

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PENTOKSİFİLİN VE PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR
UYGULAMA SONRASI SPERMATOZOADA MEYDANA
GELEN ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLERİN
KIYASLANMASI**

Biyolog Yasemin ÖZDEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2014

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**PENTOKSİFİLİN VE PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR
SONRASI SPERMATOZOADA MEYDANA GELEN
ULTRASTRÜKTÜREL DEĞİŞİKLİKLERİN
KIYASLANMASI**

Biyolog Yasemin ÖZDEMİR

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Canan HÜRDAĞ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2014

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezindeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Yasemin ÖZDEMİR



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ.....	5
4.1.1. Testis Histolojisi.....	6
4.1.2. Spermatogenez.....	8
4.1.2.1. Spermatogenezis Evresi.....	9
4.1.2.2. Mayoz Bölünme Evresi.....	9
4.1.2.3. Spermiyogenezis Evresi.....	10
4.1.3. Spermatozoonun Yapısı.....	13
4.1.3.1. Spermatozoon Membranı.....	16
4.1.3.2. Kapasitasyon.....	17
4.1.3.3. Akrozom Reaksiyonu.....	18
4.1.4. Semen Özellikleri.....	20
4.1.4.1. Semen Analizinde Spermatozoonun Mikroskopik İncelenmesi.....	21
4.1.4.2. Spermatozoon Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi.....	23
4.1.4.3. Spermatozoon Malformasyonlarının Tipleri.....	25
4.2. PENTOKSİFİLİN (PF).....	28
4.3. PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR (PAF).....	32
4.4. ERKEK İNFERTİLİTESİ.....	36
4.5. SPERMATOZOON FENOTİPİ PATOLOJİLERİ.....	38
4.5.1. Astenozoospermide Flagellar Patoloji.....	39
4.5.2. Teratozoospermide Spermatozoon Defektleri.....	40
4.5.3. Akrozom Eksikliği ve Akrozomal Hipoplazi.....	40
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
5.1. HASTA GRUPLARI.....	42

5.2. SEMEN TOPLANMASI VE ANALİZİ.....	42
5.3. SPERMATOZOON BOYAMA VE MORFOLOJİ DEĞERLENDİRMESİ.....	43
5.4. PENTOKSİFİLİN (PF) UYGULAMA PROTOKOLÜ.....	43
5.5. PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR (PAF) UYGULAMA PROTOKOLÜ..	44
5.6. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) PROTOKOLÜ.....	44
6. BULGULAR.....	46
6.1. NORMOSPERMİ DENEY GRUBUNUN ELEKTRON MİKROSKOBİK (TEM) BULGULARI.....	46
6.2. PENTOKSİFİLİN (PF) İLE MUAMELE EDİLEN GRUBUN ELEKTRON MİKROSKOBİK (TEM) BULGULARI	50
6.3. PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR (PAF) İLE MUAMELE EDİLEN GRUBUN ELEKTRON MİKROSKOBİK (TEM) BULGULARI.....	57
7. TARTIŞMA.....	65
8. SONUÇ.....	71
9. TEŞEKKÜR.....	73
10. KAYNAKLAR.....	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
Ca⁺²	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
DAG	Diasil gliserol
DFS	Fibröz kılıf displazisi
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dk	Dakika
g	Devir
FSH	Folikül stimüle edici hormon
ICS	İmmotil silya sendromu
ICSI	İntra sitoplazmik spermatozoa enjeksiyonu
IgE	İmmunoglobulin E
IL-1	İnterlökin-1
IL-2	İnterlökin-2
IP3	İnositol trifosfat
IUI	İntra uterin inseminasyon
IVF	İn vitro fertilizasyon
LH	Luteinleştirici hormon
LTB4	Lökotrien B4
M	Molar
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NSFA	Nonspesifik flagellar anomali
PAF	Platelet aktive edici faktör
PAF-ah	PAF asetil hidrolaz
PAS	Proakrozomal granüller
PF	Pentoksifilin
PGE1	Prostaglandin E1

PGE2	Prostoglandin E2
PHSS	Hızlı hareketli spermatozoon sayısı
PLA₂	Fosfolipaz A ₂
PLC	Fosfolipaz C
ROS	Reaktif oksijen türleri
SCI	Spinal cord yaralanması
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
VLS	Vasküler leak sendromu
WHO	Dünya sağlık örgütü
YÜT	Yardımla üreme teknikleri
°C	Santigrat derece
μl	mikro litre
μm	mikro metre
%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük

T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Tarafından 27.11.2013 tarih ve 14-83 numaralı karar ile onaylanmıştır.

T.C İstanbul Bilim Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 28.03.2014 tarih ve 2014-01/02 proje numarasıyla desteklenmesine karar verilmiştir.

Araştırma Projesi No: HE/1832013

1. ÖZET

Günümüzde evli çiftlerde yaklaşık olarak % 10-15 oranında infertilite görülmekte olup etiyolojik nedenler göz önüne alındığında % 40-50 kadarında erkek faktörüne rastlanmaktadır. Erkeğe bağlı infertilite problemi, düşük sayıda spermatozoon üretimi, spermatozoon motilitesinde azalma veya spermatozoon morfolojisinin yetersiz oluşu gibi özelliklerin tek başına veya bir kaçının birlikte görüldüğü durumlarda ortaya çıkar.

İlk in vitro fertilizasyon (IVF) bebeğinin 1978'de doğumundan beri yardımla üreme teknikleri (YÜT)'nin uygulanma endikasyonları ve başarı oranları giderek artmıştır.

Tüp bebek uygulamalarında bilim adamlarının üzerinde durduğu yegane durumlardan biri dölleme oranını arttırabilmektir. Bu yüzden in vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında canlı spermatozoon seçimi önemlidir. Bunun için birçok yöntem ve farklı ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlar içinde yaygın kullanım alanı bulanlar pentoksifilin (PF) ve platelet aktive edici faktör (PAF)'dür.

Yapmış olduğumuz bu çalışma ile in vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında kullanılan bu alternatif ajanların spermatozoon motilitesi ve ince yapısı üzerindeki etkilerini incelemeyi amaçladık.

Bu nedenle çalışmamızda normozoospermik semen örneklerinden elde edilen spermatozoonlara pentoksifilin (PF) ve platelet aktive edici faktör (PAF) ile muamele edildi. Spermatozoonların membran yapısındaki glikokaliks, rutenyum red boyası ile belirginleştirilip örnekler geçirimli elektron mikroskobu (TEM)'nda kıyaslanarak incelendi. Ayrıca herhangi bir ajanla muamele olmamış kontrol grubu oluşturularak, pentoksifilin (PF) ve platelet aktive edici faktör (PAF) uygulanmış gruplarla karşılaştırıldı.

Sonuç olarak; çalışmamızda spermatozoonların pentoksifilin (PF) ve platelet aktive edici faktör (PAF)'e maruz kalmasının spermatozoon baş ve kuyruk yapısındaki olumsuz etkileri gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Pentoksifilin (PF), platelet aktive edici faktör (PAF), spermatozoon, geçirimli elektron mikroskobu (TEM).

2. SUMMARY

Ultrastructural Changes Occured In Spermatozoa After The Application of Pentoxifylline and Platelet-Activating Factor

Nowadays it is known that infertility affects 10-15 % of married couples. When etiologic factors are considered, male factor is responsible for about 40 % of the issues involved with infertility. Male infertility arise due to the low sperm count, decrease in the motility or poor morphology of the semen sample, alone or in combination of more than one of these factors.

Indications and success rates of assisted reproductive techniques (ART) has steadily increased since the birth of the first in vitro fertilization (IVF) baby in 1978.

Since than, the most important issue emphasized by scientists was to increase the fertilization rate. That is why the selection of a viable spermatozoa is very important during in vitro fertilization (IVF) procedures. Different techniques and agents are used for this purpose. Of these agents the most commonly used ones are pentoxifylline (PF) and platelet-activating factors (PAF).

In this study we aimed to examine the effect of these alternative agents on sperm motility and fine morphology. The semen samples obtained from normozoospermic man were treated with pentoxifylline (PF) and platelet-activating factors (PAF). The glycocalyx, which is found in the structure of sperm membrane is marked by ruthenium red staining method and the ultrastructure of stained samples are examined by transmission electron microscopy (TEM). A control group was created with this samples and we also aimed to examine by considering sperm morphology without applying any pentoxifylline (PF) and platelet-activating factor (PAF).

As a result, the application of pentoxifylline (PF) and platelet-activating factor (PAF) had a negative effect on the ultrastructure of the head and flagellum of the spermatozoa.

KEY WORDS: Pentoxifylline (PF), platelet-activating factor (PAF), spermatozoa, infertility, transmission electron microscopy (TEM).

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite nedeniyle değerlendirilen çiftlerin % 40-50'sinin üstünde erkek faktörünün sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (1). Erkeğe bağlı infertilite düşük sayıda spermatozoon üretimi, spermatozoon motilitesinde azalma veya spermatozoon morfolojisinin yetersiz oluşu gibi özelliklerin tek başına veya birkaçının birlikte görüldüğü durumlarda ortaya çıkmaktadır (2).

Morfolojik bozukluk ve motilite problemi olan semen örneklerinde fertilizasyon düşüklüğü ve embriyo kalitesinde yetersizlik görülmektedir. Son yıllarda infertil çiftlerin çocuk sahibi olabilme olasılıkları yardımcı üreme teknikleri (YÜT)'ndeki gelişmelere paralel olarak artmıştır. Özellikle erkek faktörlü infertilite açısından değerlendirildiğinde bu gelişmeler infertilitenin çözülebilir bir sorun olduğunu göstermiştir.

Progressif motilite, spermatozoonun en çarpıcı özelliğidir ve oositi çevreleyen oosit-kumulüs kompleksi hücrelerine nüfuz etmek için gereklidir (3).

Motiliteyi ve fertilizasyonu arttırmaya yönelik kullanılan alternatif ajanlardan biri **pentoksifilin (PF)**'dir. Fosfodiesteraz inhibitörü olan PF, hücre içi siklik adenozin monofosfat (cAMP) düzeyini ve glikolizisi yükselterek endojen adenozin trifosfat (ATP) yapımını arttırmaktadır. Semendeki motil spermatozoonların uygun PF konsantrasyonunda, hiperaktiflik benzeri bir hareketliliğe ulaştıkları, ilerleme hızının flagellum hareketliliğinin ve lateral baş deplasmanının arttığı bilinmektedir. Ayrıca akrozom reaksiyonu yetmezliği saptanan vakalarda da PF uygulanmasının fertilizasyon oranlarını arttırdığı bildirilmiştir (4). PF bunların yanında, serbest radikaller tarafından oluşan peroksitleri ortadan kaldırarak antioksidan etkisi yapar ve spermatozoon plazma membranını korur. PF'nin bu yararlı etkilerini bildiren çalışmaların yanında, embriyo gelişimi üzerinde olumsuz etkileri olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (5).

Motiliteyle ilgili kullanılan diğer bir ajan da **platelet aktive edici faktör (PAF)**'dür. Özellikle motil spermatozoonlar üzerine etki gösteren PAF, spermatozoonda bulunan güçlü bir sinyal fosfolipiddir (6). Motilite kalitesini, kapasitasyonunu, akrozom reaksiyonunu ve fertilizasyon yeteneğini arttırmaktadır (7). Yapılan çalışmalar, PAF sentezinin artışıyla motilite artışıyla birlikte, gelişmiş spermatozoon-oosit etkileşimiyle sonuçlandığını göstermiştir (8). Erkek faktörüne bağlı infertil çiftlerde PAF ile tedavide istatistiksel olarak artış bildirilmiştir. İntra uterin inseminasyon (IUI)'da da spermatozoon yıkama

prosedürüne PAF dahil edilmesi gebelik oranlarını önemli ölçüde arttırmaktadır (9). Bu olumlu etkilerin yanında PAF'a ait olumsuz etkiler de bildirilmiştir ve spermatozoon motilitesi üzerindeki etkileri hala tartışmalıdır (3).

Bu bilgilere dayanarak, PF ve PAF'ın spermatozoon motilitesi ve ince yapısı üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık. Normozoospermik örneklerden alınan spermatozoonlara PF ve PAF uygulandı. Membrandaki glikokaliks yapısını belirginleştiren rutenyum kırmızısı boyası ile boyanarak geçirimli elektron mikroskobu (TEM)'nda spermatozoonların ince yapıları incelendi ve kontrol grubuyla kıyaslandı. Kullanılan ajanlar spermatozoon üzerinde ışık mikroskobu düzeyinde morfolojik bir değişikliğe yol açmadığı için elektron mikroskobu düzeyinde morfolojik bir değişiklik oluyor mu sorusuna cevap vermeyi amaçladık.

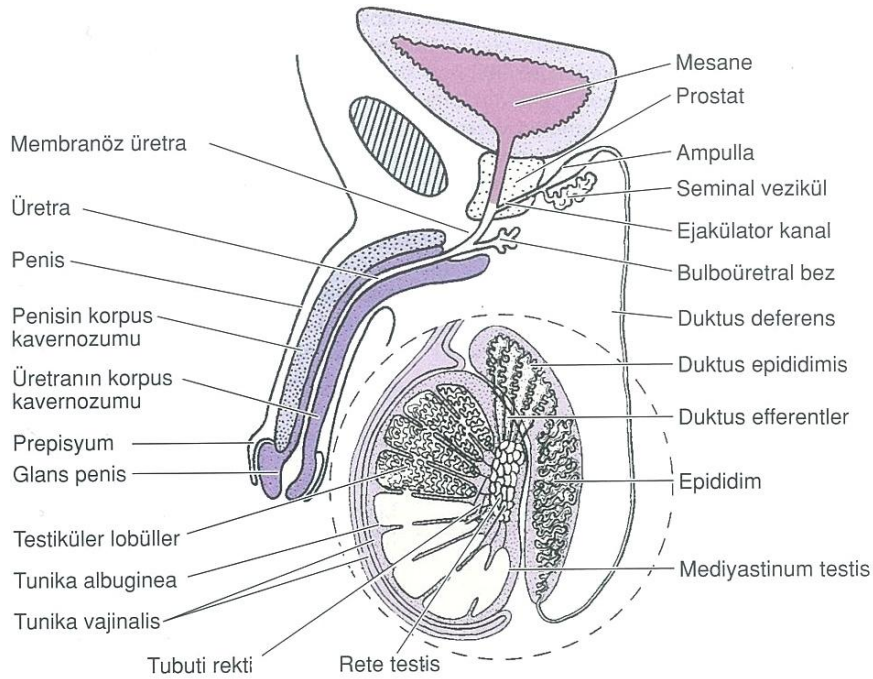
4. GENEL BİLGİLER

4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

Üreme sistemi, canlı türünün devamını sağlamak için özelleşmiş bölümlerden oluşur. Erkek üreme sistemi;

- 1) Testisler
- 2) Genital kanallar
- 3) Aksesuar bezler (Seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretral bezler)
- 4) Penisten oluşan bölümler içerir (10, 11).

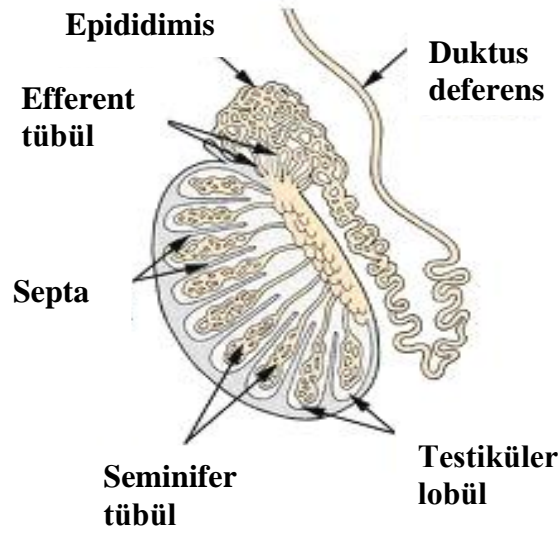
Erkek üreme sistemi; spermatozoon yapımı, erkek seks hormonlarının üretimi ve erkek gamet hücrelerinin dişi üreme sistemine iletilmesi işlevini yerine getirir (12).



Şekil 1. Erkek genital sistemi bölümleri (13)

4.1.1. Testis Histolojisi

Testisler, spermatozoon olarak bilinen erkek gamet üretimi, depolanması ve testosteron salınımından sorumlu olan organlardır (14, 15). Karın boşluğunun dışında skrotum içinde yer alır (16). Normal karın içi sıcaklıkta fonksiyon göstermeyip vücut sıcaklığından 2-3°C kadar daha düşük sıcaklıkta spermatozoon üretirler (14).



Şekil 2. Testis histolojisi (16)

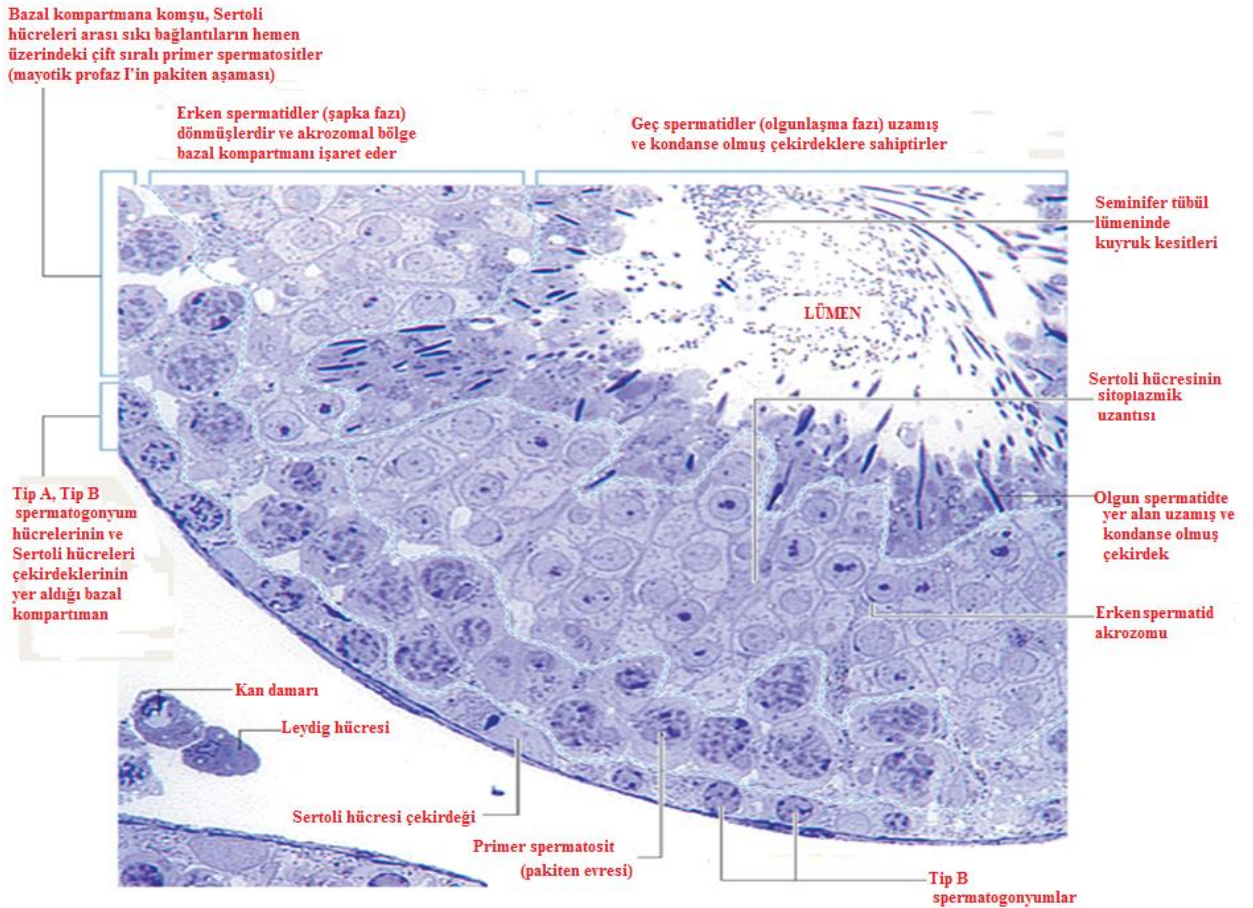
Testis, yoğun bir kapsülle sarılıdır. Bu kapsül düzenli olmayan kollajen yapısındaki bağ dokusundan oluşmuştur ve "tunica albuginea" adını almaktadır. Altında yer alan damardan oldukça zengin gevşek bağ dokusu tunica vaskülozadır ve testisin vasküler kapsülünü oluşturur. Tunica albuginea iç kısımda kalınlaşarak mediastinum testisi meydana getirir. Oluşan bağ dokusu yapısındaki septalar, testis dokusunu bölümlere ayırır. Piramid şeklindeki bu bölümler her bir testis için yaklaşık 250 tanedir ve testiküler lobüller adını alırlar. Lobüller yoğun olarak sinir hücreleri, lenf damarları içeren ve ileri derecede vaskülarize gevşek bağ dokusu ile sarılmış halde bulunan 1-4 adet seminifer tübül içermektedir (14, 17).

Seminifer tübüllerin duvarı birkaç hücre tabakası kalınlığında epitelle döşelidir. Bu epitelin bazal hücreleri, Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlardan oluşmaktadır (12).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları:

- 1- Gelişmekte olan spermatogenetik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek
- 2- Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan rezidüel cisimler olarak adlandırılan fazla hücre kısımlarını fagosite ve elimine etmek
- 3- Olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla (spermiyasyon), seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak
- 4- Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamak olarak sıralanabilir (14).

Seminifer tübülleri çevreleyen bağ doku içinde Leydig hücreleri yer alır (12, 14). Bu hücreler testisin endokrin kısmını oluşturur ve erkek cinsiyet hormonu olan testosteron üretirler (12, 17).



Şekil 3. Seminifer epitelde hücre dağılımı

4.1.2. Spermatogenez

İnsan vücudundaki en karışık hücresele farklılaşma olaylarından biri olan spermatogenez, spermatogonyumdan olgun spermiumun geliştiği bir süreçtir ve hipofizden salgılanan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH)'ların kontrolü altındadır (11).

Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerde meydana gelir (10, 11). Bu bölgede Sertoli ve spermatogonyumlar olmak üzere iki tip hücre vardır (11).

Embriyonik fetal gelişim döneminde spermatogonyumlar primordiyal germ hücrelerinden köken alır. Yeni doğan erkekte seminifer tübüller, germinal epitelden köken alan Sertoli hücreleri ve daha az olmak üzere spermatogonyumlar tarafından kuşatılmıştır. Puberteye yaklaştıkça spermatogonyumlar artar ve gelişme bununla sınırlı kalır. Puberteden itibaren spermatozoon üretimi başlar ve 45 yaşına kadar aktif olarak sürer. 45 yaşından sonra spermatozoon üretimi azalarak da olsa devam eder (10).

Spermatogenez, seminifer tübüller boyunca tekrarlanan ve senkronize olmayan bir süreç gösterir. Bu nedenle seminifer tübül epitelinde çeşitli gelişim evrelerindeki spermatogenetik seri hücrelerini izlemek mümkündür. Her bir hücre katmanı birbirlerine hücreler arası köprülerle bağlı gruplardan meydana gelmektedir. Bunlar eş zamanlı olarak seminifer tübülün lümenine doğru göç ederler (12, 18).

Spermatogenez boyunca hücrelerin gelişme hızı bellidir ve hormonlar gibi dış faktörlerden etkilenmezler (19).

Spermatogenezin üç evresi vardır: Spermatositogenezis evresi, mayoz bölünme evresi, spermiyogenezis evresi.

Spermiyogenezis sürecini tamamlayan spermatidlerin Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarından serbest kalması ise spermiyasyon olarak isimlendirilir (12, 18).

4.1.2.1. Spermatozitojeniz Evresi

İlkel erkek cins hücresi olan spermatogonyumların primer spermatozitolere farklılaşması olayıdır.

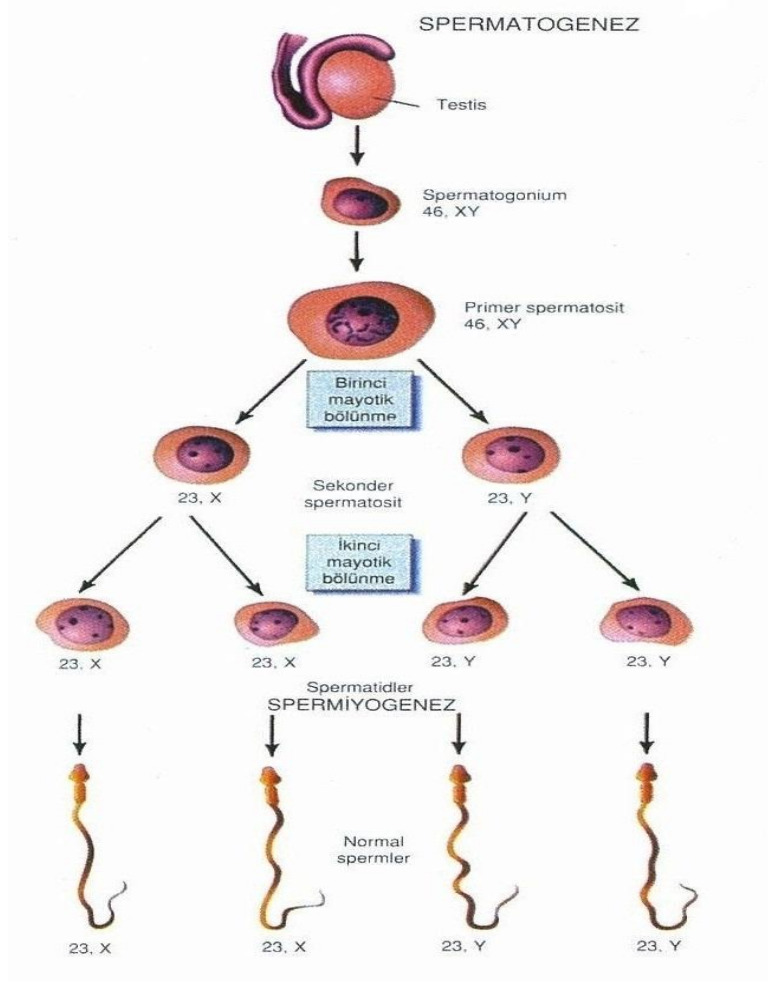
Puberte döneminden önce, testisteki seminifer tübüllerin epiteli az sayıda cins hücresine karşın, çok sayıda Sertoli hücresi içerir. Puberteyle beraber çok önemli nörohormonal değişimler olur. Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormonun etkisiyle hipofizinin ön lobundan FSH ve LH gonadotropinler salgılanır.

