

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNFERİL ERKEKLERDE HSP70 GEN  
POLİMORFİZİMLERİ VE HSP70 PROTEİNİNİN  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Bülent ÇELEPKOLU**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Halil ÇİFTÇİ**

**ŞANLIURFA  
2012**

**Bülent ÇELEPKOLU**

**ÜROLOJİ**

**UZMANLIK**

**ŞANLIURFA -2 012**

**(Çift Sıra)**

**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNERTİL ERKEKLERDE HSP70 GEN  
POLİMORFİZİMLERİ VE HSP70 PROTEİNİNİN  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Bülent ÇELEPKOLU**

**DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Halil ÇİFTÇİ**

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 1046 proje numarası ile desteklenmiştir

**ŞANLIURFA  
2012**

## TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakóltesi Üroloji Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Ercan YENİ, Prof. Dr. Ayhan VERİT, Yrd. Doç. Dr. Murat SAVAŐ, Yrd. Doç. Dr. Halil ÇİFTÇİ ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet GÜLÜM 'e; Anabilim dalında birlikte çalıştđım meslektaşlarım Dr. Halil Ferat ÖNCEL, Dr. Adem ALTUNKOL, Dr.Mehmet Mazhar UTANĞAÇ, Dr. İsmail YAĞMUR, Dr. Kemal GÜMÜŐ ve Dr. Mehmet DEMİR'e; tezimin seçilme aşamasında ve hazırlanma aşamalarında her türlü yardımda bulunan tez hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Halil ÇİFTÇİ' ye ve tezim boyunca olguların analizlerinde yardımcı olan Tıbbi Biyoloji Anabilim dalından Doç. Dr. Fuat DİLMEÇ' e ve Histoloji Anabilimdalından Yrd. Doç. Dr. Mete KÖKSAL ve Uz. Dr. Şiir UÇAR'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Hayatımın her anında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olan aileme, eşim Gülşen ve biricik kızım Beren Ezgi' ye sonsuz teşekkür ederim.

Dr.Bülent ÇELEPKOLU

# İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1.GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite	3
2.2. Erkek infertilitesinin başlıca nedenleri	4
2.3. Genital embriyoloji	5
2.3.1. Gonatların gelişimi	5
2.3.2. Erkek Genital Yapıların Gelişimi	6
2.3.3. Dış Genitallerin Gelişimi	7
2.4. Erkek Üreme Fizyolojisi	8
2.4.1. Hipotalamo - Hipofizo - Gonadal Eksen	10
2.4.2. Testisler	10
2.4.2.1. Leydig Hücreleri ve Testosteron	11
2.4.2.2. Seminifer Tübüller	12
2.4.2.3. Sertoli Hücreleri	13
2.4.2.4. Germinal Hücreler	14
2.5. Spermatogenez	14
2.5.1. Spermatogenezin Genetik Özellikleri	16
2.5.2. Endokrin Faktörler	17

2.5.3. Diğer Faktörler	18
2.6. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi	18
2.6.1. Anamnez	19
2.6.2. Fizik Muayene	20
2.6.3. Semen Analizi	20
2.6.3.1. Semen Toplanması	21
2.6.3.2. Semen Makroskopik Değerlendirilmesi	21
2.6.3.3. Semen Mikroskopik Değerlendirmesi	23
2.6.4. Endokrin İnceleme	27
2.6.5. Ejakülasyon Sonrası İdrarda Sperm Aranması	28
2.6.6. Radyolojik Değerlendirme	28
2.6.7. Sperm ve Semene Ait Spesifik Testler	29
2.6.8. Testis Biyopsisi	30
2.6.9. Genetik Araştırma	30
2.7. İnfertilite Tedavisi	31
2.7.1. Erkek İnfertilitesinde Medikal Tedavi	32
2.7.1.1. Spesifik Tedavi	32
2.7.1.2. Ampirik Tedavi	34
2.7.2. Erkek İnfertilitesinde Cerrahi Tedavi	37
2.7.2.1. Varikosel Tedavisi	38
2.7.2.2. Obstrüktif İnfertilite Tedavisi	38
2.7.3. Üremeye Yardımcı Teknikler	39
2.7.3.1. İntrauterin İnseminasyon (IUI)	39
2.7.3.2. İnvitro Fertilizasyon (IVF)	39
2.7.3.3. İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI)	39
2.8. HSP (Heat Shock Protein) Ailesi	41
2.8.1. HSP70' in hücredeki görevleri	42
2.8.2. HSP70' in Yapısı	42
2.8.3. HSP ve Gametogenezis	44
2.8.3.1. HSP ekspresyonu ve Spermatogenezis	44
2.8.3.2. Oogenez sırasında HSP ekspresyonu	44
2.8.4. HSP ve Kanser	45
2.8.5. HSP ve İmmün Cevap	46

3. GEREÇ VE YÖNTEM	48
3.1. Gereç	48
3.2. Yöntem	49
3.2.1. Genetik inceleme	49
3.2.2. İmmünohistokimyasal inceleme	52
3.2.3. İstatistik	54
4. BULGULAR	55
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇ	63
7. KAYNAKLAR	64

## SİMGELER ve KISALTMALAR

A	Alfa
ABP	Androjen Bağlayan Protein
ASA	Anti Sperm Antikoru
ATP	Adenozin Tri Fosfat
AZF	Azoospermi Faktörü
B	Beta
BMI	Vücut Kitle İndeksi
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
CBAVD	Konjenital Bilateral Vaz Deferens Yokluğu
DHT	Dihidrotestosteron
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E.R	Endoplazmik retikulum
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GH	Büyüme Hormonu
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
HHG	Hipotalamus-Hipofiz-Testis
Hmg	İnsan Menapozal Gonadotropin
HSP	Isı şok proteini
HSP10	Isı Şok Proteini 10
HSP60	Isı Şok Proteini 60
HSP70	Isı Şok Proteini 70
ICSI	İntra Sitoplazmik Sperm İnjesiyonu
IgA	İmmünglobulin A1
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IUI	Intra Uterin İnseminasyon
IVF	In Vitro Fertilizasyon
kDa	Kilo Dalton
L	Litre

LH	Luteinize Edici Hormon
M	Molarite
Mb	Mega baz
mg	Miligram
$\mu\text{g}$	Mikrogram
ml	Mililitre
MIF	Müllerian İnhibiting Factor
MIS	Müllerian İnhibitory Substance
ml	Mikrolitre
mM	Milimolar
$\mu\text{mol}$	Mikromol
mU	Mili Ünite
mRNA	Haberci Ribonükleik asit
mtDNA	Mitokondrial DNA
NO	Nitrik Oksit
ng	Nanogram
OPU	Oosit Pick Up
PgE	Prostoglandin E
PgF	Prostoglandin F
PI-3 K	Fosfoinositid 3 Kinaz
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PTH	Paratiroid Hormon
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDI	Sperm Deformite İndeksi
SCOS	Sertoli Cell Only Sendrom
SHBG	Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin
SRY	Y-kromozomu Seks Belirleyici Bölgesi
SOX9	SRY-box containing gene 9
T	Testosteron
TDF	Testis Farklılaştırıcı Faktör
TESE	Testikiküler Sperm Eldesi
TRUS	Trans Rektal Ultrasonografi
TNF-Alfa	Tümör Nekroz Faktör Alfa



TUR-ED	Trans Üretral Rezeksiyon Ejekülatuar Kanal
TZI	Teratozoospermi İndeksi
ÜYT	Üremeye Yardımcı Teknikler
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Yq	Y-kromozomu Uzun Kolu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Hipotalamo-Hipofiz-Gonadal eksen	10
Şekil 2. İnsan testisinde seminifer tübüller , epididimler ve duktus deferentesler	13
Şekil 3. Spermatogenez	15
Şekil 4. Spermin morfolojik değişiklikleri	26
Şekil 5. <i>HSPA1B</i> geni g.1269A>G polimorfik noktasının <i>PstI</i> restriksiyon profili	51
Şekil 6. <i>HSPA1L</i> geni c.1478C>T polimorfik noktasının <i>NcoI</i> restriksiyon profili.	51
Şekil 7. Çekirdekte çok hafif boyanma	55
Şekil 8. Şekil 7 için çekirdek boyanması	56
Şekil 9. Çekirdekte yoğun boyanma	56
Şekil 10. Şekil 9 için çekirdek boyanması	57
Şekil 11.Çekirdek ve kuyruk boyanması	57
Şekil 12.Şekil 11 için çekirdek boyanması	58

## TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. WHO 2010 semen analizi referans aralığı	21
Tablo 2. Kruger kesin kriterine göre sperm morfolojisi	26
Tablo 3. Çalışmada kullanılan primer dizileri	50
Tablo 4. Sperm boyama skorlanması	53
Tablo 5. Demografik özellikler sperm parametreleri	55
Tablo 6. Gruplarda Ortalama sperm boyanma skorları	58
Tablo 7. İnfertil erkek hastalar ve kontrol grubunda <i>HSPA1B</i> geni g.1269A>G ve <i>HSPA1L</i> geni c.1478C>T polimorfizmleri	59

# ÖZET

## İNFERTİL ERKEKLERDE *HSP70* GEN POLİMORFİZİMLERİ VE *HSP70* PROTEİNİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELENMESİ

**Bülent Çelepkolu, Üroloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi**

Çiftlerin yaklaşık %15'i düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen ilk bir yıl içerisinde çocuk sahibi olamamaktadırlar. Erkek infertilitesinin yaklaşık %40-60'ında altta yatan neden bilinse de birçoğunda etken ortaya konamamakta ve idiopatik infertilite olarak kabul edilmektedir. Isı şok proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşır. Isı şok proteinlerinin spermatogenez sırasında etkili oldukları, *HSP 70-2* geninin bozulmasının başarısız mayoz ve erkek infertilitesiyle sonuçlandığı gösterilmiştir. Biz bu çalışmada sperm parametreleri normal infertil erkek hastalarda *HSP 70'* in infertiliteyle ilişkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Çalışmaya 24 infertil erkek hasta ve 24 fertil kontrol alındı. Hasta ve kontrollerden alınan kanlardan DNA izole edilip *HSP70* gen polimorfizimine bakıldı. Ayrıca bu infertil erkeklerin sperm hücreleri immünohistokimyasal olarak boyanıp immünfluoresan mikroskopla sperm hücrelerinde *HSP70* antijenine bakıldı. Verilerin değerlendirilmesinde Fisher's exact testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı.

*HSPA1B* geni g.1269A>G polimorfik noktasının AG (heterozigot) ve GG (homozigot, polimorf) genotipleri ile G alleli bakımından hasta ve sağlıklı kontrol arasında karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamsız ( $P > 0.05$ ) olduğu belirlendi. Ayrıca *HSPA1L* geni c.1478C>T polimorfik alanın CT (heterozigot) ve TT (homozigot, polimorfik) genotipleri ve T allelleri hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamsız olarak tespit edildi. Sperm hücrelerinde *HSP 70'* in immünohistokimyasal boyanmasının istatistiksel değerlendirilmesinde hasta ortalaması  $1.69 \pm 0.58$ , kontrol ortalaması  $1.70 \pm 0.63$  ve P-değeri:0.744 bulundu. Hasta ve sağlıklı grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi.

**Anahtar Kelimeler:** İnfertilite, *HSP 70*, Gen Polimorfizmi, İmmünohistokimya

## ABSTRACT

### IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATION OF HSP70 PROTEIN AND HSP70 GENE POLYMORPHISMS IN THE INFERTILE MALES

**Bülent Çelepkolu, Department of Urology, Specialty Thesis in Medicine**

Although, 15% of couples have the unprotected regular a sexual life within the first year they can not have children. Approximately in the % 40-60 Male infertility, even the underlying cause is known, in the most of them etiologic cause could not found, and it is considered to be as idiopathic infertility. Heat shock proteins are very important for the all stages of the cell metabolism including growth, differentiation, division and even cell death. It is shown that heat shock proteins effective during spermatogenesis, and degradation of HSP 70-2 gene results as failed mayoz and male infertility. In this study we aim to investigate the relationship between HSP 70 and infertility in the infertile male with normal sperm parameters.

The study include 24 infertile males and for control group 24 fertile males. DNA was isolated from blood of patients and controls group, and was examined for *HSP70* gene polymorphism. In addition, HSP70 antigens were examined in the sperm cells of infertile males after immunohistochemically painted by immünfluoresan microscope. Fisher's exact test and Mann-Whitney U test was used for analyze the data.

There was no statistically significant difference between AG (heterozygous) and GG (homozygous, polymorphic) genotypes of g.1269A> G polymorphic point of *HSPA1B* gene and G allele of patients and healthy controls ( $P > 0.05$ ). In addition there was no statistically insignificant difference between CT (heterozygote) and TT (homozygous, polymorphic) genotypes of c.1478C> T polymorphic area of *HSPAIL* gene and T alleles of patients and healthy controls ( $P > 0.05$ ). Also was found the average patient  $1.69 \pm 0.58$ , control average  $1.70 \pm 0.63$  and P-value: 0.744 in the statistical evaluation of the immunohistochemical staining of HSP 70 in the sperm cells. There was no statistically significant difference between the patient and the healthy group.

**Keywords:** Infertility, *HSP70*, Gene Polymorphism, Immunohistochemistry

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Çiftlerin yaklaşık %15'i düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen ilk bir yıl içerisinde çocuk sahibi olamamaktadırlar. Olguların % 20'sinde erkek tek başına sorumlu bulunurken, % 30-40'ında kadın faktörüne eşlik eden bir patoloji mevcuttur. Dolayısıyla, infertil çiftlerin yarısında bir erkek faktörü söz konusudur (1). İnfertilitede eğer erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bozulma ile ortaya çıkar. Tedaviden yeterli sonuç alınabilmesi için, tanının iyi konması gerekir. Örneğin obstrüksiyon ve hipogonadotropik hipogonadizm tedavi edilebilir patolojiler arasında sayılırken, viral orşite bağlı sekonder bilateral testis atrofisi geri döndürülemez hasardır. Ayrıca, bazı azospermik erkeklerin testislerinde aktif spermatogenez odakları mevcut olup, tedavi ile sperm yapımı uyarılabilir. Erkek infertilitesinin yaklaşık %40-60'ında altta yatan neden bilinse de birçoğunda (%25) etken ortaya konamamakta ve idiopatik infertilite olarak kabul edilmektedir (2).

Isı şok proteinleri (İŞP) çeşitli fonksiyonları olan bir protein ailesi olup, ortak özellikleri hücrelerin ani sıcaklık değişiklikleri, anoksi, reaktif oksijen metabolitleri ve glukoz düzeylerinde değişiklik gibi çevresel faktörlere maruz kaldıkları zaman üretilmeleridir. Bu proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşır. Genel olarak stres proteinleri olarak adlandırılmaktadır. Molekül ağırlıkları 15 kDA ile 110 kDA arasında değişen bu proteinler normal koşullar altında da hücrelerde bulunurlar. Ancak ani ısı değişiklikleri veya diğer stres faktörleri ile karşılaştıklarında hücrede düzeyleri artar. İnsanlar, bitkiler ve bakteriler benzer ısı şok protein yapısına sahiptirler. Yüksek sıcaklık, pH değişiklikleri, oksijen eksikliği gibi stres faktörleri altında proteinlerin fonksiyonel yapılarının korunması oldukça zordur ve bunun sonucunda hücre protein katlanmalarında açılmalar meydana gelir. Konformasyon bozukluğu nedeniyle proteinler fonksiyonlarını kaybederler. Isı şok proteinleri bu denatüre proteinleri tutarak toplanmalarını engeller ve proteinlerin stabilitesinde rol alırlar. Isı şok proteinleri; kuvvetli hidrojen bağları, güçlü hidrofobik etkileşimleri ve çift kutuplu heliks stabilitesinden dolayı denatüre olmazlar (3).

Isı şok proteinleri, pek çok mikrobik temsilcinin konakta immün cevap oluşturmasında rol oynayan antijenlerdendir. Sağlıklı bireylerin, enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücreslerinden arınmak için, kendi ısı şok proteinlerine karşı immün cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürölmektedir (4).

HSP70 ailesi hücrede proteinlerin hücre içinde taşınmasına, sitozol, endoplazmik retikulum, mitokondrideki proteinlerin katlanmasına, kararsız proteinlerin yıkımına, protein komplekslerinin çözünmesine, protein agregasyonunun engellenmesine, bozuk katlı proteinlerin yeniden katlanmasına ve apoptosise (programlı hücre ölümlü) yardımcı olurlar (5,6).

Yapılan çalışmalarda *HSP70* gen ekspresyonu artmış kanser, immün yanıtta ve birçok kolojen doku hastalıkları ile ilişkili bulunmuştur (7). Bunun yanı sıra bozulmuş spermatogenezis ve buna bağlı olarak erkek infertilitesinin patogeneğinde rol oynayabileceği gösterilmiştir (8). Fakat sperm parametreleri normal ama nedeni açıklanmayan infertil olan hastalar ile *HSP70* gen polimorfizimleri arasında řu ana kadar bir ilişki gösterilmemiştir. Bu nedenle amacımız bu çalışmada nedeni açıklanamayan infertil erkek bireylerde *HSP70* gen polimorfizimin altta yatan bir sebep olup olmadığını araştırmaktır.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnfertilite

Çiftlerin yaklaşık %15'i düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen ilk bir yıl içerisinde çocuk sahibi olamamaktadırlar. Olguların % 20'sinde erkek tek başına sorumlu bulunurken, % 30-40'ında kadın faktörüne eşlik eden bir patoloji mevcuttur. Dolayısıyla, infertil çiftlerin yarısında bir erkek faktörü söz konusudur (1). İnfertilitede eğer erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bir bozulma ile ortaya çıkar. Oysa sperm değerleri normal olsa da cinsel fonksiyon bozuklukları ya da penil deformiteler gibi sorunlarda infertilite nedeni olabilir. Ayrıca, spermin kalitatif bozuklukları da her zaman standart testlerle ortaya çıkarılamayabilir. Özellikle kromatin hasarları, fertilizasyon ve embriyo gelişim bozukluğu durumları da son yıllarda üzerinde sık durulan konular arasındadır. Ortadan kaldırılması ile sağlıklı gebeliklerin elde edilebileceği birçok çevresel faktör, değişik mekanizmalarla spermatozoanın kapasitasyonunu ve neticede oosit ile etkileşimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Tedaviden yeterli sonuç alınabilmesi için, tanının iyi konması gerekir. Örneğin obstrüksiyon ve hipogonadotropik hipogonadizm tedavi edilebilir patolojiler arasında sayılırken, viral orşite bağlı sekonder bilateral testis atrofisi geri döndürülemez hasardır. Ayrıca, bazı azospermik erkeklerin testislerinde aktif spermatogenez odakları mevcut olup, tedavi ile sperm yapımı uyarılabilir. Erkek infertilitesinin yaklaşık %40-60'ında altta yatan neden bilinse de birçoğunda etken ortaya konamamakta( %25) ve idiopatik infertilite olarak kabul edilmektedir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmaların hız kazanması ile birlikte kromozom anomalileri (örn. Klinifelter sendromu) ve Y kromozom mikrolelesyonları gibi genetik nedenlerin erkek infertilitesindeki önemi giderek önem kazanmaktadır. Oligospermik olan erkeklerde kromozomal problemler %2,2 iken azospermik olanlarda %15 civarındadır (2,9).

Tam değerlendirilmesi neticesinde, düzeltilemeyecek bir patolojiye sahip olduğunun anlaşılması, erkeğin gereksiz ve stres yaratacak uzun tedavi protokolleri içerisine girmesini önler. Böyle çiftler ejakülat spermi ya da epididim veya testislerden elde edilecek spermlerin, in vitro fertilizasyon (IVF) veya intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI)'nda kullanılması ile çocuk sahibi olabilirler. Bütün bunlara ek olarak, altta yatan nedenin genetik olduğunun



bilinmesi, doğacak çocuğun maruz kalabileceği anomaliler hakkında ailenin önceden bilgilendirilmesi bakımından son derece önem taşır. Bütün bu nedenler sonucunda, infertilite olgularında erkeğin ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi çok önemlidir. Diğer yandan, sağlıklı bir gebeliğin başarılabilmesi için optimal değerlendirme protokolü içerisinde erkek faktörünün normal bulunmasının yanı sıra kadında ovulasyon, tubaların açıklığı ve fonksiyonel durumu, uterus kavitesinin durumu ile servikal faktörlerin de ortaya konmuş olması gerekir (10).

## **2.2. Erkek İnfertilitesinin Başlıca Nedenleri: (11,12)**

### **• Hormonal Bozukluklar**

- İzole gonadotropin yetmezliği (Kallman sendromu),
- İzole LH (luteinize edici hormon) ve FSH (folikül stimüle edici hormon) yetmezliği,
- Hiperprolaktinemi,
- Tiroid hastalıkları,
- Konjenital hipogonadotropik hastalık,
- Hipofizer yetersizlik (tümörler, infiltratif olay, ameliyat, radyasyon),
- Ekzojen hormonlar (androjen- estrogen, glukokortikoid fazla verilmesi)

### **• Kalıtsal gen hastalıkları ve kromozom bozuklukları**

- Klinefelter Sendromu, XX erkek, XYY sendromu,
- Turner sendromu,
- Y kromozom mikrolelesyonları,
- Myotonik distrofi,
- Hemokromatozis,
- Orak hücre anemisi,
- Germ hücre aplazisi (SCOS: Sertoli cell only sendromu).

### **• Gonadotoksinler**

- İlaçlar, insektisitler,
- Radyasyon, manyetik alanlar,
- Alkol, sigara ve uyuşturucu maddeler,
- Gıda katkı maddeleri.

- **Çeşitli hastalıklar**

- Testislere travma ve omurilik zedelenmesi,
- Böbrek yetmezliği, karaciğer hastalığı,
- İmmünolojik hastalıklar, enfeksiyonlar.

- **Anormal spermatogenez**

- Kriptoorşitizm (inmemiş testis),
- Varikozel,
- Sperm kanallarında tıkanıklık,
- Sperm motilite ve fonksiyon bozukluğu,
- Sperm morfoloji defekti (baş, kuyruk, akrozom vs),
- Maturasyon defekti

### **2.3.Genital Embriyoloji**

Genetik organların gelişimi genetik programlanma, hücre farklılaşması, hormonal uyarı, enzimatik aktivite ve dokunun yeniden yapılanmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Embriyo'nun cinsiyeti fertilizasyon esnasında, ovundan gelen X kromozomu, spermden gelen X veya Y kromozomunun birleşmesi ile belirlenir. Genetik seks, gonadal seks belirlenir. Gonadal seks de daha sonra sırasıyla internal duktal sistem ve dış genitallerin uygun bir şekilde dönüşümünü sağlar. Ancak, genetik seks fertilizasyonda belirlenmesine rağmen, embriyonun erkek veya dişi morfolojik özellikleri yedinci haftaya kadar gelişmeye başlamaz (13).

