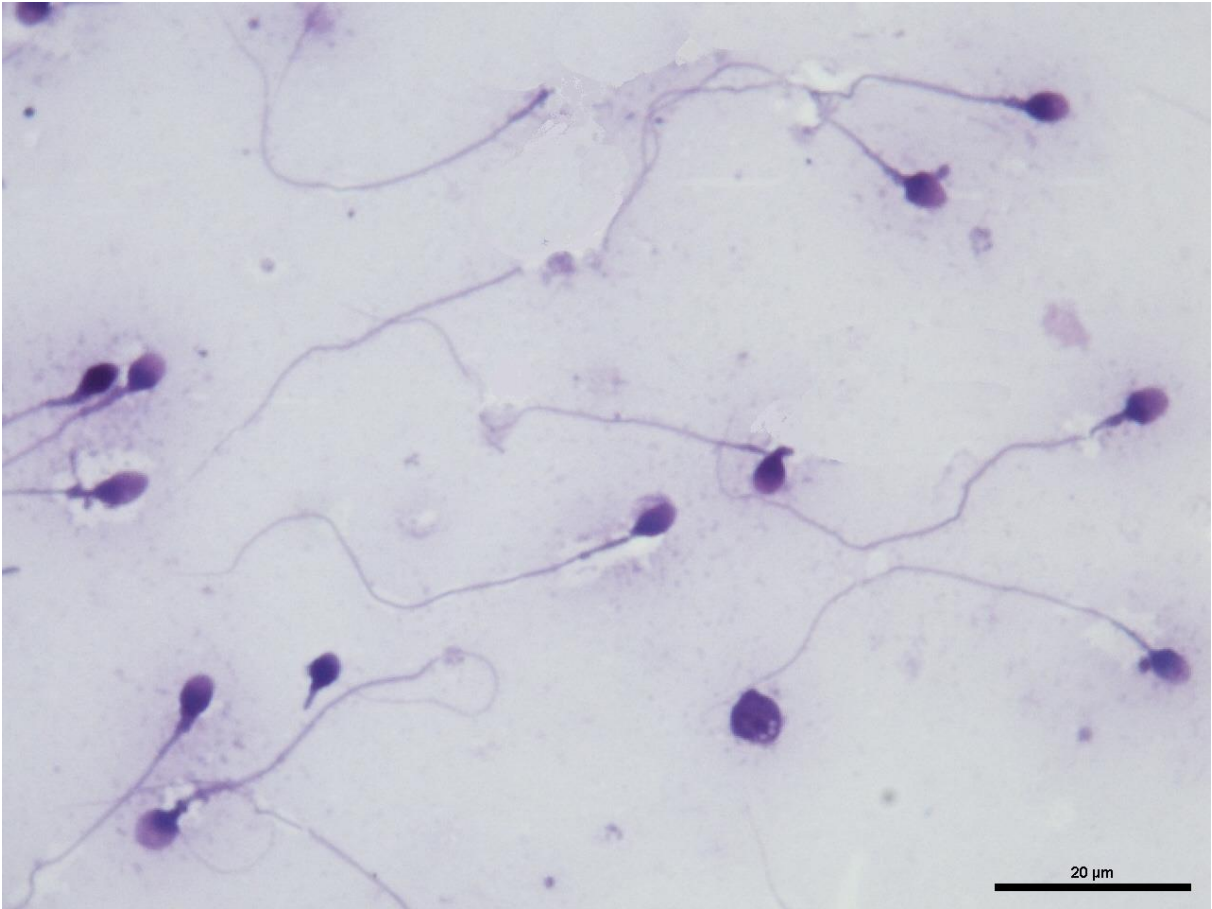
Şekil 4.2.3. Fertil bireye ait sperm hücreleri mikroskobik görüntüsü (Diff-quick, 100xObj Bar:20 µm)



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 mikroskobik görüntüsü (Diff-quick, 100xObj, Bar:20)



Şekil 4.2.5.İnfertil bireye ait sperm hücreleri mikroskobik görüntüsü (Diff-quick, 100xObj, Bar:20)

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamız sonucunda infertil ve fertil bireylere ait immünohistokimyasal boyalı sperm yayması preparatlarında sperm hücrelerindeki aquaporin proteinlerinden aqp-3, aqp7 ve aqp8 proteinlerinin immünohistokimyasal ekspresyonları ışık mikroskobu altında boyama şiddetine göre değerlendirilerek immünoreaksiyon aktiviteleri tespit edildi. İmmün boyanma şiddetlerinin ağırlıklı ortalama değerleri sonuçları oyanma H-Skorlama sistemine dönüştürülerek semi kantitatif olarak derecelendirildi [48, 49]. Hesaplanan H-Skorlama değerlerin grup ortalama değerlerin istatistiki karşılaştırmaları yapılarak her bir protein ekspresyonu bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık olup olmadığı gözlemlendi.

