T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN SEMENİNDE ÖSTROJEN RESEPTÖRLERİ; ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE İLİŞKİSİ

Vildan AYDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Duygu DURSUNOĞLU

KONYA – 2019

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN SEMENİNDE ÖSTROJEN RESEPTÖRLERİ; ERKEK İNFERTİLİTESİ İLE İLİŞKİSİ

Vildan AYDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Dr. Öğr. Üy. Duygu DURSUNOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202003 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA – 2019

ÖNSÖZ

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda eğitimim süresince engin bilgi, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, her zaman sabır gösterip yardımcı olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Duygu Dursunoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında gerekli yardım ve tavsiyeleri ile her zaman destek olan Prof. Dr. Ender Erdoğan, Dr. Öğr. Üyesi Nejat Ünlükal, Arş. Gör. Dr. Merve Solmaz'a, çalışmam süresince, örnek toplama sürecinde yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi Kliniği'nde çalışan, Özlem Şahin'e ve Rukiye Erdoğan'a, tez çalışmam süresince yanımda olan ve yardımlarını esirgemeyen ve ayrıca arkadaşım; Arş. Gör. Fatma Göktürk'e çok teşekkür ederim.

Bana hayatım boyunca her aşamada olduğu gibi bu yolda da desteklerini benden esirgemeyen; annem Nuran, babam Fikret ve kardeşim Sacit'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ... ii
İÇİNDEKİLER ... iii
ÖZET ... viii
SUMMARY ... ix
1. GİRİŞ ... 1
1.1. Dünya'da ve Türkiye'de İnfertilite Epidemiyolojisi ... 3
1.1.1. İnfertilite ... 3
1.1.2. Küresel İnfertilite Yükü ... 4
1.1.3. İnfertilite Etiyolojisi ve Çevresel Faktörler ... 4
1.2. Erkek Üreme Sistemi ... 5
1.2.1. Spermatogenez ... 9
1.2.2. Olgun Sperm Yapısı ve Fizyolojisi ... 13
1.3. Semen Analizi ... 15
1.3.1. İlk morfolojik değerlendirme: ... 17
1.3.2. Mikroskobik Değerlendirme: ... 18
1.4. Östrojen ve Östrojen Reseptörlerinin Yapı ve Fonksiyonları ... 30
1.4.1. Östrojen Hormonu Biyosentezi ... 31
1.4.2. Östrojenlerin Etki Mekanizması ... 33
1.4.3. Erkek Üreme Sisteminde Östrojen Hormonu ve Östrojen Reseptörünün Rolü ... 35
2. GEREÇ ve YÖNTEM ... 42
2.1. Örnek Toplama ... 42
2.2. Semen Analizi ... 42
2.3. İmmünoflouresan Analiz ... 43
2.4. İstaistiksel Analiz ... 44
3. BULGULAR ... 45
3.1. Östrojen Reseptör Ekspresyonlarının Sperm Parametreleri ile İlişkisi ... 45
3.2. Östrojen Reseptör Ekspresyonlarının Sperm Parametreleri ile Korelasyonları ... 47
3.3. Östrojen Reseptör Ekspresyonlarının Sperm Morfolojik Anomalileri ile Korelasyonları ... 47
3.3.1. ER-β ekspresyonunun Sperm Morfolojik Anomalileri ile Korelasyonları ... 47

3.3.2. ER-α ekspresyonunun Sperm Morfolojik Anomalileri ile Korelasyonları 51
3.3.3. GPR30 ekspresyonunun Sperm Morfolojik Anomalileri ile Korelasyonları 54
4. TARTIŞMA 59
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 66
6. KAYNAKLAR 67
7. EKLER 78
EK-A: ETİK KURUL KARARI 78
8. ÖZGEÇMİŞ 79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Acr: Akrosin

AR: Androjen Reseptörü

ARKO: Aromataz Knock-out

ARS:Aşırı Rezidüel Sitoplazma

ASA: Antisperm Antikorları

ATPaz: Adenozin Trifosfataz

BPA: Bisphenol A

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

CASA: Bilgisayar Yardımlı Sperm Analizi

Ca^{+2} : Kalsiyum iyonları

CO_2: Karbondioksit

CYP19: Cytochrome P450 Family 19

DHT: Dehidrotestosteron

DNA: Deoksiribonükleik Asit

E1: Östrone

E2: Östrodiol

E3: Östriol

ER: Östrojen Reseptörü

ERa36: Östrojen Reseptörü 36 kDa varyantı

ERa46: Östrojen Reseptörü 46 kDa varyantı

ER- α: Östrojen Reseptörü Alfa

ER-β: Östrojen Reseptörü Beta

ERKO: Östrojen Reseptör Knock-out

EST: Östrojen Sülfotransferaz

ESR1: Östrojen Reseptörü 1 (Alfa)

ESR2: Östrojen Reseptörü 2 (Beta)

EST: Östrojen Sülfotransferaz

FITC: Fluorescein isothiocyanate

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

GC-2 Hücreleri: Fare Spermatosit Hücre Hattı

GnRH: Gonadotropin Hormon

GPER: G Protein-birleşik Östrojen Reseptörü

GPCR: G protein-bağlı Reseptör

GPR30: G-Protein-bağlı Reseptör 30

HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

HHG: Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal Aks

HOS: Hipoozmotik Şişme Metodu

IM: İmmotilite

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

LH: Lüteinizan Hormon

NAD: Nikotin adenin dinükleotid

NADPH: Nikotinamid Dinükleotid Fosfat

NP: Non-Progresif Motilite

OS: Oksidatif Stres

PBS: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponlu tuz solüsyonu)

pH: Power of Hydrogen

PR: Prograsif Motilite

RFP: Kırmızı Flüoresan Proteini

RNA: Ribonükleikasit

SH: Steroid Hormonlar

SKH: Spermatogonial Kök Hücre

TPMSS: Total Progresif Motil Sperm Sayısı

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İnsan Semeninde Östrojen Reseptörleri; Erkek İnfertilitesi ile İlişkisi

Vildan AYDOĞAN

Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA 2019

İnfertil çiftlerin %20-50'sinde infertilite erkek kaynaklıdır. Östrojenlerin erkek üreme fonksiyonlarında önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Östrojenler, erkek üreme sisteminde Sertoli, Leydig ve germ hücreleri tarafından sentezlenmekte ve testislerde tespit edilebilmekte, özellikle bazı türlerin semenlerinde çok yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Klasik olarak östrojenler etkilerini ER-α ve ER-β olarak bilinen nükleer reseptörler aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Ancak son yıllarda, östrojenin hızlı etkisini, G-protein-bağlı reseptör GPR30 denilen bir membran reseptörü aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Ancak günümüzde insan semeninde östrojenin etkileri ve östrojen reseptörlerinin ve özellikle GPR30 reseptörünün ekspresyonları ile ilgili bilinenler oldukça sınırlıdır..

Bu çalışmada, insan semeninde östrojen reseptörlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi ve sperm kalitesi ve infertilite üzerindeki etkilerinin ortaya konması amaçlandı.

Çalışmada S.Ü Tıp Fakültesi Hastanesi, Androloji Laboratuarına rutin semen analizi için başvuran 18-45 yaş arası hastaların semen örnekleri kullanıldı. Hastaların rutin semen analizleri yapıldıktan sonra semen parametreleri kaydedildi. Semen örnekleri immunofluoresan boyama ile ER-α, ER-β ve GPR30 reseptörleri için primer antikorlar kullanılarak boyandı. Fluoresan mikroskop altında reseptör eksprese eden sperm hücreleri sayılarak yüzdeleri belirlendi. Reseptör ekspresyon yüzdeleri ile semen parametreleri arasındaki ilişki istatistiksel olarak değerlendirildi.

Sonuçlarımız; insan semeninde östrojen reseptörlerinin varlığını ortaya koydu. Östrojen reseptörlerinin semen parametrelerinden özellikle sperm konsantrasyonu ve bazı morfolojik bozuklukları ile ilişkili olduğu; spermlerde östrojen reseptör ekspresyonunda azalmanın sperm konsantrasyonunda azalmaya ve bazı morfolojik bozukluklarda artışa neden olduğu saptandı. Sonuç olarak spermlerde eksprese edilen östrojen reseptörlerinin semen kalitesi üzerinde etkili olduğunu ve reseptör ekspresyonunun azalmasının infertiliteye neden olabileceğini gösterdik. Çalışmamız bu anlamda erkek infertilitesinin tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

Anahtar Sözcükler: ER-α; ER-β; GPR30; İnfertilite; Östrojen Reseptörleri; Sperm

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY

HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Estrogen Receptors in Human Semen; The Relationship with Male Infertility

Vildan AYDOĞAN

Department of Histology and Embriology

MASTER THESIS / KONYA 2019

Infertility is of male origin in 20-50% of infertile couples. Estrogens are known to have important roles in male reproductive functions. Estrogens are also synthesized in the male reproductive system by Sertoli, Leydig and germ cells and can be detected in the testes, especially in very high concentrations in the semen of some species. Conventionally, estrogens act via nuclear receptors known as ER-alpha and ER-beta. In recent years, however, it has been shown that the rapid effect of estrogen is achieved through a membrane receptor called the G-protein-linked receptor; GPR30. Today, little is known about the effects of estrogen in human semen and the expression of estrogen receptors, particularly the expression of the GPR30 receptor.

The aim of this study was to determine the expression of estrogen receptors in human semen and their association with the sperm parameters.

In this study, semen samples of patients aged 18-45 years who applied to the Andrology Laboratory of the Medical Faculty Hospital of Selçuk Unıversıty for routine semen analysis were used. Semen parameters were recorded after routine semen analysis. Semen samples were stained by immunofluorescence staining using primary antibodies for ER-α, ER-β and GPR30 receptors. Under fluorescence microscope, receptor-expressing sperm cells were counted and their percentages determined. The relationship between percent of receptor expression and semen parameters was evaluated statistically.

Our results; revealed the presence of estrogen receptors in human semen. Estrogen receptors were found to be associated with semen parameters, especially sperm concentration and some morphological disorders. It was found that decrease in estrogen receptor expression in sperm caused decreased sperm concentration and increased some morphological disorders. In conclusion, we demonstrated that estrogen receptors expressed in sperm influence semen quality and decreased receptor expression may cause infertility. In this sense, our study may contribute to the development of new strategies in the treatment of male infertility.

Keywords: ER-α; ER-β; GPR30; Infertility; Estrogen Receptors; Sperm

1. GİRİŞ

İnfertilitenin demografik, klinik ya da epidemiyolojik açıdan birçok tanımı yapılabilir. Klinik olarak tanımı ise 12-24 ay boyunca gebelik başarısızlığını temel almaktadır (Gurunath ve ark 2011). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) infertiliteyi “bir yıl süreyle korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamama" olarak tarif etmiştir (WHO 2010). Dünyada infertilite oranı % 8-12 arasında olup, Türkiye’de bu oran %10-20 arasında değişmektedir. İnfertilite erkek, kadın ya da her ikisi kaynaklı veya açıklanamayan nedenli olabilir. İnfertilitenin %20-50’sini erkek faktörü oluştururken, %40-50’si kadın faktöründen kaynaklanmaktadır (Tournaye ve Cohlen 2012). Erkek infertilitesinin bilinen etiyolojileri arasında idiyopatik erkek infertilitesi, varikosel, hipogonadizm, ürogenital infeksiyon, inmemiş testis, semen oluşumunda bozukluk ve seksüel faktörler, yaygın ve sistemik hastalıklar, tıkanıklıklar ve diğer anomaliler yer almaktadır. Ayrıca erkek infertilitesinin birçok nedeni arasında oksidatif stres (OS) de önemli bir yer tutmaktadır (Kamel 2010). Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde semen analizi çok büyük önem taşımaktadır. İnsan sperması, hücresel, kimyasal bileşenleriyle ve bu sıvıyı üreten organların işlevsel özellikleri hakkında bilgi sağlar (Eliasson 2010) . Semen analizinde, spermiyogram dediğimiz yöntemle spermlerin sayı, hareket özellikleri, canlılık oranları ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesi esastır. Semenin hücresel olmayan kısmı üzerindeki çalışmalar ilk kez 1933 yılında Huggins ve Johnson’ın semen biyokimyası ile ilgili yaptığı çalışmalar ile başlamıştır (Overstreet ve Katz 1987). Mann, sperm sayısının normal olması yanında seminal sıvının kimyasal komponentinin de fertilizasyon için önemli olduğunu ilk kez 1960’lı yıllarda göstermiştir (Mann 1964). Sperm sayımının yanı sıra semenin biyokimyasal analizlerinin yapılmasıyla erkek infertilitesi hakkında daha fazla bilgi sahibi olunmuş ve semenin hormon komponentlerindeki bozuklukların da infertiliteye neden olduğu anlaşılmıştır.

Seks steroid hormonları, kadın ve erkeklerde üreme fonksiyonlarını düzenleyen temel moleküllerdir. Androjenler, spermatogenezisin başlaması ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Androjenler testiküler dokudaki etkilerini androjen reseptörüne (AR) bağlanarak gösterirler. Androjenlerin etkisine, androjenlerin östrojenlere dönüşmesini katalize eden aromataz enzimi aracılık etmektedir. Aromataz transkriptleri, insan ejakülat spermatozoalarında gösterilmiştir

(Aquila ve ark 2002). Östrojenler doğal olarak, kolesterolden türeyen C18 steroidlerdir. 17β- östrodiol (E2), östrone (E1) ve östriol (E3) olmak üzere üç tip östrojen bulunmaktadır. Östrojenlerin erkek üreme fonksiyonlarında da önemli rolleri olduğunu gösteren gittikçe artan sayıda çalışma bulunmaktadır. Östrojenlerin, özellikle bazı türlerin testislerinde tespit edildiği ve semenlerinde çok yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu rapor edilmiştir (Hess ve ark 2001). Erkeklerde östrojen seviyelerindeki artış, CYP19 geninin ürünü olan aromataz enziminin etkisi ile androjenlerin östrojenlere periferal aromatizasyonu sonucu gerçekleşmektedir (Bulun ve ark 2003). Bu durumun erkeklerde spermatogenezisin bozulmasına ve fertilitenin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Hammoud ve ark 2008). Ancak diğer yandan memeli efferent kanallarında testiküler sıvının geri emiliminde androjenler yerine östrojenlerin etkili olduğu (Oliveira ve ark 2011), semenin östrojen dengesinin bozulmasıyla efferent duktuslarda testis sıvı geri emilim mekanizmasının bozulduğu görülmüştür.

Steroid hormonları, geç genomik ya da hızlı non-genomik olmak üzere iki farklı yolla etkilerini gerçekleştirmektedir (Wang ve ark 2014). Geç etki nükleer reseptörler aracılığıyla gerçekleşirken, hızlı etki plazma membranına lokalize reseptörler aracılığıyla olmaktadır. Klasik olarak, östrojenler, nukleusda yerleşen östrojen reseptörleri (ER) ER-α ve ER-β'ya bağlanarak etki göstermektedir. Ancak son yıllarda, östrojenin hızlı etkisini, G-protein-bağlı reseptör (GPR30) denilen bir membran reseptörü aracılığıyla gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Chimento ve ark 2010). GPR30, östrojenlere yüksek afiniteli ve düşük kapasiteli bağlanma gösteren yeni bir membran estrojen reseptörüdür (Wang ve ark 2017). Real-time PCR ya da immunohistokimya kullanılarak yapılan bazı çalışmalarda östrojen reseptörü alfa (ER-α), östrojen reseptörü beta (ER-β) ve GPR30'un fare spermatositlerinde ve rat testislerinde eksprese edildiği gösterilmiştir (Menad ve ark 2017). Esas olarak somatik hücrelerde lokalize olan androjen reseptörlerinin aksine, östrojen reseptörleri, germ hücreleri de dahil olmak üzere testis hücrelerinin çoğunda eksprese edilmektedir (Carreau ve ark 2011, Menad ve ark 2017, Wang ve ark 2017). Ancak östrojenlerin erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerini gerçekleştirme mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Östrojenler, Na-K ATPaz, karbonik anhidraz, Na-H dönüştürücü ve aquaporinler gibi bazı kilit proteinleri düzenlemektedir. Bu proteinler östrojen reseptörleri tarafından regüle edilirler. Özellikle ER-α sperm olgunlaşması

ve işlevi için gerekli sıvı osmolatilesi ve asitlenmesini düzenlemektedir. 17-beta östradiolün GPR30 ve ER-α reseptörleri yoluyla rat spermatositlerinde apoptozisi indüklediği rapor edilmiştir (Chimento ve ark 2010). Ancak yapılan bir diğer çalışmada ise 17-beta östradiolün GPR30 aracılığıyla fare spermatogonial hücrelerinde proliferatif etki gösterdiği bildirilmiştir (Sirianni ve ark 2008). Dolayısıyla östrojenlerin ve östrojen reseptörlerinin insan spermlerinin oluşması ve olgunlaşmaları ve fonksiyonları üzerindeki etkisi ve semen kalitesi ile ilişkisi günümüzde tam olarak bilinmemektedir.

Bu çalışmada insan semeninde östrojen reseptörlerinin ekspresyonları ve sperm parametreleri ile ilişkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. İnfertilite şikayeti ile gelen, spermiogram testi yapılan, sigara ve alkol kullanmayan, kemoterapi, radyoterapi gibi bir tedavi almayan, sperm parametrelerini değiştirdiği bilinen başka bir neden olmaksızın, çalışmaya katılmayı gönüllü olarak kabul eden, 18-45 yaş aralığında bulunan 30 erkek bireyde östrojen reseptör ekspresyonları immünflouresan yöntemle değerlendirilmiştir. Çalışmamız bu anlamda erkek infertilitesinin tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlaması açısından önemlidir.

1.1. Dünya'da ve Türkiye'de İnfertilite Epidemiyolojisi

Fertilite tarih boyunca soyun sürdürülebilmesi amacıyla önemli olmuştur. Bilinen tarihi belgelerin çoğunda buna ilişkin hikâyeler ya da öğütler bulunmaktadır. Bunların en eski örneklerinden olan ve insan üreme sistemini anlatan Kahun Papirusu 400 yaşındadır (Haimov-Kochman ve ark (2005).

1.1.1. İnfertilite

Tıbbi literatüre bakıldığında infertilitenin tanımlanmasında demografik, klinik ya da epidemiyolojik yaklaşımlar arasında faklılıklar görülmektedir (Zegers-Hochschild ve ark 2009).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün tanımına göre ise infertilite, 12 ay veya daha uzun süreyle düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrasında gebelik elde etmedeki yetersizlik olarak tanımlanan bir üreme sistemi hastalığıdır (Zegers-Hochschild ve ark 2009). Klinik tanım 12-24 ay boyunca gebelik başarısızlığını temel alırken,

demograflara göre infertilite cinsel yönden aktif ve gebeliği önleyici yöntem kullanmayan bir kadının canlı doğum yapmamış olmasını almaktadır. Epidemiyoglar ise gebelik riskine sahip kadınların, gebe kalmak için sergilediği yaklaşımı ve süreyi baz almaktır (Gurunath ve ark 2011).

1.1.2. Küresel İnfertilite Yükü

İnfertilite, altı çiftten en az bir tanesini etkileyen, dünya çapında önemli bir sorundur.

Gelişmiş ülkelerin bazılarında 12 aylık prevalans sınırları %3,5 ile %16,7 arasında, az gelişmiş ülkelerde %6,9- 9,3 arasında değişmekte ve toplam median prevalansın %9 olduğu ön görülmektedir (Boivin ve ark 2007). Dünya genelinde erkek infertilitesine bakıldığında Swan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ABD, Avrupa ve Avustralya'da semen kalitesindeki önemli düşüş olduğu gösterilmiştir. Bu araştırmalar sperm dansitesindeki yıllık azalmayı ABD'de yaklaşık %1.5, Avrupa ve Avustralya'da ise % 3,0 olarak rapor etmişlerdir (Loughlin 2012).

Ülkemizde erkek infertilitesi için ilk nüfus sayımı 1990 sonuçlarına göre 15-49 yaş arası evli kadınlardaki infertilite oranı %8,5'tir (Kavlak S. 2002). Türkiye'de üremeye engel yöntem kullanmayan 15-49 yaş grubundaki evli kadınların beyanına göre indirekt hesaplanan infertilite oranı %2,5 civarındadır (Sayli ve ark 2003).

İnfertil çiftlerin erkek faktörünü %20-50'sini oluştururken, %40-50'sini kadın faktörü oluşturmaktadır. Doğurganlığı her iki tarafın etkilediği çiftlerin oranı ise %20-25'dir. İnfertil çiftlerin %15'inde ise yapılan tetkiklere rağmen infertilite nedeni açıklanamamıştır (Tournaye ve Cohlen 2012).

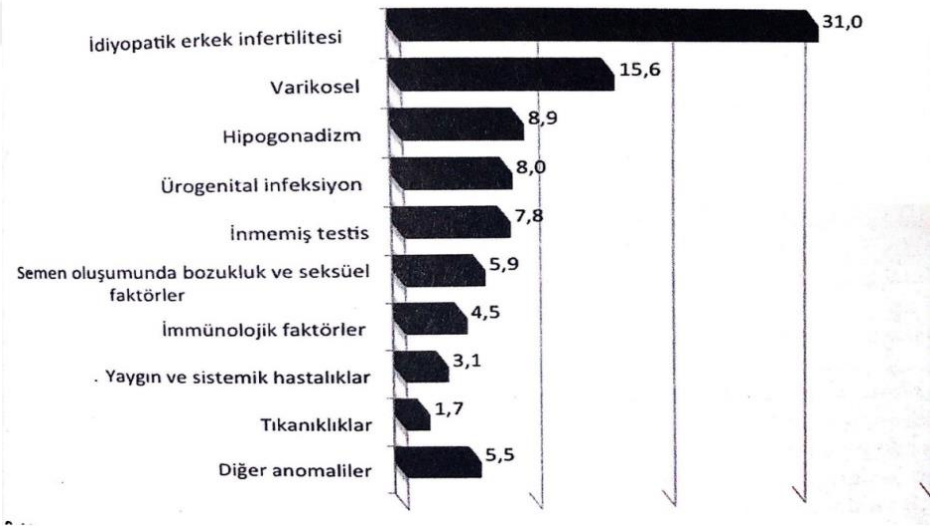
1.1.3. İnfertilite Etiyolojisi ve Çevresel Faktörler

Literatür araştırmaları sonucunda en sık karşılaşılan infertilite nedenleri erkeğe ait nedenlerden sperm anomalileri, kadına ait nedenlerden ise ovulatuvar fonksiyon bozuklukları ve tubal patolojiler gibi nedenler görülmektedir. Hem kadın hem erkeğe ait faktörlerin kesin nedenin saptanamadığı idiyopatik infertilitedir (Kamel 2010).

Erkek infertilitesi

Erkek faktörler tek başına tüm infertilite vakalarının %30-40'ını oluşturur. Erkek infertilitesinin bilinen etiyolojileri arasında idiyopatik erkek infertilitesi, varikosel, hipogonadizm, ürogenital infeksiyon, inmemiş testis, semen oluşumunda bozukluk ve seksüel faktörler, yaygın ve sistemik hastalıklar, tıkanıklıklar ve diğer anomaliler yer almaktadır. Ayrıca erkek infertilitesinin birçok nedeni arasından oksidatif stres (OS) de bulunmaktadır (Kamel 2010) (Şekil 1.1.3.1.).

İdiyopatik erkek infertilitesi çevresel kirliliği, reaktif oksijen türevleri veya genetik anormallikler gibi endokrin bozukluk içeren birçok faktörle açıklanabilir. İnfertil erkeklerin %15'inde çeşitli genetik bozukluklar saptanmaktadır. Fi (2006), Akgul ve ark (2009)'nın yaptıkları çalışmada ülkemizde infertil erkeklerde gonozomal ve kromozom düzensizlik oranlarının, literatürden yaklaşık üç kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir. İnfertil erkeklerde en sık rastlanan kromozomal neden %10.8 oranında anöploidi, en sık rastlanan anomali ise Kleinfelter Sendromu'dur (Etem ve ark 2009).



Şekil 1.1.3.1. Erkek infertilitesi ile ilişkili faktörlerin dağılımı (Aşçı ve ark 2013).

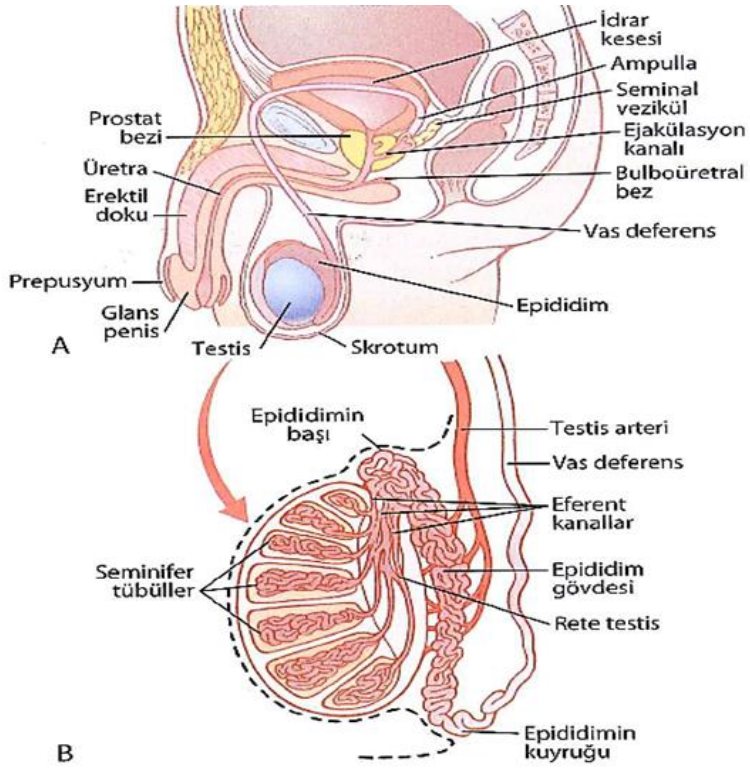
1.2. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi sırasıyla skrotum içinde asılı bulunan iki adet testis, penis, epididimis, genital kanallar ve yardımcı üreme bezlerinden oluşmaktadır (Aşçı ve ark 2013) **(**Şekil 1.2.1.).

Testis; öncelikle görevi spermatozoa olarak bilinen erkek gamet üretimi, depolanması ve androjen (testosteron) hormon salınımından sorumludur. Testislerin şekli oval olup, 4 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde ve 3cm kalınlığındadır. Embriyonik dönemde abdomal boşluğun dorsal duvarında periton zarının arasında bulunuyorken, gelişim sırasında hareket ettirilir (Gardner ve James 2001). Spermatogenez sırasında sıcaklık, 37°C'nin altında olması gerekir. Skrotumda yaklaşık 34°C'lik bir testiküler sıcaklık muhafaza edilir. Her testis, testisküler arter yoluyla kanlanır. 3°C'lik düşüşlük zıt yönlü akım sıcalık değişim mekanizması ile sağlanır. Bu mekanizma ise; testüküler arter ve testisten abdominal venlere kanı taşıyan pampiniform venöz pleksus ile gerçekleşir (Ross ve Pawlina 2014).

Testisler skrotuma hareket ederken bir miktar da peritonu beraberinde taşırlar. Bu yapı tunika vaginalis'i meydana getirir. Tunika vaginalis'in görevi testisin skrotum içinde biraz hareketli kalmasını sağlar. Testisin histolojisine baktığımızda en dış tabakasında bağ dokusundan oluşmuş tunika albuginea bulunmaktadır. Tunika albuginea'nın altında ise zengin damarlardan oluşmuş tunika vasküloza bulunmaktadır. Tunika albuginea'nın iç kısmı kalınlaşarak septaları meydana getirir. Septalar sonucunda ayrılan bölümler piramit şeklinde olup yaklaşık 250 tanedir ve bu bölümlere testiküler lobüller adı verilir (Gardner ve James 2001). Testiküler lobüllerde 1-4 adet seminifer tübüller bulunmaktadır. Seminifer tübüllerin bağ dokusunda Leyding hücreleri bulunmaktadır. Böylece seminifer tübüllerin görevi; hem testosteron üretmek hem de spermatozoaları üretmektir (Junqueira ve ark 2009).

Seminifer tübüller; Sertoli hücreleri ve spermatojenik hücreler (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatitler) den oluşmuştur. Seminifer tübüller seminifer epitelyum ile döşeli ortasında lümen bulunmaktadır (Aşçı ve ark 2013). Seminifer tübüller yaklaşık 900'den fazla olup, yarım metreden uzunluğundadır (Hall 2015). Seminifer tübüllerde bulunan bir başka hücre tipi ise kasılabilir myoid hücrelerdir. Bu hücrelerin görevleri olgunlaşmamış, hareketsiz spermleri rete testise ulaştırmaktır. Bu hücrelerin dışında fibroblastlar, kollajen lifler bulunur (Aşçı ve ark 2013).



Şekil 1.2.1. Erkek genital sistemi ve testis ve epididim ayrıntılı yapısı (Hall 2015).

Sertoli hücreleri; görevleri spermetogenik hücreleri desteklemek, beslemek ve korumak, spermiyogenezin sonunda oluşan atıkları fagosite etmek, olgun spermiyogenez sürecinde spermatidlerin seminifer lümenine hareketini sağlamak, seminifer tübül lümenine proetein ve iyon açısından zengin sıvı salgılamaktır (Aşçı ve ark 2013). Sertoli hücreleri, ön hipofiz bezinden sekrete edilen FSH (Folikül Uyarıcı Hormon)'a cevap verirler. FSH, testosteron ve dihidrotestosteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesine sahip androjen bağlayıcı protein (ABP)'yü düzenler. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Sertoli hücrelerinin hücre zarında bulunan ER-α ve ER-β sayesinde 17-β estradiol bağlanması gerçekleşir. Böylece testiküler gelişim, hemostazis ve proliferasyon mekanizmaları düzenlenir (Lucas ve ark 2011).

