

T. C. İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**İNFERTİL ERKEKLERİN SPERM ÖRNEKLERİNDE C-MET
(HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ / SKATTER FAKTÖRÜ
RESEPTÖRÜ) VE HGF (HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ)
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Doktor Başak Özge KAYAN

UZMANLIK TEZİ



İSTANBUL-2016

T. C. İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM

ANABİLİM DALI

**İNFERTİL ERKEKLERİN SPERM ÖRNEKLERİNDE
C-MET (HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ / SKATTER
FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ) VE HGF (HEPATOSİT BÜYÜME
FAKTÖRÜ) ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Başak Özge KAYAN

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

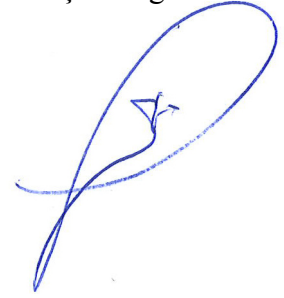
Doç. Dr. Faruk ABİKE

İSTANBUL-2016

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam sonucunda oluşturulduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynak listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve yazım haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Dr. Başak Özge KAYAN



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam sayın Prof. Dr. Cem İYİBOZKURT'a, tezimin ilk fikir ve kurulum aşamasından başlayarak her sürecindeki desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Cem Murat BAYKAL'a, tezime olan katkılarının yanında, eğitim sürecimde de pek çok tecrübesinden, bilgi ve deneyiminden faydalandığım tez danışmanı hocam Doç.Dr.Faruk ABİKE'ye, uzmanlık eğitimim boyunca çok değerli tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen, mesleki eğitimime büyük katkıları olan saygıdeğer hocalarım Prof.Dr.İlkan DÜNDER, Prof.Dr.Alın BAŞGÜL YİĞİTER, Prof.Dr.Bülent BAYSAL, Prof.Dr.M.Ziya GÜNENÇ, Doç.Dr.Banu BİNGÖL GÜNENÇ, Doç.Dr.Nilgün GÜDÜCÜ KUTAY, Yrd.Doç.Dr.Herman İŞÇİ, Yrd.Doç.Dr.Yusuf OLGAC'a teşekkürlerimi sunarım.

IVF Androloji Laboratuvarı'nda numunelerin toplanması, ayrılması ve saklanmasında göstermiş oldukları ilgi ve özen nedeniyle klinik embriyolog Uzm.Dr.Cenk ÖZCAN ve androlog Selahattin SÜTÇÜOĞLU'na, numunelerin itinayla çalışılmasını sağlayan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan sayın Prof.Dr.Uzay GÖRMÜŞ ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan sayın Doç.Dr.Veysel Sabri HANÇER hocalarıma çok teşekkür ederim.

Hem uzmanlık eğitimim boyunca, hem de tezimde büyük yardımları olan ağabeyim Doç.Dr.Murat GÖNENÇ ve ablam Yrd.Doç.Dr.Gökçenur GÖNENÇ'e, birlikte çalışmaktan her zaman büyük keyif aldığım asistan arkadaşım sevgili Dr.Güliz SIDAR'a, birlikte çalıştığım bütün çalışma arkadaşlarıma, beni her zaman destekleyen ve yanımda olan sevgili aileme ve özellikle kardeşlerim Yrd.Doç.Dr.Tuba KAYAN TAPAN ve Dr.Özcan Ekin KAYAN'a

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VIII
TABLOLAR DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
ÖZET.....	XII
SUMMARY.....	XIII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. İNFERTİLİTE TANIMI, İNSİDANSI VE ETİYOLOJİSİ.....	1
1.1.1. Tanım ve İnsidans.....	1
1.1.2. Etiyoloji.....	2
1.2. İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ	2
1.2.1. Anamnez ve Fizik Muayene.....	2
1.3. ERKEK İNFERTİLİTESİ.....	5
1.3.1. Erkek Üreme Sistemi.....	5
1.3.2. Spermatogenez, Spermiyogenez	6
1.3.3. Semen Genel Özellikleri	7
1.3.4. Erkek İnfertilitesi Etyolojisi.....	8

1.3.5. Erkek Faktörünün Değerlendirilmesi.....	10
1.3.5.1. Anamnez ve Fizik Muayene.....	10
1.3.5.2. Laboratuvar Değerlendirmesi.....	11
1.3.5.2.1. Spermiyogram.....	11
1.3.5.2.2. Özelleşmiş Semen Analizleri.....	16
1.3.5.2.3. Sperm Fonksiyon Testleri	17
1.3.5.3. Genetik Testler.....	20
1.3.5.4. Hormonal Değerlendirme.....	20
1.3.5.5. Radyolojik Değerlendirme.....	21
1.4. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF), C-MET	21
2. GİRİŞ ve AMAÇ.....	30
3. MATERYAL ve METOD.....	32
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ.....	58
7. KAYNAKLAR.....	59
8. ETİK KURUL.....	70

SİMGE ve KISALTMALAR

AMH: Anti Müllerian Hormon

CASA: Bilgisayar Destekli Semen Analizi (*Computer- Aided Sperm Analyser*)

CFTR: Kistik Fibrozis Transfer Regülatör

cm³: Santimetre küp

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü (*Epidermal Growth Factor*)

FSH: Folikül Stimulan Hormon

GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (*Gonadotropin Releasing Hormone*)

HAI: Hepatosit Büyüme Faktörü inhibitörü (*Hepatocyte Growth Factor Inhibitor*)

HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü (*Hepatocyte Growth Factor*)

HGFA: Hepatosit Büyüme Faktörü Aktivatörü (*Hepatocyte Growth Factor Activator*)

IBT: Immunobead Test

ICSI: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IU/l: İnternasyonal Ünite/litre

IVF: İnvitro Fertilizasyon

kD: kiloDalton

LH: Luteinize Hormon

MAR: Mikst Antiglobulin Reaksiyon

ml: Mililitre

mm: Milimetre

MMP: Metalloproteaz

ng/ml: Nanogram/mililitre

nl: Nanolitre

PA: Plazminojen Aktivatörü

pg/ml: Pikogram/mililitre

TRUSG: Transrektal Ultrasonografi

TSH: Tiroid Stimulan Hormon

USG: Ultrasonografi

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

VKİ: Vücut Kitle İndeksi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü (*World Health Organization*)

μm : Mikrometre

$^{\circ}\text{C}$: Santigrad Derece

α : Alfa

β : Beta

>: Küçüktür

<: Büyüktür

\geq : Büyük veya Eşit

%: Yüzde

TABLULAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Semen Analizi Referans Değerleri.....	12
Tablo 2. Gruplara Göre Sperm Sayısı, Sperm Motilite Yüzdesi, Sperm Morfoloji Yüzdesi Ve C-met Ekspresyon Düzeyi, HGF Düzeyi Ölçümlerinin Değerlendirilmesi.....	37
Tablo 3: Gruplarda ve Tüm Olgularda C-met Ekspresyon ile HGF İlişkisinin Değerlendirilmesi.....	40
Tablo 4: Gruplarda ve Tüm Olgularda Sperm Sayısı ile HGF Düzeyi ve C-met Ekspresyon Düzeyi Ölçümleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	41
Tablo 5: Gruplarda ve Tüm Olgularda Sperm Motilite Yüzdesi ile HGF Düzeyi ve C-met Ekspresyon Düzeyi Ölçümleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi	43
Tablo 6: Gruplarda ve Tüm Olgularda Sperm Morfoloji Yüzdesi ile HGF Düzeyi ve C-met Ekspresyon Düzeyi Ölçümleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi.....	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Geliştirilmiş Neubauer Hemositometresi	14
Şekil 2. Anormal Şekli Sperm Örnekleri	15
Şekil 3. HGF Ölçüm Kiti Reaksiyon Şeması.....	35
Şekil 4: HGF Ölçüm Kiti Spektrofotometre Eğrisi.....	35
Şekil5: Gruplara Göre Bazal Sperm Sayısı Dağılımı.....	38
Şekil 6: Gruplara Göre Bazal Sperm Morfoloji Yüzdesi Dağılımı.....	38
Şekil 7: Gruplara Göre C-met Ekspresyon Düzeyi Dağılımı.....	39
Şekil8: HGF düzeylerinin gruplara göre dağılımı.....	39
Şekil 9: Bazal Sperm Sayısı ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı.....	42
Şekil10: Bazal Motilite ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı.....	44
Şekil11: İnfertil Grubu Olgularda Bazal Sperm Motilite Yüzdesi ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı.....	45
Şekil 12: Sperm Morfoloji Yüzdesi ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı.....	47
Şekil 13: Sperm Morfoloji Yüzdesi ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı	48
Şekil 14: Sperm Morfoloji Yüzdesi ile HGF Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı.....	49

ÖZET

Hepatosit büyüme faktörü, pek çok organ ve dokuda güçlü mitojenik aktiviteye sahip pleiotropik bir sitokindir. C-met, tirozin kinaz aktivitesi olan bir transmembran glikoproteini olup hepatosit büyüme faktörü reseptörü olarak görev yapar. Bu çalışmada hepatosit büyüme faktörü ve c-met'in sperm motilitesi ve erkek infertilitesi üzerine etkisi araştırıldı.

Çalışma ileriye dönük, kontrollü, tesadüfi olmayan, tek merkezli bir klinik çalışma olarak tasarlandı. Çalışma Mart 2015 ile Haziran 2016 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışmada kontrol ve çalışma grubu olmak üzere iki grup mevcuttu. Kontrol grubu çocuk sahibi olan, sağlıklı ve çalışmaya katılmak için gönüllü erkek bireylerden oluştu. Kurumun Invitro Fertilizasyon Birimi'ne müracaat eden ve erkek infertilitesi tanısı alan bireyler ise çalışma grubuna dahil edildi. Çalışmaya dahil olan tüm bireylerden sperm örnekleri alınarak ikiye bölündü. Örneklerden biri taze olarak incelenirken, diğeri donduruldu ve uygun koşullarda saklandı. Taze örneklerde c-met ekspresyon, dondurulan örneklerde hepatosit büyüme faktörü düzeyleri ölçüldü. Birincil sonuç ölçütleri, hepatosit büyüme faktörü ve c-met ekspresyonu değeri, ikincil sonuç ölçütleri ise sperm sayısı, morfolojisi ve motilitesi olarak belirlendi.

Etik kurul onayı ve hasta onamları alınan 18-60 yaş arası toplam 92 birey dahil edildi. Kontrol grubunda 31, çalışma grubunda 61 birey mevcuttu. Hepatosit büyüme faktörü düzeyi, kontrol grubunda; c-met ekspresyon düzeyi, çalışma grubunda daha yüksek saptanmış olup, istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi. Tüm olgularda sperm motilite yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyleri arasında pozitif, sperm konsantrasyonu ve sperm morfoloji yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyleri arasında negatif korelasyon izlendi.

Sonuç olarak reseptör c-met ve ligandı hepatosit büyüme faktörü, erkek spermatogenez, sperm motilitesi ve fertilizasyon kapasitesinde temel düzenleyicilerden birisi olarak görünmektedir. Erkek infertilitesi için gerek etiyolojinin belirlenmesi, gerekse patogeneizde değerli bir parametredir.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi, sperm motilitesi, c-met, hepatosit büyüme faktörü

SUMMARY

Hepatocyte growth factor is a pleiotropic cytokine with potent motogenic capacities in a variety of tissues and organs. C-met is a transmembrane glycoprotein with tyrosine kinase activity and serves as a hepatocyte growth factor receptor. In the present study, the impact of hepatocyte growth factor and c-met expression on sperm motility was evaluated.

The study was designed as a single-centre, non-randomized prospective controlled clinical study and was conducted between March 2015 and June 2016. There were two groups in the study: the control and the study group. Volunteered healthy men who have already had children were included to the control group, whereas the study group was composed of men who admitted to In vitro Fertilization clinics and who were diagnosed to be infertile. Semen samples were obtained from all individuals who were included to the study. The samples were divided into two parts. One of them was examined as a fresh sample, whereas the other one was frozen and was kept under appropriate conditions. The primary outcome measures were the level of hepatocyte growth factor and c-met expression. The secondary outcome measures were sperm count, sperm motility and morphology.

Following the Ethics Committee approval and informed patient consents, aged 18-60 years 92 men were included to the study. The number of men in the control and the study group was 31 and 61, respectively. The levels of hepatocyte growth factor were found to be statistically greater in the control group and c-met expression were found to be statistically greater in the study group. In all cases there were a positive correlation between sperm motility percentage and c-met expression levels, and negative correlation between sperm concentration, sperm morphology percentage and c-met expression levels.

In conclusion, receptor c-met and its ligand hepatocyte growth factor appear to be one of the main regulators in male spermatogenesis, sperm motility and fertilization capacity. The identification of etiology is also a valuable parameter for male infertility in pathogenesis.

Key Words: Male infertility, sperm motility, c-met, hepatocyte growth factor

1. GENEL BİLGİLER

1.1. İNFERTİLİTE TANIMI, İNSİDANSI VE ETİYOLOJİSİ

1.1.1. Tanım ve İnsidans:

İnfertilite, en az 12 ay süre ile sürdürülen korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye karşın gebelik elde edilememesi olarak tanımlanır. Hiçbir şekilde kendiliğinden gebelik elde edilememesi ise 'sterilite' olarak adlandırılır (1). İnfertilite insidansı, %10-15 olarak bildirilirse de, bu oran 20-24 yaşları arasında %6 iken, 35 yaş ve üzerinde bu oran %30'lara kadar çıkmaktadır (2). Cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar, alkol sigara tüketimi, kimyasal madde maruziyeti, başta psikiyatrik, kemoterapötik ilaçlar olmak üzere bazı medikal tedaviler, geçirilmiş pelvik cerrahiler, radyoterapi öyküsü, obezite, kariyer planları nedeniyle evlilik zamanının ertelenmesi, gebe kalma yaşının geciktirilmesi gibi nedenlere bağlı olarak infertilite insidansı giderek artmaktadır (3).

Fekundabilite, korunmasız cinsel ilişki sonrasında bir menstrüel siklusta gebelik elde edebilme oranını ifade etmekte olup, sağlıklı çiftlerde %20-25 olarak bildirilmektedir. Aylık gebe kalma olasılığı korunmasız ilişkinin devam ettiği ilk yıl boyunca her ay düşmesine karşın; kümülatif gebelik oranları artar. Bu oran 3 ay sonunda %57, 6 ayda %72, 1 yılda %85 ve 2 yılda %93 olarak kabul edilmektedir (4).

Fekundite ise yine korunmasız cinsel ilişki sonrasında bir menstrüel siklusta canlı doğum elde edebilme oranını tanımlamaktadır ve genel popülasyonda %15-20 iken, infertil çiftlerde %1-3 olarak bildirilmektedir (3).

Primer infertilite daha önce hiç gebe kalamamış olma, sekonder infertilite ise gebeliğin nasıl sonuçlanmış olduğundan bağımsız olarak (term gebelik, ektopik gebelik veya abortus gibi), daha önce en az bir kere gebe kalmış olmasına rağmen, korunmasız ilişki ile yeni gebelik elde edilememesi durumunu tanımlamaktadır (5).

Çiftleri değerlendirmeye başlamak için 12 aylık infertilite süresi kesin olmamakla birlikte, yaşla birlikte oosit sayı ve kalitesindeki azalmadan dolayı 35 yaş üstü kadınlarda, adezyon riskini artıracak pelvik inflamatuvar hastalık, endometriozis, cerrahi veya radyoterapi öyküsü olanlarda, menstrüel siklus düzensizlikleri olanlarda, erkeklerde testiküler cerrahi öyküsü, erişkin yaşta kabakulak enfeksiyonu geçirme, radyoterapi kemoterapi öyküsü olanlarda, daha erken incelemeye başlanabilmektedir (6,7).

1.1.2. Etiyoloji

İnfertilite nedenleri toplumlar ve yaş grupları arasında farklılıklar gösterse de infertil çiftlerin yaklaşık %21'inde ovulatuvar disfonksiyon, %14'ünde tubal problemler, %26'sında erkek faktörü, %15'inde servikal, koital veya endometriosis gibi nedenler sorumlu tutulmaktadır. Çiftlerin %40'ında birden fazla neden bulunmakla birlikte, %15-25'inde herhangi bir neden saptanamamaktadır (8). Dünyada yaklaşık 72.4 milyon çiftte infertilite sorunu ile karşılaşılmaktadır (3). İnfertilite prevalansı gelişmiş ülkelerde daha az olup, gelişmekte olan ülkelerde ise daha sık karşımıza çıkmaktadır (9).

1.2. İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnfertilite şikâyeti ile başvuran hastaların değerlendirilmesi çift olarak yapılmalıdır. Bu dikkatli değerlendirme sonucunda çiftlerin %85-90'ında olası sebep tespit edilebilmektedir.

1.2.1 Anamnez ve Fizik Muayene

İnfertil çiftin değerlendirilmesinde detaylı anamnez alınması ve fizik muayenenin

yapılması büyük önem taşımaktadır (10).

- Çiftin yaşları, ne kadar süredir evli olduğu, önceden kontrasepsiyon uymayıp uygulamadıkları, infertilite süresi, varsa daha önceki tahlil, tedavi protokolleri ve sonuçları
- Koitus sıklığı ve seksüel disfonksiyon sorgulanması
- Sigara, alkol ve ilaç kullanımı, stres, egzersiz, diyet öyküsü

Kadın faktörleri değerlendirilirken

- Menstrüel siklus düzeni: süresi, sıklığı, kanama miktarı, eşlik eden dismenore olup olmadığı
- Telarş, pubarş, menarş zamanı
- Cinsel yolla bulaşan hastalık, pelvik inflamatuvar hastalık, anormal PAP smear, tiroid hastalığı öyküsü, galaktore, hirsutizm, dismenore, disparoni, pelvik ağrı gibi semptomların varlığı, rahim içi araç kullanım öyküsü
- Geçirilmiş pelvik cerrahi, kemoterapi, radyoterapi hikayesi
- Obstetrik hikaye: gravida, parite, abortus, küretaj
- Ailede erken menopoz, infertilite öyküsü araştırılmalıdır.

Erkek faktörleri değerlendirilirken

- Testis cerrahisi, travma, kemoterapi, radyoterapi öyküsü
- Erişkin yaşta geçirilmiş kalabulak ve cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü
- Erektile disfonksiyon
- Ejekulatuar bozukluklar
- İnmemiş testis öyküsü sorgulanmalıdır.

Fizik muayene ile hastada infertilitenin potansiyel nedenleri ve bulguları değerlendirilir

- Vücut kitle indeksi (VKİ) , bel çevresi, yağ dağılımı incelenmeli, kilo değişimleri
- Sekonder seks karakterleri ve gelişimi
- Kabızlık, titreme, kuru cilt gibi şikayetlere eşlik eden tiroid bezinde nodül ya da

hassasiyet varlığı

- Meme salgıları ve karakteri, galaktore olup olmadığı
- Saç dökülmesi, akne, ses kalınlaşması, hirsurtizm gibi hiperandrojenemi fizik bulguları
- Pelvik veya abdominal kitle ya da hassasiyet varlığı
- Adnekslerde veya Douglas'ta nodülarite, hassasiyet ve kitle varlığı
- Vajinal veya servikal akıntı ve karakteri incelenmelidir.

Detaylı anamnez ve fizik muayeneden sonra ilk yapılması gerekenler

- Erkek faktörün değerlendirilmesi için semen analizi
- Over rezervinin ve ovulasyonun araştırılması
- Tubal açıklığın ve uterin kavitenin değerlendirilmesidir

Kadın Faktörü

Kadın infertilitesinin bilinen en sık nedenleri ovulatuvar disfonksiyon, yaşla beraber over rezervi azalma, uterin ve tuboperitoneal faktörlerdir. Hepsi birtakım laboratuvar ve görüntüleme yöntemleriyle analiz edilmelidir (10).