FSH ve LH etkisiyle, genç ve ilkel spermatogonyum A hücreleri hızla çoğalarak çok sayıda yeni spermatogonyum A jenerasyonlarını oluşturur (10). Tip A koyu spermatogonyumların bir kısmı rezerv hücre olarak kalırken, bir kısmı da Tip A açık spermatogonyumlara farklılaşır. Tip A spermatogonyumların bir kısmı mitoz bölünme geçirerek Tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucu seminifer tübülün en büyük germ hücreleri olan primer spermatozitler meydana gelir (10, 20).

4.1.2.2. Mayoz Bölünme Evresi

Primer spermatozitlerin bölünerek önce sekonder spermatozitolere daha sonra da spermatidlere farklılaşması dönemidir.

Primer spermatozitler başlangıçta 46 kromozom sayısına ve $2n$ DNA miktarına sahiptir. Kısa sürede 1. mayozun profaz evresine girer (10, 21). 22 gün süren profaz evresinde leptoten, pakiten, diploten ve diakinez safhalarına ulaşır, kromozom ayrılması ve crossing over'ın gerçekleşmesiyle metafaza girer. Metafazı takip eden anafazda, kromozomların karşı kutuplara ilerlemesiyle 1. mayoz bölünmeyi tamamlar ve iki adet haploid ($2n$ DNA) sekonder spermatozit oluştururlar (20). Sekonder spermatozitler ikinci mayoz bölünmeden önce DNA'larını replike etmezler ve sonuçta iki tane ve haploid sayıda kromozom içeren 4 yavru hücre oluşur. Bu hücelere spermatid adı verilir (10, 20). Sertoli hücre çöküntülerine yerleşmiş spermatidler, haploid kromozomlu olup, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren çekirdeklere sahiptirler (20).



Şekil 4. Spermatogenez evreleri (21)

4.1.2.3. Spermiyogenezis Evresi

Spermiyogenezis, spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoon'a dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler, küçük boyutları, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nukleusları ile ayırt edilirler. Seminifer tübüllerde lümeneye yakın yerleşmişlerdir (13).

Yuvarlak spermatidlerde sırasıyla şu değişiklikler meydana gelir:

1) **Akrozom Oluşması:** Spermatidlerde spermiyogenezisin ilk belirtileri hücre organellerinde gözlenir (13). Spermatidin sitoplazması nukleusun yakınında belirgin bir

golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriol, serbest ribozomlar ve düz endoplazma retikulumu tübülleri içerir. Küçük PAS pozitif proakrozomal granüller Golgi kompleksinde birikirler ve bunun hemen sonrasında birleşerek membranla sınırlanmış bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal vezikülü oluştururlar (22).

Akrozom vezikülü, spermatid çekirdeğinin ön kutbuna hareket ederek çekirdek zarına yapışır. Vezikülü çevreleyen zar, çekirdeğin 2/3'ünü saracak şekilde çekirdeği kaplar ve bir başlık oluşturur.

Akrozom granülleri içinde proteaz, asit fosfataz ve özellikle dölleme esnasında spermiyumun oositin çevresindeki engelleri aşarken kullandığı akrozin, hiyaluronidaz ve nöraminidaz enzimleri bulunur. Bu enzimler hücre içindeyken inaktiftir (10).

2) Kuyruk Gelişmesi: Akrozom oluşurken bir çift sentriol, çekirdeğin arka kutbuna hareket eder ve proksimal ve distal sentriolleri oluşturur. Distal sentriol, bir bazal cisim gibi işlev görür ve spermiyumun kuyruğunun merkezindeki aksonemi (9+2) ya da merkez fibrillerini oluşturur. Bu yapıyla aksonem flagellumun özünü oluşturur. Bu sırada akrozomal kep de çekirdeğin her iki yanında incelerek uzar ve çekirdek üzerindeki son konumunu almış olur.

Aksonem gelişir gelişmez üzerine bazı ek yapılar ilave olur ve kuyruk giderek ergin biçimini kazanır:

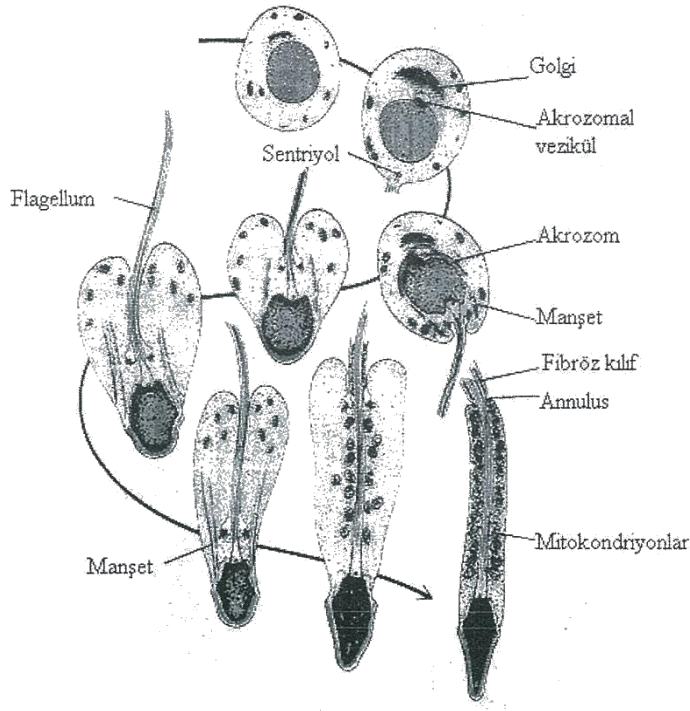
- a) 9 adet uzunluğuna kalın, koyu dış fibril
- b) Bağlantı parçası (çekirdek ile kuyruğu birleştiren parça)
- c) Fibröz tabaka. Fibröz tabaka, uzunlamasına iki kolonla bunları birleştiren kollardan oluşur.

Proksimal sentriol ise, çekirdeğin kaudal kısmındaki girintiye yerleşir ve spermiyumun boyun kısmının yapısına katılır. Flagellum boyunca hücre zarı arkaya doğru uzamaya başlar.

3) Çekirdekteki Değişiklikler (Kromatin Kondensasyonu): Kuyruk gelişirken mikrotubuluslar, çekirdeğin etrafında manşet denilen bir bant oluştururlar. Bu bant hücrenin kaudaline doğru uzanır. Manşetin şekillenmesiyle, akrozomal kep ve çekirdek hücre zarının hemen bitişiğine doğru hareket eder. Çekirdek yassılaşır, uzar ve kromatini yoğunlaşır. Buna bağlı olarak spermatid uzamaya başlar. Sitoplazma da kaudale doğru

uzayarak spermatidin spermiyum şekline almasına katkıda bulunur. Flagellumun uzunluğu boyunca hücre zarında uzaması sürecinde de manşet kaybolur.

4) Artık Spermatit Sitoplazmasının Atılması: Spermatidin sitoplazması, uzayan spermiyum şekline uyararak onu dıştan sarar. Bu sırada manşet kaybolur ve mitokondriyonlar, flagellumun proksimal kısmı etrafında heliks biçiminde dizilirler. Geriye kalan sitoplazma parçası ve içindeki organeller artık cisim olarak atılırlar ve Sertoli hücresi tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılırlar (10, 22). Sitoplazma, spermiyumun baş ve kuyruk kısmını çevreleyen çok ince bir halka biçiminde kalır. Bu dar alanda da sadece spermiyumun hareketini sağlayan organeller vardır (10).

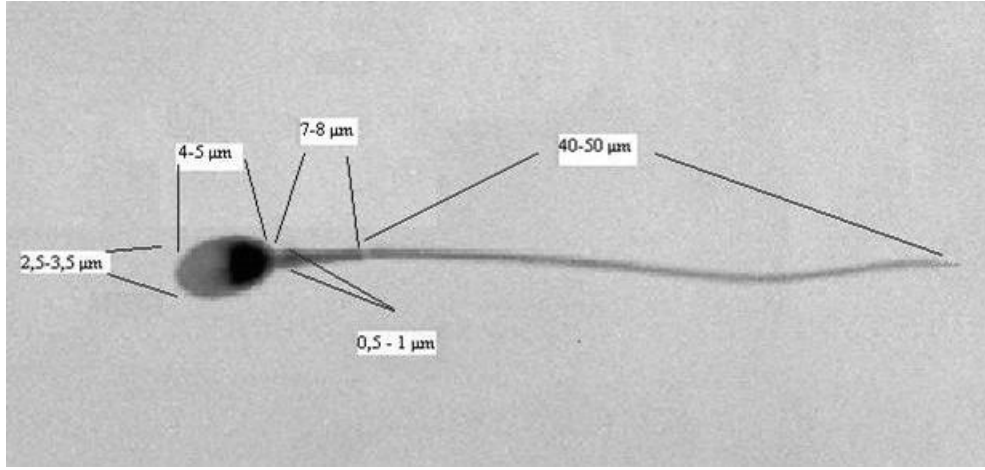


Şekil 5. Spermiyumun şekillenmesi (10)

4.1.3. Spermatozoonun Yapısı

65-72 gün süren spermiyogenez sonucu spermiyasyon olayıyla Sertoli hücrelerinden ayrılıp, seminifer tübül lümenine geçen spermatozoonlar, morfolojik olarak olgun olmalarına rağmen, fonksiyonel olarak olgun değildir. Hareket yeteneklerini yardımcı bezlerin salgıları ve duktus epididimiste ve dölleme yeteneklerini dışı genital kanallarında kapasitasyon geçirerek kazanırlar (20).

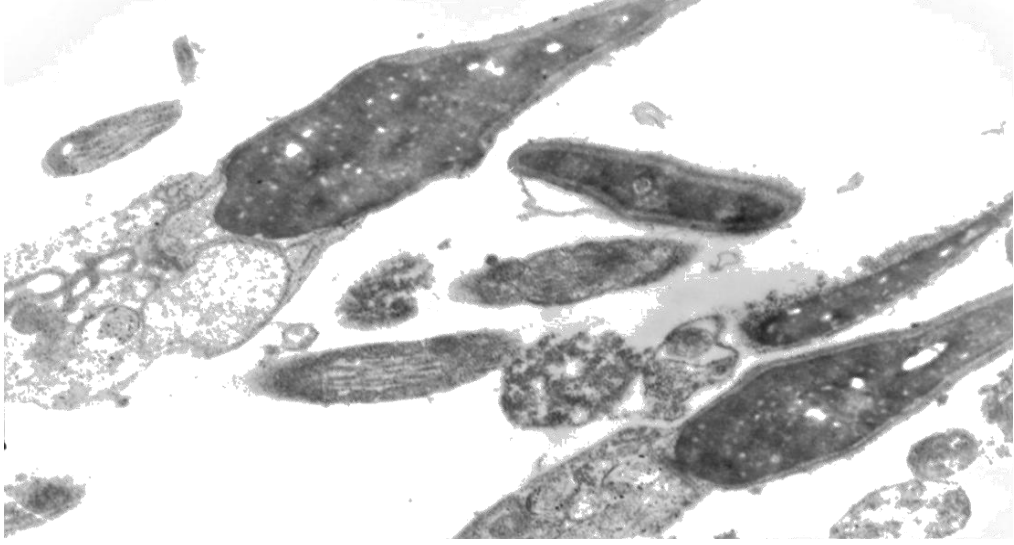
Olgun spermatozoon, 50-60 μm uzunluğunda, serbest yüzebilen ve aktif olarak hareket edebilen bir hücredir (10).



Şekil 6. Olgun spermatozoona ait bölümler ve uzunlukları (23)

Olgun spermatozoon baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur. Bir bağlantı parçası ile baş kuyruğa bağlanmıştır. Kuyruk üç parçada incelenebilir: Orta parça, esas parça, son parça (16).

Baş: Olgun spermatozoonun yoğunlaşan çekirdeği taşıyan yassılaştırmış bir başı bulunur. Ortalama 4-5 μm uzunlukta ve 2,5-3,5 μm genişliğindedir. Çekirdek başın büyük bir kısmını oluşturur ve anteriyör yarısını akrozom örter. Akrozom, membranla sınırlı, kep şeklinde bir organel olup fertilizasyon için gerekli hidrolitik enzimleri (proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluronidaz ve nöraminidaz) içerir (16, 17). Akrozomal enzimler, spermatozoonun oositi saran korona radiata ve zona pellusidayı geçişini kolaylaştırmak için dölleme anında salınır (16).



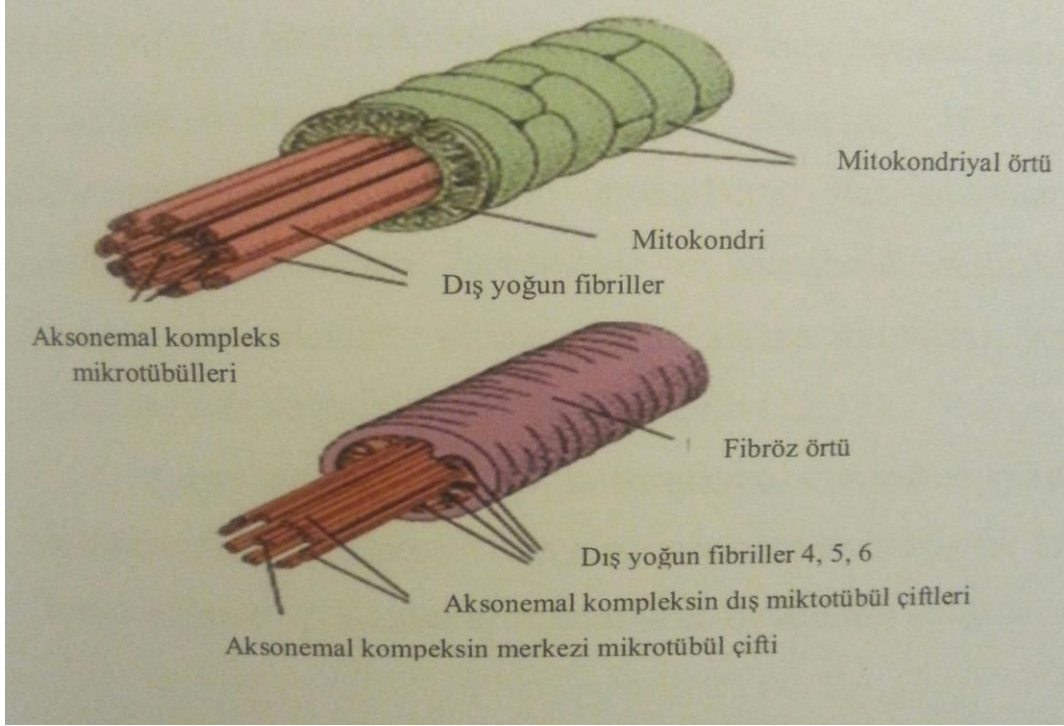
Şekil 7. Spermatozoon başının elektron mikroskopik görüntüsü (23)

Bağlantı parçası: Bir çift sentriolün bulunduğu dar bir parçadır. Distal sentriol, spermatozoon kuyruğunun merkezi parçası olan aksonemi oluşturur.

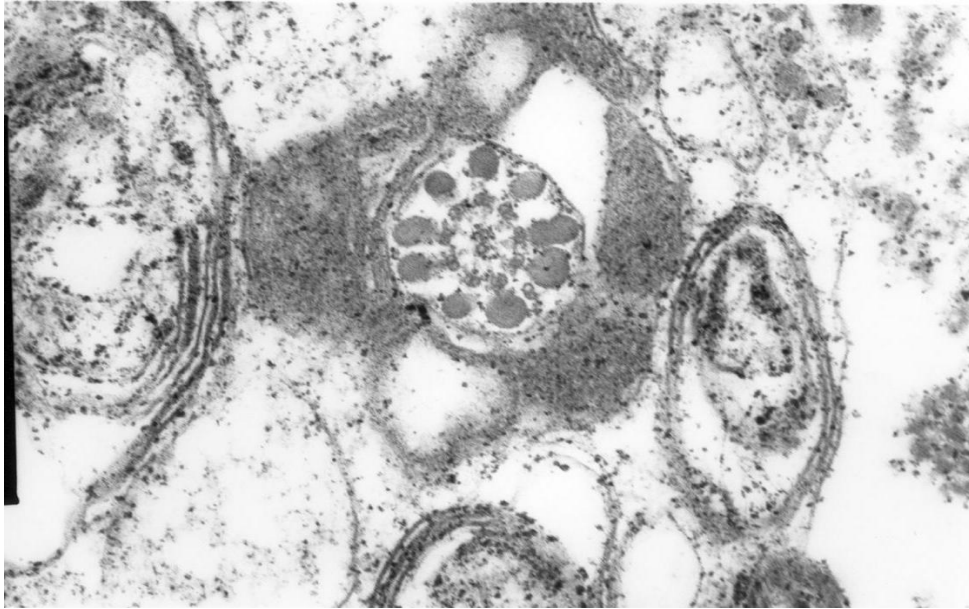
Orta parça: Sarmal olarak dizilmiş mitokondriyumların oluşturduğu tabaka 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen spermatozoon boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan 9 uzamına seyreden kolonlardan oluşur. Orta parçanın alt sınırı mitokondriyel sarmalın annulusta sonlanmasıyla belirgindir.

Esas parça: Kuyruğun en uzun parçasıdır ve giderek incilir (16, 17, 21). Yedi yoğun lifçe sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur.

Fibröz kılıf, eş uzaklıktaki uzamına kolonlardan çıkan dairesel iskelet tarafından oluşturulur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf, spermatozoonun ön hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet yapısı oluşturan keratin proteinini içerir (16).

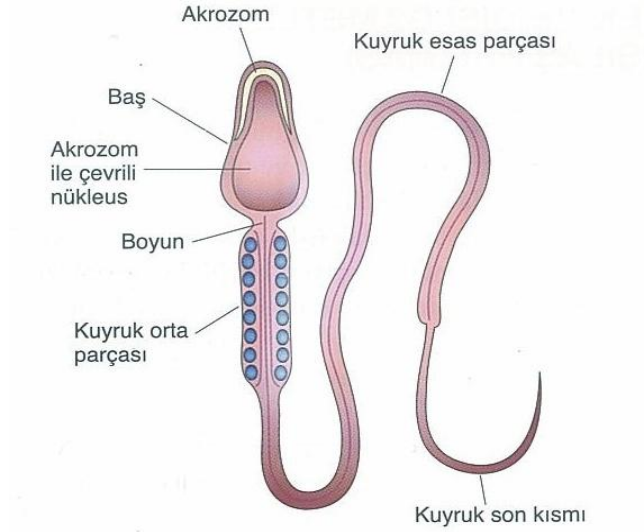


Şekil 8. Olgun spermatozoonun kuyruk yapısı (24)



Şekil 9. Spermatozoon kuyruğunun elektron mikroskopik görüntüsü (23)

Son parça: Fibröz kılıfın ve dış yoğun liflerin erken sonlanmasından dolayı, sadece aksonem bulunan, 5-7 µm uzunluğundaki en kısa parçasıdır (16, 17).



Şekil 10. Olgun spermatozoon (21)

4.1.3.1. Spermatozoon Membranı

Spermatozoon membranı; protein, lipid ve karbonhidrat olmak üzere 3 esas yapı elemanından meydana gelen lipoglikoproteinlerden oluşmuştur. Her ne kadar spermatozoon bazen enerji kaynağı olarak kendi fosfolipid kaynaklarını kullanırsa da lipidlerin esas görevi membran yapısını oluşturarak stabilizasyonu sağlamak, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit-spermatozoon füzyonunda rol almaktır (20, 25).

İnsan spermatozoonları; yüksek oranda fosfotidilkolin, fosfotidil etanolamin ve sfingomiyelin içerir. Fosfolipidlerle birlikte kolesterol spermatozoon membranının bütünlüğünü ve impermeabilitesini sağlar. Spermatozoon membranının yapısında, mannoz ve glukoz gibi monosakkaritler ile disakkaritler bulunur. Tirozin, triptofan ve histidin ise esas aminoasit yapısını oluşturmaktadır.

Spermatozoonların membranında; spesifik antijenler (tirozin kinaz sp 95, proakrozin, PH-20, PH-30, sp 56, galaktoziltransferaz, spermadezinler, progesteron reseptörü) dışında hücre-hücre ya da hücre-matriks etkileşimini yürüten nonspesifik proteinler, matriks proteinleri ile (kollajen, fibronektin, laminin, adezyon molekülleri) birlikte,

immunoglobulinler, kaderinler, selektinler ve integrinler gibi adezyon moleküllerinin de yer aldığı gösterilmiştir (20).

Spermatozoon plazma membran bütünlüğündeki zarar ve membran proteinlerindeki yetersizliğin, erkeklerde normal spermatozoon parametrelerine rağmen infertilite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (26).

4.1.3.2. Kapasitasyon

Spermatozoonlar dişi genital kanalına ilk bırakıldığında; metafaz 2'deki oositi dölleyecek yeterli motiliteye ve yeteneğe sahip değildirler.

Spermatozoonun oositi fertilize edebilmesi için kapasitasyon adı verilen fertilizasyona hazırlık süreci gereklidir. Kapasitasyon olayı, spermatozoonun dişi genital sisteminde fertilizasyon yeteneği kazandığı moleküler ve fizyolojik olayların tümünü kapsar. Dişi genital kanalında lokalize olan glikozaminoglikanlar, kondroitin sülfatlar, heparin benzeri ve henüz tanımlanmamış bazı maddelerin kapasitasyon sırasında spermatozoonların plazma membranındaki değişikliklerden sorumlu olduğu bilinmektedir. Kapasitasyon, tipik ligand-reseptör etkileşim mekanizmasına dayalı; kalsiyum (Ca^{+2}) bağımlı, c-AMP bağımlı, kinaz bağımlı, G-protein bağımlı, redoks bağımlı bir olaydır (20).

Yaklaşık 7-8 saat süren kapasitasyon süreci tamamlandığında spermatozoonlar akrozom reaksiyonu geçirebilecek özellikler kazanırlar ve motilitelerinde de hiperaktivasyon adı verilen çok önemli bir hareket tarzının geliştiği gözlenir (18).

İn vitro kapasitasyon ise, tubal sıvıya benzeyen elektrolit kompozisyonuna sahip besi yerine, ejakulat sperminin inkübasyonu ile gerçekleştirilir. Yedi saat süren kapasitasyon olayı için enerji kaynağı olarak ekzojen enerji kaynakları (piruvat, laktat, glukoz) kullanılmaktadır. Kapasitasyonun geçici bir olay olması ve kapasite olmuş bir spermatozoonun tekrar kapasite olmaması in vitro çalışmaları zorlaştırmaktadır.

Biyolojik stimulan olarak; albumin, glikozaminoglikanlar ve progesteron içeren spermatozoon motilitesi ve akrozom reaksiyonunu uyarıcı etkisi olan, insan folikül sıvısı kullanılmaktadır. Prostattan gelen, kullanımı doz bağımlı ve peroksidasyona karşı koruyucu etkisi de bulunan proteazom denilen faktörlerin seminal plazmada, spermatozoon motilitesini ve spermatozoon sayısını uyarıcı etkisi bulunmaktadır. Spermatozoonun motilitesini ve fertilizasyonunu düzeltmek amacıyla birçok farmakolojik ilaç in vitro olarak

denenmiştir. Bunlardan kafein, pentoksifilin gibi fosfodiesteraz inhibitörleri laboratuarda semene eklendiklerinde, hücre içi cAMP düzeyini, glikolizisi ve ATP yapımını arttırarak motil spermatozoon oranını yükseltmekte ve aynı zamanda canlı ama immotil spermatozoonlarda da motiliteyi başlatmaktadır. Ancak kafeinin in vitro kullanımı, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon membranı üzerine zararlı etkilerinden dolayı büyük oranda terk edilmiştir. İn vitro kullanıldığında, hücre düzeyinde fosfodiesteraz inhibisyonu yapan PF, lipid peroksidasyonunu arttırarak, spermatozoonun membran akışkanlığını etkilemektedir.

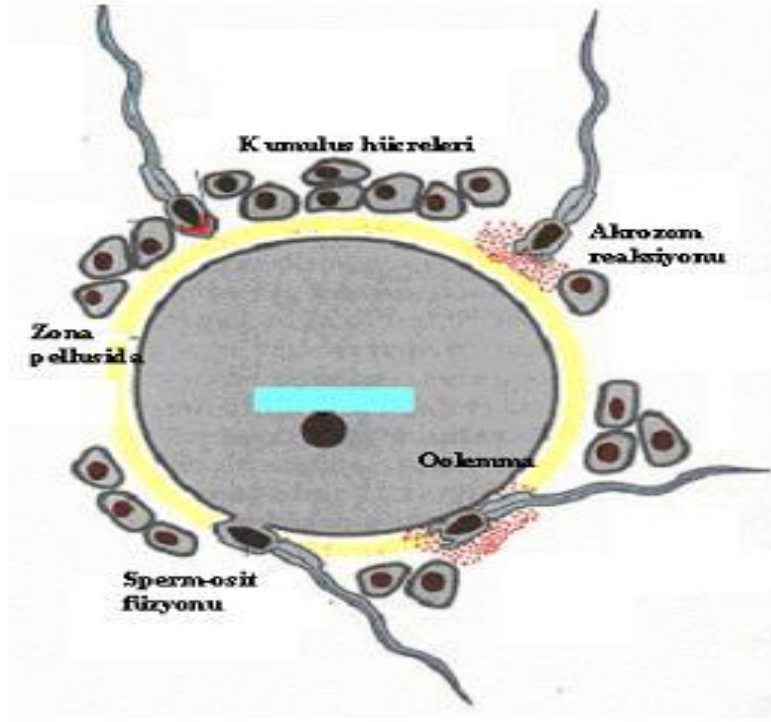
Spermatozoonun kapasitasyonu sonucu oluşan hiperaktivasyon ile oosit membranında meydana gelen penetrasyon yarığından spermatozoon girişi gerçekleşir. Bu sırada oosit iç zarında bulunan vitellüs kortikal granüllerinin, perivitellin boşluğa salınmasıyla, polispermiyi önleyen dölleme membranı oluşur. Spermatozoonun oosit içine girişinin ardından metafaz 2'de bekleyen oosit, 2. mayozu tamamlar. 2. polar cismin atılmasıyla, spermatozoon pronukleusu ile oosit pronukleusu birleşir ve zigot oluşur (20).

