T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN SPERM AKROZOMAL ENZİMLERİ ÜZERİNDE SİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Rukiye ERDOĞAN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. İlhami ÇELİK

Doç. Dr. Mehmet KAYNAR

KONYA – 2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN SPERM AKROZOMAL ENZİMLERİ ÜZERİNDE SİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

Rukiye ERDOĞAN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (VET) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. İlhami ÇELİK

Doç. Dr. Mehmet KAYNAR

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 17202045 proje numarasıyla desteklenmiştir.

KONYA – 2021

ONAY SAYFASI

ÖNSÖZ

WHO infertiliteyi "çiftlerin, en az bir yıl süreyle korunmasız olarak ilişkide bulunmalarına karşın çocuk sahibi olmamaları" şeklinde tanımlamıştır. WHO'nun çok merkezli araştırmaları sonucunda, infertilite kliniklerine başvuran çiftlerin en az %48'inde erkeğe bağlı nedenler bulunduğu anlaşılmıştır. İnfertilite olgularının yaklaşık yarısı erkeğe bağlı olduğundan iyi bir semen analizi kaçınılmazdır. Semen parametrelerinin bilinmesi, hangi olgulara inseminasyon, hangi olgulara IVF ve hangi olgulara da ICSI uygulaması yapılması gerektiği konusunda ışık tutacaktır (Baldi ve ark 1996). Klasik in vitro fertilizasyonun yeterli sayıda motil spermin olması halinde erkek subfertilitesinde de çözüm olabileceğinin gösterilmesi üzerine, IVF uygulamaları anovulasyon, tubal faktör ve açıklanamayan infertilite dışında erkek subfertilitesinde de gerçekleştirilmeye başlanmıştır. Ancak erkek subfertilitesinde sperm parametrelerinin yetersiz olmasının, fertilizasyonun düşmesine neden olduğu bilinmektedir (Bourne ve ark 1995). Fertilizasyonda etkili olan sperm parametreleri arasında sperm sayısı önemlidir. WHO standartlarına göre 20 milyon/ml üzerindeki sperm yoğunluğu normal kabul edilmektedir. Ejakülatta hiç sperm bulunmaması anlamına gelen azospermi olgusu, erkeklerin %1'inde, infertilite olgularının ise %10-15'inde gözlenmektedir. Erkek infertilite olgularının tedavisinde en önemli ilerleme, azospermi olgularında testislerde spermatogenezisin devam ettiği küçük odakların gösterilerek, bu odaklardaki matür sperm hücrelerinin elde edilmesi olmuştur (Cox ve ark 2002). Günümüzde vaza deferens, epididimis veya testisten sperm elde etmek için birçok farklı metot uygulanabilmektedir. Seçilen metot sadece cerrahi becerilere ve kliniklerin teknik imkânlarına bağlıdır. Eğer sperm ayaktaki hastadan elde edilecek ise teknik, lokal anestezi uygulanabilir şekilde adapte edilir. Ejakülat santrifüj edildikten sonra hiç motil sperm elde edilmezse, epididimal veya testiküler sperm elde etme metotları uygulanır (Bourne ve ark 1995).

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Ünitesi Androloji Laboratuvarı'na başvuran 21-45 yaş aralığındaki sigara kullanan veya kullanmayan, diyabet, hipertansiyon ve romatizma gibi kronik rahatsızlığı olmayan, varikoselli veya varikosel operasyonu geçirmiş, ciddi ürolojik enfeksiyon ve inmemiş testis tıbbi hikayesi olmayan toplam 42 erkekten alınan semen örneklerinden hazırlanan frotilerde ANAE, ACP-az ve ALP-az enzimleri

sitokimyasal yöntemlerle demonstre edilerek, spermlerdeki enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir.

ANAE, ACP-az ve ALP-az aktiviteleri genellikle spermin baş ve orta bölgelerinde, çoğunlukla granüler tarzda gözlenmiştir. Bu çalışmanın enzim sitokimyasal inceleme sonuçları, sigara içmenin ve varikoselin sperm ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivitelerinde belirgin düşüşlere yol açtığını; varikosel ameliyatının, bu enzimlerin pozitivitelerinde belirgin bir iyileşme sağlamakla birlikte, sigara içmenin devam etmesinin ameliyatın olumlu etkisinde belirgin azalmayla sonuçlandığını ortaya koymaktadır. Çalışmada az sayıda örnek üzerinde çalışılmış olmakla birlikte, spermin ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivitelerinin insanlarda semen kalitesinin değerlendirilmesinde yardımcı bir parametre olarak dikkate alınabileceği sonucuna varılmıştır.

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. İlhami ÇELİK'e, Sayın Doç. Dr. Mehmet KAYNAR'a, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Yasemin ÖZNURLU 'ya, Sayın Prof. Dr. Sadullah BAHAR'a ve Arş. Gör. İlknur ÜNDAĞ'a teşekkürlerimi sunarım. Verilerin istatistiksel analizi ve yorumlanmasında yardımcı olan sevgili ağabeyim Prof. Dr. Ahmet ERDOĞAN'a, beni bu günlere getiren, emek veren, maddi ve manevi desteği olan aileme en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, 17202045 proje numarası ile tezimin yürütülmesinde maddi destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Rukiye ERDOĞAN

Konya/2021

ONAY SAYFASI ..... **i**
ÖNSÖZ ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **v**
TABLOLAR ..... **vii**
ŞEKİLLER ..... **viii**
ÖZET ix
SUMMARY xi
1. GİRİŞ **1**
1.1. Erkek Genital Sistemi 2
1.2. Spermatogenezis 9
1.3. Akrozomal Enzimler 15
1.4. Spermatogenezisi Etkileyen Önemli Faktörler 21
2. GEREÇ VE YÖNTEM **24**
2.1. Örneklerin Toplanması ve Değerlendirilmesi 24
2.2. Sperm Yıkama 25
2.3. Enzim Sitokimyasal Çalışmalar 25
2.3.1. ANAE Aktivitesinin Sitokimyasal Yöntemle Belirlenmesi 25
2.3.2. ACP-az Aktivitesinin Sitokimyasal Yöntemle Belirlenmesi 26
2.3.3. ALP-az Aktivitesinin Sitokimyasal Yöntemle Belirlenmesi 26
3. BULGULAR **28**
3.1. Grupların Semen Analizi Bulguları 28
3.2. Enzim Sitokimyasal Sonuçlar 29
3.2.1. Enzim Pozitivitelerinin Morfolojik Açıdan Değerlendirilmesi 29
3.2.2. Enzim Pozitivite Verilerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları 36
4. TARTIŞMA **39**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **46**
6. KAYNAKLAR **47**
7. EKLER **53**
Ek-A. Etik Kurul Kararı……..…53
Ek-B. Bilgilendirilmiş Olur... Formu……..……..55
8. ÖZGEÇMİŞ **57**

SİMGELER VE KISALTMALAR

α: Alfa

ABP: Androjen bağlayıcı protein

ACP-az: Asit Fosfataz

ALP-az: Alkalin Fosfataz

ANAE: α-naftil asetat esteraz enzimi

β: Beta

Ca: Kalsiyum elementi

°C: Santigrat derece

DNAaz: Deoksiribonükleaz enzimi

FSH: Folikül uyarıcı hormon

ICSH (LH): İntersisyel hücreleri uyarıcı hormon

ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

IVF: İn vitro fertilizasyon

µm: Mikrometre

MIF: Antimüllerian hormon

MMP: Matriks metalloproteinaz enzim ailesi

mM: Milimolar

ml: Mililitre

PBS: Fosfat tamponlu serum fizyolojik

pH: Hidrojen iyon konsantrasyonunun logaritmik değeri

TESE: Testiküler sperm ekstraksiyonu

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

%: Yüzde

TABLOLAR

Tablo 2.1. Çalışmada oluşturulan gruplar……..……24

Tablo 3.1.1. Grupların semen örneklerinin morfolojik analiz sonuçları……..…....29

Tablo 3.2.2.1. Grupların enzim pozitivite verileri ve bu verilerin istatistiksel analiz sonuçları……..……36

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. 1694'te insan spermine tutunmuş homunculus'un şematik gösteri..……1

Şekil 1.2. Erkek üreme sisteminin şematik görünümü..……...3

Şekil 1.3. Testisin borucuklar sistemi ve epididimis……..…..5

Şeki1 1.4. Testis kesitinde seminifer tübül duvarları ve interstisyel alanda kan damarı……...7

Şekil 1.5. Spermatogenezis……..……...12

Şekil 1.6. Normal spermin ışık mikroskobik görünümü……...……..14

Şekil 3.2.1.1.1. Sigara içen-varikoselli gruptan ANAE demonstrasyonu yapılan bir sperma örneği……..……30

Şekil 3.2.1.1.2. Sigara içen-varikosel ameliyatlı gruptan ANAE demonstrasyonu yapılan bir sperma örneği……30

Şekil 3.2.1.1.3. Sigara içmeyen-varikoselsiz gruptan ANAE demonstrasyonu yapılan bir semen örneği……..31

Şekil 3.2.1.1.4. Sigara içen-varikoselli gruptan ANAE demonstrasyonu yapılan bir sperma örneği……...……..…….31

Şekil 3.2.1.2.1. Sigara içen-varikoselli gruptan ACP-az demonstrasyonu yapılan bir sperma örneği……..……32

Şekil 3.2.1.2.2. Sigara içmeyen-varikoselli gruptan ACP-az demonstrasyonu yapılan bir sperma örneği……33

Şekil 3.2.1.2.3. Sigara içen-varikoselli gruptan ACP-az demonstrasyonu yapılan bir sperma örneği…….……..…33

Şekil 3.2.1.3.1. Sigara içen-varikoselli gruptan ALP-az demonstrasyonu yapılan bir sperma örneği…….…….……34

Şekil 3.2.1.3.2. Sigara içen-varikosel ameliyatlı gruptan ALP-az demonstrasyonu yapılan bir sperma örneği……..……..35

Şekil 3.2.1.3.3. Sigara içmeyen-varikoselsiz gruptan ALP-az demonstrasyonu yapılan bir sperma örneği……35

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İnsan sperm akrozomal enzimleri üzerinde sitokimyasal çalışmalar

Rukiye ERDOĞAN

Histoloji ve Embriyoloji (VET) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/ KONYA-2021

Sperm enzimleri, özellikle de akrozomal enzimler, fertilizasyonda oynadıkları roller nedeniyle erkek üreme fizyolojisinde çok büyük öneme sahiptir. Bununla birlikte, sperm enzimlerinin sitokimyası ve bu enzimlerin erkek üreme bozukluklarıyla ilişkisi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Sunulan bu araştırma projesinde; sigara içmeyen-varikoselsiz, sigara içmeyen-varikoselli, sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı, sigara içen-varikoselsiz ve sigara içen-varikosel ameliyatlı olan cinsel bakımdan olgun erkeklerden alınan semen örneklerinde, sperm enzimlerinden olan ANAE, ACP-az ve ALP-az enzimleri sitokimyasal yöntemlerle demonstre edilerek, gruplar arasındaki enzimatik pozitivite farkları belirlenmiştir.

Çalışmada materyal olarak, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Ünitesi Androloji Laboratuvarı'na başvuran 21-45 yaş aralığındaki sigara içen veya içmeyen, diyabet, hipertansiyon ve romatizma gibi kronik rahatsızlığı olmayan, varikoselli ya da varikosel operasyonu geçirmiş, ciddi ürolojik enfeksiyon ve inmemiş testis tıbbi hikayesi olmayan toplam 42 erkekten alınan semen örneğinden hazırlanan frotiler kullanılmıştır. Semen örneklerinin yıkanmasında PBS solüsyonu kullanılmıştır. Santrifüj tüpüne taze semen örneğinden 1 ml alınıp üzerine 9 ml PBS eklenerek 800 G'de oda sıcaklığında (22℃) 8 dakika santrifüje edilmiştir. Üst kısım atılmış, dipteki sperm pelletinin üzerine 10 ml'ye tamamlayacak şekilde tekrar PBS eklenerek 800 G'de oda sıcaklığında 8 dakika santrifüje edilmiştir. Üst kısım atılmış ve alttaki sperm peletinden hazırlanan yayma preparatlar havada kurutularak enzim sitokimyasal işlemlerde kullanılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan frotiler enzimin demonstre edileceği tespit sıvısında -10°C'de uygun sürelerle tespit edilerek, bu frotilerde her enzim uygun sitokimyasal metotla demonstre edilmiştir. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobuyla (Nikon Eclipse E100) incelenmiş ve gerekli görülen sahaların dijital görüntüleri kaydedilmiştir. Bir enzimin spesifik reaksiyon ürününe sahip olan bir sperm o enzim bakımından pozitif olarak kabul edilmiştir. Her enzim için pozitivite oranları belirlenmiş ve yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Değerlendirmede, reaksiyon ürününün dağılım şekli (iri lokalize granüler, ince granüler ya da diffüz), hücredeki yerleşimi ve sayısı dikkate alınmıştır.

ANAE reaksiyonu, çoğunlukla spermlerin baş bölgesinde ve boyun-orta parçasında yerleşen kırmızımsı-kahverengi renkli ve lokalize granüler ya da ince granüler tarzda gözlenmiştir. Bazı hücrelerde bu reaksiyon akrozomun ön tarafında dar bir bant halinde gözlenmiştir. ACP-az enzimi reaksiyonu spermlerin baş bölgesinde ve boyun-orta parçasında yerleşen iri granüler, ince granüler ya da diffüz karakterde, kırmızımsı-kahverengi renkli reaksiyon ürünü halinde gözlenmiştir. ALP-az enzimi reaksiyonu ise spermlerin baş bölgesinde ve boyun-orta parçasında yerleşen iri granüler ya da ince granüler karakterde, pembemsi-kırmızı renkli reaksiyon ürünü halinde gözlenmiştir.

Bu çalışmanın enzim sitokimyasal inceleme sonuçları, sigara içmenin ve varikoselin sperm ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivitelerinde belirgin düşüşlere yol açtığını; varikosel ameliyatının, bu enzimlerin pozitivitelerinde belirgin bir iyileşme sağlamakla birlikte, sigara içmenin devam etmesinin ameliyatın olumlu etkisinde belirgin azalmayla sonuçlandığını ortaya koymuştur. Çalışmada az sayıda örnek üzerinde çalışılmış olmakla birlikte, spermin ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivitelerinin insanlarda semen kalitesinin değerlendirilmesinde yardımcı bir parametre olarak dikkate alınabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: akrozomal enzimler; alfa-naftil asetat esteraz; alkalin fosfataz; asit fosfataz; semen.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY

SELCUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Enzyme cytochemical studies on the human acrosomal enzymes

Rukiye ERDOĞAN

Deparment of Histology and Embryology

PhD THESIS/KONYA-2021

Sperm enzymes, specifically acromal enzymes have enormous importance in the male reproductive physiology because that they play vital roles in fertilization. However, there is not sufficent information about the cytochemistry of sperm enzymes and their relationship with male reproductive disorders.

In the present study; ANAE, ACP-ase and ALP-ase were cytochemically demonstrated in the smears prepared from semen samples of sexually mature men, who were non-smoker-without varicocele (healthy), non-smoker-varicocele diseased, non-smoker-varicocele operated, smoker-without varicocele and smoker-varicocele operated, and the differences between enzymatic positivity values of the groups were determined. The semen smears were used as material which were prepared form the semen samples obtained from sexually mature men aged between 21-45, either smokers or non-smokers, varicocele diseased or varicocele operated, who applied to Andrology Laboratory of In Vitro Fertilization Unit in Selcuk University Medical Faculty Hospital. The semen samples were washed with a PBS solution. Onto 1 ml of semen sample, 9 ml of the PBS solution was added and centrifuged at 800 G'de for 8 minutes at room temperature (22℃). Supernatant was discarged, sperm pellet was diluted to 10 ml with the solution given above and centrifuged at 800 G'de for 8 minutes at room temperature (22°C). The supernatant was discarged again and smears were prepared from the sperm pellet. The smears were air dried and used in enzyme cytochemistry. The dried smears were fixed in special fixatives for each enzyme for sufficent periods at -10°C. Enzymes were demonstrated by means of enzyme-specific cytochemical reactions for each enzyme. Preparations were investigated under light microscope (Nikon Eclipse E100) and digital images of selected areas were recorded. A sperm with specific enzymatic reaction product was evaluated as "positive" in terms of the enzyme regarded. Positivity rates of each enzyme were determined and and expressed as % of the counted sperms. In the evaluation of the enzyme positivity, location, distribution pattern (large-localised granular, fine-granular or diffuse) and number of the reaction product were taken into consideration.

ANAE positivity reaction products were observed as reddish-brown localised granular or fine granular pattern, mainly located in the head region of the sperm. In some of the cells, reaction product was seen as a narrow band located at front acrosomal membrane. ACP-ase reaction was observed in reddish-brown color as large granular, fine granular or diffuse pattern in the head region and head-midpiece of the sperm. ALP-ase reaction product displayed pale pinkish-red coloured large granular or fine granular pattern located in the head and head-midpeice connection of the sperm.

Results of the enzyme cytochemical investigations of the present study have revealed that smoking and varicocele cuased definite reductions in ANAE, ACP-ase and ALP-ase positivities. Varicocele operation significantly recovered the enzyme positivity values. Nevertheless, keeping the smoking decreased recovery effects on the enzymatic positivities of the varicocele operation.

Although sample population of the present study has limited number, it was concluded that sperm ANAE, ACP-ase and ALP-ase positivity values could be used as an additional parameter in the evaluation of the male semen quality.

Key words: acid phosphatase; alkaline phosphatase; alpha-naphthyl acetate esterase; semen; sperm enzymes,

1. GİRİŞ

Erkek üreme hücresi olan sperm (spermatozoon, spermiyum), tabiattaki en kompleks hücrelerden biridir. Bu hücre ilk kez, Antonie van Leeuwenhoek tarafından yapılan ışık mikroskobik incelemelerde görülmüştür. Leeuwenhoek ve Hamm 1677'de semende yaptıkları incelemelerde gözledikleri spermleri küçük kuyruklu hayvanlar olarak tanımlamışlar (Şekil 1.1) ve baş kısmında minyatür bir insan (homunculus) bulunduğunu ileri sürmüşlerdir (https://ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html, Kumtepe ve ark 2009). Bu fikir, "preformasyon" teorisine temel oluşturmuştur. Bu teoriye göre, dişinin yeni canlının şekillenmesinde katkısı sadece homunculusun gelişeceği uygun ortamı sağlamaktan ibarettir (Kumtepe ve ark 2009).



Şekil 1.1. 1694'te insan spermine tutunmuş homunculusun şematik gösterimi (Haimov-Kochman ve Spitz 2016).

Spallanzani 1775'te oosit ve spermin her ikisinin de yeni bir insanın gelişimi için gerekli olduğunu ispatlamıştır. 1830'da Prevost ve Dumas spermin fertilizasyon için önemli olduğunu; 1841'de Von Kolliker ise, testisin tubulus seminiferus contortuslarında (seminifer tübüller) hücre bölünmesinin son ürününün sperm olduğunu ortaya koymuşlardır. Macomber ve Sanders 1929'da semende sperm sayım tekniğini geliştirmişlerdir (Kumtepe ve ark 2009, Li ve ark 1972). Macleod (1942), Macleod ve Gold (1953), Eliasson (1971) ve Hellinga (1949,1976) konvansiyonel sperm analizinin bilimsel temellerini ortaya koymuşlardır. Bu metotlardan hala referans metotlar olarak yararlanılmaktadır (Kumtepe ve ark 2009, Li ve ark 1972, Ross ve Pawlina 2003).

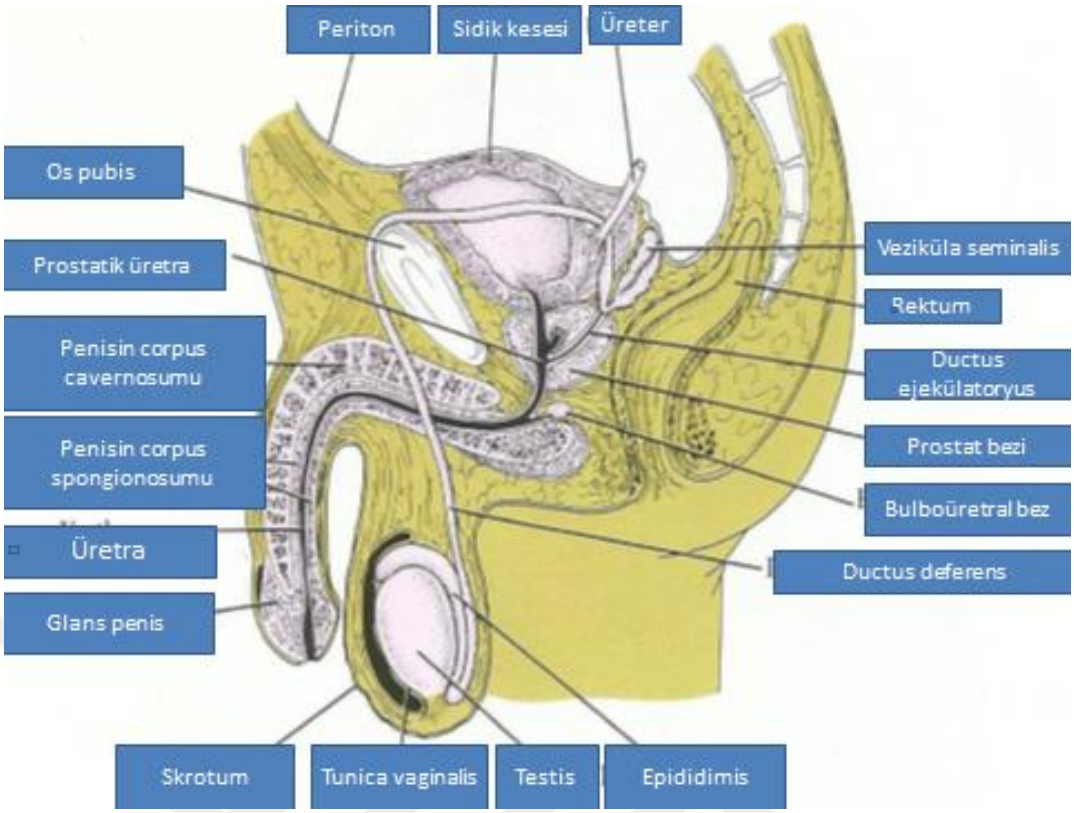
Spermin tanımlanıp semen analiz tekniklerinin uygulamaya girmesi, infertilitenin tedavisi konusunda önemli bir çığır açmıştır. 1970'li yılların sonlarından itibaren ortaya çıkan yeni teknolojiler ve bunların kliniğe uyarlanması, hem infertiliteye yol açan nedenlerin daha iyi anlaşılmasını sağlamış ve hem de milyonlarca çiftin çocuk sahibi olabilme şansını artırmıştır. 1978 yılında in vitro fertilizasyon (IVF) yöntemiyle ilk tüp bebeğin doğumu gerçekleşmiş ve daha sonra bu yöntem, erkek infertilitesi ve açıklanamayan infertilite gibi birçok endikasyonda başarıyla uygulanmıştır. 1992'de, intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yöntemiyle elde edilen ilk başarılı gebelikler sonrası bu yöntem, günümüzde şiddetli erkek infertilite tedavisinde çok önemli bir yer edinmiştir (Lens ve ark 1996).