Erkek Faktörü

- Semen analizi
- Sperm fonksiyon testleri
- Genetik testler
- Endokrin testler algoritması izlenmelidir (11).

Açıklanamayan İnfertilite

1.3. ERKEK İNFERTİLİTESİ

1.3.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi 4 yapıdan oluşmaktadır (12).

Testis

Testisler, tunika albuginea adı verilen yoğun bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşır ve bezin içine giren septumlarla testisi yaklaşık 250 piramidal bölmeğe ayırır. Her bölmede gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet Seminifer tübül bulunmaktadır. Bu gevşek bağ dokusu içinde Leydig hücreleri, Seminifer tübüllerin duvarlarında bazal lamina üzerinde ise Sertoli ve germ hücreleri bulunur. Leydig hücreleri testosteron salgılamak, Seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinden Anti Müllerian Hormon (AMH), germ hücrelerinden spermatozoalar üretilir. Bu tübüller Rete testise açılarak içeriklerini boşaltırlar. Spermatozoa buradan sırasıyla duktus efferentese, epididime ve duktus deferense gelir.

Genital Boşaltım Kanalları

- Epididim
- Duktus deferens: Seminal vezikülden gelen kanalla birleşerek duktus ejakulatorius adını alır. Bu kanal prostatik üretraya açılır. Spermin transportu, fagositozu ve sekresyonundan sorumludur.

Aksesuar Genital Bezler

Ejekulat içeriğine katkıda bulunan salgılar üretirler.

- Seminal vezikül
- Prostat
- Bulbo- Üretral Bezler (Cowper Bezleri)
- Preputial bezler (Littre Bezleri)

Penis ve Üretra

1.3.2. Spermatogenez, Spermiyogenez

Spermatogenez, puberte ile birlikte, ön hipofiz gonadotropik hormonlarının uyarısı sonucunda testislerdeki seminifer tubullerde bulunan 46 kromozomlu spermatogoniumlardan 23 kromozomlu matür spermatidlerin oluşmasıdır. Her iki testisten toplam spermatozoa üretimi 100 milyon civarındadır. Spermatogenezin başlaması için Folikül Stimülan Hormon (FSH); devamı içinse testosteron gereklidir. Primitif germ hücresi olan spermatogonium, pubertede mitoz bölünmeyle çoğalıp yeni hücreler oluşturur. Oluşan bu yeni hücreler iki yoldan birini izlerler. A tipi spermatogoniumlar germ hücreler olarak bölünmeye devam edebilir veya mitotik sikluslar sonucu farklılaşarak B tipi spermatogoniumu oluşturabilir. B tipi spermatogoniumlar, yine 46 kromozom içeren primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Daha sonra bu hücreler, birinci mayoz bölünmeye doğru ilerlerler. Birinci mayoz bölünmenin profaz aşaması 22 gün sürer. Bu nedenle kesitlerde sayıca en çok görülen hücrelerdir. Birinci mayoz bölünme sonucunda 23 kromozomlu sekonder spermatositler oluşur. Takiben gerçekleşen ikinci mayoz bölünme, 23 kromozomlu spermatidlerin oluşumuyla sonuçlanır. Böylece spermatogenez ile yaklaşık 64-74 gün içinde 46 kromozomlu bir primer spermatositten, 23 kromozomlu 4 spermatid oluşur (12).

Spermiyogenez, spermatidlerin, erkek deoksiribonükleik asidini (DNA) ovuma aktarmak için özelleşen spermatozoalara dönüşüm sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi yoktur. Akrozomun oluşumu, nukleusun yoğunlaşması ve uzaması, boyun, orta parça ve kuyruğun oluşumu ve sitoplazmanın çoğunun kaybı içerir. Golgi fazında spermatid sitoplazmasında bulunan golgi komplekslerindeki proakrozomal granüller birikir ve birleşerek tek bir akrozomal granülü oluşturur. Sentioller, akrozomun karşı tarafına göç ederek hücre yüzeyine yaklaşır ve flagellar aksonemi oluşturmaya başlar. Akrozomal fazda, akrozomal granül ve vezikül, yoğunlaşan nukleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve akrozom olarak adlandırılır. Akrozom, hyaluronidaz, nöoraminidaz, asit fosfataz gibi hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler yardımıyla ovumu çevreleyen zona pellusidayı erittiği

bilinmektedir. Nuklues uzar ve yoğunlaşır. Sentriollerden bir tanesi özelleşip flagellumu oluşturur. Mitokondriler flagellumun proksimal kısmında toplanarak spermatozoanın hareketi için ana enerji kaynağını oluşturan orta parçayı meydana getirir. Matürasyon (olgunlaşma) fazında geriye kalan artık sitoplazma, lizozomdan zengin Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoa seminifer tübül lümenine salınır (12). Spermatozoa, baş, boyun (orta parça), gövde (esas parça) ve kuyruk (son parça) olmak üzere dört kısımdan oluşur. Baş kısmı paternal DNA içeren yoğunlaşmış nükleer kromatinden oluşur. Her ne kadar morfolojik olarak matür olsa da, fonksiyon açısından immatürdür. Maturasyonun bir bölümünü oluşturan motilite kazanma, epididimde gerçekleşir. Epididim başından alınan spermlerin ovumu fertilize edemeyip, epididim kuyruk kısmından alınan spermlerin ovumu fertilize edebildiği bilinmektedir (13). Ancak son matürasyon (kapasitasyon), ejakulasyon sonrasında kadın genital sistemi içerisinde tamamlanmaktadır. Spermatozoa ovumla karşılaştığında akrozomun dış membranı spermatozoanın plazma membranıyla kaynaşır ve akrozomal enzimlerin serbestleşmesi sağlanır. Bu olay akrozomal reaksiyon olarak adlandırılır. Akrozom reaksiyonunu takiben spermatozoa hem motilite hem de enzimatik aktiviteler ile zona pellusidayı geçip perivitellin boşluğa ulaşır. Oosit membranına yapışmış olan sperm-oosit arasındaki kaynaşmayı takiben oositte ikinci mayoz bölünme tamamlanır. Son olarak nükleer membranlar kaynaşarak fertilizasyon gerçekleşmiş olur (12,14,15).

1.3.3. Semen Genel Özellikleri

Seminal plazma ve spermatozoadan oluşan ejakulatın ortalama hacmi 3-3,5 ml'dir. Seminal plazmayı; seminal vezikül, prostat, Cowper ve Littre bezlerinin sekresyonları meydana getirmektedir. Ejekulat hacminin 1,5-2 ml'sini seminal vezikül salgıları, 0,5 ml'sini prostat salgıları, 0,1-0,2 ml'sini ise Cowper ve Littre bezi salgıları oluşturur. Spermatozoalar ise total hacmin %1'inden azını oluşturmaktadır. Ejekulatın ilk kısmı spermden zengin ve daha çok prostat salgısından oluşurken, ikinci kısmı seminal vezikül salgısı ağırlıklıdır. Seminal plazmanın içeriğindeki flavin ejakulata açık sarı rengini verir. Ejekulat visköz, hafif alkali özellikte olup, yüksek miktarda fruktoz içerir (16).

Likefaksiyon; seminal vezikülden salınan protein kinaz enzimi etkisiyle koagule olan semenin, prostattan salgılanan fibrinolizin, fibrinokinaz ve aminopeptidaz gibi proteolitik enzimler sayesinde 37 °C de yaklaşık 10-20 dakika içerisinde kendiliğinden çözünebilme özelliğidir. Likefaksiyonun olmaması prostat disfonksiyonuna işaret edebilmektedir (16).

1.3.4. Erkek İnfertilitesi Etiyolojisi (17)

Hipotalamopitüiter aks hastalıkları (Sekonder hipogonadizm) (Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), luteinize hormon (LH), FSH eksiklikleri)

- Konjenital hastalıklar
- Konjenital GnRH eksikliği (Kallmann sendromu)
- Hemokromatozis
- Genetik hastalıklar (Prader Willi sendromu, Laurence-Moon-Beidl sendromu, familyal serebellar ataksi)
- Edinilmiş hastalıklar
- Pitüiter ve hipotalamik tümörler (hipofiz adenomu, kraniofarengioma)
- İnfiltratif hastalıklar (sarkoidoz, histiositoz, tüberküloz, fungal enfeksiyonlar)
- Lenfositik infundibulit veya hipofizit
- Travma, geçirilmiş cerrahi ve radyoterapi öyküsü
- Vasküler (pitüiter infarkt, anevrizma)
- Hormonal (hiperprolaktinemi, hiperandrojenemi, hiperöstrojenemi, hiperkortizolemi)
- İlaçlar (eksojen androjen, opioidler, psikotropik ilaçlar, GnRH analogları)
- Sistemik hastalıklar (kronik hastalıklar, beslenme bozuklukları, obezite)

Sperm veya hormon üretimindeki testiküler defektler

- Konjenital hastalıkları
- Klinefelter sendromu (47 XXY ve 47 XXY/XY; 48 XXXY mozaik formları)
- Kriptorşidizm

- Myotonik distrofi
- Konjenital anorşi
- Androjen insensitivite sendromu
- 5 alfa redüktaz eksikliği
- Östrojen reseptör ve sentez bozuklukları
- Edinilmiş hastalıklar
- Enfeksiyonlar-viral orşit (kalabulak, ekovirus, arbovirüs); granulomatöz orşit, (lepra, tüberküloz); epididimoorşit (gonore, klamidy)
- İlaçlar (alkilleyici ajanlar, alkol, marijuana, antiandrojenler, ketokonazol, spironolakton, histamin 2 reseptör antagonistler, iyonize radyasyon)
- Çevresel toksinler (dibromokloropropan, karbondisülfid, kadmiyum, kurşun, civa, çevresel östrojenler ve fitoöstrojenler, sigara, hipertermi)
- İmmunolojik bozukluklar (poliglandüler otoimmün hastalık, antisperm antikorlar)
- Travma
- Testiküler torsiyon
- Sistemik hastalıklar
- Renal yetmezlik
- Siroz
- Kanser
- Orak hücreli anemi
- Amiloidoz
- Vaskülitler
- Çölyak

Genetik bozukluklar

1. Y kromozom mikrolelesyonu ve ilişkili hastalıklar
2. Otozomal ve X kromozom defektleri
3. Sperm morfolojisini bozan mutasyonlar
 - Gelişimsel ve sperm transport bozuklukları (Varikosel)
 - Sperm transport bozuklukları
 - Epididim disfonksiyonu (ilaç ve enfeksiyon)

- Vas derenes anomaliler (konjenital yokluk, Young's sendromu, enfeksiyon, vazektomi)
- Seminal vezikül ve prostat
- Ejekulatuar kanal hastalıkları
- Seksüel disfonksiyon
 - Ejekulatuar disfonksiyon (spinal kord hastalıkları, otonom disfonksiyon); prematür ejakülasyon; erektil disfonksiyon

İdiopatik erkek infertilitesi

1.3.5. Erkek Faktörünün Değerlendirilmesi

1.3.5.1. Anamnez ve Fizik Muayene (18)

Hastadan alınacak ayrıntılı hikaye ve detaylı fizik muayene ile birçok hastalık hakkında fikir sahibi olmak mümkündür.

- Çocukluk çağı hastalıkları
- Unilateral/bilateral kriptorşidizm varlığı ve buna bağlı cerrahi tedavinin zamanlaması.
- Genitoüriner sisteme ait cerrahi operasyonlar
- Testis travmaları
- Testis torsiyonları ve tümörleri,
- Herni tamir ameliyatları,
- Kemoterapi ve radyoterapi öyküsü
- Puberteye ulaşma yaşı, sekonder seks karakterleri, hipogonadizm varlığı
- Cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü,
- Cinsel ilişki sıklığı
- Ejekulat varlığı ve miktarı

- Vücut kıl dağılımı (vücut kıllarının dökülmesi, tıraş olma sıklığında azalma)
- Koku alma fonksiyonları (Kalmann Sendromu)
- Öğrenme güçlüğü sorgulanması (Klinefelter Sendromu)
- Erkek kontrasepsiyon yöntemlerinden herhangi birini uygulayıp uygulamadığı
- Medikal öykü (Anabolizan steroidler, antibiyotik kullanımı, kemoterapötik ilaç, alfa- adrenerjik reseptör blokerleri, simetidin, gonadotoksik ajanlara maruziyet) tek sorgulanmalıdır.

1.3.5.2. Laboratuvar Değerlendirmesi

1.3.5.2.1. Spermogram

Erkek infertilitesinde ilk yapılması gereken, noninvaziv temel laboratuvar testidir. Sperm analizi için 2-7 günlük cinsel perhiz süresine ihtiyaç vardır. Ejekulat ya laboratuvarın olduğu birimdeki özel bir odada veya kimyasal olmayan kondom ile toplanıp 1 saat içinde androloji laboratuvarına ulaştırılabilecek şekilde elde edilmelidir. Alınan örnek 37 °C'de saklanmalıdır. Semen analizi manuel veya bilgisayar yardımlı semen analiz cihazı kullanılarak yapılır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2010 spermogram parametreleri referans aralıkları Tablo 1 de verilmiştir (19).

Parametreler	En düşük referans değeri
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (milyon)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (milyon/ ml)	15 (12-16)
Total motilite (%)	40 (38-42)
Progresif motilite (%)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (%)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (milyon per ml)	<1.0
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50

Tablo1. Semen Analizi Referans Değerleri (19) (5.persentil, %95 güvenlik aralıkları)

Semen Değişkenlikleri İçin Terminoloji (15)

Normozoospermi: Referans değerlerle tanımlanan normal ejakulat.

Oligozoospermi: Referans değerlerden düşük sperm konsantrasyonu.

Astenoospermi: Referans değerlerden düşük motilite yüzdesinin olması.

Teratoospermi: Referans değerden düşük morfoloji yüzdesinin olması.

Oligoastenoteratozoospermi: Sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji deęerlerinin hepsinin referans deęerlerden dūşük olması

Kriptozoospermi: ejakulatta sperm izlenmezken, santrifüj snrası pellette sperm izlenmesi

Nekrozoospermi: ejakulatta yüksek oranda immotil ve az sayıda canlı sperm çıkması

Azoospermi: Ejekülatta hiç sperm olmaması.

Aspermi: Ejekülat elde edilememesi.

Semen Volümü

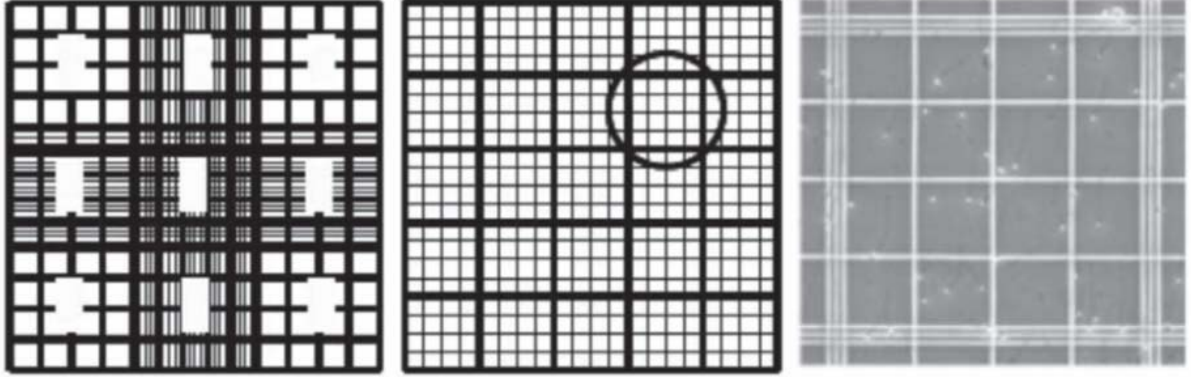
WHO'ya göre ortalama semen hacmi 3,7 ml olup, en alt limit 1,5 ml kabul edilmektedir (20).

Sperm Sayımı

Sperm konsantrasyonu her bir mililitredeki sperm sayısını ifade eder ve en düşük referans değeri 15x milyon/ml'dir. Total sperm sayısı ise sperm konsantrasyonunun tüm ejakülat volümüyle çarpılması sonucu hesaplanır ve en düşük referans değeri 39 milyondur.

Sperm sayımı için hemositometre sayma kameraları kullanılmaktadır. Sperm sayısının doğru hesaplanabilmesi için ejakülatın dilüe edilmesi gerekir. Taze örnekte 200-400 büyük büyütmede görüntü alanı başına düşen sperm sayısına göre ne kadar dilüe edileceğine karar verilir. Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi'nde iki adet 3x3 mm'lik sayım kamerası bulunur. Her bir kamerada 1x1 mm'lik 9 kare mevcuttur. Karelerin derinliği 100 µm olup her biri 100 nl'yi ifade etmektedir. Bir, 3, 7 ve 9 numaralı kareler 16 adet (6.25 nl); 2, 4, 6 ve 8 numaralı kareler 20 adet (5 nl) ve ortadaki 5 numaralı kare ise 25 (4 nl) adet küçük kareden oluşmaktadır (Şekil 1). Sayım yapılırken hataları önlemek için, her birinde 200 sperm sayılmış iki adet sayım yapılmalıdır. Sayımlar arasındaki fark kabul edilebilir sınırların üzerindeyse bu durum sayım hatası, dilüsyon hatası, spermlerin eşit dağılımının

sağlanamadığını gösterebilir. Yeni dilusyonla tekrardan sayım yapılması önerilir (21).



Şekil 1: Geliştirilmiş Neubauer Hemositometresi (21).

Sperm Canlılığı

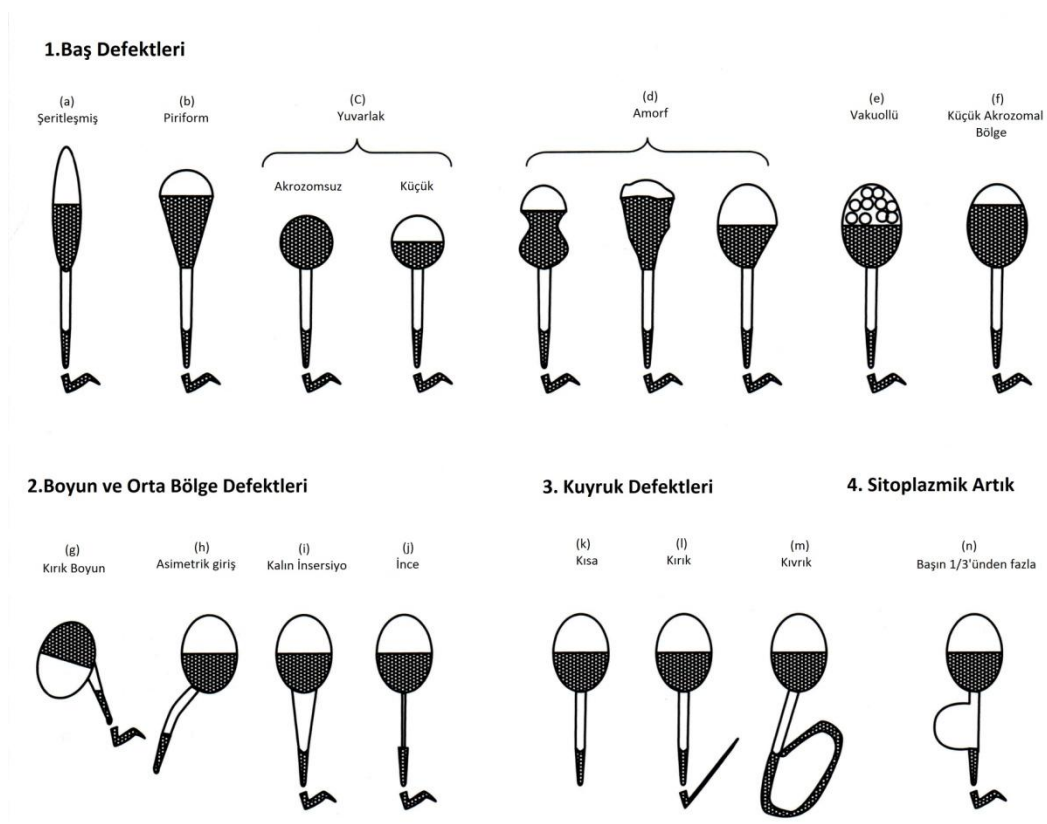
Sperm canlılığı için en düşük referans değer %58'dir. Sperm canlılığı hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranının %40'tan az olduğu durumlarda özellikle önemlidir. Bu testle motilite değerlendirmesinin doğru yapıp yapılmadığı da kontrol edilebilir. Canlı, immotil ve ölü spermilerin ayırımının yapılması, hangi tip yardımcı üreme tekniğinin seçileceği konusunda yol göstericidir (22).

