

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPERM PARAMETRELERİ İLE SPERM DNA FRAGMENTASYONU VE
KROMOZOM ANOMALİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Özcan BUDAK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ 2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPERM PARAMETRELERİ İLE SPERM DNA FRAGMENTASYONU VE
KROMOZOM ANOMALİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Özcan BUDAK

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ Olarak Hazırlanmıştır

DANIŞMAN: Prof. Dr. Süreyya CEYLAN

KOCAELİ 2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

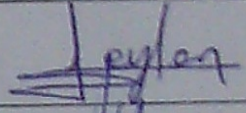
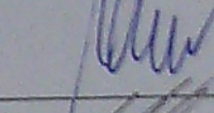


Tez adı : Sperm Parametreleri ile Sperm DNA Fragmantasyonu ve Kromozom Anomalilerinin Karşılaştırılması

Tez yazarı : Özcan BUDAK

Tez savunma tarihi: 26.06.2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Süreyya CEYLAN

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı		İmzası
Başkan	Prof. Dr. Süreyya CEYLAN	
Üye (Danışman)	Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ	
Üye	Prof. Dr. Serdar FİLİZ	
Üye	Doç. Dr. Murat KASAP	
Üye	Yard. Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Tuncay ÇOLAK
Enstitü Müdürü

ÖZET

Sperm Parametreleri İle Sperm DNA Fragmantasyonu ve Kromozom Anomalilerinin Karşılaştırılması

Erkek faktörlü infertil hastalarda, gizli sperm defektlerinin belirlenmesi hala başarısızdır. Erkek faktörlü infertilite hastalarının yaklaşık %15' i normal spermiyogram göstermektedirler. Semen örneğinin sperm DNA bütünlüğü, üreme etkinliği için çok önemlidir. Semen analizinin konvensiyonel parametreleri olan morfoloji, motilite ve örnekteki spermatozoa konsantrasyonu; üreme potansiyelinin değerlendirilmesi açısından yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sperm DNA yapısındaki defektlerin erkek infertilitesinin %20' sinden sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu durum yardımcı üreme teknikleri açısından özellikle önemlidir. Rutin semen analizleriyle karşılaştırıldığında DNA apoptozis ve fragmantasyonunun incelenmesi tanısal ve prognostik olarak daha belirleyicidir.

DNA hasarlı spermatozoon oranı arttıkça doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır. Yüksek oranda DNA hasarlı spermatozoon bulunan ejakulattan alınan spermatozoa' nın, IUI (intra uterin inseminasyon), IVF (in vitro fertilizasyon) ve ICSI (intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu)'da da soruna neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.

Çalışmamızın amacı; rutin semen analizleriyle, sperm DNA' sındaki hasarın gösterilmesinin yeterli olmaması, ayrıca WHO kriterlerine göre sağlıklı olarak nitelendirilen sperm örneklerinin gerçek anlamda sağlıklı olup olmadığını belirlemek ve sperm DNA hasarlarının gösterilmesinde ileri tekniklerin rutin olarak kullanılmasının gerekliliğini vurgulamaktır.

Çalışmamızda Kocaeli Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezine çeşitli infertilite nedenleriyle başvuruda bulunan teratozoospermik, astenozoospermik ve normozoospermik vakaların semen örnekleri kullanıldı. Kruger kriterlerine göre morfolojisi \leq %4 olanlar teratozoospermi,WHO kriterlerine göre motilitesi %40'ın altında olan vakalarda

astenozoospermi olarak kabul edilmiştir. Motolitesi % 40' in üzerinde olan ve morfolojisi > %14 olanlar ise normozoospermi olarak çalışmaya dahil edilmiştir (WHO, 2010).

Bu işlemi takiben sperm örnekleri Tunel, İmmünohistokimya, Western-Blot ve Fish analizleri yapmak üzere prosedürler uygulandı. İmmünohistokimya, İmmünofloresan ve Western-Blot yöntemi ile sperm sentrozom yapısındaki iki önemli protein olan Tubilin ve Sentrin' in varlığına bakılacaktır. Fish analizleri ile X, Y, 13, 18 ve 21 kromozomlardaki anomaliler incelenecektir. Spermlerdeki hasarın kromozom açısından kontrol edilecektir.

Çalışmamızda önemle üzerinde durulmasını istediğimiz durum sperm anöploidili oranının normozoospermik kontrol grubundada önemsenerek değerlerde olduğunu göstermekti. Normozoospermik gruptaki apoptozis oranı % 9,1 ve FISH analizlerinde Nullizomi(18,21), Monozomi (X,Y,13,18,21), Dizomi(X,Y,18,21) ve Trizomi 13 anöploidili frekansları astenozoospermik ve teratozoospermik gruplarla istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermemesine rağmen, bu analizlerde diğer iki gruba yakın anöploidili frekanslarına sahiptir. Bu spermle yapılan YÜT uygulamalarında normal kabul edilen sperm örneklerinin erkek faktörü olarak kabul edilen teratoospermi, astenozoospermi, azospermi gibi sperm örnekleri kadar dikkat edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: Teratozoospermi, astenozoospermi, erkek infertilitesi, kromozom anomalileri.

ABSTRACT

The Sperm Parameters Comparison With Sperm DNA Fragmentation and Chromosomal Abnormalities

It is still difficult to determine hidden sperm defects in infertile patients with male factor etiology. Around 15% of infertile patients with male factor etiology still present with normal spermiogram test. DNA integrity of sperm sample is very important for reproductive efficiency. Morphology, motility and spermatozoa concentration, that are conventional parameters of semen analysis, remains insufficient for the assessment of reproductive potential. Recent studies have shown that defects in DNA structure are responsible for 20% of male infertility. This condition is very crucial for assisted reproduction techniques. When compared with routine semen analysis, assessment of DNA apoptosis and fragmentation are diagnostic and prognostic determining factors.

The chance of spontaneous pregnancy decreases as the rate of spermatozoa with DNA damage increases. There are some studies showing spermatozoa obtained from the ejaculate containing high levels of DNA-damaged sperm cause problems in IUI (intrauterine insemination), IVF (in vitro fertilization) and ICSI (intracytoplasmic sperm injection).

The aim of our study is to determine whether sperm samples that are considered as healthy according to WHO criteria are really healthy or not, and to emphasize the requirement for the routine use of advanced techniques in demonstration of sperm DNA damage.

Semen samples from teratozoospermic, asthenozoospermic and normozoospermic cases who admitted to Kocaeli University Faculty of Medicine IVF Unit for various infertility reasons were included in our study. Patients whose sperm morphology is equal and less than 4% according to Kruger criteria were considered as teratozoospermia, and whose sperm motility was less than 40% were accepted as asthenozoospermia according to WHO criteria. Patients whose sperm motility is more than 40% and morphology is above 14% were included in the study as normozoospermia (WHO,2010).

Sperm samples were then underwent Tunnel, Immunohistochemistry, Western-Blot and Fish analyses. The presence of two important proteins of centrosome structure, Tubulin and Centrin, was examined by Immunohistochemistry, Immunofluorescence and Western-Blot methods. Abnormalities in chromosomes X, Y, 13,18 and 21 were investigated by FISH analysis. The damage in the chromosomes of spermatozoa will be controlled.

The main condition that we want to focus in our study is to show that the rate of sperm aneuploidy in normozoospermic control group is also at a substantial level. Apoptosis rate in normozoospermic group was found to be 9.1%. Although the aneuploidy frequencies of Nullisomy (18, 21), Monosomy (X, Y, 13, 18, 21), Disomy (X, Y, 18, 21) and Trisomy 13 in control group did not show a statistically significant difference compared to asthenozoospermic and teratozoospermic groups, it has an aneuploidy frequency close to these two groups. These results reveal that sperm samples that are considered as normal in ART procedures need to be considered as sperm samples as teratospermia, asthenospermia and azoospermia.

Key Words: Teratozoospermia, male infertility, asthenospermia chromosomal abnormalities.

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalındaki doktora tez çalışmam sırasında eşsiz destek ve yardımlarını gördüğüm danışmanım;

Prof. Dr. Süreyya Ceylan'a

Eğitimim süresince destek ve yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri değerli hocalarım;

Prof. Dr. Melda Yardımoğlu Yılmaz'a , Prof. Dr. Serdar Filiz'e ,

Doç. Dr. Süheyla Gonca'ya , Doç. Dr. Yusufhan Yazır'a

Tez çalışmam sırasında eşsiz destek ve yardımlarını gördüğüm;

Doç. Dr. Murat Kasap, Yard. Doç. Dr. Naci Cine, Yard. Doç. Dr. Ahmet Yiğit Çakıroğlu,

Bio. Buket Engüzel, Bio. Sema Kurnaz

Değerli Çalışma Arkadaşlarım;

Bio. Elif Gelenli Dolanbay, Bio. Gözde Yazıcıoğlu,

ve

Kocaeli Üniversitesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezi Tüm Çalışanlarına,

Sonsuz Desteğini ve Sevgisini Her Zaman Yanımda Hissettiğim;

Annem ve Kardeşlerime

Her Zaman Yanımda Olan Sevgili Eşim;

Özlem BUDAK'a

Canım Oğlum

Muhammed Enes BUDAK'a

TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	İV
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XXII
1. GİRİŞ	1
1.1. AMAÇ ve KAPSAM	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Testisin Gelişimi	7
2.2. Testisin Genel Yapısı.....	8
2.2.1. Seminifer Tübüller	10
2.2.2. Sertoli Hücreleri	11
2.2.3. Leydig Hücreleri	12
2.3. Germ Hücreleri ve Olusum Süreci.....	12
2.3.1. Spermatogonya.....	12
2.3.2. Spermatozitler.....	12
2.3.3. Spermatoitler	13
2.4. Nükleustaki Değişimler: Nükleik Asitlerin, Proteinlerin Sentezi ve Haploid Gen Ekspresyonu.....	15
2.5. Deneysel Modellerinde ve İnsanda Spermatogenik Siklus.....	16
2.6. Spermatogenezin Endokrin ve Parakrin Kontrolü	17
2.7. Spermatogenezin Verimliliği	18
2.8. Spermiumun Görevi Fertilizasyon.....	19
2.9. Sperm Ultrastrüktürü ve Programlanmış Görevleri	21
2.9.1. Kuyruk	21

2.9.1.1. Aksonom.....	22
2.9.1.2. Bağlantı Parçası.....	25
2.9.1.3. Dış Yoğun Fibriller	25
2.9.1.4. Orta Parça	26
2.9.1.5. Esas Parça	26
2.9.1.6. Terminal Parça	27
2.9.2. Baş.....	27
2.9.2.1. Akrozom	28
2.9.2.1.1. Ön Akrozomal Bölge	29
2.9.2.1.2. Ekvatoryal Bölge.....	30
2.9.2.1.3. Perinükleer Materyal.....	30
2.9.2.2. Nükleus (Çekirdek).....	31
2.9.2.3. Sitoplazmik Damla.....	32
2.9.2.4. Plazma Membranı	32
2.9.2.4.1. Orta Parça Bölgesi.....	33
2.9.2.1.2. Esas Parça Bölgesi	33
2.10. Spermatozoon DNA Hasarı.....	34
2.10.1. Mitokondrial DNA Hasarı	34
2.10.2. Nükleer DNA Hasarı Ve Kaynağı	34
2.10.3. Spermatozoon DNA'sını Etkileyen Faktörler	35
2.10.4. Spermatozoon DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri	36
2.10.4.1. Asidik Anilin Mavisi Boyaması.....	36
2.10.4.2. Toluidine Mavisi Boyaması	36
2.10.4.3. Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi.....	37
2.10.4.4. DBD-FISH (DNA breakage detection-fish) Yöntemi	37
2.10.4.5. İn Situ-Nick Translasyon (NT)Yöntemi.....	37
2.10.4.6. Akridin Oranj (AO) Boyaması.....	37
2.10.4.7. Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD) – HALOSPERM	38
2.10.4.8. COMET (Cluster Of Motifs E-value Tool) Yöntemi	38
2.10.4.9. TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) Yöntemi.....	38
2.10.4.10. SCSA (Sperm Kromatin Strüktür Analizi).....	39

2.10.4.11. Yüksek Performanslı Likit Kromatografi Yöntemi.....	39
2.10.5. Spermatozoon DNA Hasarı ve Klinik Önemi.....	39
2.10.5.1. Spermatozoon DNA Hasarı ve Erkek İnfertilitesi	40
2.10.5.2. Spermatozoon DNA hasarı ve Yardımlı Üreme Teknikleri	40
2.11. Apoptozis.....	41
2.11.1. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar.....	42
2.11.1.1. Fizyolojik Olaylar.....	42
2.11.1.2. Patolojik Olaylar	43
2.11.2. Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler.....	43
2.11.2.1. Morfolojik Değişiklikler.....	43
2.11.2.2. Biyokimyasal Değişiklikler.....	44
2.11.3. Apoptozis Mekanizmaları	45
2.11.3.1. Ekstresek / Reseptör Aracılı Yol.....	45
2.11.3.2. İntrensek / Mitokondrial Yol.....	46
2.11.4. Apoptozis Regülatörleri.....	46
2.11.4.1. P53	47
2.11.4.2. BCL-2 Ailesi Proteinleri.....	47
2.11.4.3. IAF Ailesi Proteinleri.....	48
2.11.4.4. Kaspazlar	48
2.11.5. Spermatogenez Ve Apoptoz.....	49
2.12. Erkek İnfertilitesi Hakkında Genel Bilgiler	50
2.12.1. Azospermi.....	51
2.12.1.1. Nonobstruktif Azospermi	52
2.12.1.2. Obstruktif Azospermi	53
2.13. Erkek İnfertilitesi İle İlgili Genetik Faktörler	54
2.13.1. İzole Spermatogenez Defekti Yapabilen Y-Kromozom Mikrodelesyonları	55
2.13.1.1. İnsan Y Kromozomu ve Yapısı.....	55
2.13.1.2. Pseudotozomal Bölgeler (PABY1, PABY2).....	56
2.13.1.3. İnsan Y Kromozomu Üzerindeki Genler ve Erkek İnfertilitesi	57
2.13.1.4. Testis Belirleyici Faktör (SRY) Bölgesi ve Geni.....	58

2.13.1.5. Azospermi Faktör (AZF) Bölgesi ve Genleri.....	59
2.13.1.6. DAZ (Deleted in Azoospermia) Gen Grupları.....	62
2.13.1.7. RBM (RNA Bağlayıcı Motif) Gen Ailesi.....	62
2.13.1.8. Y Kromozomu ile İlgili Anomaliler	63
2.13.1.8.1. XY Gonad 2.2.1.8.1. XY Gonadal Disgenezi (Swyer Sendromu).....	63
2.13.1.8.2. XYY Erkekler	64
2.2.1.8.3. Rekürren.....	65
2.13.1.8.4. Yqh bölgesi.....	65
2.13.1.8.5. Turner Sendromu (TS).....	66
2.13.1.8.6. Aday Turner Sendromu Genleri.....	66
2.13.2. Konjenital Vaz Deferens Agenezi (Yokluğu) Olan Kistik Fibrozis Gen Mutasyonları	67
2.13.2.1. Ekstra Testiküler Duktal ve Ejakülatör Sistem Anomalileri.....	67
2.13.2.1.1. Kistik Fibrozis	67
2.13.2.1.2. Persistan Müllerian Kanal Sendromu ve Young Sendromu	69
2.13.3. Testis Fonksiyonlarını Bozan Kromozom Anomalileri.....	70
2.13.3.1. Kromozom Yapısı Mutasyonları.....	72
2.13.3.1.1. Delesyon	72
2.13.3.1.2. İnversiyon (Ters Dönme).....	72
2.13.3.1.3. Duplikasyon.....	72
2.13.3.1.4. Translokasyon.....	73
2.13.3.1.5. Yüzük (Ring) Kromozom	73
2.13.3.2. Kromozom Sayısı Mutasyonları	73
2.13.3.2.1. Öploidi	73
2.13.3.2.2. Anöploidi.....	73
2.13.3.3. Kromozom Yapı Bozuklukları.....	74
2.13.3.4. Kromozom Sayı Bozuklukları.....	75
2.13.3.5. Kromozomal Bozukluklar İçin Test.....	76
2.13.4. Sperm Fonsiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar.....	77
2.13.4.1. Primer Silier Diskinezi (PCD).....	77
2.13.4.2. Noonan Sendromu.....	77

2.13.4.3. Miyotonik Distrofi	78
2.13.4.4. Orak Hücre Anemisi	78
2.13.4.5. Genetik Endokrinopatiler	78
2.13.4.5.1. Gonadotropinler (GnRH)'in Üretim veya Sekresyon Bozuklukları	79
2.13.4.5.2. Kallman Sendromu.....	79
2.13.4.5.3. Prader-Willi Sendromu	80
2.14. Yardımcı Üreme Teknikleri Başarısızlığı Ve Genetik	80
2.15. Yardımcı Üreme Teknolojisi İle Doğan Bebeklerde Perinatal ve Uzun Dönem Prognoz	81
2.15.1. Perinatal Dönem Sorunları	83
2.15.1.1. Çoğul gebelikler ve prematürite.....	83
2.15.1.2. Konjenital malformasyonlar ve kromozomal bozukluklar.....	86
2.15.2. Uzun Dönem Sorunları	87
2.15.2.1. Nörogelişimsel prognoz.....	87
2.15.2.2. Büyüme ve fiziksel sağlık.....	89
2.15.2.3. Malignite riski	90
3. GEREÇ-YÖNTEM	91
3.1. Örnek Seçimi ve Hasta Grubu.....	91
3.2. Semen Analizi	93
3.2.1. Makroskobik Değerlendirme.....	93
3.2.1.1. Likefaksiyon	93
3.2.1.2. Görünüm	93
3.2.1.3. Volüm	93
3.2.1.4. Viskozite	93
3.2.1.5. pH.....	94
3.2.2. Mikroskobik Değerlendirme	94
3.2.2.1. Konsantrasyon.....	94
3.2.2.2. Motilite.....	94
3.2.2.3. Total Motil Sayı	95
3.2.2.4. Aglütünasyon.....	95
3.2.2.5. Morfoloji.....	95

3.2.2.6. Kruger'in Kesin Kriterleri	95
3.3. Örneklerin FISH Analizine Hazırlanması	96
3.3.1. Örneklerin Yıkanması.....	96
3.3.2. Preparasyon	97
3.3.3. Fiksasyon	97
3.3.4. Dekondenzasyon	97
3.3.5. FISH Tekniğinin Uygulaması	97
3.3.5.1 .Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu	97
3.3.5.2. Prob Denatürasyonu.....	98
3.3.5.3. Hibridizasyon	98
3.3.5.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	99
3.3.5.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi.....	99
3.3.5.6 . Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	100
3.4. Western Blot.....	102
3.4.1. Protein İzolasyonu.....	102
3.5. İmmün Floresan Boyama.....	106
3.6. Tunnel Yöntemi	108
4. İSTATİKSEL ANALİZ.....	110
5.BULGULAR	111
6.TARTIŞMA.....	142
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	151
KAYNAKLAR.....	153
ÖZGEÇMİŞ.....	166

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayan Protein
AMH	: Antimüllerian hormonu
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
AZF	: Azoospermi Faktörü
cAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
CAVD	: Doğumsal Vaz Deferens Yokluğu
CBAVD	: Doğumsal Çift Taraflı Vaz Deferens Yokluğu
CD	: Clusters of differentiation
CF	: Kistik fibrozis
CFTR	: Kistik fibrozis transmembran taşıma regülatörü
CPE	: Korona Penetran Enzim
DAF	: Decay-accelerating factor
DAZ	: Deleted in Azoospermia
DHT	: Dihidrotestosteron
DNA	: Deoksiribonukleik asit
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
ES	: Ekvatorial segment
FISH	: Fluoresan in situ hibridizasyon analizi
FSH	: Folikül stümüle edici hormon
GH	: Büyüme Hormonu
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GPI	: Glikozil fosfatidil inozitol

HCFG	: Hürthle Hücre Folliküler Karsinoma
HCG	: İnsan Korionik Gonadotropin
HHG	: Hipotalamus-Hipofiz-Testis
hMG	: İnsan Menapozal Gonadotropin
IAM	: İç akrozomal membran
ICSI	: İntrasitoplasmik sperm injeksiyonu
IgA1	: İmmünglobulin A1
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IHH	: İdiopatik hipogonadotropik hipogonadizm
ISH	: In Situ Hibridizasyon
IUI	: Intra Uterin İnseminasyon
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
LH	: Luteinize edici hormon
Mb	: Megabaz
MIF	: Müllerian İnhibiting Factor
ml	: Mililitre
mtDNA	: Mitokondial DNA
nDNA	: Nükleer DNA
NK	: Natural Killer
NO	: Nitrik Oksit
NRY	: Rekombine olmayan Y
OAM	: Dış akrozomal membran
OAT	: Oligoastenoteratozoospermik
ODF	: Outer Dense Fibers
OPU	: Oosit Pick Up

OXPPOS	: Oksidatif Fosforilasyon
PAR	: Post-akrozomal bolge
PAS	: Post akrosomal kılıf
PBS	: Phosphate buffer saline
PBS-BSA	: Fosfat tampon solusyonu-sığır serum albumini
PgE	: Prostoglandin E
PgF	: Prostoglandin F
PR	: Posterior halka
PSA	: Prostat Spesifik Antijen
PT	: Perinukleer Teka
PWS	: Prader-Willi Sendromu
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBM	: RNA bağlayıcı motif
RNA	: Ribo Nükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RSA	: Rekürren spontan abortus
SCOS	: Sertoli Cell-Only sendromu
SDI	: Sperm Deformite İndeksi
SHBG	: Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin
SMCY	: Selected Mouse cDNA on the Y geni
SOAF	: Sperm-born-oocyte activating factor
SRY	: Y kromozomunun seks belirleyicisi bölgesi
T	: Testosteron
TDF	: Testis belirleyici faktör
TESE	: Testiküler Sperm Eldesi

TRUS	: Trans Rektal Ultrasonografi
TUR-ED	: Trans Üretral Rezeksiyon Ejekülatuar Kanal
TZI	: Teratozoospermi İndeksi
UVY	: Vaz deferensin konjenital unilateral yokluğu
ÜYT	: Üremeye Yardımcı Teknikler
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Yq	: Y-kromozomu Uzun Kolu
ZP3	: Zona Pellucida glikoprotein 3
β	: Beta
μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3. 1. Western transfer sonrası Ponceau-S ile boyanmış bantlar	104
Şekil 3. 2. Protein izolasyonu sonunda SDS-PAGE' de yürütülmüş protein bantları	104
Şekil 3. 3. İmmün floresan boyama basamakları. Primer antikorda (Tubulin) inkübasyon süreci	107
Şekil 5. 1. Normozoospermi grubu Tunnel boyama yöntemi, apoptozis görülmeyen sperm mavi renkte DNA yapıları görülmekte,X20 İnvirt Mikroskop	113
Şekil 5. 2. Teratozoospermi grubuna ait solda baş, boyun ve kuyruk anomalisi olan sperm X20 invert mikroskop ; sağda immünfloresan mikroskopta Dapi filtresindeki görüntüsü X20.	114
Şekil 5. 3. Sağda Normozoospermi grubuna ait sağlıklı spermler X20 immünfloresan, solda Astenozoospermi grubuna ait sağlıklı spermleri X40 immünfloresan	114
Şekil 5. 4. İmmünfloresan mikroskopta karanlık alanda Teratozoospermi grubu çift kuyruklu Sperm X40 görüntüsü	115
Şekil 5. 5. Teratozoospermi grubu mavi zeminde yeşil sinyaller alınan apoptozise uğramış spermler X20 objektif	116
Şekil 5. 6. Normozoospermi grubu apoptozise uğramış ve sağlıklı spermler X20 objektif....	116
Şekil 5. 7. Normozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı).....	119
Şekil 5. 8. Normozoospermi grubu Westen Blot bantları (monoklonal Sentrin antikoruna karşı).....	119
Şekil 5. 9. Normozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Sentrin antikoruna karşı).....	119
Şekil 5. 10. Normozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı).....	119
Şekil 5. 11. Astenozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı).....	119
Şekil 5. 12. Astenozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı).....	120
Şekil 5. 13. Astenozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Sentrin antikoruna karşı).....	120

Şekil 5. 14. Astenozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı).....	120
Şekil 5. 15. a. Normozoospermi grubu (monoklonal Tubilin antikoruna karşı) bantları	121
b. Normozoospermi grubu (monoklonal Sentrin antikoruna karşı) bantları	121
Şekil 5. 16. Astenozoospermi grubu İmmünfloresan görüntüleri X20, Dapi ile boyanan sperm başları yoğunlukta, sperm kuyukları Texas Red ile boyanmamıştır.(Sentrin).....	122
Şekil 5. 17. Normozoospermi grubu kuyukları kırmızı renkte , baş bölgesi mavi renkte boyanan sperm (Sentrin) İmmünfloresan görüntüleri X20 İnvert mikroskop.	123
Şekil 5. 18. Normozoospermi grubu sperm Tubilin, İmmünfloresan görüntüleri X20 invert mikroskop	123
Şekil 5. 19. Astenozoospermi grubu sperm Tubilin, İmmünfloresan görüntüleri X20 invert mikroskop.....	124
Şekil 5. 20. Normozoospermi İmmünfloresan görüntüleri X20 Tubilin.....	124
Şekil 5. 21. Normozoospermi İmmünfloresan görüntüleri X20 Sentrin	125
Şekil 5. 22. Normozoospermi grubu Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20, kuyukları kırmızı renkte boyanmayan sperm dikkati çekmekte	125
Şekil 5. 23. Astenozoospermi Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20, kuyukları kırmızı renkte boyanmayan sperm görüntüdedik.	126
Şekil 5. 24 Normozoospermi grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Tubilin İmmünfloresan görüntüleri X20 görüntüleri.....	126
Şekil 5. 25. Normozoospermi grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20 görüntüleri.....	127
Şekil 5.26. Normozoospermi grubu farklı yoğunlukta boyanmış ve boyanmamış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20 görüntüleri.	127
Şekil 5. 27. Astenozoospermi grubu farklı yoğunlukta boyanmış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20 görüntüleri.....	128
Şekil 5. 28. Normozoospermi grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Tubilin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüleri.....	128
Şekil 5. 29. Normozoospermi grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüleri.....	129

Şekil 5. 30. Astenozoospermii grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüler.....	129
Şekil 5. 31. Astenozoospermii grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Tubilin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüler.....	130
Şekil 5. 32. Astenozoospermii grubu düşük yoğunlukta boyanmamış ve hiç boyanmış Tubilin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüler	130
Şekil 5. 33. Normozoospermii grubu düşük yoğunlukta boyanmamış ve hiç boyanmış Tubilin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüler	131
Şekil 5. 34. Normozoospermii Grubu sağlıklı X, Y, kromozomları FİSH görüntüleri	136
Şekil 5. 35. Astenozoospermii grubu sağlıklı 21 ve 13 kromozomları FİSH görüntüleri	136
Şekil 5. 36. Teratozoospermii dizomi 13 FİSH görüntüleri	137
Şekil 5. 37. Teratozoospermii grubu FİSH öncesi karanlık alan görüntüleri X100	137
Şekil 5. 38. Teratozoospermii grubu sağlıklı olgu FİSH görüntüleri	138
Şekil 5. 39. Normozoospermii grubu Dizomi Y FİSH görüntüleri.....	138
Şekil 5. 40. Normozoospermii sağlıklı olgu FİSH görüntüleri	139
Şekil 5. 41. Teratozoospermii grubu Dizomi FİSH görüntüleri	139
Şekil 5. 42. Teratozoospermii grubu sağlıklı olgu FİSH görüntüleri	140
Şekil 5. 43. Astenozoospermii grubu sağlıklı olgu FİSH görüntüleri	140
Şekil 5. 44. Normozoospermii grubu sağlıklı olgu FİSH görüntüleri	141
Şekil 5. 45. Normozoospermii grubu immünhistokimya tubilin X20 inverted ışık mikroskop.	141

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. 2010 WHO Sperm Kriterleri.....	92
Çizelge 5. 1. Normozoospermi, Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları spermiyogram ve Tunnel bulguları.....	117
Çizelge 5. 2. Normozoospermi ve Astenozoospermi grupları western-blot , immünofloresan bulguları.....	118
Çizelge 5. 3. Normozoospermi ,Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları Nullizomi bulguları.....	131
Çizelge 5. 4. Normozoospermi ,Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları Monozomi bulguları.....	133
Çizelge 5. 5. Normozoospermi ,Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları Dizomi bulguları.....	134
Çizelge 5. 6. Normozoospermi ,Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları Trizomi bulguları.....	135

1. GİRİŞ

İnfertilite, bir çiftin bir yıl boyunca düzenli cinsel ilişkiye girdiği ve korunma yöntemi uygulamadığı halde gebe kalamama durumudur. İnfertiliteye yol açan nedenlerin bir kısmı sonradan oluştuğu halde bir kısmı da genetik bir temele dayanır. Cinsiyet kromozomları ve otozomal kromozomların her ikisinde de normal cinsiyet karakterlerini belirleyen genetik yapılar bulunmaktadır (Simpson, 1990). Bu genlerin lokalizasyonlarında ve yapılarında ortaya çıkan genetik mutasyonlar seksüel farklılaşma bozuklukları şeklinde karşımıza çıkmaktadır. Bu genlerdeki mutasyonların gen mutasyonlarının oligospermi ve azospermiye neden olduğu, bir kısım genetik değişikliklerinde spermatogenez bozukluklarına yol açtığı gösterilmiştir (Vaffe, 1994).

Yapılan bir araştırmada, azospermik hastaların %15'inde, oligospermik hastaların %5'inde, normal erkeklerin ise %1'inden daha azında kromozom anomaliliği bulunduğu, sperm sayısı arttıkça bu oranın azaldığı ve 20 milyon/ml üzerindeki sayılarda ortalama %1'e düştüğü tespit edilmiştir (Kjessler ,1974). Azospermik ve şiddetli oligospermik erkeklerin %10-15'inde aynı zamanda Y kromozom mikrolelesyonlarına da rastlandığı bildirilmiştir (Kjessler ,1974). 2372 infertil erkeğin kromozom analizlerinde, 33'ü cinsiyet kromozomunda, 18'i otozomlarda olmak üzere toplam 51 vakada %2.1 kromozom düzensizliği bulunmuştur. Bunların yaklaşık yarısını Klinifelter sendromlu vakaların oluşturduğu görülmüştür (Chandley , 1979).

Bu nedenle azospermisi ya da şiddetli oligospermisi, teratospermisi ve astenospermisi olan erkeklerin, kromozom anomalisi ve Y kromozom mikro delesyonları taşıyabilecekleri konusunda bilgilendirilmeleri gerekir. Bu erkeklerin spermeleri intrasitoplazmik sperm injeksiyon (ICSI) tekniğinde kullanılmadan önce karyotip analizi ve Y kromozom mikrolelesyonu testleri istenmelidir. Cinsiyet kromozomunda yer alan gonad belirleyici yapılar gonadların testis ve ovaryum şeklinde gelişmesine yol açmakta, daha sonra salgılanan gonad hormonları genital ve duktal farklılaşmayı sağlamaktadır. Y kromozomunda mayoz bölünme sırasında oluşan defektler cinsiyet kromozomu sayısında anormalliklere, spermatogenez ve fertilite üzerinde belirgin bozukluklara neden olmaktadır (Kjessler , 1974;

Chandler, 1979). Androjenik hormonlar erkek fenotipik karakterlerinin oluşması ve spermatogenez için kritik öneme sahiptir. Androjen sentezi ve biyolojik etkisinden sorumlu genlerdeki defektler androjen sentezi ve hormonun etkilerini engelleyebilirler veya kısıtlıyabilir. Bazı erkek infertilite vakalarında androjen reseptör genleri ile ilişkili reseptör defektlerinin rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Ayrıca birçok genetik sendromun, üreme fonksiyonlarını önemli derecede etkilediği bilinmektedir (Kjessler ,1974; Chandley , 1979). İnfertilite vakalarının yaklaşık yarısında erkek üreme yetmezliği ya da disfonksiyonu tam veya kısmen rol oynamaktadır. Özellikle erkek faktörü olan hastaların tanısı yapılırken mutlaka genetik hasar açısından değerlendirilmeleri gerekmektedir. Erkek faktörü sebebiyle doğal yollarla çocuk sahibi olamayan çiftlerde ICSI ve benzeri gelişen teknikler sperm faktörünün neden olduğu IVF - ET başarısızlıklarını önemli oranda azaltmıştır. ICSI'den önce her çifte, mevcut olan genetik hasarın, mevcut infertilitenin ve diğer değişen fenotipik belirtilerin çocuğa geçme riski olabilirliği için bilgi verilmelidir.

Erkek ilişkili faktörler, infertilitenin yaygın sebebi olmaya devam etmektedir. İnfertilite vakalarının yaklaşık % 20' sinden tek başına sorumludur, erkek ve kadın faktörünün bir arada olduğu vakaların % 30-40' ında ek bir artışa neden olmaktadır (Mau-Holzmann 2005; Ferlin, 2005).

Erkek faktörlü infertil hastalarda, gizli sperm defektlerinin belirlenmesi hala başarısızdır. Çeşitli görüşler olmasına rağmen, erkek faktörlü infertilite hastalarının yaklaşık %15' i normal spermiyogram göstermektedirler (Jarzabek, 2004).

Normal sperm DNA' sı fiziksel ve kimyasal denaturasyona oldukça dirençlidir ve sperm transportu sırasında DNA hasarına karşı çift sarmal yapısı koruma sağlar (Jarzabek, 2004). Son yıllardaki çalışmalarda insan ejakülat sperminde DNA fragmentasyonunun varlığı, özellikle semen kalitesi kötü vakalarda gösterilmiştir. Memeli spermatogenezisi esnasında germ hücre ölümü esas olarak apoptozis yoluyla görülür. Hayvan modellerinden elde edilen kanıtlar, erken germ hücrelerinin aktif proliferasyonunun, selektif apoptozis tarafından

dengelendiğini göstermiştir(Kim,1998). Örneğin testiküler germ hücre apoptosisi devamlı ve fizyolojik olarak yaşam boyunca görülür. Apoptozis, normal spermatogenezis esnasında önemli iki rol oynar: Germ hücre popülasyonunun sayısının sınırlandırılması ve anormal spermatozoanın selektif olarak bitirilmesi (Kim, 1998; De Palma, 2006; Koh, 2005).

Apoptozisin ayırd edici anahtarı, DNA tek iplik kırıklarının varlığıdır. Spermatozoalarda saptanan bu DNA tek iplik kırıkları, aynı zamanda apoptozisten bağımsız faktörlerce de oluşabilir (Koh, 2006). İlave olarak McPherson ve Longo (2008) , kromatin yapısı ve nükleoproteinler modifiye edildiğinde; uzayan rat spermatidlerinde endojen DNA tek iplik kırıklarının varlığını gösterdiler (Simoni, 2004; Siffroi, 2000).

Günümüzde DNA iplik kırılmalarının tesbitinde TUNEL' ı de içeren bir çok metod bulunmaktadır (Van Opstal, 1999).

Semen örneğinin sperm DNA bütünlüğü , üreme etkinliği için çok önemlidir. Semen analizinin konvensiyonel parametreleri olan morfoloji, motilite ve örnekteki spermatozoa konsantrasyonu; üreme potansiyelinin değerlendirilmesi açısından yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sperm DNA yapısındaki defektlerin erkek infertilitesinin %20' sinden sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu durum yardımcı üreme teknikler açısından özellikle önemlidir. Rutin semen analizleriyle karşılaştırıldığında DNA apoptozis ve fragmantasyonunun incelenmesi tanısal ve prognostik olarak daha belirleyicidir.

Spermatozoanın DNA hasarını veya kromatin yapısını değerlendirmede çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bunlar COMET assay, TUNEL, SCSA ve Insitu nick translation (ISNT) ve acridine orange testidir. Tüm bu teknikler, sperm kalitesi ölçümünden bağımsızdır ve DNA bütünlüğü veya kromatin yapısının her ikisinin defektlerinin tespit edilmesiyle, semen kalitesini değerlendirmeyi esas alır. İnsan spermatozoasının DNA hasarından sorumlu olan etyolojik faktörler arasında; artmış reaktif O₂ örnekleri (ROS) ve oksidatif stres; yüksek oranda artmış DNA fragmantasyon indeksiyle (DFI) ilişkilidir. Oksidatif stres, tek veya çift sperm DNA iplik kırığına yol açar. Apoptozis ve anormal kromatin paketlenmesi de DNA hasarıyla ilişkilidir (Mennicke, 2005).

Rutin semen parametreleri her zaman sperm DNA kalitesini yansıtmaz. Normal spermiyograma sahip erkekler de infertil olabilir. Bu durumun sebebi anormal sperm DNA' sı olabilir (Danziger, 2004). Rutin sperm analizindeki parametrelere ilave olarak, sperm DNA bütünlüğü değerlendirilebilir ve böylece spermatozoa kalitesi gösterilebilir. Sperm DNA kalitesinin belirlenmesi, yardımcı üreme tekniklerinin başarısını arttırmak için esastır.

DNA' ları hasarlı spermler kullanıldığında, doğan canlı bebek oranı özellikle düşüktür. Tekrarlayıcı ART kayıpları, çiftleri ekonomik, ve ruhsal sıkıntılara sokmaktadır. Yeni çalışmalarda, sperm deformite endeksi (SDI) 1,6' dan büyükse ART yetmezliğinin arttığı bildirilmiştir (Cuppens ,2004) .

Sperm DNA hasarı promutageniktir (Van Opstal,1997; Mennicke ,2005). Küçük sperm DNA hasarları, pre ve post replikasyon onarım mekanizmalarıyla onarılabilirken; büyük DNA hasarları onarılamayabilir. Böylelikle gerçekte infertil bir erkek rutin spermiyogram verilerine göre görünüşte normal morfolojide spermlere sahip olur, fakat germ hücreleri ise hasarlı DNA' yı barındırır. Bu durum, gebelik kayıplarına veya ölü doğumlara neden olur; ya da ciddi dismorfogenetik özellikte major veya minor konjenital malformasyonlar veya retinoblastom benzeri kesin kanser predispozisyonunu artırır. Böylelikle DNA bütünlük çalışmaları, YÜT' nin kullanımı öncesinde infertil erkeklerin değerlendirilmesinde son derece önemlidir (Danziger, 2004).

Dünya Sağlık Örgütü' nün potansiyel fertilité için açıkladığı insan semen kalitesi, çeşitli testler kullanılarak araştırılmıştır. Geleneksel semen analizleri başarılı bir gebeliğe ulaşılmasında sınırlı da olsa hatırı sayılır bilgiler vermesine rağmen, daha fazla teknolojiye hala ihtiyaç duyulmaktadır. Geçtiğimiz birkaç yılda, normal spermatogenezis sırasında ortaya çıkan fizyolojik hücre ölümünün önemine dikkat çekilmiştir. Yapılan çalışmalara rağmen, spermatozodaki apoptosisin biyolojik önemi veya erkek infertilesindeki muhtemel rolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu bilgi eksikliğinin temel nedeni, kısmen in vitro spermatozoa apoptozis basamaklarının çalışılmasındaki güçlüklerdir (Dayangaç, 2010).

1.1. AMAÇ ve KAPSAM

İnfertilite sorununun yaklaşık %50'si erkek faktörü kaynaklıdır. İlk mikroenjeksiyon uygulaması 1992 yılında gerçekleşmiş, o zamandan günümüze erkek infertilitesine çözüm arayışları için yardımcı üreme teknikleri çalışmaları gelişmiş, hızlanmış ancak hala yanıt bekleyen birçok soru vardır. Bu sorulardan biri de spermatozoada oluşan DNA hasarlarının nedenleridir.

Spermatozoon DNA hasarlarının infertilitedeki önemi in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. DNA hasarlı spermatozoon oranı arttıkça doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır. Yüksek oranda DNA hasarlı spermatozoon bulunan ejakulattan alınan spermatozoanın, IUI (intra uterin inseminasyon), IVF (in vitro fertilizasyon) ve ICSI (intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu)'da da soruna neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu soruna yanıt arayan araştırmacılar DNA fragmentasyonunun kaynağının açıklanmasına odaklanmışlardır. Ortaya çıkan veriler fragmentasyonun maturasyon sürecinde oksidatif stres sonucu ya da apoptotik yollarla oluşabileceğini düşündürmektedir.

Semen analizi rutin olarak fertilitenin göstergesi olarak kullanılmasına rağmen standart spermatozoon konsantrasyonu, motilite ve morfoloji yüzdeleri spermatozoon defektlerini açığa çıkarmayabilir. Ayrıca düşük DNA kalitesi, DNA fragmentasyonlu spermatozoon oranının artışıyla ilgilidir ve fertilitede önem taşır.

Özellikle ICSI gibi yardımcı üreme tekniklerinde DNA fragmentasyonlu spermatozoon ile oositin fertilize olma riski yüksektir. IVF ile karşılaştırıldığında ICSI'de daha düşük blastosist oluşum oranları ve DNA hasarlı embriyo ve beklenmeyen düşüklerin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Çünkü ICSI için spermatozoon seçimi, motilite ve iyi morfolojiye dayanmaktadır. Doğal seleksiyon ortadan kaldırıldığı için defektif paternal genom da bilinmeden oosit içine enjekte edilmiş olmaktadır.

Çalışmamızın amacı; rutin semen analizleriyle, sperm DNA' sındaki hasarın gösterilmesinin yeterli olmaması, ayrıca WHO kriterlerine göre sağlıklı olarak nitelendirilen sperm örneklerinin gerçek anlamda sağlıklı olup olmadığını belirlemek ve sperm DNA hasarlarının gösterilmesinde ileri tekniklerin rutin olarak kullanılmasının gerekliliğini vurgulamak istedik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testisin Gelişimi

Genetik cinsiyet, fertilizasyon ile sağlanır ve X kromozomuna sahip oositin X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllenmesine bağlıdır. Gelişmekte olan gonadlar XX veya XY kromozom kompleksine sahip olurlar. Yedinci haftadan önce gonadların görünümü her iki cinste de birbirine benzer, dolayısıyla “farklanmamış gonadlar” olarak adlandırılırlar. Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomu gereklidir, fakat bu kromozomun yalnızca kısa kolu cinsiyet belirlenmesi için son derece kritiktir. Testis belirleyici faktör (TBF) için gerekli olan SRY geninin, Y kromozomunun-cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleşik olup Y kromozomu, farklanmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir (Berta, 1990; DiGeorge, 1996).

TBF, primer seks kordonlarını uyararak, onların farklanmamış gonadın medulla derinliklerine doğru sokulmasına sebep olur; kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece “rete testis” oluşur. Seks kordonlarının (seminifer kordonlar) kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Tunika albugineanın gelişimi, fetusta testiküler gelişim için çok önemlidir. Gelişen testis, aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozun asılı bağlarından ayrılır ve kendi mezenterisi olan “mezorchium” ile asılı hale gelir. Seminifer kordonlar seminifer tübüllere farklanır, onları takip eden tubuli rekti ve rete testis tübül ağı ile bağlantı kurar.

Seminifer tübüller, interstisyel (ara) dokuda yer alan Leydig hücreleri ve destek elemanları oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testesteron ve androstenedione) salgılamaya baslarlar, bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genital yolların erkeklik yönünden farklılaşmasını tetiklerler. Testesteron üretimini insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimule eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık dönemde en yüksek değerine ulaşır (DiGeorge, 1996). Testesterona ek olarak fetal testisler glikoprotein bir hormon olan “antimüllerian hormon” (AMH) veya “müllerian inhibitör madde” (MIS) adı verilen bir hormonu da salgırlar. AMH, destek

hücreleri (Sertoli hücreleri) tarafından salgılanır, hormonun salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik (Müllerian) kanalların gelişimini baskılar.

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar, puberteden itibaren lümenleri oluşur. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur:

- Sertoli hücreleri, destek hücreleri olan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler.
- Spermatogonya, primordiyal sperm hücreleri olan bu hücreler, primordiyal germ hücrelerinden farklıdır.

Fötal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, mezonefrik kanalcıklardan oluşan efferent kanalcıklarla (5-20 adet) devam eder. Bu kanalcıklar, epididimis ile bağlantılıdır. Epididimis distalinde mezonefrik kanal, kalın bir düz kas tabakası kazanır ve deferens kanalını oluşturur. Mezonefrik kanalların kaudal uçlarının lateralinden dışa doğru seminal veziküller gelişir. Bu çift haldeki bezler spermilerin beslenmesini sağlayan salgıyı yaparlar. Seminal veziküllerin kanalı ile üretra arasında kalan mezonefrik kanal bölümü, “ejakülatör” kanal olarak bilinir.

2.2. Testisin Genel Yapısı

Spermatogenez, seminifer tübüllerde gerçekleşen ve sperm üretimi için gerekli olan bir hücrel farklılaşma sürecidir. İnsanlarda, her bir testis genellikle 15-20 ml hacminde, 4 cm2,5 cm eninde uzunluğunda ve 10-15 g ağırlığındadır. Skrotum içinde, abdomen dışında, bulunan çift testisler, “tunika albuginea” denilen sıkı bir bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Tunika albuginea, ön ve yan yüzlerinde “proessus vaginalisin” kalıntısı olan tunika vaginalisin, visseral ve pariyetal yaprakları ile kaplanmıştır . Tunika albugineanın iç yüzeyinden bir bağ dokusu bölmesi (septası) testisin arkasında yer alan “mediastinum” bölgesine doğru uzanır.

Bağ dokusundan oluşan bu bölgenin içerisinde anastomozlaşmış bir kanal ağı görünümündeki “rete testis” vardır.

Düz kas fibrillerini de içeren sıkı bağ dokusundan oluşmuş, tunika albuginea kapsülü fizyolojik ve farmakolojik uyarılara cevap olarak, kasılmayı sağlar . Tunika albugineanın iç yüzeyi ise, gevsek bağ dokusu karakterinde ve damarda zengin bir bölge olan “tunika vasküloza” ile komşuluk yapar. Testislerin loblanma derecesi türler arasında farklılıklar gösterir; lobçuklar içerisinde spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tübüller vardır. Seminifer tübüller mediastinum testisten sarmallar şeklinde uzanır ve her bir sarmalın iki ucu “tubuli rekti” denilen düz tübüllerle bağlantılıdır . Böylece, her bir sarmalı oluşturan tübül oldukça katlantılı bir yapı göstererek yüzey alanını genişletir. Tübül sarmallarının oluşması “immatür” Sertoli hücrelerinin gelişim sırasındaki mitotik aktivitenin sonucudur (Barrat, 1997).

Tübüller arası dokunun düzeni türler arasında oldukça dramatik değişiklikler gösterir; kan damarları, lenfatikler ve sinir liflerini içerir. Tübüller arası dokudaki Leydig hücreleri, damarlarla ve seminifer tübüllerin “lamina propriyası” ile ilişkili olarak gruplar halinde dağılmıştır. Seminifer tübüllerin dışında ise, “miyoid hücreler” denilen modifiye düz kas hücreleri vardır.

Testisler, insanlarda ve diğer bazı memeli türlerinde fetal ya da erken postnatal hayatta “skrotuma” inerler. Birçok omurgalının testisi abdominal bölgede yer aldığından, insanlardaki bu durum oldukça ilgi çekicidir (Glower, 1990). İnsanlarda testisin skrotumda yer alması, vücut ısısına göre, 2°C ’lik bir ısı farkına neden olur. Bir ya da her iki testisin birden abdominal kavitede asılı kalmasına “kriptorsidizm” denir. Bilateral olarak kriptorsidik olan erkekler infertilirdirler, ancak unilateral kriptorsidik olan bazı erkekler sperm üretebilirler.

“Spermatik kord” testiste gelen ve giden kan damarlarını, “vaza deferens” ise lenfatikleri ve sinirleri içerir. “Pampiniform pleksus” zengin ven kümesinden oluşur; testis üzerinde testiküler arteri çevreler ve bu arterle kaynaşarak spermatik korda uzanır. İnsanlarda ve birçok hayvanda pampiniform pleksus kompleks bir damar sisteminden oluşur ve “termo-

regülasyonda” rol oynar. Bu etkin sistem, kanı testise girmeden önce soğutur ve testisten vücuda dönen kanı ise ısıtır. Bu sistem aynı zamanda testise giden arteriyel kan basıncını kontrol etmede rol alır. Testiküler venlerin kapakçıkları vardır ve genellikle “varikoz” haline gelerek, “varikozel” denilen patolojik duruma neden olabilirler. Varikosellerin daha çok sol testiste gözlenmesinin nedeni muhtemelen testiküler venin renal vene katılırken yaptığı “dik açıdan” kaynaklanabilir. Varikozel sonucunda skrotum içi ısının arttığı ve fertilitiyi etkilediği öne sürülmektedir (WHO,1992). Ayrıca varikoselin, testiküler hacimde bir azalmaya ve Leydig hücre salgısında da düşüşe neden olduğu bildirilmiştir.

2.2.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller Germ hücreleriyle ve Sertoli hücrelerini içerirler. Testis hacminin %85-90'nını oluştururlar. Sertoli hücreleri sayıları değişmeyen, bölünmeyen hücrelerdir. Sertoli hücreleri Tübülün bazal membranına(devamlı) otururlar. Birbirleri arasında sıkı bağlantıları vardır ve böylece kan-testis bariyerini oluştururlar. İmmun sistemin kendiliğinden tanıma “self recognition” döneminden çok sonra pubertede spermatozoa ortaya çıktığından bu bariyer önemlidir. Sertoli hücreleri, gelişen germ hücrelerini beslemenin yanında özürlü olanları fagosite etmekle de görevlidir. Tübül lümenine yaklaştıkça spermatosit ve spermatidler gözlenir.

Olgun spermiyumlar Sertoli hücreleri ile simbiyotik bir evre yaşarlar. Tübülün bazal membran tarafında ve bazal lamina üzerinde spermatogonyumlar bulunur. Germinal ya da spermatogonik hücreler bazal membrandan lümeneye doğru aşama aşama erişkinleşerek sıralanır. Spermatogonyumlar bazal membran üzerine direkt otururlar. Tübül duvarında germ hücreleri 13 değişik aşamada görülebilirler. Spermatositler, bölünerek gelişim aşamasına katılır ve spermatidleri oluşturur. Bu aşamaya kadar olan olayların tümüne “spermatogenez” adı verilir. Spermatidler de değişime uğrayıp spermatozoayı oluştururlar ki bu aşamaya da “spermiyogenez, spermiyohistogenez (ya da spermiyositogenez)” denilir. Bu değişim, çekirdeğin yoğunlaşması, Golgi yıkımı sonucu akrozom belirmesi, sentriyol göçü, sitoplazmanın büyük oranda kaybı, kuyruğun gelişip spermin ortasındaki mitokondri ile ilişkili hale gelmesi olaylarını kapsar.

2.2.2. Sertoli Hücreleri

Bu hücreler, seminifer tübülün periferinden lümenine doğru uzanan diploid hücrelerdir. Spermatogenez esnasında çok önemli rol oynarlar. En önemli fonksiyonları germ hücrelerinin farklılaşması (olgunlaşması) için gerekli çevreyi sağlamaktır. Bütün germ hücre serisi ile ilişkili durumdadırlar. Sertoli hücrelerinin bazal kısımları, seminifer tübülün bazal laminası ile ilişkidir dolayısıyla sistemik sirkülasyonla gelen maddelere direkt olarak erişebilirler. Spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri gibi bazal lamina üzerinde yer alırken, spermatogenik hücre serisinin diğer hücreleri Sertoli hücreleri tarafından oluşturulmuş alanlar içinde yerleşiktirler. Sertoli hücrelerinin mikroskobik yapısı oldukça karmaşıktır. Çok miktarda düz endoplazmik retikulum (DER) ve mikroflamanlar kümesi şeklinde belirgin bir hücre iskeletine sahiptirler. En önemli özellikleri ise özelleşmiş bağlantı kompleksleridir. Çeşitli hücre tipleriyle bağlantılar kurarlar ve hücre-hücre kontaktlarını sürdürürlerken ayrıca germ hücre serileri ile de iletişim halindedirler. En önemli bağlantı Sertoli-Sertoli hücresi arasında kurulan sıkı bağlantıdır ve bu bağlantı özelliği hücreleri sıkıca bir araya getirerek, bazı maddelerin geçişine engel olmaktadır. Bu bağlantı kompleksleri, kan-testis bariyerini oluşturur. Dolayısıyla seminifer tübüllerde iki bölge mevcuttur: Seminifer tübülün periferinden hücreler arası bağlantı kompleksine kadar olan “bazal” kompartıman ve bağlantı kompleksinden tübülün lümenine doğru uzanan “adlüminal” kompartıman. Spermatogonyya bazal kompartımanda yer alırken ardından gelen spermatogenik hücre serisi ise adlüminal kompartımanda yer alırlar.

2.2.3. Leydig Hücreleri

Seminifer tübüller arasındaki bağ dokusunda bulunurlar ve kan damarları etrafında kümelenirler. Steroid biyo-sentezinde gerekli olan iyi gelişmiş DER, Leydig hücrelerinin tipik bir özelliğidir. Ayrıca, insanlarda büyüklükleri ve şekilleri değişen ve “Reinke kristalleri” olarak adlandırılan sitoplazmik inklüzyonlara sahiptirler. Bu inklüzyonları içermeyen Leydig hücreleri de bulunabilir ve bu durumda bu tür hücreler “immatür” formdaki Leydig hücreleri olarak kabul edilmektedirler (Glower , 1990). Leydig hücreleri arasında da sıkı bağlantı kompleksleri vardır.

2.3. Germ Hücreleri ve Olusum Süreci

2.3.1. Spermatogonya

Diploid sayıda kromozoma sahip olan spermatogonyumlar, seminifer tübülün bazal laminası üzerinede lokalize olmuşlardır ve sürekli mitoz bölünmeler geçirerek, ya diğer spermatogonyumları ya da farklılaşma sürecine giderek primer spermatositleri üretirler. Spermatogonyumlar üç tiptedirler; i) tip AA0, A1, A2, A3, A4, ii) ara form ve iii) tip B. Spermatogonyumların gösterdikleri mitoz bölünmeler ya rastgele (yani bölünmeler A0 ile sonuçlanır) ya da senkronizedir (yani bölünmeler spermatogenik siklusa yöneliktir). Her bir bölünme sonrasında, kardeş hücreler arasında sitoplazmik bağlantılar kalır. Tip B spermatogonya ise spermatosite farklılaşan tipteki spermatogonyadır.