4.1.3.3. Akrozom Reaksiyonu

Akrozom spermatozoon başında çekirdeğin ön kısmında yer alan, membranla çevrili, lokalizasyonu nedeniyle kep biçiminde bir yapıdır. Akrozomal kepin biçimi ve büyüklüğü türlere göre değişiklik göstermekle birlikte yapısı temel olarak bütün türlerde benzerdir.

Akrozomal kepin, lizozomların analogu olduğu veya pankreas parankim hücrelerindeki granüllere benzer özelliklerde olduğu kabul edilir. Akrozomal kepin içerdiği hidrolitik enzimlerin bir bölümü matriks içinde bulunurken bir bölümü de iç akrozomal membranda yerleşiktir. Bu enzimler içinde en çok bilinenleri hiyalüronidaz ve akrozindir. Akrozomal matriks içindeki bir diğer komponent de karbonhidratlardır. Akrozomal matriksteki karbonhidratlar ve glikoproteinlerin bir bölümü akrozomal enzimlerin akrozom reaksiyonu sırasında inaktif formdan aktif forma geçmesini sağlar.

Spermatozoonlar oositi dölleyebilmek için oosit çevresindeki glikoprotein tabakasını, yani zona pellusidayı aşmak zorundadır.



Şekil 11. Akrozom reaksiyonu (27)

Akrozom reaksiyonunun sonucu olarak spermatozoonlarda plazma membranı ve dış akrozomal membranın birleşmesiyle veziküller oluşur ve akrozom içeriği spermatozoon yüzeyine boşalır. Akrozomal içeriğin serbest kalması bir çeşit ekzositoz olarak kabul edilir. Zona pellusida akrozomal enzimlerin etkisiyle yumuşar veya lokal bir bölgede erir ve böylece spermatozoonların bu yapıya penetrasyonu kolaylaşır.

Akrozom reaksiyonunu tamamlamış spermatozoonların salgıladığı hiyalüronidaz kumulüs hücre matrisini eritirken (kumulüs hücreleri hiyaluronik asitten zengindir) spermatozoonların yüzeyindeki akrozomun de zona pellusidanın aşılmasında rol oynar.

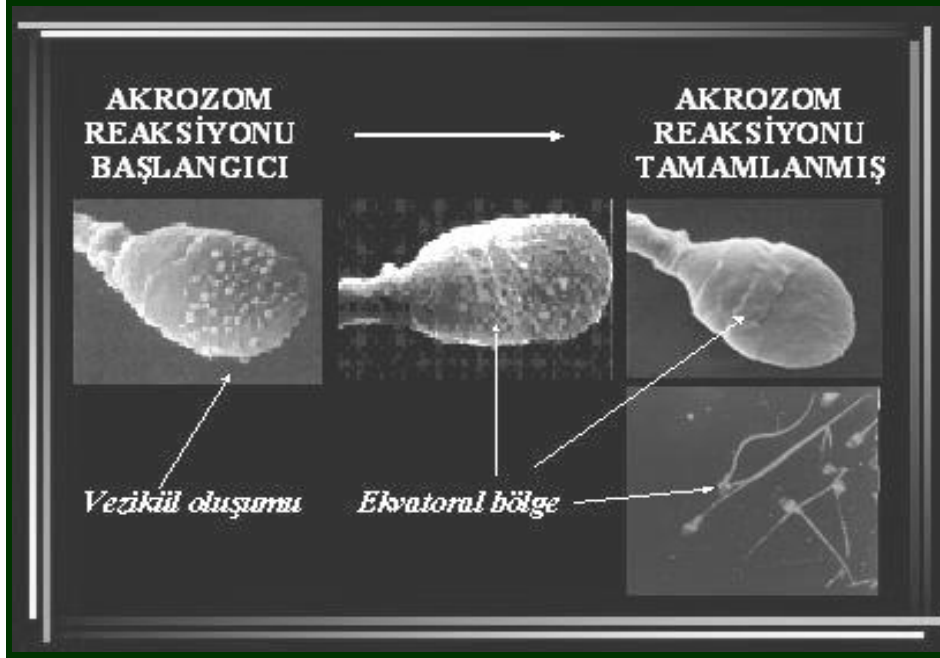
Akrozom reaksiyonunun tamamlanması iki önemli işleve yöneliktir:

- Zona pellusidanın aşılması ve
- Spermatozoon ile oositin hücre membranları düzeyinde bileşmesi.

Akrozom reaksiyonu her ne kadar canlılığını sürdüren, oositi döleyebilecek özellikteki spermatozoonlarda gerçekleşse de bazen ölü spermatozoonlarda da akrozom reaksiyonunu taklit eden değişiklikler gözlenebilir.

Akrozomal kep, güçlü hidrolitik enzimlere sahip olması nedeniyle hücre içinde membranla çevrili bir yapı olarak bulunur. Ölü spermatozoonlar akrozomal kepi

çevreleyen plazma membranı yapısal bütünlüğünü koruyamadığı için hidrolitik enzimler hücre içinde serbest kalır ve hücrenin kendi kendisini sindirmesine neden olur (18).



Şekil 12. Akrozom reaksiyonu ile meydana gelen değişiklikler (5)

4.1.4. Semen Özellikleri

Seminal sıvı (semen) bir miktar testis ve epididimis sıvısıyla aksesuar bezlerin (prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezler) salgılamalarından meydana gelmiştir (28, 29).

Semenin % 40-80'i seminal veziküllerden, % 10-30'u prostattan, % 2-5'i bulboüretal bezlerin salgılarından oluşur. Spermatozoon ise semenin % 5'ini oluşturur.

İnsanda ejakülat miktarı kişisel farklılıklar göstermekle birlikte 2-6 ml kadardır (11). Semen pH'sı 7,2-8,1 arasında değişir ve diğer pek çok memeliden farklı olarak insan semeni ejakülasyondan hemen sonra koagüle olur ve yaklaşık 20 dk içinde yeniden çözülerek likefiye olur (18, 30).

4.1.4.1. Semen Analizinde Spermatozoonun Mikroskopik İncelenmesi

a) **Konsantrasyon:** Spermatozoon sayısı, direkt olarak semenin ince bir tabaka halinde lam-lamel arasında Makler, hemosimetre, Thoma lamı ve Hoffman sayaçları kullanılarak incelenmesi ile belirlenir. Spermatozoon konsantrasyonu milyon/ml olarak değerlendirilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartlarına göre 20 milyon/ml ve daha fazla olması normal kabul edilmektedir (30).

b) **Motilite:** Spermatozoon sayımı yapılırken, spermatozoon hareketleri 4 sınıfa ayrılır:

- a) +4 hareketli spermatozoonlar; lineer bir şekilde ileri yönde hızlı hareket ederler.
- b) +3 hareketli spermatozoonlar; ileri yönde daha yavaş harekete sahiptirler.
- c) +2 hareketli spermatozoonlar; oldukları yerde hareket ederler.
- d) +1 hareketli spermatozoonlar da immotil şekilde durmaktadırlar.

Motilite, hareketlilik anlamına gelmekte olup +4, +3 ve +2 hareketli spermatozoonların toplam oranıdır. Hızlı hareketli spermatozoon sayısı (PHSS) sadece +4 ve +3 hareketli spermatozoonların oranıdır (30).

c) **Morfoloji:** Spermatozoon morfolojisi çeşitli yollarla değerlendirilebilir. Örneğin bir damla (10-20 µl) semen lam üzerine damlatılır. Örneğin üstü lamel ile örtüldükten sonra morfoloji tayini yapılır. Başka bir seçenek olarak da, örnek lam üzerine tespit edilmeden önce eşit hacimde tespit eriği ve metilen mavisi ile karıştırılabilir.

Aydınlık saha ve faz kontrast mikroskopunda X400 ya da X1000 büyütmede en azından 100 spermatozoon sayılmalıdır (31, 32).

Bir spermatozoon hücresinin normal olarak kabul edilebilmesi için spermatozoon başı, boynu (orta parça) ve kuyruğu normal olmalıdır. WHO'ya göre normal spermatozoon değerlendirmesi aşağıdaki şekilde olmalıdır:

Başın şekli oval olmalıdır. Başın boyu 4,0-5,0 µm ve genişliği 2,5-3,5 µm olmalıdır. Baş bölgesinin % 40-% 70'ini kapsayan iyi tanımlanmış bir akrozomal bölge olmalıdır.

Orta kısım ince uzun ve genişliği 1µm'den az, boyu baş uzunluğunun 1,5 katı ve başa aksiyal olarak bağlanmış olmalıdır. Orta parçada spermatozoon başının yarısından büyük hiçbir sitoplazmik damla olmamalıdır.

Kuyruk tek, düz, düzgün biçimli, orta kısımdan ince, kıvrılmamış ve yaklaşık 45µm uzunlukta olmalıdır (30) (Tablo I).

Spermatozoon morfolojisinin değerlendirilmesinde Kruger kriterlerinin kullanılabilmesi için, 5 µl sıvılaştırılmış meni lam üzerine damlatılır ve ince yayma yapılarak oda sıcaklığında kurutulur. Hazırlanan lam tespit edilir ve Diff-Quik boya seti ile boyanır. Lamlar X1000 büyütme kullanılarak ışık mikroskopunda incelenir. Sağlıklı bir değerlendirme için en az 100 spermatozoon sayılmalıdır. % 15 veya daha fazla normal spermatozoon morfolojisinin görülmesi normal bir sonuç olarak kabul edilmeli ve % 4'den küçük normal spermatozoon morfolojisi ise anormal olarak kabul edilmelidir (33, 34).

Baş	Uzunluk 5-6 mikron Genişlik 2,5-3,5 mikron
Akrozom	Başın % 40- % 70'ini oluşturmalı
Orta parça	Genişlik 1 mikron Uzunluk 1,5×başuzunluğu
Kuyruk	Boyu yaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış Kırık içermeyen
Sitoplazmik damlacık	Baş alanının % 35-70'inden daha az Sadece orta parçada lokalize

Tablo 1. Kruger kesin kriterlerine göre normal spermatozoon morfolojisi (1)

d) Spermatozoon Dışı Hücreler: Semende spermatozoon dışında yuvarlak hücreler olarak adlandırılan, ürogenital sisteme ait epitel hücreleri, prostata ait hücreler, spermatogenetik seriye ait hücreler ve lökositler olmak üzere farklı hücreler de görülebilir. WHO, tüm bu hücreler için üst limiti 5 milyon/ml olarak belirlemiştir. Çoğunlukla nötrofil olmak üzere lökositler, semende sık rastlanmakla birlikte 1 milyon/ml'nin üzerinde olduğunda (lökositospermi) enfeksiyona ve spermatozoon kalitesinde bozukluklara neden olmaktadır (35, 36).

e) Terminoloji:

Normozoospermi: ml' deki spermatozoon sayısının 20 milyon/ml ve üzeri olması.

Oligozoospermi: ml' deki spermatozoon sayısının 20 milyon/ml'den az olması.

Polispermi: ml' deki spermatozoon sayısının 20 milyon/ml'den çok fazla olması.

Azoospermi: Tüm ejakülatta hiç spermatozoon bulunmaması.

Aspermi: Seminal plazma üretiminin olmaması.

Nekrospermi: Spermatozoonların ölü olması.

Astenozoospermi: Motilitenin düşük (% 30'dan daha az) olmasıdır.

Teratozoospermi: Morfolojik olarak anormal spermatozoonların çoğunlukta olması.

Lökositospermi: Semende lökositlerin 1 milyon/ml'den daha fazla olması.

Hiperspermi: Semen hacminin 6 ml'den daha fazla olması.

Hipospermi: Semen 1 ml veya daha az olması.

Globozoospermi: Spermatozoonda akrozom yokluğu (30).

4.1.4.2. Spermatozoon Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi

Işık mikroskobu, elektron mikroskobu ya da farklı boyama teknikleri kullanılarak yapılmaktadır. Bu boyama teknikleri Papanicolaou, Hematoksilen, Toluidin blue-pironin, Giemza ve Nigrosin-eosin olarak sıralanabilir. WHO'nun 2010 yılındaki kitapçığına göre Papanicolaou boyamasının spermatozoon morfolojisi için ideal yöntem olduğu belirtilmektedir. Bu boyanma ile spermatozoonda akrozomal ve postakrozomal alan, rezidüel sitoplazma, orta parça ve kuyruk ortaya konulmaktadır. Ancak söz konusu bu yöntemle spermatozoon incelenmesi oldukça uzun zaman aldığından günümüzde sıklıkla daha kısa sürede yapılan ve spermatozoon morfolojisi hakkında detaylı bilgi veren Spermac ve Diff-Quik gibi yöntemler kullanılmaktadır (1).

Morfolojik değerlendirme yaparken kullanılan boyama yöntemine göre spermatozoonlar farklı boyutlarda görülebilir. Çünkü boyama öncesi yapılan fiksasyon işleminde spermatozoonlar bir miktar büzülebilmektedir. Diff-Quik yönteminde fiksasyon ve boyama işlemi kısa sürdüğünden spermatozoonlar gerçek boyutlarına yakın görünümdeyken Papanicolau ya da Spermac ile yapılan boyamalarda daha küçük görünürler (33).

Günümüzde erkeğin çocuk sahibi olmasında en etkili ölçütlerden biri morfolojidir. Spermatozoon morfolojisi; spermatozoon büyüklüğünü ve şeklini ifade etmektedir. Geçmişte spermatozoon morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi erkek infertilite potansiyeli tayini yönünden tartışmalı olsa da yakın zamanda yapılan çalışmalar morfolojik değerlendirmenin çiftlerde gebelik sonuçları için önemli olduğunu göstermiştir. Literatürler incelendiğinde Kruger katı kriterlerine göre yapılan incelemenin ön plana çıktığı ve sınır değeri olarak çoğunlukla % 4'ün alındığı anlaşılmaktadır (1).

Spermatozoonun Kruger kriterlerine göre değerlendirilmesinin en önemli avantajı morfolojik olarak normal değerlendirilen spermatozoon oranı ile IVF başarısı arasında korelasyon bulunmasıdır.

Bazı çalışmalarda anormal morfolojinin intrasitoplazmik spermatozoon enjeksiyonu (ICSI) sonuçlarını etkilemediği iddia edilmiştir. Güven ve arkadaşları ise gebelik sağlamada total motil spermatozoon sayısına ilave olarak spermatozoon morfolojisinin önemli olduğunu, morfolojinin Kruger kriterlerine göre > % 4 olması ile % 22,2 gebelik sağlandığını ancak bu oranın < % 4 olması ile gebelik oranının % 6,7'ye düştüğünü belirtmektedir.

Sonuç olarak, son WHO kitapçığında da belirtildiği üzere spermatozoon normal morfolojisinde Kruger katı kriterlerinde olduğu gibi % 4 sınırının alınmasının önemli olduğu, spermatozoon morfolojisinin gerek spontan gebelik gerekse de yardımcı üreme teknikleri ile gebelik sağlamayı predikte etmede son derece önemli olduğu anlaşılmaktadır.

Normal spermatozoon şeklinin tanımlanması, postkoidal servikal mukustan ya da zona pellusida yüzeyinden alınan spermatozoonların incelenmesi ile yapılmıştır. Buna göre bu spermatozoonların normal olduğu kabul edilmektedir.

Baş bölümünün büyük kısmını, içerisinde paternal DNA'nın olduğu yoğun ve kompakt yapıdaki çekirdek kaplamaktadır. Bu yapıları saran akrozom bulunur. Akrozom, baş ve ekvatoryal bölge olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır. Spermatidin golgi cisimciğinden oluşan akrozomal yapı, fertilizasyon için gerekli enzimleri içermektedir.

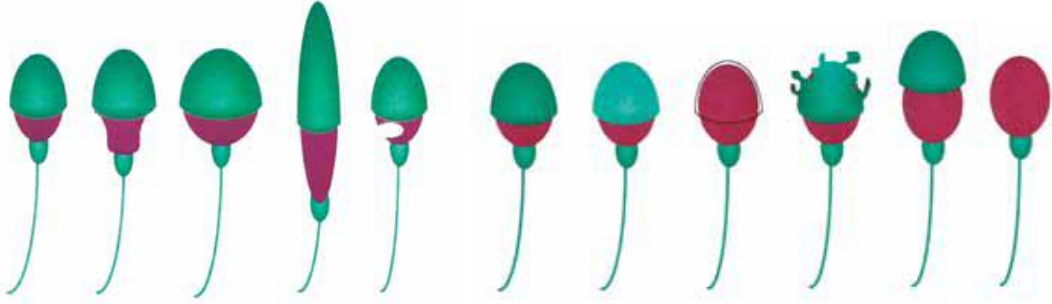
Ovumun fertilizasyonu sırasında, akrozomal membranın oosit plazma membranı ile birçok bölgeden birleşmesi ile akrozom reaksiyonu oluşmakta ve enzimatik yapı serbestleşmektedir. Akrozomal bölgede vakuoller de bulunmaktadır.

Spermatozoon kuyruğunda hareketin oluşumunu sağlayan temel yapı aksonemdir ve mikrotübüller ikililerden oluşmaktadır. Mikrotübüller, dinein olarak bilinen proteinden

oluşur. Aksonem, kendilerine karşılık gelen periferik çiftlere eşlik eden 9 ince silindirik yapıdan oluşan yoğun dış fiberler ve fibröz kılıf ile çevrelenmektedir. Yoğun dış fibriller spermatozoa kuyruğunun % 60'ını oluşturur. Bir çeşit kuyruk şekilli dış iskelet olarak kabul edilen fibröz kılıf, flagellar hareketin planı ile şeklini etkiler ve kıvrılma hareketinde yer alır (1) .

4.1.4.3. Spermatozoon Malformasyonlarının Tipleri:

Baş defektleri: Büyük ya da küçük, konik, piriform, yuvarlak, amorf, vakuollü, çift başlı veya bunların kombinasyonu şeklinde olabilir.



Şekil 13. Spermatozoon baş defektleri (1)

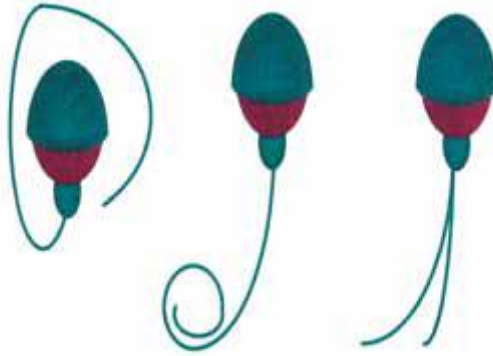
Spermatozoon morfolojisine bu bilgiler dışında bazı anormal yapıların ayrıca göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bununla ilişkili olarak akrozoma ait ana yapısal defektler; akrozomun kısmi yokluğu, komple yokluğu, intranükleer inklüzyonların varlığı, akrozomun dejenerasyonu ve hipoplazisi olarak bilinmektedir. Spermatozoonun akrozomsuz olması nükleer yapıyı değiştirmekte ve kendini globozoospermi (yuvarlak başlı spermatozoon) olarak göstermektedir. Bu patolojide, spermatozoon hareketli olmasına rağmen akrozom eksikliğine bağlı olarak akrozom reaksiyonu ve dolayısı ile oosit aktivasyonu yoktur. Golgi cisimciğinden oluştuğu düşünülen inklüzyonların spermatozoonun akrozomal reaksiyon göstermesinde veya zona pellusidaya penetrasyonunda karşılaşılan problemlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Anormal başa sahip spermatozoonlardan gelişen embriyoların normal bir gebelik olarak devam etme potansiyelleri de düşük bulunmuştur (1).

Orta parça defektleri: Başın asimetrik olarak orta parçaya girmesi, kalın ya da düzensiz olması, ince olması veya bunların kombinasyonu şeklindedir.



Şekil 14. Spermatozoon orta parça defektleri (1)

Kuyruk defektleri: Kısa, birden çok, kırık, keskin açılı, koil şekilli, düzensiz ve bunların kombinasyonları şeklinde görülebilir.



Şekil 15. Spermatozoon kuyruk defektleri (1)

Azalmış veya kaybolmuş motilite durumlarında birçok aksonemal defektin varlığı rapor edilmiştir. Aksonemal anomaliler, mikrotübüllerin sayısal veya pozisyonel anomalileri ve/veya dış veya iç dinein kollarının yokluğundan kaynaklanmaktadır. Bu anomaliler çoğunlukla genetik kökenli olarak kabul edilmektedirler (1).

Fazla sitoplazma kalıntısı: Spermatogenetik süreçte üretilen anormal spermatozoon ile ilgilidir. Büyük miktarda düzensiz sitoplazma içerir ve orta parça defektleri ile ilgilidir (Şekil 14). Sitoplazmik damla seminifer tübül tarafından salgılanan, spermatozoon içinde küçük sitoplazmik kitle olarak bilinmektedir. Bu yapı lizozomal enzimden zengindir. Sitoplazmik artıklar orta parça ve bazen de kuyrukta görülebilmekte ve bu hali ile orta parça anomalisi gibi algılanabilmektedir. Ejekülatta bu damlaların varlığı, yoğun dış fiberler ve fibröz kılıf gibi yapıların eliminasyonuna bağlı epididimal fonksiyon bozukluğu ve fertilizasyonun azalması ile birlikte görülmektedir. Ayrıca bu sitoplazmik damlalarda reaktif oksijen türleri (ROS) yapımına neden olan bol miktarda madde bulunmaktadır (1).

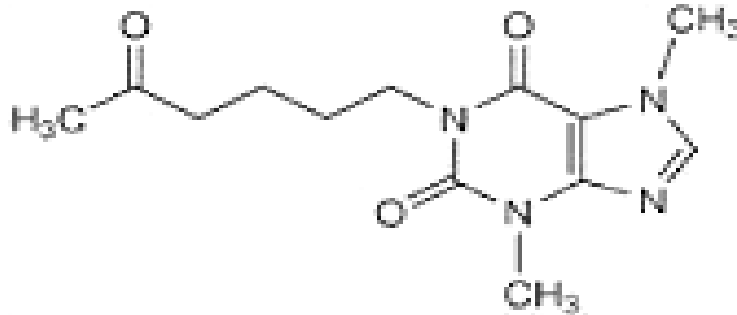
4.2. PENTOKSİFİLİN (PF)

Pentoksifilin (PF), metilksantin türevi non-spesifik bir fosfodiesteraz inhibitörü olup, eritrosit fleksibilitesini arttırarak ve trombosit agregasyonunu inhibe ederek kan viskozitesini attırmaktadır. Dolayısıyla kapiller kan akımı artışına ve doku oksijenasyonuna neden olmaktadır.

Hammerman ve ark., sıçan bağırsağı ile yaptıkları bir çalışmada, iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde PF'in ksantin enzimini inhibe ederek antioksidan olarak etki ettiğini göstermiştir (37).

PF endotel yüzeyindeki negatif elektrik yükünü arttırarak trombosit adezyonu ve agregasyonunu önlemektedir. PF, fibrinolitik sistemi aktive ederek plazma fibrinojen konsantrasyonunu da azaltır. PF, endotoksemi ve iskemi sonrası ortaya çıkan enflamatuar reaksiyonunda da etkilidir. PF nötrofil degranülasyonunu engeller. Degranülasyonun engellenmesi ile lizozomal proteolitik enzimlerin ve serbest oksijen radikallerinin oluşmasına katalizörlük eden enzimlerin salınması engellenmiş olur. Bundan başka inflammatuar olaylarda önemli mediyatörler olan Tümör Nekrozis Faktör-alfa (TNF- α) ve interlökin 1 (IL-1) yapımını da azalttığı gösterilmiştir (38).

PF primer kardiyak verim artışına neden olur ve sonuçta da refleks aksiyonu meydana getiren sistemik vazodilatasyon ve total sistemik vasküler rezistansta azalma yapar. PF güçlü bir periferik vazodilatördür. Asıl terapötik etkinliği, hemoreolojik etkileriyle kan akımı ve dokuların oksijenasyonunu artırmasına bağlıdır.



Şekil 16. Pentoksifilin (PF)' in moleküler yapısı (39)

Tullio Di Peri ve ark. ile R. Schneider ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, PF akut ve kronik kullanımı hemoreolojik (tam kan, plazma ve serum vizkozitesi, eritrosit filtrabilitesi, hematokrit), hemostazyolojik (koagulasyon ve fibrinolizis: öglobulin lizis zamanı, fibrinojen, plazminojen, alpha-2-makroglobulin, alfa-1-antitripsin, antiplazmin; platelet fonksiyonu: β -tromboglobulin) ve hemodinamik faktörler (ekstremitte perfüzyon: sistemik kan basıncı, kalp atım hızı) üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (40).

Güldal ve ark., sıçanlar üzerine yaptıkları çalışmada, testis torsiyonunda PF'in detorsiyon sonrası testis dokusunda serbest oksijen radikalleri oluşumunu azalttığı ve reperfüzyon hasarından koruyucu etkiye sahip olabileceğini göstermişlerdir (41).

PF'in aynı zamanda farelerde interlökin-2 (IL-2) aracılı Vasküler Leak Sendromu (VLS)'nda çoklu organ hasarı ve ödemi önlediği gösterilmiş olup VLS tedavisinde kullanılabilecek bir tedavi seçeneği olduğu bildirilmiştir (42).

PF'in kapalı femur kırıkları üzerine olan etkisinin incelendiği bir çalışmada, histolojik olarak erken dönemde PF kullanılmasının kırık iyileşmesini hızlandırdığı, geç dönemde ise histolojik olarak kaynamayı geciktirdiği gösterilmiştir. Radyolojik bulgular neticesinde de PF kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisiz olduğu görülmüştür (43).

Oral PF kullanımının periton geçirgenliğine, serum ve peritoneal sıvıdaki inflamatuvar sitokinlere etkisinin incelendiği başka bir çalışmada PF'in periton geçirgenliği, peritoneal sodyum atılımı üzerine etkisinin olmadığı gösterilmiştir (44).

Eskiden beri hipertansiyon tedavisinde ilaç olarak kullanılan PF'in, cAMP mekanizması üzerinden spermatozoon hareketini de arttırabileceğinin önerilmesini takiben, infertil erkeklerin tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır (45).

cAMP, spermatozoon fonksiyonlarının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. Spermatozoon motilitesinin in vitro şartlarda uyarılmasının esası da hücre içi cAMP seviyesini arttırarak spermatozoon fonksiyonlarının uyarılmasına dayanmaktadır.