#### **2.3.1. Gonadların gelişimi**

Gonadlar (testisler ve overler) üç embriyoner kaynaktan köken alır: Mezotelyum (posterior abdominal duvarı döşeyen mezodermal epitel), mezenşim (mezotelyum altındaki embriyonik bağ dokusu), primordial germ hücreleri. Dördüncü haftanın başlarında, “yolc sac” in endodermal hücreleri arasında büyük ve sferik olarak primitif seks hücreleri (primordial germ hücreleri) görünür hale gelir. Beşinci haftada mezonefrozun ventromedial kesimindeki mezoderm kalınlaşmaya başlar. Altında kalan mezenşimin proliferasyonu ile bir şişkinlik genital kabartı oluşur. Bu esnada “yolc sac”ın arka duvarındaki primordial germ hücreleri

dorsal mezenter boyunca genital kabartının içine göç ederler. Embriyo katlanırken “yolc sac” ın dorsal kısmı da embriyonun içine katılır. Altıncı haftada genital kabartıdan uzanan parmaksı epitelyal kordlar (primer seks kordları) alttaki mezenşim içine doğru büyüyerek primordial germ hücreleri ile birleşir. Bu safhaya kadar gonadlar morfolojik olarak indiferansiyedir ve dışta korteks, içte medulla kısmı vardır. Bu sırada hem erkek, hem de dişi embriyolarda mezonefrik kanalların lateralinde paramezonefrik (Müller) kanal adı verilen yeni bir çift kanal gelişmeye başlar. Kalınlaşmış kölomik epitelin invaginasyonundan oluşan bu kanalların kaudal uçları yapışarak ürogenital sinüsle birleşir. Kranial uçları ise kölomik boşluğa (gelecekteki periton) açılır (13).

### **2.3.2. Erkek Genital Yapıların Gelişimi**

SRY (“Y”kromozomunun seks belirleyici bölgesi)’nin etkisiyle primitif seks kordlarının medüller bölgesindeki hücreler Sertoli hücrelerine farklılaşmaya başlarken kortikal bölgedeki hücreler dejenere olurlar. Seks kord hücreleri sadece SRY proteini varlığında Sertoli hücrelerine farklılaşırlar; aksi takdirde seks kordları ovaryan foliküllere farklılaşırlar. Yedinci haftada, farklılaşan Sertoli hücreleri testis kordlarını oluşturmak üzere organize olurlar. Germ hücreleri ile ilişki içindeki bu kordlar pubertede seminifer tübüleri oluşturacaklardır. Seminifer tübüllerin distalindeki testis kordları da bir lümen geliştirerek bir takım ince duvarlı kanallara dönüşerek rete testis’i oluştururlar. Gelişen gonadın medialinde, rete testisin tübüleri mezonefrik kanaldan gelişen 5–12 adet duktuli efferentes ile birleşirler. Vaz deferens de mezonefrik kanaldan gelişir. Bu esnada, testis yuvarlak hale gelmeye başlar ve etrafındaki mezonefroza ilişkisi azalır. Testis geliştikçe, dejenere olan kortikal seks kordları tunika albuginea adını alan ve giderek kalınlaşan bir bağ dokusu tabakası kölomik (periton) epitelyumdan ayrılır. Tunika albuginea nın gelişmesi fetustaki testiküler gelişmenin karakteristik ve tanısal bir özelliğidir. Giderek büyüyen testis, mezorşium adı verilen kendi mezenterine asılı hale gelir. SRY’nin etkisiyle farklılaşıp, gelişen Sertoli hücreleri MIF (Müllerian - Inhibiting Factor) adı verilen bir glikoprotein hormon salgılamaya başlar. MIF, 8 ile 10 haftalar arasında paramezonefrik (Müller) kanalların hızla gerilemesine yol açar. Erişkin erkekte Müller kanalı artıkları appendiks testis ve prostatik utrikul olarak görülebilir. Dişi embriyolarda MIF olmadığı için müler kanalları gerileme göstermez (14). Genital kabartının mezenşimal hücrelerinden 9. ve 10. haftalarda SRY proteinine yanıt olarak Leydig

hücreleri gelişir. Bu endokrin hücreler testosteron üretirler. Gelişimin erken evrelerinde testosteron üretimi plasental koryonik gonadotropin tarafından kontrol edilirken, ilerleyen aşamada pitüiter gonadotropinler kontrolü ele alır. Leydig hücrelerinin testosteron salgılaması mezonefrik kanalların vaz deferense dönüşmesini uyarır. Duktuli efferenteslerin rete testisle birleşmesi 9. haftada başlayıp 3. aya kadar sürer (13). Seminal veziküller distal mezonefrik kanallardan gelişirken, prostat ve bulboüretal glandlar ürogenital sinüsten gelişir. Vezikula seminalisler 10. haftada filizlenme gösterirler. Prostat da aynı esnada pelvik üretradan endodermal tomucuklanmalar şeklinde gelişmeye başlar. Prostatın gelişimi testosteronun  $5\alpha$ -redüktaz tarafından dihidrotestosterona dönüştürülmesine bağlı olarak etrafındaki mezenşim tarafından uyarılır. Prostatik tomurcuklanmalar başlangıçta 5 bağımsız solid prostatik kordlar şeklindedir. Bu kordlarda 11. haftada lümen ve glandüler asini gelişir; 13. haftada ise testosteron seviyesinin artması ile birlikte sekretuar aktivitesi başlar. Prostatın gelişimi, androjenlerin etkisi altında, mezenşim-epitel etkileşimine bağlıdır (15,16).

### **2.3.3. Dış Genitallerin Gelişimi**

Dış genitallerin gelişimi 7. haftaya kadar her iki cinste de benzerdir. Ayırıcı cinsel özellikler 9. haftada görülmeye başlar, ancak dış genitaller 12. haftaya kadar tam olarak farklılaşmazlar. Dördüncü haftadan 7. haftanın başına kadar dış genitaller indifferansiyedir. Dördüncü haftanın başında, her iki cinste de kloakal membranın kranial ucunda proliferasyon olan mezenşim, bir genital tüberkül oluşturur. Hemen akabinde, kloakal membranın her iki yanında labioskrotal kabartılar ve ürogenital katlantılar gelişir. Genital tüberkül uzayarak bir fallus oluşturur. Glans klitoris ve glans penisin primordiumu bir koroner sulkus ile fallusun gövdesinden ayırt edilebilir. Erkek ve dişi embriyolarda dış genitallerin görünümü 12. haftaya kadar birbirine benzerdir. İndifferansiyel dış genitallerin erkekleşmesi fetal testislerin ürettiği testosteron tarafından indüklenir. Fallus penisi oluşturmak üzere büyüyüp uzarken, ürogenital katlantılar penisin ventral yüzünde üretral oluğun lateral duvarlarını oluşturur. Bu oluk, ürogenital sinüsün fallik kısmından uzanan endodermal hücrelerin proliferasyonu ile (üretral plate) kaplanmıştır. Ürogenital katlantılar spongios üretrayı oluşturmak üzere penisin ventral yüzeyi boyunca birbirleriyle birleşirler. Yüzey ektodermi penisin orta hattında birleşerek penil rafe'yi oluşturur ve spongios üretrayı penisin içine alır. Endodermal kökenli üretral katlantıların birbirleriyle orta hatta olan birleşmeleri glans düzeyine ulaşmadan önce durursa,

ventralde yüzey ektodermi de bu yapıların üzerini örtecek şekilde gelişemez, yani ventral yüzde prepisyum ve frenulum gelişmez. Spongioz uretra ve frenulumun gelişimi tamamlandığında glans penisin ucundan başlayıp içeri doğru ilerleyen ektodermal hücreler spongioz uretra ile birleştiğinde, distal uretra ve eksternal uretral meatusun da gelişimi tamamlanmış olur. Onikinci haftada glans penisin çevresindeki ektoderimde içeri doğru dairesel bir ilerleme başlar ve durduğunda prepisyumu oluşturur. Korpus kavernozum ve korpus spongiosumlar fallus içindeki mezenşimden gelişirler. Labioskrotal kabartılar skrotumu oluşturmak için birbirlerine doğru büyüyerek birleşirler. Bu katlantıların birleşme hattı skrotal raphe olarak görülür. Fötal gelişim esnasında testisler 10. torasik seviyedeki pozisyonlarından aşağı doğru inerler. Gonadların başlangıçtaki inişleri gubernakulumla bağlıdır. Testisler üçüncü aydan sonra internal inguinal halka seviyesine iner ve 7 ile 9. aylar arasında skrotuma inişlerini tamamlarlar. Testiküler iniş:

Testislerin büyümesi ve mezonefrik böbreklerin atrofisinin karın arka duvarı boyunca testislerin hareketine olanak sağlaması,

MIF etkisiyle paramezonefrik kanalların atrofisi ve bunun testislerin transabdominal olarak internal inguinal halkaya hareketini sağlaması,

Prosessus vaginalisin büyüyerek inguinal kanal içinden skrotuma doğru testise kılavuzluk etmesi ile ilişkilidir.

Testisler 26. haftada retroperitoneal olarak karın arka duvarından internal inguinal halka seviyesine inmiştir. Bu iniş ve pozisyon değişikliği relatif bir iniştir ve daha ziyade abdomenin kranial kısmının kaudal kısmından daha fazla büyümesine bağlıdır. Testislerin inguinal kanalların içinden geçerek skrotuma inişleri fötal testislerin ürettiği androjenlerin kontrolü altında gerçekleşmektedir. Testisin inguinal kanaldan geçişi esnasında gubernakulumun kılavuzluğu yanında, karın içi basıncındaki artışlarında katkısı olmaktadır. Testislerin inguinal kanallardan skrotuma inişleri 26. haftada başlamakta, 2 veya 3 gün sürmektedir. Testis skrotuma indikten sonra inguinal kanal spermatik kordun etrafında kontrakte olmaktadır. Doğumdan sonraki ilk üç ay içinde inmemiş testislerin çoğu skrotuma inebilmektedir. Bir yaşından sonra spontan iniş olmamaktadır (13).

#### **2.4. Erkek Üreme Fizyolojisi**

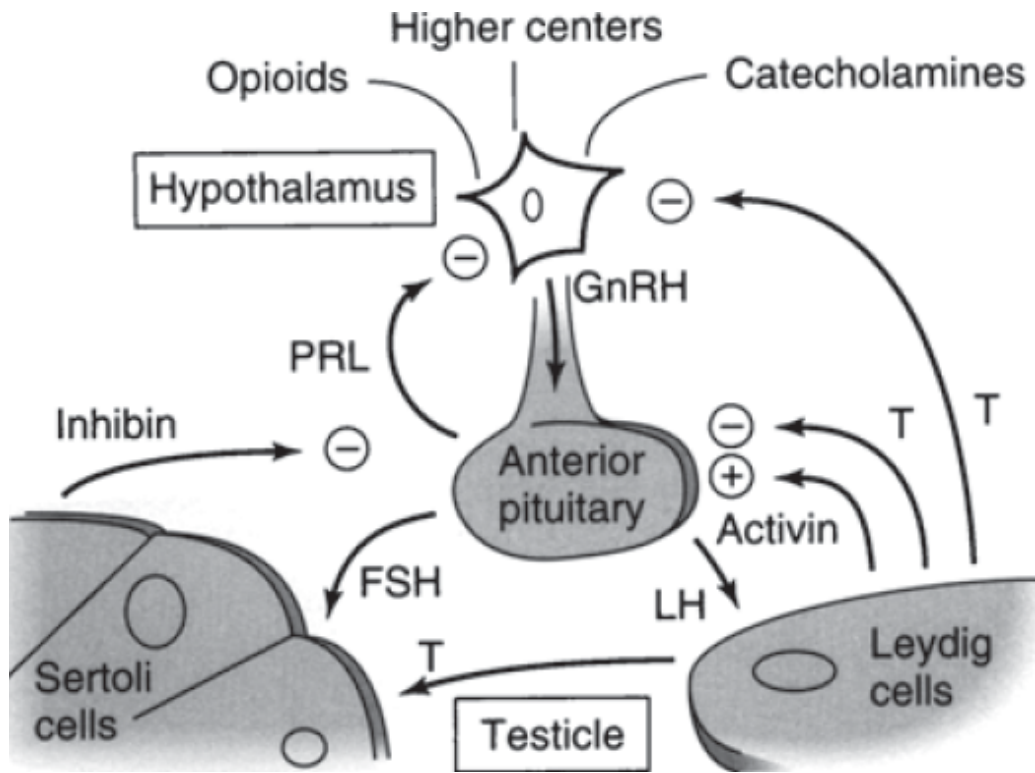
İnsan testisi iki önemli fonksiyonu olan bir organdır. Birinci fonksiyonu; seminifer tübüllerde spermatogenez ile sperm oluşumunu sağlamak, ikinci fonksiyonu ise interstisyel dokudaki

leydig hücrelerinden steroid hormonlarının (androjenleri) salgılanmasını sağlamaktır. Bu salgılanan steroid hormonlarından biri testosterondur. Testosteron yalnızca sperm üretimi için değil, aynı zamanda sekonder cinsiyet karakterlerin gelişmesi ve normal cinsel aktivitenin sürdürülmesi için de gerekli olan bir hormondur. Testosteronun bu fonksiyonları ön hipofizden; gonadotropinler (LH ve FSH) salgılanması yoluyla kontrol edilir. Normal üreme fonksiyonu, hipotalamo- hipofizo- gonadal eksen kapalı geri dönüşlü (feedback) kontrol mekanizmasına bağlı olarak sürdürülmektedir (12).

#### **2.4.1. Hipotalamo - Hipofizo - Gonadal Eksen**

Pek çok nukleus ünitelerinden oluşan ve beynin tabanında yer alan hipotalamus; retina, korteks ve talamus gibi birçok merkezden mesajlar alarak hipofizin endokrin fonksiyonlarını düzenler. Bu regülasyon hipotalamus ve hipofiz arasındaki bir vasküler portal ile sağlanmaktadır. Hipotalamus ve hipofiz arasında gözlenen kapalı normal dolaşım, ön hipofizin hormonal regülasyonunda etkin rol oynar. GnRH (Gonadotropin Releasing-Hormon) hipotalamustan salgılanan, hipofiz hormonlarını düzenleyen ve üreme fizyolojisinde önemli rol oynayan bir hormon olup ayrıca ön hipofizden LH ve FSH'nın salgılanmasını sağlar. Stres, egzersiz ve diyetle salınımı değişen GnRH'ın düzenlenmesinde katekolamin, prostaglandin ve testiküler steroidler etkin rol oynarlar. LH ve FSH hormonları hücrel metabolizmayı uyarmak için Leydig ve Sertoli hücrelerindeki reseptörlere bağlanırlar. Daha geniş dolaşım yapan FSH, LH'ya göre daha düşük konsantrasyondadır. Hipotalamo-hipofizogonadal eksen, kapalı bir geri dönüş kontrol mekanizmasıyla kontrol edilmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar hem serum FSH hem de LH'da meydana gelen yükselmelerin gonadal hormonların üzerinde inhibitör etkisi yaptığını göstermiştir. Testislerin önemli bir hormonu olan testosteron, erkeklerde LH sekresyonunun primer inhibitörüdür. Testosteron periferik dokularda güçlü bir androjen olan dihidrotestosterona ya da östrojen bileşiği olan östradiol'e metabolize olabilmektedir. Bu androjenler ve östrojenler birbirinden bağımsız olarak LH salgılanmasını düzenlerler. İnsan ve hayvan çalışmalarıyla sertoli hücre faktörü olan İnhibin'in FSH'ın geri dönüş mekanizmasında önemli bir rol üstlendiği gösterilmiştir. Spermatogenetik aktivitenin düşmesi, İnhibin konsantrasyonunun azalmasına neden olurken, FSH düzeyinde artışa neden olabilmektedir (Şekil 1). Diğer önemli hormonlardan olan prolaktin, gonadotropinlerle karmaşık bir ilişki içersindedir. Hiperprolaktinemili ve testosteron yetersizliği olan erkeklerde, serum LH düzeylerinin

tutarsız biçimde düşük oluşu bu hastalarda hipotalamo-hipofizer eksenin düşük testosteron düzeylerine yanıt veremediğini göstermektedir. Diğer yandan prolaktin, GnRH üretimini inhibe etmektedir ve prolaktin salgılayan tümörlü hastalarda GnRH enfüzyonunun LH'yi yükselttiği gözlenmektedir. Ayrıca yüksek prolaktin düzeyi androjen salgılamasını inhibe ettiği gibi merkezi sinir sistemini de doğrudan etkileyebilmektedir. Androjen verilen, yüksek prolaktin düzeyi bulunan bireylerde, prolaktin seviyeleri yüksek olduğu sürece libido ve cinsel fonksiyonun normale dönmediği gösterilmiştir (12).



Şekil 1. Hipotalamo - Hipofizo - Gonadal Eksen

#### 2.4.2. Testisler

Skrotum denen deri ve bağ dokudan yapılmış torbalar içinde sağ ve solda olmak üzere birer tane olan testislerin görevi, sperm ve hormonların oluşmasını sağlamaktır. Toplam ağırlığı 30-40 gram olan testisler bir bölme ile skrotumda ayrılmaktadırlar. Skrotum, testisleri taşımanın

yanı sıra kasılıp - gevşeyerek testislerin belli bir ısıda kalmasını sağlamaktadır. Testisler çift katlı zarla çevrili olup, testisi ilk saran tunica albuginea elastik olmayan bir dokudur. Bunun iç kısmı damar ve sinir bakımından zengindir. Testisler 250 - 300 lob taşırlar ve her bir lobda 1-4 adet kıvrımlı seminifer tübül bulunmaktadır. Seminifer tübüller, kıvrıntılı borucuklar olup duvarlarında spermatogonium ve sertoli hücrelerini taşırlar. Spermatogonium hücreleri spermeleri, oluşturur, sertoli hücreleri ise spermatogenezin yolunda gitmesini sağlayan İnhibin hormonunu salgırlar (11)

#### **2.4.2.1. Leydig Hücreleri ve Testosteron**

Testisin ara elemanlarından olan leydig hücreleri, toplam testis hacminin yaklaşık %5 – 12' lik kısmını oluştururlar. Genç bir erkekte yaklaşık 700 milyon leydig hücresi bulunmaktadır. Leydig hücreleri, LH ve testis içindeki parakrin faktörlerin etkisiyle prekürsör hücrelerden farklılaşan hücrelerdir. Leydig hücreleri içinde vücutta bulunan testosteronun büyük bir kısmı kolesterolden sentez edilir. Kolesterol ise ya dolaşımdan gelmekte ya da leydig hücreleri içindeki endoplazmik retikulumdan yeniden (*de novo*) veya hücre içindeki yağ damlacıklarında bulunan kolesterol esterlerinden sentezlenmektedir. Oluşan testosteron endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya, buradan da hücre dışına taşınarak kanda testosteron bağlayıcı proteine bağlanır. Testosteronun hücre dışına taşınması ve burada tutulması leydig hücresi dışında bulunan albumin, Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) ve testosteron-östradiol bağlayan proteinler sayesinde gerçekleştirilmektedir. Leydig hücrelerinde testosteron yapımı primer olarak LH'ya bağımlı gerçekleşir. LH dışında FSH, prolaktin, LH-RH, aktivin, inhibin, Epidermal Growth Factor (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü - 1 (IGF-1), transforming growth factor beta, prostaglandinler ve adrenerjikler gibi farklı otokrin ve parakrin faktörler de leydig hücrelerinde LH'a bağımlı steroid sentezinin gerçekleşmesinde rol oynarlar. Bununla beraber, östrojen ve androjenlerin leydig hücrelerindeki steroid sentezini engelleyici rolleri de bulunmaktadır (11,17,18).

Ritmik LH salınımına cevaben belli aralıklarla salgılanan Testosteron'un günlük sekresyon düzeyi sabah erken saatlerinde doruk noktada, akşam saatlerinde ise en düşük seviyelerdedir. Bazı mekanizmalar leydig hücrelerinin LH'a cevaben üretilen testosteron üretim yeteneğini bozmakta ve testosteron üretimi için intratestiküler bir kontrol sistemi oluşturmaktadırlar. Sağlam testislerde eksojen LH uygulamasından sonra LH reseptörleri azalmaktadır. Yüksek



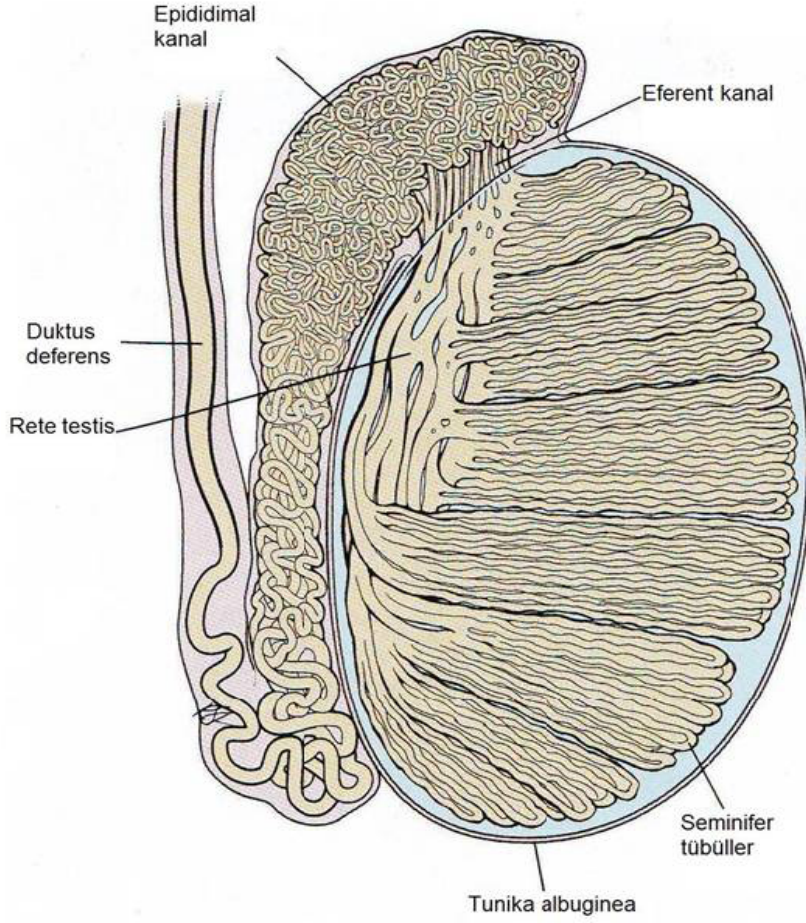
dozlardaki GnRH ve analogları LH reseptörlerinin sayısını azaltır ve LH salgılanmasını inhibe etmektedir. Ayrıca östrojen, testosteron sentez yollarındaki enzimleri inhibe ederek testosteron üretimini doğrudan etkilemektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda prolaktin' in LH reseptör sayısını arttırdığı gözlenmektedir (12). Normal erkeklerde testosteronun % 2'si serbest (bağlanmamış) halde, % 44'ü Testosteron-Östradiol Bağlayıcı Globulin (TeBG) halinde ve % 54'ü albümin veya başka proteinlere bağlı olarak, seminifer tübüllerde ise androjen bağlayıcı proteine (ABP) bağlı olarak bulunur. Androjenlerin biyolojik etkileri, hücre sitozolünde spesifik androjen reseptör proteini içeren hedef organlarda gözlenir. Testosteron dolaşımı terk ettikten sonra organizmadaki hedef hücrelere girmektedir. Bu hücrelerde 5- $\alpha$  redüktaz tarafından daha güçlü bir androjen olan dihidrotestosterona (DHT) dönüşebilir. Testosteron veya DHT, reseptör proteine bağlanarak bir kompleks oluşturur, bu kompleks de nükleer kromatine bağlanarak haberci RNA (mRNA) sentezine yol açmak üzere çekirdeğe aktarılır (translokasyon). mRNA, protein sentezine ve androjenik aktivitenin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Androjenin hedef dokulardaki başlıca fonksiyonları:

- 1) Hipotalamo-hipofizer eksen tarafından gonadotropin salgılanmasının düzenlenmesi,
- 2) Spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi,
- 3) Fötusun gelişmesi sırasında internal ve eksternal erkek genital sistemin farklılaşması ve
- 4) Pubertede cinsel gelişmenin endüksiyonudur (12).