Kan Testis bariyeri: Sertoli hücreleri arasında okludens bağlantılar taradından oluşturulurlar. Kan testis bariyerinin görevi, gelişmekte olan spermatogenik hücrleerden protein sızmasını böylece immün cevabın tetiklenmesini engellemektir. Ters yönde de düşünürsek antikorların spermatogenik hücrelere zarar vermesinin engellenmesidir (Kierszenbaum 2002). Kan testis bariyerini oluşturan hücreler sonradan gelişirlerse spermatogenez sırasında mayoz bölünmede arrest

(duraklatmak) gerçekleşir. Kan testis bariyerinde bozulmalar meydana geldiğinde spermatogenez sırasında farklılaşmanın olmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda sertoli hücrelerinde bulunan Filamin A molekülünün kan testis bariyerinin oluşumunda etkili olduğu vurgulanmıştır (Su ve ark 2012).

Testis içindeki kanallar; tubuli rekti, rete testis, efferent ductustur. Seminifer tübüller tubuli rekti (düz şeklindedir) rete testise bağlanır. Rete testis kanallarından 10-20 arasında değişen efferent kanallara çıkar. Efferent ductusların görevi henüz dölleme kapasitesi olmayan spermleri epididimise doğru taşır. Effent ductuslar bu taşıma görevinden dolayı silli hücreli ve lümenindeki sıvının reabsorpsiyondan sorumlu sterosilyalı ve prizmatik epitel ile kaplıdır. Silyasız hücreler ise seminifer tübüllerden salgılanan sıvının geri emilmesinden sorumludur (Kierszenbaum 2002, Junqueira ve ark 2009).

Genital kanallar; epididimis ve ductus deferenstir. Epididimis (ductus epididimis), görevi spermatozoonların maturasyonu (dölleyebilme özellikleri için ileriye doğru hareket etme yetenekleri) ve ovumu fertilize edebilme yeteneği kazandırır. Epididimisde dekapasitasyon faktörü içeren glikokonjugatlarının eklenmesiyle geri dönüşümlü olarak spermin fertilize etme yeteneği inhibe edilir. Dişi üreme kanalında kapasitasyondan önce dekapasitasyon faktörü salıverilir. 4-6 m uzunluğunda oldukça kıvrımlıdır. Temel olarak üç ana bölgeye ayrılır. Bunlar baş, gövde ve kuyruktur. Yalancı çok katlı prizmatik hücreler ile döşelidir. Bu hücreler peristailtik kasılmalar sağlayan düz kas hücrelerinin üzerinde bulunurlar (Kierszenbaum 2002, Junqueira ve ark 2009, Ross ve Pawlina 2014). Prizmatik epitel hücrelerin yüzeyinde stereosilyalar bulunur. Stereosilyalar yüzey alanı büyültür böylece testisten spermatozoonlarla gelen fazla sıvının emilmesinde görevlidir. Spermatozonlar epididimisi birkaç haftada geçerler. Bu geçiş sırasında spermatozoonlar olgunlaşır, hareket ve dölleme yeteneğine sahip olurlar (Ovalle ve Nahirney 2009). Epididimisin her bir bölümü farklı fonksiyon özelliğine sahiptir. Baş (caput) bölümü hücre- hücre adezyonu ile ilgiliyken, gövde (corpus) bölümü bağışıklık fonksiyonu ile ilgilidir. Kuyruk (corpus) bölümü ise hücre farklılaşmasında görevldir (Sullivan ve ark 2011). Epididimisin baş (caput) bölümü düz kaslarla uyarılırken, kuyruk (corpus) bölümü ise ejakülasyonu başlatan adrenerjik sinirler stimüle eder (Ovalle ve Nahirney 2009).

Ductus deferens (vas deferens); epididimisten sonra prostat bezine bağlanan, spermatozoonların iletimini sağlayan kanaldır (Hall 2015). Vas deferens kalın düz kas tabakasından oluşur. Bu tabakanın görevi ejakülasyon sırasında spermatozoonun fışkırmasını sağlar. Stereosilya, yalancı çok katlı epitelden oluşur. Ductus deferens prostat bezine girmeden önce genişler ve ampullayı meydana getirir (Aşçı ve ark 2013).

Yardımcı Genital Bezler; seminal veziküller, prostat bezi ve bulbouretral bezi (Cowper Bezleri) kapsamaktadır. Seminal veziküller, kıvrımlı, uzunluğu 15 cm olan kanallardır. Veziküla seminalisin kısa boşaltım kanalı ductus deferensin ampullası ile birleşerek ejakülatuar kanalı oluşturur. Görevleri, spermatozoonları aktive eden sitrat, inozitol, prostoglandin, früktoz, aminoasitler ve çeşitli proteinleri içeren salgı maddesi üretirler. Visköz, sarımsı renktedir. İnsan ejakülatının yaklaşık %70'i seminal veziküllerin salgısıdır. Testosteronun kontrolü altındadır (Aşçı ve ark 2013, Ross ve Pawlina 2014).

Prostat bezi; 30-50 adet tübüloalveoler bezlerden oluşmuştur (Junqueira ve ark 2009). Kalsiyım, sitrat, fosfat, pıhtılaşma enzimi ve fibrinolizin içeren sıvı salgılar. Ovumun döllenmesinde prostat sıvısının hafif alkali özelliği ön plana çıkmaktadır(Hall 2015). Ejakülat sıvısın %15-30'unu prostat salgısı oluşturur (Yücetürk 2011).

Bulbouretral bez (Cowper Bezleri); Prostatın altında ve üretranın iki yanında yer alan, bezelye büyüklüğünde bir çift salgı bezidir. Cinsel uyarılma ile mukus benzeri alkali bir sıvı salgılamaya başlarlar. Alkali özelliğinden dolayı idrarın asidik özelliğini nötralize eder (Tanagho 1992).

1.2.1. Spermatogenez

Spermatogenez, seminifer tübüllerinde gerçekleşir (Gardner ve James 2001). Spermatogenez, spermatogonyal kök hücre (SKH) havuzundaki germ hücrelerinin farklılaşıp sperm oluşturması sürecine denir (Aşçı ve ark 2013).

Embriyonik dönemde, primordiyal germ hücreleri testislere doğru migrasyon halindedir. Primordiyal germ hücreleri seminifer tübüllerin iç yüzeylerinin iki veya üç katmanında bulunan spermatogonyum denilen olgunlaşmamış germ hücreleri

haline dönüşürler. Spermatogonyum, puberteden itibaren başlayarak, hücre bölünmeleri (mitoz ve mayoz bölünmeleri) sonucunda ve farklılaşıp, olgunlaşmaları sonucunda sperm oluşturmak için sürekli olarak çoğalır (Gartner ve Hiatt 2007).

Spermatogenesis, ön hipofiz gonadotropik hormonların uyarılması sonucunda ortalama 13 yaşında başlar, oogenezden farklı olarak hayatın geri kalan bölümünün çoğunda devam eden ancak yaşlılık döneminde gözle görülür olarak düşer, seminifer tübüllerde görülür (Ross 2006.).

Spermatogenez 3 evreye ayrılır.

Birinci evre (Spermatogonyal): Spermatogonyal kök hücrelerinin mitoz bölünme geçirdiği evredir. Bu evre embriyonik dönemde gerçekleşir.

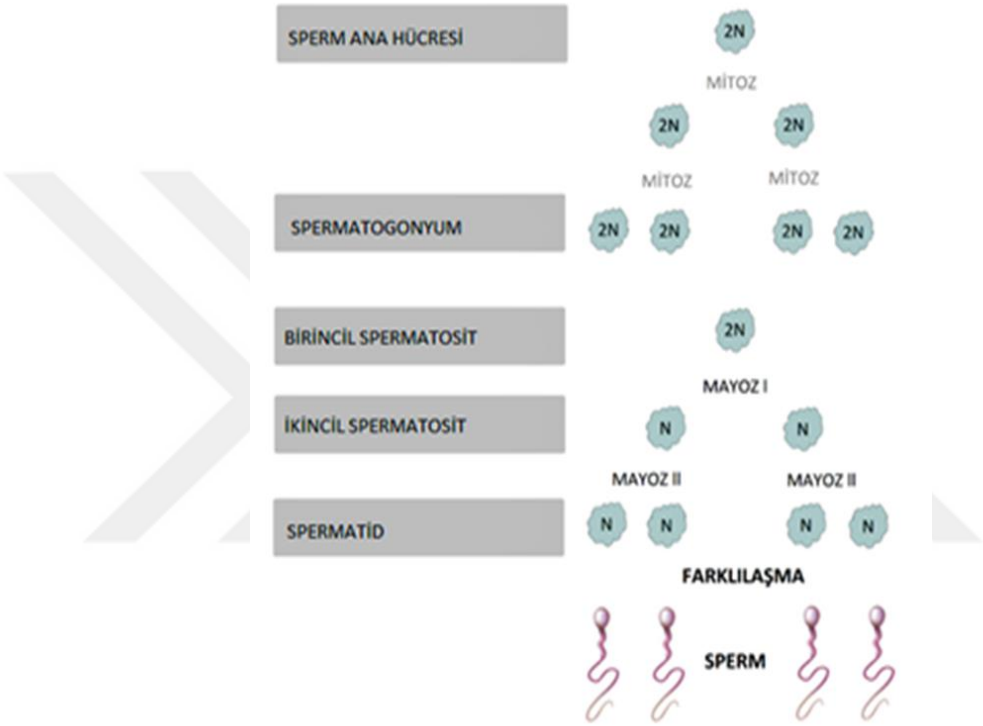
İkinci evre (Spermatosit): Germ hücrelerinin (spermatosit) mayotik evre sonunda haploid kromozomlu spermagametleri oluşturmasıdır.

Üçüncü evresi ise (Spermatid): Spermatidlerin yapısal olarak değişikliğe uğraması sonucunda matür ve fonksiyon spermatozoa haline gelmesidir (Strauss ve Barbieri 2013).

Spermatogeneziste spermatogonyumlar, seminifer epitelde, sertoli hücreleri tarafından çevrilmiştir. Spermatogonya hücreleri, mayoz bölüme sonucunda dölleme yeteneğine sahip sperm hücrelerini oluşturmak için öncelikle hızlı mitoz bölünme geçirerek germ hücrelerini oluştururlar. İki tip spermatogonya hücreleri vardır. Tip A ve Tip B olarak. Tip A spermatogonya hücreleri; spermatogonya hücrelerinin olası kök hücreleridir. Hasarlanmaya yanıt verme, farklılaşma, hücre devamını üretme gibi birden fazla fonksiyona sahiptirler. Gonodotoksin (kemoterapi, radyoterapi) gibi etkenler ve infertiliteye neden olan bazı genetik nedenler Tip A hücrelerinde hasarlanmaya neden olabilirler. Tip B hücresi; bu tip spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirmesi sonucunda, mayoz bölünme geçirecek olan primer spermatositler oluşur (Strauss ve Barbieri 2013).

Mayoz bölünmenin I. aşamasında profaz evresinde primer spermatositler 4d DNA, 46 (44+XY/XX) taşıyan kromozomlar içerirler. İnsanda spermatogenezin en uzun evresi profaz evresidir. Yaklaşık 22 gün sürer. Profaz I evresinde krossing over gerçekleşir, takiben metafaz, anafaz, telofaz ve son olarak sitokinez gerçekleşir. İlk

mayoz bölünmenin tamamlanmasının sonucunda kromozom sayısı (2N'den 1N'ye) ve DNA miktarı (4d'den 2d'ye) azalır. Mayoz I sonucunda sekonder spermatositler oluşur. Böylece hücre başına (22+X veya 22+Y, 2d DNA miktarı) düşmüştür. İkinci mayozda replikasyon olmadığı için oluşan hücreye spermatid denir ve her bir spermatid 1N kromozom sayısı ve 1d DNA miktarına sahiptir. Spermatidler seminifer lümene yakın, küçük boyutlu hücrelerdir (Strauss ve Barbieri 2013, Ross ve Pawlina 2014) **(**Şekil 1.2.1.1.).



Şekil 1.2.1.1. Spermatogenez aşamaları (Gök 2017).

Spermatogenezin hormonal kontrol mekanizması:

1) Testosteron; Gamet hücrelerin oluşmasında, erkeklere ait ikincil cinsiyet hormonudur. Yani, bireylere erkekliğe has özellikler kazandırır. Leydig hücreleri tarafından salgılanır.

2) Lüteinizan hormon (LH); ön hipofiz bezinden salgılanarak, leydig hücrelerini stimüle eder ve böylece testisten testosteron hormonu salgılanır.

3) Folikül stimüle edici hormon (FSH); ön hipofiz bezi tarafından sekrete edilip kana verilir, testis bulunan sertoli hücrelerini uyarır; bu uyarılmanın sonucunda spermatogenez meydana gelir.

4) Östrojen; ön hipofiz bezi tarafından salgılanan FSH tarafından uyarılan testislerde sertoli hücrelerinde salgılanır ve spermiyogenez için gereklidir (Hall 2015).

Spermatidler, son olarak farklılaşma sürecine girerler bu sürece spermiyogenez denir. Bu süreç dört evreye ayrılır (Ross ve Pawlina 2014) (Şekil 1.2.1.2.).

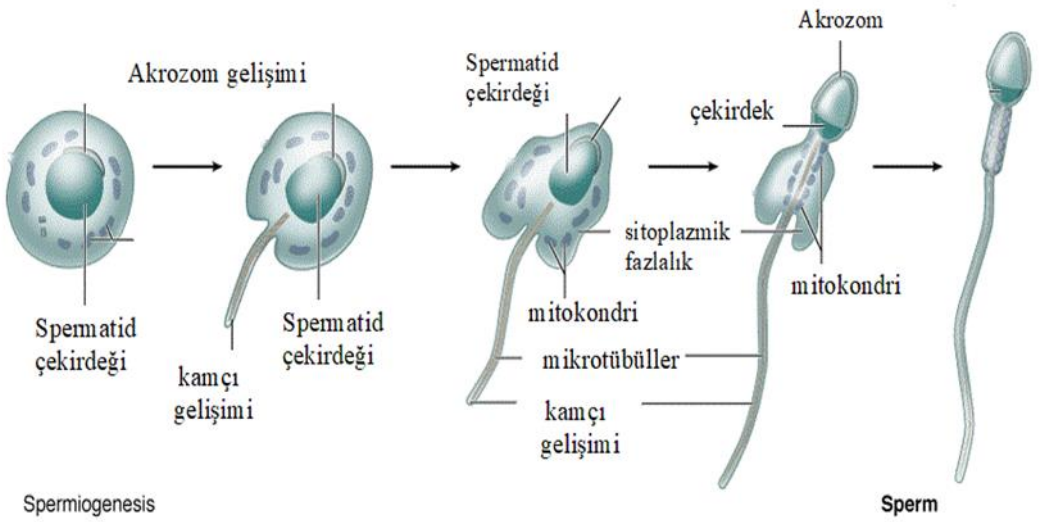
İlk evreye Golgi evresi de denir. Sitoplazmada belirgin Golgi, mitokondri, bir çift sentriol, birçok serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum içerirler. Bu evre Spermatid çekirdeğinin yanında Golgi kompleksinde kümelenen, PAS (periyodik asit – Schiff) granüllerin bulunması ile karakterizedir. Bu granüller birleşerek akrozom veziküllerini meydana getirirler. Akrozomal vezikülün pozisyonu, spermin ön kutbunu belirler. Bu evrede sentriyoller akrozoma zıt eksende, spermin arka kutbuna göç ederler. Sentrioller, dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi mikrotübüllerinin birleşmesi sonucunda sperm kuyruğunun aksonemini oluşturur (Strauss ve Barbieri 2013, Ross ve Pawlina 2014).

İkinci evre Kep evresidir. Akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısının üzerine yayılır. Nüklear içerik yoğunlaşır (Ross ve Pawlina 2014).

Üçüncü evre Akrozom evresidir. Bu evrede akrozom veziküller iyice yayılır. Akrozom veziküllerin içinde Hidrolitik enzimler (hyalurinidaz, noraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri proteazlar) içerirler. Akrozom enzimlerinin görevi, ovumun kumulus kompleksini ve zona pellusidasını geçmektir. Spermin akrozomunda bulunan serin proteinaz olan zona pellusidanın tanınması ve bağlanması ile ilgili olduğu düşünülen akrozin proteini bulunmaktadır. Bu protein Acr geni tarafından kodlanmaktadır. Acr geni çıkarılmış (knockout) fare modellerinin de fertil olduğu saptanmıştır. Ancak akrozin proteini içermeyen farelerin spermatozoasında fertilizasyon gecikmektedir. Mitokondriyonlar orta parçadakaba fibrillerin etrafında heliks halde sarmalar (Strauss ve Barbieri 2013, Ross ve Pawlina 2014).

Son evre Maturasyon (olgunlaşma) evresidir. Flagellumun etrafındaki fazla sitoplazma azalır, matür spermtozoon oluşur. Rezidüel cisimcik olan fazla sitoplazma sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Artık spermatidler Sertoli hücrelerinden salıverilir (Ross ve Pawlina 2014).

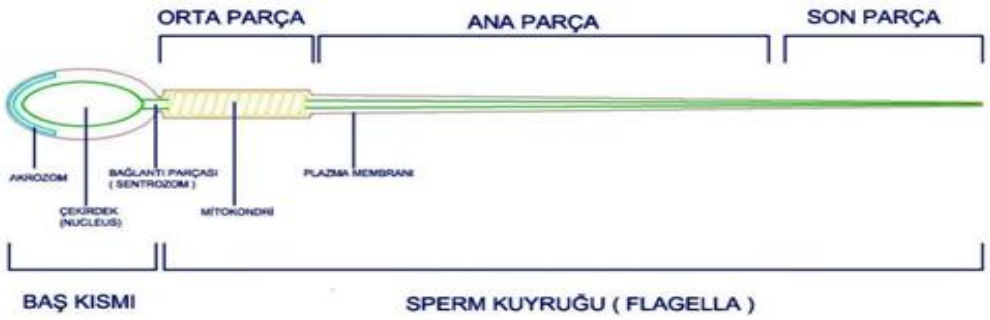
Spermatidler spermiasyon denilen süreçte seminifer tübül lümenine salınıverirler. Bu süreçte Sertoli- spermatid bağlantı kompleksleri ortadan kalkar ve spermatidler Sertoli hücrelerinden ayrılır. Sertoli-Spermatid bağlantı komplekslerinde β1 integrin reseptörü bulunur. Spermatidler Sertoli hücrelerinden salınırken, integrin bağlı kinazlar aktifleşir. Bu enzim tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir. Testisdeki spermiasyon hızı ejakülattaki sperm hücrelerinin sayını belirler (Ross ve Pawlina 2014).



Şekil 1.2.1.2. Spemiyogenez (Kahn ve Brannigan 2017).

1.2.2. Olgun Sperm Yapısı ve Fizyolojisi

Bir sperm hücresinin hacmi bir ovumdan yaklaşık olarak 85.000 kat daha azdır. Erkekte her gün yaklaşık 100-300 milyon sperm üretilirken, kadınlarda ise ayda en fazla iki yumurta üretimi görülmektedir. Bir sperm hücresinin uzunluğu yaklaşık 60 µm'dir. Baş kısmının boyu 3-5 µm, eni 2-3 µm'dir (Rogers 2010). Her spermatozoa bağlayıcı parça ile birleşmiş baş ve kuyruk kısmından meydana gelmektedir (Strauss ve Barbieri 2013) (Şekil 1.2.2.1.).



Şekil 1.2.2.1. Olgun sperm kısımları (Gök 2017).

Kuyruk üç bölümden meydana gelir. Orta, esas ve son parçadır. Baş kısmı çekirdek ve çekirdeği çevreleyen akrozomdan meydana gelmiştir. Baş ile kuyruğu bağlayan bağlayıcı parçanın içinde bir çift sentriyol bulunur. Distal sentriolden aksonem oluşur. Kuyruğun orta kısmında bir mitokondri, 9+2 mikrotübül yapısında aksonem bulunur. Kuyruğun en uzun parçası esas olup, A Kinaz proteinler ile keratinleri bulundururlar. Esas parça fibröz kılıfla çevrilidir. Fibröz kılıfta ATP'yi hidrolize eden glikolitik enzimler, A Kinaz proteinleri ve motiliteyi sağlayan keratinler bulunur (Strauss ve Barbieri 2013).

Seminifer tübülerinde sperm hareketsiz olup, dölleme yetenekleri yoktur. Sıvı ve spermler seminifer tübüllerden, seminifer tübülün kısa segmenti olan düz tübüllere girer. Düz tübüller Sertoli hücreler ile döşelidir. Buradan da rete testise girer, boşaltım kanalının ilk parçası olan ductus efferente ve ductus epididmisin baş kısmına girer (Ross ve Pawlina 2014).Sperm hücreleri karakteristik motilitesini birkaç günde geçtiği epididimisle kazanır (Strauss ve Barbieri 2013). Bazı değişikliklere uğrar. Bu değişimler;

- Nükleus yoğunlaşır, spermin baş boyutu azalır.
- Rezidüel cisimcikler atılır,
- Dış akrozomal membranda dekapasitasyon işlemleri gerçekleşir.

Sperm hücre motilitesinin başlaması siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) sayesinde gerçekleşmektedir. Sperm, erkek üreme sisteminde birkaç hafta canlı kalabilirken, dişi üreme sisteminde ise 2-3 gün canlı kalmaktadır. Matür spermler, karakteristik motilite yeteneğine sahip, fertil (üreme yeteneği olan) dir. Sıvı ortamda dakikada 1-4 mm hızda hareket edebilmektedir.

Sperm aktivitesi, nötral ve hafif alkali bir ortamda artarken, asidik ortamda baskılanır hatta hızlı ölmelerine neden olur. Sperm aktivitesi, sıcaklık arttıkça sperm ömrünü önemli ölçüde kısaltmaktadır (Gök 2017).

Dişi üreme kanalında fertilize edebilme yeteneği kazanmaya devam eder. Sperm membranında bulunan glikokaliks (glikokonjugatlar) uzaklaştırılır. Bu olaya kapasitasyon denir (Ross ve Pawlina 2014).

1.3. Semen Analizi

İlk kez Anton van Leewenhoek (1632-1723) tarafından yapılan mikroskopta erkek üreme hücresi görmüş ve bu hücreleri 'animalcules' ya da 'spermatick worms' olarak tanımlamıştır. 1850 yılına bilim adamlaraının çoğu kadar spermatozoayı parazit olarak tanımlamışlardır. Spermatozoanın adını ilk kez Baer tarafından 1827 yılında kullanmıştır. Sonrasında ise, İsveç bilim adamı Albert von Kolliker (1841) tarafından spermatozoanın parazit olmadığı histogenez süreci ile testislerde gelişen hareketli otolog hücreler olduğunu belirtilmiştir (Clarke 2006).

İnsan sperması, hücresel, kimyasal bileşenleriyle ve bu sıvıyı üreten organların işlevsel özellikleri hakkında bilgi sağlar (Eliasson 2010).

Spermanın pH değeri yaklaşık 7,5'tir. Semen, seminal vezikülerden gelen sıvı (neredeyse %60), vas deferensten gelen sıvı ve sperm (toplamın yaklaşık %10'u), prostat bezinden gelen sıvı (yaklaşık %30) ve mukus bezlerinden gelen sıvıları içerir. Alkali prostatik sıvı, hafif asidik olan semen sıvısını nötralize ederek sağlar (Hall 2015).

Yeni atılmış spermanın laboratuvar testine semen analizi denir. Spermlerin şekli, sayısı, ve hareketi mikroskop ile ölçülür. Bu test, erkek infertilitesinin teşhis edilmesinin önemli bir parçasıdır (Gök 2017).

İnsan semeni analizlerinin standartize edilmesi için Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ilk kez 1980 yılında el kitabı yayınlamıştır. El kitabı, o zamandan beri üç kez güncellenmiş ve birçok dile çevrilmiştir.

Semen alt analiz değerleri Dünya Sağlık Örgütü 2010 kriterlerine şu şekildedir (Çizelge 1.3.1.):

Çizelge 1.3.1. Dünya Sağlık Örgütünün alt referans değerleri (WHO 2010).

Parametre	**Referans Değerleri**
• Hacim	1.5 ml (1.4-1.7)
• pH	≥7.2
• Sperm Konsantrasyonu	$15x10^6$ (12-16)
• Total Sperm Sayısı	$39x10^6$ (33-46)
• Motilite	%40 (38-42)
• Progresif Motilite	%32 (31-34)
• Morfoloji	%4 (3.0-4.0)
• Vitalite	%58 (55-63)
• Peroksidaz (+) Lökosit	$< 1x10^6$

İnfertil şikâyetiyle gelen çiftlerin araştırmaları yapılırken, erkek bireye semen analizi testi uygulanır. Semen analizi; WHO tarafından onaylanmış yöntemleri kullanan laboratuvarda yapılmalıdır (Kolesinska ve ark 2014). Düzenli sperma analizi sperm üretimi, sperm motilitesi ve canlılığı, erkek genital sisteminin açıklığı, aksesuar organların salgıları hakkında sağlıkı bilgiler verirler. Bu analiz, infertil erkeği ilk değerlendirmede yararlı bilgiler ortaya koysa da spermatozoon'un fertilizasyonu hakkında yeterli bilgi vermez. Sonuçlar doğurganlık ile ilişkili olabilir fakat doğrudan ölçüsü vermez (Vasan 2011).

Semen analizi şu aşamalardan oluşur:

1. **İlk 5 dakika içinde:**
   - Alınan örneğin likefiye olması için inkübatöre (37°C) ya da tezgâha yerleştirilmesi.
2. **30-60 dakika arasında:**

- Semen görünümü ve likefaksiyonun değerlendirilmesi
- Semen hacminin ölçülmesi
- Semen pH'ının ölçümü

- **Mikroskobik inceleme**, sperm sayısı ve motilitesini değerlendirebilmek için dilüsyon ve ıslak preparatın hazırlanması
- Sperm canlılığının değerlendirilmesi (motil spermlerin oranı düşük ise)
- Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için semen yaymasının hazırlanması

- Sperm konsantrasyonunu değerlendirmek için semenin dilüsyonu
- Sperm sayısının değerlendirilmesi

- Gerek duyulursa MAR (mixed antiglobulin reaction) testinin yapılması
- Yuvarlak hücreler varsa peroksidaz pozitif hücrelerin değerlendirilmesi
- Immunobead testi için sperm hücrelerinin hazırlanması (gerek duyulursa)
- Semenin santrifüje edilmesi (biyokimyasal belirteçler çalışılacaksa)

3. **Üç saat içinde:**

- Gerekiyorsa örneklerin mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmesi

4. **Dört saatten sonra:**

- Morfolojik değerlendirilme için preparat hazırlanması
- Aynı gün içinde daha sonraki dönemde (örnek dondurulmuşsa sonraki gün)
- Aksesuar bez belirteçlerinin ölçülmesi (gerekirse)
- İndirekt immunobead testinin yapılması (gerekirse)

Semenin toplanması; Semenin ortam sıcaklığındaki değişiliklere maruz kalmaması için numunenin laboratuarın yakınındaki özel bir odada verilmesi gerekir. Numune 2-7 günlük cinsel perhizden sonra alınmalıdır. Numune mastürbasyonla elde edilmelidir. Erkek bireye, semen örneğinin toplanması ile ilgili net yazılı ve sözlü talimatlar verilmelidir (Jeyendran 2003).

Analiz yapılacak erkek hastanın adı, doğum tarihi ve kişisel kod numarası, perhiz süresi, toplanma tarihi ve saati kaydedilmelidir. Numune (semen) örneği, cam veya plastikten yapılmış temiz, geniş ağızlı bir kap içine alınmalıdır (Jeyendran 2003).

1.3.1. İlk morfolojik değerlendirme:

- Likefaksiyon
- Semen viskozitesi
- Ejakülatın görünümü
- Semen hacmi
- Semen pH'ı

Likefaksiyon: Ejakülasyon sırasında toplama kabına alınan semen, tipik olarak yarı katı koagüle şeklindedir. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde sıvılaşmaya başlar, sıvılaşma devam ederken meni daha homojen ve oldukça sulu hale gelmektedir (Kolesinska ve ark 2014). Numunenin tümü oda sıcaklığında genellikle içinde likefiye olsa da 60 dakika veya daha uzun zaman da alabilir. Likefaksiyon sırasında numune kabının oda sıcaklığında veya 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde karıştırıcıyla sürekli olarak karıştırılması homojen bir numune oluşturmaya yardımcı olabilir (WHO 2010).

Semen Vizkozitesi: Likefaksiyondan sonra semen, tek kullanımlık pipet içinden aspire edilerek damlamaya bırakıldığında oluşan iplikçiği gözlemleyerek numunenin vizkozitesi tahmin edilmelidir. Normal semen, pipetten belirgin küçük damlalar şeklinde düşer. Vizkozite anormal ise; damla 2cm'den uzun iplikçik oluşturur. Yüksek viskozite sperm motilitesini, konsantrasyonunu, spermin antikorla kaplanmasını ve biyokimyasal ölçümleri etkileyebilir (WHO 2010).

Ejakülatın Görünümü: Normal likefiye olmuş semen numunesi homojen, gri-opelesan bir görünüme sahiptir. Renk, örneğin eritrosit varsa (hemospermi) kırmızı-kahverengi, hastanın sarılığı varsa veya bazı vitaminlerin ve ilaçların kullanımı ile sarı olarak karşımza çıkabilir (WHO 2010).