Sunulan bu Doktora Tez çalışmasında, sigara kullanan veya kullanmayan, diyabet, hipertansiyon ve romatizma gibi kronik rahatsızlığı olmayan, varikoselli veya varikosel operasyonu geçirmiş, ciddi ürolojik enfeksiyon ve inmemiş testis tıbbi hikayesi olmayan hastaların semen örneklerindeki spermlerin α-naftil asetat esteraz (ANAE), asit fosfataz (ACP-az) ve alkalin fosfataz (ALP-az) enzimlerinin pozitivite oranlarının sitokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. Erkek Genital Sistemi

Erkek üreme sistemi testisler, sperma ileten borucuklar ve erkek eklenik genital bezlerinden oluşmaktadır. Ürethranın pars pelvina ve pars penis bölümleri üriner sistem organı olarak da görev yapmaktadır.

Testisler, erkeklik hormonlarını ürettikleri için birer endokrin bez olarak kabul edildiği gibi, sperm ürettikleri için de sitojenik ekzokrin bez olarak da kabul edilen çift fonksiyonlu organlardır. Spermler testiste tubulus seminiferus kontortuslarda (seminifer tübüller) yapılır ve sperma ileten borucuklarla vücut dışına taşınır. Sperma ileten borucuklar, tubulus seminiferus rektuslar, rete testis, duktuli eferentesler, kaput, korpus ve kauda bölümlerinden oluşan epididimis (epididimisteki kanalcıklar duktus epididimidislerdir), duktus deferens (vaza deferens) ve üretra'dan oluşmaktadır. Eklenik (aksessör) genital bezler ise seminal veziküller, prostat bezi ve bulboüretral bezdir (Şekil 1.2). Penis, erkekte erektil dokudan oluşan kopulasyon organıdır (Kierszenbaum 2006).



Şekil 1.2. Erkek üreme sistemine ait yapıların şematik görünümü (Ahmetoğlu 2013).

Eklenti bezleri, içerdikleri besin maddeleriyle spermlerin canlıklarının devamını sağlayan ve fonksiyonlarına destek olan salgıları üretirken; sperma ileten genital kanallar, salgıları ve duvarlarında bulunan düz kasların kontraksiyonlarının yardımıyla spermlerin lümenlerinde ilerlemesini ve ejekülasyonu sağlar. Semen; spermleri, sperm ileten kanalların ve eklenti bezlerinin salgılarını içeren alkali karakterde bir peltedir. Ejekülasyonla bir seferde atılan sperma miktarı ejekülattır. Ejekülat belli bir aglütinasyon süresini takiben likefiye olur (Kierszenbaum 2006).

Testisler

Erişkin testisleri, bu organların posterior yüzüne tutunan epididimisle birlikte skrotal kese içinde yerleşirler ve her testis duktus deferens, arteriya spermatikalar, pleksus pampiniformisler, lenfatik pleksuslar ve muskulus kremasteri içeren funikulus spermatikusla (spermatik kordonla) asılıdır. Çift organlardan olan testislerin vücut dışındaki skrotal kese içinde yerleşmiş olması, termoregülasyonu, yani bu organların spermatogenezis için gerekli olan optimum sıcaklığa (34°C-35°C arası) maruz kalmalarını sağlar (Kierszenbaum 2006).

Testisi saran yapılar;

a) Skrotum

Melanin içeriğinden kaynaklanan kahverengi renkli çok ince bir deriye sahip olan kesedir. Derisinde kendine özgü koku yayan yağ bezleri ve ter bezleri boldur. Sinir sonlanmalarından yana zengin olan bu deride derialtı yağ dokusu bulunmadığından, skrotumun ısı iletimi oldukça iyidir (Kierszenbaum 2006).

b) Tunika Vaginalis Testis

Kapsülün en dış katmanıdır ve bazal membran üzerine oturan tek katlı mezotel hücrelerinden oluşur. Testisi çevreleyen bir visceral ve skrotumun iç yüzeyini örten bir parietal katman olmak üzere 2 katmandan oluşur. Bunların arasındaki seröz kanal şeklindeki boşluk, doğumdan sonraki birkaç yıl pelvis boşluğuyla ilişkilidir. Testisler bu inguinal kanaldan geçerek skrotuma inerler. Daha sonra bağlantı kapanır (Kierszenbaum 2006).

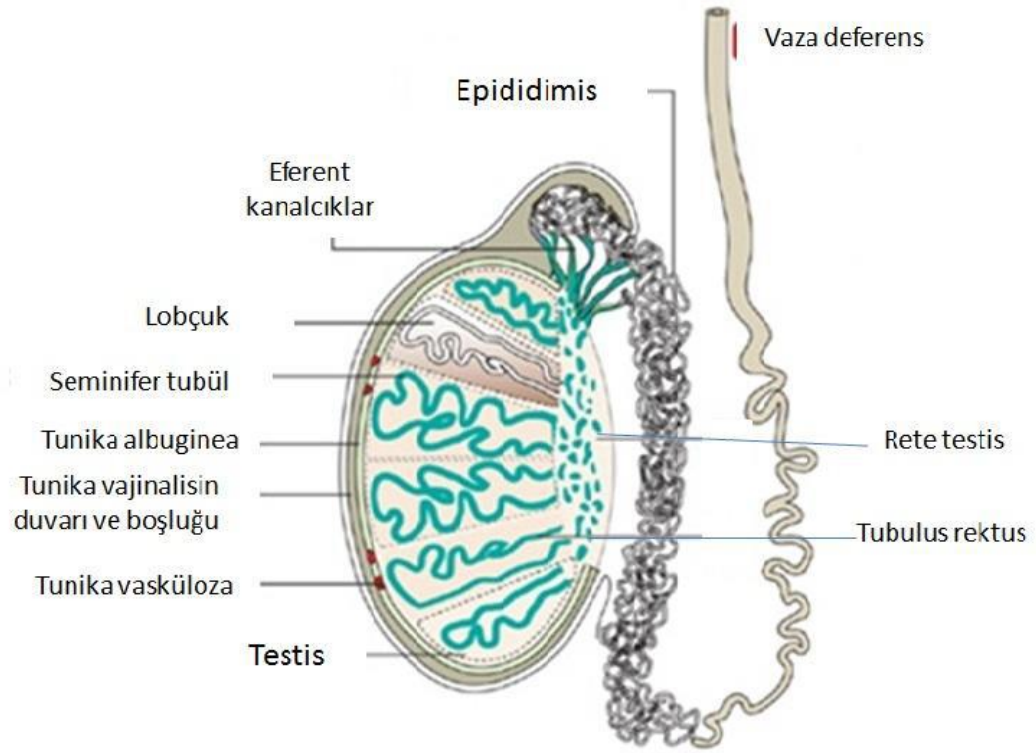
c) Tunika Albuginea

Tunika vaginalis testisin mezotel hücrelerinin oturduğu bazal laminanın altında bulunan bu katman, kapsülün en kalın katmanı olup, düz kas tellerinden zengin bir fibroelastik bağ dokusu yapısındadır. Kas telleri, testisin epididimise bakan posterior yüzünde daha yoğundur.

Testisin posterior yüzünde kalınlaşan tunika albuginea, testis içine septula testisler halinde bölmeler yollayarak mediastinum testis olarak adlandırılan ve stroma görevi yapan çatıyı oluşturur. Böylece her testis, 200-300 piramidal lopçuğa ayrılır. Her lopçukta sayıları 1-4 arasında tubulus seminiferus contortus (seminifer tübül) bulunur (Şekil 1.3) (Kierszenbaum 2006).

d) Tunika Vasküloza

İnce bir gevşek bağ dokusu içinde yayılmış kan damarı ağının oluşturduğu tunika vasküloza katmanı, testis kapsülünün en içteki katmanı'dır (Kierszenbaum 2006).



Şekil 1.3. Testisin borucuklar sistemi ve epididimis (Ahmetoğlu 2013).

Testisin Ara Dokusu (İnterstisyum)

Her testis lopçuğunun intertübüler (interstisyel) alanlarında kollagen iplikler, sinir telleri, kan ve lenf damarları, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, indiferensiye mezenşimal hücreler ve testosteron salgılayan Leydig hücreleri bulunur (Kierszenbaum 2006).

Leydig hücreleri tübüller arasındaki üçgen biçimli interstisyel alanlarda gruplar halinde lokalize olurlar (Şeki1 1.4). İnaktif durumdayken fibroblastlara çok benzerler. Leydig hücreleri steroid hormon salgılayan hücre yapısına sahiptir. Yağ damlacıklarından zengin olan sitoplazma, histolojik kesitlerde vakuolden yana da oldukça zengin görünür. Leydig hücreleri erken fötal dönemden itibaren (gebeliğin 5. ayı) testosteron salgılamaya başlayarak gonad gelişimini yönlendirirler (Kierszenbaum 2006).

Pubertiye girişle birlikte, Leydig hücreleri interstisyel hücreleri uyarıcı hormon (ICSH) yani lüteinizasyon hormonu (LH) uyarımıyla testosteron salgılamaya başlar. Testosteronun etkisiyle de sperm üretimi başlar, sekonder seks karakterleri gelişir ve eklenti bezleri salgı yapmaya başlar. Testosteron, erişkinlerde

erkeklik fonksiyonlarının devamı için mutlaka gerekli olan hormondur. Leydig hücrelerinden kaynaklanan benign tümörler erişkinlerde testislerin büyümesiyle belirginleşen jinekomasti ve feminizasyona yol açarken, çocuklarda erken buluğa girişle (puberte prekoks) sonuçlanır (Kierszenbaum 2006).

Testisin Paranşim Dokusu

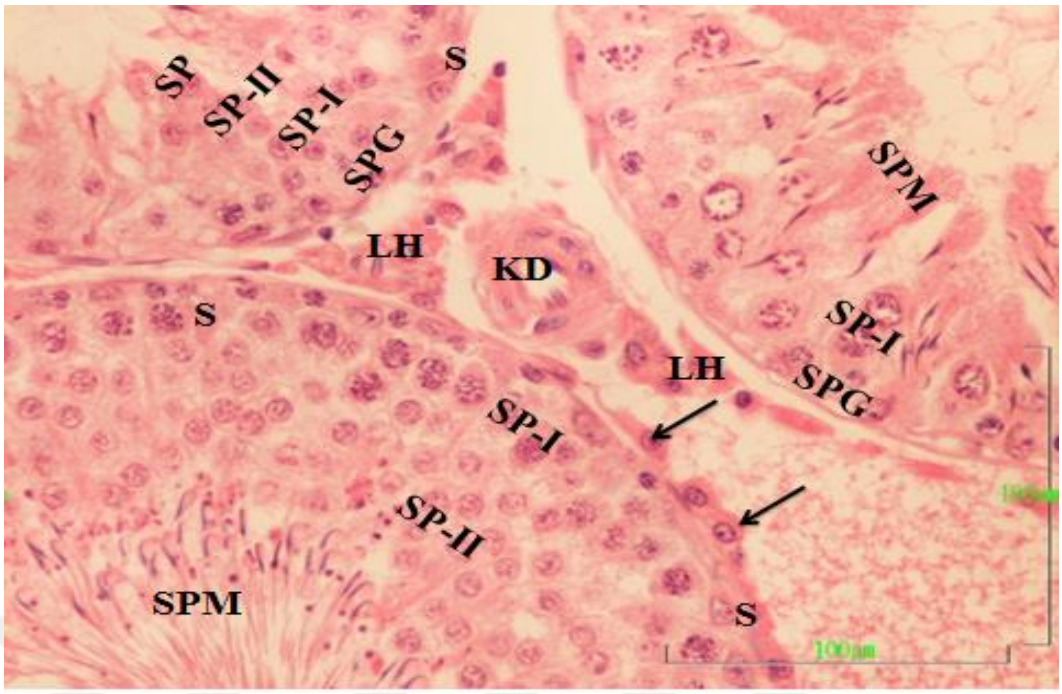
Herbir seminifer tübül, yaklaşık 150 μm çapa ve 80 cm uzunluğa sahip, bir ucu kapalı olan U biçimindeki tüpçüktür. Seminifer tübüllerde yapılan spermler ve bu tübüllerin proteinlerle iyonları içeren salgıları rete testise ilerler (Kierszenbaum 2006). Bir ucu kapalı olan seminifer tübüllerin diğer ucu düzleşerek posteriore doğru yönlenir ve tubulus rektus adını alır. Her tubulus rektus, testisin posteriorundaki rete testise açılır. Rete testis, anastomozlar oluşturan bir kanal sistemidir. Bunun apeks bölgesinden çıkan çok sayıdaki duktus eferentes birleşerek epididimisi meydana getiren duktus epididimidisleri oluşurur (Şekil 1.3). Kauda epididimisten çıkan sperma ileten borucuk duktus (vaza) deferenstir. Bu kanal ampulla ductus deferensi şekillendirdikten sonra eklenti bezlerinin salgılarını da alarak ürethranın pelvik bölümüne açılır (Kierszenbaum 2006).

Erişkin bir erkekte seminifer tübül duvarında; biri özelleşmiş spermatojenik hücre popülasyonu (spermatogonyumlar, spermatosit I ve II'ler ile spermatidler), diğeri de besleyici ve koruyuculuk görevi yapan Sertoli hücreleri olmak üzere iki farklı hücre tipi bulunur (Kierszenbaum 2006).

Sertoli Hücreleri

Vücuttaki besleyici ve koruyucu hücre grubundan (nursing cells) olan Sertoli hücreleri, prepübertal dönemdeki testisin seminifer tübül epiteli'nin dominant hücre tipidir. Pübertiye girişten sonra seminifer tübül duvarındaki hücrelerin yaklaşık %10'unu Sertoli hücreleri oluştururken; ileri yaştaki erkeklerde spermatojenik hücre popülasyonu azaldığından, bu hücreler tekrar dominant hale gelirler (Kierszenbaum 2006).

Bazal membrana oturan Sertoli hücreleri, lümene ve laterale doğru püskül tarzında sarkan hücre zarının oluşturduğu derin sitoplazmik invaginasyonlarıyla,



Şeki1 1.4. Testis kesitinde seminifer tübül duvarları ve interstisyel alanda kan damarı (KD), Leydig hücreleri (LH) görülmetedir. S, Sertoli hücresi; SPG, Spermatogonyumlar; SP-I, Primer spermatositler); SP-II, Sekonder spermatositler; SP, Spermatidler; L, Lümen ve SPM, Spermiyumlar; Oklar, Miyoid hücreler. Orijinal. HXE. Büyütme çizgisi: 100 µm.

gelişmekte olan spermatojenik hücrelere besin ve koruma desteği sağlarlar. Bu invaginasyonlar nedeniyle Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral yüzleri düzensiz seyreder (Kierszenbaum 2006).

Hücre, protein sentezi bakımından oldukça aktif olduğundan, üçgen ya da oval biçimli, çentikli, ökromatik iri bir nükleusa ve nükleusta yerleşen 7 adede kadar nükleolusa sahip olabilir. Sertoli hücrelerinin ayırt edilmesinde çekirdekteki nükleoluslar önemli rol oynar (Kierszenbaum 2006).

Sitoplazma, agranüler ve granüler endoplazmik retikulum, mitokondriyonlar, lizozomlar, lipid damlacıkları, yaygın bir Golgi aygıtı ve vimentin, aktin ve mikrotubuluslardan oluşan gelişmiş bir hücre iskeleti içerir. Sitoplazmada lipid damlacıkları oldukça boldur (Kierszenbaum 2006).

Her Sertoli hücresi, lateral yüzünde bazale yakın konumda lokalize olan zonula okludensler yardımıyla komşu Sertoli hücreleriyle sıkı sıkıya bağlanmıştır. Bu kopuntusuz zonula okludens, seminifer tübül duvarını, biri lümene komşu ve testosteron konsantrasyonu bakımından düşük adlüminal (intratübüler) ve diğeri

de bazal bölgede bulunan ve yüksek testosteron konsantrasyonuna sahip olan bazal (ekstratübüler) kompartmanlara böler. Bazal kompartmandaki yüksek testosteron düzeyi, Sertoli hücrelerinin bu bölgeye androjen bağlayıcı proteinleri (ABP) salgılamasıyla sağlanır. Böylece, bazal kompartmanda spermatogenezisin devamı için gerekli olan yüksek testosteron konsantrasyonu sağlanırken; bazal membranın da katkısıyla adlüminal kompartmandaki gelişmekte olan spermatosit ve spermatidlerin otoimmün reaksiyonlardan korunmasını sağlayan kan-testis bariyeri de oluşur (Kierszenbaum 2006).

Sertoli hücreleri pübertiden sonra mitozla çoğalmadığından, erişkinde bu hücrelerde mitoz bölünme gerçekleşmez (Kierszenbaum 2006).

Sertoli hücreleri spematogeneziste aşağıdaki hayati rolleri oynarlar;

- Gelişmekte olan spermatojenik seri hücrelerini desteklemek, korumak ve beslemek,

- Spermiyogenezisin sonunda spermatidler tarafından atılan rezidual (artık) cisimcikler olarak adlandırılan hücre artıklarını fagosite ederek ortadan kaldırmak,

- Olgun spermlerin, aktin-aracılı kasılmalarla seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak,

- Seminifer tübül lümenine protein ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamak,

- FSH uyarımına cevap olarak ABP sentezi ve sekresyonu yapmak. androjen bağlayıcı protein (ABP), testosteron ve di-hidrotestosteron andojenlerine yüksek bağlanma afinitesi olan bir salgısal proteindir,

- Sertoli hücreleri, inhibin ve aktivin alt ünitelerini (α ve β alt üniteleri) de salgılar. İnhibin, hipotalamustan ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve folikül uyarıcı hormon (FSH) üzerinde negatif feedback etkiye sahiptir. Aktivin ise FSH salınımı üzerinde pozitif feedback etki gösterir.

- Bazal yarımlarında oluşturdukları kopuntusuz zonula okludens hattı sayesinde bazal membranla birlikte kan-testis bariyerini şekillendirerek bir yandan

bazal kompartmanda spermatogenezisin devamı için gereken yüksek testosteron düzeyi sağlarken, aynı zamanda da spermatojenik seri hücrelerini vücudun savunma hücrelerinin otoimmün yanıtından korurlar.

- Embriyonik dönemde, fenotipik cinsiyetin belirlenmesi evresinde antimüllerian hormonu (MIF) salgılayarak, ovaryum gelişimini baskılar ve cinsiyet organı taslağının testis yönünde gelişmesini sağlarlar (Kierszenbaum 2006).

Testislerin Diğer Fonksiyonları

Bu organlar hücre salgılayan bir ekzokrin (sitojenik) bez olarak kabul edilebileceği gibi, testosteron, ABP ve inhibin salgıladığından endokrin bez olarak da dikkate alınır. Testosteron, spermatogenezisi kontrol etmesi yanında bireyin cinsel olgunlaşmasını, sekonder seks karakterlerinin ortaya çıkmasını, kas ve iskelet sisteminin gelişimini de etkiler. Leydig hücrelerini ön hipofiz hormonlarından ICSH kontrol ederken, Sertoli hücrelerini FSH hormonu kontrol eder. FSH etkisiyle Sertoli hücreleri ABP yaparak seminifer tübüllerin bazal kompartımanına salgılar. Burada testosteronu bağlayarak, spermatogenezisin devamı için gereken yüksek testosteron düzeyini oluşturur. Sertoli hücreleri, FSH ile negatif feedbackle etkileşen inhibin hormonunu da salgılar (Kierszenbaum 2006).

1.2. Spermatogenezis

Seminifer tübül duvarındaki spermatojenik seri hücreleri yâni germ hücreleri, 4-8 arasında hücre katmanı oluştururlar (Şekil 1.5). Spermatogonyumlardan başlayan spermatogenezis olayı, seminifer tübül lümenine düşen olgun spermlerin oluşumuyla sonlanır. Bununla birlikte, seminifer tübül lümenindeki spermler hala motilite kazanmamıştır ve bu yeteneği epididimis kanalcıklarında kazanırlar.

Puberta öncesinde seminifer tübül duvarındaki hücreler bazal membrana oturan spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleridir. Pubertaya girişle birlikte, hipofiz ön lobundan salınan FSH ve LH testiste önemli değişikliklere yol açar. FSH'ın uyarımıyla interstisyumdaki Leydig hücreleri testosteron salgılamaya

başlar ve bu hormon, Sertoli hücrelerinin, seminifer tübülün bazal kompartmanına salgıladığı ABP'ye bağlanarak buradaki konsantrasyonu artar ve spermatogenezis başlar. Testosteron aynı zamanda sekonder erkeklik belirtilerinin ortaya çıkmasına da yol açar. Pubertaya girişle birlikte, seminifer tübül duvarında diploid (44 otozom+XY gonozomları) kromozoma sahip olan spermatogonyumların 3 tipi bulunur (Kierszenbaum 2006):

1) Tip A Koyu Spermatogonyumlar: Rezerv hücre karakteri gösteren bu hücrelerin nükleusları oval ve heterokromatiktir. Bu hücreler mitozla çoğalır ve bir kısmı rezerv hücreler olarak kalırken, bir kısmı da tip A açık spermatogonyumlara dönüşür.