#### **2.4.2.2. Seminifer Tübüller**

Olgunlaşmanın farklı evrelerinde germ ve sertoli hücrelerini içeren seminifer tübüller, testis hacminin % 85 – 90' ını oluştururlar (11,12,18) (Şekil 2). Testis dokusu, içinde kan damarları, sinir lifleri ve kas hücreleri içeren bir kapsül tarafından çevrelenmiş bir yapının içindedir. Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerin içinde gerçekleşir. Her bir testis içinde yaklaşık 500 seminifer tübül bulunur ve tek bir tübülün uzunluğu 30–70 santimetredir. Seminifer tübüller testis hacminin yaklaşık %80-90'ını oluştururlar. Bu nedenle testis hacmi kabaca sperm üretim potansiyeli hakkında fikir verir (19-21).



**Şekil 2.** İnsan testisinde seminifer tübüller, epididimler ve duktus defferens.

#### 2.4.2.3. Sertoli Hücreleri

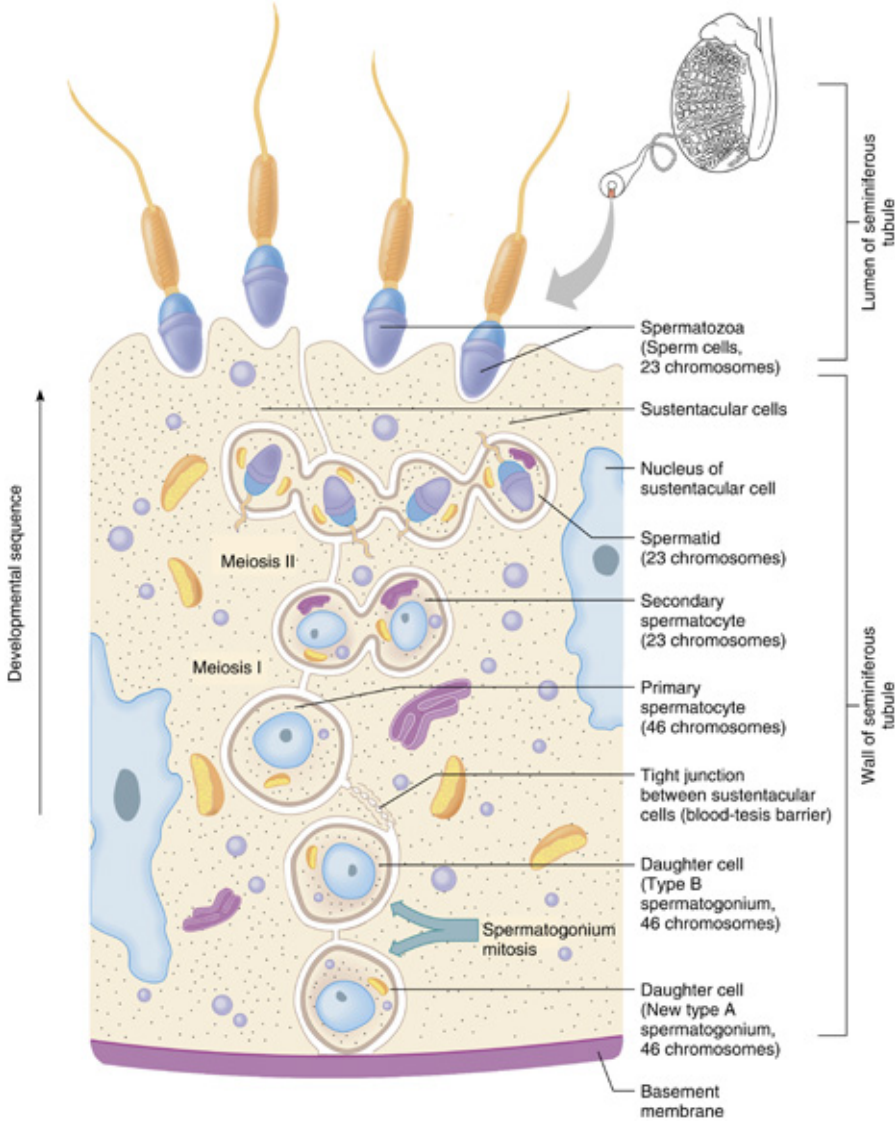
Seminifer tübüllerin bazal membranları üzerinde bulunan, lümenine doğru ipliksi sitoplazmik uzantılar veren, bölünemeyen ve sayıları sabit kalan destek hücreleridir. Bu hücreler birbirlerine, bazal ve lümene bitişik bir kompartıman olmak üzere ikiye bölen sıkı bileşiklerle bağlanırlar. Ayrıca peritübüler kontraktıl hücre tabakasının yakın ilişkide olduğu miyoid hücreleri ile birlikte kan-testis bariyerinin oluşturulmasına hizmet ederek spermatogenezi kolaylaştırırlar. Bunun başka gelişmekte olan germ hücrelerini beslerler ve fonksiyonunu kaybetmiş hücrelerin fagositozunu sağlarlar (11,12).

#### **2.4.2.4. Germinal Hücreler**

Spermatogenik hücreler; bazal membran üzerine yerleşmiş ve lümene doğru primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatid şeklinde düzenli sıralanmış olan hücrelerdir. 1964 yılında Heller ve Clermont, gelişme sürecinin farklı evrelerini temsil ettiği düşünülen 13 farklı germ hücrelerini saptamış ve en düşükten en yüksek farklılaşma derecesine göre: koyu tip A spermatogonialar (Ad); soluk tip A spermatogonialar (A); tip B spermatogonia (B); preleptoten primer spermatositler (R); leptoten primer spermatositler (L); zigoten primer spermatositler (Z); pakiten primer spermatositler (P); sekonder spermatositler (I) ve Sa, Sb, Sc, Sd1 ve Sd2 spermatidler şeklinde adlandırmışlardır (11,12).

#### **2.5. Spermatogenez**

Sperm üretimi oldukça uzun ve karmaşık bir süreçtir. 72 günlük sikluslar halindeki insan spermatogenezi pubertede başlar, yaşam boyunca sürer. Germ hücrelerinin çeşitli aşamalardan geçtikten sonra sperm hücresi haline gelmesi "spermatogenez" olarak adlandırılır. Bu süreç içinde germ hücreleri mayoz bölünme sonrası 46 kromozumlu diploid halden 23 kromozumlu haploid hale gelirler ve yine 23 kromozom içeren haploid yumurta hücresi ile birleşerek yine 46 kromozumlu yeni bir bireyin oluşmasına olanak sağlarlar. Spermatogenez proliferasyon fazı, redüksiyon-bölünme fazı ve farklılaşma fazı olmak üzere üç aşamada incelenir (12,19-21) (Şekil 3). Her aşamada hücreler spermatogonia, spermatosit, spermatid gibi farklı isimler alırlar.



Şekil 3. Spermatogenez

Seminifer epitel farklı tip hücre grupları içermektedir. Germ hücreleri sperm yapımından sorumluyken sertoli hücreleri germ hücrelerinin etrafında destek dokusunu oluştururlar. Testislerde bulunan bir diğer hücre türü de erkek seks hormonu olan testosteron yapımını sağlayan Leydig hücreleridir. Seminifer tübül içinde spermatogenezin tüm aşamalarındaki sperm öncülü hücreler bulunur. Farklılaşma fazını tamamlayan hücreler seminifer tübül içine salınırlar. Bu nedenle testisin farklı kesimlerindeki alanlarda gelişimin değişik evrelerindeki sperm üretimi devam eder (19-21).

**Proliferasyon Fazı:** Germinal epitel içinde olgunlaşma evresinin ilk basamağındaki hücreler spermatogonyumlardır. Mitoz bölünme ile oluşan bu hücrelerin bir bölümü spermatogenez sürecine girerken bir kısmı dejenere olur (19-21).

**Redüksiyon-Bölünme Fazı:** İnsanda, koyu tip A, açık tip A ve B spermatogonyumlar olmak üzere üç grup spermatogonyum ayırt edilmiştir. Koyu tip A spermatogonyumlar açık tip A spermatogonyumlara dönüşürler. Açık tip A spermatogonyumlar da tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Tip B spermatogonyumlar ise farklılaşma sürecine girerek primer spermatositlerin öncüllerini oluştururlar. Primer spermatositler ise birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatositleri oluşturur. Hemen arkasından ikinci mayoz bölünmeyi geçirerek haploid sayıda kromozom içeren spermatidleri meydana getirir. Spermatogenetik hücrelerin sertoli hücreleri arasındaki bölümde bulunması ile puberteden önce seminifer tübül lümenine geçişleri engellenir. Spermatosit adını alan hücreler DNA içeriklerini yani genetik materyallerini iki katına çıkardıktan sonra 4 ayrı hücreye bölünürler. Bu 4 hücreden her biri artık 23 kromozom içermektedir (19-21).

**Farklılaşma Fazı:** Bölünerek genetik materyallerini yarıya indiren bu yeni hücreler uzun bir süreç sonunda farklılaşırlar. Buna spermiyogenez adı verilir. Spermiyogenez süresince üreme hücreleri hem dölleme yeteneklerini kazanırlar hem de spermlerin hareket yeteneğini sağlayan kuyruk gelişir. Tüm bu fazlar sırasında sperm öncülü hücreler seminifer epitelinin derinliklerinden yüzeye yani seminifer tübüllerin iç boşluğuna doğru ilerler (19-21).

### 2.5.1. Spermatogenezin Genetik Özellikleri

Fötal dönemde gonadal dokuların farklılaşması ve çoğalmaları tamamen Y kromozomu tarafından organize edilir. Y kromozomunda SRY geni bulunur. Bu gen TDF (testis determining factor) olarak adlandırılan özel bir plazma proteini sentezine sebep olur. Testislerin morfogenezi TDF tarafından sağlanır. TDF proteininde oluşacak genetik defektler fenotipte ve fertilizasyonda değişik tablolarla kendini belli eder. Y kromozomunun uzun kolu (Yq) üzerinde spermatogenezden sorumlu 3 adet bölge vardır: Azoospermia Factor (AZF) olarak adlandırılan AZFa, AZFb ve AZFc (DAZ) bölgeleri. Bu bölgelerde spermatogenez sağlayan çok sayıda gen yer alır. AZFa bölgesindeki genlerin kaybının Sertoli cell only

sendromundan, AZFb matürasyon arrestinden, AZFc ise değişik derecede oligo-azoospermiden sorumludur. Her ne kadar, genotip/fenotip arasında kesin bir ilişki kurulamamış olsa da, çoğu çalışmalar bu görüşü desteklemektedir. Leydig hücrelerinde testosteronun sentezlenmesi LH'un stimülasyonu ile olur ve kolesterolü substrat olarak kullanır. Bu mekanizma içinde çeşitli enzimler yer alır. Enzimlerde bir defekt olursa yetersiz virilizasyon ya da sadece infertilite ile sonuçlanabilir. Bunlarda ileri derecede oligozoospermi ya da azoospermi görülebilir. Testosteronun DHT'a çeviren 5 $\alpha$  redüktaz enzim defekti ve testosteron ya da DHT'u sitoplazmaya taşıyan veya ilgili sitoplazma/nükleus reseptörlerine bağlayan enzimler ve bu reseptörlerdeki defektler de neticede değişik klinik tablolar şeklinde virilizasyon bozukluğuna neden olabilir. Bunlarda sadece infertilite görülebilir.(11).

### **2.5.2. Endokrin Faktörler**

Hipofizden salgılanan gonadotropinler olan FSH ve LH spermatogenezin esas düzenleyicileridir (22-26). LH, Leydig hücrelerini testosteron sentezlemesi için uyarır (22,23,25,27). Testosteronun, testiste dolaşımdakinin en az 200 katı kadar bulunması, spermatogenik hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için gereklidir (27). FSH ve testosteron normal spermatogenez için yaşamsal önem taşır (23,25,28).

Germ hücreleri FSH ve testosteron reseptörleri içermediklerinden, bunların esas etki alanı Sertoli hücreleridir (22,26,27). FSH'un spermatogonial proliferasyonu uyarıcı etkisi sayesinde, Sertoli hücreleri spermatogenezde primer düzenleyici olarak rol oynarlar (23,27). Testosteron, sertoli hücrelerinin spermatidlere yapışmasını, dolayısıyla spermiogenezi indükler, ayrıca peritübüler hücreleri de etkiler (22,23,25). Hem FSH hem de testosteronun, germ hücre apoptozisini Sertoli hücreleri aracılığıyla indirekt olarak baskıladığı gösterilmiştir (23,29).

Seminifer epitelin hormonal uyarıya yanıtı, lokal faktörlerin etkisiyle düzenlenir (22). Primer spermatositler ve spermatidler, hem  $\alpha$  hem de  $\beta$  östrojen reseptörü içermektedirler (24,26,30). Östrojen reseptör fonksiyonu, normal spermatogenezin gerçekleşmesi için gereklidir. Tiroid hormonlarının da Sertoli hücreleri aracılığıyla indirekt olarak spermatogenezini etkilediği bilinmektedir (31). Sertoli hücreleri tarafından salgılanan inhibin B ve testiküler volüm arasında bulunan korelasyon, inhibin B'nin spermatogenez için iyi bir endokrin belirleyici olduğunu ortaya koymuştur (32).

### 2.5.3. Diğer Faktörler

Endokrin kontrolün yanı sıra, birçok parakrin sinyalin germ hücresinin kaderinin belirlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (23,26,28). Spermatogenezin kontrolünde, hücreler arası ilişkiler, sitokinler, büyüme faktörleri, enzimler, transport proteinleri ve adezyon molekülleri etkilidir (23,31).

Kalsiyum, magnezyum, bakır ve çinkonun spermatogenez için önemli olduğu bilinmektedir. Çinko, spermium nükleusunun kromatin yoğunlaşmasında işlev görür (33). Testiküler makrofajlar, direkt ve indirekt yoldan Sertoli hücresi aktivasyonunu ve germ hücrelerinin yaşamını etkiler. Spermatogenezin hasarlandığı olgularda, testisteki makrofaj sayısının arttığı bildirilmiştir (34).

Artan yaşla birlikte spermatogenezde bazı değişiklikler meydana gelir. Koyu ve açık TipA spermatogoniumların sayısında azalma, genetik bozukluklar ve spermatidlerde görülen malformasyonların yanı sıra, yaşla birlikte Sertoli hücrelerinin sayısında da azalma görülür. Spermiositler, spermatidler ve spermiumlar spesifik antijenler salarlar, fakat sperm hücresi yapımı pubertede başladığı için, bu antijenler, puberteye kadar oluşmazlar. Bu nedenle immun tolerans gelişmez. Daha sonra otoantikörlerin gelişimini ise kan-testis bariyeri engeller. Spermatogenik hücreler, özellikle spermiositler toksik ajanlara karşı çok duyarlıdır. Beslenme bozuklukları, sistemik hastalıklar, yaygın yada lokal infeksiyonlar, genetik bozukluklar, testiküler ısının yükselmesi, steroid hormonlar ve onlara benzer ilaçlar, kemoterapötik ilaçlar, antimetabolitler, kadmium tuzları, kurşun ve pestisitler gibi toksik ajanlar, mutajenler ve radyasyon spermatogenezini etkileyen faktörler arasında sayılabilir. Bu ajanlar, sperm üretimini azaltırlar, kromozomal ve morfolojik anomalilere yol açarlar (22–24,27,34–37).

### 2.6. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi

İnfertilite, bir yıl korunmasız cinsel birleşmeden sonra gebelik oluşmaması olarak tanımlanır. Normal bir çiftin bir ay içerisinde gebe kalma şansları %20-25, altı ay içerisinde %75 ve bir yıl içerisinde ise %90' dır. Gebeliklerin çoğu ovulasyon günü veya ovulasyondan önceki ve sonraki üç gün içerisinde bulunan cinsel ilişki neticesinde görülür. Sadece ovulasyonu takip eden günlerde bulunan cinsel ilişkilerin çok azı gebelikle sonuçlanır. Hem erkek hem de

kadın için 24 yaşında fertilizasyon oranları en yüksektir. Fertilizasyon oranları bu yaştan sonra her iki cinste de azalmaya başlar. İnfertilite olgularının yaklaşık %20'si tamamıyla bir erkek faktöründen kaynaklanmaktadır. %30-40'ında ise hem erkek hem de kadın faktörleri birlikte görülür. Dolayısıyla infertil çiftlerin yarısında en az bir erkek faktörü söz konusudur (38).

İnfertil erkeğin değerlendirilmesine öykü almak ile başlanır. İlk değerlendirme fizik muayene ve başlangıç laboratuvar incelemeleri ile tamamlanır. Öykü, fizik inceleme ve laboratuvar sonuçlarına göre ayırıcı tanı için ek özel testlere yönelinmelidir. Erkeklerde infertiliteye yol açan durum ve durumları tespit etmek değerlendirmenin temel amacıdır. İnfertiliteye yol açan özel bir neden bulunursa tedavi ona yönlendirilerek sonuca gidilir. Ancak olguların çoğunda infertilitenin idiyomatik olduğu da unutulmamalıdır. Bilinen bir etyolojik faktör saptanamıyor ise ampirik tedavi, intrauterin inseminasyon (IUI), invitro fertilizasyon (IVF) veya intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) gibi tedavi yöntemleri önerilebilir. Alternatif olarak donör inseminasyon ve evlat edinme unutulmamalıdır. Eşlere her türlü alternatif anlatılmalı, hasta uzun süreli ve sonuçsuz tedavilerle oyalanmamalıdır (28).

İnfertil erkeğin değerlendirilmesindeki hedefler:

- 1-düzeltililebilir durumların,
- 2-başka yöntemlerle düzeltilemeyen ancak erkeğin spermini kullanarak yapılan ÜYT (üremeye yardımcı teknikler) ile tedavi edilebilecek nedenlerin,
- 3-bu tekniklerle de tedavi edilemeyen ve donör inseminasyonu ya da evlat edinmeyi gerektirecek nedenlerin,
- 4-altta yatan önemli tıbbi patolojilerin,
- 5-hastayı veya çocuğunu etkileyebilecek genetik ve/veya kromozomal bozuklukların belirlenmesine yöneliktir (36).

### **2.6.1. Anamnez**

İnfertilitenin araştırılmasına genel üreme hikayesinin alınarak ve 15 gün arayla 2 semen analizi yapılarak başlanır. Üreme hikayesinde

- cinsel ilişki sıklığı ve zamanlaması,
- infertilite süresi ve önceki fertilizasyon durumu,
- çocukluk hastalıkları,



- çocukluk ve puberte gelişimi,
- sistemik hastalıklar ve geçirdiği ameliyatlar,
- cinsel yaşam,
- cinsel yolla geçen hastalıklar,
- gonadal toksinlere maruz kalınımı sorgulanmalıdır (36).

Eğer erkekte temel değerlendirme sırasında üreme öyküsünde şüpheli bir durum veya semen analizinde bir bozukluk saptanırsa ileri araştırma yapılmalıdır. Açıklanamayan infertilite olgularında ya da kadının tedavi edilmesine rağmen devam eden infertilite durumunda da erkeğin ayrıntılı araştırılması gerekir. İleri araştırmada tam detaylı medikal ve üreme hikayesi alınır, fizik muayene ile birlikte 15 günden az olmayan aralıklarla en az iki semen analizi yapılır. Bunları takiben, spesifik problemleri ya da hikaye, fizik muayene veya semen analizi sırasında kaydedilen sorunları araştırmaya yönelik diğer ek testler de istenmelidir (28).

### **2.6.2. Fizik Muayene**

İnfertil erkeğin fizik incelemesi tüm sistemleri kapsamaktadır. Hastanın vücut yapısı ve virilizasyonu incelenir. Sekonder seks karakterlerinin gelişimine bakılır, jinekomasti araştırılır. Genital muayenede peniste kurvatür varlığı ve üretral meatusun yeri incelenir. Testis boyutları ölçülür. Normal erişkin testis volümü 24±4 ml'dir. Testis volümünün düşük olması seminifer tübül sayısının da az olması anlamına gelecektir. Epididim muayenesinde endürasyonlar, düzensizlikler ve kistik oluşumlar muayene ile saptanabilir. Spermatik kord ayakta muayene edilerek varikozel araştırılmalıdır. Klinik bulgusu olmayan hastalarda varikozel araştırmak için radyolojik görüntüleme gerekmez (39).

### **2.6.3. Semen Analizi**

Hikaye ve fizik muayeneden sonra, erkeğe ait laboratuvar testleri yapılmalıdır. Her hastanın en az 15 gün aralıklarla yapılan, iki ya da üç semen analizi bulunmalıdır. İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde semen analizi çok önemli bir yer tutar. Semen analizi, hastaların steril ve fertil gruplar şeklinde kesin ayırımının yapılmasını sağlamaz. Semen parametrelerinin kalitesi azaldıkça istatistiksel olarak gebelik şansı da azalır ama sıfıra inmez. Buna rağmen

doğru şekilde yapılmış bir semen analizi infertil erkeğin değerlendirilmesinde önemli bir araçtır (40) (Tablo 1).

**Tablo 1.** WHO 2010 semen analizi referans aralığı

PARAMETRE	REFERANS ARALIğI
Hacim	1,5 ml (1,4–1,7)
Toplam sperm sayısı	39x10 <sup>6</sup> (33–46)
Sperm konsantrasyonu	15x10 <sup>6</sup> /ml (12–16)
Toplam motilite	% 40 (38–42)
İleri doğrusal motilite	% 32 (31–34)
Canlılık	% 58 (55–63)
Sperm morfolojisi	% 4 (3–4)

### 2.6.3.1. Semen Toplanması

Semen en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrası toplanmalı ve bu süre 7 günü geçmemelidir. Semen laboratuvar yanında özel olarak hazırlanmış bir odada görsel cinsel uyarı ve masturbasyon yöntemi ile toplanmalıdır (41).

Aynı hastaya ait farklı semen örneklerinin doğru biçimde karşılaştırılmasının yapılabilmesi için, örnek toplamadan önceki cinsel perhiz süresinin sabit tutulması önem taşır (40).

Cinsel perhiz süresince gün başına sperm sayısında %25 artış olur, sperm motilite ve morfolojisinde değişiklik olmaz. Bu süre bir haftayı geçerse motilitede azalma bildirilmiştir. Sperm örneği dışarıdan laboratuvara getirilecekse vücut ısısında ve 1 saat içinde ulaştırılmalıdır (42).

### 2.6.3.2. Semen Makroskopik Değerlendirilmesi

Semen toplandığında koagulum halindedir ve 5–25 dakika arasında PSA ve plazminojen aktivatör gibi prostat kökenli proteazlar nedeniyle likefiye olur. Koagulasyondan seminal veziküllerden salgılanan bir madde sorumludur. Konjenital bilateral vas deferens agenezisli (CBAVD) hastalarda seminal veziküller ya yoktur ya da hipoplaziktir. Böyle hastalarda

semen koagüle olmaz, asidik ve düşük hacimlidir. Semen örneğinde likefaksiyon bozukluğu var ise bunun, likefaksiyondan sonra hipervizköz kalan semenden ayırt edilmesi gerekir. Likefiye olmamış semen koagulum halinde kalırken, hipervizköz semenin koagulum hali azalır fakat kıvamı normalden daha koyu kalır (40).