Spermatogonyumların bu bölünmelerinin mitotik kinetiği oldukça karmaşıktır ve günümüzde hala tartışmalı bir konudur (Ehmcke, 2005).

2.3.2. Spermatositler

Spermatogonyumların bölünmesi sonucu meydana gelen spermatositler mayoz bölünme geçirerek, haploid sayıda kromozom taşıyan dört adet spermatid meydana getirirler. İlk olarak, homolog kromozomların gelişigüzel bölünmeleriyle olur, ikinci olarak da, homolog

kromozomlar arasında genetik materyalin değis tokuğu (crossing over) gözlenir. Bu iki olay türlerin yasaması için gerekli olan çeşitliliği sağlar. Mayoz bölünmenin profaz aşaması oldukça uzun bir süreçte gerçekleşir; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez olmak üzere safhalar gösterir.

Spermatozitler birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasına girdiklerinde, seminifer tübülün bazal membranından lümenine doğru hareket ederler. Homolog kromozomların yanyana geldiği zigoten aşamasında ise, bazal membrandan ayrılırlar. Pakiten aşaması, mayozun ve profaz evresinin en uzun aşamasıdır ve bu nedenle geçen bu süreçte spermatozitlerin çeşitli hasarlara maruz kalma olasılığı en yüksektir. Spermatozit-I'ler diploid kromozom (2n) ve diploid DNA miktarı (4DNA) taşırlar. Birinci mayoz bölünme sonucunda bu miktarlar yarıya iner. Birinci mayoz bölünme sırasında genetik materyalin değişimi "kiazma" noktalarından gerçekleşir ve her bir primer spermatozit iki adet sekonder spermatozit oluşturur. Oluşan sekonder spermatozitler çok kısa bir süre varlıklarını sürdürürler ve ikinci mayoz bölünmeye giderek, haploid kromozom sayısına sahip olan iki adet spermatid meydana getirirler. Mayoz bölünme esnasında, seks kromozomlarının DNA replikasyonu, kondenzasyon ve transkripsiyon zamanlamaları, somatik kromozomlardan farklılıklar gösterir.

2.3.3. Spermatoidler

Mayoz bölünmeler sonucunda meydana gelen spermatidlerin gelişmesi, değişmesi ve seminifer tübül lümenine spermium olarak atılması sürecindeki olaya "spermioyogenez" denir. Basit bir hücre özelliğinde olan bir spermatid, yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal değişikliklere uğrayarak özelleşmiş bir hücre tipi olan spermatozoayı meydana getirir. Bu değişim mekanizması günümüzde hala açıklanamamıştır. Bu süreçte meydana gelen değişiklikler, bu hücrelere özgü olaylardır ve diğer hiçbir hücre tipinde gözlenmez. Spermioyogenez süreci oldukça senkronize ve entegredir, dolayısıyla bu süreç sırasında meydana gelen küçük sapmalar infertiliteye neden olabilir. Bu sapmaların ya da hataların nedeni henüz açıklanamamıştır (Fernandez, 2003).

Spermiyogenezin başında spermatid henüz basit bir hücre tipinde iken, spermiyumun temel hücre iskeletini oluşturmaya üzere pek çok değişim geçirir. Öncelikle, hücre çekirdeği kromatini daha sıkı yoğunlaşma (kondenzasyon) gösterir. Spermatidlerin farklılaşma sürecinde, yapısı diğer hücrelerden daha kompleks olan Golgi kompleksinin sisternaları yıkılarak akrozomal vezikülü oluştururlar; çekirdeğin apikaline göç ederek, çekirdeği üstten saran başlık gibi gelişen bir akrozom sistemini meydana getirirler. Bu yapının iç membranı, çekirdek membranı ile sıkı ilişkidir. Akrozom, salgı görevinde olan ve hücre çekirdeği ile yakın ilişkide bulunan dev lizozom gibi düşünülebilir.

Spermatidde bulunan iki sentriyol ise, gelişmekte olan akrozoma zıt yönde göç ederler ve bunlardan bir tanesi ışınsal bir düzenleme göstererek gelecekte oluşacak spermiyum kuyruğunun “aksonom” yapısını meydana getirirken, bu sentriyole 90°'lik açıyla konumlanan diğer sentriyol ise, kuyruğu çekirdeğe bağlayan bağlantı parçasını oluşturur. Kuyruğun aksonom parçası uzayarak tabanındaki halka (anulus) yapısına tutunur. Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, spermatidde yer alan mitokondriyonlar bölünürler; dış yoğun fibrillerle ilişkiye geçerek tipik çiftli sarmal (heliks) yapısını meydana getirirler. Spermiyogenez tamamlandığında, spermatogenik hücre serisindeki hücrelerin Sertoli hücreleri ile olan sitoplazmik uzantıları kırılır ve spermiyumlar seminifer tübül lümenine salınırlar. Spermiyogenez süreci Sertoli hücrelerinin desteği ile gerçekleşir; bunun için spermatid ile Sertoli arasında simbiyotik bir yaşam vardır.

2.4. Nükleustaki Değişimler: Nükleik Asitlerin, Proteinlerin Sentezi ve Haploid Gen Ekspresyonu

Mayoz bölünme sırasında, RNA ve protein sentezi maksimum düzeydedir ve erken spermatogenez sırasında oldukça azalarak, neredeyse sıfır seviyesine iner. Spermatogenez esnasında, hücre çekirdeği somatik hücreye benzeyen “nükleozom” yapısını, memeli spermiyumunun “nükleoprotamin” yapısındaki çekirdek yapısına dönüştürür. DNA sarmalı arasında bulunan histonlar önce geçiş proteinleri (transition proteinler) ile yer değiştirirler ve daha sonra bu geçiş proteinleri de yerlerini “arjininden zengin”, küçük bazik proteinlere, yani protaminlere bırakırlar (Ward,1991). Protaminlerin temel görevleri, fonksiyonel bir spermiyum için gerekli olan, hücre çekirdeğinin sıkıca paketlenmesi gibi görünmektedir. Spermiyumun DNA’sı, protaminlerle ilişkiye girerek çizgisel, yan yana olan kromatin ışınlarını oluşturunca, somatik hücre DNA’sı histonlar etrafında dolanır. Memeli spermiyum DNA’sı en sıkı şekilde paketlenmiş olan ökaryotik DNA olup mitotik kromozomların DNA’sından en az 6 kat daha fazla kondanse dir (Ward, 1991).

“Haploid gen ekspresyonu”, spermiyumun genotip yapısının ve fonksiyonunun aydınlanması için önemli bir konudur. Ancak, bir çok ileri düzeyde moleküler biyoloji tekniği kullanılarak yapılan çalışmalar olmasına rağmen, “spermiyumun haploid gen ekspresyonu” hala tartışmalıdır. Muhtemel bazı haploid gen ürünleri keşfedilmiştir ve günümüzde bunların gerçekten olup olmadığı ve fonksiyonları yoğun bir araştırma konusudur (Hecht, N.B., 1990, Tanaka, 1995). Haploid gen ekspresyonuna örnek teşkil edebilecek ve muhtemelen en iyi bilinen örnek “T locus fareidir”. Dominant T aleli homozigot olunca farede kısa kuyruk meydana getirirken, heterozigot olunca ölümcüldür. Bazı resessif T allellerinde ise kuyuksuz hayvanlar meydana gelir. Ayrıca t/t spermiyum fareler sperm üretmelerine rağmen, infertil dirler (Hecht, 1990).

Bu konuda birçok çalışma yapılmasına rağmen, Mendel kurallarına uymayan bu “genetik aktarım” ve “haploid genom” ile olan ilişkisi halâ bilinmemektedir. Genetik olarak birbirlerinden farklı olan spermatidler, hücrelerin senkronize bölünmesini sağlayan 1µm boyutundaki hücrelerarası köprülerle adeta bir “sinsisyum” halindedirler. Bu nedenle, bazı

spesifik mRNA'nın spermatidden spermatide bu köprüler aracılığıyla geçtiği ve dolayısıyla bütün "post mayotik" genlerin spermatidler arasında eşit olarak dağıtıldığı ileri sürülmektedir (Wrobel, 2005; , Miller, 1997). Bu bütün ürünlerin eşit olarak dağıtıldığı ya da paylaşıldığı anlamına gelmez, ancak ileri araştırma isteyen ilginç bir konudur.

Çeşitli testiküler belirteç (marker) proteinlerinin üretim (ekspresyon) zamanı ve varlıkları biyokimyasal çalışmalarla ortaya konulmuştur. Ancak, erkek germ hücre olgunlaşması hakkındaki bilgiler henüz oldukça yetersiz ve sınırlı olup, sürekli bir yenilenme halindedir (Ivell, 1999).

2.5. Deney Modellerinde ve İnsanda Spermatogenik Siklus

Birçok hayvan türünde, belli başlı spermatogenik hücreler sadece belli başlı diğer hücreler ile ilişki halindedir. Örneğin; farelerde her bir spermatogonyum bir diğeri ile aynı anda gelişir, dolayısıyla herhangi bir zaman aralığında seminifer tübül kesiti incelenirse, spermatogonyumdan spermiyuma kadar tüm bir hücre serisi bir arada görülebilir. Bu hücre ilişkisine spermatogenik siklus denir. Gelişmeye başlayan her bir spermatogonyumdan potansiyel olarak 64 spermiyum üretilebilir. İnsanda her bir saniyede 20 adet spermatogonyum spermatogenik sürece başlar. Spermatogenik siklus, spermatogonyumdan spermiyumun atılmasına dek dört ya da beş kez tekrarlanır . Türlerde her bir spermatogenik siklusun süresi sabittir ve 8 ile 16 gün arasında değişir (farelerde 9 gün, insanda 16 gün). İnsanlarda tüm evre 64 gündür, artısı ya da eksisi olabilir.

Yukarıda tanımlanan türdeki seminifer epitel modeli birçok hayvan türünde mevcut iken, insanda bu model bu kadar açık değildir. İnsan seminifer tübül kesitlerinde, birden fazla değişik spermatogenik siklus seviyesinde olan hücre varlığı ya da bazı germ hücrelerinin birbirleriyle olan ilişkisinin varlığı ya da yokluğu gibi birçok düzensizlikler göze çarpar. Bu da, insanda gerçekleşen spermatogenezin daha düzensiz ya da en azından daha az koordine olduğu yönünde varsayımlara yol açar.

1984 yılında, Schulze ve arkadaşları, insan seminifer epitelinin düzeni hakkında bazı kanıtlar ortaya koymuşlardır. Spermatogenezin basamaklarının, seminifer tübülün uzun eksenine heliks şeklinde bir uyum gösterdiğini söylemişlerdir. Yani seminifer epitelin organizasyonu, biyolojide büyüme ve farklılaşmanın temel prensibi olan “spiral geometrisi” plânına uyum gösterir. Dolayısıyla, insanlardaki seminifer epitelin yapısı, düzensiz ya da kaotik değildir, aksine kompleks bir organizasyon gösterir. Bu kompleks düzenlenmeyi kontrol eden mekanizmalar tam olarak bilinmese de, parakrin ve otokrin mekanizmaların rolü olduğu tahmin edilmektedir.

2.6. Spermatogenezin Endokrin ve Parakrin Kontrolü

Hipofiz gonadotropinlerinden olan, folikül stimulan hormon (FSH) ve Luteinizan hormon (LH), spermatogenezin önemli düzenleyicileridir. LH, seminifer tübüllerin arasında yer alan intersitisyel dokudaki Leydig hücrelerini uyararak, androjen üretimini artırır ve bu androjenin primer etki alanı Sertoli hücreleridir. FSH ise, germinal epitel ve Sertoli hücreleri üzerine etki yapar; androjen üretimine sadece küçük oranda direkt etkiye sahiptir. Kaliteli ve tamamlanmış bir spermatogenez için her iki hormonun kontrolü de gereklidir. Kontrol mekanizmasını genelleyebilmek, türler arasındaki belirgin farklılıklardan dolayı, oldukça zordur. Ayrıca, birçok araştırma deney hayvanlarında yapılmasına karşın insanda yapılabilecek araştırma sınırlıdır. Bütün bunlardan önemlisi, testis biyokimyası ve fizyolojisi homojen bir yapı olarak düşünülemez. Belki de, spermatogenezin endokrin / parakrin kontrolünü anlamamızın daha geçekçi bir yolu, tübülün her bir parçasını bir “mikrokosmos” olarak düşünmek olmalıdır (De Kretser , 1990).

Seminifer epitelin, eksojen FSH ve LH uyarısına cevabı lokal faktörler tarafından düzenlenir. Endokrin ve parakrin mekanizmalar arasındaki ilişki testisin fonksiyonlarını belirler. Ancak, bu ilişkinin doğası ve mekanizmaları bu konuda bir çok çalışma yapılmasına rağmen hala tartışmalıdır. Çok sayıda potansiyel parakrin faktörler keşfedilmesine rağmen, bu faktörlerin in vivo fizyolojik etkilerine dair direkt deliller oldukça azdır (De Kretser , 1990 ; Skinner, 1991)

Testisin çeşitli hücre tiplerinin fonksiyonları birbirleri ile bağlantılıdır örneğin; Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron, peritübüler hücelere ve Sertoli hücreleri üzerine etki yapar; böylece hem germ hücrelerinin gelişimine önayak olur, hem de damar yapısında bir etki meydana getirir. Dolayısıyla, testosteron testis dokusunda endokrin bir etkiden çok parakrin bir ürün olarak görev yapar (Sharpe, 1990)

Germ hücresi ile Sertoli hücresi arasındaki ilişkiyi düzenleyen mekanizmalar henüz tam anlamıyla açıklanamamış olsa da, pakiten evresindeki spermatositler, Sertoli hücrelerini stimule ederek “androjen bağlayıcı protein” üretimini ve “adenilat siklaz” aktivitesini stimule ederler. Yuvarlak spermatidlerin hiçbir uyarıcı etkileri olmadığından dolayı bu etkiler hücreye özeldir . Sertoli hücreleri ayrıca, testis içi düzenleyiciler olan “transferin” ve “insülin benzeri büyüme faktörünü” de üretirler. Sertoli hücreleri tarafından üretilen parakrin düzenleyicilerin üretimi ve etkileri, seminifer epitel siklusu tarafından kontrol altındadır. Buna örnek olarak, Sertoli hücrelerinin “transferin” üretimi verilebilir (Sharpe, 1992). Sonuç olarak, testiküler germ hücrelerinin büyümesi ve farklılaşması, somatik ve germinal elemanlar arasındaki bir seri kompleks ilişkiyi içerir. Bu ilişkiler endokrin, parakrin ve otokrindir. Bu mekanizmalar, testisin normal fonksiyonu için ince bir denge sağlarlar (Sharpe, 1991).

2.7. Spermatogenezin Verimliliği

Günümüze dek yapılan çalışmalar bütün türlerin ortak bir özelliğini ortaya koyar; spermatogenez esnasında germ hücrelerinin büyük bir çoğunluğu gelişmelerini tamamlayamazlar. Dolayısıyla, gelişmekte olan germ hücrelerinin büyük bir kısmının dejenerasyonu fizyolojik bir fenomendir (Obregon, 1997).Üç kritik aşamada hücrelerin kaybı söz konusudur; spermatogoniyal gelişme, mayotik bölünmeler ve spermiyogenez. Sıçanlarda, A1 spermatogoniyumlardan teorik olarak üretilmesi gereken preleptoten spermatositlerin sadece %25’inin üretimi meydana gelir. İnsanlarda, daha gelişmiş teknikler kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, mayoz sırasında potansiyel sperm üretiminin %50’si kaybedildiği belirtilmiştir . Spermiyogenez sırasında ise insanlarda, farelerde, sıçanlarda ve sığırlarda çok az sayıda hücre kaybı söz konusudur. Dolayısıyla, spermatogenez çok verimli

bir hücre üretimi süreci değildir ve insanlarda bu verim diğer memelilere göre (sıçanlar, primatlar) sadece %25 dolaylarındadır .

Erkeklerde, yaşa bağlı olarak günlük sperm üretiminde bir azalma söz konusudur ve bu azalma Sertoli hücrelerinin kaybı ile ilişkilidir . Bu durum daha çok mayoz bölünmenin profaz aşamasındaki germ hücrelerinin dejenerasyonundan yani primer spermatosit kaybından kaynaklandığı ve aynı zamanda Leydig hücrelerinin, seminifer tübüller arasındaki diğer hücrelerin, miyoid hücrelerin ve Sertoli hücrelerinin de sayıları azalır .

2.8. Spermiumun Görevi Fertilizasyon

İnsan gelişimi bir oositin fertilize olması ile başlar. Fertilizasyon birbiri ile ilişkili karmaşık moleküler olaylar dizisidir(Acosta, 1994) sperm ile oositin teması ile başlar ve tek hücreli embriyo olan zigotun birinci mitoz bölünmesinin metafaz plağında anne-baba kromozomlarının bir araya gelmesi ile son bulur. Bu olaylar sırasında herhangi bir aşamada bozukluk zigotun ölmesine neden olabilir .Gametlerin yüzeyindeki karbonhidrat bağlayıcı proteinler, fertilizasyon sırasında gametlerin birbirini tanıyıp birleşmesinde rol oynar . İnsanlarda fertilizasyon yaklaşık 24 saat sürer (Obregon, 2004).

Fertilizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan aşamalar şu şekilde özetlenebilir:

a. Spermin oositin zona pellusidasını çevreleyen korona radiatayı geçmesi

Ovositin zona pellusidasını çevreleyen korona radiatadaki foliküler hücrelerin birbirinden ayrılması sadece spermin akrozomundan salınan hyaluronidaz enziminin aktivitesi ile olmaz (Carlson, 1994) , tubal mukozal enzimler de hayaluronidaza yardım eder. Korona radiatanın delinmesinde spermin kuyruk hareketi önemli rol oynar.

b. Oosit çevresindeki zona pellusidanın delinmesi

Zona pellusidanın sperm tarafından delinmesi fertilizasyon başlangıcı için önemli bir aşamadır. Akrozomdan salınan enzimler zona pellusidadan geçişte de önemlidir. Bir sperm zona pellusidayı geçerse zona reaksiyonu denilen zona pellusidanın özelliklerinde değişiklikler gerçekleşir ve bu şekilsiz (amorf) tabaka diğer spermleri geçirmez bir hale dönüşür. Buradaki ekstrasellüler glikoprotein örtünün içeriği fertilizasyondan sonra değişir . Zona reaksiyonunun, oosit sitoplazmasında membrana yakın korteks granüllerinden salınan lizozomal enzimlerin etkisi ile olduğu düşünülmektedir. Perivitellin boşluğa salınan granüller oosit plazma membranında değişiklikler yapar ve diğer spermlerin geçmesine engel olur .

c. Oosit ve spermin plazma membranlarının birleşmesi

Oosit ve spermin plazma membranları birleşir, birleşme noktasından yırtılma olur, spermin başve kuyruğu oosit sitoplazmasına girer. Ancak sperme ait plazma zarı dışarıda kalır.

d. Oositin ikinci mayotik bölünmeyi tamamlaması ve dişi pronükleusun oluşması

Sperm girdikten sonra, ikinci mayoz bölünmenin metafazında bekleyen oosit bölünmesini tamamlar. Olgun bir oosit ve ikinci polar cisimcik oluşur. Anneden gelen kromozomların dekondenzasyonu (gevşeyip açılması) ile olgun oositin nükleusu, dişi pronükleusu oluşturur.

e. Erkek pronükleusun oluşumu

Oosit sitoplazması içerisinde sperm çekirdeği genişleyerek erkek pronükleusu oluşturur ve spermin kuyruğu dejenere olur. Morfolojik olarak erkek ve dişi pronükleuslar ayırt edilemezler. Pronükleusların büyümesi sırasında DNA replikasyonu olur. DNA1-n (haploid) 2c (2 kromatid) içerir.

f. Pronükleusların zarlarının parçalanması, kromozomların kalınlaşması ve mitotik hücre bölünmesi için düzenlenme

Döllenmiş oosit ya da zigot tek hücreli bir embriyodur. Her bir pronükleustaki 23 kromozomun birleşmesi ile 46 kromozomlu bir zigot oluşur.

2.9. Sperm Ultrastrüktürü ve Programlanmış Görevleri

Spermiyum, kompleks fonksiyonlarını yerine getirebilmek için oldukça özelleşmiş bir morfolojiye sahiptir. Temel olarak iki kısımdan oluşur; enerji üretilmesinden ve hareketlilikten sorumlu olan kuyruk ile DNA'yı içeren ve oositin zona pellusidasını tanıyarak sperm-ovosit birleşmesini sağlayan baş bölgesi. Bu her iki temel bölge de kendi içlerinde fonksiyonlarına göre alt bölgelere ayrılmışlardır.

2.9.1. Kuyruk

Spermiyumun kuyruk bölgesi, enerji üretim bölgesi olup, sperm hareketinden sorumludur. Fertilizasyonun gerçekleşmesi için hareketlilik gerekli bir özelliktir. Spermiyum, ilk olarak ejakulasyon sırasında hareketli hale gelir ve hareketliliğe postejakulasyonun erken dönemlerinden başlayıp, servikal mukusu geçmek, utero-tubal birleşimi geçmek ve oosite ulaşmak için ihtiyaç duyar.

İnsan spermiyumu kuyruğu dört ana bölgeye ayrılabilir; kısa bir bağlantı parçası, orta parça, esas parça ve son (terminal) parça. Her bir bölgenin fonksiyonuna bağlı olarak farklı yapısı vardır. Bu dört bölge, “aksonom” ve “dış yoğun fibriller” denilen iki diğer yapı ile birlikte seyrederek. Bu yapılar dört parçanın bazılarında ortak olduklarından dolayı ayrı yapılar olarak değerlendirilirler.

2.9.1.1. Aksonom

Aksonom ya da aksiyel filaman, spermiyumun kuyruğunun dört parçasında da mevcuttur ve kuyruğun motor parçasını oluşturur. Aksonom yapısı, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan silya ve flagellum yapısına benzer; klasik 9+2 yapısını oluşturan iki adet merkezi mikrotübül ve eşit aralıklarla dizilmiş dokuz adet mikrotübül çiftinden oluşur. Bu benzerliğe dayanarak, spermiyumun hareketini anlamak için yapılan çalışmalar daha düşük omurgalıların kuyruk yapısını inceleyerek yapılmıştır.

Dokuz adet periferel mikrotübül çifti saat yönünde birden dokuza kadar numaralanır. Bir numaralı çift, merkezdeki iki mikrotübüle dik olarak yerleşen tek tübüldür. Her bir mikrotübül çifti A subünitesi ve serbest uçları ile A subünitesine tutunan B subünitesinden oluşur. B subünitesi enine kesitte C şeklinde görülür. Bu mikrotübüllerin esas yapı elemanı a ve b olmak üzere iki formdan oluşan, tübülindir (Van Blerkom, 1993) Tübülün molekülleri, protofilamentleri oluşturmak için sıraya dizilirler ve daha sonra yan yana gelerek mikrotübül duvarını oluştururlar. A tübülü 13, B tübülü ise 10 protofilamentten oluşur. Bu iki form arasındaki elektroforetik hareketlilik, aminoasit kompozisyonu ve fosforilasyon bölgeleri farkı, hem mikrotübüllerin kendi içinde, hem de aralarında yüksek düzeyde heterojeniteye neden olur. Komşu mikrotübülün A tübülünden B tübülüne doğru bir çift uzantı (kollar) vardır. Bu kollar, 24 nm'lik aralıklarla dizilirler ve pozisyonlarına göre "iç" ya da "dış" adını alırlar. Kuyruk hareketi sırasında bu kollar önemli role sahiptirler; mitokondriyonlarda oluşan kimyasal enerjiyi kinetik enerjiye çevirerek hareketi sağlarlar. Bu kolların temel molekülü Ca^{+2} Mg^{+} bağımlı ATPaz izomer proteini olan "dinein"dir. Dinein kolları, komşu tübüllerin birbirine göreceli olarak kaymalarını sağlar ve aynı kas kasılmasında gözlenen kayan filamanlara benzer bir mekanizma ile kuyruk hareketi meydana gelir (Van Blerkom, 1993).

Dokuz adet periferel mikrotübül çifti birbirlerine "neksin" proteininden oluşan bağlarla tutunurlar. Neksin bağları mikrotübül çiftlerin boyları boyunca 96 nm'lik aralıklarla dizilmiş olup "aksonom" yapısının simetrisini korurlar. Merkezde yer alan iki mikrotübül birbirine düzenli aralıklarla dizili bağlantılarla bağlanırlar ve bu bağlantı noktalarında mikrotübüllere tutunan bir çift spiral fibrille çevrenirler. Bu spiral fibriller merkezi kılıf denen yapıyı

oluştururlar. Bunlardan periferdeki her mikrotübül çiftinin A subünitesine ulaşan bir seri ışımsal uzantılar uzanır. Merkezi mikrotübül çiftinin ve bununla ilişkide olan merkezi kılıf ve ışımsal uzantıların fonksiyonları henüz net olarak bilinmemektedir; ancak kuyruk hareketinde rolleri olduğu ileri sürülmüştür . Bu duruma göre merkezi kılıfın iki fibrili zıt periferel mikrotübül çiftine uzanan ışımsal uzantıları destekler ve merkezi kompleks bir şekilde tetiklenerek periferel çiftlerin “asenkrone” (aynı anda olmayan) kaymalarını sağlar, böylece kuyruk hareketi oluşur. Fakat böyle bir asenkrone aktivasyonun mekanizması henüz açık değildir .

Sentrozom , çok sayıda düzenleyici proteinin bir arada bulunmasıyla oluşan memeli hücre yapısal bir bileşendir. Sentrozom, sentriol adı verilen ve radial olarak çevresini saran mikrotübüllerden oluşmuşlardır, bununla beraber hücre bölünmesinde anahtar rol oynamaktadırlar. Sperm sentrozomu kuyruğun midpiece bölgesinde dik olarak konumlanmış iki adet sentriyolden oluşur.

Sentrozom insanlarda babadan gelen bir kalıtsal özelliktir. Oositleri sentrozom taşımazken spermlerde iki tane bulunur. ICSI yapılırken, sperm oosite enjekte edilirken sperm kuyruğuda oosit oplazmasına dahil olur. Sperm baş kısmı daha yoğun hale gelmeden sperm sentrioler bölgesi yıldız şeklindedir, buradaki yıldızsı ağ yapısı dişi pronükleusu erkek pronükleusa doğru çeker. Pronükleer safhada sentrioller duplike olur, ve singamide birbirlerinin zıt kutuplarına çekilirler. Sentrozomun fertilizasyon ve embriyo gelişimi için çok önemlidir. Buradaki önemli görev sperm sentrozom proteinlerinin dişi ve erkek pronükleusunun organizasyonunu gerçekleştirmesidir. Bu yüzden sperm sentriol yapısındaki bir bozukluk, düzensizlik vs. direkt olarak fertilizasyon ve devamında süre gelen embriyo gelişimine zarar verecektir.

Daha önceki çalışmalar gösterdiği sentriol fertilizasyondan sonraki ilk mitoz hücre bölünmesini kontrol etmektedirler. Sentrozom yapısındaki herhangi bir eksiklik fertilizasyon ve embriyonik gelişimi etkiler. Bunun yanında sentrozom sperm kuyruğunda lokalize olmuştur ve muhtemeldirki bu durum sperm hareketini etkileyecektir.

ICSI ,erkek infertilitesi vakalarında çok önemli bir tedavi yöntemidir, klinik olarak çok sayıda klinik olgunun ortadan kaldırılmasına imkan sağlamaktadır (Palermo ve ark.,1992; Rawe ve ark., 2003). Bununla beraber spermin oosit plazması içerisine girdikten sonraki gelişimlerin düzenlenmesi hakkındaki moleküler bilgiler hakkında sınırlı bilgi vardır ve sperm sentrozomal fonksiyonel görevinin fertilizasyon üzerinde çok önemli bir görev taşır. Sperm oosit plazması içerisine girdikten sonra, sentrozom mikrotübül organizasyon merkezi (MTOC), sayesinde mikrotübül dairesel dizilimi sağlayan içsel yapılar lokalize olur. Bu organizasyon, dişi ve erkek pronükleusların organizasyonunu ve hareketi sağlarlar(Shatten, 1994; Simerly, 1995). Bu verilerle anlaşılıyor ki sentrozom insan fertilizasyonunda önemli ama zor bir görevi üstlenmiştir.

Yapılan paralel çalışmalarda, sperm sentrozomal fonksiyonun anlaşılması için, farklı türlerde ICSI sistemleri hazırlanmış, insan spermi, tavşan, sığır oositlere enjekte edilmiştir (Terada ve ark., 2000, 2004; Nakamura ve ark., 2001, 2002). Bu sistemlerde, fertilizasyon sırasında sentrozomal kaynağı spermdir, buralardaki sentrozom mikrotübül organizasyonu fertilizasyondaki yapıya benzerlik gösterir (Terada , 2004).

Fibröz kılıf displazisi (DFS), teratospermi vakalarında nadir görülür ve infertilite nedenidir. DFS sperm örneklerinde, kuyruğun midpiece bölgesindeki hasarından dolayı spermelerde hareketsizlik gözlenir (Chemes, 1987; 1998), bunun yanında sentrozomal bozuklukta bu hareketsizlikten sorumludur. Bu iki anormallik infertiliteye neden olur (Rawe, 2002). Bu spermle yapılan ICSI işlemimde birçok hastada fertilizasyon ve embriyo gelişimleri kayıpları gözlenir (Chemes ve Rawe, 2003).

2.9.1.2. Bağlantı Parçası

Bağlantı parçası, kuyruk ile sperm başı arasında 0.5 µm uzunluğunda kısa bir parçadır. Ana parçaları; “kapitulum (başçık)” denilen sıkı, kubbe şeklinde bir fibröz yapı ile segmentli kolonlardır. Kafa-kuyruk bağlantısı, kapitulum ve nükleusun kuyruğa bakan yüzeyinde uzanan bazal plak arasında yer alan çeşitli proteinöz filamanlar tarafından sağlanır. Proksimalde yer alan iki parçalı kolon yapısı kaynaşarak, kapitulumla gömülen iki büyük ve beş küçük kolonları meydana getirirken, distaldeki dokuz kolon üst üste gelerek orta parçadaki dış yoğun fibrillere tutunurlar (Curry ,1995).

Bu kolonların üzerinde, birbirleriyle 6,5 nm aralıklarla dizili enine çizgilenmeler vardır. Segmentli kolonların fonksiyonu henüz net olarak bilinmemekle birlikte, bunların adeta bir eklem gibi bir arada olduğu, dolayısıyla spermin boyun bükme hareketlerine kapitulum-bazal plâk bağlantısına zarar vermeden esneklik sağladığı düşünülmektedir (Curry ,1995).

Kapitulum, kuyruğun uzun eksenine dik olarak uzanan proksimal sentriyolu de içerir. Spermiyogenezin son basamaklarında distal sentriyol gerilediğinden, proksimal sentriyol geriye kalan bir çift sentriyoldür. Sentriyoller, spermiyogenez sırasında aksonom yapısının oluşmasında rol alırlar, ancak aksonomun doğru fonksiyonu için gerekli olmadıkları bilinmektedir . Sentriyollerin yapısı aksonom yapısına benzerlik gösterir ancak mikrotübüllerin merkezi mikrotübül çiftini içermez ve aksonomdaki tübüler çiftlerinin yerine periferalde yerleşik üçlü yapılardan oluşan mikrotübüllere sahiptirler (Curry ,1995).

2.9.1.3. Dış Yoğun Fibriller

Her bir mikrotübül çifti, bir dış yoğun fibril ile ilişkidir ve bunlar parçalı kolonların distalinden başlayarak esas parça kısmında sonlanırlar. Enine kesitlerde, dış yoğun fibriller gözyaşı damlası şeklinde izlenirler ve yuvarlak, geniş kısımları dışta, daralan kısımları ise aksonom tarafındadır. Her biri içte medülla ve dista onu saran korteksten oluşur. Korteks kesintilidir; yani sadece dış kısımda mevcuttur ve içte yoktur. Medülla oldukça kararlı bir yapıdır; ancak, korteks az stabil olup Sodyum Dödesil Sülfat (SDS) uygulaması ile çözünür.

Her bir dış yoğun fibril farklı uzunluğa sahiptir; 3 ve 8 nolu fibriller (6 µm), 2,4 ve 7 nolu fibriller (17-21 µm) ve 1,5,6,9 nolu fibriller (31-35 µm) uzunluğundadırlar .

Bu fibriller, kasılabilir proteinler içermezler ancak ATPaz ya da Ca²⁺ bağlayıcı rolleri nedeniyle hareketliliğin kontrolünde bir rolleri olabileceği, ayrıca, kuyruğun sert yapısını destekleyerek asimetrik dizilimlerinin kuyruğun hareketlerine izin verdiği düşünülmektedir .

2.9.1.4. Orta Parça

Kuyruğun 3,5 µm uzunluktaki orta parçası, bağlantı parçasının en distalindeki “anulus” hizasına kadar uzanır. Anulus orta parça ve esas parça arasındaki bağlantıyı işaretleyen çevresel banttir. Orta parçanın en önemli ayırıcı özelliği, çeşitli sayıda sarmal dizimli mitokondriyonlara sahip olmasıdır. İnsan sperminin mitokondriyonları düzensiz aralıklarla diziliyken, diğer türlerde bu dizilim yüksek bir organizasyon gösterir . Sperm mitokondrisinin dış membranı oldukça stabil bir yapı gösterirken, iç membran yapısı diğer hücrelerdekilere benzer . Bunun nedeni disülfid bağlarının varlığı olabilir. Bu tür bir dış membranın fonksiyonunun kuyruk hareketi sırasındaki gerilmelere dayanıklılık olabileceği düşünülmektedir (Curry , 1995).

2.9.1.5. Esas Parça

Adından da anlaşılacağı gibi, esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır (55 µm) ve anulustan terminal parçanın proksimaline kadar uzanır. Karakteristik özelliği, aksonom ve dış yoğun fibrilleri saran sitoiskelet yapısındaki fibröz kılıf içermesidir. Bu kılıf, merkezi mikrotübül çiftinin düzleminde bulunan 2 periferel, longitudinal kolona sahiptir ve bu kolonlar sıkı paketlenmiş filamanlar olan kurdele benzeri yapılarla birbirlerine bağlanırlar. Fibröz kılıfın yapısal proteinleri arasındaki disülfid bağları bütün yapıyı oldukça stabil bir hale getirirler. Görevlerinin aynı dış yoğun fibrillerin de olduğu gibi elastik bir korse yapısını sağlayarak kuyruk hareketini kontrol etmek olduğu düşünülmektedir (Curry , 1995).

2.9.1.6. Terminal Parça

Fibröz kılıfın ilerisinde kuyruğun 3 µm uzunluğundaki terminal parçası yer alır. Bu parçada aksonomun mikrotübüler elemanları sonlanır. Önce dinein kolları yok olur ve A subünitesi bugulu bir şekilde izlenir. Ortada yer alan mikrotübül çifti yok olur ve dış mikrotübül çiftlerinden iki tanesi merkeze hareket ederek, 7 adet rastgele dağılmış mikrotübül çifti tarafından sarılır. Çiftler ayrılır ve B tübüleri yok olarak, sadece 1 mikrotübülden oluşan ve yalnızca hücre membranı ile çevrelenmiş yapıyı oluşturur. Dolayısıyla, kuyruğun ucuna doğru gidildikçe kalan tübüllerin mükemmel bir şekilde sonlandırılması gerçekleşir.

2.9.2. Baş

Sperm başının fonksiyonları; DNA'yı içermesi, koruması ve oositin döllenmesi (fertilizasyon) sırasında bu içeriğini oosite aktarmasıdır. Bunu gerçekleştirmek için; a) DNA erkek pronükleusunun oluşmasına kadar stabil bir formda tutulmalıdır, b) spermiyum oositin etrafındaki tabakaları geçmeli ve oosite ulaşmalıdır, c) sperm ve oosit tanınması için türe özgü bir mekanizma olmalıdır, d) oosit membranı ile füzyon yeteneğinde olmalıdır. Sperm başı bu fonksiyonlarını gerçekleştirmek için az sayıda organelle sahiptir, bu organeller nükleus dışında baş bölgesinde bulunan akrozom ve postakrozomal kılıftır. Sperm başının temel organizasyonu bütün memeli spermelerinde ortaktır ancak hem nükleusun hem de akrozomun dolayısıyla sperm başının şekli ve boyutu oldukça farklı ve türe özgüdür. İnsan spermiyumunda başın şekli pleomorfik olarak tanımlanır ve bu tanım çok heterojen tipteki sperm şeklini ifade eder; dolayısıyla 'normal' şekil ve boyut tanımını oldukça güçleştirir. Bununla birlikte, normal sperm başının yaklaşık 4–5 µm uzunluğunda ve yaklaşık 3 µm genişliğinde olduğu kabul edilir.

2.9.2.1. Akrozom

Akrozom spermiyum nükleusunun ön kısmını çevreleyen bir takke benzeri membrana bağlı veziküldür. İnsan spermiyumunda akrozom göreceli olarak küçüktür ve nükleusun yaklaşık üçte ikisini kaplar ancak ön kenarının ötesine uzanmaz. Dış akrozomal membran hemen hücre membranı altında uzanır ve akrozom şapkasının arka kenarlarında nükleer kılıfın üzerine uzanan iç akrozomal membran ile devam eder. İki membran birbirine paralel uzanır ve araları dar bir boşluk olan akrozomal matriks ile doludur. Bu matriks çok sayıda çeşitli hidrolitik enzimleri içerir. Bunlardan en önemli iki tanesi ve en iyi tanımlananları “hyalüronidaz” ve “proakrozin” denilen inaktif zimojen formunda bulunan tripsin benzeri proteinaz “akrozin”dir . Bu tür zimojenlerin inaktif formları akrozomal matriksteki özgün (spesifik) inhibitörlerin (baskılayıcıların) kompleks oluşturmasıyla uyarılabilir. Akrozomal matriksteki diğer enzimler ise asit fosfataz, fosfolipazlar, Nasetilglikozaminidaz ve kollajenaz’dır. Bazı hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda bu çeşitli enzimlerin akrozomda rastgele dağılmadıkları aksine paketlenmiş bir halde buldukları dolayısıyla sıralı bir aktivasyon mekanizmasıyla salındıkları hakkında kanıtlar vardır (Morales, 2004). Bu enzimler “akrozom reaksiyonu” denilen temel bir egzositotik bir olayla salınırlar.

Spermiyumun belirgin bir özelliği, ekvatoryal bölge denilen akrozomal kılıfın arka sınırında yer alan stabil bölgenin varlığıdır. Ön akrozomun enzim içeren matriks yapısı bu bölgede mevcut değildir. İnsan spermiyumunda ekvatoryal bölge aynı zamanda vimentin birikimine sahip bir alandır .Bu özellik sitoskeletal elemanların varlığı ile güçlenen oldukça stabil bir membran yapısını akla getirir. Akrozomal reaksiyonun ardından ekvatoryal bölge bozulmadan kalır. Ön akrozom ve ekvatoryal bölge arasındaki sınırda dış akrozomal membran hücre mebranı ile birleşerek akrozomal sapka kaybının ardından hücre bütünlüğünü korur. Ekvatoryal bölgenin üzerini örten plazma membranı bölgesi sperm-ovosit tanınmasının ve füzyonunun gerçekleştiği alandır. Bu nedenle akrozomun ekvatoryal bölgesi bu kritik membran alanında özellikle zona pellusida penetrasyonu sırasında sıkıca stabilize edilmiştir (Virtanen, 1984).

2.9.2.1.1. Ön Akrozomal Bölge

Sperm başının ön bölgesini çevreleyen plazma membranı iki önemli işlemde yer alır; zona pellusidayı tanıma ve bağlanma ile eksositotik akrozom reaksiyonu sırasında alttaki dış akrozomal membranla birleşme. Bu fonksiyonların her ikisi de kapasitasyonla birlikte meydana gelen membran yapısının belirgin özelliklerin değişmesiyle ilişkili olabilir. Zonaya bağlanma muhtemelen bu bölgede yoğun olan membran glikokaliksinde bulunan kompleks glikokonjugatlar aracılığı ile gerçekleşir. Bununla birlikte lektinler, spesifik karbonhidrat kısımlarını tanımları nedeniyle hücre yüzey proteinlerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılırlar (Baker, 2004).

Lektin bağlanma şekillerine bakılarak ortaya konan ejakülasyon sırasında oluşturulan glikokaliks kompozisyonu, yeniden bir organizasyona gider ve zona pellusidaya bağlanmadan önce kapasitasyon sırasında kaybolur (Baker, 2004). Membranın potansiyel füzogenik doğası, membran akiskanlığındaki değişikliklerle, intramembranöz partiküllerin kısmi kaybı ile membran lipid kompozisyonundaki değişimlerle anlaşılır. Akrozomal reaksiyonun başlaması ile plazma membranının bu bölgesinin destabilizasyonu ve dış akrozomal membran ile birleşmesi sağlanır. Akrozom reaksiyonunun başlamasından sonraki ilk gözlemlenebilir değişiklik, matriksin dekondezasyonu ve sismesidir. Bunun sonucu olarak dış akrozomal membran dalga benzeri bir şekil alır.

Bu olayı, plazma membranı ve dış akrozomal membran arasında noktasal birleşme bölgelerinin meydana gelmesi izler. Bu ilk birleşme, plazma membranı ve dış akrozomal membranda bir seri deliklerin meydana gelmesini sağlar. İn vitro koşullarda, yaklaşık yirmi saniye sonra delinme (fenestrasyon) tamamlanır ve noktasal birleşme bölgeleri bir araya gelerek akrozom yüzeyinin karışık veziküllerle kaplanmasıyla sonuçlanır. Bu karışık veziküller hem plazma membranı hem de dış akrozomal membran parçalarından oluşurlar; bu veziküllere “hibrid” veziküller de denir (Yudin, 1988). Bu veziküller çoğunlukla küresel şekilli ve çeşitli boyutlardadırlar. Bu aşamada akrozomal matriks göreceli olarak dağılmamış olmasına rağmen artık membranlarla sınırlı değildir. Üç dakika içinde matriks tamamen

kaybolur, membran vezikülleri halâ varlıklarını sürdürürler ve zamanla kademeli dağılıma giderler. Bu noktada iç akrozomal membran spermium basının ön bölgesinin sınırlayıcı membranı haline gelir .

Dolayısıyla, dış akrozomal membranın stabil bir yapıda olmaması sperm plazma membranı ile birleşmesi için gerekliken, iç akrozomal membranın kararlı yapısı (stabilitesi) özellikle hücrenin zona pellusidayı geçerken maruz kalabileceği streslere karşı sınırlayıcı bir hücre membranı olması açısından önemlidir.

2.9.2.1.2. Ekvatoryal Bölge

Ekvatoryal bölge, ovosit ile sperm membranlarının birleşmesinin gerçekleştiği yegâne bölgedir. Bununla birlikte, sperm-ovosit birleşmesi ancak akrosomal reaksiyon tamamlandıktan sonra gerçekleşebilir (Yanagimachi, 1988). Bu durum akrosomal reaksiyon sırasında ekvatoryal bölgede önemli fizyolojik membran değişikliklerinin görüldüğü fikrini doğrular, fakat bu fikri destekleyecek önemli bir yapısal değişikliğin membranda olmadığı anlaşılmıştır. Ekvatoryal bölgedeki membran büyük oranda stabildir ve muhtemelen ön ve arka postakrozomal membran bölgeleri arasındaki intramembranöz partikül geçişini önleyen bir bariyer görevi yapar .

2.9.2.1.3. Perinükleer Materyal

Perinükleer materyal akrozomun hemen altında onu nükleustan ayıran ince bir tabakadır. Bu tabaka disülfid köprüleri ile sağlamlaştırılmış nükleusu örten devamlı bir tabaka oluşturur. Akrozom ve nükleus arasında 'çimento benzeri' bir madde olarak rol alır. Akrozomun arka kısmında bu madde postakrozomal kılıfı oluşturur. Yapısı kompleks olmasına rağmen postakrozomal kılıfın fonksiyonu hakkında belirgin bir bilgi henüz bilinmemektedir.

2.9.2.2. Nükleus (Çekirdek)

Sperm nükleusunun kromatini, DNA kompleksi ile arjinin ve sisteinden zengin olan ve protaminler denilen bazik proteinleri içerir. Somatik hücre nükleuslarının histonlarından farklı olarak, sperm nükleoproteinleri türler arasında belirgin farklılıklar gösterirler. Birçok memeli türünde sadece bir adet predominant protamin mevcutken insan ve fare spermelerinde iki adettir. Bu protaminlerin en önemli özelliği DNA'daki fosfat-ester çatisının yükünü nötralize ederek kromatinin çok sıkı paketlenmesini sağlamaktır. Protaminlerin yüksek orandaki sistein içeriği serbest tiyoller arasındaki disülfid çapraz köprülerinin olusmasına izin verir.

Nükleusa oldukça stabil "keratinoid" karakterini veren bu çapraz bağlanma spermiyogenezin geç basamaklarında baslar ancak esasen epididimisten geçis sırasında tamamlanır. Nükleusun bu yüksek stabilitesi ve bu stabiliteyi bozmak için gerekli olan ciddi uygulamalar kromatin paketlenmesinin düzenlenmesinin anlaşılmasını zorlaştırır. Nükleus haploid sayıda kromozom sayısına sahiptir ve her bir kromozom çiftinin bir tanesini içerir. DNA tamamen inaktiftir ve sperm ovositin içine girmesinden sonra protaminlerin yer degistirmesine kadar replike olmaz.

Nükleusun sekli, sperm genotipi tarafından belirlenen ve birçok türde tek tip (uniform) olan türe özgü karakterdedir. İnsan spermatozoası ise bu kuralın istisnasını olusturur. Çünkü uzayarak incelenden, kısa yuvarlak nükleuslara kadar degisen çeşitlilikler gösterir. Bununla birlikte, nükleus seklinin degiskenligi morfolojik olarak "normal" yani oval sekilli insan sperm çekirdegini tanımlamayı zorlaştırır. Nükleusun seklindeki bu degiskenlik kromatin kondanzasyonundaki degiskenlige bağlanabilir. Çünkü birçok nükleusta çeşitli vakuoller ve zayıf kondanze olmuş kromatin alanları bulunabilir. Ancak bu vakuollerin ve diger kondanzasyon defektlerinin spermiyumun fertilizasyon kabiliyetini olumsuz yönde etkileyip etkilemediği henüz bilinmemektedir.

Posteriyor halka (çizgili bant), plazma membranı ve nükleus zarı arasındaki çevresel bir bağlantı noktasıdır; küçük membran partiküllerinden oluşan bir seri çizgilenmelerden meydana gelir . Posteriyor halka kuyrukun annulus yapısına benzer olarak membran bölgeleri arasında fiziksel bir bariyer olup, kuyruk ile baş bölgelerini ayıran temel bir bölünme noktası olarak görev yapar. Bu çizgili bantların ön tarafında yer alan ve nükleer delikler içermeyen nükleer kılıf, iç ve dış laminaları arasında daralır (Bedford, 1984). Bu sıra dışı özellikler muhtemelen yüksek oranda kondanzenmiş kromatin yapısı ile sperm nükleusunun kararlı doğasını yansıtır.

2.9.2.3. Sitoplazmik Damla

Sitoplazmik damla, spermiyogenez sırasındaki hücrenin morfolojik olarak yeniden şekillenmesinden sonra, arta kalan (rezidüel) sitoplazma kalıntılarını içerir. Hayvan türlerinin bir çoğunda sitoplazmik damla epididimise geçiş sırasında distale, kuyruğa doğru kayar ve ejakülasyon sırasında da atılır. Bununla birlikte, insan spermiyumunda kuyrukun orta parça ve bağlantı parçası çevresinde çok sayıda ribozom ve mitokondri gibi organel fazlalıklarını içeren sitoplazmik bir atık gibi çeşitli miktarda damla içerir..

2.9.2.4. Plazma Membranı

Birçok hücre tiplerinin aksine yapı ve fonksiyon olarak sperm plazma membranı oldukça heterojendir ve keskin sınırlarla ayrılmış çok sayıda membran bölgesi içerir. Bu bölgesel özelleşme fiziksel kimyasal ve immünolojik parametrelerle kanıtlanmıştır. Membranın hem yüzey özelliklerini hem de üç boyutlu yapısını yansıtır. Ek olarak, erkek üreme yollarından geçiş sırasında oluşturulan membran bölgelerinin bileşenleri ve yapıları sabit değildir; dolayısıyla dişi üreme yollarındaki kapasitasyon sırasında yeniden organize olur.

Sperm yüzeyi beş belirgin membran bölgesine sahiptir, her biri altındaki hücre kompartmanı ile yakından ilişkili olup her biri hücre fonksiyonunun değişik aşamalarında görev alır. Kuyruk orta parçası ve esas parçası üzerinde iki farklı plazma membranı bölgeleri

vardır. Baş bölgesinde ise, ekvatoryal bölge, postakrozomal bölge ve akrozomu örten bölge olmak üzere üç belirgin plazma membranı bölgeleri mevcuttur. Bu farklı membran bölgeleri, bitki lektinlerini bağlama afinitelerine göre değişkenlik gösterir . Dolayısıyla glikokaliks yapılarındaki farklılıkları yansıtır. Membran akıskanlığı ve lipid içeriği arasındaki farklılıklar birçok moleküler prob ile gösterilmiştir . Dondurma-kırma preparatları ile yapılan çalışmalar plazma membranındaki partiküllerin dağılım farklılıkları ve özgün monoklonal antikorlar için farklı bağlanma özellikleri gösterirler . Ayrıca, membran yüzeyi elektriksel yükleri arasında da farklılıklar vardır . Birbirinden farklı bölgelerin sınırlanması görevini üstlendiği düşünülen ve plazma membranının altında yer alan hücre iskeleti elemanlarının da bölgesel özelleşmeleri olduğu yönünde kanıtlar vardır . Aktin, spektrin ve vimentin dağılımı değişik membran bölgeleri ile ilişkilendirilebilir; vimentin ekvatoryal bölgede sınırlı iken aktin ve spektrin ön akrozom ve esas parçada yer alır . Hücre ölümüne bölgesel yapıların kaybının eşlik etmesi gerçeği, membran bölgelerinin bütünlüğünün devamında en azından kısmen, hücre içindeki aktif bir sürecin rol aldığını gösterir. Özgün bölgesel membran içeriği, kapasitasyon ve hareketlilik gibi bir çok hücresel işlevin aynı anda başarılmasını kolaylaştırır (Friend, 1982).

2.9.2.4.1. Orta Parça Bölgesi

Orta parça plazma membranı, mitokondriyal kılıfa madde geçişine izin vermek zorundadır. Burada oluşan değişikliklerin, kapasitasyon sırasında önemli hücre metabolizması olaylarına aracılık ettiği muhtemel gözükmektedir. Mitokondriyal kılıfı örten membran altta uzanan mitokondriyal sarmalı izleyen membran içi partikül zincirleri içerir ve bunlar mitokondriyalar arasındaki bölgelerde bulunmazlar. Bu bölgelerde membranın mitokondriyal kılıfa çok yakın olduğu gözlenmiştir .

2.9.2.1.2. Esas Parça Bölgesi

Esas parça spermiyum hareketi için gereken gücü yaratır ve bu fonksiyonun etkili olabilmesi için, aksonemal kompleks bağlanmamış “membran zarfı” içinde kuyruk hareketini oluşturmaktan ziyade, plazma membranına bağlı olmak zorundadır. Bu bağlantı “fermuar” diye adlandırılan uzunlamasına çift sıralı düzenlenmiş intramembranöz partiküllerden oluşur . Bu

partiküller membranı enine katederler ve aynı zamanda mekanik bir bağlantı oluşturarak, kapasitasyon sırasında gözlenen kuyruk vurus seklinin değişmesi gibi aksonemal fonksiyonların kontrolünde rolleri olabilir. Bununla birlikte, fibröz kılıfın uzantılarına tutunan fermuar partikülleri, fibröz kılıfın varlığı, partiküller ve aksonom arasındaki dış yoğun fibrillerin varlığı düzenleyici bir fonksiyona zıtlık oluşturur .

2.10. Spermatozoon DNA Hasarı

Spermatozondaki DNA hasarlarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı konusu tam olarak izah edilmiş değildir. DNA hasarı geçiren spermatozoon tamir olabilir, tamir kapasitesini aşmış ise hasarlı olarak çoğalmasına devam edebilir, spermatogenez bir seviyede duraklayabilir (maturasyon duraklaması) ya da hücre ölür (Sun, 1997). Erkek infertilitesinde spermatozoon DNA hasarı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (Sakkas , 1999; Sikka ,2004)

2.10.1. Mitokondrial DNA Hasarı

Spermatozoon gelişiminin farklı formlarında bilinen muhtemel delesyonlar; nokta mutasyonlar ve polimorfizm gibi mitokondrial DNA anomalilerini kapsar. Bu anomaliler semen kalitesi, motilite ve erkek infertilitesiyle ilişkilidir. Mitokondrial DNA (mt DNA) yardımcı histonlardan yoksun olduğundan sadece esas tamir mekanizmalarına sahip olduğuna inanılır (Sharma ,2004).

2.10.2. Nükleer DNA Hasarı Ve Kaynağı

Önceleri erkek germ hücre hattındaki DNA hasarının iki tipi tanımlanmıştır. İlki replikasyon hataları diğeri ise DNA tek ve çift zincir kırıklarını içeren DNA fragmentasyonudur (Aitken, 2001). İnsan ejakulatındaki bu anomalilerin kaynağını açıklamada günümüzde farklı mekanizmalar tanımlanmıştır (Sharma, 2004). İlk teori DNA hasarının, spermatozoon maturasyonu sırasında yanlış paketlenmesi ve ligasyonu nedeniyle olduğudur (Sakkas , 1999). İkinci teori apoptozisin yol açtığı DNA fragmentasyonu nedeniyle olduğudur

(Sakkas , 1999; Sakkas, 2002). Üçüncü teori ise oksidatif stresin DNA hasarına neden olduğudur (Saleh, 2002; Agarwal , 2003).