Uyarılmanın bir diğer sonucu ise spermatozoonun sitoplazması içinde kalsiyum düzeylerinde uygun dengenin sağlanmasıdır. Çünkü sitozolik kalsiyum hem flagellumun kıvrılmasında hem de kapasitasyon ve hiperaktivasyonda önemli bir araçtır.

PF laboratuarda semene eklendiğinde, hücre içi cAMP düzeyini, glikolizisi ve ATP yapımını kolaylaştırarak spermatozoon motilitesini arttırmaktadır (4, 5, 46). Motil spermatozoon oranını yükseltmekte ve aynı zamanda canlı ama immotil spermatozoonlarda motiliteyi de başlatmaktadır (5).

PF'in spermatozoon motilitesi üzerindeki etkilerinin dışında akrozom reaksiyonunu güçlendirmekle ilgili etkileri de bildirilmiştir. cAMP akrozom reaksiyonunun indüklenmesinde ikinci haberci olduğundan fosfodiesterazların spesifik olmayan inhibisyonu metilksantin ile hücre içi cAMP seviyesini arttıracığından akrozom reaksiyonunun indüklenmesine neden olur. Bununla beraber spermatozoonun zona pellusidaya bağlanma yeteneği artar (29). Yogev ve ark. tarafından da PF'in, spermatozoonun zona pellusidaya bağlanma yeteneğinin arttırdığı gösterilmiştir (28). Spermatozoonda hız artışının yumurtaya penetrasyon kapasitesini arttırdığı da saptanmıştır (4, 46).

Dondurulup çözülmüş spermatozoon motilitesini de uyardığı gösterilmiştir (5, 29).

PF'in 2-deoksiadenozin ile kombine edilmesinin etkinliği daha da arttırdığı gözlenmiştir (5).

Faka ve ark., 14 infertil erkek üzerinde yaptıkları çalışmada PF kullanımının semen parametrelerini iyileştirdiğini göstermişlerdir (47).

PF genelde bireysel etki göstermekte ve farklı sonuçlar vermektedir (5). Sonuçla ilgili en önemli faktör, konsantrasyon ve inkübasyon süresidir (4). PF toksik olduğu için 90 dk'dan daha uzun süre uygulanmasının spermatozoon canlılığında azalmaya yol açtığı ileri sürülmüştür (48).

Hattori ve ark. "Kartagener Sendromlu" hastalarda yaptıkları çalışmada PF'e pozitif tepki gösteren birkaç spermatozoon dışında neredeyse tüm spermatozoonların anormal morfolojide olduğunu bildirmişlerdir (50).

PF'in spermatozoon kalitesine etkisinin incelendiği varikoselli erkekler üzerinde yapılan bir çalışma, tedaviden dört hafta sonra morfolojik olarak normal spermatozoon hücreleri oranının önemli ölçüde arttığını göstermiştir (50).

Oral PF kullanımının spermatozoon kalitesini düzelttiği ve yüksek konsantrasyonlarda ROS oluşumunu önlediği bildirilmiştir (5, 46).

İn vitro kullanıldığında da PF, hücre düzeyinde fosfodiesteraz inhibisyonu yapar. Ayrıca lipid peroksidasyonunu artırarak spermatozoon membran akışkanlığını da etkilemektedir. Süperoksit dismutaz enzimini inhibe edici etkisi de bulunmaktadır (5).

PF'in spermatozoon motilitesini attırdığı ile ilgili hiç şüphe yok iken motilite kalitesi hakkında çelişkili raporlar hazırlanmıştır. PF normozoospermik örneklerde progressif hareketli spermatozoon sayısını arttırmak için herhangi bir etkiye sahip olmadığı fakat

astenozoospermik örneklerde progressif spermatozoon yüzdesini arttırmakta etkili olduğu bulunmuştur. Marrama ve ark., idiyopatik oligozoospermik hastalarda ilacı oral olarak alan kişilerde motilite yüzdesinde artış olduğunu gösterirken diğer araştırmacılar ise astenozoospermik örneklerde spermatozoon hızında PF'in sınırlı artışa neden olduğunu göstermiştir. Bu çelişkili sonuçlar, farklı zamanlardan ve farklı dozlardan kaynaklanabilmektedir. Bu sonuçlara göre klinik uygulama öncesi uygun PF konsantrasyonu saptanmalı ve embriyo gelişimi üzerindeki olumsuz etki ihtimali de göz önünde bulundurularak dikkatli kullanılmalıdır (46).

nedeniyle PG'ler PAF'ın aracılık ettiği inflamatuvar reaksiyonları kontrol etmede lokal bir faktör olarak görev alabilirler (58).

PAF aynı zamanda tıkanma sarılığında doku hasarının oluşumunda rol oynayan önemli bir mediyatördür. Fosfolipaz A₂ (PLA₂) 'nin aktivasyonu sonucu oluşur. Kimyasal yapısı, asetil gliserol eter fosfokolindir. Bu potent inflamasyon mediyatörü sitooksijenaz yoluyla kuvvetli bir vazokonstrüktör madde olan tromboksan A₂ üretimini arttırarak trombosit stimülasyonu yapar. Ayrıca lökosit kemotaksisi, makrofaj, bazofil, mast hücrelerinin aktivasyonu gibi bir seri sistemik hemodinamik değişikliklere yol açar. Endotelial hücrelerin de şeklini değiştirerek vazokonstrüksiyon ve permeabilite artışına neden olur (59).

1970'lerin başında keşfedilmesinden sonra PAF aynı zamanda ovulasyon, fertilizasyon, preimplantasyon, implantasyon ve doğum olmak üzere üreme ile ilgili çeşitli fonksiyonlarla da ilişkilendirilmiştir (6, 9, 60).

PAF'ın varlığına insan dahil birçok memeli spermatozoonunda rastlanmıştır (52). Roudebush ve ark.'nın 95 spermatozoon üzerinde PAF varlığını inceledikleri çalışmada, tüm örneklerde PAF saptanmıştır (6).

PAF, spermatozoonda lokalizedir ve seminal sıvılarda mevcut değildir (52). Spermatozoonda mevcut olan endojen PAF'ın motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit penetrasyonu ile ilgili pozitif etkileri bildirilmiştir (8, 29).

PAF'ın aktivasyonu ve deaktivasyonu için gerekli olan enzimler (lyso-PAF asetiltransferaz ve PAF-asetilhidrolaz) spermatozoonda bulunmaktadır. Spermatozoonda bulunan Ca⁺² bağımlı PLA₂ alkil-asil-GPC'den lyso-PAF oluşumunu katalizler. Lyso-PAF biyolojik olarak aktif değildir. İnaktif olan lyso-PAF asetil Co-A kullanılarak, aktif PAF oluşturmak için (asetiltransferaz ile) asetillenir. Asetilhidrolaz ise inaktif olan PAF (lyso-PAF) oluşumundaki temel enzimdir (8, 52). Yapılan çalışmalar, seminal plazmada bulunan PAF-asetilhidrolazın (PAF-ah) kaynağının aksesuar bezler (seminal vezikül ve prostat) olduğunu göstermektedir (7).

Bazı araştırmacılar, asetilhidrolazın spermatozoon dekapasitasyon faktörü olduğunu ileri sürmektedir. Veriler, kapasitasyon sırasında asetilhidrolazın ortadan kaldırılmasının PAF sentezini teşvik ettiğini göstermektedir. Bu da artmış spermatozoon motilitesi ve gelişmiş spermatozoon-oosit etkileşimi ile sonuçlanmaktadır (8, 52).

PAF-ah hakkındaki çalışmalardan biri spinal kord yaralanması (SCI) olan erkekler üzerinde yapılmış ve sağlıklı kontrol grubundaki erkeklerle asetilhidrolaz düzeyleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, SCI olan hastalarda seminal plazmalarındaki PAF-ah aktivitesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu ve seminal plazmadaki enzimatik aktivite ile spermatozoon motilitesi arasında negatif ilişki olduğunu göstermiştir (7).

PAF'ın metabolizması testosteron, östrojen ve progesteron gibi hormonlardan etkilenir ve spermatozoon motilitesi üzerindeki etkisinin de cAMP aracılığı ile olduğu gösterilmiştir (8, 53). Fakat diğer PAF etkisi inositol trifosfat (IP3) ve hücre içi Ca^{+2} aracılığı ile gerçekleşmektedir. Sonuç olarak PAF'ın bulunduğu hücrelerde etkisi cAMP, IP3 ve Ca^{+2} seviyelerine bağlıdır (8).

PAF antagonistleri motiliteyi, akrozom reaksiyonunu ve fertilitiyi inhibe edebilir (9, 29, 61). Bu veriler PAF'a özgü bir reseptör varlığını işaret eder (9, 61). Reinhart ve ark., PAF'a ait reseptörün insan spermatozoonunda orta parça ve spermatozoon başına yakın olduğuna dair kanıtlar sunmuştur (29). Roudebush ve arkadaşlarının da immünfloresan mikroskop kullanarak spermatozoadaki PAF reseptörünü inceledikleri çalışmada, normal ve anormal spermatozoonlar arasında boyun bölgesindeki floresan yoğunluklarında önemli derecede fark belirtilmiştir (52). Özellikle fertil ve infertil insan spermatozoonunda PAF reseptör konsantrasyonu ve PAF reseptör konsantrasyonu için mRNA ekspresyon seviyeleri anlamlı derecede farklılıklar gösterir. İnfertil insan spermatozoonları anormal PAF reseptör mRNA dizilerine sahiptir (8, 52).

PAF, yüzey reseptörüne bağlanır ve bunun sonucunda diasil gliserolü (DAG) IP3'a dönüştürür ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu artırır. Hücre içi Ca^{+2} artışı akrozom reaksiyonunun başlamasından sorumludur (29).

PAF'ın reseptörüne bağlanması ile fosfolipaz C (PLC) ve PLA2 aktive olur. Aktivasyonun G protein aracılığı ile olduğuna dair çalışma sonuçları bulunmaktadır (62). PAF'ın tirozin kinazı uyardığı da gösterilmiştir (51, 63).

PAF konsantrasyonlarının motilite üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada, motilitedeki en büyük artışın en düşük motilite gösteren spermatozoonlarda olduğu görülmüştür. Maksimum 4 saat 10 nM PAF'a maruz kalmanın spermatozoon üzerinde olumlu etkileri vardır. Fakat progressif motilitedeki en büyük artışın 50 nM PAF ile muamele edilen spermatozoonlarda gözlenmiştir. Ayrıca PAF ile muamele edilen spermatozoonlar oositi lyso-PAF ile muamele edilen spermatozoonlara göre daha yüksek

oranda döllemiştir. PAF ile muamele edilen spermatozoonlardan embriyo oluşumunda da daha yüksek oranda blastosist kaydedilmiştir (53).

Herhangi bir yardımla üreme tekniği ve en fonksiyonel testler için spermatozoon işleminden geçmiş olmalıdır (silika partikül süspansiyonu ile yıkama veya swim up). Bu işlem, spermatozoonun en fazla motil sayıya ulaşmasını ve işlevselliğini kolaylaştırmak içindir. Bu sayede, işlem görmüş spermatozoonda PAF etkisi fertilizasyon potansiyeli ile pozitif ilişkili olacaktır. PAF aktivite seviyelerinin ölçümü, yardımcı üreme tekniklerinde gebelik sonuçlarını önceden tahmin etmede yararlı olabilir (61).

Araştırmalar PAF'ın IUI gebelik oranlarını ve motiliteyi arttıran nontoksik bir tedavi olduğunu göstermiştir. PAF'ın PF ve bazı diğer motilite uyarıcılarından belirgin avantajı; spermatozoon tarafından üretilen doğal bir madde olması ve toksik olmamasıdır (60).

4.4. ERKEK İNFERTİLİTESİ

Erkek infertilitesine ait nedenler çok olsa da genel olarak üç grup altında toplanabilir:

- Pretestiküler nedenler
- Testiküler nedenler
- Posttestiküler nedenler

Pretestiküler nedenler, daha çok hormonal kaynaklıdır. Hipotalamus ve hipofize bağlı nedenler olarak ikiye ayrılabilir.

Hipotalamusa bağlı nedenler: LH eksikliği, FSH eksikliği, gonadotropin eksikliği ve konjenital hipogonadotropik sendromlardır.

Hipofize bağlı nedenler: Hipofiz yetmezliği, hiperprolaktinemi, ekzojen hormonlar ve büyüme hormonu eksikliğidir.

Testiküler nedenler, testis düzeyinde etki göstererek infertiliteye neden olan durumları kapsar. Büyük oranda geri dönüşümsüzdür. Testiküler nedenler;

- Kromozomla ilişkili (Klinefelter sendromu, XX cinsiyet dönüşümü, XXY sendromu)
- Turner sendromu
- Miyotonik distrofi
- Kaybolan testis sendromu (iki taraflı anorşi)
- İzole Sertoli hücresi sendromu (germ hücresi aplazisi)
- Y kromozomu mikrolelesyonları (DAZ)
- Gonadotoksinler (ilaçlar, radyasyon)
- Sistemik hastalıklar (böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği, orak hücre anemisi)
- Defektif androjen aktivitesi
- Testis zedelenmesi (orşit, torsiyon, travma)
- Varikosel
- İdiyopatik (64).

Posttestiküler nedenler üç grupta incelenebilir:

1- Reprodüktif yol obstrüksiyonu: Doğrusal blokajlar, edinsel blokajlar ve fonksiyonel blokajlar

2- Spermatozoon fonksiyon ve hareketliliğini ilgilendiren anormallikler: ICS (immotil silya sendromu) , olgunlaşma kusurları, immünolojik infertilite

3- Cinsel birleşmeyle ilgili sorunlar: Empotans, hipospadiyas (64).

4.5. SPERMATOZOON FENOTİPİ PATOLOJİLERİ

Erkek infertilitesinden genellikle astenozoospermi ve teratozoospermi sorumlu olmasına rağmen sebepler tam olarak anlaşılmış değildir. Erkek infertilitesinin nedeni birçok bireyde belirsizdir ve çok sayıda hasta idiopatik infertiliteden muzdariptir. Bununla birlikte son gelişmeler, erkek infertilitesinde genetik anomalilerin rol oynadığını göstermiştir.

1970'lerin ortalarında İskandinav gruplar tarafından yapılan açıklamaya göre şiddetli astenozoosperminin nedeni, spermatozoonda moleküler mekanizmalarda rol oynayan dinein (ATPaz aktivitesi ile ilgili) protein eksikliği, kistik fibrozis, Y kromozomunun uzun kolundaki mikrolezyonlar olabilir.

Spermatozoon patolojileri, rutin semen analizleri veya fonksiyonel testler ile tespit edilememektedir. Çünkü bu testler, patolojilerin altında yatan sorunu ortaya çıkaramamaktadır.

Elektron mikroskobu, ışık mikroskobuna kıyasla spermatozoon bileşenlerinin iç yapısal ve konumsal organizasyonlarını detaylı olarak ayırt edebildiği için patolojiler açısından mükemmel bir gözlem sağlamaktadır.

4.5.1. Astenozoospermide Flagellar Patoloji

Şiddetli astenozoospermi genellikle flagellar yapısal değişikliklere neden olur ve bu infertil erkeklerin % 70'inden fazlasında motilite eksikliğinden sorumludur.

Şiddetli astenozoospermi hastaları üzerinde yapılan çalışma iki çeşit kuyruk anomalisi olduğunu göstermektedir. Birincisi, solunum patolojisi ve ailesel insidans ile ilişkili olan ve çoğu spermatozoonu etkileyen fibröz kılıf displazisi (DFS)'dir. İkinci anomali ise nonspesifik flagellar anomali (NSFA)'dir. Bu anomali spermatozoonlarda rastgele görülmektedir. Şiddetli astenozoospermi hastalarında NSFA tipi anomalinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu anomalide aksonemal mikrotübüldeki normal 9+2 düzeninde bozulma ve değişim görülmektedir. Patolojik NSFA fenotipinde geri dönüşümlüdür ve çoğunlukla varikozel, seminal yolda enfeksiyon, immünolojik faktörler gibi ikincil koşullar fertilitiyi olumsuz etkilemektedir (65).

Şiddetli astenozoospermide en sık rastlanan patoloji NSFA'dır ve bu fenotip heterojen olarak rastgele mikrotübüler değişiklikler ile karakterizedir. NSFA, ailesel geçmiş içermez.

Spermatozoonda bu anomaliler semen yaymalarında mikrotübüler değişimin flagellar çapına yansımından dolayı ışık mikroskopunda görülememektedir. Bu nedenle sadece ultrastrüktürel inceleme ile spermatozoondaki anomaliler tespit edilebilmektedir.

DSF tipi anomali taşıyan spermatozoon örneklerinde motilitenin daha düşük olduğu saptanmıştır. Çoğu durumda spermatozoon tamamen immotil ve kısa, kalın, düzensiz kuyruğa sahiptir. Bu özel görünüm patolojileri "stump tail" ya da "short tail" olarak isimlendirilmiştir.

Ultrastrüktürel çalışmalar kısa ve kalın kuyrukları ile DFS spermatozoonları diğer spermatozoonlardan ayırt etmek için önemlidir. DFS tanısı, tüm fibröz kılıf değişiklikleri görülen spermatozoonlara dayanarak yapılır. Bu değişiklikler fibröz örtüde hipertrofi ve hiperplazi, mikrotübül etrafında kalın yüzük ve fibröz örtü şeklinde gözlenen normal veya bozuk aksonem şeklindedir. Orta parça oluşmuş değildir. Mitokondri az sayıda ya da hiç bulunmamaktadır.

Testiküler biopsiler veya immatür spermatid içeren semen üzerinde yapılan çalışmalar sonucu, bu defektlerin spermiyogenezis sürecinde fibröz kılıf organizasyon başarısızlığı ile ortaya çıktığı gösterilmiştir. DFS'li 50 hasta üzerindeki çalışma ile 10 hastanın erken çocukluk döneminden itibaren kronik solunum hastalığı geçirdiği gösterilmiştir. İki hasta üzerindeki ultrastrüktürel çalışma bronşiyal silyaların dinein kollarında eksik olduğunu göstermiştir ve ICS karakteristik bulguları görülmüştür.

DFS, şiddetli astenozoospemi veya total spermatozoon immotilitesi ile birlikte sistematik spermatozoon anormalitesidir. Fibröz kılıf ve aksonemal, periaksonemal yapıda homojen ve özgün bozulmuş fenotiple karakterizedir. Diğer androlojik bozukluklar gibi ikincil bir koşuldan etkilenmez ve çoğunlukla medikal tedavilere cevap vermez. DFS, fertilité açısından oldukça olumsuzdur. Bu hastalarda klasik IVF metodları fertilizasyonu ve gebeliği aktive etmede başarısızdır. ICSI bir tedavi seçeneği olabilir fakat genetik analiz gerektirir (65).

4.5.2. Teratozoospermide Spermatozoon Defektleri

Teratozoospermi, fertilité yetersizliği olan erkeklerde önemli bir neden olarak bildirilmiştir. Teratozoospermide iki tür tanımlanabilir:

İlk ve en sık görülen, morfolojik incelemede çok sayıda anomali ve farklı spermatozoon bileşenleri görülen teratozoospermidir. Bu heterojen modelde spermatozoondaki değişiklikler rastgeledir ve hiçbir ortak defekt görülmez. Yukarıda anlatılan NSFA tipi bu kategoriye aittir.

İkinci türde, spermatozoonların çoğunda homojen mikroskobik görüntü ve sistematik spermatozoon defekti görülür. Bu çeşitlilik; asefalik spermatozoon, yuvarlak baş akrozomlu spermatozoon, mini akrozom defektli spermatozoon, DFS ya da stump-tail defekti veya ICS'de dinein aksonem eksikliğidir.

4.5.3. Akrozom Eksikliği ve Akrozomal Hipoplazi

Yuvarlak başlı, akrozomsuz spermatozoonlar 20 yıl önce tespit edilmiştir. Ultrastrüktürel inceleme sonrasında akrozomun eksik ve kromatin kondansasyonunun yetersiz olduğu görülmüştür. Bu kusur spermatozoon analizlerinde tanınıyor olsa da bu hastaların semen incelemelerinin elektron mikroskobunda yapılması tavsiye edilmektedir.

Oval ve amorf spermatozoon başları da dahil olmak üzere farklı şekillerde akrozomsuz spermatozoonlar gözlenmiştir. Yuvarlak şekil ve akrozom gelişim eksikliği arasındaki ilişki mutlak bir kural değildir. Akrozomal anomalileri olan 35 hasta üzerinde yapılan çalışmada sadece 7 hastada akrozom eksikliği görülmüştür. 4 hastada da amorf ve oval kafalar ile akrozom eksikliği ilişkili bulunmuştur. Diğer 28 hasta hipoplaziktir. Herbir örnekte spermatozoonun % 35-70'ini kaplayan küçük akrozom vardır. Daha önce de literatürlerde bu spermatozoon defekti mini akrozom olarak bildirilmiştir.

Akrozomal hipoplazinin şiddetli teratozoospermi durumlarında araştırılması gerekir ve bu durum elektron mikroskobu ile kolaylıkla tanınabilir.

Zambani (1992)'ye göre akrozom hipoplazisi teratozoospermik erkeklerde sık görülmektedir. Fakat genellikle diğer anormal spermatozoon formlarına göre göz ardı edilmektedir (65).

Akrozomal agenezi veya hipoplazisi olan hastalar, akrozomal fonksiyon eksikliği nedeni ile infertildir. Ancak akrozomal hipoplazide, normal formda akrozoma sahip spermatozoon sayısına göre bazı hastalarda fertilizasyon olasılığı bulunmaktadır.

Akrozomsuz spermatozoon sendromunda birden fazla gende kalıtım olabileceği öne sürülmüştür.

Klasik IVF, akrozom eksikliği nedeni ile etkili değildir. Ancak başarılı ICSI kullanımı vardır (65).

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1 HASTA GRUPLARI

Bu çalışmaya infertilite merkezine başvurmuş olan yaşları 24-44 arasında değişen normospermi (sayı 20 milyon/ml ve üzeri, motilite % 50 ve üzeri, n=20) semen örnekleri dahil edildi.

Bu çalışmada yer alan her erkek grubunun % 50 motilite, 20 milyon üzeri spermatozoon sayısı ve en az % 4 (Kruger'e göre) normal morfoloji görülen normospermik olarak değerlendirildi. Yaş, sigara kullanımı, meslek etkileri, ilaç kullanımı gibi özellikler dikkate alınmadı. Rutin morfolojik preparatlarda üçlü boyamaları kullandığımız takdirde çekirdek, akrozom ve boyun kuyruk kısmında bariz değişiklikleri belirleyebilmekteyiz. Ayrıca rutin tedavilerde spermiyogram testi haricinde aşılama ve mikroenjeksiyon uygulamalarına hazırlanan spermatozoonlarda morfoloji değerlendirilmemektedir. Ancak çalışmamıza dahil edilen her örneğin bazal değerleri dikkate alınmıştır.

5.2 SEMEN TOPLANMASI VE ANALİZİ

Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle kliniğe gelen hastalardan, hastanın adının, soyadının yazılı olduğu steril kaplara, mastürbasyon yöntemi ile alındı. Semen alındığı saat not edildi. Oda ısısında yarım saat likefiye olması için bekletildi. Turnusol kağıdı ile pH (7,2-8,0) değerlendirmesi yapıldı. Cinsel perhiz süresi, vizkosite (normal), hacim (2-6 ml), renk (opak) ve hastaya özel likefaksiyon zamanı (30 dk) kaydedildi. Mililitredeki spermatozoon sayısını belirlemek üzere, Makler sayma kamarasına (Counting Chamber Makler, Sefi Medikal Instruments, İsrail) küçük bir damla semen örneği konuldu. Toplam spermatozoon sayısı ve progresif hareketli ve immotil spermatozoon sayısı ile motilite değerlendirmesi yapıldı.

Spermatozoon konsantrasyonu, motilite ve morfolojisi için standart manuel teknikler uygulandı. Motilite ve konsantrasyon ışık mikroskopunda X20 büyütmede WHO

kriterlerine göre en az 100 spermatozoon sayılarak yapıldı. Makler sayma kamarasına (Makler chamber, Sefi Medikal Instr. İsrail) 10µl semen koyularak ve X20 büyütme altında 10 kare sayılarak konsantrasyon ve motilite belirlendi.

Morfolojik skorlama için lam üzerine yayılarak hazırlanan semen preparatları Spermac boyama yöntemi ile boyandı. Morfoloji, faz kontrast mikroskopta, X100 büyütmede Kruger kriterlerine göre değerlendirildi.

5.3. SPERMATOZOON BOYAMA VE MORFOLOJİ DEĞERLENDİRMESİ

Morfolojik değerlendirme için bir lama bir damla semen örneğinden damlatıldı. Damlatılan semenin miktarını spermatozoon sayısına bağlı olarak ayarlandı. İkinci bir lam aracılığı ile bu damlayı slayt üzerine yayılıp hava ile kurutuldu. İstenilen boyama, Spermac boyama (Ferti Pro NV, Industriepark Noord, Belçika) yöntemi ile boyandı.

Lam üzerine yayılıp kurutulmuş preparatlar, fiksatif solüsyonunda 10 dk bekletildi. Fiksatif su ile arandıktan sonra suyu süzülerek A,B,C (Ferti Pro NV, Industriepark Noord., Belçika) solüsyonlarından 1,5 dk olacak şekilde sırayla boyama işlemi yapıldı. Kuruması için beklendi. İmmersiyon yağı kullanılarak X100 büyütmede incelendi. Morfoloji değerlendirmesi yaparken 100 spermatozoon dikkate alındı. Her anomali ayrı ayrı not edildi.

5.4. PENTOKSİFİLİN (PF) UYGULAMA PROTOKOLÜ

Tüm sistem bileşenleri ve örnek oda sıcaklığına ya da 37°C'ye getirilir. Steril santrifüj tüpüne silika density solüsyonu ile gradient hazırlanır. Üzerine 2 ml likefiye olmuş semen eklenerek 350-400 g'de 15-20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında gözle görülür pellet yok ise prosedüre 5 dk'lık ikinci santrifüj ile devam edilir. Sperm wash medyumunda PF ile (1 mg/ml) stok solüsyon hazırlanır. Süpernatant atılıp süspansiyon edilen pellete 1 ml stok PF eklenir. Nihai konsantrasyonun 1,76 mM olması sağlanır. 37°C'de **15 dk**'lık inkübasyon sonrasında 300 g'de 8-10 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılarak pellete

4 ml sperm wash medyumunu eklenir. 300 g'de tekrar 8-10 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılarak üzerine uygun medyum eklenir.