Likefaksiyon gelişmemiş hastaların semeninde doku plazminojen aktivatör düzeyleri normal semendekinden daha düşük bulunmuş olmakla birlikte (43), aynı ilişki PSA düzeyleri için geçerli değildir (44). Likefiye olmamış semenin erkekte fertilité üzerine etkisi açık değildir. Semende likefaksiyon yok veya hipervizkozite var ise postkoital testin yapılması önerilmektedir. Bu test sırasında servikal mukusta yeterli sayıda hareketli sperm var ise semenin kıvamının bir önemi yok demektir. Ancak servikal mukus kaliteli olmasına karşın az sayıda sperm var ise genellikle yapılacak olan artifisyel inseminasyondur. Semenin veya  $\alpha$  amilaz ilave ederek likefaksiyonu artırmak mümkündür ancak bu yaklaşımın fertilitéyi artırdığına dair bilgi yoktur (45,46).

Semen volümü WHO' ya göre 1,5 ml.' nin üzerinde olmalıdır. Bunun altındaki değerlerde retrograt ejakülasyon ve distal kanal patolojileri akla gelmeli ve buna yönelik araştırmalar yapılması gerekmektedir. Seminal sıvının tam yokluğuna aspermi denilmektedir. Bu durum ya retrograt ejakülasyona ya da emisyon olmamasına bağlıdır. Emisyon olmamasının en sık nedeni spinal kord yaralanmasıdır. Diabet ve multipl skleroza bağlı olarak sıklıkla görülmektedir. Retroperitoneal cerrahi ejakülasyonu kontrol eden sempatik ganglionlara zarar vermektedir, ancak bugün sıklıkla uygulanan sinir koruyucu tekniğe bağlı olarak bu komplikasyon azalmıştır. Asperminin diğer bir nedeni de orgazm olunamaması gibi psikolojik bozukluklardır. Ancak düşük ejakülat volümünün en sık nedeni spesmenin doğru toplanamamasıdır. Bu yanılığın ortadan kaldırmak için test tekrarının yapılması önemlidir. Diğer bir sık neden de parsiyel retrograt ejakülasyona bağlıdır. Bunun nedenleri ise nörolojik bozukluklar, ilaçlar, mesane boynu cerrahisi ve bazı sebebi açıklanamayan durumlardır. Seminal sıvının büyük çoğunluğunu seminal vezikül salgıları oluşturmaktadır. Parsiyel ve total ejakülatuar kanal tıkanıklıklarında düşük ejakülat volümü görülmektedir. Vazal agenezde seminal vezikül sıklıkla yok olduğu için ejakülat hacmi azdır. Seminal veziküller semende fruktozun kaynağıdır. Normal semende fruktoz konsantrasyonu 120–450 mg/dl'dir. Seminal vezikül inflamasyonlarında, androjen eksikliğinde, parsiyel veya total distal ejakülatuar kanal patolojilerinde seminal fruktoz konsantrasyonu 120 mg/dl'nin altındadır. Düşük volümlü semende fruktoz tayini mutlaka yapılmalıdır (42,47).

Semen pH'sı 7,2 veya üzerinde olmalıdır. pH, asidik prostat salgıları ve alkalen seminal vezikül salgılarının karışım oranına bağlı olarak değişebilir. Normal pH ile beraber düşük semen volümü normal olabileceği gibi tam olmayan toplama veya retrograt ejakülasyon sonucu da olabilir. Düşük ejakülat volümü ve/veya asidik pH ejakülatuar kanal patolojilerini veya vaz deferens yokluğunu akla getirmelidir (41).

### **2.6.3.3. Semen Mikroskopik Değerlendirmesi**

#### **Sperm sayısı**

Fertil popülasyonda bildirilen ortalama sperm sayısı mililitrede 70–100 milyondur. WHO'nun referanslarına göre olması gereken en az sperm sayısı 15 milyon/ml'dir. Bu değer altı oligospermi olarak adlandırılmaktadır. İzole oligospermi nadirdir, çoğu zaman sebebi bilinmez ve bazen androjen eksikliğine bağlı olabilir. Sayı 10 milyon/ml'den az olursa testosteron ve FSH düzeylerinin bakılması önerilmektedir. Sadece FSH yüksekliği spermatogenezdeki sıkıntıyı gösterir ve tam bir endokrinolojik değerlendirmeye gerek yoktur. Oligospermiye neden olabilecek saptanabilir en sık neden varikoseldir, bunda da seminal parametrelerde multipl defekt vardır. Ejakülatta spermatozoa hücrelerinin hiç görülmemesi azospermi olarak adlandırılır. Azoospermi; yetersiz hormonal stimülasyon (hipogonadotropik hipogonadizm), spermatogenez anormallikleri ya da obstrüksiyon nedeniyle meydana gelebilir. Azoospermik hastanın değerlendirilmesi, azosperminin spermatogenez eksikliğinden mi yoksa duktal obstrüksiyondan mı kaynaklandığını saptamaya yönelik olmalıdır. Santrifüj edilmiş semen örneğinde sperm saptanması bilateral duktal obstrüksiyonu ekarte ettirir. Fizik muayenede testisin büyüklüğü ve kıvamı, epididimin dolgunluğu ve vazların varlığı veya yokluğu yol göstericidir. Obstrükte testisler genellikle normalden büyük, epididimler belirgin olmaktadır. Genel bir kaide olmamakla birlikte, testiküler yetmezliği olan hastalarda testisler normalden küçüktür. Hipogonadotropik hipogonadizimli olgularda virilizasyon ve sekonder seks karakterleri azalmıştır, testisler oldukça küçüktür. Bu olgularda serumda LH, PRL ve testosteron düzeyi mutlaka bakılmalıdır (41,47).

## **Sperm motilitesi**

Motilite kuyruk hareketi gösteren sperm yüzdesidir. Motilitenin değerlendirilmesi likefaksiyondan sonra 1 saat içinde yapılmalıdır. Bu süre içerisinde semen oda sıcaklığında saklanmalıdır. Spermin ileri hareketinin kalitesi değerlendirilerek kaydedilmelidir. Sık kullanılan bir metoda göre sperm hareketleri 5 skalaya ayrılır. 0 hiç motilitenin olmadığını gösterir; 1 ileri progresyon göstermeyen, tembel hareketi; 2 yavaş, doğrusal olmayan, dolambaçlı ileri hareketi; 3 oldukça doğrusal ama orta hızda hareket eden sperm; 4 ise doğrusal ve hızlı hareketi belirtir (48). Spermden en fazla görülen hareket kategorisi değerlendirmeye alınır. Alternatif bir sistem sperm 4 kategoride ele alır: A ileri hızlı hareketi; B yavaş ya da tembel ileri hareketi; C ileri olmayan hareketi ve D hareketin bulunmadığını belirtir. Bu sistemde, her bir kategoriye giren sperm yüzdesi değerlendirmeye alınır. WHO 'a+b' motilitenin %40'nin, sadece 'a' kalite motilitenin ise %32'in üzerinde olması gerektiğini belirtmiştir (47). Sperm hareket bozukluğu (astenospermi) motilitede ya da ileri harekette veya her ikisinde birden azalmayı ifade eder. Bu olgularda spermatozoanın yapısal defektlerinden, uzamış cinsel perhiz süresi, genital sistem enfeksiyonları, antisperm antikolar, parsiyel duktal obstrüksiyon, varikozel ve idiyomatik faktörler sorumlu olabilir. Astenospermi bulgusu ya da şiddetli sperm aglütinasyonu immunolojik infertilite olasılığını akla getirir. Bu durumda antisperm antikör testi yapılmalıdır. Semen analizinde lökosit sayısı artmışsa enfeksiyondan şüphelenilmelidir ve bu durumda gerekli ileri tetkikler yapılmalıdır. Varikozel, infertil erkeklerde cerrahi olarak düzeltilen en sık anomali olup, sperm sayısı ve şekil bozukluklarının yanı sıra sperm motilite bozukluğundan da sorumlu olabilir. Astenospermik hastalarda, özellikle ejakulat volümü düşük ve sperm canlılığı azalmış olgularda, parsiyel ejakulatör kanal tıkanıklığı düşünülebilir. Bu hastalarda TRUS yapılabilir. Sperm motilitesinin hiç bulunmadığı ya da motilitenin %5' in altında olduğu olgular sperm canlılık testleri ile değerlendirilmelidir. Motilitenin hiç olmadığı ya da azaldığı durumlarda yüksek fraksiyonda canlı sperm bulunması, immotil silia sendromu ve Kartagener sendromunda olduğu gibi ultrastrüktürel bir anomaliye işaret eder. Spermatozoanın elektronmikroskopik tetkiki böyle olguları ayırt eder. Bazen cinsel perhiz süresinin fazla uzaması da motilitede ciddi azalmayla sonuçlanabilir. Son olarak, sperm toplama kaplarındaki toksik kalıntılar ya da sıcak veya soğuk ortam azalmış motiliteden sorumlu olabilir (41).

### **Yuvarlak hücre sayısı**

Semendeki yuvarlak hücreler immatür spermatozoalar, genitoüriner sistem epitel hücreleri, prostatik hücreler ve lökositlerden oluşur. Normal semende yuvarlak hücre sayısı  $< 5$  milyon/ml olmalıdır. Yuvarlak hücrelerden klinik olarak önemli olan lökositlerdir. Yuvarlak hücre sayısı  $>1$  milyon/ml. olduğunda lökosit sayısını değerlendirmek için myeloperoksidaz testi (Endtz testi) yapılmalıdır. Normal semende lökosit sayısı  $<1$  milyon/ml olmalıdır (41). Artmış yuvarlak hücre sayısı olanların ancak 1/3'ünde gerçekten pyospermi vardır ve semende bakteri bulunan olgularda her zaman pyospermi saptanmamaktadır. Bu nedenle pyospermili birçok hastada genital trakt enfeksiyonu yoktur (42). Semende lökosit enfeksiyon haricinde, anormal spermatogenez, çevresel faktörler, seks alışkanlıkları ve cinsel perhiz süresi ile ilgili olabilir (41).

### **Sperm morfolojisi**

Sperm morfolojisi değerlendirmesi, taze semende elektron mikroskop ile, taze semende faz kontrast mikroskop ile ve spermleri çeşitli yöntemlerle boyayarak yapılabilir. Post-koital mukustan ya da zona pellusida yüzeyinden elde edilen spermler normal kabul edilir (Şekil 4).



**Şekil 4.** Spermin morfolojik değişiklikleri

Doğru bir morfolojik değerlendirme için spermin boyanması gereklidir. Bunun için en fazla kullanılan boyama yöntemleri “Papanicolau” yöntemi ve “Diff- Quick” yöntemidir. Değerlendirmede birçok kriter kullanılmasına karşın en fazla kullanılanlar WHO kriterleri ve

Kruger'in kesin kriterleridir (49). Bir spermin normal kabul edilebilmesi için baş, boyun, orta kısım ve kuyruğun normal olması gereklidir. Normal sperm başı, oval, boyu 5–6 $\mu$ , eni 2,5–3,5 $\mu$ , boyunun genişliğine oranı 1.5- 1.75 olmalıdır. Baş bölgesinin %40-70'ini kapsayan akrozomal bölge olmalıdır. Orta kısım ince uzun ve genişliği <1 $\mu$  , boyu başın 1,5 katı ve başa aksiel olarak bağlanmış olmalıdır. Sitoplazmik artıklar normal baş alanının yarısından az olmalıdır. Kuyruk düz, orta kısımdan ince ve yaklaşık 45 $\mu$  uzunluğunda olmalıdır. WHO kriterlerine göre ara formlar normal, Kruger'in kesin kriterlerine göre anormal kabul edilir (41,42) (Tablo 2).

**Tablo 2.** Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi

<b>Baş</b>	Uzunluk: 5–6 $\mu$ Genişlik: 2,5–3,5 $\mu$
<b>Akrozom</b>	Başın % 40-70'ini oluşturmali
<b>Orta parça</b>	Genişlik 1 $\mu$ Uzunluk 1,5 x baş uzunluğu
<b>Kuyruk</b>	Boyuna yaklaşık 45 $\mu$ Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış Kırık içermeyen
<b>Sitoplazmik artık</b>	Baş alanının % 30-70'inden az Sadece orta parçada lokalize

**Spermde yaygın görülen defektler:**

Baş defektleri: Büyük, küçük, yassı filiform, yuvarlak, amorf, vakuollü, küçük akrozomlu, çift baş ve bunların kombinasyonları.

Boyun ve orta kısım defektleri: Bükük boyun, başa düzensiz bağlanma, kalın boyun, ince boyun ve bunların kombinasyonları.

Kuyruk defektleri: Kısa, birden fazla, ince, kırık, kıvrık, düzensiz genişlikte ve bunların kombinasyonları şeklindedir.

Spermde normal morfolojiye sahip sperm oranı WHO'ya göre  $> \%4$ , Kruger' in kesin kriterlerine göre  $\geq \%14$  olmalıdır (51). Kruger'in kesin kriterleri kullanılarak yapılan çalışmada, sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml. üzerinde ve hareket  $\% 30$ 'un üzerinde olan popülasyonda, normal morfolojili sperm oranı  $\% 14$ 'ün üzerinde olanlarda IVF'de  $\% 91$ ,  $\% 14$ 'ün altında olanlarda ise  $\% 37$  oranında fertilizasyon saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise  $\% 4$ 'ün altında  $\% 7,6$   $\% 4-14$  arasında  $\% 63$  fertilizasyon oranları bildirilmiştir (51).

Rutin semen analizlerinde genelde bakılmayan fakat klinik olarak kullanılabilen çoğul sperm defekti indeksleri de vardır. Teratospermik indeks (multipl anomali indeksi) (TZI) defekt sayısının, defektli sperm sayısına bölünmesi ile elde edilir.  $TZI > 1,6$  ise gebelik şansı düşüktür. Defekt sayısının toplam sperm sayısına bölünmesi ile de sperm deformite indeksi (SDI) hesaplanır.  $SDI > 1.6$  ise fertilizasyon oranı düşmektedir (50).

Özellikle amorf ve baş anomalisi taşıyan spermlerin yapısal kromozom anomali sıklığı da artmaktadır. Böyle olgularda sperme ait kromozom anomalilerinin fertilizasyon bozukluğundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Normal sperm değerleri, gebeliği sağlamak için gerekli olan minimum değerler değildir. Bu değerlerin dışında da olursa erkek fertil olabilir. Aksine sperm parametreleri normal sınırlar içinde bulunan erkeklerde infertil olabilirler (11).

#### **2.6.4. Endokrin İnceleme**

Erkeklerde istenecek temel hormonlar serum FSH, testosteron ve östradiol'dür (52). Testosteron düşük bulunursa total ve serbest testosteron ölçümlerinin tekrarı yanı sıra LH ve prolaktine de bakılmalıdır. Spermatogenez bozuk olan erkeklerin çoğunda serum FSH değerleri normal bulunmakla birlikte, FSH aşırı yükselmiş ise büyük olasılıkla spermatogenez bozukluğuna işaret eder. Her ne kadar serum gonadotropin düzeyleri pulsatil salınımlarından dolayı değişkenlik göstermekteyse de, olgunun endokrinolojik yönden klinik durumunu aydınlatmada sabah tek ölçümleri yeterli olabilir. Testosteron, FSH, LH ve prolaktin arasındaki ilişki klinik durum hakkında bilgi verir (10). Özellikle sperm sayısının düştüğü



(<10 milyon/ml) veya morfoloji bozukluğu görülen sperm analizi bozukluklarında, cinsel fonksiyon bozukluğu olan ya da spesifik bir endokrinopatiye işaret eden hastalığın varlığı durumlarında hormonal inceleme gereklidir. Sperm analizi normal olan erkeklerde endokrinolojik bir bozukluk çok nadir görülür. Bazı araştırmacılar infertil erkeklerin tetkikinde endokrin değerlendirmenin rutin olarak yapılmasını önermekteyseler de bu konuda fikir birliği yoktur (10).

### **2.6.5. Ejakülasyon Sonrası İdrarda Sperm Aranması**

Bilateral vaz deferens agenezisi ya da klinik olarak hipogonadizm belirtileri bulunmayan erkeklerde, ejakülat volümü <1 ml. ise ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranmalıdır. Azospermik veya aspermik bir hastada ejakülasyon sonrası idrarda sperme rastlanması, retrograd ejakülasyona işaret eder. Ejakülat volümünde düşüklük ya da aspermiye, retrograd ejakülasyon dışında emisyon yokluğu, ejakülatuar kanal tıkanıklığı, hipogonadizm ve bilateral vaz deferens agenezi olgularında da rastlanır. Ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranması için, idrar örneği santrifüj edilerek, pellet mikroskop altında incelenir. İnceleme sonucunda en az bir sperm görülmesi retrograd ejakülasyona işaret eder (10).

### **2.6.6. Radyolojik Değerlendirme**

Radyolojik değerlendirmenin amacı parsiyel veya total duktal obstrüksiyonun olup olmadığı, özellikle olgularda varikoselin tespiti ve gerekli hallerde testis volümünü saptamaktır. Ancak parsiyel duktal obstrüksiyonu infertilitenin diğer nedenlerinden, özellikle sebebi bilinmeyen oligospermiden ayırt etmek çok zordur.

**Vazografi:** Testis biopsisi ile spermatogenezi ispatlanmış azospermik olgularda obstrüksiyonun yerini saptamak için kullanılmaktadır.

**Transrektal Ultrasonografi:** Vaz deferensleri palpe edilen ve ejakülat volümü azalmış azospermik erkeklerde ejakülatör kanal tıkanıklığını araştırmak amacıyla TRUS uygulanır. Normalde seminal veziküllerin ön-arka çapı <1,5 cm.'dir. TRUS sırasında seminal veziküllerde, ejakülatör kanallarda dilatasyon ve/veya prostat içinde orta hat kisti saptanması

parsiyel ya da komplet ejakülatör kanal tıkanıklığı için kesin olmasa da, olası bir tanı koydurur (53).

Total ejakülatör kanal tıkanıklığı olan erkekler düşük hacimli, fruktoz negatif, asit pH'lı, azospermik ejakülat çıkarırlar. CBAVD'li olgular da sıklıkla seminal vezikül agenezisine ya da atrofisine sahip olduklarından, aynı bulguları gösterebilir. Düşük ejakülat hacimli, oligospermik erkeklerde ve spermin ileri motilitesi bozulmuş bazı erkelerde parsiyel ejakülatör kanal darlığı bulunabilir. Bu nedenle, düşük ejakülat hacimli, vaz deferensleri palpe edilebilen ve normal testis volümü bulunan oligospermik erkeklerde de parsiyel ejakülatör kanal darlığı düşünülerek TRUS istenebilir (10).

**Skrotal Ultrasonografi:** Varikosel, spermatosel, vaz deferens yokluğu, epididimlerde sertlik ve testiküler kitle gibi skrotal patolojilerin çoğu fizik muayene sırasında anlaşılabilir. Testislerin yukarı pozisyonda lokalize olduğu ya da küçük skrotumu bulunan ve fizik muayene bulgularının şüphede bıraktığı durumlar ile, skrotum ve spermatik kordonun muayenesini engelleyen hidrosel ya da diğer anatomik anormallik durumlarında da skrotal ultrasonografi yapılması gerekir. Skrotal ultrasonografi testiste kitle bulunan olgularda da endikedir. Her ne kadar muayene ile saptanamayan varikoseller skrotal renkli Doppler ultrasonografi ile tanınabilirse de bunların klinik önemi tartışmalıdır (10).

#### **2.6.7. Sperm ve Semene Ait Spesifik Testler**

Erkek infertilitesinin standart araştırmasında sperme ait spesifik testlerin yapılması gerekmez. Ancak sperm analizi de her zaman erkeğin fertilitate potansiyelini tam olarak yansıtmayabilir. Bu durumlarda tanı koyabilmek için diğer spesifik testlere gerksinim vardır. Açıklanamayan infertilite olgularında erkek faktörünün de eşlik edip etmediğini ortaya koymak için, ya da ÜYT ile tedavi seçimi yapılmasında sperm ve semene ait spesifik testler yararlı olabilir. Bu testler arasında; antisperm antikor tayini, sperm vitalite testleri, sperm-servikal mukus etkileşim testleri, sperm penetrasyon testi, akrozom reaksiyonu, hemizona testi, sperm kreatin kinaz ölçümü, ROS tayini, sperm yüzeyinde mannoz reseptör tayini gibi nadiren gereken testler bulunur. Eğer tedavinin yönlendirilmesinde faydalı olacaksa bu testlerin yapılması önerilir (10).

### 2.6.8. Testis Biyopsisi

Testiste sperm üretiminin varlığını göstermek amacıyla, perkütan testis biyopsileri uzun süre rutin olarak kullanılmıştır. Ayrıca obstrüktif azospermi olgularında da sperm elde edilmesi amacıyla biyopsi uygulamaları yapılmıştır. Bununla birlikte özellikle son yıllarda mikrocerrahi konusunda sağlanan gelişmelerin ardından, testisten mikrodiseksiyon yöntemi ile sperm elde edilmesi ve elde edilen bu hücrelerin mikroenjeksiyonda kullanılması gündeme gelmiştir. Mikrocerrahi yöntemlerin kullanılması ile elde edilen canlı sperm hücre yoğunluğu, klasik perkütan yöntemlerle elde edilen sayıdan çok daha fazladır (54). Bundan dolayı klasik yöntemin tanı amacıyla kullanılması günümüzde oldukça azalmıştır. Testis biopsisinin histopatolojik değerlendirmesinde Levin'in tanımlamaları esas alınmaktadır (55).

**Normal spermatogenez:** Normal testis yapısı gözlenir. Kanseri veya karsinoma in situ bulgusu yoktur. Bütün seminifer tübül kesitlerinde spermatogenez aktivitesi izlenir. Bazı klinisyenlere göre tübül başına >20 spermatid sayılması kantitatif olarak normal kabul edilir.

**Matürasyon duraklaması (arrest):** Sperm hücresi matürasyonu, birçok basamakta duraksamaya maruz kalabilir ve arrest paternleri oluşur. Erken evrelerde mayoz bölünmeyle, geç evrelerde spermiogenez regülasyonu ile ilgili bir sorun olabilir.

**Hipospematogenez:** bu paternde, tüm germ hücreleri bulunur ancak sayısal olarak azdır. Bunun sonucunda ejakülatta az sayıda sperm bulunabilir.

**Germ hücresi yokluğu veya aplazisi:** Germ hücresine hiç rastlanılmayan bu durum "Sertoli Cell Only" sendromu olarak da adlandırılır.

**Diğer patternler:** Seminifer tübüllerin skar ya da sklerotik dokuyla tamamen veya kısmen yer değiştirmesi ile karakterizedir (56).

### 2.6.9. Genetik Araştırma

Erkek infertillitesi ile ilişkili olarak üç genetik faktör bilinmektedir.

1. Konjenital vaz agenezi nedeni olan kistik fibrozis gen mutasyonları
2. Testis fonksiyonlarını bozan kromozom anomalileri
3. İzole spermatogenez defekti yapabilen Y kromozom mikrodelsiyonları (11).