Her üç aquaprotein molekülü ekspresyonlarının benzer oranlarda fertil bireylere ait olan sperm hücrelerinde çok az bir miktar yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 4.3.1,2). Ancak istatistiksel olarak karşılaştırıldıklarında infertil ve fertil grupların sperm hücreleri aquaporin molekülleri ekspresyonlarının birbirleri ile farklı olmadıkları ve benzer oldukları analiz edildi (Şekil 4.3.3). Fertil ve infertil gruplara ait her bir aquaporin molekülü (aqp-3, aqp7 ve aqp8) immünohistokimyasal ekspresyonlarına ait temsili mikroskobik görüntü resimleri Şekil4.3.2,3,4,5,6 ve 7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.1. Fertil bireylere ait sperm hücreleri Aquaporin molekülleri immünohistokimya analiz sonuçları H-skor değerleri (F: Fertil)

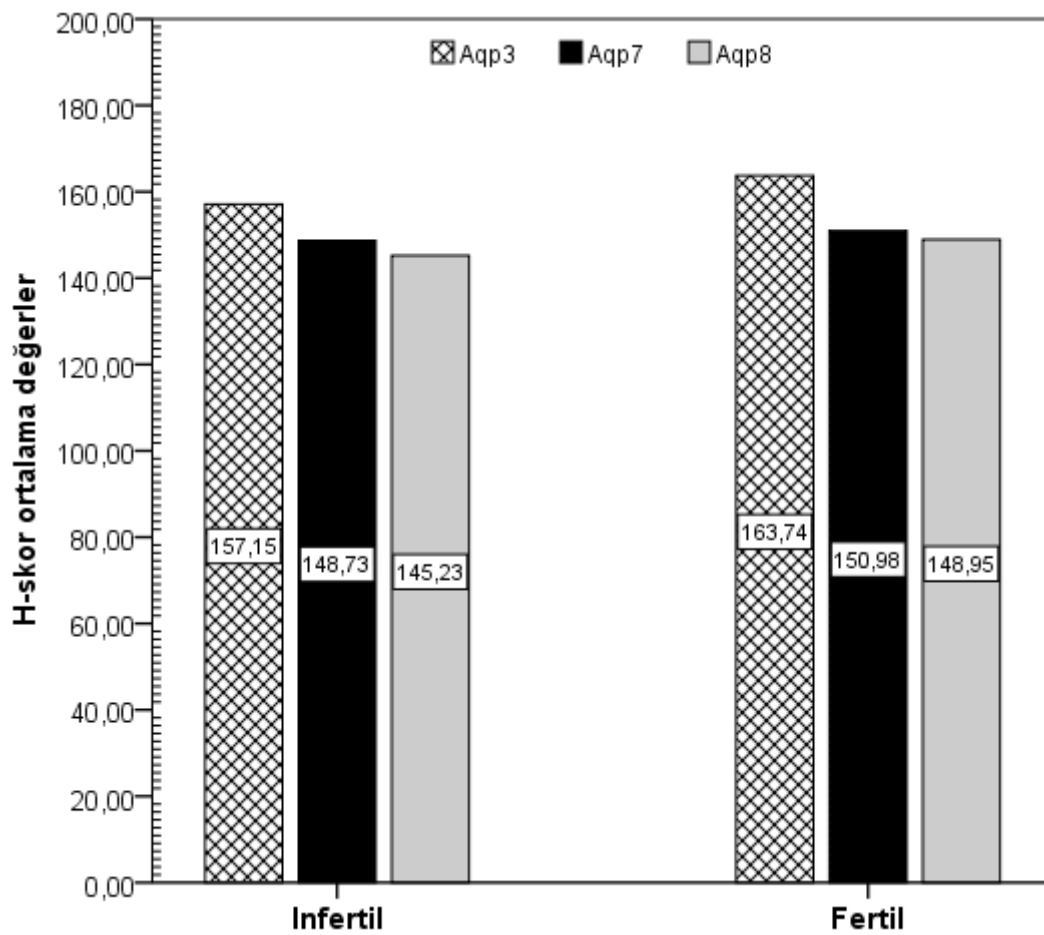
K	Aq-3	Aq-7	Aq-8
1	164,78	156,77	170,95
2	148,74	149,17	143,14
3	181,23	141,15	137,03
4	147,10	132,97	125,91
5	176,87	174,86	167,74