Spermatozoon Kromatin Paketlenmesi; immatür spermatozoonda muhtemelen protaminasyon ve kromatin paketlenmesi sırasında DNA hasar ve ROS (reaktif oksijen türleri) üretim seviyeleri yüksektir. DNA zincir kırıkları doğal olarak erkek germ hattında kondenzasyon sırasında oluşabilir (Sakkas, 1999, Sharma, 2004). Subfertil erkeklerin ejakulatlarında genelde tespit edilen DNA fragmantasyonu tek ve çift zincir kırıkları ile karakterizedir (Irvine, 2000). Apoptozis; Apoptozis, sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek kapasitede erkek gametlerinin üretimini ve normal proliferasyon seviyelerini kontrol eder (Sakkas, 1999). Ejakulattaki spermatozoon endojen çentiklerinin varlığı somatik hücre apoptozisindeki gibi karakteristik programlı hücre ölümünün bir göstergesidir (Sharma, 2004).

Oksidatif Stres; Oksidatif stresin nedeni ROS üretimi ve antioksidan kapasite arasındaki dengesizliktir (Sharma, 2004). ROS, kromatin çapraz bağlanmaları, DNA zincir kırıkları, DNA baz oksidasyonu (Aitken, 2001), kromozom delesyonları, disentrik ve kardes kromatid değişimine (Aitken, 2001) neden olabilir. Oksidatif stres, apoptozisle, DNA tek ve çift zincir kırıklarının sıklığıyla korelasyon gösterir (Sun, 1997; Aitken, 2001; Sharma, 2004).

2.10.3. Spermatozoon DNA'sını Etkileyen Faktörler

Spermatozoon DNA'sında oluşan hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonunun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi, kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlamaları, DNA da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır (Türk, 2006).

Spermatozoon DNA'sında hasara neden olan faktörler:

İn Vivo Faktörler; Sigara (Sepaniak, 2006; Potts, 1999; Moein , 2007), varikosel (Abraham, 2002; Türk, 2006), yaş (Singh, 2003; Chen, 2006), radyasyon (Abraham ,2002), kemoterapi (Abraham, 2002), alkol (Sharma, 2004), kafein (Schmid, 2006).

İn Vitro Faktörler; Spermatozoonun saklanması (Peirouvi, 2007), santrifüj (Shekarriz, 1995), spermatozoonu semenden ayırma yöntemleri (Mortimer, 2000), ROS'a maruz kalması (Agarwal, 2003), kryoprotektanlardır (Türk, 2005).

2.10.4. Spermatozoon DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri

2.10.4.1. Asidik Anilin Mavisi Boyaması

Lizinden zengin histonlarla, arjinin/sistein zengini protaminlerin ayırımında kullanılan bir boyadır. İmmatür spermatozoonun lizinden zengin histon taşıyan nükleusu sonuç olarak mavi rengi alacaktır. Matür spermatozoonun arjinin-sistein zengini protaminli nükleusu çok düşük lizin içerdiğinden anilin mavisiyle boyanmayacaktır (Agarwal, 2004) .

2.10.4.2. Toluidine Mavisi Boyaması

Kromatinin metakromatik boyanmasında kullanılır. Hasarlı yoğun kromatinde ağır bir şekilde birleşmiş hale gelir. Bu boya DNA paketlenmesine hassastır. Zayıf spermatozoon bütünlüğünü ve siddetli DNA hasarını gösterir (Agarwal, 2004). Erenpreiss 2004'te yaptığı çalışmada buboyanın spermatozoon DNA fragmentasyonu ya da anormal kromatin yapısını göstermede diğer metotlarla korelasyon gösterdiğini saptamıştır (Erenpreiss , 2004).

2.10.4.3. Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi

Spermatozoonda zayıf paketlenen kromatinde, indirekt yolla protaminden eksik DNA'nın görüntülenmesinde kullanılan guanin–sitozin spesifik bir boyadır. CMA3 ve protaminler DNA'da aynı yere bağlanır. Bu yüzden yüksek CMA3 floresanı, spermatozoonun düşük protaminasyonunun isaretidir. CMA3 yöntemi, spermatozoon kromatin değerlendirilmesinde diğer yöntemlerle güçlü korelasyon gösterir (Sakkas, 2000).

2.10.4.4. DBD-FISH (DNA breakage detection-fish) Yöntemi

Floresan in situ hibridizasyon çoklu mikrolezyon gibi kromozom anomalilerini saptamak için kullanılan bir metottur. Hücreler bir agaroz matriksle bir slayta gömüldüğünde bir alkali çözücü (denatüre) solusyonla parçalanır. ssDNA motifleri DNA zincir kırıklarına dönüşür. Nötralize edilir ve protein uzaklaştırılır, ssDNA, bütün genom yada spesifik DNA problemleriyle hibritlenerek floresan yoğunluğunda incelenir(Agarwal, 2004; Fernández, 2003).

2.10.4.5. İn Situ-Nick Translasyon (NT)Yöntemi

NT yöntem biyotinlenen deoksiuridin trifosfatın (dUTP) ssDNA kırıklarında kalıp bağımlı DNA polimeraz I enzimi tarafından katalizlendiği reaksiyonda kaynasması esasına dayanır. Spesifik olarak endojen DNA hasarını tespit eder ve değişken seviyelerini içeren spermatozoonu boyar. NT yöntemi spermatozoonda, nükleer DNA'nın yeniden modellenmesi sırasında meydana gelen anomalileri gösterir (Agarwal, 2004) .

2.10.4.6. Akridin Oranj (AO) Boyaması

Spermatozoon nükleer DNA'sının asit ilavesiyle denatürasyon hassasiyetinin in situ (yerinde) ölçülmesine dayanır. Metakromatik AO boyası çift zincir (ds) DNA'da (dogal DNA, yeşil) monomer olarak araya sokulurken, tek zincir (ss) DNA'da (denatüre DNA, kırmızı) agregat olarak bağlanır. ssDNA değerlendirmesinde kullanılan diğer yöntemlerle güçlü

korelasyon göstermektedir. Ancak floresan mikroskobu kullanılıyorsa gözlemci özneliği sonuçları etkileyebilir (Cebesoy , 2006 ; Khalili, 2006; Kazım, 2006).

2.10.4.7. Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD) – HALOSPERM

SCD test prensip olarak; spermatozoonun, liziz solusyonundan önce asit solusyonuyla muamele edildiğinde fragmente olmayan DNA'lı spermatozoonda nükleer protein uzaklaştırmasından sonra DNA dağılım haloları (fragmente DNA'lı spermatozoonda bu halolar ya hiç yoktur ya da minimaldir) meydana gelir. DNA kırıklarının varlığı nükleoidin halo genişlemesiyle ilerler. Floresan siddetine ihtiyaç duyulmadan kullanımı en büyük avantajıdır. Basit, kısa sürelidir ve SCSA (sperm kromatin strüktür analizi) ile karşılaştırılabilir (Fernández, 2003; Kazım, 2006; Fernández , 2005; Evenson, 2005; Enciso , 2006; Muriel, 2006; Muriel, 2006).

2.10.4.8. COMET (Cluster Of Motifs E-value Tool) Yöntemi

Bu yöntem DNA hasarı analizinde tek hücre jel elektroforezidir. Hasarlı hücreden dsDNA zincir migrasyonu şeklinde görünür. DNA kırıkları COMET'in bas kısmında yoğunlaşırken, çift ve tek DNA zincirindeki kırıklar COMET'in kuyruğuna doğru uzama yapar. Spermatozoon DNA fragmentasyonunun tespiti alkali koşullarda, nötral koşullardan hem tek hem de çift zincir kırıklarını tespit edebildiğinden daha üstündür. Floresan mikroskobu kullanılır. Sonuçların yorumlanması ve görüntü analizi için tecrübeye ihtiyaç duyulur (Agarwal, 2004; Morris, 2002).

2.10.4.9. TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) Yöntemi

Kalıp bağımsız TdT (Terminal Deoksinukleotidil Transferaz) enziminin katalizlediği reaksiyonda tek ve çift zincirli DNA'da dUTP'nin (deoksiuridin trifosfatın) katılımı esasına dayanır. Bu enzim biyotinlenen dUTP'nin DNA kırığının olduğu kısımlarda DNA 3'-OH'da sinyal verir. Normal DNA'lı spermatozoonda sadece arka kısım floresan boyanır, fragmente DNA (çoklu kromatin 3'-OH uçları) açık floresan renk oluşturur. Genel olarak flow sitometrik

metot daha hassas ve güvenilir olmasına rağmen, karmaşık ve pahalıdır. Floresan TUNEL da kontrol parametreleriyle çok iyi korelasyon göstermektedir (Kazım, 2006; Lopes, 1998; Younglai, 2001; Benchaib, 2003; Huang, 2005).

2.10.4.10. SCSA (Sperm Kromatin Strüktür Analizi)

Anormal kromatinli spermatozoon in situ kısmi DNA denatürasyonuna çok hassastır. Isı ya da asitle muamele ile DNA denatürasyonu metakromatik olarak değişen akridin oranı boyaması ile flow sitometrik incelenmesi esasına dayanır. SCSA asit metot kullanımı daha kolaydır. SCSA'da tespit edilen DNA hasarı DFI (DNA fragmentasyon indeksi) tarafından izah edilir. DFI sınırı fertil ve infertillerde genelde %30'dur. Flow sitometrik olduğundan hem pahalı hem de teknisyen tecrübesi gerektirir (Kazım, 2006; Lopes, 1998; Virro, 2004; Saleh, 2003; Gandini, 2004).

2.10.4.11. Yüksek Performanslı Likit Kromatografi Yöntemi

Spermatozoonda oksidatif DNA hasarı yan ürünü olan 8-OHdG (8-hidroksideoksi guanozin) seviyesi ölçümünü esas alan bir yöntemdir. Bu en yaygın çalışılmış oksidatif DNA hasarı biyo isaretleyicisidir. Çeşitli oksidatif DNA eklentileri arasında 8-OHdG, oksidatif DNA hasarını göstermede yüksek spesifitesi, mutajenik potansiyeli ve DNA'da göreceli çokluğuyla tercih edilir (Agarwal, 2004).

2.10.5. Spermatozoon DNA Hasarı ve Klinik Önemi

Semen analizi rutin olarak fertilitenin göstergesi olarak kullanılmasına rağmen standart spermatozoon konsantrasyonu, motilite ve morfoloji yüzdeleri spermatozoon defektlerini açığa çıkarmayabilir (Aitken, 2001; Lopes, 1998). Ayrıca zayıf DNA kalitesi, DNA fragmentasyonlu spermatozoon oranının artışıyla ilgilidir ve fertilitede önem taşır (Sun, 1997; Irvine, 2000, Lopes, 1998).

2.10.5.1. Spermatozoon DNA Hasarı ve Erkek İnfertilitesi

Normal testislerdeki germ hücreleri %5'ten daha az DNA zincir kırığına sahiptir. Yükselen DNA zincir kırıklı spermatozoon sayısı artışıyla erkek fertilité parametreleri arasında ilişki vardır (Seli, 2005). DNA hasarlı spermatozoon oranı arttıkça doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır. Spermatozoon DNA hasarı, fertilité potansiyeliyle negatif korelasyon gösterir. DNA kırıklarının seviyeleri infertillerde fertillere göre daha yüksektir (Sharma, 2004).

Yapılan çalışmalarda testiküler spermatozoonlarda, epididimis proksimalinden elde edilenlere göre DNA hasarlı spermatozoon oranı anlamlı olarak daha düşük bulundu. Bu farkın nedeninin genital yolda spermatozoonlara etki eden reaktif oksijen türleri (ROS) olabileceği belirtilmiştir (Seli, 2005).

2.10.5.2. Spermatozoon DNA hasarı ve Yardımlı Üreme Teknikleri

Spermatozoon DNA hasarlarının infertilitedeki önemi çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir (Sharma, 2004; Morris, 2002). Bazı araştırmacılar spermatozoon DNA hasarının fertilizasyon oranını düşürdüğü (Lopes, 1997; Benchaib, 2003), bazıları da etkisiz olduğu görülmüştür (Sharma, 2004; Morris, 2002; Virro, 2001, Henkel, 2004). Spermatozoondaki DNA hasarı; apoptozis erken embriyo fragmantasyonu ya da daha sonra düşüklerle (abort) sonuçlanabilir (Sun, 1997). Fakat sonuçlar hasta seçimi ve yöntem farklılıklarından dolayı değişebilir (Zini, 2006). Dört blastomer döneminde paternal genler açıldığında spermatozoon DNA'sının fragmantasyonu ve oksidasyonu nedeniyle embriyo gelişimi duracak ve erken embriyo ölümü gerçekleşecektir (Sakkas, 1997, Morris, 2002).

Özellikle ICSI gibi yardımcı üreme tekniklerinde DNA fragmantasyonlu spermatozoon ile oositin fertilize olma riski yüksektir (Morris, 2002). IVF ile karşılaştırıldığında ICSI'de daha düşük blastokist oluşum oranları (Henkel, 2004) ve DNA hasarlı embriyo ve beklenmeyen düşüklerin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Sharma, 2004). Çünkü ICSI için spermatozoon seçimi, motilite ve iyi morfolojiye dayanmaktadır. Doğal seleksiyon ortadan

kaldırıldığı için defektif paternal genom da bilinmeden oosit içine enjekte edilmiş olabilmektedir (Sharma R.K., 2004). Aksine bulgular da mevcut olup, ICSI olgularında eğer morfolojisi normal spermatozoon enjekte edilmişse, fertilizasyon ve gebelik oranlarının DNA hasarlı spermatozoon oranları ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (Host, 2001). Ayrıca oosit, spermatozoon DNA'sında önceden var olan belli orandaki çentikleri tamir edebilme yetenegindedir (De Jonge, 2002).

2.11. Apoptozis

Morfolojik olarak ayrı, doğal ve biyolojik öneme sahip iki farklı hücre ölümü; nekroz ve apoptozistir (Brooks, 2006). 1967-1970 yılları arasında büzümeye nekrozu Kerr tarafından elektron mikroskopik olarak gösterildi. Kerr, Wyllie ve Currie 1972 yılında Apoptozisi, hücre morfolojik ve biyokimyasal serileri içeren bir genetik mekanizmaya dayanan hücre ölüm modeli olarak tanımladılar (Yunanca: Sonbaharda dökülen yapraklar). 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptozis endonükleazların aktive olarak merdiven basamağı denemelerinde karakteristik DNA kırıklarına neden olduğunu gösterdi. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve apoptozisin genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkarılmıştır (Kerr, 2002).

Organizmada hücre bölünmesi kadar önemli olan hücre göçü, hücre ölümünün regülasyonu (ya da programlanması) sıkı bir şekilde hücre sayısının kontrolü, doku büyüklüğü ve homeostozis ile korunur. Çok hücreli organizmalarda da gelişimsel olarak istenmeyen hücrelerin eliminasyonu programlanmış hücre ölümü ile gerçekleşir (Kerr, 2002; Hengartner, 2000). Apoptozis ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir. Belirli bir dokuda hücre proliferasyonu mitozla, o dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (Hengartner, 2000).

Apoptozis, hücrede yarattığı değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılsa da nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma zarı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma

membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında gösterir. Eger hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. Apoptoziste mitokondri tarafından sitoplazmaya sitokrom-c gibi birçok madde salınır (Brooks, 2006; Kerr, 2002; Lachaud, 2004).

2.11.1. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Apoptozis organizmanın bazı doku ve hücrelerinde sürekli olmakta ve ömür boyu devam etmektedir. Günde yaklaşık bir milyon hücre apoptozisi uğrayarak ölür ve yerine yeni hücreler yapılır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı bir insanın vücut ağırlığının her 24 ayda bir yenilenmesi anlamına gelir. Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır. Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (Hengartner, 2000).

2.11.1.1. Fizyolojik Olaylar

- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde (Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı iç organların lümenlerinin oluşması).
- Menstrual siklusta endometriyum hücrelerinde, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu gibi olaylarda.
- Vertebraların nöron gelişimi sırasında. Barsak kripta epiteli gibi sürekli proliferasyon gösteren hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesinde.
- T lenfositlerinin kontrolünde, matür T lenfositlerinin antijene bağımlı düzenlenmesinde, immatür B lenfositlerinin gelişimi gibi immün sistemin düzenlenmesinde.

- Derideki keratinositlerin epiderminin en üst tabakası olan stratum korneumu olusturmasında görülür (Brooks, 2006; Elmore, 2007).

2.11.1.2. Patolojik Olaylar

- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofide, otoimmün hastalıklar sitotoksik T hücreleri ile olusturulan hücre ölümünde.
- Her türlü neoplastik oluşumda; hem büyüme hem gerileme döneminde, hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gibi hafif siddette fiziksel ve toksik uyaranlara maruz kalan dokularda.
- Pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi parankimden zengin dokularda duktus tıkanması sonrası patolojik atrofide apoptozis görülür (Brooks, 2006; Elmore, 2007).

2.11.2. Morfolojik ve Biyokimyasal Değişiklikler

Apoptotik hücrelerde küçük parçalara ayrılan hücre kısımlarında bozulmamış organeller, yoğunlaşmış sitoplazma, kompakt kromatin, nükleer sarılma dikkati çeker. Son olarak da kromatin kondenzasyonu, nükleozomal DNA fragmantasyonu, nükleer membran yıkımı, fosfolipidlerinin membran dışına yerleşimi ve apoptotik cisimciklerin görünümü apoptoziste gerçekleşen değişimlerdir (Hengartner, 2000).

2.11.2.1. Morfolojik Değişiklikler

Hücre Büzülmesi: Sitoplazması daha yoğundur ve bu yüzden organeller kalabalık görünür. Komşu hücreye göre daha küçüktür. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Hücre zarı sağlamdır, nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (Hengartner , 2000; Elmore, 2007).

Kromatin Yoğunlaşması: Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır ve genellikle büzülür (Hengartner, 2000). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır.

Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür (Yan , 2001).

Apopitotik Cisimlerin Olusması: Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apopitotik cisimlere dönüşür (Kerr, 2002).

2.11.2.2. Biyokimyasal Değişiklikler

DNA Fragmentasyonu : Hedef proteinlerden biri olan DNA, endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca^{+2} Mg^{+2} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur ve merdiven basamağı adıyla karakterizedir (Brooks, 2006).

Hücre İskeletinin Yıkılması: Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteindir. Aktin filamanlarının yıkımı ile hücre normal şeklini kaybeder (Wang, 2001).

Hücre Membranı Değişiklikleri: Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle ilişkisi kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovilluslar ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır. Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozulur. Plazma zarının iç yüzündeki fosfatidilserin yer değiştirerek zarın dış yüzüne yerleşir (Khosrowbeygi, 2004; Fauser, 1999). Ayrıca bazı apopitotik hücreler hücre zarlarında thrombospondin adlı adheziv bir glikoprotein içerirler. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar membranların parçalanmasını ve apopitotik cisimlerin oluşmasını sağlarlar (Kerr, 2002). Bu membran değişiklikleri apopitotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositozlarını sağlar. Apopitotik cisimler çevredeki parenkim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokulardan temizlenirler .

2.11.3. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis, ekstrinsek ve intrinsek olmak üzere iki mekanizma ile gerçekleşir (Brooks, 2006).

2.11.3.1. Ekstresek / Reseptör Aracılı Yol

Apoptozisin dış yolu Tümör Nekroz Faktör (TNF) ailesi hücre yüzey reseptörlerinin ligantlar yolu ile aktive edilmesi ile uyarılır. Hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların belki de en iyi anlaşılmış örneği sitokine bağlı dış apoptozis yoludur. TNF-, TNF ile ilişkili apoptozis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar. TNF ailesi reseptörleri (TNF-R1/CD120a, TNF-R2, DR3/Wsl1/Tramp, DR4/Trail-R1, DR5/Trail-R2, CAR-1) ve Fas (CD95/APO1) reseptörü, belli bir aminoasit diziliminde ve homologtur (Elmore, 2007).

Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesi (DD) bulunur. Bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlanarak apoptozisin başladığı yerlerdir. Ligandlar bağlandığında 3 Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü kompleks oluşturur. TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TNFR'e bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD/Mort-1) denen adaptör proteinlere bağlanır. Bu proteinlerin hem DD hem de proteazların ölüm oluşturan kısımlarına (DED) bağlanan bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar ölümü başlatan sinyalleme kompleksini (DISC) oluştururlar (Brooks, 2006) . Normalde ölüm bölgesi susturucusu (SODD) olarak bilinen proteiniyle uyarılmamış reseptörlerin sitoplazmik DD uçları maskelenerek reseptörlerin kendi kendilerine sinyal üretmeleri önlenir. Reseptörün uyarılmasıyla SODD ölüm ucundan ayrılarak DED içeren adaptörün bağlanmasına izin verir (Hengartner, 2000; Yan, 2003).

2.11.3.2. İntrensek / Mitokondrial Yol

Mitokondri apoptoziste ölüm programını aktive eden birkaç faktör salar. İntraselüler stimüle DNA hasarı gibi genel olarak sadece BH3- Bcl-2 ailesi proteinlerin aktivitesiyle sitoplazmada mitokondri iç membranından proapoptotik faktörlerin salınımı ile sonuçlanır (Wang, 2001;Yan, 2005). Bu salınım Bax ve Bak apoptotik proteinleri tarafından indüklenir ve antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinleri tarafından inhibe edilir. Salınan protein faktörlerden biri sitokrom c, direkt olarak Apaf-1'i aktive eder ve ATP varlığında multimerik kompleks olan apoptozomu oluşturur (Yan, 2005). Apoptozisin yaygın yolu olan iç yol hücrenin kendi içinden, sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla baslar ve iç yoldaki apoptotik sinyal iletiminde mitokondri tarafından gerçekleşir. AIF (Apoptozis indükleyici faktör) canlı hücrede iç ve dış mitokondriyal membran arasında bulunur ve çekirdek tarafından kodlanan, proteaz özelliğinde olan 57 kDa'lık bir flavoproteindir. AIF sitoplazmik faktörler yokluğunda apoptotik çekirdek değişikliklerini baslatır ve kaspazı aktive eder (Yan, 2005). Sitokrom c (Cyt-c) mitokondriyal elektron iletim sisteminin önemli bir parçasıdır. Normalde mitokondrinin iç ve dış membranı arasında bulunur. Salınımı Bcl-2 proteinleri tarafından düzenlenen ve kaspazların aktivasyonunda gerekli bir kofaktördür. dATP (ya da ATP) ve sitoplazmik faktör Apaf-1 ile birlikte sitoplazmaya salınımı önce Kaspaz-9'u sonra da Kaspaz-3'ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar. Apaf-1 proteinin kaspazla etkileşme aktivasyonu için gereken bilinen tek mekanizma sitokrom-c'dir (Elmore, 2007; Weng, 2002).

2.11.4. Apoptozis Regülatörleri

Apoptozisi düzenleyen genler cmyc, p53 ve bcl-2 olarak bilinir ve ürettikleri proteinler aynı adı alır. Apoptozisi baskılayan (anti-apoptotik) ya da indükleyen (pro-apoptotik) proteinler vardır. P53, Bcl-2 ailesi, apoptozis baskılayıcı faktör (IAP), Kaspazlar gibi protein aileleri apoptozis regülatörleridir (Wang, 2001).

2.11.4.1. P53

Anti-apoptotik özellikte, 393 aminoasitli bir proteindir ve çevresel şartlara, hücre duruma göre hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, hücre farklılaşması, genomik şekillenme ve programlı hücre ölümünde görev alır (Elmore, 2007). N-ucunda asidik transaktivasyon bölgesi, merkezinde DNA'ya bağlanan bölge ve C-ucunda tetramerizasyon bölgesi olmak üzere 3 fonksiyonel bölgesi vardır. DNA hasarlanması olan normal hücrelerde p53 protein düzeyinde belirgin bir artışla hücre döngüsü G1'de bloke olur. Büyümenin durmasından sonra DNA onarımı, hücre DNA' sının çoğaldığı S fazına geçmeden önce tamamlanır. Genom hasarı büyük boyutlarda ise hücre programlı hücre ölümüne girer (Brooks, 2006; Hengartner, 2000).

2.11.4.2. BCL-2 Ailesi Proteinleri

Bcl-2 ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur (Weng, 2002). Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve Bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür (Kerr, 2002). Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membranı dışında, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda bulunur. Bcl-2 ayrıca Raf 1 ve kalsinörine bağlanır (Elmore, 2007). İnsanda en az 17 Bcl-2 ailesi üyesi protein bulunur. Bcl-2 ailesi proteinler birkaç heliks yumağını içeren benzer protein yapısındadır. Bunlar 4'e kadar numaralanan Bcl-2'ye benzer (BH) bölgesidir. Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve fonksiyonlarına göre 3 grupta toplanır :

- Bax alt grubu; Hepsi proapoptotiktir. Bax ve Bak'dan oluşur. BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde Bcl-2'ye benzerlik gösterirler. Yapı olarak bazı bakteriyel toksinlerin por oluşturan proteinlerine benzerlik gösterirler ve kısmen hücre içi zarlarda bulunan mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarlarında kanallar oluşturma yetenekleri vardır.

- Bik alt grubu; Proapoptotik Bik, Bid ve Bim'den oluşur. Bunlara yalnız BH3 bölgeleri Bcl-2'ye benzerlik gösterdiği için BH3 proteinler de denir. Heterodimerler yaparlar ve böylece eslerinin aktivitelerini düzenlerler (Hengartner, 2000).

• Bcl-2 alt grubu; Hepsinin antiapoptotik aktivitesi vardır Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'den oluşur, dört bölgeleri (BH1, BH2, BH3, BH4) kuvvetli benzerlik gösterir. Proteinin C ucunda zara tutunma bölgesi vardır ve mitokondri membranında bulunur (Brooks, 2006).

2.11.4.3. IAF Ailesi Proteinleri

Anti-apoptotik protein ailesindedir ve bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP, Bruce, Survivin, pIAP olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre ölümünü Kaspaz-3, Kaspaz-7 ve Kaspaz-9'a direkt olarak bağlanıp onları inhibe ederek gerçekleştirirler. Apoptozis protein inhibitörleri kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (Elmore, 2007).

2.11.4.4. Kaspazlar

Kaspaz; Sistein aspartatik asit proteazlar olarak bilinir ve birbirleriyle homolog büyük protein ailesidir (Donepudi, 2002 ;Hengartner, 2000). Kaspazlar, proteolitik yarıklanmasıyla aktiflesen, inaktif granüller olarak üretilir (Donepudi, 2002). Simdiye kadar yaklaşık 100 Kaspaz substratı rapor edilmiştir (Hengartner, 2000). Kaspaz kaskadını başlatan kaspaz -3,-6 ve -7'dir. Kaspaz ailesi üyelerinden bazıları küçük N-terminal peptidler (Ör: Kaspaz-3,-6,-7) ve geniş N-terminal domainler içeren (Kaspaz-2, -8, -9, -10 ve sitokin aşamasında Kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13). ProKaspaz-7 zimojen tek polipeptid zinciri bulundurur. Matür Kaspaz'ın küçük ve geniş altbirimleri arasında bir halka bulunur. Bu alt üniteler arasında ProKaspaz-7 aktivasyonu için bölünme alanları bulunur (Ile195 Gln196–Ala197–Asp198). Aktivatör kaspazın aktif bölgesine bağlanması için gerekli aktif bölgedeki esneklikten dolayı bu halka yapısal olarak görünmez (Hengartner, 2000). İnsanda yapı ve fonksiyonlarına göre 11 değişik Kaspaz tarif edilmiştir:

- Baslıca lenfokin yapımında bulunan kaspazlar: Kaspaz-1 (ICE) , -4, -5, -11, -12 , -13, -
- Sonuçlandırıcı (effektör) kaspazlar: Kaspaz-3 (CPP32/Yama) , -6 , -7
 - Baslatıcı (initiatör) kaspazlar: Kaspaz-2, Kaspaz-8 (FLICE/MACH), -9, -10

2.11.5. Spermatogenez Ve Apoptoz

Normal spermatogenez sırasında hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu spermatozoon oluşumunda kritik rol oynar. Sonuçta spermatozoon potansiyel sayısı tahminen %75'i kadar azalır. Testiküler germ hücre apoptozisi fizyolojik ve devamlı olarak hayat boyu meydana gelir (Seli, 2005). Apoptozisin normal spermatogenez sürecinde iki önemli rolü vardır. Bunlardan ilki Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıda germ hücre popülasyonunu sınırlandırmak, ikincisi de anormal spermatozoonun azaltılmasında seçici olmaktır (Seli, 2005; Sakkas, 2002).

İnsan spermatozoonda apoptozisin varlığı yapılan çalışmalarda ortaya konduktan (Sun, 1997; Sakkas, 1999) sonra ejakulatta matür spermatozoonda apoptozisin varlığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Sun, 1997; Sakkas, 1999). Bu araştırmacılar somatik hücredeki kapsamlı DNA hasarına neden olan endojen endonükleazların aktivasyonu ile, üreme havuzundan defektli germ hücrelerinin eliminasyonu gerçekleştireceği görüşündedirler. Sakkas 1999'da apoptotik eliminasyon hatası sonucu ejakulattaki spermatozoonda görülen apoptozisi 'abortif apoptozis' olarak tanımlamıştır ve bu hücrelerin bir şekilde apoptozisten kaçtığını öne sürmüştür (Sakkas, 2002).

Apoptozis çeşitli patolojilerin ve spermatogenez kontrol sistemlerinin kaldırılmasının sonucu olabilir (Gandini, 2001). Yapılan bir çalışmada DNA hasarı ve muhtemel DNA tamirinin azalan seviyeleri karşısında apoptozisin, hatalı genetik bilginin embriyoya geçmesini engelleyen son basamak olduğu düşünülmüştür. Erkek üreme sistemine lökositlerin büyük etkisi gösterilmiştir fakat seminal lökositlerin islevi hala netlik kazanmamıştır. Spermatozoon apoptozisi semen kalitesiyle korelasyon göstermeyebilir. Ürogenital kanallardaki enfeksiyon yokluğunda; Seminal lökositlerin asıl fonksiyonlarından biri, apoptotik spermatozoonları ortadan kaldırmak olabilir (Ricci, 2002).

Spermatozoon apoptozisi ve spermatozoon DNA'sında hasar erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilir. Apoptozis ile ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında olur. p53, p21, CD 95 , Kaspaz-3 , Kaspaz 1-8 , Bcl-2 , Bcl xl (Cayli, 2004) ve Fas düzeyleriyle, değişik yollarla saptanabilmektedir. Kaspaz 1-3-8 postakrozomal bölgede, Kaspaz 9 ise orta parça (midpiece) bölgesinde gösterilmiştir (Paasch, 2003).

Son çalışmalar antiapoptotik fonksiyon sergileyen ve spermatozoon matürite isareti olarak kabul edilen HspA2 adlı protein ve erkek fertilitesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Isı şoku proteini A2 (Heat-shock protein, HspA2) bir spermatozoon matürite isareti Hsp70 şaperon protein ailesinin üyesi olan testis spesifik proteinidir. Hsp70-2 bloke edilen farelerde mayoz duraksamasına ek olarak karakteristik apoptotik DNA patern bozulmasıyla germ hücre apoptozisi artışı görülür. Yapılan çalışmalarda HspA2 gen ekspresyonu oligozoospermik grupta normozoospermik gruba göre daha düşük bulunmuştur (Cedenho, 2006). HspA2 ilk olarak primer ve sekonder spermatositte, daha sonra plazma membran yeniden şekillenmesi ve sitoplazmik artıklı uzamış spermatidde görüldü. İnsan ejakulatında düşük seviyede HspA2 tespit edilmiştir. Hsp70'in apoptoziste çalışma mekanizması, apoptotik enzimler olan Kaspaz-3 ve -9'un salınmasıyla gerçekleşir. Böylece HspA2, apoptotik sürecin olası inhibitörüdür (Huszar, 2000).

2.12. Erkek İnfertilitesi Hakkında Genel Bilgiler

Eşlerin istemelerine ve herhangi bir gebeliği önleyici yöntem kullanmamalarına rağmen en az 1 yıl içerisinde çocuk sahibi olamamalarına primer infertilite denir. Evli çiftlerin yaklaşık %15'i bir yıl beklemelerine rağmen çocuk sahibi olamamaktadırlar (Kadıoğlu, 2004). Fertilité erkek ve kadın üreme sistemlerinin anatomik ve fonksiyonel olarak normal çalışmalarına bağlıdır. Hem kadında hem erkekte üreme sistemlerini bozan edinsel ve konjenital faktörlere rastlanabilir. Ya kadında ya erkekte, ya da her ikisinde bu faktörlerden biri veya daha fazlası mevcut olabilir. İnfertil olguların %20'sinde erkek tek başına sorumlu iken, %30-40'ında kadın faktörüne eşlik eden bir patoloji bulunmaktadır (Kadıoğlu, 2004).

Erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bozulma ile ortaya çıkar. Normal fertil bir erkekte sperm sayısının mililitrede 20 milyondan fazla olması gerekir. Oligospermi sperm yoğunluğunun 20 milyon/ml'den az olması durumudur. Sperm sayısının 5 milyon/ml'den az olması şiddetli oligospermi olarak adlandırılır. Ejekülatta hiç sperm bulunmamasına azospermi denir.

İnfertilite, önemli bir sağlık sorunu olarak çiftlerin %15'ini yaşam boyunca etkiler (Mau-Holzmann, 2005). Daha önce idiopatik olarak tanımlanmış olguların büyük kısmında tanı yöntemlerinin gelişmesine bağlı olarak nedenler açığa kavuşmaktadır (Ferlin, 2005). Genetik anormallikler infertil çiftlerde sık olarak gözlenmekte, erkek infertilitesinde %15 olguda çeşitli genetik bozukluklar saptanmaktadır. Konstitüsyonel kromozom anomalileri oligozoospermik erkeklerin %5'inde, azospermik erkeklerin ise %15'inde gözlenmekte iken Y kromozomunun uzun kolunun mikrodelesyonları ağır oligozoospermide %5-10, nonobstrüktif azospermide %10-15 olguda bulunmaktadır (Ferlin, 2005). İnfertil erkeklerin %1-2'sinde gözlenen vaz deferensin konjenital bilateral yokluğu (CBAVD) durumunda ise kistik fibroz transmembran regülatör (CFTR) gen mutasyonları sorumlu tutulmaktadır (Jarzabek, 2004).

2.12.1. Azospermi

Semen örneği incelendiğinde sperm içermiyorsa, azospermik olduğu düşünülür; buna rağmen, sperm içermeyen ejakülat mutlaka santrifüj edilmelidir. Seminal sıvı volümü azosperminin etiyolojisini belirlemede önemli bir kriterdir. Total ejakülat sıvısının, yaklaşık %70'ini seminal veziküller, %10'unu vas deferens ve %20'sini prostat oluşturur. Normal semen volümüne sahip azospermili erkeklerde (>1 mL, pH>7.5) en olası etiyoloji spermatogenetik yetmezlik ya da vazal epididimal tıkanmadır. Seminal veziküller normal, ejakülatör kanallar açık ve sağlam ise vazal aplazi patofizyolojisi düşünülmelidir. Semen volümü <1mL ve pH<7.5 ise, ya seminal veziküller ejakülata katılamıyordur ya da yoktur veya hipoplazik ya da tam olarak tıkanmıştır. Bu durum bilateral ejakülatör kanal

obstrüksiyonu olarak tanımlanır. Azosperminin ayırıcı tanısı semen volümü ve pH'ya dayanır (Kadıoğlu, 2004).

Azospermik hastalar iki geniş kategoride sınıflandırılabilir:

- 1- Spermatogenetik yetmezliğe sahip hastalar (nonobstruktif azospermi)
- 2- Bir obstrükte duktal sisteme sahip ama normal spermatogeneze sahip hastalar (obstruktif azospermi) (Kadıoğlu, 2004).

2.12.1.1. Nonobstruktif Azospermi

Nonobstruktif azospermi, testisdeki spermatogenetik potansiyelin spermatozoanın ejakülatta bulunup bulunamayacağını belirleyen belirli bir eşiğin altına düştüğü zaman oluşur. Nonobstruktif azospermili erkeklerin yaklaşık %50'si, testiküler parankima içerisinde bulunan birkaç sperme sahip olabilir. Bu erkeklerin spermatogenezis düzeyleri, ejakülatlarında belirlenebilen sperm üretmeye yetmeyecek kadar düşüktür. Fakat bu spermatogenezis düzeyi ile testis içinde sperm bulunabilir ve bu sperm testis dokusundan çeşitli yöntemler ile toplanabilir. Testis parankiminde bulunan spermlerin izolasyonu ile fertiliteye sahip olamayan erkeklerin ICSI ile çocuk sahibi olabilmeleri başarılabilir. Bir organizmanın yaşamı ve üreme yeteneğinin optimizasyonu evrimsel bir gerçektir ve spermatogenezis sıkı şekilde kontrol edilen kompleks bir olaydır. Üreme yetmezliğine herhangi bir çevresel faktör sebep olmamışsa, böyle vakaların çoğunda üreme yetmezliği genetik bir temelden kaynaklanır (Kadıoğlu, 2004).

2.12.1.2. Obstruktif Azospermi

Vazal Aplazi Sendromu, azospermiye neden olan en yaygın genetik durumdur. Bilateral ya da unilateral vazal aplaziye neden olan en az 3 ayrı klinik sendrom vardır. Bunlar, kistik fibrozis (CF), vas deferensin konjenital bilateral yokluğu (CBAVD) ve vaz deferensin konjenital unilateral yokluğudur (UVY). Erken embriyogenezde, primitif ürogenital trakt hem erkeklerde hem kadınlarda benzerdir. Hamileliğin yaklaşık 7. haftasında farklılaşmalar (diferansiyasyon) yani mezonefrik (wolfian) farklılaşırken, paramesonefrik (müllerian) kanalları kaybolmaya başlar. Yedinci haftadan önce mesonefrik kanalı oluşturan hareketler renal sistemin morfogenezi kadar reproduktif kanal sistemini de etkiler, daha sonra oluşan yeni hareketler yalnız bir sistemi etkilerken diğerini etkilemez (Kadıoğlu, 2004).

2.12.2. Gonad Farklılaşması

İnsanda bulunan 23 çift kromozomun bir çifti cinsiyet kromozomudur (erkekte XY, dişilerde XX). Y kromozomun kısa kolunda (Yp) testis gelişimini sağlayan genler (Y kromozomunun seks belirleyicisi bölgesi; SRY) bulunmaktadır (Harley, 1992). Gonad gelişimi gebeliğin 5.-6. haftalarında gerçekleşir. Bu haftalarda SRY bölgesi normal bir Y kromozomu varlığında primitif gonadın korteks bölgesi geriler, medulla gelişimine devam ederek primitif testis halini alır. Y kromozomu yoksa medulla kısmı gerileyip korteks gelişmesini sürdürerek overler oluşur (Simpson, 1990). Yp eksik olan kişilerde dişi yönünde farklılaşma ortaya çıkmaktadır. Ancak SRY'nin lokalizasyonu değişiklikler gösterebilmektedir (Harley, 1992; Tilford, 2001; Foresta, 2001; Vogt, 1996). Testis gelişimi için Y kromozomundaki genlere ilave olarak X kromozomu ve otozomal kromozomlarda ki yapılara da ihtiyaç duyulmaktadır (Simpson, 1990). X kromozomunun önemi X'e bağlı XY gonad disgenezilerinde ortaya çıkmaktadır. Otozomal faktörler hem erkek hem de kadında germ hücrelerinde hipoplaziye neden olmaktadır. Farelerde yapılan deneysel araştırmalarda otozomal genlerin testis farklılaşmasında diğer faktörleri bütünlüleyici bir rol aldığı kesin olarak gösterilmiştir (Simpson, 1990).

2.12.3. İnsan Eşey Kromozomlarının Tarihçesi

İnsan eşey kromozomlarının memelilerde ortaya çıkmadan evvel sürüngenlerden 300 milyon yıl önce özdeş bir kromozom çiftinden oluştuğu düşünülür. Bu kromozomlar üzerindeki genler bugün hala bazı sürüngenlerde çevresel uyarılara maruz bırakıldıklarında seks belirleyici olarak görülür (Graves, 1994). Memelilerde seks kromozomları muhtemelen memeli X kromozomu üzerinde de yapısal homoloğu olan SOX3' den SRY geninin farklılaşması ile ortaya çıkar. SRY ve SOX3 bir progenitor genden oluşur. Gelişmiş SRY geni ise erkek belirleyici fonksiyon kazanır (Graves, 1994; Stevanovic, 1993). Memeli X ve Y kromozomunun ayrılması sırasında X kromozomu üzerinde minör değişiklikler oluşurken Y kromozomunda hızlı dejenereasyon oluşmaktadır. İlave olarak Y kromozomunun geniş bir bölümünün ters çevrilmesini (inversiyon) takip eden mutasyonlar X ve daha küçük olan Y kromozomları arasında non-rekombinasyona neden olur. Rekombinasyon yokluğunun Y bağlantılı genlerin parçalanmasından sorumluolabileceği düşünülür (Graves, 1994; Lahn, 1999). Yq üzerinde P1'den P5'e kadar olan bölgede yer alan palindromik dizilerde meydana gelen delesyonların spermatogenetik yetmezliğe sebep olduğu bulunmuştur. P5/proksimal P1 delesyonları 6.2 Mb dizi ve 32 gen ile transkriptinden fazlasını kapsarken P5/distal P1 delesyonları 7.7 Mb'lık dizi, 42 gen ve transkriptinden fazlasını içermektedir (Reijo, 1995; Vogt, 1996; Underhill, 2001). Bu palindromik dizilerin analizi ile AZFb ve AZFc bölgelerinin birbirinden bağımsız olmayıp hatta *overlap* yaptığı gösterilmiştir. Fakat 0.8 Mb'lık dizi uzunluğundaki AZFa bölgesi AZFb ve AZFc' den bağımsızdır.

2.13. Erkek İnfertilitesi İle İlgili Genetik Faktörler

Oligozoospermik erkeklerde kromozom anomalisi rastlanma sıklığı normal erkeklerden 10 kat fazla olarak gözlenmiştir (De Palma, 2005). Karyotip anomalisi durumunda azospermik olmayan erkekler anöplid, diploid ve rekombinant kromozomları içeren anormal spermler üretirler (De Palma, 2005). Kromozom analizi ile kromozom sayısı ve yapı kusurlarının saptanması periferik kan lökosit kültürleri ile mümkündür. Artmış rastlanma sıklığı nedeniyle ICSI öncesi erkek infertilitesi durumunda mutlaka uygulanmalıdır (Kim, 1998).

Erkek infertilitesi ile birlikte görülen genetik bozukluklar, sperm yapımını bozarak ya da spermin taşınmasını engelleyerek erkekte infertiliteye neden olurlar. Bu hastalarda ya azospermi ya da şiddetli oligospermi mevcuttur. Erkek infertilitesi ile ilgili dört genetik faktör bilinmektedir:

- 1--İzole spermatogenez defekti yapabilen Y-kromozom mikrodelesyonları
- 2-Konjenital vaz deferens agenezi (yokluğu) olan kistik fibrozis gen mutasyonları
- 3-Testis fonksiyonlarını bozan kromozom anomalileri
- 4 Sperm fonksiyonlarını direkt olarak etkileyen genetik sendromlar

2.13.1. İzole Spermatogenez Defekti Yapabilen Y-Kromozom Mikrodelesyonları

2.13.1.1. İnsan Y Kromozomu ve Yapısı

Y kromozomu testiste gonadal farklılaşma ve spermatogenez için gerekli genleri taşıyan yaklaşık altmış milyon baz çifti içeren, sentromeri uca yakın yani akrosentrik bir kromozomdur. Pek çok ilginç biyolojik özelliğe sahiptir. Erkek karakterinin özelliklerinin genetik belirleyicisi olan Y kromozomu fonksiyonel genlerin yanı sıra yüksek oranda tekrar elementleri içerir. Y kromozomu Yq ve Yp kolları üzerinde iki tane pseudotosomal bölge (PABY1 ve PABY2) içerir (Tilford, 2001). Boyanma özelliğine göre ökromatik ve heterokromatik olmak üzere iki bölümde incelenebilir. Ökromatik bölgenin boyutu hemen her zaman sabit olup otuz milyon baz çifti uzunluğundayken heterokromatik bölgenin boyutu çok değişkendir. Ökromatik bölge kromozomun kısa kolunu (Yp), sentromerik bölgeyi ve uzun kolun (Yq) proksimalini kapsar . Ökromatik bölge içeriğinin en azından %25'i X kromozomu ile homologtur. Aynı zamanda mitoz ve mayoz sırasında X-Y eşleşmesi ve krossing-over bu bölgede gerçekleşmektedir. Uç kısımlarda pseudotozomal (PABYI ve PABYII) bölgeler bulunmaktadır ve eşleşme sırasında X kromozomu ile tutunma bu bölgelerde gerçekleşmektedir. Yp'nin 2.7 milyon baz çifti uzunluğundaki pseudotozomal bölümünde haritalandırılmış birçok gen bulunur. Bunlar arasında MIC2 (monoklonal antikorlar tarafından belirlenen antijen) geni ve CSF2RA (koloni stimüle edici faktör) genini sayabiliriz ki bu

genler Xp üzerindeki genlerle benzerlik gösterirler. Pseudootozomal bölgenin hemen proksimalindeki 280-kb'lık bölgede de üç gen gösterilmiştir. Bu genler SRY (Y kromozomunun seks belirleyicisi bölgesi), ZFY (çinko parmak gen) ve RPS4Y (ribozomal protein geni) genleridir. Ökromatik Yq bölgesinde AZF geni, H-Y antijen geni, vücut yapısı ve diş boyutunu belirlemeye yardım eden genler ve X homolog bölgeler bulunmaktadır. Heterokromatik bölge ise replike olan fakat transkribe olmayan çeşitli uzunluktaki DNA'yi içerir ve uzunluğu bireyler arasında çok farklılık gösterir. Spermatogenezi ve testisi belirleyen genler Y kromozomuna özgüdür. Y kromozomunun uzun kolunun spermatogenez için gerekli olduğunun ortaya konduğu yetmişli yıllardan sonra Y kromozomundaki yapısal değişikliklerin erkek infertilitesinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür (Foresta, 2001; Vogt, 1996).

1994'den beri Yq mikrodelesyonlarının azospermik ve oligospermik erkeklerde oranlarını tespit etmek ve infertil fenotip ile delesyonun boyut ve pozisyonunu ilişkilendirmek için klinik ve moleküler çalışmalar birlikte yürütülmektedir. Bu bilgilerin edinilmesi, özellikle "sertoli cell-only" sendromlu veya ağır spermatogenez bozukluk gösteren hastaların ICSI yöntemi ile çocuk sahibi olabilmeleri ve bu genetik hasarı erkek çocuklara geçirme riski açısından önem taşımaktadır.

2.13.1.2. Pseudootozomal Bölgeler (PABY1, PABY2)

Pseudootozomal (PABYI ve PABYII) bölgeler Y kromozomunun uç kısımlarında bulunmaktadır ve eşleşme sırasında X kromozomu ile tutunma bu bölgelerde gerçekleşmektedir. Haritalandırılmış birçok gen, Yp'nin 2.7 milyon baz çifti uzunluğundaki pseudootozomal bölümünde bulunur. PABY1 (pseudootozomal boundry region on Y chromosome) ve PABY2 bölgelerinin X kromozomu üzerinde aynı sırada homologları mevcuttur. Y kromozomu üzerinde sadece bu iki bölge mayotik bölünmeye katılır. Mayotik bölünmeye katılmayan bölge Y kromozomunun %95'ini oluşturur. Bu bölgeler erkeğe spesifik özellikleri belirleyen bölge (MSY) ismini alır. Bu bölgeler üç farklı ökromatik (X transposed, X degeneratif ve amflikonik sekanslar) ve heterokromatik bölgeden oluşur. Pseudootozomal

bölgeler toplam 156 transkripsiyon üniti ve 78 proteini kodlayan bir bölgedir. Günümüze kadar bu bölgelerle ilgili 27 ayrı protein tanımlanmıştır (Sun, 1999; Prasanth, 2003).

2.13.1.3. İnsan Y Kromozomu Üzerindeki Genler ve Erkek İnfertilitesi

Y kromozomu üzerindeki toplam 107 gen sembolü, sitogenetik harita pozisyonu, ilave isimleri ve pek çok karakterize özellikleri ile 2002 yılı aralık ayında listelenmiştir. Ama devam eden çalışmalar bu veri bankasına yeni bilgiler ilave etmeye devam etmektedir. Y kromozomu üzerinde erkek spesifik bölge olarak tarif edilen MSY bölgesi, Y kromozomunun non-rekombine bölgesinin (NRY) %95'ini oluşturur. En az 156 transkripsiyon ünitesini barındırmaktadır. Bu ünitelerin yarısının 78 adet protein kodladığı düşünülür. MSY bölgesinde 27 ayrı protein ya da protein ailesi belirlenmiştir. Bunların 12 adedi her zaman bulunur ve 11 tanesi sadece testiste salınmaktadır (Skaletsky, 2003). İnsan Y kromozomu üzerindeki testis spesifik genlerin çoğunluğu ilginç bir şekilde birden (*TGIF2LY=TGFB* linked Y), ikiye (*VCK*, *XKRY*, *HSFY*, *PRY*), üçe (*BPY2*), dörde (*CDY=* chromodomain region on Y chromosome, *DAZ=* deleted on Y chromosome), altıya (*RBMY=* RNA binding motif protein on Y chromosome) hatta otuzbeşe (*TSPY=* testis spesifik protein, Y-linked) kadar değişen pek çok kopyaya sahiptir. Bu genler AZF faktörleri kuşatan proksimal ve distal palindromik komplekslere yerleşmiştir ve spermatogenetik yetmezliğe neden olan silinme gösterirler (Skaletsky, 2003). Toplam 23 testis spesifik transkripti (TTTYI– 23) tanımlanmıştır. Bunlardan 3, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 14 nolu palindromik komplekslerin silinmesi spermatogenetik yetmezlikli hastalarda tanımlanmıştır. Ancak yeni çalışmalar, *TTTY4'*ün testis ve prostattan, *TTTY10'* nun testis, prostat ve fetal beyinden salgılandığını, *TTTY1*, 2, 6, 7, 8, 18, 19, 21, 22 nolu transkriptlerinin ise noncoding olduğunu bildirmektedir (Skaletsky, H.,2003; ,Reijo, R., Lee, 1993). Görüldüğü gibi testis spesifik olduğu düşünülen transkriptlerin bazıları fertilitenin regülasyonundan başka, daha geniş biyolojik aktivite göstererek diğer somatik dokularda da kopya edilirken diğerlerinin görünen biyolojik bir aktivitesi yoktur.

Bu genlerden özellikle erkek infertilitesi ile ilişkili olanları burada sırayla araştırılmıştır.

2.13.1.4. Testis Belirleyici Faktör (SRY) Bölgesi ve Geni

Testis gelişimini belirleyen faktör ya da faktörlerin araştırılması sırasında birçok gen incelenmiştir. Bunlar arasında H-Y antijeni ve ZFY geni de vardır. Ancak bugün için bu faktörlerin testis belirlenmesinde rolleri olmadığı kabul edilmiştir. Bipotansiyel gonadın testis yönüne farklılaşması için gerekli gen, “Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen bölgesindeki SRY genidir (Vogt, 1996; Skaletsky, 2003) . Bu gen farklılaşma için gerekli olmakla beraber yeterli değildir. Yp 11.3 bandında tanımlanan ve intronsuz olan SRY'nin tek ekzonunun oluşturduğu 1.1 kb boyutundaki transkriplerin ürettiği proteinler, 204 aminoasit uzunluğundadır. HMG-BOX (High mobility group) homolog dizi içerir. HMG-BOX ileri düzeyde korunan 79 aminoasitlik DNA bağlayıcı bir motiftir. DNA'nın kıvrılmasına yardımcı olarak, hedef genin aktivasyonu veya baskılanmasını ve gendeki transkripsiyonun hızlanması veya yavaşlamasını sağlar. 46, XY kadınlarda yapılan çalışmalarda X kromozomunun kısa kolu üzerinde (xp21.2 – p22.11) SRVX (X – linked sex reversed locus: cinsiyet dönüştürücü gen) adlı bir gen haritalanmıştır. Ogata ve Matsuo (2008), SRY geni ile SRVX ve testis oluşturan otozomal genlerin ilişkisi hakkında bir hipotez öne sürmüşlerdir. Buna göre SRY, SRVX'i baskılamak üzere işlev görmekte, SRVX ise otozomal genlerin baskılanmasında rol oynamaktadır. 46 XY dişilere seks reserved dişiler denir ve bu dişilerde yetersiz SRY veya SRY yokluğu bulunmaktadır (Berta, 1990). XY seks reserved dişilerde SRVX duplikasyonundan bahsedilmektedir (Pao, 1993). Normal 46, XY erkekler ve bir kısım 47, XXY Klinefelter erkeklerde SRY geni, SRVX'in aktif tek kopyasını baskılayabilir. Böylece serbest kalan otozomal lokus testis formasyonunu gerçekleştirebilir. 46, XX dişilerde SRVX aktiftir ve otozomal genleri baskılayarak, bipotansiyel gonadın over yönünde farklılaşmasını sağlar. Eğer SRVX iki kopya halinde ise ve aktif durumdaysa SRY geni SRVX'in fonksiyonlarını yeterince azaltmayacak ve testis oluşumu engellenecektir. Bu model gonadal farklılaşmada X ve Y kromozomları ile otozomal genlerin birlikte çalıştığını açıklamaktadır.

2.13.1.5. Azospermi Faktör (AZF) Bölgesi ve Genleri

DNA hibridizasyon yöntemi ile Y kromozomunun bir delesyon haritası çıkarılmıştır. Bu haritada pseudotozomal bölgeler hariç olmak üzere birden dörde kadar olan bölgeler kısa kol ve sentromeri, beşden yediye kadar olan bölgeler ise uzun kolu kapsayacak şekilde 7 ayrı bölge tarif edilmiştir.