Semen Hacmi: Total sperm hücresi ve sperm olmayan hücrelerin sayısının hesaplanmasında kullanılır. Semen hacim ölçümü, semen numunenin içinde toplandığı kapla birlikte tartılmasıyla yapılır. Semenin dansitesi 1,043 ve 1,102 g/ml arasında değişmektedir (Huggins ve ark 1942, Cooper ve ark 2007).

Semen pH'ı: Esas olarak alkali özellikteki seminal vezikül sekresyonu ile aksesuar bezlerin sekresyonları arasındaki dengeyi yansıtır. pH, likefaksiyondan sonra 30 dakika içinde ölçülmelidir. pH aralığı 6,0 ile 10,0 arasında olan pH kağıdı kullanılmalıdır. Ancak her durumda, üretiminden itibaren CO_2 kaybından etkilendiği için, pH ölçümü ejakülasyondan sonraki bir saat içinde mutlaka yapılmış olmalıdır (WHO 2010).

1.3.2. Mikroskobik Değerlendirme:

- İlk mikroskobik değerlendirme

- Sperm sayısı
- Sperm motilitesi
- Sperm vitalitesi
- Spermatozoa dışındaki hücrelerin sayımı
- Sperm morfolojisi

İlk Mikroskobik İnceleme: Taze semen değerlendirmesi için faz-kontrast mikroskobu kullanılır. Numunenin ilk mikroskobik incelenmesinde preparat, toplam X100 büyütme altında taranır. İlk mikroskobik değerlendirme sırasında konsantrasyon, mukus iplikleri, motilite, sperm agregasyon, aglütinasyonu ve spermden farklı hücresel elemanların değerlendirmesi yapılabilir. Daha sonra, mikroskop büyütmesi X200 veya X400'e (X20 veya x40 objektifli X10 okülerin kombinasyonu) çıkarıldığında sperm motilitesinin, sperm sayısının doğru olarak değerlendirilmesi yapılır (WHO 2010).

Semenin iyice karıştırılması; Mikroskobik incelemenin aşamalarının doğru değerlendirilmesi için semenin iyi bir şekilde karıştırılıp, homojen haline getirilmesi gerekmektedir. Bu işlem, numuneyi geniş çaplı (~1,5mm) tek kullanımlık plastik pipetle 10 kez aspire ederek gerçekleşebilir. Vorteks yapılmamalıdır (WHO 2010).

Islak preparat hazırlama; Semen numunesi karıştırıldıktan sonra temiz bir lamın üzerine 10 µl konulur. Üzerine 22x22 lamel kapatılır. Yaklaşık 20 µl derinlikte spermler rahatlıkla yüzebilmektedirler (WHO 2010).

Sperm Sayısı: Sperm konsantrasyonu her bir ünite semen volümü başına düşen sperm sayısını ifade ederken, total sperm sayısı tüm ejakülattaki sperm sayısını ifade eder.

Ejakülattaki sperm sayısı ölçülürken, semen değerlendirmesinde ölçülen spermatozoanın konsantrasyonundan hesaplanır. Normal ejekülat için, üreme kanallarında tıkanıklık yoksa ve pehriz süresi kısaltıldığında, verilen örnekteki toplam spermatozoa sayısı ve testis hacmi ile korelasyon gösterir. Bu da, üreme kanallarının açık olup, testislerin spermatozoa üretme kapasitesinin olduğunu gösterir. Spermatozoa konsantrasyonu, fertilizasyon ile ilişkilidir (WHO 2010).

Sperm konsantrasyonufertilizasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir ancak testis fonksiyonunu değerlendirmek için özgün değildir (Eliasson 1975). Sperm sayımı için hemositometre sayma kamaraları tavsiye edilmektedir (WHO 2010).

Sperm sayısını belirlemek için şu aşamalar yapılır.

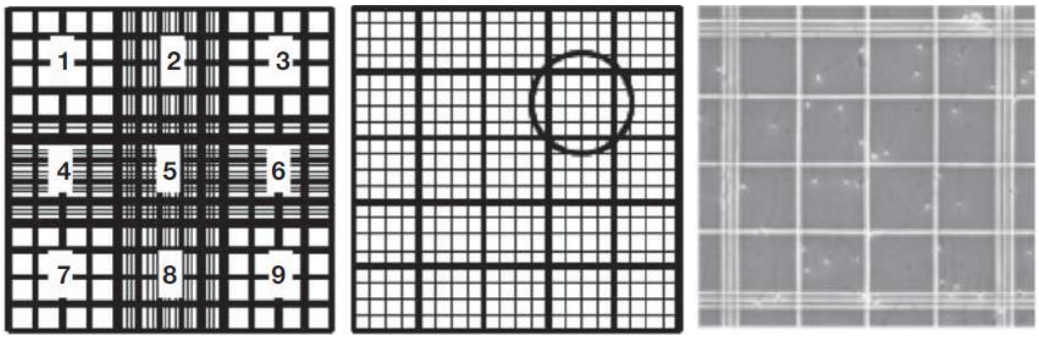
- Gerekli olan dilüsyon oranı belirlenir.
- Semeni seyreltici fiksatif hazırlanır.
- Dilüsyonlar hazırlanır.
- Hemositometre kamaralarına uygun şekilde yerleştiriilir.
- Sayma kamaralarında spermler sayılır.
- Spermatozoa konsantrasyonunu hesaplanır.
- Ejakülattaki toplam spermatozoa sayısı hesaplanır.

Spermlerin doğru bir şekilde sayılıp hesaplanabilmesi için semenin dilüe edilmesi gerekir. Ne kadar dilüe edileceği taze preparatta 200 veya 400 büyütmede görüntü alanı başına sayılan sperm hücresi sayısına göre belirlenebilir (Çizelge 1.3.2.1.) (WHO 2010).

Çizelge 1.3.2.1. Gerekli semen dilüsyonları, nasıl yapılacağı, kullanılan kamaralar ve değerlendirme için potansiyel alanlar (WHO 2010).

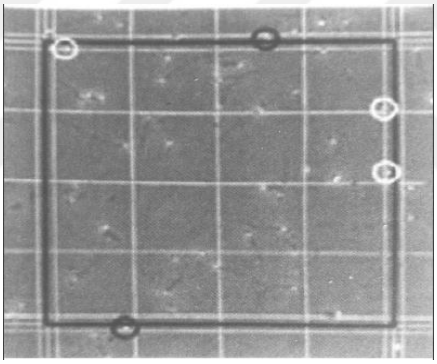
Sperm (her 400 büyütmede)	Sperm (her 200 büyütmede)	Gerekli dilüsyon	Semen (µl)	Fiksatif (µl)	Kamara	Sayılacak alanlar
>101	>404	1:20 (1 + 19)	50	950	Geliştirilmiş Neubauer	5, 4, 6
16–100	64–400	1:5 (1 + 4)	50	200	Geliştirilmiş Neubauer	5, 4, 6
2–15	8–60	1:2 (1 + 1)	50	50	Geliştirilmiş Neubauer	5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1 + 1)	50	50	Geliştirilmiş Neubauer veya büyük volüm	9 karenin tamamı

Semen örneği sayım için cam bir lama koyulup üzeri lamelle kapatılarak, kameralar belirlenir. Sperm olarak tanımlanamayan numuneler için ise santrifüj yapılıp, pelet sperm varlığı açısından incelemelidir. Hemositometre kamerasi ile sayım yaparken çok az sperm sayılması tanı ve tedavide yanlışlığa yol açacaktır, bu yüzden en azından toplam 400 sperm sayılması gerekir (Şekil 1.3.2.1.) (WHO 2010).



Şekil 1.3.2.1. Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi (Brazil ve ark 2004).

Sperm sayımı yapılırken sadece olgunlaşmış (başları ve kuyrukları olan) spermatozoalar sayılır. Sperm sayılıp-sayılmayacağı başın lokasyonu ile belirlenir. Kuyruğun ise önemli değildir. Üç kenar çizgisinden ortancası kameranın sınırıdır. Başları iki iç sınır arasında kalan spermlerin (beyaz daireler) hepsi sayılır, iki dış sınır çizgisi arasında kalanlar ise (siyah daireler) sayılmaz (Şekil 1.3.2.2.).



Şekil 1.3.2.2. Hemositometrenin karelerinde spermler sayılır (WHO 2010).

Bazı durumlarda sperm görülmezse santrifüj yapılır ve incelenir, buna rağmen hala sperm görülmüyor ise azospermiden şüphelenilebilir. Aşağıda sperm durumlarına göre yapılmış sınıflandırmalar verilmiştir (Çizelge 1.3.2.2.) (Vasan 2011).

Sperm sayısının o spermlerin içinde bulunduğu volüme bölünmesi sperm konsantrasyonunu verir. "C = (N/n) x (1/20) x dilüsyon faktörü" formülüyle hesaplanabilir (C: konsantrasyon, N: sperm sayısı, n: sayım yapılan kare sayısı). En düşük referans değer $15x10^6$ /ml'dir. Total sperm sayısının hesaplanması ise tüm ejakülat volümüyle sperm konsantrasyonunun çarpılması sonucu hesaplanır ve en düşük referans değeri $39x10^6$'dır (Gökçe 2011).

Çizelge 1.3.2.2. Semen parametreleri analizi sonucuna göre tanılar (Vasan 2011).

Azoospermi	Ejakulatta ve santrifüj sonrası örnekte hiç sperm olmamasıdır.
Kriptozoospermi	Taze preparatlarda sperm olmamasına rağmen santrifüjlenmis pellette spermlerin gözlenmesidir.
Hemospermi	Ejakülatta eritrositlerin varlığıdır.
Lökospermi (Lökosito-spermi, Piyospermi)	Ejakülatta eşik değer üstünde (≥1 milyon) lökosit varlığıdır.
Nekrozoospermi	Ejakülatta canlı sperm yüzdesi (vitalite) <%58 olmasıdır.
Normozoospermi	Sperm konsantrasyonu ≥15 milyon/ml, total sperm motilitesi ≥%40 ve/veya progresif sperm motilitesi ≥%32, normal sperm morfolojisi ≥%4 (Kruger Strict kriteri) ve sperm vitalitesi ≥%58 olmasıdır.
Oligozoospermi	Sperm konsantrasyonu <15 milyon/ml ve/veya total sperm sayısı <39 milyon olmasıdır.
Astenozoospermi	Total sperm motilitesi <%40 ve/veya progresif sperm motilitesi <%32 olmasıdır.
Teratozoospermi	Normal sperm morfolojisi <%4 (Kruger Strict kriteri) olmasıdır.
Oligoastenozoospermi	Sperm konsantrasyonu <15 milyon/ml ve/veya total sperm sayısı <39 milyon ve total sperm motilitesi <% 40 ve/veya progresif sperm motilitesi <% 32 olmasıdır.
Oligoteratozoospermi	Sperm konsantrasyonu <15 milyon/ml ve/veya total sperm sayısı <39 milyon ve normal sperm morfolojisi <%4 (Kruger Strict kriteri) olmasıdır.
Astenoteratozoospermi	Total sperm motilitesi <%40 ve/veya progresif sperm motilitesi <%32 ve normal sperm morfolojisi <%4 (Kruger Strict kriteri) olmasıdır.
Oligoastenoteratozoospermi	Sperm konsantrasyonu <15 milyon/ml ve/veya total sperm sayısı <39 milyon ve total sperm motilitesi <%40 ve/veya progresif sperm motilitesi <%32 ve normal sperm morfolojisi <%4 (Kruger Strict kriteri) olmasıdır.
Aspermi	Semenin yokluğudur.

Sperm Motilitesi: Motilite ejakülasyondan sonra ilk bir saat içinde, likefaksiyondan sonraki tercihen 30 dakikada değerlendirilmelidir (Gökçe 2011). Semen iyice karıştırıldıktan sonra ideal olarak 37°C'de yaklaşık 20µm (10µl semen üzerine 22x22 lamel kapatılır)derinliğinde ıslak preparat hazırlanır ve faz kontrast mikroskop altında X200 veya X400 büyütmede incelenir (WHO 2010).

Sperm hareketlerinin sınıflandırılması: İleri veya yerinde hareketli olan spermihareketsiz spermlerden ayırt edebilmek için hareketlilik derecelendirme sistemi kullanılır. Her spermin hareketliliği aşağıdaki şekilde derecelendirilir (WHO 2010).

- **Progresif Motilite (PR):** Spermlerin geniş dairesel veya doğrusal olarak hareket etmesidir.
- **Non-progresif Motilite (NP):** İlerleyici olmayan, yerinde hareketi kapsar. Örneğin kuyruk hareketinin etkisiyle baş kısmının güçlükle oynaması, çok küçük daireler çizerek yüzme veya sadece kuyruğun hareket etmesi gibi.
- **İmmotilite (IM):** Spermde hiç hareketin görülmemesidir (WHO 2010).

Bilgisayar yardımlı sperm analizi (CASA), sperm hareketini (sperm baş ve kamçı hareketi) analiz edebilmesi açısından yararlıdır. CASA'nın sonuçları ise İn vitro fertilizasyon (IVF) sonucuyla korelasyonlu olduğu gösterilmiştir (Vasan 2011).

Sperm Vitalitesi: Diğer bir ifadeyle sperm canlılığı; sperm membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi temeline dayanır. Sperm total motilite oranının %40'dan az olduğu durumlarda önem taşır. Bu test sperm hareketliliği ve motilite değerlendirilmesinde önem taşır (WHO 2010).

Canlı spermlerin hesaplanması, birden fazla metodla gerçekleştirilir. Bu metodlar şunlardır; boya tutumu ya da hipoozmotik şişme yöntemleri ile ve hücre zarı sağlam olanların değerlendirilmesidir (WHO 2010).

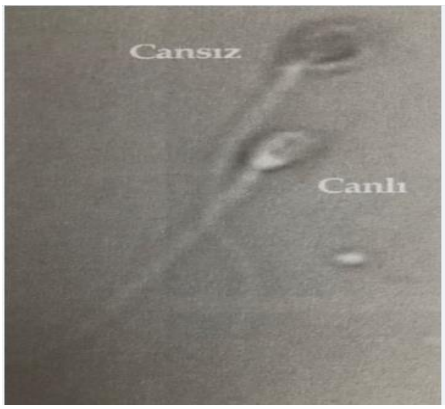
- *Boya eksklüzyonu metodu:* Ölü hücrelerin plazma zarının hasarlanması sonucunda bazı boyaları alması prensibine dayanır. Bu yöntemle kullanılan boyalar ise; eosin-nigrosin veya sadece eosin boyalarıdır.

- *Hipoozmotik şişme metodu:* Hipotonik ortama konulan hücrelerden sadece membranı sağlam olan hücrelerin şişmesi prensibine dayanır. Bu metod likefaksiyondan sonraki 30 dakikada ya da ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde değerlendirilmelidir (WHO 2010). Spermlerin boyanmasının istenilmediği durumlarda bu test uygulanır. Bu test sperm hücrelerine zarar vermez. Hipoozmotik ortamda beş dakikada sağlam membranlı spermler şişer ve kamçısal (flagellar) şekillerin tümü 30 dakika içinde hareketsiz olur. (Şekil 1.3.2.4). HOS, sperm fertilitesi konusunda sağlıklı bilgi vermez (Vasan 2011). Alt sınırı %58'dir. Şişmiş spermler, kuyruğun sarmal şeklinde olması ile şişmiş spermler tanımlanır (WHO 2010) .

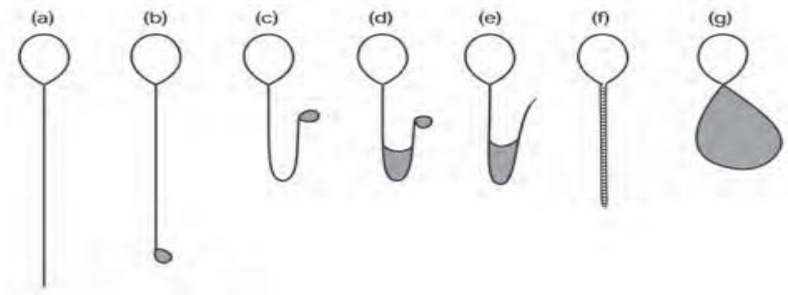
Hareketsiz spermlerin canlı olup olmadıkları klinik açıdan önem bir veridir. Canlı olan sperm kuyruktaki defektlerin sonucunda büyük oranda hareketsizdir (Moskovtsev ve Librach 2013). Epididimal bir patolojinin göstergesi ise, hem ölü hem de hareketsiz hücrelerin (nekrozoospermi) yüksek oranda bulunmasıdır (Correa-Perez ve ark 2004). Sperm canlılığı için en düşük referans değer %58'dir (WHO 2010).

- *Eosin-nigrosin testi:* Temel olarak ölü spermlerin membran yapısı bozulduğu için boyanmış görülmesine dayanır (Björndahl ve ark 2003). Spermin fark edilmesi, zemin ile sperm başları arasındaki kontrastı arttırmak için nigrozin kullanılmaktadır. Canlı spermler beyaz, cansız hücreler pembe boyanır (Cooper ve ark 2004).

Yalnızca eosin kullanılan test: Bu yöntem sonucunda cansız hücreler pembe boyanır, canlı spermler ise boyanmazlar (Şekil 1.3.2.3.). Bu metod basit ve hızlıdır. Vitalitenin referans alt sınırı ise %58'dir (WHO 2010).



Şekil 1.3.2.3. Eozin boyanma ile cansız ve canlı spermler (WHO 2010)

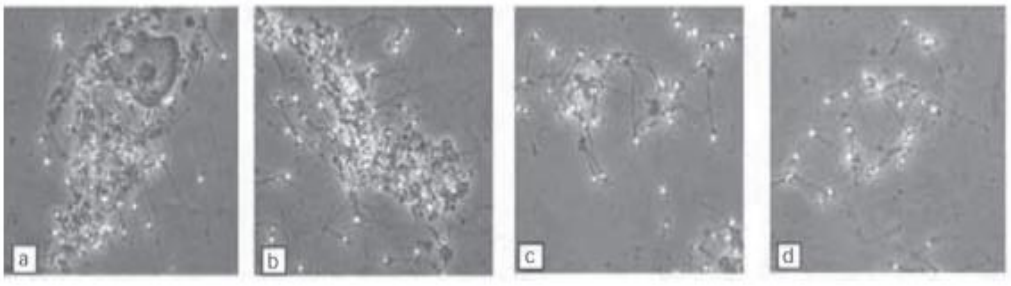


Şekil 1.3.2.4. Hipoozmotik strese maruz bırakılmış insan spermatozoasındaki morfolojik değişikliklerin şematik görünümü (WHO 2010).

(a) değişiklik yok. (b)–(g) kuyruklarda oluşan değişikliklerin çeşitli tipleri. Kuyruklarda şişme gri alanla gösterilmiştir.

Spermatozoa dışındaki hücrelerin sayımı: Epitel hücreleri, lökositler ve immatür germ hücreleri gibi spermatozoa dışı (yuvarlak hücreler) hücreler ejakülat içinde bulunabilir. Sperm sayımında yuvarlak hücreler, epitel hücreler (lökosit ve germ hücreleri) belirlenir. Tüm ejakülatta $1x10^6$/ml'den fazla yuvarlak hücre bulunması halinde bir takım testler yapılmalıdır. Peroksidaz testi, lökosit belirteçleri çalışılmalı ve konsantrasyonları hesaplanmalıdır. Oksidatif saldırı yoluyla sperm motilitesi ve DNA bütünlüğünü lökositler bozabilir (WHO 2010).

Sperm agregasyonu (Kümeleşmesi); İmmotil spermlerin birbirlerine veya hareketli spermlerin mukus iplikçiklerine, sperm dışı hücrelere veya debrise yapışması agregasyon olarak düşünülür (Şekil 1.3.2.5.).



Şekil 1.3.2.5. Semende spermatozoanın nonspesifik kümeleşmesi (agregasyon)
Bir epitel hücresi (a), debris (b) veya spermatozoa (c, d) ile kümeleşmiş spermatozoa görüntüleri (Brazil ve ark 2004).

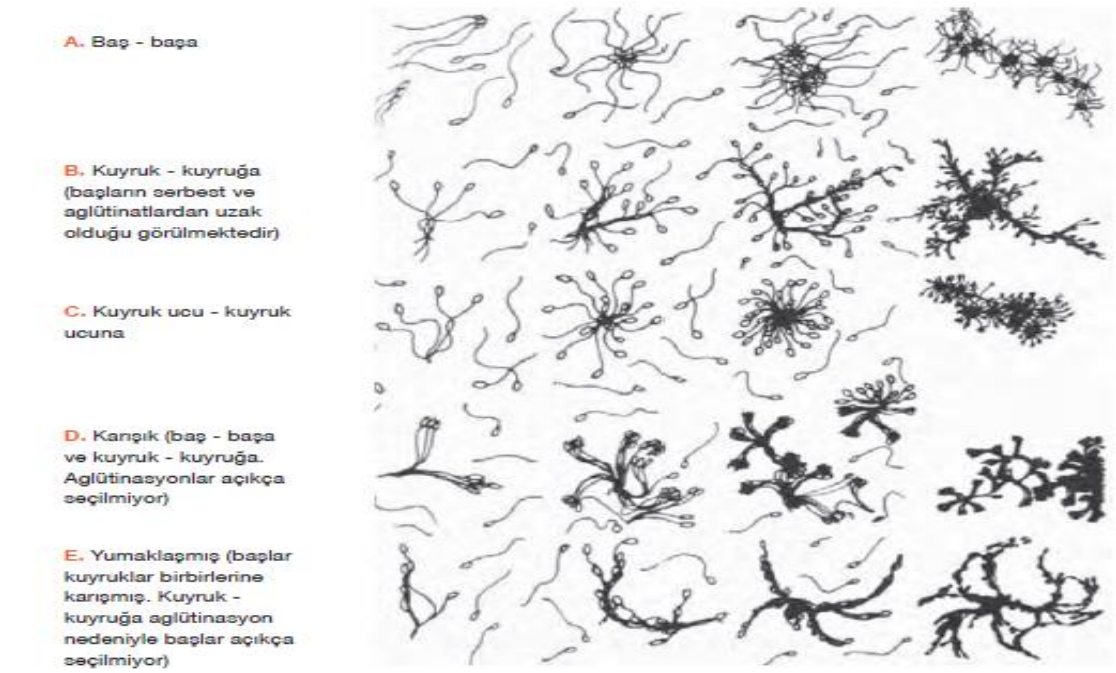
Spermatozoanın aglütinasyonu: Aglütinasyon özellikle hareketli spermlerin birbirlerine karışık şekilde yapışması demektir. Bazen aglütinasyon o kadar yoğun olur ki hareket kısıtlanır ancak hareketlileri kaydedilmelidir (WHO 2010).

Antijenlere karşı immünolojik koruma, kan testis bariyerini oluşturan sertoli hücreleri ile sağlanır. Kan testis bariyeri bozulduğunda sistemik bağışıklık savunma sistemine maruz kaldığında bağışıklık sistemi uyanır ve antisperm antikorlarının (ASA) oluşumuna neden olur. Bazı ASA'lar sperm hücresi üzerinde sitotoksik bir etkiye sahiptir ve hücre apoptozuna ve sperm hücrelerinin immobilizasyonuna neden olabilir. ASA'ların diğer etkileri ise,hareketli spermlerin aglütinasyonlu kümelerinin oluşturulmasını sağlar (Vasan 2011).

Esas aglütinasyon şekli (aglütinasyonun derecesini [1–4 derece] ve yapışma yerini [A-E derece] gösteren) kaydedilmelidir (Rose ve ark 1976) (Şekil 1.3.2.6.).

- Derece 1: izole Her aglütinatta < 10 spermatozoa, birçok serbest spermatozoa
- Derece 2: orta derecede Her aglütinatta 10–50 spermatozoa; serbest spermatozoa
- Derece 3: geniş Aglütinatlarda > 50 spermatozoa, bazı spermler hâlâ serbest
- Derece 4: yoğun Spermatozoanın tümü aglütine olmuş ve aglütinatlar birbirleriyle bağlantılı

	Aglütinasyonun derecesi			
İlgili kısımlar	1. Izole (< 10 sperm/ aglütinat, birçok serbest sperm)	2. Orta (10– 50 sperm / aglütinat, serbest sperm)	3. Geniş (> 50 sperm / aglütinat, bazı spermler hâlâ serbest)	4. Yoğun (spermlerin hepsi aglütine olmuş ve aglütinatlar birbirleriyle bağlantılı)



Şekil 1.3.2.6. Farklı sperm aglütinasyon derecelerinin şematik diyagramı (WHO 2010)

Sperm Morfolojisi: Sperm konsantrasyonu ve motilitesi ve morfolojisinden oluşan en önemli üç parametreden biridir. Bu parametreler içerisinde sperm morfolojisi, bir erkeğin dölleyebilme potansiyelini en iyi biçimde gösterenidir (Bostofte ve ark 1982). Dünya sağlık örgütü (WHO) kriterlerine göre toplam sperm morfolojisinin en az %30'unun normal olması gerekir (Aggerholm ve ark 2008).

Sperm morfolojisinin belirlenmesi aşağıdaki aşamaları içermektedir:

a) Bir lam üzerine semen sürüntüsünün hazırlanması (Aynı numuneden iki eş semen sürüntüsü hazırlanır ve bundan sonraki aşamalar ise ikisi için ayrı ayrı uygulanır).
b) Lamın havada kurumaya bırakılması, fikse edilmesi ve boyanması
c) Lam uzun süre saklanacaksa lamın üstüne bir lamel koyarak bekletilmelidir.
d) Aydınlık alan mikroskobunda, immersiyon yağında X100 büyütmede lamı incelenir.
e) Normal veya anormal formların yüzdesini belirlemek için, her iki eş örnekte yaklaşık 200 sperm (toplam 400 sperm) değerlendirilir.
f) Aynı numuneden alınan iki eş örneğin değerlendirme sonuçları kabul edilebilir derecede yakınsa, hesaplamalara başlayın, aksi takdirde lamları yeniden değerlendirin.

Kruger kriterlerine göre (sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılır) normal morfolojinin %4'den az olduğunda gebelik oranlarının düşük olduğu belirtmiştir (Çizelge 1.3.2.3). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 kılavuzunda, normal sperm morfolojisi için kabul edilen alt sınır, Kruger kriterlerine göre %4'tür (WHO 2010).

Çizelge 1.3.2.3. Kruger kriterlerine göre normal sperm morfolojisi (Aşçı ve ark 2013).

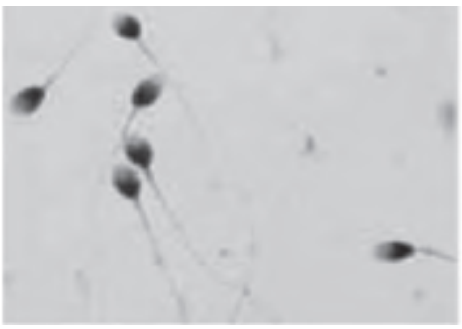
Baş	Uzunluk 4-5 mikron Genişlik 2.5-3.5 mikron
Akrozom	Başın %40-70'ini oluşturmalı
Orta parça	Genişlik 1 mikron Uzunluk baş uzunluğunun 1.5 katı kadar
Kuyruk	Boyu yaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış ve kırık içermeyen yapıda
Sitoplazmik damlacık	Baş alanının %50'sinden az

Sperm; bir baş, boyun, orta parça, ana parça ve son parçadan oluşmaktadır. Ancak son parçayı ışık mikroskobuyla görmek güç olduğundan, sperm hücresinin iki bölümden ibaret olduğu düşünülmektedir (Şekil 1.3.2.7.). Bu bölümler bir baş (ve boyun) ve kuyruktan (orta ve ana parça) ibaret olduğu düşünülebilir.

Baş bölümü: genellikle oval ve düzgün sınırlıdır. Baş bölümünde akrozom bölgesi bulunmaktadır. Akrozom bölgesi; sperm başının % 20'sinden fazlasını geçmemelidir. Post-akrozomal bölge ise herhangi bir vakuol içermemelidir.

Orta parça: yaklaşık olarak sperm başı uzunluğunda ve ince olmalıdır. Sperm başının ana ekseniyle aynı hizada olmalıdır.

Ana parça: Orta parçadan daha ince ve yaklaşık 45 µm uzunlukta (baş uzunluğunun yaklaşık 10 katı) olmalıdır.



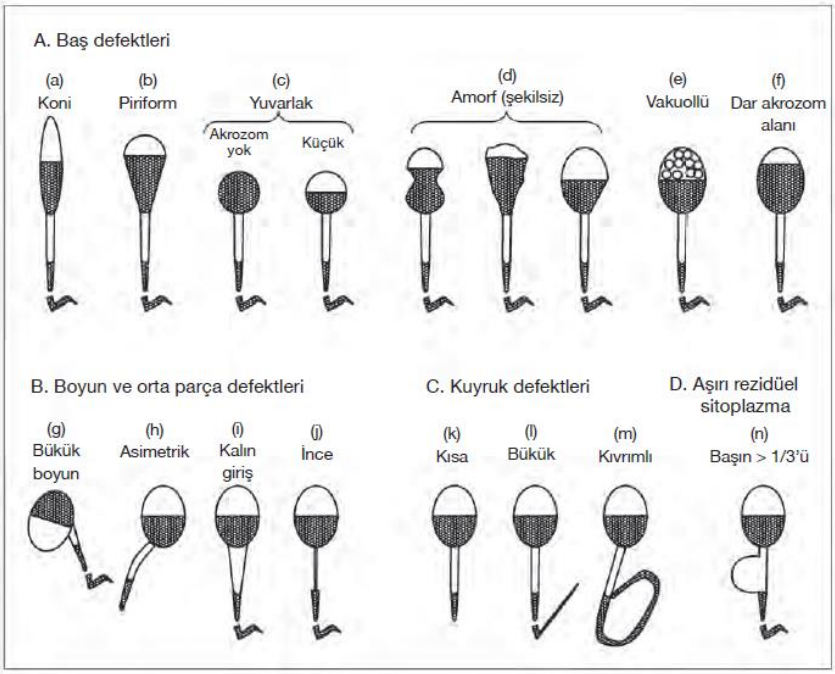
Şekil 1.3.2.7. Normal sperm (Aşçı ve ark 2013).