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

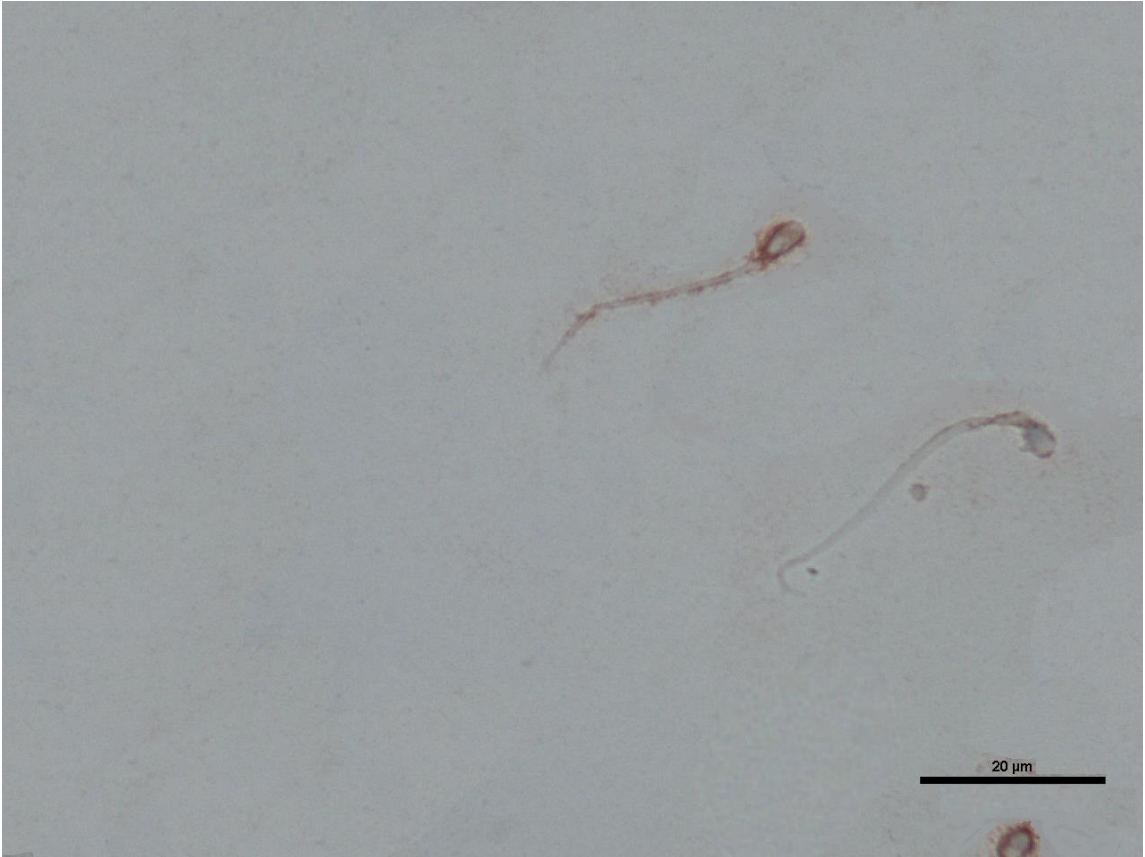
İF	Aq-3	Aq-7	Aq-8
1	152,20	163,27	155,69
2	173,70	178,22	148,16
3	172,28	187,69	145,33
4	152,63	141,95	140,35
5	168,00	172,85	144,36
6	147,56	153,98	162,43
7	168,83	137,14	137,03
8	168,59	155,52	128,32
9	157,19	125,93	134,73
10	153,98	130,62	187,69
11	151,21	151,01	141,15
12	149,39	132,28	119,70
13	140,99	128,28	149,56
14	143,55	123,50	138,74
15	152,20	163,27	155,69
16	173,70	178,22	148,16
17	172,28	187,69	145,33
18	152,63	141,95	140,35
19	168,00	172,85	144,36
20	147,56	153,98	162,43

Tablo 4.3.3.Aq-3, Aq-7 ve Aq-8 immünohistokimyasal boyanma şiddetleri H-skorları ağırlıklı grup ortalama değerleri(\pm : sem).

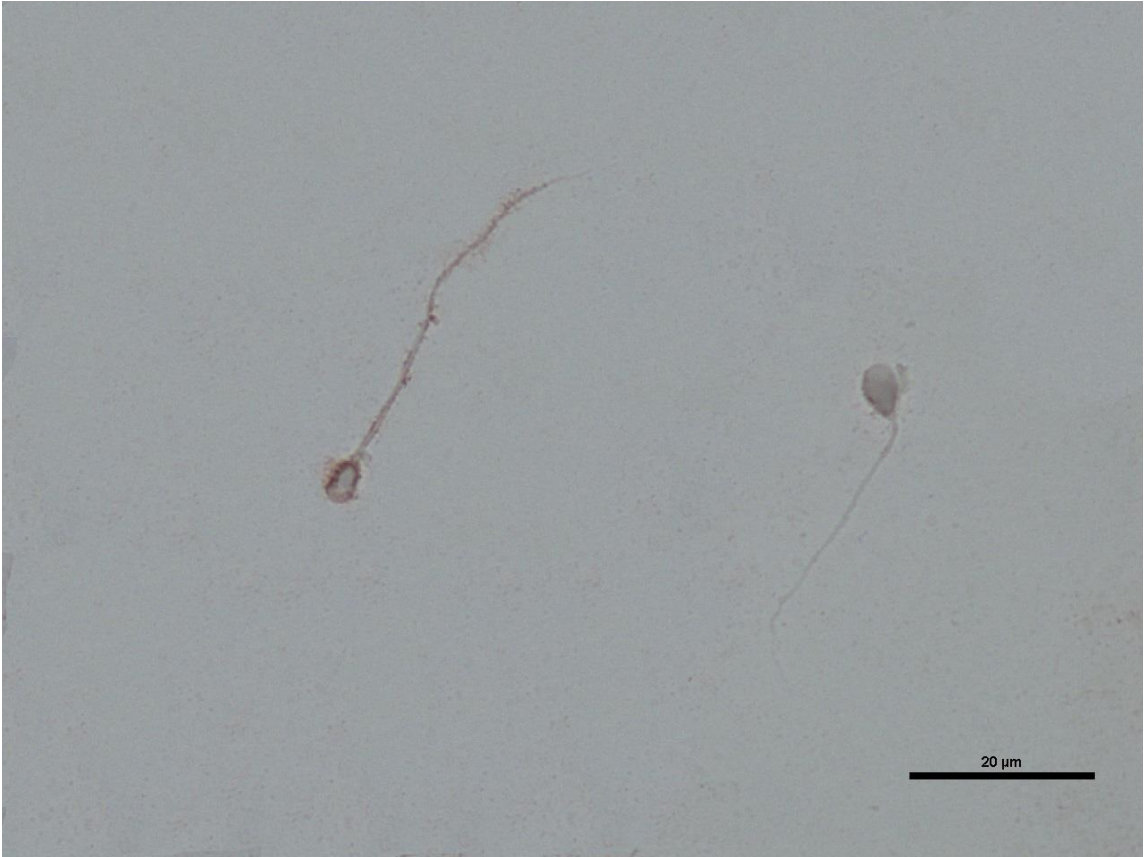
Grup	Aq-3	Aq-7	Aq-8
İnfertil	157,15 \pm 2,94	148,73 \pm 5,55	145,23 \pm 4,34
Fertil	163,74 \pm 7,00	150,98 \pm 7,17	148,95 \pm 8,79
P >	0.005	0.005	0.005