2) Tip-A Açık Spermatogonyumlar: Bu hücrelerin çekirdekleri, koyu tip-A spermatogonyumlarınki gibi oval biçimliyse de ökromatiktir.

3) Tip-B Spermatogonyumlar: Bu hücrelerin çekirdekleri yuvarlak ve heterokromatiktir.

Bazal membrana komşu durumdaki en alt katman hücreleri mitozla sürekli çoğalan spermatogonyumlardır. Artan hücre sayısı nedeniyle bazı hücreler lümene doğru itilir ve irileşirerek spermatosit-I'leri oluştururlar. Spermatosit-I'lerin oluşumunun tamamlandığı aşamaya kadarki spermatogenezis aşaması, spermatogonyum evresi (goniogenezis) olarak da bilinir. Spermatosit-I B'lerin mayoz bölünmeyi geçirerek haploid kromozomlu spermatidlerin oluştuğu evre spermatositogenezis evresidir. Spermatidlerin metamorfozis geçirerek spermlere dönüştükleri evre ise spermiogenezis evresidir (Kierszenbaum 2006).

Spermatogonyumların mitozla bölünmesiyle oluşan hücreler spermatosit-I'lere (primer spermatositler) transforme olur. Hücreler irileşerek bazal membrandan lümene doğru yer değiştirir. Bu hücreler seminifer tübül duvarındaki ikinci sırada yer alan iri hücrelerdir; seminifer tübülün ortasına yakın bir konumda lokalize olurlar. Primer spermatositler mayoz bölünmenin birinci aşamasını geçirerek, lümene daha yakın konumda lokalize olan küçük hücreler olan spermatosit-II'leri oluştururlar. Mayoz bölünmenin bu birinci aşamasında sentromer yarıklanması gerçekleşmediği ve 2 kromatidden oluşan homolog kromozomlardan biri hücrenin bir kutbuna, diğeri de diğer kutba çekildiğinden, bu

hücrelerdeki genetik madde 23 kromozomdan (22 otozom+1 gonozom) oluşur. Sitokinezis tamamlanmamış olduğundan, oluşan 2 spermatosit-II sitoplazmik köprülerle biribirine bağlıdır. Bu hücreler yeni bir DNA replikasyonu yapmadan, senkronize biçimde mayoz bölünmenin ikinci aşamasına girerler. Bu seferki genetik madde dağılımında sentromer yarıklanır ve her kromozomu oluşturan 2 kromatidden biri hücrenin bir kutbuna, diğeri de karşı kutba çekildiğinden, oluşan spermatidler interfaz aşamasındaki diploid spermatogonyum ve spermatosit-I'lerin yarısı kadar (haploid) genetik maddeye sahiptir. Mayozun ikinci aşamasından sonra bir spermatosit-I'den 4 adet haploid spermatid meydana gelir. Spermatidler seminifer tübülün lümenine komşu olan en içteki küçük hücrelerdir. Bu hücreler bölünmelerini tamamlayınca Sertoli hücre zarındaki invaginasyonlara girerek hücre zarına sıkıca tutunurlar. Oval yuvarlak biçimli küçük hücreler olan spermatidler spermiyogenezis olarak da isimlendirilen olay sırasında metamorfozis geçirerek morfolojik açıdan olgun spermlere dönüşürler ve spermiasyon denilen olayla seminifer tübül lümenine dökülürler (Kierszenbaum 2006).

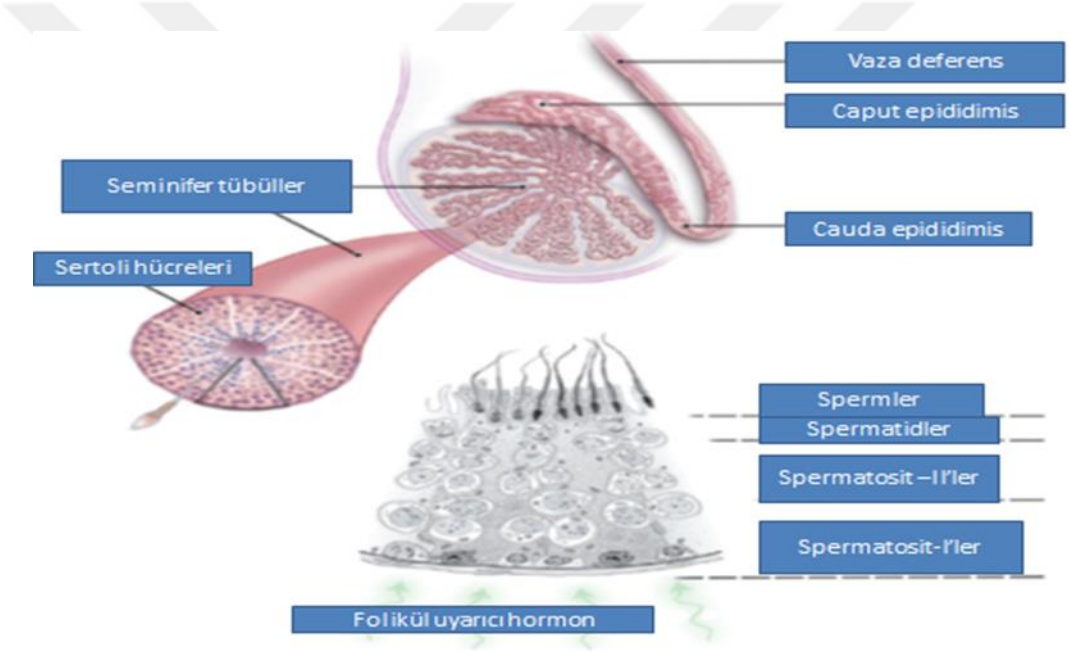
Spermiyogenezis 4 aşamada gerçekleşir (Kierszenbaum 2006). İlk üçü spermin baş bölgesindeki akrozomun gelişimiyle ilgili olan bu aşamalar;

1) **Golgi Evresi:** Golgi bölgesinde bulunan küçük veziküller kaynaşarak tek ve iri bir akrozomal vezikül oluşturur.

2) **Şapka Evresi:** Bu evrede akrozomal vezikül, hücre zarı altında çekirdeği ekvatoryal bölgeye kadar kuşatacak şekilde yassılaşarak şapka biçimini alır ve akrozoma dönüşür.

3) Uzama Evresi: Akrozom uzayarak başın ekvatoryal bölgesine kadar yayılır. Terzi yüzüğü biçimindeki akrozomu, dış ve iç akrozomal membranlar kuşatır. Golgi organeli kökenli olan akrozomda hidrolitik enzimlerden başlıca hyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri proteaz olan proakrozin gibi hidrolitik enzimler biriktirilir. Hücre çekirdeği kompaktlaşır ve akrozomdaki boşluğa oturarak spermin baş kısmı belirginleşir. Ön bölgede bu olaylar gerçekleşirken, sitoplazmanın arka bölümünde mitokondriyonlar annulus ve bazal sentriol arasındaki bölgeye geçerek helikal morfoloji kazanırlar.

4) Maturasyon Evresi: Bu evrede baş, orta parça ve kuyruktan oluşan spermin morfolojik oluşumu tamamlanır. Sitoplazma geriye doğru uzar ve sentriyollerden biri baş-orta parça arasına yerleşerek ön sentriyolü, diğeri de orta parça-kuyruk arasına yerleşerek, arka sentriyolü oluşturarak olgun spermin 3 bölümünün birbirlerine oynak biçimde bağlanmasını sağlar. Bu olaylar sırasında oluşan rezidüel cisimcikler atılır. Bu yapıları Sertoli hücreleri fagosite ederek sindirir. Orta parçadan itibaren 2X9+2 mikrotubulus tertiplenmesi kuyruğun pars principalis bölümünün sonuna kadar devam eder. Kuyruğun pars terminalisinde mikrotubulus bulunmaz. Henüz motilite yeteneği kazanmamış olan sperm, yolu boyunca önce epididimiste motilite, dişi genital kanalındaysa kapasitasyon yeteneği kazanır.



Şekil 1.5. Spermatogenezis (Samplaski ve ark 2010)

Semen (sperma)

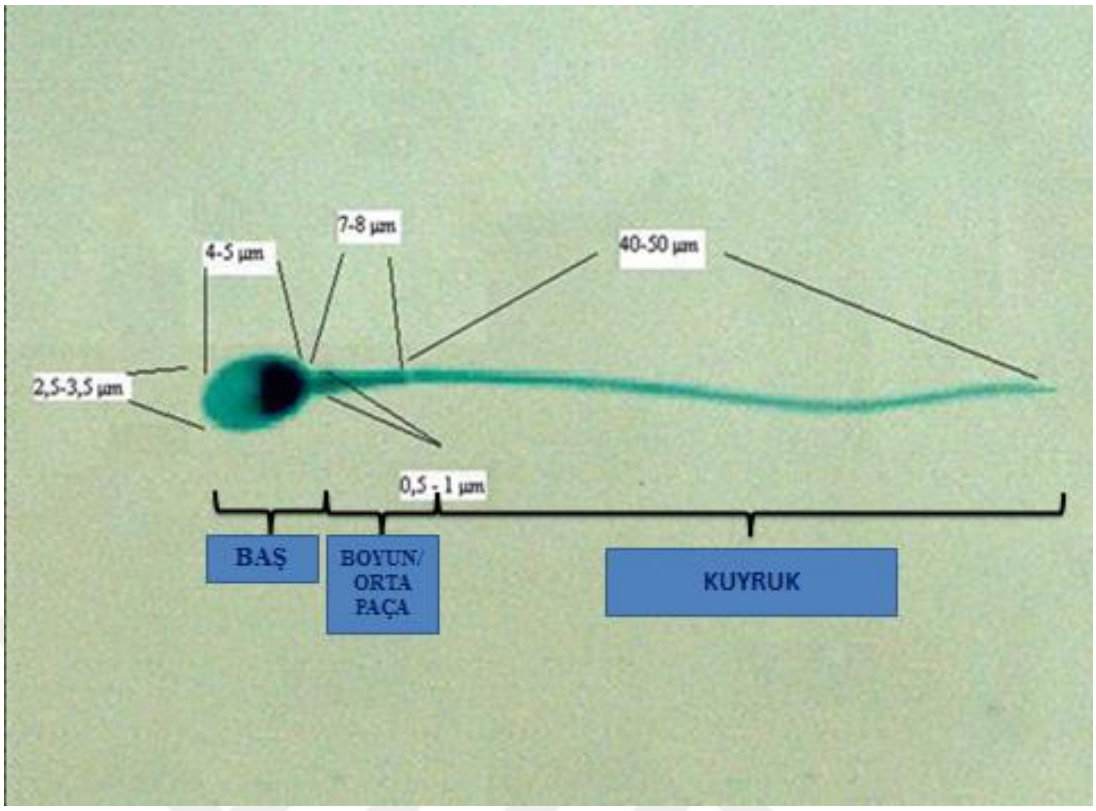
Semen, sperm hücrelerinden, testis ve epididimisin salgılarından, ejekülasyon sırasında içeriğe karışan prostat, seminal veziküller ve bulboüretral bezlerin salgılarından oluşan; viskozitesi yüksek ve pelte kıvamında bir sıvıdır (WHO 2002). Sperm hücreleri, semenin %2-5'ini oluşturur. İnsanda ejakülat miktarı kişisel farklılık göstermekle birlikte, 2-6 ml kadardır. Semenin pH'sı 7,2-8 arasında değişiklik gösterir. Ejekülasyondan sonra aglütine olan semen yaklaşık 20 dakika içinde likefiye olur (Gorus ve Pipeleers 1981, Visconti 1999).

Olgun Sperm

Altmış beş-yetmiş iki gün süren spermatogenezis sonunda spermiasyon olayıyla Sertoli hücrelerinden ayrılıp, seminifer tübül lümenine geçen spermler, morfolojik olarak olgun germ hücresi olmakla birlikte, fonksiyonel açıdan henüz olgun değildir. Metamorfozu tamamlanan sperm, flagellalı bir hücredir (Şekil 1.6). Hareket yeteneğini epididimiste, dölleme yeteneğini de dişi genital kanalında kapasitasyon geçirerek kazanır.

Sperm hücre zarı; diğer hücre zarları gibi fosfolipid omurga, bu omurgaya gömülmüş globüler proteinler ve bunların her ikisine bağlanan karbonhidrat moleküllerinden oluşur. Fosfolipidler membranın yapısal omurgasını oluşturmaları yanında zara yapısal kararlılık sağlarlar; kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve ovosit-sperm füzyonunda önemli rol alırlar. İnsan sperm membranı; yüksek oranda fosfotidil kolin, fosfotidil etanolamin ve sfingomiyelin içerir. Kolesterol de sperm membranının bütünlüğüne katkıda bulunur ve impermeabilitesini sağlar. Sperm membranında, mannoz ve glukoz gibi monosakkaridlerle disakkaridlerin yanında tirozin, triptofan ve histidin aminoasitlerini içeren proteinler de bulunur. Membranda ayrıca, spesifik antijenlerle, proakrozin, PH-20, PH-30, sp 56 ve galaktozil transferaz enzimi yanında progesteron reseptörleri, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimini sağlayan nonspesifik proteinlerle adezyon molekülleri de bulunmaktadır (Junqueira ve Carneiro 2009).

Normal yapıya sahip olan bir insan spermi üç bölümden oluşur. Bunlar; baş, boyun-orta parça ve kuyruktur.



Şekil 1.6. Normal spermin ışık mikroskobik görünümü (Kierszenbaum 2006).

Baş

Normal bir insan sperminin baş uzunluğu 4-5 µm, baş eni 2,5-3,5 µm, başın uzunluk/en oranı 1,50-1,75'tir (WHO 2002). Başın ön tarafında şapka biçimli ve çok sayıda hidrolitik enzim içeren akrozom yer alır. Akrozom, Napolyon şapkasına benzer ve nükleusun hemen hemen yarısını kaplar (Lens ve ark 1996). Anteriyor segment ve gamet füzyon bölgesi olan posteriyor (ekvatoryal) segment bölümlerine ayrılır. Anteriyor segmentte apikal ve prinsipal olmak üzere 2 saha ayırt edilir. Başın ön bölgesinde 4 zar bulunur. Bunlar; hücre zarı, dış (anteriyor) akrozom membranı, iç (posteriyor) akrozom membranı ve çift katlı çekirdek zarfıdır (Ito ve Toshimori 2016).

Akrozom; spermatogenezis sırasında Golgi kompleksinden gelişen ve hidrolitik enzimleri içeren özelleşmiş iri bir primer lizozom olarak kabul edilebilir. Gelişimi sırasında akrozomda fertilizasyonda görev yapan pekçok proteolitik enzim biriktirildiğinden, fertilizasyonda vazgeçilmez bir organeldir.

Yoğun kromatin içeren yassı sperm çekirdeği, akrozomun çukur bölgesinde yerleşmiş haldedir.

Baş bölgesini orta parçaya bağlayan boyun bölgesinden başlayan aksonem, kuyruk boyunca uzanırken, özellikle boyun bölgesinde, özelleşerek spiral morfoloji kazanmış olan mitokondriyonla çevrilidir (Hokin ve Hokin 1953, Ross ve Pawlina 2003, Gardner ve ark 2010).

Boyun-Orta Parça

Boyun bölgesinin son kısmında spermin hareketinde rol alan "annulus" adı verilen bir kalınlaşma yer alır. Orta parça, başa bir sentriyol vasıtasıyla oynak biçimde bağlanır. Benzeri bağlanma şekli orta parçayla kuyruk arasında da bulunur.

Orta parça, özelleşmiş spiral mitokondriyon sistemine sahip olduğundan, spermin enerji sistemi ve hareketinde merkezi bir rol oynar (Hokin ve Hokin 1953, Ross ve Pawlina 2003, Gardner ve ark 2010).

Kuyruk

Kuyruk aktif hareket yeteneğine sahip olan bir kamçı özelliği gösterir ve periferde ikişerli ve birbirine yapışmış halde 9 çift ve merkezde bir çift tam mikrotubulus bulunur. Kuyruğun hareketi, ışık mikroskobik incelemelerde bir düzlem içinde gerçekleşen çırpma hareketi şeklinde görülsede aslında koni kesiti hacimde gerçekleşen spiral darbeler halindedir.

Kuyruğun en uzun parçası olan esas parça, yedi adet dışta yerleşmiş olan yoğun lifle sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıf içerir. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıfta, spermin öne hareketi sırasında mikrotubulusların kayma ve kıvrılma hareketleri için gerekli olan sağlam bir iskelet oluşturan keratin proteinleri bulunur. Kuyruğun en kısa parçası olan son parça ise dış yoğun liflerin ve fibröz kılıfın sonlanması nedeniyle sadece aksonem içerir (Hokin ve Hokin 1953, Ross ve Pawlina 2003, Gardner ve ark 2010, Canbolat ve ark 2020).

1.3. Akrozomal Enzimler

Spermin baş bölgesinde akrozom dışındaki bölgelerde ve orta parçada da enzimatik reaksiyonlar gözlenmektedir. Bu enzimlerin görevleri hakkında yeterli

bilgi bulunmamaktadır. En iyi bilinen enzimler olan akrozomal enzimler, çoğu diğer somatik hücrelerin lizozomlarında da bulunan hidrolitik enzimlerdir (Bertalanffy ve Bickis 1956, Bishop ve Walton 1960, Allison ve Young 1969, Allison ve Hartree 1970). Akrozomal membranların geçirgenliği ve zarlardaki hasarın derecesine bağlı olarak akrozomal enzimler farklı oranlarda seminal plazmada da bulunurlar.

Ayrıca prostat bezinin de seminal plazma enzimlerinin önemli bir kısmını sentezlediği bilinmektedir.

Akrozomun içerdiği lizozomal hidrolitik enzimler, fertilizasyon sırasında kümülüs ooforus ve korona radiata hücrelerinin dağılmasını ve zona pellusidadaki hyaluronik asidin parçalanmasını sağlayarak, spermin oosit II'ye penetrasyonunu kolaylaştırdığından, fertilizasyonun başarısında çok büyük öneme sahiptirler. Akrozomal enzimlerin çoğunluğu asit hidrolaz grubu enzimler olmakla birlikte, nötral ve alkali ortamda aktivite gösteren enzimler de bulunur (Lens ve ark 1996).

Biyokimyasal yöntemlerle varlığı belirlenen akrozomal enzimler arasında α-mannozidaz, α-naftil asetat esteraz, aril amidaz, aril sülfataz A ve B, asit proteazlar, asit ve alkali fosfatazlar, aspartil amidaz, β-glukuronidaz, DNA-az, RNA-az, esterazlar, fosfolipaz-A, galaktozil transferaz, hidrolazlar, hyaluronidaz, katepsin D (proteaz benzeri), kollagenaz (peptidaz benzeri), matriks metalloproteinazlar (MMPs), N- asetil β-glukozaminidaz, N-asetil-β-galaktozaminidaz, nöraminidaz, proakrozin-akrozin ve tripsin en önemlileridir (Holt 1963, Allison ve Hartree 1970).

Hyaluronidaz

Akrozomda bulunan suda eriyebilir bir enzimdir. Akrozom reaksiyonunda ve penetrasyonda rol aldığından, fertilizasyonda hayati öneme sahiptir. Ejekülasyondan sonra seminal plazmaya da geçen bu enzim, spermi çevreleyen kümülüs ooforus ve korona radiata hücreleri arasındaki hyaluronik asidin yıkımlanarak bu katmanların ortadan kaldırılmasında önemli rol oynadığından akrozomdan ilk serbest bırakılan enzimdir (Allison ve Hartree 1969, Mc Rorie ve Williams 1974).

Proakrozin-Akrozin

Proakrozin, akrozinin inaktif formu olup; iç akrozom membranında lokalize olur. Tripsin benzeri proteazlardandır. Akrozom iç ortamındaki Ca^{+2} iyonu

konsantrasyonu artışı, proakrozinin akrozine dönüşümünü tetikler. Bu özelliğinden yararlanılarak, akrozin aktivitesinin tayininde spektrofotometrik ve jelâtinin sindirilmesine dayanan yöntemler geliştirilmiştir (Kennedy ve ark 1989). Akrozinin amino asit dizilimi, aynı enzim ailesindeki diğer serin proteazlardan olan kemotripsin, tripsin, plazminojen, kallikrein, trombin, testis serin proteazı-1 ve testis serin proteazı-2'nin amino asit dizilimiyle yüksek bir homoloji göstermektedir (Mc Rorie ve Williams 1974, Brener ve ark 2002).

Akrozin, spermin kapasitasyonu sırasında akrozomun ön yüzüne taşınarak spermin zona pellusidaya penetrasyonu esnasında daha etkin olmasını sağlar. Akrozinin sperm başının ön bölgesine doğru taşınması, akrozom reaksiyonunun başlatılmasını da tetikler. Bu enzim, akrozom reaksiyonunda ve spermin yumurta hücresine penetrasyonunda rol aldığından, fertilizasyonda hayati öneme sahiptir. Akrozin, aynı zamanda zona pellusidadaki karbonhidratlara bağlanarak akrozom reaksiyonu geçiren spermlerin zona pellusidaya tutunmasını güçlendirir. Zona pellusidanın yıkımında rol oynadığından, zona-lizin olarak da bilinir (Mc Rorie ve Williams 1974, Brener ve ark 2002).