Anormal sperm morfolojisi: Anormal spermler, genellikle düşük bir dölleme potansiyeline sahiptir ve DNA'ları da anormal olabilme ihtimalleri yüksektir.

Morfolojik defektler; artmış bir DNA parçalanma süreci, yapısal kromozom anormallikleri, immatür kromatin ve anöploidi insidansında artışla ilişkilendirilmiştir (Dadoune ve ark 1988, Gandini ve ark 2000). Bu nedenle başın şekli sperm kuyruğuna göre daha fazla vurgulanmıştır.

Sperm morfolojisinin anormal kabul edilebilmesi için; Baş defektleri: büyük veya küçük, sivri, armut şeklinde, yuvarlak, amorf, vakuollü, post-akrozomal bölgede vakuoller veya küçük veya geniş akrozom alanları, çift başlılık veya bunların kombinasyonları. Boyun ve orta parça defektleri; orta parçanın başa asimetrik bağlantısı, kalın veya düzensiz, keskin açılı kıvrılmış, anormal derecede ince veya bunların herhangi bir şekilde kombinasyonlarıdır. Ana parça defektleri: kısa, birden fazla sayıda, kırık, düzgün firkete şeklinde gövde, keskin açılı bükümler, düzensiz genişlik, sarmal veya bunların herhangi bir şekilde kombinasyonlarıdır (Şekil 1.3.2.8.).

Aşırı rezidüel sitoplazma (ARS); Defekt spermlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bol miktarda düzensiz boyanmış, normal sperm başının üçte biri büyüklüğündeki sitoplazma, "sitoplazma damlacığı" olarak tanımlanmaktadır (Cooper ve ark 2005).



Şekil 1.3.2.8. İnsan spermatozoasının bazı anormal formlarının şematik resmi (Aşçı ve ark 2013)

1.4. Östrojen ve Östrojen Reseptörlerinin Yapı ve Fonksiyonları

Östrojen hormonundan bahsetmeden önce bu hormonun salınımını etkileyen faktörlere bakalım. Bu faktörlere hipotalamo-hipofizer-gonadal (HHG) aks denir. Erkek bireylerde bu aksın iki temel fonksiyonu vardır. Bunlardan ilki üreme performansı bakımından seks hormonlarının salgılanmasını kontrol etmek, ikincisi ise dölleme yeteneğine sahip, sağlıklı spermatogenetik hücrelerin oluşmasını sağlamaktır. HHG aksın erkeklerde hipotalamus, ön hipofiz ve testisler olmak üzere üç büyük bileşeni vardır (Aşçı ve ark 2013).

HHG aksında, hipotalamustan gonadotropin hormon (GnRH) salgılanmakta, salgılanan (GnRH) portal dolaşımla hipofiz bezin ön lobuna gelir ve burada hipofiz bezindeki reseptörleri aracılığıyla gonadotropik hücrelere bağlanmakta ve bu hücrelerden luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) salgılanmaktadır. LH ve FSH sistemik dolaşım ile testislere ulaşmaktadır. LH testislerdeki Leyding hücrelerini uyararak androjen salınımına yol açarken, FSH'ın görevi ise sertoli hücrelerini uyarır ve spermatogenezin başlatılmasına yol açar (Aşçı ve ark 2013). GnRH salınımını etkileyen faktörlerden biri östrojen hormonudur.

Östrojenler hem erkeklerde hem de kadınlarda bulunmakla beraber, reprodüktif dönemdeki kadınlarda çok daha yüksektir. Doğal olarak oluşan östrojenler, kolesterolden türeyen C18 steroidlerdir. C18 steroidleri ise üç tiptir. Bunlar 17 β-östradiol (E2), östrone (E1), and östriol (E3) olmak üzeredir. (Gruber ve ark 2002). Bunların içinde önemlileri ve çok miktarda salgılananı 17β-östradiol'dur. Östron ise; adrenal androjenlerden ve granüloza hücrelerinde üretilir, zayıf etkili ve az miktarda salınmaktadır. Östriol ise, diğerlerinin karaciğerdeki oksidasyon ürünü olarak ortaya çıkar. Sekresyon miktarı açısından 17β-östradial; östronun 12, östriolün ise 80 katı östrojenik etkiye sahiptir (Altunkaynak ve ark 2012). Kanda bulunan başlıca östrojenik hormon, östrojenlerin en önemli aktif gerekli olan östradiol ve daha az aktif olan östrondur. Östradiol testosterondan, östron da androstenedion'dan sentezlenir (Ayvaz 2008).

Steroid hormon östrojen, kadın ve erkeğin her ikisinde de bulunduğu için önemli fizyolojik olaylarda gereklidir. Steroid hormonlar omurgalıların seksüel gelişiminden, büyüme, üreme, bağışıklık sistemi, beyin fonksiyonları ve davranışlarına kadar birçok olayın gelişimini etkilemektedir (Rhen ve Cidlowski

2006). Östrojen, reprodüktif sistem dokularının gelişmesi, farklılaşması ve fonksiyonunda etki gösterir. Östrojenin ayrıca osteoblastların Ca^{2+} depo etmesinin sağlamak ve bunun sonucunda osteoporoza karşı koruyucu ve karaciğer yağlanmasını önleyici, kolesterol düzeyini düşürücü metabolik etkileri vardır. Kan kolesterol seviyesini Düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) azaltıp, yüksek yoğunluklu lipoproteinleri (HDL) artırıcı özellikleri sağlamaktadırlar. Ayrıca beyindeki reprodüktif davranışları ve gonadotropin hormonunun düzenlenmesinde görevlidir (Osborne 1998).

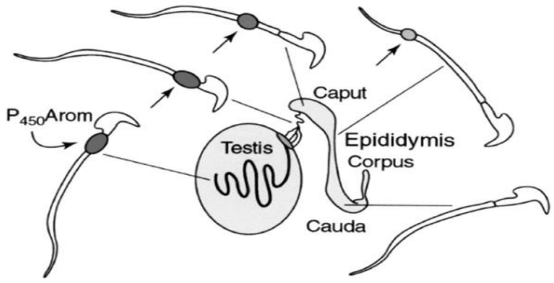
1.4.1. Östrojen Hormonu Biyosentezi

Steroid hormon sentezi, kolesterol molekülünden bir dizi reaksiyon sonucunda pregnan, androstan veya östron ailesindeki moleküllere dönüştürülmesidir (Bulun 2014).

Östrojenler büyük ölçüde kolesterolden sentezlenirken ayrıca küçük bir miktar da olsa asetil CoA'dan da sentezlenirler. Steroid yapılı kolesterolden öncelikli olarak progersteron ve testosteron sentezlenir. Granüloza hücrelerinde testosteronun tümü östrojene dönüştürülür. Östrojenler, 30 dakika içinde dokulara geçerler. Karaciğer östradiol ve östronu östriole çevirir (Altunkaynak ve ark 2012).

Seks steroid sentez aşamalarından en önemlisi; C19 steroidlerinin östradiole (E2) dönüşümünü sağlayan aromataz tarafından gerçekleştirilmesidir (Bulun ve ark 2005). Aromataz enzimi östrojen sentezleyen hücrelerin endoplazmik retikulumunda bulunur. Aromataz, sitokrom P450 süper ailesinin bir üyesi ve CYP19A1 geninin ürünüdür (Simpson ve ark 1994). Aromataz, androstenedion, testosteron ve 16α-hidroksididroepiandrosteron sülfatı sırasıyla estron, estradiol ve estriol'e dönüştürür (Corbin ve ark 1988). Östrodiol P450 aromataz enzimi sayesinde testosterondan sentezlenir.

Testosteronun östrojene dönüşümünden sorumlu olan P450 aromataz enzimi gonadlarda, beyinde, yağ dokusunda, deride ve plasentada bulunmaktadır (Kamat ve ark 2002) (Çizelge 1.4.1.1.). Ayrıca erkeklerde Leyding ve Germ hücrelerinde Western Blot analizi ile saptanmıştır. Yuvarlak spermatitlerin Golgisinde, uzamış spermatitlerin sitoplazması boyunca ve geç spermatitlerin kamçısında bulunmaktadır (Hess ve ark 2001) (Şekil 1.4.1.1.).



Şekil 1.4.1.1. İmmün boyama ile spermde bulunan P450 Aromataz enzimi (Hess ve ark 2001, Yılmaz ve ark 2013).

ER-α, fetal fare beyninde aromataz ekspresyonun düzenlenmesinde önemli role sahiptir (Yılmaz ve ark (2013). Böylece embriyonik dönemde nöronların ve beynin gelişiminde özellikle üremeye yönelik davranış yapı ve fonksiyonların ortaya çıkmasında rol oynadıkları düşünülmektedir.

Çizelge 1.4.1.1. Bazı hayvan ve insan dokularında aromataz varlığı (Cooke ve ark 2017).

Species	Tissues	Reference Nos.
Mouse	Whole testis, Leydig cell, immature germ cell, spermatozoa	67, 121, 247, 330, 496, 724
Rat	Whole testis, Leydig cell, immature germ cell, spermatozoa, epididymal epithelium	34a, 78, 85, 86, 110, 238, 239, 282, 328, 329, 377, 388, 404, 405, 528, 533, 545, 551, 591, 630, 681, 686, 687, 688, 692, 699, 734, 735, 736, 744, 760
Dog	Leydig cell, Sertoli cell, immature germ cell	546, 733
Monkey	Immature germ cell, Leydig cell, immature germ cell	545, 692
Human	Immature germ cell, spermatozoa, epithelium of efferent ductule, epithelium of proximal epididymis	22, 24, 54, 93, 94, 111, 114, 117, 323, 382, 383, 384, 572, 600, 639, 692
Bird	Leydig cell, immature germ cell, spermatozoa	226, 378, 698
Fish	Total testis analysis, Leydig cell, immature germ cell	Dogfish (*S. acanthias*) (60, 156), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (75, 160, 250), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (358), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (357), sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) (396)
Amphibian	Total testis analysis	376, 510
Turtle	Total testis analysis	245, 552
Bear	Leydig cell, Sertoli cell, immature germ cell	318, 511, 690
Deer	Leydig cell	277
Boar	Leydig cell	145, 146, 149, 150, 224, 467, 732
Bull	Total testis analysis	704
Ram	Total testis analysis, Leydig cell	570, 615, 704
Stallion	Leydig cell, Sertoli cell, immature germ cell, epididymis	14, 193, 282, 288, 399, 400, 643
Bat	Leydig cell, Sertoli cell, germ cells	50
Squirrel	Leydig cell, Sertoli cell, germ cells	412, 567
Bank vole	Leydig cell, Sertoli cell, immature germ cell	68, 223, 362, 616

Aromataz enziminin fonksiyonunun anlaşılması için (ArKO) aromataz geni tahrip edilmiş farelerle ve aromataz geninin inaktivasyonuna sebep olan

mutasyonlara sahip erkeklerde yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır (Golovine ve ark 2003, Jones ve ark 2006). ArKO erkek farelerde libido miktarı düşük saptanmıştır ancak bu durum östrojen takviyesiyle aşılmıştır. Böylece aromataz ve östrojenin aynı zamanda seksüel davranışların düzenlenmesinde de temel rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (Simpson ve Jones 2007, Belgorosky ve ark 2009). Yine başka bir çalışmanın da sonucu da destekler yönde olmuştur. ER-α engellenmiş (ERKO) farelerde gösterildiği üzere erkeklerde normal üreme fonksiyonu ve davranış için östrojen gerekmektedir (Couse ve ark 2001, Scordalakes ve ark 2002). Bu yüzden omurgalılarda erkek davranış şekli testosteronun aromataz ile 17-β östrodiole dönüştürülmesi ER aktivasyonuna bağlıdır (Roselli ve ark 1997, Balthazart ve ark 2001).

Erkeklerde aromataz enzim eksikliğinin sonuçlarının ER-α eksikliği ile benzer olduğu görülmüştür. Bu semptomlar önükoid vücut yapısı (kollar ve bacak uzunlukları arası orantısızlık), epifiz kapanması, osteoporozdur (Smith ve ark 1994, Morishima ve ark 1995, Carani ve ark 1997). α-ERKO erkekleri epididimisin başı tarafından sıvı geri emiliminin kesintiye uğraması nedeniyle infertildir. İnfertilitenin nedeni ise; spermin konsantre edilmekten ziyade seyreltilmiş olarak epididime girmesidir (Hess ve ark 1997). ArKO erkekleri ise başlangıçta fertildir. Ancak 4,5 aydan itibaren spermiyojenik aşamaların durdurulduğu ortaya çıkmıştır. Muhtemelen dolaşımda artan LH'nin bir sonucu olarak Leydig hücre hiperplazisi ve hipertrofisi görülmüştür (Robertson KM. ve ark. 1997). İki çalışmanın özeti ERKO ve ArKO erkeklerinin fenotipleri, sperm üretiminde ve işlevinde kritik östrojen rollerinin göstergesidir (Bulun 2014).

1.4.2. Östrojenlerin Etki Mekanizması

Steroid hormonlar (SH) ortak bir "siklo pentan operhidro fenantren" omurgası taşırlar (Jaffe 2006).

Steroid homonlar böbrek üstü bez, gonadlar ve plasentadan sentezlenen hormonlardır (Jaffe 2006).

Çalışmalarda; östrojenin hücresel düzeydeki etkisi temel olarak üç mekanizma ile gösterilmiştir (Isgor ve Watson 2005, Mazzucco ve ark 2006, Rune ve ark 2006, Von Schassen ve ark 2006, Green ve Galea 2008). Bu mekanizmalar ilk

olarak direkt genomik mekanizmalar yoluyla, ikincisi indirekt genomik mekanizmaların olarak sınıflandırılmaktadır (Kuiper 1998, Katzenellenbogen 2000., Matthews 2003, Yılmaz ve ark 2011).

Östrojen moleküllerinin genomik etkilerini östrojen reseptörleri (ERs) aracılığıyla gerçekleşir (Kuiper 1998, Katzenellenbogen 2000., Matthews 2003, Yılmaz ve ark 2011). Son yıllardaki çalışmalarda ER'nin ERα ve ERβ adı verilen iki alt gruba ayrıldıkları görülmektedir. ERα ve ERβ reseptörlerinin farklı doku ve organlarda dağılımları görülmektedir (Sica ve ark 2009, Meyer 2009., Knapczyk-Stwora ve ark 2009). Örneğin; uterus ve meme bezlerinde ERα yoğunluğu fazlayken; merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, immün sistem, ürogenital yollar, kemik, böbrek ve akciğerlerde ERβ'nın baskın olarak bulunduğu saptanmıştır (Zhou ve ark 2002).

Östrojenin etkisi moleküler düzeyde incelendiğinde, 17α-östradiolün hücre membranından geçerek, ERα ve ERβ'nın nükleer yapısına bağlandığı zaman ya DNA üzerinde yerleşik östrojen duyarlı bölge (estrogen response element-ERE) olarak bilinen alana ya da yine DNA üzerindeki AF1 (activation function-1/ NH2-terminal transcriptional AF1) Fos/jun heterodimerlerine bağlanır. Bu etkileme biçimi literatürde direkt genomik mekanizma olarak adlandırılmaktadır (Choudhry ve McEwan 2004, Lavery ve McEwan 2005, Choudhry ve ark 2006, Lavery ve McEwan 2006, Teng ve ark 2008).

İndirekt genomik mekanizmada; 17α-östradiol, bu sefer genomik etkiden faklı olarak hücre membranında yerleşik bulunan ERα ve ERβ reseptörlerine bağlanır (Teng ve ark 2008). Bu etkileşimde, hücre içi ikincil yolaklar vasıtasıyla ortaya çıkar. Başlıca ikincil yolaklar;

- Protein kinaz C (PKC),
- cAMP,
- Protein kinaz A (PKA),
- Mitojenin aktifleştirdiği protein kinaz (MAPK) ve
- Hücre dışı sinyalin düzenlediği kinaz yolağı (ERK) olduğu görülecektir (Toran-Allerand 2004, 2005, McMillan ve ark 2006).

Steroid hormonlar hücre içine girdikten sonra aynı aileden gelen reseptörlere bağlanırlar. Reseptörlere bağlandıktan sonra meydana gelen değişiklikler:

- Reseptörün aktifleşmesini engelleyen moleküler etkileşimin kesilmesi
- Reseptör dimerler oluşumunun kolaylaştırılması
- Hedef genlerin promoter bölgesinde spesifik DNA dizilimlerinin etkileşime girmesini kolaylaştırmak
- Temel transkripsiyon mekanizması ve kromatin yapıyı etkileyen koaktivatör ve kopressör proteinlerin toplanmasına yardımcı olmaktır.

Efferent kanallar ve epididimcaput bölgesinde çok miktarda bulunan östradiol reseptörlerinin (ER) uyarımı ile seminifer tübül sıvısı içeriğindeki su bu bölgelerden geri emilmektedir. Geçiş hızı lümen içeriği visköz olmadığından efferent kanallar ve epididim başında daha yüksek iken, suyun geri emilmesi sonucu visköz hale gelen içerikten dolayı distal epididimde azalmaktadır (Gundiah ve ark 2007, Lee ve ark 2008). Epididim tübülü boyunca sperm geçiş hızı sanıldığından daha önemlidir. Epididim segmentlerinde sekrete ve absorbe edilen moleküllerin farklı yoğunlukları spermatozoa olgunlaşmasını etkilemektedir. Efferent kanallar ile kauda epididim arasındaki sperm konsantrasyonundaki artış sıvı geri emilimine bağlıdır. Bir çok çalışmanın sonuçları gösteriyor ki, spermatozoalar epididim baş kısmına ulaşana kadar rete testisten gelen sıvının %75-95'i geri emilmektedir. Bu sıvının çoğu östrojen ve östrojen reseptörleri tarafından efferent kanallardan geri emilmektedir (Lee ve ark 2008). Epitelyal hücre membranında bulunan aquaporin kanalları aracılığıyla suyun epididim lümeninden çekilmesi sağlar. Suyun geri emilmesi intralüminal sperm konsantrasyonunu dereceli olarak arttırır ve kauda epididim yoğun sperm yığınları ile dolar. Spermlerin progresif motilite ve ovuma bağlanma kapasiteleri kaput epididimde sıfır iken, kauda epididimde çok daha yüksektir.

1.4.3. Erkek Üreme Sisteminde Östrojen Hormonu ve Östrojen Reseptörünün Rolü

Erkeklerde östrojen fonksiyonlarına tarihsel açıdan bakacak olursak; 17β-Estradiol (E2) ve diğer östrojenler, kadın üreme gelişimi ve fonksiyonunun birçok yönünü düzenler. Östrojenler ilk 1930'larda aygırlarda tespit edilmesine rağmen 1960'lar ve 1970'lerde, erkeklerin önemli miktarlarda östrojen ürettikleri tespit edilmiştir (Zondek 1934). Son yirmi yılda, transgenik fare modellerini kullanan

çalışmalar, östrojenlerin erkek üreme ve üreme dışı organların normal gelişimi ve işlevi için kritik olduğunu ortaya koymuştur (Cooke ve ark 2017). İlk çalışmalar östrojenlerin erkek davranışlarını etkilediğini göstermiştir (Levine S ve Jr. 1964, Feder HH 1965.). Son olarak, erken östrojen uygulaması, kanserojen kaynaklı karaciğer kanserine erkek duyarlılığını arttırmıştır (Weisburger ve ark 1966).

Östrojenler 1960'larda radioimmunoassay yöntemleriyle yapılan çalışmalarda erkeklerde, dolaşımdaki E2 ve diğer östrojenlerin çeşit konsantrasyonlarının ovariektomize edilmiş dişi sıçanlara göre yüksek çıktığı gözlenmiştir. Yüksek E2 konsantrasyonları rete testis sıvısında ve birçok türün sperminde bulunur (Cooke ve ark 2017) (Çizelge 1.4.3.1.).

Çizelge 1.4.3.1. Erkekte bazı dokularda östrojen konsantrasyonları (Cooke ve ark 2017).

Source	Concentration	Species	Reference Nos.
Peripheral blood	3.6–91 pg/ml	Human	98, 112, 181, 207, 523, 762
	29–197 pM		125, 397, 495, 607
	43–464 pM (estrone)		397, 607
	40–145 pg/ml	Monkey	716
	2–175 pg/ml	Rat	58, 147, 168, 184, 340
	~70 pM	Mouse	77
	73.4 pg/ml	Horse	623
	64–250 ng/ml (estrone sulfate)		138, 571
	9–180 pg/ml	Bull	192, 232
	6.3 pg/ml	Ram	459
	~180 pg/ml	Boar	139, 624
	0.18 nM (total estrogens)		
	21.5 nM (estrone sulfate)		
	22.1–24.7 pg/ml	Avian	401
Testicular vein	104–200 pg/ml	Monkey	716
	19.0 pg/ml	Rat	168
	450 ng/ml (estrone sulfate)	Horse	623
	1.09 nM (total estrogens), 52.4 nM (estrone sulfate)	Boar	624
Testicular lymph	900 ng /ml (estrone sulfate)	Horse	623
Testicular homogenate	5–20 ng/g	Man	112
	39–751 pg/g	Rat	137, 340
	~4,500 pg/g (breeding season), ~100 pg/g (nonbreeding)	Avian	401
Rete testis	14–195 pg/ml	Monkey	716
	249 pg/ml	Rat	225
	11.5 pg/ml	Bull	232
	0.38 nM (total estrogens), 8.60 nM (estrone sulfate)	Boar	624
Semen	162 pg/ml	Man	98
	50–73 pg/ml (E2)	Horse	138, 399
	0.73–6.3 ng/ml (estrone sulfate)		138, 399, 571
	50–890 pg/ml	Bull	192, 232, 246
	430 pg/ml (E2), 860 pg/ml (estrone)	Boar	139

Erkeklerde E2 üretimi, sitokrom P450 redüktaz enzimi olan aromataz enzimi (Cyp19a1) gerektirir (Carreau ve ark 2010). LH ile uyarılmış leydig hücrelerinin, daha fazla aromataz eksprese ettikleri için birincil kaynak olduğunu ileri sürülmüştür (Çizelge 1.4.3.2.). (Rommerts ve Brinkman 1981, Van der Molen HJ 1981., Kurosumi ve ark 1985, Payne ve ark 1987, O'donnell ve ark 2001, Lambard ve ark 2005, O'Donnell L ve Louis 2006, Carreau ve ark 2008, Haverfield ve ark 2011).

Erkeklerde, en yüksek EST (östrojen sülfotransferaz) konsantrasyonları ve aktiviteleri testistedir, ancak epididim ve duktus deferens'te de görülür (Roberts 1987, Hobkirk ve Glasier 1992, Tong ve Song 2002, Luu-The ve ark 2005, Frenette ve ark 2009). Testislerde, sadece Leydig hücrelerinde bulunur, ancak farede epididimis ve duktus deferens epitelinde ve ayrıca duktus deferensin düz kasında bulunur (Tong ve Song 2002). EST nakavt farelerden alınan testler Leydig hücreli hiperplazi ve hipertrofiyi, testis ve epididyal ağırlığının azaldığını göstermiştir (Qian ve ark 2001). Sperm hareketliliği ve doğurganlık da azaldı.

Çizelge 1.4.3.2. Erkek dokularında aromataz varlığı (Cooke ve ark 2017).

Species	Tissues	Reference Nos.
Mouse	Whole testis, Leydig cell, immature germ cell, spermatozoa	67, 121, 247, 330, 496, 724
Rat	Whole testis, Leydig cell, immature germ cell, spermatozoa, epididymal epithelium	34a, 78, 85, 86, 110, 238, 239, 282, 328, 329, 377, 388, 404, 405, 528, 533, 545, 551, 591, 630, 681, 686, 687, 688, 692, 699, 734, 735, 736, 744, 760
Dog	Leydig cell, Sertoli cell, immature germ cell	546, 733
Monkey	Immature germ cell, Leydig cell, immature germ cell	545, 692
Human	Immature germ cell, spermatozoa, epithelium of efferent ductule, epithelium of proximal epididymis	22, 24, 54, 93, 94, 111, 114, 117, 323, 382, 383, 384, 572, 600, 639, 692
Bird	Leydig cell, immature germ cell, spermatozoa	226, 378, 698
Fish	Total testis analysis, Leydig cell, immature germ cell	Dogfish (*S. acanthias*) (60, 156), European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (75, 160, 250), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (358), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (357), sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) (396)
Amphibian	Total testis analysis	376, 510
Turtle	Total testis analysis	245, 552
Bear	Leydig cell, Sertoli cell, immature germ cell	318, 511, 690
Deer	Leydig cell	277
Boar	Leydig cell	145, 146, 149, 150, 224, 467, 732
Bull	Total testis analysis	704
Ram	Total testis analysis, Leydig cell	570, 615, 704
Stallion	Leydig cell, Sertoli cell, immature germ cell, epididymis	14, 193, 282, 288, 399, 400, 643
Bat	Leydig cell, Sertoli cell, germ cells	50
Squirrel	Leydig cell, Sertoli cell, germ cells	412, 567
Bank vole	Leydig cell, Sertoli cell, immature germ cell	68, 223, 362, 616

Erkeklerde, periferik kandaki östrojen konsantrasyonu düşüktür, ancak türe bağlı olarak 2-180 pg/ml arasındadır (Hess ve ark 2001). Östrojen konsantrasyonları tipik olarak testis damarında daha yüksektir (De Jong ve ark 1973, Waites ve Einer-Jensen 1974, Setchell ve Cox 1982, Setchell ve ark 1983).

Aşırı östrojen salınımı olan erkeklerde jinekomasti ve kadın tipi yağlanmanın olması gibi feminizasyon belirtilerinin ve libido azalması, impotans ve prostat hacminde azalma gibi androjen yetersizliği belirtilerinin ortaya çıkması, östojenlerin HHG aksı baskıladığı görünüşünü doğurmuştur (Veldhuis ve Dufau 1987).

1960'larda Jack Gorski, Elwood Jensen, Bert O'Malley ve diğerleri tarafından yapılan çalışmalar, steroid hormonu sinyalizasyon mekanizmasını belirledi (Gorski ve ark 1968, McGuire ve Lisk 1968, Soloff ve Szego 1969). Son zamanlarda erkek organlarında ER dağılımı ile ilgili veriler öncelikle immünohistokimyadan geliyor. Ek olarak, burada tarif ettiğimiz ESR1 ve ESR2 destekleyicilerinin kontrolü altında kırmızı flüoresan proteinini (RFP) ifade eden yeni fare modeli gibi metodolojiler geliştirilmeye devam edilmektedir (Cooke ve ark 2017). Erken ER çalışmaları kadın organlarına odaklandı, ancak ER erkeklerde de gösterildi. Erkeklerde birçok çalışma hipotalamus gibi beyin bölgelerini incelemiştir (Stumpf 1971). Daha sonra ER'ler erkek üreme yanı sıra üreme yapmayan (karaciğer, kas ve böbrek) organlarında da bildirilmiştir (Mester ve Baulieu 1972, Lı ve ark 1974, Dube ve ark 1976). Son zamanlarda erkek organlarında ER dağılımı ile ilgili veriler immünohistokimya ile elde edilmektedir. İnsanlarda ve deneysel türlerin çoğunda, testis germ hücreleri ve epididimal spermler, efferent duktül ve epididim epitelinde bol miktarda ER-α 'i hedefleyebilen benzersiz östrojen kaynakları olarak işlev görür (Hess ve ark 2011) (Çizelge 1.4.3.3).

ER-β'nın klonlanmasına kadar östrojenin biyolojik etkilerinin tek bir reseptör ER-α üzerinden olduğu düşünülmekteydi (Kuiper 1998). İki farklı genin ürünü olan ER-α ve ER-β'yı kodlayan genlerin değişik dokularda bulunduğu ve reseptörlerinin östrojen sinyalleri üzerinde farklı roller oynadığı gösterilmiştir (Kuiper 1998, Couse ve ark 2001).

Çizelge 1.4.3.3. Türlerin çeşitli dokularında ER-α 'i hedefleyen östrojen kaynakları (Hess ve ark 2011).

Organ	Bird	Fish	Amphioxus	Newt	Turtle	Lizard	Bat	Rat, Hamster, & Squirrel	Mouse & Vole	Dog	Cat	Goat & Ram	Marsupial	Horse	Boar	Monkey	Human
Testis	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+/-
Leydig cell		+		+	+		+/-	+/-	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-
Sertoli cell		-	+	+	-		+/-	+/-	+/-	-	+		+	+	+	-	+/-
Germ cell		-/+	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	-	-		+	+	+	+/-	+/-
Myoid cell*					-		-	+/-	+	+	+		-	+	-		+/-
Rete testis	+				+		+	+/-		+	+	-				-	+
Efferent ducts	+				+	+	+	+	+	+	+	+				+	+
Epididymis	+				+	+	+	+/-	+	-	+					+	-
Vas deferens								+/-	+/-	-	+						+
Reference Nos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17

İn vitro çalışmalarda ER-α ve ER-β'nın doğal östrojenlere afiniteleri benzer olmasına rağmen ikisininde kendine has fonksiyonları olduğunu göstermiştir (Çizelge 1.4.3.4.). Çalışmalara dayanarak bu iki reseptörün kendilerine has amino terminal (A/B) bölgelerinden kaynaklandığı söylenebilir.