5.5. PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR (PAF) UYGULAMA PROTOKOLÜ

Tüm sistem bileşenleri ve örnek oda sıcaklığına ya da 37°C'ye getirilir. Steril santrifüj tüpüne silika density solüsyonu ile gradient hazırlanır. Üzerine 2 ml likefiye olmuş semen eklenerek 350-400 g'de 15-20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında gözle görülür pellet yok ise prosedüre 5 dk'lık ikinci santrifüj ile devam edilir. PAF'a 10 ml sperm wash eklenir ve kullanmadan önce 1 dk boyunca vortekslenir. Sperm wash medyumuna 3 ml PAF eklenir ve pellet tekrar süspanse edilir. Final konsantrasyonun 10^{-7} M olması sağlanır. 37°C'de **15 dk** inkübe edilerek 300 g'de 8-10 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılarak pellete 4 ml sperm wash eklenir. 300 g'de tekrar 8-10 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılarak üzerine uygun medyum eklenir.

5.6. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) PROTOKOLÜ

Semen örnekleri % 2,5'lük 1,1 M fosfat tampon (PBS)'lu (pH 7,2) glutaraldehit fiksatifi içerisinde +4°C'de 4 saat immersiyon fiksasyonu yapıldıktan sonra tamponda yıkanacak, sonrasında % 1'lik osmiyum tetraoksitle 1 saat postfiksasyon yapılacaktır.

Membrandaki glikokaliks yapısını göstermek için de rutenyum kırmızısı boyama metodu kullanılacaktır. Distile su ile % 0,003 dilüsyonda stok rutenyum kırmızısı hazırlanacaktır (rutenyum kırmızısı:distile su = 3:10000). Hazırlanan stok rutenyum kırmızısı 5:1 oranında fosfat tamponunda hazırlanmış % 2,5 glutaraldehit ile 2 saat fikse edilen spermatozoa PBS ile yıkandıktan sonra 5:1 oranında % 1'lik osmiyum tetraoksit karışımı rutenyum kırmızısı ile 1 saat süresince post-fikse edilir. PBS ile yıkanan örneklerin 1 saat boyunca 5:1 oranında distile su ile hazırlanmış % 2'lik uranil asetat:rutenyum kırmızısı içinde bekletilerek boyanmaları sağlanır. Yükselen alkol serilerinden (% 70, % 90, % 96, % 100) geçirilerek dehidrate edilecek dokular, propilen oksitten geçirilir. Propilen oksit + Epon (1:1) karışımında 20 dakika, propilen oksit + Epon

(1:2) karışımında 1 gece ve Epon da 3 saat muamele edilir. Epona gömülen örnekler, 60 °C'lik etüvde 24 saat bekletilir. Ultramikrotomda (Reichert, Supernova ultramicrotome) cam elmas bıçakla alınacak olan yarı ince kesitler (1 µm) toluidin mavisi ile boyanacaktır. Yarı ince kesitlerde yer tayini yapıldıktan sonra bakır gridler üzerine alınacak olan yaklaşık 60 nm kalınlığındaki ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanacaktır. İnce kesitler Jeol JEM 1011 TEM ile incelenip fotoğraflanacaktır.

6. BULGULAR

Çalışmamızda, herhangi bir ajan ile muamale olmamış kontrol grubu, pentoksifilin (PF) ve platelet aktive edici faktör (PAF) ile muamele edilen normozoospermik semen örnekleri (n=20) değerlendirmeye alındı. Bununla birlikte spermatozoonların membran yapısında bulunan glikokaliks rutenyum red boyası ile belirginleştirilerek geçirimli elektron mikroskobunda kıyaslanarak incelendi. Son olarak oluşturulan kontrol grubu (n=6) ile PF ve PAF (n=14) uygulanmış grupların spermatozoon motilitesi ve ince yapıları üzerindeki etkileri karşılaştırılarak değerlendirildi.

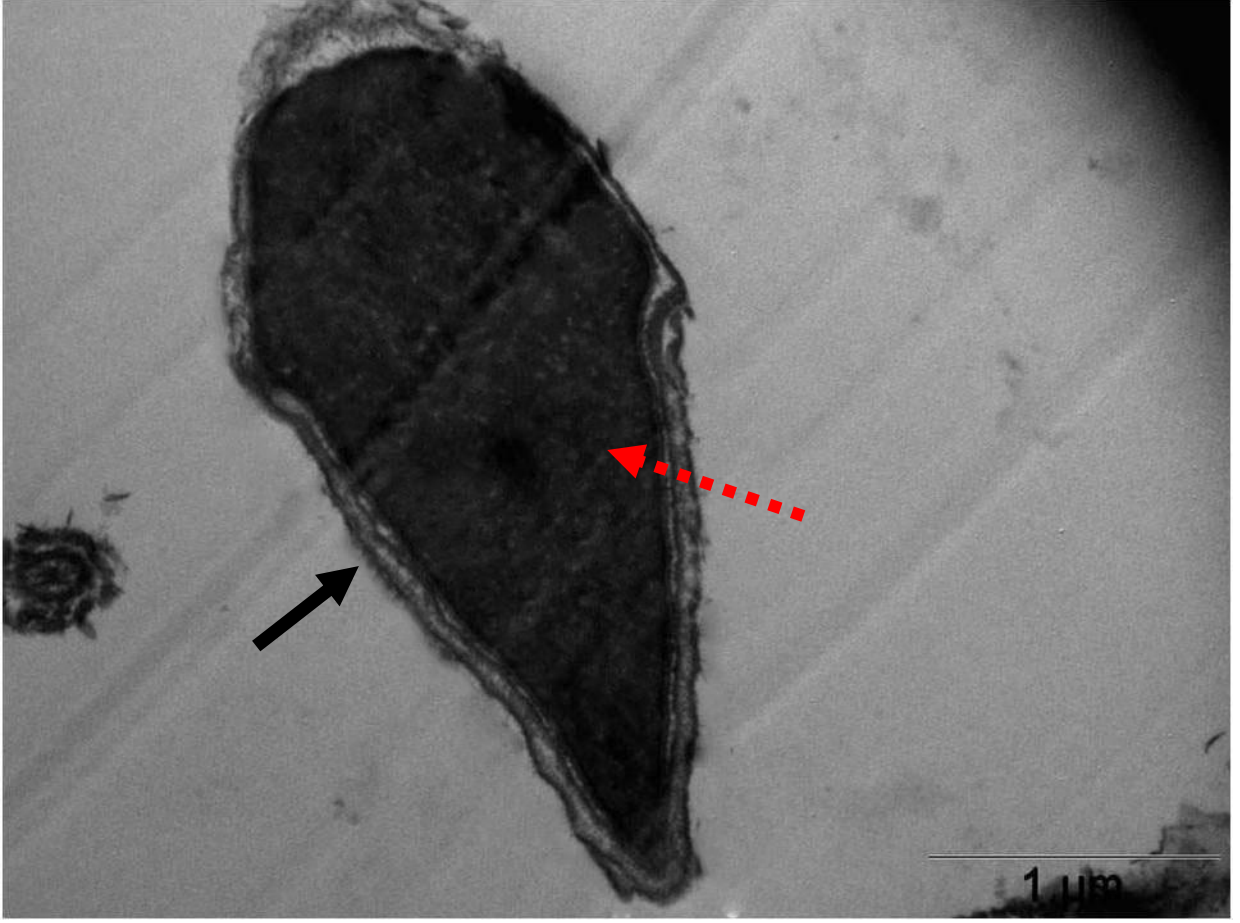
6.1. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) BULGULARI

6.1.1. Normospermi Deney Grubunun Elektron Mikroskobik Bulguları

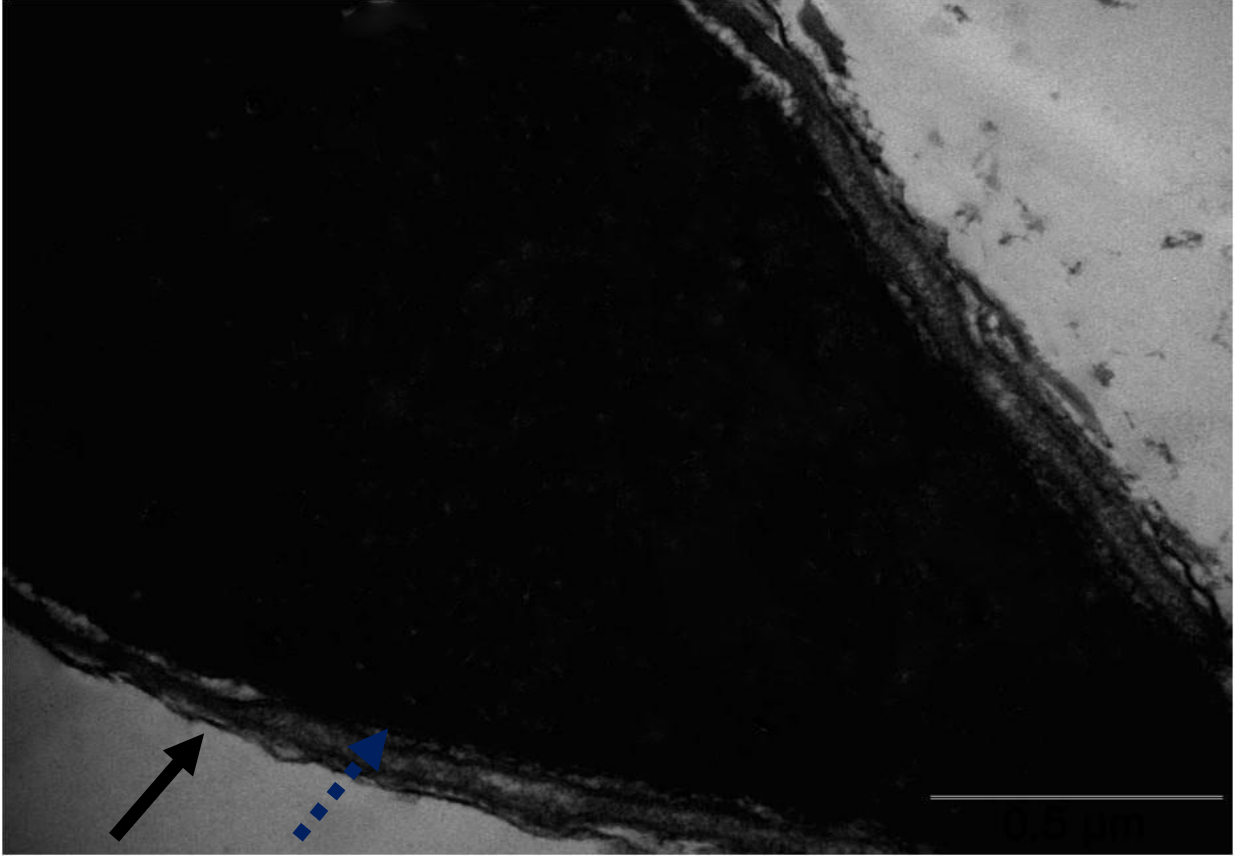
Geçirimli elektron mikroskobu çalışmamızda, normosperminin herhangi bir ajana maruz kalmamış kontrol grubu ile PF ve PAF uygulanmış gruplar incelendi. Bu örneklerimizin, spermatozoonda baş ve kuyruk olmak üzere 2 kısmı değerlendirildi.

Normospermi grubunda, spermatozoonların baş kısmındaki nukleusun ve plazma membranının korunmuş olduğu (Resim 1 ve Resim 2) görüldü.

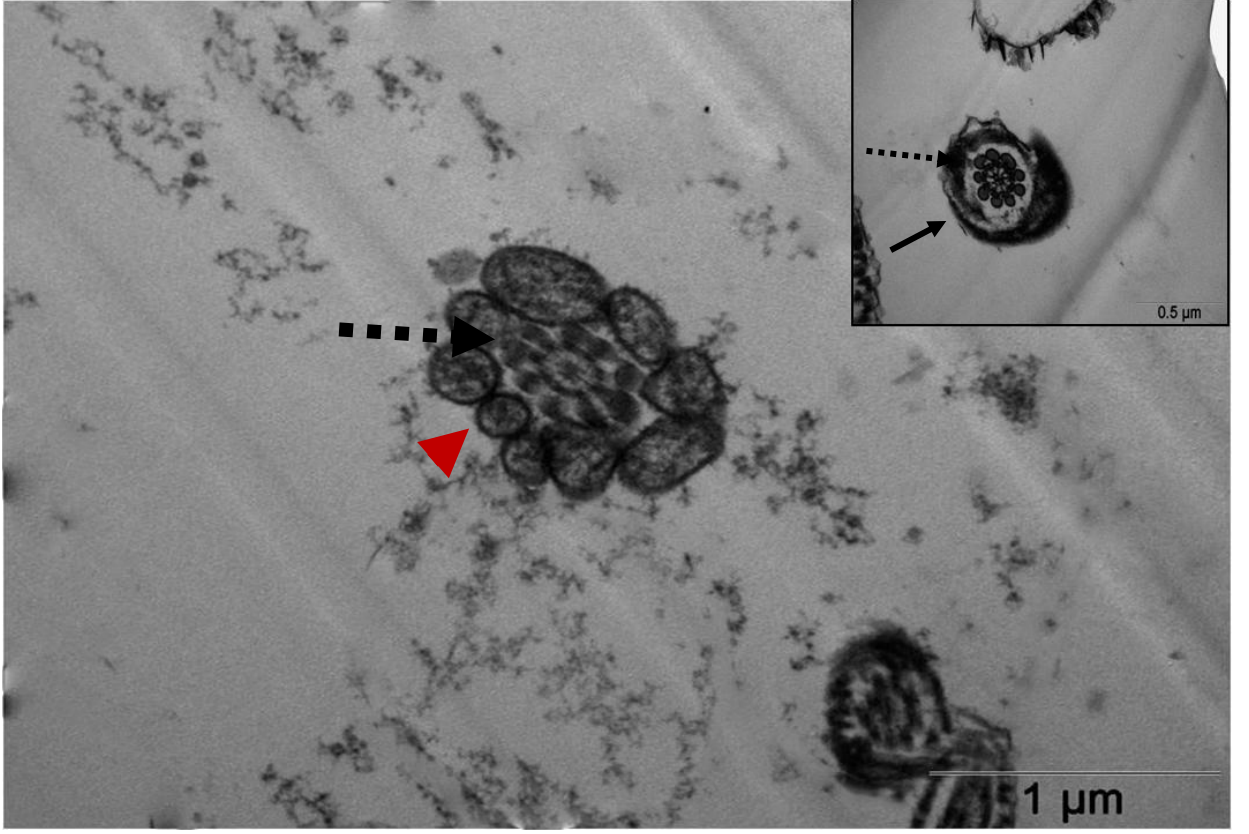
Normospermi grubundaki örneklerimizde kuyruğun orta parçasında yer alan düzgün morfolojiye sahip mitokondriyumlar, 9+2 aksonem ve fibröz örtü yapısının bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi (Resim 3).



Resim 1. Normospermi grubunda; plazma membranı (—————>) ve nukleus bütünlüğü (.....>) korunmuş normal spermatozoon baş görüntüsü. Büyütme: X30000.



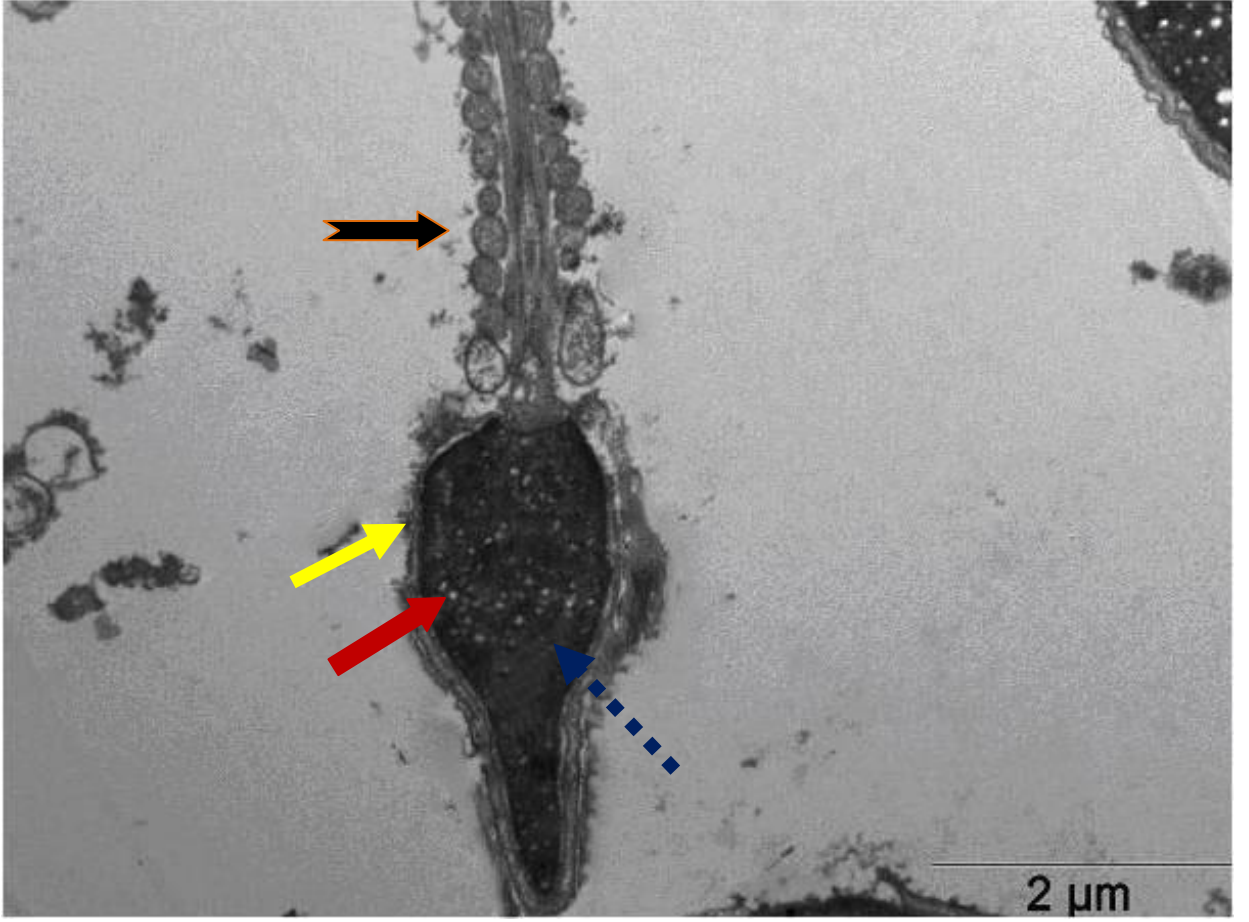
Resim 2. Normospermi grubunda; plazma membranı (—▶) ve nukleus bütünlüğü (•••▶) korunmuş normal spermatozoon baş görüntüsü. Büyütme: X60000.







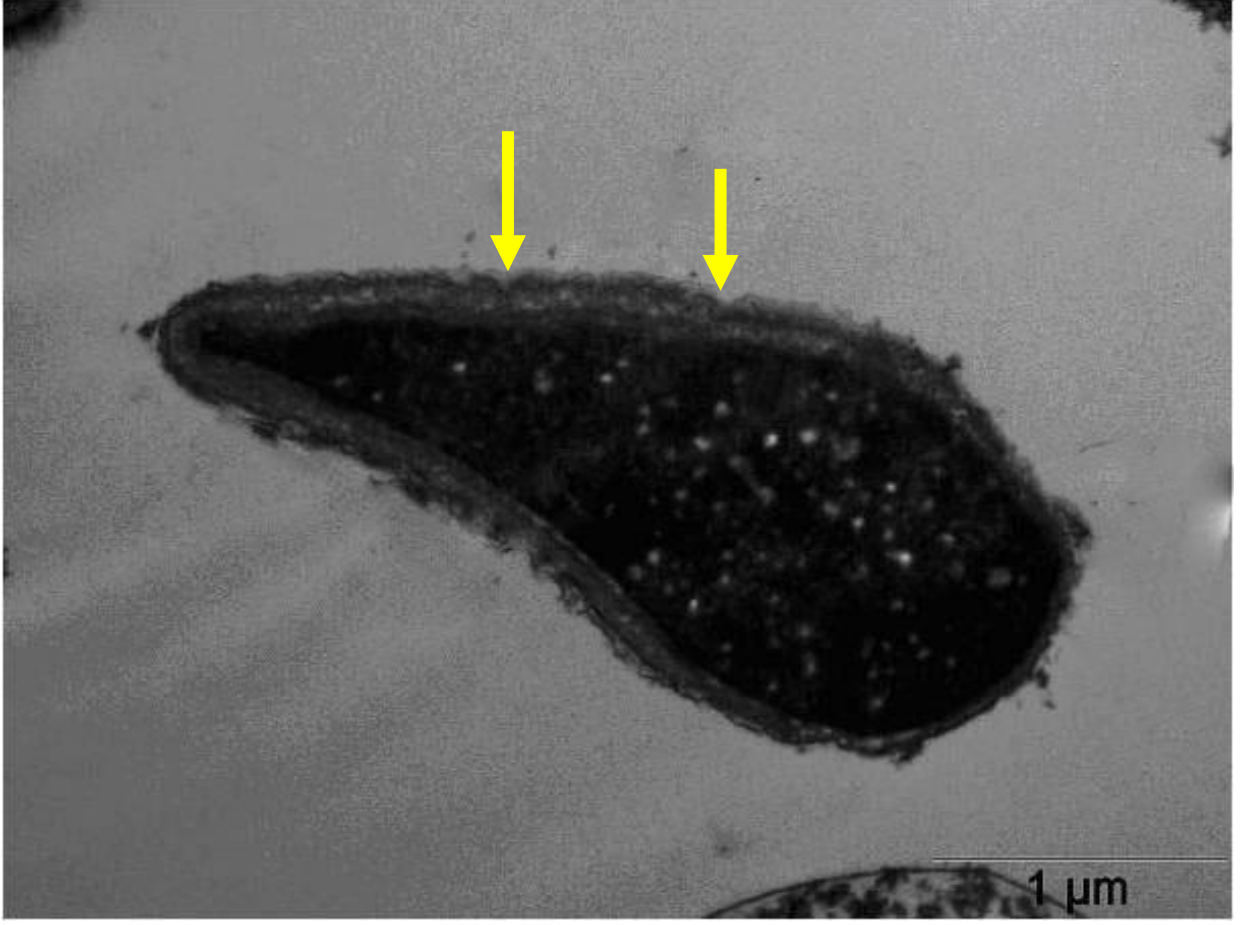
Resim 3. Normospermi grubunda; flagella'nın orta parçasında normal fibröz örtü (—→), düzgün morfolojiye sahip mitokondriyumlar (▲) ve aksonem (- - - ->) yapısı. Büyütme: X 30000 (inset) X60000.

6.1.2. Pentoksifilin (PF) ile Muamele Edilen Grubun Elektron Mikroskopik Bulguları

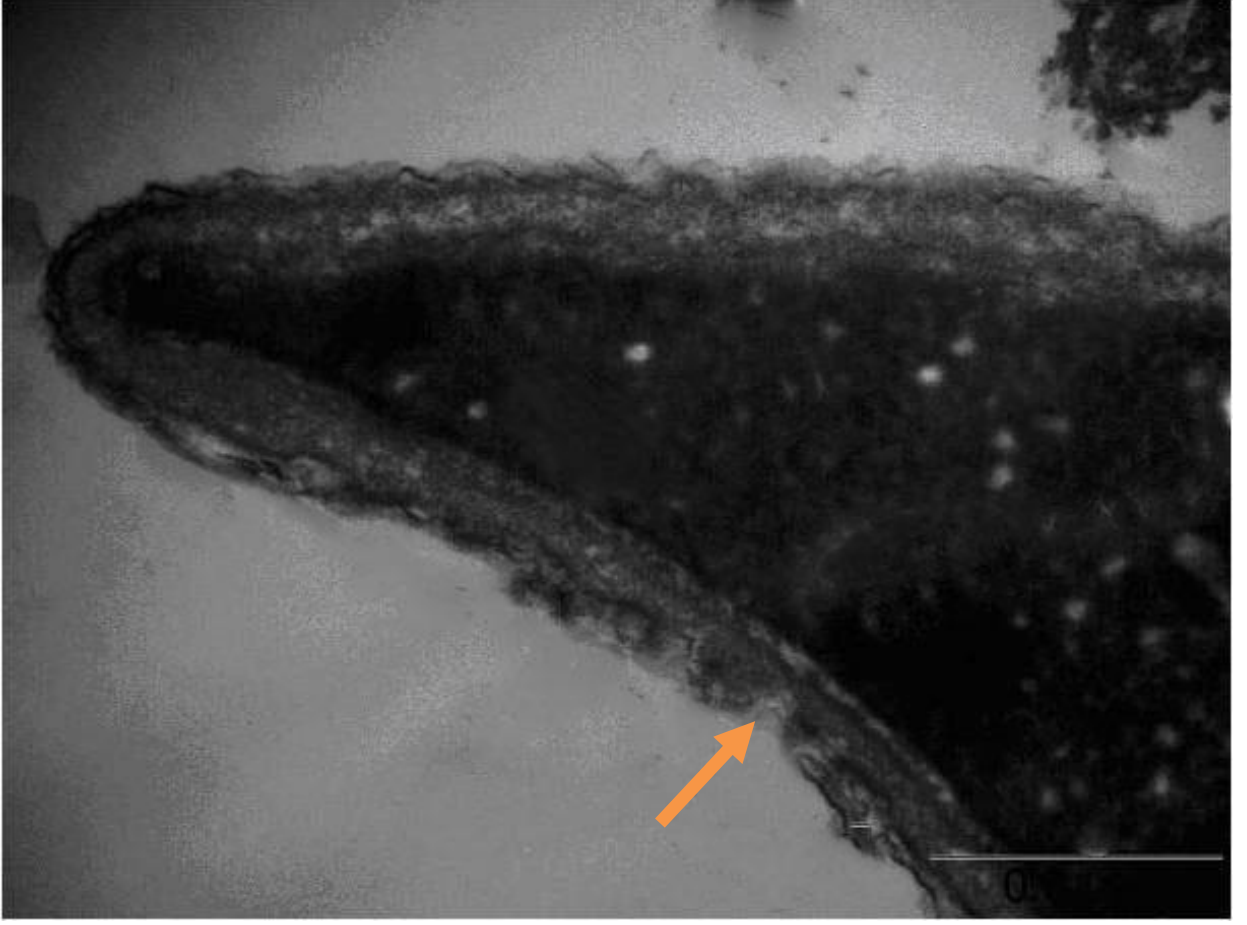
Pentoksifiline 15 dk maruz kalmış gruptaki spermatozoonların baş kısmının plazma membran yapısında (glikokaliks) yer yer bozulmalar olduğu (Resim 4, Resim 5 ve Resim 6) ve vakuollü ve granüllü bir kromatin yapısına sahip olduğu (Resim 4) görüldü. Bu gruba ait spermatozoonların bağlantı bölgesinde düzgün sentriyol görüntüsüne rastlanırken (Resim 7) spermatozoonların kuyruk kısmında da düzenli sıralanmış mitokondri yapısı görüldü (Resim 4). Kuyruk kısmının orta parçasında, motilitede önemli rol oynayan aksonem yapısındaki 9+2 bütünlüğünün düzgün olduğu, ancak çevresindeki mitokondriyon kristallarının kaybolduğu görüldü (Resim 8). Spermatozoon kuyruğunun esas kısmında da kontrole yakın aksonem yapısı ve dinein kolları görüldü (Resim 9).



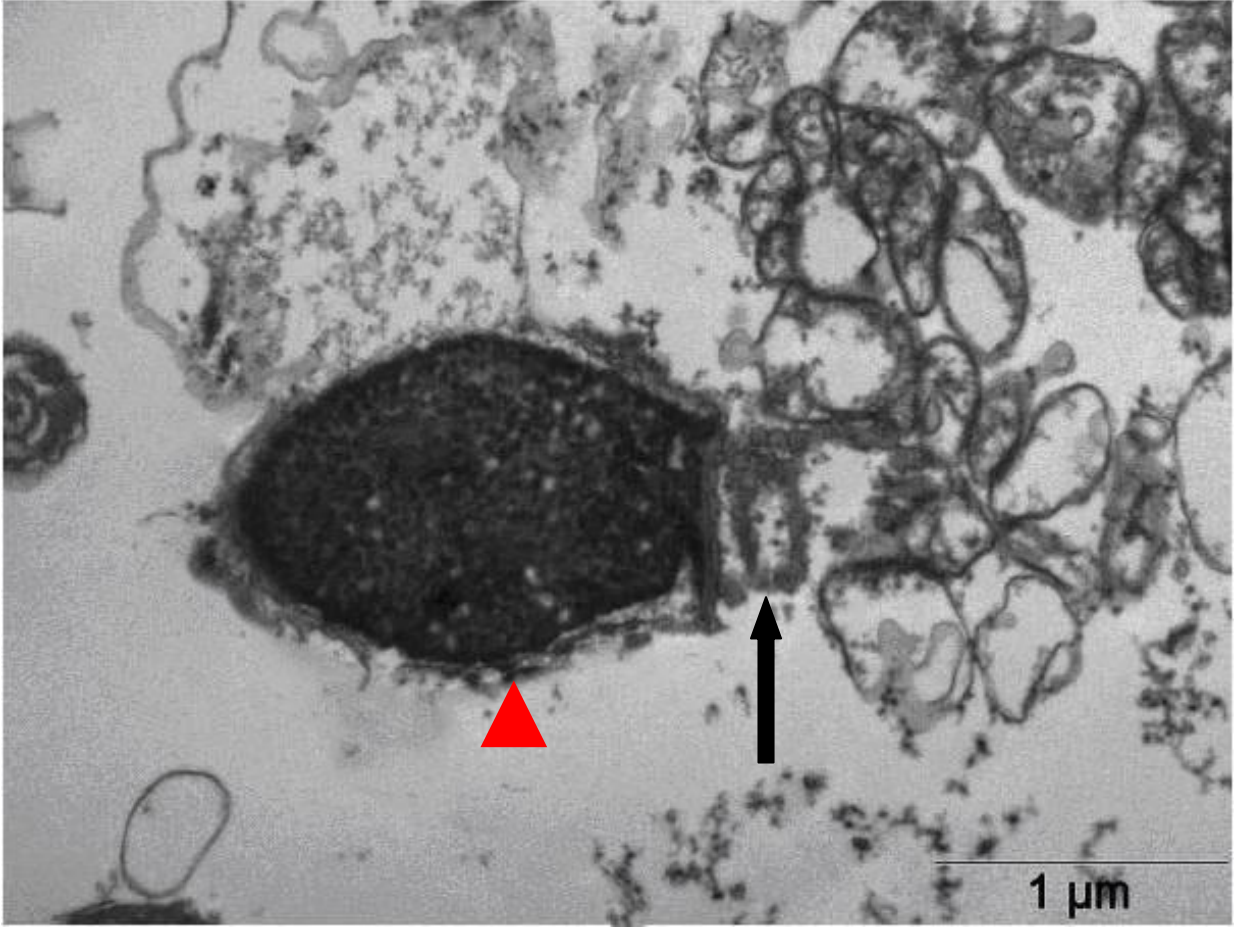
Resim 4. PF'e maruz kalan grupta; spermatozoon başı membran yapısında yer yer bozulmalar (), kromatinde granüler () ve vakuollü yapı () ile düzenli sıralanmış mitokondri () görüntüsü. Büyütme: X15000.



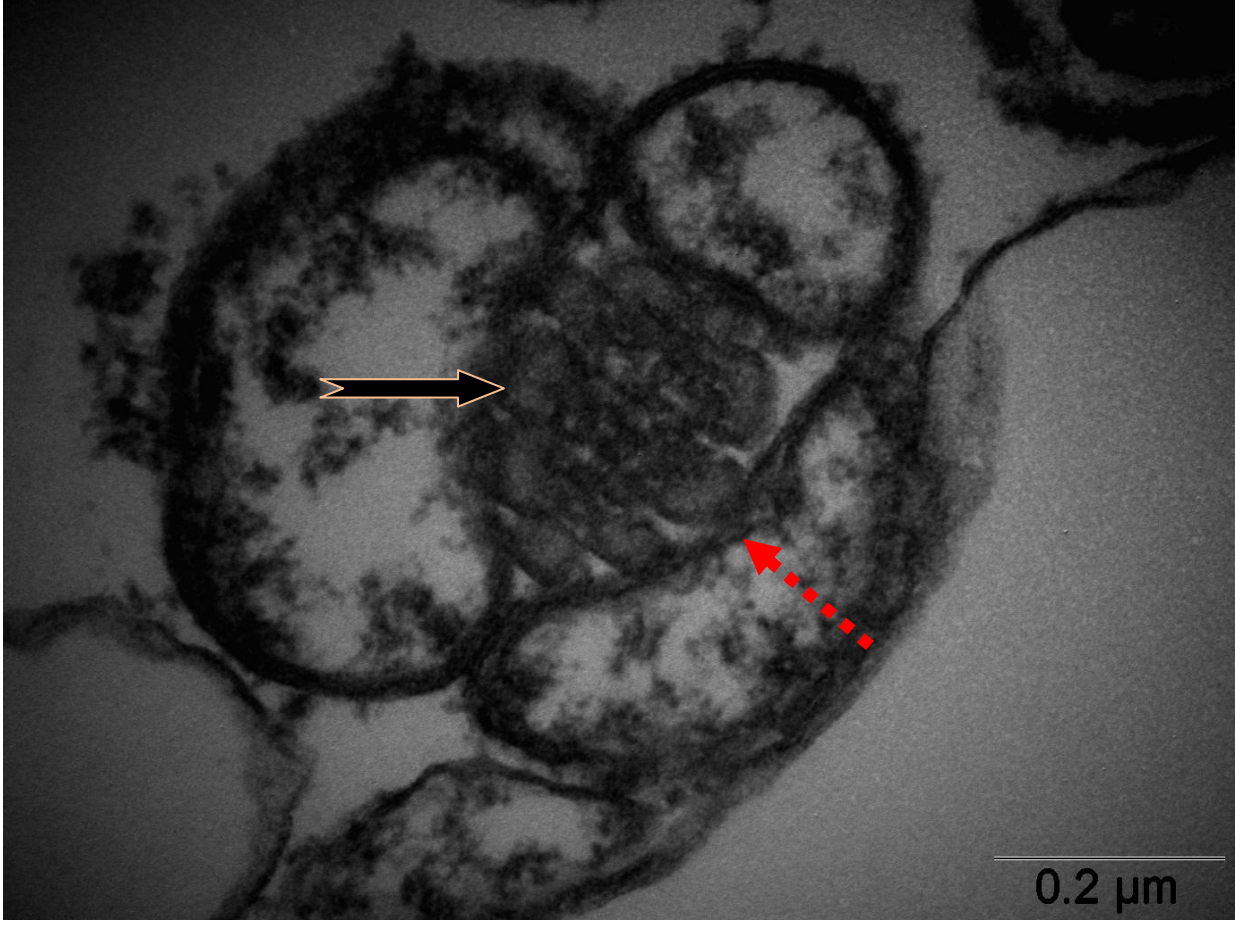
Resim 5. PF'e maruz kalan grupta; spermatozoon başının membran yapısında yer yer bozulmalar (→). Büyütme: X30000.



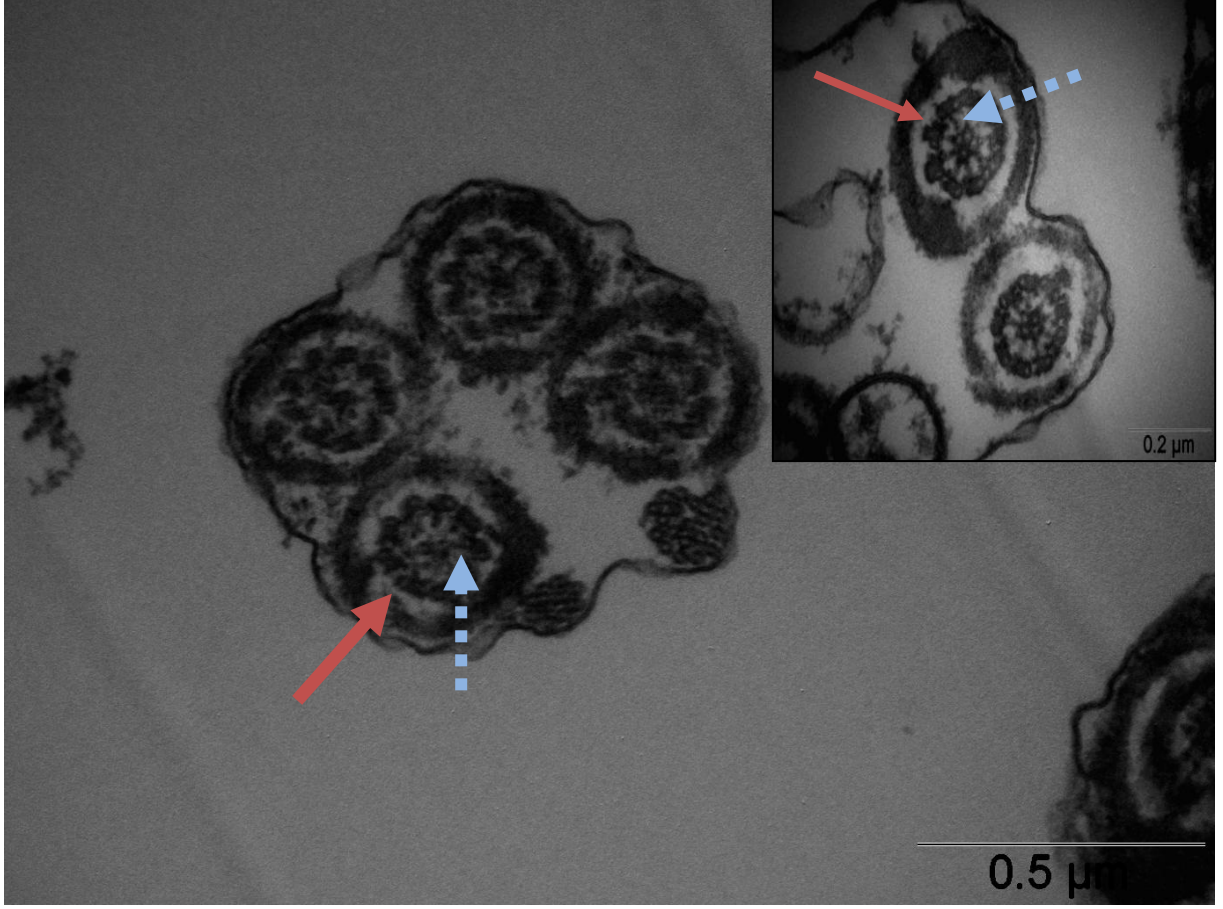
Resim 6. PF'e maruz kalan gruptaki spermatozoon baş membranında yer yer bozulmalar (→). Büyütme: X60000.



Resim 7. PF'e maruz kalan gruptaki spermatozoonda baş (▶) ve sentriyol görüntüsü (➔). Büyütme: X30000.



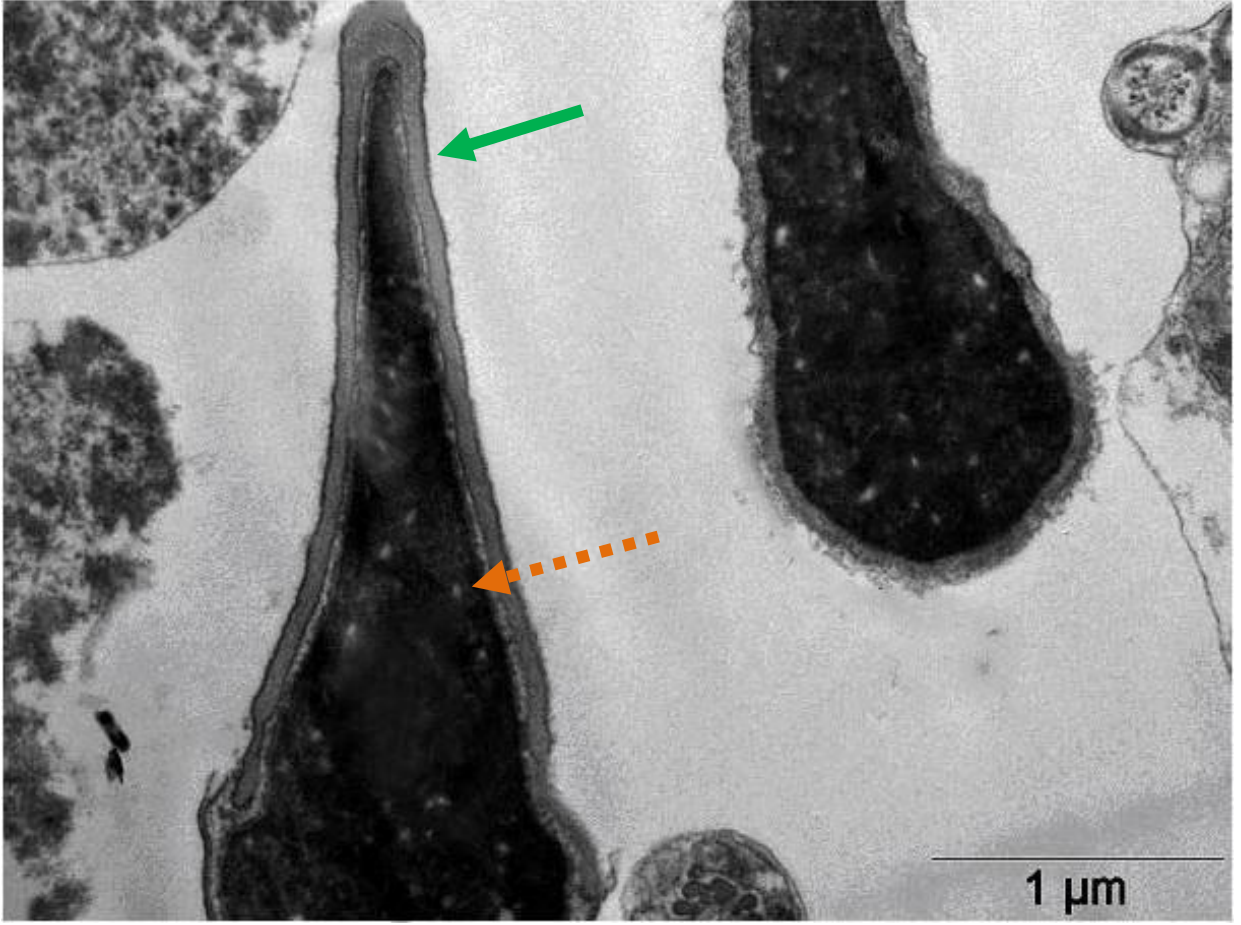
Resim 8. PF'e maruz kalan grupta; spermatozoonun orta kısmındaki aksonem yapısındaki (9+2) bütünlüğünün düzgün olması (→) ve çevresindeki mitokondri yapılarındaki kristalarının kaybı (---→) görüntüsü. Büyütme: X120000.



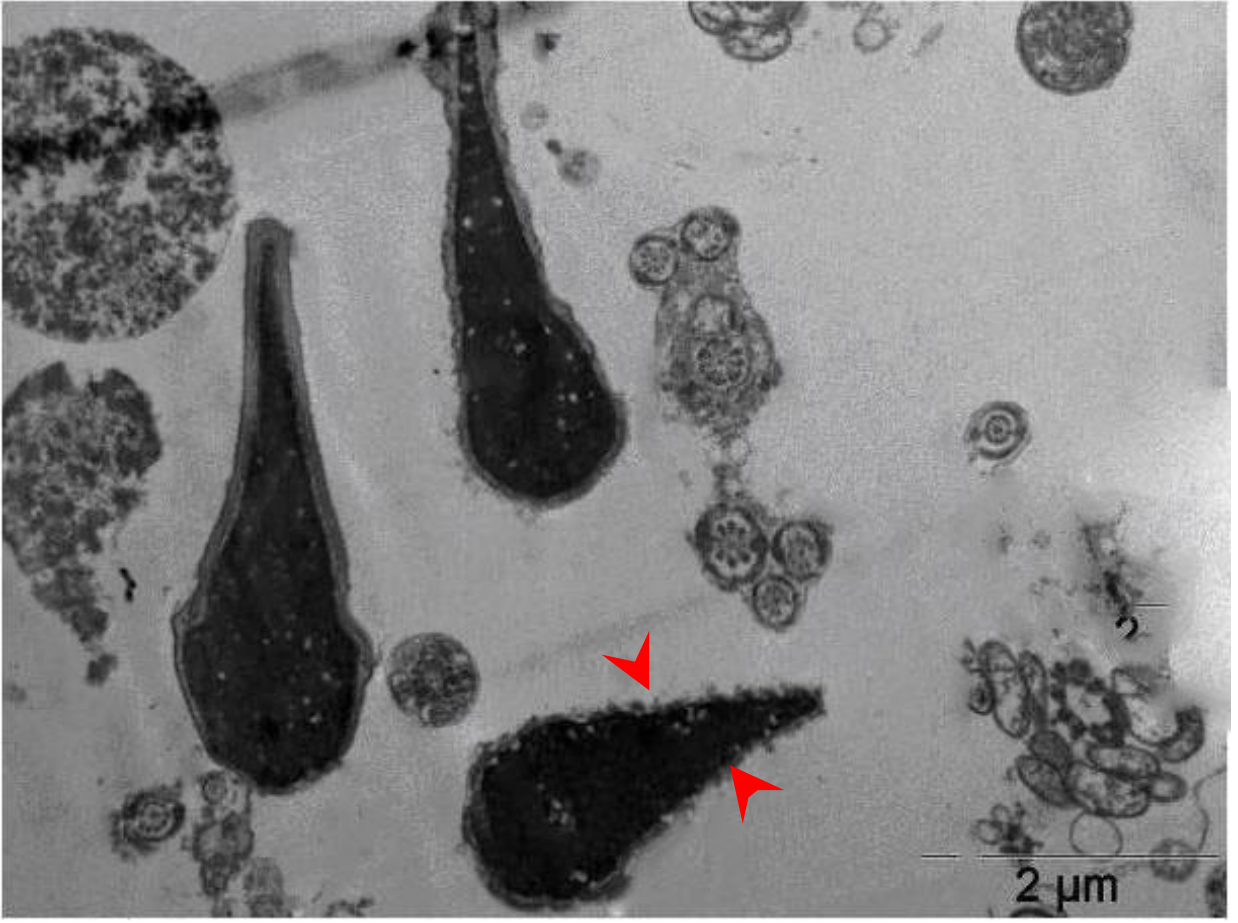
Resim 9. PF'e maruz kalan grupta; spermatozoon kuyruğunun esas kısmında kontrole yakın aksonem yapısı (→) ve dinein kollarının (---▶) görüntüsü. Büyütme: X120000 (inset) X60000.

6.1.3. Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) ile Muamele Edilen Grubun Elektron Mikroskopik Bulguları

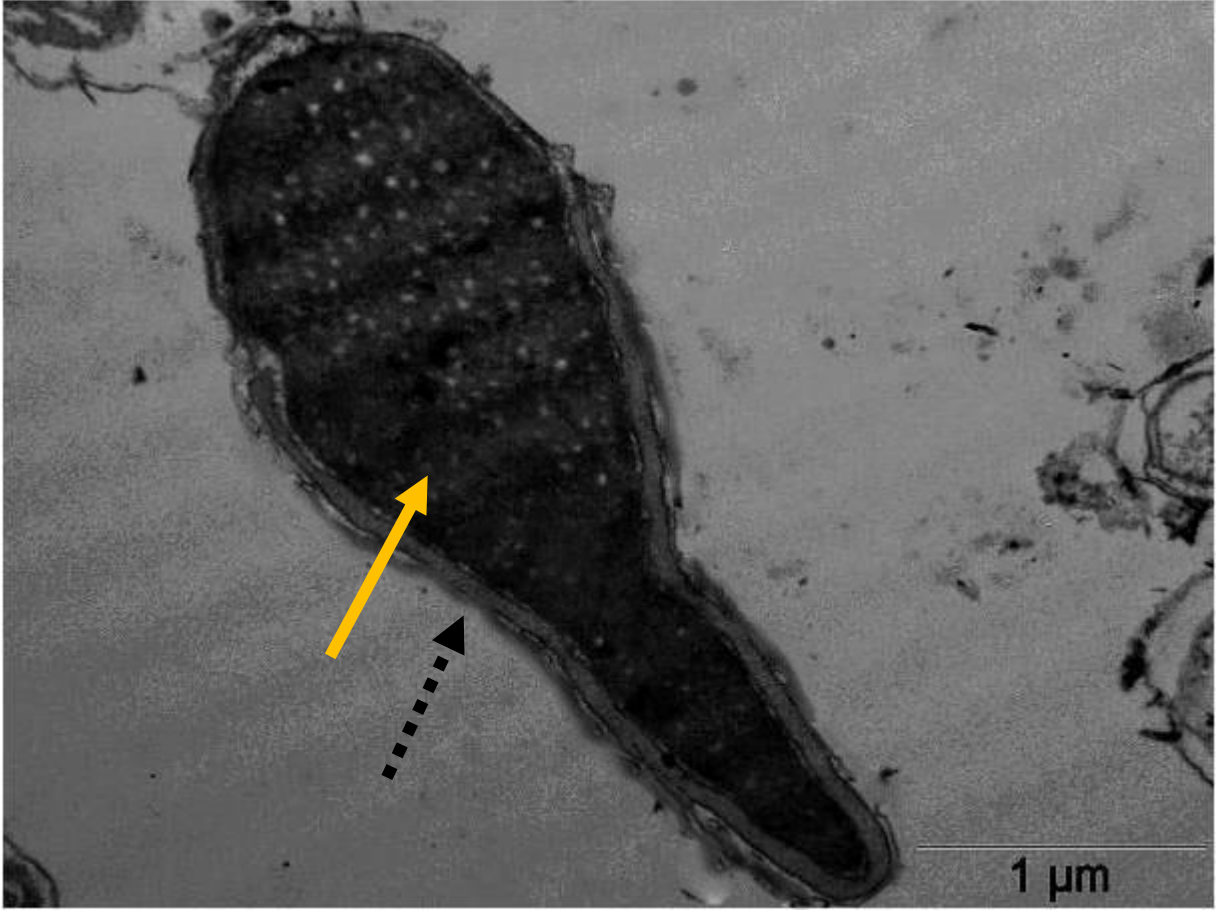
Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)'e maruz kalmış gruplarda elonge başlı spermatozoonların olduğu gözlemlendi (Resim 10). Bu spermatozoonların baş kısmının plazma membran yapısının yer yer bozulduğu (Resim 11) vakuollü ve granüllü bir kromatin yapısına sahip olduğu (Resim 10, Resim 12 ve Resim 13) görüldü. Bu grubun bazı örneklerinde atılamamış sitoplazmik artığın yer aldığı (Resim 14) gözlemlendi. Bu gruba ait spermatozoonların bağlantı bölgesinde düzgün sentriyol ve kristaları belirgin olan mitokondrilere rastlandı (Resim 13). Ancak spermatozoonların kuyruk kısmının orta parçasında yer alan mitokondriyonların kristalarının kaybolduğu ve mitokondri matriks bölgesinin vakuollü bir görünüm aldığı gözlemlendi (Resim 15). Bunun yanı sıra spermatozoonların kuyruğunun esas parçasında, motilitede önemli rol oynayan 9+2 aksonem yapısının düzgün ve düzenli sıralanmış fibröz örtünün olduğu görüldü (Resim 16).


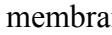


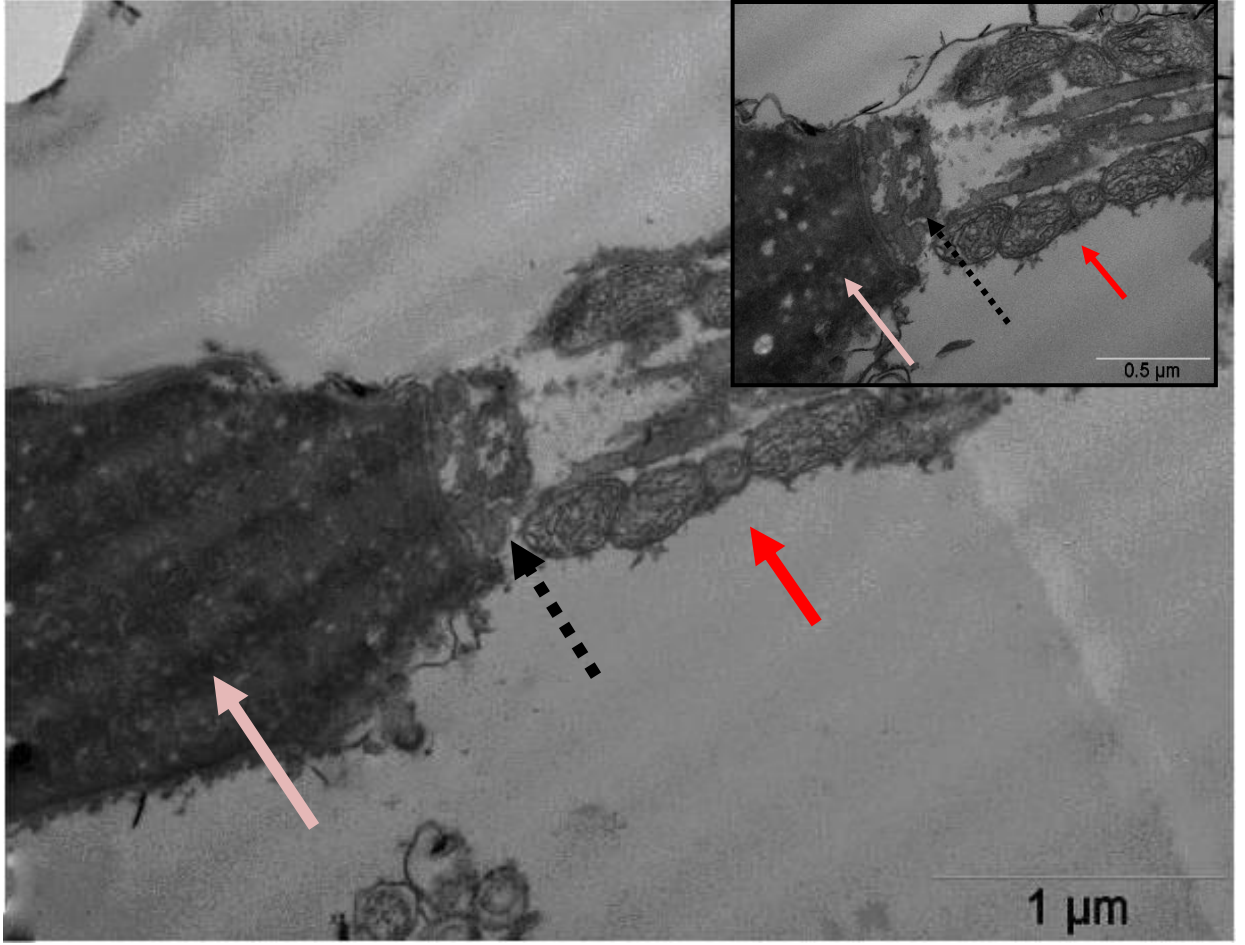
Resim 10. PAF'a maruz kalan gruptaki; spermatozoon baş kısmının ince uzun bir yapı aldığı (→) ve vakuollü yapıların görüntüsü (---→). Büyütme: X30000.



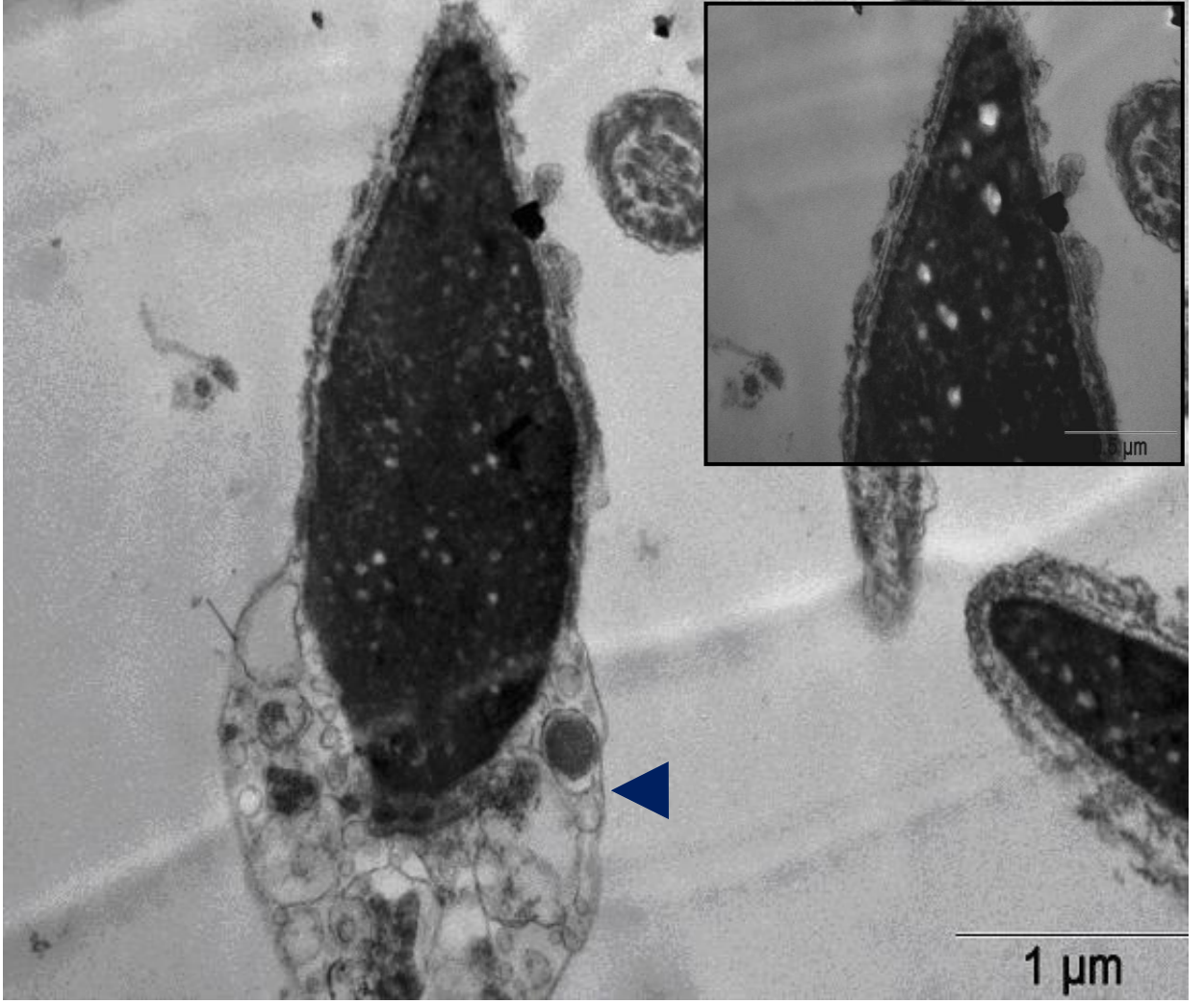
Resim 11. PAF'a maruz kalan gruptaki; spermatozoon baş kısmındaki membran yapısında yer yer bozulmalar (➤). Büyütme: X15000.




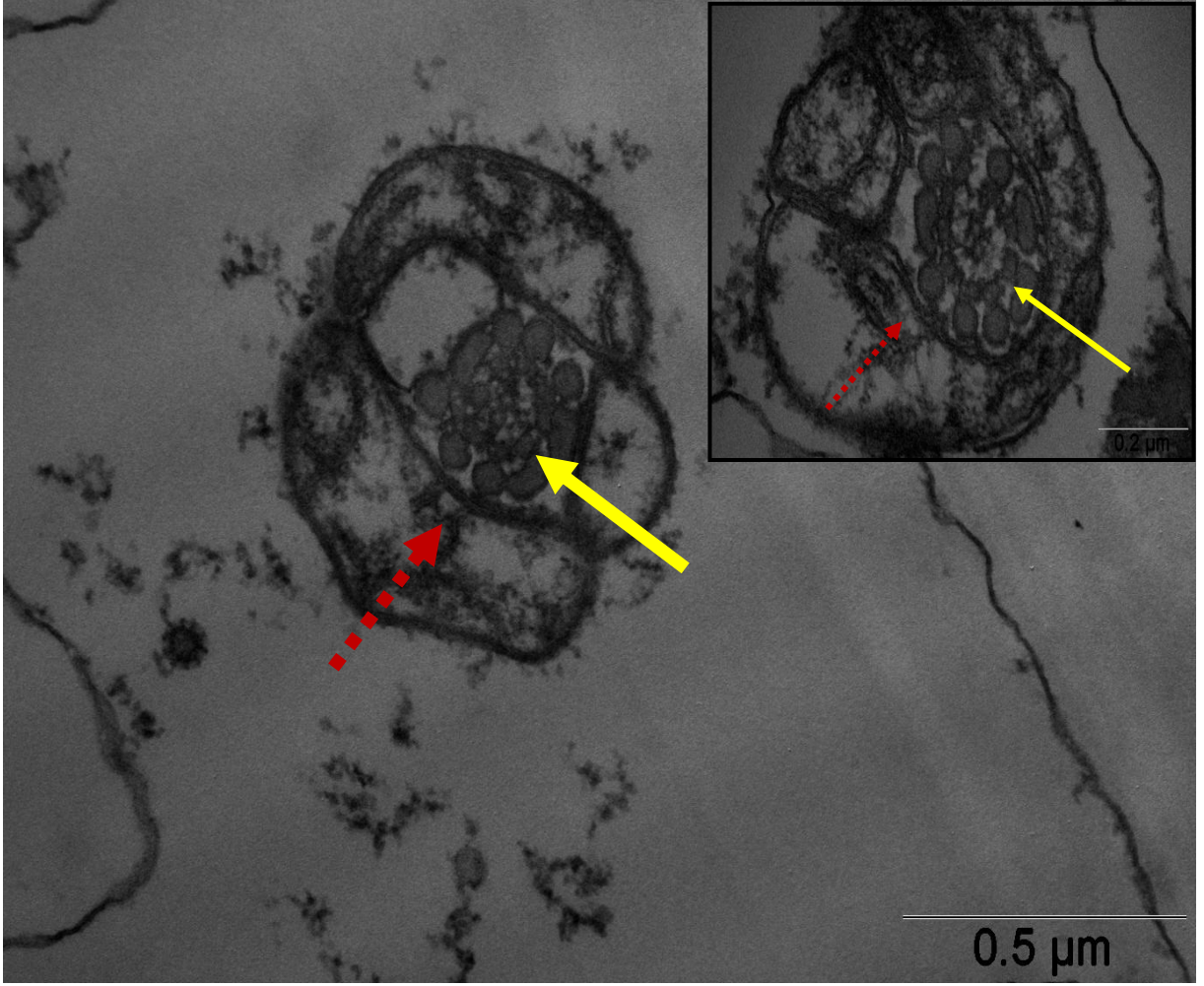
Resim 12. PAF'a maruz kalan gruptaki; spermatozoon başındaki, granüler kromatin () ve düzgün plazma membranı görüntüsü (). Büyütme: X60000.



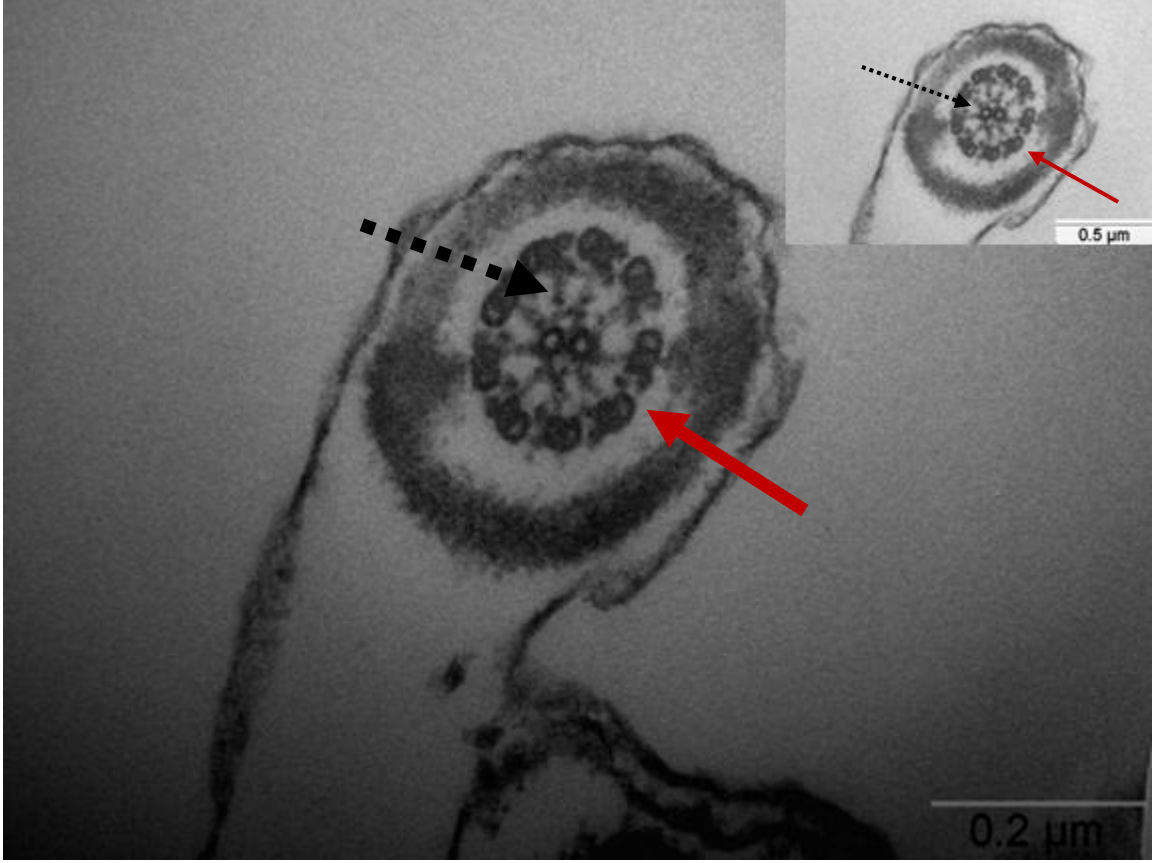
Resim 13. PAF'a maruz kalan gruptaki spermatozoonun baş bölgesindeki granüllü görüntüsü (—→) ve bağlantı bölgesindeki düzgün sentriol (.....▶) ve mitokondri yapısı (—→). Büyütme: X30000 (inset) X60000.



Resim 14. PAF'a maruz kalan gruptaki spermatozoonun baş bölgesinde sitoplazmik artık (). Büyütme: X25000 (İnset) X60000.



Resim 15. PAF'a maruz kalan gruptaki spermatozoonun orta kısmındaki aksonem yapısındaki (9+2) bütünlüğünün düzgün olması (—→) ve çevresindeki mitokondri yapılarındaki kristallerinin kaybı (.....→) görüntüsü. Büyütme: X60000 (inset) X120000.



Resiml 16. PAF'a maruz kalan gruptaki; spermatozoon kuyruğunun esas kısmında kontrole yakın aksonem yapısı (→) ve dinein kollarının (••••→) görüntüsü. Büyütme: X120000 (inset) X60000.

7. TARTIŞMA

İnfertilite, en az bir yıl korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalınamaması durumu olarak tanımlanır (1). Dünya genelinde infertilite her yedi çiftten birini etkilemektedir (66). 2008 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmada 6,5 milyon çiftin çocuk sahibi olamadıkları için infertilite kliniklerine başvurdukları bildirilmiştir . İnfertilite sebepleri incelenirken olguların % 50'sinde sadece kadın faktörünün, % 30'unda sadece erkek faktörünün ve geri kalan % 20'lik grupta da hem erkek hem de kadın faktörünün sorumlu olduğu görülmüştür (1). Bu endişe verici veriler infertilitenin WHO tarafından artık hastalık sınıfına alınmasına neden olmuştur (67).

Erkek faktörüne bağlı infertilite, düşük sayıda spermatozoon üretimi, spermatozoon motilitesinde azalma veya spermatozoon morfolojisinin yetersiz oluşu gibi özelliklerin tek başına veya birkaçının birlikte görüldüğü durumlarda ortaya çıkmaktadır. Morfolojinin IVF'te gebelik oranları üzerine etkisi olduğu bilinmektedir (2).

Yetmişli yıllardan itibaren uygulanmaya başlanan IVF ve 1992'den itibaren uygulanan ICSI yöntemleri, erkek infertilitesi başta olmak üzere günümüzde infertilite tedavisinde umut kaynağı olmuştur (68). Klasik IVF, pek çok infertil çift için etkili bir tedavi yöntemi olmasına rağmen şiddetli erkek infertilitesinin görüldüğü vakalarda etkili değildir (69). Böyle durumlarda bireyin spermatozoonunun direkt oosit içine enjekte edildiği ICSI tekniği uygulanmaktadır. İngiltere'de yaklaşık olarak tüm IVF vakalarının % 52'sini ICSI oluşturmaktadır (70). Bu tekniğe rağmen, halen ICSI sikluslarının % 1-5'i başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (71).

Bu başarısız sonuçlar bilim adamlarını döllenme oranlarını arttırmaya yönelik farklı farmakolojik ajanlar kullanma yoluna sevk etmiştir. Fakat şimdiye kadar yapılan çalışmalarda bu ajanların embriyo gelişimi üzerindeki kesin etkisi belirlenmiş değildir. Çalışmamızın, YÜT'de kullanılmaya başlanan bu ajanların spermatozoon ince yapısındaki etkilerini belirleyerek embriyo gelişimi üzerindeki etkisine ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Spermatozoonun fertilizasyon yeteneğini etkileyen en önemli iki parametre morfolojik özelliği ve motilitesidir (2). Bu ajanlar içinde bulunan PF, IVF laboratuvarlarında motiliteyi arttırmaya yönelik en yaygın kullanım alanı bulan ajandır.

PF, bir metilksantin bileşiği olup kafein ve teofilin ile aynı farmakolojik sınıfa aittir. Kafeine olan üstünlüğü yarı ömrünün daha uzun ve suda çözünürlüğünün daha fazla

olmasındandır. Bu gruba ait ajanların, fosfodiesterazı inhibe ederek hücre içi cAMP düzeyini arttırdığı bilinmekte ve bu yolla ATP yapımını kolaylaştırarak spermatozoon motilitesinde artışa neden olacağı savunulmaktadır (72). PF etkisiyle biriken cAMP, spermatozoon kuyruğundaki protein fosforilasyonunu indükleyen cAMP'ye bağımlı kinazları uyarır ve böylece spermatozoon motilitesinde artış görülür (74). cAMP, akrozom reaksiyonunun indüklenmesinde ikinci haberci olduğundan fosfodiesterazların spesifik olmayan inhibisyonu metilksantin ile hücre içi cAMP seviyesini arttıracığından akrozom reaksiyonunun indüklenmesine de neden olur. Buna ek olarak da spermatozoonun zona pellusidaya bağlanma yeteneği artar (29). PF'in ayrıca testiste mikrosirkülasyonu arttırarak spermatozoon parametreleri üzerinde olumlu etki yapması beklenmektedir. PF'in erkek infertilitesinde en yaygın kullanımı in vitro spermatozoon motilitesinin arttırılması amacıyla (72).

Los Angeles Fertilité Merkezi'nde yapılan bir çalışmada, ICSI yapılacak olgularda spermatozoonun laboratuarda PF ile muamele edilmesinin, fertilizasyon ve gebelik oranlarını düzelttiği bildirilmiştir. 348 siklusu içeren çalışmada PF kullanıldığında gebelik oranlarının % 36'dan % 48'e çıktığı görülmüştür (45).

Tesarik ve ark., PF'in 2-deoksiadenozin ile kombine edilmesinin motilitedeki etkinliği daha da arttırdığını gözlemişlerdir. Bu konuda yapılan başka bir çalışmada da bu kombinasyonun embriyo gelişimini olumsuz etkilediği bildirilmiştir. Burada PF'in yumurta üzerine olan direkt etkisinin sorumlu olabileceği düşünülerek fertilizasyondan önce spermatozoonun yıkanarak ilacın ortamdan uzaklaştırılması düşünülmüştür. PF'in yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmasını takiben etkisinin normozoospermiklerde 3-4 saat, astenozoospermiklerde 2 saat daha devam ettiğini bildirmektedir (5).

Lacham-Kaplan Trounson ise embriyonik gelişim ile ilgili olarak, spermatozoonun 3mM PF ile kısa inkübasyonunda negatif etkinin olmadığını bildirmişlerdir (75).

Okada H. ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada ise, oral PF verilmesinin, seminal plazmalarında ROS'un yükselmiş olduğu olgularda spermatozoon motilitesini düzelttiği (% 21), ROS normal olanlarda ise bir etkisinin bulunmadığı ortaya konmuştur. Aynı çalışmada PF'in ROS'u düşürücü bir etkisinin bulunmadığı da ayrıca bildirilmiştir (76).

Metilksantinlerin in vitro kullanımıyla ilgili *Gearon CM. ve ark.* ile *Merino G. ve ark.*'nin yaptığı gibi çok sayıda çalışma bildirilmiş olmakla birlikte, genel kanı bu

maddelerin bireysel etki gösterdiği ve farklı sonuçlar verdiği. Sonuçlar üzerine etkili en önemli faktörler ilacın konsantrasyonu ve inkübasyon süresidir (77, 78).

Yapılan çalışmaların çoğu in vitro kullanımında spermatozoon motilite yüzdesinde belirgin artışlar olduğunu göstermektedir. Fakat kullanım sonrası fertilizasyon ve gebelik oranlarına pozitif etkisi tartışmalıdır (72).

Aliabadi ve ark. 'nın çalışmaya göre PF'in uzun süre (90 dk gibi) uygulanması toksik etkisi sebebiyle spermatozoon canlılığında azalmaya yol açabilmektedir (48).

Taşdemir ve ark. ile *Tarlatzis ve ark.*'nin sırasıyla 51 ve 43 hastayı içeren küçük çalışmalarında IVF oranlarında umut verici iyileşmeler saptanmıştır. Diğer bilim adamları kontrol ve IVF ile IUI tedavi grupları arasında farklılık gözlememiştir. Bu nedenle PF'in gelişigüzel kullanılmaması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Zararlı etkileri de tartışmalı olan PF'in yardımcı üreme tekniklerinde kullanılması için çok daha fazla çalışma yapılmalıdır (29).

Ayrıca çalışmamızda rutenyum red boyası ile belirginleştirdiğimiz glikokaliks; glikoprotein, glikolipit, proteoglikan gibi glikokonjugatlardan oluşmaktadır. Memelilerde, testiküler germ hücrelerinin glikoproteinleri spermatozoon farklılaşması ve spermatogenezde Sertoli hücreleriyle etkileşimi de önemlidir. Glikokaliks aynı zamanda, dişi immün sistemine karşı spermatozoon korunmasında, akrozom reaksiyonlarında ve spermatozoonun oositi dölleme yeteneğinde önemli rol oynamaktadır. Erkek infertilitesi bazı durumlarda spermatozoon yüzeyindeki glikokonjugatların değişikliği sonucu görülebilmektedir. PF'in, spermatozoon plazma membran bütünlüğünü de koruduğu bildirilmiştir (48).

Spermatozoonun dölleme oranlarını arttırmaya yönelik kullanılan farmakolojik ajanlardan diğeri de PAF'dır. Fakat PAF'ın kullanımı PF'e oranla daha kısıtlıdır.

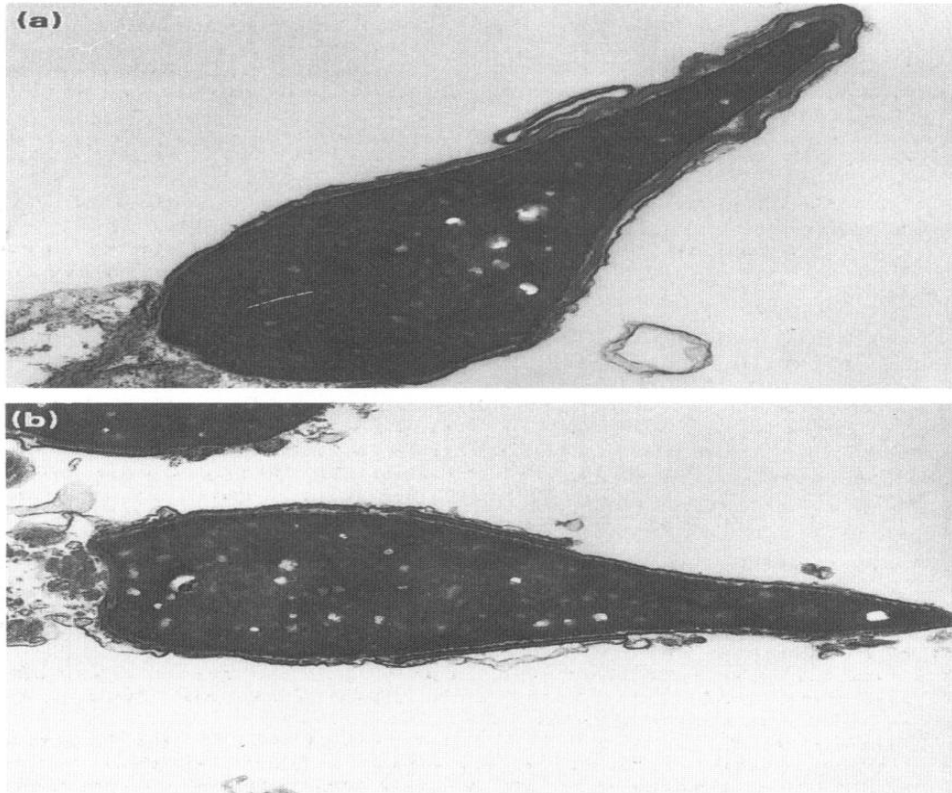
1970'lerin başında keşfedilen PAF, spermatozoonda lokalizedir ve seminal sıvılarda mevcut değildir. İnsan spermatozoonu dahil bir çok memeli spermatozoonunda bulunur.

PAF, özellikle motil spermatozoonlar üzerine etki göstermektedir. Araştırmacılar çeşitli dokularda da varlığını ortaya çıkarmışlardır (53).

PAF'ın spermatozoon motilitesi üzerindeki etkisinin cAMP aracılığı ile olduğu görülmektedir. Ancak diğer hücrelerde, IP3 ve hücre içi Ca^{+2} etkisi ile gerçekleşmektedir. Dolayısı ile PAF etkisi cAMP, IP3 ve Ca^{+2} seviyelerine bağlıdır (8).

Angle ve ark.'nın yaptığı çalışmada normal erkeklerin spermatozoonunda bulunan PAF miktarı, astenozoospermik hastalara oranla anlamlı derece yüksek bulunmuştur. Bu da PAF'ın normal spermatozoon fonksiyonları ve fertilizasyonda önemli bir rolü olduğunu göstermektedir.

Yine aynı çalışmada PAF'ın akrozom reaksiyonunun indüklenmesinde de etkili olduğu bildirilmiştir. PAF ve akrozom reaksiyonu ile ilgili çalışmalar, zamanın akrozom reaksiyonu üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermiştir. PAF ile muamele sonrası akrozom reaksiyonuna yanıtın 2 dk içinde 3 kat, 5 dk içinde 4 kat arttığı görülmüştür. Yanıt, 30 dk'lık inkübasyon süresi boyunca devam etmiştir. Ayrıca deneylerde, akrozomal bölgede görülen PAF kaynaklı değişikliklerin foliküler sıvının kullanıldığında görülenlerle benzer olduğu ortaya çıkmıştır (79). (Şekil 18)



Şekil 18. İnsan spermatozoonunda PAF ile stimülasyonu öncesi (a) ve sonrasında (b) akrozom morfolojisinin elektron mikroskopik görüntüsü (79).

PAF'ın fare ve tavşan oositlerinde, fertilizasyon oranlarının arttırılması ve dölleme sürecinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. *Roudebush ve ark.*'nin yaptığı çalışmada PAF'a maruz kalan spermatozoon ile döllemiş tavşan oositlerinde artmış embriyo gelişimi bildirilmiştir. Bu bakımdan menide PAF incelemek, fertilizasyon tahmini için ek bir parametre olabilir (80).

Roudebush ve ark.'nin sincap maymunlar üzerinde yaptığı çalışmada, PAF'a sincap maymun semen örneğinde de rastlanmış ve üreme mevsimindeki sincap maymunlarda üreme mevsimi dışında olanlara oranla anlamlı derecede yüksek miktarda PAF varlığı ortaya konmuştur (56).

Juming Zhu ve ark.'nin 125 SCI geçiren erkek üzerinde yaptıkları araştırmada; yaralanma sonrası spermatozoon konsantrasyonu yıllarca normal kalırken spermatozoon motilitesinde düşüş görülmüştür. Ayrıca araştırma, SCI olan hastalarda kontrol grubundaki erkeklere oranla daha yüksek oranda PAF-ah olduğunu göstermiştir. PAF-ah enzimi, PAF'ı katalize eder ve biyolojik olarak inaktif olan Lyso-PAF oluşturur. Bu işlem spermatozoonun kapasitasyonu için şart olan hiperaktivasyonu engeller.

20 SCI'li ve 20 sağlıklı erkek üzerinde yapılan çalışmada, SCI'li hastaların PAF-ah konsantrasyonu 1117,40 bulunurken sağlıklı erkeklerde 458,60 bulunmuştur. Ortalama spermatozoon motiliteleri ise kontrol grubunda % 61 iken SCI'li hastalarda % 25'tir (7).

Krausz ve ark.'nin yaptığı çalışmada, kısa süreli PAF inkübasyonunun progressif hareketli spermatozoon motilitesini arttırdığı görülmüştür. Ancak hareketlilikte artış 25 hastadan 16'sında görülürken diğer hastalarda hiçbir gelişme görülmemiştir. Cevap veren 16 hastanın 9'unda artış ilk 1 saat içinde görülürken kalan 7 hastada 2 saatlik inkübasyon sonrasında etki gözlenmiştir (3).

IUI'da spermatozoon yıkama işlemine PAF eklenmesi motiliteyi ve gebelik oranlarını arttırmaktadır (9). Bununla birlikte bu önemli gelişme sadece semen analizinin normal olduğu durumlarda görülebilir (53). *Roudebush ve ark.*'nin 165 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, normal semen özellikleri ile başvuran ve PAF kullanılan grupta gebelik oranı % 29,8 olurken kontrol grubunda % 17,9 olarak bulunmuştur. Erkek faktörüne bağlı infertilitede ise PAF ile tedavi uygulanan grupta gebelik oranları % 36,8 iken kontrol grubunda % 26,1 bulunarak istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış görülmüştür (9). Lyso-PAF ile muameleden ise motilite etkilenmemiştir. Bu da spermatozoon üzerindeki motilite etkisinin PAF'a bağlı olduğunu ortaya koymaktadır (53).

PF ve PAF uygulama sonrası spermatozoonun tüm ince yapısı Geçirimli Elektron Mikroskopu(TEM)'nda ayrıntılı şekilde incelendi.

Elektron mikroskopunda spermatozoonun ince yapısını inceleyen bu araştırmamızda karşılaştırma yapabilmek için daha önceden yapılmış yeterli sayıda çalışma bulamadık.

Araştırmamızın sonuçları doğrultusunda, spermatozoonların PF ve PAF gibi ajanlara maruz bırakılmasının motiliteye olan olumlu etkisi dışında spermatozoon baş ve kuyruk yapısı üzerinde az da olsa olumsuz etkileri olduğunu görmekteyiz. YÜT'de de kullanılan bu ajanların olumsuz etkilerinin embriyo gelişimi üzerinde de etkili bir faktör olabileceğini düşünmekteyiz. Bu bağlamda PF ve PAF ile ilgili spermatozoon ince yapısının incelenmesi ve kıyaslanması ile ilgili araştırmaların artırılması bu konuda aydınlatıcı olacaktır.

8. SONUÇ

Çalışmaya, infertilite merkezine başvurmuş olan normozoospermik (sayı 20 milyon/ml ve üzeri, motilite % 50 ve üzeri, n=20) bireylerden elde edilen semen örnekleri dahil edildi. Elde edilen spermatozoonlara PF ve PAF ile muamele edildi. Ayrıca spermatozoonların membran yapısındaki glikokaliks, rutenyum kırmızısı ile boyanarak belirginleştirildi. PF ve PAF ile muamele edilen spermatozoonların ince yapıları ve kontrol grubunda hiçbir ajanla muamele olmamış spermatozoonların ince yapıları geçirimli elektron mikroskobu (TEM)'nda kıyaslanarak incelendi.

Kontrol grubundaki spermatozoonlar ile PF ve PAF ile muamele edilen spermatozoonların kıyaslanması baş ve kuyruk olarak iki kısımda yapıldı.

Normozoospermik bireylerden elde edilen kontrol grubunda, spermatozoonların baş kısmındaki nukleusun ve plazma membranının korunmuş olduğu görüldü. Kontrol grubundaki bu örneklerimizin kuyruk bölgesinde düzgün morfolojiye sahip mitokondriyumlar olduğu, orta parçasında yer alan 9+2 aksonem ve fibröz örtü yapısının bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi.

PF ile muamele edilen spermatozoonlarda, baş kısmında glikokaliks yapısında yer yer bozulmalar olduğu, vaküollü ve granüllü bir kromatin yapısına sahip olduğu görüldü. Yine bu gruptaki spermatozoonlarda bağlantı bölgesinde düzgün sentriyol görüntüsü de gözlemlendi.

Kuyruk kısmının orta parçasında motilitede önemli rolü olan 9+2 aksonem yapısındaki merkezi çiftin düzgün olduğu ve çevresindeki mitokondri yapılarında kristallerin kaybolduğu görüldü.

Spermatozoon kuyruğunun esas kısmında da kontrole yakın aksonem yapısı ve dinein kollarının görüntüsü gözlemlendi.

PAF'a maruz bırakılan spermatozoon grubunda elonge başlı spermatozoonlar görülmüştür.

Bu gruptaki spermatozoonların plazma membran yapılarında yer yer bozulmalar ve granüllü ve vaküollü kromatin yapısına sahip olduğu gözlemlendi. Yine baş bölgesi incelemelerinde sitoplazmik artıklara da rastlandı.

PAF'a maruz bırakılan spermatozoonların bağlantı bölgelerinde düzgün sentriol ve mitokondri yapısı gözlenirken kuyruğun esas kısmında da kontrol grubundaki spermatozoonlara yakın aksonem yapısı ve dinein kolları gözlemlendi.

Çalışmamızda; her hastanın temel bulguları ve ajanlar ile muamele sonrası bulguları değerlendirildiğinden, bir kıyaslama çalışması olduğu için diğer etkilerin sonuca yansıma ihtimali gündeme gelmedi.

Bu farmakolojik ajanların spermatozoon ince yapısı üzerindeki olumsuz etkileri dolayısıyla embriyo gelişimi de olumsuz etkilenebileceğinden IVF laboratuvarlarında kullanımının çok dikkatli yapılması gerektiğini düşünüyoruz. Bu konuda yapılacak olan çalışmaların sayısının artırılmasının IVF uygulamalarında fertilizasyon ve gebelik oranlarına etkisi açısından aydınlatıcı ve faydalı olacağına inanıyoruz.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam süresince, bilgi birikimini paylaşan, katkılarını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, tezimi hazırlama döneminde deneyimleri ve desteği ile her zaman yanımda olan çok sevgili hocam Sayın Prof. Dr. Canan HÜRDAĞ'a,

Çalışmamda örnek temininde elinden gelen tüm özveriyi gösteren sevgili hocam Yard. Doç. Dr. Evrim ÜNSAL'a,

Laboratuvardaki yardımlarından dolayı sevgili hocam Yard. Doç. Dr. Yasemin ERSOY ÇANILLIOĞLU'na,

İki yıllık bu eğitim süresi için anlayışından dolayı Özel Ada Tıp Hastanesi Başhekimi Sayın Op. Dr. Sadık AKBIYIKLI'ya,

Yardımlarından dolayı Bio. Dr. Gülleyle KILIÇ'a,

Yardım ve destekleri için arkadaşlarım Bio. Gözde BABİKLİ, Bio. Yeliz HATİBOĞLU, Bio. Sıla Özlem PALTUN ve Bio. Gamze BEREKETOĞLU'na,

Her zaman yanımda olan, desteğini her an hissettiren ve üzerimde sonsuz bir emeğe sahip sevgili annem, sevgili babam ve eşime,

Ayrıca bu süreçteki anlayış ve sabrından dolayı özellikle kızım S. Ece'ye ve yüksek lisans süresinin bir kısmına benimle katılan oğlum M. Eren'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

10. KAYNAKLAR

1. Fikret Erdemir, Fatih Fırat, Yusuf Gençten. 2011. The Evaluation and Clinical Significance of Sperm Morphology. *Turk Urol Sem.* 2: 11-7
2. Doç. Dr. Lale Delilbaşı. 2006. In vitro Fertilization (IVF) Labaoratuvar Yöntemleri Güneş Tıp Kitabevleri
3. Cs. Krausz, G. Gervasi, G. Forti and E. Baldi. 1994. Effect of platelet-activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. *Human Reproduction.* Vol. 9 no.3 pp. 471-476
4. Tesarik, J., Mendoza, C. 1993. Sperm treatment with pentoxifylline improves the fertilizing ability in patients with acrosome reaction insufficiency. *Fertil Steril.* 60: 141
5. Tesarik J., Thebault A., Testart J. Oct 1992. Effect of fentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic spercimens. *Hum Reprod.* 7 (9) : 1257-63
6. Andrew Toledo, Dorothy Mitchell-Leef, Carlene W. Elsnen, Scott M. Slayden, William E. Roudebush. May 2003. Fertilization Potential of Human Sperm Is Corralated With Endogenous Platelet-Activating Factor Content. *Journal of Asisted Reproduction and Genetics.* Vol.No.5
7. Juming Zhu, Nancy L. Brackett, Teodoro C. Aballa, Charles M.Lynne, Michael A. Witt, Hilton I. Kort, and Wiiliam E. Roudebush. May/June 2006. High Seminal Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Activity in Men With Spinal Cord Injury. *Journal of Andrology.* Vol.27, No.3
8. Roudebush WE, Massey JB, Elsner CW, Shapiro DB, Mitchell-Leef D, Kort HI. 2005. The significance of platelet-activating factor and fertility in the male primate: a review. *J Med Primatol.* 34: 20-24
9. William E. Roudebush, PhD., Andrew A. Toledo, M.D., Hilton I. Kort, M.D., Dorothy Mitchell-Leef, M.D., Carlene W. Elsner, M.D., and Joe B. Massey, M.D. July 2004. Platelet-activating factor significantly enhances intrauterine insemination pregnancy rates in non-male factor infertility. *Fertility and Sterility.* Vol.82, No.1

10. Prof. Dr.Erdal Karagöz. Özel Histoloji. 2002. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi. Yayın No:29
11. A. Kadioğlu, S. Çayan, B. Semerci, İ. Orhan, R. Aşçı, M. Ö. Yaman, M. F. Usta, M. Kendici. 2004. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi Türk Androloji Derneği.
12. Leslie P. Gartner, James L. Hiatt. 2009. Renkli Histoloji Atlası (Prof. Dr. Atilla Dağdeviren, Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu, Doç. Dr. Gülten Karabay, Çev). Güneş Tıp Kitabevleri.
13. Luiz Carlos, Jungueirra, MD, Phd, Jose Carneiro, MD, Phd. 2006. Temel Histoloji Text&Atlas. (Prof. Dr. Yener Aytekin, Doç. Dr. Seyhun Solakoğlu, Çev). Nobel Tıp Kitapevi.
14. Ramazan Aşçı, Selahattin Çayan, Fikret Erdemir, İrfan Orhan, Önder Yaman, Mustafa Faruk Usta, Muammer Kendirci, Oğuz Ekmekçioğlu, Ateş Kadioğlu. 2013. Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. Türk Androloji Derneği İstanbul. İstanbul Tıp Kitapevi
15. William K. Ovalle, Patrick C. Nahirney. 2009. Netter Temel Histoloji (Seda Müftüoğlu, Figen Kaymaz, Pergin Atilla, Çev). Güneş Tıp Kitapevi.
16. Abraham L. Kierszenbaum. 2006. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. (Demir R., Çev). Ankara, Palme Yayıncılık.
17. Prof. Dr. Hikmet Hassa. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuar Uygulamaları
18. Doç. Dr. Lale Delilbaşı, Bio. Başak Balaban, Bio. Bağdagül Ayaş. (2000-01) Gametler (Sperm/Oosit) Fertilizasyon ve Embriyoner Gelişim. Bölüm I. Serono Yayınları .
19. Kay Elder, Brian Dale. İn Vitro Fertilizasyon (Prof. Dr. Tülay İrez, Çev). Nobel Tıp Kitapevi
20. Gülfidan Zülfikaroğlu (2010). *Kapasitasyonun Moeküler Temelleri*. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Adana.
21. Keith L. Moore, T.V.N. Persaud. 2009. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (Prof. Dr. Hakkı Dalcık, Prof. Dr. Mehmet Yıldırım, Çev). Nobel Tıp Kitapevi.

22. L. Carlos Junquera, Jose Carneiro, Robert O. Kelley. 1998. Temel Histoloji. (Prof. Dr. Yener Aytekin. Editör Yardımcıları: Uz. Dr. Seyhun Solakoğlu, Uz. Dr. Bülent Ahışalı, Çev).
23. Semen Analizi. (t.y.). Erişim: 01 Ocak 2014, <http://www.tupbebek-genetik.com/laboratuvar-yontemleri/androloji->
24. Ross, MH. 2003. Histology a Text and Atlas with Cell and Molecular Biology. Fourth Edition, Lippincott Williams&Wilkins.
25. Andoloji Bülteni. Haziran 2005 sayı 21
26. S.K. Rajeev and K.V.R. Reddy. 2004. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility-associated sperm antigen. *Human Reproduction*. Vol.19, No.2 pp. 234-242
27. Spermin Kapasitasyonu ve Sinyal İleti Mekanizması. (t.y.). Erişim: 18 Şubat 2014, http://www.kaanaydos.net/kapasitasyon_patofizyoloji.php
28. P. Mirshakiaei, H. Hassanpour, A. Mehdizadeh, M. Akhavan Taheri. 2011. Pentoxifylline induces capacitation and acrosome reaction and improves quality of motility in canine ejaculated spermatozoa. *Research in Veterinary Science*. 91;281-284
29. Ralf R. Henkel and Wolf-Bernhard Schill. 2003. Sperm Preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*. 1: 108 Published online Nov 14.
30. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Laboratuvar El Kitabı. 2002. İnsan semen ve sperm servikal-mukus etkileşimi değerlendirilmesi. (Günalp S, Çev) Ankara, Tıp Teknik Kitapevi.
31. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd edn. 1992. New York: Cambridge University Press.
32. World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 4th edn. 1994. New York: Cambridge University Press.
33. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. 1988. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 49: 112-117

34. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, et al. 1986. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 46: 1118-23
35. Tomlinson MJ, Barrat CLR, Cook ID. 1993. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulation in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril.* 60: 1069-75
36. Wolf H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. 1990. Leukospermia is associated with poor sperm quality. *Fertil Steril.* 53: 528-36
37. Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, et al. 1999. Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat pentoxifylline-mediated inhibition of xanthine oxidase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 29: 69-74.
38. Steeb GD, Wilson MA, Garrison RN. 1992. Pentoksifilin preserves small intestine microvascular blood flow during bacteremia. *Surgery.* 112: 756-764.
39. Pentoxifylline. (t.y.). Erişim: 28 Aralık 2013, <http://www.medicinescomplete.com>
40. T. D. Perri, O. Carandente, A. Vittoria, et al. 1984. Studies of the Clinical Pharmacology and Therapeutic Efficacy of Pentoxifylline in Peripheral Obstructive Arterial Disease. *Angiology.* 35(7): 427-435.
41. Grdal M, Tekin A, Erol A, et al. 2002. Torsiyone Rat Testisinde Gelişen İskemi-Reperfzyon Hasarında Pentoksifilinin Antioksidan Etkisi. *Türk roloji Dergisi:* 28 (3): 260-263.
42. Dr. Kubilay ınar (2002). Vasküler Leak Sendromu. Güncel Gastroenteroloji. Erişim: 15 Ocak 2014, <http://guncel.tgv.org.tr/journal>
43. Dr. Bahattin Kerem Aydın (2007). *Pentoksifilin Kullanımın Kırık İyileşmesi zerine Etkisinin Ratlarda İncelenmesi.* Uzmanlık Tezi. İstanbul.
44. Dr. Havva Yeşilınar (2011). *Sürekli Ayaktan Periton Diyalizi Hastalarında Pentoksifilinin Periton Fonksiyonlarına ve Sitokin Düzeyleri zerine Etkileri.* Uzmanlık Tezi. ukurova Üniversitesi, Adana
45. İnfertilite Tedavisinde Yeni Uygulamalar. (t.y.). Erişim: 04 şubat 2014, <http://www.kaanaydos.com.tr/infertilite-tedavisinde-yeni-uygulamalar.html>
46. P. Negri, E. Grechi, A. Tomasi, E. Fabbri and A. Capuzzo. 1996. Effectiveness of pentoxifylline in semen preparation for intrauterin insemination. *Human Reproduction.* Vol.11 no.6 pp.1236-1239

47. Mohammad Reza Safarinejad. 2010. Effect of pentoxifylline on semen parameters, reproductive hormones and seminal plasma antioxidant capacity in men with idiopathic infertility: a randomized double-blind placebo-controlled study.
48. Elham Aliabadi, Phd., Fatemeh Karimi, MSc., Tahereh Talaei-Khozani, Phd. 2013. Effect of L-Carnitine and Pentoxifylline on Carbohydrate Distribution of Mouse Testicular Sperm Membrane. *IJMS* Vol 38, No 2: 107-115
49. Hiromitsu Hattori, B.S., Yukiko Nakajo, B.S., Chizuro Ito, M.D., Ph.D., Yoshiro Toyama, D.V.M., Ph.D., Kiyotaka Toshimori, M.D., Ph.D., and Koichi Kyono, M.D., Ph.D. 2011. Birth of healthy infant after intracytoplasmic sperm injection using pentoxifylline-activated sperm from a patient with Kartegener's syndrome.
50. Pentoxifylline and antioxidant improve sperm quality in male patients with varicocele. April 2009. *Fertility and Sterility*. Vol. 91, No.4, Supplement
51. Shukla SD. 1992. Platelet activating factor receptor and signal transduction mechanisms. *FASEB J*. 6: 2296-301
52. Michael W King, PhD | © 1996–2013 themedicalbiochemistrypage.org, LLC | info @ themedicalbiochemistrypage.org.
53. William E. Roudebush, PhD. 2007. Seminal Platelet Activating Factor. Reproductive Biology Associates, Atlanta. Georgia. *Semen Thromb Hemost*. 33: 69-74
54. Adam S. Levine, Hilton I. Kort, Andrew A. Toledo, and William E. Roudebush. July/August 2002. A Review of the Effect of Platelet Activating Factor on Male Reproduction and Sperm Function. *Journal of Andrology*. Vol.23, No.4
55. W. E. Roudebush. 2001. Jun. Role of platelet-activating factor in reproduction: sperm function. *Reproductive Biology Associates, Atlanta. J.Androl*. 3: 81-85
56. W. E. Roudebush, Rajesh S. Mathur. 1998. Presence of Platelet-Activating Factor Squirrel Monkey (*saimiri bolivensis*) Spermatozoa: Seasonal Differences. *American Journal of Primatology*. 45: 301-305
57. Dr. Ethem Şahin (2005). *Dermatophagoides Pteronyssinus ve dermatohhagoides farinea alerjenlerinde uygulanan spesifik immünoterapinin üç yıllık klinik ve laboratuvar sonuçlarının karşılaştırılması*. Uzmanlık Tezi. İstanbul.
58. Dr. Şule Gök. 1992. Temel Tıp Bilimleri Farmakoloji. Lökotrienler ve Antagonistleri. T Klin Tıp Bilimleri

59. Uzm. Dr. Mustafa Kerek, Doç. Dr. Nevzat Akyürek, Prof. Dr. Erdoğan Sözüer, Uzm. Dr. Makbule Arar, Doç. Dr. Sabahattin Muhtaroglu, Yard. Doç. Dr. Selma Gökahmetoğlu. Deneysel Tıkanma Sarılığında Rekombinant Platelet Aktive Edici Faktör Asetilhidrolazın Karaciğer Hasarına Bakteriyel Translokasyona ve Antioksidanlara Etkisi. TÜBİTAK Proje No: SBAG-2143(199S021) Nisan 2001/Kayseri
60. Shilo L. Archer and W. E. Roudebush. 2013. Enhancement of Sperm Motility Using Pentoxifylline and Platelet-Activating Factor. *Spermatogenesis: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. Vol.927*
61. Andrew A. Toledo, Dorothy Mitchell-Leef, Carlene W. Elsner, Scott M. Slayden. May 2003. Fertilization Potential of Human Sperm Is Correlated with Endogenous Platelet-Activating Factor Content. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics. Vol.20, No.5*
62. Brass LF, Hoxie J. A, Kieber-Emmons T. Et al. 1993. Agonist reseptors and G proteins as mediators of platelet activation. In Authi KS. eds. Mechanism of Platelet Activation and Control. New York: Plenum Press. 17-35
63. Dhar A, Paul A. K, Shukla SD. 1990. Platelet activating factor stimulation of tryosine kinase and its relationship to phospholipase C in rabbit platelets: studies with genistein and monoclonal antibody to phosphotyrosine. *Mol Pharmacol. 37(4): 519-25*
64. Emil A. Tanagho, JackW. McAnnich. 2009. Smith Genel Üroloji. (Kazancı G, Çev). Erkek İnfertilitesi. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri
65. Chemes HE. 2000. Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men. *Journal of Andrology. Vol.21 no 6: 799-808*
66. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. 2007. International estimates of infertility prevalance and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod. 22(6): 1506-1512*
67. Zegers- Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, van der Poel S. 2009. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glassary on ART terminology. *Hum Reprod. 24(11): 2683-2687*

68. Dr. Hatice Aktaş (2007). *Derin Teratozoosperminin ICSI'de Gebelik Sonuçları Üzerindeki Etkisi*. Uzmanlık Tezi. İstanbul.
69. Wilkes S, Chinn DJ, Murdoch A, Rubin G. 2009. Epidemiology and management of infertility: a population – based study in UK primary care. *Fam Pract.* 26(4): 269-274
70. HFEA: Latest UK IVF figures- 2009 and 2010. [<http://www.infea.gov.uk/ivffigures-2006.html>]
71. Nasr- Esfahani MH, Deemeh MR, Tavalae M. 2010. Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 94(2): 520-526
72. Yovich JL, Edirisinghe WR, Cummins J. 1990. Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. *Fertil Steril.* 53: 715
73. Yovich JL. 1993. Pentoxifylline ; actions and applications in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 8: 1786-1791
74. Tournaye H, Devroey P, Camus M, Van der Linden M, and Janssens R, Van Steirteghem A. 1995. Use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Hum Reprod.* 10: 72-79
75. Lacham-Kaplan O, Trounson A. 1993. The effects of sperm motility activators 2-deoxyadenosine and pentoxifylline used for sperm microinjection on mouse and human embryo development. *Hum Reprod.* 6: 945-952
76. Okada H, Tatsumi N, Kanzaki M, Fujisawa M, Arakawa S, Komidono S. 1997. Formation of reactive oxygen species by spermatozoa from asthenospermic patients: response to treatment with pentoxifylline. *J.Urol.* 157(6): 2140-6
77. Gearon CM, Forman RG. Feb 1994. Farmacological stimulation of sperm motility. *Hum Reprod.* 9(2): 192-9
78. Merino G, Martinez Chequer JC, Barahona E, Bermudez JA, Moran C, Carranza-Lira S. 1997 Jul-Aug. Effects of pentoxifylline on sperm motility in normogonadotropic asthenozoospermic men. *Arch Androl.* 39(1): 65-9
79. Angle MJ, Tom R, Khoo D, McClure RD. 1991. Platelet-activating factor in sperm from fertile and subfertile men. *Fertil Steril.* 56(2): 314-8
80. W.E Roudebush and J.R. Diehl. 2000. Platelet- Activating Factor Content In Boar Spermatozoa Correlates With Fertility. *Reproductive Biology Associates*, Atlanta, Georgia, USA.