Şekil 4.3.1. Aq-3, Aq-7, Aq-8 İHK boyanma şiddeti H-Skorları grupların ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması.*:p=0.001



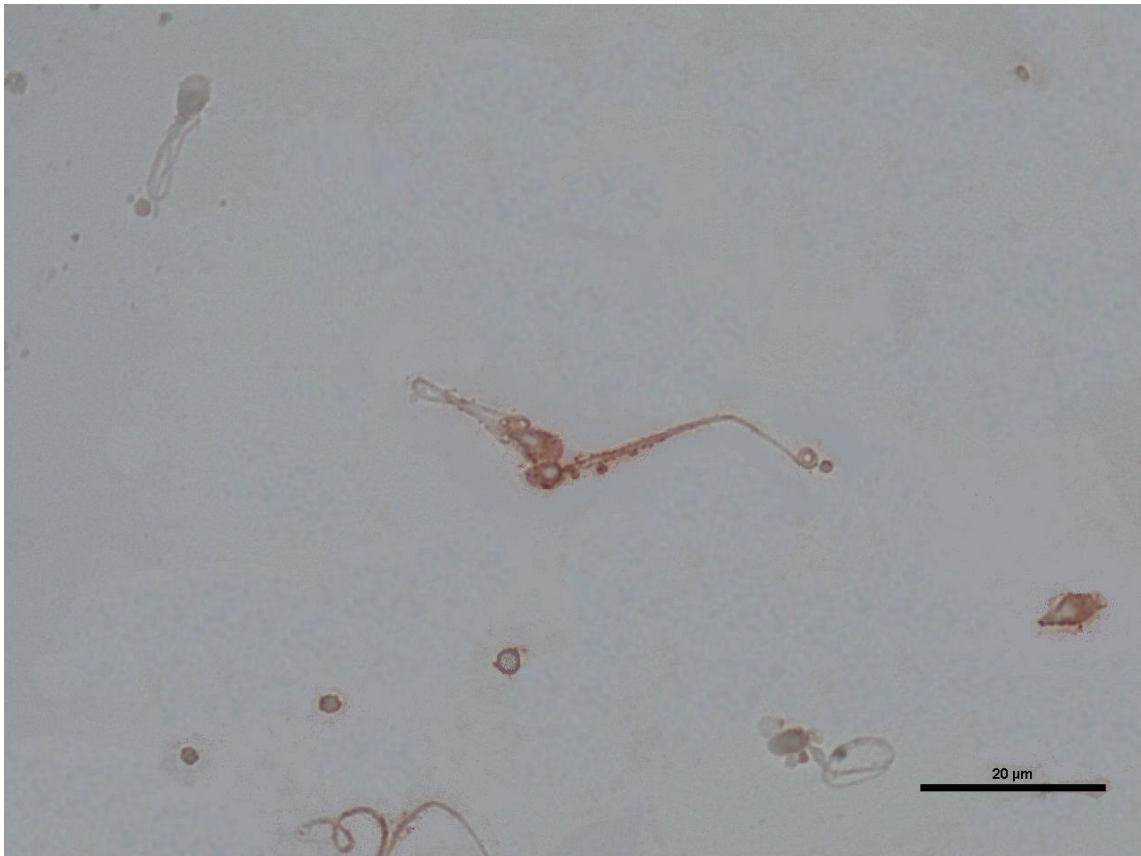
Şekil 4.3.2. Fetil bireyde Aqp-3 Ab immun boyanmış sperm hücresi (İHK,100xobj, Bar 20 µm)