Sperm Motilitesi

Toplam motilite için en düşük referans değer %40 olup, progresif motilite için en düşük referans değer %32'dir. Progresif motilite; aktif hareketli olup, lineer hareketler yapan veya geniş daireler çizen spermilerdir. Non-Progresif motilite; Küçük daireler çizen, flagellar hareketin baş kısmını zorlukla yapabilen ya da sadece flagellar hareketler yapıp ilerleyemeyen spermilerdir. İmmotilite ise tamamen hareketsiz olan spermilerdir.

Sperm Morfolojisi

Normal sperm hücreleri için en düşük referans değer %4'tür. Eskiden sadece mikroskopik olarak sperm şekline bakılarak morfoloji tayini yapılmakta iken, şimdi boy, en, en oranı, akrozomal alan, boyun ve kuyruk defektleri de morfoloji tayininde önem taşımaktadır. Bu kriterler 'strict' kriterleri olarak adlandırılıp invitro fertilizasyon sonrasında gebelik oranlarını iyi öngörebilmektedir (20).



Şekil 2: Anormal Şekilli Sperm Örnekleri (15)

Semen pH

Seminal plazmanın pH'ı, 7,2-7,8'dir (20). Alkali yapıdaki seminal vezikül ve asidik yapıdaki prostat gibi aksesuar genital bezlerin sekresyonlarından etkilenmektedir.

1.3.5.2.2. Özelleşmiş Semen Analizi

Bu testler rutin olarak uygulanmamaktadır. Erkek infertilite nedenini araştırmada semen analizi sonuçlarında arada kalınan olgulara ışık tutmada yardımcı olabilmektedir.

Spermatozoanın Antikor ile Kaplanması Testi (Antisperm Antikor Değerlendirilmesi)

Subfertil erkeklerin yaklaşık %4-8'inde sperm otoantikorları saptanmaktadır. Antikorlar, zona bağlanması ve akrozom reaksiyonunu bozar. İlk sperm analizinde aglütinasyon görülmesi, otoimmunitiyi öngörmektedir. Ancak bu durumun, sperm yüzey antikorlarını tespit eden mikst antiglobulin reaksiyon testi (MAR) veya immunobead test (IBT) ile doğrulanması gerekmektedir (22). Bu antikorlar, spermatozoaların %50'den fazlasını kapladığı, spermatozoanın preovulatuvar servikal mukusa penetre olamadığı ve bozulmuş fertilizasyon kapasitesi gösterdiği durumlarda önem taşımaktadır (24).

Sperm Biyokimyası

Sperm biyokimyasında en sık bakılan test seminal vezikülden salınan fruktozdur. Fruktozun düşük miktarda saptanması veya hiç saptanamaması, vas deferens ve seminal vezikülün konjenital yokluğu ya da ejakulatuar kanal obstrüksiyonu ile ilişkili iken, epididim obstrüksiyonunda normal semen fruktoz seviyesi izlenir.

Semen Kültürü

Semen kültürü, semen örneğinde inflamatuvar hücreler olan erkeklerde yapılmaktadır. Ancak sonuçlar genellikle tanı koydurucu değildir.

Sperm-Servikal Mukus İlişkisi

Sperm-servikal mukus interreaksiyon testi, problemin spermde mi yoksa servikal mukusta mı olduğunu invivo olarak postkoital test (Sims-Hühner testi), invitro olarak kapiller tüp testi (Modifiye Miller-Krurzrok testi) şeklinde saptamaya yöneliktir. Postkoital test, kadın partner preovulatuvar fazda iken laboratuvar ortamında yapılır. Koitus sonrası 9-24 saat içinde servikal mukustaki canlı sperm sayısına bakılır. İnvitro olarak yapılacaksa, infertil çiftten alınan sperm ve servikal mukus örnekleri, lam üzerinde veya kapiller tüp içinde değerlendirilir. Bu teste ‘crossed test’ de denir. Bu test problemin sperm veya servikal mukus kaynaklı olup olmadığını ayırt eder. Servikal mukus testinde spermin mukusa penetrasyonundaki yetmezlik, çiftin yardımcı üreme tekniklerinden fayda görebileceği fikrini doğurmaktadır (15).

Ejekülasyon Sonrası İdrar Örneğinin Mikroskopik İncelemesi

Retrograd ejakülasyondan şüphelenilen ejakulat hacminin 1 ml altında olduğu hastalarda kullanılabilen bir yöntemdir.

1.3.5.2.3. Sperm Fonksiyon Testleri

Sperm fonksiyon testleri, ileri androloji tanı testleri olup, pahalı ve uygulaması zordur. Ancak semen analizi normal veya normale yakın olanlarda seçilerek kullanılabilir (25).

Bilgisayar Destekli Semen Analizi (CASA)

Ticari olarak kullanılmakta olan CASA sistemleri, spermin velositesi (eğrisel, düz), yana yer değiştirme amplitüdü ve diğer türemiş fonksiyonları gibi sperm motilitesi karakterini (sperm kinematiklerini) ölçer. CASA yöntemi ile, motil sperm konsantrasyonu ve motilite yüzdeleri, morfolojisi de hesaplanabilir, ancak hata payını azaltmak için şartların çok iyi optimize edilmesi gerekmektedir (26).

Akrozom Reaksiyonu Değerlendirilmesi

Akrozom reaksiyonu, akrozom ve plazma membranının füzyonu neticesinde, akrozomal enzimlerin salınması ve sperm başının görünür hale gelmesini içerir. Bu reaksiyonun zamanlaması, sperm zona pellusidaya penetre ettiğinde olmaktadır. Akrozomun zamanından önce kaybı, spermin zona pellusida bağlanma bölgelerini tanıyamaması neticesinde spermin zonaya bağlanamamasına neden olur (27).

- Akrozomal Enzim Aktivitesi Tayini
- Hipoosmotik Şişme Testi
- Sperm Penetrasyon Testi

Zona-free Hamster Oocyte Penetration Test

Tanımlandığı 1970'lerden bu yana, bu test klinik androloji laboratuvarlarında invitro ve invivo fertilizasyonun başarısını öngörmeye kullanılmaktadır. Bu test, insanı da içeren çeşitli memeli türlerinin spermatozoalarının zona pellusidası soyulmuş hamster oositlerine penetrasyonun gözlenmesine dayanır. Yalancı pozitif ve negatiflik oranları fazla olan bu testin, sadece bu iş için özelleşmiş laboratuvarlarda yapılması uygundur (28).

İnsan Zona Pellusida Bağlanma Testi

İnvitro Fertilizasyon (IVF) başarısını öngörmeye 2 adet zona bağlanma testi kullanılmaktadır:

- Hemizona testi
- Yarışmalı zona bağlanma testi

Her iki testte de, test örneğinde ve kontrol örneğinde zonaya bağlanan spermatozoa sayısı karşılaştırılır. İnsan oosit eldesi zor olduğu için, bu testlerin uygulaması zordur ve sıklıkla kullanılmazlar (29).

Sperm Biyokimyası

Reaktif oksijen türleri, sperm membranında peroksidasyonu yol açarak sperm disfonksiyonuna neden olup, invitro fertilizasyonu predikte edebilir. Bu test sadece araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

Sperm Kromatin ve DNA Analizi

Sperm kromatin bütünlüğü ve sperm fonksiyonunu ölçmek için düşük pH ile denatüre edildikten sonra sperm kromatin yapılarının flowsitometrik ölçümü esasına dayanır. DNA fragmentasyonu da (sperm apoptoz ölçütü) sperm nükleer bütünlüğünü ölçmede kullanılır. Sperm nükleer kromatin ve DNA yapısı ile ilgili bu testler, infertil erkeklerdeki semen analizi hakkında, reproduktif toksikoloji çalışmalarında ve yardımcı üreme tekniklerinin sonuçları hakkında bilgi verebilir (30).

1.3.5.3. Genetik Testler

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun (ICSI) bulunması ile ağır oligozoospermik ve azospermik erkeklerin baba olması mümkün olabilmektedir. Ancak bu çok invaziv testlerin genetik riskleri göz önünde bulundurulmaktadır. ICSI ile, kistik fibrozis transfer regülatör (CFTR) gen, somatik ve seks kromozom anomalileri, Y kromozom mikrodelsyonları gibi genetik problemlerin transfer edilme riski artmaktadır (31).

CFTR geni: CFTR gen mutasyonu olan erkekler, normal testiküler volüm, eksternal genital palpasyonda vas deferens yokluğu, obstrüktif azospermi, normal serum LH, FSH ve testosteron seviyeleri ile prezente olur. Bu durumda kistik fibrozis aile hikayesi sorgulanmalı hem kadın hem erkek partner CFTR gen mutasyonu açısından test edilmelidir (32).

Genetik hastalıklar; pretestiküler, testiküler, posttestiküler etyolojik faktörlerin sebebi olarak karşımıza çıkabilmektedir.

- Pretestiküler faktörler; Kallmann Sendromu, Prader- Willi Sendromu, Beta Talasemi, Orak hücreli anemi,
- Testiküler faktörler; Klinefelter Sendromu, Y Kromozom mikrodelsyonları, Noonan Sendromu, Myotonik Distrofi, posttestiküler faktörler ise Kistik fibrozis, Young Sendrom, Erişkin polikistik böbrek hastalığı olarak sıralanır.

1.3.5.4. Hormonal Değerlendirme

Hormonal problemler erkek infertilitesinde nadiren görülmekle birlikte hipergonadotropik ve hipogonadotropik hipogonadizmden şüphelenildiği durumlarda FSH, LH, tiroid stimulan hormon (TSH), testosteron, prolaktin, östrojen seviyeleri değerlendirilmelidir.

1.3.5.5. Radyolojik Değerlendirme

Erkek infertilitesinde radyolojik değerlendirme, testiküler ve posttestiküler faktörleri saptamak için kullanılır. Vazografi ile obstrüktif azospermi düşünülen hastalarda duktuslardaki tıkanıklığın seviyesi belirlenebilir (32). Transrektal Ultrasonografi (TRUSG) ile prostatın, seminal vezikülün ve ejakulatuar kanalların anatomik yapısı değerlendirilir. Ejakulatuar kanal obstrüksiyonu, transrektal ultrasonografide seminal vezikül genişlemesi izlenmesi ile doğrulanabilir (33). Skrotal Ultrasonografi ile testis ve epididim hakkında bilgi sahibi olunurken, Doppler Ultrasonografi ile varikozel tanısı konulur.

Tüm bu değerlendirmelerin ışığında fertil bir erkekte; spermatogenez, bunun sonucunda elde edilmiş normal yapıda canlı spermatozoa, sperm motilitesinin sağlanması ve devamlılığını koruması için iyonik mikroçevre, uygun pH ve pek çok hücre içi olay ve hücrelerarası iletişim için sinyal yollarının işlevsel olması gerekir (15). Bu faktörlerin birleşmesi ile oluşan kompleks sistem ile nesiller boyu sağlıklı genetik aktarım sağlanabilmektedir.

1.4. HEPATOSİT BÜYÜME FAKTÖRÜ (HGF), C-MET

Spermatogenez, germ hücresi topluluklarında oluşan proliferasyon, mayoz bölünme ve farklılaşmanın katı bir şekilde kontrol edildiği çok basamaklı bir süreçtir. Testis ve epididimdeki hücre içi etkileşimler, spermatogenez ve sperm olgunlaşması için gereklidir (34). Hücrelerarası iletişim ve hücrenin proliferasyonu büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Hepatosit büyüme faktörü (HGF), hepatositler için potent mitojen olan ve daha sonra da hedef hücreler arasında bağlantı sağlayan bir 'scatter faktör' olduğu tespit edilmiş pleiotropik sitokindir (35-38).

HGF'nin prekürsörü 92 kiloDalton (kD)'luk inaktif tek bir zincir olarak sentezlenir, daha sonra bölünerek 55-60 kD'luk bir α zinciri ve 32-36 kD'luk bir β zincirin biyoaktif disülfid bağlantılı heterodimerik formu haline kazanır (39-41).

İmmatür HGF prekürsörünü matür biyoaktif HGF'ye ayırabilen en önemli aktivatörlerinden biri, bir serin proteaz olan HGF aktivatör protein (HGFA)'dir (42). Ayrıca HGF aktivasyonu aktif metalloproteaz 2 ve 9 (MMP2, MMP9) ve plazminojen aktivatörü (PA) tarafından da sağlanabilmektedir. Son zamanlarda HGF aktivasyonunu inhibe eden HGF aktivatör inhibitör (HAI) olarak adlandırılan serin proteaz inhibitörünün, HGFA aktivasyonunu bloke ettiği keşfedilmiştir (43). HGF'nin doku homeostazisi için önemli bir faktör olmasından dolayı, mikroçevre dokusundaki HGFA ve HAI dengesi ile uygun HGF düzeylerini sağlayabilmektedir (44).

HGF ile ilgili ilk çalışmalar karaciğer dokusuna etkileri üzerine yapılmıştır. Ratlarda yapılan hepatic lobektomi sonrasında hepatositlerde görülen hızlı rejenerasyon sırasında HGF üretiminin de belirgin olarak arttığı ve böylece HGF'nin rejenerasyonun önemli bileşenlerinden biri olduğu tespit edilmiştir (45). Karbontetraklorür ile karaciğer hasarı oluşturulan ratlara anti HGF antikoru verildiğinde ise karaciğer dokusunda beklenen rejenerasyonunun görülmediği izlenmiştir (46). Bunu takip eden çalışmalarda da HGF'nin pankreas β hücreleri, melanositler, kondrositler ve keratinositler gibi daha birçok dokuda hücre rejenerasyonundan sorumlu bir büyüme faktörü olduğu gösterilmiştir (47,48).

HGF; erkek reproduktif sisteminde seminifer tübül, epididim, duktus deferens, prostat ve seminal veziküllerin epiteli gibi immünreaktivite gösteren çeşitli organlarda eksprese edilmektedir (49,50).

Bir mitojen (hücre büyümesi stimülasyonu), bir motojen (hücre motilitesi stimülasyonu) ve morfojen (multiselüler doku benzeri yapının indüksiyonu) olarak hareket edebilme yeteneği olan HGF, spermatogenik epitelde olduğu gibi, hareket edebilen pek çok sistemin fonksiyonunun düzenlenmesinde işlev görebilecek özelliklere sahiptir (44,51,52).

HGF'nin tek reseptörü met olup, onu kodlayan onkogen c-met olarak adlandırılmaktadır. Bu onkogen, tirozin kinaz aktivitesi gösteren, 50kD'luk bir α zinciri ve 155 kD'luk bir β zincirinden oluşan heterodimer yapıdaki reseptörü kodlar. Her iki alt birim, 170 kD'lık ana prekürsörün glikozilasyonu ve proteolitik ayrılması ile oluşur. C-met onkogeni, ilk kez kimyasal bir karsinojen olan N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidin ile insan osteosarkom hücrelerinin transforme edilmesi ile elde edilmiştir (45). Ayrıca bu onkogenin endotelial hücrelerde (54,55), myoblastlarda (56), hematopoetik hücrelerde (57,58) ve spinal motor nöronlarda (59), karaciğer, tiroid, pankreas, prostat, akciğer, mide ve kolonda

normal olarak eksprese edildiği bilinmektedir(60-64). Karaciğer, mide, kolon, böbrek, over, deri, akciğer, tiroid, pankreas gibi pek çok epitelyal solid doku tümöründe ise normalden fazla eksprese edildiği tespit edilmiştir (53,65). Yine solid doku tümörlerinde yapılan bir çok çalışmada c-met ve HGF'nin hastalığın progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (66). HGF ve c-met ilişkisi antitümöral tedavide de kullanıma girmiş, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) ve Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) üzerinden etkili olan inhibisyon tedavilerinde, c-Met etkisinin tedavi başarısını etkilediğine dair yayınlar yer almaktadır (67).

C-met, normalde epitelyal orijinli hücrelerden eksprese edilir. HGF ekspresyonu ise sadece mezenkimal orijinli hücrelere sınırlı olarak bulunmuştur (47).

HGF; reseptörü c-met'e bağlandığı zaman, β zincirinin tirozin kinazı aktive etmesiyle otofosforilasyon gerçekleşir ve HGF stimülasyonu üzerinden, reseptör sinyalinin hücre içine iletilimi başlatılır. HGF ile c-met arasındaki bu iletişim, embriyogenezden tümöral gelişime kadar birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynamaktadır. Bu büyüme faktörü-reseptör ilişkisinin mezenkimal hücreler ve onların komşuluğundaki epitelyal hücreler arasında kontrolü sağlayan bir sistem olduğu belirtilmiştir. Bu sistemin hücre hareketi, morfogenez, mitogenez, tubulogenez, embriyogenez, angiogenez, proliferasyon, diferensiasyon, doku onarımı, tümör oluşumu ve gelişimi için multiple biyolojik yanıtın tetiklenmesinde son derece önemli bir işlevi olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (44,51,52).

Embriyogenezde tüm doku ve organlar, trilaminer disk hücrelerinin diferansiasyonu ile oluşur. Bu diskin oluşumunu, işlev ve histoloji olarak birbirinden farklı pek çok dokuya dönüşümünü kontrol altında tutan bir takım faktörler mevcuttur. Trilaminar diskten fibroblastların ve tübüler yapıdaki organların primitif hallerinin oluşumu sırasında HGF'nin etkili olduğu, embriyogenez safhasında oluşmakta olan organlarda HGF ve reseptörü c-met'in de tespit edildiği bildirilmiştir (68-70).

C-met'i hasarlanmış deney farelerinde izlenen ağır plasental defekte bağlı embriyonik letal fenotip, HGF/c-met sisteminin memelilerin embriyolojik gelişimi sırasındaki rolünü açıklamak için sınırlı bilgi sağlasa da, bazı çalışmalar, bu deney hayvanlarında, HGF'nin gastrulasyon, angiogenez, myoblast migrasyonu ve karaciğer gelişimi hakkında önemli rolü olduğunu altını çizmiştir (71,72,73).

Matsumoto ve arkadaşları (ark.) nin yaptığı HGF/c-met sisteminin fare organogenezi sırasındaki ekspresyonunu gösteren çalışma ile HGF'nin organogenezdeki fonksiyonunun anlaşılmasını sağlamıştır. Bu bulguların ışığında, HGF/c-met sisteminin hem embriyonik morfogenezde mezenkimal ve epitelyal hücreler arasındaki sinyal değişimine, hem de postnatal stroma-parankim iletişimi ve doku homeostasisine aracılık ettiği gösterilmiştir (74).

HGF/c-met sistemi, testis embriyonik gelişiminin tüm periyotlarında bulunmakla birlikte, erişkin yaşa kadar saptanabilmektedir. HGF'nin epitelyal-mezenkimal iletişimde embriyonik morfogenez sırasında önemli rolü olduğu belirtilmektedir. Ayrıca HGF'nin mezenkimal hücrelerin epitelyal hücrelere dönüşümünü indüklediği bildirilmiştir (69). Testis, ara mezoderm ve çöломik epitelin işbirliği ile gelişir. Bu morfogenez, hem epitelyal hücrelerde mezenkimal dönüşümü (örneğin Sertoli ve Leydig hücreleri), hem de epitelyal-mezenkimal hücreler arasındaki sıkı iletişimi karakterize etmektedir (68).