Çizelge 1.4.3.4. Farelerde dokuya spesifik ER-α ve ER-β ekspresyonu (Kuiper ve ark 1997).

Doku	*Reseptör*	
	ERα	*ERβ*
Epididim	+++	+
Prostat	+	+++
Testis	+++	+
Hipofiz	++	+
Over	+++	+++
Uterus	+++	++
Mesane	+	++
Akciğer	0	+
Karaciğer	+	0
Böbrek	++	0
Timus	+	+
Adrenal	++	0
Olfaktör lob	0	+
Serebellum	0	+
Beyin sapı	0	+
Spinal kord	0	+
Kalp	+	0

Dişilerde hem ER-α hem de ER-β'nın normal over gelişiminde gerekli olduğu bilinmekle beraber, bu reseptörlerin engellenmiş olduğu farelerde farklı fenotiplerin

geliştiği gözlenmiştir. ER-α engellenmiş farelerin overlerinde kistik foliküllerin biriktiği izlenmiştir. ER-β engellenmiş farelerde ise histolojik olarak normal overler bulunmasına rağmen ovulasyon bozukluğu tespit edilmiştir. Mevcut kanıtlara dayanarak, diğer dokulardaki östrojen etkileşiminin ER-α'nın sorumlu olduğu söylenebilir. Uterusun gelişimi ve farklılaşmasında sadece ER-α'nın etkili olduğu, yine farelerde yapılan deneylerde meme bezi gelişiminde ER-α'nın etkilisi görülmüştür. Ayrıca ER-α engellenmiş dişi farelerde cinsel davranış bozukluğu görülmüştür.

Sertoli hücreleri üzerinde FSH, testosteron ve östrojen hormon reseptörleri bulunmaktadır. Östrojenler, Sertoli hücreleri için çok önemlidir. Östrojenler içinde, 17 β-östradiol (E2)'ün Sertoli hücre proliferasyonunu immatür ratlarda aktive ettiği ve bu sayede normal testis gelişiminin sağlandığı belirtilmektedir (Lucas TF ve ark. 2011). Yine Sertoli hücrelerinin bölünme aşamasında bu hücrelerin yüksek miktarda östrojen salgılaması, östrojen reseptörlerinin Sertoli hücrelerinin mitojenik aktivitesine katıldığını göstermektedir. Sharpe ve arkadaşları sıçanlarda ekzojen olarak uygulanan östrojenin FSH düzeyini ve Sertoli hücre matürasyonunu azaltarak spermatogenezis ve testiküler histolojide kalıcı defektler yarattığını Dorrington ise östrojenin, sertoli hücre bölünmesini uyardığı ancak farklılaşması ve gelişimi üzerine negatif etki oluşturduğu bildirilmiştir. Yine çalışmalarda erkek fertilitesi için E2'nin gerekli olduğu ve E2 reseptör bozukluğu olan erkek farelerin infertil olduğu gösterilmiştir. Literatürü gözden geçirdiğimizde, FSH eksikliği veya FSH reseptör bozukluğu olan erkeklerin tümünde komplet spermatogenez duraksamasının olmaması buna karşın E2 reseptör aktivitesi olmayan erkeklerde infertilite görülmüştür (Majewski ve ark 2009).

ER-α engellenmiş erkek farelerde infertil olmasına rağmen ER-β engellenmiş farelerde üreme fonksiyonunun normal olduğu saptanmıştır. ER-α'dan yoksun erişkin erkeklerde kemik mineral yoğunluğunun azaldığı, kemik yapım-yıkımını arttığı epifizlerin yetersiz kaldığı belirtilmiş ve böylece östrojen ve östrojen reseptörlerinin kemik gelişimi ve homeostazlarda rol oynadığı gösterilmiştir (Zhou ve ark 2002).

Sonraki çalışma, şu anda G protein-birleşik östrojen reseptörü (GPER) olarak bilinen bir ER daha ortaya çıkardı. Bu protein, hücre membranları ve endoplazmik

retikulum ile ilişkilidir ve ESR1 / ESR2'den daha az afinite olmasına rağmen, E2 gibi östrojenleri bağlar (Filardo ve ark 2000, Revankar ve ark 2005, Thomas ve ark 2005). ESR1 ve ESR2 ekspresyonu yetişkin erkek fare üreme yolları boyunca gerçekleşir (Zhou ve ark 2002). Testislerde, çoğu antikor ESR1'i Leydig, peritubüler ve Sertoli hücrelerinde bulunmaktadır (Gunawan ve ark 2011, Lucas ve ark 2014, Lin ve ark 2015).

Diğer taraftan; ESR2'de Leydig, peritubular, germ ve Sertoli hücrelerinde bulunmaktadır. Efferent kanallarda ESR1 uterustan üç kat daha fazla yoğunluğa sahiptir (Hess ve ark 1997, Cacioppo ve ark 2016). ESR1'in aksine, ESR2 birkaç türün erkek üreme organlarında her yerde rastlanlanır ancak, tür, yaş, antikor, ve organa bağlıdır. Örneğin, fare testikülerde ESR2, doğum sonrası 1-5 gününden sonra kuvvetli bir şekilde eksprese edilmiş, daha sonra neredeyse 12-26 günlerinde bulunmamıştır (Prins ve ark 1998, Saunders ve ark 1998, Saunders ve ark 2001, Nie ve ark 2002, Zhou ve ark 2002, Oliveira ve ark 2003, Cacioppo ve ark 2016).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Örnek Toplama

Çalışmaya, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Tüp Bebek Merkezine spermiogram testi yaptırmak üzere başvuran, sigara ve alkol kullanmayan, kemoterapi, radyoterapi gibi bir tedavi almayan, sperm parametrelerini değiştirdiği bilinen başka bir neden olmaksızın, çalışmaya katılmayı gönüllü olarak kabul eden, 18-45 yaş aralığında bulunan 30 erkek birey dahil edildi. Tüm hastalardan onam formu alındı. Azospermik bireyler mikroskobik inceleme ile tespit edildikten sonra çalışma dışında tutuldu.

Semen örnekleri 3-5 günlük cinsel perhiz süresi ardından mastürbasyon yolu elde edildi ve steril kaplara alındı. Daha sonra likefaksiyon işlemi için oda sıcaklığında 30-60 dakika bekletildi ve likefaksiyon süreleri kaydedildi.

2.2. Semen Analizi

Semen örnekleri likefiye olduktan sonra ilk önce makroskopik olarak değerlendirilerek görünüm, renk, koku özellikleri, viskozite, hacim ve pH değerleri kaydedildi. Daha sonra mikroskopik değerlendirmeye geçildi. Semen örnekleri Makler kamara kullanılarak, 20X büyütmede faz kontrast mikroskobunda (Olympus, CX31) sperm sayısı ve motilite özellikleri açısından değerlendirildi. Ardından semen örnekleri, spermlerin morfolojik anomalilerinin değerlendirilmesi için lamlara yayılarak yayma preparatları hazırlandı. Yayma preparatlar tespit edildikten sonra boyamaları (Spermac boyası (FERTİPRO)) yapıldı ve X100 büyütmede mikroskop altında incelendi. Spermlerin baş, boyun ve kuyruk anomalileri detaylı olarak değerlendirilerek kaydedildi.

Sperm parametrelerinin değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Örgütü (2010) kriterleri kullanıldı. Sperm parametreleri; sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, total sperm motilitesi (WHO class A+B+C), progresif sperm motilitesi (WHO class A+B), doğrusal progresif motilite (WHO class A) ve normal sperm morfolojisini kapsadı. Anormal sperm parametreleri; sperm konsantrasyonu <15 milyon/ml, total sperm sayısı <39 milyon, total sperm motilitesi <%40, progresif sperm motilitesi <% 32 ve normal sperm morfolojisi <%4 (Kruger Kriteri) olarak değerlendirildi. Bu

kriterlere göre çalışmaya katılan bireyler 4 gruba ayrıldı: Normozoospermi; sperm konsantrasyonu ≥15 milyon/ml, total sperm motilitesi ≥%40 ve/veya progresif sperm motilitesi ≥%32, normal sperm morfolojisi ≥%4 (Kruger Strict kriteri) ve sperm vitalitesi ≥%58 olan bireyler, Oligozoospermi: sperm konsantrasyonu <15 milyon/ml ve/veya total sperm sayısı <39 milyon olan bireyler, Asthenozoospermi: total sperm motilitesi <%40 ve/veya progresif sperm motilitesi <%32 olan bireyler, Teratozoospermi: normal sperm morfolojisi <%4 olan bireyler.

2.3. İmmünoflouresan Analiz

Rutin semen analizinden sonra kalan ve atılacak olan semen örnekleri immunoflouresans analiz için kullanıldı. Bu amaçla semen örnekleri lizinli lam üzerine yayılarak oda ısısında bir süre kurumaya bırakıldı. Yayma preparatları daha sonra absolu metanol ile tespit edildi ve indirekt immünofluoresan boyama protokolüne uygun olarak boyandı.

İmmunoflouresan boyamada ER-α, ER-β ve GPR30 için primer antikorlar kullanıldı. Boyama protokolünde özetle; permeabilizasyonu arttırmak için %0,25 Triton X-100 (sc-29112 Santa Cruz Biotecnology) içeren PBS'de 10 dakika bekletildi. Daha sonra preparatlar non-spesifik boyanmaları önlemek için serum blok solüsyonunda (10X Blocking Buffer (ab126587) 30 dakika bekletildi. Blok solüsyonunu pipetle çekildi, yıkama yapılmadı. Blok solüsyonundan sonra preparatlar ER-α (rabbit poliklonal; Abcam; ab3575, 1:100), ER-β (mouse monoklonal; Abcam; ab288, 1:200) ve GPR30 (rabbit poliklonal; Abcam; ab39742, 1:200) için primer antikorlar ile 4 °C'de 1 gece boyunca muamele edildi. Daha sonra uygun sekonder antikorlarda 1 saat bekletildi. Sekonder antikorlar olarak 1:200 oranında dilüe edilen goat anti-rabbit IgG-FITC Alexa Fluor ® 488; Abcam; ab150081) ve goat anti-mouse IgG-TR (Alexa Fluor ® 647; Abcam; ab150119) kullanıldı. Basamaklar arasında yıkama solüsyonu olarak PBS (P4417-100TAB Sigma) kullanıldı. Preparatlar son olarak nukleusların boyanması için DAPI içeren kapatma medyumu kullanılarak kapatıldı.

Tüm preparatlar, 100X büyütmede flouresan mikroskobu (Olympus BX51) altında incelendi. Spermlerde östrojen reseptör ekspresyonları her preparatda 10 farklı alanda, toplam 100 spermin sayılmasıyla değerlendirildi. Her bir östrojen reseptörünü eksprese eden spermler sayılarak östrojen reseptör ekspresyon yüzdeleri belirlendi.

2.4. İstaistiksel Analiz

İstatistiksel analizde Statistical Package for Social Sciences version 17.0 (SPSS-17.0, for windows) program kullanıldı. Östrojen reseptör ekspresyonları ile sperm parametreleri arasındaki ilişki Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Öströjen reseptör ekspresyonları ile sperm parametreleri arasındaki korelasyonların belirlenmesi için Spearman korelasyon testi uygulandı. $P<0,05$ olması anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

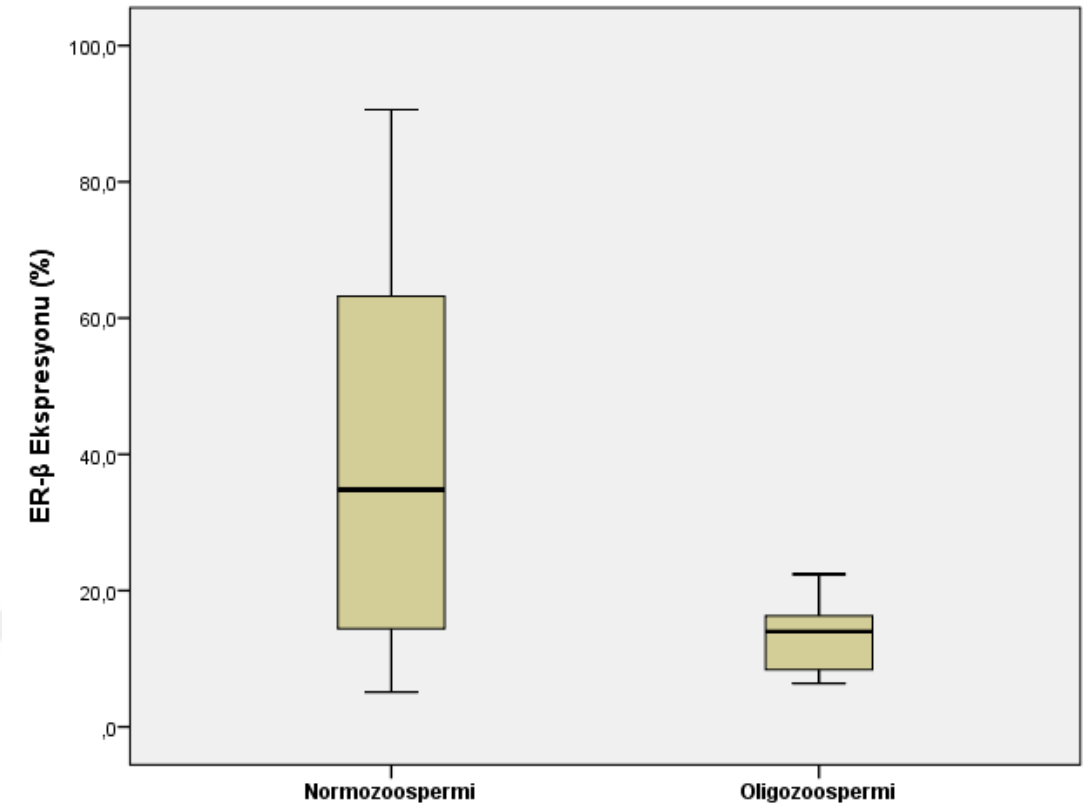
İmmunoflouresan sonuçlarımız; ER-α, ER-β ve GPR-30 reseptörlerinin sperm hücrelerinde eksprese edildiğini ortaya koydu. Tüm bireylerde ER-β ekspresyonunun % 28,4 oranla en yüksek seviyede olduğu, bunu % 21,5 oranla ER-α ekspresyonunun izlediği, GPR30 ekspresyonunun ise %16,7 oranla en düşük seviyede olduğu görüldü. Östrojen reseptörlerinin özellikle olgun spermiumların baş kısmında; nukleus ve akrozomal kep bölgesinde, sperm membranında, orta ve eses parçalarında eksprese edildiği tespit edildi.

3.1. Östrojen Reseptör Ekspresyonlarının Sperm Parametreleri ile İlişkisi

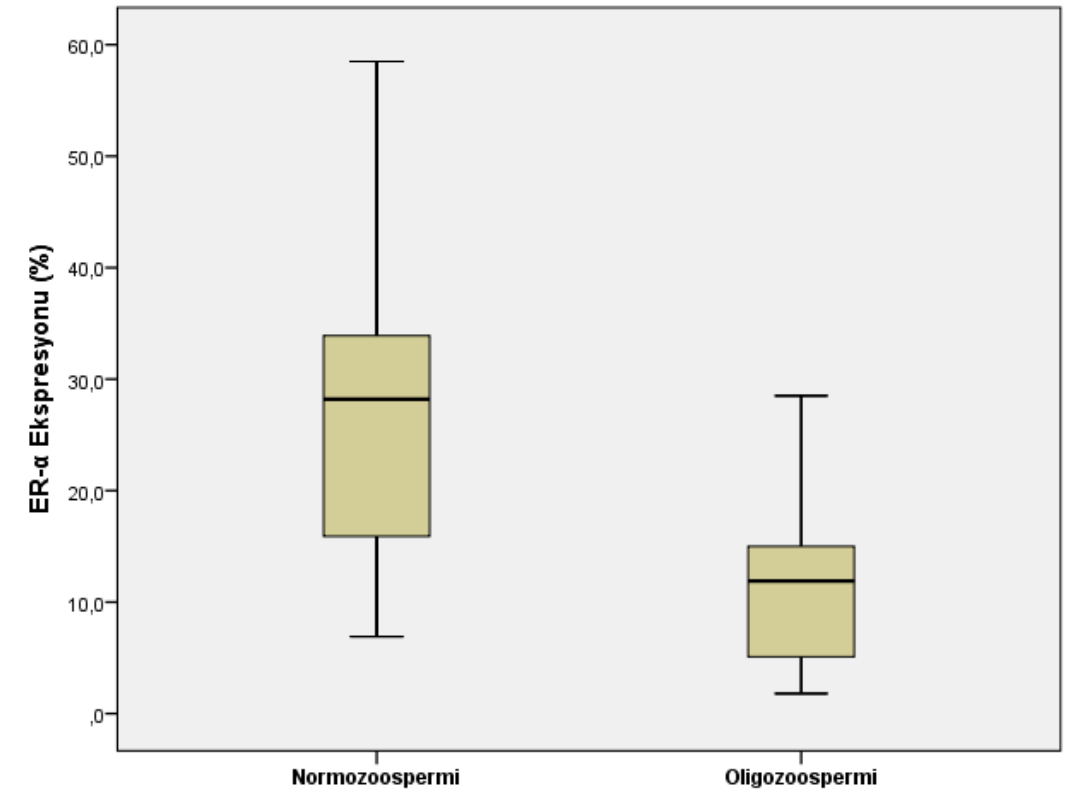
Sperm parametreleri ile sperm hücrelerinde eksprese edilen östrojen reseptörlerinin ilişkisi değerlendirildiğinde; oligozoospermi grubunda, normozoospermi grubuna göre ER-α, ER-β ve GPR-30 ekspresyonlarında azalma olduğu görülmekle birlikte, istatistiksel olarak ER-β ve GPR30 ekspresyonlarındaki azalma anlamlı olarak bulundu. Normozoospermi ile asthenozoospermi ve teratozoospermi grupları arasında ise östrojen reseptör ekspresyonlarında anlamlı bir fark bulunmadı. Normozoospermi ile oligozoospermi gruplarında östrojen reseptör ekspresyonları Çizelge 3.1.1. ve Şekil 3.1.1., 3.1.2., ve 3.1.3.'de görülmektedir.

	ER-β (%)	**ER-α (%)**	**GPR30 (%)**
Normozoospermi	33,3±23,4	23,9±15,6	19±11,2
Oligozoospermi	13,9±6,5	12,5±10,4	9,4±9
Total	28,4±22,1	21,5±15,2	16,7±11,3

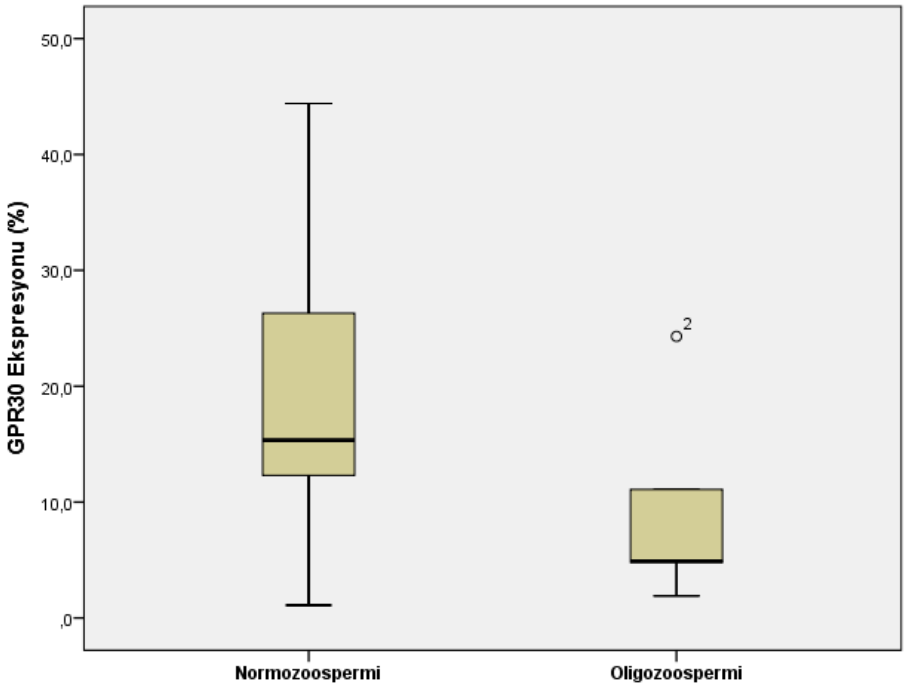
Çizelge 3.1.1. Normozoospermi ile oligozoospermi gruplarında östrojen reseptör ekspresyon oranları. Gruplar arasında ER-β için p=0,04, GPR30 için p=0,05, ER-α için P>0,05



Şekil 3.1.1. Normozoospermi ile oligozoospermi gruplarında ER-β ekspresyonu



Şekil 3.1.2. Normozoospermi ile oligozoospermi gruplarında ER-α ekspresyonu



Şekil 3.1.3. Normozoospermi ile oligozoospermi gruplarında GPR30 ekspresyonu

3.2. Östrojen Reseptör Ekspresyonlarının Sperm Parametreleri ile Korelasyonları

Sperm parametreleri ile östrojen reseptör ekspresyonları arasındaki korelasyonlar değerlendirildiğinde; ER-β ile sperm konsantrasyonu, total sayısı, doğrusal progresif motilitesi ve total progresif motil sperm sayısı (TPMSS) arasında pozitif korelasyon saptandı.

ER-α; sperm total motilitesi ile pozitif korelasyon gösterirken, diğer sperm parametreleri ile aralarında herhangi bir korelasyon bulunmadı.

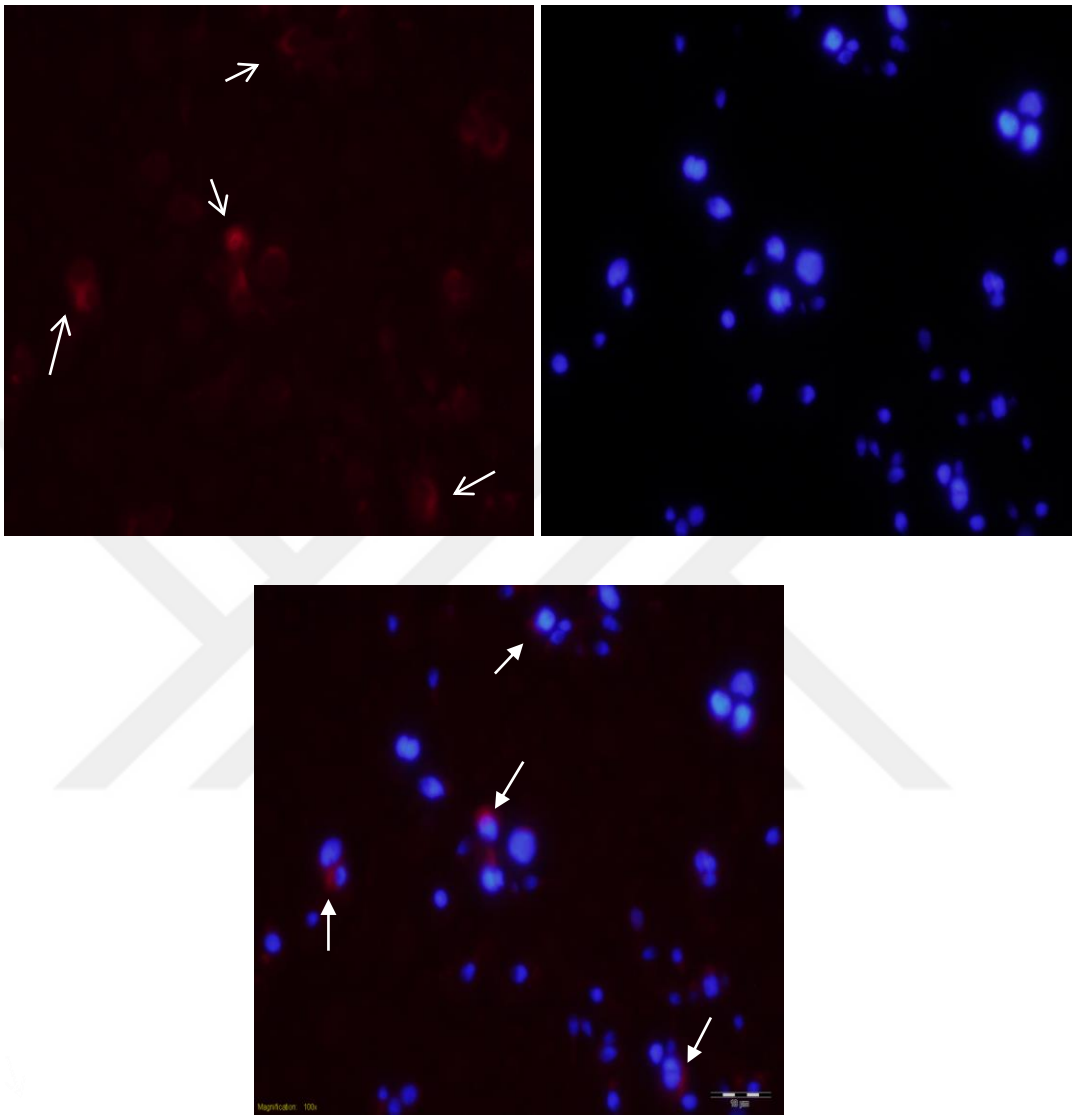
GPR30 ile sperm parametreleri arasında herhangi bir ilişki saptanmadı.

3.3. Östrojen Reseptör Ekspresyonlarının Sperm Morfolojik Anomalileri ile Korelasyonları

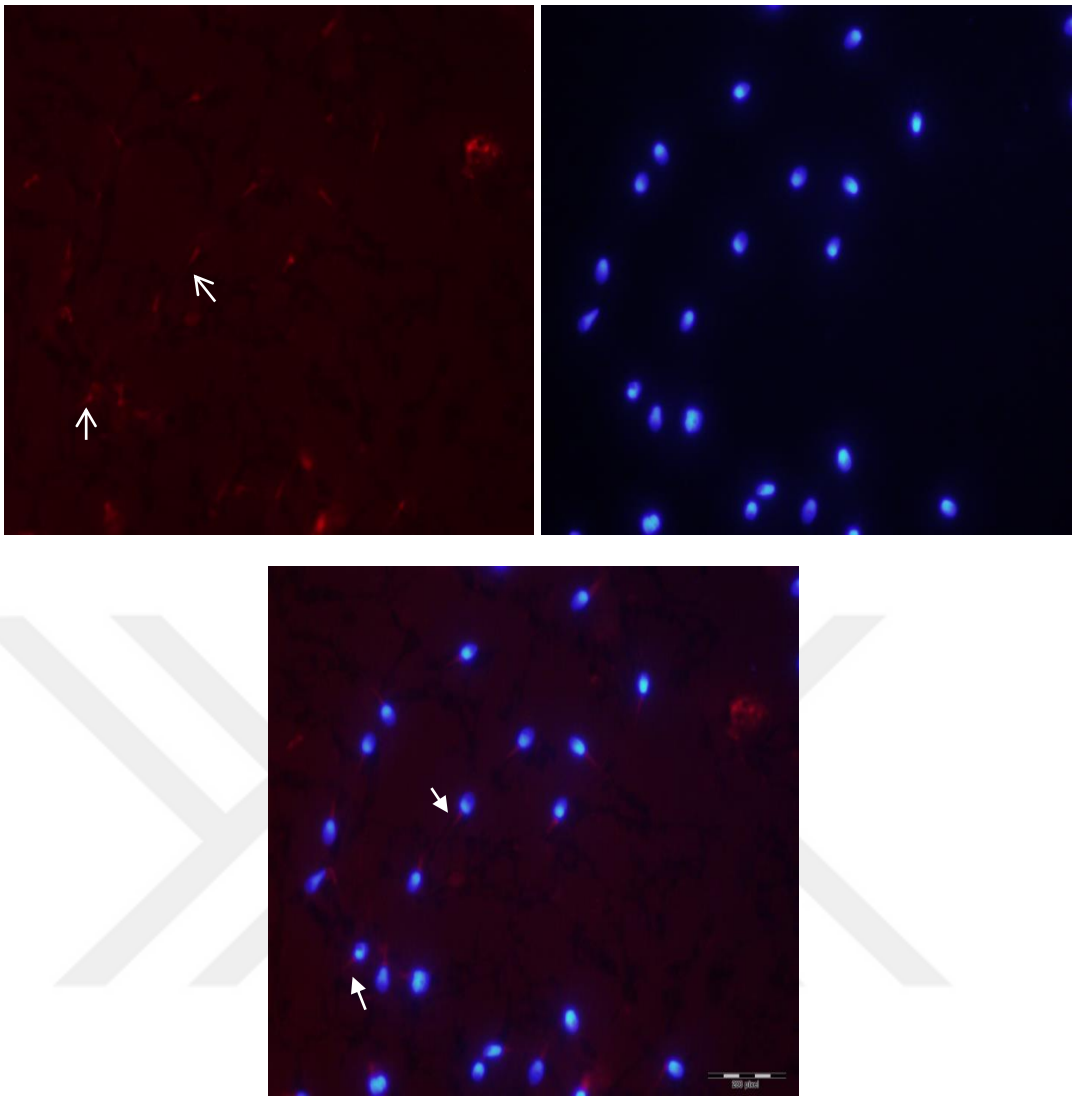
3.3.1. ER-β ekspresyonunun Sperm Morfolojik Anomalileri ile Korelasyonları

ER-β ekspresyonunun, total baş anomalisi ile negatif korelasyon gösterdiği bulundu. Morfolojik anomalilerin detayına bakıldığında, ER-β ile büyük baş anomalisi arasında negatif, kırık boyun anomalisi arasında pozitif korelasyon görüldü.