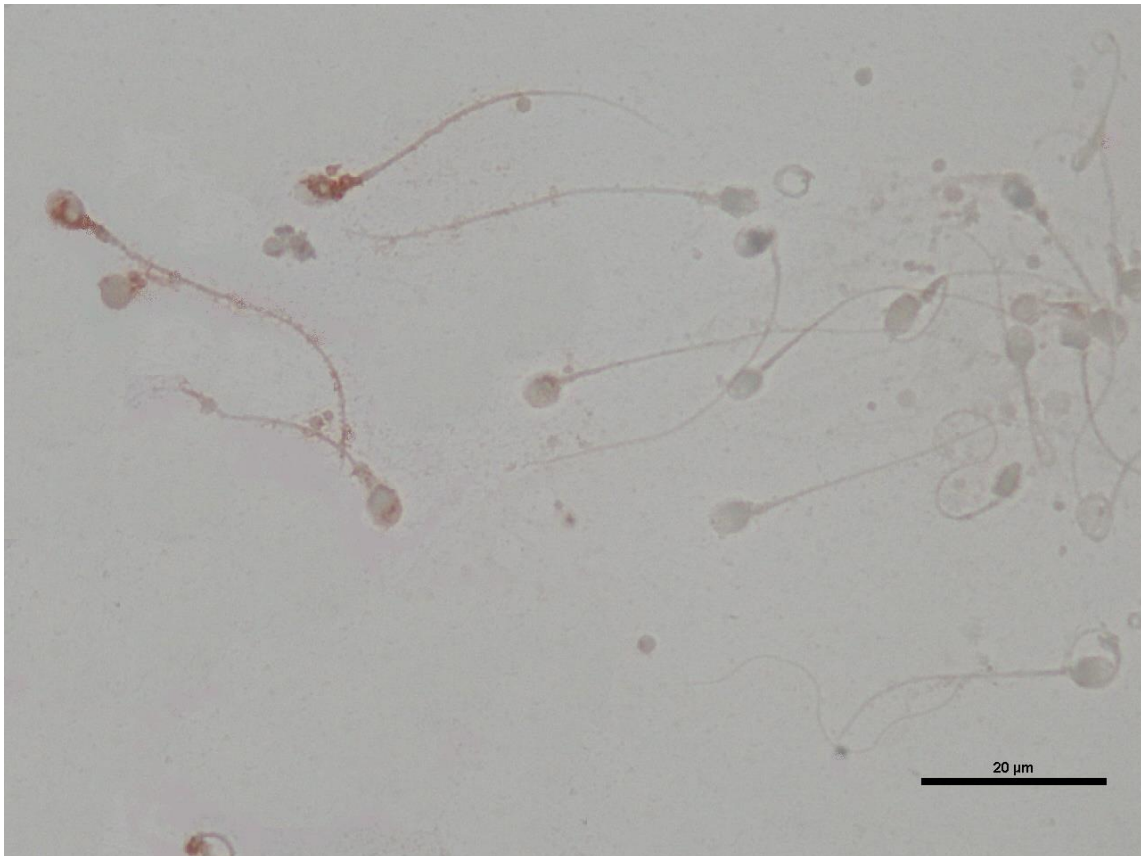
Şekil 4.3.3. İnfertil bireyin Aqp-3 Ab immun boyanmış sperm hücresi (İHK,100xobj, Bar 20 µm)



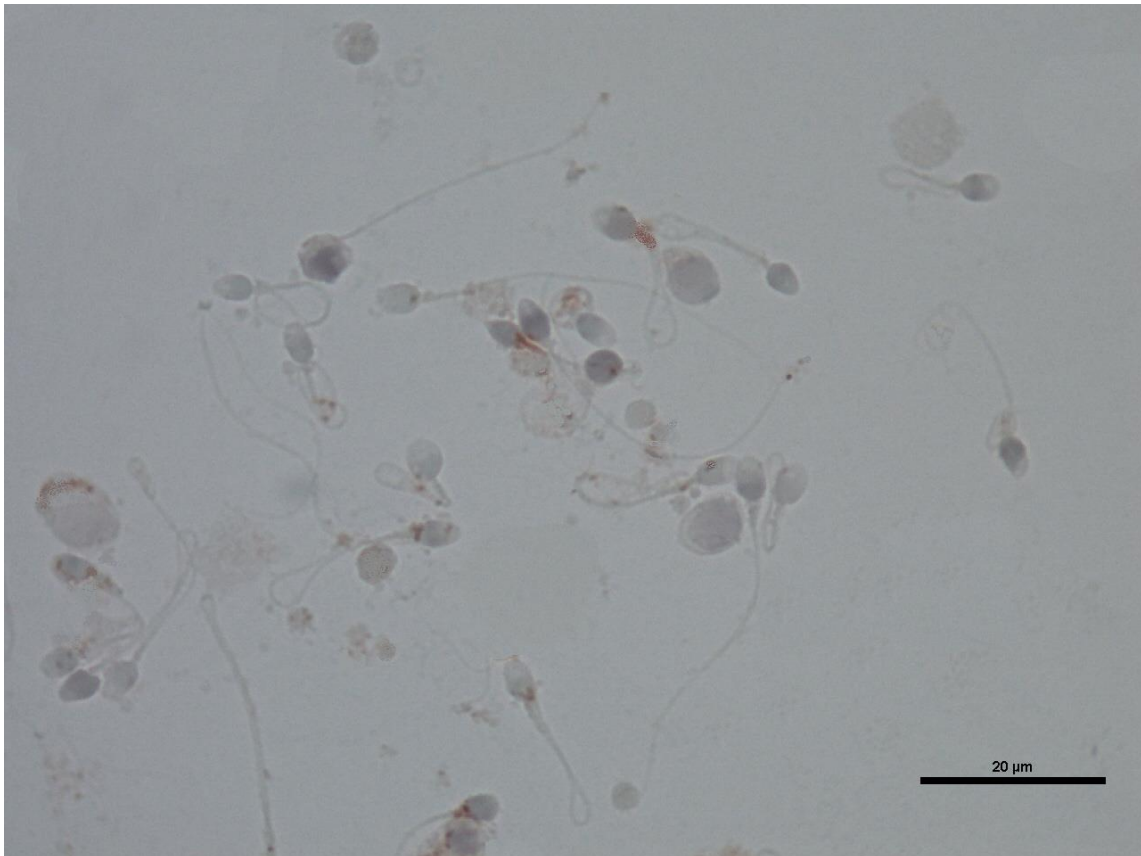
Şekil 4.3.4. Fetil bireyin Aqp-7 Ab immun boyanmış sperm hücresi (İHK,100xobj, Bar 20 μ m)