Tripsin

Tripsin, pankreas tarafından salgılanan ve amino asitler arasındaki karboksil bölgelerini yıkımlayan proteolitik bir enzimdir. Arjinin ve lizin gibi temel amino asitlerin karboksil bölgelerini kestiğinden, hücre kültürü çalışmalarında sıklıkla kullanılır. Akrozomal tripsin de proteolitik etkisi sayesinde zona pellucidadaki glikoproteinleri parçalar (Allison ve Hartree 1969, Mc Rorie ve Williams 1974).

β-Galaktozidaz

İlk olarak spermatidlerde akrozom gelişimi esnasında ortaya çıkar ve proakrozoma geçer. Pubertiye girişten sonra miktarı artar. Glikoprotein ve proteoglikanların karbonhidrat (laktoz) kısımlarının parçalanmasını sağlar (Mc Rorie ve Williams 1974, Gulaya ve ark 2001).

N–Asetil-β-Glukozaminidaz

Aslında lizozomal bir enzimdir ve spermatogenezis sırasında ortaya çıkar. Akrozomda üç farklı izomeri bulunmaktadır (Mc Rorie ve Williams 1974).

Aminopeptidazlar

Amino asitler arasındaki peptit bağlarını yıkımlayarak proteinleri parçalayan bu enzimlerin, testis dokularında, 4 farklı fraksiyonu bulunmaktadır (Allison ve Hartree 1969, Mc Rorie ve Williams 1974).

β-Glukuronidaz

Bu enzim, glukuronid teşkiliyle suda daha fazla eriyebilen metabolitlerin oluşturulmasında rol oynadığından, esas olarak hücrenin detoksikasyon mekanizmalarında rol alır. β-glukuronidazın Sertoli hücrelerinde bulunduğu, histokimyasal yöntemle gösterilmiştir (Males ve Turkington 1971). Akrozomdaki rolü hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Bu enzimin genital salgılardaki aktivitesi, yeni doğan aşamadan tam olgunluğa doğru ilerledikçe beş kat azalma göstermektedir (Allison ve Hartree 1969, Günalp 2004).

Esterazlar

Esterazlar çok önemli lizozomal enzimlerden olup, ester gruplarını parçalarlar. Somatik hücrelerin lizozomlarında bulunan esterazların akrozomda da bulunması, akrozomal ve lizozomal enzimlerin bağlantısını ortaya koymaktadır. Mekanizması tam olarak aydınlatılmamışsa da zona pellusidanın yıkımlanmasında ve spermin zona pellusidayı geçişinde yardımcı olurlar. Bunlardan 5-bromo-4-kloroindoksil asetat esteraz, ilk defa Dalcq (1967) tarafından Yeni Gine domuzu spermatozoon akrozomunda gösterilmiştir. Allison ve Hartree (1970), bu enzimin sitokimyasal yöntemle demonstrasyonunda fikzasyon süresinin kısa tutulması gerektiğine işaret etmişlerdir (Allison ve Hartree 1969).

Hidrolaz ve Galaktozil Transferazlar

Hidrolazlar, değişik kimyasal bağların hidrolizini (yani bir hidroksil ya da su molekülü eklenmesini) gerçekleştirirler. Zona pellucidanın yıkımlanmasında ve spermin zona pellusidayı geçişinde yardımcı olurlar.

Galaktozil transferazlar, zona pellusida ve korona radiata hücreleri arasındaki glikoprotein ve proteoglikanların yıkımında rol alırlar (Allison ve Hartree 1969, Brener ve ark 2002).

Aril Sülfataz – A ve B

Döllenmede rolü olan, fakat fonksiyonları ve ince yapıları tam olarak anlaşılamamış olan enzimlerdir (Allison ve Hartree 1969).

Asit ve Alkali Fosfatazlar

Her ikisi de lizozomal enzimlerdir. Kemik metabolizmasındaki (asit fosfatazın kemiğin inorganik matriksinin eritilmesi sonucu serum Ca^{+2} iyonu konsantrasyonunun yükseltilmesi, alkali fosfatazın da bunun tam tersi olan) rolleri iyi bilinir. Fertilizasyondaki rolleri açık olmamakla birlikte, mikro ortamın Ca^{+2} iyon seviyesinin ayarlanmasında rol oynayabilirler (Allison ve Hartree 1969, Brener ve ark 2002).

ACP-az, asit hidrolazlar grubundan, spermatogenezisin son evresinde kazanılan bir enzimdir ve çeşitli fosfat esterlerinin hidrolizini katalize eder (Miteva ve ark 2010). Bu enzim prostat, kemik, kan hücreleri, dalak ve diğer organlarda yüksek konsantrasyonda bulunur. ACP-az'ın farklı izoenzimleri tanımlanmış olup, spermada bulunanların en önemlisi prostatik ACP-az'dır. Bu nedenle prostatın fonksiyonlarının araştırılmasında seminal plazmadaki ACP-az seviyesi belirlenir. Seminal plazmadaki ACP-az'ın asıl kaynağı prostat bezi salgıları olmakla birlikte; ACP-az enzimi, spermin proakrozom ve akrozomunda da bulunur (Canbolat ve ark 2020). İnsan akrozomundaki ACP-az aktivitesi hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır. Kapasitasyon sırasında akrozomdan ACP-az salınmamakta; bu enzimin salınması, spermin zona pellucidaya bağlandıktan sonra gerçekleşen akrozom reaksiyonu sırasında olmaktadır (Leventerler 2005, İlkan 2014).

Kemiğin mineralizasyonu ve bağırsak villuslarının emilim fonksiyonunda önemli rol alan ALP-az, seminal plazmada da bulunur (Patel ve ark 2013). İnsan ve hayvan seminal plazmasında bulunduğu bildirilen ALP-az, organik fosfatı alkali pH ortamında hidrolize eden bir enzimdir. Seminal plazmaya, tavşan ve köpekte epididimisten (Leventerler 2005, İlkan 2014) verildiği kabul edilmektedir. İnsandaysa; testis sıvıları, epididimis ve prostattan seminal plazmaya verildiği bilinmektedir (Brener ve ark 2002, Ahmetoğlu 2013; Coulibaly ve ark 2014). Seminal plazma ALP-az seviyesiyle spermanın sperm konsantrasyonu arasındaki bağıntı konusunda araştırıcılar arasında ortak görüş yoktur. Ayrıca, insan sperminin

akrozom ve baş bölgesinin ALP-az içeriği hakkında da yeterli bilgi yoktur (Leventerler 2005, İlkan 2014).

ALP-az'ın testiste 4 farklı izoenzimi bulunmaktadır. Tip II olanı akrozomda ve Sertoli hücresinde bol olup lizozomal aktivite gösterir. Spermatogenezisin son evresinde kazanılan bir enzimdir. Feritilizasyondaki rolleri açık olmamakla birlikte mikro ortamın Ca^{+2} iyon seviyesinin ayarlanmasında rol oynayabilirler (Allison ve Hartree 1969, Brener ve ark 2002).

α-Naftil Asetat Esteraz

ANAE lizozomal bir enzimdir ve pratikte pek çok hayvanın gerek doku ve gerekse perifer kan frotilerinde T-lenfosit, B-lenfosit ve monositlerin birbirlerinden ayırt edilmelerinde kullanılmaktadır (Çelik ve ark 1991, Ramadan ve ark 2012). ANAE, T-lenfosit olgunlaşmasının ileri aşamalarında kazanılan T lenfositlere özgü bir enzimdir (Basso ve ark 1980). Yapılan bir çalışmada (Cross 1998), sığır fötüslerinin perifer kanlarında ANAE pozitif lenfositlere gebeliğin 60. gününde rastlanmış, gebeliğin ilerlemesi ile birlikte pozitif lenfosit oranlarının da arttığı tespit edilmiştir. ANAE enziminin diğer esteraz grubu enzimler gibi aktive olan T-lenfositlerin sitotoksik fonksiyonları ile makrofajların fagosite ettikleri materyalleri parçalamalarında etkinlik gösterdiği düşünülmektedir (Çelik ve ark 1991). ANAE enzimi özellikle başta insan olmak üzere (Çelik ve ark 1992, Leventerler 2005.), sığır (Çelik ve ark 1991), tavuk (Moghissi 1984) ve farede (Moghissi 1984) T-lenfositlerin ayırımında yararlanılan bir enzimdir.

ANAE enziminin boğa spermatozoonlarının akrozomlarında varlığı sitokimyasal yöntemle gösterilmiş ve sperma dondurup-çözme işleminin akrozomal ANAE pozitivitesini zayıflattığından, bu enzim pozitivitesinin akrozomal membranın bütünlüğünün ve sonuç olarak spermanın kalitesinin değerlendirilmesinde yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür (Canbolat ve ark 2020).

Her ne kadar sperm kalitesinin belirlenmesinde sitolojik analizler hala önemli yer tutmaktaysa da seminal plazmanın biyokimyasal analizi de önemli ipuçları verebilir. Özellikle bu sıvının enzimatik içeriği önemlidir. Zira bu sıvıdaki enzimler testisin sperm üreten ve ileten kanacıklarıyla eklenti bezleri kökenli olsa da akrozomdan da kaynaklanabilir. Bu yüzden, spermin akrozomal enzimlerinin

seminal plazmaya sızması, akrozom ve spermin membran bütünlüğü hakkında önemli bilgiler sağlayabilir. Spermin baş kısmındaki ve özellikle akrozomdaki enzimlerin sitokimyasal analizi, sperm kalitesinin değerlendirilmesinde önemli bulgular sağlayabilir.

1.4. Spermatogenezisi Etkileyen Önemli Faktörler

1. Çevre Sıcaklığı

Spermatogenezisin düzenli bir şekilde gerçekleşmesi için gerekli olan en uygun sıcaklık, 35°C civarındandır ve testislerin termoregülasyonu, musculus cremasterin sıcaklık artınca uzaması ve spermatik arterle onu saran venaların oluşturduğu pleksus pampiniformisler arasındaki ısı değişimi yoluyla skrotumda gerçekleşir. Bu olayda ters akım prensibi iş görür. Bu prensibe göre arteriya spermaticadaki kanla, nispeten daha soğuk olan pleksus pampiniformislerdeki kan ters yönde akarken, bu damarlar arasında ısıyı ileten ara doku tarafından ısı alış-verişi gerçekleşir ve testise giren kanın 35°C civarında tutulması sağlanır. Musculus cremasterin sıcaklık artınca uzaması da testislerin sarkarak vücuttan uzaklaşmasını sağlar (Doğantekin ve Özcan 2016).

2. Varikosel

Varikosel terimi (Curling varikoseli), ilk defa 1846 yılında Thomas Blizard Curling tarafından, 1843 yılında araştırıcının karşılaştığı bir vakanın takdiminde kullanılmış olup, pleksus pampiniformisi oluşturan damarların aşırı dilatasyonunu ifade etmektedir. Yüzyıllardır bilinen hastalığın fizyopatolojisi henüz aydınlatılamamıştır. Bu tabloda funiculus spermaticustaki pleksus pampiniformis venalarında dilatasyon, staz ve yüksek basınç tipiktir (Raifer 1998). Bu durumun nedenleri çok farklı olabilirse de en yaygın tablo primer nedenler, yani pleksus pampiniformisteki venalarla ilgilidir.

Varikosel, erişkin erkek popülasyonunun yaklaşık %15-22'sinde görülür (Oğuz 2007). İnfertilite sorunlarının ortalama %30-40'ı varikosel kaynaklıdır (Oğuz 2007). Sperm analizi sonuçları normal olmayan erkeklerde varikosel oranı %25 kadardır (Turner 2001, Oğuz 2007). Normal semene sahip olan erkeklerde bile varikosel oranının %11,7 olduğu ifade edilmektedir (Oğuz 2007). Sekonder

infertilite vaklarında varikosel oranı oldukça yüksek olup %69-81'e ulaşmaktadır (Jefferson 2000). İlginç bir şekilde, varikoselli erkeklerin %80'inde infertilite sorunu görülmemektedir (Oğuz 2007).

Varikosel çok erken yaşlarda dahi gelişebilmektedir (Kadıoğlu ve Köksal1998). Varikoselli erkeklerin birinci derece akrabalarında hastalığın görülme sıklığının %53 gibi yüksek bir orana ulaşması, hastalığın genetik temelinin olabileceğini akla getirmektedir (Doğan 2011). Varikosel'in etiyolojisinde anatomik yapı özellikleri, venalardaki konjenital ya da sonradan ortaya çıkan valvula hasarları sonucu gelişen venöz reflü ve venöz obstrüksiyon önemli rol oynar (Shafik ve ark 1990). Varikosel'e, sol testiste daha sık (%90) rastlanmaktadır. Varikosel, progresif yani zamanla artan testis hasarına yol açtığından (Nagler ve ark 1997), testis gelişiminde gerileme, spermatogeneziste hasar ve en sonunda da infertiliteyle sonuçlanabilmektedir. Genişlemiş damarların ligasyonu, testis fonksiyonlarını büyük oranda düzelttiğinden, operasyon sonrası vakaların %80'inde sperm sayısı ve kalitesi düzelmektedir.

3. Sigara Kullanımı

Sigara içmenin sperm morfolojisi yanında, sperm sayısı ve motilitesi üzerinde de olumsuz etkileri vardır. Sperm sayısı ve motilitesi, erkeklerde fertiliteyi belirleyen en önemli faktörlerden olduğundan, bu iki faktörün bozulması, erkek fertilitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Gaur ve ark 2007, Doğantekin ve Özcan 2016).

Sigara dumanında, mutajenik ve karsinojenik olabileceği düşünülen 4000 kadar toksik madde bulunmaktadır. Bunların en önemlisi nikotindir. Sigara dumanında ayrıca aseton, arsenik ve kadmiyum gibi maddeler de bulunabilir. Gaur ve ark. (2007), sigara içen ve içmeyen infertil erkeklerin sperm kalitesini karşılaştırdıklarında sigara içmeyenlerde normospermi oranının %39 olduğu halde, sigara içenlerde bu oranın %3'e düştüğünü tespit etmişlerdir. Günde 20 adetten fazla sigara içen ağır içicilerde sperma hacmi, sperm sayısı ve sperm motilitesi düşmekte, anormal sperm oranı ise artmaktadır. Özellikle, sperm motilitesi en fazla etkilenen parametredir. Sigara içmenin motilite üzerinde baskın olumsuz etkisinin olması, bu kişilerin yardımcı üreme teknikleriyle dahi çocuk sahibi olmalarına engel

teşkil eder. ICSI için sperm seçiminde de motil spermler tercih edilmekte, ejakülatta motil sperm bulunamazsa testiküler sperm ekstraksiyonunda (TESE) motil sperm aranmakta, bunda da başarılı olunamazsa ejakülattaki immotil spermler kullanılmaktadır (Turner 2001).

Sigara içmenin sperm morfolojisini bozduğu ve özellikle baş bölgesi anomalilerine neden olduğu iyi bilinmektedir. Hâlbuki gerek normal gebelik ve gerekse de yardımcı üreme tekniklerinde normal sperm oranının %4'ten yüksek olması gerekmektedir (WHO 2010).

Sigara içenlerin spermlerinde DNA fragmantasyonu ve anöploidi oranı artmaktadır. Bu durum, yardımcı üreme tekniklerinin başarısını düşürmesi yanında konjenital malformasyon oranını da artırmaktadır. Sigara içmenin, sonraki nesillerin üreme fonksiyonları üzerinde bile olumsuz etkilerinin olabileceğini gösteren bulgular vardır (Travis ve Kopf 2002, Sadler 2010).

Varikoseli olan olgularda sigara içiminin tek başına sigara içimine göre daha fazla spermatogenezi etkileyeceği bildirilmiştir (Klaiber ve ark 1987). Varikoselli hastalarda testiküler geri akımın olduğu venlerden alınan kandaki kateşolamin düzeyinin periferik venden alınan kandaki kateşolamin düzeyinden 3 kat, varikoselsiz hastalarda ise 1,5 kat daha fazla olduğu ortaya konmuştur. Venlerdeki bu artmış katekolamin karşı akım sistemi yolu ile pleksus pampiniformis düzeyinde testiküler arterlere geçerek arterlerdeki noradrenalin düzeyini arttırmakta ve arteriyorlerde buna bağlı oluşan vazokonstrüksiyon testiküler hipoksiye katkıda bulunmaktadır (Cohen ve ark 1975).

Bu çalışmada; sigara içmeyen varikosel ameliyatsız, sigara içmeyen varikosel ameliyatlı, sigara içen varikosel ameliyatsız ve sigara içen varikosel ameliyatlı üreme çağındaki erkeklerden alınan semen örneklerinde akrozomal enzimlerden olan ANAE, ALP-az ve ACP-az enzimlerinin sitokimyasal yöntemlerle demonstre edilerek gruplar arasındaki farkların belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Ünitesi Androloji Laboratuvarı'na başvuran 21-45 yaş aralığındaki sigara kullanan veya kullanmayan, diyabet, hipertansiyon ve romatizma gibi kronik rahatsızlığı olmayan, varikosel operasyonu geçirmiş veya geçirmemiş, ciddi ürolojik enfeksiyonu ve inmemiş testis tıbbi hikâyesi olmayan toplam 42 erkekten alınan semen örneğinden hazırlanan frotiler materyal olarak kullanılmıştır.

Semen örnekleri, her enzim için; sigara içmeyen ve varikoseli bulunmayan grup, sigara içmeyen ve varikosel ameliyatsız grup, sigara içmeyen ve varikosel ameliyatlı grup, sigara içen ve varikosel ameliyatsız grup, sigara içen ve varikosel ameliyatlı grup olmak üzere 5 farklı gruba ayrılmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Çalışmada oluşturulan gruplar.

Gruplar	**Semen alınan kişilerin özellikleri**
Sigara içmeyen-varikoselsiz N=7	Sigara içmeyen-varikoselsiz sağlıklı erkek bireyler
Sigara içmeyen-varikoselli **N=8**	Sigara içmeyen-varikoselli erkek bireyler
Sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı **N=8**	Sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı erkek bireyler
Sigara içen-varikoselli **N=10**	Sigara içen-varikoselli erkek bireyler
Sigara içen-varikosel ameliyatlı **N=9**	Sigara içen-varikosel ameliyatlı erkek bireyler

2.1. Örneklerin Toplanması ve Değerlendirilmesi

Materyal temini için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Uygulamalar Etik Kurulu'ndan gerekli izin (07.06.2017 tarihli 2017/11 nolu izin, bkz. EK-A) alınmıştır. Çalışmaya katılan her hasta için bilgilendirilmiş onam formu ile gerekli izinler alınmıştır (bkz. EK-B). İnfertilite kriterlerine uyan ancak,

mikroskopik yöntemle incelendikten sonra azospermik olarak değerlendirilen semen örnekleri araştırma dışında bırakılmıştır. Semen örnekleri en az üç günlük cinsel perhiz sonrasında, steril kaplara mastürbasyon yöntemiyle alınmıştır. Alınan semen örneklerinin makroskobik incelemesinin yapılması amacıyla, örnekler 15-60 dakika 37°C'lik etüvde likefiye edilmiştir. Her semen örneğinin vizkozitesi, görünümü, hacmi ve pH'sı değerlendirildikten sonra, ışık mikroskobunda X20'lik objektifle incelenerek, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO 2010) kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir (WHO 2010). Morfolojik değerlendirme için hazırlanan yayma preparatlar oda sıcaklığında (22°C) havada kurutulduktan sonra Spermac (Minitube) boyasıyla boyanarak ve WHO 2010 kriterlerine göre semen kalitesi belirlenmiştir.

2.2. Sperm Yıkama

Bu amaçla, 1 ml taze semen örneğine, 9 ml fosfat tamponu (PBS, 0,1 M, pH: 7,4) eklenerek 800XG'de oda sıcaklığında (22 ℃) 8 dakika santrifüje edildi. Santrifüj sonunda üst kısım atıldı, dipteki sperm peletinin üzerine 10 ml'ye tamamlayacak şekilde tekrar PBS eklenerek, 800XG'de oda sıcaklığında 8 dakika santrifüje edildi. Üst kısım atıldı ve alttaki sperm peleti 2 ml PBS'le sulandırılarak, yayma preparatlar hazırlandı ve havada kurutuldu. Kurutulan bu frotiler, enzim sitokimyasal işlemlerde kullanıldı.

2.3. Enzim Sitokimyasal Çalışmalar

Daha önceden havada kurutularak hazırlanan sperma frotileri ANAE, ALP-az ve ACP-az enzimlerinin sitokimyasal demontrasyonu amacıyla aşağıdaki işlemlere tabi tutuldu.

2.3.1. ANAE Aktivitesinin Sitokimyasal Yöntemle Belirlenmesi

ANAE aktivitesinin demonstre edileceği sperma frotileri, -10°C'de glutaraldehid-aseton solüsyonunda (pH 4,8) 5 dakika süreyle tespiti takiben, üç kez distile suyla yıkandı. ANAE'nin demonstrasyonunda kullanılan inkübasyon solüsyonu, Çelik ve ark'na (1994) göre hazırlandı. Bu amaçla pH'sı 5,0 olan tamponlu fosfat solüsyonunun 80 ml'sine 0,8 ml asetonda eritilen 20 mg substrat (alpha-naphthyl acetate, Sigma) yavaş yavaş damlatıldı. Ardından 4,8 ml hekzazotize edilmiş pararozanilin karışımı, substrat içeren tamponlu fosfat solüsyonuna eklendi. Hazırlanan solüsyonun pH'sı, 1N NaOH solüsyonu ile 5,8'e ayarlandıktan sonra

süzüldü. Bu inkübasyon solüsyonu içerisinde, önceden havada kurutulmuş olan semen frotileri 37ºC'de 60 dakika süreyle kontrollü bir şekilde bekletildi. Spermde kırmızı-kahverengi renkli reaksiyon ürününün şekillenmesinin ardından inkübasyon işlemi sona erdirildi ve 3 kez distile suyla yıkananan preparatlara %2'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı (Maiti ve ark 1990). Preparatlar sentetik resin kullanılarak lamelle kapatıldı.