Şekil 2’de bu bölgeler ve AZF gen lokusu gösterilmektedir. İlk kez 1976’da Tiepolo ve Zufuardi, 1170 infertil erkek üzerinde yaptıkları çalışmada Y kromozomunun üzerinde spermatogenezden sorumlu bir bölgenin varlığına işaret etmişler ve karyotip analizleri sonucunda 6 hastada Y kromozomunun uzun kolunun delesyona uğradığını gözlemiş ve bu bölgeyi de Azospermi Faktörü (AZF) olarak adlandırmışlardır (Tiepolo, 1976). İnfertil erkekler üzerinde daha sonra yapılan sitogenetik çalışmalarda insitu hibridizasyon bantlama yöntemleri ile sık delesyona uğrayan bölgenin Y kromozomunun uzun kolu olduğu gözlenmiş ve bu bölge AZF olarak adlandırılmıştır. İnfertil erkekler üzerinde daha sonra yapılan sitogenetik çalışmalarda insitu hibridizasyon bantlama yöntemleri ile sık delesyona uğrayan bölgenin Y kromozomunun uzun kolunun distal bölgesi (Yq11) olduğu gösterilmiştir (Tiepolo, 1976). İnfertil erkekler arasında Y kromozomu mikrodelesyonlarının prevalansı ortalama %7’dir. Son çalışmalarda Y-mikrodelesyonuna sahip erkeklerin spermini kullanarak ICSI ile hamileliklerin başarıldığı bildirilmektedir (Choi, 2004).

İnfertil erkeklerde yapılan Y kromozomu moleküler analizlerinde, 1’den 5’e kadar olan bölgede herhangi bir delesyon bulunamamış ve rastlanılan tüm delesyonların 6. bölgede olduğu saptanmıştır. 1992’de Vogt, 19 infertil erkeğin ikisinde, 6. bölgede delesyon saptamış ve bu delesyonlardan birinin Yq 11.22’nin distalinde, diğerinin ise Yq11.23’ün distalinde olduklarını göstermiş ve sonuç olarak bu bölgede azospermiden sorumlu en az iki genin olması gerektiği kanısına varılmıştır (Vogt, 1992). Bugün Y kromozomu uzun kolu üzerinde spermatogenezin farklı aşamalarında etkili olan AZF a, AZF b ve AZF c olmak üzere en az 3 bölgenin varlığı bilinmektedir. İnfertilite sebebi açıklanamayan erkeklerde, bu bölgelerin delesyona uğramış olduğu görülmüştür (Kent- First, 1999). AZFa bölgesi aynı zamanda *Jolar Bölgesi* olarak da adlandırılır . Testise spesifik ekspresyon gösteren her üç gen bölgesinin hem

testiküler histoloji ile ilgili olduğu hem de spermatogenezin evrelerine etki ettiği gösterilmiştir. AZFa bölgesinde X kromozomu üzerinde homologları bulunan ve vücutta yaygın olarak ekspresye edilen *DFFRY*, *DBY*, *UTY*, *TBY* genleri bulunurken, AZFc bölgesinde *DAZ*, *CDY*, *SPGY*, *BPYz* ve *PRY* genleri haritalanmıştır. AZFb’de ise RNA binding motif kodlayan gen olarak adlandırılan *RBM* gen ailesi bulunur ki bu bölgeye ayrıca *YRRM* (Y spesifik RNA recognition motif) de denilmektedir. AZFb’de bulunan *RBM* genleri ve AZFc’de bulunan *DAZ* genleri testise spesifik ekspresyon göstermekte ve her ikisi de RNA – binding motif içeren birer proteini kodlamaktadır. Bu genlerin yapı ve fonksiyonları tam anlamıyla bilinmemekle beraber her ikisinin de spermatogenez esnasında spermin matürasyonundan sorumlu oldukları sanılmaktadır. Kent ve First’ün 1996’da yaptıkları çalışmada AZFb ve AZFc arası delesyonlara daha sık rastlandığını, AZFb’nin delesyonlarının matürasyon arrestine ve AZFa, AZFb ve AZFc’nin delesyonlarında Sertoli Cell Only sendromuna neden olduğu bildirilmektedir (Kent- First,1996). AZFa delesyonları, sertoli cell only sendromu ile, AZFb delesyonları, pakiten spermatosit evresindeki spermatogenez arresti ile, AZFc delesyonları ise spermatid evresindeki spermatogenez arresti ile birlikte gözlenmiştir. İnfertil erkeklerdeki Y kromozom delesyonlarının, en yaygın olarak, 3. bölge yani AZFc’de olduğu gösterilmiştir. Reijo ve arkadaşları 89 erkek ile çalışmış ve bunların %13’ünün AZFc bölgesinin tüm uzunluğu boyunca Y kromozomunun mikrodèlesyonlarına sahip olduklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda şiddetli oligospermik erkeklerin %6’sının da AZFc’nin delesyonuna sahip olduğunu bildirmişlerdir (Reijo, 1995). AZFc bölgesinde delesyon var ise hastaların şiddetli oligospermiye ya da testiküler dokuda hiç spermin saptanamadığı azospermiye sahip olma ihtimalleri yüksektir.

Y kromozomu 50-60 milyon baz çifti içermektedir. Kromozomun her iki ucunda mayozda krosing over’ın gerçekleştiği psödootozomal bölgeler bulunur. Bu iki bölgenin arasında ise ökromatin ve heterokromatin bölgeler vardır. Bu bölgelerde rekombinasyon gerçekleşmez. Azoospermia faktör (AZF) geni Y kromozomunun uzun kolunda, Yq11’de yerleşmiş sperm üretiminden sorumlu gendir. Üç spermatogenez lokusunu, AZFa, AZFb ve AZFc içerir. Histopatolojik olarak AZFa defekti sertoli-cell-only sendromuna neden olurken AZFb’nin yokluğu sperm maturasyon arresti, AZFc delesyonu ise çeşitli histopatolojik değişiklikler ile karakterizedir (Koh, 2005).

Y kromozom mikrolelesyonları polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile belirlenir. Azoospermili olgularda sıklığı %2 ile 53 arasında bildirilmiş olmakla birlikte son yıllarda %7 olduğu bildirilmektedir(Koh, 2005). AZFa bölgesi kromozomun sentromere yakın proksimal kısmında iken AZFb ve AZFc distal uçtaadır. AZFc bölgesindeki genlerin STS markerları tam olarak haritalamada polimorfik özellikler nedeniyle başarılı olamadığından mikrolelesyonların bölgeleri ile ilgili raporlar arasında uyumsuzluk sürmektedir(Koh, 2005).

Klinefelter sendromundan sonra Y mikrolelesyonları erkek infertilitesinin en sık nedenidir (Van Opstal, 1997). AZFc delesyonları Y mikrolelesyonu saptanan olguların %79'unda gözlenmekte, bunu %9 ile AZFb, %6 ile AZFb c, %3 ile AZFa ve yine %3 ile AZFabc (XX erkek) izlemektedir (Simoni, 2004). Y mikrolelesyonu tanısında uygulanan tanı protokolleri farklılık göstermekte ve yanlış tanı olasılığı bulunmaktadır. Standardizasyonu sağlamak amacı ile Avrupa Androloji Akademisi (EAA) ve Avrupa Moleküler Genetik Kalite ağı (EMQN) 2004 yılında tanıda kullanılması gereken temel STS primerlerini önerdikleri rehberi yayınladılar. Rehberde göre AZF'nin her bölgesi için en az iki STS lokusunun taranması gerekmektedir. Ek olarak SRY geninin testis determine edici faktör için kontrol olarak kullanılması önerilmektedir.

Özetle SRY, ZFY, SY86, SY127, SY254, SY84, SY134, SY255 multipler PCR ile tanıda kullanılması uygun bölgeler olarak belirtilmekte ve raporlama standartları getirilmektedir (Simoni, 2004). Y mikrolelesyonu saptanması durumunda genetik danışma sırasında delesyonların çoğunun de novo olduğu vurgulanmalıdır (Siffroi, 2000) Aynı zamanda AZFc delesyonları saptanan erkeklerde Y kromozomunun kaybı sonucunda babanın gonadlarında 45,X/46,XY mozaizmi bulunabileceği ve ICSI ile X açısından monozomik embryo oluşabileceği veya embryonun erken dönemlerinde erkek embryoya aktarılan stabil olmayan Y kromozomu nedeniyle 45,X/46,XY mozaizmi bulunan şüpheli eksternal genitalya veya mikst gonadal disgenezili erkek çocuk olabileceği konusunda aileye bilgi aktarılmalıdır (Siffroi, 2000) ICSI gebeliklerinde 45,X/46,XY gonodal mozaizmi ve Turner Sendromu için risk artışı bildirilmiş ve eksik X kromozomunun paternal olduğu tanımlanmıştır (Van Opstal, 1997).

2.13.1.6. DAZ (Deleted in Azoospermia) Gen Grupları

Bu gen grupları Y kromozomunun 6. bölgesindeki AZFc'nin distalinde yer alırlar ve ardışık tekrarlanan 24 aminoasitlik 7-11 kopyadan oluşan bir proteini kodlarlar. DAZ geni 10 exon içerir ve spermatozoada ifade edilir. DAZ geni en erken germ hücrelerinin spermatogonial çizgi boyunca farklılaşmasına yardım eder ya da onların farklılanıp farklılanmayacağını ya da yenilenip yenilenmeyeceklerini belirler. DAZ genlerinin özellikle spermatogonia ve spermatisitlerde transkribe olduğu gösterilmiştir. DAZ geninin tüm kopyaları AZFc bölgesinde bulunduğundan, bu bölgenin delesyonu tüm kopyalarının kaybına neden olabilmektedir. Y kromozomu üzerinde dağınık olarak bulunan ve çok sayıda fonksiyonel kopyası olan genlerin bir veya bir kaçının delesyonu fenotipte ortaya çıkmayabilir. DAZ geninin tüm kopyalarının kaybı, ağır klinik belirtilerle ortaya çıkabilir. Farenin Y kromozomu üzerindeki AZF bölgesinde DAZ veya DAZ benzeri bir gene rastlanmamıştır. 17. kromozomun uzun kolu üzerinde DAZ'a benzer DAZL genine rastlanmıştır. Fakat bu DAZL geni DAZ'ın aksine bir tek DAZ kopyasından oluşmaktadır. İnsanda DAZL'a benzer bir gen dizisi 3. otozomal kromozomun kısa kolunun 3p24 bölgesinde bulunmuş ve DAZLA (DAZ like Autozomal) olarak adlandırılmıştır. Yapı olarak tek DAZ kopyasından oluşur. DAZL ve DAZLA, RNA binding motif içeren bir proteini kodlamaktadır. DAZLA'nın otozomal resesif erkek infertilitesinin bazı ailesel olgularından sorumlu olduğu düşünülmektedir. DAZ geninin testise spesifik ekspresyon gösterdiği, insanda DAZ proteininin sperm kuyruğunda toplandığı ve immatür germ hücre popülasyonunda da böyle bir proteinin bulunduğu gösterilmiştir (Kadıoğlu, 2004).

2.13.1.7. RBM (RNA Bağlayıcı Motif) Gen Ailesi

Y kromozomunun uzun ve kısa kolu üzerinde yayılmış olarak bulunan 20- 40 kopyadan oluşmuş bir gen ailesi olan *RBM*, 32 aminoasitlik bir proteini kodlar. *RBM 1* ve *RBM 2* olmak üzere 2 gen ailesinden oluşur. *RBM 1* gen ailesi Yq 11.23'te kümelenir ve 15 kopyadan oluşur. AZFb bölgesinde *RBM* gen ailesinin en azından bir fonksiyonel kopyasının bulunduğu gösterilmiştir. AZFb delesyonlu erkeklerde *RBM 1* gen kaybının kesin olarak

infertiliteye neden olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Japon infertil erkekler üzerinde yapılan moleküler analizler sonrasında *RBM2* geninin polimorfik olduğu gösterilmiş ve bu genin infertil erkeklerin babalarında da delesyona uğramış olduğu saptanmıştır. Bu durum oğuldaki infertilitenin *RBM2* gen delesyonuna bağlı olmadığını göstermiştir (Arn, 1994).

Özetlenecek olursa Y kromozomunun diğer bölgeleri korunmuş olmakla birlikte DAZ bölgesinin korunmadığı ve bu bölgede delesyonlara sıkça rastlandığı dikkat çekmektedir. *RBM 2* geninin infertil erkeklerde delesyona uğradığı gösterilmekle birlikte babalarında da aynı delesyona rastlanması bunun infertiliteye yol açan bir mutasyondan çok fenotipe yansımayan bir polimorfizm olduğunu düşündürmektedir (Kadıoğlu, 2004).

Bazı infertil erkeklerde *RBM 1* geni delesyonu gösterilmiş olsa da DAZ bölgesinin bu tür hastalarda daha büyük sıklıkla delesyona uğradığının gösterilmesi ve aynı zamanda sağlıklı fertil erkeklerde de *RBM 1* geni delesyonuna rastlanmış olması, AZF'ye en güçlü aday genin AZFc bölgesindeki DAZ geni olduğunu ortaya koymaktadır.

2.13.1.8. Y Kromozomu ile İlgili Anomaliler

Y kromozomu; XY gonadal disgenezi, XYY erkekler, rekürren spontan abortuslar (RSA), Turner sendromu gibi seks kromozom anomalilerinde rol oynamaktadır. Buna rağmen bu anomalilerde Y kromozom bağlantılı genlerdeki değişiklikler ve düzenleyici diziler hala açıklanamamıştır.

2.13.1.8.1. XY Gonad 2.2.1.8.1. XY Gonadal Disgenezi (Swyer Sendromu)

Fenotipik olarak kadın görüntüsüne sahiptirler. XY gonadal disgenezili kadınlar doğumda normaldirler. Puberte ile gelişmemiş çizgi (strik) şeklinde kalıntı gonadlar belirir. Menstruasyon olmazlar. Sekonder seks karakterleri yoktur. Hastalar fenotipik olarak normal yapıdadır. XY gonadal disgenezili kadınlar normal kadınlardan daha uzundur. Bu durum kalıntı halinde bulunan gonadlardan androjen salınımı ile açıklanabilir. Turner sendromunun somatik bulgularına sahip değildirler. Bazı vakalarda kliteromegali vardır.

Swyer sendromunun üç formu gözlenmektedir.

1- STAS Formu: H-Y negatif kişilerde saptanan sporadik testiküler agenezi formudur.

2- FTAS Formu: Familial testiküler agenezi sendromudur. X'e bağlı resesif pedigrigösterirler.

3- FTDS Formu: Ailesel testiküler disgenezi sendromudur. Hastalar H-Y pozitif olmalarına rağmen kadın fenotipi gösterirler. Ayrıca testis benzeri tümoral yapılar içerebilen strik gonadlara sahiptirler. Mutasyon STAS'ta Y kromozomunda, FTAS'ta ise X kromozomunda olmasına rağmen her ikisinde de fenotip aynıdır. Yapılan bir çalışmada iki vakada Y kromozomunun p kolunda küçük delesyonlar bildirilmiş ve vakaların 46 XY kadın karyotipine sahiptirler. Bu iki vakada lenf ödem, primer amonera ile birlikte strik gonadları içeren Turner sendromunun bazı belirtilerinin de mevcut olduğu bildirilmektedir (Dimitrios, 2004). Hastaların boyları normal uzunluktayken vakalardan birinde bilateral gonadoblastoma tanısı da koyulmuştur. DNA analizi ile her iki hastada da delesyonun farklı olduğu, fakat testis belirleyici faktör (TDF) genini kapsayan yaygın bir *overlapping bölgeyi* içerdiği gösterilmiştir (Dimitrios, 2004; Sher, 2003).

2.13.1.8.2. XYY Erkekler

Ekstra bir Y kromozomuna sahip XYY sendromu uzun boy, düşük zeka seviyesi, geç konuşma, bazı öğrenme problemlerinin görüldüğü bir anomalidir. Hastalık her 1000 canlı doğumda bir görülür. Nadiren sendrom babadan oğla geçer. Fakat pek çok vakada kalıtım özelliği gösterilememiştir. XYY sendromu genelde gizli kalır ve ciddi bir rahatsızlık göstermez. Ancak kromozom analizi ile teşhis edilebilir. Tüm hücreler XYY yapısına sahip olmayabilir. Bu duruma *mozaizim* denir ve değişik derecelerde gözlenir. İnsan Y kromozomunun, erkek fetüsün miyadında gebeliklerinin devam ettirilmesinde rol oynayıp oynamadığı henüz tam olarak belirlenememiştir. Tekrar eden abortus gözlenen çiftlerden alınan DNA örneklerinin analizi, bu yönde bilgi sağlayabilir. Ayrıca abortus olan fetüsün

analizi eğer var ise Y bağlantılı bazı kritik somatik kromozom yerlerini ve dizi modüllerini anlamamıza yardım edecektir (Sher, 2003).

2.2.1.8.3. Rekürren

Spontan Abortus (RSA), RSA' dan sorumlu spesifik bir gen gösterilememesine rağmen Yq pozitifliği ile artmış abortus riski arasında bir ilişki mevcuttur. 11148 ardışık yeni doğan çocukla yapılan bir araştırmada Yq pozitif kromozomuna sahip 58 erkek çocuk görülmüştür. Bu 58 erkek çocuğun annelerinin %22 gibi abortus oranına sahip olduğu gözlenmiştir. Yq pozitifliği olmayan normal karyotipli 4895 çocuk ile bu çocukların anneleri arasındaki ilişkiye bakıldığında bu oran %13 olarak bulunmuştur ve bu oran istatistiki olarak anlamlı değerlendirilmiştir ($p > 0.001$). Araştırma sonuçları uzun bir Y kromozomunun zigotun canlılığını etkileyebildiğini fakat bu mutasyonu taşıyan ebeveynin fertilizasyonunu etkilemediğini göstermiştir. Yani Yqh bölgesinin miyadında gebeliğin sağlanmasında oldukça önemli bir rolü olduğu görülmektedir. Araştırmaya göre Yqh materyali aynı zamanda fetüse de zarar vermektedir. Yqh materyalinin nasıl olup da babanın fertilizasyonuna zarar vermediği ise oldukça ilginçtir. Yq bölgesinin bazı açıklanamamış, bilinmeyen mekanizmalar ile babanın doğumundan sonra Yq pozitif olabileceği ihtimali oldukça güçlüdür. Bu durum daha sonra fetüsün abortusuna neden olan bir genetik bozukluk halini almaktadır (Sher, 2003; Genest, 1985).

2.13.1.8.4. Yqh bölgesi

Yqh materyalinin major kısmını DYZI satellit fraksiyonu oluşturur. Tekrar eden abortus vakalarında bu bölgenin kaybedilmesi ya da sayısının artması önemli olabilir. DYZI satellit fraksiyonu insan Y kromozomunun Yqh bölgesinde 3.4 kb' lık tek bir dizinin 800 - 4000 kopyasını içermektedir. Tekrar eden abortus vakalarında DYZI bölgesinin analizi Yqh bölgesinin fetüse zarar verip vermediğini açıklayacağı gibi aynı zamanda normal bir insanda DYZI kopyalarının optimal sayısının da belirlenmesini sağlayacaktır. Heterokromatik dizilerin kaybı ile tekrar eden abortus gözlenen hastalardan alınan DNA örneklerinin analizi miyadında erkek gebeliğin sağlanmasında Yqh bölgesinin rolünü anlamamızı sağlayacaktır.

2.13.1.8.5. Turner Sendromu (TS)

45,XO karyotipine sahip turner sendromu, 2500 kız canlı doğumunda bir oranında görülür. X kromozomunun bilinen tek monozomik vakasıdır. Saf XO döllenmelerinin %90'ından fazlası prenatal gelişim esnasında ya da postnatal dönemin ilk aylarında elimine olmaktadır. Hem X hem de Y kromozomlarının kromozomal mozaizmi görülür. Yeni bir çalışmada turner sendromlu bir hastada DYZI bölgesinde nadir silinme ve anneden kalıtılmış olduğu düşünülen, Y kromozomundan türeyen anormal bir markır kromozom belirlenmiştir. Hastadaki DYZI' deki silinmelerin post zigotik bir sporadik mutasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir.

2.13.1.8.6. Aday Turner Sendromu Genleri

Turner sendromu fenotipini açıklamak için, kromozom imbalansı, genomik imprinting, haplo-yetmezlik gibi pek çok mekanizma öne sürülmüştür. Her bir hücrede iki X kromozomu bulunan normal kadında bir X kromozomu üzerindeki genler, inaktivedir. Böylece kadınlar erkekte olduğu gibi X' e bağlı genlerin aynı miktarına sahip olmaktadırlar. Bu kuralın dışında kalan istisnalar ise Y kromozomu üzerinde karşılığı bulunan **X bağlantılı idareci** genlerdir. İdareci genler her iki X kromozomu üzerinde de açık kalarak erkek hücrelerinin miktarına eşit olurlar. Bundan da anlaşılacağı gibi turner sendromundaki anormallikler haplo yetmezliğe bağlı olarak ortaya çıkabilir. Çünkü tek X kromozomunun ürünü pek çok fonksiyon için ihtiyaç duyulan miktarın sadece yarısını oluşturmaktadır. Bu hipoteze göre turner sendrom lokusunun orijinal olarak X ve Y kromozomlarının kısa kolu üzerindeki pseudootozomal bölge dışında bulunabileceği öne sürülmektedir (Quintana-Murci, 2001). Mutasyon analizleri Xp-Xp pseudootozomal bölgedeki SHOX/PHOX genlerinin TS için büyüme genine aday olabileceğini göstermektedir. Ayrıca ilave X' e bağlı lokus ya da anoploidinin de TS gelişimine katkıda bulunduğu iddia edilmektedir. X' e bağlı bu ilave lokusun insanda ZFX (X kromozomu üzerindeki çinko parmak motif geni) geni olma olasılığı oldukça güçlüdür. TS'da kısa boyluluktan başka hiçbir fenotip X ya da Y kromozomunun spesifik delesyonları ile ilgili

değildir. TS lenf ödem geninin de Yq ya da Yp' nin distal bölgesinde olabileceği yönünde bulgular mevcuttur (Zinn, 1998).

2.13.2. Konjenital Vaz Deferens Agenezi (Yokluğu) Olan Kistik Fibrozis Gen Mutasyonları

2.13.2.1. Ekstra Testiküler Duktal ve Ejakülatör Sistem Anomalileri

2.13.2.1.1. Kistik Fibrozis

Kistik fibrozis (CF) kuzey avrupada 1/1600 sıklıkla görülen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Taşıyıcı sıklığı 1/25'dir. 250 kilobaz uzunluğunda ve 27 ekzon içeren CF geni 7q31'de lokalizedir. Bu gen, epitelle örtülü lümenlerde klor iyon transmembran transportunun regülasyonuna yardım eden, kistik fibrozis transmembran taşıma regülatörü (CFTR) ismi verilen bir proteini kodlar. CFTR proteininin fonksiyonunun bozulması bilateral vaz deferens ile sonuçlanabilir. Azoospermik olguların %1.4'ünü oluşturan konjenital vaz deferensli hastaların %85'inde CF gen mutasyonu tanımlanmıştır (Quinzii, 2000). Normal ve fonksiyonel CFTR miktarı belirli değerlerin altına düştüğü zaman respiratuvar sistem ve pankreatik kanalda sekresyonlar kalınlaşır ve yapışkanlaşır. CFTR'nin vazal gelişme ya da vazal bütünlüğün devam ettirilmesinde de bir rolü vardır, çünkü hemen hemen kistik fibrozisli tüm erkekler bilateral vaz deferens agenezi gösterirler. Kistik fibrozisli hastaların kliniği fonksiyonel CFTR protein miktarına bağlıdır. Fonksiyonel CFTR miktarındaki azalma arttıkça hastaların fenotipik olarak daha fazla etkilendikleri görülür. Bu nedenle, modifiye polimorfizimler kadar her bir allel üzerinde oluşan mutasyonların kombinasyonları da hastalığın klinik seyrini belirler. Şimdiye kadar, 1000'in üzerinde farklı mutasyon kistik fibrozisli ya da Konjenital bilateral vas deferens yokluğu (CBAVD) olan hastalarda belirlenmiştir. ΔF508 en sıklıkla belirlenen mutasyondur ve en az CF'li hastaların %50'sinde bulunur. CF'li pek çok hasta ΔF508 mutasyonu için homozigottur (Mc callum T,2001). CBAVD obstruktif azospermili hastaların yaklaşık %6'sında bulunur. CBAVD olan erkeklerde mutasyon ve polimorfizimlerin kombinasyonları kistik fibrozisli erkeklerde görülenden daha az şiddetli olduğu için, CBAVD'li olan erkekler kistik fibrozisli hastalar gibi

pulmoner yada pankreatik disfonksiyona sahip değillerdir. CBAVD'li hastaların sahip olduğu fonksiyonel CFTR proteini miktarı respiratuvar ve pankreatik belirtileri önlemek için yeterli düzeydedir. Kistik fibrozisli ve CBAVD'li hastaların fizik muayenesinde vaz deferensin bilateral yokluğu ve epididimal kalıntının değişen uzunlukları görülür. Semen analizi seminal vezikülün yokluğu yada hipoplazisine göre asidik sıvı ve düşük volüm (<1ml) gösterir. Testiküler hacim normaldir ve spermatogenezis için uygundur. Klinik kistik fibrozisli ya da CFTR proteininin fonksiyonel olarak yetersizliğinin neden olduğu CBAVD'li hastalarda, renal anatomi normaldir. Uygun vazal gelişmeyi inhibe eden fonksiyonel CFTR protein miktarındaki azalma yedinci haftadan sonra üreme sisteminin duktal morfogenezini engellerken üreteral /renal büyümei etkilemez (Daudin, 2000).

CBAVD'li hastaların %90'nı iki CFTR allelinin en azından birinde bir anormalliğe sahiptir. Hastaların yaklaşık olarak %75'i ya 2 mutasyona ya da bir mutasyon ve 5T polimorfizminin bir kombinasyonuna sahiptir. Araştırmalar polimorfizm etkisinin bu genin ürününün tamamen salgılanmasını inhibe ettiğini göstermiştir. ΔF508 mutasyonu bir allel üzerinde bulunduğu zaman, Normal CFTR'nin total miktarı anlamlı olarak azalır. M470 varyantı gibi diğer polimorfizimler, ya direkt olarak genin salınımını etkiler ya da aynı allel üzerinde diğer mutasyon ve polimorfizimlerin yan etkilerini modifiye eder (Daudin , 2000). CBAVD, kistik fibrozisten daha hafif fenotipik özelliklere sahip olmasına rağmen her iki rahatsızlık da CFTR proteininde ki bir anormallikten kaynaklanır. Ebeveynlerin bebeğe kistik fibrozisi ya da CBAVD'yi geçirme riskini belirlemek için mutasyon analizi her iki ebeveyne birden yapılmalıdır.

CF, beyaz Avrupalılarda gözlenen en sık otozomal resesif hastalık olup rastlanma sıklığı 2500'de 1'dir (Mennicke, 2005). CFTR geni 7q31.2 kromozom lokusunda bulunan 230 kb uzunluğunda ve 27 eksondan oluşan bir gendir (Danziger, 2004; Cuppens, 2004). Gen ürünü klor kanalı olarak işlev yapan Erkek infertilitesinde genetik yaklaşım 150 glikozillenmiş transmembran proteindir ve ekzokrin dokuların (akciğer, pankreas, ter bezleri, vaz deferens) epitel hücrelerinde ifadelenen bir proteindir (Cuppens, 2004). CF olgularında 1000'den fazla mutasyon ve 200 polimorfizm belirlenmiş olmakla birlikte tek amnioasit delesyonunu içeren (DF508) mutasyonu en sık mutasyondur (Mennicke, 2005).

Vaz deferensin konjenital bilateral yokluğu (CBAVD) obstrüktif azosperminin sık nedenidir ve erkek infertilitesinde olguların %1-2'sinden sorumludur (Dayangaç, 2004). 51 CBAVD olgusunda yaptığı çalışmada IVS8-5T aleli %19.6 oranla en sık mutasyon olarak gözlenmiş ikinci sıklıkta %14.7 ile D1152H mutasyonu belirlenmiş, her iki mutasyonun çalışma kapsamına alınan olguların alellerinin 1/3'ünde gözlendiği belirlenmiştir (Dayangaç, 2004).

CF mutasyon taraması sırasında toplumlar arasında etnik kökene bağlı farklılıklar değerlendirilmelidir (Dayangaç, 2004). Rutin tarama panelleri önerilmiş olmakla birlikte, ülkemiz açısından farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır. CFTR mutasyon testleri idiyopatik infertilite düşünülen erkek olgularda yardımcı üreme yöntemlerine başvurulmadan önce uygulanmalıdır. Herhangi bir olguda mutasyon belirlenmesi durumunda mutlaka eşine de mutasyon taraması yapılmalıdır. Eşlerin her ikisinde de taşıyıcılık durumunda çocuklar açısından riskler aileye bildirilmeli, gerekli önlemler alınmalı, preimplenetik tanı şansı değerlendirilmelidir .

2.13.2.1.2. Persistan Müllerian Kanal Sendromu ve Young Sendromu

Young Sendromu ve Persistan Müllerian Kanal Sendromu, obstrüktif azospermiye neden olur. Young sendromlu hastalar kronik sinüzit, bronşiektazi ve epididimal obstrüksiyona ve sekonder azospermiye sahiptir. Epididimal obstrüksiyon mikrocerrahi rekonstrüksiyonla düzeltilir. Gerçek hastalık sebebi belirlenememesine rağmen bazı çalışmalarda anormal bir aksonomel yapının anormal sperm motilitesine yol açabileceği bildirilmektedir. Hastalığın diğer olası sebepleri arasında anormal silier fonksiyon ya da mukus niteliği sayılabilir (Jaffe T. 1996). Persistan müllerian kanal sendromu, AMH ya da AMH reseptörünün kantitatif, kalitatif yada geçici yetmezliği nedeniyle oluşmakta ve erkek psödohermafrodizminin nadir bir formunu oluşturmaktadır. PMDS'li erkekler sıklıkla bir inguinal herni içinde bulunan bir uterus, üst vajina ve fallop tüplerine (müllerian kanal yapıları) sahiptir. Bu erkekler sıklıkla kriptorşittir ve kısmi ya da tamamen duktal obstrüksiyona sahiptir.

2.13.3. Testis Fonksiyonlarını Bozan Kromozom Anomalileri

Normal insan somatik hücreleri 22 otozom çifti ve 1 seks kromozom çifti içeren 46 kromozomlu diploid hücrelerdir. Erkekler X ve Y olmak üzere 2 farklı seks kromozomuna sahiptir. Buna karşın kadınlar 2 X kromozomuna sahiptir. Gametler yani sperm ve yumurta haploiddir ve her biri 22 otozom ve bir tek seks kromozomunun tek bir kopyasına sahiptir. Fertilizasyon sırasında her iki ebeveynin kromozomlarının birleşmesi ile normal 46 kromozomlu yapıyı oluşturur. Normal populasyonda var olan %1'lik kromozom anormallik oranı İnfertil erkekteki %5.8'lik kromozomal anormallik oranı ile kıyaslandığında oldukça anlamlı olduğu görülür (Düzcan, 2003). Üstelik erkek infertilitesinde seks kromozom anomalileri otozomal kromozom anomalilerinden daha sık görülmektedir (%4.2 vs %1.5) (Johnson, 1998).

Çizelge 2.1. Azospermik ve Şiddetli Oligospermik İnfertil Erkeklerdeki Kromozomal anomaliler

	9766 infertil erkek	94465 erkek yenidoğan
Kromozomal anomali	%5,8	%0,38
Seks kromozomal	%4,2	%0,14
Otomal kromozomal	%1,5	%0,25

Kromozom anomalileri yapısal ya da sayısal olarak sınıflandırılabilir. Yapısal kromozomal anomalileri delesyon, inversiyon, bir kromozomun bir kısmının dublikasyonu ya da bir kromozomun diğer kromozoma bir parçasının translokasyonunu ve ring kromozom yapısını içerir. Sayısal kromozomal anomaliler poliploid (tüm kromozomların multipl kopyalarını içeren hücreler) ya da anöploid (bir ya da daha fazla kromozomun bir ilavesini ya da delesyonunu içeren hücreler) olarak sınıflandırılır. Bazı kanser tipleri hariç poliploid hücreler genellikle yaşayamaz. İnfertiliteye neden olan kromozom anomalilerinden önce kısaca translokasyon, duplikasyon, delesyon, poliploidi ve anöploidi tanımlamalarını yapmak yararlı olacaktır.

X-Otozom ve Y-Otozom Translokasyonları

Resiprokal X-otozom translokasyonları X üzerindeki kırılma noktasının yerine bağlı olmaksızın erkek infertilitesine neden olabilir. Spermatogenetik arrest sonucu azoospermi gelişir. Resiprokal Y-otozom translokasyonları; mayozda anormal cinsiyet kromozom eşleşmesine bağlı spermatogenez anormalliklerine, SRY geni defektine bağlı anormal testis determinasyonuna ve AZF genlerinin hatalı transkripsiyonuna yol açabilir.

Resiprokal Otozomal Translokasyonlar

Transloke kromozom segmentlerinde homolog eşleşme başarısız olduğu için mayoz sırasında X veya Y kromozomları ile eşleşebilecek geniş eşleşmemiş serbest segmentler bulunur. X ile eşleşen otozomal segmentler spermatogenezde normal X inaktivasyonunu engeller ve erkek germ hücrelerinde letal doz etkisine yol açar. Azoospermik ve oligospermik olgularda otozomal translokasyonlar (%0,9 ve %0,6) normale göre (%0,1) artmıştır.

Robertson Tipi Translokasyonlar

Şiddetli oligospermik ve azoospermik olgularda Robertson tipi translokasyon taşıyıcılığı (%1,6 ve %0,09) fenotipik olarak normal yenidoğanlara (%0,8) göre artmış bulunmuştur. İnfertil erkeklerde en sık Robertson tipi translokasyon t(13q;14q)'dur (Johnson, 1998).

2.13.3.1. Kromozom Yapısı Mutasyonları

2.13.3.1.1. Delesyon

Kromozomunun küçük bir parçasının kırılma sonucu kopması demektir. Kopma iki türlü olabilir ya bir darbe sonucu kromozomun terminal parçası koparak kromozomdan ayrılır (terminal delesyon) yada iki darbe sonucu kopan parça aradan çıktıktan sonra kromozomun iki parçası yeniden kaynaşır (insersiyonel delesyon). Terminal delesyon pek mümkün görülmemektedir. Çünkü kopan uç yapışkan uç halini alır ve delesyondan sonra bir translokasyon gerçekleşir.

2.13.3.1.2. İnverson (Ters Dönme)

Bir kromozoma iki darbenin gelmesi ve bunun sonucunda kopan parçanın delesyona uğramadan kendi eksenini etrafında 180 derece dönerek yine eski yerine yapışması olayıdır. İki türlü inverson olmaktadır. Perisentrik ve parasentrik inverson. Sentromerin dışında olan ters dönmelere parasentrik inverson denir ve kırılma uzun ya da kısa kollardan birinde olur. Kromozomun görünümünü değişmemekle beraber gen sırası değişmektedir. Perisentrik inversonda ise iki darbe kromozomun kısa ve uzun kollarına gelir. Kırılan aradaki parça sentromeri de içerir ve bu parça kendi eksenini etrafında 180 derece ters dönerek yapıştığında hem gen sırası hem de kromozomun yapısı değişir.

2.13.3.1.3. Duplikasyon

Homolog iki kromozomdan birinde çift darbe sonucu kopan parça diğerinde tek darbe sonucu kopan aralığa girer ve kaynaşırsa duplikasyon gerçekleşir. Duplikasyon daha çok mayoz bölünme sırasında eşit olmayan crossing-over sonucu oluşur. Duplikasyon kendini iki şekilde gösterir. Tandem duplikasyonda genler ardı ardına dizilirken ters tandem duplikasyonda artan parça kendi eksenini etrafında ters dönerek yeni yerine eklenmiştir.

2.13.3.1.4. Translokasyon

Heterolog iki kromozomdan birinden kopan bir parçanın diğerinin kırılan parçasının üzerine yapışmasıdır. İki grup içerisinde incelenebilirler. 1- *Resiprokal (karşılıklı) Translokasyon*: Homolog ya da homolog olmayan iki kromozom arasında kopan parçaların karşılıklı yer değiştirmesi olayıdır. 2-*Sentrik kaynaşma tipi translokasyon*: Akrosentrik kromozomlar arasında kromozomların birinde sentromere yakın kısa kolda diğerinde ise sentromere yakın fakat uzun kolda birer kırılma olur. Sonra iki kromozomun uzun ve kısa kolları birleşerek translokasyon kromozomlarını oluştururlar. Bu tip translokasyona Robertsonian Translokasyon da denmektedir.

2.13.3.1.5. Yüzük (Ring) Kromozom

Bir kromozomun iki ucunda oluşan iki kırılma sonucunda, kırık uçların birbiri ile kaynaşması sonucunda halka şeklinde bir kromozom oluşur. Bu kromozoma yüzük veya ring kromozom denir.

2.13.3.2. Kromozom Sayısı Mutasyonları

2.13.3.2.1. Öploidi

Kromozomlardaki sayısal düzensizlikler olarak bilinirler. İnsan eşey hücrelerinde haploid sayıda bulunan 23 adet kromozomun haploid sayının tam katları kadar ($n=23$ ve $3n$, $4n, 5n, \dots$) artması olayıdır.

2.13.3.2.2. Anöploidi

Temel kromozom sayısının tam katları kadar olmayan artma yada eksilmelere denir ve öploiden daha sık görülür (Nurten, 1999).

Klinefelter Sendromu (47, XXY) ve 47, XYY olgular bu başlık altında incelenebilir. Klinefelter sendromunda; germ hücrelerinin yokluğu ve atrofik hyalinize testis söz konusudur.

Gonadal mozaisizm bulunan olgularda (46, XY;47,XXY) sperm yapısında yer alan değişen derecelerde canlı XY germ hücreleri bulunur.

47, XXY erkeklerde testis biyopsisi ile ICSI için spermatozoon elde edilebilen olgular bildirilmiştir. Normal çocukların doğumu ile sonuçlanan gebelikler de bildirilmiştir. Klinefelter olgularında elde edilen gebeliklerde preimplantasyon genetik tanı yapılması önerilir. 47, XYY erkekler fertildir ve normal 46, XY erkek ve 46, XX kız çocukları olur. Ancak, bunlarda YY germ hücrelerinin mayoz sırasında anormal mayotik eşleşmesi sonucu spermatogenez aresti ve sperm yapımında şiddetli bozulma izlenebilir.

2.13.3.3. Kromozom Yapı Bozuklukları

Erkek infertilitesinin şiddetli şekilde görüldüğü azospermi ve ciddi oligospermili hastalarda otozomal ve seks kromozomlarında veya her ikisinde kromozomal yeniden düzenlenmeler görülür. Özellikle Robertsonian ve resiprokal translokasyonlar rastgele seçilmiş erkek yenidoğanlara göre infertil erkeklerde 8.5 kat daha fazladır (Van Asche, 1996). Benzer şekilde, otozomal inversiyonlar da genel populasyona göre infertil erkeklerde 8 kat daha fazladır. Tutulan kromozomlara bakılmaksızın, Robertsonian translokasyonları olan hastaların çoğu anormal seminal parametreler göstermektedir. Resiprokal translokasyon taşıyan erkekler normalden azospermiğe kadar değişen semen özelliklerine sahip olabilir. Normal bir fenotipe karşın, 46, XX karyotipli bir erkek (XX erkek sendromu) infertildir. Bu nadir durum yaklaşık 20.000 canlı doğumda bir görülür. Daha önce tanımlandığı gibi, bu sendrom için en olası açıklama, çok az hastada olmasa da, testisin Y kromozomu uzun kolunda bulunan seks belirleyici bölge yani SRY'nin X kromozomuna translokasyonudur. Bu XX erkek hastalar testis biyopsilerinde Sertoli cell-only patolojisiyle birlikte azospermiktir (Antonelli, 2000). Fenotipik özellikleri arasında jinekomasti, dişi kıllanma modeli ve küçük testisler bulunur. XX erkeklerin yaklaşık %10'unda (SRY-negatif) ambigius genitalia veya hipospadias bulunmaktadır (Antonelli, 2000)

2.13.3.4. Kromozom Sayı Bozuklukları

Genellikle, otozomal sayısal bozukluğa sahip fetuslar yaşamla bağdaşmaz. Sadece trizomi 13, trizomi 18 ve trizomi 21’li fetuslar doğuma dek varlığını sürdürür ve trizomi 21’li hastalar nadiren trizomi 13 ile trizomi 18’ li hastalar reproduktif döneme erişebilir. Otozomal sayısal bozukluğa sahip erkeklerde genellikle ciddi oligospermi veya azospermi vardır (Speed, 1989). Sayısal kromozomal anormalliklerin örnekleri arasında Klinefelter sendromu, mikst gonadal disgenezis ve XYY erkekleri sayabiliriz. Klinefelter sendromu (XXY) en sık görülen seks kromozom bozukluğudur ve infertilite kiliniğine başvuran infertil erkeklerde genel popülasyona göre 30 kat daha sıktır. Klinefelter sendromunun genetik özelliği fazladan bir X kromozomunun bulunmasıdır. Bu sendroma doğan her 600 erkekten birinde rastlanır. Hastalık mayotik redüksiyon bölünme sırasında seks kromozom ayrılamamasından kaynaklanır. Klinefelter sendromlu hastalar azospermik veya ciddi oligospermiktir ve azospermi vakalarının yaklaşık %14’ünü oluşturur (Rives, 2000).

Testis biyopsilerinde sıklıkla seminifer tübüllerde skleroz gözlenir. Ancak, nadiren Sertoli hücreleri ve spermatozoa da bulunabilir. Seminifer tübüllerdeki şiddetli hasar nedeni ile hastaların %50’sinde gonadotropinlerin plazma seviyeleri değişir. Plazma FSH seviyesi genellikle belirgin olarak yükselirken, luteinize edici hormon (LH) seviyesi normal ya da yükselmiş olabilir. Hastaların %50-60’ında total plazma testosteron seviyesi düşmüştür. Klinefelter sendromlu erkeklerin fenotipi değişkendir, ancak küçük, sıkı testisler, artmış boy, kadın tipi kıllanma, alt ekstremitelerde artmış varikozitler, zeka düzeyinde azalma, obezite, lösemi ve nonseminomatöz, ekstraponadal germ hücre tümörlerinin insidansında artış ve infertiliteyi içermektedir (Okada, 1999). Ayrıca, jinekomastili klinefelter sendromlu hastalarda meme kanseri gelişme riski artmıştır (Okada, 1999). Anne ya da babaya ait gametlerde mayoz sırasında kromozomların birbirinden ayrılmamaları Klinefelter sendromuna yol açarken, bu ayrılmanın olmayışı embriyonun gelişmesi sırasında mitozla çoğalan hücrelerde meydana gelirse mozaik tablo ortaya çıkar. Klinefelter sendromlu hastaların %10’u 46XY/47XXY mozaik karyotipine sahiptirler. Hücrelerin bir kısmının 46XY ve kalan hücrelerin 47XXY olduğu mozaik grup hastalar fenotipte daha az şiddetli belirtilere sahiptir. Bu hastalar değişen düzeylerde sperm üretirler ve nadiren de olsa doğal konsepsiyonla hamilelik

sağlanabilmektedir. Daha yaygın olarak üreme teknolojilerinin uygulanmasıyla Klinefelter sendromlu bazı hastalar doğal yolla hamileliği sağlayabilir fakat bu karyotipik anomali bu hastaların çocuklarına değişik kromozom düzensizlikleri olarak geçmektedir (Mroz, 1999). Daha az yaygın olarak, seks kromozom anormallikleri mikst gonadal disgenezili ve XYY'li hastalarda ortaya çıkar. Mikst gonadal disgenezili hastalar fenotipik olarak erkek, kadın ya da ambigus genitaleli olabilir. Bu hastalar sıklıkla 45X/46XY mozaik karyotipine sahiptir; yaklaşık olarak 1/3'ü normal karyotipe sahiptir. Pek çok hasta bir testise ve streak gonada sahiptir. Testis kriptorşit ya da skrotumda lokalize olabilir. Testis skrotumda lokalize ise normal leydig hücreleri ve sertoli hücre popülasyonları genellikle vardır. Buna rağmen, seminifer tübüllerde germ hücresi yoktur. Bu hastaların streak gonadları gonadoblastoma için malign dejenerasyon riski taşırlar. XYY erkeklerin semen bulguları normalden azospermiye doğru değişen bir profil gösterir. Pek çok XYY erkek artmış boy hariç fenotipik olarak normaldir. XYY hastalar spermatogenezis yetmezliğe sahiptir ve testis biyopsisinde matürasyon arresti ya da sertoli-cell only sendromu gösterirler (Attanasio, 1982).

2.13.3.5. Kromozomal Bozukluklar İçin Test

Kromozomal anomaliler ve bazı yapısal defektler giemsa bantlama sitogenetik analizi kullanılarak belirlenebilir. İdiopatik infertil erkeklerin %7-13'ü anormal bir karyotipe sahiptir. Bu nedenle genelde 5 milyondan daha az sperm dansiteli tüm erkeklere, özellikle bir yardımcı üreme tekniğini kullanmak için başvuranlara, yüksek rezolüsyonlu bantlama sitogenetik analizini önerilmelidir. Normal karyotipli bir infertil erkek, germ hücrelerinde kromozomal anöploidide bir artışa sahip olabilir (Düzcan, 2003). İnfertil hasta ejakülatlarından morfolojik olarak normal spermin multikolor FISH , seks kromozom anomalilerinin artmış seviyelerini ortaya koymuştur. Ayrıca, azospermik hastaların testis biyopsilerinde yapılan FISH çalışmaları, hastaların germ hücrelerindeki seks kromozom anöploidilerinin insidansında artış olduğunu göstermiştir (Van Asche, 1996). Bu çalışmaların her ikisi de, rutin kan karyotipi veya sperm morfolojisiyle önceden bilinemesi de, yardımcı üreme tekniklerinde genetik olarak anormal spermleri kullanmanın riskini yansıtmaktadır. Bundan dolayı, ICSI'den sonraki hamileliklerde otozomal trizomi ve seks kromozom anöploidilerinin daha yüksek görülmesi şaşırtıcı değildir. Bu nedenle, hastada sayısal veya yapısal bir kromozomal anomali

saptandığında, hastaya genetik danışma verilerek preimplantasyon genetik tanı önerilmeli, prenatal genetik tanı için amniyosentez veya koryonik villus örnekleme tavsiye edilmelidir.

2.13.4. Sperm Fonsiyonlarını Direkt Olarak Etkileyen Genetik Sendromlar

2.13.4.1. Primer Silier Diskinezi (PCD)

Silialı hücrelerin aksonemlerine ait bazı defektleri içeren birçok sendrom tanımlanmıştır. Kartagener ve Usher bu sendromların en bilinen örneklerdir. (Elsawi, 1994) Kartagener sendromu otozomal resesif bir hastalık olup kronik sinüzit, bronşektazi, retinitis pigmentosa ve sağırılık ile karakterizedir. Ağır formlarında mukosilier transportun bozulması ile respiratuar yetmezliğe neden olabilir. Semen analizinde normospermiye rağmen motilite yetersiz ya da tamamen yoktur. Fertilitenin gerçekleşmediği vakalarda ICSI uygulanabilir. Otozomal resesif bir hastalık olmasına rağmen X'e bağlı dominant kalıtımda bildirilmiştir. Normal silier fonksiyon için gerekli genin FISH analizi ile 14q 23'de lokalize olduğu bildirilmiştir (Rutland, 1990). Usher sendromu retinal fotoreseptörler ve odyovestibüler organlardaki silier defekte bağlı olarak retinitis pigmentosa ve sağırılık ile birlikte görülür. Sperm motilitesindeki bozukluk infertiliteye neden olmaktadır (Elsawi, 1994, Rutland, 1990).

2.13.4.2. Noonan Sendromu

Turner sendromunun fenotipik özelliklerine benzer klinik özellikler gösterir. Fasial dismorfizm, kısa boy, pulmoner ve kardiyak problem, bilateral kriptorsidizm (% 77 erkekte) en yaygın belirtilerdir. Özellikle erkek fertilitesi, kriptorşidizm ve yükselmiş plazma FSH düzeyi ile ilişkilidir (Elsawi, 1994). Yüksek FSH ve kriptorşidizimli erkekte ciddi spermatik disfonksiyon görülür. Semen analizinde azospermi veya ciddi oligozoospermi saptanır. Otozomal dominant geçiş gösterir ve kromozom yapısı erkekte 46XY, kadında 46XX'dir. Bu sendrom ile ilişkili farklı kromozomlara ait delesyonlar bildirilmekle beraber henüz aday bir gen ortaya konulamamıştır.

2.13.4.3. Miyotonik Distrofi

Erişkin yaşlarda ortaya çıkan müsküler distrofinin en sık nedeni 19. kromozomun 3' bölgesinde serin-treonin kinaz proteinini kodlayan gendeki CTG trinükleotid tekrarıdır. CTG tekrarlarının olması spermatogenezin azalması ile korelasyon gösterir. Katarakt, müsküler atrofi, endokrinopati en belirgin özellikleridir. Çoğu hasta seminifer tübül hasarına bağlı olarak infertildir. Yapılan bir çalışmada 208 kişilik hasta grubunda; 70 miyotonik distrofi erkekten % 65'inin testiküler atrofi gösterdiği bulunmuştur (Rutland, 1990).

2.13.4.4. Orak Hücre Anemisi

Hemoglobinopatilerin en tipik ve en sık görüleni β -globin zincirini kodlayan gendeki utasyon sonucu gelişen orak hemoglobindir. Onbir nolu kromozomda lokalize olan genin, β zincirin 6. pozisyonunda bulunan glutamin aminoasidinin yerine valin aminoasidi gelerek rahatsızlık oluşur. Otozomal resesif geçiş gösteren hastalık testiküler disfonksiyon, hipotalamik-hipofizer defektler veya çok sayıda kan fransfüzyonuna bağlı olarak gonadlarda demir depoizasyonu sonucu oluşmaktadır (Osegbe, 1987).

2.13.4.5. Genetik Endokrinopatiler

Hormonlar, büyüme faktörleri ve onların reseptörleri ve diğer ilgili sinyal transdüksiyon proteinleri mutasyona uğrayabilir ve hipotalamik pitüiter gonadal aksı etkileyebilir. Bu rahatsızlıklar nadirdir fakat şiddetli erkek infertilite bozukluğu yapabilir. Rahatsızlıklar genellikle, seksüel gelişme ve fonksiyonun endokrin ya da humoral regülasyonunda yer alan spesifik genler içinde mutasyonlar, küçük delesyonlar ya da polimorfik genişlemelerden kaynaklanır.

2.13.4.5.1. Gonadotropinler (GnRH)'in Üretim veya Sekresyon Bozuklukları

GnRH'nin anormal salınımı ve sentezi ile GnRH'nin salınımını takiben FSH ve LH'da anatomik bir sebep olmaksızın düşük düzeyde salınım sonucunda oluşan bozukluklar idiopatik hipogonadotropik hipogonadizm (IHH) olarak ifade edilir. Gonadotropinler normal düzeylerde salgılanmazsa, androjen üretimi ve spermatogenezis yetersiz olur.

2.13.4.5.2. Kallman Sendromu

Erkek infertilitesinde en sık rastlanılan X'e bağlı bozukluktur ve IHH'nin bir sebebi olarak bilinir. Kalman sendromu yaklaşık 10000-60000 canlı doğumda bir görülür. X kromozomunun uzun kolunda lokalize olan Ka1 (Xp22.3) geninde oluşan mutasyon hipotalamustan GnRH sekresyonunda bozukluğa sebep olur. Kallman sendromlu hastalar uzun boylu ve azospermiktirler. Pubertal gelişim gecikmiştir. Bu hastalarda testisin FSH ve LH stimülasyonunun yokluğu sebebiyle, spermatogenezis ve testosteron üretimi yoktur. Bu erkekler sıkı prepubertal boyutta testislere ve küçük penise sahiptir. Hastalar konjenital sağırlığa, kraniyum ve yüz asimetrisine, yarı damak, serebeller disfonksiyon, kriptorşidizm ve renal anomalilere sahip olabilir. Kallman sendromlu pek çok hastada fertilité için yapılan hormon replasman tedavisinin (insan koryonik gonodotropin = hCG ve FSH) sonucu başarılıdır (Bick, 1992). Pek çok gen mutasyonu farklı mekanizmalarla IHH'ye sebep olmaktadır. Bir X kromozom geni olan Dax1, konjenital adrenal hipoplazi ve IHH'ye neden olmaktadır. Dax1 bir nükleer hormon reseptör süper familyasını kodlar ve testis epitelyal bütünlüğünün ve spermatogenezisin devamlılığında fonksiyona sahiptir. Gonadotropin releasing hormon için bir G protein reseptör çiftini kodlayan Gonadotropin releasing hormon reseptörlerinin mutasyonları, üreme disfonksiyonuyla sonuçlanan parsiyel ya da tam hipogonadizme sebep olmaktadır. Gonadotropin releasing hormon sekresyonu PC1 geni tarafından etkilenir. PC1 geni mutasyona uğradığı zaman IHH, obezite ve diyabete sebep olmaktadır (Özdiler, 2000).

2.13.4.5.3. Prader-Willi Sendromu

Obezite, kriptorşidizm, hafif ya da orta mental gerilik ve IHH ile karakterizedir. Kromozom 15'in kısa kolunda oluşan mutasyon ya da delesyon (15q11q13) bu sendroma neden olur. Hastalık babadan ya da daha az sıklıkla bu lokusun 2 kromozomal kopyasının annesinden geçmesi sonucu oluşur (Jaffe, 1996). Genetik, erkek üreme sisteminin pek çok özelliğini etkiler. Fare modellerinde infertiliteyle ilgili 150'den fazla gen gösterilmiştir. Buna rağmen bu bulguların insan erkek infertilitesinde bulunması ve gösterilmesi oldukça yavaştır. Yine de, farelerde gösterilen infertilite gen silinmelerinin önemli bir kısmının erkek infertilitesiyle ilişkili olması olasılığı oldukça güçlüdür. İnsan erkek infertilitesinin moleküler temeli hakkında daha anlaşılmamış pek çok şey vardır. İnsanlardaki genetik rahatsızlıklar bozulmuş spermatogenezise ve ejakülasyon bozukluklarına neden olabilir. Erkek infertilitesinin genetik temelini anlaşılmaması ile yeni tedavi yaklaşımları geliştirilerek bu hastaların çocuk sahibi olabilmeleri başarılacaktır.