Şekil 4.3.5. İnfertil bireyin Aqp-7 Ab immun boyanmış sperm hücresi (İHK,100xObj, Bar 20 µm)



Şekil 4.3.6. Fertil bireyin Aqp-8 Ab immun boyanmış sperm hücresi (İHK,100xObj, Bar 20 μm)



Şekil 4.3.7. Fertil bireyin Aqp-8 Ab immun boyanmış sperm hücresi (İHK,100xObj, Bar: 20 μm)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Halk arasında kısırılık olarak ta bilinen infertilite, düzenli ve korunmasız bir cinsel ilişkiye rağmen bir sene sonunda gebeliğin elde edilememesi olarak tanımlanır. Bu durum önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir [1, 2]. İnfertilitenin etiyojisinde erkek faktörlerin direkt veya indirekt olarak katkısı %50 oranındadır [6]. Biz de bu çalışmamızı erkek infertilitesi ile ilgili olarak planladık.

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre sadece bir semen analizi kişinin semen kalitesini değerlendirmek için yeterli olmayıp, temel verileri elde etmek için iki veya üç örnek incelenmesi yararlı olacağı bildirilmiştir [14, 15]. Bu nedenle bir bireye ait örnekler üzerinde farklı en az iki analiz yapılacak şekilde çalışmamız planlanmıştır ve infertilite belirleme kriterleri olarak değerlendirilmeyen ancak infertilite parametreleri standart değerini etkileyebileceğini düşündüğümüz aqp moleküllerinden sperm hücrelerindeki varlığı tespit edilmiş olanlardan; aqp3, aqp7 ve aqp8 moleküllerini immünohistokimyasal olarak analiz ettik.

Sperm fertilizasyon kapasitesi birçok farklı moleküle bağlı olabilmektedir. Aqp 3, 7 ve 8 molekülleri sperm hücrelerinin plazma zarlarında bulunduğu tespit edilmiş olan ve hücrelerin hayatiyetinin ve fonksiyonlarının devam ettirilmesi için mutlaka gerekli olan su moleküllerinin geçişini sağlayan proteinlerdir [8]. Bu nedenlerle bu moleküller sperm hücrelerinin canlılığı ve hareketi ile doğrudan ilgilidir [9]. ile sperm hücrelerinin fertilizasyon kapasitesi üzerinde etkili olup erkek infertilitesi ile ilişkili olabilir.

İnsan sperm hücrelerinde yapılan çalışmalarda aqp-7 molekülünün sperm hücrelerinin hem genel olarak hem de baş kısımları çevresi plazma membranında, aqp-8 moleküllerinin spermatozoa hücrelerin daha çok orta parçası hücre zarında, aqp-3 moleküllerinin ise daha çok sperm hücresi kuyruk bölgesi plazmalemmasında bulunduğu tespit edilmiştir [50-52]. Ayrıca bu çalışmalarda sperm sayısı, hareketlilik ve aqp moleküllerinin işleyişi arasında

ilişkinin varlığı bildirilmiştir [52]. Ayrıca Chen ve arkadaşları da sperm osmoregülasyon mekanizmasında aqplerin katkılarının olduğunu belirtmektedirler [50]. Aqp moleküllerin sperm hücrelerindeki lokalizasyonları bakımından bu çalışmanın sonuçları ile bizim çalışmamız sonuçları genel olarak uygunluk göstermektedir. Sperm hücresinin orta parçası hücre zarında yoğun ekspresyon gösteren aqp-8 molekülleri orta parçada bulunan çok sayıdaki mitokondri organeli zarında bulunan aqp-8 moleküllerinden de kaynaklanmış olabilir.

Spermatozoon testistlerden yumurtalığa kadar ozmotik basınca cevap olarak bir takım fizyolojik olarak bir takım değişikliklere uğrar. Sperm hücre büyüklüğü, şekli, fonksiyonu için sabit bir hücre boyutunun korunması önemlidir. İyon kanallarının yanı sıra, su kanalları sperm hacminin düzenlenmesinde önemli etkilere sahiptir. Yapılan bir çalışmada genel olarak, aqp-8'in normal bir spermatogenez için gerekli olan sperm hacmi düzenlenmesi bakımından önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir [8]. Başka bir çalışmada da aqp-7 ve aqp-8'in testislerde germ hücrelerinin olgunlaşmasına yardımcı olduğu ve spermatogenezde rol oynadığını göstermiştir [53, 54].

Atieh Alyasin ve arkadaşları, Aqp'lerin hücre hacminin düzenlenmesinde ve insan sperm hücrelerinin detoksifikasyonunda önemli rollerinin olduğunu ve özellikle de aqp-3 hücre hacminin düzenlenmesinde daha önemli bir rol oynadığını belirtmişlerdir [55].

Saito ve arkadaşları; aqp-7 molekülü eksikliğinin erkeklerde infertilite nedeni olabileceğini, fertil erkeklerde aqp-7 molekülünün olduğunu infertil erkeklerde ise bulunmadığını bildirmişlerdir [11]. Yapmış olduğumuz bu çalışmamızda saito ve arkadaşlarının iddialarının aksine infertil bireylerin sperm hücrelerinde de aqp-7 molekülü ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu durum belki infertilitenin tipi ile de ilişkili olabileceğini akla getirmektedir.