HGF'nin, testis dokusu üzerindeki aktivitesi prenatal ve postnatal gelişim evrelerinde değişiklik göstermektedir. Bu alanda steroidogenez ve apoptozun modülasyonu; mitoz, morfogenez ve diferensiasyonda yol göstericidir (44). HGF, erkek reproduktif sisteminin gelişimini destekleyen ve spermatogenetik sürecin kontrolünde rol alan büyüme faktörlerinden biridir.

Depuydt ve ark. tarafından yapılan çalışmada HGF'nin insan seminal plazmasında da önemli miktarda bulunduğu saptanmıştır. HGF'nin vazektomili erkeklerde de saptanmış olması, HGF'nin testis orijinli olmadığını anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. HGF'nin insandaki ana kaynağı epididim, prostat ve seminal veziküldür. İmmunohistokimya ile c-Met'in varlığı spermatogonia, spermatozoid, spermatozoid ve spermatozoa hücre membranlarında saptanmış olmasına rağmen, Sertoli ve Leydig hücrelerinde c-met ekspresyonu izlenmemiştir. C-met, peritübüler myoid hücrelerde ve interstisyel kompartmanlarda hem mitotik ve mayotik germ hücrelerinde hem de spermatozoalarda mevcut olup, bu reseptör insan spermatogenezi sırasında spermatozoa diferensiasyonu ve migrasyonunda rol oynamak olduğu belirtilmiştir (75,76).

Memeli spermatozoası hareket ve fertilite kapasitesini epididimden geçişi sırasında kazanır. Spermin motilite yüzdesi bu transfer sırasında artar (77,78). Memeli türüne göre motilite spermin kaput veya kauda kısmında maksimum seviyeye ulaşır. HGF, sperm

motilitesini indükleyen bir büyüme faktörüdür (79). HGF'nin spermatozoa üzerindeki etkisi epididimden geçiş sırasında artar ve bu direkt olarak yüksek reseptör ekspresyonu ile koreledir (68). C-met, epididimin kaput veya kauda kısmından izole edilen hücrelerde lokalizedir. C-met'in sperm hücre membranındaki dağılımı, epididimal spermin kaput ve kaudal bölgelerinde farklılık gösterir (80). İmmunohistokimya ile kaput epididimden izole edilmiş hücrelerdeki c-met lokalizasyonu hücrenin baş kısmında daha yüksek oranda olup, kaput epididimdeki spermlerin az bir kısmında ise reseptör hem baş hem flagellumda mevcuttur. Kaudal epididimden izole edilen spermlerde reseptör, oldukça homojen ve tüm hücre yüzeyinde bulunur. HGF'nin erkek fertilitesindeki rolü, Catizone ve ark. nın çalışmasında kaput epididimden izole edilmiş spermatozoaların yalnız medyumlu kültür ve HGF ile desteklenmiş kültürde motilitelerinin değerlendirilmesi ile incelenmiştir. HGF yokluğunda motilitenin önemli ölçüde azaldığı, HGF varlığında ise spermin motilitesini uzun süre muhafaza edebildiği görülmüş, her iki grupta eşit sayıda ölü sperm saptanmıştır. Böylece HGF'nin sperm canlılığını artırıcı etkisi olmamakla birlikte, spermin epididimden geçişi sırasında motil sperm yüzdesini artırmada etkisiz olduğu görülmüştür. İn vitro ortamda c-met reseptör ve onun ligandı HGF arasındaki anahtar-kilit sistemi sayesinde, spermin epididimden geçişi sırasında sperm motilitesini muhafaza etmede pozitif rolü olduğu saptanmıştır (81).

Her ne kadar bazı çalışmalar HGF'nin sperm motilitesi üzerine olumlu etkileri olduğu gösterse de Kitamura ve ark. nın çalışmasında infertil hastaların yıkanmış spermatozoalarına rekombinant HGF ilave edilmiş ve sperm hareketleri CASA ile ölçülmüştür. Seminal plazmadaki HGF konsantrasyonu ölçülmüş, veriler olguların hormon profili ve semen analizi parametreleri ile karşılaştırılmıştır. Fizyolojik HGF konsantrasyonu, uzun süreli enkübasyon sonrasında sperm motilitesini korumuş olsa da fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Rekombinant HGF'nin, spermatozoada hiperaktivasyona neden olacak spermin lineer hareketine veya hareket frekansına etkisi olmamıştır. Seminal plazmadaki HGF konsantrasyonu ile olguların herhangi bir klinik parametresi arasında korelasyon izlenmemiştir. Erkek reproduktif sisteminde sperm hareketindeki ana rolün epididimdeki matürasyonu olduğu sonucuna varılmıştır (82).

Wiltshire ve ark. nın çalışmasında da normozoospermik, subfertil ve azospermik olarak 3 gruba ayrılan hastalarda HGF ve semen analizi parametreleri değerlendirilmiş, semendeki HGF konsantrasyonu ile sperm konsantrasyonu, sperm motilite yüzdesi, total

sperm sayısı veya total motil sperm sayısı arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Ayrıca gruplar arasında da HGF düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır (78).

Depuydt ve ark. nın 1996 yılındaki çalışmasında, sperm konsantrasyonları ile c-met ekspresyonu arasında %90'lık Perkol fraksiyonu grubunda ters korelasyon izlenirken, %47'lik Perkol grubunda anlamlı fark izlenmemiştir. HGF'nin insan seminifer tübül, epididim, duktus deferens, prostat ve seminal vezikül epitelinde bulunması, c-met ekspresyonunun seminifer tübül ve spermatozoada gerçekleşmesi ve c-met'in %90'lık Perkol fraksiyonunda, %47'lik Perkol fraksiyonuna göre daha az eksprese edilmesi, HGF ve c-met'in spermatozoanın formasyon ve maturasyonunda rolü olduğunu düşündürmekte, HGF ve c-met'in spermatogenez sırasında farklılaşma ve migrasyonda görevli olduğunu akla getirmektedir (83).

Depuydt ve ark. tarafından yapılan 1998 yılındaki çalışmada seminal plazmadaki HGF konsantrasyonundaki değişikliklerin, farklı androlojik hastalıklar ve erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir, ama daha bu vakalarda literatürde çelişkili veriler rapor edilmiştir (78,82). HGF'nin seminal plazma konsantrasyonu vazektomili (obstruktif azospermi) erkeklerde düşük, aksesuar bez inflamasyonu olan erkeklerde yüksek, normospermik erkeklerde düşük, oligozoospermik erkeklerde düşük, primer testiküler yetmezliği olan azospermik erkeklerde ise yüksek olarak saptanmış, böylece farklı androlojik hastalıklarda seminal plazmadaki HGF konsantrasyonlarında dikkat çekici değişimler olduğu rapor edilmiştir. Bu literatürün tartışmalı olması, androlojik hastalıkların klasifikasyonunun zorluklarıyla ilgili olup, bu çalışma için farklı çalışma gruplarının olmasının uygun olduğu dikkate alınmalıdır. Daha derin araştırmalar yapılarak daha fazla çalışma ile bu noktayı daha iyi açıklamak gerekmektedir (75).

HGF, ya direkt erkek germ hücreleri ya da indirekt testisteki tübüler ve interstisyel somatik hücreler üzerinden spermatogenezin kontrolü ve sperm kalitesinde rol oynar. Catizone ve ark. nın prepubertal deney farelerinde yaptıkları çalışmada, fare spermatogoniası, pakiten spermasiti ve yuvarlak spermatidinde bulunan c-met'in, HGF ile birlikte germ hücre proliferasyon aktivitesini artırdığı ve apoptotik hücre sayısını azaltarak erkek germ hücresi homeostasisi ve dolayısıyla erkek fertilitesi üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (81).

Ricci ve ark. nın 2006 ve 2012 yıllarında yaptıkları çalışmalarda, prenatal gelişimin geç döneminde c-met dağılımı testiküler kordlarda downregüle ve interstisyel fetal Leydig hücrelerinde upregüle olarak değişmektedir (84). HGF, her zaman interstisyel korpartmanda mevcuttur ama fare fetal Leydig hücrelerinde üretilmemektedir. Böylece HGF fetal Leydig hücrelerini diferensiyasyon yaparak, interstisyel kompartmanında parakrin faktör gibi hareket eder. Testiküler organ kültürlerinde HGF, testosteron üretimini (84), fetal Leydig hücre sağkalımını stimüle edebilmektedir (85). C-met, erken prenatal dönemde fetal Leydig hücrelerinde saptanamazken, seminifer kordlarda ekspresyone edilebilmektedir. Böylece HGF erken prenatal döneme ait testiküler organ kültüründe testosteron sekresyonunun değiştirilemezken, geç prenatal dönemde testosteron üretimini stimüle etmektedir. Bu verilere göre HGF; normal prenatal steroidogenezde sorumlu olan büyüme faktörlerinden biridir (85-87).

HGF, testiküler fizyolojide parakrin, otokrin ve endokrin regülasyonu düzenlemede etki gösterebilmektedir. HGF, testiküler fonksiyonları düzenlemede mezenkimal-epitel iletişimi için parakrin faktör olarak saptanmakla birlikte, aynı zamanda bu büyüme faktörünün kan damarları üzerinden hasarlı organların tamiri ve homeostasisini sağlamada görevli olduğu bilinmektedir. Ayrıca HGF otokrin faktör gibi davranarak reseptörü c-met'e, pubertede değişen sinyaller gönderir, bu sayede c-met, FSH etkisiyle up regüle olarak Sertoli hücrelerinden ekspresyone edilir. HGF'nin organizmadaki endokrin rolü ile, hem fetal hem erişkin Leydig hücrelerinde testosteron sekresyonunu artırmaktadır (84). HGF'nin hormonal etkisinin dışında, HGF ekspresyonunun kandaki hormonlar, nörotransmitterler, sitokinler, büyüme hormonları (88), norepinefrin (89), sistemik prostoglandin E (90) tarafından regüle edildiği gösterilmiştir.

Sertoli hücre diferensiyasyonunun doğru olarak gerçekleştirilmesi, spermatogenetik süreci sürdürmek için gerekli olan mikroçevreyi korumak adına büyük önem taşır (92,93). Sertoli hücreleri, endokrin hipotalamus-pitüiter-gonadal aks sinyalleri sayesinde, FSH yanıtı ile östrojen üretimi ve sekresyonu yapar ve bu durum spermatogenetik süreci regüle eder. HGF'nin, Sertoli hücre fizyolojisini modifiye eden ve onların diferensiyasyon olmuş fenotipini koruyan faktörlerden biri olduğu ileri sürülmektedir. Bu durum HGF'nin gonadal-pitüiter iletişimde rolü olduğunu düşündürmektedir. Zachow ve Üzümcü 2007'de (91), erkek ve dişi gonad fizyolojisinde HGF'nin bazı endokrin sinyalleri olduğunu öne sürmüştür. HGF'nin direkt olarak CYP19 enzimini azaltarak FSH bağımlı 17 β estradiol üretimini suprese edip

ovaryan steroidogenezi downregüle ettiği bildirilmiştir (94-95). Sertoli hücrelerinin, overdeki Granulosa hücrelerinin testiküler karşılığı olduğu ve 17 β estradiolün testiküler kaynağı olduğu bilinmektedir. Sertoli hücreleri, sıçanlarda postnatal dönemin ilk 10-20 gününde yüksek oranda 17 β estradiol üretimi yapacak yetenektedir (96). HGF'nin invivo ortamda Sertoli hücrelerinden 17 β estradiol üretimini, Granulosa hücrelerinde gözlenen benzer bir yolla lokal olarak kontrol edebileceği varsayılmaktadır. Bu veri ile uygun olarak, FSH'nin Sertoli hücre kültüründe c-met ekspresyonunu up-regüle ettiği gösterilmektedir (97). HGF/c-met sisteminin, FSH bağımlı östrojen üretimine katkısı olabileceği öne sürülmektedir.

Catizone ve ark., c-met'in hem insan hem sıçan germ hücrelerinde eksprese edildiğini, sıçanlarda, bu reseptörün spermatogenetik süreç sırasında spermatogoniadan spermatozoaya kadar her zaman mevcut olduğunu bildirmiş (81,83,97), HGF'nin, 8-30 günlük sıçan testislerinin ex vivo organ kültüründe spermatogonial hücre proliferasyonunu anlamlı olarak arttırarak germ hücre mitotik aktivitesini kontrol ettiği gösterilmiştir. Spermatogonia hücreleri üzerine elde edilen bu sonuç, HGF aktivatör inhibitör (HAI-2)'ün sadece primer spermatisitlerde eksprese edildiğini vurgulamaktadır (98). Mitotik germ hücreleri, HGF sinyaline ihtiyaç duymaktadır. Oysa mayotik sürecin başında, bu proliferatif işaret, germ hücrelerinin sırayla mayotik girişine izin vermek için, inhibe edilmeye ihtiyaç duymaktadır.

Germ hücre apoptozu, sırasıyla diferensiyel olan gametlerin en iyi seçimi yapabilmesi için testiste kontrol edilmektedir ve hatta HGF'nin bu biyolojik sürecin kontrolü ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Bu büyüme faktörünün, germ hücre apoptozunu anlamlı olarak azaltma yeteneğinde olduğu gösterildiğinden beri, HGF erkek germ hücrelerinde sağkalım faktörü olarak hareket etmektedir (99). Sağlıklı hayvanlardaki bu sonuç, Goda ve ark. tarafından çalışılan deneysel kriptorşid sıçan modelleri ile güçlendirilmiştir (100). Bu hayvanların testisine yapılan adenovirüs aracılı HGF gen transferi, HGF'nin overekspresyonunu uyarır ve spermatogenezi ve testiküler ağırlığı düzenleyerek apoptotik germ hücre sayısını anlamlı olarak azaltır. Germ hücre proliferasyonu ve sağkalımının endokrin sinyaller tarafından kontrol edildiği bilinmektedir: örneğin FSH, hem in vivo hem in vitro ortamda spermatogonial proliferasyonu stimüle eder (101-103). Böylece HGF'nin erkek germ hücreleri homeostazisini desteklemek için endokrin sinyallerle işbirliği yapan lokal sitokinlerden biri olduğu düşünülebilir(102-106).

HGF'nin epididimal sperm maturasyonu üzerindeki rolünü kuvvetle öne süren ilk bulgu 1994'te Naz ve ark. tarafından bildirilmiştir (102). Bu grup, spermin motilitesini kazandığı yer olan fare epididimal traktındaki distal korpus ve kaudada HGF'nin en yüksek spesifik alan dağılım paterni olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada, HGF'nin immotil spermlerdeki hücre motilitesini hafifçe indüklediği bulunmuştur. C-met'in sperm yüzeyindeki dağılım paterni, sıçanların testiküler epididimal spermatozoalarının kaput ve kauda kısımlarında değişiklik göstermektedir (103). Sperm motilitesine olan etkinin bir kısmı HGF'nin invitro olarak epididimal sperm motilitesinin korunmasında pozitif etkisi olmasına rağmen, aslında bu faktörün motil hücrelerin yüzdesini artırmada anlamlı etkisi olmadığı saptanmıştır (103). Ancak, kemirgenlerde bildirilen aynı motojenik etkinin insan spermelerinde olmaması (105), ve bu büyüme faktörünün insan sperm fizyolojisindeki rolünün hala tartışmalı bir konu olduğu gösterilmektedir.

2. GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlıklı bir gebeliğin oluşması için kadında ovulasyonun olması, bu ovumun tuba uterinalar tarafından tutulması, fertilizasyonun tamamlanması, oluşan embriyonun reseptif bir endometrium tarafından karşılanması ve bu sırada blastokist aşamasına gelen embriyonun endometriuma implante olması gereklidir. Erkeğin fertilitesi için de ovulasyon dönemine yakın, yeterli sayıda ve motilitede, fertilizasyon yeteneği olan spermilerin servikste depolanması gerekmektedir.

Fertilizasyondan itibaren hücrel farklılaşma yaşam boyunca devam etmektedir. Diferensiyel olan hücreler, hem kendisi hem de komşu organlar ve uzak organlar ile sürekli iletişim halindedir. Hücrel morfogenez, mitogenez, motogenez (hareketin stimülasyonu), embriyogenez, angiogenez ve onarım gibi hücre içi fonksiyonların yürütülebilmesi için hücrelerarası irtibat büyük önem taşımaktadır, Bu iletişim birtakım hücreler arasındaki sinyal iletim mekanizmaları ile sağlanmaktadır.

Erkek üreme sisteminde de puberte ile birlikte başlayan en önemli değişikliklerden biri spermatogenez ile germ hücresi topluluklarında proliferasyon, mayoz bölünme ve diferensiyasyon ile matür spermatidlerin elde edilmesidir. Testis ve epididimdeki hücre içi etkileşimler spermatogenez ve sperm olgunlaşması için gereklidir. Hücrelerarası iletişim ve hücrenin proliferasyonu büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Bir mitojen bir motojen ve morfojen olarak fonksiyon görme yeteneği olan HGF, spermatogenik epitelde olduğu gibi, hareket edebilen pek çok sistemin fonksiyonunun düzenlenmesinde işlev gören özelliklere sahiptir. HGF, hepatositler için potent mitojen olduğu bilinen, ayrıca hedef hücrelerde bağlantı sağlayan bir 'scatter faktör' olduğu anlaşılmış bir pleiotropik sitokindir. Tirozin kinaz aktivitesi bulunan reseptörü c-met'e yüksek afiniteyle bağlanır ve sadece mezenkimal hücreler tarafından eksprese edilir. Erkek reproduktif sisteminde ise seminifer tübül, epididim, duktus deferens, prostat ve seminal veziküller epiteli gibi organlarda eksprese edilmektedir.

Bir protoonkogen olan c-met, büyük oranda epitelyal hücreler tarafından eksprese edilmekle birlikte endotelial hücrelerde, myoblastlarda, hematopoetik hücrelerde ve spinal motor nöronlarda gösterilmiş, pek çok solid organ tümöründe ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. C-met, puberte ile birlikte değişen endokrin sinyaller üretir ve FSH etkisiyle Sertoli hücrelerinden eksprese edilir. HGF, organizma üzerindeki endokrin etki ile de hem fetal hem erişkin Leydig hücrelerinde testosteron sekresyonunu artırır. HGF, testiküler fonksiyonları desteklemede parakrin hem de otokrin bir modülatör olarak etki eder. Spermatogenezin kontrolü ve sperm kalitesi üzerindeki rolünü, ya direkt sperm germ hücrelerine ya da testisteki übüler ve interstisyel somatik hücelere etki ederek göstermektedir. HGF, sperm motilitesini indükleyen bir büyüme faktörüdür. HGF'nin spermatozoa üzerindeki etkisi epididimden geçiş sırasında artar ve bu direkt olarak yüksek reseptör ekspresyonu ile koreledir.

HGF/c-met kompleksinin, gerek normal genital dokudaki gerekse birçok neoplazideki ekspresyonunu inceleyen çalışmalar olsa da, sperm motilitesine olan etkisi ve erkek infertilitesi ile ilişkisi çok az sayıdaki çalışmada yer almıştır. Bu çalışmada, bu onkogen ve ligandı HGF'nin, infertil erkeklerin spermelerindeki sperm konsantrasyonu, morfolojisi ve motilitesi parametrelerine göre değişimlerin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bulunan sonuçlara göre erkek infertilitesinin HGF ve reseptörü c-met ile ilişkisi irdelenecektir.