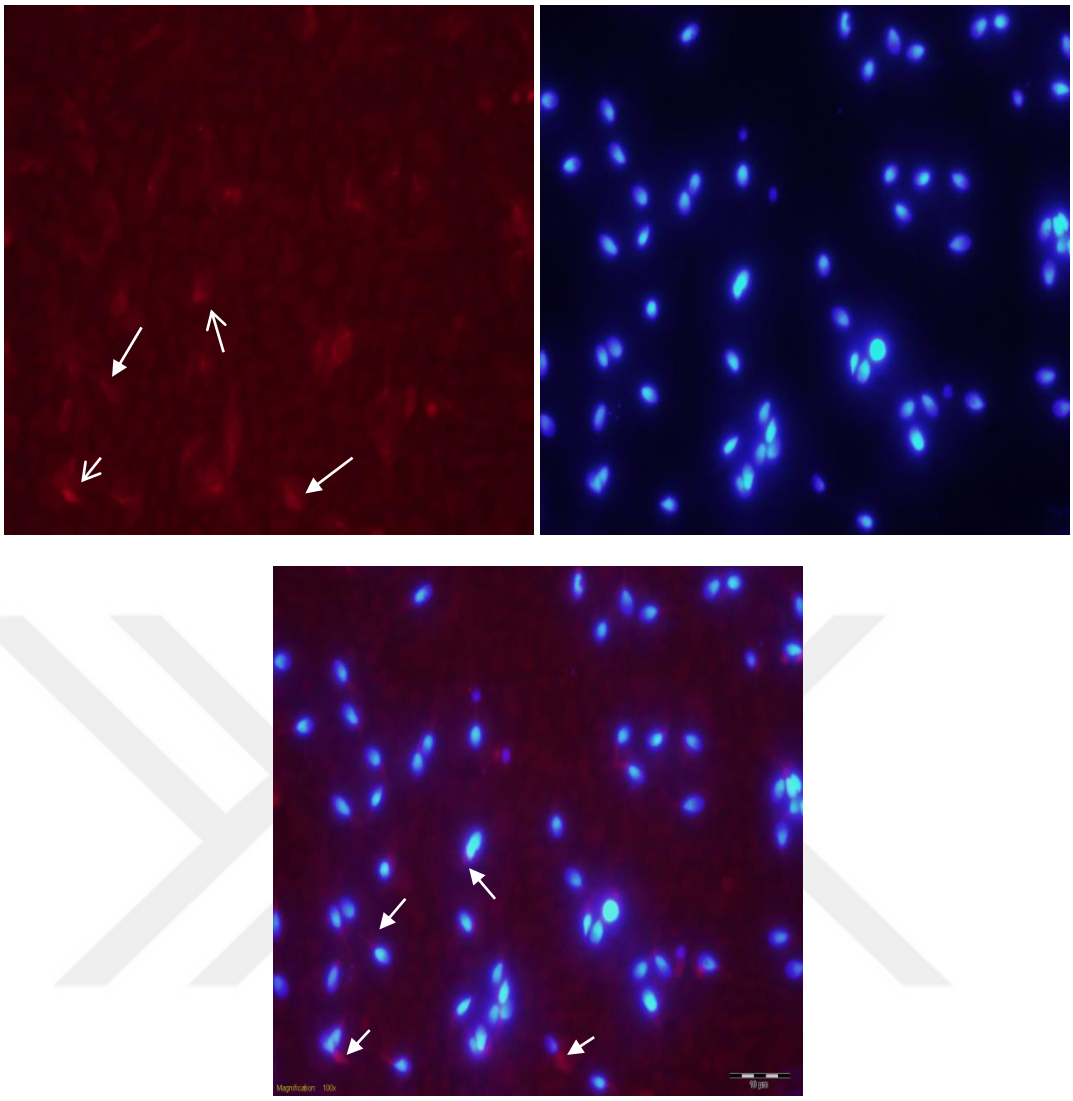
ER-β'nın yaygın olarak spermin baş bölgesinde; akrozomal kep bölgesinde ve nukleusunda ve bunun yanında orta parçasında, az da olsa morfolojik anomali olan sitoplazmik droplette lokalize olduğu tespit edildi.



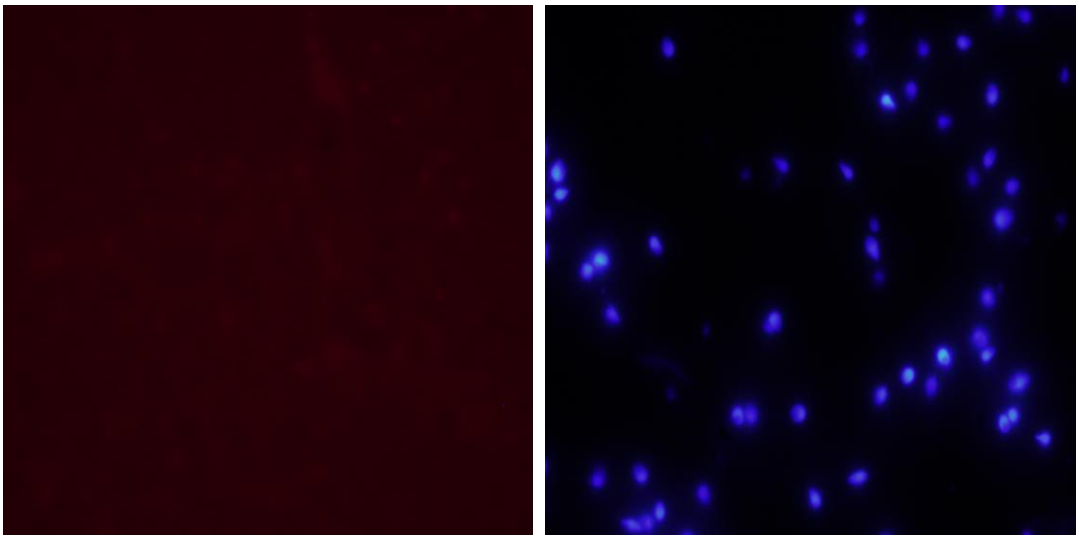
Şekil 3.3.1.1. İmmünoflouresan boyanma. ER-β Ekspresyonu: (A) Kırmızı floresan (Texas-Red); spermin akrozomal kep bölgesinde ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.



Şekil 3.3.1.2. İmmünoflouresan boyanma. ER-β Ekspresyonu: (A) Kırmızı floresan (Texas-Red; spermin orta parçasında ekpresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.



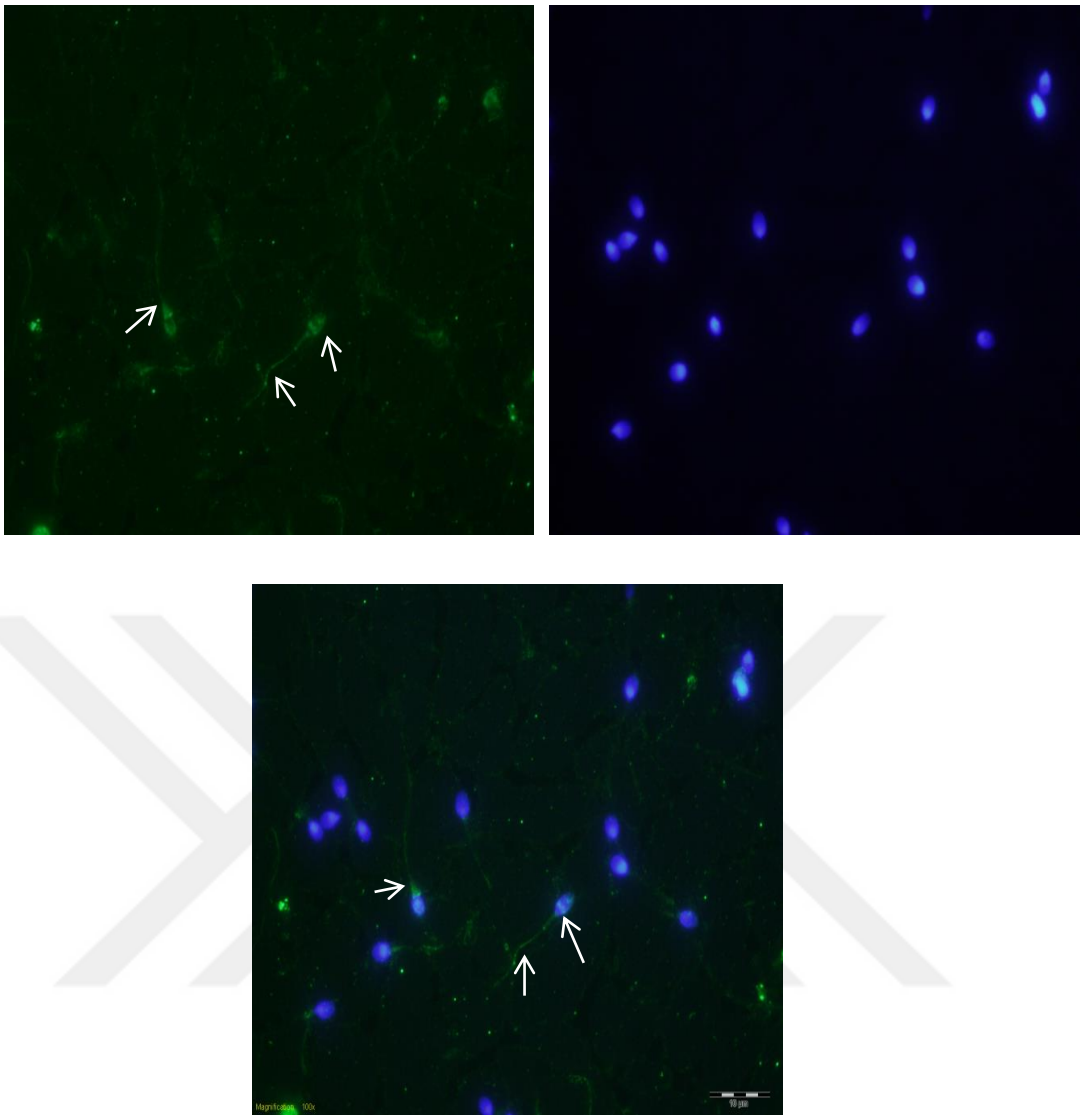
Şekil 3.3.1.3. İmmünoflouresan boyanma. ER-β Ekspresyonu: (A) Kırmızı floresan (Texas-Red); spermin normal orta parçası, akrozomal kep ve sitoplazmik droplet bölgesinde ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.



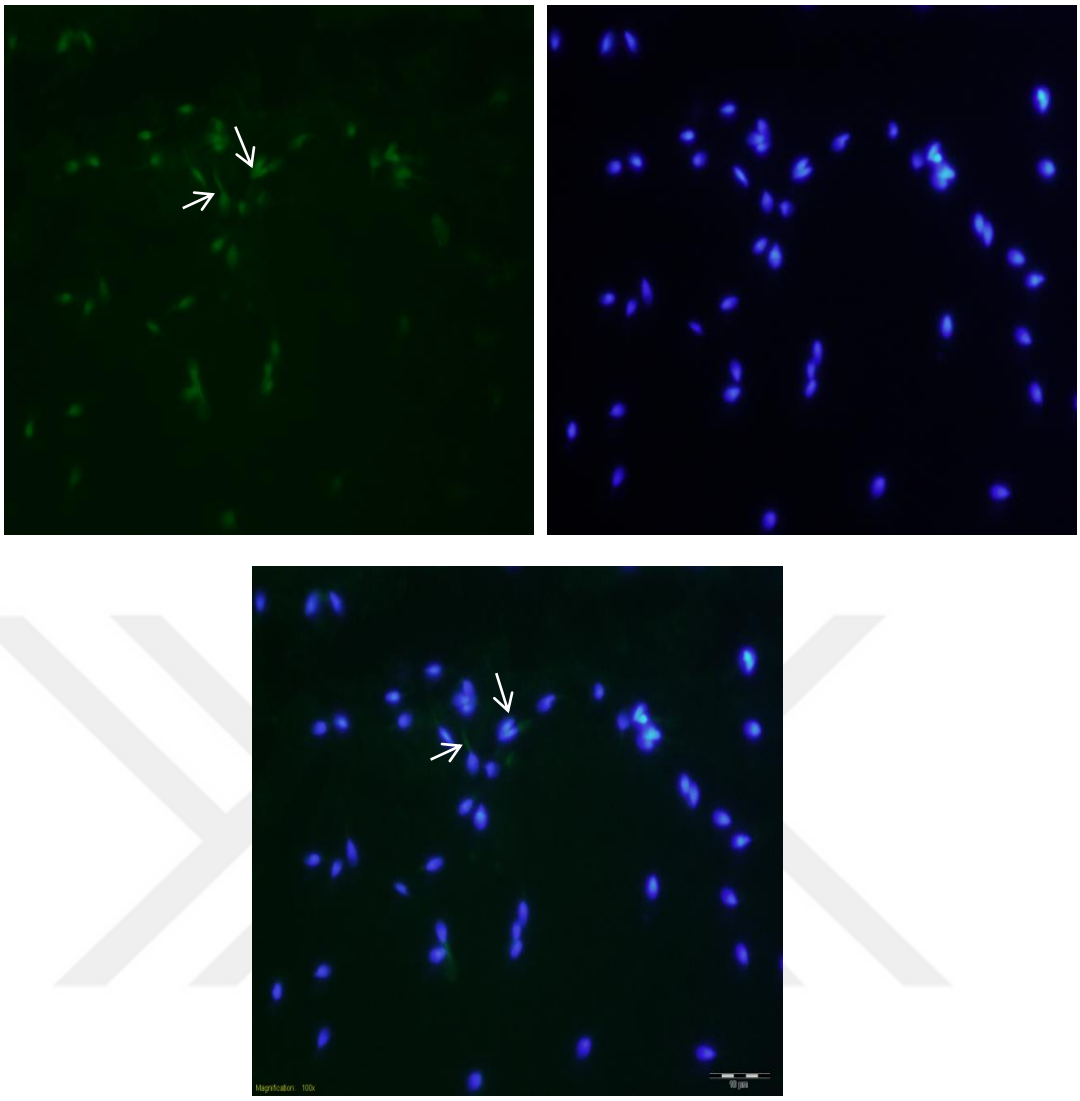
Şekil 3.3.1.4. İmmünoflouresans boyanma. ER-β Ekspresyonu: (A) Kırmızı floresan (Texas-Red); ekspresyon görülmemektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresans mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.

3.3.2. ER-α ekspresyonunun Sperm Morfolojik Anomalileri ile Korelasyonları

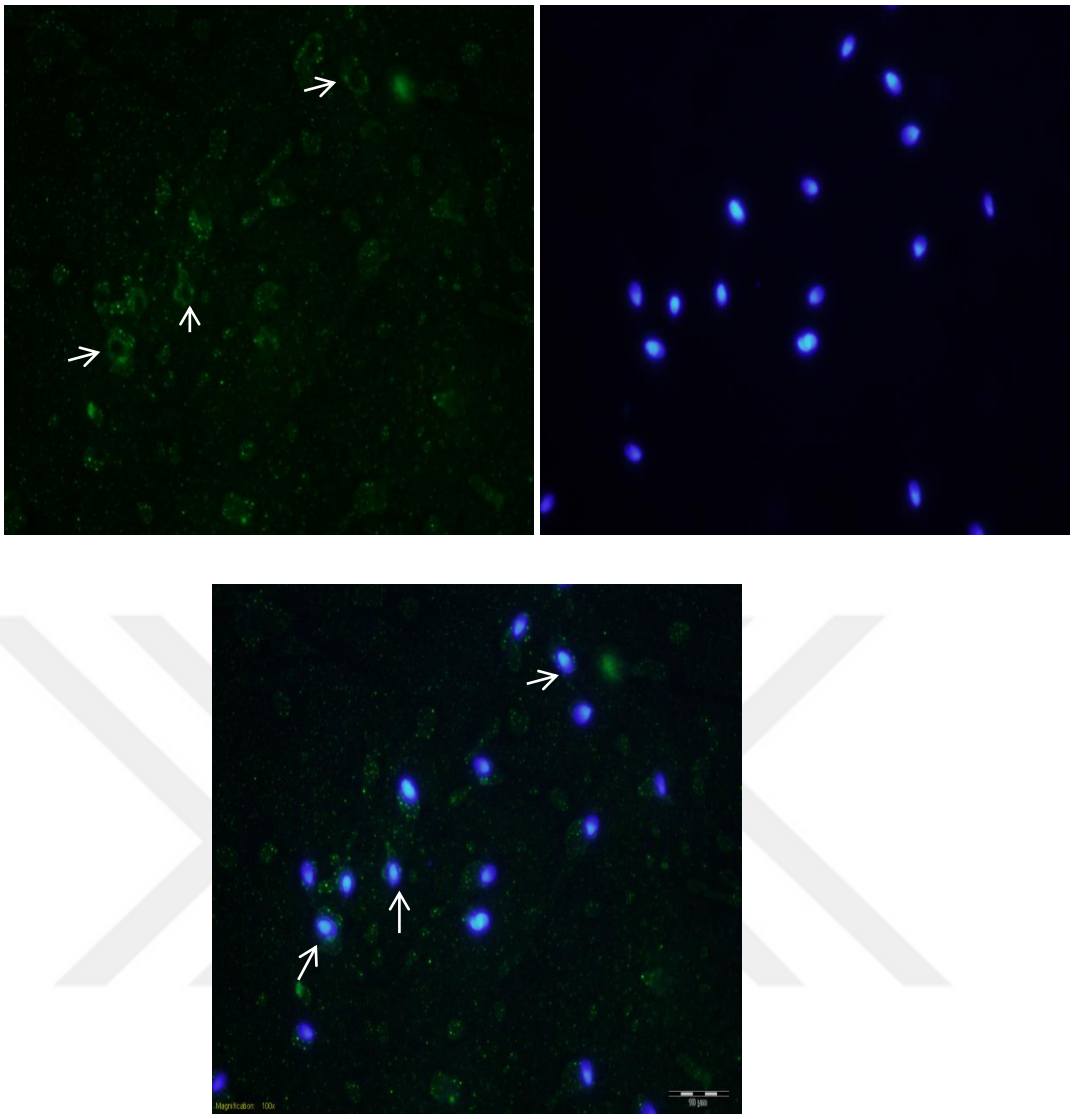
ER-α'nın uzun kuyruk anomalisi ile pozitif korelasyon gösterdiği tespit edildi. ER α'nın yaygın olarak spermin nukleus, orta parçası, esas parçası ve membranında lokalize olduğu görüldü.



Şekil 3.3.2.1. İmmünoflouresan boyanma. ER-α Ekspresyonu:(A) Yeşil floresan (FITC); spermin nukleus, orta parça ve esas parçasında ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.



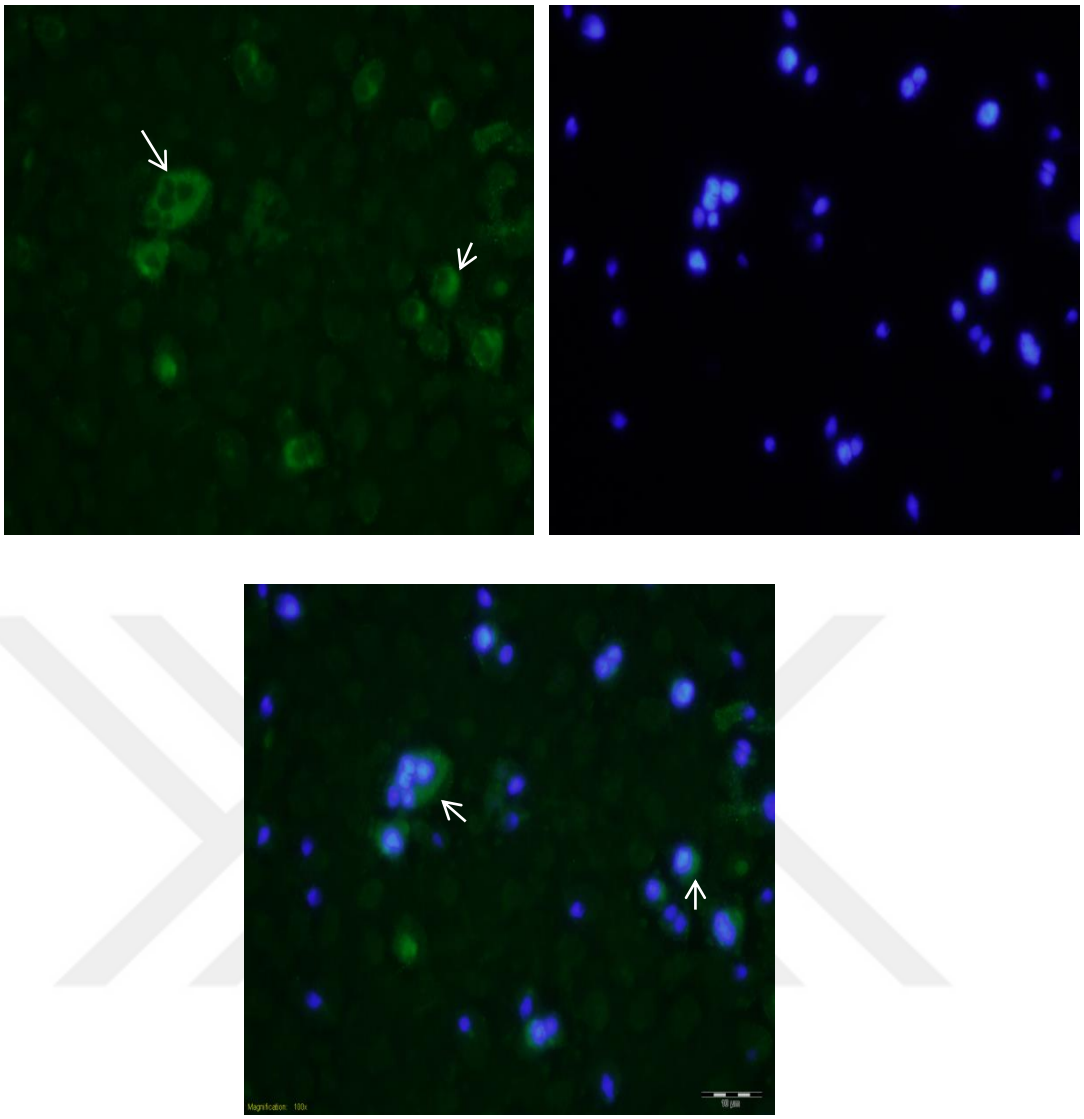
Şekil 3.3.2.2. İmmünoflouresan boyanma. ER-α Ekspresyonu: (A) Yeşil floresan (FITC); spermin nukleus ve orta parça parçasında ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.



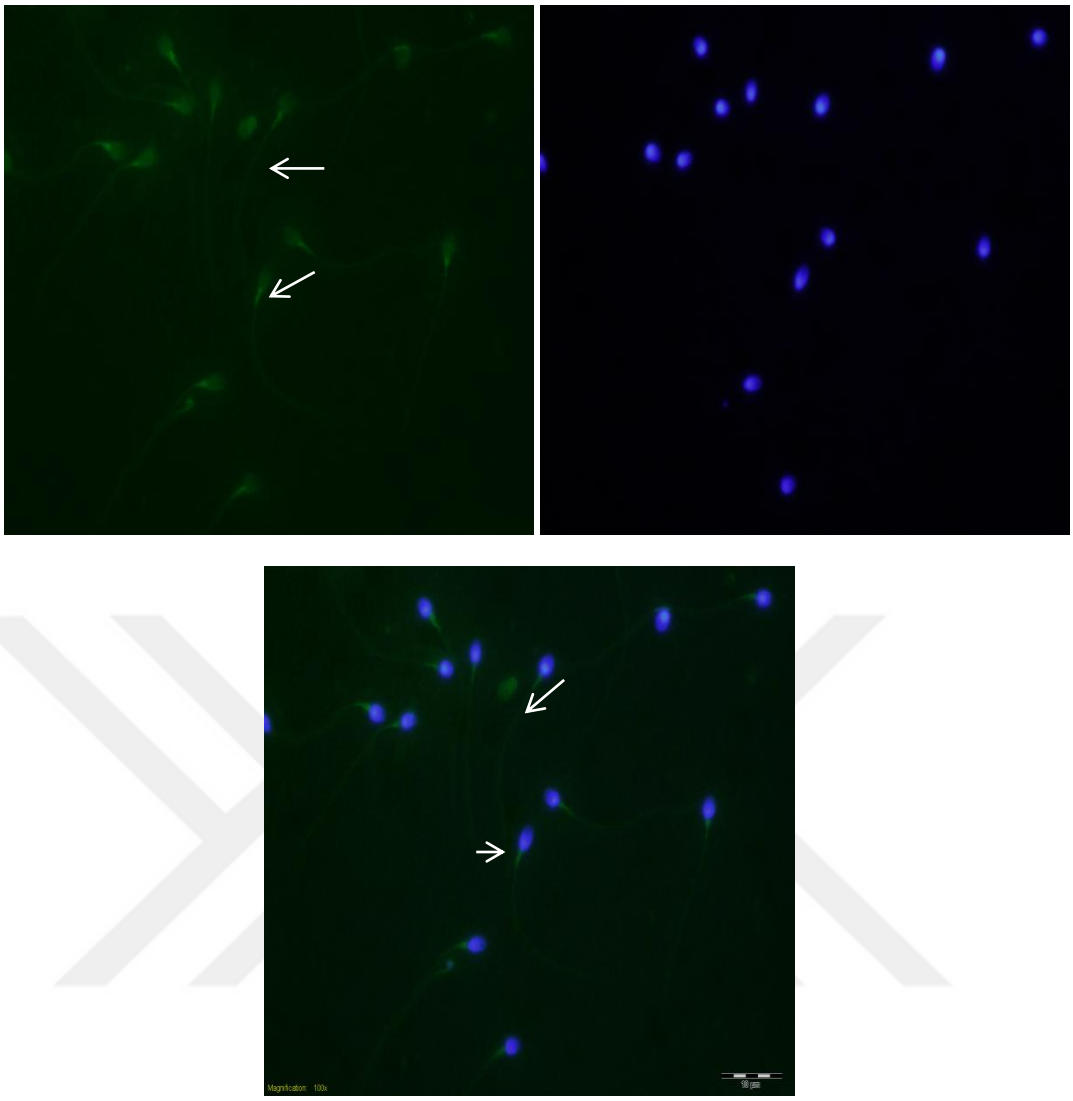
Şekil 3.3.2.3. İmmünoflouresan boyanma. ER-α Ekspresyonu: (A) Yeşil floresan (FITC); sperm membranında ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.

3.3.3. GPR30 ekspresyonunun Sperm Morfolojik Anomalileri ile Korelasyonları

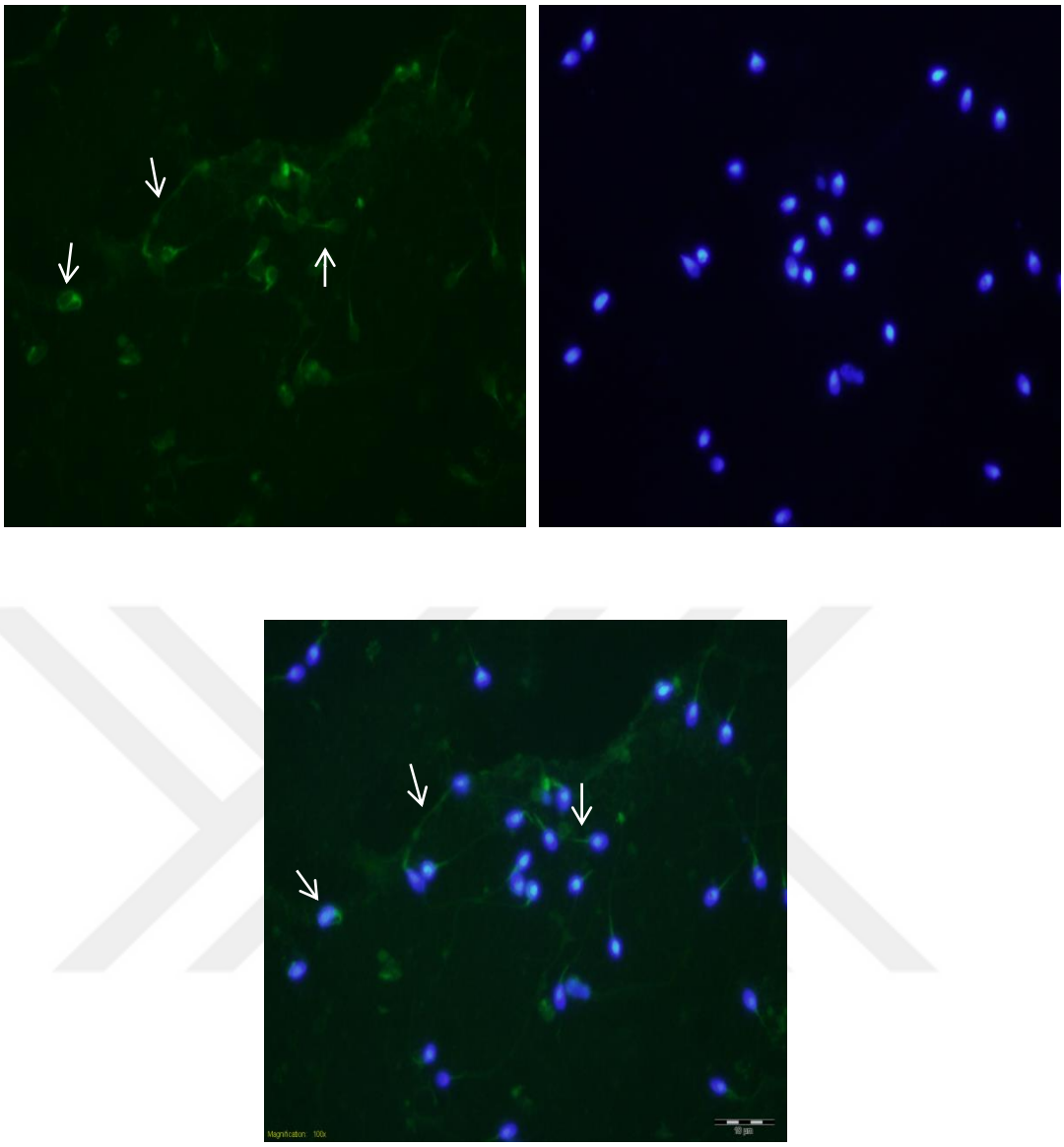
GPR30 reseptörünün akrozomal kist ve uzun kuyruk anomalileriyle pozitif, kısa kuyruk anomalisi ile negatif korelasyon gösterdiği tespit edildi. GPR30 reseptörünün yaygın olarak sperm membranında eksprese edildiği görüldü. Ayrıca spermin nukeusu, orta parçası, sitoplazmik droplet ve uzun kuyrukta lokalize olduğu tespit edildi.