Azospermik erkeklerin %10-15'inde, oligozoospermik erkeklerin %5'inde, normal erkeklerin ise % 1'inden azında karyotip anomalisi bulunur (57). İnfertilite nedeni ile tetkik edilen erkekler arasında en sık rastlanılan karyotip anomalisi Klinefelter sendromudur. Y-kromozom mikrolelesyonuna azospermik veya şiddetli oligozoospermik erkeklerin %10-15'inde rastlanır (58). TESE yapılacak olgularda daha önceden Y kromozomundaki delesyona uğramış bölgenin tespit edilmesinin, TESE sırasında hücre bulma şansını tahmin etmede prognostik öneme sahip olduğu ortaya konmuştur. AZFc bölgesini de içine alan kombine delesyonlarda (AZFb+c, AZFa+b+c) testiküler spermatozoaların total yokluğu söz konusudur. AZFb delesyonlarının prognozu ise oldukça kötüdür. AZFb bölgesinin total yokluğunda, TESE ile hücre elde etme oranı sıfıra yakındır. Tek başına AZFc delesyonlarında ise % 50 olguda matür spermatozoa bulunmaktadır (11). Bu nedenle, nonobstrüktif azospermisi ya da şiddetli oligozoospermisi bulunan erkeklerin, kromozom anomalisi veya Y-kromozomu mikrolelesyonu taşıyabilecekleri konusunda bilgilendirilmeleri gerekir. Böyle erkeklerden spermleri ICSI'de kullanılmadan önce karyotip analizi ve Y-kromozom mikrolelesyonu testleri istenmelidir. Erkek ya da kadında genetik bir bozukluktan şüphelenilirse, genetik danışma verilmelidir (10).

Görüldüğü gibi, erkek infertilitesi, etyolojisinde genetik faktörlerin de yer aldığı kompleks bir hastalıktır. Erkek infertilitesi olgularının büyük oranda idiopatik olarak adlandırılması, spermatogenez ve sperm fonksiyonlarının temel mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesi ve etyolojinin bu nedenle karanlık kalması sebebiyledir. Genetik infertilite olgularında spermatogenik bozukluğun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılacak geniş tabanlı assosiasyon çalışmaları, testiküler ve spermatozoal ekspresyon çalışmaları, spermatogenezin moleküler mekanizmalarını aydınlayacak, gelecekte bu konudaki tanı ve tedavinin doğru yönlendirilmesini sağlayacaktır (59).

## **2.7. İnfertilite Tedavisi**

İnfertil erkeklerin tedavisinde farmakolojik yaklaşımlarla spermatogenez kalitesinin iyileştirilmesi amaçlanırken, cerrahi olarak ürolojik sorunlar ortadan kaldırılır. Hastaların büyük kısmında başlangıçta spesifik bozukluklar düzeltilerek ya da ampirik yöntemler kullanılarak semen kalitesinin iyileştirilmesi düşüncesiyle tedaviye başlanılmaktadır. Ancak,

farmakolojik bir tedavi planlanıyorsa bunun en az bir spermatogenez siklusu içine alacak şekilde 3 ay veya daha fazla süreyle kullanılması gerektiği unutulmamalıdır (60).

### **2.7.1. Erkek İnfertilitesinde Medikal Tedavi**

Erkek infertilitesinde medikal tedavi nedene yönelik (spesifik) ve ampirik olarak uygulanabilir (61).

#### **2.7.1.1. Spesifik Tedavi**

Endokrin bozukluklar, lökospermi, immunolojik infertilite, gonadotoksinlere maruziyet gibi durumlarda, bozukluğa yönelik medikal tedaviler uygulanır (61).

### **Endokrin Bozukluklar**

**a) Hipogonadotropik hipogonadizm:** Gonadotropin yetmezliğinde normal spermatogenezin başlatılması dışarıdan gonadotropik hormon veya gonadotropin releasing hormon verilmesiyle mümkün olabilir. Human koryonik gonadotropin (hCG) LH aktivitesine, Human menopozal gonadotropin (hMG) ise hem FSH hem de LH aktivitesine sahiptir. Spermatogenezin başlaması ilk 3–6 ay içerisinde görülürse de, bu süre 20 ay veya daha uzun da sürebilir. Sperm sayısı genellikle 10 milyonun üzerine çıkmaz. Birçok hastada sperm sayısı az olmasına rağmen gebelik sağlanabilmektedir. Spontan gebelik sağlanamayan olgularda sperm parametreleri göz önünde bulundurularak yardımcı üreme teknikleri uygulanır (11,60). Leydig hücre yetmezliğine bağlı primer hipogonadizm nadir görülen bir infertilite nedenidir. Serum testosteronunun normal düzeylere çıkarılabilmesi için testosteron replasmanı yapılır. Libido ve seksüel fonksiyonlarda düzelme de görülebilir, ancak bu olgularda testosteron replasmanının spermatogeneze katkısı yoktur (60).

**b) Hiperprolaktinemi:** Hiperprolaktinemide spermatogenez inhibe olur. Posterior hipofizden aşırı prolaktin salgılanması infertilite ve seksüel fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. Hiperprolaktinemili infertil hastalarda prolaktin inhibitörleriyle tedaviden olumlu sonuçlar alınmakta ve olgular fertil hale gelmektedir (60).

**c) Konjenital adrenal hiperplaziler:** Kortizol mekanizmasında enzimatik defekt sonucu böbreküstü bezlerinde üretilen aşırı miktardaki androjenler testiküler gelişimi engellemektedir. Puberte prekoks gelişir. Tanı kan ve idrar tetkikleri ile konur. Kortikosteroid tedavisi ile spermatogenez sağlanabilir (50).

**d) Tiroid fonksiyon bozuklukları:** Hipertiroidizm de spermatogenezis üzerine etkilidir % 0,6 oranında erkekte infertiliteye neden olabilir. Tiroksin replasman tedavisi genellikle fertilitenin tekrar kazanılması ile sonuçlanır (50,60,61).

### **Lökospermi**

Erkek infertil hastaların %10-20'sinde lökospermi vardır. Genital sistem infeksiyonuna ait semptomu olan olguların değerlendirilmesi ve tedavi edilmesi gerekmektedir (61).

### **İmmunolojik infertilite**

Antisperm antikörler erkek infertilitesinin %3-7'sinde immunolojik infertilite nedeni olarak görülürler. Sperm immünizasyonu gelişen infertil erkeklerin çoğunda sperm analizi normal olmasına karşın, spontan sperm aglütinasyonu ve motilite azlığı gibi durumlarda antisperm antikörlerin varlığı akla gelmelidir (61). İmmunolojik infertilitenin tedavisinde en çok başvurulan yöntem düşük doz sistemik kortikosteroidlerle yapılan immünsüpresyondur. Mekanizma tam olarak anlaşılmasa da steroidlerin inflamatuvar hücrelerin kemotaksisini engellediği sitokinler veya lenfosit büyüme faktörü salınımını önlediği, antikor üretimini azalttığı ve antijen-antikor birleşmesini bloke ettiği bilinmektedir. Kortikosteroid tedavisi ile gebelik görülme oranları % 6–50 arasında değişmektedir (60). İmmunolojik infertilite tedavisinde kortikosteroidlere alternatif olarak siklosporin kullanılabilir. Altı ay süreli kullanımlarında başarılı sonuçlar alındığı görülmüştür (60). Sperm yıkama yöntemleri kullanılarak sperm yüzeyinde ve seminal plazmada bulunan antisperm antikörler uzaklaştırılabilir. Ancak, spermin sadece dilüe edilerek yıkanması spermatozoa üzerine yapışık antikörleri tamamen uzaklaştırmaz. Son zamanlarda IgA1 proteaz enzimi kullanılarak IgA grubu antisperm antikörleri sperm yüzeyinden ayırmak mümkün olmuştur. Bu yöntem ve

yardımcı üreme tekniklerinin birlikte kullanılması immunolojik infertilite tedavisinde ümit vermektedir (60,62).

## **Gonadotoksinler**

Endüstriyel toksinlerin erkekte fertilitiyi azalttığı düşünülmektedir. Toksisitenin mekanizmasının germinal epitele direkt etki yoluyla olduğu gösterilmiştir. Değişik mesleklere özgü spesifik gonadotoksinler tanımlanmıştır. Bunlar değişik pestisitler, organofosfatlar, organoklorinler, karbamatlar, fumigantlar, herbisitler ve fungusitlerdir. Tedavi stratejisi bu etkenlerden uzak kalma ya da korunmadır. Erkek infertilitesinde endüstriyel ve tarımsal gonadotoksinlere maruz kalımın en aza indirilmesiyle infertilite riski azaltılabilir (61).

### **2.7.1.2. Ampirik Tedavi**

Belirgin patolojinin saptanmadığı oligozoospermi ve açıklanamayan infertilite varlığında, çok sık kullanılmamakla ve ayrıca sonuçları tartışmalı olmakla birlikte kullanılan çeşitli ampirik tedavi yöntemleri mevcuttur. Bu grupta hormonal ve non-hormonal tedaviler uygulanmaktadır (61).

#### **a) Antiöstrojenler**

**Klomifen sitrat:** Sentetik, steroid olmayan bir antiöstrojendir. Hipotalamus ve hipofizdeki östrojen reseptörlerine bağlanarak feed back inhibisyonu önler. GnRH, FSH ve LH sekresyonları yükselir. Bunların Leydig hücrelerinden testosteron salgısını artırarak ya da FSH yoluyla sertoli hücrelerini uyarak spermatogenezi düzeltmesi beklenir (63,64). Olguların % 4-89'unda sperm konsantrasyonlarında düzelme, % 0-70'inde ise motilitede düzelme bildirilmiştir. Buna bağlı olarak gebelik oranlarında % 0-90 arasında değişmektedir. WHO'nun yaptığı bir değerlendirmede seminal parametrelerde ve gebelik oranlarında anlamlı bir düzelme bulunmamıştır (60).

**Tamoksifen:** Klomifen sitrattan daha az etkiye sahip bir antiöstrojendir. Etki mekanizması klomifen sitrata benzer. Serumda östrojene duyarlı bağlayıcı protein konsantrasyonunda artış yapmaz. Sperm konsantrasyonunda % 0-100 arasında artış bildirilirken, gebelik sıklığı genelde % 11-40 olmaktadır. Motilite üzerine fazla bir etkisi bulunmaz (60).

## **b) Androjenler**

Yüksek doz testosteron gonadotropin sekresyonunu baskılar, intratestiküler testosteron üretimini durdurur ve spermatogenezi bozar. Bu tedavi yaklaşık 5 ay içerisinde azoospermi geliştirebilir. Tedavinin birden bırakılmasıyla spermatogenezin 4 ay içerisinde tekrar başlaması ve sperm sayısının artması amaçlanır (63-65).

Wang ve arkadaşlarının yaptığı plasebo kontrollü çalışmada semen parametrelerinde düzelme olmadığı ve gebelik oranlarının kontrol grubu ile aynı olduğu görülmüştür (66).

Günümüzde testosteron rebound tedavisi erkek infertilitesinin ampirik medikal tedavi seçenekleri arasında yer almamaktadır.

## **c) Gonadotropinler**

Hipogonadotropik hipogonadizmde hormonal tedavi ile başarılı sonuçların alınması normogonadotropik oligozoospermi olgularında gonadotropinlerin kullanımını gündeme getirmiştir (63).

Burada amaç testislerde testosteron yapımını artırarak spermatogenezi uyarmak ya da bilinmeyen bazı mekanizmalarla germinal epitel üzerine etkide bulunulmasını sağlamaktır. Çok sayıdaki çalışmalara göre; tek başına hCG kullanılarak sperm konsantrasyonunda ortalama % 17–35, motilitesinde ise % 22–94 düzelme elde edilmektedir. Gebelik oranları ise % 6–47 arasındadır. hCG ile birlikte hMG de eklendiğinde sperm konsantrasyonundaki artış % 50'ye çıkabilmektedir. Bununla birlikte geniş serilerde kombine tedavi ile seminal parametrelerde, serum gonadotropinleri ile serum testosteron düzeylerinde plasebodan farklı sonuçların elde edilemediği de bildirilmektedir. Ampirik gonadotropin tedavisi ekonomik profili ve sonuçlarının çok iyi olmaması nedeniyle ancak seçilmiş bir grup hastada kullanılabilir (60). Ciddi seminal parametre bozukluğu gösteren ya da daha önce IVF uygulamalarında başarısız kalınmış olgularda pür FSH kullanılması ile fertilizasyon oranlarında artış gözlemlenmiştir. Burada seminal parametrelerde düzelme gözlenmemekle birlikte kalitatif bir etki söz konusudur. Bu şekilde yardımcı üreme tekniklerinde başarıyı artırmak ya da spontan gebelik şansını yükseltmek amacıyla pür FSH kullanımı tavsiye edilmektedir (67).



#### **d) Gonadotropin Releasing Hormon**

Alternatif bir tedavi yöntemi sentetik GnRH analogları kullanarak hipofizer gonadotropin salınımını artırmaktır. Normalde GnRH 90 dakika aralıklarla salgılanır ve 4–9 dakika gibi kısa bir yarı ömrü vardır. Bu nedenle taşınabilir infüzyon pompası ile aralıklı hormon verilmesi normal GnRH salgılanmasını en iyi taklit eden sistem olmuştur. 90–120 dakika aralıklarla 5µg GnRH'un subkutan olarak 12–24 hafta boyunca kullanılması önerilir. Bu yöntemle alınan sonuçlar çelişkilidir. Uygun doz ve salınım sıklığı ayarlanabildiğinde yeterli cevap alınması mümkün olabilir (60).

#### **e) Aromataz İnhibitörleri**

Aromataz, testosteronun periferde östradiole çevrilmesini sağlayan bir enzimdir. Östrojenlerin spermatogenez üzerine olumsuz etkileri vardır. Östrojen seviyesinin düşürülmesi veya testosteron östrojen dengesindeki bozuklukların düzeltilmesi ile idiopatik oligozoosperminin düzelebileceği düşünülerek aromataz inhibitörleri denenmiştir. Plasebodan farklı sonuçlar alınamayan çalışmaların yanı sıra, % 33'lük gebelik oranları da gözlemlenmiştir. Sperm motilitesi ve semen volümü üzerine belirgin etkisi bulunmamaktadır (60,68).

#### **f) Diğer İlaçlar**

**Kallikrein:** Kallikrein, kininojenin bradikinin ve kallidine dönüşümünü sağlayan polipeptid yapıda bir enzimdir. Koagülasyon ve fibrinolizis sisteminde rol oynayan bradikinin ve kallidin lokal inflamatuvar cevaptan da sorumludur. Aynı zamanda spermatogenezde rol oynayan bradikinin ve kallidin spermin servikal mukusa penetrasyon ve migrasyonunu artırır. Kininlerin ayrıca vasküler permeabilityi artırıcı, glukoz taşınmasını kolaylaştırıcı, düz kas kasıcı ve testislere kan akımını artırıcı özellikleri de ortaya konmuştur (69–72).

Kallikrein'in esas kaynağı pankreas olmakla birlikte, kallikrein kinin sisteminin komponentleri kadın ve erkek üreme sistemi sekresyonunda da bulunmaktadır. Yan etkileri oldukça az olan kallikrein, prostat ve epididimin inflamatuvar hastalıklarında kinin serbestlenmesine bağlı alevlenmeler yapabilmektedir (58,71,72). İnfertilite tedavisinde kallikrein kullanımına ait farklı sonuçlar bildirilmekle birlikte, sperm parametrelerinde düzelleme ve gebelik oranlarında artma olduğu görülmektedir (73).

**Prostoglandin sentez inhibitörleri:** Prostogalandinlerin spermatogenez, steroidogenez ve sperm motilitesi üzerine bozucu etkileri vardır. PgE ve PgF seminal veziküllerde ve seminal plazmada yüksek konsantrasyonda bulunur. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların seminal prostogalandinleri düşürdükleri gösterildikten sonra indometazin ve ketoprofen oligospermik erkeklerde kullanılmaktadır (74–76).

Sperm sayısını %25, sperm motilitesini %35 oranında artırdığı bildirilmektedir. İndometazin veya ketoprofen 3–6 ay süre ile kullanılır (77,78).

**Pentoksifilin:** Erkek infertilitesinde testis ve epididimiste mikrosirkülasyonu düzenleyici etkisinden faydalanmak amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, fosfodiesteraz inhibisyonu da yaptığından hücre içi cAMP düzeyi yükselir (54,59,64,73).

Sonuçta hücrede glikoliz ve endojen ATP yapımı artar. Bunun da sperm motilitesini artırması beklenir. Sonuçlar çelişkilidir. İn vitro kullanımda sperm yıkama solüsyonlarına pentoksifilin eklenmesi ile normozoospermik ve oligozoospermik olgularda sperm aktivasyonunda artış gözlenir. Pentoksifilin akrozom reaksiyonunu uyardığı ve reaktif oksijen radikallerinin yapımını azalttığı ortaya konmuştur. Ancak embriyogenez üzerine zararlı etkilerinden dolayı inseminasyon öncesi sperm yıkama ile temizlenmesi gerekir (60).

**Antioksidanlar:** İdiopatik infertilite bulunan hastaların bir kısmında, semende reaktif oksijen radikallerinde artış gösterilmiştir. Buna paralel olarak spermoosit füzyonunda bozulama ortaya çıkmaktadır. Klinikte bazı ilaçların reaktif oksijen radikallerinin etkisini elimine ettiği gösterilmiş ve infertilite tedavisinde kullanılmaya başlanılmıştır. E vitamini antioksidan etkisinden faydalanılarak invitro kullanımında sperm-oosit füzyonunu düzelttiği gösterilmiştir. Ama oral kullanımında seminal plazma parametrelerinde sabit bir düzelme elde edilememiştir. Glutathione, lipid peroksidasyonunu önleyen bir antioksidandır ve özellikle astenospermide tavsiye edilmektedir (60).

### 2.7.2. Erkek İnfertilitesinde Cerrahi Tedavi

İnfertilitenin cerrahi tedavisi; varikosel, inmemiş testis gibi sorunların ameliyatla düzeltilmesi yanında vazo-vazostomi, vazo-epididimostomi ve ejakülatuar kanallara yapılan cerrahi girişimleri kapsar.

### 2.7.2.1. Varikosel Tedavisi

Erkek infertilite tedavisinde varikosektomi en çok uygulanan cerrahi metoddur (79). Varikosel ameliyatından sonra hasta başka bir tedavi yöntemi uygulanmaksızın en az 6 ay süreyle 3 ayda bir spermioqram yapılarak izlenmelidir. Spermioqramdaki düzelmeler bazen bir yıla kadar uzamaktadır. Genellikle varikosel cerrahisinden sonra ilk 12 ay içinde spermioqram parametrelerindeki düzelme oranı % 30–90, gebelik oranı % 10–55 arasında değişmektedir. Ameliyat ile gebelik oluşumu arasında geçen süre 6–12 ay olarak kabul edilmektedir (60).

### 2.7.2.2. Obstrüktif İnfertilite Tedavisi

İnfertilite nedeniyle polikliniğe başvuran hastaların % 3,5'i obstrüktif infertilite vakalarıdır. Bu olguların % 85'inde olay epididimdedir. Obstrüksiyon saptanan olgularda yapılacak tedavi yöntemleri vazo-vazostomi, vazoepididimostomi, veziküla seminalis kist aspirasyonu ve ejakülatör kanallara yapılan girişimler olarak sayılabilir (60).

**a) Vazo-vazostomi:** Duktus deferenste obstrüksiyon olduğunda bunun proksimalinde kalan tübüler yapılarda genişleme meydana gelir. Eksplozasyon sırasında epididim tübülüsündeki genişlemelerin görülmesi obstrüksiyonu gösteren önemli bir bulgudur. Vazo-vazostomi duktus deferensin kısa tıkanmalarında yapılan kısa bir girişimdir (60).

**b) Vazo-epididimostomi:** Makroskopik vazoepididimostomiden sonra elde edilen anatomik başarı %50, gebelik oranı ise en fazla %30 civarındadır. Yayınlanan mikroskopik vazo-epididimostomi sonuçlarına göre hastaların %75,3'ünde hücre görülmüş, %29 oranında gebelik elde edilmiştir (60).

**c) Ejakülatör kanallara yapılan girişimler:** Ejakülatör kanallar ya doğmalık olarak kapalıdır, ya da edinsel olarak tıkanabilir. Edinsel olarak tıkanmalar enfeksiyon, iatrojenik, travmatik, taş, kist ya da veziküla seminalis kistlerinin baskısı ile olabilir. Hastalarda perineal ağrı, hemospermi ya da epididimit olabilir. Ejakülatör kanal tıkanıklarının tedavisi transüretal kanal ağzlarının rezeksiyonudur. (TUR-ED) Alternatif diğer bir yaklaşım şekli transüretal

balon dilatasyondur. Uzun dönem takipler balon dilatasyon öncesi TUR-ED uygulamasının daha faydalı olduğunu göstermektedir. Genel olarak bakıldığında ejakülatör kanal tıkanıklığı saptanan hastalarda cerrahi tedavi ile semen parametrelerinde düzelme oranı %49, gebelik oluşma oranı ise %25'dir (60).

### **2.7.3. Üremeye Yardımcı Teknikler**

İnfertilite sebebiyle başvuran çiftlerin ilk arzusu fizyolojik yoldan çocuk sahibi olabilmektir. Erkeklerde tedaviyi takiben fizyolojik yoldan eşlerinde gebeliğin sağlanabileceği birçok düzeltilbilir faktör bulunmaktadır. Buna rağmen olguların önemli bir kısmında fizyolojik yollardan gebelik sağlanamamaktadır. Böyle durumlarda üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYT) kullanılması gerekmektedir. ÜYT'in kullanılması ile infertilite olgularında sorun büyük oranda çözümlenebilmektedir. Günümüzde 3 çeşit ÜYT uygulaması yapılmaktadır. IUI, IVF ve ICSI (80).

#### **2.7.3.1. İntrauterin İnseminasyon (IUI)**

Kısaca, spermin yıkanarak iyi motilite ve morfolojideki spermatozoanın konsantre halde uterus içerisine bir kanül vasıtasıyla verilmesidir (81).

#### **2.7.3.2. İn vitro Fertilizasyon (IVF)**

Kadından toplanan oositlerin (OPU: oocyt pick up) bir petri kutusu içerisinde spermatozoa ile 24–48 saat inkübe edilmesi, arkasından oluşan embriyoların uterus kavitesine transferini içerir (80).

#### **2.7.3.3. İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI)**

Tek bir spermatozoanın oosit sitoplazması içerisine mikroskop altında mikroenjeksiyonudur. IUI için ileri motil en az 5 milyon spermatozoa gerekmektedirken, ICSI'de tek bir spermatozoa bile yeterli olur. Ancak gerek kanıta dayalı tıp gerekse maliyetaçısından her infertilite olgusunda ICSI yapılması hatadır. Özellikle tetkik sonuçları erkek faktörüne işaret ediyorsa

veya daha önceki fertilizasyon denemeleri başarısız kalmışsa ICSI düşünülmeli, izah edilemeyen infertilite ve kadın faktörü olgularında doğrudan ICSI'ye geçilmeyip, diğer yöntemler denenmelidir.