3. MATERYAL ve METOD

Çalışma ileriye dönük, tesadüfi dağılımlı olmayan, kontrollü bir çalışma olarak tasarlandı. Çalışma tek merkezde gerçekleştirildi. Kurumsal etik kurulundan onay alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Çalışma Mart 2015 ile Haziran 2016 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

Çalışma için kontrol ve çalışma grubu olmak üzere iki grup oluşturuldu. Kontrol grubuna 18-60 yaş grubunda, çocuk sahibi olan, bilinen kronik bir hastalığı olmayan, ürolojik operasyon geçirmemiş, sperm analizi sonucunda sperm sayısı, motilite ve morfolojisi normal bulunmuş sağlıklı ve çalışmaya katılmak için gönüllü olan erkek bireyler dahil edildi. Çalışma grubu için adaylar ise kurumun IVF Androloji Laboratuvarı'na müracaat eden 18-60 yaş grubunda, sperm analizi sonucunda sperm sayısı, motilite ve morfoloji kriterlerinden en az birinin WHO 2010 Semen Analiz Parametreleri'nin referans aralığı altında kalan ve çalışmaya katılmak için gönüllü olan erkek bireyler arasından seçildi. Çalışmaya dahil olan her bireye ayrıntılı sözlü ve yazılı bilgi verildikten sonra Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu imzalatıldı.

Parametreler	En düşük referans değeri
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (milyon)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (milyon / ml)	15 (12-16)
Total motilite (%)	40 (38-42)
Progresif motilite (%)	32 (31-34)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)

Tablo1: Semen Analizi İçin En Düşük Referans Değerler (5.persentil, %95 güvenlik aralıkları). (19)

Çalışma Protokolü

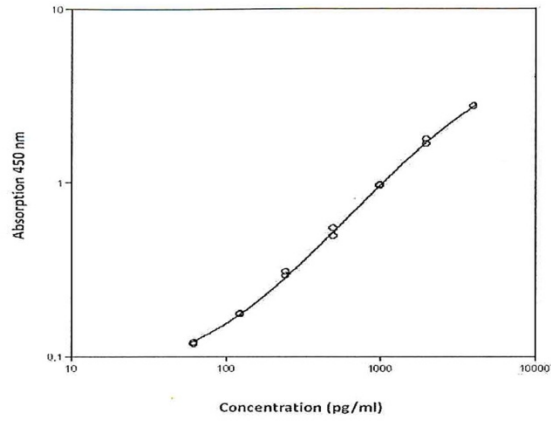
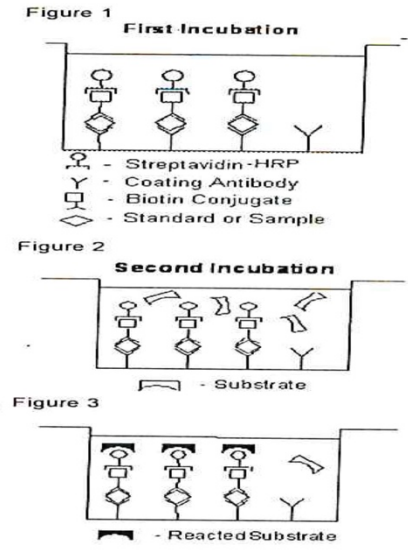
Çalışmaya dahil olan tüm bireylerden sperm örneği alındı. Kurumun IVF Androloji Laboratuvarı'nda sperm örnekleri 2-5 günlük cinsel perhiz sonrasında uygun koşullar altında temin edildi. Sperm örneği 3 ml.'nin altında olan bireyler çalışma dışında bırakıldı. Numuneler 37°C'de otuz dakikalık bir likefaksiyon sürecinin ardından spermiyograma tabi tutuldu. Makler Chamber kameraya konulan 10 µl sperm örneği ile spermiyogram işlemi IVF Androloji Laboratuvarı'nda görevli embriyologlar tarafından gerçekleştirildi. Spermiyogram işlemi sırasında sperm volümü, sperm konsantrasyonu, motilite yüzdesi ve morfoloji yüzdesi ölçümleri kaydedildi.

Spermiyogram işlemi takiben bir milimetrelik ilk örnek ayrılarak hiçbir işleme tabi tutulmadan Falcon 2003 marka tüpe alınarak, aynı gün taze olarak incelenmek ve c-met ekspresyonu tayini yapılması için kurumun Genetik Laboratuvarı'na gönderildi. Bir mililitrelik ikinci örnek ise herhangi bir işleme tabi tutulmaksızın, Falcon 2003 tüp ile -10°C'de buzdolabının derin dondurucu haznesinde dondurularak saklandı.

C-met ekspresyon düzeyi ölçümü için, 1 ml'lik taze ejakülatın ticari bir kit ile (tissue total RNA isolation kit, HibriGen) total RNA izole edilip cDNA sentezlendi. (The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems). Hedef gen c-met'e ait transkript varlığı 'Human C-Met Expression Kit, HibriGen' kullanılarak üreticinin önerdiği deney koşullarında Real Time PCR yöntemiyle gösterildi. Her numune için PCR sırasındaki eşik değerler kayıt edildi. İstatistik, PCR döngü numarasına göre yapıldığı için c-met ekspresyon düzeyi değerleri için birim kullanılmamıştır.

HGF düzeyi ölçümü için kurumun Biyokimya Laboratuvarı'na gönderilen, -10°C'de dondurulmuş tüp 24°C'de çözülürerek ticari kit ile (Human HGF Instant ELISA Affymetrix eBioscience) ile HGF değerleri ölçüldü.

Ticari kitler -20°C'de muhafaza edildi. Her plakada 14 standart ve 2 boş dahil olmak üzere toplam 96 küçük bölme mevcuttu. Küçük bölmelerin içine anti-human HGF kaplanmış antikorlar absorbe edilmişti. Her bölmeye 100 µl distile su eklendi. Her örnekten 50 µl alınarak bölmelere eklendi ve adeziv film ile kapatılarak oda sıcaklığında 'Microplate Shaker'da 3 saat sallandı. İlk inkubasyonda human HGF, her numunede veya standart küçük bölmelerde mevcut olup, bölmelerde absorbe edilmiş haldeki HGF antikorlarına bağlandı. Biotin ile konjuge anti-human HGF antikoruna, ilk antikora bağlanmış olan human HGF'ye bağlandı. Streptavidin-HRP ise biotin ile konjuge edilmiş anti-human HGF antikoruna bağlandı. Adeziv film çıkartılarak bölmeler boşaltıldı ve bağlı olmayan biotin ile konjuge anti-human HGF antikoruna ve Streptavidin-HRP herbiri 6 kez ticari kitin bünyesinde mevcut olan 'wash buffer' ile iyice yıkanıp, son yıkamada plaka peçeteye vurularak iyice uzaklaştırıldı. Tüm bölmelere 100 µl substrat solusyon eklendi ve oda sıcaklığında direkt ışık maruziyeti engellenerek 30 dakika inkübe edildi, bölmelere eklenen substrat solusyonu ile HRP reaktif edildi. Bölmelerdeki soluble human HGF miktarına bağlı olarak farklı oranlarda mavi renk değişimleri gözlemlendi. Her bölmeye 100 µl stop solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve 1 saat boyunca 2-8°C'de karanlıkta bekletildi ve her bölmede elde edilen renk değişiminin absorbansı 450 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Standart eğri, 7 adet human HGF standart bölmesine ve human HGF örneği konsantrasyonlarına göre belirlendi. Örnekler 1:2 oranında dilüe edildikleri için, standart eğride hesaplanan konsantrasyona ulaşmak için dilüsyon faktörü hesaba katılarak sonuçlar 2 ile çarpıldı.



Şekil 3: HGF Ölçüm Kiti Reaksiyon Şeması **Şekil 4:** HGF Ölçüm Kiti Spektrofotometre Eğrisi

İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, oran, minimum, maksimum) yanı sıra nicel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değişkenlerin iki grup karşılaştırmalarında Student's t test, normal dağılım göstermeyen değişkenlerin iki grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin grup içi karşılaştırmalarında Wilcoxon Signed Ranks test kullanıldı. Değişkenler arası ilişkilerin değerlendirilmesinde Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0,01$ ve $p < 0,05$ düzeylerinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışma Mart 2015-Haziran 2016 tarihleri arasında Florence Nightingale Hastaneler Grubu IVF bölümüne müracaat eden %66,3'ü (n=61) infertil, %33,7'si (n=31) sağlıklı toplam 92 erkek hasta ile yapılmıştır.

Bazal sperm sayısı, kontrol grubunda $66,84 \pm 27,12$ (18-116) olarak, çalışma grubunda $25,99 \pm 23,00$ (2-110) olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.001$).

Sperm motilite yüzdesi, kontrol grubunda $49,84 \pm 10,77$ (40-86) olarak, çalışma grubunda $45,43 \pm 17,39$ (15-85) olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. ($p>0,05$).

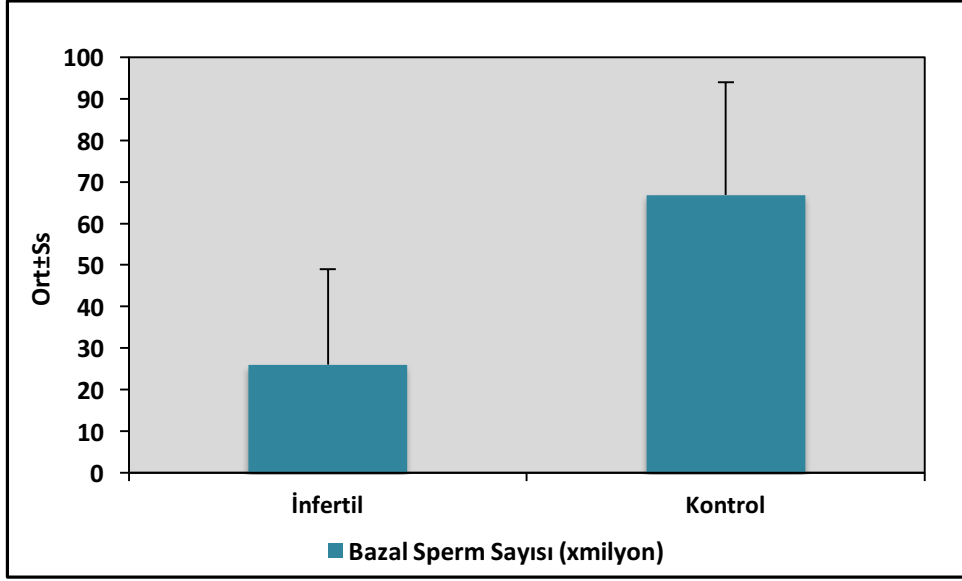
Sperm morfoloji yüzdesi, kontrol grubunda $4,45 \pm 0,62$ (4-6) olarak, çalışma grubunda $1,80 \pm 1,65$ (0-5) olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. ($p=0,001$).

C-met ekspresyon düzeyi, kontrol grubunda $26,53 \pm 3,50$ (19,43-32,73) olarak, çalışma grubunda $27,95 \pm 2,86$ (21,58-33,07) olarak tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. ($p=0,039$).

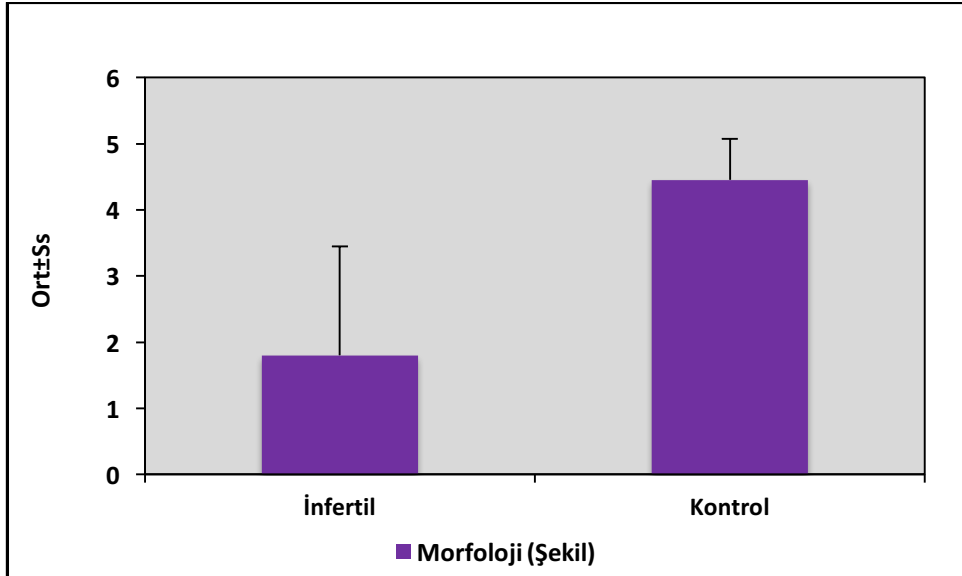
HGF düzeyi ölçümleri çalışma grubunda $4,87 \pm 4,11$ (1,01-21,58), kontrol grubunda $3,25 \pm 1,76$ (0,83-8,25) olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,043$).

Tablo 2: Gruplara Göre Sperm Sayısı, Sperm Motilite Yüzdesi, Sperm Morfoloji Yüzdesi Ve C-met Ekspresyon Düzeyi, HGF Düzeyi Ölçümlerinin Değerlendirilmesi

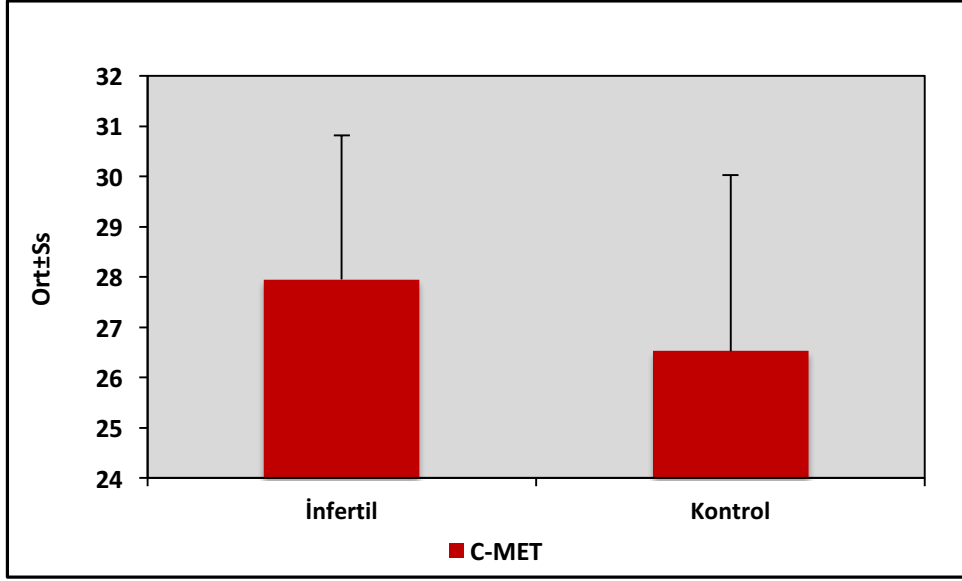
		Toplam	İnfertil	Kontrol	<i>p</i>
		(n=92)	(n=61)	(n=31)	
Bazal Sperm Sayısı (x milyon)	<i>Ort±Ss</i>	39,75±31,12	25,99±23,00	66,84±27,12	<i>^a0,001**</i>
	<i>Min-Maks</i> <i>(Medyan)</i>	2-116 (33,5)	2-110 (21)	18-116 (64)	
Sperm Motilitesi (%)	<i>Ort±Ss</i>	46,91±15,56	45,43±17,39	49,84±10,77	<i>^b0,138</i>
	<i>Min-Maks</i> <i>(Medyan)</i>	15-86 (45)	15-85 (45)	40-86 (45)	
Sperm Morfolojisi (%)	<i>Ort±Ss</i>	2,70±1,87	1,80±1,65	4,45±0,62	<i>^a0,001**</i>
	<i>Min-Maks</i> <i>(Medyan)</i>	0-6 (3)	0-5 (2)	4-6 (4)	
C-met	<i>Ort±Ss</i>	27,47±3,15	27,95±2,86	26,53±3,50	<i>^a0,039*</i>
	<i>Min-Maks</i> <i>(Medyan)</i>	19,43-33,07 (28,35)	21,58-33,07 (28,76)	19,43-32,73 (27,89)	
HGF (ng/mL)	<i>Ort±Ss</i>	3,79±2,86	3,25±1,76	4,87±4,11	<i>^a0,043*</i>
	<i>Min-Maks</i> <i>(Medyan)</i>	0,83-21,58 (3,10)	0,83-8,25 (2,98)	1,01-21,58 (3,63)	
<i>^aMann Whitney U Test</i>		<i>^bStudent-t Test</i>		<i>*p<0,05</i>	<i>**p<0,01</i>



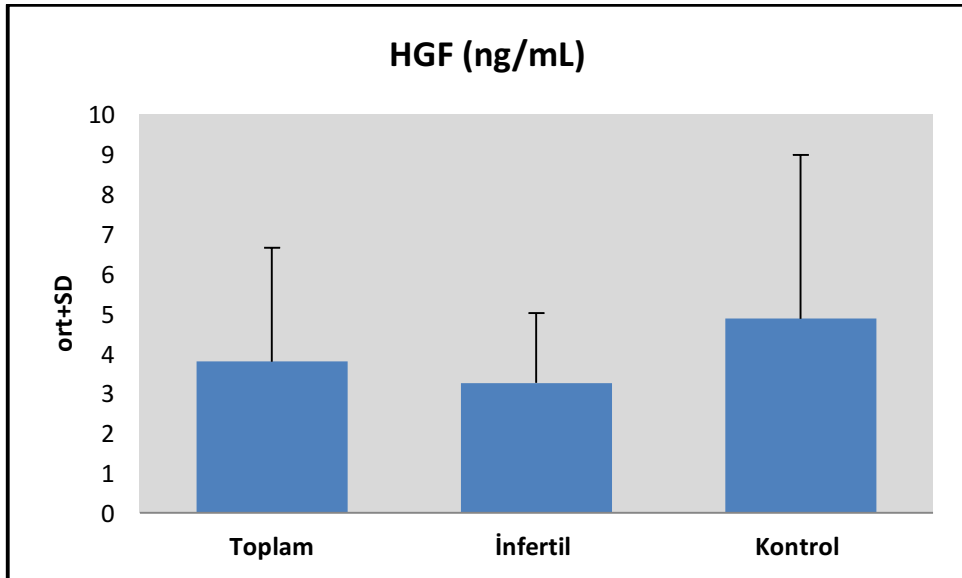
Şekil5: Gruplara Göre Bazal Sperm Sayısı Dağılımı



Şekil 6: Gruplara Göre Bazal Sperm Morfoloji Yüzdesi Dağılımı



Şekil 7: Gruplara Göre C-met Ekspresyon Düzeyi Dağılımı



Şekil8: HGF düzeylerinin gruplara göre dağılımı

Tüm olgularda, c-met ekspresyon düzeyi ile HGF düzeyi ölçümü arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