2.3.2. ACP-az Aktivitesinin Sitokimyasal Yöntemle Belirlenmesi

ACP-az'ın demonstre edileceği sperma frotileri 10 ml metil alkol, 60 ml aseton, 30 ml distile su ve 630 mg sitrik asitten oluşan ve pH'sı 1M NaOH ile 5,4'e ayarlanan tespit sıvısında -10ºC'de 5 dakika süreyle tespit edildi. Tespiti takiben üç kez distile suyla yıkanan frotiler, havada kurutuldu. Enzimin demonstrasyonunda inkübasyon solüsyonu olarak pH'sı 5,0 olan Michael'in Veronal-asetat tampon solüsyonu ve substrat olarak 1 ml N,N-dimetil formamid içerisinde çözdürülmüş olan 10 mg naftol AS-BI fosfat (Sigma) kullanıldı. Tampon solüsyonunun 5 ml'sine ilave edilen 1 ml substrat solüsyonu, 13 ml distile su ile karıştırıldıktan sonra 0,8 ml hekzazotize edilmiş (0,4 ml pararozanilin, 0,4 ml %4'lük sodyum nitrit) pararozanilin solüsyonu eklendi. Karışımın son pH'sı, 1N NaOH solüsyonu ile 5,0'e ayarlandıktan sonra süzüldü. Hazırlanan bu inkübasyon solüsyonunda sperma frotileri oda sıcaklığında 1 saat kontrollü bir şekilde bekletildi. İnkübasyon sonunda 3'er kez distile suyla yıkanan preparatlara, asetat tamponunda (pH 4,8) hazırlanmış olan %2'lik methyl-greenle çekirdek boyası uygulandı (Barka ve Anderson 1962). Hazırlanan preparatlar Kaiser jelâtini kullanılarak lamelle kapatıldı.

2.3.3. ALP-az Aktivitesinin Sitokimyasal Yöntemle Belirlenmesi

ALP-az aktivitesi, Lojda ve ark'na (1979) göre simultane azo-coupling metoduyla demonstre edildi. Bu amaçla, sperma frotileri buzdolabında formal-kalsiyum tespit solüsyonunda 5 dakika süreyle tespiti takiben, üç kez distile suyla yıkandı. İçinde, 30 mg Naphtol AS-BI fosfat (Sigma) çözdürülmüş olan 0,5 ml N,N-dimetil formamid, 0,3M Tris tamponuyla (pH 9) karışımın hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Bu karışıma 300 ml distile su ve 180 ml 0,2M Tris-HCl tamponu (pH 8,3) ilave edilerek Naphtol AS-BI stok solüsyonu hazırlandı. İnkübasyon solüsyonuysa, 10ml Naftol AS-BI (Sigma) stok solüsyonunda 10 mg Fast Red TR (Sigma) ilave edilerek çözdürülmesiyle elde edildi. İnkübasyon işlemi, sperma frotilerinin inkübasyon solüsyonunda oda sıcaklığında kontrollü biçimde 10-15

dakika süreyle bekletilmesiyle gerçekleştirildi. Pembe-kırmızı reaksiyon ürünü şekillendiğinde inkübasyon sonlandırılarak frotiler 3'er kez distile suyla yıkandı. Frotilere asetat tamponunda (pH 4,8) hazırlanmış olan %2'lik methyl-green ile çekirdek boyası uygulandı. Hazırlanan preparatlar Kaiser jelâtini kullanılarak lamelle kapatıldı.

Her enzimin demonstrasyonuyla hazırlanan preparatlar dijital kameralı ışık mikroskobuyla (Nikon Eclipse, E-400 equipped with Nikon DS-5M DS5 Camera Head and DS-L1 Control Unit) incelendi ve gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi. Görüntülerde, her enzim için pozitif reaksiyon veren sperm oranı belirlenerek elde edilen değer yüzde (%) olarak ifade edildi. Dijital görüntüler üzerinde dijital görüntü analiz programıyla (BS200 PRO, 2005) renk yoğunluğu analiz edildi. Elde edilen sayısal veriler normal dağılım göstermediğinden, veriler Kruskal Wallis testiyle analiz edilmiş; grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem derecesini belirlemek için ise Mann Whitney U-testi uygulanmıştır. $P \leq 0,05$ değeri önemli kabul edilmiştir.

3. BULGULAR

Semen örnekleri ışık mikrokobuyla incelenerek her grubun ortalama sperm konsantrasyonu (sperm saysı/ml) ve motilitesi (hareketli sperm %'si) belirlendi.

3.1. Grupların Semen Analizi Bulguları

Sigara içmeyen-varikoselsiz grubun yaş ortalaması 36 olup, yaş aralığı 28-55 idi. Sigara içmeyen-varikosel ameliyatsız grubun yaş ortalaması 37, yaş aralığı ise 19-42 idi. Sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grubun yaş ortalaması 29.62, yaş aralığı 24-37 arasında değişmekteydi. Sigara içen-varikosel ameliyatsız grupta yaş ortalaması 25,9 ve yaş aralığı 18-35 olarak bulundu. Sigara içen-varikosel ameliyatlı grubun yaş ortalaması 31,33 ve yaş aralığıysa 23-38 arasında değişmekteydi (Tablo 3.1.1).

Sperm konsantrasyonu, sigara içmeyen-varikoselsiz grupta en yüksek seviyedeyken ($72,87x10^6$ hücre/ml), sigara içimi ve varikosel birlikte bulunduğunda sperm konsantrasyonu önemli derecede düşmektedir (sigara içen-varikoselli grupta en düşük seviyededir, $31,88x10^6$ hücre/ml). Tek başına varikosel bulunması da sperm konsantrasyonunda belirgin düşüşe neden olmaktadır (sigara içmeyen-varikoselli grupta sperm konsantrasyonu $52,37x10^6$ hücre/ml). Varikosel ameliyatı sperm konsantrasyonunda belirgin artışla sonuçlanmakla (sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grubun sperm konsantrasyonu $60,28x10^6$ hücre/ml'dir) birlikte; sigara içimi varikosel ameliyatının olumlu etkisini azaltmaktadır (sigara içen-varikosel ameliyatlı grubun sperm konsantrasyonu $41.00x10^6$ hücre/ml'dir, Tablo 3.1.1).

Sigara içmeyen-varikoselsiz grubun motilitesi en yüksek (%66,71) değere sahiptir. Varikosel motiliteyi belirgin biçimde düşürmektedir (sigara içmeyen-varikosel ameliyatsız grupta motilite %59,25 olarak bulunmuştur). Varikosel ameliyatı sperm motilitesini belirgin biçimde yükseltmekte (sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grupta %64), sigara içmenin devam etmesi varikosel ameliyatının etkinliğini azaltmaktadır (sigara içen-varikosel ameliyatlı grubun sperm motilitesi %56,33'tür (Tablo 3.1.1).

Enzim sitokimyasal yöntemle boyanan frotilerin ışık mikroskobik incelemesinde, her enzimin pozitivite oranı ve paterni belirlendi. Grupların enzim

pozitivite oranları normal dağılım göstermediğinden, elde edilen sayısal veriler, Kruskal Wallis testiyle analiz edildi.

Tablo 3.1.1. Grupların semen örneklerinin morfolojik analiz sonuçları.

Gruplar	**Sıra Ortalaması**	**Yaş ortalaması (Yıl)**	**Sperm konsantrasyonu (x10^6 hücre/ml)**	**Sperm motilitesi (%)**
Sigara içmeyen-varikoselsiz N=7	38	36,00 (28-55)	72,87 (65-100)	66,71 (62-70)
Sigara içmeyen-varikoselli N=8	12.06	37,00 (19-42)	52,37 (16-82)	59,25 (60-79)
Sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı N=8	26	29,62 (24-37)	60,28 (20-80)	64 (25-78)
Sigara içen-varikoselli N=10	4	25,9 (18-35)	31,88 (15-65)	46,70 (60-74)
Sigara içen-varikosel ameliyatlı N=9	23,5	31,33 (23-38)	41,00 (20-80)	56,33 (50-75)

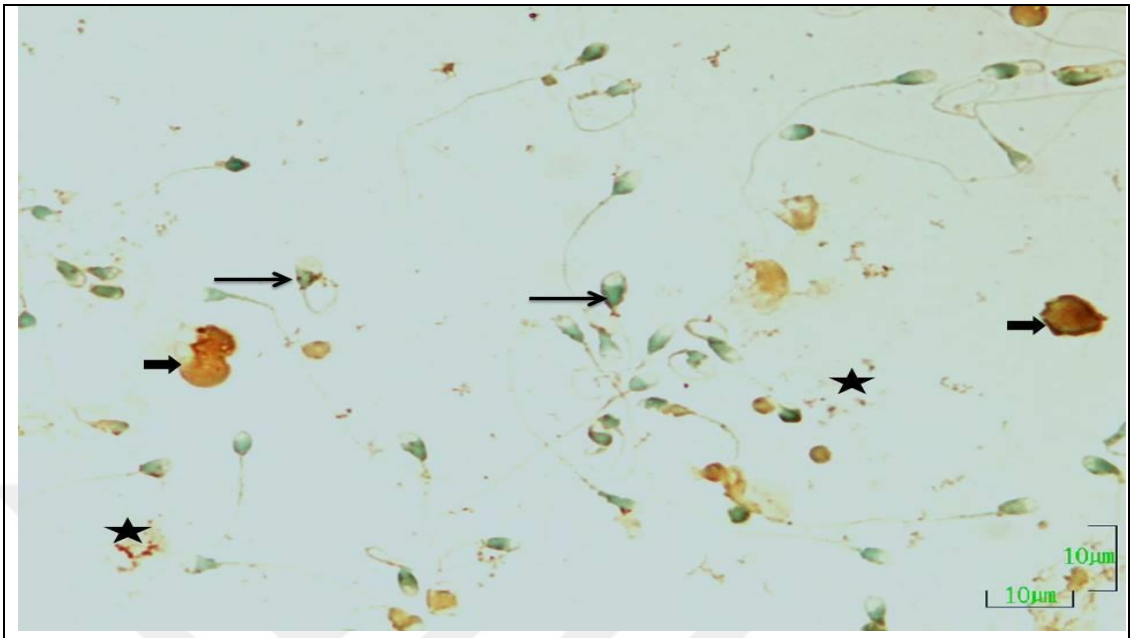
3.2. Enzim Sitokimyasal Sonuçlar

3.2.1. Enzim Pozitivitelerinin Morfolojik Açıdan Değerlendirilmesi

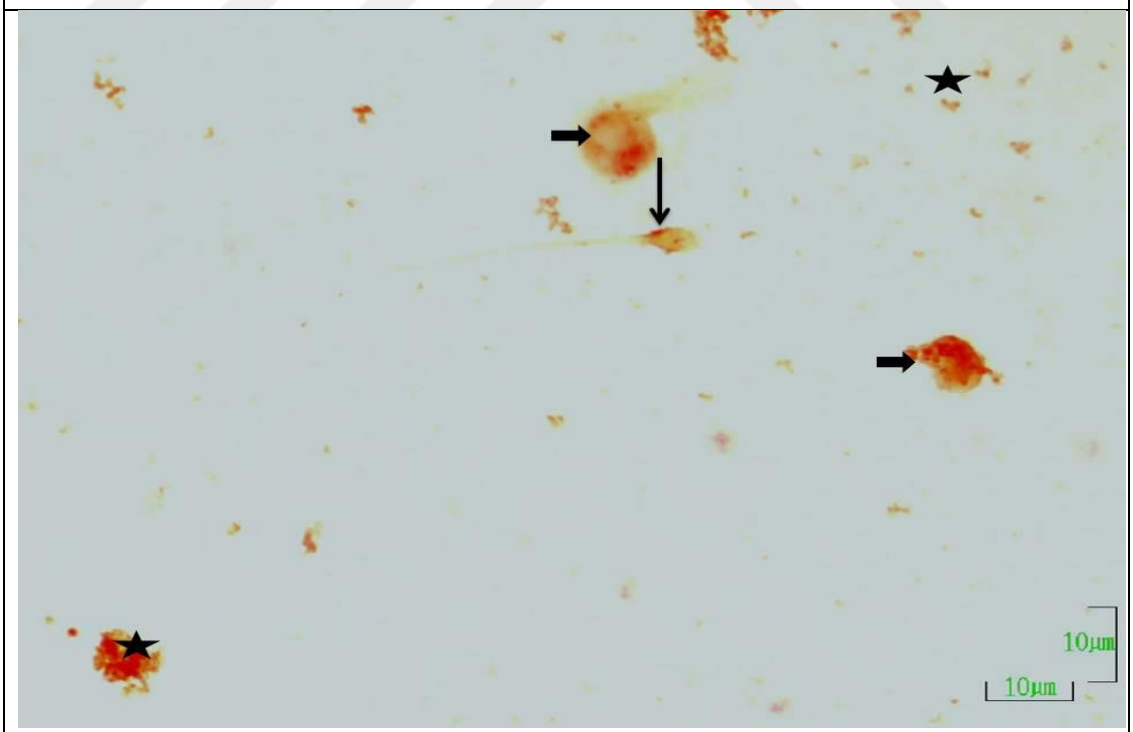
3.2.1.1. ANAE Enzimi Bulguları

ANAE enzimi pozitivitesi, başlıca spermin baş bölgesinde, ekvatorun gerisinde ve orta parçaya yakın yerleşen granüller (Şekil 3.2.1.1.1) ya da bölge zarına komşu konumda lokalize olan, kırmızımsı-kahverengi renkli granüller veya bantlar halinde (Şekil 3.2.1.1.2 ve 3.1.1.3), nadiren de orta parçada lokalize olan bantlar halinde (Şekil 3.2.1.1.4) gözlendi. Semende bulunan mononükleer somatik hücrelerde de güçlü granüler ve diffüz pozitivite tespit edildi (Şekil 3.2.1.1.1 ve Şekil 3.2.1.1.2). Semen damlacıkları da güçlü ANAE pozitivitesi vermekteydi (Şekil 3.2.1.1.1, Şekil 3.2.1.1.2 ve Şekil 3.2.1.1.4). ANAE enzimi reaksiyon ürünü olan

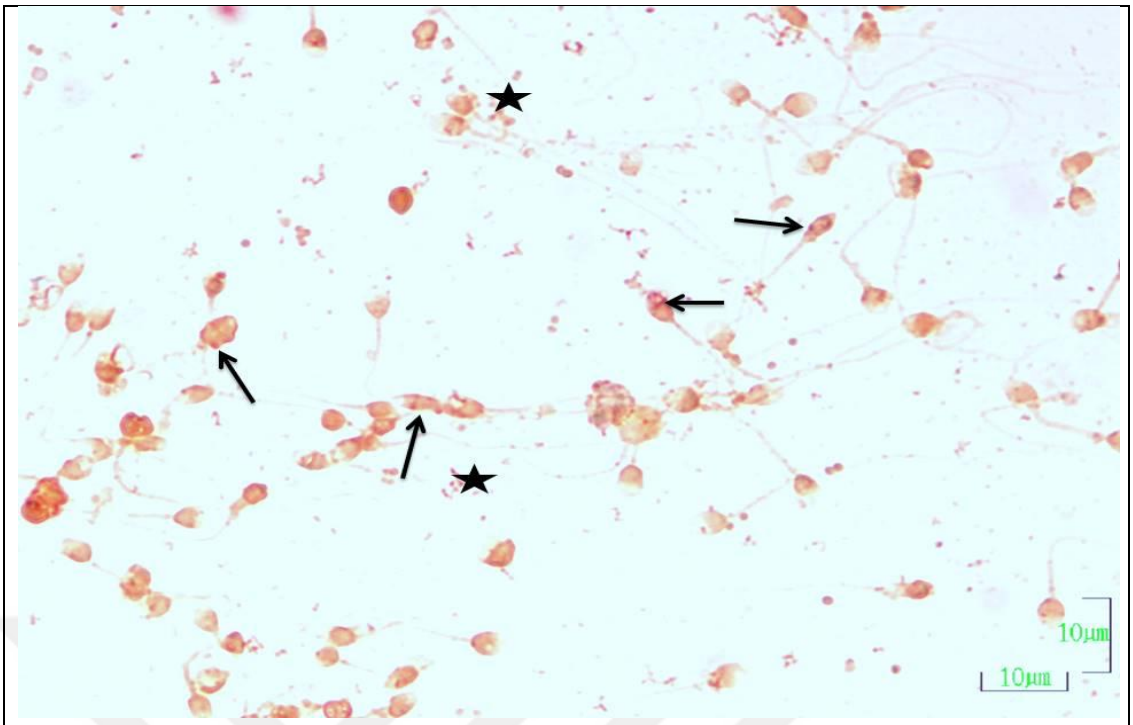
kırmızı-kahverengi renkli granüler ve bant şeklindeki boyanmanın, spermdeki dağılımı ve yerleşimi bakımından gruplar arasında fark gözlenmedi.



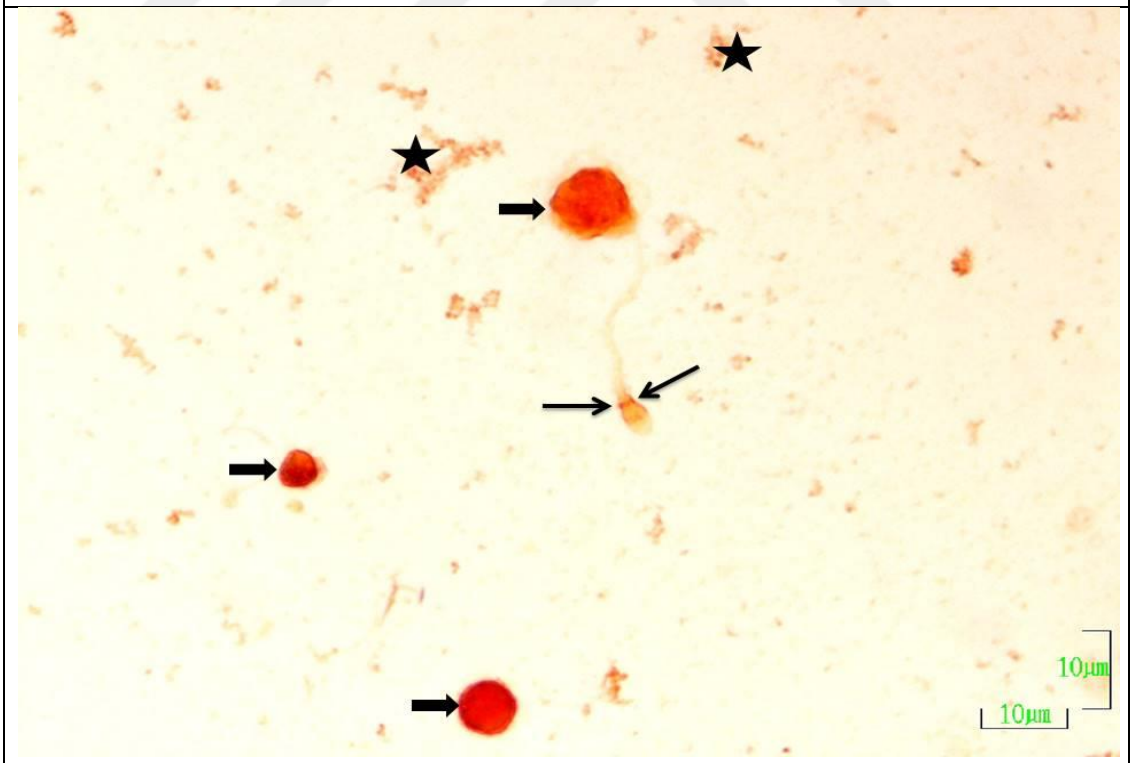
Şekil 3.2.1.1.1. Sigara içen-varikoselli gruptan ANAE demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. ANAE-pozitif hücrelerde (ince oklar) kırmızımsı-kahverengi renkli enzimatik reaksiyon ürünü, spermin baş bölgesinde ve ekvatorun gerisinde, küçük granüller ya da bantlar halinde lokalize olmaktadır. Somatik hücreler (kalın oklar) ve semen damlacıkları (yıldızlar) da güçlü ANAE pozitivitesine sahiptir. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.2.1.1.2. Sigara içen-varikosel ameliyatlı gruptan ANAE demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. ANAE pozitif bir hücrede kırmızımsı-kahverengi renkli reaksiyon ürünü spermin ekvatoryal bölgesinin gerisinde granüller ve bant tarzında (ince ok) yerleşim göstermektedir. Somatik hücreler (kalın oklar) ve semen damlacıkları (yıldızlar) da güçlü ANAE pozitivitesi göstermektedir. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.