Bahsedilen tüm bu literatür çalışmalarındaki bilgilerinden de anlaşılacağı gibi infertilite genetik, kaynaklı olabileceği gibi daha çok dış ve iç çevresel faktörlerdeki olumsuzluklardan kaynaklanabilmektedir. Sperm hücrelerinde morfolojik, sayısal ve fonksiyonel yetersizlik veya kusurlar bulunabilir. Bu sorunların belli kritik değerlerin üzerinde olması ise yetişkin erkek bireylerde halk arasında kısırılık olarak bilinen infertiliteye yol açmaktadır.

Özette bu tez çalışması sonucunda gruplardaki bireylerin spermiyogram sonuçları ile Kruger strickt sperm morfolojisi değerlerinin karşılaştırılmasından gruplardan birinin fertil bireylerden oluşmuş olduğu, diğerinin ise infertil bireylerden oluştuğu kesinleştirilmiştir. Fertil ve infertil bireylerin sperm hücrelerinde aqp-3, aqp7, ve aqp-8 moleküllerinin immünohistokimyasal ekspresyonlarının infertil bireylerde bir miktar düşüş göstermiş olsa da gruplar arasında bir farklılık göstermemiştir. Ancak mevcut sonuçlarımıza göre infertilite ile aquaporin molekülleri ekspresyonları arasındaki tam olarak bir ilişkinin olmadığını iddia etmek doğru olmayacaktır. Bu nedenle daha üst düzey ileri tekrarlı çalışmaların sonuçlarına göre kesin bir yargıya varmak daha gerçekçi olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kaya Z, Sogut E, Cayli S, Suren M, Arici S, Karaman S, Erdemir F: **Evaluation of effects of repeated sevoflurane exposure on rat testicular tissue and reproductive hormones.** *Inhal Toxicol* 2013, **25**(4):192-198.
2. 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.
3. Gevrek F, Aydin D, Ozsoy S, Aygun H, Bicer C: **Inhibition by Egb761 of the effect of cellphone radiation on the male reproductive system.** *Bratisl Lek Listy* 2017, **118**(11):676-683.
4. Pei L, Yang G, Jiang J: **Diyabetik ratların prostat ve seminal veziküllerinde aquaporinlerin ekspresyonu.** *J Sex Med* 2013, **10**:2975-2985.
5. Pei L, Yang G, Jiang J, Jiang R, Deng Q, Chen B, Gan X: **Expression of aquaporins in prostate and seminal vesicles of diabetic rats.** *J Sex Med* 2013, **10**(12):2975-2985.
6. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C: **(European Association of Urology Working Group on Male, Infertility) European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update.** *Eur Urol* 2012, **62**(2):324-332.
7. Sales AD, Lobo CH, Carvalho AA, Moura AA, Rodrigues AP: **Structure, function, and localization of aquaporins: their possible implications on gamete cryopreservation.** *Genet Mol Res* 2013, **12**(4):6718-6732.
8. Yeung C, Callies C, Tüttelmann F, Kliesch S, Cooper T: **Aquaporins in the human testis and spermatozoa—identification, involvement in sperm volume regulation and clinical relevance.** *Int J Androl* 2010, **33**(4):629-641.
9. 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, **58**(3):129-135.
10. Laforenza U, Pellavio G, Marchetti AL, Omes C, Todaro F, Gastaldi G: **Aquaporin-Mediated Water and Hydrogen Peroxide Transport Is Involved in Normal Human Spermatozoa Functioning.** *Int J Mol Sci* 2017, **18**(1):66.
11. 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 Pt 1):2073-2076.
12. Nelson SM, Fleming R: **Obesity and reproduction: impact and interventions.** *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007, **19**(4):384-389.
13. Maeda N, Hibuse T, Funahashi T: **Role of aquaporin-7 and aquaporin-9 in glycerol metabolism; involvement in obesity** In: *Aquaporins*. Springer; 2009: 233-249.
14. WHO: **World health statistics 2010:** World Health Organization; 2010.
15. Gökçe A: **Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre standart semen analizi.** *Turk Urol Sem* 2011, **2**:1-7.
16. Nurmio M, Keros V, Lahteenmaki P, Salmi T, Kallajoki M, Jahnukainen K: **Effect of childhood acute lymphoblastic leukemia therapy on spermatogonia populations and future fertility.** *J Clin Endocrinol Metab* 2009, **94**(6):2119-2122.
17. Heller CG, Moore DJ, Paulsen CA: **Suppression of spermatogenesis and chronic toxicity in men by a new series of bis(dichloroacetyl) diamines.** *Toxicol Appl Pharmacol* 1961, **3**(1):1-11.
18. Amann RP: **Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals.** *Environ Health Perspect* 1986, **70**:149-158.