2.14. Yardımcı Üreme Teknikleri Başarısızlığı Ve Genetik

Kromozomlardaki polimorfizmler ile ilgili olarak geçmiş yıllardaki bilgiler araştırma yöntemlerinin detaylanması ile giderek değişmekte ve bazı özellikler açıklığa kavuşmaktadır. Bugünkü bilgilerimize göre heterokromatin bölge büyüklük polimorfizmleri içerikleri gereği klinik bulgu vermezler ya da bilinen bir genetik hastalığa yol açmamakla birlikte reproduktif başarısızlık, tekrarlayan spontan düşüklükler gibi kliniğe yansıyan bazı durumlardan son yıllarda kromozom varyasyonları sorumlu tutulmaktadır (Madon, 2005). Akrosentrik kromozomların yapısında bulunan satellit bölgesi ve sentromerler heterokromatin büyüklük polimorfizmi göstermektedir. Akrosentrik olmayan 1, 9 ve 16. kromozomların uzun kollarının parasentrik bölgelerinde ve Y kromozomunun distal bölgesinde de heterokromatin büyüklük polimorfizmleri bulunmaktadır (Madon, 2005). Bu bölgelerdeki heterokromatin artışı qh+ şeklinde karyotipte gösterilirken akrosentrik kromozomların kısa kolunda bulunan satellit artışları ps+ şeklinde rapor edilmektedir (Madon, 2005).

Akrosentrik kromozomların kısa kolunda 18S ve 28S rRNA ve ribozomal proteinleri kodlayan ve nukleolar organize edici bölgeyi (NOR) oluşturan genler bulunur. Kromozom en sık morfolojik varyasyon gözlenen kromozomlardandır. inv' un mitoz hataları ve 21 kromozom trizomisi ile birlikte olduğu bildirilmiştir (Madon, 2005). Kromozomun perisentrik bölgesinde 12 heteromorfik kalıp belirlemiştir. Bu bölgede yer alan tekrarlayan dizilerden oluştuğunu bildirmişler, bu dizilerin akrosentrik kromozomların kısa kollarındaki diziler ile homolog olduğunu tanımlamışlardır.

Tekrarlayan dizilerin bulunduğu sentromerik bölgede mayoz sırasında oluşan değiş tokuşlar sırasında polimorfizmlerin ortaya çıktığını ileri süren çalışmalar ile ilgili bir mekanizmanın bu şekilde açıklanabileceğini bildirmişlerdir. Infertil erkek olgularda kromozom varyantlarının insidansında artış bulunduğu, ancak heterokromatin artışının çoğunlukla raporlarda belirtilmeye gerek duyulmayacak kadar önemsiz bulunduğu bildirilmiştir (Starke, 2002). Heterokromatin polimorfizmi bulunan erkek hastalarda sperm FISH ile anöploidi oranlarında artış saptanmış, bu olgularda yardımcı üreme tekniklerinin uygulanması sırasında daha yüksek başarısızlık ve daha düşük gebelik ve implantasyon oranları bulunduğu bildirilmiştir. Heterokromatinin sperm üretiminde hangi mekanizmayı değiştirerek etkili olduğu henüz bilinmemekle birlikte normal varyant olarak değerlendirilen değişikliklerin detaylı olarak araştırmaları ile sperm üretiminde rol oynayan genler ile nasıl etkileştikleri açıklığa kavuşacaktır.

2.15. Yardımcı Üreme Teknolojisi İle Doğan Bebeklerde Perinatal ve Uzun Dönem Prognoz

Yardımcı üreme teknolojileri fertilizasyonun laboratuvar ortamında ovum ve spermin manipülasyonu ile gerçekleştiği teknolojileri tanımlar. Bu teknikler IVF, ICSI, embriyo kültürü, preimplantasyon genetik tanı (PGT), taze, donmuş embriyo transferi ve donör oositi ile IVF'yi içerir. 1978 yılında İngiltere'de ilk YÜT bebeğinin doğmasından bu yana geçen yaklaşık 30 yılda, dünyada bir milyonun üzerinde bebek bu yöntemler sonucu doğmuştur ve günümüzde gelişmiş ülkelerde tüm gebeliklerin yaklaşık %1-4'ünü bu tip gebelikler oluşturmaktadır (Basatemur, 2008; Reddy, 2007). Ülkemizde ise ilk YÜT bebeği 1989 yılında

İzmir’de doğmuş ve bu tekniğin yaygınlaşması sonucunda son üç yılda yaklaşık 108,000 tüp bebek uygulaması yapıp bunların %25’i canlı doğum ile sonuçlanmıştır. Son 30 yılda YÜT’de önemli gelişmeler olmuştur. Embriyo kriyoprezervasyonu ve ardından daha invaziv bir yöntem olan ICSI, IVF’nin başarısını artırmıştır. PGT’nin gelişmesi, genetik olarak anormal embriyoların tanımlanmasını ve dışlanması sağlamıştır (Wright, 2008).

YÜT bebeklerinin büyük çoğunluğu normal ve sağlıklı olmasına rağmen, günümüzde bu bebeklerin sağlık durumlarının birçok açıdan, doğal gebelik bebeklerine göre daha fazla risk altında olduğu düşünülmektedir. Bunun birçok nedeni vardır; YÜT’de çoğul gebelik riski yüksektir ve bu artmış prematürite ve düşük doğum ağırlığı oranı ile ilişkili olarak perinatal morbidite ve mortalite riskini artırır (Adamson, 2004). Bunun dışında düşük fertiliteli anne-babanın biyolojik ve genetik özellikleri bebek açısından riskli olabilir; düşük fertilitelikte tek başına artmış gebelik ve doğum sorunları ile ilişkilidir; ayrıca infertilite tedavisi için yapılan girişimler ve verilen ilaçlar, fetusta ve yenidoğanda önemli sorunlara yol açabilir. Bu olumsuz etkiler ovülasyonun yapay olarak uyarılması sonucu follikül ortamının ve oosit yapısının değişmesi, sperm ve embriyonun doğal fonksiyonlarını bozucu ortamlar ile karşılaşması, oosit ve embriyoların dondurulması ve manipülasyonu (PGT) olarak sayılabilir (Basatemur, 2008; Halliday, 2007).

Günümüzde YÜT gebelikleri sonucu doğan çocuklar önemli bir sayıya ulaşmasına rağmen, bu çocukların prognozları ile ilgili çalışmaların büyük çoğunluğu yenidoğan ve erken çocukluk döneminin araştırılması ile ilgilidir. Oysa bu çocukların adolesan hatta erişkin döneme kadar izlenmesi uzun dönemli prognozun daha doğru olarak belirlenmesini sağlayacaktır. YÜT gebeliklerinin beraberinde getirdiği maternal, perinatal, neonatal ve uzun dönemli sorunlar çoğul gebelikler ve prematürite, konjenital malformasyonlar ve kromozomal bozukluklar, nörolojik ve gelişimsel sorunlar, fiziksel sağlık ve büyüme sorunları ve malignite riski başlıkları altında incelenecektir.

2.15.1. Perinatal Dönem Sorunları

2.15.1.1. Çoğul gebelikler ve prematürite

YÜT'ün yaygınlaşması ile birlikte iyatrojenik çoğul gebeliklerde önemli bir artış olmuştur. Bunun en önemli nedeni YÜT'de başarının "canlı doğumların sayısı" ile değerlendirilmesi nedeniyle yapılan çoklu embriyo transferleri ve bunların doğuma kadar sağkalımlarıdır (Halliday, 2007; Van Voorhis, 2006). Çoğul gebelik ve bunun sonucu olan preterm doğum tek başına YÜT gebeliklerinin prognozunu olumsuz etkileyen en önemli faktördür. YÜT gebeliklerinin %30'dan fazlası ikiz veya daha yüksek sayılı çoğul gebeliklerdir ve YÜT bebeklerinin yarıdan fazlası (%51) çoğul bebeklerdir. Ayrıca YÜT gebeliklerinde doğal gebeliklere göre artmış olan monozigotik, monokoryonik ikiz gebeliği ("monozygotic twinning" doğal gebelikte %0.45, YÜT gebeliğinde %1.5-4.5) riski de bu artışa katkıda bulunmaktadır (Reddy, 2007; Adamson, 2004; Pinborg, 2005; Alikani, 2003).

YÜT'de ikiz gebelik riski normalden 22 kat (normali %2), üçüz ve daha yüksek sayılı çoğul gebelik riski ise 50 kat (normali %0.18) artmıştır. IVF ve ICSI sonrasında çoğul gebelik hızı Avrupa'da %22.7, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde ise %31.7 olarak bildirilmiştir. ABD'de 2000 yılında 99,629 YUT uygulaması sonucu 25,228 canlı doğum gerçekleşmiş ve 35,025 bebeğin %53'ü çoğul bebek olup, bunun %44'ü ikiz, %9'u ise üçüz ve daha yüksek sayılı çoğul bebeklerdir. Bu ülkede doğan tüm bebeklerin %0.9'unun YÜT sonucu doğduğu, tüm ikizlerin %12'sinin ve tüm üçüzlerin %43'ünün YÜT bebeği olduğu bildirilmiştir (Reynolds, 2000). YÜT dışı infertilite tedavilerinin kullanımı ve kadınların çocuk sahibi olmayı doğal çoğul gebelik riskinin yüksek olduğu ileri yaşlara erteleme eğilimi de çoğul gebeliklerin sıklığının artmasına katkıda bulunmuştur. Bunun yanında aile isteği de çoğul gebelik sayısını artıran faktörlerden biridir. YÜT uygulanan infertil çiftlerin yaklaşık %20'si çoğul gebelik ile ilişkili riskler konusunda ayrıntılı olarak bilgilendirilmiş olsalar bile, çoğul bebek sahibi olmayı istemektedir (Adamson, 2004, Ryan , 2004; Blennborn, 2005).

Çoğul gebelikte gebeliğin nasıl oluştuğundan bağımsız olarak artmış maternal, uteroplental ve fetal komplikasyonlar vardır. Maternal morbiditelerden, özellikle hipertansiyon ve preeklampsi, gestasyonel diyabet, anemi, polihidramniyos, antepartum ve postpartum kanama ve maternal mortalite riski artmıştır. Fetal ve neonatal etkilerin en önemlileri ise prematürite, düşük doğum ağırlığı, konjenital malformasyonlar, mortalite ve sağkalanlar arasında uzun dönemli nörogelişimsel bozukluklardır. Genel popülasyonda preterm doğum riski ikizlerde tekizlere göre beş kat fazladır ve ikizlerin %50'si düşük doğum ağırlıklıdır (< 2500 g) (Norwitz, 2005). 2005 yılında yapılan ve 2003 yılına kadar yapılmış olan IVF/ICSI ikiz gebeliklerin incelendiği çalışmaları değerlendiren bir metaanalizde, bu ikizlerde preterm doğum (OR 1.57, %95 GA 1.01-2.44), sezaryen ile doğum (OR 1.33, %95 GA 1.06-1.67) ve yenidoğan yoğun bakım ünitesine alınma riski (OR 2.22, %95 GA 1.64-3.02) doğal ikizlere göre daha yüksek bulunmuştur (McDonald, 2005). IVF/ICSI ikiz gebeliği olan kadınlarda plasenta previa, antepartum kanama, gestasyonel diyabet ve preeklampsi gibi perinatal komplikasyonlar daha sık görülür ve bunlar esas olarak preterm eylem nedenidir. Bununla birlikte günümüze kadar elde edilen kanıtlar, YÜT ile oluşan çoğul gebeliklerin, doğal yolla oluşan çoğul gebeliklere göre olumsuz perinatal prognoz için artmış bir risk altında olduğunu düşündürmemiştir (Reddy, 2007; Smithers, 2003; Joy, 2008). Son yıllarda, YÜT'ün neden olduğu çoğul gebelik sorununun çözümüne yönelik olarak birçok ülkede tek bir IVF/ICSI siklusunda uterusu transfer edilen embriyo sayısına sınırlama getirilmiştir (Bergh, 2005). Bazı İskandinav ülkelerinde yasalar ile "tek embriyo transferi" zorunlu hale getirilmiş ve bu çoğul gebelik hızını %5'e kadar düşürmüştü, buna karşılık transfer başına gebelik oranı %30-40'larda korunmuştur (Bergh, 2005). ABD'de 2006 yılında Yardımcı Üreme Teknolojisi Derneği ve Amerikan Üreme Tıbbı Derneği tarafından güncellenen ve YÜT'de transfer edilecek embriyo sayısı ile ilgili rehberde, 35 yaşın altındaki hastalarda tek embriyo transferi yapılması önerilmiştir. Cochrane grubunun yaptığı ve bir IVF/ICSI siklusunda tek embriyo transferi ile çift embriyo transferinin prognoz açısından karşılaştırıldığı bir sistematik analizde, her iki grupta benzer gebelik oranları olmasına rağmen, çift embriyo transferinde çoğul gebelik riski istatistiksel olarak çok yüksek bulunmuştur (OR 62.83, %95 GA 8.52-463.57) (Pandian, 2005). Benzer şekilde çift embriyo transferinde, tek embriyo transferine göre preterm doğum, düşük doğum ağırlığı ve yenidoğan yoğun bakım ünitesi bakımını gerektiren neonatal morbiditelerin sıklığı daha fazla bulunmuştur (Kjellberg, 2006).

YÜT ile oluşan çoğul gebelikler perinatal morbidite ve mortaliteyi artırmasına rağmen, çoğul gebeliklerin önlenmesi olumsuz perinatal prognoz riskini azaltmada tek başına yeterli değildir. Literatürde birçok metaanalizde YÜT sonucu doğan tekiz bebeklerde doğal gebelik sonucu doğan tekiz bebeklere göre prematürite, düşük ve çok düşük doğum ağırlığı, gebelik yaşına göre küçük olma, yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlenme ve neonatal morbidite ve mortalite riskinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Benzer şekilde plasentaprevia, antepartum kanama, erken membran rüptürü, preeklampsi ve gestasyonel diyabet gibi perinatal maternal komplikasyonlar da IVF/ICSI tekiz gebeliklerde daha sık görülmektedir. Burada ilginç olan nokta bu perinatal komplikasyonların IVF/ICSI tekizlerde ikizlere göre daha fazla olmasıdır (Basatemur, 2008, Jackson, 2004; McDonald, 2005).

Tekiz IVF/ICSI bebeklerin prognozunu belirleyen faktörlerden biri de fetal ölümdür (multifetal gebelik redüksiyonu). Embriyonik dönemde 6. haftadaki IVF ikiz keselerin %25'i 20. gebelik haftasında fetuslardan birinin ölümü nedeniyle tekize dönüşür, %7'sinde her iki fetus ölür ve %69'u ise ikiz gebelik olarak devam eder. Bir çalışmada spontan fetal redüksiyon oranının yüksek olduğu IVF çoğul gebeliklerde (ikizlerde %35, üçüzlerde %52), spontan fetal redüksiyon sonrası kalan tekiz veya ikiz fetusların doğumda gebelik yaşının ve doğum ağırlığının, redüksiyona uğramamış bebeklere göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Halliday, 2007).

Değişik YÜT tiplerinde perinatal morbidite risklerinin farklı olabileceği de bildirilmiştir. Bir çalışmada IVF tekiz gebeliklerde prematürel riski, ICSI ikiz gebeliklerde ise ölü doğum ve intrauterin büyüme geriliği riski daha yüksek bulunmuştur (Ombelet, 2005). Bununla birlikte YÜT gebeliği ile ilişkili değişik olumsuz sonuçlara katkıda bulunabilecek ve henüz etkileri tam olarak incelenmemiş birçok faktör bulunmaktadır. Annenin yaşı, obstetrik öyküsü, infertilite nedeni ve süresi, sigara içme durumu, YÜT'ün tipi (IVF veya ICSI) ve embriyoya kriyoprezervasyon veya fetal redüksiyon yapılması gibi birçok faktörün prognoz üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir.

2.15.1.2. Konjenital malformasyonlar ve kromozomal bozukluklar

YÜT'ün yaygın olarak kullanılması ile birlikte bu yöntemlerin konjenital anomali sıklığında artışa neden olup olmadığı konusu önem kazanmıştır. Ancak bu konuda literatürde çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen, çalışmalar arasındaki metodolojik farklılıklar, yetersiz vaka sayısı, standart bir konjenital anomali tanımının olmaması, infertilite nedeni ve potansiyel parental genetik katkıların dikkate alınmaması gibi nedenlerle sonuçlar oldukça tartışmalıdır (Sutcliffe, 2997). Birçok metaanalizde YÜT bebeklerinde, doğal gebelikler sonucu doğan bebeklere göre konjenital anomali riskinin %29- 41 oranında artmış olduğu gösterilmiştir. 2002 yılında yayınlanan bir çalışmada doğal gebelik bebeklerinde %4.2 olan konjenital anomali sıklığı IVF gebeliği bebeklerinde %9.0 olarak bulunmuştur. IVF ve ICSI tekizlerde anne yaşı, parite, bebeğin cinsiyeti ve kardeş öyküsünün etkisi ortadan kaldırıldıktan sonra bu risk için OR 2.2 olarak bulunmuştur (Hansen, 2005).

Yakın zamanda yayınlanmış topluma dayalı iki çalışmada YÜT bebeklerinde, YÜT-ilişkili riskler ve altta yatan parental infertilite nedenlerinden tam olarak ayıramamasına rağmen, konjenital anomali riskinin artmış olduğu bildirilmiştir . IVF ve ICSI bebeklerinde konjenital anomalilerin prevalansı ile ilgili bir metaanalizde 19 çalışma incelenmiş ve konjenital anomali riski için kümelenmiş OR 1.29 (%95 GA 1.01-1.67) olarak bulunmuştur (Rimm, 2004). Finlandiya'da yapılan, nüfus kayıtları temeline dayalı ve 4559 IVF bebeği, 4467 diğer YÜT bebeği ve 27,078 kontrol bebeği içeren bir çalışmada, konjenital anomali riski için OR 1.3 (%95 GA 1.1 1.6) olarak bulunmuştur. Bu riskin tekiz erkeklerde arttığı, çoğul kızlarda ise azaldığı belirtilmiştir. IVF tekiz erkek bebeklerde majör ürogenital ve kas-iskelet sistemi anomalileri daha sık bulunmuştur. YÜT en güçlü olarak hipospadias ve diğer ürogenital sistem anomalileri, nöral tüp defektleri, gastrointestinal anomaliler, kas-iskelet anomalileri ve kardiyovasküler anomaliler ile ilişkili bulunmuştur (Klemetti, 2005). Buna karşılık IVF ve ICSI yöntemi ile doğan bebekler arasında konjenital anomali riski açısından fark bulunmamıştır. Danimarka'da yapılan bir çalışmada infertil çiftlerden doğal gebelik veya YÜT gebeliği sonucu doğan tekiz bebeklerde, fertil çiftlerden doğal gebelik sonucu doğan tekiz bebeklere göre konjenital anomali sıklığı daha yüksek olarak bulunmuştur (doğal

gebelikte OR 1.2, %95 GA 1.07-1.35, YÜT’de OR 1.39, %95 GA 1.23-1.57). İnfertil çiftlerden doğal veya YÜT gebelikleri sonucu doğan tekiz bebeklerde konjenital anomalilerin ortalama prevalansı arasında önemli bir fark bulunmamıştır. Bu sonuç YÜT sonucu oluşan gebeliklerdeki artmış konjenital anomali riskinin tedavi tekniğinden çok, infertil çiftin genetik ve biyolojik özelliklerinden kaynaklandığını düşündürmüştür (Basatemur, 2008; Zhu, 2005).

YÜT’de özellikle, erkek infertilitesi nedeniyle uygulanan ICSI’da sayısal ve yapısal kromozomal anomalisi riskinin hafifçe arttığı bildirilmiştir. Sekiz bin üç yüz on dokuz canlı ICSI bebeğin incelendiği bir çalışmada, de novo seks kromozom anöploidisi (%0.6 vs. %0.2) ve yapısal otozomal kromozom anomalisinde (%0.4 vs. %0.07) hafif fakat önemli bir artış belirlenmiştir. Ancak, bütün bu anomalilerde tedavi etkisinin, infertilite nedeninin etkisinden ayırt edilmesi mümkün değildir, çünkü infertil erkeklerde Y kromozomu uzun kolundaki mikrodelesyonları ve translokasyonları içeren kromozomal anomalileri daha sıktır. Benzer şekilde YÜT uygulanan infertil kadınlarda da kromozom anomalisi riski daha yüksektir (Van Steirteghem, 2002).

Konjenital malformasyonlar ve kromozomal bozukluklar dışında YÜT bebeklerinde başka genetik bozukluklar olabileceği de bildirilmiştir. YÜT sonrası Beckwith- Wiedemann sendromu, Angelman sendromu ve Russel-Silver “dwarfism” gibi seyrek görülen “imprinting” bozuklukları riskinin arttığını bildiren çalışmalar olmasına rağmen, sonuçlar tartışmalıdır. YÜT ile oldukça seyrek görülen bu bozukluklar arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılması için daha çok sayıda vaka içeren çalışmalara gereksinim vardır (Paoloni-Giacobino, 2006; Maher, 2003).

2.15.2. Uzun Dönem Sorunları

2.15.2.1. Nörogelişimsel prognoz

İskandinav ülkelerinde topluma dayalı yapılan birkaç çalışmada IVF tekiz bebeklerde doğal tekiz bebeklere göre serebral palsi riskinin 1.6-3.7 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalardan yapılan regresyon analizi bu artmış riskin daha çok yüksek çoğul gebelik, prematürite ve düşük doğum ağırlığı sıklığı ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Çoğul

bebelerde tekiz bebeklere göre serebral palsi riski dört kat fazla olmasına rağmen, IVF ikizler ile doğal ikizler arasında serebral palsi sıklığı açısından fark bulunmamıştır (Basatemur, 2008, Stromberg, 2002). 2008 yılında yayınlanmış bir sistematik derlemede bugüne kadar IVF-ICSI bebeklerinin nörogelişimsel prognozu konusunda yapılan çalışmalar analiz edilmiş ve bunlardan metodolojisi iyi olan 23'ü değerlendirilmiştir. Bu derlemede IVF/ICSI'nin tek başına ağır algılama bozukluğu (mental retardasyon) veya nöromotor engel (serebral palsi) riskini artırmadığı, bu riskin YÜT'ün preterm doğum ile ilişkili olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Aynı zamanda literatürde YÜT bebeklerinin nörogelişimsel değerlendirmesinin çoğunlukla süt çocukluğu döneminde yapıldığı, bu sürenin yeterli olmadığı ve ince motor ve konuşma bozuklukları gibi sorunların belirlenebilmesi için bu çocukların okul çağı boyunca izlenmesi gerektiği belirtilmiştir (Middelburg, 2008).

Bunun dışında YÜT çocuklarında epilepsi riskinin orta derecede arttığını destekleyen kanıtlar vardır. İsveç YÜT ulusal kayıt sistemi verilerine göre 1-11 yaş arasındaki IVF çocuklarında, doğal gebelik sonucu doğan çocuklara göre epilepsi nedeniyle hastaneye yatırılma riski daha yüksek bulunmuş (OR 1.54, %95 GA 1.10-2.15) ancak yalnızca zamanında doğan bebekler değerlendirildiğinde, her iki grup arasında epilepsi riski açısından fark bulunmamıştır (Ericson, 2002). Danimarka'da yapılan bir çalışmada subfertil çiftlerin (konsepsiyon için geçen süre > 12 ay) doğal veya YÜT gebeliği sonucu doğan tekiz çocuklarında, fertil (konsepsiyon için geçen süre < 6 ay) çiftlerin tekiz çocuklarına göre 0-6 yaş arasında epilepsi riski daha yüksek bulunmuş (OR 1.38 ve 1.83) ancak, prematüre bebekler çıkarıldığında bu fark kaybolmuştur. Bu nedenle YÜT çocuklarındaki artmış epilepsi riskinin büyük ölçüde parental subfertilite nedenine ve prematüriteye bağlı olduğu düşünülmüştür (Sun, 2007). Birçok prospektif kontrollü çalışmada, YÜT ve doğal gebelik çocukları arasında 5-8 yaşlarında nörolojik prognoz ile ilgili fark bulunmamıştır (Bonduelle, 2005).

YÜT ile doğan bebeklerin nörogelişimsel (algılama, dikkat, konuşma, dil yeteneği, davranış) prognozları ile ilgili olarak yapılmış araştırmaların büyük çoğunluğunda, bu çocuklarda doğal gebelikler sonucu doğan çocuklara göre olumsuz bir sonuç belirlenmemiştir. Finlandiya'da yapılan bir çalışmada 299 IVF çocuğu ve 558 doğal gebelik çocuğu 12. ay, 18. ay, iki ve üç yaşta psikomotor gelişim açısından Bayley ölçeği ile değerlendirilmiş ve her iki

grup arasında fark bulunmamıştır (Koivurova, 2003). Avrupa’da beş ülkenin katılımı ile yapılan ve YÜT ile doğan, gebelik yaşı ≥ 32 hafta olan, tekiz çocukların beş yaşına kadar nörogelişimsel izlemlerinin yapıldığı bir çalışmada ise 511 ICSI, 424 IVF ve 488 doğal gebelik sonucu doğan çocuk karşılaştırılmış ve bu üç grup arasında nörogelişimsel özellikler açısından fark bulunmamıştır (Ponjaert-Kristofferse, 2005). PGT yapılan bebeklerin nörogelişimsel izlemleri ile ilgili de az sayıda yayın vardır. Yaşları 3 ay-4 yaş arasında değişen 49 PGT ve 66 doğal gebelik sonucu doğan bebeğin nörogelişimsel durumları arasında fark bulunmamıştır (Banarjee, 2008).

2.15.2.2. Büyüme ve fiziksel sağlık

Neonatal dönem sonrası büyümeyi inceleyen çalışmaların büyük çoğunluğu YÜT veya doğal gebelik sonucu doğan bebeklerin büyümesi arasında fark bulmamıştır. IVF ve ICSI bebeklerinin 6-12 ay, 1-3 yaş, 5 yaş, 8 yaş ve 6-12 yaşındaki izlemlerinde vücut ağırlığı, boy ve baş çevrelerinin normal olduğu gösterilmiştir (Bonduelle, 2004; Knoester, 2008).

YÜT gebelikleri sonucu doğan çocuklarda çocukluk çağı hastalıklarının sıklığı ve şiddeti ile ilgili bilgiler ise tartışmalıdır. Aileler ile görüşme sonucu elde edilen verilere dayanan bir çalışmada, YÜT gebeliği sonucu doğan çocuklarda beş yaşına kadar ciddi bir çocukluk çağı hastalığı geçirme sıklığı, doğal gebelik sonucu doğan çocuklara göre daha yüksek bulunmuştur . Başka bir çalışmada ise IVF çocuklarında üç yaşına kadar özellikle solunum sistemi hastalıkları ve ishalin daha sık görüldüğü bildirilmiştir . Benzer şekilde YÜT gebeliği çocuklarının fizyoterapi, diyet ve ortopedik tedaviler için hastanelere daha fazla başvurduğu, bu çocukların neonatal dönem sonrası hastane bakım masraflarının doğal gebelik sonucu doğan çocuklara göre 2.6 kat fazla olduğu belirtilmiştir (Bonduelle, 2007; Koivurova, 2007). Ancak birçok çalışmada YÜT ve doğal gebelik sonucu doğan çocuklarda sekiz yaşına kadar çocukluk çağı hastalıkları ve kronik hastalıkların sıklığı açısından fark bulunmamıştır.

Literatürde tekiz IVF/ICSI çocuklarının daha fazla cerrahi girişim geçirdiği özellikle beş yaşına kadar küçük kulak ameliyatlarının (timpanik dren, adenoidektomi) daha sık yapıldığı bildirilmiştir . Başka bir çalışmada ise IVF/ICSI erkek çocuklarında genitouriner sistem bozukluklarının daha fazla olması nedeniyle, genitouriner sistem operasyonlarının daha fazla yapıldığı bildirilmiştir (Bonduelle, 2004).

2.15.2.3. Malignite riski

YÜT bebeklerinin uzun süreli izlemi ile ilgili yapılan çalışmalarda retinoblastom hariç diğer çocukluk çağı maligniteleri açısından artmış bir risk bildirilmemiştir. Bir çalışmada Hollanda'da beş IVF çocuğunda retinoblastom geliştiği bildirilmiştir. Hollanda'da retinoblastom insidansının 1/17,000 canlı doğum olduğu, bu durumda YÜT çocuklarında %1-1.5 olarak hesaplanan insidansın neden olduğu rölatif riskin 4.9-7.2 arasında değiştiği belirtilmiştir (Moll, 2003). Literatürde 1994-2004 yılları arasında yayınlanmış ve IVF bebeklerindeki kanser insidansını araştıran çalışmaların değerlendirildiği bir meta-analizde IVF ile çocukluk çağı kanserleri arasında bir ilişki bulunmamıştır (Raimondi, 2005). Sonuç olarak, YÜT bebekleri ile doğal bebekler arasında perinatal ve uzun dönemli prognoz açısından bazı farklar vardır ve bu farklar özellikle perinatal dönemde tekiz IVF bebeklerde daha belirgindir. IVF bebeklerde preterm doğum riski daha yüksektir ve konjenital anomali riskli %25-40 daha fazladır. Ancak uzun dönemde IVF/ICSI bebeklerinde nörogelişimsel sorunların riskinin daha yüksek olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır. YÜT gebeliğinde doğru amaç tek embriyo transferi yapılarak tekiz ve sağlıklı bir bebeğin doğmasını sağlamak olmalıdır.

3. GEREÇ-YÖNTEM

Bu çalışma Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Yardımla Üreme Teknikleri merkezine infertilite şikayetiyle başvuran çiftlere çalışmanın amacı ve yapıma şekli anlatılarak gönüllülük esasına göre yazılı bilgilendirme formu imzalatılarak yapılmıştır.

Çalışma, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Komitesi tarafından 6/12 karar numaralı ve 2013/63 proje numarası ile 12.03.2013 tarihinde onaylanmıştır.

3.1. Örnek Seçimi ve Hasta Grubu

Çalışmada, Normospermik, Astenospermik ve Teratospermik hastaların sperm örnekleri kullanıldı. Sperm örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizden sonra merkezimizde sperm verme odasında alındı. Sperm örnekleri likefiye olduktan sonra spermiyogram analizleri yapıldı. 2010 WHO kriterlerine göre numuler Normospermik, Astenospermik ve Teratospermik olmak üzere üç gruba ayrıldı. Kruger kriterlerine göre normal morfolojisi \leq %4 olanlar teratozoospermi, WHO kriterlerine göre motilitesi %40' ın altında olan vakalarda astenozoospermi, normal morfolojisi \geq 4 ve hareketi %40 ' ın üzerinde olanlar ise normozoospermi, olarak değerlendirildi. Bu işlemi takiben sperm örnekleri TUNEL, İMMÜNHİSTOKİMYA, WESTERN-BLOT ve FİSH analizleri için ayrıldı.

Çalışmada normospermik ve astenospermik sperm örneklerinin hareket parametrelerini karşılaştırırken, sentrozom yapısında bulunan sentrin ve tubilin proteinlerini kullanmayı amaçladık. İmmünfloresan, Western-Blot ve İmmünohistokimya da Primer antikor olarak SantaCruz firmasına ait Alfa Tubulin antibody Mouse monaklonal, sc-8035(USA) ve Sentrin Mouse monaklonal sc-365697(USA) , sekonder antikor olarak Goat-anti mouse hrp, Bio Rad 170-5040 (USA) kullanıldı.

Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Yardımla Üreme Teknikleri merkezine infertilite şikayetiyle başvuran çiftlerden, androloji laboratuvarında yapılan spermiyogram sonucuna göre sayısal ve yapısal sperm anomalisi olan 35 astenospermik, 35 teratospermik toplam 70 hasta ile 20 normospermik hastayı ise kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Sperm örnekleri WHO(2010) kriterlerine göre analiz edilmiştir.

Çizelge 3. 1. 2010 WHO Sperm Kriterleri

Parametreler	En Düşük Referans Değer
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (10 ⁶)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP,%)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR,%)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm,%)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar,%)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (10 ⁶ per ml)	<1.0
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2.4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	>20

3.2. Semen Analizi

3.2.1. Makroskopik Değerlendirme

Sperm örnekleri; likefaksiyon, görünüm, hacim, viskozite ve pH açısından değerlendirildi.

3.2.1.1. Likefaksiyon

Eld edilen örneklerin oda ısısında 15-60 dakika likefiye olması beklendi (WHO, 2010; Delilbaşı, 2008).

3.2.1.2. Görünüm

Likefaksiyondan sonra 1 saat içerisinde yapıldı. Normalde homojen, gri-opak görünümde olan semen örnekleri Normal (N) olarak değerlendirildi.

3.2.1.3. Volüm

Steril enjektör veya dereceli pipete çekilerek değerlendirildi.

3.2.1.4. Viskozite

Likefiye olduktan sonra semen 5 ml' lik bir pipete çekildi ve kendi ağırlığı ile pipetin ucundan damlaması sağlandı. Bu sırada akarak uzayan damlanın boyu ölçüldü. Viskozite, sübjektif olarak 4 dereceli bir skalada değerlendirildi: (WHO, 2010)

Ø : Viskozite normal

+ : Biraz artmış viskozite

++ : Orta derecede artmış viskozite

+++ : Çok artmış viskozite

3.2.1.5. pH

Bunun için 6.1- 10.0 arasında indikatör kağıtlar kullanıldı. Bir damla semen örneği bu indikatör üzerine damlatıldı. Oluşan renk değışimi, skala ile karşılaştırılarak pH tayin edildi. Normal pH değeri 7.2- 8.0 arasındadır (WHO, 2010).

3.2.2. Mikroskopik Değerlendirme

Spermatozoon konsantrasyonu ve motil spermatozoon yüzdesi (motilite) WHO kriterlerine göre belirlenerek faz kontrast mikroskobu ile değerlendirme yapıldı (WHO, 2010; Delilbaşı, 2008). Spermatozoon konsantrasyonu ve motil spermatozoon yüzdesinin belirlenmesi için Makler Sayım Kamerası kullanıldı .

3.2.2.1. Konsantrasyon

Makler Sayım Kamerasının ortasına 10 µm semen örneği konup üst kapak kapatılarak X20 büyütme altında yan yana 10 kare sayılarak mililitredeki spermatozoon sayısı tespit edildi (WHO, 2010).

3.2.2.2. Motilite

Lineer motilitesi olan spermatozoonların (+4, +3) toplam yüzdesi ise toplam hareketlilik olarak belirlendi (WHO, 2010; Delilbaşı, 2008).

Şu şekilde sınıflandırıldı:

- +4 Hızlı ileri (progresif) hareketli
- +3 Yavaş ileri (progresif) hareketli
- +2 Yerde hareketli
- +1 Hareketsiz (immotil)

3.2.2.3. Total Motil Sayı

Bir ml 'deki ileri, hızlı ve ileri hareketli spermatozoon sayılarının oranıdır.

Total Motil sayı = (ml 'deki spermatozoon sayısı x hacim) / Motilite (%) şeklinde hesaplandı. (WHO, 2010; Delilbaşı, 2008).

3.2.2.4. Aglutünasyon

Motil spermatozoonlara antisperm antikorlarının bağlanmaları nedeni ile baş-baş, orta parça-orta parça, kuyruk-kuyruk ya da benzer şekillerde birbirlerine yapışmalarıdır. Aglutünasyon immünolojik infertilite için düşündürücü bir parametredir (WHO, 2010; Delilbaşı, 2008)

Değerlendirme kriterleri:

- Ø : Aglutünasyon yok
- + : Artmış Aglutünasyon
- ++ : Çok artmış Aglutünasyon

3.2.2.5. Morfoloji

Morfolojik değerlendirme için Kruger'in kesin kriterlerine göre ışık mikroskopisinde değerlendirildi. (WHO, 2010; Delilbaşı, 2008).

3.2.2.6. Kruger'in Kesin Kriterleri

- Spermatozoon başı ovoid ve düzgün konturlu olmalı, iyi sınırlanmış bir akrozomal kılıf içermelidir.
- Baş boyutları, 4–6 mikron x2–3 mikron x1,5 mikron olmalıdır.
- Akrozom, baş alanının %40–70' ini kaplamalıdır.
- Akrozom altında kalan bölümlerin konturları düzgün olmalıdır.

- Boyun, orta parça ve kuyruk anomalisi olmamalıdır.
- Orta parça silindirik ve baş ile aksiyel olmalıdır.
- Orta parça eni 1 mikron, uzunluğu baş uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır.
- Orta parça sitoplazmik artık içermemelidir.
- Kuyruk uniform, orta parçadan daha ince ve 45–55 mikron uzunluğunda olmalıdır.
- Kesin kriterlere göre morfolojik değerlendirmede dikkat edilecek noktalar:
- Spermatozoonun tümünün morfolojik yapısı değerlendirilmelidir.
- Değerlendirme x100 büyütme alanında yapılmalıdır.
- Değerlendirme esnasında hücre kümelerinin bulunduğu bölgelerdeki spermatozoonlar dikkate alınmamalıdır (WHO, 2010; Delilbaşı, 2008).

Mikroskopik değerlendirmede spermatozoon sayısı, motilitesi yine 2010 WHO kriterlerine göre ve morfolojisi de Kruger'in kesin kriterlerine göre değerlendirildi (WHO, 2010; Delilbaşı, 2008).

3.3. Örneklerin FISH Analizine Hazırlanması

3.3.1. Örneklerin Yıkınması

1. Sperm örnekleri santrifüj tüpüne aktarıldı. Santrifüj tüpü 1800 rpm de 6 dakika santrifüje edilip ve supernatant atılmıştır.

2. Pelet üzerine tekrar 5 ml 0.01M Tris-0.9%NaCl ilave edilip pipetaj yapıldıktan sonra santrifüj edilmiş ve aynı işlem iki kez daha tekrarlanmıştır.

3.3.2. Preparasyon

1. Son santrifükasyondan sonra pelet 0.15 ml 0.01M Tris-0.9% NaCl ile süspanse edilmiştir.

2. Süspanse edilen peletten, daha önce temizlenmiş lamlara, iki lama üzerinde bir alan olacak şekilde yayma yapılmıştır.

3. Yayma yapılan preparatlar oda ısısında kurutulmuştur.

3.3.3. Fiksasyon

Kuruyan preparatlar 3:1 metanol/asetik asit dolu şaleye konmuştur. +4 °C de bir gece bekletilmiştir.

3.3.4. Dekondenzasyon

1. Fikse edilmiş sperm preparatları 0.1M Tris/10mM DTT dolu şalede 30 dakika oda ısısında bekletilmiştir.

2. Süre sonunda preparatlar 0.1M Tris/10mM LIS/1mM DTT bulunan şalede oda ısısında 3 saat bekletilmiştir.

3. Preparatlar 2xSSC solüsyonunda çalkalanarak kurutulmuş ve FISH işlemine kadar --20 °C de saklanmıştır.

3.3.5. FISH Tekniğinin Uygulaması

3.3.5.1 .Preparatların Ön Yıkaması ve Denatürasyonu

1. Preparatlar her biri 1 dakika olmak üzere sırasıyla % 100–70–50–30 luk alkol serisinden geçirilerek dehidre edilmiştir.

2. Dehidre edilen preparatlar 1 dakika oda ısısındaki 0.1 XSSC solüsyonundan geçirilmiştir.

3. Ardından preparatlar 70 °C deki 2XSSC solüsyonuna alınmış ve bu ısıda 30 dakika bekletilmiştir.

4. Süre sonunda 2XSSC solüsyon ısısının 37 °C ye gelmesi beklenmiştir.

5. Daha sonra preparatlar 1 dakika oda ısısındaki 0.07 M lık NaOH solüsyonunda denatüre edilmiştir.

6. Denatürasyonu takiben preparatlar sırasıyla 1 dakika +4 °C de 0.1XSSC ve +4 °C de 2XSSC de bekletilmiştir.

7. Sırayla preparatlar % 30 – 50 – 70 – 100 lük alkol serisinde geçirilerek kurumaya bırakılmıştır.

3.3.5.2. Prob Denatürasyonu

Prob seti su banyosunda 5 dakika 70 °C de bekletilerek denatüre edilmiştir.

3.3.5.3. Hibridizasyon

1. Her preparata uygulanacak çoklu prob setinin bulunduğu ependorf tüpleri santrifüj edilerek tüm probun dibe çökmesi sağlanmıştır.

2. Denatüre edilen preparatlarda belirlenen 2 alana proplar (5 µl prob seti-1 ve 5 µl prob seti-2) eklenmiş ve her iki alan üzererine 20 mm lik kare lamel kapatılmıştır.

3. Lamel çevresi su girmemesi için yalıtılmıştır.

4. Preparatlar 37 °C de bir gece nemli ortamda hibridizasyona bırakılmıştır.

3.3.5.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

1. Hibridizasyonu tamamlanan preparatlar etüvden çıkartılarak lamellerin çevresindeki yalıtım maddesi dikkatlice temizlenmiştir.

2. Preparatlar, oda ısısındaki 2XSSC solüsyonunda hafifçe çalkalanarak lameller preparatlardan uzaklaştırılmıştır.

3. Preparatlar 74 °C deki 1XSSC solüsyonunda 5 dakika bekletilmiştir.

4. Sonrasında preparatlar oda ısısındaki 2XSSC/T-20 solüsyonunda 5 dakika bekletilmiştir.

3.3.5.5. Hibridize Olan Bölgelerin Görüntülenmesi

1. Hibridizasyon sonrası yıkamaları yapılan preparatlar 4XSSC/DAPI solüsyonunda 2 dakika bekletilmiştir.

2. Süre sonunda preparatlardaki alanlara 15 µl antifade eklenmiş ve lamel ile kapatılmıştır.

3. Preparatlar inceleme aşamasına kadar – 20 °C de ve karanlıkta bekletilmiştir.

3.3.5.6 . Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Preparatlar Olympus BX61 Floresan mikroskobunda uygun filtrelerle incelenmiştir. İlk önce DAPI filtresi kullanılarak uygun metafaz taraması yapıldı. Uygun metafaz tesbit edildikten sonra, kırmızı ve yeşil spektrumlu filtreler kullanılarak sinyaller gösterildi. Her lam için prob başına 200 sperm nükleusu değerlendirildi. Floresan mikroskoba bağlı bilgisayar sistemi Applied Image Analyser (USA) ile sinyaller analiz edilmiş ve Sensys (Olympus,USA) kamera aracılığıyla resimlendirilmiştir. Analiz sonunda sayısal kromozom anomalilerinin (dizomi, nullizomi ve diploidi v.s.) oranı ortaya konmuş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda FISH analizlerini, Cytocell-aquaris marka prenatal kit problemleri ile gerçekleştirildi. Katalog no.LPA 001, problemler;

Prob Seti 1:

X sentromer Xp11.1-q11.1 (DXZ1) Yeşil

Y sentromer Yp11.1-q11.1 (DYZ1) Turuncu

18 sentromer 18p11.1-q11.1(D18Z1) Mavi

Prob Seti 2:

13 dizi (13q14.2) Yeşil

21 dizi (21q22.13) Turuncu

FISH analizleri kullanılan problemlere göre yapılmıştır.

20XSSC Solüsyonu	
NaCl(3 M)	175,3 gr
Tri Sodyum Sitrata(0,3 M)	88,24 gr
Distile Su	1000 ml

0,1XSSC Solüsyonu	
20XSSC	3 ml
Distile su	597 ml
Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır	

0,07M NaOH(Preparatların Denatürasyon Solüsyonu)	
1M NaOH	14 ml
Distile su	200 ml

Hibridizasyon Sonrası Solüsyonlar

1XSSC Solüsyonu	
20XSSC	10 ml
Distile su	190 ml
2XSSC Solüsyonu	
20XSSC	20 ml
Distile su	180 ml
2XSSC/Tween-20 Solüsyonu	
20XSSC	20 ml
Tween 20	100 µl
Distile su	180 ml
Tüm solüsyonlar HCl ile pH 7.0 a ayarlanır	

Görüntüleme Sistemleri Solüsyonu

DAPI/Antifade Solüsyonu	
2XSSC	20 ml
DAPI	100 µl
Distile su	180 ml

3.4. Western Blot

3.4.1. Protein İzolasyonu

Protein izolasyonunu Bio-Rad Protein Extraction Kit (Soluble/İnsoluble)(USA) kullanarak gerçekleştirdik. Sperm protein izolasyonu İnsoluble şekilde istediğimiz konsantrasyonlarda elde ettik.

Sperm örneklerinin bulunduğu tüpler işlem sırasında buz üzerinde tutuldu. Örnekler buldukları tüpten çıkartılarak falkon tüplere aktarıldı ve soğuk PBS ile hafifçe çalkalandı. 15 dakika santrifüj edildikten sonra supernatant atıldı. Daha sonra tüpte bulunan sperm örneklerinin (yaklaşık 250µl) üstlerine 250µl 2-D Rehydration Buffer, 2.5 µl Ampholyte , 2,5µl proteaz inhibitörü eklendi. Oluşan pellet eriyene kadar karıştırıldı. Daha sonra 10 dakika vorteks işlemi uygulandı. Bu işlemden sonra sonikasyon işlemi gerçekleştirildi.

Sonikasyon probu %70 etil alkol ile temizlendi. Örneklerin, içerisinde buz parçalarının bulunduğu bir beherin içinde tutuldu. Homojenizatörün probu beher içerisindeki sperm örneklerinin bulunduğu cam tüpe yerleştirildi ve homojenizatörün forward, reverse basamakları 3'er kez kullanılarak sperm örneklerinin parçalanması sağlandı. Cam tüp içerisindeki örnek yeni bir tüpe aktarıldı ve 20000 rpm'de 20 dakika 18-20 °C santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında prosedüre uygun olarak dokudan protein elde edilmesi işlemi gerçekleştirildi.

SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Protokolü

Ayırma Jeli (% 12)

Ayırma jeli (% 12) hazırlamak için aşağıdaki karışım hazırlandı;

Saf su :1,75 ml

1.5 M Tris.Cl pH 8.8 :1,25 ml

% 30 Akrilamid/bisakrilamid :2 ml

% 10 SDS (Sodyum dodesil sülfat) :50 µl

% 10 APS (Amonyum persulfat) :25 µl

TEMED :2,5 µl

Yükleme Jeli (% 4)

Yükleme jeli (% 4) hazırlamak için aşağıdaki karışım hazırlandı;

Saf su :1,50 ml

0.5 M Tris.Cl pH 6.8 :625 µl

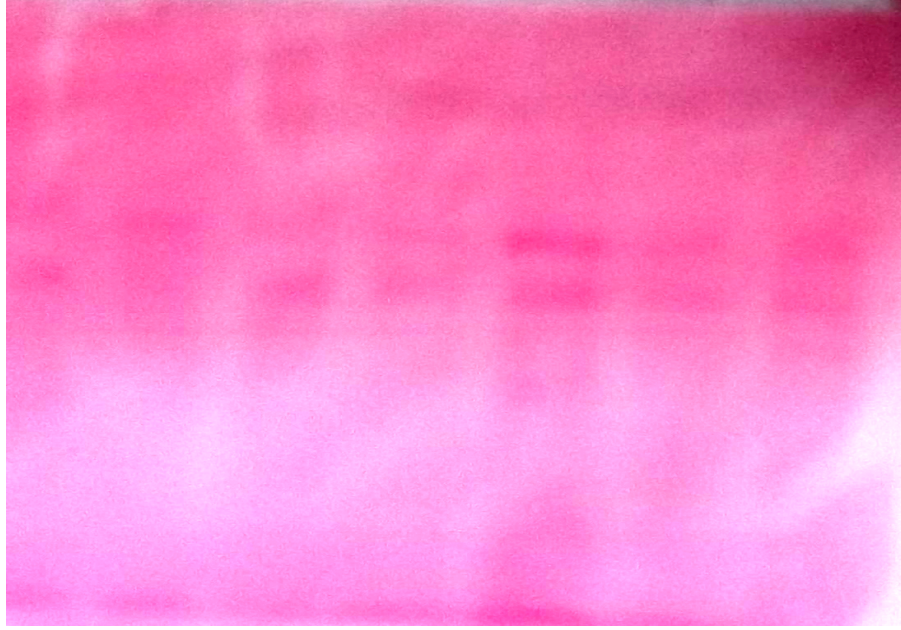
% 30 Akrilamid/bisakrilamid :325 µl

% 10 SDS :25 µl

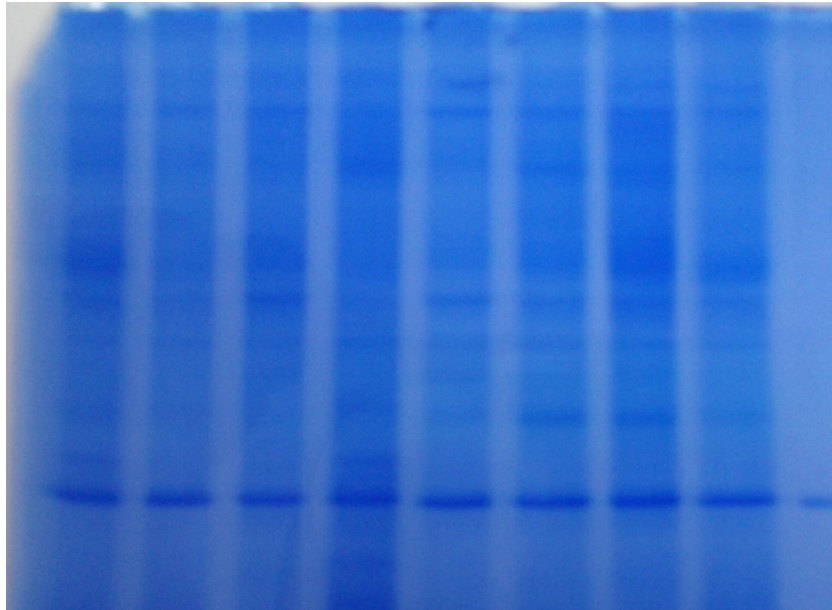
% 10 APS :12,5 µl

TEMED :2,5 µl

İki ucu açık dikdörtgen cam plakalar arasına önce ayırma jeli üstten 5 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Üst yüzeyine 2 mm yüksekliğe kadar izopropanol pipet ile eklendi. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol saf su ile uzaklaştırıldı. Kurutma kâğıdı ile cam plakalar arası temizlendi ve ayırma jeli eklenerek yüklemeye tarağı yerleştirildi. Polimerize olan jel tanka yerleştirildi. Protein çözeltileri 95°C'de 3 dakika kaynatılarak buz üzerine alındı ve kısa bir santrifüjden sonra mikropipet yardımıyla her bir deney grubu için eşit miktarlarda yüklemeye gözlerine pipet yardımıyla eklenerek 180V'da 60 dakika jelde yürütüldü.



Şekil 3. 1. Western transfer sonrası Ponceau-S ile boyanmış bantlar



Şekil 3. 2. Protein izolasyonu sonunda SDS-PAGE' de yürütülmüş protein bantları

Protein örnekleri SDS-PAGE ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldıktan sonra jel nitroselüloz membrana transfer edilerek hedef protein için analiz edildi. Western Blot için yarı kuru transferi sağlayan Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, ABD) cihazı kullanıldı. SDS-PAGE jeli cam plakalar arasından transfer tamponunun içine alınarak 10 dakika bekletildi. Süre sonunda sırasıyla 3 whatman kağıdı, 7cm'lik jel, membran ve tekrar 3 whatman kağıdı şeklinde sıralandıktan sonra sabit 15V elektrik akımıyla 30 dakikada negatif yüklü proteinlerin katottan (-) anoda (+) geçişi sağlandı.

Transfer sonunda membran üzerindeki proteinler Ponceau S (C.I. 27195 Millipore Merck USA) ile geri dönüşümlü olarak boyanarak transfer verimi ve eşit miktarda örnek yüklemesi yapıldığı kontrol edildi. Saf su ile Ponceau S boyası uzaklaştırıldıktan sonra membran %5 bloklama tamponu ile oda ısısında 1 saat çalkalanarak bloklandı. Süre sonunda membran 3 kere TBST (Tris- Buffered Saline Tween 20) solüsyonu ile sırasıyla 15- 5-5 dakika çalkalanarak yıkandı.

Membran üreticinin tavsiye ettiği oranda TBST içinde dilüe edilen birinci antikorlardan; Santa Cruz sc-8035 ve sc-365697 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda membran 3 kere TBST solüsyonu ile sırasıyla 15- 5-5 dakika çalkalanarak yıkandı. İkinci antikorlardan; Goat-anti mouse hrp, Bio Rad 170-5040 ile belli oranda TBST içinde dilüe edilerek eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Tekrar üç kere TBST solüsyonu ile yıkandı ve görüntüleme yapmak için hazırlandı.

Görüntüleme ECL Western Blotting detection reagents kiti(Bio-Rad) kullanılarak yapıldı. Kemilüminesans sinyal üretimini sağlayan reaksiyon ile membran üzerindeki proteinler belirlendi. Bunun için eşit miktarda alınan Immun-Star HRP Peroxide tamponu ve Immun-Star HRP Luminol/Enhancer (Bio-Rad, ABD) karıştırılarak membran üzerine yayıldı. 1 dakikalık bir bekleme sonrasında fazla sıvı alındı ve membran plastik streç film ile sarılarak Hypercassette (Amersham, Biosciences) içerisine yerleştirildi. Karanlık odada membran üzerine oluşan ışığı algılayabilecek bir X-ray filmi yerleştirildi ve sinyalin film üzerine yansımaları için bir süre bekletildi. Daha sonra oluşan sinyal, film 3 dakika developer çözeltisinde, 30 saniye saf suda ve 1 dakika fikser çözeltisinde yıkandıktan sonra hedef protein

film üzerinde görünür hale geldi. Oluşan bantların yoğunluğu İmaj J(2.1.4.7 windows) görüntüleme programı kullanılarak ölçüldü. Okunan değerler karşılaştırılmak üzere kaydedildi.