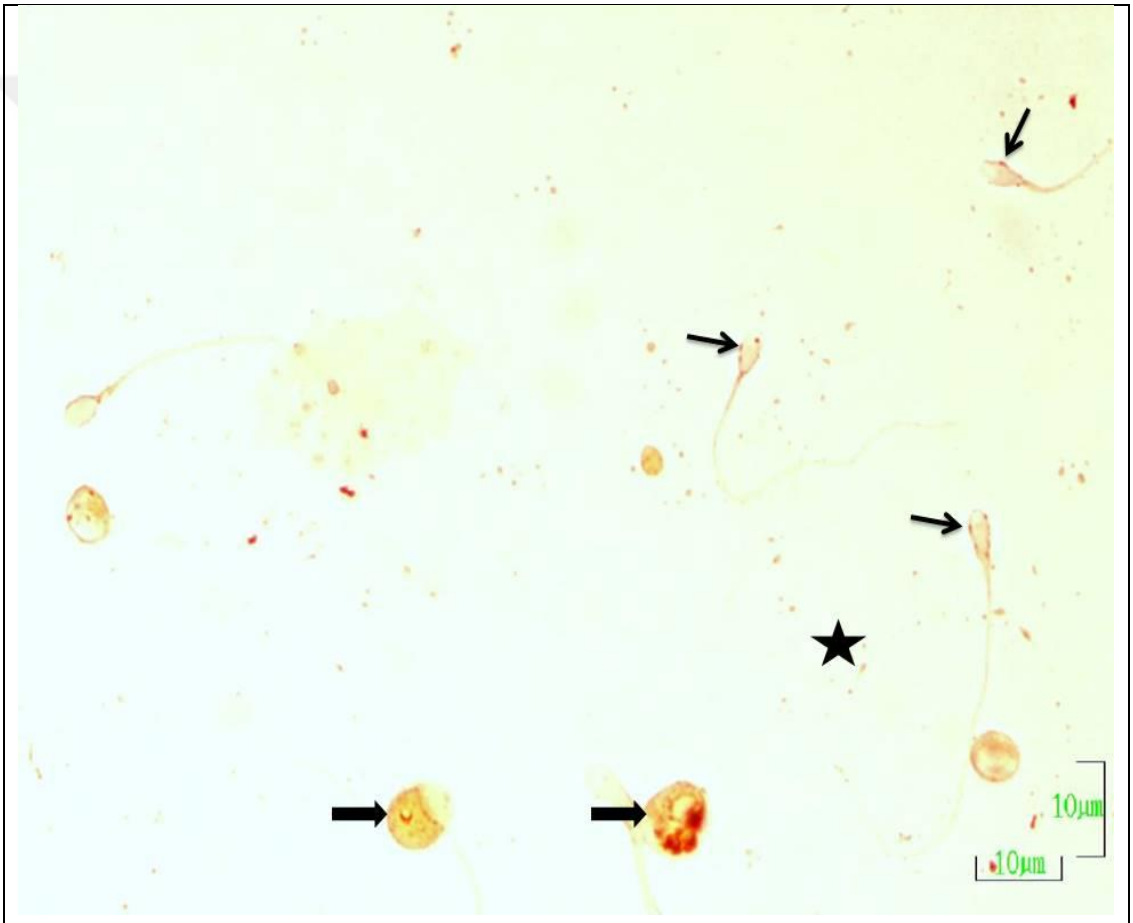
Şekil 3.2.1.1.3. Sigara içmeyen-varikoselsiz gruptan ANAE demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. ANAE pozitif hücrelerde kırmızımsı-kahverengi renkli reaksiyon ürünü, spermin baş bölgesinde granüller ve bant tarzında (ince oklar) yerleşim göstermektedir. Semen damlacıkları (yıldızlar) da ANAE-pozitif reaksiyon vermektedir. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.



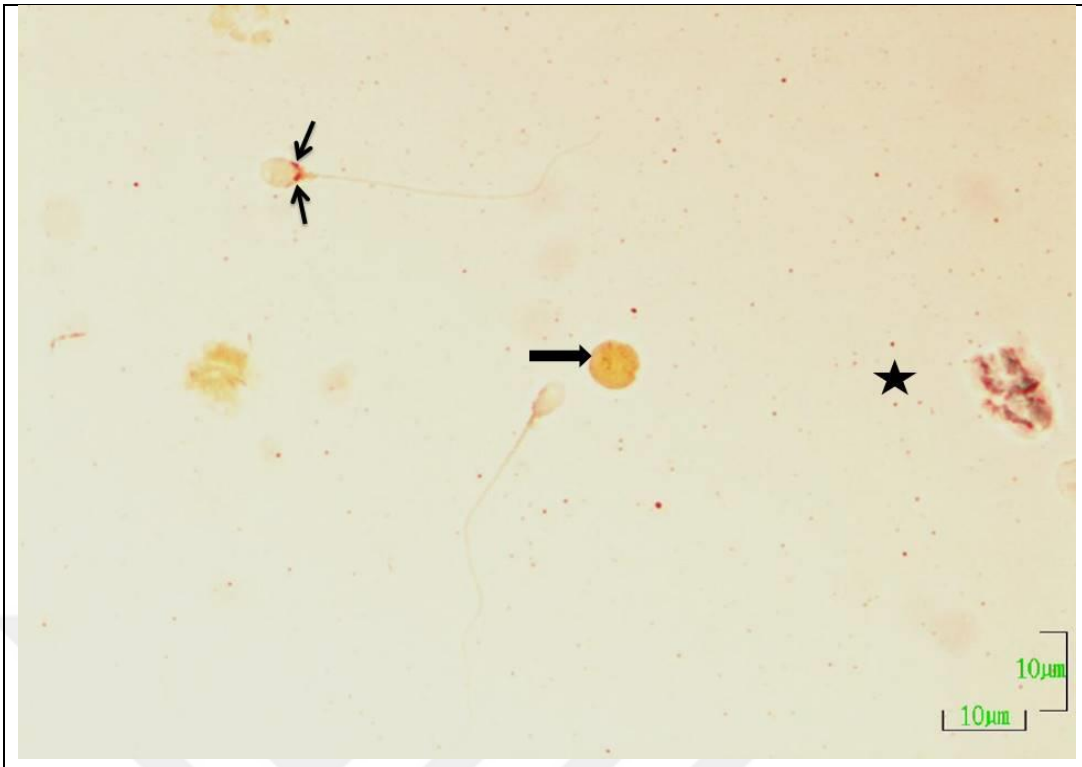
Şekil 3.2.1.1.4. Sigara içen-varikoselli gruptan ANAE demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. ANAE pozitif bir hücrede kırmızımsı-kahverengi renkli reaksiyon ürünü, baş bölgesinin ekvatorunun gerisinde zayıf diffüz boyanma ve orta parçasında güçlü granüler tarzda (ince oklar) yerleşim göstermektedir. Somatik hücreler (kalın oklar) ve semen damlacıkları (yıldızlar) da güçlü ANAE pozitivitesine sahiptir. ANAE demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.

3.2.1.2. ACP-az Enzimi Bulguları

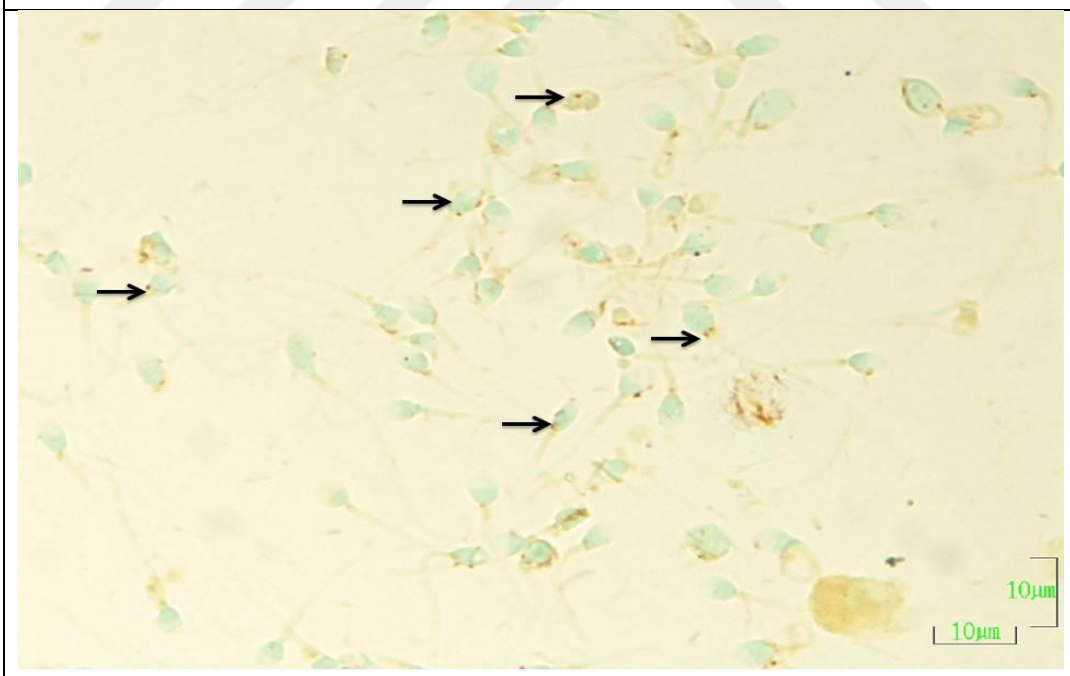
ACP-az pozitivitesi, bazı örneklerde spermin akrozomal bölgesinde kırmızımsı-kahverengi renkli, orta parça ve kuyruk bölümündeyse yer yer küçük granülleri de içeren diffüz boyanma halinde gözlendi (Şekil 3.2.1.2.1). Örneklerin çoğunluğundaysa ACP-az reaksiyon ürünü spermin orta parçasında yoğunlaşmış durumdaydı (Şekil 3.2.1.2.2). Semendeki somatik hücreler (Şekil 3.2.1.2.2) ve semen damlacıklarında da ACP-az pozitivitesi gözlendi (Şekil 3.2.1.2.1 ve Şekil 3.2.1.2.3). ACP-az enzimi reaksiyon ürünü olan kırmızımsı-kahverengi renkli ürünün spermdeki dağılımı ve yerleşimi bakımından gruplar arasında fark gözlenmedi.



Şekil 3.2.1.2.1. Sigara içen-varikoselli gruptan ACP-az demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. Spermin baş bölgesinin lateralinde ve baş-orta parça birleşme bölgesinde lokalize olan kırmızımsı-kahverengi renkli küçük granüller halindeki ACP-az reaksiyonu (ince oklar) dikkati çekmektedir. Semendeki somatik hücrelerle (kalın oklar) semen damlacıkları da ACP-az pozitivitesi (yıldız) göstermektedir. ACP-az demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.



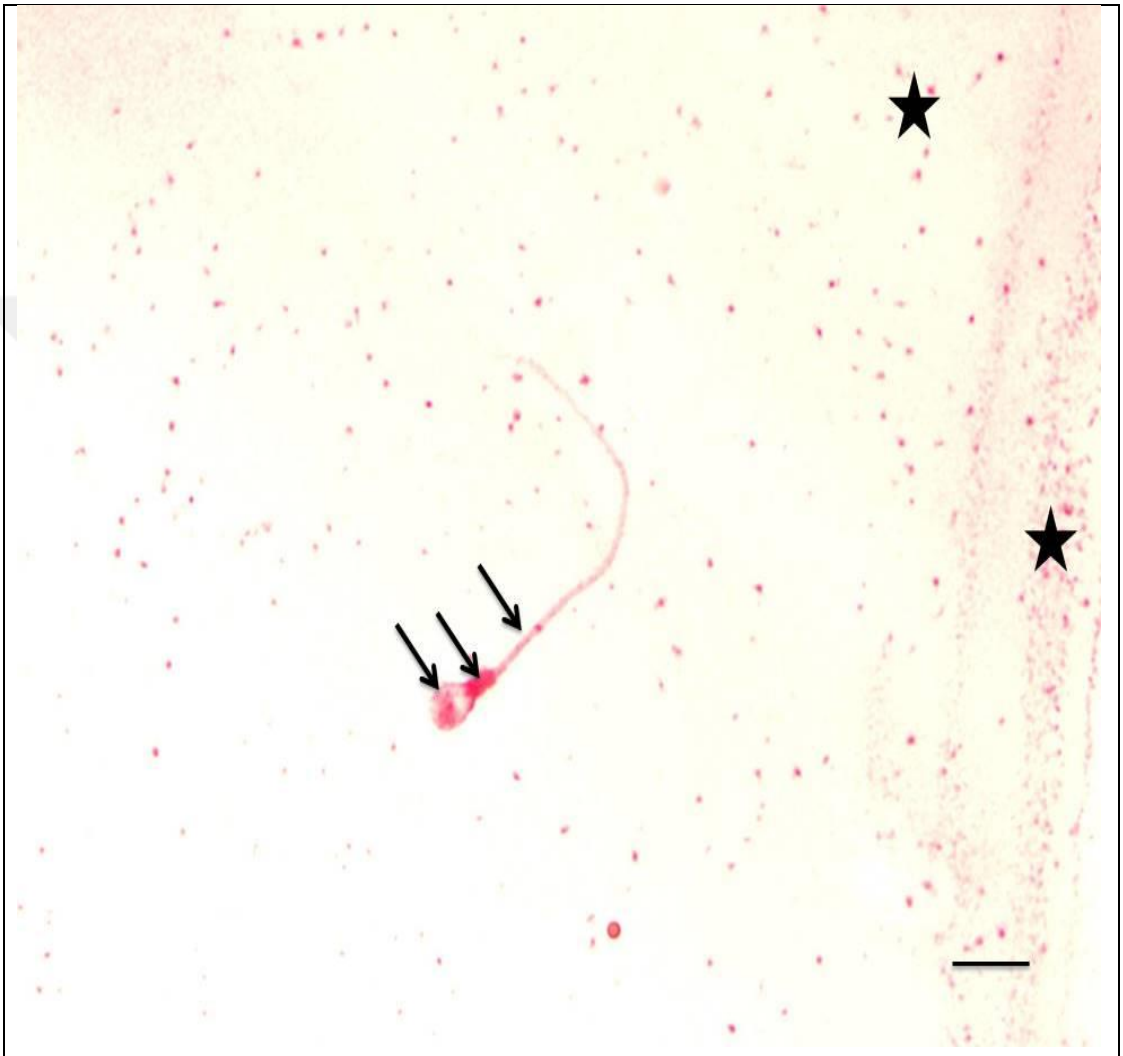
Şekil 3.2.1.2.2. Sigara içen-varikosel ameliyatlı gruptan ACP-az demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. Spermin baş bölgesi-orta parça birleşme bölgesinde lokalize olan kırmızımsı-kahverengi renkli iri 2 granül halindeki ACP-az reaksiyonu (ince oklar) dikkati çekmektedir. Semendeki somatik hücre granüler ACP-az pozitivitesi (kalın ok) göstermekte, semen damlacıkları da güçlü ACP-az pozitivitesi (yıldız) göstermektedir. ACP-az demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.



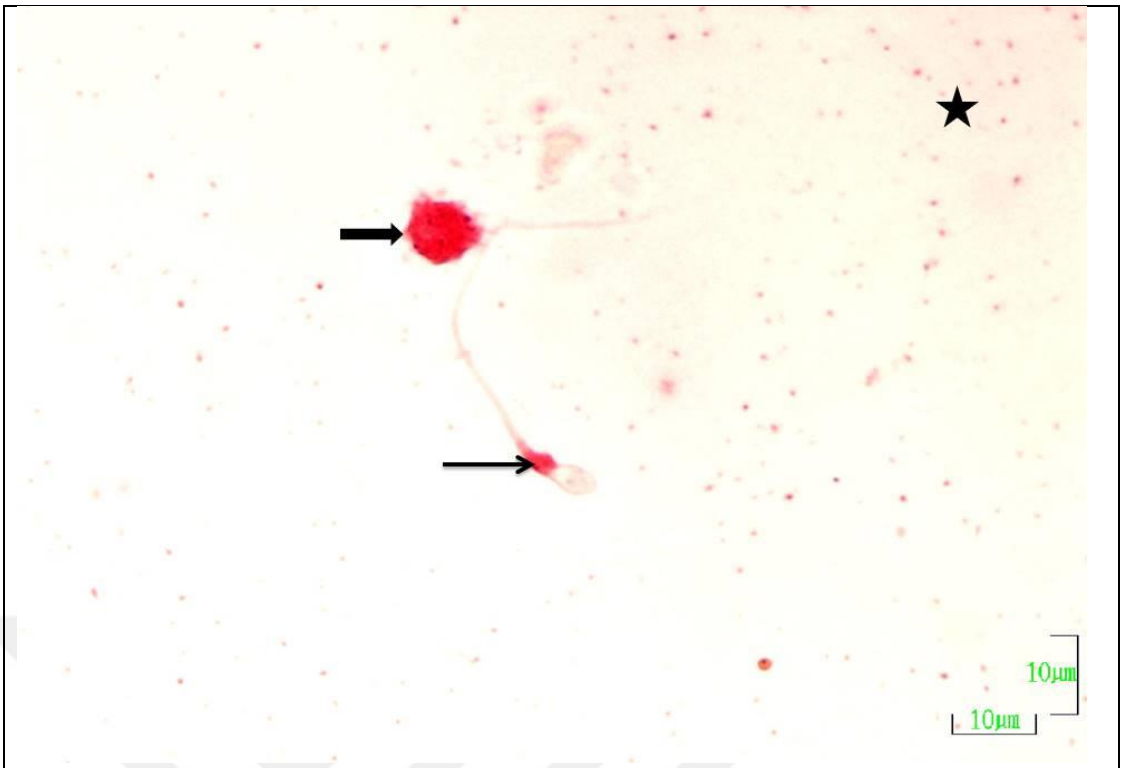
Şekil 3.2.1.2.3. Sigara içmeyen-varikoselsiz gruptan ACP-az demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. ACP-az reaksiyonu küçük granüler tarzda olup, küçük kırmızımsı-kahverengi renkli granüller (ince oklar) çoğunlukla spermin baş bölgesi ve orta parçasında lokalize olmaktadır. ACP-az demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.

3.2.1.3. ALP-az Enzimi Bulguları

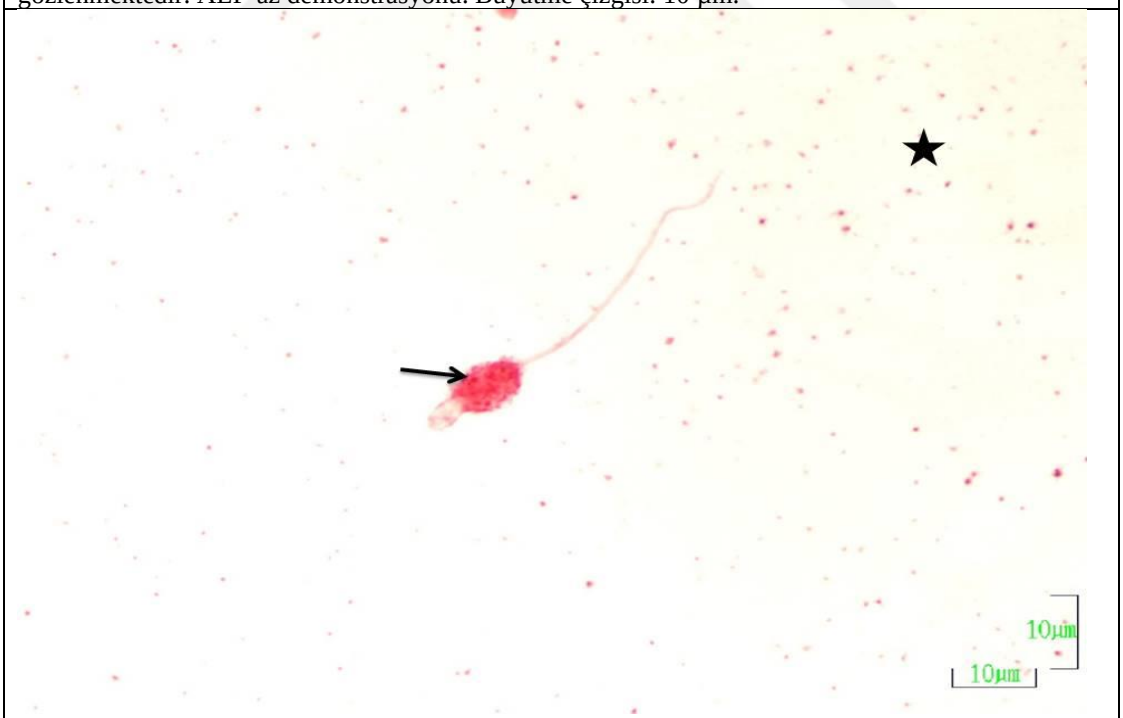
ALP-az pozitivitesi spermin çoğunlukla baş ve boyun bölgesinde lokalize olan, pembemsi-kırmızı renkli küçük granüller tarzında gözlendi (Şekil 3.2.1.3.1, Şekil 3.2.1.3.2, Şekil 3.2.1.3.3). Grupların ALP-az enzimi pozitivite paterni arasında belirgin fark gözlenmedi.



Şekil 3.2.1.3.1. Sigara içen-varikoselli gruptan ALP-az demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. Spermin akrozomu ve baş-orta parça bağlantı bölgesiyle orta parçasında pembemsi-kırmızı renkli, güçlü ALP-az reaksiyonu (ince oklar) dikkati çekmektedir. Semen damlacıklarında da ALP-az pozitivitesi (yıldızlar) gözlenmektedir. ALP-az demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.2.1.3.2. Sigara içmeyen-varikoselli gruptan ALP-az demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. Spermin akrozomunda zayıf diffüz, orta parçasında güçlü diffüz ve kuyruk bölümündeyse zayıf pembemsi-kırmızı renkli ALP-az reaksiyonu (ince ok) dikkati çekmektedir. Semendeki bir somatik hücre (kalın ok) ile semen damlacıklarında da ALP-az pozitivitesi (yıldızlar) gözlenmektedir. ALP-az demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.



Şekil 3.2.1.3.3. Sigara içen-varikoselli gruptan ALP-az demonstrasyonu yapılan bir semen örneği görülmektedir. Spermin akrozomunda zayıf diffüz, orta parçasında yer yer granülasyon gösteren güçlü diffüz ve kuyruk bölümünde pembemsi-kırmızı renkli ALP-az reaksiyonu (ince ok) dikkati çekmektedir. Semen damlacıkları da ACP-az pozitivitesi (yıldızlar) göstermektedir. ALP-az demonstrasyonu. Büyütme çizgisi: 10 µm.

3.2.2. Enzim Pozitivite Verilerinin İstatistiksel Analiz Sonuçları

ANAE, ACP-az ve ALP-az enzimlerinin sitokimyasal demonstrasyonuyla hazırlanan preparatlar üzerinde yapılan incelemelerde elde edilen sayısal veriler normal dağılım göstermediğinden, veriler Kruskal Wallis testiyle analiz edilmiş; grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem derecesini belirlemek için ise Mann Whitney U-testi uygulanmıştır.

Yapılan analiz sonuçları, grupların ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivitesinde belirgin bireysel farklılıkların bulunduğunu ortaya koymaktadır. Grupların ortalama ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivite değerleri birbirine oldukça yakın olup, benzer değişim göstermektedir.

Tablo 3.2.2.1. Grupların enzim pozitivite verileri ve bu verilerin istatiksel analiz sonuçları.