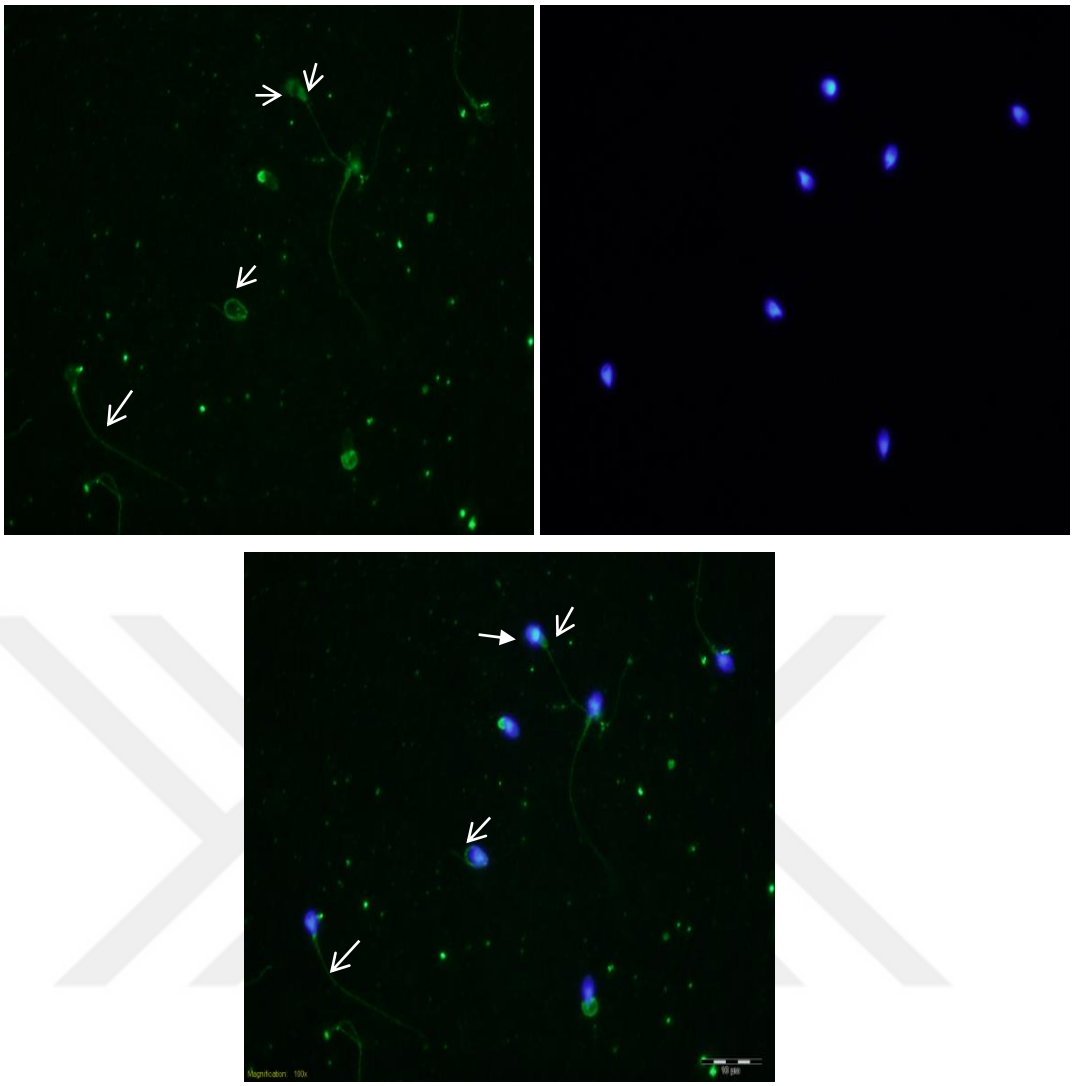
Şekil 3.3.3.1. İmmünoflouresan boyanma. GPR30 Ekspresyonu: (A) Yeşil floresan (FITC); sperm membranında ve akrozomal kistte ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.



Şekil 3.3.3.2. İmmünoflouresan boyanma. GPR30 Ekspresyonu: (A) Yeşil floresan (FITC); orta parça ve uzun kuyrukta ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.



Şekil 3.3.3.3. İmmünoflouresan boyanma. GPR30 Ekspresyonu: (A) Yeşil floresan (FITC); orta parça, uzun kuyruk ve sitoplazmik droplette ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.



Şekil 3.3.3.4. İmmünoflouresan boyanma. GPR30 Ekspresyonu: (A) Yeşil floresan (FITC); dag defekt, akrozomal kist, uzun kuyruk ve sitoplazmik droplette ekspresyon görülmektedir. (B) DAPI ile boyanmış sperm nukleusu. (C) A ve B görüntülerinin kombinasyonunun flouresan mikroskop görüntüsü. X100 Büyütme.

4. TARTIŞMA

Östrojen hormonu tarihsel olarak her zaman kadın üreme ile ilişkilendirilmiştir, ancak son yirmi yılda yapılan çalışmalar östrojenlerin ve reseptörlerinin (ER-α ve ER-β) ve G protein-bağlantılı östrojen reseptörünün (GPR30) erkek üreme organlarını ve üreme organlarını düzenlediği tespit edilmiştir. Erkek üreme sisteminde östrojen, en az üç farklı hücre tipi ile sentezlenmektedir. Bunlar sertoli, leydig ve germ hücreleridir. Her ne kadar testosteron erkekte primer seks steroidleri olarak bilinse de östrojen testiste ve ayrıca beyinde büyük miktarlarda üretilir ve birkaç türün semeninde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunur. E2 (17- β Estradiol) yüksek konsantrasyonları rete testis sıvısında ve birçok türün sperminde bulunur. Erkeklerde E2 üretimi, P450 redüktaz enzimi olan aromataz tarafından (Cyp19a1) gerçekleşir (Carreau ve ark 2010). Androjenleri östrojene dönüştüren aromataz, Leydig hücrelerinde, seminifer epitelde ve diğer erkek organlarında eksprese edilir (Cooke ve ark 2017).

Östrojen hormonunun aktivitesi östrojen reseptörleri tarafından gerçekleştirilir. Bunlardan ER-α'nın efferent duktüller ve epididimal yapılarda uterus dokusundan bile daha yüksek miktarda eksprese edildiği bilinmektedir. Hem ERα hem ERβ efferent duktüllerde ve epididimde bulunur. Efferent duktüller spermi testisten epididimise taşırlar. Epididimis başındaki lümen sıvısı silli hücreler tarafından karıştılmaktadır ancak silli olmayan hücreler de içermektedir. Bu silli olmayan hücreler iyon, su ve proteinlerin geri emiliminde görevlidir (Ilio ve Hess 1994, Chan ve ark 1995). Ratlarda rete testis sıvısının %90'ı geri emilmektedir. Bu iyon ve suyun geri emilimi sonucunda sperm konsantrasyonunu arttırır. Bu mekanizma spermin epididimisde olgunlaşmasını iyileştirir. Spermlerin döllenme yeteneklerini arttırır. Bu veriler ışığında ER'nin sıvı emiliminin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu hipotezi test etmek için ER-α açısından nakavt fare (ERKO) fareler kullanılmıştır.

ER-α veya aromataz kaybı ayrıca beyin, yağ, iskelet kası, kemik, kardiyovasküler ve immün dokular gibi üreme dışı dokuların üzerinde de etkiler yaratır (Cooke ve ark 2017).

Elastik duktüllerde yüksek konsantrasyonda ER-α reseptörü bulunmaktadır. ER-α reseptörü efferent kanallarda sıvı emiliminde gerekli olup, ekspresyon yokluğunda erkeklerin infertil olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmaya göre α-ERKO erkekleri, özellikle epididimin başında sıvı emiliminin olmaması nedeniyle infertildir. Bunun nedeni ise, spermin konsantre edilmek yerine seyreltilmiş olmasındandır (Hess ve ark 1997).

Smith, Carani ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre (ERKO) erkekleri infertil ancak, testisleri ergenliğe kadar normal görünmüştür. 20-40 günlük iken dejenere olmaya başlar, 150 günlük iken de testisler atrofi görülür. Spermleri anormal, epididimis sperm konsantrasyonları düşüktür. Rete testisin akıntı yönünde efferent ductuslar şişmiş, lümen sıvısının geri emilmediği veya testisin tarafından fazla salgı gerçekleştiği anlaşılmaktadır. Testislerin ağırlığında geçici artış görülür. ERKO erkekte, efferent duktüllerin testisten gelen lümen sıvılarını emebilme kabiliyetleri yoktur. Bu nedenle ERKO faresi, östrojenlerin, epididimise girmeden önce sperm konsantrasyonunu artıran, sıvı taşınmasının düzenlenmesinden sorumludur. ER- α hem erkek üreme sisteminin normal büyümesi hem de elastik duktüllerin fonksiyonu için önemlidir. İnsanlarda, ER - α ve P450 aromatazındaki mutasyonel işlev bozukluğu, sperm sayısını azaltır. Efferent kanallarda sıvı birikmesi ve ardından testisin atrofisine neden olmaktadır (Smith ve ark 1994, Carani ve ark 1997).

Oliveira ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada Artibeus lituratus isimli büyük meyve yiyen yarasa türünün testislerinde ERα, ERβ ve AR dağılımı, üreme ve regresif dönemlerde seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada kullanmış oldukları immünohistokimya metodunun sonuçları gösteriyor ki; ERα ve AR'nin testisin somatik hücrelerle sınırlı olduğunu oysa, ERβ ise hem somatik hem de spermatojenik hücrelerde geniş ölçüde dağılım göstermiştir. Testis gerilemesinde ERβ özellikle spermatogenik hücrelerde artış göstermiştir. ERβ ve AR'nin regresyon sırasında arttığı Western blotlama ile doğrulanmıştır. Testislerde ERα, ERβ ve AR'nin mevsimsel, hücre ve evreye özgü bir şekilde lokalizasyonu, bu reseptörlerin, testis fonksiyonlarında üreme ve üreme dışı dönemlerde önemli roller oynayabileceğini göstermektedir (Oliveira ve ark 2012).

González-Morán ve arkadaşlarının çalışmasında erkek beyaz Leghorn tavuklarının testisleri ile yaptıkları çalışmada; olgunlaşmamış (1,5 aylık), olgun (12 aylık cinsel) ve yaşlı (48 aylık üreme fonksiyonunun kesilmesi) testislerini ve seks steroid hormon reseptörlerini Western blot analizi ve histomorfometrik yöntemler ile değerlendirmişlerdir. Tavuk yaşına göre testis dokusunda alan başına Sertoli hücreleri, germ hücreleri ve leydig hücrelerinin sayısındaki belirgin değişiklikler gözlenmiştir. Sertoli ve leydig hücreleri olgun olmayan tavukların testislerinde yüksek sayıda, olgun tavuklarda ise azaldığı gözlenmiştir. Ancak, germ hücrelerinin sayısı, olgun tavuklarda en yüksek bulunmuştur. Tavuk testislerinde ER-α içeriğinin hayvanların yaşlarına göre değiştiğini bulunmuştur. ER-α, olgun hayvanların testislerinde daha yüksek olarak bulunmuştur. Cinsel olarak aktif olmayan genç ve yaşlı tavuklardan elde edilen testlersonucunda, ER-α oranı düşük çıkmıştır. Buna karşılık, cinsel açıdan aktif olan olgun tavuklarda ise, bazı Sertoli hücreleri, germ hücre gelişimi ve spermatozoa tüm aşamalarında daha fazla sayıda aktif spermatogenezve en yüksek ER-α bulunmuştur (Gonzalez-Moran ve ark 2008).

Oliveira ve arkadaşlarının horozların testis ve epididimal bölgesinde ER-α ve ER-β'nın hücresel dağılımına yönelik yaptıkları western blot ve immunohistokimya çalışmaları ise göstermiştir ki, ER-β somatik ve germ hücrelerinde ve efferent duktusların tüm segmentlerinde yoğun olarak bulunmaktadır. ER-α ise; efferent duktusların distal segmentinde yoğun olarak tespit edilmiş ve memeli efferent kanallarında testiküler sıvının geri emiliminde androjenler yerine östrojenlerin etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Oliveira ve ark 2011).

Hess'in 2003 yılında yapmış olduğu derlemede östrojen, germ hücreleri tarafından sentezlendiği için rete testis sıvısının nispeten yüksek konsantrasyonlu olmasını sağlar. ER-α erkek gonadlarında efferent duktül epitelinde bulunmuştur. ERα'nın gonadlarda birincil işlevi, kanallarda sıvı emiliminin düzenlenmesi gibi görünmektedir. Reseptörünün bozulması ya da nakavt (α-ERKO) 'de kauda epididimalde sperm seyreltmesi ile sonuçlanmıştır. Bu nedenle ile sperm morfolojisinin bozulması, sodyum taşıma ve daha sonra su yeniden emiliminin inhibisyon, Cl salgılanmasını arttırmış ve sonuçta doğurganlığı azaltmıştır. Bu nedenle östrojen veya reseptörünün erkeklerde infertilite açısından önemi vurgulanmıştır (Hess 2003).

Koyun fetüslerinin testis, efferent duktülü ve epididimisi gebeliğin 70, 90 ve 120. günlerinde ve yenidoğan kuzularında toplanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda ERβ reseptörü gebelik boyunca incelenen tüm dokularda negatifken, ERα immünoreaktivitesi sadece efferent duktule epitelinin çekirdeğinde bulunduğu gösterilmiştir. Ek olarak, hem ERα boyanma yoğunluğu hem de ERα-pozitif hücre sayısı, gebeliğin 90. gününde, 70. ve doğumdakilere kıyasla daha yüksek çıkmıştır. Bu sonuçlar, östrojenin koyun fetüslerinde efferent duktül gelişiminde önemli rol oynayabileceğini göstermektedir (Tian ve ark 2004).

Yapılan bir derlemede östrojen reseptörlerinin metabolik hastalıklar üzerindeki etkileri vurgulamışlardır. Östrojen sinyalindeki anormallikler kanser ve metabolik hastalıklar gibi farklı patolojik durumlara yol açmaktadır. Genellikle kanserin erken evrelerinde ve bir tümör promotörü olarak ERα ekspresyonu işlev görür. ERα ekspresyonunun aksine, kanserin ilerlemesi sırasında ERβ seviyeleri azalır ve bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir. Bu nedenle ERβ kanser tedavinde umut vericidir (Jia ve ark 2015).

Türler farketmeksizin ERβ'nin lokalizasyonu ERα'dan daha fazla çıkması sonucumuzu destekler. ERβ ve ERα yuvarlak spermatidlerde pakiten spermatozidlerden daha çok bulunur. Çünkü östrojenlerin spermatogenezin haploid basamaklarında bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Ancak GPR30'un (bir transmembran hücre içi östrojen reseptörü) yetişkin sıçan pekiten spermatoitlerinde eksprese edildi görülmüştür (Bois ve ark 2010). GPER ekspresyonu, erkek üreme sisteminde geniş yere sahip olup, bu reseptör üzerinden E2 sinyalinin erkek üremesinde olası bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Cooke ve ark 2017).

Steroid yapılı hormonların etkilerini gösterebilmeleri için plazma membranına bağlı reseptörlerin bulunması gerekmektedir. Bu reseptörlerden biri G protein-bağlı (GPCR) reseptörlerdir. Steroid hormonlardan olan östrojen içinise G protein-bağlantılı reseptör 30 (GPR30) reseptörü öne çıkmaktadır. Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da bu reseptörlerin biyolojik etkileri ortaya koyulmuştur. Üreme gelişimi, kardiyovasküler fonksiyon, nöroendokrinoloji ve kanser patofizyolojisi üzerinde etkisi bulunmaktadır (Wang ve ark 2014).

GPR30'un işlevi ile ilgili, GPR30'un kaudal epididim kısmında sıvı ortamının oluşumunda rol oynadığı için sperm hareketliliğinde etkili olduğu gözlenmiştir (Cao ve ark 2017). Bizim sonucumuz tersini ifade eder. Sonucumuza göre, sperm parametreleri ve GPR30 arasında ilişki bulunmadı.

Germ hücreleri de dahil olmak üzere testis hücrelerinin çoğunda östrojen reseptörleri açıklanmaktadır. Ayrıca, ERβ, ERα ve GPR30 östrojen reseptörü bildirilmiştir. Özellikle GPR'nin yetişkin sıçan pakten spermlerinde eksprese edildiği gösterilmiştir. Farede, ERβ, spermatoositler ve spermatitler hariç, testis hücrelerinin çoğunda immünohistokimya ile gösterilmiştir. ERα ise Leydig hücrelerinde gösterilmiştir (Carreau ve ark 2011).

İmmünohistokimya kullanılarak Menad ve arkadaşlarının kum fareleri (*Psammomys obesus*) ile yaptıkları çalışmada dönemsel yaşlarına östrojen reseptörleri ER-α, ER-β ve GPR30 reseptörlerinin testis dokusunun işlevlerine etkisi incelenmiştir. Sadece üreme döneminde testis dokularının Leyding hücrelerinde aromataz ekpresyonu görülürken, üreme ve dinlenme dönemlerinde ise ER-α, ER-β ve GPR30 reseptörleri ekspresse olduğu görülmüştür. Sertoli hücreleri ise, üreme mevsiminde ER-β için pozitif ancak, GPR30 dışında tüm moleküller dinlenme mevsiminde ekspresse olmuştur. Spermatogonia hücrelerinde, üreme mevsiminde ER-β ve GPR30 için ve dinlenme mevsiminde ise ER-α ve GPR30 için pozitif bulunmuştur. Olgun spermatitler ve spermler sadece üreme mevsiminde bütün reseptörlerim eksorese olduğu gözlenmiştir (Menad ve ark 2017).

GPR30 ile ilgili yapılan bir diğer çalışma da Wang ve arkadaşlarının farelerde spermatosit hücrelerinin BPA'dan (insanda östrojen hormon benzeri etkiye sahip organik bir kimyasaldır) etkilenen GPR30'un biyolojik fonksiyonunu ve sinyal yolunu araştırmışlardır. Çalışmanın sonucuna göre BPA hasarlı farelerin testisi dokusu üzerinde immünohistokimyasal çalışma yapılmıştır. Düşük dozda BPA tarafından indüklenen GPR30 aktivasyonunun, hücre büyümesini inhibe ettiğini ve hücre apoptozunu indüklemiştir. BPA'nın seminifer tübülleri ve spermatoiteyi etkilemeden spermatosit (GC-2) hücrelerinde programlı hücre ölümü olan apoptoziyi indüklediği gösterilmiştir (Wang ve ark 2017).

BPA kullanılan bir başka çalışma da düşük konsantrasyonlu BPA'nın GPR30 ve ER-α'nın erkek germ hücrelerinde GC-1 hücre (fare spermatogonial) proliferasyonunu uyardığını göstermektedir (Sheng ve Zhu 2011). Sheng ve Zhu (2011) çalışmasını destekleyen bir başka çalışma ise GC-1 hücre hattıyla yapılan çalışmalar sonucunda düşük konsantrasyonlu bir BPA'nın GPR30 ekspresyonunu indüklediğini ve muhtemelen hücrelerin çoğalmasını düzenleyici bir döngü yoluyla arttırdığını gösterilmiştir (Sheng ve ark 2013).

Derlemeye göre östrojen aktivitesi ayrıca spermatogenezde etkilidir. Germ hücrelerinin proliferasyonunda, farklılaşmasında, olgunlaşmasında ve apoptoz mekanizmasında etkilidir. Özellikle GPR30, Bax genindeki artışı sağlaması ile apoptozis kontrolünü sağlamaktadır. Yani, GPR30 spermatositlerin apoptozunu indikler (Carreau ve ark 2012).

Literatüre baktığımızda genellikle östrojenlerin rolü ile ilgili olarak insan testis germ hücrelerinde ve ejaküle edilmiş spermatozoada aromataz ve östrojen reseptörlerinin tespit edildiği çalışmalar yapılmıştır. Östrojen yetmezliğinin anormal spermatogenez ve erkek kısırlığı ile nasıl ilişkili olduğunu kanıtlamıştır.

Çalışma sonuçlarımız ER-α, ER-β ve GPR-30 reseptörlerinin sperm hücrelerinde varlığını ve lokalizasyonunu ortaya koymuştur. Reseptör ekspresyonlarının olgun spermiumların özellikle baş kısmında; nukleus ve akrozomal kep bölgesinde, membranında ve orta parçasında olduğunu tespit ettik. ER-β ekpresyonun spermlerin orta parçasında yoğun olarak bulunurken, ER-α ekspresyonunun nukleusda, GPR30 ekspresyonunun ise sperm membranında olduğunu gözlemledik.

Testis yerine olgunlaşmamış sperm hücresi ile çalışılmış ve bu hormonların spermlerin olgunlaşması üzerindeki rolü tespit edilmiştir. Çalışmanın immünofloresan sonuçlarına göre; ERβ ve ERα östrojen reseptörlerinin her ikisinin de olgunlaşmamış spermin rezidüel sitoplazmasında lokalize olduğunu göstermiştir. ERβ, olgunlaşmamış spermde aşırı rezidüel sitoplazmada ve kuyrukta FITC ile boyanırken, baş kısmı boyanmamıştır. Normal spermlerde kuyrukta tespit edilmiştir. Klasik ER'lerin, spermatogenetik hücrelerde östrojen etkisine aracılık edebileceği hipotezini ortaya koymuşlardır. Anormal germ hücrelerinde ERβ tespit edilip, olgun

spermde kaybolması sonucunda sperm olgunlaşması sırasında rolü olduğu ortaya koyulmuştur. ERα ise, olgunlaşmamış spermde baş ve kuyrukları Texas Red ile boyanmazken, aşırı rezidüel sitoplazmada bulundu. Normal spermlerde ise sadece orta parça boyanmıştır (Rago ve ark 2006). Çalışmamız benzer sonuçları ortaya koymuştur. Çalışma sonucumuza göre; matür spermin nükleus, orta parça, esas parça ve sitoplazmik membranında ERα ekprese oldu. Sitoplazmik droplette ERβ ve GPR30 reseptörlerini tespit ettik. GPR30 reseptörü özellikle sitoplazmik membranda, akrozomal kist, orta parça, morfolojik bozukluk olan uzun kuyruk, dag defekt ve sitoplazmik droplette ekprese olduğunu tespit ettik.

Ekvator segmentinde ERα'nın lokalizasyonu, spermin oositlerle kaynaşmasında çok önemli bir rol oynayacağı tahmin edildiğinden döllenme sürecine dahil olduğu anlamına gelebilir (Ramalho-Santos ve ark 2002).

Solakidi ve arkadaşları, insan sperminin fizyolojisinde, belki döllemesinde östrojen reseptörlerinin ve mitokondri lokalizasyonu arasındaki bağlantıyı ortaya koymuşlardır. ERα spermin başının ekvatoral bölgesinde ve kuyrukta bulundu. ERβ spermin orta parçasında ve mitokondri ile ortak yerleşim halindedir. Erkek üreme sisteminden atılan ejakülatın biyolojik olarak aktif olmayıp, protein sentezlenmez. Bu nedenle hareketlilik için ATP'ye ihtiyaç vardır. ERβ'nın sperm hareketliliğini dolaylı olarak etkileyebileceği ortaya koyulmuştur. Çalışmamızın ERβ'nın diğer reseptörlere göre orta parçada yüksek oranda lokalize olması ve doğrusal progresif motilitesi ve total progresif motil sperm sayısı açısından yine diğer reseptörlere göre anlamlı sonuç vermesini destekler (Solakidi ve ark 2005).

Çalışmamızda östrojen reseptörlerinin sperm parametreleri üzerindeki etkilerine bakıldığında sperm fonksiyonları üzerindeki rollerinin farklı olduğu sonucuna varıldı. Yapılan literatür çalışmalarında östrojen reseptörlerinin sperm motilitesi üzerine detaylı çalışmaların az olduğu görüldü. Çalışmamızda, sperm konsantrasyonu üzerinde ER-β ve GPR30'un etkisi görülürken, motilite üzerinde ER-β ve ER-α'nın etkisi vardı. ER-β'nın doğrusal progresif motilite oranlarında artışa, ER-α'nın ise total motilite oranlarında artışa neden olması dikkat çekiciydi. GPR30 ise sperm motilitesi üzerinde herhangi bir etkiye sahip değildi.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız ER-α, ER-β ve GPR30 reseptörlerinin insan sperm hücrelerinde varlığını ve lokalizasyonunu ortaya koydu. ER-α ejaküle spermlerin özellikle nuklus ve esas parçasında lokalize olurken, ER-β özellikle orta parçada, GPR30 ise sperm membranında eksprese edildi. Östrojen reseptörlerinin semen parametrelerinden özellikle sperm konsantrasyonu ve motilitesi ve bazı morfolojik anomalileri ile ilişkili olduğunu, spermlerde östrojen reseptör ekspresyonunda azalmanın sperm konsantrasyonunda ve motilitesinde azalmaya ve bazı morfolojik bozukluklarda artışa neden olduğunu saptadık. İlginç olarak östrojen reseptörleri sperm parametreleri üzerinde farklı rollere sahipti. Sperm konsantrasyonunu üzerinde ER-β ve GPR30'un etkisi görülürken, motilite üzerinde ER-β ve ER-α'nın etkisi bulundu. ER-β'nın doğrusal progresif motilite oranlarında artışa, ER-α'nın ise total motilite oranlarında artışa neden olması dikkat çekiciydi. GPR30 ise sperm motilitesi üzerinde herhangi bir etkiye sahip değildi. Sonuç olarak, spermlerde eksprese edilen östrojen reseptörlerinin semen kalitesi üzerinde etkili olduğunu ve reseptör ekspresyonunun azalmasının infertiliteye neden olabileceğine dair veriler ortaya koyduk. Çalışmamız bu anlamda erkek infertilitesinin etiyopatogenezi ve dolayısıyla tedavisinde yeni yorumların geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP, 2008. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile. Fertility sterility, 90, (3), 619-26.

Akgul M, Ozkinay F, Ercal D, Cogulu O, Dogan O, Altay B, Tavmergen E, Gunduz C, Ozkinay C, 2009. Cytogenetic abnormalities in 179 cases with male infertility in Western Region of Turkey: report and review. Assist Reprod Genet, 26, (2-3), 119-22.

Altunkaynak BZ, Ünal D, Aksak S, Ünal B, 2012. Östrojen hormonu ve menopoz. Journal of Experimental and Clinical Medicine, 252-6.

Aquila S, Sisci D, Gentile M, Middea E, Siciliano L, Andò S, 2002. Human ejaculated spermatozoa contain active P450 aromatase. The Journal of Clinical Endocrinology, 87, (7), 3385-90.

Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan Ġ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, 2013. Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi, İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, p. 185.

Ayvaz Ö, 2008. Mikroenjeksiyon Ve Piezo Elektrik Uygulanmiş İnsan Oositlerinde DNA Hasarinin Belirlenmesi ve Östrojen Reseptör Gen Polimorfizmlerinin Fertilizasyona Etkisinin İncelenmesi, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Balthazart J, Stamatakis A, Bacola S, Absil P, Dermon CR, 2001. Effects of lesions of the medial preoptic nucleus on the testosterone-induced metabolic changes in specific brain areas in male quail. Neuroscience, 108, 3, 447-66.

Belgorosky A, Guercio G, Pepe C, Saraco N, Rivarola M, 2009. Genetic and clinical spectrum of aromatase deficiency in infancy, childhood and adolescence. Hormone Research in Paediatrics, 72, 6, 321-30.

Björndahl L, Söderlund I, Kvist U, 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Human reproduction, 18, 4, 813-6.

Bois C, Delalande C, Nurmio M, Parvinen M, Zanatta L, Toppari J, Carreau S, 2010. Age-and cell-related gene expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. Journal of molecular endocrinology, 45, 3, 147-59.

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG, 2007. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Human Reproduction, 22, 6, 1506-12.

Bostofte E, Serup J, Rebbe H, 1982. Relation between sperm count and semen volume, and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. International Journal of Andrology, 5, 3, 267-75.