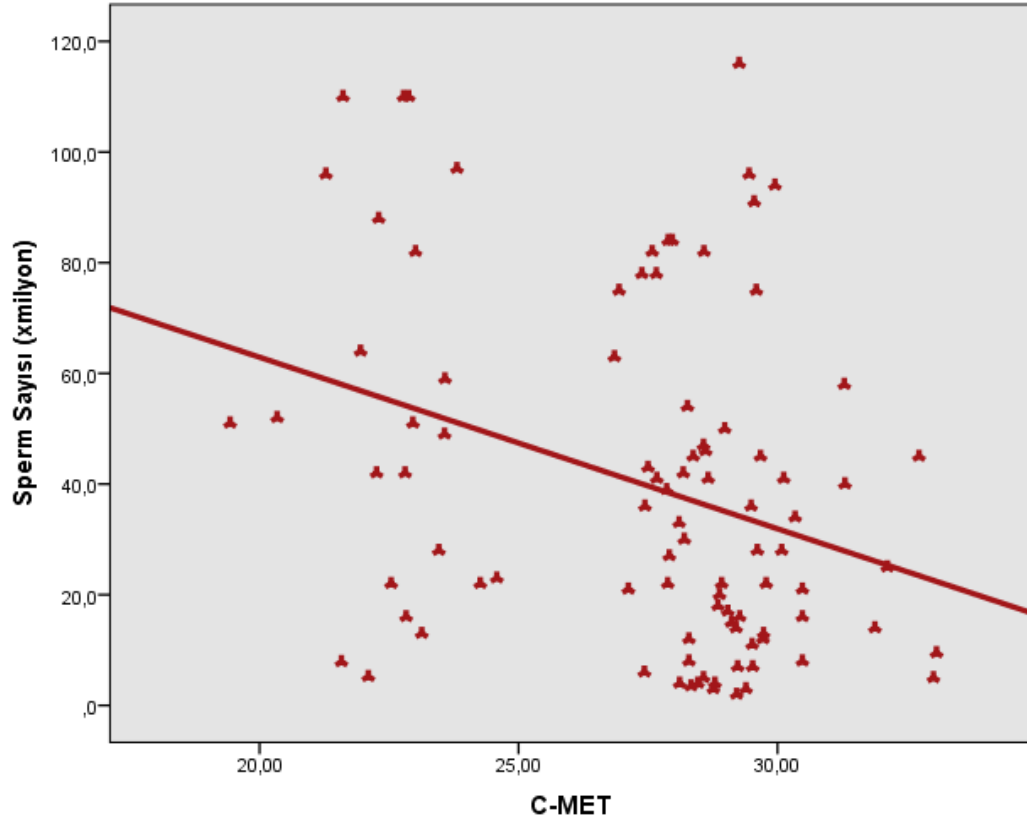
C-met ekspresyon düzeyi ile HGF düzeyi ölçümü arasında çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

C-met ekspresyon düzeyi ile HGF düzeyi ölçümü arasında kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 3: Gruplarda ve Tüm Olgularda C-met Ekspresyon ile HGF İlişkisinin Değerlendirilmesi

	C-MET - HGF (ng/mL)	
	r	p
Toplam (n=92)	0,130	0,219
İnfertil (n=61)	0,146	0,263
Kontrol (n=31)	0,287	0,117

r=Spearman 'in Korelasyon Katsayısı



Şekil 9: Bazal Sperm Sayısı ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı

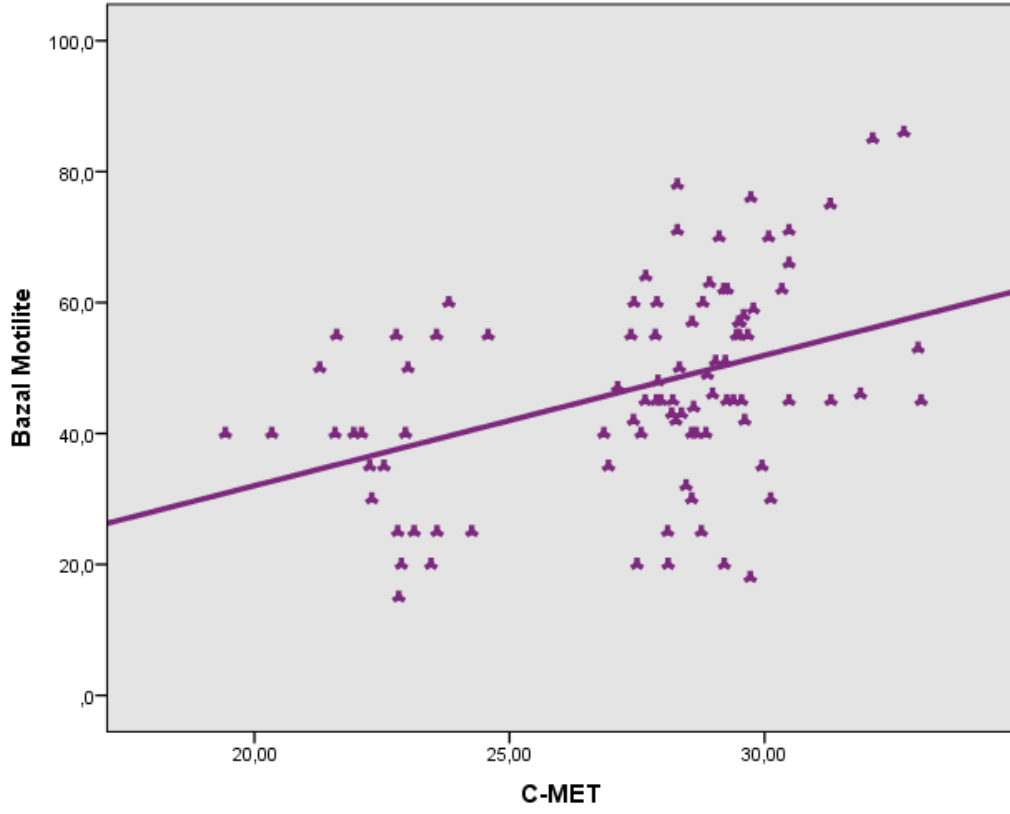
Tüm olgularda sperm motilite yüzdesi ile HGF düzeyi ölçümü arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Sperm motilite yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyi ölçümleri arasında pozitif yönlü (motilite yüzdesi arttıkça c-met ekspresyon değeri de artan) %42,1'lik ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($r=0,421$; $p=0,001$).

Sperm motilite yüzdesi ile HGF düzeyi ölçümü arasında çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Sperm motilite yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyi ölçümleri arasında pozitif yönlü (sperm motilite yüzdesi arttıkça c-met ekspresyon değeri de artan) %31,2'lik fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($r=0,312$; $p=0,031$).

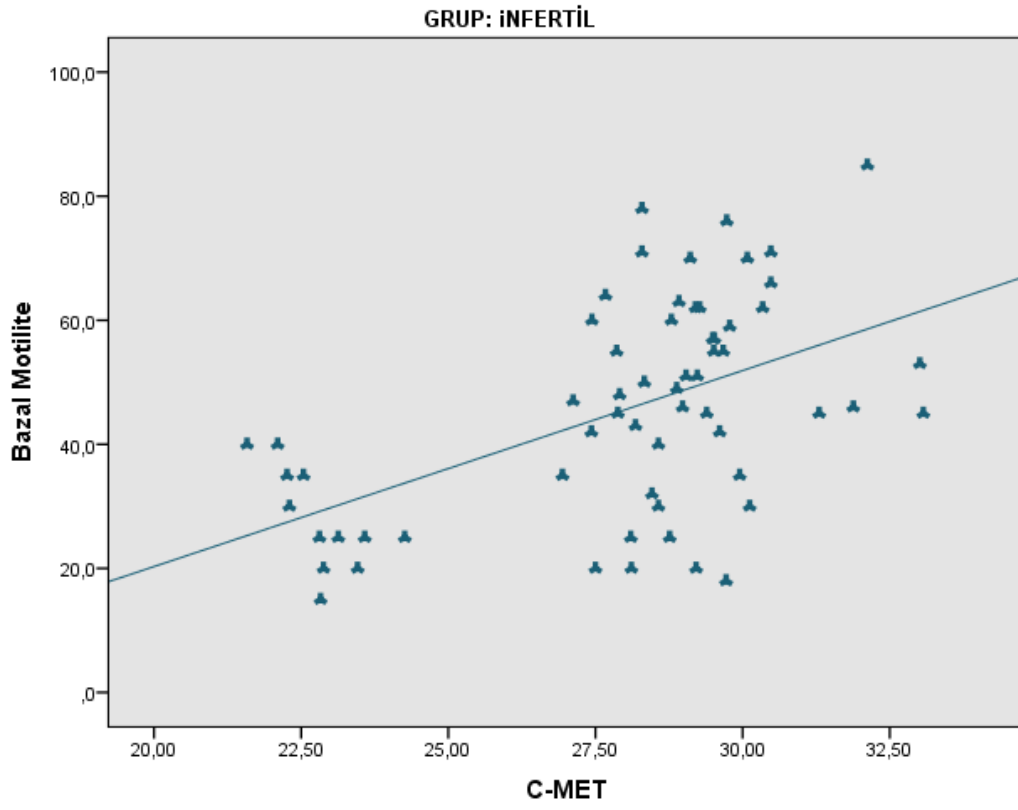
Sperm motilite yüzdesi ile HGF düzeyi ölçümü arasında çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Sperm motilite yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyi ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 5: Gruplarda ve Tüm Olgularda Sperm Motilite Yüzdesi ile HGF Düzeyi ve C-met Ekspresyon Düzeyi Ölçümleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

	Sperm Motilite Yüzdesi					
	Toplam (n=92)		İnfertil (n=61)		Kontrol (n=31)	
	r	p	r	p	r	p
HGF (ng/mL)	0,129	0,221	0,145	0,265	0,014	0,942
C-met	0,421	0,001**	0,488	0,001**	0,259	0,159
<i>r=Spearman'ın Korelasyon Katsayısı</i>		<i>*p<0,05</i>		<i>**p<0,01</i>		



Şekil10: Basal Motilite ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı



Şekil11: İnfertil Grubu Olgularda Bazal Sperm Motilite Yüzdesi ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı

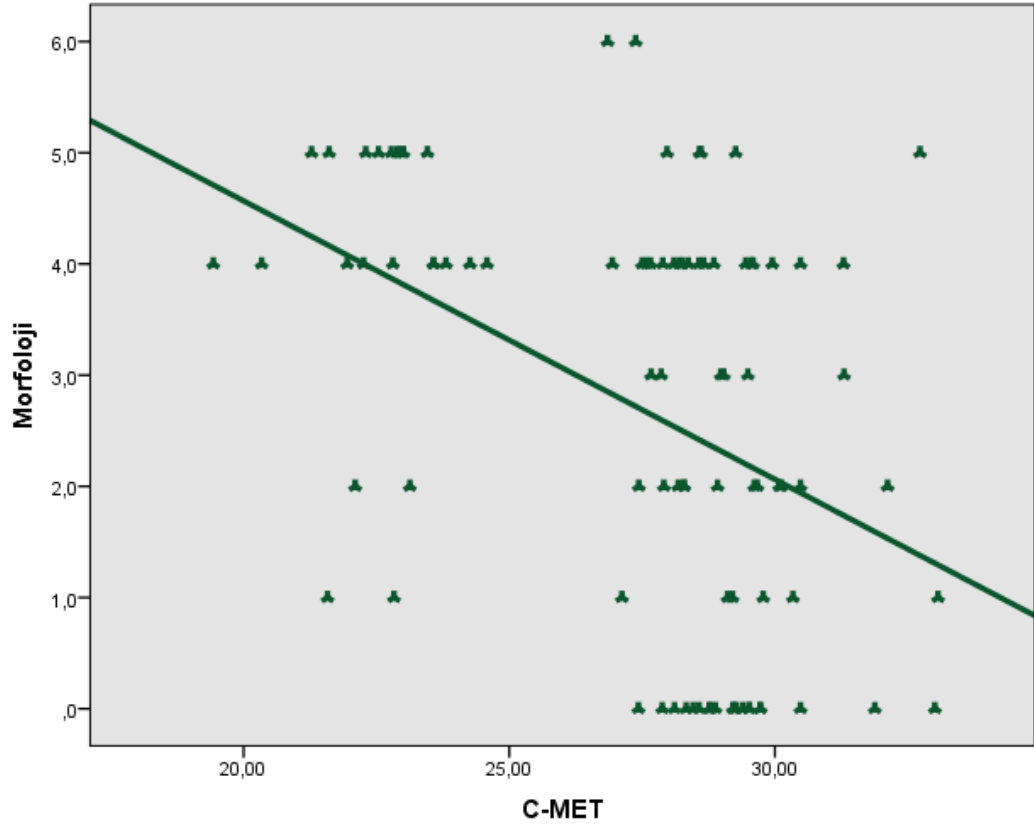
Tüm olgularda sperm morfoloji yüzdesi ile HGF düzeyi ölçümü arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$). Sperm morfoloji yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyi ölçümleri arasında negatif yönlü (sperm morfoloji yüzdesi arttıkça c-met ekspresyon değeri azalan) %44,1'lik fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($r=0,441$; $p=0,001$).

Sperm morfoloji yüzdesi ile HGF düzeyi ölçümü arasında çalışma grubunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Sperm morfoloji yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyi ölçümleri arasında negatif yönlü (sperm morfoloji yüzdesi arttıkça c-met ekspresyon değeri azalan) %42,2'lik fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($r=-0,422$; $p=0,001$).

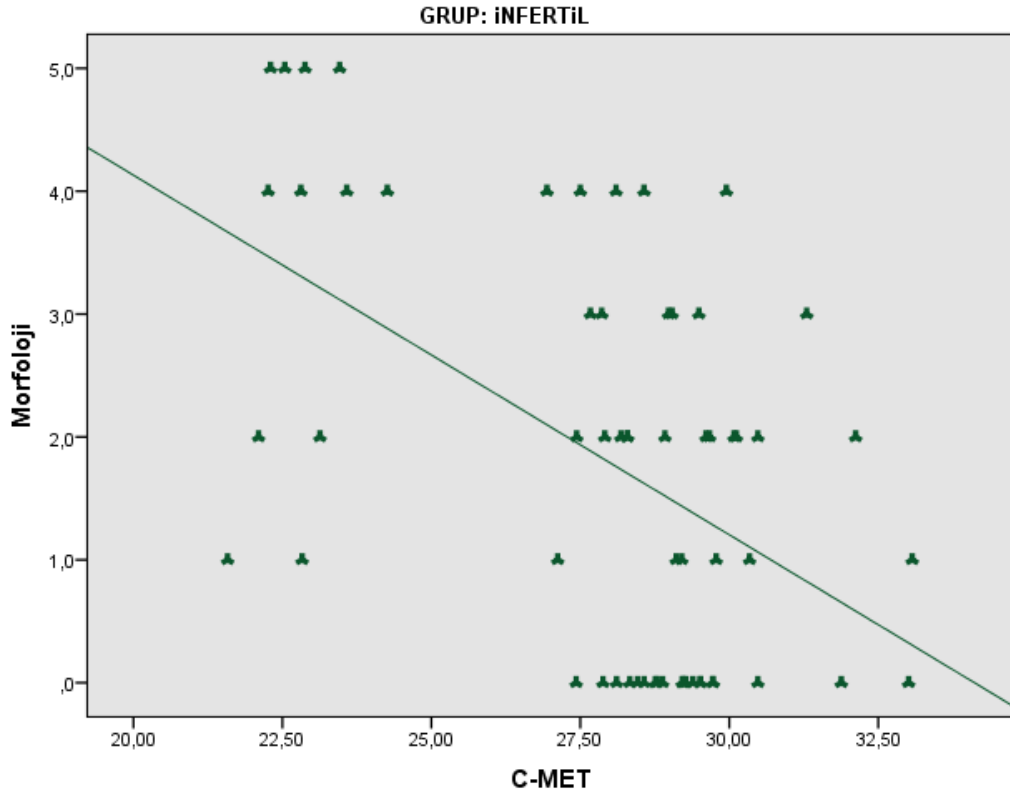
Sperm morfoloji yüzdesi ile HGF düzeyi ölçümü arasında kontrol grubunda negatif yönlü (sperm morfoloji yüzdesi arttıkça HGF değeri azalan) %37,8'lik ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($r=0,378$; $p=0,036$). Sperm morfoloji yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyi ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Tablo 6: Gruplarda ve Tüm Olgularda Sperm Morfoloji Yüzdesi ile HGF Düzeyi ve C-met Ekspresyon Düzeyi Ölçümleri Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

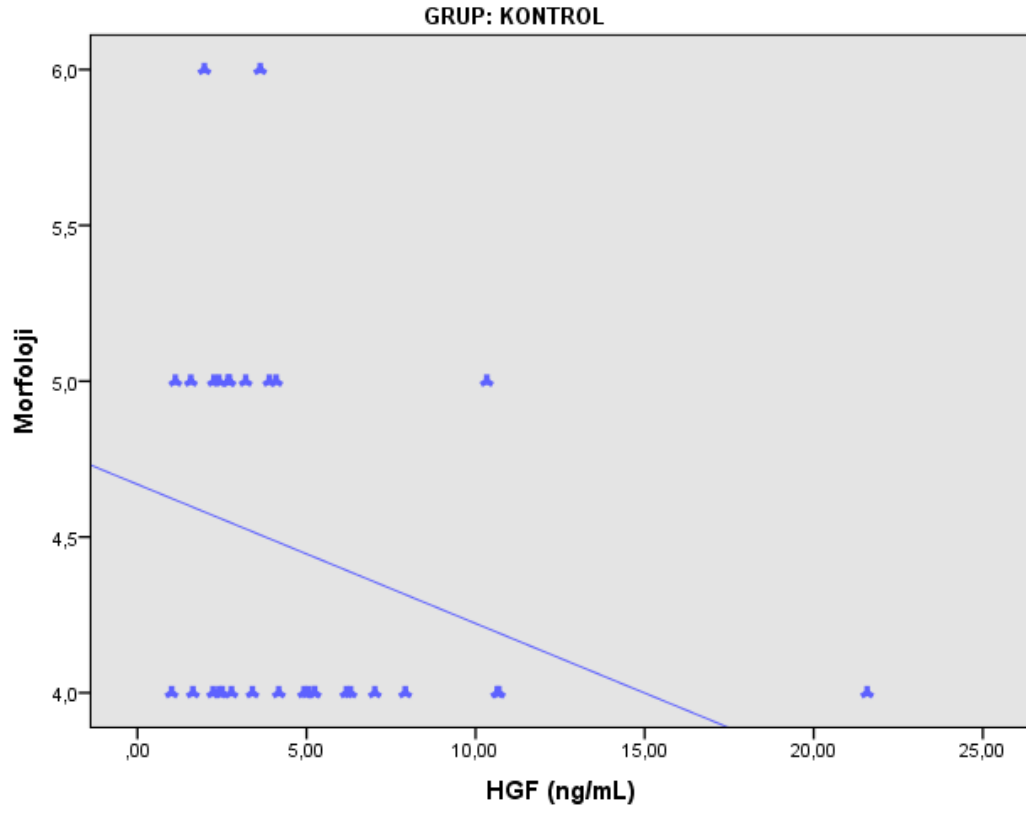
	Sperm Morfoloji Yüzdesi					
	Toplam (n=92)		İnfertil (n=61)		Kontrol (n=31)	
	r	p	r	p	r	p
HGF (ng/mL)	0,089	0,397	0,052	0,691	-0,378	0,036*
C-met	-0,441	0,001**	-0,422	0,001**	-0,176	0,342
<i>r=Spearman 'in Korelasyon Katsayısı</i>		<i>*p<0,05</i>		<i>**p<0,01</i>		



Şekil 12: Sperm Morfoloji Yüzdesi ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı



Şekil 13: Sperm Morfoloji Yüzdesi ile C-met Ekspresyon Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı



Şekil 14: Sperm Morfoloji Yüzdesi ile HGF Düzeyi Arasındaki İlişkinin Dağılımı

5. TARTIŞMA

Reprodüktif dönemle birlikte hem kadın hem erkekte meydana gelen değişiklikler hipotalamo-hipofizo-gonadal aksın dengeli ve yeterli çalışması ile gerçekleşebilmektedir. Bu sayede üreme devamlılığı ve genetik özelliklerin nesillere aktarımı sağlanmaktadır. Fertilizasyonla başlayan süreç, insan hayatı boyunca farklılaşmanın devam etmesiyle süregelmektedir. Fertilizasyon öncesi veya sonrasında meydana gelen birtakım aksaklıklar sonucunda infertilite problemi ile karşılaşmaktadır. İnfertilite, tanım olarak düzenli sıklıkla yapılan cinsel ilişkiye rağmen birinci yılın sonunda gebelik elde edilememesidir (1). Bu durum, reprodüktif çağıdaki çiftlerin %10-15'ini etkilemektedir (2). Batı toplumlarındaki sanayileşme, sosyokültürel veya tıbbi nedenler, mesleki kariyer veya eğitim için çocuk sahibi olmanın ertelenmesi, boşanmaların artması, kontrasepsiyon yöntemlerinin daha gelişmiş olması ve yaygın kullanımı infertilite oranlarında artışa neden olmaktadır. İnfertilitenin sık görülen nedenleri arasında kadınlara bağlı ovulatuvar disfonksiyon, tuboperitoneal patolojiler, uterin faktörler mevcut olup, erkeğe bağlı nedenlerde ise sperm sayısı, motilite ve morfolojisinde yetersizlikler sayılabilmektedir (10,11).