Gruplar	**Enzim pozitivitesi (%)** **Sıra ortalaması**		
	ANAE	**ACPaz**	**ALPaz**
Sigara içmeyen-varikoselsiz **N=7**	38,11[a] (26,15-40.18)	38,65[a] (28,25-41,02)	38,95[a] (27,05-42,16)
Sigara içmeyen-varikoselli **N=8**	12,06[c] (12,00-12,82)	13,67[c] (11,68-13,85)	11,94[c] (10,00 -12,94)
Sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı N=8	26,00[b] (19,25-29,52)	24,95[b] (18,52-27,23)	25,21[b] (17,18-27,43)
Sigara içen-varikoselli **N=10**	4,00[d] (6,66-7,47)	4,82[d] (7,87-8,12)	3,98[d] (6,52-7,29)
Sigara içen-varikosel ameliyatlı **N=9**	23,50[b] (18,25-25,32)	22,93[b] (17,11-24,98)	24,85[b] (17,13-26,83)

a-d) Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler arasındaki farklar önemlidir (P≤0,05).

3.2.2.1. ANAE Enzimi Sonuçları

Sigara içmeyen-varikoselsiz grup en yüksek ANAE pozitivitesine (%38,11) sahipken; sigara içmeyen-varikoselli grubun ANAE pozitivitesi %12,06 olarak tespit edilmiştir. Sigara içen-varikoselli grubun en düşük ANAE pozitivitesine (%4,00) sahip olduğu dikkati çekmektedir. Sonuçlar, varikosel ve sigara içmenin spermin ANAE pozitivitesini önemli derecede (P≤0,05) düşürdüğünü göstermektedir (Tablo 3.2.2.1). ANAE pozitivitesi sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grupta %26,00'ya yükselmiştir. Bu artış, varikosel ameliyatının, spermin ANAE pozitivitesi üzerinde olumlu katkısının olduğunu göstermektedir. Sigara içen-varikosel ameliyatlı grupta ANAE pozitivitesi önemli derecede artarak (P≤0,05) %23,50'ye ulaşmıştır. Bu grupta varikosel ameliyatının spermin ANAE pozitivitesi üzerindeki olumlu katkısı gözlenmekle birlikte, ANAE pozitivitesi sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı gruptakinden biraz daha düşük olmakla birlikte, iki grubun ortalama değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir (P≥0,05, Tablo 3.2.2.1).

3.2.2.2. ACP-az Enzimi Sonuçları

Tablo 3.2.2.1'de görüldüğü gibi ACP-az enzimi pozitivitesi ANAE pozitivite sonuçlarına büyük benzerlik göstermektedir. Sigara içmeyen-varikoselsiz grup en yüksek ACP-az pozitivitesine (%38,65) sahipken, sigara içen-varikoselli grup en düşük ACP-az pozitivitesine (%4,82) sahiptir. Sigara içmeyen-varikoselli grubun ACP-az pozitivitesi, sigara içmeyen-varikoselsiz grubunkinden önemli derecede (P≤0,05) düşüktür (Tablo 3.2.2.1). Bu bulgu da varikoselin spermin ACP-az aktivitesinde önemli düşüşe yol açtığını göstermektedir. Sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grupta ACP-az pozitivitesi önemli derecede yükselerek %24,95'e ulaşmıştır. Bu sonuç, varikosel ameliyatının, spermin ACP-az pozitivitesi üzerinde olumlu katkısının olduğunu ortaya koymaktadır. Sigara içen-varikosel ameliyatlı grupta ACP-az pozitivite değeri önemli derecede (P≤0,05) artarak %22,93'e ulaşmıştır. Bu grupta, varikosel ameliyatının ACP-az pozitivitesini önemli derecede (P≤0.05) artırdığı dikkati çekmekle birlikte, pozitivite seviyesi, sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grubun ortalama değerinden (%24,95) biraz daha düşüktür (Tablo 3.2.2.1).

3.2.2.3. ALP-az Enzimi Sonuçları

Sigara içmeyen-varikoselsiz grup en yüksek ALP-az pozitivitesine (%38,95) sahip iken, sigara içen-varikoselli grup en düşük ALP-az pozitivitesine (%3,98) sahipti. Sigara içmeyen-varikoselli grubun ALP-az pozitivitesinin, sigara içmeyen-varikoselsiz grubunkinden önemli derecede ($P \leq 0,05$) düşük olduğu (%11,94) tespit edildi. Bu bulgu, varikoselli kişilerde sperm ALP-az pozitivitesinin önemli derecede ($P \leq 0,05$) düştüğünü göstermektedir (Tablo 3.2.2.1). Sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grubun ALP-az pozitivitesi %25,21'e yükselmiştir. Bu artış, varikosel ameliyatının, ALP-az pozitif sperm oranını artırdığını göstermektedir. Sigara içen-varikosel ameliyatlı grubun ALP-az pozitivitesi de artarak %24,85'e ulaşmış olmakla birlikte, bu artış sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grubun ortalama değerinden biraz daha düşüktür. Bununla birlikte, iki grubun ortalama değerleri arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir ($P \geq 0,05$, Tablo 3.2.2.1).

4. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, infertilite, üreme çağındaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. İnfertil çiftlerin yaklaşık %20'sinde sadece erkek faktörü temel nedendir. Kadın ve erkek faktörü birlikteliği de dahil edilirse bu oran %30-%40'lara ulaşmaktadır (Koyuncu 2011). Erkekte infertiliteye neden olan pekçok etken bulunmaktaysa da ileri yaş, hormonal bozukluklar, genetik nedenler, sigara, varikosel, çevre faktörleri ve beslenme şekli en önemlilerindendir. Semen kalitesinin belirlenmesi, erkek infertilitesinin belirlenmesinde en önemli aşamadır.

Önceki yıllarda araştırıcılar semen kalitesinin belirlenmesinde sperm konsantrasyonu, vitalite, motilite, ışık mikroskobuyla incelenebilen morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi üzerinde yoğunlaşmış olsada, bu parametrelerin spermin fertilizasyon kapasitesinin belirlenmesinden kısmen uzak olduğu vurgulanmaktadır (Kumar ve ark 2016). Spermin plazma membranı bütünlüğü, sperm kalite kriterlerinin en önemlilerindendir (Kumar ve ark 2016) ve özellikle akrozomal mebran bütünlüğünün tespiti bu açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla uygulanabilecek en basit tekniklerden birisi, sperm enzimlerinin, özellikle de akrozomal enzimlerin belirlenmesidir. Çünkü sperm yapım aşamalarındaki aksaklıklara bağlı olarak bu enzimler ya az üretilmekte, ya da membran hasarına bağlı olarak seminal plazmaya sızmaktadır. Sonuç olarak, akrozom reaksiyonu normal olarak şekillenmediğinden fertile düşmektedir.

ANAE'nin insan sperminde bulunup bulunmadığı konusunda yapılan enzim sitokimyasal çalışmaya rastlanmamış olmakla birlikte, Wislocki (1950) ACP-az ve ALP-azın insan spermlerinde bulunduğunu bildirmiştir. ACP-az insan sperminde baş, ekvatoryal segment, galea capitis, orta ve kuyruk bölümlerinde lokalize olurken, ALP-az başla boyun bağlantı bölgesinde lokalize olmaktadır (Mathur 1971). Sunulan bu çalışmada da ACP-az ve ALP-az enzimleri önceki araştırıcıların (Mathur 1971) bulgularına benzer pozitivite paterni göstermekteydi.

Mathur (1971) fare spermatozoonlarında ALP-az reaksiyonu gözlenmediğini bildirmiştir. Non-spesifik esterazların ise orta parçaya özgü olduğunu, çekirdek ve kuyrukta soluk zemin boyanması gözlendiğini bildirmiştir. ALP-az enzimi, kemiğin mineralizasyonu ve bağırsak villuslarının emilim fonksiyonunda önemli roller oynadığından, özellikle insan ve köpekte seminal

plazmada bol miktarda bulunur (Patel ve ark 2013). ALP-az seminal plazmaya; köpekte epididimisten (Leventerler 2005, İlkan 2014), insanda ise prostattan verildiğinden (Brener ve ark 2002, Ahmetoğlu 2013), insanlarda prostatın durumu hakkında önemli bilgiler sağlar. Seminal plazmadaki ALP-az seviyesiyle semen sperm konsantrasyonu arasındaki bağıntı konusunda araştırıcılar arasında ortak görüş bulunmamaktadır. Ayrıca, ACP-az ve ALP-az enzimleri seminal plazma yanında semen damlacıklarında da bulunduğundan, bu enzimlerin, erkek genital kanalı organlarında yapılarak moleküler düzeyde veya damlacıklar halinde seminal plazmaya verilmeleri yanında akrozomdan seminal plazmaya sızmaları da söz konusu olabilir.

Canbolat (2019), taze ve dondurulup-çözülen boğa spermatozoonlarının ANAE, ACP-az ve ALP-az aktvitelerinin belirlendiği bir çalışmada, taze spermada ANAE pozitivitesini boğa spermatozoonunun akrozomal bölgesinde yerleşen; farklı yoğunluk ve şiddetteki, homojen ve diffüz boyanma gösteren kırmızımsı-kahverengi reaksiyon ürünü halinde gözlemiştir. Taze spermada seminal plazma damlacıklarında enzimatik reaksiyon gözlenmemiştir. Dondurulup-çözdürülen sperma örneklerinde ANAE-pozitif spermatozoonların oranı önemli derecede azalmış; akrozomal bölgede lokalize olan ANAE reaksiyonu zayıflamıştır. Araştırıcı (Canbolat 2019, Canbolat ve ark 2020), bu durumun dondurup-çözme işlemi sırasında akrozomal membranların hasara uğraması sonucu enzimin hücre dışına sızmasından kaynaklandığını ileri sürmüştür. Canbolat (2019), ALP-az pozitivitesini, hem taze ve hem de dondurulup-çözdürülen spermatozoonların baş bölgesinin tamamında diffüz lokalizasyonlu, soluk pembe-kırmızı renkli reaksiyon ürünü halinde gözlemiş; dondurup-çözdürme işleminin, spermatozoonların ALP-az pozitivitesinde belirgin düşüşe yol açtığını tespit etmiştir.

Canbolat (2019), boğa sperması örneklerinde ne taze ne de dondurulup-çözdürülen spermatozoonlarda ve seminal plazma damlacıklarında ACP-az enzimi pozitivitesi gözlememiştir. Araştırıcı (Canbolat 2019), motilite, vitalite ve hücre yoğunluğu yüksek olan, ancak total anomali oranları düşük olan boğaların taze sperma örneklerinin ANAE ve ALP-az pozitivitesinin daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Çalışmada, dondurulup-çözdürülen sperma örneklerinin ANAE ve ALP-az aktivitesinin, taze sperma örneklerindekinden daha zayıf ve pozitivitenin daha düşük olduğu da tespit edilmiştir.

Sunulan bu çalışmada, ANAE enzimi pozitivitesi, başlıca spermin baş bölgesinde, ekvatorun gerisinde ve orta parçaya yakın yerleşen granüller, hücre zarına komşu durumda lokalize olan granüller veya bantlar halinde, nadiren de orta parçada lokalize olan bantlar halinde gözlenmiştir. Semendeki mononükleer somatik hücrelerde de güçlü granüler ve diffüz pozitivite tespit edilmiştir. Semen damlacıklarında da güçlü ANAE pozitivitesi gözlenmiştir. Canbolat ve ark (2020) boğa spermatozoonları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ANAE pozitivitesinin hem taze ve hem de dondurulup-çözdürülen örneklerdeki çoğu spermatozoonda, akrozomda lokalize olan farklı yoğunluk ve şiddetteki homojen ve diffüz boyanma gösteren kırmızımsı-kahverengi reaksiyon ürünü halinde gözlemişlerdir. Araştırıcılar (Canbolat ve ark 2020), dondurulup-çözdürülen sperma örneklerinde ANAE pozitivitesinin önemli derecede düştüğünü gözlemişler ve spermatozoon kümeleri arasındaki bölgelerde de ANAE pozitivitesinin gözlenmesinin, dondurma işlemleri sırasında oluşan membran hasarı sonucunda hücre dışına sızan ANAE enziminden kaynaklanmış olabileceği sonucuna varmışlardır. Membran hasarıyla ANAE pozitivitesindeki düşüşün bağıntılı olabileceğini ileri süren araştırıcılar (Canbolat ve ark 2020) bu özellikten sperma kalitesinin belirlenmesinde yararlanılabileciğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada, varikoselli ve sigara içen gruplarda ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivitelerinin düşük olması, varikosel sonucu testislerin termoregülasyonunun bozulması ve sigaranın sperm membranlarında yapısal bozukluğa yol açabileceğini akla getirmektedir.

Varikosel yüzyıllardır bilinmesine karşın, patofizyolojisi günümüze kadar tam olarak aydınlatılamamıştır. Erişkin erkek populasyonunun %15-22'sini etkileyen fiziksel bir anomali olan varikoselin, infertilite şikayetiyle başvuran erkeklerde ortalama %30-40 iken, anormal semen parametrelerine sahip infertil erkeklerde ise %25 olduğu bildirilmiştir (Nieschlag ve ark 1998). Varikoselin kalıtımla ilişkisi araştırılan başka bir çalışmadaysa, varikoselli erkeklerin birinci derece akrabalarında hastalığın görülme sıklığı %53 gibi genel populasyondan önemli derecede yüksek oranda bulunmuştur (Pinto ve Kroovand Jarov 1994, Oğuz 2007, Doğan 2011). Varikosel vakalarının %78-93'ü sol testiste gerçekleşmekteyken, bilateral varikosel görülme sıklığı çok daha azdır (Kantartzi ve ark 2007). Venöz pleksusun genişlemesine bakılarak birinci, ikinci ve üçüncü derece varikosel şeklinde derecelendirme yapılmaktadır (Rajeev ve Rupin 2005, Kantartzi

ark 2007). Varikosel vakaları incelendiğinde, nedenleri henüz tam olarak bilinmese de sperm morfolojisinde yapısal defektler, sperm DNA'sı hasarı gibi birçok sperm parametresinde bozulmalar görülmektedir (Green ve ark 1984, Moro ve ark 2000, Marmar 2001, Naughton ve ark 2001, Barqawi ve ark 2004, De Stefani ve ark 2005). Klasik varikoselektomi veya mikro varikoselektomi sonucu hastaların sperm parametrelerinde belli oranlarda iyileşme gösterilebilmiştir (Kantartzi ve ark 2007, Shiraishi ark 2012). Ancak sperm parametreleri düzelse bile hastaların bir kısmında infertilite devam etmektedir (Shiraishi ve ark 2012).

Green ve arkadaşlarının hayvanlarda yaptığı çalışmada, deneysel olarak oluşturulan varikoselin intraskrotal sıcaklık artışına neden olduğu ve varikoselin onarımıyla sıcaklığın normale döndüğü gösterilmiştir (Green ve ark 1984). Yapılan çalışmalarla intraskrotal sıcaklık artışının testiküler histolojide anormalliklere neden olduğu ve sperm kalitesini düşürdüğü de bildirilmiştir (Saypol ve ark 1981, Shafik ve ark 1989). Varikoselin, akrozom reaksiyonunda aksamaya neden olarak sperm fonksiyonunu olumsuz yönde etkilediği ileri sürülmüştür (Rogers ve ark 1985, Virgil ve ark 1994, Kendirci ve Miroğlu 2004). Varikoselli olgularda, akrozomun gelişememesi, immatür sperm ve amorf baş anomalilerine sıklıkla rastlanmaktadır (Reichart ve 2000). Varikoselin sperm enzimleri üzerindeki etkisi konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Sunulan bu çalışmadaysa sigara içmeyen varikoselli grupta sperm konsantrasyonu, sigara içmeyen varikoselsiz gruptan önemli derecede ($P \leq 0,05$) düşük bulunmuştur. Varikosel ameliyatı, sperm konsantrasyonunda belirgin artışla sonuçlanmaktadır. Bu sonuç, varikoselin sperm yapımını aksattığı görüşünü desteklemektedir. Varikosel, muhtemelen yapısal ve fonksiyonel defektli sperm yapımına neden olmasına bağlı olarak sperm motilitesini de düşürmektedir. Nitekim sunulan bu çalışmada, sigara içmeyen varikoselsiz grubun sperm motilitesi %66,71 iken, sigara içmeyen-varikoselli grubun motilitesi %59,25 olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada incelenen ANAE, ACP-az ve ALP-az enzimlerinin her üçünün de pozitivite paternlerinin, grupların tamamında benzer özellikler gösterdiği; bununla birlikte, pozitivite oranlarında önemli farkların ortaya çıktığı tespit edilmiştir. ANAE pozitivitesi başlıca spermin baş bölgesinde, ekvator bölgesinin gerisinde ve orta parçaya yakın yerleşen granüller veya bölge zarına komşu konumda lokalize olan granül ve bantlar halinde, nadiren de orta parçada lokalize

olan 2 bant halinde gözlenmiştir. Semen damlacıklarında da güçlü ANAE pozitivitesi gözlenmiştir. Sigara içmeyen-varikoselli grubun ANAE pozitivitesi, sigara içmeyen varikoselsiz gruptan önemli derecede ($P \leq 0,05$) düşüktür. Bu sonuç, varikoselin, spermin ANAE pozitivitesi üzerinde önemli olumsuz etkilerinin olduğunu göstermektedir. Nitekim ANAE pozitivitesi sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grupta önemli derecede yüksektir. Bu artış, varikosel ameliyatının, testisin termoregülesyonunu düzelterek ANAE pozitivitesini artırdığını göstermektedir.

Varikosel, sperm ACP-az pozitivitesinde de önemli düşüşe yol açmaktadır. Nitekim sigara içmeyen-varikoselli grubun ACP-az pozitivitesi, sigara içmeyen-varikoselsiz grubunkinden önemli derecede düşüktür. Sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grupta ACP-az pozitivitesi önemli derecede yükselerek %24,95'e ulaşmıştır. Bu bulgular varikoselin spermin ACP-az aktivitesinde önemli düşüşe yol açtığını ve varikosel ameliyatının, spermin ACP-az pozitivitesi üzerinde olumlu katkısının olduğunu ortaya koymaktadır.

Sigara içmeyen-varikoselli grubun ALP-az pozitivitesinin, sigara içmeyen-varikoselsiz grubunkinden önemli derecede ($P \leq 0,05$) düşük olması, varikoselin sperm ALP-az pozitivitesini önemli derecede düşürdüğünü göstermektedir. Sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı grubun pozitivitesi önemli derecede yükselmiş olup, bu sonuç, ameliyatın testis termoregülasyonunun sağlanmasında ve sperm ALP-az aktivitesi üzerinde belirgin olumlu etkisinin olduğunu göstermektedir.

Sigara içmenin erkek üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkileri konusunda halen tartışmalar sürmekteyse de bu alışkanlığın, vücudun diğer sistemleri üzerindeki olumsuz etkileri dikkate alındığında bile üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilerinin ortaya çıkmamasının imkânsız olduğu görülmektedir (Collodel ve ark 2010).

Sigara içmenin spermatogenezisi aksattığı, spermde ultrastrüktürel düzeyde yapısal anomalilere neden olduğu ve apoptozisi indüklediği ileri sürülmüştür (Sepaniak ve ark 2006). Sigara içmenin, sperm morfolojisi yanında, sperm sayısı ve motilitesi üzerinde de olumsuz etkilerinin olduğu ve bu iki faktörün bozulmasının, erkek fertilitesini çok belirgin biçimde olumsuz yönde etkileyebileceği ileri sürülmektedir (Gaur ve ark 2007, Doğantekin ve Özcan 2016). Gaur ve ark (2007),

sigara içen ve içmeyen infertil erkeklerin sperm kalitesini karşılaştırdıklarında sigara içmeyenlerde normospermi oranının %39 olduğu halde, sigara içenlerde bu oranın %3'e düştüğünü tespit etmişlerdir. Günde 20 adetten fazla sigara içen ağır içicilerde sperma hacmi, sperm sayısı ve sperm motilitesi düşmekte, anormal sperm oranı ise artmaktadır. Özellikle, sperm motilitesi en fazla etkilenen parametredir. Sigara içmenin motilite üzerinde baskın olumsuz etkisinin olması, bu kişilerin yardımcı üreme teknikleriyle dahi çocuk sahibi olmalarına engel teşkil eder. ICSI için sperm seçiminde de motil spermler tercih edilmekte, ejakülatta motil sperm bulunamazsa TESE yöntemiyle motil sperm aranmakta, bunda da başarılı olunamazsa ejakülattaki immotil spermler kullanılmaktadır.

Sigara içmenin sperm morfolojisini bozduğu ve özellikle baş bölgesi anomalilerine neden olduğu iyi bilinmektedir. Hâlbuki gerek normal gebelik ve gerekse de yardımcı üreme tekniklerinde, normal sperm oranının %4'ten yüksek olması gerekmektedir. Sigara içenlerin spermlerinde DNA fragmantasyonu ve anöploidi oranı artmaktadır. Bu durum, yardımcı üreme tekniklerinin başarısını düşürmesi yanında konjenital malformasyon oranını da artırmaktadır. Sigara içmenin, sonraki nesillerin üreme fonksiyonları üzerinde bile olumsuz etkilerinin olabileceğini gösteren bulgular vardır (Travis ve Kopf 2002, Sadler 2010). Yukarıda bildirilen sonuçlara rağmen, sigara içmenin sperm kalitesi üzerindeki etkileri konusunda çelişkili sonuçlar da bildirilmiştir. Özgür ve ark (2005) yaş, cinsel perhiz süresi, semen volümü, sperm yoğunluğu, likefaksiyon zamanı ve mililitredeki yuvarlak hücre sayısının sigara içmeyen, az ve ağır içicilerde benzer olduğunu ileri sürümüşlerdir.