Aşağıdaki durumlarda ÜYT endikasyonu vardır:

- a. Cerrahi ya da medikal tedavilerin başarılı olmadığı durumlar
- b. Açıklanamayan infertilite olguları
- c. Temel sperm parametrelerinde orta ya da şiddetli bozukluk bulunması
- d. Sperm fonksiyon testlerinde patolojik sonuç alınması

ÜYT'de kullanılmadan önce semenin hazırlanması gerekir. Bu yöntemlerin hepsinde de seminal plazma ortamdan uzaklaştırılırken, motilitesi bulunmayan sperm ve lökositler elimine edilerek motil sperm seçimi yapılır. Spermin yıkanarak hazırlanmasında sıklıkla 4 metod kullanılır:

- 1- Swim-up (yüzdürme) tekniği
- 2- Standart yıkama yöntemi (santrifüj ve yüzdürme)
- 3- Gradient tekniği
- 4- Mini- gradient yöntemi

Sperm yıkandıktan sonra ileri motil (a+b kategorisinde) total sperm sayısı 5 milyondan fazla ise en az 3 en çok 6 siklus IUI ile tedaviye başlanır. Ancak kadının yaşı >35 ise, IVF/ICSI tercih edilebilir. Total motil sperm sayısının 5 milyondan az ve morfolojisinde % 4-14 arasında olduğu olgularda IVF önerilir. Total motil sperm sayısının < 1,5 milyon ve kesin morfolojinin < %4 olması durumunda ise ICSI uygundur. Ancak bazı otörler geniş serilerine dayanarak, total motil sperm sayısı 1 milyonun altına inmedikçe ve normal morfoloji > % 4 kaldıkça IUI'dan vazgeçilmemesini önermektedirler (80).

IUI'da gebeliklerin büyük kısmı ilk üç siklus sırasında görülür. Bundan sonraki sikluslarda özel indüksiyon şemaları uygulanarak çok az sayıda gebelik gelişebilmektedir. Kadında klomifen sitrat ile indüksiyon yapıldığı zaman siklus başına sıklıkla % 5-8 arasında değişen gebelik oranları elde edilmektedir. Gonadotropin ile ovulasyon indüksiyonu yapılmış IUI'larda ise siklus başına ortalama % 10-15 gebelik görülmektedir (80).

IVF ve ICSI yöntemleriyle nakledilen embriyoların sadece % 20-30'u implante olur ve klinik gebelikle sonuçlanır. Son yıllarda, embriyolar kültür ortamında 5 gün bekletilerek blastosist safhasına geldikten sonra transfer edilmeye başlanmıştır. IVF'de gebelik oranları üzerine

kadın yaşının önemli etkisi bulunur. Otuzbeş yaş altı kadınlarda gebelik oranları % 35,7 iken 40 yaş üzerindeki de % 13,2 olarak bildirilmiştir. ICSI ile de benzer ya da kısmen daha iyi sonuçlar elde edilmektedir. Her ne kadar bu teknoloji infertil erkeklerin tedavisinde büyük üstünlük sağlamaktaysa da bu tekniklerin kısmen yeni oldukları ve uzun dönem güvenilirliklerinin henüz belirlenmediği de akılda tutulmalıdır. ICSI sikluslarından doğan çocuklarda seks kromozom anomalilerinde artış olduğunu gösteren kanıtlar vardır (11,80).

## **2.8. HSP (Heat Shock Protein) Ailesi**

Isı şok proteinleri, ilk kez 1962 yılında Ritossa ve arkadaşları tarafından, ısı artışının meyve sineği, *Drosophila melanogaster*'ın tükürük bezi kromozomlarında şişmeye neden olması sonucu tespit edilmiş (81), 1974 yılında da Tissieres ve arkadaşları tarafından “ısı şoku ile artan gen ürünü” olarak adlandırılmıştır (82).

Isı şok proteinleri, molekül kütlelerine göre bazı alt gruplara ayrılırlar. Bu grubun üyeleri sadece büyüklük yönünden değil, başka özellikleriyle de benzerlik gösterirler. Örneğin; HSP60 ve HSP70 aileleri, ister bakteri, ister küf, ister bitki veya hayvan hücresinde bulunsun benzer fonksiyonlar görürler ve bunların amino asit sıralanmaları %50'nin üzerinde benzerlik gösterir. Ve ayrıca HSP60 ve HSP70 E.R (endoplazmik retikulum) içindeki kalneksin ve mitokondri içindeki karetikulum proteinlerinin katlanmalarına yardımcı olurlar. HSP70 ve HSP40 katlanmamış proteinleri yakalayarak bozulmasını engellerken, HSP60 ise bozulmuş proteinleri yakalayıp bu proteinlerin kimyasal enerjileri yardımıyla parçalanmasını sağlar (83).

Isı şok proteinleri ailesinin en önemli özelliklerinden biri ökaryotlar ve prokaryotlarda evrim boyunca en iyi korunmuş protein olmalarıdır. En ilkel bakteriden, en karmaşık ökaryota kadar tüm canlılarda bulunur. Hücre içerisinde sürekli sentezlenen ve stres uyarımlı üyeleri bulunmaktadır. Biyoloji ve tıpta önemli bir araştırma konusu olan ısı şok proteinlerinin yapısının evrim boyunca büyük bir özenle korunduğu ve ısı şok cevabının insandan bakteriye kadar tüm canlılarda bulunduğu artık bilinmektedir (3).

Isı şok proteinleri büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşır. Isı şok proteinleri, pek çok mikrobik temsilcinin konakta immün cevap oluşturmasında rol oynayan antijenlerdendir. Isı şok proteinlerine karşı gelişen immün cevaplar çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine

karşı da (anti-self) reaksiyon oluşmasına neden olabilmektedir. Sağlıklı bireylerin, enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerinden arınmak için, kendi ısı şok proteinlerine karşı immün cevap verebilme yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesindeki bozukluklar bazı oto immün hastalıklara yol açabilir. Isı şok proteinleri, immün cevapta hedef olmanın yanı sıra, antijen sunulmasında da önemli rol oynarlar (4).

Isı şok proteinlerin önemi, diğer proteinlerle etkileşip onların fonksiyon ve yapılarını değiştirebilme özelliklerine dayanır. Bu proteinlerin bazı fonksiyonel özellikleri belirlenmiştir. HSP60 ve HSP70 ailelerinin bireyleri, hücre içi polipeptidlerin katlanma, açılma ve translokasyonunda olduğu kadar, oligomerik protein komplekslerin toplanma, birleşme ve ayrılmalarında da önemli rol oynar. Bu grup stres proteinleri, sitoplazmik proteinleri açarak mitokondri, kloroplast veya endoplazmik retikulumu taşır ve bu organellerin içinde tekrar katlanmalarını ve gerekiyorsa oligomerik kompleksler halinde birleşmelerini sağlarlar (5).

### **2.8.1. HSP70 proteinin Hücredeki Görevleri**

HSP70 ailesinin hücredeki görevleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- 1-Proteinlerin hücre içinde taşınmasına
- 2-Sitozol, endoplazmik retikulum, mitokondrideki proteinlerin katlanmasına
- 3-Kararsız proteinlerin yıkımına
- 4-Protein komplekslerinin çözünmesine
- 5-Protein agregasyonunun engellenmesine
- 6-Bozuk katlı proteinlerin yeniden katlanmasına
- 7-Apoptosise (programlı hücre ölümü) yardımcı olurlar (5).

### **2.8.2. HSP70 proteininin Yapısı**

Hsp70, proteinlerin üç boyutlu yapıya erişmesini ve proteinlerin bu yapılarını korumasını sağlayan, türler arasında evrensel olarak bulunan önemli bir proteindir. Bu protein

translasyon, membranlar arasında protein taşıma ve klattrin parçalanması gibi hücresel görevlerine ilaveten üçüncül yapılarına kısmi olarak erişmiş proteinlere bağlanıp agregasyonu önleyerek hücreleri stresten korur. Tüm bu farklı fonksiyonlar substratın proteine bağlanma ve salınmasına bağlı olarak düzenlenmiştir. Stresten koruma mekanizması Creutzfeldt-Jacob, Gerstmann-Straussler-Schienker, insomnia, kuru gibi çeşitli ölümcül nörodejeneratif hastalıkların engellenmesi için önemlidir. HSP70'ler üç farklı domainden oluşur; 44 kDa'lık ATPaz domain, 18 kD'lık substrat bağlanma domain ve 10 kDa'lık C-terminali.(6).

**1. N- ucu ATPase domaini:** Bu bölge ATP'ye bağlanarak, ADP'ye hidrolize olmasını ve ATP'den ADP'ye dönüşüm, yapısal değişim için gerekli enerjiyi sağlamaktadır. Bu bölge yaklaşık 385 aminoasitten oluşmaktadır.

**2. Substrat bağlanma domaini:** Nötral ve hidrofobik aminoasit rezidülerine yüksek afinite gösteren bu alan aracılığıyla peptidlerle etkileşim kurulması gerçekleştirilmektedir.

**3. C- ucu domaini:** Bu bölge substrat bağlanma alanı için bir tür kapak görevini görmektedir. HSP70 proteinine ATP bağlı olduğunda C-ucu domaini açık olmakta, peptidler hızla proteine bağlanmakta ve ayrılmakta iken, ADP bağlı olduğunda C- ucu domaini kapalı durumda olup peptidler substrat bağlanma alanına sıkıca tutturulmaktadır(84).

Substrat bağlanması ATP hidrolizi ve nükleotid değişimi ile düzenlenerek nükleotit bağlayıcı bölgeye tutturulur ve katlanması sağlanır. Isı şok proteinleri stres faktörlerine cevap olarak prokaryotik ve ökaryotik canlılarda üretilir (6).

Yeni sentezlenmiş polipeptid zincirleri, ribozomdan ayrıldıklarında HSP70 proteininin substrat bağlanma bölgesi hidrofobik amino asit rezidülerini tanıyarak etkileşime girer ve bağlanır. Bu bağlanma ve polipeptidleri salma mekanizması ATP-ADP dönüşümü yoluyla sağlanmaktadır. ADP bağlı durumdayken yeni sentezlenmiş polipeptid zincirleri, kolayca HSP70 proteini ile birleşir ve serbest kalır. Ökaryotlarda HSP40 ve prokaryotlarda *E. coli* Dnaj yardımcı şaperonu ile HSP70 proteininin oluşturduğu yapı aracılığıyla henüz kısmi katlanmış proteinlerin çökmesini ya da yanlış katlanmalarının engellenmesi sağlanmaktadır (85).



### **2.8.3. HSP ve Gametogenezis**

Başarılı spermatogenezis ve oogenezis embriyo gelişimi öncesi iki temel adımdır. Bu işlemler sırasında HSP'lerin benzersiz ekspresyonu ve işlevleri vardır (86).

#### **2.8.3.1. HSP ekspresyonu ve Spermatogenezis:**

Spermatogenez sırasında, üç ayrı aşama ayırt edilebilir: 1-mitotik spermatogonia proliferasyonu, 2-mayotik spermatosit gelişimi ve 3-postmayotik spermatid gelişimi ve spermatozoon olgunlaşması (87). Tüm bu gelişim evrelerinde olayların dramatik bir transformasyon ve hücrel diferansiasyonla meydana geldiği görülmektedir ki, spermatogenezde farklı HSP ekspresyonlarının olması şaşırtıcı değildir (88). Fare ve sıçan spermatogenezisleri sırasında HSP70 in yapıcı formu (HSC70) birikir (89). Ayrıca HSP86 ile ilgili proteinleri kodlayan mesajcı RNA (mRNA), sıçan ve insan testisinde bulunmuştur (90). İnfertil erkeklerde HSP60 ekspresyonunun spermatogonik fonksiyon kaybı olan spermatogonyumlarla paralellik gösterdiği kanıtlanmıştır (91). Bu gözlemler HSP60 ekspresyonu düşük spermatogonyumlarda düşük spermatogonik etkiye de sebep olan değişmiş koruma seviyesinin neden olduğunu düşündürmektedir (92). Yapılan bir çalışmada Dix ve ark. farelerde HSP70-2 geninin bozulmasının başarısız mayoz, germ hücre apoptozisi ve erkek infertilitesiyle sonuçlandığını göstermiştir (93). HSP70-2 geni inaktif olmuş farelerin spermatositlerinde mayoz bölünmede duraklama olduğu görülmüş. Bu farelerin morfolojik incelenmesinde sadece 1/3 ünde testis varlığı görülmüş. Bu başarısız mayoz bölünme spermatosit apoptozisinde artışla ilişkili bulunmuştur (94). Bundan dolayı HSP70-2 geninin fare spermatositlerinde spermatogenezde başarılı bir mayoz bölünme için gerekli olduğunu düşündürüyor (92).

#### **2.8.3.2 Oogenezis sırasında HSP ekspresyonu**

Memeli erkek germ hattı gibi dişi germ hattı da hipertermik ve diğer çevresel stres faktörlerine hassastır. HSP ekspresyonunun, böcekler (95), balık ve amfibiler (96-98) ile insanları da (99) içeren birkaç türün oogenezi sırasında, tıpkı spermatogenezdeki gibi

tamamlayıcı bir rol oynadığı görülmektedir. Evrimsel birçok organizmada HSP ekspresyonunun korunması, germ hücre gelişiminde HSP nin temel rolü olduğu varsayımını desteklemektedir. Örneğin, *Drosophila* ovaryumundaki besin hücrelerinde daha sonrasında oosite taşınan HSP ler bulunmaktadır (100). Memeli oositlerinde HSP nin ısı indüksiyonu için, oosit gelişiminin spesifik devresince düzenlenen bir ‘pencere’ mevcuttur. Fare oositlerinde ısı şok yanıtı, oositin büyüme periyodunda maksimuma ulaşp son oosit çapının kazanılmasıyla azalır. Sonunda, terminal oosit ve follikül farklılaşmasından sonra durur (101,102). Bu nedenle, fare oositlerinin indüklenebilen bir ısı şok yanıtı oluşturma yeteneği erken folliküler gelişimde en yüksek olup, ovulasyondan önce ortadan kalkmaktadır. Ayrıca, gelişen oositler, yüksek düzeylerde HSC 70 ve HSP 90 ı kendiliğinden eksprese etmektedir. Preovulatuvar oositte HSC 70 yüksek düzeyde bulunur (102). Daha sonra, germinal vezikül bozulmasının hemen ardından sentezi sona erer ve fertilizasyon dönemindeki ovulasyonla atılan oositte saptanamaz. Mayoz sonrasında HSC70 sentezi tamamen biter. Memeli oositlerinin ısıya çok duyarlı olduğu bilindiğinden bu dikkat çekicidir. Tamamen gelişmiş oositlerin ısıyla indüklenebilen HSP70’i eksprese edememeleri, memeli oositlerinin hipertermik stres sonrası neden atipik ve dejenere bir morfoloji sergilediklerini açıklayabilmektedir (103). Anomaliler içinde, çok çekirdekli yumurtalar ile ilk polar cisimciğın ebadında bir artış da mevcuttur. İn vitro, artmış sıcaklık düzeyleri metafaz II’ye ilerleyen oosit sayısında eksilme ve fertilizasyon hızında azalmaya yol açmıştır (104). Oosit farklılaşması sırasındaki ısı şok gen indüksiyonu bloğu, farklı türlerde farklı zaman programları izlesede, oogeneizde genel bir özelliği gösteriyor gibi görünmektedir. Ovulasyon inflamatuvar bir reaksiyonun belli başlı niteliklerince karakterize olduğundan (105), HSP lerin, ovulasyon süreci ile postovulatuvar metabolik aktivitenin idamesinde ve oositin sağ kalımında rol oynaması mümkündür. Buna rağmen, üremenin bu periyodu için uygun veri yoktur (86).

#### **2.8.4. HSP ve Kanser**

1981 yılında Pramod Srivastara adında bir öğrenci yaptığı bir seri deneyde tümörlü hücreleri parçaladı. Sonra her bir tümörlü hücre parçasını aşilayarak gelişen kanserden farenin korunduğunu gördü. Daha sonra yapılan deneyler fareyi korumaktan sorumlu elementlerin ısı şok proteinleri olduğunu gösterdi (106). Çoğu kanser çeşidinde ısı şok proteinlerin üretimi artar. Isı şok proteinleri tümör hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması, invazyonu,

metastazı, ölümü ve immün sistem tarafından tanınması ile ilişkilidir (107). Kanser hastası bireylerin kanser hücrelerinde HSP-peptit kompleksleri oluşur. Bu anormal peptitlerin hasta hücreler içerisinde bulunuşu, kanserden kansere ve bireyden bireye farklı şekildedir. Bu yüzden anormal peptitlerin çok düşük düzeydeki oluşumu dahi kanser düşüncesini akla getirmelidir (106).

Ayrıca ısı şok proteinleri bazı kanser tiplerinde hücre farklılaşma derecesinin de göstergesidir. Bazı kanser tedavilerinde artan HSP üretimi tedavinin etkili olduğunun belirteçidir. Örneğin göğüs kanserinde HSP27 ve HSP70 kemoterapiye karşı olan direncin göstergesidir (107).

### **2.8.5. HSP ve İmmün Cevap**

İnterlökin 1 ve mitojenlerin, lenfosit ve makrofajlar ile aktivasyonu sırasında oluşan değişik polipeptid mRNA ları stres proteinlerinin artmasına yol açarlar. Bazı stres protein genleri, major histokompatibilite kompleksi (MHC) içinde yer almaktadır. Sıçanlarda, HSP70 ailesini kodlayan genlerin, kompleman komponentleri ile tümör nekrozis faktör (TNF) arasında ve MHC III genlerine yakın olarak yerleştiği belirlenmiştir (7).

Hedef hücrelerin 42°C'ye maruz bırakılmaları TNF'e bağlı yıkıma direnci de artırır. Sikloheksimid gibi bir protein sentez blokörü ortama eklendiğinde direncin kaybolması, olayın protein sentezi ile ilişkili olduğunu gösterir. Subletal dozda uyarılarla stres proteinlerinin indüklenmesi, nasıl daha sonraki letal dozlardaki uyarılara karşı koruyuculuk sağlıyorsa, TNF ya da gama interferon uyarıları da natural killer (NK) hücreler ve lenfokinle uyarılmış killer (LAK) hücrelerin yapacağı saldırıya karşı hedef hücre direncini arttırabilir. Mitojenin aktive ettiği protein kinaz (MAPK) lar ve HSP' ler hücrenin hem normal hem de strese bağlı patofizyolojik durumlarda fonksiyon gören proteinlerdir. Pankreasta HSP27, HSP60 ve HSP70 gibi birçok protein tanımlanmışsa da akut pankreatitteki zararlı veya yararlı etki gösterip göstermedikleri belirlenememiştir (108). Stres proteinlerinden, özellikle de HSP60 ve HSP70'in proteinlerinin açılması, taşınması, parçalanması ve katlanmasındaki rolleri, stres proteinlerinin antijen işleme ve sunmada da rolleri olabileceğini düşündürmektedir (108). Mikobakterilerin hücre duvarlarının adjuvan etkisiyle uyarılan otoreaktif T hücrelerinin klonal genişlemesi, HSP65 ile önlenebilmektedir. Klamidya enfeksiyonu ile ilişkili HSP57'in geç tip aşırı duyarlık reaksiyonlarında önemli rol oynadığı

ve bu ajana bağlı reaktif artrit vakalarında HSP57'ye karşı oluşan monoklonal antikorların sinoviyal dokuda arttığı saptanmıştır (109).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereç**

##### **Kullanılan gereçler**

Cetvel  
Steril semen toplama kabı  
Nüve EN 400 marka etüv  
Nüve NF 615 marka santrfüj  
Otomatik pipet  
Lam  
poly-L lizin kaplı Lamel  
Makler Counting Chamber Sefi-Medical Instrumentes Ltd.  
Ph paper  
Kronometre  
Dikey şale  
Spermac Stain Fixatuer  
Spermac Stain Colorant A  
Spermac Stain Colorant B  
Spermac Stain Colorant C  
Kurutma kağıdı  
Olympus CX21 Binokuler Mikroskop  
Enjektör  
EDTA' lı Tam Kan Tüpü  
Metanol  
Aseton  
Aleminyum Folyo  
Fluoresan ataçmanlı Zeiss Axioplan 2 mikroskop

### 3.2. Yöntem

Yapılan çalışma için proje oluşturulduktan sonra Üroloji Anabilim Dalından kurul kararı ile izin alındı. Çalışma protokolü ve formları için Harran Üniversitesi Etik Kurul onayı alındı. Bu çalışmaya Kasım 2010- Kasım 2011 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalının Adroloji ve İnfertilite Polikliniğine, infertilite nedeniyle baş vuran ardışık 90 hasta alındı. Hastaların fertilitate potansiyellerini etkileyebilecek faktörleri de içeren detaylı öyküleri elde edildi. Genital konjenital ve/veya edinsel malformasyonlar ile sekonder seks karakterlerine yoğunlaşan fizik muayeneleri yapıldı. İlave malformasyonların düşünüldüğü, fizik muayenenin yetersiz veya şüpheli kaldığı olgularda skrotal, transrektal ve/veya abdominal ultrasonografi yapıldı. Varikosel, lökospermi, enfeksiyon, sigara kullanımı, alkol kullanımı, vazektomi gibi bilinen nedenlere bağlı infertilite olguları çalışmadan çıkarıldı. Çalışmaya gönüllü olan ve açıklanamayan infertil, sperm parametreleri normal 24 birey, bilgilendirilmiş onam formları imzalatıldıktan sonra hasta grubu olarak çalışmaya alındı. Son 1 yıl içerisinde çocuğu olan WHO 2010 kriterlerine göre normal sperm parametreleri olan 24 fertil birey de kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Çalışmamızda toplanan kanlardan genetik inceleme ve semen örneklerinden immünühistokimyasal inceleme yapıldı

Açıklanmayan infertilite için çalışmaya alınma kriterleri:

- i. kadın faktörü normal olup, istenmesine rağmen en az 1 yıldır çocuk sahibi olmaması
- ii. yaşın 20 nin üstünde veya 45' in altında olması
- iii. normal sperm parametresinin olması
- iv. klinik varikosel, lökospermi gibi infertiliteye neden olabilecek bir durum olmaması

#### 3.2.1. Genetik inceleme

**Kan örnekleri:** Çalışmamızda Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalınca İnfertilite tanısı konmuş hasta bireylerden ve aynı yaş grubunda olan fertil kişilerden 1'er ml EDTA'lı tam kan alındı ve kanlar DNA izolasyonuna kadar -20°C'de saklandı.

**DNA İzolasyonu:** DNA, EDTA'lı kandan tuzla çöktürme (salting out) tekniğine göre elde edildi, konsantrasyon ayarlaması yapıldıktan sonra PCR'da kullanılabilecek kadar -20°C'de korundu. PCR'da her bir hasta için 30 ng DNA kullanıldı.

**Primerler:** *HSPA1B* geni 3'UTR bölgesinde g.1269A>G (*Pst*I A>G; dbSNP: rs1061581A>G) ve *HSPA1L* geni c.1478C>T (*Nco*I C>T, dbSNP: rs2227956) polimorfik noktaları genotip ve allel bölgelerini belirlemek üzere 4 adet primer kullanıldı (Tablo 3).

**Tablo 3.** Çalışmada kullanılan primer dizileri

SNP'ler	Primer dizileri	PCR ürünleri (bp)
<i>HSPA1B</i>	5'-CATCGACTTCTACACGTCCA-3' 5'CAAAGTCCTTGAGTCCCAAC5'-	1117
<i>HSPA1L</i>	GGACAAGTCTGAGAAGGTACAG3' 5'-GTAACCTTAGATTCAGGTCTGG3'	878

**PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu):** Genler üzerinde seçilen g.1269A>G ve c.1478C>T polimorfizmlerinin durumlarını belirlemek üzere DNA, seçilen primerler varlığında PCR metodu ile amplifiye edildi ve sonra RFLP metodu ile analiz edildi.