3.5. İmmün Floresan Boyama

Boyama protokolünü takip etmek için, fiksasyon ve boyama basamaklarını boyama işlemini gerçekleştireceğimiz parafilm üzerine yazıldı. Kullanmadan önce cover-slip leri distile su ile yıkayıp kuruttuk, sperm örneklerini PBS ile yıkadıktan sonra cover-sliplerin üzerine 20 µl olarak yaydık ve kurummasını bekledik, daha sonra fiksasyon ve boyama basamakları gerçekleştirildi;

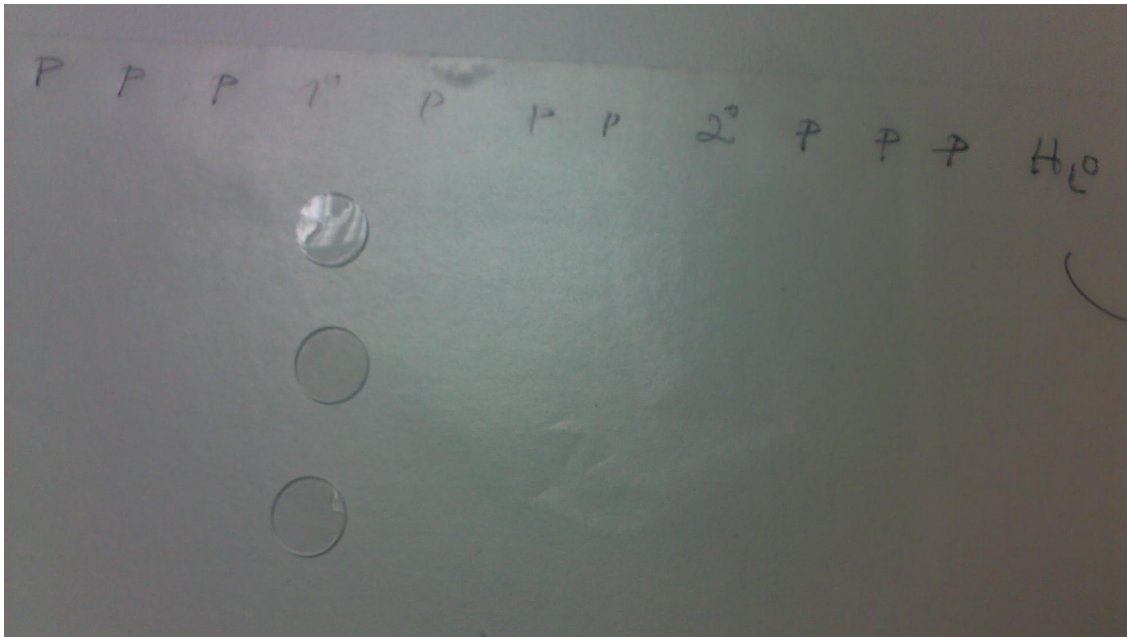
1. %3 lük formaldehitte sperm hücrelerini 20 dakika fiske ettik,
2. Kullanımdan önce 50 m M NH₄CL₂ mikro santrifüj tüplerine alarak oda sıcaklığına gelmesini sağladık,
3. Fiksasyon işleminden sonra cover-slipleri 5 dakika 3' er kez olmak üzere PBS ile yıkadık,
4. Yıkama işleminden sonra, cover-slipler 50m M NH₄CL₂ ye 5 dakika süreyle işleme alındı,
(Buradaki amaç serbest aldehyitleri ortamdan uzaklaştırmaktır)
5. Bu işlemin ardından, tekrar 5 dakika X 3 PBS ile yıkandı,
6. Cover-slipler, % 0.5 lik Triton -X100' te 2 dakika tutuldu,
7. Yıkama işlemi 5 dakika X 3 kez yapıldı,
8. Yıkama işleminden sonra, 1/100 oranında dilüe edilmiş primer antikor ile 45 dakika inkübe edildi,
9. İnkübasyon sonrası, 15',5'5' olmak üzere PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi,
10. Yıkama işleminin devamında 1/100 oranında dilüe edilmiş Sekonder antikor (Teksas Red ile bağlanmış) ile inkübasyon edildi,

11. Sekonder antikordan sonra tekrar 5',5',5' olmak üzere yıkama işlemi gerçekleştirildi, üçüncü yıkama işleminde, 10 ml ye 0.5 mikro litre olacak şekilde dilüe edilmiş DAPI kullanıldı.

12. Boyama işleminden sonra cover-slipler, suda 4-5 kez daldırıldı ve tuzlardan arındırıldı,

13. Slaytların üzerleri yaklaşık 8 mikrolitre moviol ile kaplanıp, mikroskopta inceleme yapıldı.

Hazırladığımız preparatlar karanlık ortamda immünfloresan mikroskop altında incelendi, sperm baş yapısı mavi renkte kuyruk ve antikorların bağlandığı alanlar kırmızı renkte gözlemlendi.



Şekil 3. 3. İmmün floresan boyama basamakları. Primer antikorda (Tubulin) inkübasyon süreci

3.6. Tunnel Yöntemi

Tunnel uygulamasını Millipore, ApotTag- Plus Fluorescein In Situ Apoptosis Detection Kit S7111(USA) referanslarıyla gerçekleştirildi.

1. Sperm hücreleri özel lamlara yayılıp oda ısısında kurumaları beklendi daha sonra %1' lik paraformaldehitte 10 dakika fikse edildi,
2. İki kez PBS ile 5 dakika yıkandı,
3. Boyama işlemine kadar +4°C de bekletildi,
4. Boyamaya geçmeden önce preparatlar, -20 °C de 2:1 oranında Etanol:Asetik Asit te 5 dakika bekletildi(Permabilizasyon için),
5. Daha sonra PBS ile 5 dakika 2 kez yıknadı,
6. Equilibration Buffer 10 saniye işleme alındı,
7. Ardında hızlı bir şekilde nemli ortamda ışıktan korunacak şekilde 1 saat 37°C de Working Strenght TdT Enzyme ile inkübasyona alındı,
8. İnkübasyon sonrası, 10 dakika Stop/Wash Buffer ile yıkamaya alındı,
9. Kullanımdan önce Anti-digoxijen conjugate oda sıcaklığına gelmesi için küçük tüplere alındı,
10. Stop/Wash Bufferdan sonra preparatlar tekrar 5 dakika PBS ile yıkandı,
11. Yıkamadan sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında 30 dakika Anti-digoxijen conjugate ile inkübasyona alındı,

12. İnkübasyon sonrası preparatlar 2 dakika 4 kez PBS ile yıkandı,
13. Üzerleri DAPI ile kaplandı ve mikroskopta incelemeye alındı.

Preparatlar floresan mikroskobunda (Olympus BX51) fotoğraflanarak her preparat başına ortalama 200 hücre sayılarak TUNEL tekniği ile % olarak hesaplandı. Sağlıklı spermlerden sinyal alınmazken, apoptozis olan spermelerde yeşil renkte sinyaller alındı. Dapi kullanıldığından, sağlıklı spermeler mavi renkte görüldü. Ortak filtre kullanıldığından apoptozise uğramış spermeler mavi zeminde yeşil renkli sinyalleriyle gözlendi.

4. İSTATİKSEL ANALİZ

Değişkenler ortalama \pm ss ve medyan (25. - 75. persantil) olarak gösterildi. İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Nümerik değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov Testi ile test edildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olmayan değişkenler için Kruskal Wallis Tek Yönlü Varyans Analizi ve Dunn Çoklu karşılaştırma testi, Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Önemlilik için $p < 0.05$ kullanıldı.

5.BULGULAR

Çalışmamızdaki normozoospermi grubunun yaş ortalaması 31,75 ($\pm 1,2$), astenozoospermia grubunun 31,02 ($\pm 0,9$), teratozoospermi grubunun ise 31,57 ($\pm 0,9$) olarak bulundu. Kontrol grubu olarak kullanılan normospermi grubunun yaş ortalaması ile astenospermi ve teratospermi gruplarının yaş ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. P değeri 0,924 bulduk (Çizelge 5.1).

Çalışmada kullanılan sperm örnek miktarının ortalamaları normozoospermi grubunda 3,04 ml, astenospermi grubunda 3,41 ml ve teratospermi grubunda ise 3,69 ml idi ve aralarında istatistiksel açıdan bir fark yoktu ve P değerini 0,392 olarak bulduk (Çizelge 5.1).

Tüm olguların spermatozoon sayısı ortalaması 55,30 $\times 10^6/\text{mL}$ ' dir , normozoospermi spermatozoon sayısı ortalaması 78,24 $\times 10^6/\text{mL}$ iken astenozoospermia olgularında bu ortalama 41,76 $\times 10^6/\text{mL}$, teratozoospermi grubunun ortalaması ise 45,91 $\times 10^6/\text{mL}$ olarak bulduk. Bu üç grupta spermatozoon sayıları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,005$) (Çizelge 5.1). Üç grubu kendi içerisinde analiz ettiğimizde astenozoospermi ile teratozoospermi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Astenozoospermi ile normozoospermi grupları ve teratozoospermi ile normozoospermi grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu, sırasıyla P değerleri, $P < 0,007$ ve $P < 0,013$ bulduk. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda normozoospermi grubunda medyan değeri 70,50 ($\times 10^6$), astenozoospermi grubunda 41,76 ($\times 10^6$), teratozoospermi grubunda ise 45,91 ($\times 10^6$) olarak bulduk.

Çalışma gruplarımızı oluşturan olguların motilitesi için medyan değerleri sırasıyla normozoospermi %59, astenozoospermi grubu için %30, teratozoospermi grubu için %50 ve normozoospermi için %57 olarak saptanmış ve gruplar karşılaştırıldığında Çizelge 5.1de görüldüğü gibi istatistiksel anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0,000$). Bu üç grubu kendi içlerinde karşılaştırdığımızda teratozoospermi ile normozoospermi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ve P değeri 1,00 olarak bulduk. Astenozoospermi-

teratozoospermi ve astenozoospermi-normozoospermi grupları arasında yaptığımız istatistiksel analizde her iki karşılaştırmada anlamlı farklar bulundu, P değerleri sırasıyla 0,000 ve 0,000 dir.

Hareketlilik bakımından üç grubu incelediğimizde, toplamda progressif hareket için medyan değerleri normozoospermi grubunda % 50, astenozoospermi grubunda %19 ve teratozoospermi grubunda ise % 42,80 olarak bulduk ve bu üç grup arasında yapılan istatistiksel analiz anlamlı bulundu ve P değeri 0,000 olarak bulduk. İleri hareketli spermatozoon (+4) medyan değerleri normozoospermi olgularında % 5,0 , astenozoospermi olgularında %0,0, teratozoospermi grubunda ise % 5,0 olarak bulduk ve bu üç grup arasında yapılan istatistiksel analiz anlamlı çıktı ve P değerini 0,000 bulduk (Çizelge 5.1).

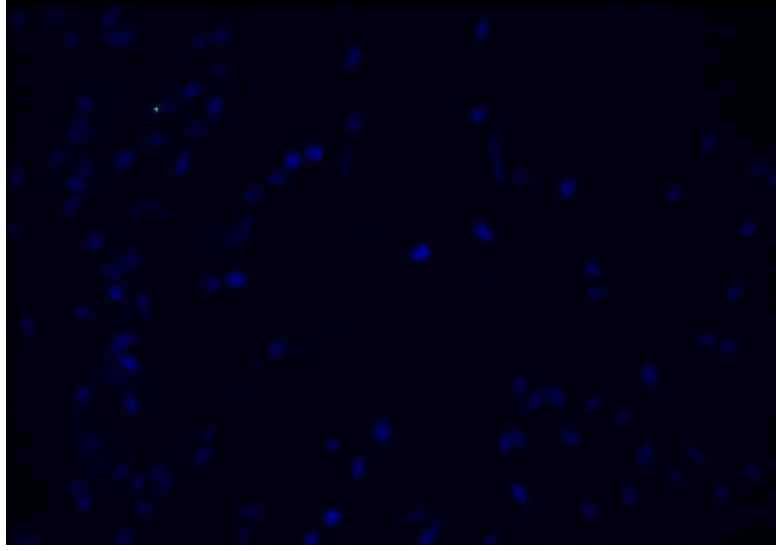
Normozoospermi olgularında ileri motil spermatozoon (+3) medyan değeri %42,5 iken astenozoospermi olgularında %18 teratozoospermi olgularında ise %37 olarak bulduk. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlıydı P değerini ($p<0,000$) olarak bulduk (Çizelge 5.1).

Lökosit sayısı açısından değerlendirme yaptığımızda üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı, P değerini 0,150 olarak bulduk. Üç grubun medyan değerleri sırasıyla normozoospermi grubunda 0,5 ($\times 10^6$), astenozoospermi grubunda 0,8 ($\times 10^6$), teratozoospermi grubunda 0,4 ($\times 10^6$) olarak bulduk (Çizelge 5.1).

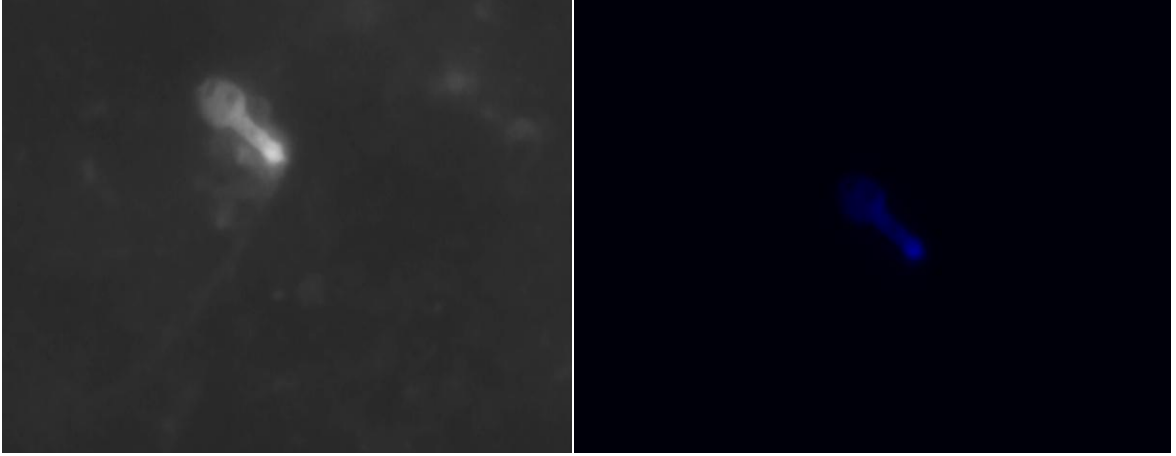
Morfolojik yüzde değerleri açısından incelediğimizde ise üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ve P değerini 0,000 olarak bulduk. Medyan değerleri normozoospermi grubunda % 8 , astenozoospermi grubunda % 5,0 iken teratozoospermi grubunda ise % 0 olarak bulduk (Çizelge 5.1).

TUNNEL metodu sonucu olarak yüzdesini belirlediğimiz DNA apoptozis sonuçları her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı çıktı P değeri 0,013 olarak bulduk. Medyan değerleri sırasıyla normozoospermi grubunda % 6,0 , astenozoospermi grubunda 10,0 ve teratozoospermi grubunda ise % 13 olarak bulduk (Çizelge 5.1). Üç grubu kendi içerisinde ikili gruplar olarak karşılaştırdığımızda normozoospermi-astenozoospermi grupları arasında

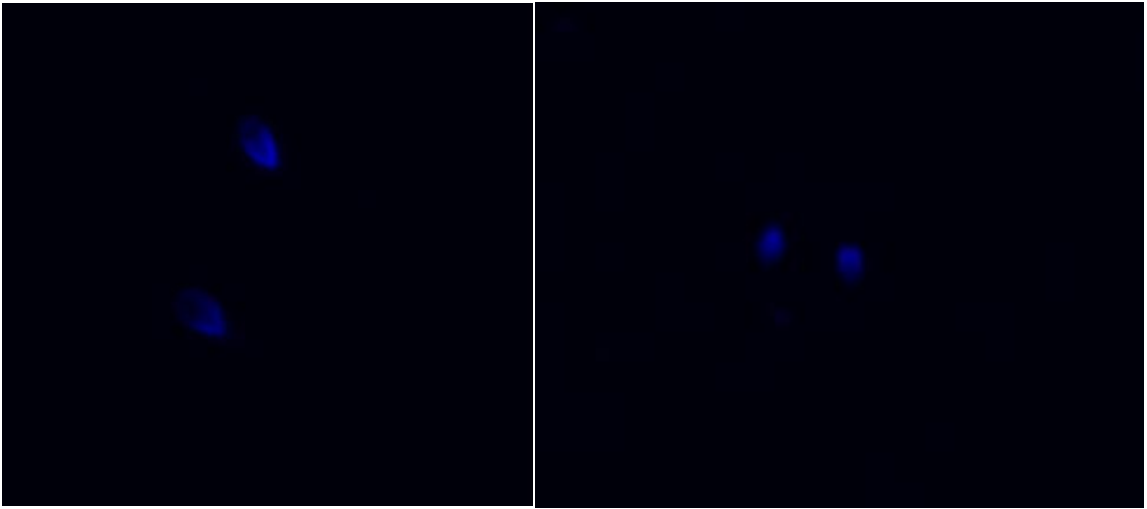
anlamli fark bulunamadi. Normozoospermi- teratozoospermi ile astenozoospermi- teratozoospermi gruplari arasinda ise istatiksels olarak anlamli farklar bulunmustr. İki karşılaştırmanın P değerleri sırasıyla 0,033 ve 0,046 olarak bulduk.



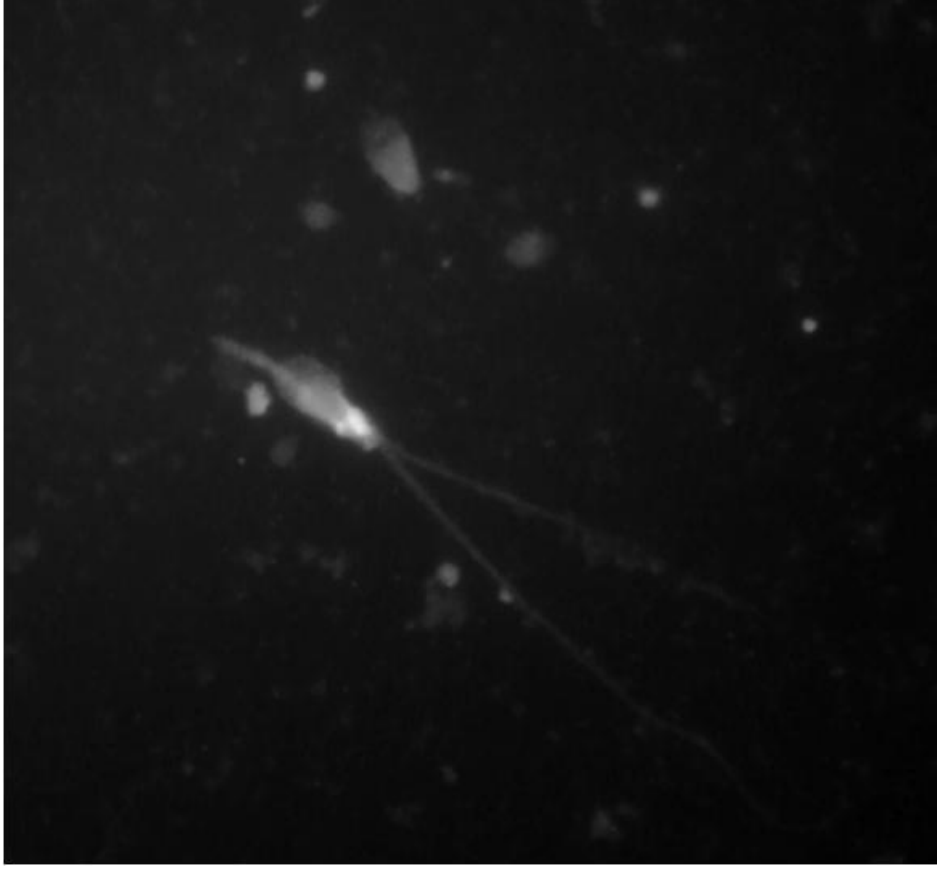
şekil 5. 1. Normozoospermi grubu Tunnel boyama yöntemi, apoptozis görülmeyen sperm mavi renkte DNA yapıları görülmekte,X20 İvert Mikroskop



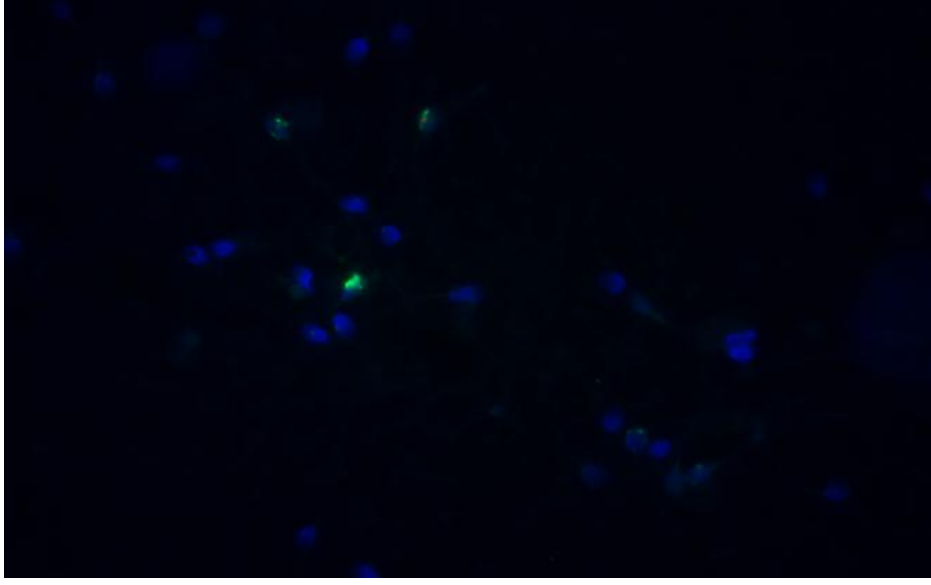
Şekil 5. 2. Teratozoospermi grubuna ait solda baş, boyun ve kuyruk anomalisi olan sperm X20 invert mikroskop ; sağda immünfloresan mikroskopta Dapi filtresindeki görüntüsü X20.



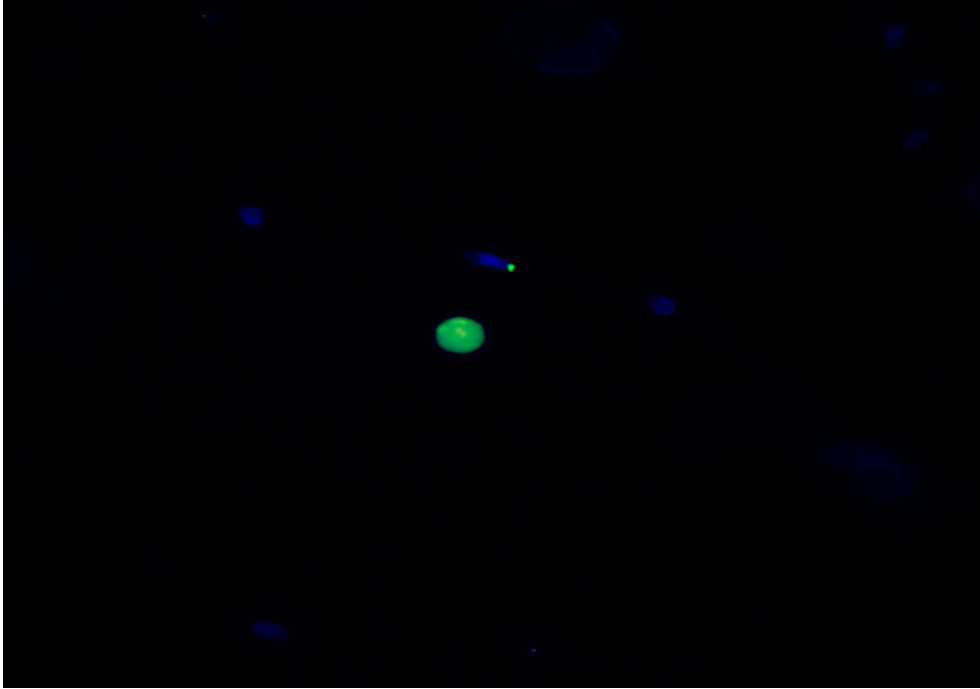
Şekil 5. 3. Sağda Normozoospermi grubuna ait sağlıklı spermler X20 immünfloresan, solda Asterozoospermi grubuna ait sağlıklı spermleri X40 immünfloresan



Şekil 5. 4. İmmünfloresan mikroskofta karanlık alanda Teratozoospermi grubu çift kuyruklu Sperm X40 görüntüsü



Şekil 5. 5. Teratozoospermi grubu mavi zeminde yeşil sinyaller alınan apoptozise uğramış spermler X20 objektif



Şekil 5. 6. Normozoospermi grubu apoptozise uğramış ve sağlıklı spermler X20 objektif

Çizelge 5. 1. Normozoospermi, Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları spermiyogram ve Tunnel bulguları

	Normo Spermi (n=20)	Medyan Değeri	Asteno Spermi (n=35)	Medyan Değeri	Terato Spermi (n=35)	Medyan Değeri	P Değeri
Yaş	31,75	30	31,02	30	31,57	32	,924
Volum	3,04	3,45	3,41	3,0	3,69	3,40	,392
Sperm Sayısı	78,24	70,50	41,76	37	45,91	36	,005
Sperm Motilite	59,55	59,00	29,31	30,00	55,60	57,00	,000
Sperm Progresyon	48,70	50,00	21,57	19,00	42,80	41	,000
+4 Hareket	6,75	5,0	1,0	0,00	4,14	5,0	,000
+3 Hareket	41,00	42,5	20,25	18,00	38,65	37,00	,000
Morfoloji	8,65	8,0	5,40	5,0	0,48	0,0	,000
Lokosit Sayısı	0,69	0,5	1,36	0,8	0,63	0,4	,150
Tunnel	9,1	6,0	10,62	10,0	20,77	13,0	,013

Çizelge 5. 2. Normozoospermi ve Astenozoospermi grupları western-blot , immünofloresan bulguları

	Normo Spermi (n=20)	Medyan Değeri	Asteno Spermi (n=35)	Medyan Değeri	P Değeri
Western -blot Tubilin	205038,00	45378,00	18733,54	1679,00	,000
Western- blot Centrin	76565,45	37677,55	10178,60	1680,00	,000
İmmünfloresan Tubilin	59,00	60,00	38,28	40,00	,000
İmmünfloresan Centrin	54,60	61,00	41,62	42,00	,016

Sentrozom yapısındaki sentrin ve tubilin proteinlerinin western-blot yöntemiyle elde ettiğimiz bantların konsantrasyonlarını karşılaştırdığımızda normozoospermi ve astenozoospermi grupları arasında her iki protein için istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu. P değerleri tubilin için 0,000 iken centrin için 0,000 olarak bulduk. Medyan değerleri tubilin için normozoospermi grubunda 45378,00 , astenozoospermi grubunda 1679,00 olarak bulduk. Sentrin için ise normozoospermi için 37677,55 astenozoospermi grubunda ise 1680,00 olarak bulduk. Her iki protein için normozoospermi grubu istatistiksel olarak daha yüksek konsantrasyona sahiptir (Çizelge 5.2.).



Şekil 5. 7. Normozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı)



Şekil 5. 8. Normozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Sentrin antikoruna karşı)



Şekil 5. 9. Normozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Sentrin antikoruna karşı)



Şekil 5. 10. Normozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı)



Şekil 5. 11. Astenozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı)



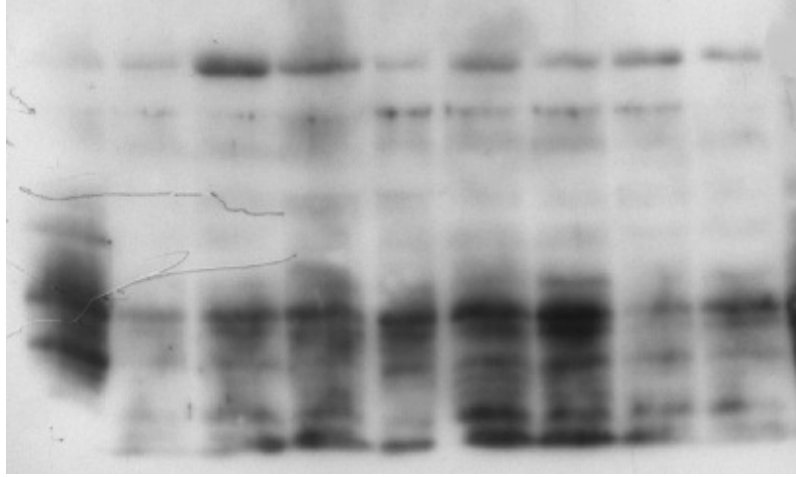
Şekil 5. 12. Astenozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı)



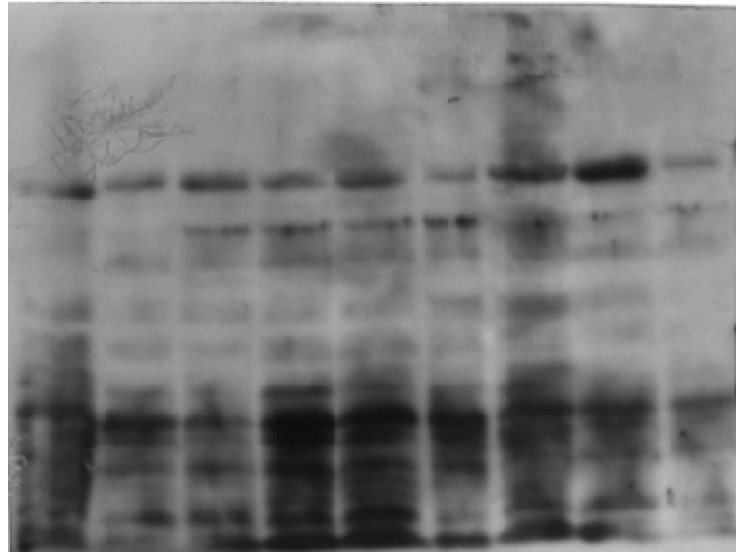
Şekil 5. 13. Astenozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Sentrin antikoruna karşı)



Şekil 5. 14. Astenozoospermi grubu Western Blot bantları (monoklonal Tubilin antikoruna karşı)



(a)



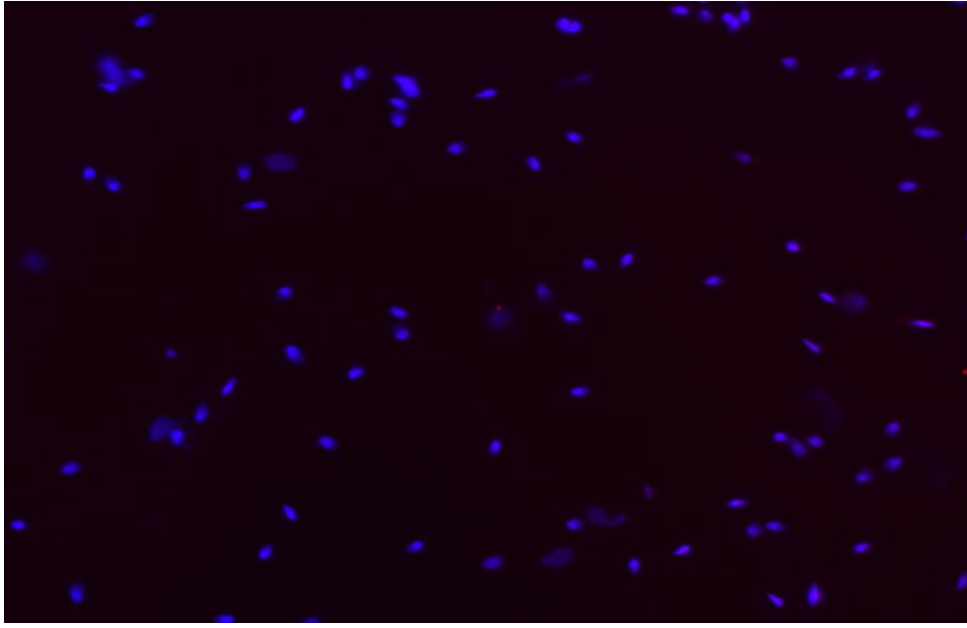
(b)

Şekil 5. 15. a. Normozoospermi grubu (monoklonal Tubilin antikoruna karşı) bantları

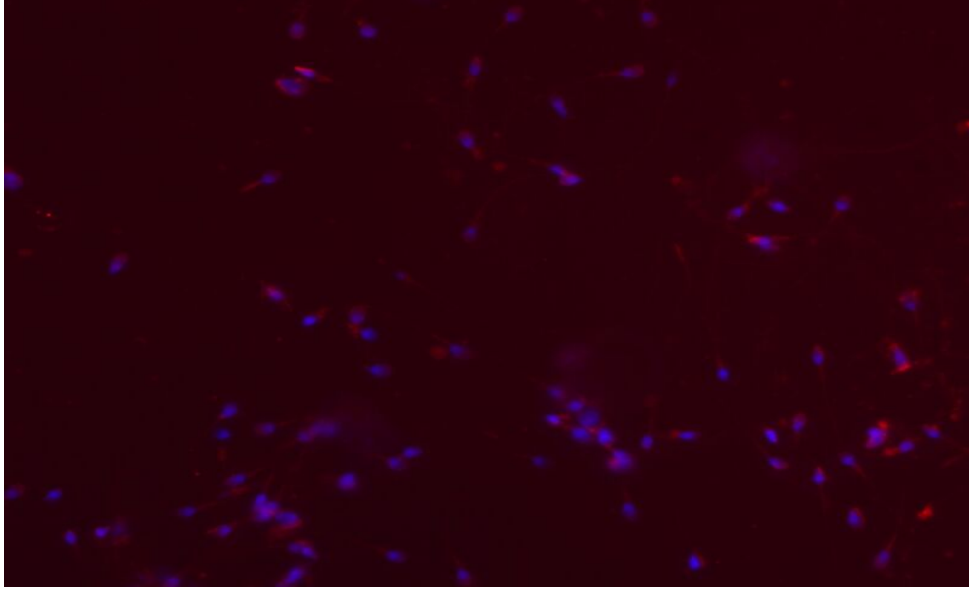
b. Normozoospermi grubu (monoklonal Sentrin antikoruna karşı) bantları

Tubilin ve sentrin proteinlerinin immünfloresan boyama sonucu elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırdığımızda normozoospermi ve astenozoospermi grupları arasında her iki protein boyamasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulduk P değerleri tubilin için 0,000 ,

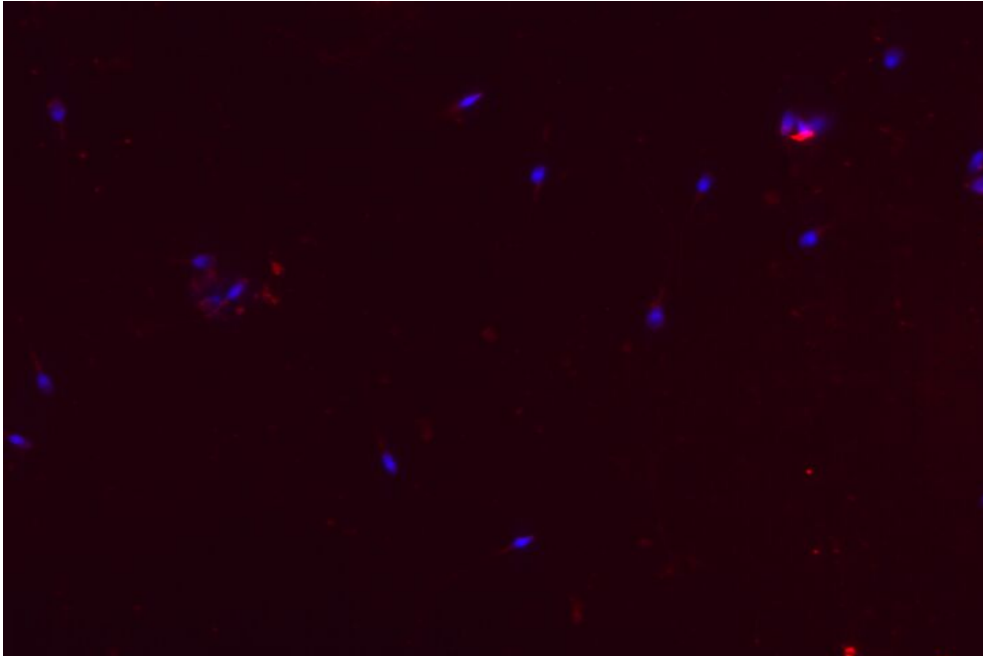
sentrin için 0,016. Medyan değerleri tubilin için normozoospermi grubunda % 60, astenozoospermi grubunda ise % 40 olarak bulduk. Sentrin için ise medyan değerleri normozoospermi grubunda %61 astenozoospermi grubunda ise % 42 olarak bulduk (Çizelge 5.2.). Normozoospermi grubu her iki protein için istatistiksel olarak daha yüksek bulduk ve burada bulunduğumuz sonuçlar western-blot sonuçlarıyla paralellik gösterdi böylece iki analizde de öngördüğümüz sonuçları bulduk.



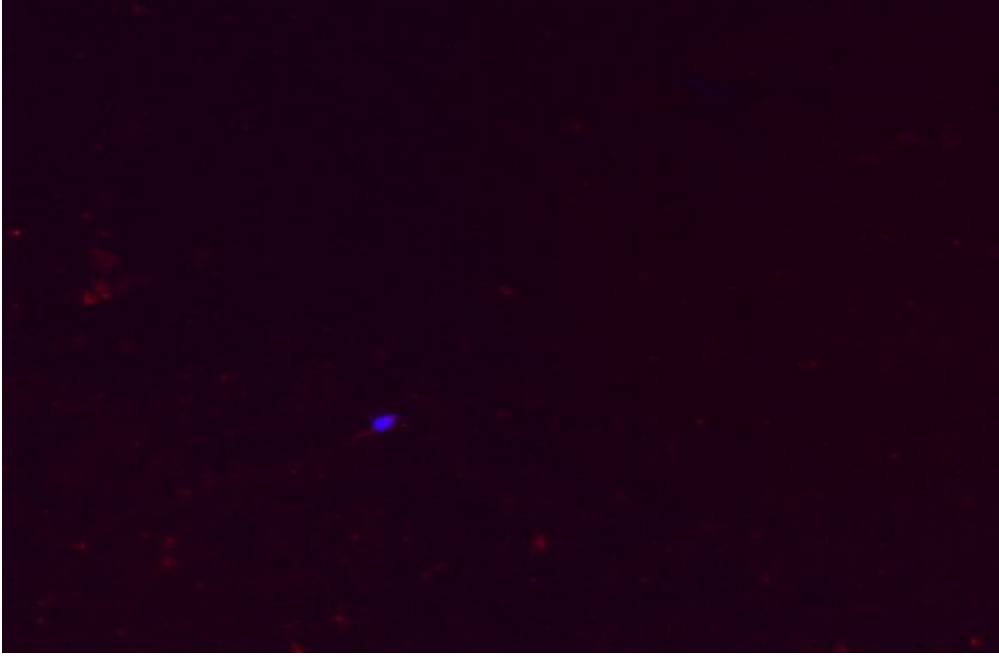
Şekil 5. 16. Astenozoopermi grubu İmmünfloresan görüntüleri X20, Dapi ile boyanan sperm başları yoğunlukta, sperm kuyrukları Texas Red ile boyanmamıştır.(Sentrin)



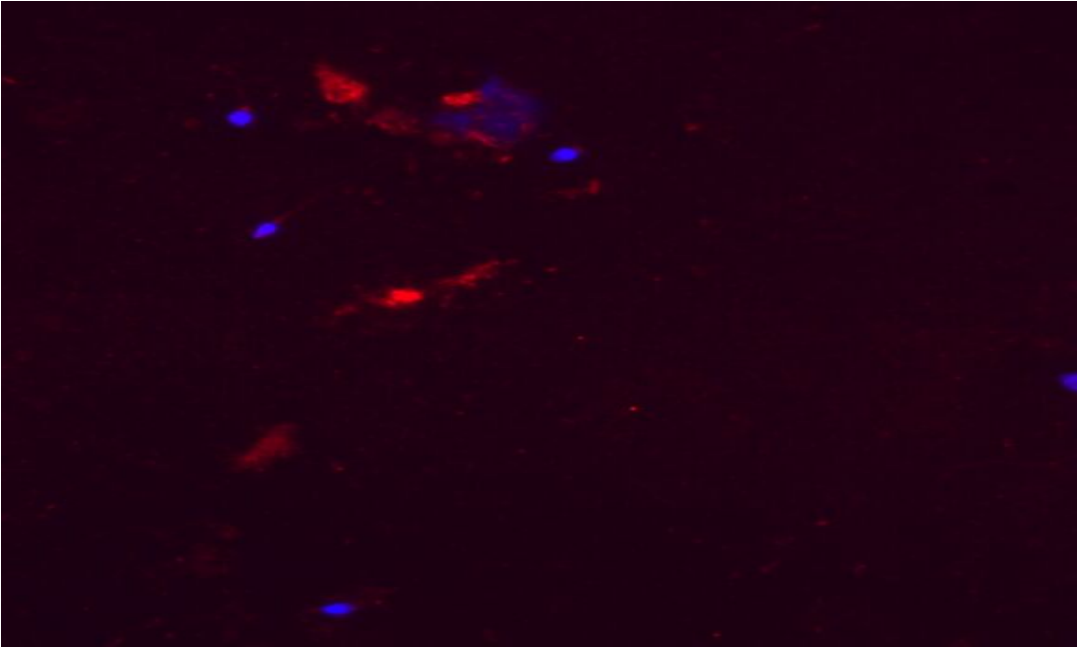
Şekil 5. 17. Normozoospermi grubu kuyrukları kırmızı renkte , baş bölgesi mavi renkte boyanan spermiler (Sentrin) İmmünfloresan görüntüleri X20 İvert mikroskop.



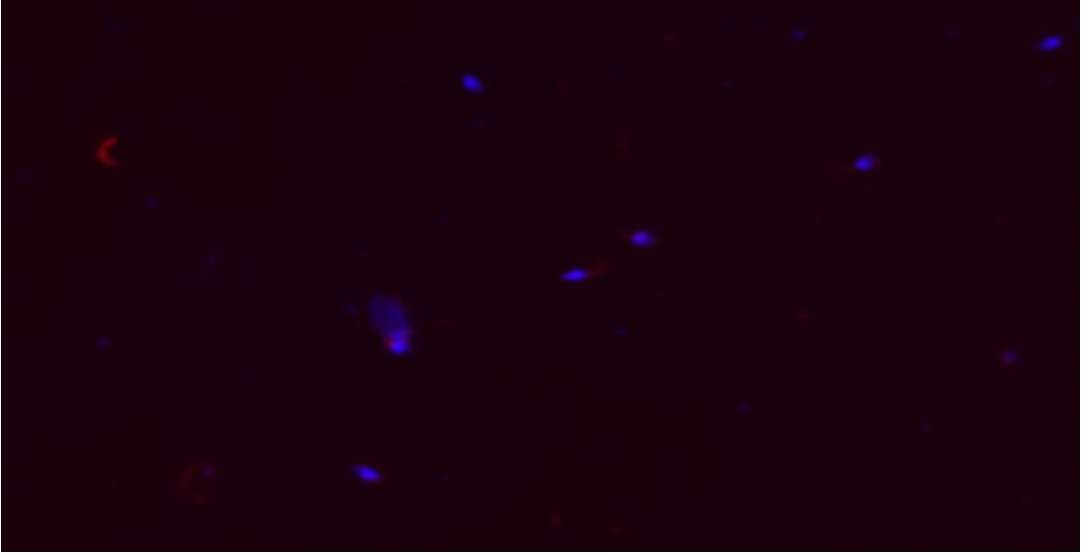
Şekil 5. 18. Normozoospermi grubu spermiler Tubilin, İmmünfloresan görüntüleri X20 invert mikroskop



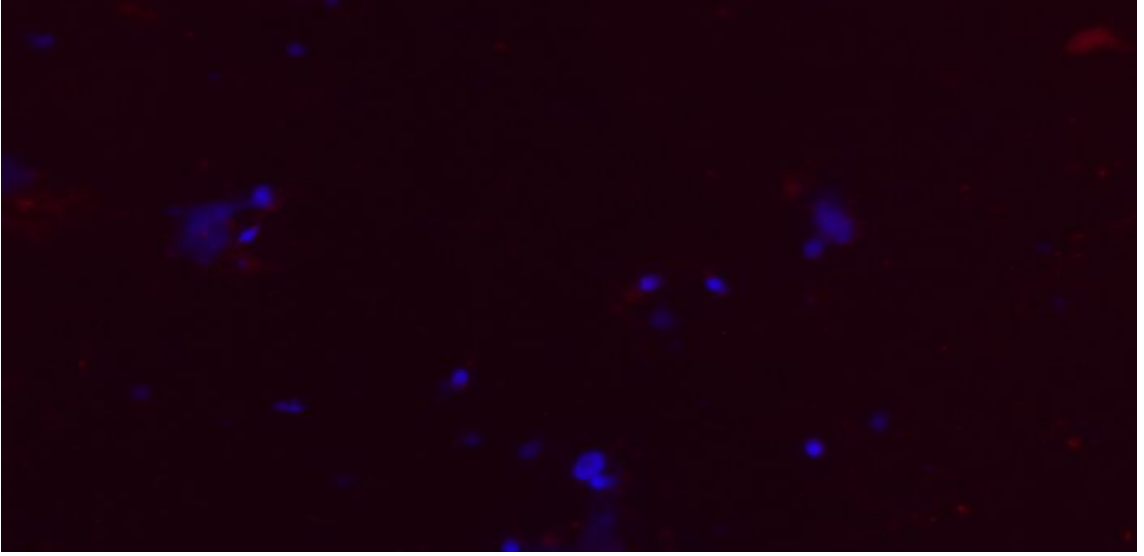
Şekil 5. 19. Astenozoospermi grubu sperm Tubilin, İmmünfloresan görüntüleri X20 invert mikroskop.



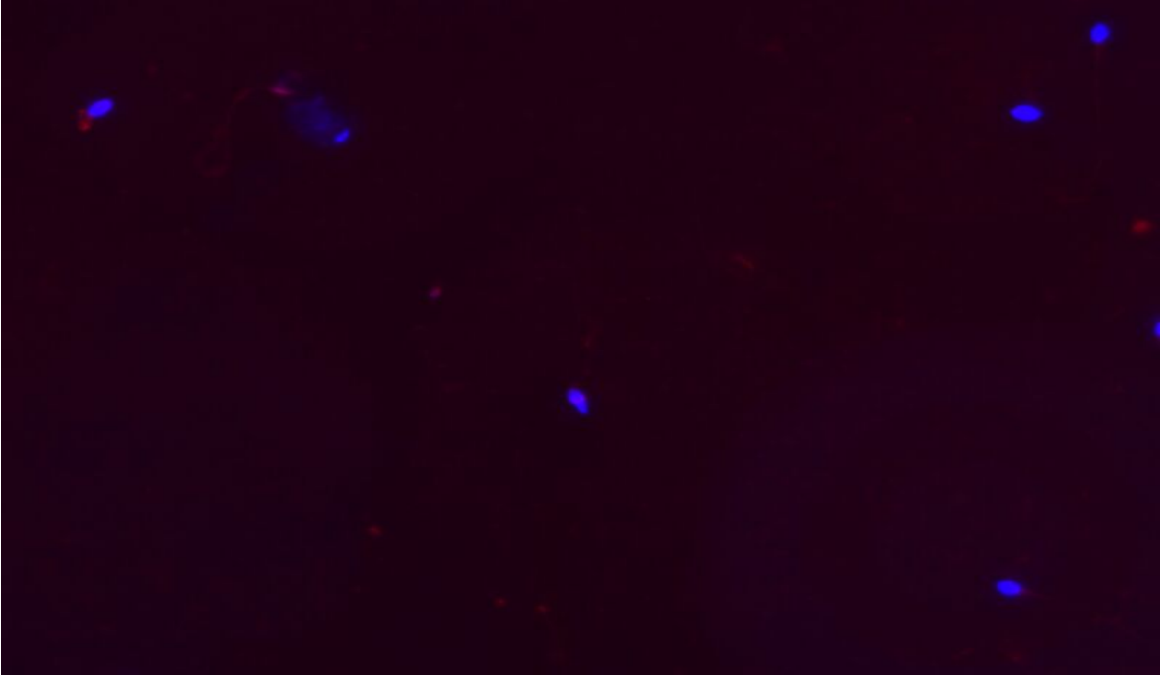
Şekil 5. 20. Normozoospermi İmmünfloresan görüntüleri X20 Tubilin



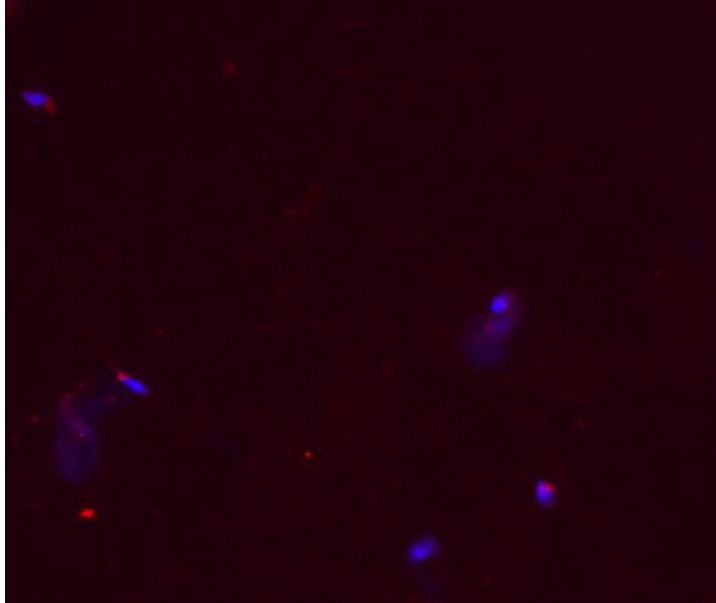
Şekil 5. 21. Normozoospermi İmmünfloresan görüntüleri X20 Sentrin



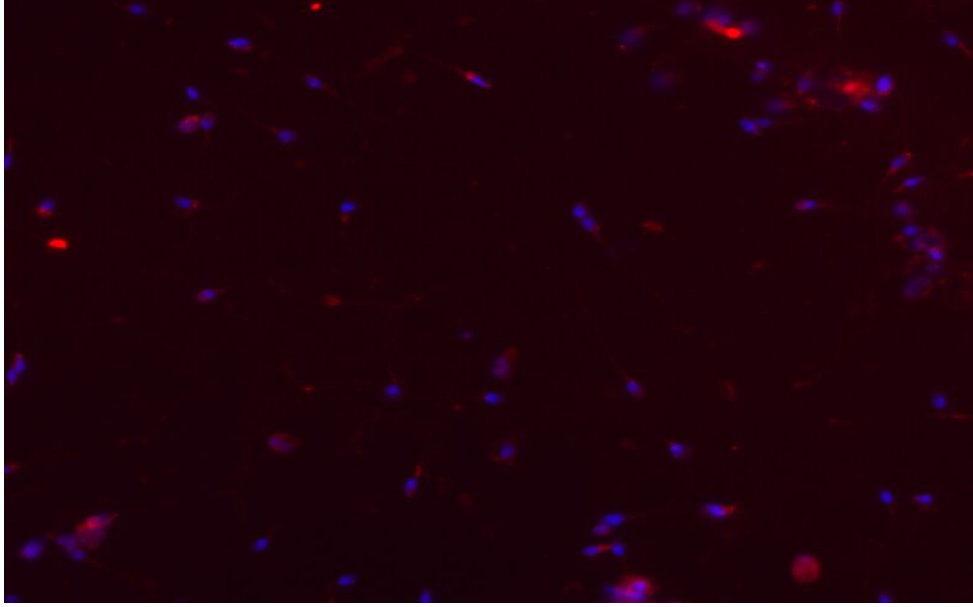
Şekil 5. 22. Normozoospermi grubu Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20, kuyrukları kırmızı renkte boyanmayan spermeler dikkati çekmekte.



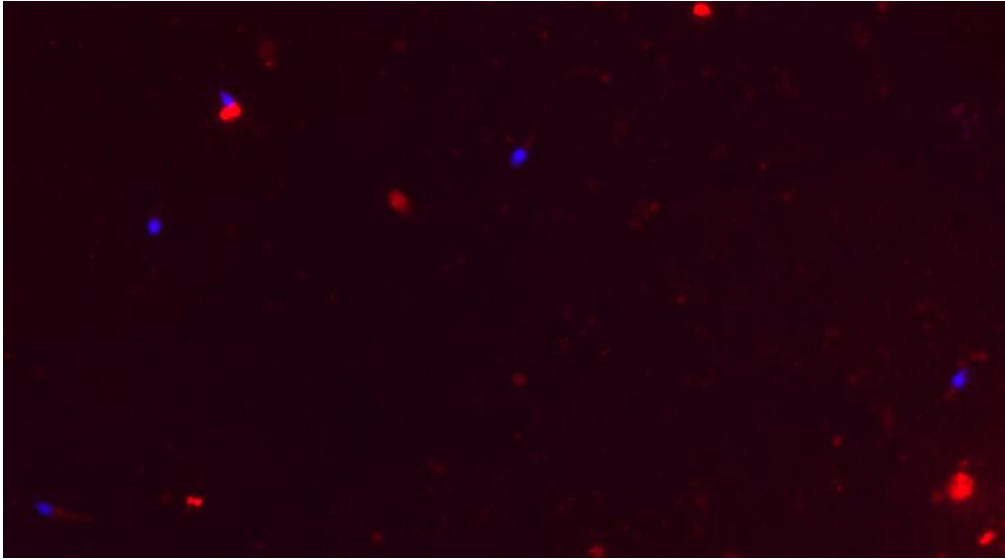
Şekil 5. 23. Astenozoospermi Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20, kuyrukları kırmızı renkte boyanmayan spermeler görüntüledik.