19. Moore K, Persaud T, Torchia M: **İnsan embriyolojisi**. *Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara* 2002.
20. Junqueira L, Editörleri CJÇJ: **(Solakoğlu S, Aytekin Y.) Temel Histoloji Text Atlas**. *İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi* 2009.
21. Moore K, Persaud T: **Embriología clínica. 8th ed. Rio de Janeiro: Elsevier**. In.: Barcelona: Editorial Gea; 2009.
22. Ovalle WK, Netter FH, Chovan J, Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P: **Netter temel histoloji**: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009.
23. Tournaye H: **Evidence-based management of male subfertility**. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006, **18**(3):253-259.
24. WHO: **World Health Organization**: World Health Organization; 1993.
25. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K: **Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization**. *Fertil Steril* 1986, **46**(6):1118-1123.
26. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ: **DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality**. *Journal of andrology* 2000, **21**(1):33-44.
27. Carrell DT: **The clinical implementation of sperm chromosome aneuploidy testing: pitfalls and promises**. *J Androl* 2008, **29**(2):124-133.
28. Carrell DT: **Semen analysis at the turn of the century: An evaluation of potential uses of new sperm function assays**. *Arch Andrology* 2000, **44**(1):65-75.
29. Ombelet W, Menkveld R, Kruger TF, Steeno O: **Sperm morphology assessment: historical review in relation to fertility**. *Hum Reprod Update* 1995, **1**(6):543-557.
30. Eisinger SH, Bonfiglio T, Fiscella K, Meldrum S, Guzick DS: **Twelve-month safety and efficacy of low-dose mifepristone for uterine myomas**. *J Minim Invasive Gynecol* 2005, **12**(3):227-233.
31. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA *et al*: **Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men**. (*National Cooperative Reproductive Medicine, Network*) *N Engl J Med* 2001, **345**(19):1388-1393.
32. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA *et al*: **Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men**. *N Engl J Med* 2001, **345**(19):1388-1393.
33. WHO: **Expert Committee on Diabetes Mellitus [meeting held in Geneva from 25 September to 1 October 1979]: second report**. WHO 1980.
34. Aydos SE, Elhan AH, Tükün A, obstetrics: **Is telomere length one of the determinants of reproductive life span?** *Arch Gynecol Obstet* 2005, **272**(2):113-116.
35. Erdemir F, Fırat F, Gençten Y: **Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi**. *J Turk Urol Sem* 2011, **2**:11-17.
36. Jones KS: **Synonymy and semantic classification (Publication of Ph.D. thesis, University of Cambridge, 1964.)** vol. 1. Edinburgh: Edinburgh University Press 1986.
37. WHO: **World Health Organization**, vol. 1: World Health Organization; 2004.
38. 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**(5):281-285.
39. Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Namiki M, Koh E, Kanaya J, Okuyama A, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K *et al*: **Semen quality of fertile Japanese**

- men: a cross-sectional population-based study of 792 men.** *BMJ Open* 2013, **3**(1):e002223.
40. Rigot J, Mahe P, Gervais R, Dumur V, Lemaitre L, Mazeman E: **Correlation of genitourinary abnormalities, spermiogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens.** *Prog Urol* 1998, **8**(3):370-376.
 41. von 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.** *Fertility sterility* 2000, **73**(6):1226-1231.
 42. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J *et al*: **Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities.** *Hum Reprod* 2002, **17**(2):503-515.
 43. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A: **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**(7):1562-1567.
 44. 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**(2):103-116.
 45. 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**(5):369-382.
 46. Eliasson R: **Analysis of semen.** In: Behrman SJ, Kistner RW, eds. *Progress in Infertility* 1975:691-713.
 47. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, Morshedi M, Brugo S: **New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization.** *Urology* 1987, **30**(3):248-251.
 48. Gevrek F, Bicer C, Kara M, Erdemir F: **The ameliorative effects of Ginkgo biloba on apoptosis, LH-R expression and sperm morphology anomaly in testicular torsion and detorsion.** *Andrologia* 2018, **50**(4):e12969.
 49. Godbole GB, Modi DN, Puri CP: **Regulation of homeobox A10 expression in the primate endometrium by progesterone and embryonic stimuli.** *Reproduction* 2007, **134**(3):513-523.
 50. Chen Q, Duan EK: **Aquaporins in sperm osmoadaptation: an emerging role for volume regulation.** *Acta Pharmacol Sin* 2011, **32**(6):721-724.
 51. Ishibashi K, Hara S, Kondo S: **Aquaporin water channels in mammals.** *Clin Exp Nephrol* 2009, **13**(2):107-117.
 52. Skowronski MT, Skowronska A, Rojek A, Oklinski MK, Nielsen S: **Prolonged Starvation Causes Up-Regulation of AQP1 in Adipose Tissue Capillaries of AQP7 Knock-Out Mice.** *Int J Mol Sci* 2016, **17**(7):1101.
 53. Calamita G, Mazzone A, Bizzoca A, Svelto M: **Possible involvement of aquaporin-7 and -8 in rat testis development and spermatogenesis.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **288**(3):619-625.
 54. Kageyama Y, Ishibashi K, Hayashi T, Xia G, Sasaki S, Kihara K: **Expression of aquaporins 7 and 8 in the developing rat testis.** *Andrologia* 2001, **33**(3):165-169.
 55. Alyasin A, Momeni HR, Mahdiyeh M: **Expression of Aquaporin-3 and the role of aquaporins in human sperm motility.** *Reprod Syst Sex Disord* 2018, **7**:C1-008.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Arif AKYÖRÜK

Doğum Tarihi: 10/02/1985

Medeni Hali: Evli

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Veteriner Fakültesi	Yüzüncüyıl Üniversitesi- Veteriner Fakültesi	2009
Y. Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Tokat Gaziosmanpaşa Üniv. Tıp Fakültesi	2015/2019

Görevler :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Veteriner Hekim	Zile İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü	2009