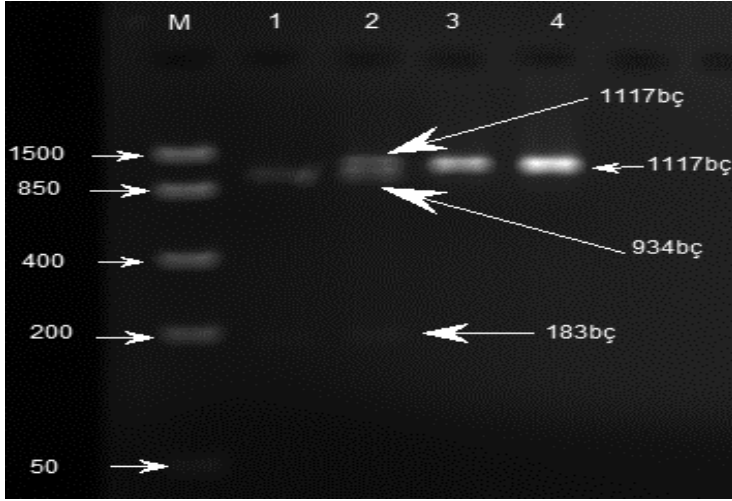
Her iki genin polimorfik alanları için DNA ayrı ayrı; 1xPCR tamponu, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM primerler (polimorfik yere göre seçilen forward, diğeri reverse primer), 200 µM dNTPs, 30 ng genomik DNA, 0.5 U Taq DNA polimeraz içeren 10µl'lik reaksiyon karışımında amplifiye edildi. Polimorfik yerler için PCR programı; 3 dakika süre ve 94°C'de ilk denaturasyonun ardından 30 siklus boyunca 94°C'de 30 sn denaturasyon, sırasıyla *HSPA1B* geni için 60°C ve *HSPA1L* geni için 55°C'de 30 sn primer yapıştırma, 72°C'de 30 sn sentez ve son sentez tamamlama için 72°C'de 5 dakika boyunca uygulandı.

**RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi:** g.1269A>G ve c.1478C>T polimorfik noktaları için elde edilen 10µl'lik PCR ürünleri 30µl restriksiyon endonükleaz karışımı içinde ilgili restriksiyon endonükleazlar tarafından kesime tabi tutuldu. g.1269A>G PCR, 2U *Pst*I ve c.1478C>T PCR ürünleri 2U *Nco*I enzimleriyle 2 saat 37°C'de işlem gördü.

**Elektroforez:** Kesilen PCR ürünleri; 10mM Lithium Borat tamponunda hazırlanan ve içinde 0.5 µg/ml EtBr (Etidyum Bromid) bulunan %1.5'luk agaroz jelinde DNA Marker'i (FastRuler low range, Fermentas) varlığında yürütüldü.

**Değerlendirme:** Elektroforez sonrası, tüm jellerde bulunan DNA bandları, DNA markerleri varlığında Jel dökümentasyon ve analiz sistemi ile analiz edilerek fotoğrafları çekildi.

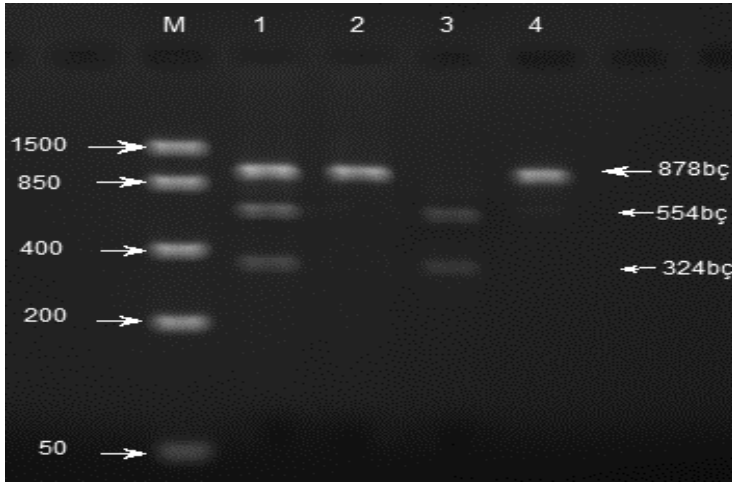
Buna göre PCR-RFLP analizinin yapıldığı *HSPA1B* geni g.1269A>G polimorfik alanın genotiplemesinde; AA genotipi 934, 183 bp; AG genotipi 1117, 934 ve 183 bp, GG genotipi 1117 bp olarak kabul edildi (Şekil 5).



**Şekil 5.** *HSPA1B* geni g.1269A>G polimorfik noktasının *PstI* restriksiyon profili. M: DNA ladder (1500-50bç), 1: homozigot (AA, normal), 2: heterozigot (AG), 3: homozigot (GG, polimorfik), 4: kesilmemiş PCR ürünü



*HSPA1L* geni c.1478C>T polimorfik alanının genotiplemesinde CC genotipi 878 bp, CT genotipi 878, 554 ve 324bp, TT genotipi 554 ve 324 bp olarak değerlendirildi (Şekil 6).



**Şekil 6.** *HSPA1L* geni c.1478C>T polimorfik noktasının *NcoI* restriksiyon profili. M: DNA ladder (1500-50bç), 1: heterozigot (CT), 2: kesilmemiş PCR ürünü, 3: homozigot (TT, polimorfik), 4: homozigot (CC, normal).

### 3.2.2. İmmünohistokimyasal inceleme

#### Spermlerin boyamaya hazırlanması

Hasta ve kontrollerden semen örneği steril toplama kabına masturbasyon yöntemi ile alındı. Elde edilen semene 1/1 oranında sperm wash solüsyonu eklenerek 2000 devirde 7 dk santrifüj edildikten sonra 1ml'de  $30-35 \times 10^6$  sperm hücresi olacak şekilde seyreltilmiş spermlerden 30 mikrolitre alınarak poly-L lizin kaplı lameller üzerine yayıldıktan sonra örnekler aşağıdaki şekillerde tespit edilip hücrelerin cama yapışması için 30 dk beklendi.

**Tespit ve Permeabilizasyon** (Boyama için hücre zarı geçirgenliğinin sağlanması)

#### 1- Metanolle ve asetonla tespit

-20°C derecedeki metanol ile 10 dk ve ardından soğuk asetonla 2 dk tespit ve permeabilize edildi. Yıkanmadan önce iyice kurumaları sağlandı ve sonra 3x5dk PBS le yıkandı.

#### 2-Saklama

Lamlar iki lam sırt sırta gelecek şekilde alüminyum folyo ile sarıldı ve -20°C derecede saklandı.

### 3-İmmünfluoresan Boyama

-20°C dereceden çıkarılan lamellerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

a) 3x5 dk PBS le yıkandı.

b) 20 dk PBS çözeltisi ile seyreltilmiş keçi serumu (normal goat IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) ile yıkandı

c) % 1.5 keçi serumu katılmış Primer antikorla (HSP70 / HSC70 (W27), Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) 60 dk inkübe edildi.

d) 3 X 5 dk PBS ile yıkandı.

e) % 1.5 keçi serumu katılmış sekonder antikorla (goat anti-mouse IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) 45 dk karanlık ortamda inkübe edildi.

f) 3 X 5 dk PBS ile yıkandı.

g) Kapatma solusyonu ile lamel kapatıldı

h) Floresan ataçmanlı Zeiss Axioplan 2 mikroskopta incelendi.

### Boyamaların değerlendirilmesi

Sperm hücreleri boyanma yerleri ve şiddetine göre dört gruba ayrılarak skorlandı (tablo 4).

Her bir birey için 100 adet sperm hücresi değerlendirildi.

**Tablo 4.** Sperm boyama skorlanması

Skor	Boyanma yeri
0	Spermde hiç boyanma yok veya çekirdekte çok hafif boyanma var
1	Çekirdek boyanması
2	Çekirdek ve kuyruk boyanması (tüm spermde boyanma)
3	2 ye ek olarak ekvatoryal - orta bölge yada boyun kısmı boyanması

### 3.2.3. İstatistik

Hasta ve kontrollerin yaş, BMI ve semen parametrelerinin değerlendirilmesinde Kolmogorov Smirnov testi ile dağılımların normalliğine bakıldı. Hastaların morfolojileri ve ortalama sperm boyanma skorları dışındakiler normal dağılım göstermekteydiler. Morfoloji ve sperm boyanma skorları dışındakilerde parametrik testler kullanıldı. BMI, yaş, sayı, motilite ve volüm için bağımsız Student's-T testi kullanıldı. Morfoloji ve ortalama sperm boyanma skorlaması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen genotip ve allel değerleri  $X^2$ -testi kullanılarak Hardy-Weinberg testi ile normal dağılım yönünden incelendi ve SPSS istatistik programı kullanılarak Fisher's exact testi ile karşılaştırmalar yapıldı. İstatiksel anlamlılık  $p < 0.05$  olarak kabul edildi. Odds ratio (OR) değeri, bulunan bağlantının düzeyini ölçmek için kullanıldı. Veriler SPSS 11,5 istatistiksel analiz sistemine aktarılarak analiz edildi.

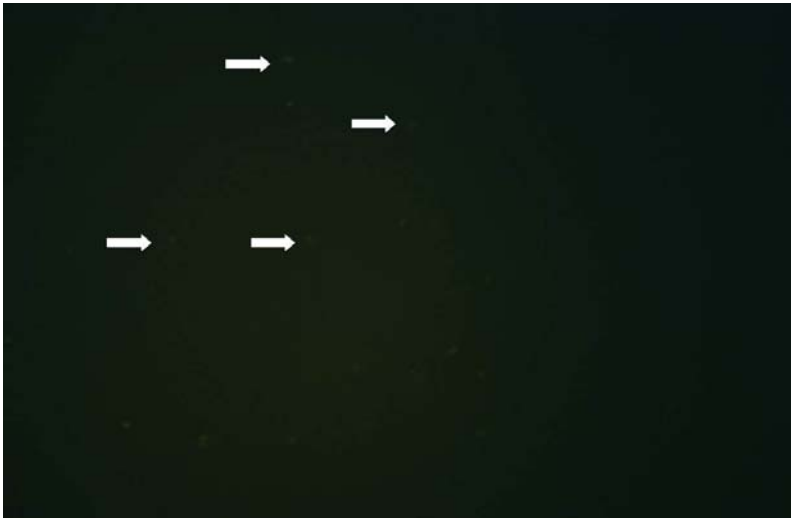
#### 4. BULGULAR

Hasta ve kontrollerin yaş, BMI ve semen parametreleri Tablo 5 te gösterildi. Bu parametreler açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Tablo 5).

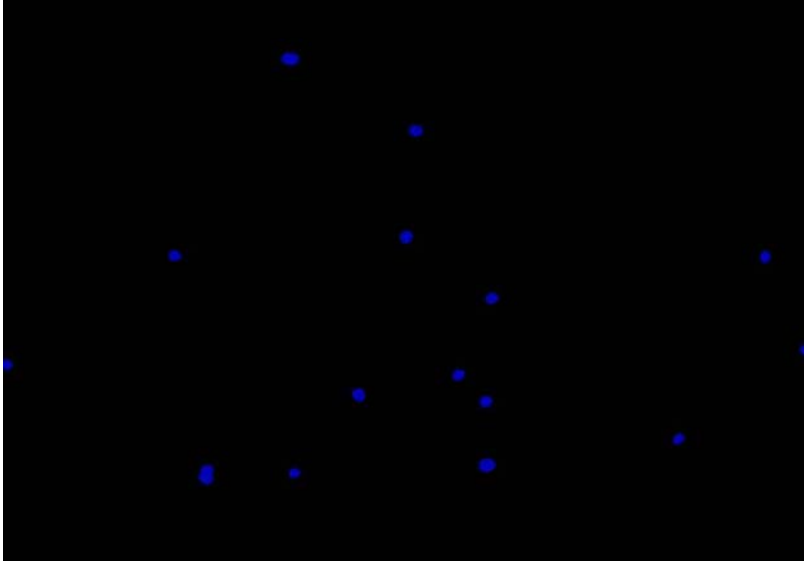
**Tablo 5.** Demografik özellikler sperm parametreleri (Ortalama  $\pm$  standart sapma)

	İnfertil hasta (n=24)	Fertil kontrol (n=24)	P değeri
Yaş (yıl)	27,83 $\pm$ 5,04	30,70 $\pm$ 5,15	0,570
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,93 $\pm$ 2,54	23,32 $\pm$ 2,07	0,368
Hacim (ml)	2,69 $\pm$ 1,15	2,83 $\pm$ 1,10	0,667
Toplam Sayı (milyon)	68,50 $\pm$ 42,76	71,91 $\pm$ 34,64	0,762
Motilite (%)	66,25 $\pm$ 14,12	61,54 $\pm$ 15,93	0,284
Morfoloji (%)	4,37 $\pm$ 0,64	4,41 $\pm$ 0,71	0,928

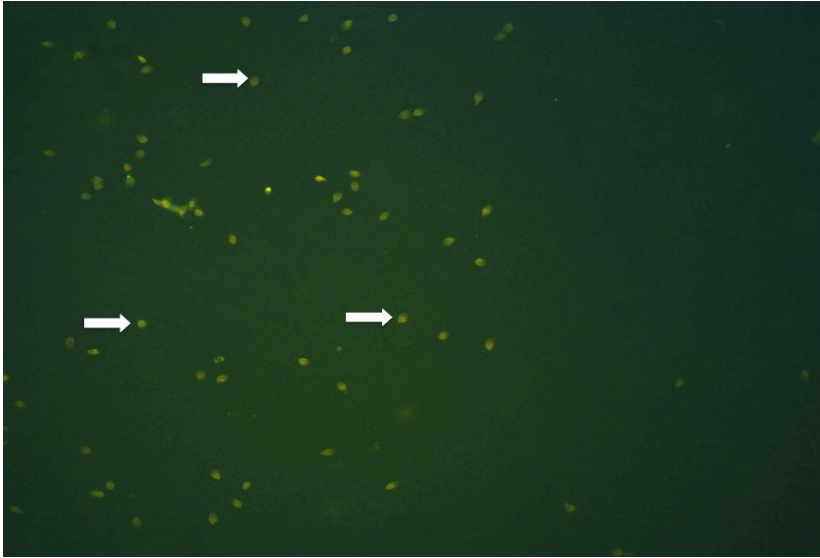
Boyanma skorlamasında kullanılan mikroskopi görüntüleri Şekil 7-12 de gösterildi. Ortalama sperm boyanma skorları hasta grubunda 1,69  $\pm$ 0,58 ve fertil kontrol grubunda 1,70  $\pm$ 0,63 olarak belirlendi. Gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı fark bulunmadı (Tablo 6).



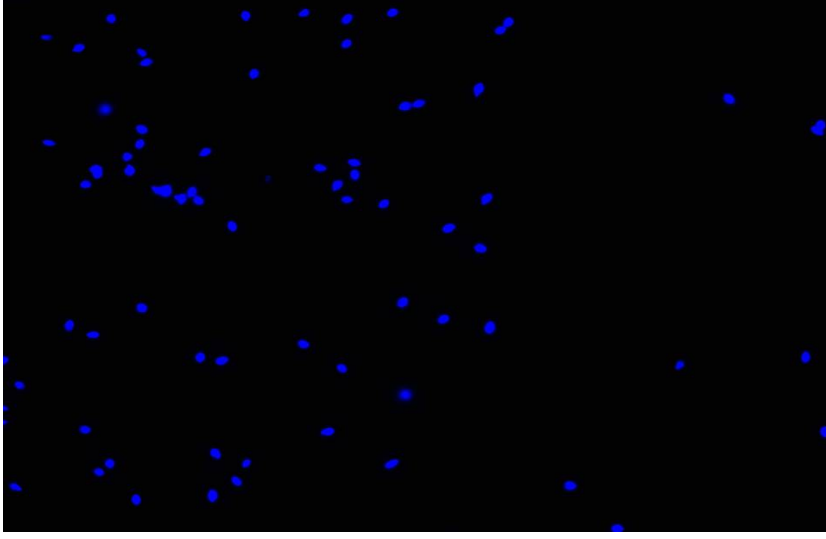
**Şekil 7.** Çekirdekte çok hafif boyanma (skor:0)



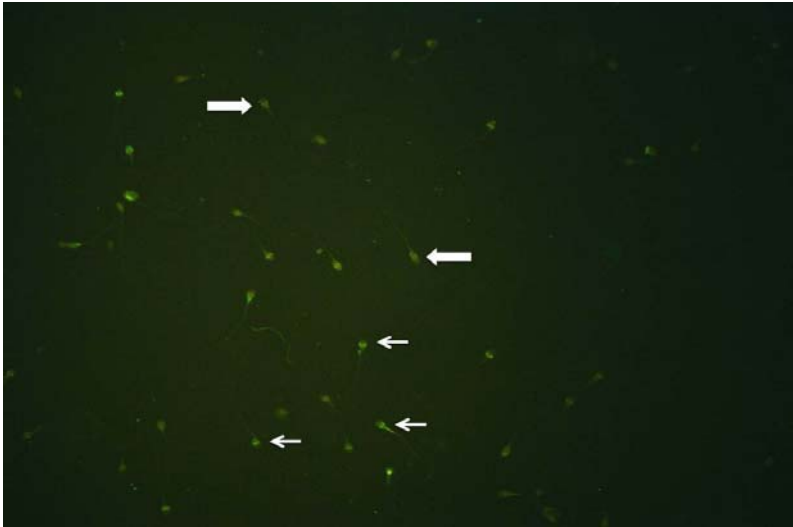
Şekil 8. Şekil 7 için çekirdek boyanması



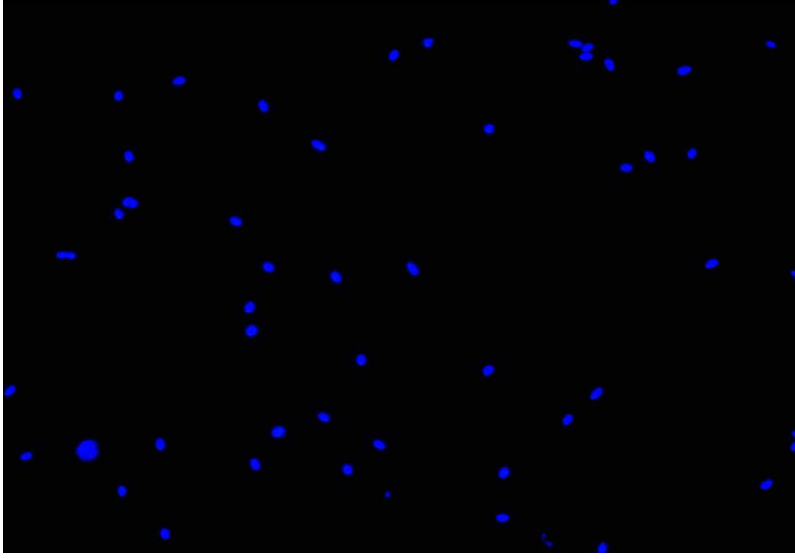
Şekil 9. Çekirdekte yoğun boyanma (skor:1)



**Şekil 10.** Şekil 9 için çekirdek boyanması



**Şekil 11.** Çekirdek ve kuyruk boyanması (kalın okla gösterilen, skor: 2), 2 ye ek olarak ekvatoryal-orta bölge yada boyun kısmında boyanma (ince okla gösterilen, skor:3)



**Şekil 12.** Şekil 11 için çekirdek boyanması

**Tablo 6.** Gruplarda Ortalama sperm boyanma skorları

	İnfertil hasta (n=24)	Fertil kontrol (n=24)	P değeri
Ortalama sperm boyanma skoru	1,69 ±0,58	1,70 ±0,63	0,744

*HSPA1B* NM\_005346.4 g.1269A>G ve *HSPA1L* NM\_005527.3: genlerinde polimorfik alanlar Hardy-Weinberg dengesine göre analiz edildi ve bu dengeye uyum gösterdikleri belirlendi. Çalışılan genlerin polimorfik alanlarının genotip ve allel frekanslarının dağılımı Tablo 7’de verildi.

*HSPA1B* geni g.1269A>G polimorfik noktasının AG (heterozigot) ve GG (homozigot, polimorf) genotipleri ile G alleli bakımından infertil hasta ve fertil kontrol arasında karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak anlamsız ( $P > 0.05$ ) olduğu belirlendi. Ayrıca *HSPA1L* geni c.1478C>T polimorfik alanın CT (heterozigot) ve TT (homozigot, polimorfik) genotipleri ve T allelleri infertil ve fertil kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamsız tespit edildi (Tablo 7).

**Tablo 7.** İnfertil erkek hastalar ve kontrol grubunda *HSPA1B* geni g.1269A>G ve *HSPA1L* geni c.1478C>T polimorfizmleri.

SNP Genotip/Allele	İnfertil hastalar (n=24)	Fertil kontrol (n=24)	X <sup>2</sup>	OR (95% CI)	P-değeri
<i>HSPA1B</i> geni g.1269A>G					
<b>Genotip</b>					
AA	4 (%16.7)	3 (%12.5)	1.167	Referans	Referans
AG	9 (%37.5)	10 (%41.7)	0.087	0.840 (0.164-2.675)	0.768
GG	11 (%45.8)	11 (%45.8)	0.000	1.000 (0.321-3.113)	1.000
<b>Allel</b>					
A	17 (%35.4)	16 (%33.3)	0.046	Referans	Referans
G	31 (%64.6)	32 (%66.7)	0.046	0.912 (0.393-2.118)	0.830
<i>HSPA1L</i> geni c.1478C>T					
<b>Genotip</b>					
CC	2 (%8.3)	2 (%8.3)	0.000	Referans	Referans
CT	10 (%41.7)	11 (%45.8)	0.085	0.844 (0.270-2.644)	0.771
TT	12 (%50.0)	11 (%45.8)	0.083	1.182 (0.380-3.672)	0.773
<b>Allel</b>					
C	14 (%29.2)	15 (%31.3)	0.049	Referans	Referans
T	34 (%70.8)	33 (%68.8)	0.049	1.104 (0.462-2.639)	0.824

Kısaltmalar: X<sup>2</sup> = Ki-Kare, OR = Odds ratio, CI = güven aralığı, SNP = Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotid polimorfizmi).



## 5. TARTIŞMA

Üreme ve nesli devam ettirme yeryüzünde yaşayan tüm canlıların en önemli ve temel içgüdülerinden biridir. İnsan söz konusu olduğunda bu biyolojik içgüdüye psikososyal bir boyutta eklenerek, üreme ve nesli devam ettirme daha geniş ve derin bir anlam kazanmaktadır. Çocuk sahibi olmak, yalnızca biyolojik bir devamlılık sağlamamakta, çocuklarımızla olan psikososyal etkileşim yoluyla gerek bilinçli gerek bilinç dışı tüm özelliklerimizi aktararak nesiller arası devamlılığı da sağlamaktadır. Tüm bu sosyal ve psikolojik durumlar göz önüne alındığında infertilitenin gerek kişisel gerekse toplumsal bazda ne kadar önemli olduğu apacık ortadadır.