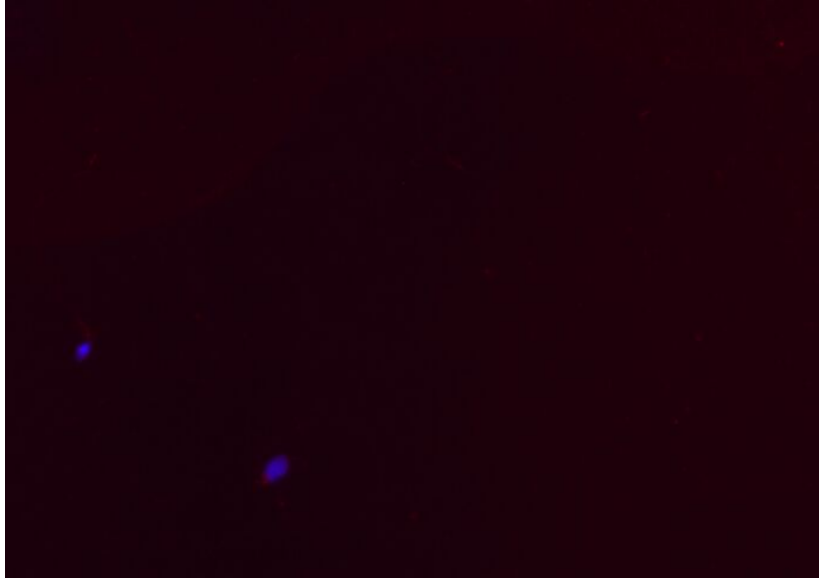
Şekil 5. 24 Normozoospermi grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Tubilin İmmünfloresan görüntüleri X20 görüntüleri.



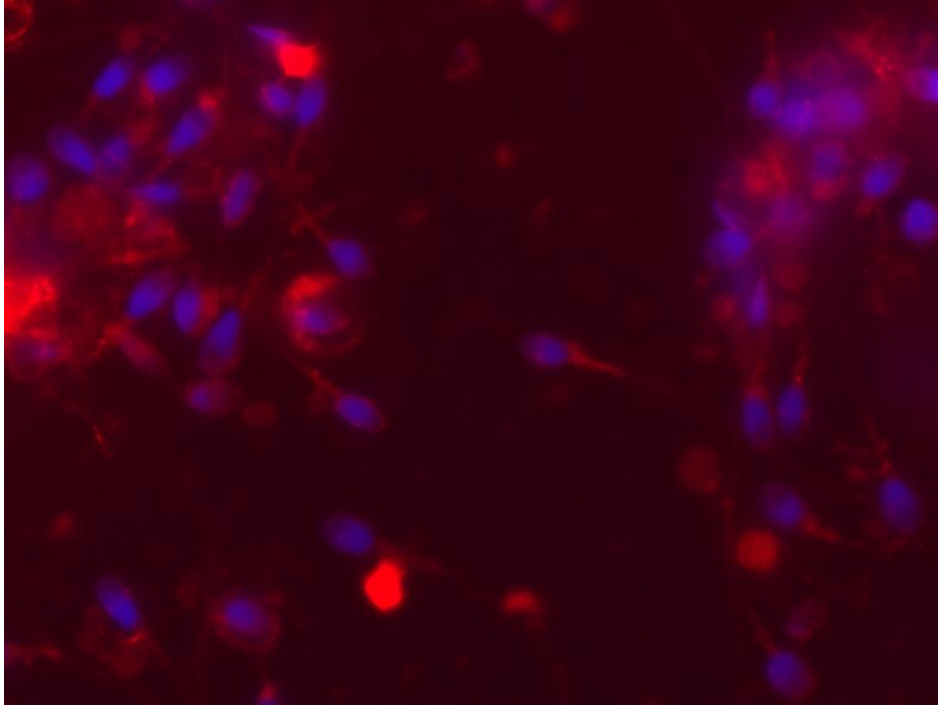
Şekil 5. 25. Normozoospermi grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20 görüntüleri.



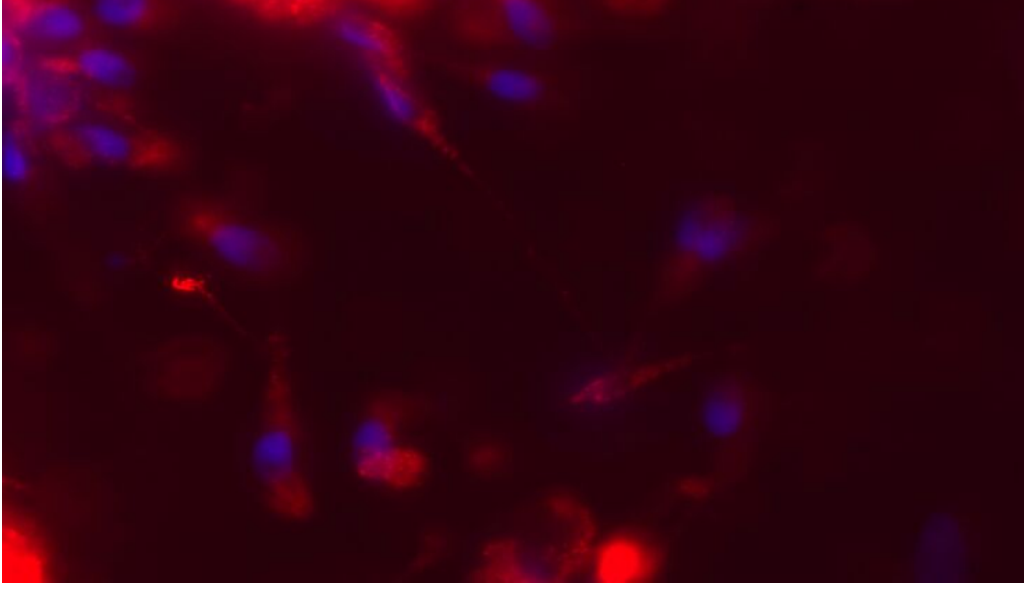
Şekil 5.26. Normozoospermi grubu farklı yoğunlukta boyanmış ve boyanmamış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20 görüntüleri.



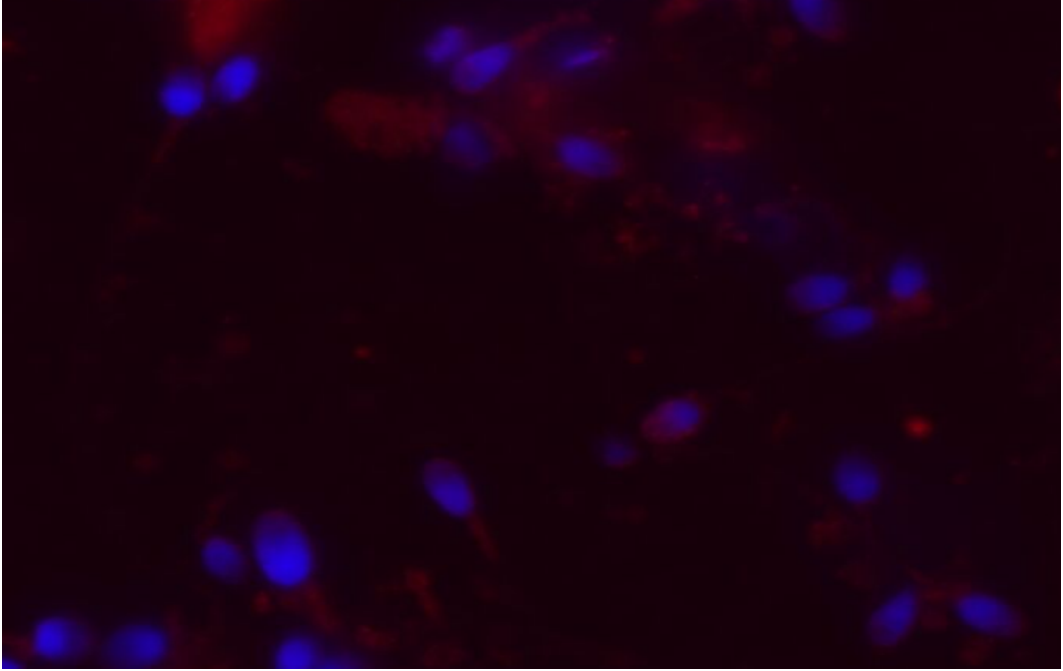
Şekil 5. 27. Astenozoospermi grubu farklı yoğunlukta boyanmış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X20 görüntüleri.



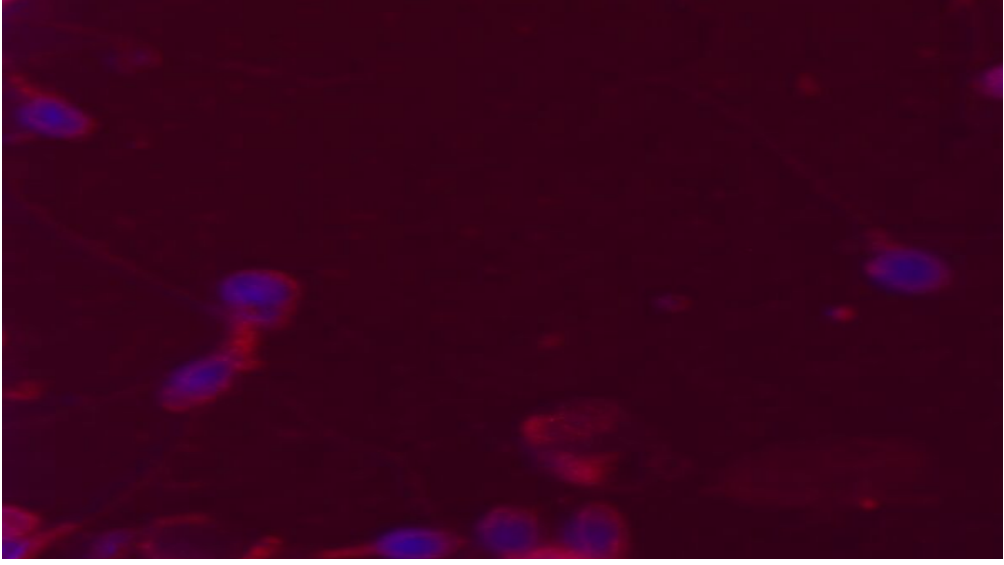
Şekil 5. 28. Normozoospermi grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Tubilin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüleri.



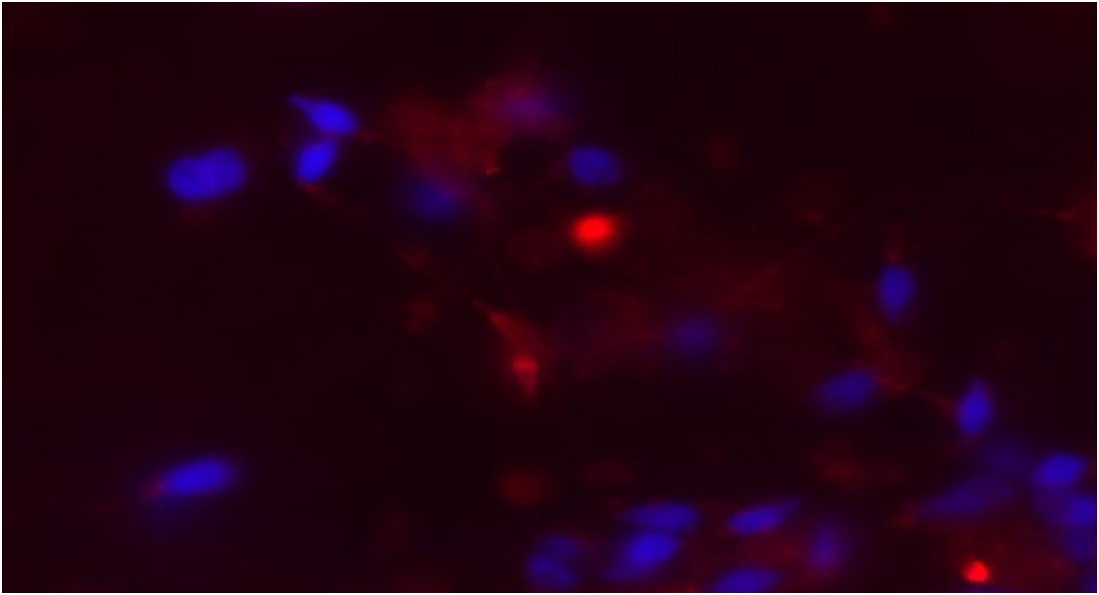
Şekil 5. 29. Normozoospermi grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüleri



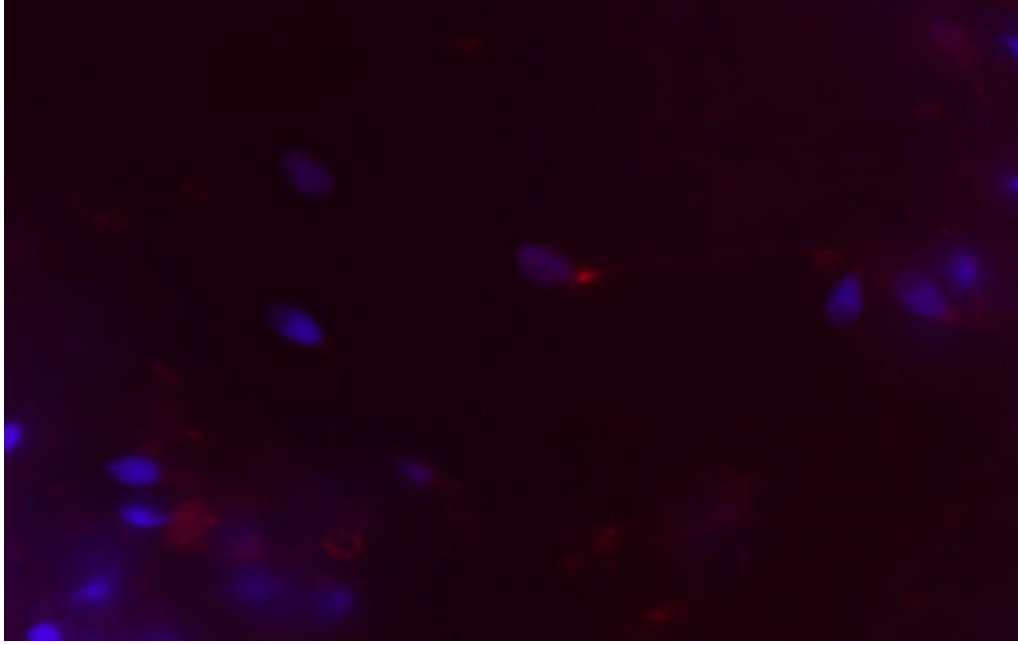
Şekil 5. 30. Astenozoospermii grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Sentrin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüler



Şekil 5. 31. Asterozoospermii grubu yüksek yoğunlukta boyanmış Tubilin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüler



Şekil 5. 32. Asterozoospermii grubu düşük yoğunlukta boyanmamış ve hiç boyanmış Tubilin İmmünfloresan görüntüleri X100 görüntüler



Şekil 5. 33. Normozoospermi grubu düşük yoğunlukta boyanmamış ve hiç boyanmış Tubulin İmmü floresan görüntüleri X100 görüntüler

Çizelge 5. 3. Normozoospermi ,Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları Nullizomi bulguları

	Normo Spermi (n=20)	Medyan Değeri	Asteno Spermi (n=35)	Medyan Değeri	Terato Spermi (n=35)	Medyan Değeri	P Değeri
NullizomiX	0,45	0,00	0,28	0,00	0,88	1,00	,021
NullizomiY	0,00	0,00	0,05	0,00	0,45	0,00	,020
Nullizomi13	0,65	0,00	1,02	0,00	1,14	1,00	,006
Nullizomi18	1,00	0,00	0,17	0,00	0,20	0,00	,117
Nullizomi21	0,45	0,00	0,62	0,00	,68	0,00	,136

Her üç grubumuzda FISH analizleri sonucunda nullizomi frekansları karşılaştırıldığında, Nullizomi X, Nullizomi Y ve Nullizomi 13 istatikselsel olarak anlamlı bulundu. P değerleri sırasıyla Nullizomi X için 0,021 , Nullizomi Y için 0,020 ve Nullizomi 13 için 0,006 olarak bulduk. Nullizomi X için medyan değerleri normozoospermi için % 0,00, astenozoospermi için % 0,00 ve teratozoospermi için % 1,00 olarak bulduk. Nullizomi X için normozoospermi ve astenozoospermi grupları arasında bir fark olmadığını bulduk. Teratozoospermi grubu ise normozoospermi ve astenozoospermi gruplarından istatikselsel olarak daha yüksek oranlara sahiptir (Çizelge 5.3). Nullizomi Y için medyan değerleri normozoospermi grubu için % 0,00 , astenozoospermi grubu için % 0,00 , teratozoospermi grubu için ise % 0,00 olarak bulduk. Her üç grupta da Nullizomi Y için teratozoospermi grubu astenozoospermi ve teratozoospermi gruplarından daha yüksek bir yüzdeye sahiptir (Çizelge 5.3). Nullizomi 13 için medyan değerleri normozoospermi grubu için % 0,00 , astenozoospermi grubu için % 0,00 , teratozoospermi grubu için % 1,00 olarak bulduk . Nullizomi 13 için normozoospermi ve astenozoospermi grupları arasında bir fark bulunamadı. Teratozoospermi grubu ise istatikselsel olarak normozoospermi ve astenozoospermi gruplarından daha yüksek yüzdeye sahiptir (Çizelge 5.3).

Fish analizleri sonucunda nullizomi 18 ve nullizomi 21 için çalışma gruplarımız arasında istatikselsel olarak anlamlı bir sonuç bulamadık. P değerleri sırasıyla nullizomi 18 için 0,117 ve nullizomi 21 için ise 0,136 olarak bulduk.

Çizelge 5. 4. Normozoospermi ,Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları Monozomi bulguları

	Normo Spermi (n=20)	Medyan Değeri	Asteno Spermi (n=35)	Medyan Değeri	Terato Spermi (n=35)	Medyan Değeri	P Değeri
MonozomiX	0,35	0,00	0,20	0,00	0,49	0,00	,136
MonozomiY	0,15	0,00	0,28	0,00	0,20	0,00	,288
Monozomi13	0,15	0,00	0,05	0,00	0,17	0,00	,427
Monozomi18	0,00	0,00	0,08	0,00	0,31	0,00	,066
Monozomi21	0,45	0,00	0,62	0,00	0,68	0,00	,154

Fish analizleri sonucunda monozomi X, monozomi Y, monozomi 13, monozomi 18 ve monozomi 21 için her üç grubumuz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. P değerleri sırasıyla monozomi X için 0,136 , monozomi Y için 0,288 , monozomi 13 için 0,427, monozomi 18 için 0,066 ve monozomi 21 için 0,154 olarak bulduk (Çizelge5.4).

Çizelge 5. 5. Normozoospermi ,Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları Dizomi bulguları

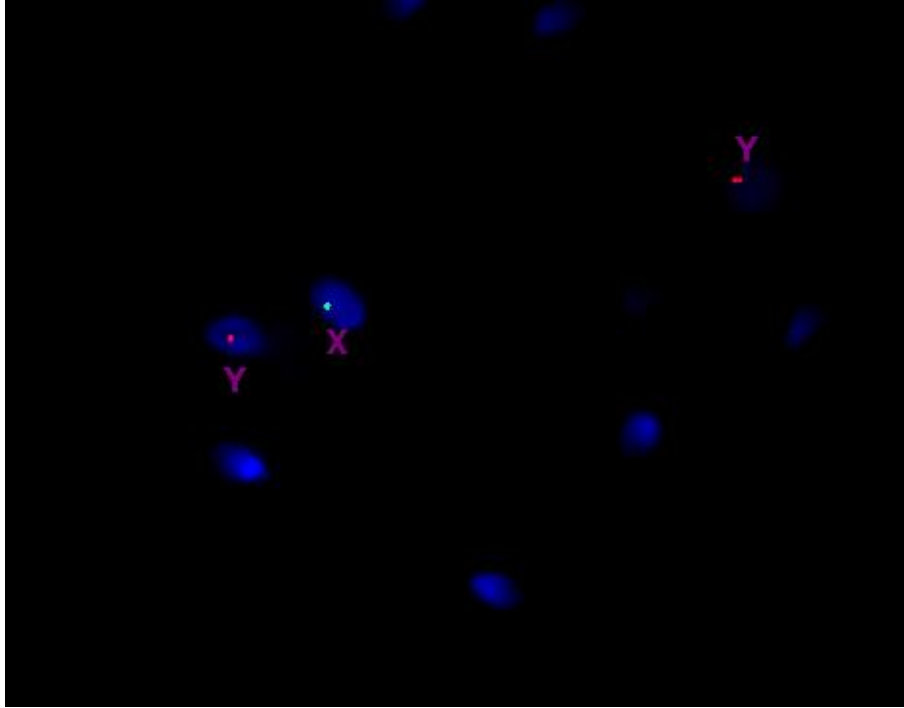
	Normo Spermi (n=20)	Medyan Değeri	Asteno Spermi (n=35)	Medyan Değeri	Terato Spermi (=35)	Medyan Değeri	P Değeri
DizomiX	0,35	0,00	0,22	0,00	0,31	0,00	,364
DizomiY	0,20	0,00	0,46	0,00	0,63	0,00	,212
Dizomi13	0,15	0,00	0,29	0,00	0,54	0,00	,048
Dizomi18	0,20	0,00	0,17	0,00	0,17	0,00	,728
Dizomi21	0,45	0,00	0,28	0,00	0,77	0,00	,063

Fish analizleri sonucu çalışma gruplarımızda dizomi X, dizomi Y, dizomi 18 ve dizomi 21 için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. P değerleri sırasıyla dizomi X için 0,364 , dizomi Y için 0,212 , dizomi 18 için 0,728 ve dizomi 21 için 0,063 olarak bulduk. Dizomi 13 ise her üç grubumuz için istatistiksel olarak anlamlı bulduk, P değeri 0,048. Dizomi için medyan deperleri Normozoospermi grubu için % 0,00 , astenozoospermi grubu için % 0,00 ve teratozoospermi grubu için ise % 0,00 dır. Teratozoospermi grubu her iki gruba göre daha yüksek oranda bulundu (Çizelge5.5).

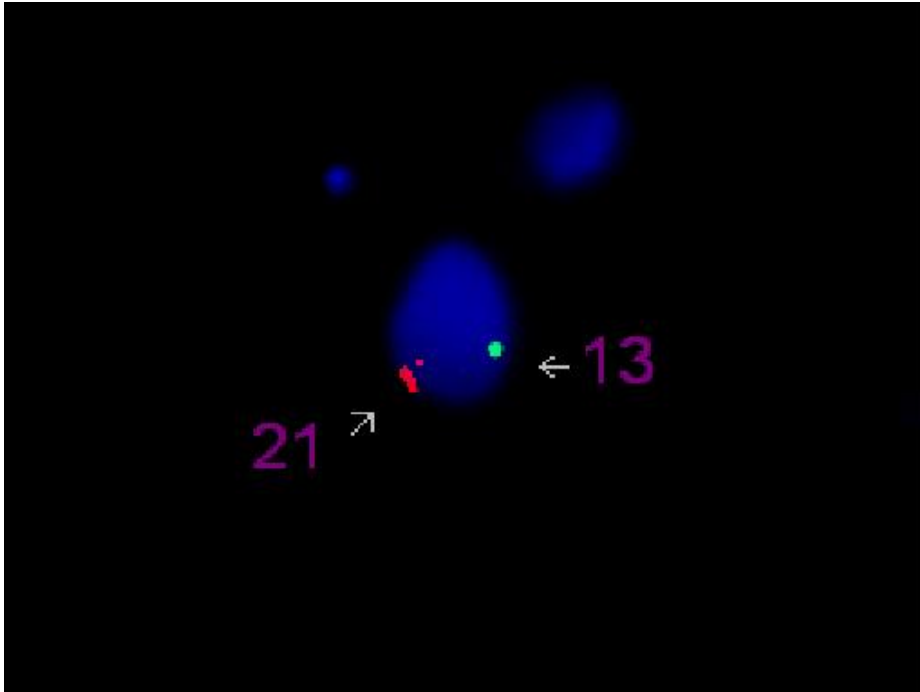
Çizelge 5. 6. Normozoospermi ,Astenozoospermi ve Teratozoospermi grupları Trizomi bulguları

	Normo Spermi (n=20)	Medyan Değeri	Asteno Spermi (n=35)	Medyan Değeri	Terato Spermi (n=35)	Medyan Değeri	P Değeri
Trizomi13	0,11	0,00	0,23	0,00	0,40	0,00	0,07
Trizomi21	0,70	0,00	0,05	0,00	0,63	0,00	,001

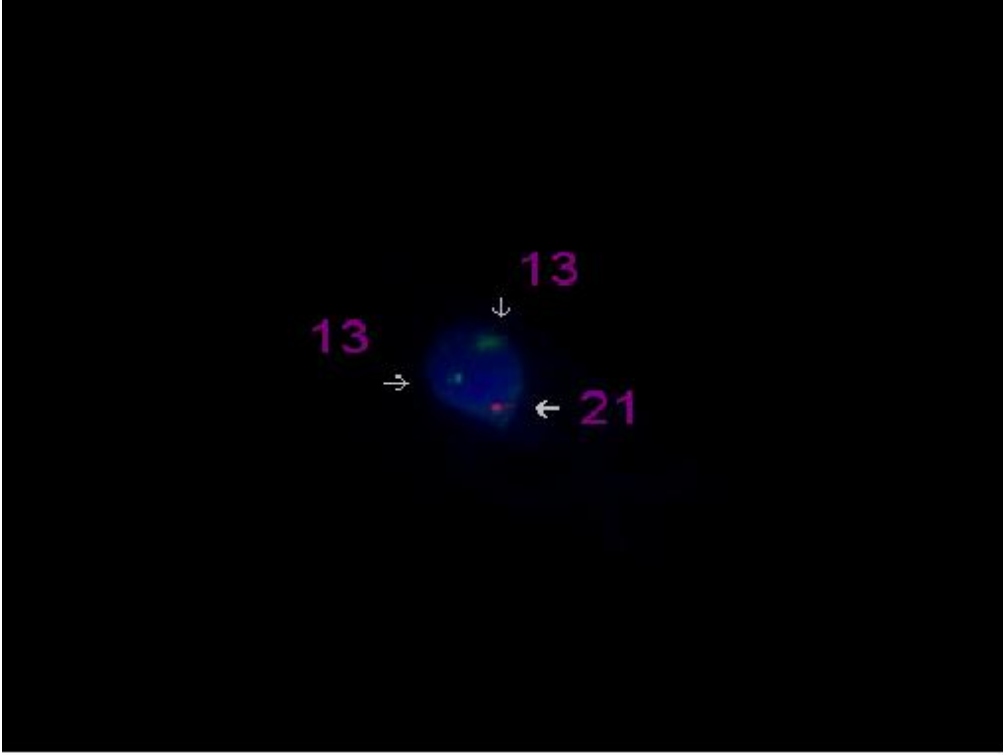
Fish analizleri sonucunda normozoospermi, astenozoospermi ve teratozoospermi grupları arasında yapılan istatistiksel analizlerde trizomi 13 anlamlı bulunmazken ve trizomi 21 için ise istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Trizomi 13 için Pdeğeri 0,070, Trizomi 21 için ise 0,001 olarak bulduk. Trizomi 21 için medyan değerleri normozoospermi için % 0,00 , astenozoopermi için 0,00 ve teratozoospermi için ise % 0,00 olarak ulduk.Normozoospermi grubu istatistiksel olarak diğer iki gruba göre daha yüksek trizomi 21 oranına sahipken, astenozoospermi grubu ise teratozoospermi grubuna göre daha yüksek oranda trizomi 21 yüzdesine sahiptir (Çizelge5.6).



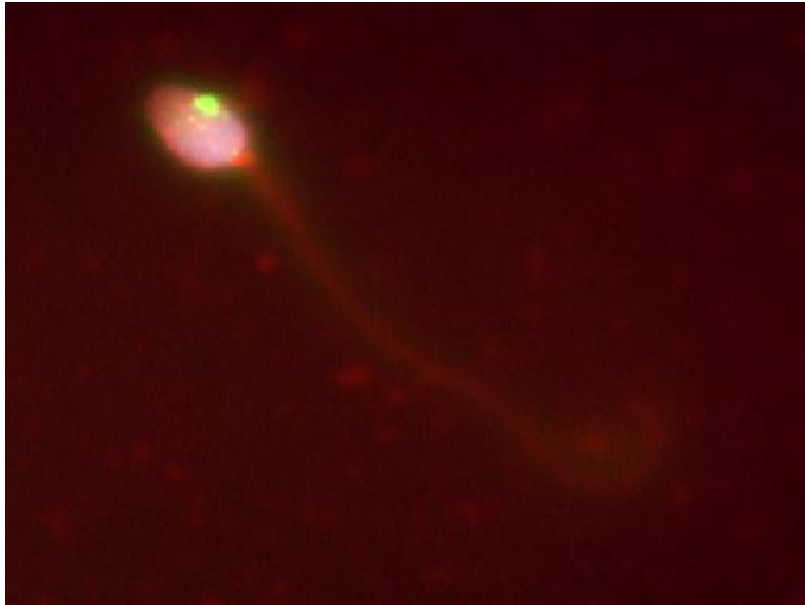
Şekil 5. 34. Normozoospermi Grubu sağlıklı X, Y, kromozomları FISH görüntüleri



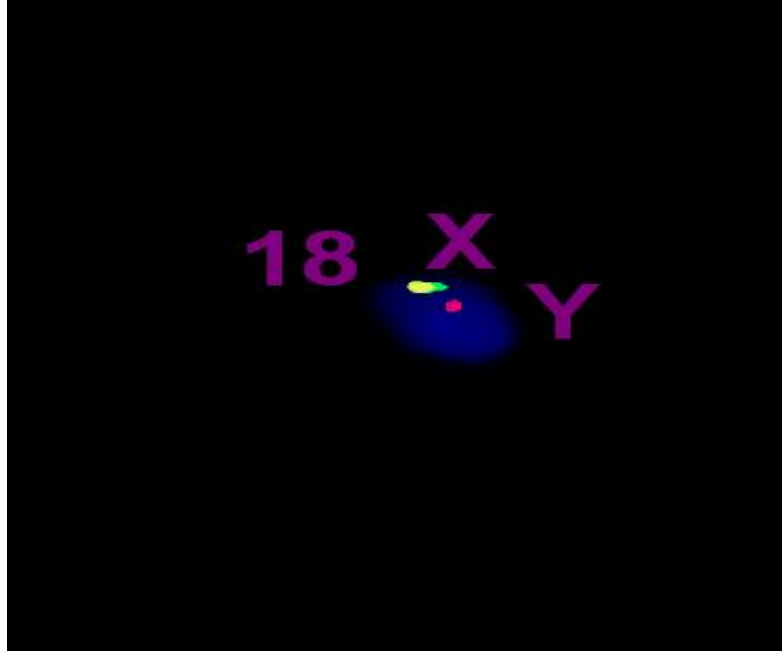
Şekil 5. 35. Astenozoospermi grubu sağlıklı 21 ve 13 kromozomları FISH görüntüleri



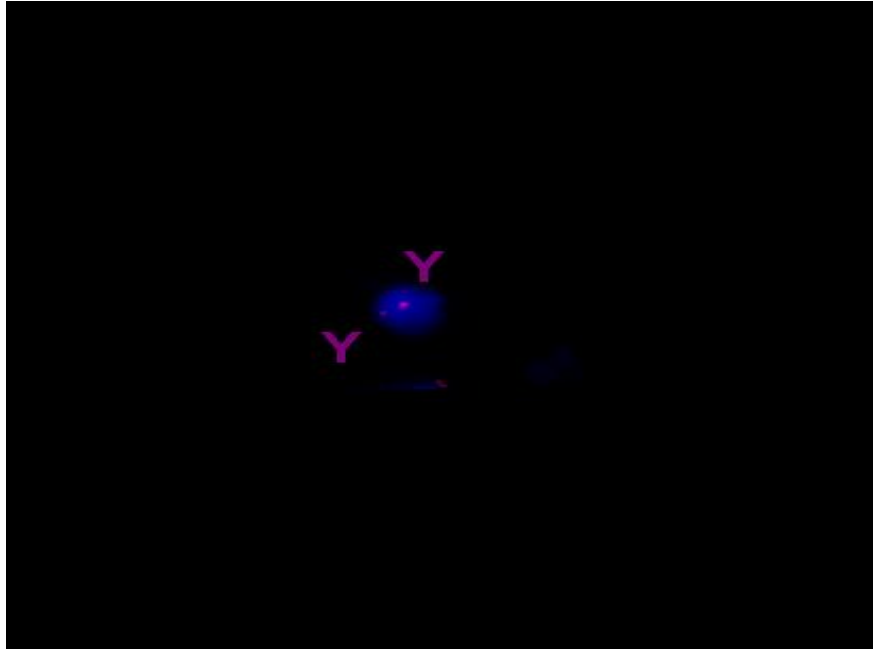
Şekil 5. 36. Teratozoospermi dizomi 13 FİSH görüntüleri



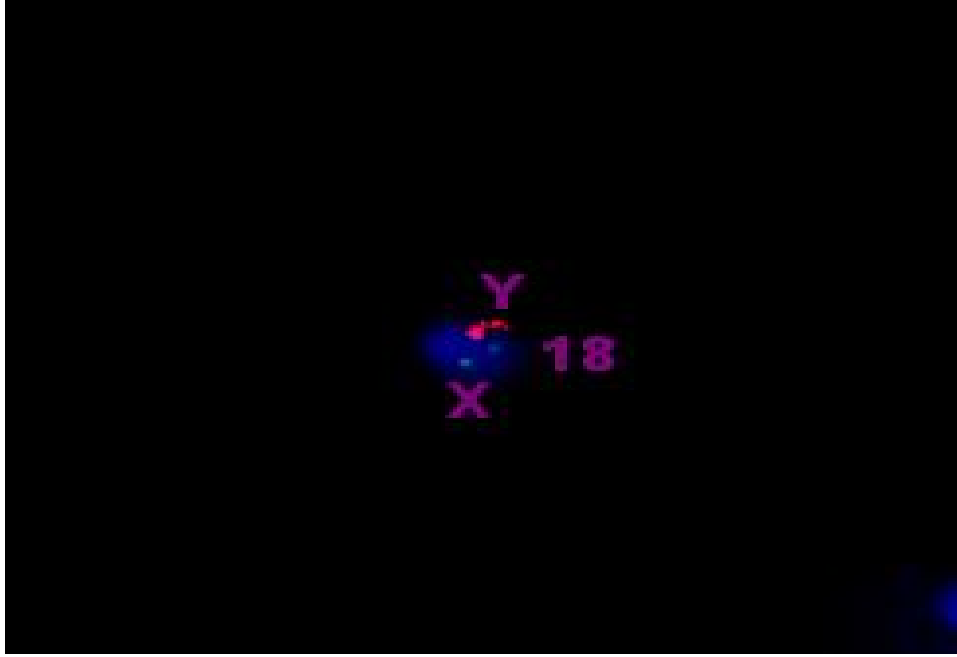
Şekil 5. 37. Teratozoospermi grubu FİSH öncesi karanlık alan görüntüleri X100



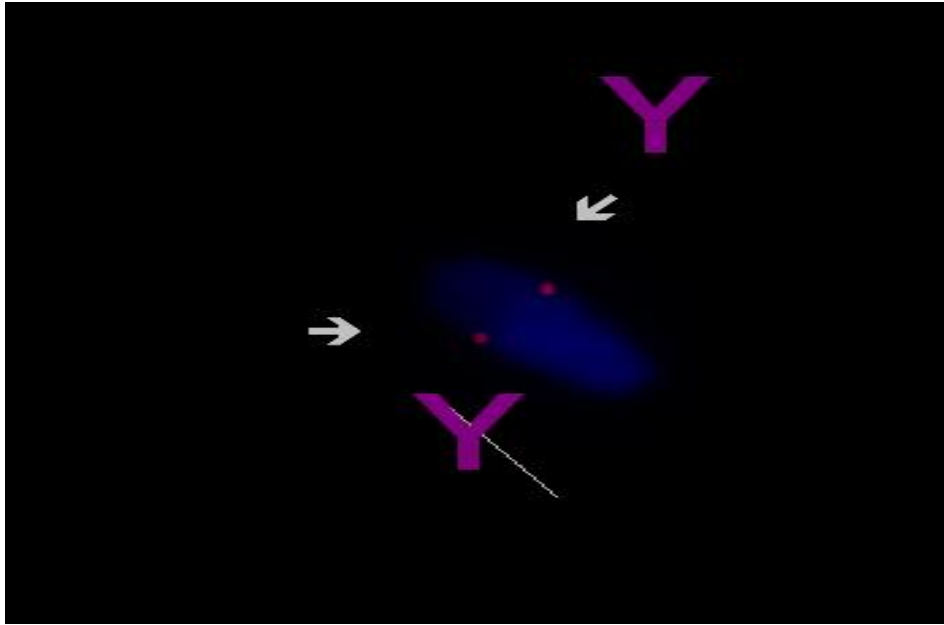
Şekil 5. 38. Teratozoospermi grubu sağlıklı olgu FİSH görüntüleri



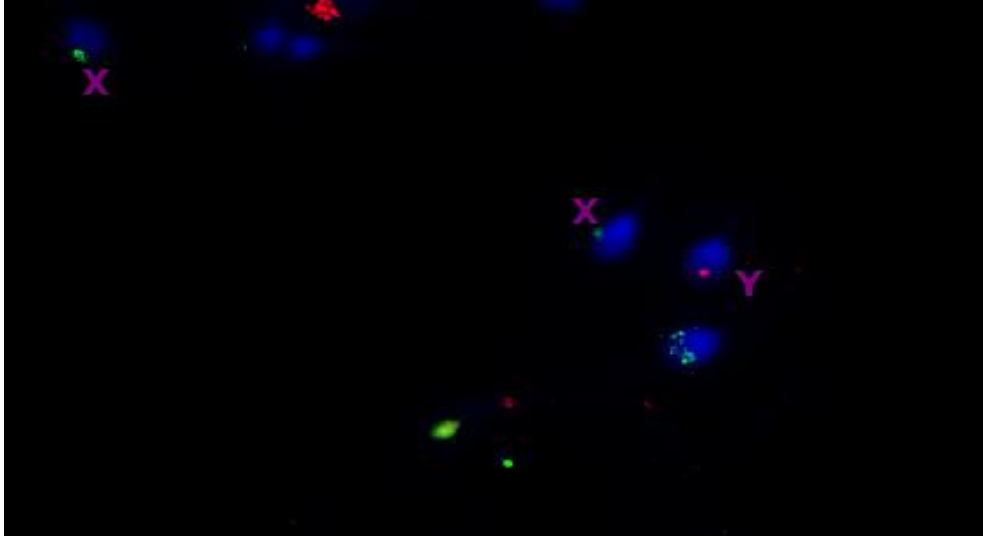
Şekil 5. 39. Normozoospermi grubu Dizomi Y FİSH görüntüleri



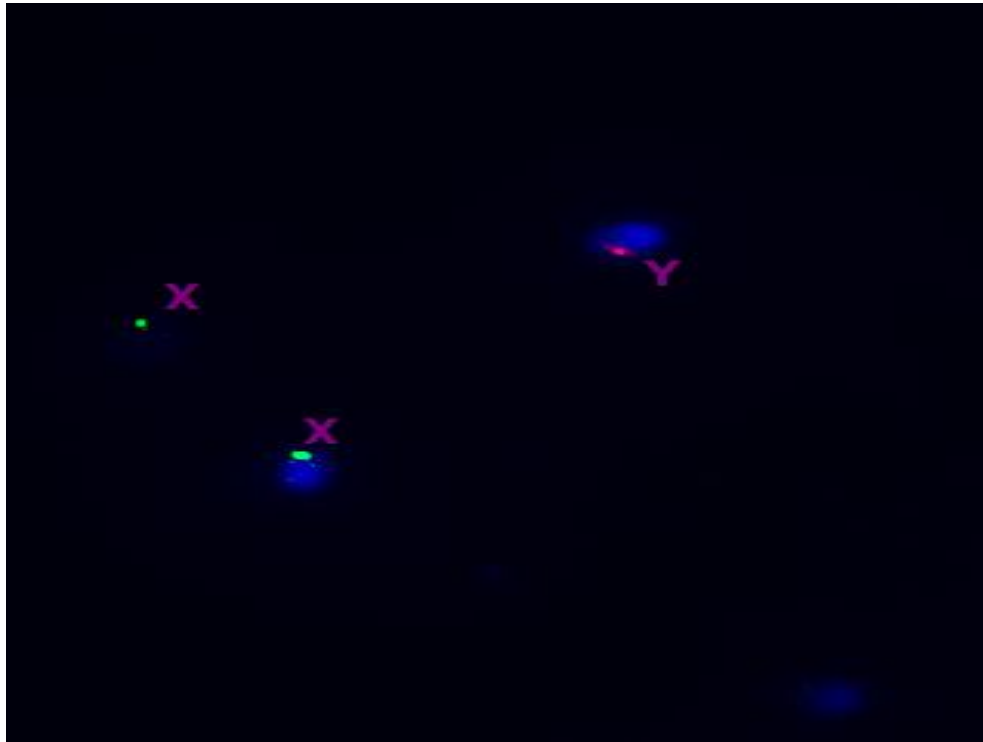
Şekil 5. 40. Normozoospermi sağlıklı olgu FİSH görüntüleri



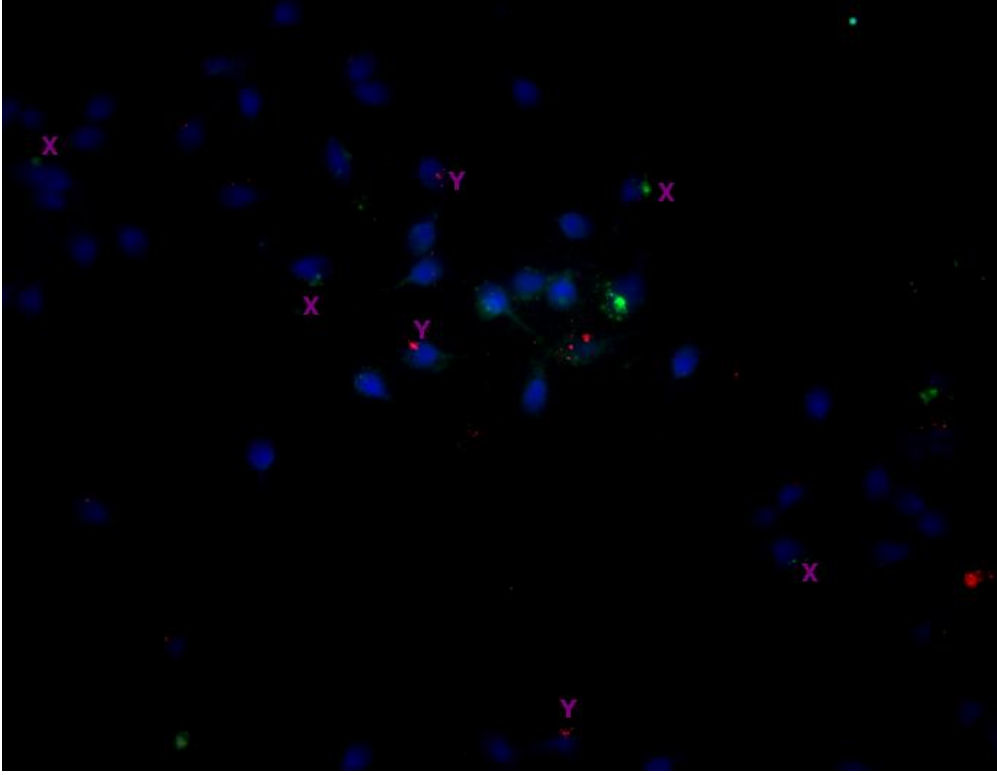
Şekil 5. 41. Teratozoozpermi grubu Dizomi FİSH görüntüleri



Şekil 5. 42. Teratozoospermi grubu sağlıklı olgu FISH görüntüleri



Şekil 5. 43. Astenozoospermi grubu sağlıklı olgu FISH görüntüleri



Şekil 5. 44. Normozoospermi grubu sağlıklı olgu FISH görüntüleri



Şekil 5. 45. Normozoospermi grubu immünohistokimya tubilin X20 inverted ışık mikroskop.

6.TARTIŞMA

Sentrozom , çok sayıda düzenleyici proteinin bir arada bulunmasıyla oluşan memeli hücrenin yapısal bir bileşenidir. Sentrozom, sentriol adı verilen ve radyal olarak çevresini saran mikrotübüllerden oluşmaktadır, bununla beraber hücre bölünmesinde anahtar rol oynamaktadırlar. Sperm sentrozomu, sperm kuyruğunun midpiece bölgesinde dik olarak konumlanmış iki adet sentriyolden oluşur(Palermo, 1997).

Sentrozom insanlarda babadan geçen bir kalıtsal özelliktir. İnsan oositleri sentrozom taşımazken spermlerde iki tane bulunur. ICSI yönteminde, sperm oosite enjekte edilirken sperm kuyruğuda oosit ooplazmasına dahil olur. Sperm baş kısmı olgun hale gelmeden sperm sentrioler bölgesi yıldız şeklindedir, buradaki yıldızsı ağ yapısı dişi pronükleusu erkek pronükleusa doğru çeker. Pronükleer safhada sentrioller duplike olur, ve singamide birbirlerinin zıt kutuplarına çekilirler(Palermo, 1997). Sentrozom fertilizasyon ve embriyo gelişimi için önemi, dişi ve erkek pronükleuslarının organizasyonunu gerçekleştirmesidir. Bu yüzden sperm sentriol yapısındaki bir bozukluk, düzensizlik vs. direkt olarak fertilizasyon ve devamında süre gelen embriyo gelişimine zarar verecektir(Schatten, 2008).

Önceki çalışmalarda gösterildiği gibi sentrioller fertilizasyondan sonraki ilk mitoz hücre bölünmesini kontrol etmektedirler(Schatten,2008). Sentrozom yapısındaki herhangi bir eksiklik fertilizasyon ve embriyonik gelişimi etkiler. Bunun yanında sentrozom sperm kuyruğunda lokalize olmuştur ve sperm hareketini etkilemektedir.

Sentrozom, hücreler için büyük ve önemli hücre organize edici bir merkezdir, ve bu özelliğini mikrotübül organizasyonunun kabiliyetine göre ya direkt kendi koordine ederek veya etkileyerek yerine getirir. Son yıllarda yapılan immün boyama çalışmalarında fareler hariç sentrozom kaynağı olarak dominant yapı spermdir(Manandhar, 2005; Sun, 2007). Böylece sperm sentrozom fonksiyonunun görevlerini daha iyi anlayabilmek için, araştırmacılar farklı türlerde ICSI işlemlerini gözlemlemişlerdir(Terada, 2000; Nakamura, 2002). Çalışmalar sonucunda, sentrozomun sperm hareketini ve fertilitiyi etkileyebileceğini tespit etmişlerdir.

Fibröz kılıfta displazi(DFS), nadir görülen teratospermi formudur ve infertiliteye neden olur. DFS spermier immotil olup kuyruğun midpiece kısmında hasara uğramışlardır ve bununla beraber sentrozomları hasar görmüştür, tüm bu nedenler, infertiliteye neden olmaktadır (Rawe, 2002) . Bu spermierle yapılan ICSI işleminden sonra çoğu vakada kötü fertilizasyon ve embriyo gelişimine neden olduğu gözlenmiştir(Rawe, 2002). Bu çalışmalarda sperm mikrotübül organizasyonu kötü olan hastalarda, oosit aktivasyonunda düşük olduğunu saptamışlardır. Bu hastalara göre sperm mikrotübül organizasyonu normal hastalarda sentrozom fonksiyonu daha yüksektir bu durumu sığır spermierinde gözlemlemişlerdir. Sentrozom yapısı hasarlı olan spermierle yapılan ICSI işleminden sonra fertilizasyon başarısının zayıf olduğu gözlenmiştir(Terada, 2009).

Erkek infertilitesinde sperm sentrozom yapısı bozukluğu, zigot sentrozom bozukluğu ve polispermi görülebilir (Schatten, 1994). İnsanlarda fonksiyonel sentriol, fertilizasyondaosite taşınır.Terada ve arkadaşları 2007 yılında (Terada, 2009) sentrozomun bu fonksiyonun erkek ve dişi genomun yumurta içerisinde beraber bulunduğu zaman prosesin devamı için önem taşıdığını söylemektedirler.

Normospermik ve astenospermik hastaların kuyruk yapıları incelendiğinde, normal gruba göre astenospermik grubun sperm kuyruk yapısında western blot analizlerinde daha az miktarda gama ve alfa tubulin yapısının görüldüğü gözlemlenmiştir. Sentrozomal protein alfa tubulin, Mikrotübül ormanizasyon merkezinin fonksiyonel kısmını oluştururlar ve sentrom yapısının oluşumunda en büyük görevi üstlenirler(Zheng, 1995; Raff, 1993). Siemrly ve arkadaşları (1999) alfa ve gama tubulinin fertilizasyon esnasında genetik olarak tek taraflı sağlandığını gözlemlemişlerdir.

Eliza ile yapılan ölçümlerde normal grupla astenospermik grup karşılaştırıldığında, sentrin miktarlarının normal grupta daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçla sentrinin hareket ile ilgili olduğunu söyleyebiliriz. Sentrin kalsiyum bağımlı bir proteindir ve aksonem hareketinde flagellar yapının birbirinden ayrılmasına yani hareketin oluşmasında görev alır, ayrıca fertilizasyon sırasında da görev alır.Sentrin hareketli organellerin fonksiyonel görevlerini yerine getirmesinin yanı sıra sperm kuyruk kısmı içinde önem taşır(Laoukili,2000;

Zoran,1994). Kalsiyum miktarının intraselüler artmasıyla fertilizasyonun devamlılığında rol aldığını savunulmuştur. Kalsiyum miktarının artması fertilizasyon sonrası hücre bölünmesindeki anafaz aşamasında etki edebileceği söylenilmektedir. Schatten, sentrinin oositin içerisine giren spermin oositi aktiveleştirme yeteneğine sahip olduğunu ve bu özelliğini olgun sentrozomal yapılarda daha çok gösterdiğini söylemişlerdir (Schatten, 1995). Anormal sentrin miktarları astenospermik erkeklerde gözlenmiştir(Nakamura, 2005). Özellikle sperm baş ve kuyruk organizasyonu kötü olan spermelerde bu daha çok görülmüştür(Bomens, 1997; Whitaker, 1993;Bomens, 1998).

Çalışmamızda normozoospermi ve astenozoospermi grupları arasında western-blot ve immünfloresan teknikleriyle yaptığımız analizlerde, tubilin ve sentrin proteinlerinin normozoospermi grubunda astenozoospermi grubuna göre daha fazla yoğunlukta olduğunu bulduk. İstatiksel olarak western blot tubilin ve sentrin için sırasıyla P değerleri 0,000 ve 0,000 olarak anlamlı bulunmuştur. İmmünfloresan analizlerinde P değerleri tubilin ve sentrin için sırasıyla 0,000 ve 0,016 olarak bulduk. Çalışmamızdaki sonuçlar literatürdeki çalışmalarla benzerlik göstermiştir. Normozoospermi grubunda astenozoospermi grubuna göre sentrozom yapısındaki tubilin ve sentrin protein miktarları daha yoğun miktarda bulunmaktadır.

İnfertilite nedeniyle IVF merkezlerine başvuran çiftlerin yaklaşık % 50 sinde androlojik nedenler söz konusudur (Attia, 2006; Griffin, 2003). Androlojik nedenler ile başvuran olguların spermiyogramlarında azospermi, oligoastenoteratospermi, oligospermi,astenospermi, oligoteratospermi ve teratospermi bulunmaktaydı . Bu endikasyonlar, IVF merkezlerine başvuran çiftlerde testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulamalarını gerektirmektedir. Türkiye’ de öncelikle kadına uygulanan tedavi yöntemleri sayesinde çiftlerin bir kısmında hamilelik gerçekleşmektedir. Eğer hamilelik olmazsa ikinci seçenek olarak erkeğe tedavi edilmesi planlanmaktadır. Bu da sorunun erkekte olduğu durumlar için IVF merkezine yapılan başvurulardaki artışı açıklayabilmektir. TESE ve ICSI, IVF merkezlerinde en sık uygulanan yöntemlerdir. Bu yöntemlerin uygulamaya girmesiyle, oositlerde döllenme oranı artmıştır (Palermo, 1998). Uygulanan yöntemin bir sorunu bazen genetik olarak matür hale gelmemiş

spermilerin oosit içine yerleştirilmesi ve sonuçta döllenmemiş veya dejenere olmuş embriyolar oluşmaktadır.

Spermlerdeki ortalama kromozom anomali düzeyinin saptanması için yapılan ilk çalışmalar sağlıklı d6norlardan elde edilen spermlele ger6ekleştirilmiştir. Egozcue ve ark yaptıkları 6alışmada otozomal kromozomlar i6in dizomi sıklığının % 0,13; cinsiyet kromozom anomali sıklığının % 0,37 olduğunu g6stermiş ve ortalama an6ploidiili sperm oranının yaklaşık % 6,5 olduğunu rapor etmişlerdir (Egozcue, 1997). Yapmış olduğumuz 6alışmada spermiyogramları a6ısından normal olarak değerlendirilen bireylere bakıldığında bunlarda g6r6len anomali oranının otozomal kromozomlarda dizomi sıklığının % 0,27 , seks kromozomları dizomi sıklığı % 0,28 olduğu g6r6lm6řt6r . Bu normal bireylerden elde edilen sonu6ların ortalaması yaklaşık % 2,9 bulunmuş olup bu oranın Egozcue ve ark tarafından bulunan % 6,5 değerinden daha d6ř6k an6ploidiili g6zlendiği g6r6lm6řt6r.

Spermiyogramda g6zlenen durumun sperm FISH ileri tetkik y6ntemiyle incelenmesi klinisyene PGT uygulaması sırasında ek bilgi sağlayacaktır. Bu durumda sperm FISH sonu6ları gerekli ve şart olmamakla birlikte PGT uygulayıcı ekip i6in uygulama sırasında olabileceklerin 6nceden fark edilmesine yardımcı olabilecektir. Ayrıca 6alışmamızda tespit ettiğimiz sperm FISH anomali sıklığı ile 6nceki IVF denemesi sayısı arasındaki anlamlı korelasyon, t6p bebek uygulaması i6in ilk başvuru yapan 6iftlerde uygulamanın başarısı hakkında bilgi sağlayıcı olabilecektir .