Erkek infertilitesi, tüm infertilite nedenleri içinde yaklaşık %25-30'luk bölümü oluşturur (8). Erkek infertilitesi ile ilgili pek çok neden olmasına rağmen sperm sayısı, motilite ve morfolojisindeki değişiklikler ön plana çıkmaktadır. Bu sebeple de 1980 yılında WHO insan semeni değerlendirilmesi ile ilgili kitabı yayınlamıştır. Bu kitap üç kez güncellenmiş ve 30 yıl içinde dünya çapında tanınıp kabul görmüştür. Bu başarıya rağmen, yeni bilgilerin ışığında revizyon gereksinimleri doğmuş ve en son 2010 yılında güncelleme yapılmıştır. Bu edisyonda dikkat çeken güncellemeler spermatozoa dondurulması bölümünün ilave edilmesi, ejakülat başına total sperm sayısının, testiküler fonksiyonları göstermede sperm konsantrasyonundan daha iyi bir gösterge olduğudur. Ayrıca semen analizinde değerlendirilen parametrelerin referans değerlerinde değişiklikler yapılmıştır. Erkek infertilitesinin önemli parametrelerden biri olan sperm motilitesinin değerlendirilmesinde a, b,c,d kategorizasyonu yerine progresif motil, nonprogresif motil, immotil kategorileri kabul edilmiştir (19).

Spermin motilitesini ve fertilité kapasitesini kazanması, epididimden geçişi sırasında gerçekleşir (77,78). Epididim başından alınan spermlerin ovumu fertilize edemeyip, epididim kuyruk kısmından alınan spermlerin ovumu fertilize edebildiği bilinmektedir (13). Bu motilitenin kazanılmasında pek çok faktör etkili olmaktadır. Bu faktörler arasında insan vücudunun birçok başka bölümünde ve fonksiyonunda olduğu gibi büyüme faktörleri ailesinin üyesi endokrin ve parakrin faktörler öne çıkmaktadır. Büyüme faktörleri gerek dokular arası gerekse de komşu hücreler arasında iletişimi sağlayan ve hücre proliferasyonunun ve çoğalmasının kontrol altında olmasını sağlayan aracı proteinlerdir. Günümüzde onkolojiden fizyolojiye birçok tıp disiplininde büyüme faktörleri gittikçe artan önem kazanmakta, VEGF ve EGF gibi aile üyeleri üzerinden tedavide de kullanıma girmiş bulunmaktadır (67). Bu peptidler otokrin, endokrin ve parakrin yollarla hücre üstünde etkili olmaktadır. HGF, spermatogenik epitelde olduğu gibi, hareket edebilen pek çok sistemin fonksiyonunun düzenlenmesinde işlev sahibidir. HGF, hepatositler için potent mitojen olduğu bilinen, ayrıca hedef hücrelerde bağlantı sağlayan bir ‘skatter faktör’ olduğu anlaşılmış bir pleiotropik sitokindir (35-38). Tirozin kinaz aktivitesi bulunan reseptörü c-met’e yüksek afiniteyle bağlanır ve sadece mezenkimal hücreler tarafından eksprese edilir. Erkek reproduktif sisteminde ise seminifer tübül, epididim, duktus deferens, prostat ve seminal veziküller epiteli gibi organlarda eksprese edilmektedir.

C-met, normalde epitelyal orijinli hücrelerden eksprese edilir (47). Puberte ile birlikte değişen endokrin sinyaller üretir ve FSH etkisiyle Sertoli hücrelerinden eksprese edilir. HGF, organizma üzerindeki endokrin etki ile de hem fetal hem erişkin Leydig hücrelerinde testosteron sekresyonunu artırır (84). HGF, testiküler fonksiyonları desteklemede hem parakrin hem de otokrin bir modülatör olarak etki eder. HGF; reseptörü c-met’e bağlandığı zaman, β zincirinin tirozin kinazı aktive etmesiyle otofosforilasyon gerçekleşir ve HGF stimülasyonu üzerinden, reseptör sinyalinin hücre içine iletilimi başlatılır. HGF ile c-met arasındaki bu iletişim, embryogenezden tümöral gelişime kadar birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynamaktadır. Bu büyüme faktörü-reseptör ilişkisinin mezenkimal hücreler ve onların komşuluğundaki epitelyal hücreler arasında kontrolü sağlayan bir sistem olduğu belirtilmiştir. Bu sistemin motogenez, morfogenez, mitogenez, tubulogenez, embryogenez, angiogenez, proliferasyon, diferensiasyon, doku onarımı, tümör oluşumu ve gelişimi için multiple biyolojik yanıtın tetiklenmesinde son derece önemli bir işlevi olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (44,51,52).

Spermatogenezin kontrolü ve sperm kalitesi üzerindeki rolünü ya direkt sperm germ hücrelerine ya da testisteki tübüler ve interstisyel somatik hücrelere etki ederek göstermektedir. HGF, sperm motilitesini indükleyen bir büyüme faktörüdür (79). HGF'nin spermatozoa üzerindeki etkisi epididimden geçiş sırasında artar ve bu direkt olarak yüksek reseptör ekspresyonu ile koreledir (68).

Matsumoto ve ark. nın yaptığı HGF/c-met sisteminin fare organogenezi sırasındaki ekspresyonunu gösteren çalışma ile hem embriyonik morfogenezde mezenkimal ve epitelyal hücreler arasındaki sinyal değişimine, hem de postnatal stroma-parankim iletişimi ve doku homeostasisine aracılık ettiği gösterilmiştir (74).

Depuydt ve ark. tarafından yapılan çalışmada HGF'nin insan seminal plazmasında da önemli miktarda bulunduğu saptanmıştır. HGF'nin vazektomili erkeklerde de saptanmış olması, HGF'nin testis orijinli olmadığına katkıda bulunmuştur. HGF'nin insandaki ana kaynağı epididim, prostat ve seminal veziküldür (75,76).

HGF'nin erkek fertilitesindeki rolü, Catizone ve ark. nın çalışmasında kaput epididimden izole edilmiş spermatozoaların yalnız medyumlu kültür ve HGF ile desteklenmiş kültürde motilitelerinin değerlendirilmesi ile incelenmiştir. HGF yokluğunda motilitenin önemli ölçüde azaldığı, HGF varlığında ise spermin motilitesini uzun süre muhafaza edebildiği görülmüş, invitro ortamda HGF/c-met anahtar-kilit sistemi sayesinde spermin epididimden geçişi sırasında sperm motilitesini muhafaza etmede pozitif rolü olduğu görülmüştür (81).

HGF düzeyi ile sperm motilitesi arasında olumlu bir ilişki saptanamayan çalışmalar da mevcuttur. Kitamura ve ark. nın çalışmasında infertil olguların yıkanmış spermatozoalarına rekombinant HGF ilave edilmiş ve sperm hareketleri ile ölçülmüş, seminal plazmadaki HGF konsantrasyonu ölçülmüş, veriler olguların hormon profili ve semen analizi parametreleri ile karşılaştırılmıştır. Rekombinant HGF'nin, spermatozoada hiperaktivasyona neden olacak spermin lineer hareketine veya hareket frekansına etkisi olmamıştır. Seminal plazmadaki HGF konsantrasyonu ile olguların herhangi bir klinik parametresi arasında korelasyon izlenmemiştir (82).

Wiltshire ve ark. nın çalışmasında da normozoospermik, subfertil ve azospermik olarak 3 gruba ayrılan hastalarda HGF ve semen analizi parametreleri değerlendirilmiş,

semendeki HGF konsantrasyonu ile sperm konsantrasyonu, sperm motilite yüzdesi, total sperm sayısı veya total motil sperm sayısı arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Ayrıca gruplar arasında da HGF düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmamıştır (78).

Catizone ve ark. nın prepubertal deney farelerinde yaptıkları çalışmada, fare spermatogoniası, pakiten spermasiti ve yuvarlak spermatidinde bulunan c-met'in, HGF ile birlikte germ hücre proliferasyon aktivitesini artırdığı ve apoptotik hücre sayısını azaltarak erkek germ hücresi homeostasisi ve dolayısıyla erkek fertilitesi üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (81).

Depuydt ve ark. nın 1996 yılındaki çalışmasında, c-met ekspresyonunun seminifer tübül ve spermatozoada gerçekleşmesi ve c-met'in %90'lık Perkol fraksiyonunda, %47'lik Perkol fraksiyonuna göre daha az eksprese edilmesi, HGF ve c-met'in spermatozoanın formasyon ve maturasyonunda rolü olduğunu, HGF ve c-met'in spermatogenez sırasında farklılaşma ve migrasyonda görevli olduğunu düşündürmektedir (83).

Depuydt ve ark. nın 1998 yılındaki çalışmasında HGF'nin seminal plazma konsantrasyonundaki değişikliklerinin, farklı androlojik hastalıklar ve erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir, ama aslında bu vakalarda literatürde çelişkili veriler rapor edilmiştir (78,82). Bu literatürün tartışmalı olması, androlojik hastalıkların klasifikasyonunun zorluklarıyla ilgili olup, bu çalışma için farklı çalışma gruplarının oluşturulması gerekmektedir (75).

Ricci ve ark. nın 2006 ve 2012 yıllarında yaptıkları çalışmalarda, testiküler organ kültürlerinde HGF'nin, testosteron üretimini (84), fetal Leydig hücre sağkalımını stimüle edebildiği gösterilmiştir (85). C-met, erken prenatal dönemde fetal Leydig hücrelerinde saptanamazken, seminifer kordlarda eksprese edilebilmektedir. Böylece HGF erken prenatal döneme ait testiküler organ kültüründe testosteron sekresyonunun değiştiremezken, geç prenatal dönemde testosteron üretimini stimüle etmektedir ve normal prenatal steroidogenezde sorumlu olan büyüme faktörlerinden birisidir (85-87).

Zachow ve Üzümcü (91), erkek ve dişi gonad fizyolojisinde HGF'nin bazı endokrin sinyalleri olduğunu öne sürmüştür. HGF'nin direkt olarak CYP19 enzimini azaltarak FSH bağımlı 17 β estradiol üretimini suprese edip ovaryan steroidogenezi downregüle ettiği bildirilmiştir (94-95). HGF'nin *invivo* ortamda Sertoli hücrelerinden 17 β estradiol

üretimini, lokal olarak kontrol edebileceği varsayılmaktadır. FSH'nin Sertoli hücre kültüründe c-met ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmekte ve HGF/c-met sisteminin, FSH bağımlı östrojen üretimine katkısı olabileceği öne sürülmektedir (97).

Catizone ve ark., c-met'in hem insan hem sıçan germ hücrelerinde eksprese edildiğini, sıçanlarda, bu reseptörün spermatogenetik süreç sırasında spermatogoniadan spermatozoaya kadar her zaman mevcut olduğunu bildirmiş (81,83,97), HGF'nin, 8-30 günlük sıçan testislerinin ex vivo organ kültüründe spermatogonial hücre proliferasyonunu artırarak germ hücre mitotik aktivitesini kontrol ettiği gösterilmiştir. Spermatogonia hücreleri üzerine elde edilen bu sonuç, HGF aktivatör inhibitör (HAI-2)'ün sadece primer spermatositlerde eksprese edildiğini vurgulamaktadır (98). Mitotik germ hücreleri, HGF sinyaline ihtiyaç duyarken, mayotik sürecin başında, germ hücrelerinin sırayla mayotik girişine izin vermek için, inhibe edilmeye ihtiyaç duymaktadır.

Goda ve ark. tarafından çalışılan deneysel kriptorşid sıçan modellerinin testisine yapılan adenovirüs aracılı HGF gen transferi, HGF'nin overekspresyonunu uyarılmış, spermatogenezi ve testiküler ağırlığı düzenleyerek apoptotik germ hücre sayısını anlamlı olarak azaltmıştır (100). Böylece HGF'nin erkek germ hücreleri homeostazisini desteklemek için endokrin sinyallerle işbirliği yaptığı, germ hücre apoptozunu azalttığı ve erkek germ hücrelerinde sağkalım faktörü olarak rol oynadığı görülmüştür (102-106).

Naz ve ark., spermin motilitesini kazandığı yer olan fare epididimal traktındaki distal korpus ve kaudada HGF'nin en yüksek spesifik alan dağılım paterni olduğunu göstermiştir. HGF'nin immotil spermlerdeki hücre motilitesini hafifçe indüklediği bulunmuş, HGF'nin invitro olarak epididimal sperm motilitesinin korunmasında pozitif etkisi olmasına rağmen, aslında motil sperm yüzdesini artırmada anlamlı etkisi olmadığı saptanmıştır (102,103). Ancak, kemirgenlerde bildirilen aynı motojenik etkinin insan spermelerinde olmaması (105), bu büyüme faktörünün insan sperm fizyolojisindeki rolünü hala tartışmalı bir konu haline getirmektedir.

Çalışmamızda infertil ve sağlıklı erkeklerin semen analizleri yapılarak bazal sperm sayısı, sperm morfoloji yüzdesi ve sperm motilite yüzdesi parametreleri değerlendirilmiş, bu parametrelerin HGF düzeyi ve c-met ekspresyon düzeyi ile ilişkisi araştırılmıştır.

Gruplar oluşturulurken WHO 2010 Semen Analiz Parametreleri'nden sperm konsantrasyonu, sperm motilite yüzdesi ve sperm morfoloji yüzdesi dikkate alınmıştır. Bu parametrelerden herhangi birinde referans aralığı altında kalan erkekler çalışma grubuna dahil edilmiştir. Kontrol grubuna ise bazal sperm konsantrasyonu ≥ 15 milyon/ml, sperm motilite yüzdesi $\geq 40\%$, sperm morfoloji yüzdesi $\geq 4\%$ parametrelerinin hepsini sağlayan erkekler seçilmiştir.

Kontrol grubu ve çalışma grubunda önceden seçilmiş parametrelerin karşılaştırıldığı *Mann Whitney U Test* ile yapılan değerlendirmede; sperm konsantrasyonu ve sperm morfoloji yüzdesi daha yüksek olup, kontrol grubu ve çalışma grubu arasında anlamlı fark izlenmiştir. Kontrol grubunda sperm motilite yüzdesi çalışma grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen, anlamlı fark izlenmemiştir. Bunda, çalışma grubu oluşturulurken semen analizi parametrelerinden sadece birinin referans aralığı altında kalmasının yeterli bir kriter olarak alınması etkili olmuştur.

Çalışma grubunda c-met ekspresyon düzeyi, kontrol grubuna göre daha yüksek saptanmış olup, istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir. Çalışma grubunda izlenen düşük HGF düzeyinde, c-met ekspresyon düzeyinin artması, düşük HGF'ye yanıt olarak reseptör c-met'in upregüle olduğunu ve artan c-met ekspresyonu ile birlikte HGF/c-met anahtar-kilit sistemini oluşturarak hücreiçi sinyal iletimini artırmaya çalıştığını desteklemektedir.

Kontrol grubunda HGF düzeyi, çalışma grubuna göre daha yüksek saptanmış ve istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmiştir. Kontrol grubunda yüksek HGF değerlerinde, yeterli ligand varlığı söz konusu olduğu için, uygun ölçüde HGF/c-met kompleksi oluşturulabilmekte, hücre içi sinyal sistemi layıkıyla yerine getirilebilmektedir. Bu durum anlamlı fark bulunmamış olsa da kontrol grubunda çalışma grubuna kıyasla izlenen HGF düzeyi yüksekliği ile sperm motilite yüzdesi yüksekliğinin de paralellik gösterdiğini destekler. Bu yüzden HGF yükseldiği zaman, reseptörünün artışı önlemekte, reseptör downregülasyonu ile c-met ekspresyonunu azaltmaktadır ya da fizyolojik düzeyinde kalmaktadır.

Tüm olguların tek tek ele alınıp birbiri ile karşılaştırıldığı *Spearman'in Korelasyon Katsayısı analizinde* c-met ekspresyon düzeyi ve HGF değerleri arasında tüm olgularda, çalışma grubunda ve kontrol grubunda anlamlı fark saptanmamıştır.

Tüm olgularda ve çalışma grubunda sperm motilite yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyleri arasında, sperm motilite yüzdesi arttıkça c-met ekspresyon düzeyinde de artışı gösterecek şekilde pozitif korelasyon izlenmiştir. Bu durum c-met ekspresyonunun sperm motilitesi üzerine pozitif etki gösterdiğini desteklemektedir. Tüm parametrelerin WHO 2010 Semen Analizi referans aralıklarını karşıladığı kontrol grubunda ise sperm motilite yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyi arasında korelasyon izlenmedi. Sağlıklı spermatozoa varlığında, seminal plazma ile uyum içinde sperm maturasyonu ve diferensiasyonu sağlandığından, yeterli sperm motilitesi mevcut olduğunda c-met ekspresyonunda artışa ihtiyaç olmadığı gösterilmiştir.

Tüm olgularda ve çalışma grubunda sperm morfoloji yüzdesi ile c-met ekspresyon düzeyleri arasında sperm morfoloji yüzdesi arttıkça c-met ekspresyon düzeyinde azalma ile karşımıza çıkan negatif korelasyon gözlenmiştir. Sperm morfolojisi iyileştikçe ya da başka bir deyişle kaliteli ve fertil aralıkta oldukça hücre içi sinyal iletimini artırma gereksinimi ortadan kalkarak, c-met ekspresyonunun azaldığı düşünülmektedir.

Tüm olgularda sperm konsantrasyonu ile c-met ekspresyon düzeyleri arasında sperm sayısı arttıkça c-met ekspresyon düzeyinde azalmanın gösterildiği negatif korelasyon izlenmiştir. Yeterli sperm konsantrasyonu varlığında, spermin uyarılarak aktivasyonunun artırılması için c-met ekspresyonunda artışa ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu da epididim fonksiyonlarını da değerlendirme sırasında düşünme gerekliliğini ortaya koymaktadır. Zira HGF salınımı ve buna karşılık fonksiyonları optimize edecek c-met regülasyonunun bu bölgede gerçekleşiyor olması nedeniyle sperm kalitesi kriterlerinin bir “ana kontrol” altında düzeltilmeye çalışılmasının da olası olduğunu göstermektedir.

İnfertilite sebebinin sperm motilite yüzdesi dışındaki parametrelerden biri olması durumunda (örneğin sperm konsantrasyonun azalması veya sperm morfoloji yüzdesinin azalması), reseptör c-met’in, bu durumu kompanse etmek adına upregüle olması birçok başka dokuda gösterilen özellikle onkolojik materyallerde rastlanan anahtar-kilit organizasyonunu epididimden başlayarak spermin ömrü boyunca kontrolü elinde tuttuğunu düşündürmektedir. Yani sperm motilite yüzdesi dışındaki faktörler kötüye gittikçe, c-met reseptörü hücre içi sinyal iletimini artırabilmek, spermin hayati ve işlevsel kriterlerini düzeltmek ve sonuç olan fertilizasyonu sağlayabilmek için overeksprese olmaktadır. Erkek infertilitesi sebebinin sadece sperm motilite yüzdesinin azlığı düşünülen sadece

astenospermik olguların dahil edildiği bir çalışma grubu oluşturularak c-met ekspresyon düzeyleri ve HGF değerleri incelenirse, sperm konsantrasyonu ve sperm morfoloji yüzdesi gibi diğer Semen Analiz Parametreleri'nin c-met ve HGF ile olan ilişkisine dair daha net yorum yapılabilmesi mümkün olacaktır. Bu çalışmayı gerçekleştiren ekibin sonraki planlaması bu astenospermik çalışması grubunda bu değerlendirmeyi yapmak ve rekombinant HGF ile etkileşimi izlemek olacaktır.