İnfertilite, çiftlerin düzenli korunmasız cinsel ilişkilerine rağmen bir yıl süresince gebeliğin gerçekleşmemesi olarak tanımlanmaktadır. Toplumdaki çiftlerin yaklaşık %15-20'sini etkileyen bu önemli sağlık sorununda, erkek faktör %50 oranında rol oynamaktadır. Erkek faktörün normal olduğunu söyleyebilmek için spermde yeterli sayı, hareketlilik ve morfolojinin varlığı, spermelerin gerekli akrozom reaksiyonunun gerçekleştirip oositlerin zona pellusida tabakasına bağlanmaları ve zigotun fertilizasyonu gerekmektedir. Bu aşamalarda oluşabilecek herhangi bir bozukluk infertilite nedeni olabilir. Varikosel, obstrüktif, hormonal, genetik, immunolojik patolojiler gibi infertiliteye neden olabilecek birçok durum tanımlanmakla beraber, olguların yaklaşık %25'inin herhangi bir nedeni bilinmemekte olup idiyopatik olarak kabul edilmektedir (2). Sperm fizyolojisi ve gamet etkileşimini anlamaya yönelik önemli gelişmeler sağlanmasına, tedavide intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi ileri yöntemlerin kullanılıyor olmasına rağmen, özellikle idiyopatik infertil olgularda patofizyolojiyi ortaya koymak, tanısal ve klinik uygulamalarda sonuç alıcı, düşük maliyetli ve güvenilir modalitelere ulaşmak için hücresel ve moleküler düzeyde çalışmalar sürdürülmektedir (109).

Son dönemde üzerinde çalışılan alanlardan biride ısı şok proteini (İŞP) ile infertilite arasındaki ilişkidir. Stres proteinleri olarakta adlandırılan İŞP, büyüme, farklılaşma, bölünme, hatta hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde hayati önem taşıyan bir protein ailesidir. Ortak özellikleri hücrelerin ani sıcaklık değişimleri, reaktif oksijen metabolitleri, ağır metaller, kuraklık, tuzluluk gibi çevresel faktörlere maruz kaldıklarında

üretilmeleridir. İnsandan bakteriye kadar tüm canlılarda bulunduğu artık bilinmekte olan ısı şok proteinler ve ısı şok cevabı biyoloji ve tıpta özellikle kanser, otoimmün (romatoidatrit, SLE, Ankliozanspondilit ve sjögrensendromu) hastalıklar ve infertilitede önemli bir araştırma konusudur (110).

Huai ve arkadaşlarının yaptığı; azalmış ısı şok protein expressionunun (HSP70) erkek infertilite patogeneziyle birlikteliği adlı çalışmalarında, infertilite ile başvuran bireylerin ve kontrol grubundan alınan testis biyopsilerinde (ki bunların testis biyopsileri normal testis dokusu, maturasyon aresti olan testis dokusu ve sertoli cel only olan testis dokusu) HSP70'in normal testis dokularının sperminde boyandığı, maturasyon aresti olanda çok az boyandığı, sertoli cel only grubunda ise hiç boyanmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak maturasyon aresti ve sertoli cel only grubunun spermlerinde azalmış ısı şok protein expressionunun (HSP70) erkek infertilite patogeneziyle birlikteliği olabileceğini ileri sürdüler (7). Yukarıdaki çalışmayı destekleyen Son ve arkadaşlarının insan erkek germ hücrelerinde HSPA2 spesifik ekspresyonu adlı çalışmasında; HSPA2 nin normal spermatogenezli testislerde görüldüğünü fakat Sertoli cell-only sendromlu testislerde düşük düzeyde görüldüğünü buldular. Yine Dix ve arkadaşlarının gen hedefli bozma tekniği ile HSP70-2 genini homozigot mutant (-/- HSP70-2) olarak bozdukları erkek farelerde HSP70-2 proteininin sentezlenmediğini, bu farelerde postmayotik spermatid ve olgun spermatozoa olmadığını ve bu farelerin infertil olduklarını gösterdiler; bu bulguya dayanarak HSP70' in eksprese edilmemesinin mayozu etkileyerek infertiliteye neden olabileceğini ileri sürdüler (111,112). Yukarıdaki üç çalışmanın tersine bizim çalışmamızda HSP70 proteininin immünohistokimyasal incelenmesinde hem idiopatik infertil hemde fertil kontrol grubu arasında spermde elde edilen ortalama boyama skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı.

Gen polimorfizmleri açısından özellikle Pericles ve arkadaşlarının varikoselli ve sperm parametreleri kötü, idiopatik infertil ama sperm parametreleri kötü ve fertil kontrol grubundan oluşan ve *HSP90* gen polimorfizmleri ilgili çalışmasında her üç grupta gen polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadığı ve *HSP90* gen polimorfizminin erkek infertilitesinden sorumlu olabileceği sonucuna ulaşılmadığı rapor edildi (113). Bizim çalışmamız her ne kadar ısı şok proteinin farklı bir grubunda olsada *HSPA1B* geni g.1269A>G polimorfik noktasının AG (heterozigot) ve GG (homozigot, polimorf)

genotipleri ile G alleli bakımından infertil hasta ve fertil kontrol arasında karşılaştırma yapıldığında istatiksels olarak anlamsız olduğu belirlendi. Ayrıca *HSPAIL* geni c.1478C>T polimorfik alanın CT (heterozigot) ve TT (homozigot, polimorfik) genotipleri ve T allelleri hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında istatistikî olarak anlamsız olarak tespit edildi

## 6. SONUÇ

Yapılan çalışmalarda ısı şok proteininin (İŞP70) artmış ekspresyonu bozulmuş sperm parametreleriyle ve dolayısıyla erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak verilerimizin incelenmesi sonucunda, sperm parametreleri normal infertil erkeklerle kontrol grubu arasında gerek *HSP70* Gen Polimorfizimleri gerekse *HSP70* Proteinin ekspresyonu açısından anlamlı fark gözlenmedi. Bu çalışmanın sonuçları sperm parametreleri normal infertil erkeklerde infertilitenin *HSP70* gen polimorfizimleri ve *HSP70* gen ekspresyonu ile açıklanamıyacağı kanaatini uyandırmıştır.

Ancak bunun doğrulanması için daha büyük vaka serileri içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 7. KAYNAK

1. Moshcr WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Ferti Steril.* 1991; 56: 192-193.
2. Revelli A, Tur Kasoa I, Holte JG, Massobrio M. *Biotechnology of Human Reproduction.* Parthenon Publishing, 2003.
3. De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999 ; Clark JI.
4. Korber P, Stahl JM, Nierhaus KH. A ribosome associated heat shock protein. *EMBO J* 2000 163(2):495–506
5. Clark JI, Muchowski PJ. Small heat shock proteins and their potential role human disease. *Curr Opin Biol* 2000
6. Tutar Y Heat shock proteins, substrate specificity and modulation of function. *Protein Pept Lett.* 2006;13(7):699–705.
7. Baykal Y, Gök F, Kocabalkan F IsI Şok Proteinleri ve Hastalıklardaki Rolü T Klin J Med Sci 2000, 20.187-195
8. Feng HL, Sandlow JI, Sparks AE. Decreased expression of the heat shock protein hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. *Fertil Steril.* 2001 Dec;76(6):1136-9
9. Delilbaşı L. İn vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri. Öncü Basımevi, Ankara, 2007.
10. Aydos K. Subfertil erkeğin değerlendirilmesi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; 2004.s.74–172.*

11. Aydos K. Erkek infertilitesi. İç: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N editörler. Temel Üroloji 3. baskı; Güneş Tıp Kitabevleri; 2007.s.967-1012
12. Turek P, Erkek infertilitesi. Smith Genel Üroloji. Nobel Tıp Kitabevleri: 2004.s.678-712
13. Sarıkaya Ş. Genital embriyoloji. TÜYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Ünal Ofset; 2007.s.4-42.
14. Park JM. Ürogenital Sistemin Normal ve Anormal Gelişimi. Alan BR, E Darracott V, Alan JW, editörler. Campbell Üroloji. Güneş Kitabevi; 2005.s.1737-1764.
15. Chung LW, Cunha GR. Stromal-epithelial interactions: II Regulation of prostatic growth by embryonic urogenital sinus mesenchyme. Prostate. 1983; 4: 503-511
16. Cunha GR, Chung LW. Stromal-epithelial interactions: I Induction of prostatic phenotyp in urothelium of testicular feminized (Tfm\_y) mice. J Steroid Biochem Mol Biol. 1981; 14: 1317-1324.
17. Davidoff M. S, Schulze W, Middendorff R, Holstein AF. The Leydig cell of the human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system, Cell Tissue Res,1993 271: 429-439
18. Holstein A. F. Schulze W. And Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment, Reproductive Biology and Endocrinology, 2003: 1: 107-108
19. Işık AZ, Vicdan K. İn Vitro Fertilizasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Çağdaş Medikal, Ankara, 1999.
20. Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Verveld M, Zeilmaker GH. İvf Lab-Laboratory aspects of in vitro fertilization. N.V. Organon, 1996.

21. Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler (sperm/oosit) fertilizasyon ve embriyoner gelişim. Serano yayınları. 01-2000.
22. Barrat CLR. Spermatogenesis. In: Grudzinkas JG, Yovich JL(eds): Gametes- The Spermatozoon. Cambridge, Cambridge University Pres, 1995. p.250-267. (h 25)
23. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. Theriogenology. 2003; 59: 73-86.
24. Syed V, Hecht NB. Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. Mol Cell Endocrinol, 2002. 186: 7-155.
25. Sairam MR, Krishnamurthy H. The role of Follicle-Stimulating Hormone in spermatogenesis: Lessons from knockout animal models. Arch Med Res. 2001; 32: 8-601.
26. Hedger MP, Meinhardt A. Cytokines and immune-testicular axis. J Rep Immunol. 2003; 58: 1-26
27. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas, 4th edn, Lippincott Williams-Wilkins, Philedelphia; 2003.p.689-696.
28. Aşçı R. İnfertil çiftte erkeğin sorgulanması. Türkiye Klinikleri Üroloji Özel Erkek İnfertilitesi Özel Sayısı. 2008, 1(1):1-6.
29. Print CG, Lakoski Loveland K. Germ cell suicide: New insights into apoptosis during spermatogenesis. Bioessays. 2000; 22: 423-430.
30. Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilinska B, Benahmed M, Levallet J. Aromatase expression in male germ cells. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2001; 79: 203-208.

31. Niederberger CS, Lamb DJ. Spermatogenesis in the Adult. In: Lipshultz LI, Howards SS (eds), Infertility in the Male, 3rd edn. Mosby, St Louis, 1997. p.106-122.
32. Hipler UC, Hochheim B, Knöll B, Tittelbach J, Schreiber G. Serum inhibin B as a marker for spermatogenesis. Arch Androl. 2001; 46: 217-222.
33. Wong WY, Flik G, Groenen PMW, Swinkels DW, Thomas CMG, Copius- Peereboom JHJ, Merkus HMWM, Steegers-Theunissen RPM. The impact of calcium, zinc, and Cooper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. Rep Toxicol. 2001;15: 131-136.
34. Cooke HJ, Hargreave T, Eliot DJ. Understanding the genes involved in spermatogenesis: A progress report. Fertil Steril. 1998; 69: 989-995.
35. Adler ID. Spermatogenesis and mutagenicity of environmental hazards: Extrapolation of genetic risk from mouse to man. Andrologia. 2000; 32: 233-237.
36. Gazvani MR, Wilson EDA, Richmond DH, Howard PJ, Kingsland CR, Lewis- Jones DI. Role of mitotic control in spermatogenesis. Fertil Steril. 2000;74: 251-256.
37. Meistrich ML, Wilson G, Shuttlesworth GA, Porter KL. Dibromochloropropane inhibits spermatogonial development in rats. Rep Toxicol. 2003; 5515: 1-9.
38. Kayıgil Ö. Erkek infertilitesinde tanı yöntemleri. TÜYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Kongre Basımevi; 2006.s.253-261.
39. Çulha M. Erkek infertilitesinde tanı. TUYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Ünal Ofset; 2007.s.292-296.
40. Sigman M, Jonathan P J. Erkek infertilitesi. İç: Alan BR, E Darracott V, Alan JW, editörler. Campbell Urology. Güneş Kitabevi; 2005.s.1475-1531.



41. Kandıralı E. Semen analizi ve sperm morfolojisi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; 2004.s.317-323.
42. Emir L. Erkek infertilitesinde tanı yöntemleri. TUYK Ders Notları Kitabı; 2008.291-298.
43. Arnauld A, Scheved JF, Gris JC, Costa P, Navratil H, Hurneau C. Tissue-type plasminogen activator level is decreased in human seminal plasma with abnormal liquefaction. Fertil Steril. 1994;61: 741-745.
44. Dube JY, Gaudreault D, Tremblay RR. The concentration of immunoreactive prostat specific antigen is not decreased in viscous semen samples. Andrologia. 1989; 21: 136-139.
45. Syner FN, Moghtsii KS, Yanez J. Isolation of a factor from normal human semen that accelerates dissolution of abnormally liquefying semen. Fertil Steril. 1975;26: 1064-1069.
46. Wilson VB, Bunge RG. Infertility and semen non-liquefaction. J Urol. 1975; 113: 509-510.
47. World Health Organization Manual for semen analysis, 5th, edn, 2010
48. Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C. Semen analysis: An Office technique. Urology. 1973;2: 605-611.
49. Ombelet W, Pollet H, Bosmans E, Vereecken A. Results of questionnaire on sperm morphology assessment. Hum Reprod. 1997;12: 1015-1020.
50. Biri H. Erkek infertilitesinde medikal ve cerrahi tedavi. TUYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Ünal Ofset; 2007.s.297-298.

51. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lambard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphology features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986; 46: 118-123.
52. Pavlovich CP, King P, Goldstein M, Schlegel PN. Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. *J Urol.* 2001; 165: 837-841.
53. Jarrow JP. Transrectal ultrasonography of infertile men. *Fertil Steril.* 1993; 60: 1035-1039.
54. Turek PJ, Cha I, Ljung BM. Systematic fine-needle aspiration of the testis: correlation to biopsy and results of organ 'mapping' for mature sperm in azoospermic men. *Urology.* 1997;49: 743-748.
55. Levin HS. Testicular biopsy in the study of male infertility. Its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Hum Pathol* 1979;10: 569-570.
56. Kefi A, Esen A. Testis biopsisi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği*; 2004.s.238-239.
57. De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod.* 1991;6: 245-250.
58. Bozkırlı İ. Erkek İnfertilitesi. Bozkırlı İ(eds), *Yeni Üroloji*. Türk Hava Kurumu Basımevi, Ankara. 1999, pp583-602.
59. Aydos S. Erkek infertilitesi ve genetik. *Türkiye Klinikleri Üroloji Özel Erkek İnfertilitesi Özel Sayısı*.2008 1(1):34-40.
60. Özgök Y. İnfertilite tedavisi. *TUYK Ders Notları Kitabı*; 2008.s.299-305.

61. Çayan S. Erkek infertilitesinde medikal ve cerrahi tedavi. TÜYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Kongre Basımevi; 2006.s.262-263.
62. Semerci B. Erkek infertilitesinin spesifik medikal tedavisi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; 2004.s.396-401.
63. Jarow JP. Nonsurgical treatment of male infertility: Empirical therapy. In: Lipshultz LI, Howards SS (eds): Infertility in the Male, 2 nd Edition. St Louis, Mosby-Year Book, 1991
64. Charny CW, Gordon JA. Testosterone rebound therapy: A neglected modality. Fertil Steril. 1978;29: 64-68.
65. Lamensdorf H, Compere D, Begley G. Testosterone rebound therapy in the treatment or male infertility. Fertil Steril. 1975; 26: 46-72.
66. Wang C, Dahl KD, Leung A, Chan SY, Hsueh AJ. Serum bioactive folliclestimulating hormone in men with idiopathic azoospermia and oligospermia. J Clin Endocrinol Metab. 1987;65: 627-633.
67. Acosta AA, Khalifa E, Oehninger S. Pure human follicle stimulating hormone has a role in the treatment of severe male infertility by assisted reproduction: Norfolk's total experience. Hum Reprod.1992; 7: 1067-1072.
68. Vigersky RA, Glass AR. Effects of delta-1-testolactone on the pituitaritesticular axis in oligospermic men. J Clin Endocrinol Metab. 1981; 52: 897-902.
69. Göğüş O. Ampirik medikal tedavi. İç: Özdiler E, Aydos K(ed). Klinik Androloji. Ankara Üniversitesi Basımevi. 2000, pp.597-612.

70. Schill WB. Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: Results of double-blind study. Arch Androl. 1979; 2: 163-170.
71. Homonai ZT, Shilon M, Paz G. Evaluation of semen quality following kallikrein treatment. Jinecol Obstet Invest. 1978; 9: 132-138.
72. Keck C, Behre HM, Jockenhovel F. Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male in fertility: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Hum Reprod. 1994; 9: 325-329.
73. Bozkırlı İ, Tunç L. Erkek İnfertilitesinde Ampirik Medikal Tedavi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; 2004.s.410.
74. Aparicio NJ, Schwarzstein L, Turner EA, Turner D, Mancini R, Schally AV. Treatment of idiopathic normogonadotropic oligoasthenospermia with syntetic lüteinizing hormone-releasing hormone. Fertil Steril. 1976;27: 549-552.
75. Dubin L, Amelar RD. Varicocelectomy as therapy in male infertility: A study of 504 cases. J Urol. 1975;113:640-641.
76. Willis KC, London DR, Bevis MA. Hormonale effects of tamoxifen in oligospermic men. J Endocrinol. 1977; 73: 171-174.
77. Barkay J, Harpas-Kerpel S, Ben-Ezra S, Gordon S, Zuckermann H. The prostoglandin inhibitor effect of anti-inflamatory drugs in the therapy or male infertility. Fertil Steril. 1984; 42: 406-411.
78. Cohen MS, Colin MJ, Golimbu M. The effects of prostoglandins on sperm motility. Fertil Steril. 1977; 28: 78-85.

79. Oktar T, Ahmedov İ, Kadioğlu A. Varikosel Tedavisi. İ: Kadioğlu A, ayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; 2004.s.463.
80. Aydos K. Erkeğin üremeye yardımcı teknikler için hazırlanması. Türkiye Klinikleri Üroloji Özel Erkek İnfertilitesi Özel Sayısı.2008 1(1): 57-66.
81. Ritossa FA. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962;18:571-573.
82. Tissiere A, Mitchell HK, Tracy U. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosomal puffs. *J Molec Biol* 1974;84:389-398.
83. Tutar Y. 2003 Structure function studies with the cAMP Receptor Protein of *E. Coli*. Lubbock, TX. Doktora tezi.
84. Morimoto, R.I., Kroeger, P.E., and Cotto, J.J., 1996, The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. *EXS.*, 77:139–163
85. Hartl, F.U., 1996, Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381: 571–579.
86. Neuer, S.D. Spandorfer, P. Giraldo, J. Jeremias, S. Dieterle, I. Korneeva, H.-C. Liu, Z. Rosenwaks, and S.S. Witkin:Heat Shock Protein Expression During Gametogenesis and Embryogenesis, *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 1999;7:10-16
87. Eddy EMO'Brien DA, Welch JE. Mammalian sperm development in vivo and in vitro. In Wassarman PM (ed): *Elements of Mammalian Fertilization*. Boca Raton: CRC Press, 1991, pp 1-28

88. Dix DJ. Hsp70 expression and function during gametogenesis. *Cell Stress Chaperones* 1997;2:73-77
89. Allen RL, O'Brien DA, Eddy EM. A novel hsp70-like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells. *Molec Cell Biol* 1988;8:828-832.
90. Lee SJ. Expression of HSP86 in male germ cells. *Molec Cell Biol* 1990;10:3239-3242.
91. Werner A, Meinhardt A, Seitz J, Bergmann M. Distribution of heat-shock protein immunoreactivity in testes of infertile men. *Cell Tissue Res* 1997;288:539-544.
92. A. Neuer, S.D. Spandorfer, S. Dieterle, Z. Rosenwaks and S.S. Witkin, The role of heat shock proteins in reproduction, *Human Reproduction Update* 2000, Vol.6 No. 2 pp. 149-159
93. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis and male infertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3264-3268.
94. Mori C, Nakamura N, Dix DJ, et al. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and hsp70-2 knockout mice. *Dev Dynamics* 1997;208:125-136.
95. Ambrosio L, Schedl P. Gene expression during *Drosophila melanogaster* oogenesis: Analysis by in situ hybridization to tissue sections. *Dev Biol* 1984;105:80-92.
96. Heikkila JJ, Kloc M, Bury J, Miller Schultz, GA, Browder LW. Heat shock gene expression during early animal development. In: Aitkinson BG, Walden DB (ed): *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress*. Orlando: Academic Press, 1985, pp 135-138.

97. Heikkila JJ, Miller JGO, Schultz GA, Kloc M, Browder LW. Acquisition of the heat-shock response and thermotolerance during early development of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 1985;107:483-489.
98. Heikkila JJ, Ohan N, Tam Y, Ali A. Heat shock protein gene expression during *Xenopus* development. *Cell Molec Life Sci* 1997;53:14-121.
99. Heikkila JJ, Browder LM, Genamu L, Nickels RW, Schultz GA. Heat shock gene expression in animal embryonic systems. *Can Genet Cytol* 1986;28:1093-1105.
100. Zimmerman JL, Petri W, Meleson M. Accumulation of a specific subset of *D. melanogaster* heat shock mRNAs in normal development without heat shock. *Cell* 1983; 32:1161-1170.
101. Curci A, Bevilacqua A, Mangia F. Lack of heat shock response in preovulatory mouse oocytes. *Dev Biol* 1987; 123:154-160.
102. Curci A, Bevilacqua A, Fiorenza MT, Mangia F. Developmental regulation of heat shock response in Mouse oogenesis: Identification of differentially responsive oocyte classes during Graafian follicle development. *Dev Biol* 1991;144:362-368.
103. Baumgartner AP, Chrisman CL. Ovum morphology after hyperthermic stress during meiotic maturation and ovulation in the mouse. *J Reprod Fertil* 1981;61:91-96.
104. Lenz RW, Ball GD, Leibfried ML, Ax RL, First NL. In vitro maturation and fertilization if bovine oocytes are temperature-dependent processes. *Biol Reprod* 1983; 29:173-179.
105. Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biol Reprod* 1994;50:233-238.

106. Laad A D, Thomas ML, Fakih AR, C hiplunkar SV: Human gamma delta T cells recognize heat shock protein 60 on oral tumor cells. *Int J Cancer*, 80 (5), 709-714, 1999.
107. Ciocca, DR, Calder wood, SK: Heat shock proteins in cancer: Diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones*, 10 (2): 86 -103, 2005.
108. Schaffer C, Williams JA. Stress kinase and HSPs in the pancreas. *J Gastroenterol* 2000; 35(1):1-9.
109. Oehninger S, pathophysiology of oligoasthenoteratozoospermia:Are we improving in the diagnosis?. *Reprod biomed online* 2003;7(4)433-439)
110. Kontaş T, Ergün N, Turunç V. ısı şok proteinler ve fizyolojik rolleri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* 13 (1): 109-114, 2007
111. Son WY, Hwang SH, Han CT, Lee JH, Kim SJ, Kim YC. Specific expression of heat shock protein hspA2 in human male germ cells. *Molecular Human Reprod* 1999;5,1122–6.
112. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93.3264–8.
113. Pericles A. Hassun Filho, Agnaldo P. Cedenho, Samira B. Lima, Valdemar Ortiz, Miguel Srougi, Single nucleotide polymorphisms of the heat shock protein 90 gene in varicocele-associated infertility. *International Braz J Urol*; Vol. 31 (3): 236-244, May - June, 2005