Brazil C, Swan SH, Drobnis EZ, Liu F, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW, 2004. Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. Journal of andrology, 25, 4, 635-44.

Bulun SE, 2014. Aromatase and estrogen receptor alpha deficiency. Fertility and sterility, 101, 2, 323-9.

Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Langoi D, Deb S, 2005. Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. Pharmacological reviews, 57, 3, 359-83.

Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M, 2003. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 86, 3-5, 219-24.

Cacioppo JA, Koo Y, Lin PCP, Osmulski SA, Ko CD, Ko C, 2016. Generation of an estrogen receptor beta-iCre knock-in mouse. Genesis, 54, 1, 38-52.

Cao X, Huang J, Zhang G, Zuo W, Lan C, Sun Q, Yang D, Gao D, Cheng CH, Zhou WL, 2017. Functional expression of G protein-coupled receptor 30 in immature rat epididymal epithelium. Cell biology international, 41, 2, 134-46.

Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER, 1997. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. New England Journal of Medicine Endocrine reviews, 337, 2, 91-5.

Carreau S, Bois C, Zanatta L, Silva FR, Bouraima-Lelong H, Delalande C, 2011. Estrogen signaling in testicular cells. Life Sci, 89, 15-16, 584-7.

Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C, 2011. Estrogens – new players in spermatogenesis. Reproductive Biology, 11, 3, 174-93.

Carreau S, Bouraima-Lelong H, Delalande C, 2012. Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. Advances in medical sciences, 57, 1, 31-6.

Carreau S, De Vienne C, Galeraud-Denis I, 2008. Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. Advances in medical sciences, 53, 2.

Carreau S, Wolczynski S, Galeraud-Denis I, 2010. Aromatase, oestrogens and human male reproduction. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 365, 1546, 1571-9.

Chan HC, Zhou WL, Fu WO, Ko WH, Wong PY, 1995. Different regulatory pathways involved in ATP-stimulated chloride secretion in rat epididymal epithelium. Journal of cellular physiology, 164, 2, 271-6.

Chimento A, Sirianni R, Delalande C, Silandre D, Bois C, Ando S, Maggiolini M, Carreau S, Pezzi V, 2010. 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. Mol Cell Endocrinol, 320, 1-2, 136-44.

Chimento A, Sirianni R, Delalande C, Silandre D, Bois C, Andò S, Maggiolini M, Carreau S, Pezzi VJM, endocrinology c, 2010. 17β-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ERα. 320, 1-2, 136-44.

Choudhry MA, Ball A, McEwan IJ, 2006. The role of the general transcription factor IIF in androgen receptor-dependent transcription. Mol Endocrinol, 20, 9, 2052-61.

Choudhry MA, McEwan IJ, 2004. In vitro regulation of reporter gene transcription by the androgen receptor AF1 domain. Biochemical Society transactions, 32, Pt 6, 1103-6.

Clarke GN, 2006. A.R.T. and history, 1678-1978. Human reproduction (Oxford, England), 21, 7, 1645-50.

Cooke PS, Nanjappa MK, Ko C, Prins GS, Hess RA, 2017. Estrogens in Male Physiology. Physiological reviews, 97, 3, 995-1043.

Cooper TG, Barfield JP, Yeung CH, 2005. Changes in osmolality during liquefaction of human semen. Int J Androl, 28, 1, 58-60.

Cooper TG, Brazil C, Swan SH, Overstreet JW, 2007. Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. Journal of andrology, 28, 1, 1-4.

Cooper TG, Yeung C-H, Fetic S, Sobhani A, Nieschlag EJHr, 2004. Cytoplasmic droplets are normal structures of human sperm but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. 19, 10, 2283-8.

Corbin CJ, Graham-Lorence S, McPhaul M, Mason JI, Mendelson CR, Simpson ER, 1988. Isolation of a full-length cDNA insert encoding human aromatase system cytochrome P-450 and its expression in nonsteroidogenic cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 85, 23, 8948-52.

Correa-Perez JR, Fernandez-Pelegrina R, Aslanis P, Zavos PM, 2004. Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrospermia. Fertility and sterility, 81, 4, 1148-50.

Couse JE, Mahato D, Eddy EM, Korach KS, 2001. Molecular mechanism of estrogen action in the male: insights from the estrogen receptor null mice. Reprod Fertil Dev, 13, 4, 211-9.

Couse JF, Dixon D, Yates M, Moore AB, Ma L, Maas R, Korach KS, 2001. Estrogen receptor-alpha knockout mice exhibit resistance to the developmental effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on the female reproductive tract. Developmental biology, 238, 2, 224-38.

Dadoune J, Mayaux M, Guihard-Moscato M, 1988. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics: Beziehungen zwischen Defekten der chromatinkondensation menschlicher spermatozoen, die mittels anilinblau gefärbt wurden und spermacharakteristika. Andrologia, 20, 3, 211-7.

De Jong F, Hey A, Van der Molen H, 1973. Effect of gonadotrophins on the secretion of oestradiol-17β and testosterone by the rat testis. Journal of Endocrinology, 57, 2, 277-84.

Dube JY, Lesage R, Tremblay RR, 1976. Androgen and estrogen binding in rat skeletal and perineal muscles. Can J Biochem, 54, 1, 50-5.

Eliasson R, 1975. Analysis of semen.

Eliasson R, 2010. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. Asian journal of andrology, 12, 1, 26-32.

Etem EÖ, Yüce H, Erol D, 2009. Cytogenetic analysis in infertile males with sperm anomalies. J Assist Reprod Genet., 22, 217-24.

Feder HH WR, 1965. Feminine behavior in neonatally castrated and estrogentreated male rats. Science, 306–7.

Fi Ş, 2006. Erkek infertilitesinde genetik yaklaşım. J Turk Soc Obstet Gynecol, 3, 147-51.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Jr F, Raymond A, 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. Molecular endocrinology, 14, 10, 1649-60.

Frenette G, Leclerc P, D'amours O, Sullivan R, 2009. Estrogen sulfotransferase is highly expressed along the bovine epididymis and is secreted into the intraluminal environment. Journal of andrology, 30, 5, 580-9.

Gandini L, Lombardo F, Culasso F, Dondero F, Lenzi A, 2000. Myth and reality of the decline in semen quality: an example of the relativity of data interpretation. Journal of endocrinological investigation, 23, 6, 402-11.

Gardner L, James L, 2001. Color textbook of histology., Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 487-508.

Gartner LP, Hiatt JL, 2007. Color textbook of histology 3rd ed. Saunders Elsevier.

Golovine K, Schwerin M, Vanselow J, 2003. Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome p450 gene (cyp19) in mouse gonads and brain. Biol Reprod, 68, 3, 978-84.

Gonzalez-Moran MG, Guerra-Araiza C, Campos MG, Camacho-Arroyo I, 2008. Histological and sex steroid hormone receptor changes in testes of immature, mature, and aged chickens. Domest Anim Endocrinol, 35, 4, 371-9.

Gorski J, Toft D, Shyamala G, Smith D, Notides A, 1968. Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus. J Recent Progress in Hormone Research, 24, 45-80.

Gök N, 2017. İnfertil erkeklerde obeziteye bağlı sperm apopitozunun ve DNA hasarının değerlendirilmesi., Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.

Gökçe AJTUS, 2011. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. 2, 1-7.

Green AD, Galea LA, 2008. Adult hippocampal cell proliferation is suppressed with estrogen withdrawal after a hormone-simulated pregnancy. Horm Behav, 54, 1, 203-11.

Gruber CJ, Wieser F, Gruber IM, Ferlitsch K, Gruber DM, Huber JC, 2002. Current concepts in aesthetic endocrinology. Gynecol Endocrinol, 16, 6, 431-41.

Gunawan A, Kaewmala K, Uddin MJ, Cinar MU, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K, 2011. Association study and expression analysis of porcine ESR1 as a candidate gene for boar fertility and sperm quality. Anim Reprod Sci, 128, 1-4, 11-21.

Gundiah N, M BR, L AP, 2007. Determination of strain energy function for arterial elastin: Experiments using histology and mechanical tests. J Biomech, 40, 3, 586-94.

Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S, 2011. Defining infertility--a systematic review of prevalence studies. Human reproduction update, 17, 5, 575-88.

Haimov-Kochman R, Sciaky-Tamir Y, Hurwitz A, 2005. Reproduction concepts and practices in ancient Egypt mirrored by modern medicine. European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology, 123, 1, 3-8.

Hall JE, 2015. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology, Elsevier, p.

Hall JE, 2015. Guyton and Hall textbook of medical physiology e-Book, Elsevier Health Sciences, p.

Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW, 2008. Male obesity and alteration in sperm parameters. Fertility and sterility, 90, 6, 2222-5.

Haverfield JT, Ham S, Brown KA, Simpson ER, Meachem SJ, 2011. Teasing out the role of aromatase in the healthy and diseased testis. Spermatogenesis, 1, 3, 240-9.

Hess RA, 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. Reproductive biology and endocrinology : RB&E, 1, 52.

Hess RA, Bunick D, Bahr J, 2001. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. Mol Cell Endocrinol, 178, 1-2, 29-38.
Hess RA, Bunick D, Lee K-H, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, Lubahn DB, 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature, 390, 6659, 509.
Hess RA, Fernandes SA, Gomes GR, Oliveira CA, Lazari MF, Porto CS, 2011. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. Journal of andrology, 32, 6, 600-13.
Hess RA, Gist DH, Bunick D, Lubahn DB, Farrell A, Bahr J, Cooke PS, Greene G, 1997. Estrogen receptor (α and β) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. J Journal of Andrology, 18, 6, 602-11.
Hobkirk R, Glasier MA, 1992. Estrogen sulfotransferase distribution in tissues of mouse and guinea pig: steroidal inhibition of the guinea pig enzyme. Biochemistry Cell Biology, 70, 8, 712-5.
Huggins C, Scott WW, Heinen JH, 1942. Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. American Journal of Physiology-Legacy Content, 136, (3), 467-73.
Ilio KY, Hess RA, 1994. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. Microscopy research and technique, 29, 6, 432-67.
Isgor C, Watson SJ, 2005. Estrogen receptor alpha and beta mRNA expressions by proliferating and differentiating cells in the adult rat dentate gyrus and subventricular zone. Neuroscience, 134, 3, 847-56.
Jaffe Y, 2006. Üreme endokrinolojisi, Ankara, Güneş Kitabevi, p.
Jeyendran RS, 2003. Sperm collection and processing methods: a practical guide, Cambridge University Press, p.
Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, 2015. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism, 29, 4, 557-68.
Jones ME, Boon WC, Proietto J, Simpson ER, 2006. Of mice and men: the evolving phenotype of aromatase deficiency. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 17, 2, 55-64.
Junqueira C, Carneiro J, RO. K, 2009. Basic histology, Nobel Tıp Kitabevi, p. 418-33.
Kahn BE, Brannigan RE, 2017. Obesity and male infertility. Current opinion in urology, 27, 5, 441-5.
Kamat A, Hinshelwood MM, Murry BA, Mendelson CR, 2002. Mechanisms in tissue-specific regulation of estrogen biosynthesis in humans. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 13, 3, 122-8.
Kamel RM, 2010. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. Reproductive biology and endocrinology : RB&E, 8, 21.
Katzenellenbogen BS, Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T.R., Martini, P.G., Montano, M., Sun, J., Weis, K., Katzenellenbogen, J.A., , 2000. Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology.,. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 74, 279-85.
Kavlak S. SA, 2002. A study on determination the loneliness level in infertile women and to assess the factors that effect the loneliness level. Ege Tıp Dergisi 41 (4), 229 - 32,.
Kierszenbaum A, 2002. Histology and Cell Biology, Missouri,, p. 531-64.

Knapczyk-Stwora K, Durlej M, Duda M, Czernichowska-Ferreira K, Tabecka-Lonczynska A, Slomczynska M, 2009. Expression of oestrogen receptor alpha and oestrogen receptor beta in the uterus of the pregnant swine. Reprod. Domest. Anim, in press.

Kolesinska Z, Ahmed SF, Niedziela M, Bryce J, Molinska-Glura M, Rodie M, Jiang J, Sinnott RO, Hughes IA, Darendeliler F, Hiort O, van der Zwan Y, Cools M, Guran T, Holterhus PM, Bertelloni S, Lisa L, Arlt W, Krone N, Ellaithi M, Balsamo A, Mazen I, Nordenstrom A, Lachlan K, Alkhawari M, Chatelain P, Weintrob N, 2014. Changes over time in sex assignment for disorders of sex development. Pediatrics, 134, 3, e710-5.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson J-Ak, 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β. Endocrinology, 138, 3, 863-70.

Kuiper GG, Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Gustafsson, J.A., 1998. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. Neuroendocrinol. , 253-86.

Kurosumi M, Ishimura K, Fujita H, Osawa Y, 1985. Immunocytochemical localization of aromatase in rat testis. Histochemistry, 83, 5, 401-4.

Lambard S, Silandre D, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bourguiba S, Carreau S, 2005. Aromatase in testis: expression and role in male reproduction. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 95, 1-5, 63-9.

Lavery DN, McEwan IJ, 2005. Structure and function of steroid receptor AF1 transactivation domains: induction of active conformations. The Biochemical journal, 391, Pt 3, 449-64.

Lavery DN, McEwan IJ, 2006. The human androgen receptor AF1 transactivation domain: interactions with transcription factor IIF and molten-globule-like structural characteristics. Biochemical Society transactions, 34, Pt 6, 1054-7.

Lee WJ, AL TT, Cheng YZ, 2008. Pain in both knees. CMAJ, 179, 11, 1227.

Levine S, Jr. MR, 1964. Estrogen administered neonatally affects adult sexual behavior in male and female rats. . Science, 144, 185–7, .

Lı JJ, Talley DJ, Lı SA, Villee CA, 1974. An estrogen binding protein in the renal cytosol of intact, castrated and estrogenized golden hamsters. Endocrinology, 95, 4, 1134-41.

Lin JZ, Martagón AJ, Cimini SL, Gonzalez DD, Tinkey DW, Biter A, Baxter JD, Webb P, Gustafsson J-Å, Hartig SM, 2015. Pharmacological activation of thyroid hormone receptors elicits a functional conversion of white to brown fat. Cell reports, 13, 8, 1528-37.

Loughlin KR, 2012. Changes in male fertility in the last two decades. The Urologic clinics of North America, 39, 1, 33-6.

Lucas TF, Pimenta MT, Pisolato R, Lazari MF, Porto CS, 2011. 17beta-estradiol signaling and regulation of Sertoli cell function. Spermatogenesis, 1, 4, 318-24.

Lucas TFG, Lazari MFM, Porto CS, 2014. Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats. Mol Cell Endocrinol, 382, 1, 84-96.

Luu-The V, Pelletier G, Labrie F, 2005. Quantitative appreciation of steroidogenic gene expression in mouse tissues: new roles for type 2 5α-reductase, 20α-hydroxysteroid dehydrogenase and estrogen sulfotransferase. The Journal of steroid biochemistry molecular biology, 93, 2-5, 269-76.

Majewski S, Bosch FX, Dillner J, Iversen OE, Kjaer SK, Munoz N, Olsson SE, Paavonen J, Sigurdsson K, Bryan J, Esser MT, Giacoletti K, James M, Taddeo F, Vuocolo S, Barr E, 2009. The impact of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, 18) virus-like particle vaccine in European women aged 16 to 24. J Eur Acad Dermatol Venereol, 23, 10, 1147-55.

Mann T, 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract., London, Methuen, p.

Matthews J, Gustafsson, J.A., 2003. Estrogen signaling: A subtle balance between ER alpha and ER beta. Mol Interv. 3, 281-92.

Mazzucco CA, Lieblich SE, Bingham BI, Williamson MA, Viau V, Galea LA, 2006. Both estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. Neuroscience, 141, 4, 1793-800.

McGuire JL, Lisk RD, 1968. Estrogen receptors in the intact rat. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 61, 2, 497.

McMillan J, Fatehi-Sedeh S, Sylvia VL, Bingham V, Zhong M, Boyan BD, Schwartz Z, 2006. Sex-specific regulation of growth plate chondrocytes by estrogen is via multiple MAP kinase signaling pathways. Biochimica et biophysica acta, 1763, 4, 381-92.

Menad R, Smai S, Bonnet X, Gernigon-Spychalowicz T, Moudilou E, Khammar F, Exbrayat JM, 2017. Seasonal variations of aromatase and estrogen receptors expression in the testis of free-ranging sand rats. Acta histochemica, 119, 4, 382-91.

Mester J, Baulieu EE, 1972. Nuclear estrogen receptor of chick liver. Biochimica et biophysica acta, 261, 1, 236-44.

Meyer MR, Haas, E., Prossnitz, E.R., Barton, M., , , 2009. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. Mol. Cell Endocrinol. 308, 9-16.

Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K, 1995. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. The Journal of clinical endocrinology metabolism, 80, 12, 3689-98.

Moskovtsev SI, Librach CL, 2013. Methods of sperm vitality assessment. In: Spermatogenesis. Eds: Springer, p. 13-9.

Nie R, Zhou Q, Jassim E, Saunders PT, Hess RA, 2002. Differential Expression of Estrogen Receptors α and β in the Reproductive Tractsof Adult Male Dogs and Cats. Biology of Reproduction, 66, 4, 1161-8.

O'Donnell L MS, Stanton PG, McLachlan RI., edited by Neill JD. St., Louis, 2006. Endocrine regulation of spermatogenesis. In: Kobil and Neill's Physiology of Reproduction. MO: Elsevier, 1017–69.

O'donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER, 2001. Estrogen and spermatogenesis. Endocrine reviews, 22, 3, 289-318.

Oliveira AG, Dornas RA, Mahecha GA, Oliveira CA, 2011. Occurrence and cellular distribution of estrogen receptors ERα and ERβ in the testis and epididymal region of roosters. General comparative endocrinology, 170, 3, 597-603.

Oliveira CA, Nie R, Carnes K, Franca LR, Prins GS, Saunders PT, Hess RA, 2003. The antiestrogen ICI 182,780 decreases the expression of estrogen receptor-alpha but has no effect on estrogen receptor-beta and androgen receptor in rat efferent ductules. Reproductive Biology Endocrinology, 1, 1, 75.

Oliveira RL, Nogueira JC, Mahecha GA, Oliveira CA, 2012. Seasonal variation in estrogen receptor ERα, but not ERβ, androgen receptor and aromatase, in the efferent ductules and epididymis of the big fruit-eating bat Artibeus lituratus. General comparative endocrinology, 179, 1, 1-13.

Osborne CK, 1998. Steroid hormone receptors in breast cancer management. Breast cancer research and treatment, 51, 3, 227-38.

Ovalle WK, Nahirney PC, 2009. Netter's Essential Histology: With Student Consult Access, Elsevier Health Sciences, p. 377-98.

Overstreet J, Katz D, 1987. Semen analysis. The Urologic clinics of North America, 14, 3, 441-9.

Payne AH, Perkins LM, Georgiou M, Quinn PG, 1987. Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular estradiol. Steroids, 50, 4-6, 435-48.

Prins GS, Marmer M, Woodham C, Chang W, Kuiper G, Gustafsson J-Ak, Birch L, 1998. Estrogen receptor-β messenger ribonucleic acid ontogeny in the prostate of normal and neonatally estrogenized rats. Endocrinology, 139, 3, 874-83.

Qian Y, Sun X, Tong M, Li X, Richa J, Song W, 2001. Targeted disruption of the mouse estrogen sulfotransferase gene reveals a role of estrogen metabolism in intracrine and paracrine estrogen regulation. Endocrinology, 142, 12, 5342-50.

Rago V, Siciliano L, Aquila S, Carpino A, 2006. Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. Reproductive Biology, 4, 1, 36.

Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno RD, 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. J Biology of reproduction, 67, 4, 1043-51.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER, 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. Science, 307, 5715, 1625-30.

Rhen T, Cidlowski JA, 2006. Steroid Hormonların Etki Mekanizmaları. In: Yen & Jaffe Üreme Endokrinolojisi. Eds, 5. Ankara: Güneş Kitabevi, p. 155.

Roberts K, 1987. Sterol sulfates in the epididymis; synthesis and possible function in the reproductive process. Journal of steroid biochemistry, 27, 1-3, 337-41.

Rogers K, 2010. The Reproductive System, Britannica Educational Pub., p.

Rommerts F, Brinkman A, 1981. Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells. Molecular cellular endocrinology, 21, 1, 15-28.

Rose NR, Hjort T, Rumke P, Harper M, Vyazov O, 1976. Techniques for detection of iso-and auto-antibodies to human spermatozoa. Clinical Experimental immunology, 23, 2, 175-99.

Roselli CE, Abdelgadir SE, Resko JA, 1997. Regulation of aromatase gene expression in the adult rat brain. Brain research bulletin, 44, 4, 351-7.

Ross MH, Pawlina W, 2014. Histology, Lippincott Williams & Wilkins, p.

Ross R, 2006. . Section 21: Male Reproductive System. . In: Histology: a text and atlas. . Eds, p.

Rune GM, Lohse C, Prange-Kiel J, Fester L, Frotscher M, 2006. Synaptic plasticity in the hippocampus: effects of estrogen from the gonads or hippocampus. Neurochem Res, 31, 2, 145-55.

Saunders P, Fisher J, Sharpe R, Millar M, 1998. Expression of oestrogen receptor beta (ERb) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. Journal of Endocrinology, 156, 3, R13.

Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, Millar MR, 2001. Differential expression of oestrogen receptor α and β proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. Molecular Human Reproduction, 7, 3, 227-36.

Sayli BS, Cçöl M, Elhan AH, Genç Y, 2003. Asseessmenr of Fertility And İnfertility İn Boron- exposed Turkish Subpopulatitns 6: Relevant Data From All Centers Journal of Ankara Medical School, 25, 4.

Scordalakes EM, Shetty SJ, Rissman EF, 2002. Roles of estrogen receptor alpha and androgen receptor in the regulation of neuronal nitric oxide synthase. The Journal of comparative neurology, 453, 4, 336-44.

Setchell B, Cox J, 1982. Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. Journal of reproduction fertility, 32, 123-7.

Setchell B, Laurie M, Flint A, Heap R, 1983. Transport of free and conjugated steroids from the boar testis in lymph, venous blood and rete testis fluid. Journal of Endocrinology, 96, 1, 127-36.

Sheng ZG, Huang W, Liu YX, Zhu BZ, 2013. Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. Toxicology and applied pharmacology, 267, 1, 88-94.

Sheng ZG, Zhu BZ, 2011. Low concentrations of bisphenol A induce mouse spermatogonial cell proliferation by G protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha. Environmental health perspectives, 119, 12, 1775-80.

Sica M, Martini M, C. V-P, Panzica G, 2009. Estrous cycle influences the expression of neuronal nitric oxide synthase in the hypothalamus and limbic system of female mice. B.M.C. Neurosci. 10.78.

Simpson E, Jones M, 2007. Of mice and men: the many guises of estrogens. In: Tissue-specific estrogen action. Eds: Springer, p. 45-68.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, et al., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr Rev, 15, 3, 342-55.

Sirianni R, Chimento A, Ruggiero C, De Luca A, Lappano R, Andò S, Maggiolini M, Pezzi VJE, 2008. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17β-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. 149, 10, 5043-51.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS, 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. New England Journal of Medicine Endocrine reviews Developmental biology, 331, 16, 1056-61.

Solakidi S, Psarra A-MG, Nikolaropoulos S, Sekeris CE, 2005. Estrogen receptors α and β (ERα and ERβ) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERβ and AR in mitochondria of the midpiece. Human Reproduction, 20, 12, 3481-7.

Soloff MS, Szego CM, 1969. Purification of estradiol receptor from rat uterus and blockade of its estrogen-binding function by specific antibody. Biochemical biophysical research communications, 34, 1, 141-7.

Strauss JF, Barbieri RL, 2013. Yen & Jaffe's reproductive endocrinology E-book: physiology, pathophysiology, and clinical management (Expert Consult-Online and Print), Elsevier Health Sciences, p.

Stumpf WE, 1971. Probable sites for estrogen receptors in brain and pituitary. In: Zentralnervöse Sexualsteuerung. Eds: Springer, p. 51-64.

Su W, Mruk DD, Lie PP, Lui WY, Cheng CY, 2012. Filamin A is a regulator of blood-testis barrier assembly during postnatal development in the rat testis. Endocrinology, 153, 10, 5023-35.

Sullivan R, Legare C, Thabet M, Thimon VJJoa, 2011. Gene expression in the epididymis of normal and vasectomized men: what can we learn about human sperm maturation? , 32, 6, 686-97.

Tanagho E, 1992. McAnnich J.W. Smith' s General Urology. Lange, Prentice Hall International Inc., p.

Teng J, Wang ZY, Jarrard DF, Bjorling DE, 2008. Roles of estrogen receptor alpha and beta in modulating urothelial cell proliferation. Endocrine-related cancer, 15, 1, 351-64.

Thomas P, Pang Y, Filardo E, Dong J, 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. Endocrinology, 146, 2, 624-32.

Tian X, Cui S, Liu J, Yi S, 2004. Expression of estrogen receptors in the efferent ductule of male sheep fetuses during gestation. Histochemistry and cell biology, 122, 5, 473-5.

Tong M, Song W, 2002. Estrogen sulfotransferase: discrete and androgen-dependent expression in the male reproductive tract and demonstration of an in vivo function in the mouse epididymis. Endocrinology, 143, 8, 3144-51.

Toran-Allerand CD, 2004. Minireview: A plethora of estrogen receptors in the brain: where will it end? Endocrinology, 145, 3, 1069-74.

Toran-Allerand CD, 2005. Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol. Annals of the New York Academy of Sciences, 1052, 136-44.

Tournaye HJ, Cohlen BJ, 2012. Management of male-factor infertility. Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology, 26, 6, 769-75.

Van der Molen HJ BA, de Jong FH, Rommerts FF. , 1981. Testicular oestrogens. J Endocrinol 89, 33P–46P, .

Vasan SS, 2011. Semen analysis and sperm function tests: How much to test? Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India, 27, 1, 41-8.

Veldhuis JD, Dufau ML, 1987. Estradiol modulates the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. J Clin Invest, 80, 3, 631-8.

Von Schassen C, Fester L, Prange-Kiel J, Lohse C, Huber C, Bottner M, Rune GM, 2006. Oestrogen synthesis in the hippocampus: role in axon outgrowth. J Neuroendocrinol, 18, 11, 847-56.

Waites G, Einer-Jensen N, 1974. Collection and analysis of rete testis fluid from macaque monkeys. Reproduction, 41, 2, 505-8.

Wang C, Liu Y, Cao JM, 2014. G protein-coupled receptors: extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids. International journal of molecular sciences, 15, 9, 15412-25.

Wang C, Zhang J, Li Q, Zhang T, Deng Z, Lian J, Jia D, Li R, Zheng T, Ding X, Yang F, Ma C, Wang R, Zhang W, Guo Wen J, 2017. Low concentration of BPA induces mice spermatocytes apoptosis via GPR30. Oncotarget, 8, 30, 49005-15.

Weisburger JH, Yamamoto RS, Korzis J, Weisburger EK, 1966. Liver cancer: neonatal estrogen enhances induction by a carcinogen. Science, 154, 3749, 673-4.

WHO, 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.

Yılmaz MB, Erkoç MA, Kocatürk-Sel S, Tunç E, Özpak L, Pazarbaşı A, Güzel Aİ, Alptekin D, Lüleyap HÜ, Demirhan OJCMJ, 2013. Gelişmekte Olan Fare Fetüs Beyninde Aromataz, Östrojen Reseptör Alfa ve Progesteron Reseptörünün Birbirleriyle Olan İlişkileri. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi (Cukurova Medical Journal) 38, 2, 174-80.

Yılmaz MB, Wolfe A, Zhao H, Brooks DC, Bulun SE, 2011. Aromatase promoter I.f is regulated by progesterone receptor in mouse hypothalamic neuronal cell lines. Journal of Molecular Endocrinology, 47, 1, 69-80.

Yücetürk A, 2011. Erkek infertilitesi olan hastalarda serum ve seminal plazma çinko düzeylerinin sperm parametreleri üzerine etkisi, Gazi Üniversitesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S, 2009. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. Fertility and sterility, 92, 5, 1520-4.

Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA, 2002. Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. Journal of andrology, 23, 6, 870-81.

Zondek BJN, 1934. Mass excretion of oestrogenic hormone in the urine of the stallion. Nature, 133, 3354, 209.

8. ÖZGEÇMİŞ

1991 yılı Ankara doğumludur. İlk, ortaokul, lise ve üniversite eğitimlerini Ankara'da tamamladı. 2013 yılında Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden Onur Derecesi (3,46/4) ile mezun olmuştur. Lisans eğitimi boyunca Olympus mikroskop seminer, Thermo Scientific Pathology ve cytology seminer ve mikropipet kullanımı seminer ve sertifikalarını almıştır. 2011 yılında Biyolojik şube İncelemeler Müdürlüğü Kriminal Polis Laboratuvarında, 2012 yılında Ankara Refik Saydam Hıfsısıha Halk Sağlığı'nda staj yapmıştır. 2014 yılında Gazi Üniversitesi Biyoloji Öğretmenliği'nden Pedogojik Formasyon sertifikasını almıştır. Ayrıca 2014 yılında histoloji, özel histoloji ve embriyoloji dallarına özel ilgi ve merakından dolayı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji ABD yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Son olarak 2014 yılında Ankara Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Merkezi Tüp Bebek Ünitesinde staj yapmıştır. Halen Ankara'da özel bir kurumda biyoloji öğretmenliği yapmıştır.

vldnaydgn91@gmail.com