Triploid gebeliklerin nedenini a6ıklamak 6zere yapılan bir 6alışmada doksan bir olgunun altmışında nedenin baba kaynaklı olduğu g6sterilmiştir. Bu olguların 6oğu dispermi nedeniyle olmasına rağmen az bir kısmında g6r6len diploid sperm, triploidinin ger6ekleşmesine sebep olmaktadır. Diploid sperm oranı, oligospermik olguların 1/4 6nde, kriptozoospermilerin 1/2 sinde ve azospermilerin 1/2 sinde g6r6lmektedir (Egozcue, 2002). Cinsiyet kromozom anomalilerinin spermlelede sık olduğu bilindiği halde inceleme sırasında bir otozomal kromozomu (kromozom no;18) eklenmiştir.

Erkek germ hücrelerinde oluşan DNA hasarlanması yaşı ile birlikte artmaktadır. Bu hasarlanmalar normal koşullarda DNA tamir mekanizmaları ile düzeltilmekte ve sorunsuz olarak üreme/fertilizasyon devam etmektedir. Hasarlanmış sperm, tamir edilemeyecek ise diğer tüm hücreler gibi apoptozis sürecine girecektir. Bu şekilde ejakulat içinde inaktif edilmiş sperm, fertilité yeteneği ortadan kalkmış ve gelecek kuşaklar bozuk genlerden korunmuş olacaktır (Gorczyca,1997). Tamir edilebilecek spermde bulunan minimal DNA hasarı, embriyo içine taşınabilmektedir. Bu taşınan hasarın birinci bölünme aşamasına kadar tamir edilmesi gerekmektedir (Aitken,1997) .

Spermdeki DNA hasarından söz edilmesine rağmen, sperm DNA sı çift sarmalda bulunan disülfid bağları ile kondanse yapısını korur ve dıştan gelebilecek negatif uyarılara karşı bozulmalarını engeller. Fakat DNA hasarlanması normozoospermi erkeklerde bile meydana gelmektedir. McKelvey ve ark nın yaptıkları çalışmada H₂O₂ ve X radyasyonunun sperm DNA hasarlama etkisinin infertil erkeklerde görülenden daha fazla olduğunu göstermiştir (McKelvey-Martin, 1997). Hughes ve ark yaptıkları çalışmada, infertil ve fertil erkekler arasında DNA hasarlanma farklılıklarını test etmişlerdir. İnfertil erkeklerde ilk aşamada alınan spermde fertil erkeklere göre DNA hasarlanma farkı olmamasına rağmen bu sperm hücrelerinin oksidatif ajanlara daha hassas olduklarını göstermişlerdir (Hughes, 1998).

DNA hasarı ve fragmantasyonun erkek eşey hücrelerindeki nedeni hala kesin olarak belli değildir. Irvine ve ark insan sperm hücrelerinde DNA hasarlanmasını göstermek için IVF merkezine başvuran erkekleri incelemişler ve infertil hastalarda normal popülasyona göre daha yüksek oranda apoptozis oranlarını tespit etmişlerdir (Irvine, 2000). Çalışmamızda incelediğimiz sperm apoptozis oranları normozoospermi grubunda % 9,1 medyan değeri % 6,0 , astenospermi grubunda % 10,62 medyan değeri % 10, teratoospermi grubunda ise % 20,77 olarak bulduk ve medyan değerleri %13 dü. Her üç grubun ortalama apoptozis oranı : % 14,1 olduğu görülmüştür. Sun ve ark yaptıkları çalışmada IVF kliniğine başvuran olgularda sperm apoptozis oranını yaklaşık % 4 olarak bulmuşlardır. Sun ve ark ait bu çalışmadaki ortalama değeri bizim bulduğumuz değerden daha azdır fakat Sun ve ark nın çalışmasındaki apoptozis oranları olguların % 27 sinde % 5 ile % 40 arasındaydı (Sun, 1997). Zini ve ark yaptıkları

çalışmada DNA fragmantasyonunu % 13,3 bulmuşlardır (Zini, 2001). Zini ve ark yaptıkları çalışmada elde ettikleri sonuçlar bizim sonuçlarımıza daha yakındır.

Sperm FISH sonuçları ile sperm apoptozis oranları ile karşılaştırması sonucu aralarında anlamlı ilişki bulunmuştur. Erkek infertilitesinin sebeplerini açıklamak için yapılan çalışmalarda ayrı ayrı olarak kromozom sayı anomalileri ve apoptotik hücre oranları kullanılmıştır. Literatüre bakıldığında bu iki parametrenin birlikte değerlendirildiği ait bir çalışma bulunmuştur (Carrell, 2003). Bu çalışmada tekrarlayan düşükleri olan çiftlerdeki erkeklerden elde edilen sperm örneklerinde sperm FISH anomalileri ile apoptotik hücre oranları birbiri ile uyumlu bulunmuştur. DNA fragmantasyonu ile spermlerdeki kromozom sayı anomali oranı arasındaki bu uyum ilgi çekicidir. Bu durumu açıklamak için spermatogenezis sırasında gerçekleşen mekanizmalara bakılabilir. Spermatogenezis, mayozun kontrol noktaları ile düzenlenmektedir. Bunlarda gerçekleşen mayotik hatalar hücrel apoptozisi uyarabilir ve bu şekilde spermlerde sayısal kromozom anomalileri ile apoptozis oranları arasında uyum görülebilir. Bizim bulduğumuz sonucun bu çalışmada bulunan sonuçtan paralellik göstermektedir. Çalışmamızda, sperm apoptozis oranları yüksek çıkan teratozoospermi grubunda Fish analizleri sonucunda anöplodili sperm sayısının daha yüksek oranda gözlemledik. Aynı şekilde sperm apoptozis oranları daha düşük çıkan astenozoospermi grubunda daha anöplodili sperm gözlemlendi, en düşük sperm apoptozis oranları en az anöplodili gözlenen normozoospermi grubunda gözledik.

Kromozom anomalilerinin orijinini etkileyen mekanizmaları anlamak için gamet hücrelerinin incelenmesi gerekir. Çünkü bölünme kusurlarının büyük bir bölümü mayoz sırasında oluşmaktadır. Spontan abortus ve intrauterin ölümlerin en önemli nedeni kromozom anöplodileridir. Germ hücrelerinde kromozom ayrılamaması (nondisjunction) sonucu meydana gelen anomaliler, kromozomal anomalili fetus ve çocukların doğma olasılığının artmasına neden olur (Martin, 2003; Martin, 2008; Mehdi, 2006; Asada, 2000; Schmid, 2004).

Özellikle üremeye yardımcı tekniklerin gelişmesi ile, de novo kromozom anomalisi bulunan çocuk olma riskinin arttığı bildirilmektedir (Martin, 2003; Kirkpatrick, 2008; Shi,2001). İnfertil erkeklerin spermleri kullanılarak gerçekleştirilen ICSI gibi yardımcı üreme

teknikleri sonrası oluşan gebelik sonuçları, bu kromozom anomalilerinin büyük kısmının paternal kaynaklı olduğunu göstermiştir (Martin, 2003; Mehdi, 2006). ICSI ile gebelik sağlanan çiftlerde, erkeğin spermelerinin FISH ile incelenmesi sonucu sperm anöploidi oranının artmış olduğu bildirilmektedir (Martin, 2003; Calogero, 2001). Ayrıca semen parametrelerinde de anormalliklerin olabileceği bildirilmektedir. Semen parametrelerindeki bu anormallikler sperm anöploidileri ile de ilişkilendirilmektedir (Martin, 2003; Martin, 2008; Tempest, 2007).

Literatürde normal somatik karyotipe sahip olan infertil erkeklerde FISH ile sperm anöploidilerinin tespitine ilişkin 30'un üstünde çalışma bulunmaktadır (Martin, 2008; Tempest, 2007). Bu çalışmaların büyük kısmında sperm parametreleri ve sperm kromozom anomalileri arasında anlamlı bir bağlantı olduğu ve düşük kalitede sperm parametreleri bulunan olgularda sperm kromozom anomali oranının, normal donörlerle karşılaştırıldığında 2 ila 10 kat yükseldiği bildirilmiştir (Martin, 2008). Bunun yanında az sayıdaki çalışmada ise düşük kalitede sperm parametreleri ile sperm kromozom anomalileri arasında bağlantının bulunmadığından söz edilmektedir (Martin, 2008; Tempest, 2007).

Çalışmamızda sperm parametreleri ile sperm kromozom anomalileri arasında bağlantı bulunmuş ve normozoospermik grup ile astenozoospermik ve teratozoospermik gruplar arasında kromozom anomali sıklığı istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir.

Literatürde bildirilen çalışmalara bakıldığında birbirinden farklı kromozomlar için anöploidi oranları ortaya konmaya çalışılmıştır. Genellikle gonozomların yanında çok farklı otozomlar incelenmiştir. Çalışmamızda son literatürlerde de kullanılmış olan üç renkli FISH yöntemi kullanılmıştır. Bu sayede aynı sperm içerisinde üç farklı kromozom sayısı aynı anda incelenebilmiştir. Yöntem diploid ve dizomik spermeleri kolayca ayrılmasına ve nullizomilerin belirlenmesine olanak vermiştir.

Çalışmaya alınan tüm olgular, normal oosit ile fertilizasyon sonrası yaşamla bağdaşabilecek konseptus oluşturabilecek sperm kromozom anomalileri açısından değerlendirilmiştir. Bu nedenle dizomi 13, dizomi 18, dizomi 21, XY, XX, YY ve diploid kromozom kuruluşuna sahip sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu anomalilere sahip spermeler

fertilizasyon sonrası toplumda en sık gözlenen ve yaşamla bağdaşan Patau, Edwards, Down Sendromu, cinsiyet kromozom anomalileri ve triploidilere neden olmaları bakımından önem taşımaktadırlar (Martin,2003; Gardner, 2004; Vegetti, 2000).

Çalışmamızın sonuçlarında olduğu gibi literatürde de bildirilen birçok çalışmada otozom dizomileri (13,18,21) frekansı açısından normozoospermik grup ile astenozoospermik ve teratozoospermik gruplar arasında fark bulunmuştur. Çalışmamızda olduğu gibi diğer çalışmaların büyük kısmında da normozoospermik grup ile karşılaştırıldığında en farklı grubu teratozoospermi oluşturmaktadır (Martin, 2003; Calogero, 2001; Martin, 2008; Mehdi, 2006; Pang, 1997; Vegetti, 2000). Normozoospermi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p < 0.048$).

Sonuçlar arasındaki farklılığın olgu sayısı, etnik özellik, teknik farklılık, kullanılan problemler gibi çeşitli sebeplerden kaynaklanabileceğinin düşünmekteyiz.

Cinsiyet kromozom dizomileri XXY (Klinefelter sendromu), XXX ve/veya XYY sendromlarına sahip embriyo oluşumuna neden olur. Bu embriyoların büyük kısmı terme ulaşırlar, doğum sonrasında çeşitli fertilité, davranış, öğrenme ve mental problemlere sahip olurlar (Martin, 2003; Vegetti, 2000). Bizim çalışmamızın sonuçları gibi, literatürde bildirilen tüm çalışmalarda teratozoospermik ve astenozoospermik olgularda yapılan sperm analizinde sperm cinsiyet kromozomları için bildirilen dizomilerde (XX, XY, YY) normozoospermik grup ile karşılaştırıldığında farklılık bulunmuştur. Cinsiyet kromozomu dizomilerinde teratozoospermik grupta artış bildirilmiştir, fakat sadece dizomi 18 de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. (Martin, 2003; Mehdi, 2006; Calogero, 2001; Tempest,2004; Asada,2000; Pang,1999; Kirkpatrick, 2008; Vegetti, 2000). Cinsiyet kromozom dizomilerindeki bu belirgin artış dikkati çekmiş ve son yıllarda yapılan mayoz araştırmaları (sinaptonemal kompleks analizi) ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Mayoz araştırmaları özellikle sinaptonemal kompleks analizi mayozda homolog kromozomların incelenmesine ve mayotik rekombinasyonun gözlenmesine dayanan bir yöntemdir (Kirkpatrick, 2008).

Yüksek sperm kromozom anöploidisi oranı yardımcı üreme teknikleri başarısında negatif bir parametredir. Yardımcı üreme tekniklerine en çok yönlendirilen olgu grupları oligozoospermik, astenospermik ve teratospermik erkeklerdir. Doğal olarak anöploid spermilerin normal spermilerin yanında zona pellucida geçişinde bir seleksiyona uğradıkları ve oositi fertilize edemedikleri bilinmektedir. ICSI aneuploid spermier için bir bariyer olabilen zona pellucida engelini ortadan kaldırmaktadır. Böylece doğal seleksiyon ortadan kaldırılarak, potansiyel anöploid embriyo oluşabilme ihtimali artmaktadır (Mehdi, 2006; Varshini, 2011; Mehdi, 2009; Varghase, 2009; Kumar, 2010)

7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Spermiyogramlarda görülen anomalilerin sayısal kromozom anomali sayısı ile uyumlu olduğu görülmüştür. Sperm FISH sonuçları ile sperm apoptozis sonuçları arasında ilişki bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda semen parametreleri (sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfolojisi) ve sperm anöploidi oranları arasındaki ilişki gösterilmiştir. Yüksek sperm anöploidisi oranı yardımcı üreme teknikleri başarısında negatif bir parametredir. Anöploid ve diploid sperm üretimine yatkınlık kromozomal olarak anormal konseptus riskini arttıracaktır.

Sonuç olarak bu durum implantasyon başarısızlığı, gebelik kayıplarına ve/veya kromozomal anomalili fetus ve çocukların doğma olasılığının artmasına yol açacaktır. Özellikle yardımcı üreme tekniklerine en çok yönlendirilen olgular olan teratozoospermik, oligozoospermik ve astenozoospermik erkeklerde sperm anöploidi oranının belirlenmesinin, reproduktif uygulamalara geçmeden önce yardımcı bir test olarak önerilmesi uygundur. Bu sonuca göre hastalara genetik danışmanlık bilgileri verilmeli, gerekli durumlarda preimplantasyon tanı ve prenatal tanıya yönlendirilmelidirler.

Çalışmamızda önemle üzerinde durulmasını istediğimiz durum sperm anöploidili oranının normozoospermik kontrol grubundada azımsanmıyacak değerlerde olduğunu göstermekti. Normozoospermik gruptaki apoptozis oranı % 9,1 ve FISH analizlerinde Nullizomi(18,21), Monozomi (X,Y,13,18,21), Dizomi(X,Y,18,21) ve Trizomi 13 anöploidi frekansları astenozoospermik ve teratozoospermik gruplarla istatistiksel olarak anlamlı bir farka sahip göstermemesine rağmen, bu analizlerde diğer iki gruba yakın anöploidi frekanslarına sahiptir. Bu spermle yapılan YÜT uygulamalarında normal kabul edilen sperm örneklerinin erkek faktörü olarak kabul edilen teratospermi, astenospermi, azospermi gibi sperm örnekleri kadar dikkat edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Yardımcı üreme teknikleri uygulanması öncesinde, sırasında veya sonrasında genetik tanı testlerine başvurulması iyi klinik uygulamaların bir parçasıdır. Bu testler doğru tanı koyulmasını sağladığı gibi uygun genetik danışmanlığının verilmesini de mümkün kılacaktır. Uygulanacak testlere karar verilmesi sırasında klinik bulgulara ek olarak aile öyküsünün

genetik danışmanlık sırasında değerlendirilmesi hastaların daha fazla yarar görmesini sağlayacaktır.

Yardımcı üreme teknikleri tedavilerine başlamadan önce, özellikle erkek hastalara sperm ile ilgili ileri tekniklerin rutin olarak uygulanması, pahalı ve uzun süren bir tedavi olan yardımcı üreme tekniklerinin ülke ekonomisine verdiği zararları önemli oranda azaltacaktır. Başarısız olan ve tekrarlanan tedavi denemeleri düşünüldüğünde ülke ekonomisine sağlayacağı katkı azımsanmayacak miktarlara çıkacaktır. Hasta açısından değerlendirecek olursak, başarısız denemelerin engellenmesi ve hastaların bilgilendirilmesi tedavide önemli bir payı olan hasta psikolojisinin daha sağlıklı olmasına yardımcı olacaktır. Günümüzde genetik kaynaklı hastalıkların sayısını arttığı düşünüldüğünde , genetik tanı analizlerinin bugün ve gelecekte daha sık kullanılmasının gerekliliği ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

'The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology and the Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Guidelines on number of embryos transferred' 2006, *Fertil Steril*; 86: 51-2.

Abraham, L. (2002) *Kierszenbaum Histology and Cell Biology*, 2th edition. Mosby, 529-550.

Adamson, D., Baker, V. (2004) Multiple births from assisted reproductive technologies. A challenge that must be met. *Fertil Steril*, 81: 517-22.

Agarwal, A., Said, T.M., Gardner, D.K. (2004) *Textbook of assisted reproductive techniques*, <http://www.clevelandclinic.org/reproductiveresearchcenter/docs/agrach016.pdf>

Agarwal, A., Said, TM. (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and dna damage in male infertility. *Hum Reprod Upd*, 9:331-34.

Aitken, R., Baker J., Mark, A. Sawyer, Dennis. (2003) Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease, *Reproductive BioMedicine Online*, 7(1), 65-70.

Aitken, R.J. (1999) The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis. *J Reprod Fertil*, 115(1):1-7.

Aitken, R.J., Krausz, C. (2001) Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Biolreprod*, 122:497-506.

Alikani, M., Cekleniak, NA., Walters, E., Cohen, J. (2003) Monozygotic twinning following assisted conception: an analyses of 81 consecutive cases. *Hum Reprod*, 18: 1937-43.

Andersson, AM., Carlsen, E., Petersen, JH., Skakkebaek, NE. (2003) Variation in levels of serum inhibin B, testosterone, estradiol, luteinizing hormone, folliclestimulating hormone, and sex hormone-binding globulin in monthly samples from healthy men during a 17-month period: possible effect of seasons. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:932-7.

Antonelli, A., Gandini, L., Petrinelli, P., et al. (2000) Chromosomal alterations and male infertility. *J Endocrinol Invest*, 23: 677-83.

Arn, P., Chen, H., Tuck Muller, CM., Mankinen, C., Wachtel, G., Li, S., et al. (1994) SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2-p22.11. *Hum Genet*, 93: 389.

Asada, H., Sueoka, K., Hashiba, T., Kuroshima, M., Kobayashi, N., Yoshimura, Y. (2000) The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa. *J Asist Reprod Genet*, 17:51-9.

Attanasio, A., Blank, B., Rager, K., Gubta, D. (1982) Effect of human chorionic gonadotropin on the plasma levels of testosterone, estradiol sex hormone binding globuline and free testosterone in klinefelter syndrome. *Endokrinologie*, 80: 129-134.

Attia, A.M., Al-Inany, H.G., Proctor, M.L. (2006) Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility, *Cochrane Database Syst Rev*, 25;(1):CD005071.

Aziz, N., Said, T., Paasch, U, Agarwal, A. (2007) The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod*, 22:(5):1413-19.

Banarjee, I., Shevlin, M., Taranissi, M., et al. (2008) Health of children conceived after preimplantation genetic diagnosis: a preliminary outcome study. *Reprod Biomed Online*, 16: 376-81.

Basatemur, E., Sutcliffe, A. (2008) Follow-up of children born after ART. *Placenta*, 29: 135-40.

- Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S. (2003) Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*, (18)5:1023-28.
- Bergh, C. (2005) Single embryo transfer: a mini-review. *Hum Reprod*, 20: 323-7.
- Bergh, C., Kjellberg, AT., Karlstrom, PO. (2005) Single-embryo fertilization in vitro maintained birth rate in spite of dramatically reduced multiple birth frequency. *Lakartidningen*, 102:3444-7.
- Berta, P., Hawkins, JR., Sinclair, AH., Taylor, A., Griffiths, BL., Goodfellow, PN., et al. (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis- determining facto. *Nature*, 348: 448.
- Bick, D., Franco, B., Sherins, RJ., Heye, B., Pike, L., Crawford, J. (1992) Brief report: intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *N Engl J Med*, 326: 1752.
- Blennborn, M., Nilsson, S., Hillervik, C., et al. (2005) The couple's decision- making in IVF: one or two embryos at transfer? *Hum Reprod*, 20: 1292-7.
- Bonduelle, M., Bergh, C., Niklasson, A., Palermo, GD., Wennerholm, UB. (2004) Medical follow-up study of 5-year-old ICSI children. *Reprod Biomed Online*, 9:91-101.
- Bonduelle, M., Wennerholm, UB., Lof, t A., et al. (2005) A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod*, 20:413-9.
- Brooks, N.L. (2006): Apoptotic Markers in Ejaculated Human Spermatozoa. http://etd.uwc.ac.za/usrfiles/modules/etd/docs/etd_init_5617_1174551574.pdf
- Calogero, AE., De Palma, A., Grazioso, C., Baron, e N., Burrello, N., Palermo, I., Gulisano, A., Pafumi, C., D'Agata, R. (2001) High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and relationship with intracytoplasmic sperm injection outcom. *Hum Reprod*, 16:1433-9.
- Cayli S., Sakkas, D., Vigue, L., Demir, R., ve ark. (2004) Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod*, 10(5):365-72.
- Cebesoy, F.B., Ünlü, C., Aydos, K., Baltacı, V. (2006) The Relationship Between Sperm Morphology-Acridine Orange Staining Andfertilization Rate-Embryo Quality in Icsi. *J Turkish-German Gynecol Assoc*, 7(2):110-14.
- Cedenho, A.P.,Lima, S.B.,Cenedeze, M.A.,Spaine, D.M., ve ark. (2006) Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod*, (21)7:1791-94.
- Celik-Ozenci, C., Catalanotti, J., Jakab, A., Aksu, C., ve ark. (2003) Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fish: shape analysis and objective morphometry. *Biol reprod*, 69:1347-55.
- Chandley, A.C. (1979) The Chromosomal Basis of human infertility, *Br Med Bul*, 35.
- Chen, Z., Hauser, R., Trbovich, A.M., Shifren, J.L. ve ark. (2006) The Relationship BetweenHuman Semen Characteristics and Sperm Apoptosis: A Pilot Study. *J Androl*, 27(1):112-20.
- Choi, JM., Chung, P., Veeck, L., Mielnik, A., Palermo, GD. (2004) Schlegel PN Center for Reproductive Medicine and Infertility. Weill Medical College of Cornell University, New York, New York 10021, USA, *Fertil Steril*, 81(2): 337-41.
- Cunha, GR., Chung, LW. (1981) Stromal-epithelial interactions: I Induction of prostatic phenotyp in urothelium of testicular feminized (Tfm_y) mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 14:1317-24.

- Cuppens, H., Cassiman, JJ. (2004) CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *Int J And*, 27: 251-256.
- Danziger, KL., Black, LD., Keiles, SB., Kammesheidt, A., Turek, PJ. (2004) Improved detection of cystic fibrosis mutations in infertility patients with DNA sequence analysis. *Hum Reprod*, 19: 540-546.
- Daudin, M., Bieth, E., Bujan, L., Masat, G., Pontonnier, F., Mieuisset, R. (2000) Congenital bilateral absence of the vas deferens clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and implications for genetic counseling. *Fertil Steril*, 74: 1164-69.
- Dayangaç, D., Erdem, H., Yılmaz, E., Şahin, A., Sohn, C., Özgüç, M., Dörk, T. (2004) Mutations of the CFTR gene in Turkish patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Hum Reprod*, 19: 1094-1100.
- De Jonge, C. (2002) The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Fertil Steril*, 5: 51-53.
- De Palma, A., Burrello, N., Barone, N., D'Agata, R., Vicari, E., Calogero, AE. (2005) Patients with abnormal sperm parameters have an increased sex chromosome aneuploidy rate in peripheral leukocytes. *Hum Reprod*, 20: 2153-2156.
- Delilbası, L. (2008) *In Vitro Fertilizasyon Laboratuvar Yöntemleri. Birinci Basım Günes Tıp Kitabevleri, Ankara, 61-83.*
- Dimitrios, I., Nikolaos, V., Alexandra, T., Israel, R., Nikolaos, V. (2004) Description and molecular analysis of SRY and AR genes in a patient with 46,XY pure gonadal dysgenesis (Swyer syndrome). *Annales de génétique*, 47, 185-190.
- D'Occhio, MJ., Hengstberger, KJ., Johnston, SD. (2007) Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim Reprod Sci*, 101(1-2):1-17.
- Donepudi, M., Grutter, M.G. (2002) Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry*, 101 – 102:145-53.
- Durak, B. (1998) Normal ve Translokasyon Taşıyıcısı Erkeklerin Spermiumlarında FISH ile Kromozom Analizi. *Tıbbi Genetik Bilim Dalı Doktora Tezi. Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.*
- Düzcan, F., Atmaca, M., Ozan Çetin, G., Bağcı, H. (2003) Cytogenetic studies in patients with reproductive failure. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 82: 53- 56.
- Egozcu, J., Blanco, J., Vidal, F. (1997) Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update*, 3(5):441-52.
- Egozcue, S., Blanco, J., Vendrell, J.M., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Bari, P.N., Vidal, F., Egozcue, J. (2000) Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*, 6(1):93-105.
- Egozcue, S., Blanco, J., Vidal, F., Egozcue, J. (2002) Diploid sperm and the origin of triploidy. *Hum Reprod*, 17(1):5-7.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4): 495-516.
- Elsawi, MM., Pryor, Jp., Klufio, G., Barnes, J., Patton, MA. (1994) Genital Tract function in men with Noonan syndrome. *J Med Genet*, 31: 468.
- Enciso, M., Muriel, L., Fernández, J.L., Goyanes, V. ve ark. (2006) Infertile Men With Varicocele Show A High Relative Proportion Of Sperm Cells With Intense Nuclear Damage Level, Evidenced By The Sperm Chromatin Dispersion Test . *J Androl*, (27):1.

- Erenpreiss, J., Jepson, K., Giwercman, A., Tsarev, I. ve ark. (2004) Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod*, 19(10):2277–82.
- Ericson, A., Nygren, KG., Olausson, PO., Kallen, B. (2002) Hospital care utilization of infants born after IVF. *Hum Reprod*, 17: 929-32.
- Evenson, D.P, Wixon, R. (2005) Comparison of the Halosperm test kit with the sperm chromatin structure assay(SCSA) infertility tes in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril*, 84(4):846-9.
- Fauser, B.C.J.M., Rutherford, A. J., Strauss, J. F.(1999) Van Steirteghem A. *Molecular biology in Reproductive Medicine* 11h edition. Parthenon publishing group, 271-295.
- Ferlin, A., Garolla, A., Foresta, C. (2005) Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities. *Cytogenet Genome Res*, 111: 310-316.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., ve ark. (2005) Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*, (84):4.
- Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M.T., Goyanes, C.V., ve ark. (2003) The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm dna fragmentation. *J Androl*, 24:1.
- Foresta, Moro, E., Ferlin, A. (2001) Y chromosome mikrodeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocrinol Rev*, 22: 226.
- Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caruso, F., Eleuteri, P. (2004) Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod*, (19)6:1409-17.
- Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., ve ark. (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 15(4):830-39.
- Gardner, R.J.M., Sutherland, GR. (2004) Reproductive Failure. In: *Chromosome abnormalities and genetic counselling* 3rd edn., New York:Oxford University Press, pp.339-349.
- Genest, P., Genest, F.B. (1985) The influence of the length of the human Y chromosome on spontaneous abortions. A prospective study in family lines with inherited polymorphic Y chromosomes. *Ann. Genet*, 28: 143–148.
- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., Darzynkiewicz, Z. (1993) Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*, 207(1):202-5.
- Graves, J.A., Foster, J.W. (1994) Evolution of mammalian sex chromosomes and sex determining genes. *Int. Rev. Cytol*, 154: 191–259.
- Griffin, D.K., Hyland, P., Tempest, H.G., Homa, S.T. (2003) Safety issues in assisted reproduction technology: Should men undergoing ICSI be screened for chromosome abnormalities in their sperm?. *Hum Reprod*, 18(2):229-35.
- Halliday, J. (2007) Outcomes of IVF conceptions: are they different. *Best Prac Res Clin Obstet Gynecol*, 21: 67-81.
- Hansen, M., Bower, C., Milne, E., de Klerk, N., Kurinczuk, JJ. (2005) Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects- a systematic review. *Hum Reprod*, 20: 328-38.

- Harley, VR., Jakson, DI., Hextall, PJ (1992) DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Scienc*, 255: 453.
- Helmerhorst, FM., Perquin, DA., Donker, D., Keirse, MJ. (2004) Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ*, 328:261-5.
- Hengartner, M.O. (2000) The Biochemistry Of Apoptosis. *Nature*, 407.
- Henkel, R., Hajimohammad, M., Staf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C. (2004) Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*, 81(4):965-72.
- Host, E., Lindenberg, S., Smidt-Jensen, S. (2001) The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 79(7):559-63.
- Huang, C.C., Lin, D.P.C., Tsao, H.M., Cheng, T.C., ve ark. (2005) Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril*, 84,1:130-40.
- Hughes, C.M., Lewis, S.E., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W. (1998) The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod*, 13(5):1240-7.
- Huszar, G., and Vigue, L. (1990) Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 25:258-62.
- Huszar, G., Stone, K., Dix, D., Vigue, L. (2000) Putative creatine kinase Misoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod*, 63:925- 32.
- Irvine, D.S., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J. (2000) DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality, *J Androl*, 21:33-44.
- Irvine, DS., Twigg, JP., Gordon, EL., Fulton, P. A. ve ark. (2000) DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. *J Androl*, 21:33-44.
- Jackson, RA., Gibson, KA., Wu, YW., Croughan, MS. (2004) Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 103:551-63.
- Jarzabek, K., Zbucka, M., Pepinski, W., Szamatowicz, J., Domitrz, J., Janica, J., Wolczynski, S., Szamatowicz, M. (2004) Cystic fibrosis as Feride İffet Şahin 151 a cause of infertility. *Reproductive Biology*, 4: 119-129.
- Johnson, MD. (1998) Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril*, 70: 397-411.
- Joy, J., McClure, N., Cooke, IE. (2008) A comparison of spontaneously conceived twins and twins conceived by artificial reproductive technologies. *J Obstet Gynecol*, 28: 580-5.
- Kadioğlu, A., Aydos, K., Çayan, S., Semerci, B., Orhan, İ., Aşçı, R., Yaman, MÖ., Usta, MF., Kendirci, M., (edt) (2004) İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul: Subfertil erkeğin değerlendirilmesi, İn: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi, 161-174.
- Kadioğlu, A., Çayan, S., Semerci, B., Orhan, İ., Aşçı, R., Yaman, MÖ., Usta, MF., Kendirci, M., (edt) (2004) İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul: Azospermik Olgunun Değerlendirilmesi, İn: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi, 232-237.
- Kadioğlu, A., Çayan, S., Semerci, B., Orhan, İ., Aşçı, R., Yaman, MÖ., Usta, MF., Kendirci, M., (edt). (2004) İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul: Şamlı MM. Spermatogenezin genetik kontrolü, İn: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi, 101-114.

- Kazım, Chohan., Jeanine, Griffin., Marie Lafromboise. (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl*, (1):27.
- Kent- First, M., Kol, A., Muallem, R. (1996) Infertility in intracytoplasmic sperm injection-derived sons. *Lancet*, 348: 332.
- Kent- First, M., Muallem, A., Shultz, J., et al. (1999) Defining regions of the Y chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Molec Reprodand Develop*, 53 (1): 27-41.
- Kerr, J.F.R. (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182: 471-74.
- Khalili, M.A., Maybodi, F.A., Anvari, M., Taleb, A.R. (2006) Sperm nuclear dna in ejaculates of fertile and infertile men correlation with semen parameters. *J Urol*, 3(3):154-59.
- Khosrowbeygi, A., Zarghami, N., Deldar, Y. (2004) Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. *Iranian J Reprod Med*, 2(2):58-64.
- Kierszenbaum, AL. (2001) Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Develop*, 58:357-58.
- Kim, E.D., Bischoff, FZ., Lipshultz, LI., Lamb, DJ. (1998) Genetic concerns for the subfertile male in the era of ICSI. *Prenat Diagn*, 18: 1349-1365.
- Kirkpatrick, G., Ferguson, KA., Gao, H., Tang, S., Chow, V., Yuen, BH., Ma, S. (2008) A comparison of sperm aneuploidy rates between infertile men with normal and abnormal karyotypes. *Hum Reprod*, 23:1679-83.
- Kirkpatrick, RH. (2008) Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod*, 4:379-90.
- Kjellberg, AT., Carlsson, P., Bergh, C. (2006) Randomized single versus double embryo transfer: obstetric and paediatric outcome and a cost-effectiveness analysis. *Hum Reprod*, 21: 210-6.
- Kjessler, B., Mancini, RE., ve Martini, L., (Eds.) (1974) Academic Pres, New York: Chromosomal Constitution and male reproductive failure In: *Male Fertility and Sterility*, 231-247.
- Klemetti, R., Gissler, M., Sevon, T., Koivurova, S., Ritvanen, A., Hemminki, E. (2005) Children born after assisted fertilization have an increased rate of major congenital anomalies. *Fertil Steril*, 84: 1300-7.
- Knoester, M., Helmerhorst, FM., Vandenbroucke, JP., van der Westerlaken, LA., Walther, FJ., Veen, S. (2008) Perinatal outcome, health, growth and medical care utilization of 5-to 8-year oldintracytoplasmic sperm injection singletons. *Fertil Steril*, 89:1133-46.
- Koh, E., Choi, J., Namiki, M. (2005) Y chromossome and new concept of azoospermia factor. *Reproduc Med Biol*, 4: 123-127.
- Koivurova, S., Hartikainen, AL., Gissler, M., Hemminki, E., Jarvelin, MR. (2007) Post-neonatal hospitalization and health care costs among IVF children: a 7-year follow-up study. *Hum Reprod*, 22:2136-41.
- Koivurova, S., Hartikainen, AL., Sovio, U., Gissler, M., Hemminki, E., Jarvelin, MR. (2003) Growth psychomotor development and morbidity up to 3 years of age in children born after IVF. *Hum Reprod*, 18:2328-36.
- Lachaud, C., Tesarik, J., Cañadas, M.L., and Mendoza, C. (2004) Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod*, 19(3):607-10.

Lahn, B.T., Page, D.C. (1999) Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science*, 286: 964–967 67.

Lopes, S., Sun, JG., Jurisicova, A., Meriano, J. (1998) Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 69(3):528-32.

Mack, S., Bhattacharyya, AK., Joyce, C., Van Der Ven, H., ve ark. (1983) Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol Reprod*, 28(5):1032-42.

Madon, PF., Athalye, AS., Parikh, FR. (2005) Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reproductive BioMed Online*, 11: 726-732.

Madon, PF., Tommerup, N. (2005) *ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: S Karger.

Maher, ER., Afnan, M., Barratt, CL. (2003) Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs. *Hum Reprod*, 18:2508-11.

Martin, RH., Rademaker, AW., Grene, C., Ko, E., Hoang, T., Barclay, L., Chernos, J. (2003) A Comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate and severe oligozoospermia. *Biol Reprod*, 69:335-9.

Mau-Holzmann, UA. (2005) Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res*, 111: 317-336.

Mc callum, T., Milunsky, J., Munariz, R., Carson, R., Sadeghi- Nejad, H., Oates, R. (2001) Unilateral renal agenesis associated with congenital bilateral absence of the vas deferens: phenotypic findings and genetic considerations. *Hum Reprod*, 16: 282.

McDonald, S., Murphy, K., Beyene, J., et al. (2005) Perinatal outcomes of in vitro fertilization twins: a systematic review and meta- analyses. *Am J Obstet Gynecol*, 193:141-52.

McDonald, SD., Murphy, K., Beyene, J., Ohlsson, A. (2005) Perinatal outcomes of singleton pregnancies achieved by in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *J ObstetGynaecol Can*, 27: 449-59.

McKelvey-Martin, V.J., Melia, N., Walsh, I.K., Johnston, S.R., Hughes, C.M., Lewis, S.E., Thompson, W. (1997) Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mutat Res*, 29;375(2):93-104.

Mehdi, M., Smatti, B., Saad, A., Guerin, JF., Benchaib, M. (2006) Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomic aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia. *Andrologia*, 38:137-41.

Mennicke, K., Klingenberg, RD., Bals-Pratsch, M., Diedrich, K., Schwinger, E. (2005) Rational approach to genetic testing of cystic fibrosis (CF) in infertile men. *Andrologia*, 37: 1-9.

Middelburg, KJ., Heineman, MJ., Bos, AF., Hadders-Algra, N. (2008). Neuromotor, cognitive, language and behavioural outcome in children born following IVF or ICSI-a systematic review. *Hum Reprod Update*, 14:219-31.

Moein, M.R., Dehghani, V.O. (2007) Reactive Oxygen Species(ROS) Level in Seminal Plasma of infertile Men And Healthy Donors. *Iranian J Reprod Med*, 5(2):51-55.

Moll, AC., Imhof, SM., Cruysberg, JR., Schouten-van Meeteren, AY., Boers, M., van Leeuwen, FE. (2003) Incidence of retinoblastom in children born after in-vitro fertilisation. *Lancet*, 361:309-10.

- Morris, I.D., Ilott, S., Dixon, L., Brison D.R. (2002) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod*, (17)4:990-98.
- Mortimer, D. (2000) Sperm preparation methods. *J Androl*, 21(3):357-65.
- Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thornton, J., Mascha, E. (2004) Relationship Between ROS Production, Apoptosis and DNA Denaturation in Spermatozoa from Patients Examined for Infertility. *Hum Reprod*, 19(1):129-38.
- Mroz, K., Carrel, L., Hunt, P.A. (1999) Germ cell development in the XXY Mouse: evidence that X chromosome reactivation is independent of sexual differentiation. *Developmental Biology*, 207: 229-238.
- Muriel, L., Garrido, N., Fernández, J.L., Remohí, J., ve ark. (2006) Value of the sperm DNA fragmentation level, measured by the sperm chromatin dispersion (SCD) test, in the IVF and ICSI outcome. *Fertil Steril*, 85:371– 83.
- Muriel, L., Meseguer, M., Fernández, J.L., Alvarez, J., ve ark. (2006) Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination (IUI): a doubleblind prospective study. *Hum Reprod*, 21:738–44.
- Norwitz, E.R., Edusa, V., Park, J.S. (2005) Maternal physiology and complications of multiple pregnancy. *Semin Perinatol*, 29: 338-48.
- Okada, H., ve Fujioka, H. (1999) Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic. *Human Reprod*, 14: 946-52.
- Ombet, W., Cadron, I., Gerri, J., et al. (2005) Obstetric and perinatal outcome of 1655 ICSI and 3974 IVF singleton and 1102 ICSI and 2901 IVF twin births: a comparative analysis. *Reprod Biomed Online*, 11: 76-85.
- Osegbe, D.N., Akiyanju, O.O. (1987) Testicular dysfunction in men with sickle cell disease. *Postgrad Med J*, 63: 95-70.
- Özçelik, N. (1999) *Tıbbi Biyoloji*. Isparta, 103-111.
- Özdiler, E., Aydos, K. (2000) *Ankara: Klinik Androloji*, 71-101.
- Paasch, U., Grunewald, S., Agarwal, A., Glandera, H.J. (2003) Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril*, 81:802-9.
- Palermo, G.D., Schlegel, P.N., Sills, E.S., Veeck, L.L., Zaninovic, N., Menendez, S., Rosenwaks, Z. (1998) Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med*, 338(9):588-90.
- Pandian, Z., Templeton, A., Serour, G., Bhattacharya, S. (2005) Number of embryos for transfer after IVF and ICSI: a Cochrane review. *Hum Reprod*, 20: 2681-7.
- Pang, M.G., Hoegerman, S.F., Cuticcia, A.J., Moon, S.Y., Doncel, G.F., Acosta, A.A., Kearns, W.G. (1999) Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 14:1266-73.
- Pao, C.C., Kao, S.M., Hor, J.J., Chang, S.Y. (1993) Lack of mutational alteration in the conserved region of ZFY and SRY genes of 46, XY females with gonadal dysgenesis. *Hum Reprod*, 8: 224.
- Paoloni-Giacobino, A. (2006) Implications of reproductive technologies for birth and developmental outcomes: imprinting defects and beyond. *Expert Rev Mol Med*, 8:1-14.

- Peirouvi, T., Farjah, G., Rad, J., Novin, M.G. (2007) Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. *Iranian J Reprod Med*, 5(3):17-20.
- Pinborg, A. (2005) IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum Reprod Update*, 11: 575-93.
- Ponjaert-Kristoffersen, I., Bonduelle, M., Barnes, J., Nekkebroeck, J., Loft, A., Wennerholm, UB. (2005) International collaborative study of intracytoplasmic sperm injection-conceived, invitrofertilization-conceived, and naturally conceived 5-year- old child outcomes: cognitive and motor assessments. *Pediatrics*, 115:283-9.
- Potts, R.J., Newbury, C.J., Smith, G., Notarianni, L.J. ve ark. (1999) Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation Research*, 423: 103–111.
- Prasanth, S.G., Ali, S. (2003) Expression of Protooncogene c-kit receptor in rats *Rattus norvegicus* and identification of a mutant mRNA transcript implicated in spermatogenic failure. *DNA Cell Biol*, 22: 447–456.
- Quintana-Murci, L., Fellous, M. (2001) The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland”. *J. Biomed. Biotechnol*, 1: 18–24.
- Quinzii, C., Castellani, C. (2000) The cystic fibrosis transmembrane regulator gene and male infertility. *J Endocrinol invest*, 23: 684.
- Raimondi, S., Pedotti, P., Taioli, E. (2005) Meta-analysis of cancer incidence in children born after assisted reproductive technologies. *Br J Cancer*, 93:1053-6. (1983) Human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol Reprod*, 28(5):1032-42.
- Reddy, UM., Wapner, RJ., Rebar, RW., Tasca, RJ. (2007) Infertility, assisted reproductive technology, and adverse pregnancy outcomes: executive summary of a National Institute of Child Health and Human Development Workshop. *Obstet Gynecol*, 109:967-77.
- Reijo, R., Lee, T.Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L.G., Rosenberg, M., Rozen, S., Jaffe, T., Straus, D., Hovatta, O. (1995) Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat. Genet*, 10: 383–393.
- Reynolds, MA., Schieve, LA., Martin, JA., Jeng, G., Macaluso, M. (1997-2000) Trends in multiple births conceived using assisted reproductive technology, United States, *Pediatrics* 2003; 111:1159-62.
- Ricci, G., Perticarari, S., Fragonas, E., Giolo, E., ve ark. (2002) Apoptosis in human sperm : Its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod*, 17(10):2665 -72.
- Rimm, AA., Katayama, AC., Diaz, M., Katayama, KP. (2004) A metaanalysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *J Assist Reprod Genet*, 21: 437-43.
- Rives, N., Joly, G., Machy, A., Simeon, N., Leclers, P., Mace, M. (2000) Assesment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comporison with fertile and infertile males with normal karyotype. *Molecular Human Reproduction*, 6: 107-112.
- Rutland, J., de long, RU., (1990) Random ciliary orientation. A cause of respiratory tract disease. *N Engl J Med*, 323 (24): 1681.
- Ryan, GL., Zhang, SH., Dokras, A., et al. (2004) The desire of infertile patients for multiple births. *Fertil Steril*, 81: 500-4.
- Sakkas, D, Manicardi, GC. (2000) The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear dna anomalies. *Hum Reprod*, 15:1112–16.

- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., ve ark. (1999) Origin of dna damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*, 4:31-37.
- Sakkas, D., Moffat, O. (2002) Nature of dna damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. *Biol reprod*, 66:1061-67.
- Saleh, R A., Agarwal, A. (2002) Oxidative Stress And Male Infertility :From Research Bench To Clinical Practice- Review. *J Androl*, 23, No.6.
- Saleh, RA., Agarwal, A. (2003) Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*, 79:3.
- Schachter, M., Raziell, A., Friedler, S., Strassburger, D., Bern, O., Ron-el, R. (2001) Monozygotic twinning after assisted reproductive techniques: a phenomenon independent of micromanipulation. *Hum Reprod*, 16: 1264-9.
- Schlegel, PN., Matthew, H. (2005) Erkek Reprodüktif Fizyolojisi. İç: Alan BR, E Darracott V, Alan JW, editörler. *Campbell Üroloji. Güneş Kitabevi*, s.1437-41.
- Schmid, TE., Brinkworth, MH., Hill, F., Solter, E., Kamischke, A., Marchetti, F., Nieschlag, E., Wyrobek, AJ. (2004) Detection of structural and numerical chromosomal abnormalities by ACM-FISH analysis in sperm of oligozoospermic infertility patients. *Hum Reprod*, 19:1395-400.
- Schmid, TE., Eskenazi, B., Baumgartner, A., Marchetti, F., ve ark. (2007) The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod*, 22(1): 180–87.
- Seli, E., Sakkas, D. (2005) Spermatozoal Nuclear Determinants of Reproductive Outcome: Implications For ART. *Hum Reprod Update*, 11(4):337–349.
- Sepaniak, S., Forges, T. (2006) The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicol*, 223:54–60. 83.
- Sharma, R.K., Said, T., Agarwal, A. (2004) Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome *Asian J Androl*, 6:139-48.
- Shekarriz, M., DeWire, M.D. (1995) A Method of Human Semen Centrifugation to Minimize The Iatrogenic Sperm Injuries Caused by Reactive Oxygen Species. *Eur Urol*, 28:31-35.
- Sher, A., Seyed, E., Hasnain. (2003) Genomics of the human Y-chromosome 1. Association with male infertility. *Gene*, 321: 25-37.
- Shi, Q., Martin, RH. (2001) Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction*, 121:655-66.
- Siffroi, JP., Bourhis, CL., Krausz, C., Barboux, S., Quintana-Murci, L., Kanafani, S., Rouba, H., Bujan, L., Bourrouillou, G., Seifer, I., Boucher, D., Fellous, M., McElreavey, K., Dadoune, JP. (2000) Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. *Hum Reprod*, 15: 2559-2562.
- Sikka, C.S. (2004) Role of Oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal Androl*, 25.1.
- Simoni, M., Bakker, E., Krausz, C. (2004) EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *Int J And*, 27: 240-249.
- Simpson, JL. Churchill Livingstone, (1990) New York: Emery AEH, (Ed.): Disorders of gonads and internal reproductive ducts. In: *Principles and Practice of Medical Genetics*, 1593.

- Singh, NP., Muller, CH., Berger, RE. (2003) Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, 80(6):1420-30.
- Skaletsky, H., et al. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003, 423: 825–837.
- Smithers, PR., Halliday, J., Hale, L., et al. (2003) High frequency of cesarean section, antepartum hemorrhage, placenta previa, and preterm delivery in in-vitro fertilization twin pregnancies. *Fertil Steril*, 80: 666-8.
- Speed, EM. (1989) Heterologous pairing and fertility in humans. In: Gillies CB, editor. *Fertility and chromosome pairing: recent studies in plants and animals*. Boca Raton (FL): CRC Pres, 1-36.
- Starke, H., Seidel, J., Henn, W., Reichardt, S., Volleth, M., Stumm, M., Behrend, C., Sanding, KR., Kelbova, C., Senger, G., Albrecht, B., Hansmann, I., Heller, A., Claussen, U., Liehr, T. (2002) Homologous sequences at human chromosome 9 bands p12 and q13-21.1 are involved in different patterns of pericentric rearrangements. *Eur J Hum Gene*, 10: 790-800.
- Stevanovic, M., Lovell-Badge, R., Collignon, J., Goodfellow, P.N. (1993) SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum. Mol. Genet*, 2: 2013–2018.
- Stromberg, B., Dahlquist, G., Ericson, A., Finnstrom, O., Koster, M., Stjernqvist, K. (2002) Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *Lancet*, 359:461-5.
- Sun, C., Skaletsky, H., Birren, B., Devon, K., Tang, Z., Silber, S., Oates, R., Page, D.C. (1999) An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y chromosomal gene USP9Y. *Nat. Genet*, 23: 429– 432.
- Sun, J.G., Jurisicova, A., Casper, R.F. (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 56(3):602-7.
- Sun, J.G., Jurisicova, A., Casper, R.F. (1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 56: 602-07.
- Sun, Y., Vestergaard, M., Christensen, J., Zhu, J.L., Bech, BH., Olsen, J. (2007) Epilepsy and febrile seizures in children of treated and untreated subfertile couples. *Hum Reprod*, 22:215-20.
- Sutcliffe, AG., Ludwig, M. (2007) Outcome of assisted reproduction. *Lancet*, 370:351-9.
- Tempest, HG., Homa, ST., Dalakiouridou, M., Christopikou Wright, D., Zhai, XP., Griffin, DK. (2004) The association between male infertility and sperm disomy: Evidence for variation in disomy levels among individuals and a correlation between particular semen parameters and disomy of specific chromosome pairs. *Reprod Bio Endocrin*, 2:1-9.
- Tiepolo, L., Zuffardi O. (1976) Localization of factor controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*, 34: 119.
- Tilford, C.A., Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Rozen, S., Brown, L.G., Rosenberg, M., McPherson, J.D., Wylie, K., Sekhon, M., Kukaba, T.A., Waterston, R.H., Page, D.C. (2001) A physical map of the human Y chromosome. *Nature*, 409: 943–945.
- TMOR, J. (1996) Genetic disorders affecting male infertility. In *advances in urology* (eds): M. T. Book: Chicago, Year Book Medical Publishers, vol. 9, pp. 363-405.
- Türk, G., Aksu, E.H. (2006) Spermatozoon Dna'sı Hasarı. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*, 20(1):85-95.
- Ulukaya, E. Apoptozis Ders Notları, Uludag Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf

- Underhill, P.A., Passarino, G., Lin, A.A., Shen, P., Foley, R.A., Mirazo'n Lahr, M., Oefner, P.J., Cavalli-Sforza, L.L. (2001) The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origin of modern human populations. *Ann. Hum. Genet.*, 65: 43–62.
- Vaffe, T., Qates, RD. (1994) Genetic abnormalities and reproductive failure, *Urol CI North Am*, 21: 389.
- Van Asche, E., Boundella, M., Tournaye, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P. (1996) Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod*, 11 (Suppl 4) : 1-24.
- Van Opstal, D., Los, FJ., Ramlakhan, S., Van Hemel, JO., Van Den Ouweland, AM., Brandenburg, H., Pieters, MH., Verhoeff, A., Vermeer, MC., Dhont, M., In't Veld, PA. (1997) Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 12: 682-686.
- Van Steirteghem, A., Bonduelle, M., Devroey, P., Liebaers, I. (2002) Follow-up of children born after ICSI. *Hum Reprod Update*, 8:111-6.
- Van Voorhis, BJ. (2006) Outcomes from assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol*, 107:183-200.
- Vegetti, W., Van Assche, E., Frias, A., Verheyen, G., Bianchi, MM., Bonduelle, M., Liebaers, I., Van Steirteghem, A. (2000) Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod*, 15:351-65.
- Virro, M.R., Larson -Cook, K.L., Evenson, D.P. (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril*, (81), 5:1289-95.
- Vogt, P., et al. (1992) Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet*, 89: 491.
- Vogt, P.H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., Ko'hn, F.M., Schill, W.B., Farah, S., Ramos, C., Hartmann, M., Hartschuh, W., Meschede, D., Behre, H.M., Castel, A., Nieschlag, E., Weidner, W., Gro'ne, H.J., Jung, A., Engel, W., Haidl, G. (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different sub-regions in the Yq11. *Hum. Mol. Genet*, 5: 933– 943.
- Vogt, PH., Edelman, A., Kirch, S. (1996) Human Y chromosome: azoospermia factors (AZF) mapped the different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet*, 5: 993.
- Weng, S.H., Taylor, S.L., Morshedi, M., Schuffner, A., et al. (2002) Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*, 8(10):984–91.
- WHO (1999) World Health Organization Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Sperm-Cervical Mucus _ntraction. 4th Ed. New York: Cambridge University Press: Cambridge
- Wright, VC., Chang, J., Jeng, G., Macaluso, M. (2008) Assisted reproductive technology surveillance-United States, 2005. *MMWR Surveill Summ*, 57:1-23.
- Wyrobek, AJ., Schimid, TE., Marchetti, F. (2005) Cross species sperm-FISH assay for chemical testing and assessing paternal risk for chromosomally abnormal pregnancies. *Environ Mol Mutagen*, 45:271-83.
- Yakin, K., Balaban, B., Urman, B. (2005) Is there possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis. *Int J Urol*, 12: 984-989.
- Yan, N., Shi, Y. (2001) Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual Review of Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Genes & Development*, 15: 2922–33.

Younglai, EV., Holt, D., et Al. (2001) Sperm Swim-Up Techniques and DNA Fragmentation. *Hum Reprod*, 16(9):1950–53.

Zhu, JL., Basso, O., Obel, C., Bile, C., Olsen, J. (2006) Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: danish natioanal birth cohort. *BMJ*, 333: 679.

Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., Zenzes, M.T. (2001) Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*, 75:674–7

Zini, A., Libman, J. (2006) Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*, 175(5):495-500.

Zinn, A.R., Ross, J.L. (1998) Turner syndrome and haploinsufficiency. *Curr. Opin. Genet. Dev*, 8: 322– 327.

ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı : Özcan BUDAK
- Doğum yeri ve tarihi : KOCAELİ 1979
- Uyruğu : T.C.
- Medeni Durumu : EVLİ
- Askerlik Durumu : 2008 Yılında yapıldı
- Çalıştığı kurum : KOÜ Tıp Fak. Hast. Tüp Bebek Merkezi
- İletişim Adresi ve telefonu : KOÜ Tıp Fak. Hast. Tüp Bebek Merkezi Umuttepe
Kampüsü KOCAELİ Tel: 0546 895 18 73
- Yabancı dili : İngilizce, 2008 ÜDS (80 PUAN)
- Unvanları : -Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri
Enst. Histoloji- Embriyoloji A.D. Yüksek Lisans (2010)
-GYTE Yüksek Lisans Biyoloji Bölümü bitirildi (2008)
-Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen – Edebiyat A.D
Biyoloji Bölümü Mezunuyum (2004)
-Marmara Üniversitesi Sağ. Hiz. MYO
Tıbbi Laboratuvar Mezunuyum (1999)
- Mesleki Deneyimi : Sağlık Bakanlığı Embriyoloji Laboratuvarı Sorumlusu Sertifikasını, İstanbul Özel Kadıköy Acıbadem Hastanesinde aldığım üç aylık eğitimle aldım. Son altı yıldır Embriyoloji ve Androloji laboratuvarlarında aktif olarak çalışmaktayım. Ayrıca özel kuruluşlarda sekiz yıl Biyokimya ve Mikrobiyoloji laboratuvar deneyimine sahibim.