6. SONUÇ

C-met ekspresyon düzeyi ve HGF değerlerinin semen analizi parametreleriyle karşılaştırıldığı bu çalışmada kontrol grubunda yüksek motiliteyi destekler şekilde HGF düzeyleri yüksek izlendi. Böylece HGF'nin sağlıklı erkeklerde, ejakulatın epididimden geçişi sırasında sperm motilitesine katkı sağlamak için yüksek değerlerde olduğu, dolayısıyla c-met upregülasyonuna gerek bırakmayacak şekilde HGF tarafından yeterli uyarımın sağlandığını ortaya koymaktadır.

Çalışma grubunda ise c-met düzeylerinin daha yüksek saptanması, düşük HGF'ye yanıt olarak spermi stimüle etmek adına c-met'in overeksprese olduğunu, bu da hücrenin HGF'nin motilite başta olmak üzere fonksiyonlarının yetersiz olduğu durumda reseptör upregülasyonunu sağlayarak fonksiyonlarındaki defekti gidermeye çalıştığı yönündeki çabasını göstermektedir.

Sperm motilitesi arttıkça c-met ekspresyonunda artış izlenmesi de bundan önce yapılan yayınları doğrular nitelikte c-met'in sperm motilitesi ile ilişkisini ortaya koymaktadır. HGF ile c-met arasındaki ligand reseptör ilişkisinin sağlıklı erkekteki normal değeri gibi bir normogram değerine sahip olmadığımız ve de bu ilişki tüm spermatogenez sırasında bile değişken olduğu için bu ikiliyi bir bütün halinde düşünmek daha yararlı olacaktır.

Sperm konsantrasyonu ve sperm morfoloji yüzdesi artışı ile c-met ekspresyon düzeyi arasında negatif korelasyon izlenmesi de sperm motilitesi dışındaki parametrelerin infertiliteye yol açtığı durumlarda c-met'in upregüle olarak hücre içi sinyal iletimini arttırmaya ve HGF ligandıyla c-met arasındaki ilişki sonrası hücre içinde aktive edilmeye ve/veya arttırılmaya çalışılan proseslerin yardımıyla aktivitenin düzenlenmeye çalışıldığını düşündürmektedir.

Reseptör c-met ve ligandı HGF, erkek spermatogenez ve fertilizasyon kapasitesinde temel düzenleyicilerden birisi olarak gözükmektedir. Erkek infertilitesi içinse gerek etiyolojinin belirlenmesi, gerekse patogeneizde değerli bir parametredir. Sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfolojisi ile ilişkisi ve kompensasyon mekanizmaları daha iyi aydınlatılırsa erkek infertilitesi tedavisinde de terapötik yararının olması mümkündür.

KAYNAKLAR

1. Speroff L, Marc AF. Clinical Gynecological Endocrinology and Infertility Seventh Edition, LWW. 2008:1114-1133.
2. Abma JC, Chandra A, Mosher WD, Peterson LS, Piccinino LJ. Fertility, Family Planning and Women's Health: new data from the 1995 National Survey of Family Growth. Vital Health Stat. 1997;23:1-114.
3. Bolvin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. Hum Reprod. 2007;22(6):1506-12.
4. Howards SS. Treatment of Male Infertility, New England J Med. 1995;332:312-17.
5. Yakın K, Urman B: Kadın İnfertilitesi. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Güneş Tıp Kitabevleri 2014;31:351.
6. Speroff L, Fritz M.A. Kadın İnfertilitesi. Editörler, Demirtürk F, Çalışkan AC. Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite. Güneş Kitabevi 2007;27:1025.
7. Turek PJ. Male Infertility. Smith' s General Urology, Tanagho EA. Mc Aninch JW. Appleton Lange. 2000;750-87.
8. Bhattacharya S1, Porter M, Amalraj E, Templeton A, Hamilton M, Lee AJ, Kurinczuk JJ. The epidemiology of infertility in the North East of Scotland. Hum Reprod. 2009;24(12):3096-107.
9. Cates W et al. Worldwide patterns of infertility: is Africa different? Lancet 1985. 2(8455):596-8.
10. Boyraz G, Selçuk İ, Gürkan T, İnfertil çiftin değerlendirilmesi. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Güneş Tıp Kitabevleri 2014;30:346-347.

11. Brugh VM, Lipshultz L. Male factor infertility: evaluation and management. Med Clin North Am. 2004;88(2):367-85.
12. Junqueira L C, Carneiro J. Temel Histoloji. Erkek Üreme Sistemi Editörleri: Aytekin Y, Solakoğlu S. Nobel Tıp Kitabevi 2006:431-447.
13. Bostofte E, Bagger P, Michael A. Fertility prognosis for infertile men: results of follow up study of semen analysis in infertile men from two different populations evaluated by the cox regression model. Fertil Steril 1990;54(6):1100-6.
14. Johnson L, Petty CS, Neaves WB. Further quantification of human spermatogenesis: germ cell loss during postprophase of meiosis and its relationship to daily sperm production Biol Reprod. 1983;29(1):207-15.
15. Günalp S: Erkek İnfertilitesi. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Güneş Tıp Kitabevleri, 2014;32:359-379.
16. Patrick C. Campbell' s Urology, 8th ed. Saunders Company, Philadelphia, 2002.
17. de Kretser DM. Male infertility. Lancet. 1997;15;349(9054):787-90.
18. Doğan E. İnfertil çiftin araştırılmasında tanısal yöntemler. Üreme Endokrinolojisi Teknikleri ve Cerrahisi. Üreme Tıbbı Derneği Kitabı 2011;362-363.
19. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm –Cervikal Mucus İnteraction. 5th ed. Cambridge: Cambridge Uni. press;2010.
20. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. 24. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update. 2010;16(3):231-45.
21. Gökçe A. Standard Semen Analysis Criteria of World Health Organization, Turk Urol Sem 2011;2:1-7.

22. World health organization department of reproductive health and research. World health organization laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed, World health organization, Geneva, Switzerland, 2010.
23. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod. 1990;5(5):586-92.
24. Bohring C, Krause W. Immune infertility: towards a better understanding of sperm (auto)-immunity. The value of proteomic analysis. Hum Reprod. 2003;18(5):915-24.
25. Consensus workshop on advanced diagnostic andrology technique ESHRE, Hum Reprod 1996;11(7):1463/79.
26. Davis RO, Katz DF. Computer aided-sperm analysis:technology at a crossroad. Fertil Steril 1993;59(5):953.
27. Liu DY, Baker HW. Tests of human sperm function and fertilization invitro Fertil Steril 1992;58(3):465.
28. Kathiravan P, Kalatharan J, Edwin MJ, Veerapandian C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. Anim Reprod Sci. 2008;1;104(1):9-17.
29. Oehninger S, Coldington CC, Scott R, et al. Hemizona Assay: Assessment of sperm dysfunction and prediction of invitro fertilization outcome Fertil Steril 1989;51(4):665
30. Larson KL, de Jonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques Hum Reprod 2000;15(8):1717.
31. Bhasin S, Ma K, de Kretser DM. Y-chromosome microdeletions and male infertility Ann Med 1997;29(4):261.
32. Sigman M, Jarow JP. Erkek İnfertilitesi. Campbell. Üroloji.In: Walsh P. 8th ed. Saunders Comp. Güneş Kitabevi. 2005:1492.

- 33.** Biochemical analysis of the sperm and infertility Dieudonne O, Godin PA, van-Langendonck A, Jamart J, Galanti L, Clin Chem Lab Med 2001;39(5):455-7.
- 34.** Saez, JM, Avallet O, Lejeune H, Chatelain PG. Cell-cell communication in the testis. Horm. Res. 1991;36:104-115.
- 35.** Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. Biochem Biophys Res Commun 1984;122:1450-9.
- 36.** Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. Nature 1989;342:440-3.
- 37.** Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast- derived modulator of epithelial cell mobility. Nature 1987;327:239-42.
- 38.** Weidner KM, Hartmann G, Sachs M, Birchmeier W. Properties and functions of scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor c-Met. Am J Respir Cell Mol Biol 1993;8:229-37.
- 39.** Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. Biochem Biophys Res Commun 1989;163:967-73.
- 40.** Godha E, Tsubouchi H, Nakayama H, Hirono S, Sakiyama O, Takahashi K, Miyazaki H, Hashimoto S, Daikuhara Y. Purification and partial characterisation of hepatocyte growth factor from plasma from a patient with hepatic failure. J. Clin. Invest., 1988;81:414-419.
- 41.** Zamegar R, Michalopoulos G. Purification and biological characterization of human hepatopoietin A, a polypeptide growth factor for hepatocytes. Cancer Res 1989;49:3314-3320.

42. Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura A, Kondo J, Morimoto Y, Kitamura N. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine pro- tease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural simi- larity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J Biol Chem* 1993;268:10024-8.
43. Kawaguchi T, Qin L, Shimomura T, Kondo J, Matsumoto K, Denda K, et al. Purification and cloning of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor. *J Biol Chem* 1997;272:27558-64.
44. Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2010;86:588–610.
45. Matsumoto K, et al. Hepatocyte Growth Factor: Molecular structure and implications for a central role in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:5:509.
46. Burr AW, et al. Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol* 1998;185:39:298.
47. Hayek A et al. Growth factor/matrix-induced proliferation of human adult beta cells. *Diabetes* 1995;44(12):1458.
48. Takebayashi T, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and protoglycan synthesis of chondrocytes. *J Cell Biol* 1995;129:1411.
49. Toshiro K, Hagiya M, Nishizawa T, Seki, Shimonishi M, Shimizu S, Nakamura T. Primary structure of rat HGF deduced from the complementary DNA and its expression in rat tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990;87:3200-3204.
50. Zanegar R, Muga S, Raija R, Michalopoulos G. Tissue distribution of hepatopoientin A: a heparin binding polypeptide growth factor for hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1990;87:1252-1256.
51. Kim ES, Salgia R. MET pathway as a therapeutic target. *J Thorac Oncol* 2009;4:444-7.
52. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM. MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:834-48.

- 53.** Di Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, Bretti S, Giordano S, Medico E, Gaglia P, Zara P, Comoglio PM. Expression of the met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues. *Oncogene*. 1991;6(11):1997-2003.
- 54.** Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamognone L, Coffer A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol*. 1992;119(3):629-41.
- 55.** Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Pulverini P, Rosen EM. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci*. 1993;1;90(5):1937-41.
- 56.** Anastasi S, Giordano G, Sthandier O, Gambarotta G, Maione R, Comoglio PM, Amati P. A natural hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in myoblast cells and the effect of the constitutive met kinase activation on myogenic differentiation. *J Cell Biol*. 1997;2;137(5):1057-68.
- 57.** Galimi F, Bagnara GP, Bonsi L, Cottone E, Follenzi A, Simeone A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor induces proliferation and differentiation of multipotent and erythroid hemopoietic progenitors. *J Cell Biol*. 1994;127 (6):1743-54.
- 58.** Nisnino T, Hisha H, Nishino N, Adachi M, Ikehara S. Hepatocyte growth factor as a hematopoietic regulator. *Blood*. 1995;1;85(11):3093-100.
- 59.** Ebens A, Brose K, Leonardo ED; Hanson MGJ, Bladt F, Birchmeier C, Barres BA, Tessier-Lavigne M. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. *Neuron*. 1996;17(6):1157-72.
- 60.** Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature* 1984;311:29-33.
- 61.** Chan AM-L, King HWS, Deaking EA, Tempest PR, Hilkens J, Kroezen V, et al. Characterization of the mouse met protooncogene. *Oncogene* 1988;2:593-600.

- 62.** Di Renzo MF, Olivero M, Serini G, Orlandi F, Pilotti S, Belfiore A, et al. Overexpression of the c-met/HGF receptor in human thyroid karsinomas derived from the folllicular epithelium. *J Endocrinol Invest* 1995;18:134-139.
- 63.** Di Renzo MF, Poulson R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR. Expression of the met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1995;55:1129-1138.
- 64.** Furukawa T, Duguid WP, Kobari M, Matsuno S, Tsao MS. Hepatocyte growth factor and met receptor expression in human pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 1995;147:889-895.
- 65.** Maria P, Radha P, Rita M, Pier G, Paolo M: The receptor encoded by the human c-met oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int J Cancer* 1991;49:323-32.
- 66.** Prat M, Narsimhan RP, Crepaldi T, Nicotra MR, Natali PG, Comoglio PM. The receptor encoded by the human c-MET oncogene is expressed in hepatocytes, epithelial cells and solid tumors. *Int J Cancer*. 1991;30;49(3):323-8.
- 67.** Ciamporzero E, Miles KM, Adelaiye R, Ramakrishnan S, Shen L, Ku S et al. Combination strategy targeting VEGF and HGF/c-met in human renal cell carcinoma models. *Mol Cancer Ther*. 2015 Jan;14(1):101-10.
- 68.** Tsarfaty I, Rong S, Resau JH, Rulong S, da Silva PP, Vande Woude GF. The Met proto-oncogene; mesenchymal to epithelial cell conversion. *Science* 1994(7)263:98-101.
- 69.** Tsarfaty I, Resau JH, Rulong S, Keydar I, Faletto DL, Vande Woude GF. The c-met proto-oncogene receptor and lumen formation. *Science* 1992;(5074)257:1258-61.
- 70.** Rosen EM, et al. Scatter factor modulates the metastatic phenotype of the EMT6 mouse mammary tumor. *Int J Cancer* 1994;1;57:706-14.
- 71.** Maina F, Casagrande F, Audero E, Simeone A, Comoglio PM, Klein R, et al. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 1996;87:531-42.

- 72.** Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, Aguzzi A, Birchmeier C. Essential role for the c met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 1995;376:768-71.
- 73.** Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995;373:699-702.
- 74.** Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem* 1996;119:591-600.
- 75.** Depuydt CE, De Potter CR, Zalata A, Baekelandt E, Bosmans E, Comhaire FH. Levels of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) in seminal plasma of patients with andrological diseases. *J Androl.* 1998;19(2):175-82.
- 76.** Catizone A, Ricci G, Arista V, Innocenzi A, Galdieri M. Hepatocyte growth factor and c-MET are expressed in rat prepuberal testis. *Endocrinology.* 1999;140(7):3106-13.
- 77.** Depuydt CE, Zalata A, Falmagne JB, Bosmans E, Comhaire FH. Purification and characterization of hepatocyte growth factor (HGF) from human seminal plasma. *Int J Androl.* 1997;20(5):306-14.
- 78.** Wiltshire EJ, Flaherty SP, Couper RT. Hepatocyte growth factor in human semen and its association with semen parameters. *Hum Reprod.* 2000;15(7):1525-8.
- 79.** Naz RK, Joseph A, Lee Y, Ahmad K, Bhargava MM. Expression of scatter factor/hepatocyte growth factor is regionally correlated with the initiation of sperm motility in murine male genital tract: is scatter factor/hepatocyte growth factor involved in initiation of sperm motility. *Mol Reprod Dev.* 1994;38(4):431-9.
- 80.** Chevrier C, Dacheux JL. Evolution of the flagellar waveform of ram spermatozoa in relation to the degree of epididymal maturation. *Cell Motil Cytoskeleton.* 1992;23(1):8-18.
- 81.** Catizone A, Ricci G, Galdieri M. Functional role of hepatocyte growth factor receptor during sperm maturation. *J Androl.* 2002;23(6):911-8.

- 82.** Kitamura M, Matsumiya K, Nishimura K, Yamanaka M, Matsumoto K, Okuyama A. Effect of hepatocyte growth factor on sperm motility. *Am J Reprod Immunol.* 2000;44(4):193-6.
- 83.** Depuydt CE, Zalata A, de Potter CR, van Emmelo J, Comhaire FH. The receptor encoded by the human C-MET oncogene is expressed in testicular tissue and on human spermatozoa *Mol Hum Reprod.* 1996;2(1):2-8.
- 84.** Ricci G, Catizone A, Galdieri M. Expression and functional role of hepatocyte growth factor and its receptor (c-met) during fetal mouse testis development. *J Endocrinol* 2006;191:559-70.
- 85.** Ricci G, Guglielmo MC, Caruso M, Ferranti F, Canipari R, Galdieri M, et al. Hepatocyte growth factor is a mouse fetal Leydig cell terminal differentiation factor. *Biol Reprod* 2012;87:146.
- 86.** Barsoum IB, Yao HH. Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *J Androl* 2010;31:11-5.
- 87.** El-Gehani F, Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. Evidence that pituitary adeny- late cyclase-activating polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicu- lar steroidogenesis. *Biol Reprod* 2000;63:1482-9.
- 88.** Ekberg S, Luther M, Nakamura T, Jansson JO. Growth hormone promotes early initiation of hepatocyte growth factor gene expression in the liver of hypophy- sectomized rats after partial hepatectomy. *J Endocrinol* 1992;135:59–67.
- 89.** Broten J, Michalopoulos G, Petersen B, Cruise J. Adrenergic stimulation of hepatocyte growth factor expression. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:76–9.
- 90.** Matsumoto K, Okazaki H, Nakamura T. Novel function of prostaglandins as inducers of gene expression of HGF and putative mediators of tissue regener- ation. *J Biochem* 1995;117:458–64.
- 91.** Zachow R, Uzumcu M. The hepatocyte growth factor system as a regula- tor of female and male gonadal function. *J Endocrinol* 2007;195:359–71.

- 92.** Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998;9:411-6.
- 93.** Huleihel M, Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl* 2004;6:259-68.
- 94.** Zachow RJ, Weitsman SR, Magoffin DA. Hepatocyte growth factor regulates ovarian theca-interstitial cell differentiation and androgen production. *Endocrinology* 1997;138:691-7.
- 95.** Zachow RJ, Ramski BE, Lee H. Modulation of estrogen production and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-type 1, cytochrome P450 aromatase, c-met, and protein kinase B α messenger ribonucleic acid content in rat ovarian granulosa cells by hepatocyte growth factor and follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 2000;62:1851-7.
- 96.** Le MB, Jegou B. Paracrine control of immature Sertoli cells by adult germ cells, in the rat (an in vitro study). Cell-cell interactions within the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1988;58:65-72.
- 97.** Catizone A, Ricci G, Galdieri M. HGF and postnatal testis development. *Mol Cell Endocrinol* 2005;241:32-40.
- 98.** Yamauchi M, Itoh H, Naganuma S, Koono M, Hasui Y, Osada Y, et al. Expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2 (HAI-2) in human testis: identification of a distinct transcription start site for the HAI-2 gene in testis. *Biol Chem* 2002;383:1953-7.
- 99.** Catizone A, Ricci G, Del BJ, Galdieri M. Hepatocyte growth factor modulates in vitro survival and proliferation of germ cells during postnatal testis development. *J Endocrinol* 2006;189:137-46.
- 100.** Goda K, Fujisawa M, Shirakawa T, Dobashi M, Shiota G, Zhang ZJ, et al. Adenoviral-mediated HGF expression inhibits germ cell apoptosis in rats with cryptorchidism. *J Gene Med* 2004;6:869-76.
- 101.** Boitani C, Politi MG, Menna T. Spermatogonial cell proliferation in organ culture of immature rat testis. *Biol Reprod* 1993;48:761-7.

- 102.** Parvinen M, Kangasniemi M, Kaipia A, Mali P, Soder O, Pollanen P. Local regulation of seminiferous epithelium: the role of cytokines. *Bull Assoc Anat* 1991;75:163-5.
- 103.** Pollanen P, Soder O, Parvinen M. Interleukin-1 alpha stimulation of spermatogonial proliferation in vivo. *Reprod Fertil Dev* 1989;1:85-7.
- 104.** Boitani C, Stefanini M, Fragale A, Morena AR. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. *Endocrinology* 1995;136:5438-44.
- 105.** Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2004;71:722-31.
- 106.** Puglisi R, Montanari M, Chiarella P, Stefanini M, Boitani C. Regulatory role of BMP2 and BMP7 in spermatogonia and Sertoli cell proliferation in the immature mouse. *Eur J Endocrinol* 2004;151:511-20.