Sunulan bu çalışmada, sigara içimi ve varikosel birlikte bulunduğunda sperm konsantrasyonunun önemli derecede düştüğü tespit edildi. Sigara içimi varikosel ameliyatının olumlu etkisini belirgin biçimde azaltmakta ve sperm konsantrasyonu sigara içen-varikosel ameliyatlı grupta, sigara içmeyen-varikosel ameliyatlı gruba oranla belirgin olarak daha düşük seviyededir. Sigara içmemek ve varikosel bulunmaması, sperm motilitesinin normal değerde olmasını sağlamakta; sigara içimi ve varikosel birlikte bulunduğunda sperm motilitesi önemli derecede düşmektedir. Varikosel ameliyatı sperm motilitesini belirgin biçimde yükseltmekteysede, sigara içmeye devam edilmesi, varikosel ameliyatının motilite üzerindeki olumlu etkisini azaltmaktadır. Motilite, fertilitede çok önemli bir parametre olduğundan, bu

çalışmada elde edilen sonuçlar, daha önceki araştırıcıların (Travis ve Kopf 2002, Sadler 2010), sigara içmenin erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilediği konusundaki görüşleriyle uyumludur.

Bu çalışmanın enzim sitokimyasal sonuçları, sigara içme ve varikoselin, sperm ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivitelerinde belirgin düşüşlere yol açtığını; varikosel ameliyatının, bu enzimlerin pozitivitelerinde belirgin bir iyileşme sağlamakla birlikte, sigara içmenin devam etmesinin ameliyatın olumlu etkisinde belirgin azalmayla sonuçlandığını ortaya koymaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma sonuçları, sigara içmenin ve varikoselin sperm ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivitelerinde belirgin düşüşlere yol açtığını; varikosel ameliyatının, bu enzimlerin pozitivitelerinde belirgin bir iyileşme sağlamakla birlikte, sigara içmenin devam etmesinin ameliyatın olumlu etkisinde belirgin azalmayla sonuçlandığını ortaya koymaktadır. Çalışmada az sayıda örnek üzerinde çalışılmış olmakla ve sigara içen-varikoselsiz grup bulunmamakla birlikte; spermin ANAE, ACP-az ve ALP-az pozitivitelerinin insanlarda semen kalitesinin değerlendirilmesine yardımcı bir parametre olarak dikkate alınabileceği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Ahmetoğlu N, 2013. Normospermi ve astenospermi olgularında plcζ'nın fertilizasyondaki etkisi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Allison AC, Hartree EF, 1969. Lysosomal enzymes in the acrosome and theirpossible role in fertilization. J. Reprod. Fert. 21: 501-515.

Allison AC, Hartree EF, 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. Reprod. 21,3: 501-515.

Allison AC, Young MR, 1969. Vital staining and fluorescence microscopy of lysosomes. In the role of lysosomes in biyology and pathology. Vol II EDS JT Dingle and HB Fell North Holland Publishing Co, Amsterdam, p, 600.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G, 1996. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. Front Biosci. 15,1: 189-205.

Barka T, Anderson PJ, 1962. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. J Histochem Cytochem. 10: 741-753.

Barqawi A, Caruso A, Meacham RB, 2004. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. J Urol. 171,1: 501-503.

Basso G, Cocito MG, Semenzato G, Pezzutto A, Zanesco L, 1980. Cytochemical study of cthymocytes and T lymphocytes. Br J Haematol. 44: 577-582.

Bertalanffy L Von, Bickis I, 1956. Identification of cytoplasmic basophlia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy. J Histochem Cytochem. 4: 481-493.

Bishop MWH, Walton A, 1960. Spermatozoonatogenesis and the strucure of mammalian spermatozoonatozoa. In: Marshall's Physiology of Reproduction, 3rd Ed. Vol 1, Part 2 Ed. A S Parkes, Longmans Green, London.

Bourne H, Liu DY, Clarke GN, Baker HW, 1995. Normal fertilization and embryo development by intracytoplasmic sperm injection of round-headed acrosomeless sperm. Fertil Steril. 63: 1329-1332.

Bourne H, Richings N, Harari O, Watkins W, Speirs AL, Johnston WI, Baker HW, 1995. The use of intracytoplasmic sperm injection for the treatment of severe and extreme male infertility. Reprod Fertil Dev. 7: 237- 245.

Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H, 2002. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation. Biol Reprod. 68: 837- 845.

Canbolat ÜN 2019. Boğa sperm akrozomal enzimleri üzerinde sitokimyasal çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji (Vet) Anabilim Dalı, Konya.

Canbolat ÜN, Çelik İ, Erdoğan R, 2020. Determination of alpha-napthyl acetate esterase activity of native and frozen-thawedbull sperm acrosome. Eurasian J Vet Sci. 36, 1: 1-7.

Cohen MS, Plaine L, Brown JS 1975. The role of internal spermatic vein plasma catecholamine determinations in subfertile men with varicoceles. Fertil Steril. 26:1243-1249.

Collodel G, Capitani S, Pammolli A, Giannerini V, Geminiani M, Moretti E, 2010. Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study. J Androl. 31: 108-113.

Coulibaly FA, N' Zi KS, Ayekoue E, Coulibaly N, Yaye YG, Djaman AJ, 2014. Comparative study of enzymatic markers in seminal liquids of normospermic and azoospermic samples at Pasteur Institute of Cote D'Ivoire (IPCI) ISSN 2321-2748.

Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA, 2002. Sperm phospholipase C zeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca^{+2} oscillations, activation and development of mouse oocytes. Reprod. 124: 611-623.

Cross NL, 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. Biol Reprod. 59: 7-11.

Çelik İ, Aştı RN, Boyraz MÜ, 1992. Sığır fötal perifer kan lenfositlerinin alfa-naftil asetat esteraz aktivitesi üzerinde ışık mikroskobik çalışmalar. SÜ Vet Fak Derg. 8, 2: 41-44.

Çelik İ, Aştı RN, Ergene N, 1991. İnsan perifer kanındaki B, T ve Null lenfositlerinin esteraz sitokimyası ve yüzey immünoglobülinlerinin immünoenzimatik yöntemle boyanarak belirlenmesi. SÜ Tıp Fak Derg. 7, 4: 497-503.

Çelik İ, Aştı RN, Kadak R, Işık K, 1994. Farklı yaşlardaki sığırların perifer kan T lenfosit oranlarında görülen değişiklikler. Hayvancılık Araştırma Derg. 4, 2: 68-72.

Dalcq AM, 1967. Les resherches recentes sur la formation du testicule des mammiferes et sur la cytologie de ses constituants. Bull Acad Rle Med. 3, 1.

De Stefani S, Silingardi V, Micali S, Mofferdin A, Sighinolfi MC, Celia A, Bianchi G, Giulini S, Volpe A, Giusti F, Maiorana A, 2005. Experimental varicocele in the rat: early evaluation of the nitric oxide levels and histological alterations in the testicular tissue. Androl. 37, 4: 115-118.

Doğan F, 2011. Deneysel Sıçan Varikosel Modelinde Varikoselin Oluşturduğu Testiküler Hasar Üzerine Diosminhesperidinin Etkileri Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi.

Doğantekin E, Özcan S, 2016. Çevresel etkenler ve spermatogenez. Androloji Bülteni. 18, 66: 183-187.

Eliasson, R, 1971. Standards for investigation of human semen Untersuchungsstandards für das menschliche Sperma La standardisation de l'analyse du sperme humain. Andrologia. 3,2: 49-64.

Gardner KG, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, 2010. Çev. Ed. İrez T, Arda O, Kaleli S. Sperm değerlendirmesi, in Vitro oosit olgunlaşması. Yardımla Üreme Teknikleri Temel Kitabı, Laboratuvar ve Klinik Görüşler. Nobel Kitabevleri, 65-151.

Gaur DS, Talekar M, Pathak VP, 2007. Sigara içiminin infertil erkeklerde sperm kalitesi üzerine etkisi. Singapore Med J. 48,2: 119-23.

Gorus FK, Pipeleers DG, 1981. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. Fertil Steril. 35, 6: 662-665.

Green KF, Turner TT, Howards SS, 1984. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. Journal Urol. 131, 6: 1208-1211.

Gulaya NM, Margitich VM, 2001. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. Arch Androl. 46, 3: 169-175.

Günalp S, 2004. Kadın Doğum Hekiminin Erkek Faktörünün Araştırılması ve Değerlendirilmesindeki Rolü Ne Olmalıdır? Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Uzmanlık Sonrası Eğitim Dergisi. 7: 129-140.

Haimov-Kochman R, Spitz IM, 2016. Three giants in the cradle of reproductive medicine; reproduction theories of the seventeenth century as discerned by pregnancy portraiture in the oeuvre of jan vermeer. Rambam Maimonides Med J. 7, 2: e0017. Doi: 10.5041/RMMJ.10244

Hellinga G, 1949. Pseudo-anovulatoire Bloeding?. Ned Tijdschr Verloskd Gynaecol. 49, 3: 193-198.

Hellinga, G. (1976). Clinical andrology: a systematic approach, with a chapter an intersexuality. William Heinemann Medical, London.

Hokin MR, Hokin LE, 1953. Enzyme secretion and the incorporation of P32 into phospholipides of pancreas slices. Biol Chem. 203,2: 967-977.

Holt SJ, 1963. Some observations on the occurence and nature of esterases in lysosomes. Ciba Fdn Symp Lysosomes, Eds A V S de Rueck and M P Cameron, Churchill, London. http://www. ucmp. berkeley.edu/history/leewenhoek.html erişim tarihi: 2.12.2004

Ito C, Toshimori K, 2016. Acrosome markers of human sperm. Anat Sci Int. 91:128-142.

İlkan A, 2014. Düşük fertilizasyona neden olan sperm örneklerinde fosfolipaz c zeta'nın immunfloresan gösterimi ve plcζ gen mutasyonlarının tayini. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

Jefferson KP, Persad RA, Holly MP, 2000. Apoptosis and relevance to urologists. Br J Urol. 86: 598-606.

Junqueira LC, Carneiro J, 2009. Temel Histoloji. Çeviri editörleri: Solakoğlu S, Aytekin Y. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi.

Kadıoğlu A, Köksal T, 1998. Skrotum ve kapsamı hastalıkları. Temel Üroloji. (Anafarta K, Göğüs O, Arıkan N, Bedük Y, Editörler). Güneş Kitabevi, Ankara, pp: 949-960.

Kantartzi PD, Goulis ChD, Goulis GD, Papadimsa I, 2007. Male infertility and varicocele: myths and reality. Hippokratia. 11, 3: 99–104.

Kendirci M, Miroğlu C, 2004. Varikosel Patofizyolojisi: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi (Editörler: Kadıoğlu A, Çayan S, Semerci B ve ark.). Türk Androloji Derneği yayını, İstanbul, 427-439.

Kennedy WP, Kamıskı JM, Van Der Ven HH, Jeyendran RS, Reid DS, Blackwell J, Bıelfield P, Zaneveled LJD, 1989. A simple, clinical assay to evalute the acrosin activity of human spermatozoa. J Androl. 10: 221-231.

Kierszenbaum AL, 2006. Çev. Ed. Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 531-589.

Klaiber EL, Broverman DM, Pokoly TB, Albert AJ, Howard PJ, Sherer JF, 1987. Interrelationships of cigarette smoking, testicular varicoceles, and seminal fluid indexes. Fertil Steril. 47: 481-486.

Koyuncu H, 2011. Methods for the determination of sperm DNA damage. Türk Urol Sem. 2: 18-23.

Kumar D, Kumar P, Singha P, Yadav SP, Yadav PS, 2016. Assessment of spermatozoon damages during different stages of cryopreservation in water buffalo by fluorescent probes. Cytotechnol. 68: 451-458.

Kumtepe Y, Beyazyürek C, Çınar C, Özbey I, Özkan S, Çetinkaya K, Karlıkaya G, Karagözoğlu H, Kahraman S, 2009. A genetic survey of 1935 Turkish men with severe male factor infertility. Reprod Biomed Online. 18: 465-474.

Lens JW, Bras M, Piederiet MH, 1996. IVF lab-Laboratory aspects of in vitro fertilization, NV Organon: Amsterdam.

Leventerler H, 2005. Fertil ve infertil semen örneklerinde enerji üretiminde görev alan bazı sitolojik ve mitokondriyal enzim aktivitelerinin karşılaştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Adana.

Li CY, Yam LT, Crosby WH, 1972. Histochemical characterization of cellular and structural elements of human spleen. J Histochem Cytochem. 20, 12: 1049-1058.

Lojda Z, Grossrau R, Schibler TH, 1979. Enzyme histochemistry: a laboratory manual. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Maiti NK, Saini SS, Sharma SN, 1990. Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes. Vet Res Comm, 14: 207–210.

Males JL, Turkington RW, 1971. Hormonal control of lysosomal enzymes during spermatogenesis in the rat. Endocrinol. 88, 3: 579-588.

Marmar JL, 2001. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. Human Reprod Update, 7, 5: 461-472.

Mathur RS, 1971. Histo-enzymological observations on spermatozoa of inbred strains of mice. Reprod. 27, 1: 5-11.

Mc Rorie RA, Williams LW, 1974. Biochemistry of mammalian fertilization. Ann Review Biochem. 43: 777-802.

MacLeod J, Gold RZ, 1953. The male factor in fertility and infertility IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. Fertil Steril. 2:394-414.

MacLeod J, Hotchkiss RS, 1942. The Distribution of Spermatozoa and of Certain Chemical Constituents in the Human Ejaculate. The Journal of Urology 48,2: 225-229.

Miteva R, Zapryanova D, Fasulkov IV, Yotov S, Mircheva T, 2010. Investigations on acid phosphatase activity in the seminal plasma of humans and animals. Trakia Jf Sci. 8,2: 20-23.

Moghissi GS, 1984. The function of the cervix in human reproduction, Year Book Medical Publishers, Chicago.

Moro E, Marin P, Rossi A, Garolla A, Ferlin A, 2000. Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele. Mol Cell Endocrinol. 161, 1-2: 67-71.

Nagler HM, Luntz RK, Martinis FG, 1997. Varicocele. St. Louis. Mosby Year Book 336–359.

Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A, 2001. Varicocele and male infertility: Part II: pathophysiology of varicoceles in male infertility. Human Reprod Update. 7, 5: 473-481.

Nieschlag E, Hertle L, Fischedick A, Behre HM, 1998. Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. Human Reprod. 13, 8: 2147-2150.

Oğuz I, 2007. Varikosel oluşturulan ratlarda germ hücre apopitozisini önleyici bir alternatif medikal tedavi etkinliğinin immünohistokimyasal ve elektron mikroskobik yöntemlerle araştırılması Uzmanlık Tezi. Mersin: Mersin Üniversitesi.

Özgür K, Işıkoglu M, Seleker M, Dönmez L, 2005. Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Turkish population. Arch Gynecol Obstet. 271,2: 109-112.

Patel A, Dixit HS, Patel MA, Shah P, 2013. Study of sperma acid and alkaline phosphatase in relation to spermatozoon count and motility. Seajcrr. 1: 112-121.

Pinto KJ, Kroovand Jarow JP, 1994. Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. Journal Urol. 152, 2. 2: 788-790.

Raifer J, 1998. Varicocele. Congenital anomalies of the scrotum and testis. Campbell's Urology (Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editors), Philadelphia, WB Saunders Company, 2186-2195.

Rajeev K, Rupin S, 2005. Varicocele and male infertility: current status. J Obstet Gynecol India. 55, 6: 505-516.

Ramadan WM, Kashir J, Jones C, Coward K, 2012. Phospholipase C zeta and its potential role in infertility treatment. Cell Commun Signal. 10: 12.

Reichart M, Eltes F, Soffer Y, Zigenreich E, Yogev L, Bartoov B, 2000. Sperm ultramorphology as a pathophysiological indicator of spermatogenesis in males suffering from varicocele. Androl. 32, 3: 139-145.

Rogers BJ, Mygatt GG, Soderdahl DW, Hale RW, 1985: Monitoring of suspected infertile men with varicocele by the sperm penetration assay. Fertil Steril. 44: 800-805.

Ross MH, Pawlina W.2003. Histology: a Text and Atlas: with Cell and Molecular Biology, Fourth Edition, Philadelphia, ISBN 0781772001. Lippincott Williams&Wilkins. 50-65.

Sadler TW, 2010. Langman's medical embryology. Philadelphia, ISBN 9781469897806 Lippincott Williams-Wilkins, 27-39.

Samplaski MK, Agarwal A, Sharma R, Sabanegh, E, 2010. New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. Int J Urol. 17,10: 839-847.

Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED, Jr, 1981. Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. J Clin Invest. 68, 1: 39-45.

Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P, 2006. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. Toxicol. 223, 1-2: 54-60.

Shafik A, Wali MA, Abdel Azis YE, Saleh M, El-Kateb S, El-Sharkawy AG, Olfat E, 1989. Experimental model of varicocele. Europ Urol. 16: 298-303.

Shafik A, Moftah A, Olfat S, Mohi-el-Din M, el-Sayed A, 1990. Testicular veins: anatomy and role in varicocelogenesis and other pathologic conditions. Urol. 35, 2: 175-182.

Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara M, 2012. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. Int J Urol. 19, 6: 538-550.

Travis AJ, Kopf GS, 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. Clin Invest.110, 6: 731-736.

Turner TT, 2001. The study of varicocele through the use of animal models. Human Reprod Update. 7, 1: 78-84.

Ünal MS, Özer MC, Sönmez FH, Bayrak G, Demirbağ HO, 2017. Seminal sıvının fertilizasyondaki rolü. Androloji Bülteni. 19, 4: 138-143.

Vigil P, Wöhler C, Bustos-Obregón E, Comhaire F, Morales P, 1994. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. Andrologia 26: 55-60.

Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valanzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS, 1999. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. B-Cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. J Biol Chem. 274, 5: 3235-3242.

WHO (Dünya Sağlık Örgütü), 2002. Laboratuvar El Kitabı: İnsan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi. Çev. Ed. Günalp S. Ankara, Tıp Teknik Kitapevi.

WHO (Dünya Sağlık Örgütü), 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edition.

Wislocki GB, 1950. "Cytochemical reactions of human spermatozoa and seminal plasma. Anat Record. 108,4: 645-661.

7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 12/06/2017-E.60200

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 70632468-050.01.04/
Konu : Kararlar

Sayın Prof. Dr. İlhami ÇELİK

26.05.2017 tarihli "İnsan akrozomal enzimleri üzerinde enzim sitokimyasal çalışmalar" başlıklı araştırma projeniz, 07.06.2017 tarihli Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Toplantısı'nda görüşülmüş olup; kurulun konu ile ilgili 2017/187 sayılı kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Doç. Dr. Hüsnü ALPTEKİN
Başkan

NOT: 3359 sayılı Sağlık Hizmetleri Temel Kanunu Ek 10.madde hükümleri uyarınca; bazı çalışmalar için etik kurul onayı alındıktan sonra, Sağlık Bakanlığı veya bağlı kuruluşlarından izin alınması zorunlu olduğundan araştırmacıların bu hususa dikkat etmeleri gerekmektedir.

Ek : Karar sureti

Evrakı Doğrulamak İçin : http://193.255.244.181/enVision-Sorgula/Validate_Doc.aspx?V=BEKRBBD4U
Akademi Mah. Yeni İstanbul Cad. No:313 Selçuk Üniversitesi Alaeddin Keykubad Yerleşkesi Selçuklu - Konya 42250 Türkiye
Bilgi İçin: Samiye Selcen ÇELİK
Tel:3322412181 Faks:3322412184
E-Posta :dekanliktip@selcuk.edu.tr Elektronik Ağ :www.selcuk.edu.tr

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

EK-B: Bilgilendirilmiş Olur Formu

‘‘İnsan akrozomal enzimleri üzerinde enzim sitokimyasal çalışmalar” başlıklı araştırma projesinde akrozomal asit fosfataz (ACP-az), alkalin fosfataz (ALP-az) ve α-naftil asetat esteraz (ANAE) enzimlerinin sitokimyasal yöntemle belirlenerek, grupların enzim pozitivite oranlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu proje için 21-45 yaş aralığındaki sigara içen ve içmeyen, ameliyatsız veya ameliyat olmuş varikoselli 40 erkek hasta ile çalışılacaktır. Üç-beş günlük cinsel perhiz süresinin ardından mastürbasyon yoluyla verilen örnek her hasta için değerlendirilecektir. Normospermik örnekler çalışma için kullanılacakır.

Çalışma örneği olarak semen numuneleri kullanılacaktır. Bireyler açısından risk ve rahatsızlık oluşturacak bir durum söz konusu değildir.

Hastalara araştırma süresince ve sonunda bir tedavi uygulanmayacaktır.
Çalışmamız klinik bir çalışma olmadığı için bireyler açısından klinik zarar içermemektedir.
Bireylerin çalışmaya katılımı gönüllülük esasına bağlı olduğundan bireyler istedikleri bir zamanda, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilir ve araştırmadan çıkmalarını talep edebilirler.
Kişilerin sadece laboratuvar verileri kullanılacak, ilgili mevzuat gereğince gönüllünün kimliğini ortaya çıkaracak kayıtlar kesinlikle gizli tutulacaktır. Araştırma sonuçlarının yayınlanması halinde dahi gönüllünün kimliği kesinlikle gizli kalacaktır.
Araştırmanın süresi 36 ay olarak planlanmış olup araştırmaya 40 hasta dahil edilecektir.
Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur formunda yer alan yukarıdaki açıklamaları okudum.
Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim/yetkili araştırmacı tarafından yapıldı.
Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.
Yukarıda adı geçen araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı ve benden elde edilen semen örneklerinin bu çalışmada kullanılmasını kabul ediyorum.

Yetkili araştırmacının:
Adı/Soyadı:
İmzası:

Gönüllünün:
Adı/Soyadı:
İmzası:

Yasal temsilcisinin(gerekirse):
Adı/Soyadı:
İmzası:

Not: araştırma hakkında, kendi hakları hakkında veya araştırmayla ilgili herhangi bir olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bunlara günün 24 saatinde erişebileceği telefon numaraları:

Yardımcı Araştırmacı:
Ad/Soyad: Rukiye Erdoğan
Telefon: 0(507)4818061

8. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Kulu'da doğdu. İlköğretimini Kırşehir'de, ortaöğretim ve lise eğitimini Konya'da tamamladıktan sonra, 2004 yılında Kırıkkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2011 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı.