

**T.C.  
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) DOKTORA PROGRAMI**

**ERKEK İNFERTİLİTESİ TANISI ALMIŞ BİREYLERİN  
SPERMLERİNDE OTOFAJİ BELİRTEÇLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**NAZLI KARAGÖZ CAN**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof.Dr. Kemal ERGİN**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-17038 Proje numarası ile desteklenmiştir

**AYDIN-2018**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Nazlı Karagöz CAN tarafından hazırlanan “Erkek İnfertilitesi Tanısı Almış Bireylerin Spermelerinde Otofaji Belirteçlerinin Araştırılması” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 08/08/2018

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Kemal ERGİN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN	Ege Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU	Dokuz Eylül Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Doç. Dr. Nüket ELİYATKIN	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

### ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsünün .....tarih ve .....sayılı oturumunda alınan .....nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Eğitimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübesi ile bana her zaman yol gösterici olan, tez danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. Kemal ERGİN' e,

Çok değerli tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Hocam Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN' e

Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma;

Mesleki eğitimime büyük katkıları olan ve doktora hayatım boyunca beni destekleyen doktora eğitimimi başarı ile tamamlamama olanak sağlayan, sayın hocalarım Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR' e, Prof. Dr. Nilgün TURHAN'a ve Prof. Dr. Akın SİVASLIOĞLU'na

Hayatım boyunca sonsuz özveri ve sevgileriyle yanımda olan, beni maddi ve manevi her konuda destekleyen ve bu günlere getiren canım anneme, babama ve biricik kardeşime;

Sevgi ve anlayışıyla her zaman sol yanımda olan, hayatımın her anında olduğu gibi doktora eğitimim boyunca da elimi hiç bırakmayan, bir an olsun yanımdan ayrılmayan, tezimin her sayfasında varlığını hissettiğim hayat arkadaşım sevgili eşim Mesut CAN'a,

Varlıklarıyla beni onurlandıran, her zamankinden daha güçlü bir insan olmamı sağlayan, yaşama sevinçlerim biricik oğullarım Bartu Ege ve Emir Mete' me sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca;

“Bu proje Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TPF-17038 proje numarası ile desteklenmiştir.” Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi' ne desteğinden ötürü teşekkür ederiz.

# İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY .....	i
TEŞEKKÜR .....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
RESİMLER DİZİNİ .....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET .....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1.Erkek Üreme Sistemi.....	4
2.1.1.Testis Embriyolojisi.....	8
2.1.2.Genital Kanalların Gelişimi.....	8
2.1.3.Dış Genital Organların Gelişimi.....	10
2.1.4.Testis Histolojisi.....	12
2.1.5.Spermatogenez.....	17
2.1.6.Sperm Yapısı.....	22
2.1.7.Testis İçi Genital Kanallar.....	24
2.1.8.Genital Boşaltım Kanalları.....	25
2.1.9.Yardımcı Üreme Bezleri.....	27
2.1.10.Penis.....	28
2.2.İnfertilite.....	29
2.2.1.Erkek İnfertilitesi.....	30
2.2.2.Erkek İnfertilitesi Değerlendirme Testleri.....	36
3. OTOFAJİ.....	43
3.1. Otofaji Mekanizmaları.....	42
3.2.Otofajinin Düzenlenmesi.....	46
3.2.1.Fagofor ve Otofagozom Oluşumu.....	46
3.2.2.Otofagozomun Taşınması.....	47
3.3.Otofaji ve Erkek Üreme Sitemi.....	49

4.GEREÇ ve YÖNTEM .....	51
4.1. Materyallerin Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması .....	51
4.1.1. Makler Kamera ile Sperm Sayımı .....	53
4.1.2. Spermilerin Morfolojik Değerlendirilmesi .....	54
4.1.3. İmmunohistokimyasal Boyama Teknikleri .....	55
4.1.4. Ultrastrüktürel İnceleme Ve Elektron Mikroskopik Doku Takibi.....	56
4.1.5. Western Blot Analizi .....	57
4.2. H Skoruması .....	59
4.3. İstatistiksel Analizler .....	59
5. BULGULAR .....	60
5.1. Spermiyogram Sonuçları .....	60
5.2.Yayma Preparatların Spermac Stain Boyaması ile Krugere Göre Değerlendirilmesi.....	63
5.3.Yayma preparatların İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi İle Değerlendirilmesi .....	67
5.3.1.LC3 A/B primer antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme.....	68
5.3.2.Beclin-1 primer antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme.....	69
5.3.3. P62 primer antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme .....	71
5.3.4. ATG5 primer antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme .	73
5.3.5. ATG12 primer antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme ... .....	75
5.3.6.ATG16 primer antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme	77
5.4. Western Blot Yöntemi ile Bulguların Değerlendirilmesi .....	80
5.4.1. Beclin-1 bulguları.....	80
5.4.2. LC3A/B Bulguları .....	83
5.5. Transmising Elektron Mikroskobu (TEM) ile Değerlendirilmesi.....	88
6. TARTIŞMA.....	91
7. SONUÇ ve ÖNERİLER .....	99
KAYNAKLAR.....	100
EKLER .....	
ÖZGEÇMİŞ.....	

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AMPK</b>	: AMP-aktif protein kinaz
<b>ATG</b>	: Otofaji ile bağlantılı proteinler
<b>AZF</b>	: Azospermik Faktör
<b>CLA-1</b>	: 85-kD plazma membran glikoproteini
<b>DDSA</b>	: Dodesenil Süksinik Anhidrit
<b>ER</b>	: Endoplazmik retikulum
<b>FDA</b>	: Gıda ve ilaç dairesi
<b>FIP200</b>	: Fokal adhezyon kinaz ailesi 200 kDA'lık Protein
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen-peroksit
<b>HSC73</b>	: 73 kDa ısı şoku şaperon proteini
<b>KTB</b>	: Kan Testis Bariyeri
<b>LAMP2</b>	: Lizozom ilişkili membran proteini tip2
<b>LH</b>	: Lüteinizan Hormon
<b>mTOR</b>	: Rapamisin'in memeli hedefi
<b>NSF</b>	: N-ethylmaleimide Duyarlı Faktör
<b>OsO<sub>4</sub></b>	: Osmium tetroksit
<b>PAP</b>	: Prostat bezi prostatik asit fosfataz
<b>PAS</b>	: Periodik asit Schiff
<b>PBS</b>	: Fosfat buffer salin
<b>PE</b>	: Fosfatidiletanolamine
<b>PI3K</b>	: Fosfatidilinozitol-3-kinaz
<b>PSA</b>	: Prostat spesifik antijen
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>T</b>	: Testosteron

**TNF** : Testis belirleyici faktör  
**ULK** : Uncoordinated-51-Like Kinase  
**WHO** : Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Erkek genital sistem kompetentini gösteren şematik diyagram (Jangueria LC ve Carneiro J, 2003).....	4
Şekil 2. Testis gelişim evrelerinin şematik diyagramı (Ross MH ve Pawlina W, 2014) .....	8
Şekil 3. A. Gelişimin 8. Haftasında testisten geçen, testis kordonları, tunika albuginea ve primordial germ hücrelerini gösteren transvers geçit B. 4. ayda testis ve genital kanalların genel görünümü (Sadler TW, 2005). .....	9
Şekil 4. İnsan testisinin sagittal kesitinin şematik diyagramı (Ross MH ve Pawlina W, 2006).....	13
Şekil 5. Seminifer tübül epitelyum hücreleri ve çevre doku hücrelerini gösteren şematik diyagram (Jangueria LC ve Carneiro J, 2003) .....	17
Şekil 6. Spermatogenik hücre serilerini gösteren şematik diyagramı (Ross MH ve Pawlina W, 2014) .....	19
Şekil 7. Spermiyogenez fazında spermatidlerde meydana gelen değişimleri gösteren şematik diyagram (Jangueria LC ve Carneiro J, 2003) .....	21
Şekil 8. İnsanda olgun bir spermatozoanın diyagramı (Ovalle WK ve Nahirney PC, 2009).....	23
Şekil 9. Sertoli hücrelerinin oluşturduğu kan testis bariyerinin şematik diyagramı (Jangueria LC ve Carneiro J, 2003).....	24
Şekil 10. Mayalarda makrotofajinin şematik diyagramı (Klionsky DJ ve Emr SD, 2000)....	46
Şekil 11. Otofajinin moleküler düzenlenmesi gösteren şematik diyagramı (Levine B, Yua J, 2005) .....	49
Şekil 12. LC3 A/B primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri .....	68
Şekil 13. Beclin-1 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri .....	70
Şekil 14. P62 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri .....	72
Şekil 15. ATG 5 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri .....	74
Şekil 16. ATG 12 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri .....	76
Şekil 17. ATG 16 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri .....	78



<b>Şekil 18.</b> Beclin-1 ile beta-aktin oranlanması sonrası görülen kat değişimleri.....	82
<b>Şekil 19.</b> Örneklerin ortalaması ile Beclin 1 - beta aktin oranlanması sonrası belirlenen yüzdeler.....	83
<b>Şekil 20.</b> Örneklerin ortalaması ile Beclin 1 - beta aktin oranlanması sonrası belirlenen kat değişim değerleri.....	83
<b>Şekil 21.</b> LC3A/B ile beta-aktin oranlanması sonrası görülen kat değişimleri.....	86
<b>Şekil 22.</b> Örneklerin ortalaması ile LC3A/B-beta aktin oranlanması sonrası belirlenen yüzdeler.....	87
<b>Şekil 23.</b> Örneklerin ortalaması ile LC3A/B-beta aktin oranlanması sonrası belirlenen kat değişim değerleri.....	87

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Işık Mikroskop Ataçmanlı Makler Kamera .....	54
<b>Resim 2.</b> (a) Elektron mikroskobu takip protokolünden bir görüntü (b) Elektron mikroskobu kesit almak için kullanılan ultratom cihazı .....	57
<b>Resim 3.</b> (a) Elektroforez sistemi (b) Western blot işlemi görüntüleme cihazı .....	58
<b>Resim 4.</b> Kontrol grubuna ait krugere göre spermac stain boyama morfoloji sonuçları .....	65
<b>Resim 5.</b> Varikosel grubuna ait krugere göre spermac stain boyama morfoloji sonuçları .....	66
<b>Resim 6.</b> Enfeksiyon grubuna ait krugere göre spermac stain boyama morfoloji sonuçları.....	66
<b>Resim 7.</b> Açıklanamayan infertilite grubuna ait krugere göre spermac stain boyama morfoloji sonuçları.....	67
<b>Resim 8.</b> LC3A/B, x100 büyütme.....	69
<b>Resim 9.</b> Beclin-1, x100 büyütme.....	71
<b>Resim 10.</b> P62, x100 büyütme .....	73
<b>Resim 11.</b> P62, x100 büyütme .....	75
<b>Resim 12.</b> ATG12, x100 büyütme .....	77
<b>Resim 13.</b> ATG16, x100 büyütme .....	79
<b>Resim 14.</b> Gruplara ait Western blot analizi Beclin-1 bantları .....	80
<b>Resim 15.</b> Gruplara ait Western blot analizi 1. Jel Beta-aktin bantları.....	81
<b>Resim 16.</b> Gruplara ait Western blot analizi LC3A/B bantları .....	84
<b>Resim 17.</b> Gruplara ait Western blot analizi 2. Jel Beta-aktin bantları.....	85
<b>Resim 18.</b> Kontrol grubunda düzenli yapıda gözlenen bir spermatozoa .....	88
<b>Resim 19.</b> Varikosel grubunda artmış otofagozomal veziküller.....	89
<b>Resim 20.</b> Varikosel grubunda artmış otofagozomal veziküller.....	89
<b>Resim 21.</b> Enfeksiyon grubunda artmış otofagozomal veziküller .....	90
<b>Resim 22.</b> Açıklanamayan İnfertilite grubunda artmış otofagozomal veziküller .....	90

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Erkek İnfertilitesi Nedenleri ve Görülme Oranları (Kışnişçi H.A ve ark, 1996). ....	1
<b>Tablo 2.</b> WHO'ya göre semen analizinin en düşük referans değer aralıkları (WHO, 2010)...	38
<b>Tablo 3.</b> Spermec Stain boyası ile Kruger' e göre morfoloji boyama protokolü.....	55
<b>Tablo 4.</b> Spermiyogram Sonuçları .....	62
<b>Tablo 5.</b> Kontrol grubu ile hasta gruplarının karşılaştırıldıkları krugere göre morfoloji sonuçları .....	64
<b>Tablo 6.</b> Hasta gruplarının karşılaştırıldıkları krugere göre morfoloji sonuçları.....	65
<b>Tablo 7.</b> LC3 A/B primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi .....	68
<b>Tablo 8.</b> Beclin-1 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi .....	70
<b>Tablo 9.</b> P62 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi .....	72
<b>Tablo 10.</b> ATG 5 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi .....	74
<b>Tablo 11.</b> ATG 12 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi .....	76
<b>Tablo 12.</b> ATG 16 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi .....	78
<b>Tablo 13.</b> Post Hoc Power analiz sonuçları .....	79
<b>Tablo 14.</b> Gruplara ait 1. Jel Beclin-1 bant yoğunlukları .....	80
<b>Tablo 15.</b> Gruplara ait 1. Jel beta-aktin bant yoğunlukları .....	81
<b>Tablo 16.</b> Beclin-1/Beta-aktin ortalama yüzde değer ve kat değişim oranları .....	81
<b>Tablo 17.</b> Beclin-1, Beta-aktin ortalama değer ve standart sapma oranları.....	82
<b>Tablo 18.</b> Beclin-1/Beta-aktin oranının, ortalama, yüzde ve kat değişim değerleri .....	83
<b>Tablo 19.</b> Gruplara ait 2. Jel LC3A/B bant yoğunlukları .....	84
<b>Tablo 20.</b> Gruplara ait 2. Jel beta-aktin bant yoğunlukları .....	84
<b>Tablo 21.</b> LC3b/B-Actin ortalama yüzde değer ve kat değişim oranları.....	85
<b>Tablo 22.</b> LC3A/B Beta-aktin ortalama değer ve standart sapma oranları.....	86
<b>Tablo 23.</b> LC3AB/Beta-aktin oranının, ortalama, yüzde ve kat değişim değerleri .....	87

## ÖZET

### ERKEK İNFERTİLİTESİ TANISI ALMIŞ BİREYLERİN SPERMLERİNDE OTOFAJİ BELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

**CAN K. N. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Programı Doktora Tezi, Aydın, 2018.**

İnfertilite sadece fizyolojik olarak değil, psikolojik ve sosyolojik yönleri ile de ele alınması gereken önemli bir sağlık sorunudur. İnfertilite günümüzde üreme çağındaki çiftlerin % 10-15' ini etkilemektedir. Erkek faktörüne bağlı infertilite ise bu oranın yaklaşık olarak %30-40'ını oluşturmaktadır. Normal erkek fertilitésinin korunması morfolojisi normal, yeterli ve hareketli sperm üretimine dayanır. İnsan spermatozoası, otofaji aktivasyonu için gerekli olan moleküler mekanizmaya sahiptir. Bu mekanizma, insan sperm fizyolojisinde canlılığı ve motiliteyi korumada görev almaktadır. Otofaji işlevselliğini yitirmiş olan proteinlerin, sitoplazmik yapıların ve organellerin parçalanmasından sorumlu fizyolojik bir süreçtir. Otofaji mekanizmasında meydana gelebilecek bir bozulma hücre canlılığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu bilgiler ışığı altında biz yapmış olduğumuz bu çalışmada 4 grup oluşturduk. Grup1: Kontrol Grubu: Hiçbir infertilite rahatsızlığı bulunmayan Dünya Sağlık Örgütü (WHO 2010) semen parametrelerine göre normal kabul edilen hastalar,

Grup:2 Varikosel Grubu: Varikosel teşhisi almış ve diğer infertilite nedeni olan hastalıkları bulunmayan hastalar ve

Grup:3 Enfeksiyon Grubu: Orşit-Epididimit teşhisi almış ve diğer infertilite nedeni olan hastalıkları bulunmayan hastalar

Grup 4: Açıklanamayan İnfertilite Grubu: Açıklanamayan İnfertilite teşhisi almış ve diğer infertilite nedeni olan hastalıkları bulunmayan hastalar.

Her bir gruba dahil edilen hastaların sperm parametreleri WHO 2010 kriterlerine göre değerlendirildi. Ayrıca her bir hasta grubundan alınan örneklere yayma preparat ile LC3A/B, Beclin-1, p62, ATG5, ATG12 ve ATG16 antikoları ile immunohistokimyasal olarak boyama yapıldı. Her bir hasta grubundan alınan örneklere LC3A/B ve Beclin-1 antikoları ile western blot analizi yapıldı ve her bir hasta grubu Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak ultrasitrüktürel olarak incelendi.

Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda normal insan spermatozoasında işlevsel olarak var olduğu bilinen otofaji belirteçlerinin hasta gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını gözlemledik. Yapmış olduğumuz western blot analizi ve ultrastrüktürel incelemelerde bu elde ettiğimiz verileri desteklemekteydi. Bu sonuçlarda bize varikozel, orşit-epididmit gibi rahatsızlıkların otofaji mekanizmasında bozulmaya neden olabileceğini göstermiştir. Bu mekanizmanın açığa çıkarılması yeni tedavi seçenekleri oluşturulmasının kapısını açacaktır. Ayrıca yapılan tüm araştırmalara rağmen açıklanamayan erkek infertilitesi teşhisi konmuş vakalarda da otofaji belirteçlerindeki bu artışın, yeni teşhis ve tedavi alternatiflerinin geliştirilmesi yönünden bilime katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** İnfertilite, sperm, otofaji.

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF AUTOPHAGY MARKERS IN THE SPERMS OF MALE INFERTILITY DIAGNOSED INDIVIDUALS**

**CAN K. N. Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Histology and Embryology Program PhD Thesis, Aydın, 2018.**

Infertility is an important health problem not only physiologically but also psychologically and sociologically. Infertility affects 10-15% of the reproductive couples today. Infertility due to male factor accounts for approximately 30-40% of this ratio. The preservation of normal male fertility is based on the production of morphologically normal, adequate and mobile sperm. Human spermatozoa has the molecular mechanism necessary for autophagy activation. This mechanism is responsible for maintaining vitality and motility in human sperm physiology. Autophagy is a physiological process responsible for the disruption of proteins, cytoplasmic structures and organelles that have lost their functionality. A disruption that may occur in the autophagy mechanism affects the cell viability negatively. In this study we have created 4 groups:

Group 1: Control Group: Patients without any infertility disorders who are considered normal according to the World Health Organization (WHO 2010) semen parameters.

Group 2: Varicocele Group: Patients diagnosed with varicocele but without other infertile diseases.

Group 3: Infection Group: Patients diagnosed with Orchitis- epididymitis but without other infertile diseases.

Group 4: Unexplained Infertility Group: The group in which the patients were diagnosed with an unexplained infertility diagnosis (without other infertile disease).

The sperm parameters of patients included in each groups were assessed according to the WHO 2010 criteria. Immunohistochemical staining was also performed with LC3A/B, Beclin-1, p62, ATG5, ATG12 and ATG16 antibodies in the specimens obtained from each patient group. Samples from each patient groups were subjected to western blot with LC3A/B and Beclin-1 antibodies. In addition, each patient group was examined ultrastructurally using TEM microscopy. We observed that autophagic markers known to be functionally present in normal

human spermatozoa increased significantly in patient groups compared to the control group. The western blot and ultrastructural studies that we have done have also supported the data we have obtained. These results have shown us that such disorders as varicocele, orchitis-epididitis may cause deterioration in autophagy mechanism. The discover of this mechanism will open the door to the creation of new treatment options. In addition, we believe that this increase in autophagic markers will shed new light on the development of new diagnostic and therapeutic alternatives for unexplained infertility cases.

**Key Words:** Infertility, Sperm, Autophagy.

# 1. GİRİŞ

İnfertilite medikal, sosyal, psikolojik ve evlilik içi uyumsuzluk gibi birçok yönden çiftleri olumsuz yönde etkileyen küresel bir sorundur (Subedi S ve ark, 2016). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) infertiliteyi; bir çiftin bir yıl boyunca düzenli korunmasız cinsel ilişkiye girdiği halde gebe kalamama durumu olarak tanımlamaktadır. Günümüzde üreme çağındaki çiftlerin % 10-15' inde infertiliteye rastlanmaktadır. Çiftlerin % 40-50' sinde kadın kaynaklı infertilite mevcutken, % 30-40' ında ise erkek kaynaklı infertilite durumu ile karşılaşılmaktadır. Bu çiftlerin yaklaşık olarak %10-15' inde ise günümüzdeki mevcut standart tanısal testler ile açıklanamayan infertilite mevcuttur (Speroff L ve Fritz M.A, 2011).

İnfertilite nedenlerinin %30-40 'ında erkek kaynaklı infertilite ile karşılaşılmaktadır ve bu yüksek oran bir çok araştırmacıyı bu konuda çalışmaya yönlendirmiştir. Erkek infertilitesi olgularında dikkatli öykü ile etyoloji büyük bir oranda ortaya konabilir. Bu nedene bağlı olarak erkek hastaların değerlendirilmesinde öykü çok önemlidir. Erkek infertilitesinde en sık karşılaşılan nedenler aşağıda Tablo 1'de gösterilmektedir (Kışnişçi H.A ve ark, 1996).

Tablo 1. Erkek İnfertilitesi Nedenleri ve Görülme Oranları (Kışnişçi H.A ve ark, 1996).

İnfertilite Nedeni	Yüzdesi %
İdyopatik nedenler	75.1
Varikosel	12.3
Ürogenital enfeksiyon	6.6
İmmünolojik faktörler	3.1
Kazanılmış faktörler	2.6
Konjenital anomaliler	2.1
Seksüel nedenler	1.7
Endokrin Patolajiler	0.6

WHO 2010 tarihinde sperm parametrelerinin alt referans değerlerini güncellemiştir. Semen değerlendirmeleri bu kriterlere göre yapılarak infertilite tanısı konmaktadır.

Normal erkek fertilitésinin korunması yeterli ve motil sperm üretimine dayanır, bu nedenle spermatogenezisin sağlıklı bir şekilde gerçekleşebilmesi için mikro ortamının dengesi önemli bir rol oynamaktadır (Aparicio IM ve ark, 2016). İnsan spermatozoası, otofaji aktivasyonu için gerekli olan moleküler mekanizmaya sahiptir. Bu mekanizma, insan sperm



fizyolojisinde canlılığı ve motiliteyi korumada görev almaktadır (Aparicio IM ve ark, 2016; Song WH ve ark, 2016).

Kelime anlamı olarak kendi kendini yeme anlamına gelen otofaji, açlık gibi fizyolojik bir durumla karşılaşan hücrenin, besin elde edebilmek için hücre içerisinde bulunan yapıları nasıl parçalandığını anlatabilmek için kullanılmaktadır. Otofaji, hücre içerisinde bulunan ve yapısal olarak işlevi bozulmuş yada görevini yerine getiremeyen organellerin ve hücre içerisinde bulunan makro ve mikro moleküllerin bir kesecik ile sarılarak lizozomlara gönderilmesi ve bu keseciğin lizozom ile birleşmesi sonucu bu yapıların lizozom içerisinde parçalanmasına neden olan bir mekanizmadır (Song WH ve ark, 2016). En az üç ayrı otofaji mekanizması tanımlanmıştır. Bunlar: Makrotofaji, şaperon aracılı otofaji ve mikrotofajidir. Otofaji denildiğinde genel olarak makrotofaji kastedilmektedir. Otofaji ile bağlantılı proteinler (Atg proteinleri) ilk olarak mayalarda yapılan araştırmalarda saptanmıştır. Günümüzde Atg geninin 30 dan fazla çeşidi tanımlanmıştır (Kroemer G, 2010). Bu proteinlerin bir kısmı otofajik keseciğin ve otofagozomun oluşumunda görev almaktadır. Otofaji aşağıda belirtilen beş adımda gerçekleşmektedir: 1) İndüksiyon 2) Genişleme 3) Tamamlama 4) Yapışma ve füzyon 5) Degredasyon. Besin azlığında otofajinin uyarılmasıyla tip I PI3K (Fosfotidilinozitol-3-kinaz) AKT-mTOR sinyalinin inhibisyonuna ve tip III PI3K hVPS34/Beclin 1 (Drosophilada Atg6 ve Mayada Atg6/Vps30)'nın da aktivasyonuna neden olur (Papinski D ve ark, 2014). Otofajinin aktivasyonu için öncelikle serine/threonine kinaz Atg1'in (Memelilerde ULK 1 ve 2) aktive olması gerekmektedir. Otofajinin aktivasyonu ile beraber Atg1, Atg13 ile bir kompleks oluşturur. Bu kompleksin oluşumunun otofagozomal yapının oluşumuyla ilgili olduğu düşünülmektedir (Song WH ve ark, 2016). Fagofor, otofagozom ve otofagolizozom oluşumu en az 30 Atg proteini tarafından ayarlanmaktadır. Atg1 ve Beclin 1 (Atg 6'nın memeli homologu) bu sürecin ilk aşamalarına katılırlar. Atg5, Atg12, Atg16 arasındaki protein ilişkileri ve Atg8 'in lipidasyonu otofagozom oluşumunu indükler. Mayalardaki memeli homologlarından Atg8, mikrotübüle bağlı protein hafif zinciri 3 (LC3) olup, LC3-I ve LC3-II olmak üzere iki formda bulunur. LC3-I, sitozolde normal olarak bulunan bir 18-kDa polipeptid iken proteolitik olgunlaşmanın ürünü olan LC3-II (16 kDa) otofagozomal membranlarda bulunur. LC3-II, otofajiyi incelemek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve memelilerde otofagosomatik bir belirteç olarak düşünülmüştür (Aparicio IM ve ark, 2016). Otofaji, embriyo gelişimi, doku homeostazı ve hastalık sırasında hücre sel sağkalımı ve hücre ölümünü teşvik eden dinamik bir süreçtir.

Yapılan çalışmalar da, otofajinin besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre

homestostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (de Bruin EC ve Medema JP, 2007). Bunlara ek olarak bir çok çalışma otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Carew JS ve ark, 2007; Papandreou ME ve Tavernarakis N, 2016). Ayrıca bu çalışmalarda, otofaji mekanizmasında meydana gelebilecek anormalliklerin, nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları ve kanser gibi rahatsızlıkların oluşumunda önemli bir rol oynayabileceği de vurgulanmıştır. (Aparicio I.M ve ark, 2016; Papandreou ME ve Tavernarakis N, 2016).

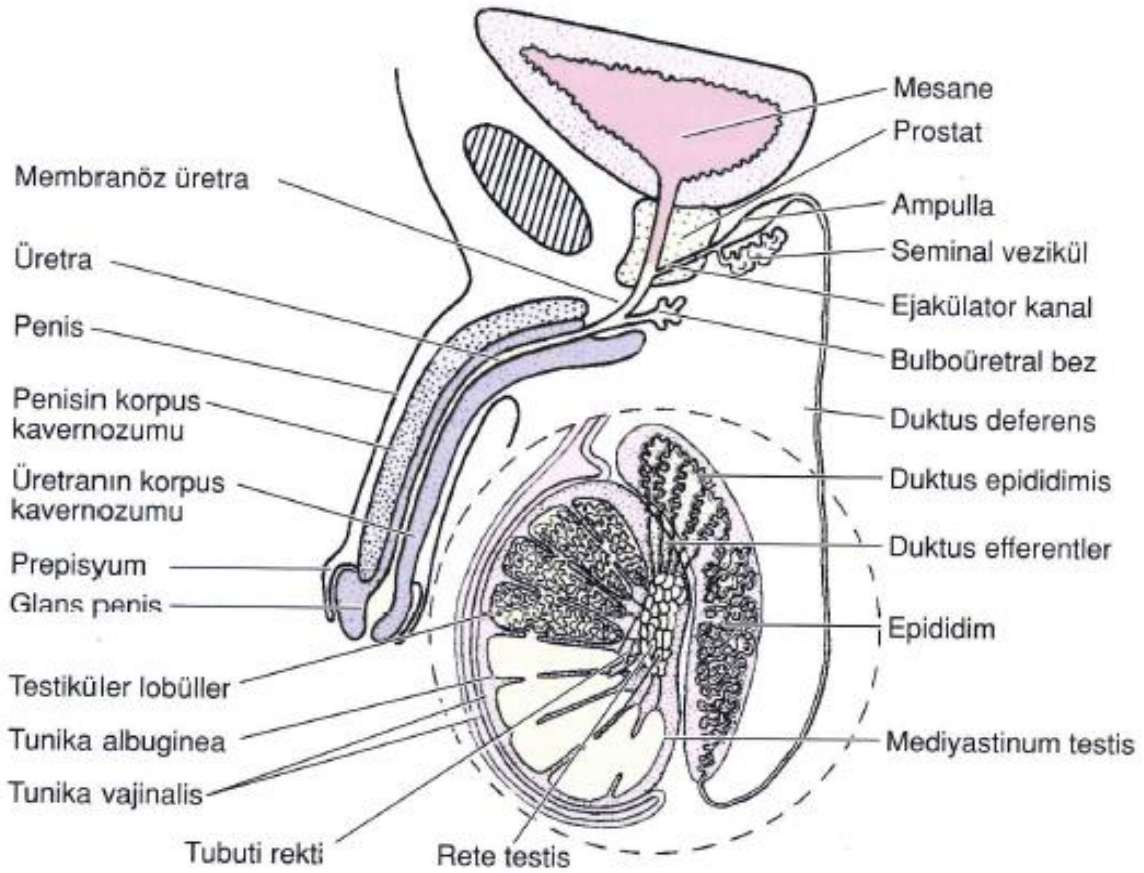
Erkek infertilitesi bir çok farklı hastalığa bağlı olarak ortaya çıkabildiği gibi idiopatik infertilite oranlarında oldukça fazladır. Sperm parametrelerindeki bozulmaların moleküler mekanizması halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Otofajinin genel prensibi hücre korunmasına katkıda bulunmak olsa da, apoptozu kolaylaştırmak, antagonize etmek yada birlikte çalışmak, veya bağımsız olarak hücre ölümünü gerçekleştirmek gibi fonksiyonlarında bulunmaktadır. Sağlıklı sperm, otofaji aktivasyonu için gerekli olan moleküler mekanizmaya sahiptir. Bu mekanizma, insan sperm fizyolojisinde canlılığı ve motiliteyi korumada görev almaktadır.

Biz bu çalışmada küresel bir sorun olarak ortaya çıkan infertilitenin büyük bir yüzdelik dilimini oluşturan erkek infertilitesini nedenleri ile sınıflandırarak normal fertil erkek spermelerinde işlevsel olarak bulunduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan otofajik belirteçlerdeki olası değişiklikleri incelemeyi, erkek infertilitesi olgularında otofajinin rolünü araştırmayı ve bu bilgiler ışığında yeni yapılacak olan çalışmalara ışık tutmayı ve literatüre katkı sağlanmayı hedeflemekteyiz. Çalışmamız erkek infertilitesi tanısı almış bireylerde otofaji belirteçlerinin çalışıldığı ilk çalışma olarak da önem kazanmaktadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, asıl olarak spermatogenezis ve spermiyogenezis süreçleri sonunda sperm üretiminin gerçekleştiği ve testosteron gibi androjenlerin sentez ve salgılanmasından sorumlu olan testisler ile dışarıya sperm taşınmasından sorumlu olan genital boşaltım kanallarından oluşmaktadır. Erkek üreme sisteminin bir parçası olan bu genital boşaltım kanalları, duktus eferentes, tuktus epididimis, duktus deferentes, duktus ejakulatoryus ve erkek üretrasının bir parçasıdır. Semen sperm dışındaki kısmını oluşturmada görev alan ve sperm beslenmesi için besin kaynağı oluşturan, vezikula seminalis, aksesuar cinsiyet bezleri, prostat, bulboüretral bezler ve penisten oluşmaktadır (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).



Şekil 1. Erkek genital sistem kompetentini gösteren şematik diyagram (Jangueria LC ve Carneiro J, 2003)

## 2.1.1. Testis Embriyolojisi

### 2.1.1.1. Cinsiyetin belirlenmesi

Embriyonun genetik olarak cinsiyeti, fertilizasyon sırasında oositi dölleyen spermim yapısına bağlı olarak belirlenmektedir. Seks kromozom kompleksinde bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda genellikle testisler gelişmektedir (Moore KM ve Persaud TVN). Kısaca cinsiyet X kromozomu taşıyan bir sekonder oositin, X ya da Y kromozomu taşıyan bir sperm ile döllemesi sonucu belirlenmektedir. Fertilizasyondan sonra oluşan embriyo XX veya XY kromozom kompleksine sahip olmuş olur. Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti sekonder oositi dölleyen sperm çeşidi ile fertilizasyon sırasında belirleniyor olsa da embriyonun görünümü 7. haftaya kadar her iki cinste de birbirine benzer devam etmektedir ve bu safhaya 'seksüel gelişiminin farklanmamış safhası' denilmektedir. Testislerin gelişimi koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanmaktadır. Y kromozomunun kısa kolunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yer alan SRY geninin varlığı ile gonadal cinsiyet belirlenmiş olur (Moore KM ve Persaud TVN, 2002; Sadler T.W, 2005; Ross MH ve Pawlina W 2014; Kierszenbaum AL, 2006).

Erken embriyonik gelişimde SRY geninin ekspresyonu cinsiyetin belirlenmesinden sorumludur. Y kromozomunda bulunan SRY geninin kodladığı genetik bilgi erkek bireyin gelişimi için yeterli değildir. SRY geni otozomal 9, 11, 17 ve 19 numaralı kromozomlarda ve X kromozomunda bazı genlerin aktivasyon zincirini kontrol eden bir ana şartel olarak görev yapmaktadır. SRY geni tarafından kodlanan testis belirleyici faktör (TNF) olarak bilinen transkripsiyon faktörü DNA ya bağlanan ve DNA'nın moleküler yapısını değiştirebilen bir yapıya sahiptir. Etkilenen DNA diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına izin verecek şekilde bir halka oluşturur. Bu transkripsiyon faktörleri de hem testislerin hem de diğer erkek cinsiyet organlarının oluşumunu başlatan diğer genlerin ekspresyonlarına neden olurlar. SRY geni ile eksprese olan genler ve görevleri şu şekilde sıralanabilir;

- WT-1 geni: Ürogenital sistemin gelişimi SRY transkripsiyonunun düzenlenmesi
- SOX-9 geni: Müllerian inhibe edici faktörün sentezlenmesinden sorumlu olan AMH genini aktive etmesi
- SF-1 geni: Birkaç steroidogenik genin ekspresyonunu düzenlenmesi
- DAX-1 geni: Nüklear reseptör DAX-1'i kodlaması

Testisler abdomenin posteriyör duvarında retroperitoneal olarak ürogenital sistemle yakın ilişki halinde gelişirler ve daha sonra skrotumun içerisine girerler (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

Testisler üç kaynaktan köken almaktadırlar.

1. Posterior abdominal duvarın mezotel epitelyumu (mezodermal epitel)
2. Altındaki mezenşim dokusu (embriyonik bağ dokusu)
3. Primordial germ hücreleri (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006; Moore KM ve Persaud TVN, 2009).

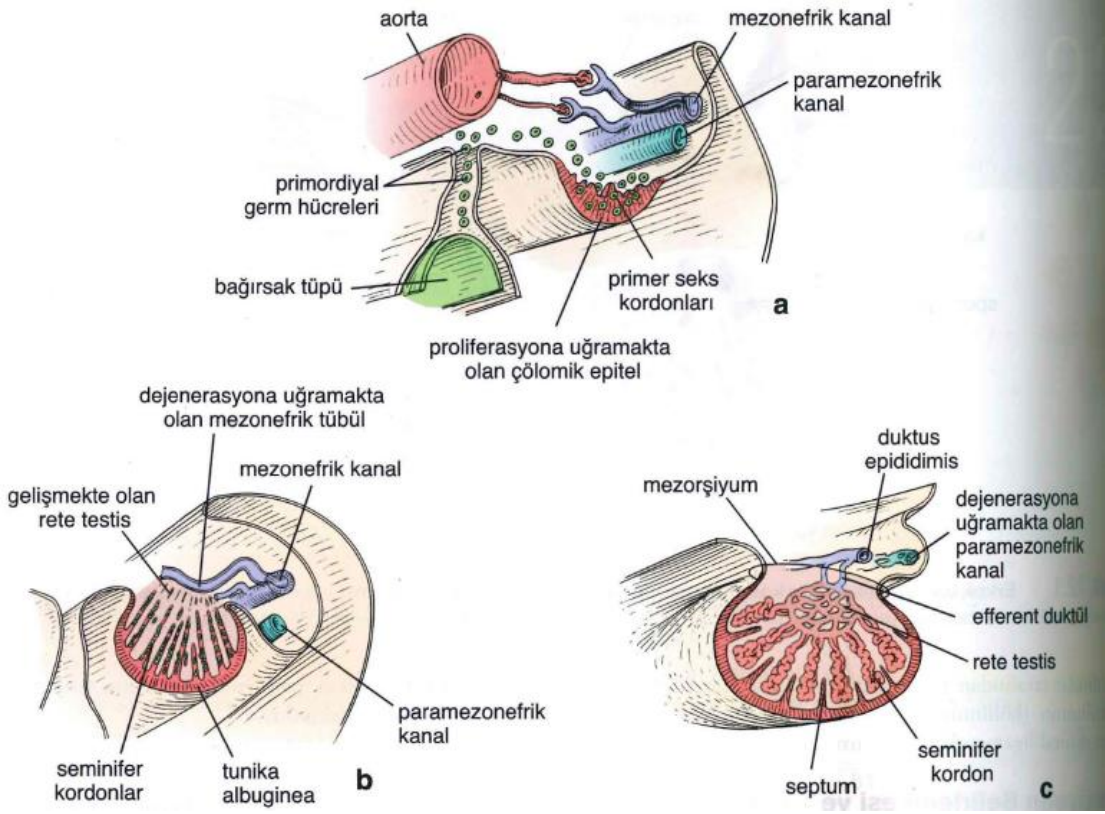
Üçüncü haftada vitellus kesesi duvarında lokalize olan endodermal primordial germ hücrelerinin allantoyisi geçerek bağırsağın arka kısmında radix mesenterii olarak adlandırılan mezenter kökü'nün sağında ve solunda ve mezonefrozun medialindeki mezotelde plica genitilis olarak adlandırılan gonadal kabartı içine girmesi ve buradaki hücreleri indüklemesi ile 5. hafta başına denk gelen bir süreçte gonad taslakları gelişmeye başlar. Yani gonadal gelişimin ilk dönemleri 5. haftada ortaya çıkmaya başlar. Mezonefrozun medialinde, sağ ve solda, mezotel epitelinde çoğalma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin çoğalması ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık 'gonadal (genital) kabartı' oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar primer seks kordonları altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Bu sırada farklanmamış gonad, dışta yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe farklılaşır ve medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklanır, korteks birtakım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur (Moore KM ve Persaud TVN, 2009; Sadler T.W, 2005).

### **2.1.1.2. Testislerin gelişimi**

Primordial germ hücreleri içerisinde genetik olarak XY kromozomunu taşıyan embriyo erkek cinsiyet özelliklerini göstererek gelişimini sürdürecektir. Y kromozomunda bulunan testis belirleyici faktörün etkisi ile primitif cinsiyet kordonları (testiküler kordonlar) çoğalmaya devam eder ve medullanın iç kesimlerine doğru testis ve medullar kordonları oluşturmak üzere ilerler ve daha sonrasında da rete testisi oluşturacak olan ince bir ağ yapısı oluştururlar. Testislerin gelişim basamaklarında dens tunika albuginayanın gelişim aşaması testis gelişiminin devamı için önem arz etmektedir. Genişleyen testis artık mezonefrozdan ayrılarak kendi mezenterisi olan mesorchium ile asılı hale geçer. Testiküler kordonlar bu aşamadan sonra artık,

seminifer tübüllere, tubuli rektiye ve rete testise farklılanacaktır (Moore KM ve Persaud TVN, 2002; Sadler T.W, 2005).

Gonadal kabarıklığın mezenşiminden intersitisyel leydig hücreleri köken alırlar. Testiküler kordonlar arasında bulunurlar ve bu kordonların farklanmasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Seminifer tübüller leydig hücrelerini oluşturan mezenşimden ayrılırlar. 8. haftaya gelindiğinde leydig hücreleri artık testesteron ve androstenedion salgılamaya başlamışlardır. Bu hormonların salınımı ile de mezonefrik duktusların ve dış genitallerin erkek yönünde farklılaşması indüklenmiş olmaktadır. Gelişimin dördüncü ayna gelindiğinde at nalı şeklini alan testis kordonlarının son kısımları da rete testisi oluşturmaktadır. Testis kordonları asıl olarak iki elemandan oluşmaktadır bunlar; sertoli destek hücreleri ve primitif germ hücreleridir. Sertoli destek hücrelerinden glikoprotein bir hormon olan Anti Müllerian Hormon (AMH) salgılanmaktadır. AMH sertoli hücrelerinden p berteye kadar salgılanır daha sonra ise seviyesi azalır. AMH paramezonefrik duktusların gelişimini baskılamaktadır. Seminifer tübüllerin puberteye kadar lümenleri oluşmaz. Lümen gelişimi p berteden sonra başlamaktadır. Fetal dönemlerde seminifer tübül duvarında çoğunlukla sertoli hücreleri bulunmaktadır, daha sonra ise testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyini oluşturan mezotel meydana gelir. Rete testis duktus eferentesi oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübül ile devam etmektedir. Bu duktus yapıları duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanır (Moore KM ve Persaud TVN, 2009).



Şekil 2. Testis gelişim evrelerinin şematik diyagramı (Ross MH ve Pawlina W, 2014)

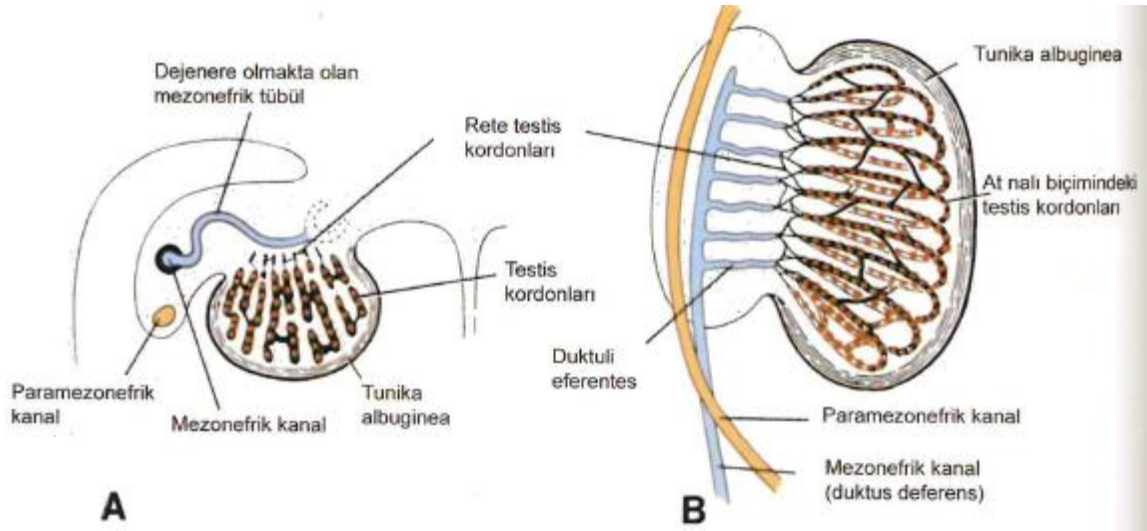
### 2.1.2. Genital Kanalların Gelişimi

Hem dişi hem de erkek karakterde gelişim gösterecek olan embriyo mezonefrik (Wolffian) kanallar ve paramezonefrik (Müllerian) kanallar olarak iki çift genital kanalı da içerisinde barındırmaktadır. Bu nedenle gelişimin 5. ve 6. haftalarında embriyoda genital sistem farklılaşmamış evrededir. Erkek üreme sisteminin gelişiminde mezonefrik kanallar önemli bir yer tutarken, dişi üreme sistemi gelişiminde paramezonefrik kanallar rol oynamaktadır (Sadler TW, 2005; Moore KM ve Persaud TVN, 2009).

Sekizinci haftada fetal testislerden salgılanan testosteron etkisi ile mezonefrik böbreklerden idrar akışını sağlayan mezonefrik duktusların proksimal parçası kıvrımlı bir hale gelerek epididimise farklılaşır. Mezonefrik duktusun kıvrımlı kısmının epididimise farklılaşmasından sonra geriye kalan kanal kısmından duktus deferens ve duktus ejakulatoryus gelişmektedir. Paramezonefrik kanallar mezonefrozların lateralinde, mezotelin longitudinal invaginasyonlarından oluşurlar. İnvaginasyonların kenarlarının birleşmesi ve birbiri ile kaynaşması sonucu meydana gelen yapılar paramezonefrik kanallardır. Bu kanalların, periton boşluğuna açılan huni şekilli kranial uçları vardır. Paramezonefrik kanallar, mezonefrik

kanallara paralel olarak, kaudal yönde embriyonun gelecekteki pelvik bölgesine ulaşmaya kadar uzanırlar. Bu bölgeye ulaştıklarında ise paramezonefrik kanallar mezonefrik kanalları ventralde çaprazlarlar ve tam orta kısma gelecek şekilde bir birleşme gösterip kaynaşırlar. Bu kaynaşma sonucunda Y harfine benzer şekilli, uterovaginal primordiyum' un oluşumu sağlanmış olur. Tübüler bir yapı sergileyen uterovaginal primordiyum, ürogenital sinüsün dorsal duvarı içine uzanır, burada bir kabartı şeklinde olan sinüs tüberkülünü oluşturur (Moore KM ve Persaud TVN, 2009).

8. haftada testosteron üretimi başlar ve stimülasyonundan da insan koryonik gonodotropin hormonu sorumludur. Mezonefrik duktuslardan erkek genital duktusların gelişimi bu üretilen testosteron ile uyarılırken, Müllerial inhibe edici hormon (MIS) ile de epitelial mezenşimal transformasyon ile paramezonefrik duktusun kaybolması sağlanmış olur. Mezonefrozun dejenerasyonundan sonra mezonefrik duktusların bazıları kalıcılığını devam ettirerek duktali eferentesi oluştururlar. Bu duktulilerin mezonefrik duktusa açıldıkları kısım duktus epididimise dönüşmektedir. Mezonefrik duktusun epididimisin distaline gelen kısmı kalın bir düz kas tabakası ile sarılır ve artık bu yapıya duktus deferens denir. Son olarak da mezonefrik duktusun üretra arasında kalan kısımda duktus ejakulatoryusu oluşturur (Moore KM ve Persaud TVN, 2002).



Şekil 3. A. Gelişimin 8. Haftasında testisten geçen, testis kordonları, tunika albuginea ve primordial germ hücrelerini gösteren transvers geçit B. 4. ayda testis ve genital kanalların genel görünümü (Sadler TW, 2005).



### **2.1.2.1. Genital bezlerin gelişimi**

Seminal Vezikül: Mezonefrik duktusların kaudal uçlarının yanlarından dışa doğru seminal vesiküllerin duktusları gelişerek seminal bezleri oluşturur. Bezler, spermilerin beslenmesini sağlayan ejakülat içindeki sıvının büyük kısmının salgılandığı yapılardır (Moore KM ve Persaud TVN, 2002).

### **2.1.2.2. Prostat**

Üretranın prostatik parçasından köken alan çok sayıdaki endodermal çıkıntı kendi etrafındaki mezenşimin içerisine doğru büyür. Prostatın glandüler bez epiteli bu endodermal hücrelerden gelişirken, epitel hücrelerini çevreleyen mezenşimden ise düz kaslar ve stroma meydana gelmektedir (Moore KM ve Persaud TVN, 2002).

### **2.1.2.3. Bulboüretal bezler**

Üretranın spongioz parçasından çiftler halinde dışarıya doğru büyüyen hücrelerden gelişirler, görünümü bezelyeyi andıran bu organların düz kas hücreleri ve stroması çevre dokuda bulunan mezenşimden köken almaktadır. Bulboüretal bezlerin üretmiş olduğu sağlıklı semen içeriğine karışmaktadır (Moore KM ve Persaud TVN, 2002).

## **2.1.3. Dış Genital Organların Gelişimi**

Erkek fetüste dış genital organların gelişimi fetal testisten salgılanan androjenlerin etkisi altında gerçekleşmektedir. 7. hafta sonuna kadar dış genitalerin gelişimi her iki cinsten de birbirine benzer olarak devam ederken, 9. haftada cinsiyetin farklılaşması ortaya çıkmakta fakat 12. hafta sonlarına kadar dış genitalerin farklılaşması tam olarak gerçekleşmemektedir (Sadler TW, 2005).

Erkek dış genital organların gelişiminde fallus oluşumu karakteristiktir. Primitif çizgiden köken alan mezenşim hücrelerinin çoğalarak bir şişlik şeklinde oluşturduğu kloakal kıvrım kloakal membranın kranialinde birleşerek genital tüberkülü oluşturur, genital tüberkülün hızla uzaması ile bir primordiyal fallus oluşur. Bu uzama sırasında fallus üretral kıvrımı öne doğru çekerek üretral oluğun yan duvarlarının oluşmasını sağlamış olur. Üretral oluk uzayan fallusun kaudal ucuna kadar gelir ancak en uç noktasına ulaşamaz bu oluğun epiteli endodermal kökenlidir ve bu epitel üretral plağı oluşturur. Fallusun hızla uzaması ile penis oluşur (Sadler TW, 2005).

Üçüncü ayın sonunda, penisin ventral yüzeyi boyunca, ürogenital katlantılar, birbirleriyle birleşerek spongioz (penil) üretra' yı oluştururlar. Bu kanal fallusun ucuna kadar uzanmaz. Penisin orta hattında yüzey ektoderminin birleşmesi ile penil rafe oluşur. Penil rafenini oluşumu ile penis içerisine spongioz üretranın hapsedilmesi sağlanmış olur. 4. ay civarında glans penisin uç kısmında, üretranın en distal kısmı içe doğru büyüyen ektodermal kökenli bir kordon meydana getirir, bu kordon penis köküne doğru büyüyerek spongioz üretra ile birleşir. Daha sonra bu kordonun kanalize olması ve spongioz üretraya bağlanması ile üretranın terminal parçası tamamlanmış olur ve dış üretral açıklık (eksternal uretral meatus) glans penis ucuna açılmış olur (Sadler T.W, 2005; Moore KM ve Persaud TVN, 2002).

20. haftaya gelindiğinde, glans penisin çevre dokusunda sirküler olarak ektodermal bir içe büyüme gerçekleşir. Bu içe büyüme kanalize olduğunda, prepus adı verilen örtücü bir deri katlantısı da oluşumunu tamamlamış olur. Penisin, korpus spongiozum ve korpora kavernosa kısımları, fallus mezenşiminden gelişir. Erkeklerde son olarak skrotal şişkinliklerin birbirine doğru büyüüp birleşmesi sonucu skrotum meydana gelir. Bu birleşme sonucu bir birleşme çizgisi oluşur ve bu çizgi skrotal rafe olarak adlandırılır (Sadler T.W, 2005; Moore KM ve Persaud TVN, 2002).

Testislerin inişi: Fetal gelişimin 26. haftasında fetal testisler abdomenden skrotum içerisine inmektedirler. Testislerin skrotum içerisine inişinde gubernakulumun testosteron etkisi ile kısılması ve abdominal kavitenin de kendi yönünde embriyonik gelişimi etkilidir. Testosteron duyarlı bir ligament olan gubernakulum ayrıca gelişmekte olan skrotal kese ile her bir testisin inferiyör kısmı arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır. İnguinal kanal abdominal kavite ile skrotum arasında dar bir geçit yapısındadır ve testisler bu yapı içerisinden geçerek skrotum içerisine inerler. Testislerin skrotum içerisine inişinde; duktus deferens, otonomik sinirler, kan ve lenf damarlarını ve testislerin anterolateral yüzeyini kaplayan tunika vaginalis adı verilen abdominal periton uzantısını da beraberinde götürürler. Kriptorşidizm bir diğer adı ile inmemiş testis, testislerin skrotum içerisine inmeleri sırasında testis inişinin obstürüksiyona uğrayarak gerçekleşmemesi durumudur. Prematüre doğumların yaklaşık %30' unda tam term doğumlarında %1' inde gözlenen bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır (Moore KM ve Persaud TVN, 2002; Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).

Skrotal kese içerisindeki sıcaklık vücut sıcaklığından 2-3 derece daha düşüktür. Bu düşük sıcaklık vücut içerisindeki sıcaklıkta da üretilen hormonlar için gerekli olmasa da spermatogenezisin gerçekleşebilmesi için çok önemlidir (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

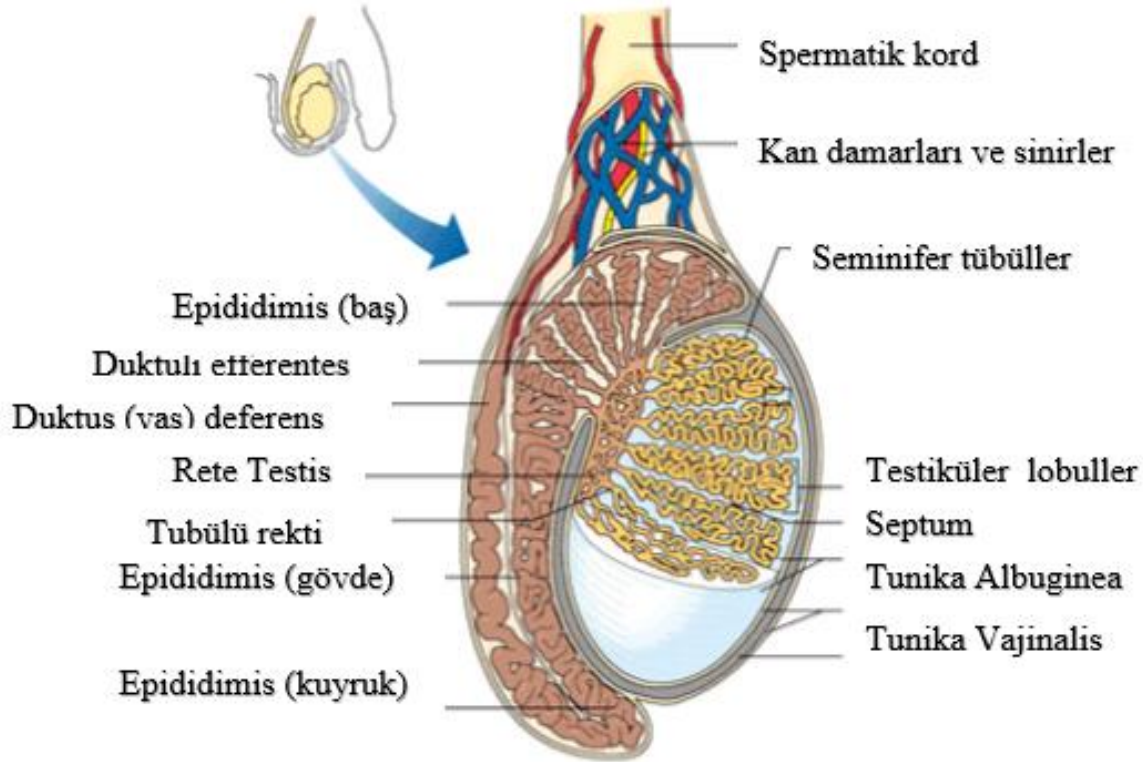
#### 2.1.4. Testis Histolojisi

Yetişkin testisleri, vücut boşluğu dışında yer alan ve skrotal kese adı verilen cep şeklinde bir yapı içerisinde uzanan bir çift oval şekilli organdır. Her bir testis anterior abdominal duvarın tabakaları ile devamlılık gösteren ve skrotum içerisine uzanan uzun bir muskulofasiyal kesenin ucunda asılıdır. Testisler spermatik kordonlar tarafından abdominal duvara bağlıdır (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

Her bir testis, sıra dışı bir kalınlığa sahip bağ dokusu yapısındaki kapsül olan tunika albuginea tarafından çevrelenmiştir. Tunika albuginea testisin posterior yüzünde kalınlaşır, bu kalınlaşan bölgeye mediastinum testis adı verilir. Bu fibröz yapı testislerin bez yapısına doğru ilerler ve testiküler lobül adı verilen yaklaşık 250 ila 300 piramidal lobül oluşturur. Her bir lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1 ile 4 adet seminifer tübül adı verilen ince tübül yapısı içerir. Seminifer tübülleri çevreleyen bağ dokusu kan ve lenf damarlarından zengindir. Bu bağ dokusu içerisinde ayrıca sinirler, makrofajlar ve testis bağ dokusuna özelleşmiş ve androjen salgı yapan Leydig hücreleri gibi interstisyel hücreler bulunmaktadır. Seminifer tübüller, asıl erkek üreme hücresi olan spermatozoonların oluştuğu ve birçok görevinin yanı sıra spermatogonyumlara desteklik sağlayan sertoli hücrelerinin bulunduğu kısımlardır. Seminifer tübüllerin her biri yaklaşık 150-250 µm çapında ve 50 cm uzunluğundadır ve seminifer tübüller U şeklindeki iki ucu rete testise açılan tübül yapılarıdır. Seminifer tübüller alışılmışın dışında karmaşık yapıdaki spermatogenik serileri ve spermatogenik seri hücrelerine nispeten oldukça büyük olan sertoli hücrelerini içeren çok katlı bir epitel ile döşelidir. Sertoli hücreleri, bu adlandırma dışında destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinmektedir. Bu hücreler puberteden sonra çoğalma özelliklerini yitiren hücrelerdir. Sertoli hücreleri komşu spermatogenik seri hücreleri arasındaki boşlukları boylu boyunca dolduran böylelikle seminifer tübüllere yapısal olarak düzen veren, çok sayıda apikal ve lateral uzantıları olan prizmatik görünümde hücrelerdir (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006; Jangueria LC ve ark, 2006).

Spermatogenik hücreler düzenli olarak spermatogenezis geçirerek olgun sperme dönüşen hücrelerdir. Spermatogonium adı verilen kök hücre görevi gören immatür spermatogenik hücreler bazal lamina üzerine dizilmişlerdir. Spermatid adı verilen matür hücreler ise sertoli hücrelerinin lümene bakan apikal bölümlerine tutunmuşlardır. Spermatogenezisi takiben spermin son halini aldığı spermiyogenezis başlar ve artık olarak spermatid fazının sonunda oluşan spermier sertoli hücrelerinin apikalinden lümene bırakılır. Peri tübüler doku olarak bilinen tunika propria çok tabakalı bir bağ dokusudur. Seminifer tübülleri çevreleyen bu bağ

dokusu bol sayıda kan damarları, yaygın lenf damarları, seminifer tübülünün bazal laminasının dışında 3-5 tabaka miyoid hücre ve kollajen fibrillerden oluşmaktadır ve içerisinde fibroblast bulundurmamaktadır. Tunika propria içerisinde bulunan miyoid hücrelerin ince yapısı incelendiğinde bazal laminalarında bol sayıda aktin filamentleri gözlenir, buna bağlı olarak miyoid hücrelerinin düz kas ile ilgili özellik gösterdiği söylenebilmektedir. Ayrıca bu hücrelerin fazla sayıda endoplazmik retikulum içermeleri nedeni ile bu hücrelerin olmayan fibroblastlar yerine kollajen sentezleme rollerinin de olduğu düşünülmektedir. Kıvrımlı yapıdaki her bir seminifer tübül sonlanırken lumeni daralır ve tubuli rekti denilen düz tübüller halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübülleri rete testise bağlar. Rete testis, seminifer epitelyumun ürünleri olarak adlandırdığımız testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonları toplayan kanallar ağıdır. 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmını bağlar (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006; Jangueria LC ve ark, 2006).



Şekil 4. İnsan testisinin sagittal kesitinin şematik diyagramı (Ross MH ve Pawlina W, 2006)

#### 2.1.4.1 Seminifer epitelyum siklusu

Spermatogenetik hücreler spermatogenezis öncesi seminifer epitelyum üzerinde dağınık halde rastgele dizilmişlerdir. Bir seminifer tübülün herhangi bir bölümünde farklılaşmanın tüm fazları ardışık olarak oluşur ve birbirleri ile spermatogenik köprülerle bağlantılı olarak senkronize

şekilde mitotik ve mayotik bölünmelerle olgunlaşmaya başlarlar. Bu siklik süreç içerisinde tanımlanabilen her bir hücre topluluğu bir evre olarak tanımlanır ve seminifer tübülün herhangi bir bölgesinde aynı hücre birliği örtüsünün ardışık olarak iki ortaya çıkışı arasındaki evreler serisi ‘seminifer epitelin bir siklusunu’ oluşturmaktadır. İnsanda seminifer epitelyum siklusunda altı evre tanımlanmaktadır. Otoradyografik çalışmalar seminifer epitelyum siklusunun süresinin sabit olduğunu ve insanda yaklaşık olarak 16 gün sürdüğünü ortaya koymaktadır. İnsanda bir serinin spermatogenezisi tamamlayabilmesi için her biri 16 günden 4-6 sıklusa yani ortalama 76 güne ihtiyaç vardır. Oluşan spermatislerin epididimisten geçişini tamamlaması içinse 12 güne ihtiyaç duyulmaktadır. İnsan testislerinde günde yaklaşık olarak toplam 300 milyon spermatozoa üretilmektedir. Siklusun uzunluğu ve spermatogenezis için geçen süre sabittir ve her tür için kendine özgüdür (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).

#### **2.1.4.2 Seminifer epitelyum dalgaları**

Seminifer epitelyum dalgaları seminifer tübül uzunluğu boyunca hücresel evrelerin düzenli bir biçimde birbirini takip ederek gelişmesinin dağılımı olarak tanımlanmaktadır. İnsanda her bir hücre siklusunun evreleri insan seminifer tübülünde yama benzeri bir dağılıma sahiptir ve buna bağlı olarak insan seminifer tübülünden alınan bir transfer kesitte tübülün çevresi boyunca siklusunun altı farklı evresi ortaya konabilmektedir (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).

#### **2.1.4.3 Sertoli hücreleri**

Sertoli hücreleri seminifer tübül epitelinin asıl epitelyum hücrelerini oluşturmaktadır. Sustentaküler hücreler olarak da adlandırılan sertoli hücreleri uzun prizmatik replike olmayan ve çok tabakalı seminifer epitelyumun bazal laminası üzerine oturmuş hücrelerdir. Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelin baskın hücrelerdir (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).

Puberteden sonra, seminifer epitelde kök hücre görevindeki spermatogoniumların mitoz ve akabinde mayoz bölünmeler geçirerek spermatogenezise başlaması ile sertoli hücreleri seminifer epitelin yaklaşık %10’ luk kısmını oluşturur. Yaşın ilerlemesi ve spermatogenezisin azalması ile sertoli hücreleri tekrar epitelin ana elemanı haline gelirler (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006; Ovalle ve Nahirney, 2009; Junqueira ve ark, 2006).

Puberteden sonra post mitotik olan sertoli hücrelerinin sitoplazmaları organelce zengindir. Sitoplazmasında yaygın bir agranüler endoplazmik retikulum ağı, iyi gelişmiş bir

granüllü endoplazmik retikulum, annüler lameller iyi gelişmiş golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri ve lizozom, lipid damlacığı, lipofuksin pigmenti, glikojen granülleri ve mikrotübül ve ara filamanlardan oluşan zengin bir hücre iskeletine sahiptir. Sertoli hücreleri aktif hücrelerdir. Bu nedenle ökromatik bir nukleusa sahiptir. Nukleus genelde oval veya üçgen şekilli olabilmektedir. Oluklu bir yapıda olan çekirdek heterokromatin kitleleri içeren büyük bir nukleolusa sahiptir. Nükleusun bulunduğu yer ve şekli değişkenlik göstermektedir. Hücrenin bazallinde yassı bir şekilde bulunabildiği gibi, üçgen ya da oval şekilli olup hücrenin bazaline yakında konumlanabilmektedir. İnsanlarda sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında özel inklüzyon cisimcikleri bulunur. Bu inklüzyon cisimciklerine Charcot Böttcher cisimleri denmektedir. 10-15 mikrometre uzunluğunda 1 mikrometre genişliğindeki ince fuziform kristeloidler ışık mikroskobik olarak da görüntülenebilmektedir. Ultrastrüktürel olarak ise 15 nm çapında paralel seyirli filament demetleri şeklinde gözlenir. Bu yapıların, kimyasal organizasyonları ve üstlendikleri roller tam olarak bilinmemesine rağmen son çalışmalar bu yapılarda lipoprotein reseptör (CLA-1) proteinlerinin biriktiğini buna bağlı olarakta, inklüzyon cisimciklerinin lipid transportunda ve sertoli hücreleri tarafından lipidlerin kullanımında fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

Seminifer tübülün epitelinde yan yana bulunan sertoli hücreleri, taban ve yan yüzlerinde bulunan sıkı bağlantılar ile birbirlerine tutunmaktadır. Bu bağlantı ile epitelyum bazal ve abdominal kompartmanlara ayrılır. Bu sertoli-sertoli hücresi bağlantı kompleksi, seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartmana bölmektedir. Bu yapıya bağlı olarak oluşan kan testis bariyeri spermatogonium ve primer spermatositleri yukarıda bulunan sekonder spermatosit ve spermatidlerden ayırır (Öber A, 2006).

Kan testis bariyeri, seminifer tübül lümeninin içinde bulunan sekonder spermatositleri ve spermatidleri dolaşım sistemi elemanlarından bir başka deyişle antijenlerden ayırır. Bu sayede spermatogenezisini tamamlamış olan spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlara karşı korur (Kierszenbaum AL, 2006; Junqueira LC ve Carneiro J, 2003; Ross MH ve Pawlina W, 2014).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları şunlardır;

1. Spermatogenik serilere yapısal desteklik sağlarken onların, korunması ve beslenmesinden de sorumludur. Birbirleri ile sitoplazmik köprüler ile bağlanmış olan spermatogenik seri hücreleri, sertoli hücrelerinin sitoplazmik dallanmaları ile fiziksel olarak desteklenir. Kan-testis bariyeri ile sekonder spermatositler ve spermatidlerin kan dolaşımı ile

bağlantısı kesildiği için, bu hücrelerin besin alışverişi sertoli hücreleri vasıtası ile gerçekleşmektedir (Junqueira ve ark, 2006).

2. Fagositoz özelliği ile spermiyogenezis geçiren spermatidlerin rezidüel cisimcik olarak adlandırılan fazla sitoplazmasını parçalar bunun yanı sıra sertoli hücreleri tarafından gelişimini tamamlayamamış hücreler ve dejeneratif spermatojenik hücreler de fagosite edilir (Junqueira ve Carneiro).

3. Embriyonik gelişim sırasında müller kanalının gelişimini baskılayarak erkek yönünde ilerleyecek olan fetusta müller (paramezonefrik) kanalllarının gerilemesinden sorumlu anti-müllerian hormonu salgılar (Junqueira ve Carneiro, 2003).

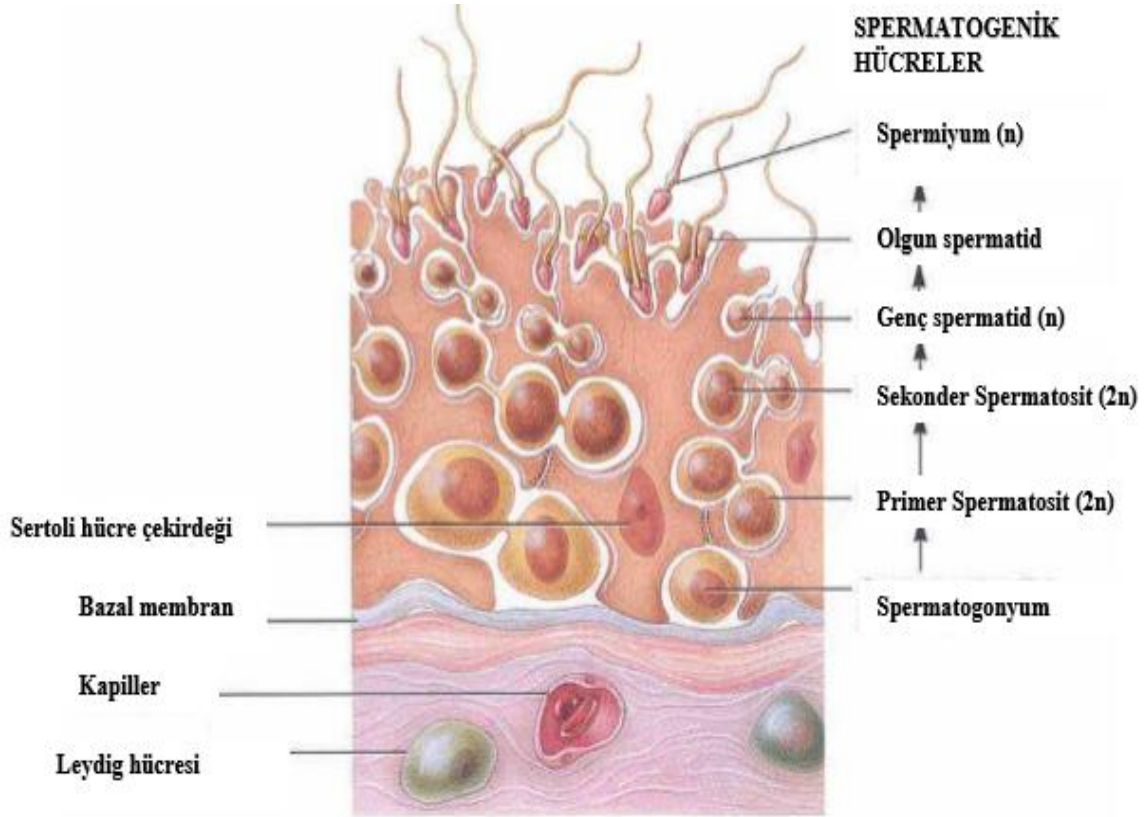
4. Sertoli hücreleri olgunlaşmakta olan spermın seminifer tübüllerden genital kanallar yönünde taşınması için kullanılan sıvıyı üretmektedir. Sertoli hücreleri androjen bağlayıcı protein salgılayarak spermatogoniumların olgun bir sperm haline dönüşmesi için gerekli testosteronu seminifer tübüllerin luminal kompartmanına bırakmaktadır (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006, Junqueira ve Carneiro, 2003).

5. Follükül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında sertoli hücreleri androjen bağlayıcı protein salgılayarak spermatogoniumların olgun bir sperm haline dönüşmesi için gerekli testosteronu seminifer tübüllerin luminal kompartmanına bırakmaktadır (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).

#### **2.1.4.4 Leydig hücreleri**

İntersitisyel hücreler olarak ta adlandırılan leydig hücreleri eozinofik boyanan poligonal hücrelerdir. Büyük olan bu hücrelerin çekirdeği merkezin dışında ve bir ya da iki çekirdekçik içermektedir. Hücre sitoplazması testosteron üretimine bağlı olarak yüksek oranda lipit içermesine bağlı olarak köpüksü şekilde görülmektedir. Leydig hücrelerinde lipofuksin pigmenti ve çubuk şeklindeki sitoplazmik kristaller olan reinke kristalleri bulunmaktadır. Bu kristallerin kesin yapı ve fonksiyonu tam olarak bilinemese de hücrenin bir protein ürünü olduğu düşünülmektedir (Ross MH ve Kierszenbaum AL, 2006). Bu kristaloid inklüzyonlar puberteden önce görülmemektedir ve yaş ilerledikçe sayıları artmaktadır. Steroid salgı yapan hücrelere özgü bir özellik olan sıkı paketlenmiş ve yoğun bir düz endoplazmik retikuluma sahiptir. Testosteron kolestrolen üretilmektedir. Kolestrol ya doğrudan düz endoplazmik retikulum zarında sentezlenmekte ya da dolaşımdaki düşük lipoprotein moleküllerinden üretilmektedir. Gerektiğinde kullanılmak üzere lipit damlacıklarında da kolestrol depolanmaktadır. Kolestrol taşıyıcı proteinler vasıtası ile mitokondrilerin iç zar yapısına taşınır

daha sonra luteinizan hormon etkisi ile kolestrol pregnanola çevrilir. Mitokondrion zarından düz endoplazmik retikuluma aktarılan pregnanolon düz endoplazmik retikulumda bulunan enzimler tarafından işlenerek testesterona çevrilir. Aralıksız olarak sentezi devam eden testesteron hücre zarından difüzyonla geçerek hücre dışı alana salınarak dolaşımdaki steroid bağlayıcı proteinlere bağlanır (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006; Ovalle ve Nahirney, 2009).



Şekil 5. Seminifer tübül epitelyum hücreleri ve çevre doku hücrelerini gösteren şematik diyagram (Jangueria LC ve Carneiro J, 2003)

### 2.1.5. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumlardan olgun sperm oluşana kadar geçen süreç olarak tanımlanmaktadır. Spermilerin üretildiği bu kompleks süreçte bir seri olay gerçekleşmektedir. Puberteden kısa bir süre önce, hipofizden salgılanan gonodotropinlerin seviyelerindeki artışın etkisi ile başlar ve yaşam boyu devam eder. Spermatogenez tanımlatıcı olabilmesi için üç ayrı faza ayrılmaktadır; spermatogonyal faz, spermatozoid fazı (mayoz) ve spermatid fazı (spermiyogenez) (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).



### **2.1.5.1.Spermatogonyal faz**

Spermatogonyumlar testis dokusunda bazal kompartmanda bulunan, yaklaşık 12 µm çapındaki bazal lamina ile direkt olarak ilişkide bulunan diploid spermatogenik kök hücrelerdir. Spermatogonial kök hücreler erkek fertilitesindeki yeri çok büyüktür. Bu hücrelerin kanser kemoterapisine ve radyasyona dirençleri yüksektir. Bu hücrelerin somatik hücreler gibi mitoz bölünme ile bölünmesi ile hem kendi yerlerine geçecek olan hücreleri hem de primer spermatositlere farklılaşacak olan spermatogonyum hücrelerini oluştururlar. Spermatogonyumlar sık mitoz göstermektedirler ve bu mitoz erkeklerde ileri yaşlara kadar devam etmektedir (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006). Seminifer tübül epitelinin bazal kompartmanında, sertoli hücreleri arasında yerleşik iki tip hücre mevcuttur; bu hücreler spermatogonyum A ve spermatogonyum B olarak adlandırılmaktadır (Kierszenbaum AL, 2006).

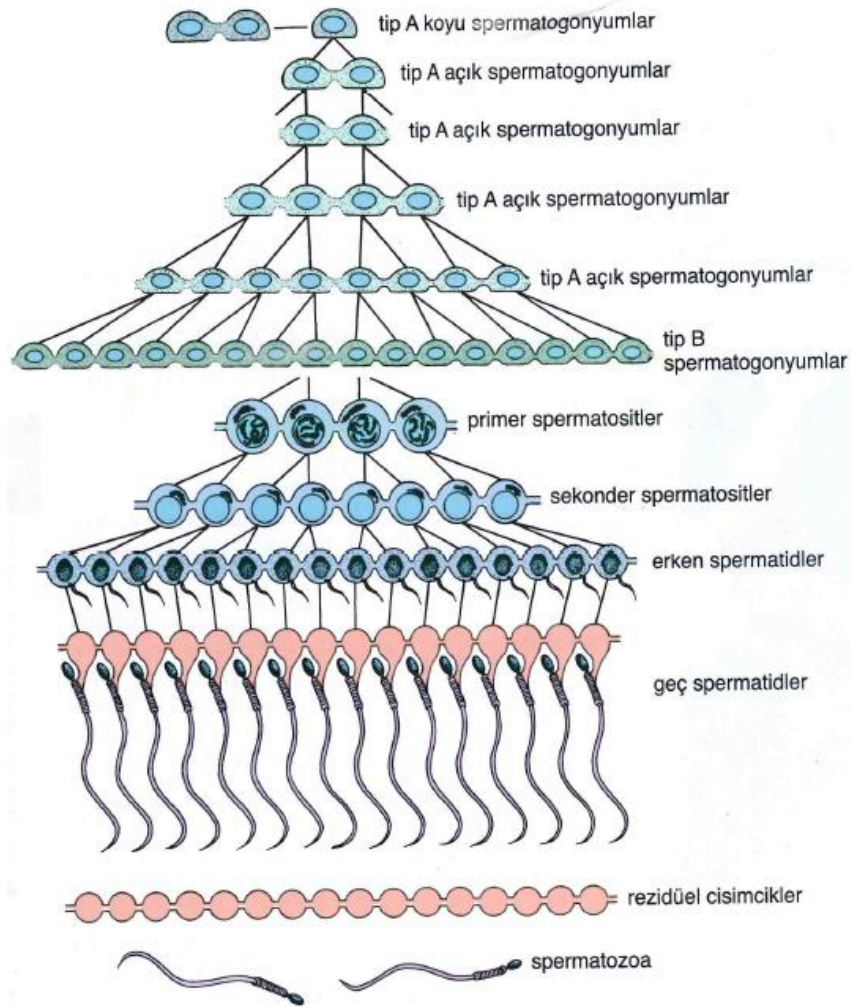
Nükleuslarının histolojik görünümüne göre spermatogonyum A kök hücreler, A tipi (koyu) spermatogonyumlar ve A tipi (açık) spermatogonyumlar olmak üzere ikiye ayrılır. A tipi (koyu) spermatogonyumların seminifer epitelin kök hücreleri olduğu düşünülmektedir ve bu spermatogonyumlar ya spermatogonium epiteline kaynak oluşturacak şekilde çoğalan A tipi (koyu) spermatogonyumlara ya da A tipi (koyu) spermatogonyumlar kök hücre topluluğunu terk ederek her biri daha iyi farklılaşmış A tipi (açık) spermatogonyum dizilerine kaynak oluşturacak spermatogonyumlara farklılaşırlar. A tipi (açık) spermatogonyumları da birkaç mitotik bölünme geçirirler ve A tipi (açık) spermatogonyumlarında son bölünmesinden sonra B tipi spermatogonyumlar meydana gelir. B tipi spermatogonyumların daha sonra mitoz bölünme geçirmeleri ile primer spermatosit meydana gelir. Primer spermatositler, spermatogenezin, mayoz fazının başlangıcını oluştururlar (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006). Bir A tipi koyu spermatogoniumun, A tipi açık spermatogoniumuna mitoz ile bölünmesinde bilinen mitoz bölünmeden farklı kardeş hücrelerin birbirlerine ince bir sitoplazmik köprü ile bağlanmasıdır. Bu bağlantı başlangıçtaki A tipi koyu spermatogoniumun tüm soyu için geçerlidir ve birbirleri ile bir inci dizisi gibi bağlıdırlar ve bu bağ spermatogenezin son aşamasına kadar devam etmektedir (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

### **2.1.5.2.Spermatosit Fazı (Mayoz):**

Spermatosit fazında ana amaç primer spermatositlerin mayoz bölünme geçirerek hem kromozom sayılarını hem de DNA miktarının yarıya indirmektir. B tipi spermatogonyumların mitotik bölünmeleri sonucunda primer spermatositler meydana gelir. Primer spermatositlerin

oluşumundan kısa bir süre sonra mayoz bölünmeden hemen önce DNA replikasyonu gerçekleşir; böylece her spermatozoid iki katı DNA ( $4c$ ) ve normal sayıda kromozom ( $2n$ ) içerir. İnsan primer spermatozoidleri yaklaşık olarak 22 gün sürecek olan mayoz I' in profazında kromozomları oluşturacak şekilde yoğunlaşır. Profaz sonunda homolog kromozomlar metafaz çizgisinde dizilirler. Mayoz I sonunda DNA miktarı ve kromozom sayısı yarıya düşer. Birinci mayoz bölünme ile oluşan sekonder spermatozoid haploid kromozom ( $n$ ) ve  $2c$  miktarda DNA içerir. Birinci mayozun profazında paternal ve maternal DNA'nın homolog kısımları birbiriyle karşı karşıya gelir ve kardeş olmayan kromatidler arasında crossing over başlar. Böylece genetik çeşitlilik sağlanmış olur (Kierszenbaum A, 2006).

Sekonder spermatozoid DNA sentezi olmadan ikinci mayotik bölünmenin profazına geçer. Metafazda kardeş kromatidler ayrılır ve bölünme tamamlandığında  $1n$  kromozom ve  $1c$  miktarda DNA içeren iki haploid spermatid oluşur (Ross MH ve Pawlina W, 2014).



Şekil 6. Spermatogenik hücre serilerini gösteren şematik diyagramı (Ross MH ve Pawlina W, 2014)

### 2.1.5.3.Spermatid Fazı (Spermiyogenez)

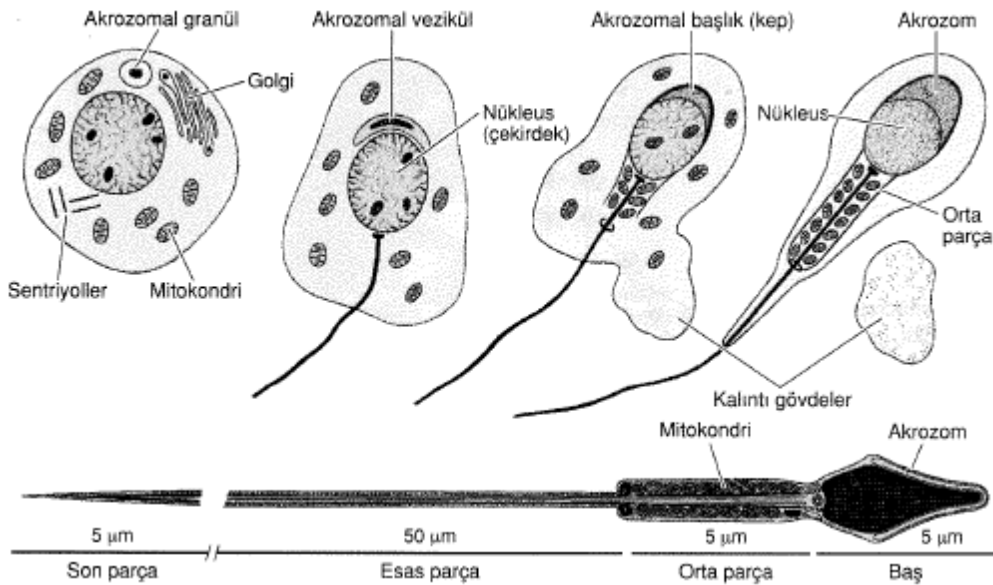
Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır. Spermatid fazında spermatidler olgun sperm yapısı kazanmak için yüksek düzeyde yeniden şekillenmeye uğrarlar. Bu aşamada artık daha fazla hücre bölünmesi gerçekleşmez. Haploid yapıdaki yuvarlak hücreler morfolojik değişime uğrar oluşacak olan matür spermde haploiddir. Bir sperm sadece bir oositi fertilize ettiği zaman diploid yapı yeniden oluşur (Menscher, 2015).

Spermiyogenez dört fazda meydana gelmektedir:

1. Golgi Fazı: Spermatidlerin sitoplazmasında belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriyonlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve endoplazmik retikulum bulunur. Bu faz spermatidin golgi kompleksinde bulunan çok sayıdaki periodik asit schiff (PAS) pozitif granülleri ile karakterizedir. Bu proakrozomal granüller akrozomal vezikül adı verilen zar ile çevrelenmiş bir vezikül yapısı oluşturmak için bir araya gelirler. Bu akrozomal vezikül daha sonra akrozomal kepi oluşturacaktır. Bu vezikülün olduğu kısım oluşacak olan spermın ön kutbunu belirlemektedir. Bu aşamada sentriollerde oluşan bu vezikülün tam zıt kutbuna giderek oluşacak olan spermın arka kutbuna yerleşirler.
2. Kep Fazı: akrozomal veziküllerin çekirdeğin ön yarısı üzerinde yayılarak akrozomal kepi oluşturduğu fazdır. Akrozomal kepin altında bulunan çekirdek zarı porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Nükleer içerik aynı zamanda yoğunlaşmaya başlar.
3. Akrozom Fazı: Akrozom fazında spermatid kendini yeniden hizalar, kondanse olan (yoğunlaşan) nükleus yassılaşır ve uzar. Baş sertoli hücrelerinin içerisine tam olarak gömülür sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kısmına yerleşik, silindirik bir kılıf olan manşeti oluştururlar. Manşet spermatidin arka kutbuna doğru uzanır. Gelişmekte olan flagellum seminifer tübülün lümenine doğru uzar. Flagellumun gelişimini başlatan sentriyoller çekirdeğin arka kısmına geçerek burada spermın boyun kısmını oluşturmak üzere modifiye olurlar. Çekirdeğe sıg bir oluk ile tutunan sentriyollerden 9 fibril yapısı gelişir ve kuyruğun içine doğru dış yoğun fibrilleri oluşturur. Çekirdeğin flagellumla birleştiği kısma bağlantı parçası denmektedir ve bağlantı parçası proksimal ve distal sentriyolden oluşmaktadır (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006). Flagellumun proksimal parçası etrafında toplanan mitokondriyonlar daha kalın bir bölge olan orta parçayı oluşturur. Bu bölge de bulunan mitokondriyonlar spermiyumların hareketi için gerekli olan enerjinin kaynağıdır (Oko, 1991). Orta parçanın distalinde iki sütun ve çok sayıda bağlantı kuşağından oluşan esas parçayı saran fibröz kılıf flagellumun neredeyse ucuna kadar uzanmaktadır. Flagellumun uç kısmında kalan fibröz kılıf ile sarılı

bulunmayan kısım son parça olarak isimlendirilmektedir. Akrozom; hyaluronidaz, nöraminidaz asit fosfotaz ve proteaz gibi hidrolitik enzimleri içerir ve bu yapısı ile özelleşmiş bir lizozom gibi işlev görür. Olgun bir sperm bir sekonder oositle karşılaştığında akrozomun dış zarı birçok farklı bölgede plazma zarı ile kaynaşır ve akrozom enzimleri hücre dışına salınır. Bu olay akrozom reaksiyonu olarak bilinir ve fertilizasyonun ilk basamağıdır (Kierszenbaum AL, 2006).

4. Olgunlaşma Fazı: Bu fazda somatik histonlar protamin denilen, arjinin ve lizinden zengin çekirdek proteinleri ile yer değiştirir. Bu olay sonucunda olgunlaşma fazında çekirdekte kromatin yoğunlaşması gözlenmektedir. Spermin genomik DNA'sını sabitlemek ve korumak için gerekli bir süreçtir. Somatik histonların protaminlerle yer değiştirmesinin ardından, nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilirler. Çekirdek uzar ve yoğunlaşır, manşet kaudal yönde göç eder. Olgunlaşma, çekirdek yoğunlaşır, manşet dağılmaya başladığında ve dış yoğun lifler tamamen organize olduğunda tamamlanır (Kierszenbaum AL, 2006). Spermatidin olgunlaşmasının tamamlandığı bu son fazda flagellumun çevresindeki fazla sitoplazma başka bir ifade ile rezidual cisimcik sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir. Artık matür spermatozoa son halini almıştır (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).



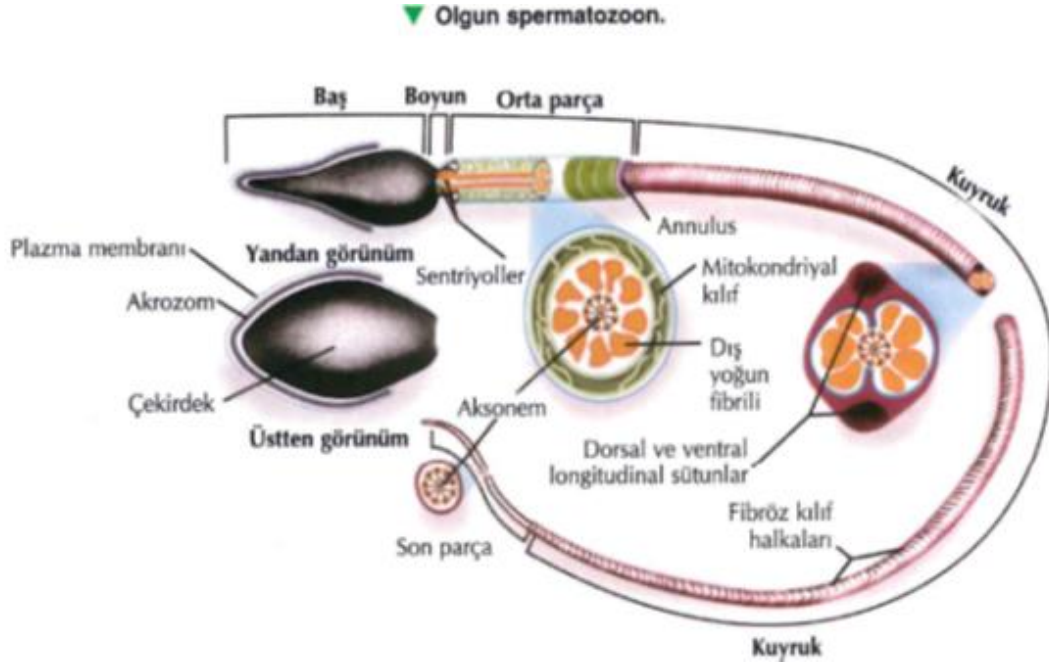
Şekil 7. Spermiyogenez fazında spermatidlerde meydana gelen değişimleri gösteren şematik diyagram (Jangueria LC ve Carneiro J, 2003)

### 2.1.6. Sperm Yapısı

Spermiyogenezis sonrası eşsiz bir hücre olan matür sperm oluşur. Olgun insan spermi, 60 µm uzunluğundadır. Son derece özelleşmiş olan olgun sperm hücresi iki ana elemandan oluşmaktadır. Bunlar baş ve kuyruk kısmıdır. Baş ve kuyruk birbirlerine bir bağlantı parçası ile bağlanmış durumdadır. Sperm 4,5 µm uzunluğunda, 3 µm çapında ve 1µm kalınlığında yassı ve silindir şekilde bir başa sahiptir. Sperm başının 3/2' lik ön kısmı akrozom ile sarılı bir çekirdek, sitoplazma ve sito iskeletal yapılar oluşturur (Sutovsky P ve Manandhar G, 2006).

Akrozomal kep, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin adı verilen tripsin benzeri bir proteaz içermektedir. Akrozomdan salınan bu enzimler, fertilizasyon sırasında salınılmaktadırlar ve o ana kadar inaktif olarak kalırlar. Matür spermin ovuma teması ile akrozomal enzimlerin salını verilmesi akrozoamal reaksiyonun ilk basamağını oluşturur. Bu süreç sperm penetrasyonunu ve onun akabinde de fertilizasyonu kolaylaştır ve artık ovuma başka spermlerin girmesi önlenir (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).

Sperm kuyruğu proksimalden distale doğru; boyun ya da diğer bir adı ile bağlantı parçası, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere bölümlere ayrılır (Fawcett, 1975). Boyun, kuyruk ve baş kısmının bağlantı bölgesidir ve kuyruk boyunca devam eder. Orta parça mitokondrionların sarmal bir şekilde yer aldığı kısımdır ve 7µm uzunluğundadır. Sperm metabolizması ve kuyruk hareketi için gerekli olan enerji bu orta parçada sarmal şekilde bulunan mitokondrionlardan sağlanmaktadır. Esas parça 40 µm uzunluğunda, fibröz kılıf ile çevrili dış yoğun fibrillere desteklik sağlayan kısımdır. Son parça olgun sperm de kuyruğun terminal kısmını oluşturan yaklaşık 5 µm kısımdır ve sadece hücre zarı ile çevrili axonemal kompleksi içermektedir (Ovalle WK ve Nahirney PC, 2009).



Şekil 8. İnsanda olgun bir spermatozoanın diyagramı (Ovalle WK ve Nahirney PC, 2009)

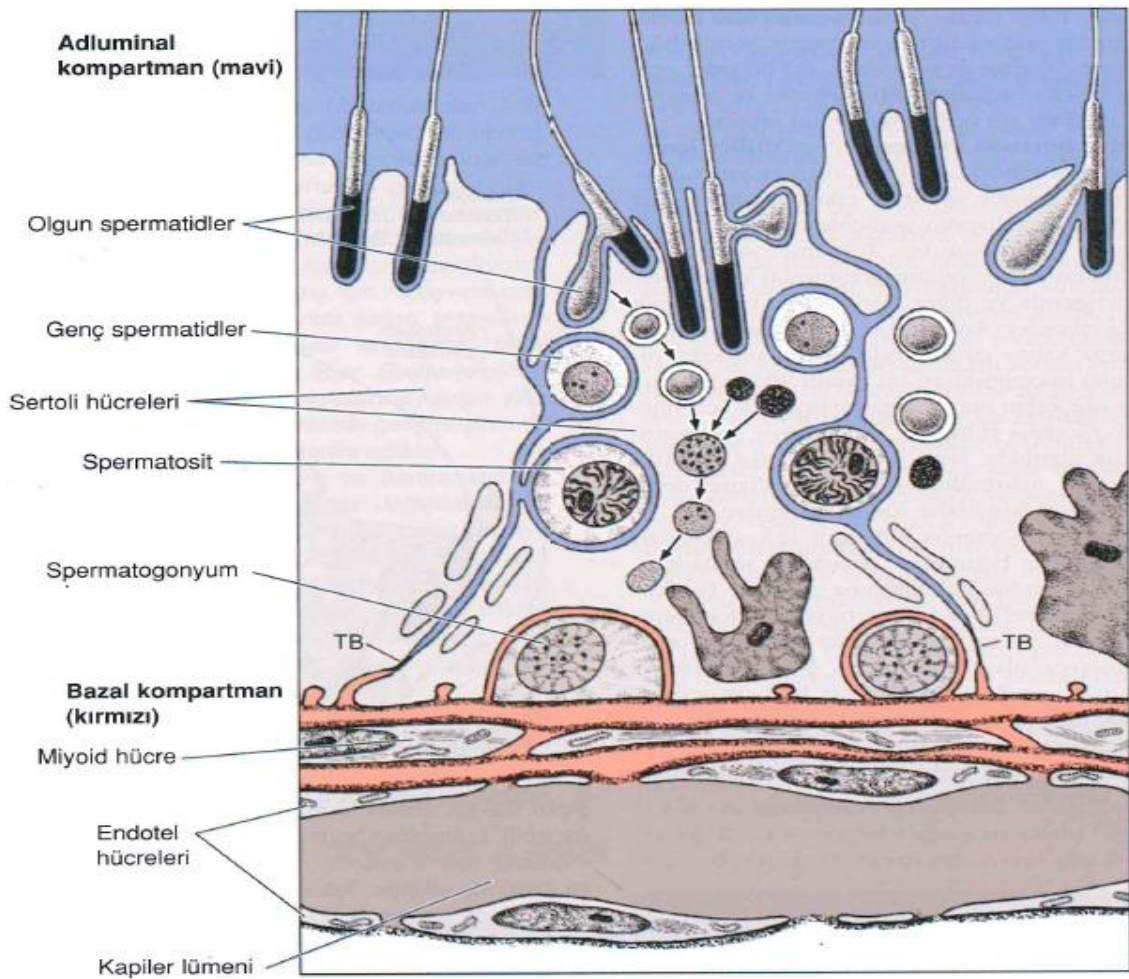
#### 2.1.6.1. Testislerin kanlanması

Testislerin her biri abdominal aortanın bir dalı olan testiküler arter yolu ile kanlanmaktadır (Çolgar U ve Arıcı A, 2006). Testiküler arterler testislere yaklaşıncaya oldukça kıvrımlı bir hal alır ve panpiniform venöz pluksus adı verilen testisten abdominal venlere kan taşıyan venöz pluksus ile çevrelenmiştir. Bu düzenek damarlar arasındaki ısı değişimine bağlı olarak skrotum içerisindeki testislerin daha düşük sıcaklıkta muhafaza edilmesini sağlamış olur. Testislerdeki zıt yönlü akım sıcaklık değişim mekanizması ile testisten dönen soğuk venöz kan ile abdominal bölgeden gelen sıcak kan soğutulmuş olur. Bunun yanında kremaster kası olarak adlandırılan ve lifleri abdominal duvarın internal abdominal oblik kasından köken alan kas demetinin kontraksiyonu testisleri abdominal duvara yaklaştırırken gevşemesi testisleri skrotumun içerisinde aşağıya indirir. Düşük sıcaklıklarda dartos kasında kontraksiyonlar oluşturur. Bu kaslardaki kontraksiyonlar ile skrotum içerisinde sıcaklık kaybının düzenlenmesi skrotal kesenin büzülüp gevşemesi ile gerçekleşir (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

#### 2.1.6.2. Kan testis bariyeri

Sertoli sertoli sıkı bağlantı alanları kan testis bariyerinin bulunduğu alanlardır. Kan testis bariyeri seminefer tübül epitelinde iyon, aminoasit ve karbonhidrat ve protein bileşenleri için fizyolojik bir tabakalanmanın oluşabilmesi için gereklidir. Bu bariyerin yardımı ile plazma

proteinleri ve dolaşımdaki antikorlar seminifer tübül lümenlerinden uzak tutulmuş olur. Spermatogenezis ile spermatogonyumların farklılaşması sperme özgü proteinlerin salınımına yol açar. Seksüel olgunlaşma immun bileşenlerin oluşumundan çok daha sonra ortaya çıktığı için diferansiye olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin yok edilmesine neden olabilecek bir immün yanıtı neden olabilir. Kan testis bariyeri gelişen spermatogenik hücre serileri ile immün sistem arasındaki herhangi bir girişimi elemine etmektedir. Kan testis bariyeri seminifer tübüllere immunoglobülinlerin geçmesini engeller. Böylelikle sertoli hücreleri vasıtası ile seminifer epitelyum herhangi bir otoimmün reaksiyondan korunmuş olur (Ross MH ve Pawlina W, 2014; RO ve ark, 1993).



Şekil 9. Sertoli hücrelerinin oluşturduğu kan testis bariyerinin şematik diyagramı (Jangueria LC ve Carneiro J, 2003)

### 2.1.7. Testis İçi Genital Kanallar

Tubuli rekti, rete testis ve duktus efferentes, testis içi genital kanallar olarak adlandırılmaktadır.

### **2.1.7.1. Tubuli rekti**

Seminifer túbüllerin çoğu loplul bir yapıya sahiptir, bu túbüllerin her iki ucu tubuli rekti adı verilen ve dallanma göstermeyip düz olan túbüllerle rete testise bağlanır. Tubuli rekti, testisin mediastinumunda yer alan tubuli rektide spermatogenik hücrelerin dereceli olarak kaybolmasına bağlı olarak bu túbüllerde artık sadece sertoli hücreleri bulunmaktadır. Tubuli rektinin başlangıç kısmı başlangıç sıkı bağ dokusu yapısında bir kılıfı ile desteklenmiştir ve kübik epitelyum ile döşeli ana kısım ile devam eder (Jangueria LC ve ark, 2006).

### **2.1.7.2. Rete testis**

Tubuli rekti mediastinum oldukça vasküler bağ dokusu içerisinde karmaşık bir yapıyla birbirlerine bağlanan kanallardan oluşan rete testisin içine boşalır. Rete testis apikal yüzeyi mikrovilluslar ve tek bir sil içeren kübik epitel ya da alçak prizmatik epitelyum ile döşelidir. Rete testiste ulaşan spermilerin kuyruklarında zayıf bir titreşim hareketi gözlenmektedir (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Jangueria LC ve ark, 2006).

### **2.1.7.3. Duktuli efferentes**

İnsanda yaklaşık olarak 20 adet duktuli efferentes mediastinumun süperiör uçundaki rete testisin kanallarını duktus epididimisin proksimal parçasına bağlar. Testisten çıkan duktus efferentes son derece kıvrımlı bir hal alırken 6-10 adet konik kütle oluşturur. Bu yapılar epididimisin baş kısmını oluşturur ve koni vaskülozi adını alır (Ross MH ve Pawlina W, 2014). Duktuli deferentes luminal yüzeye testere dişi görünümü veren yalancı çok katlı prizmatik epitelyum ile döşelidir. Prizmatik hücreler arasında epitelyal kök hücre olarak görev yapan bazal hücreler bulunur. Prizmatik hücreler silyumludur. Silyum bulundurmeyen prizmatik hücrelerde ise çok sayıda mikrovillus apikal yüzeyde invaginasyonlar, pinositotik veziküller ve endositotik yapı ile ilişkili diğer sitoplazmik içerik bulunur. Silyasız hücreler tarafından seminifer túbüllerden salgılanan sıvının çoğunu duktuli efferenteste geri emilir. Silyalı hücrenin sağlamış olduğu sıvı akımı ile spermiyumların epididimise doğru süpürülmesi sağlanmış olur. Duktuli efferentes túbülleri epididimise doğru ilerledikçe birleşiip epididimisin duktus epididimisini oluşturur (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Jangueria LC ve ark, 2006, 1993; Kierszenbaum AL, 2006).

### **2.1.8. Genital Boşaltım Kanalları**

Testiste üretilen spermiyumları penil yollara doğru taşıyan kanallar duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve duktus ejakulatoryus'dur.



### **2.1.8.1. Duktus epididimis**

Duktili eferentes ve duktus epididimis ikisi birlikte epididimisi oluşturmaktadır. Duktus epididimis yüksek düzeyde kıvrımlı bir yapıya sahip, yaklaşık 4-6 µm uzunluğunda bir yapıdır. Epididimis üç ana bölüme ayrılır; baş, gövde ve kuyruk. Baş kısmını duktus eferentes oluştururken gövde ve kuyruk kısmını duktus epididimis oluşturmaktadır. Testiste yeni üretilmiş ve epididimise giren sperm, duktus epididimiste ilerlemeleri sırasında hareket ve fertilizasyon yeteneği kazanırlar ve artık epididimisin son kısmında toplanan sperm, ileri doğru hareket yeteneği göstermektedirler. Duktus epididimis yuvarlak bazal hücreler ve prizmatik ve esas hücre adını alan stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Bu hücrelerin üzerine oturdukları bazal lamina, düz kas hücreleri ve kan kapillerlerinden zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş durumdadır. Prizmatik esas hücrelerinin yüzeylerinde bulunan stereosilyalar, epididimin baş bölgesinde dallanmalar gösterir ve uzundur. Kuyruk bölgesinde bulunan prizmatik hücrelerin stereosilyaları ise daha kısadır. Prizmatik esas hücreler, lizozom ve iyi gelişmiş bir golgi aygıtı içerir. Epididimis içerisinde eferent kanalcıklarda ve duktus epididimisin esas hücreleri tarafından testiküler sıvının yaklaşık %90' ını emilmektedir. Bazal hücreler ise bir kök hücre görevi üstlenerek esas hücrelerin farklılaşmamış öncülleri olarak düşünülmektedir. Ayrıca epitelyum içerisinde halo hücreleri olarak adlandırılan göç eden lenfositler bulunmaktadır. Epididimis epiteli boşaltım kanallar sistemi içerisinde lenfositlerin bulunduğu en üst seviyeyi temsil etmektedir. Duktus epididimisin bağ dokusunda bulunan düz kasların peristaltik hareketleri ile sperm hareket yeteneğini kazanana kadar kanallar boyunca ilerlemesi sağlanmış olur (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

### **2.1.8.2. Duktus deferens**

Duktus deferens bir diğer adı ile vaz deferens sperm izlediği yolda en uzun boşaltım kanalı olarak bilinmektedir. Kalın m. müsküler duvarlı epididimisin kuyruk kısmının düz bir tüp olarak devamıdır ve prostatik üretraya açılır. Duktus deferentesin en tipik özelliği dar bir lümen ve kalın bir düz kas tabakaya sahip olmasıdır. Duktus deferentes yüzeyi yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir ve epitelyum hücrelerin yüzeyi stereosilyalıdır. Elastik liflerden zengin bağ dokusu lamina propriayı oluşturmaktadır. Dışta ve içte longitudinal, ortada sirküler kalın bir kas tabakasından oluşmuştur. Sperm kordonunun bir parçası olarak bilinen duktus deferens prostata girmeden önce genişler ve ampulla denilen kısmı oluşturur. Bu alan epitel kalınlaşması ve fazla sayıda kıvrımlar yapması ile karakterizedir. Seminal veziküller ampullanın son kısmında duktusa katılırlar (Junqueira LC ve Carneiro J, 2003).

### **2.1.8.3. Duktus ejakulatorius**

Duktus deferensin ampullası, vezikula seminalisin kanalı ile birleşir ve ejakulatuar kanal olarak prostad bezinin içerisine girerek prostatik üretraya açılır. Ejakulatuar kanalın duvarında bir kas tabakası bulunmayıp prostadın fibromüsküler tabakası onun yerini alır (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

### **2.1.9. Yardımcı Üreme Bezleri**

Vezikula seminalis, prostat bezi ve bulboüretal bezler erkek üreme sisteminin yardımcı üreme bezleri olarak adlandırılmaktadır. Vezikula seminalis ve prostat androjenlerin kontrolü altında seminal sıvının çoğunu üretir (Junqueira LC ve Carneiro J, 2003).

#### **2.1.9.1. Vezikula seminalis**

Bir diğer değişle seminal veziküller, mesanenin posteriyöründe, duktus deferentesin ampullasına paralel olarak konumlanmış, iki adet yaklaşık 15 cm uzunluğunda ve yüksek düzeyde katlantılı tübüler bir bezdir (Ross MH ve Pawlina W, 2014). Salgı histolojik yapısı incelendiğinde, protein sentezleyen hücre yapısına sahip tek katlı kübikten yalancı çok katlı prizmatige doğru değişen bir epitel ile örtülüdür ve granüllerinden zengin epitelyum katlantılı mukoza kıvrımları içermektedir. Seminal veziküllerin dairesel ve uzunlamasına düz kas tabakaları ile çevrili lamina probriasi elastik liflerden zengindir. Seminal veziküllerin salgısı visköz beyazımsı sarı renktedir. Sperm aktivitesi için gerekli olan fruktozdan zengin bu salgı, sitrat, inositol, prostaglandinler ve çeşitli proteinleri de içermektedir. Androjenlerin kontrolü altında seminal veziküller tarafından üretilen ve seminal sıvıya salgılanan fruktoz gibi karbonhidratlar sperm hareketleri için gerekli enerji kaynağını oluştururlar. Seminal veziküller insan ejakülatının %70' ini oluşturmaktadır (Junqueira LC ve Carneiro J, 2003; Ross MH ve Pawlina W, 2014).

#### **2.1.9.2. Prostat**

Prostat, erkek üreme sisteminin en büyük yardımcı üreme bezidir. Büyüklüğü ve şekli ceviz bezeyen prostad dallanmış, 30-50 adet tübüloalveoler bezin oluşturduğu bir bezdir ve bu bezlerin kanalları prostatik üretraya açılır. Prostad bezinin ana görevi seminal sıvı oluşumuna katkı sağlar. Yetişkin prostat parankimi, santral zon denilen merkezi bölgedir. Prostad bezinin içerisinden geçen ejakulatuar kanalı çevrelemektedir ve bez dokusunun %25' ini oluşturur. Merkezi zon yalancı çok katlı bir epiteli ile döşelidir. İkinci olarak periferik zondan söz edilir;

periferik zon prostad bez dokusunun %70' ini oluşturmaktadır. Periferik zonun epiteli daha düzgündür ve prostat kanserinin geliştiği başlıca bölge periferik zondur. Bir diğer bölge olan transizyonel (geçiş) zonu prostadik üretyayı çevrelemektedir ve prostad bezinin %5' lik kısmını oluşturmaktadır. Son olarakta mukozal ve submukozal bezleri içeren periüretral zon bulunmaktadır (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Junqueira LC ve Carneiro J, 2003). Prostatik bezlerin lümeninde genellikle glikoproteinden zengin 0,2-2 mm küçük yuvarlak cisimcikler bulunur. Bunlar korpora amilasea olarak isimlendirilen prostat taşlarıdır. Sayıları yaşla birlikte artan ve çoğunlukla kalsifiye olmuş bu cisimciklerin işlevleri tam olarak bilinmemektedir. Prostad bezi prostatik asit fosfataz (PAP), fibrinolizin, sitrik asit ve prostad spesifik antijen (PSA) salgırlar. Hücreler bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve golgi kompleksine sahiptir. Salgı ürünleri prostat-spesifik asit fosfataz, prostat-spesifik antijen, amilaz ve semenin likefaksiyonunda rol alan fibrinolizin içerir. Prostatın salgısı pH 6,5 yani asidik değerdedir (Junqueira LC ve Carneiro J, 2003; Ross MH ve Pawlina W, 2014).

### **2.1.9.3. Bulboüretral bez**

Bulboüretral bezler bir diğer adı ile Cowper bezleri, ürogenital diyaframda yer alan çapları 3-5 mm olan bezelye büyüklüğünde yapıldır. Bulboüretral bezler preseminal sıvıyı salgılayan tek katlı kübik epitele sahip tübüloalveoler bezlerdir ve salgılarını penil üretraya boşaltırlar. Preseminal sıvı, yüksek miktarda galaktoz, alaktozamin galakturonik asit, sialik asit, metilpentoz içerir ve kayganlaştırıcı bir fonksiyona sahiptir (Junqueira LC ve Carneiro J, 2003; Ross MH ve Pawlina W, 2014).

### **2.1.10. Penis**

Penis başlıca iki erektil doku kütleli olan korpus kovernozom ve bir ventral erektil doku kütleli olan korpus sipongiozumdan oluşur ve dıştan deri ile sarılmıştır. Korpus sipongiozumun içinde üretranın sipongioz parçası yer alır. Tunika albuginea ile birbirine bağlanmış bu üç yapı yine tunika albugineanın oluşturduğu bir kapsül ile sarılmıştır hem korpus kavernozom hem de korpus spongiyozom, bir arterle beslenen ve venöz kanallarla boşaltılan sinüzoidler içerir. Korpus kovernozomun düzensiz şekilli vasküler boşlukları bir düz kas tabakası ile çevrelenmiştir. Tunika albuginea içerisinde birleşerek korpus kovernozomda çapraz geçiş yaparak trabekülalar oluşturan, bu düz kas demetleri düzensiz vasküler boşlukları saran subendotelial yastıklar olarak bulunmaktadır. Prostadın intersitisyel dokusunda çok sayıda sinir sonlanmaları ve lenf damarları bulunmaktadır. Ereksiyon sırasında penise kan akışını arttırmak üzere dilate olan Helisin arterlerinin kan ile dolması ile vasküler boşlukların boyutları ve sertliği

artmaktadır. Penisin ince olan derisi glans penis hariç alttaki gevşek bağ doku ile gevşekçe bağlı durumdadır. Glans peniste ise deri oldukça incedir ve bağ dokusuna sıkıca bağlıdır (Ross MH ve Pawlina W, 2014).

## 2.2. İnfertilite

İnfertilite fizyolojik, psikolojik ve sosyolojik yönleri ile belirgin bir şekilde ortaya çıkan etkileri ile önemli bir sağlık sorunudur (Song WH ve ark, 2016). WHO ise infertiliteyi bir yıllık cinsel ilişkiden sonra gebe kalamama durumu olarak tanımlamıştır. Eğer çiftler genç ise ve bilinen bir sağlık sorunları yoksa bu süreyi iki yıla kadar uzatmak mümkündür. Eğer kadın yaşı 35' in üzerinde ise bu bir yıllık süre beklenmeksizin 6 aylık süre infertilite tetkiklerine başlamak için yeterli bulunmaktadır. İnfertiliteye neden olabilecek birçok etken sayılabilmektedir. Yaş, cinsiyet, meslek ve çevre faktörleri ve beslenme şekli gibi etkenler ve bu etkenler üzerinde yapılan çalışmalar infertilite ile bu faktörlerin bağlantılı olabileceğini göstermektedir. Özellikle ileri yaş ile fertilitenin azaldığı bilinmektedir. 30 yaş üzerinde infertilitede artış gözlenirken 35-40 yaş arasında infertilite belirgin şekilde artar ve genelde 40 yaş üstü fertilitede neredeyse yok denecek kadar azalmıştır. Sağlık sorunu olmayan normal olduğu ön görülen çiftlerde bir ay diliminde gebelik elde etme oranı %20 ile %25 arasında iken, altı aylık bir periyotta bu oran %75'e çıkmakta ve 12 aylık periyotta ise bu oran %90' ları bulmaktadır. Hem erkek hem de kadınlarda fertilizasyon başarısının en yüksek olduğu yaş 24 yaş olarak kabul edilmektedir. Ortalama 30 yaşındaki bir kadın 6 ay içerisinde gebe kalabilmekte iken 40 yaş üstü bir bayanın bir yıl içerisinde gebe kalma olasılığı, oosit kalitesinin kötü olması, menstural siklusta gözlenen düzensizlikler, endometriumda gözlenen problemler nedeni ile başarı şansı oldukça azalmaktadır. İleri yaş sadece kadınları etkilememektedir. Fakat erkeklerde etkisi daha az gözlenmektedir. İnfertilite dünya üzerindeki çiftlerin yaklaşık %15'ini etkileyen dünya çapında bir sağlık sorunudur (Nailwal M ve Chauhan JB, 2017).

Gelişmekte olan ülkelerde infertilite daha çok karşımıza çıkmaktadır. Üreme çağının üçte birlik kısmı infertilite sorunu yaşayan Sun-Saharan Afrika bölgesi infertilite kuşağı olarak bilinmektedir. 1981 yılında nüfus sayımları ile infertilite hızı % 4-6 olarak bulunmuştur. Dünyadaki fertilitate çalışmalarında Bengladeş, Nepal, Pakistan ve Srilanka gibi Güney Asya ülkelerinde infertilite sıklığı sırası ile %54, %6, %5, %4 olarak bulunmuştur. Ve yapılan çalışmalar her geçen yıl tüm dünyada infertilite sıklığında artışa dikkat çekmektedir.

### **2.2.1. Erkek İnfertilitesi**

Üreme çağındaki fertil çiftlerin 12 aylık periyot içerisinde düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen ancak %85' inde gebelik oluşması geriye kalan %15' lik dilimde infertilite sorunun olduğunun bir göstergesidir (Delilbaşı L, 2008). Erkek infertilitesinde ana belirteç indirek olarak kadının gebe kalamaması ile belirlenir. İnfertilite sorunu yaşayan çiftlerin yaklaşık olarak yüzde 25' inde erkek ve kadın faktörü birlikte görülmektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi erkek infertilitesi olması durumunda yüzde 50 kadın faktörü de bulunmaktadır (Çiçek NM, 2008).

Üreme çağındaki erkeklerin %6' sında üreme problemi karşımıza çıkmaktadır. Bu olguların %90' ında da bozulmuş bir spermatogenez gözlenmektedir. Normal fertil bir erkekte günde yaklaşık olarak 120 milyon sperm yapımı gerçekleşmektedir (Çolgar U ve Arıcı A, 2006).

Epidemiyolojik olarak yapılan araştırmalar, coğrafi çeşitliliğin semen kalitesi ve erkek üreme sistemi üzerinde bir etkisi olduğunu göstermiştir. Tüm dünyayı göz önüne aldığımızda, evli çiftlerin yaklaşık %15 ila %20' si infertilite sorunundan etkilenmektedir ve bu yüzdelik dilimin yaklaşık %50' sini erkek faktörü oluşturmaktadır. Günümüzde sperm kalitesindeki düşüş ve erkek fertilitesindeki önemli orandaki bozulmaya bağlı olarak üreme sağlığına ilişkin endişeler de giderek artmaktadır. Erkek infertilitesinin nedeni, çoğu zaman bilinmeyen nedenlere bağlı bir şekilde idiopatik olarak gelişmektedir. Bu oran erkek infertilite vakalarının yaklaşık %60-75' i gibi yüksek bir oranını kapsamaktadır (Famurewa AC ve Ugwuja EI, 2017).

Erkek infertilitesi değerlendirilirken hastadan ayrıntılı olarak tıbbi ve üreme öyküsü, bir ürolog tarafından yapılmış fiziksel muayene ve yine bir ürolog tarafından değerlendirilmek üzere en az 2 hafta ara ile yapılmış iki semen analiz sonucu gerekmektedir (Çolgar U ve Arıcı A, 2006).

#### **2.2.1.1 Anamnez ve fizik muayene**

Değerlendirmeye ilk olarak infertilite sorunu yaşayan çiftin ayrıntılı üreme öyküsü ile başlanır. Buradan yola çıkarak infertilite etiyolojisinde önemli olabilecek risk faktörleri saptanmaya çalışılır.

Hastada;

- Çocukluk çağında geçirilmiş hastalıklar

- Tek ya da iki taraflı inmemiş testis (kriptorşidizm) varlığı ve buna bağlı cerrahi tedavinin ne zaman yapıldığı
- Geçirilmiş ürogenital sistem cerrahi öyküsü
- Herhangi bir nedenle meydana gelmiş olan testis travmaları
- Tek ya da iki taraflı testis torsyonu
- Herni tamir ameliyatları
- Testiste oluşan tümörler ve bunlara bağlı radyoterapi veya kemoterapi öyküsü
- Puberteye girdiği yaş, sekonder seks karakterlerinin gelişim hızı
- Hipogonadizm varlığı
- Cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü
- Cinsel ilişki sıklığı
- Ejekülat miktarında azalma olup olmadığı ya da ejakulatın tamamen yok olması durumu
- Vücut kıllarının dökülmesi, tıraş olma sıklığında azalma gibi vücut kıl dağılımı ile ilgili yaşanan sorunlar
- Hastanın medikal öyküsü de dikkatli bir şekilde alınmalıdır (Anabolizan steroidler, kemoterapötik ilaç, alfa- adrenerjik reseptör blokerleri ve antibiyotik kullanımı) (Doğan E, 2011).

Erkek infertilitesi, nedenleri ile incelendiğinde üç ana grup oluşturulur;

Non-Obstrüktif İnfertilite

İdiopatik erkek infertilitesi

Obstrüktif İnfertilite

### 2.2.1.2 Non-obstrüktif infertilite

Non-obstrüktif infertilite %60 olarak karşımıza çıkar ve testisler tarafından yeterli sayı ve harekette sperm üretilememesi durumudur.

**Hormonal Bozukluklar:** Kallmann sendromu konjenital tipi erkek doğumlarının 1/10000' de görülen ve gonadotropin salgılatıcı hormonda eksikliğe neden olan başlıca sebeplerden biridir. Ayrıca hormonal anomalilerin nedeni olarak beyin tümörleri ani baş travmaları ve ışın tedavileri de hormonlarda meydana gelen bozulmaya bağlı olarak infertiliteye neden olabilir. Tiroid bezinde meydana gelen otoimmün ya da farklı sebeplerle oluşan bozukluklar da yüksek prolaktin seviyesi ve düşük testesteron seviyesi sperm üretimini bozabilmektedir. Bunlara ek olarak, obezite, serum SHBG (Sex hormone-binding globulin)

düzeyinde azalma ile ilişkili olarak serum total testosteron konsantrasyonunda azalmaya neden olur (Hammoud AO ve ark, 2006; Spratt DI ve ark, 1987).

**Genetik Nedenler:** İnfertil erkeklerin yaklaşık yüzde 5' inde yapısal ve sayısal kromozom anormallikleri bulunmaktadır. Azospermi olgularında genetik nedenler daha çok karşımıza çıkmaktadır. Genetik anormallikler genellikle; Y kromozomu mikrodelsiyonları, anöploidi ve kromozomal translokasyonları içermektedir. Primer hipogonadizm ve Klinefelter Sendromu sperm sayısındaki anormalliğin en önemli sebeplerinden biridir. Ayrıca Y kromozomu mikrodelsiyonları da özellikle azospermi ve ciddi oligosperminin önde gelen genetik nedenlerindedir (Ferlin A ve ark, 2007). Y kromozomu uzun kolunda mikrodelsiyon infertil erkeklerin %22' sinde gözlenmektedir. Y kromozomu uzun kolunda mikrodelsiyon genellikle Yq11 bölgesindedir ve bu bölge azospermik faktör (AZF) olarak isimlendirilmektedir. Reifenstein Sendromu bir başka deyişle parsiyel androjen insensitivitesi olan bireylerde; ambigus eksternal genitalya, hipogonadizm ve özellikle infertilite gibi klinik durumlar ortaya çıkabilmektedir (Griffin JE, 1992). İnfertilite tanısı almış ve genetik incelemeler sonrası genetik bozukluğu tespit edilmiş bireylerde ya sperm yapı, sayı ya da motilitede anomali ya da spermin taşındığı genital yollarda bir anomaliye neden olarak infertiliteye yol açmaktadır. Genellikle bu hastalarda azospermi ya da şiddetli oligospermi gözlenmektedir.

**Varikosel:** Varikosel pleksus pampiniformisin patolojik dilatasyonu olarak tanımlanır ve erkeğe bağlı infertilite olgularının içerisinde büyük bir oranı kapsamaktadır. İnfertil erkeklerde %12 oranında görülmektedir. İnfertilite araştırmaları için beklenen 1 yıllık sürenin ardından erkekte yapılan fiziksel muayene ve semen analizi testleri sonucunda %90' ı sol testiste olmak üzere başvuran hastaların %21-41 oranında varikosel görülebilmektedir. Varikosel erkeklerde bir infertilite nedeni olarak görülmekte ve tedavi edilmediği takdirde, semen parametrelerinde, sayıda ve harekette azalmaya, morfolojik olarak bozulmalara neden olabilmektedir (Çiçek NM, 2008).

**Varikosel gradlendirilmesi:** Subklinik Varikosel: göz ile görülemeyen veya palpe edilemeyen ancak skrotal termografi ve doppler ultrasonografi, görüntüleme yöntemleri ile saptanabilen varikoseldir.

Grade 1: Valsalva manevrası dışında görülemeyen ya da palpe edilebilecek bir distansiyonu olmayan varikosel

Grade 2: Valsalva manevrası yapılmadan da palpe edilebilen fakat sadece göz ile görülemeyen varikosel

Grade 3: Direk gözle görülebilen, distansiyone venöz pleksusun skrotum cildinden de görülebilir şekilde şişkin olduğu varikosel (Çiçek NM, 2008; Atan A ve ark, 2013).

Erkek infertilitesi ve varikosel arasındaki ilişki tam olarak anlaşılammış olsa da WHO çok net bir şekilde varikoselin semen anomalileri, testis hacminde azalma ve leydig hücre fonksiyonunda bozulma olduğunu göstermektedir. Varikosel şikâyeti olan bir bireyin infertil kabul edilebilmesi için semen analizi sonuçlarının WHO semen parametreleri alt referans değerinin altında olması gerekir (WHO, 2010).

**Üriner sistem enfeksiyonu:** Üroloji polikliniğinde en çok karşılaşılan üriner sistem patolojisi üriner sistem enfeksiyonlarıdır. WHO; orşit, epididimit, uretrit ve prostatit erkek üreme sistemi enfeksiyonları olarak tanımlamaktadır. Erkek üreme sistemine ait organlar olan; prostat, epididimis ve testislerin enfeksiyonu ve buna bağlı olarak gelişen spermatogeneziste sperm üretiminde ve spermatogenezis sonrası oluşan olgun sperm fonksiyonunda meydana gelen bozukluklar arasında sıkı bir ilişki olduğu düşünülmekteyse de bu konuda yapılmış olan bilimsel çalışmaların az olması nedeni ile bu ilişki tam olarak ortaya konulamamıştır (Gözükara KH ve Görür S, 2015).

Enfeksiyon oluşan hasara karşı vaskülarize dokunun koruyucu bir yanıtıdır, hasar bölgesinde koruma ve iyileştirme mekanizmalarının çalışmasını indükler. Enfeksiyonun olduğu alanda meydana gelen vazodilatasyon, kan akımının bu bölgedeki artışına ve lökositlerin enfekte bölgeye yönelmesine yol açar. Aktive olmuş lenfosit ve makrofajların salgılamış olduğu sitokinler (kemokinler, interlekinler, büyüme faktörleri) inflamatuvar reaksiyonun şiddetlenmesini sağlar. Erkek genital sisteminde meydana gelebilecek bir inflamatuvar durumda en etkili sitokinler  $1\beta$ , TNF- $\alpha$ , ve IL- $1\alpha$  yani proinflamatuvar sitokinlerdir. Enfeksiyon hem spermatogenezis hem de steroidogenezis üzerindeki olumsuz etkileri ile spermatositik arrestte neden olurken serumda testosteron (T) ve luteinizan hormon (LH) düzeylerinde düşüşe neden olarak testislerde olumsuz etkiye neden olmaktadır (Liew SH ve ark, 2007).

Erkek üreme sisteminde meydana gelebilecek enfeksiyonun lokalizasyonunda spermilere verdiği hasar açısından oldukça önem taşımaktadır. Prostad, epididimis ve testislerde meydana gelen enfeksiyonlar en çok karşımıza çıkan erkek te gözlenen üriner sistem enfeksiyonlarıdır.



**Prostatit:** Prostad bezinin enfeksiyonudur. Sperm parametrelerinin semptomatik prostatitten çok fazla etkilendiğini gösteren birçok araştırma yapılmış, fakat sınıflandırma sistemlerinin birbirinden farklı olması, prostatit tanısını koymada yaşanan sorunlardan dolayı prostatitin sperm kalitesi üzerine etkisini gösterecek sonuçlara tam da net olarak ulaşılamamıştır (Ludwig M ve ark, 2003).

**Epididimit:** Epididimiste oluşan enfeksiyon epididimit olarak tanımlanmaktadır. Akut epididimit, genelde tek taraflıdır ve epididimo-orşitin parçası olarak gelişmektedir. 35 yaş altı olarak adlandırılan genç hasta grubunda genelde cinsel yolla geçen mikroorganizmalar etken patojen olarak gözlenirken, yaşın ilerlemesi ile diğer gram negatif patojenler daha sıklıkla inflamatuvar etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Epididimisler seminifer tübüllerden lümeneye bırakılan hareket yeteneği kazanmamış matür spermlerin depolandığı, olgun bir sperme dönüşme sürecini tamamladığı ve en önemlisi hareket yeteneklerini kazandığı yerlerdir. Bu bölgede meydana gelebilecek herhangi bir enfeksiyon sonucunda semen parametrelerinde, sperm sayılarında azalma, motilitede bozulma veya işlevsel disfonksiyon gibi sorunlar gözlenebilmektedir. Epididimit sonrası epididimiste meydana gelebilecek hasara bağlı spermlerde meydana gelebilecek olumsuz etkisi üzerine çok az çalışma bulunmaktadır (Grabe M ve ark, 2015).

**Orşit:** Testislerde meydana gelen enfeksiyon orşit olarak tanımlanmaktadır. Prostatit ve epididimite göre izole orşit, çok daha az görülen bir enfeksiyon türüdür. Virüslerin etken olduğu viral enfeksiyonlar orşitlerin önemli kısmını oluşturmaktadır. En sık karşılaşılan patojen mumps (kabakulak) virüsüdür. Viral hastalıklar dışında ürogenital sistemde gözlenen enfeksiyonlardan testisler genellikle izole olarak etkilenmemektedir. Genellikle epididimdeki enfeksiyon kaynağından doğrudan testislere yayılım sonucu oluşan bakteriyel orşitler, hem testislerin hem de epididimin etkilendiği epididim-orşit şeklinde görülür. En sık olarak karşılaşılan etkenler; stafilokok, E. coli, P. Aeruginosa, K. pneumoniae ve streptokoklardır (Doshi SB ve ark, 2012; Dousset B ve ark,1997).

### **2.2.1.3. İdiopatik erkek infertilitesi**

İdiopatik infertilite; infertilite şikayeti ile başvuran hastada mevcut olan semen analizi sonucu elde edilen sonuçların WHO referans değerlerinin altında olması ve mevcut şartlarda bu durumun bir nedene bağlanamaması ile ortaya çıkmaktadır (Cacuzza M ve Agarval A, 2007). Düzeltilebilecek bir nedenin ortada olmayışına bağlı olarak FDA (Gıda ve ilaç dairesi) onaylı hiçbir medikal yöntem açıklanamayan erkek infertilitesinde bulunmamaktadır (Ko Ey

ve ark, 2012). Literatürde ise bu hastalara ampirik medikal tedavi yöntemleri önerilmekte ya da yardımcı üreme teknikleri merkezine başvurmaları için yönlendirilmektedirler (Schiff JD ve ark, 2007). İdiopatik infertilitenin etyolojisi tam olarak bilinmemesine rağmen genetik, çevresel ve hormonal olarak birçok farklı parametreyi bir arada barındıran çok yönlü bir etyolojisinin olduğu düşünülmektedir (Abid S ve ark, 2008).

İdiyopatik infertilitenin her ne kadar moleküler temeli açıkça gözler önüne serilemese de oksidatif stres altta yatan mekanizmalardan biri olarak öne çıkmaktadır. Spermde gerçekleşen ve karmaşık mekanizmalar olan kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda reaktif oksijen türleri (ROS), gerekli olmasına rağmen, ROS' taki aşırı artışın sperm bütünlüğünde bozulmaya ve işlevsel kayıplara neden olduğu bilinmektedir (Aktan G ve ark, 2012).

**İnmemiş Testisler:** Testislerin skrotum içerisinde vücudun dışında olması spermatogenez için hem önemli hem de gereklidir. İnmemiş testislerin abdominal bölgede kalarak yüksek sıcaklıklara maruz kalması, spermatogenezin düzgün gerçekleşmemesi ve sperm yapısında bozulmalara neden olmaktadır. İnmemiş testis bir diğer adı ile kriptoorşidizm; testisin fetal gelişim sürecinde skrotuma inmemesi abdomende, inguinal kanalda veya diğer ektopik lokasyonlarda kalması durumu olarak tanımlanmaktadır. Genelde sol tarafta ve bilateral (tek taraflı) gözlenebilen kriptoorşidizm bazı durumlarda unilateral (her iki tarafta da) gözlenebilir. Bu neden doğumda inmemiş testise sahip bebeklerde iki yaşına kadar testislerin skrotum içerisine yerleştirilmesi yani orşidopeksi yapılması gerekmektedir. Yapılan çalışmalar inmemiş testisin spermatogeneziste bozulma ve testiküler tümör riskinde artış ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Rajfer J ve ark 1986).

**Gonadotoksinlere Maruz Kalmak:** Gonadotoksin olarak adlandırdığımız maddeler; çevresel etkenlere bağlı olarak maruz kaldığımız kimyasallar, uyuşturucu maddeler, tütün, alkol, pestisitler, herbisitler ve ağır metalleri içerir. Yukarıda saydığımız ya da saymadığımız birçok kimyasal ve ilaç; özellikle spermatogenik seri hücrelerinde bozulma speermatogenez sürecinde aksaklıklara neden olarak ve intersitisyel dokuda bulunan leydig hücrelerinin fonksiyonlarını yerine getirmesini engelleyerek infertiliteye neden olabilir (Raheem AA ve Ralph D, 2011).

**Testis Torsiyonu:** Spermatik kordun kendi etrafında dönmesi sonucu oluşan testis torsiyonu testislerde kanlanmanın bozulmasına neden olur ve bunun sonucunda testislerde iskemi meydana gelir. Eğer 6 saat içerisinde detorsiyonla testislerde meydana gelen torsiyon düzeltilmezse oluşan bu iskemi sonucunda negroz meydana gelir ve bu negroza bağlı olarak

testislerde küçülme ve kalıcı hasarlar oluşabilmektedir. Testis torsiyonu tek taraflı gerçekleşse bile tedavi edilmediği durumlarda diğer sağlıklı testisi etkileyen antisperm antikörlerin üretimi söz konusu olabilir (Raheem AA ve Ralph D, 2011). Genellikle 20 yaş öncesi gözlenen testis torsiyonu yetişkin dönemde gözlenirse geri dönüşümü daha zor bir süreçtir (Türk H ve ark, 2014).

**Testis Tümörleri:** Testis tümörleri; sağlıklı testis dokusunda tahribe neden olarak ve testis dokusunu sıkıştırarak infertiliteye yol açar. Testis kanseri tedavisi, orşiektomi, kimyasal tedavi veya ışın tedavisi fertilitede bozulmaya neden olur. Testis kanserlerinde genetik faktörler önemli bir yer tutmaktadır (Raheem AA ve Ralph D, 2011).

**Otoimmün İnfertilite:** Sertoli-sertoli hücre bağlantıları ile oluşan kan testis bariyeri otoimmün yanıtı karşı testisleri korumaktadır. Böylelikle immün bir yanıt spermatogenezis ile yeni oluşan spermi etkilemez fakat skrotum üzerine alınmış bir darbe varikosel hastalığı ve geçirilmiş testiküler ameliyatlara bağlı olarak meydana gelebilen kan testis bariyerindeki bozulmalara bağlı olarak immün sistemin bir yanıtı olarak, otoimmün infertilite gözlenebilir (Raheem AA ve Ralph D, 2011).

#### **2.2.1.4. Obstrüktif infertilite**

Obstrüktif İnfertilite testislerde normal olarak sperm üretimi gerçekleşmekte iken genital sistemin bir başka bölgesinde meydana gelmiş olabilecek bir tıkanıklığa bağlı olarak gerçekleşen infertilite tipidir. Bir infertilite nedeni olarak gösterilebilecek distal obstrüktif patolojiler, doğumla birlikte ya da daha sonra edimsel olarak oluşan patolojiler olarak iki grupta incelenebilir (Karakeçi A ve ark, 2014). Doğumsal patolojiler arasında klinik olarak en önemlisi ve en sık rastlanana median ve lateral yerleşimli gözlenen kistlerdir. Daha sonra doğumsal patolojiler arasında ejakülator kanalda meydana gelen atrezi ve stenoz da sayılabilmektedir. Ejakülator kanalda meydana gelen edimsel patolojiler ise bir enfeksiyon sonrası oluşan taş ya da kalsifikasyon oluşumu olarak tanımlanabilir. Bunun dışında cerrahi ve üretral girişimler bağlı olarak gelişen sekonder ejakülator kanal obstrüksiyonları da sayılabilmektedir (Dik P ve ark, 1996; Karakeçi A ve ark, 2014).

#### **2.2.2. Erkek İnfertilitesi Değerlendirme Testleri**

##### **2.2.2.1. Semen analizi**

Erkek infertilitesi araştırmalarında laboratuvar değerlendirilmesinin temel taşı semen analizidir (Çolgar U ve Arıcı A, 2006). İlk olarak semen analizi 1902 yılında Edward Martin

tarafından yapılmıştır. Semen analizinin fertilitiyi belirlemedeki önemi göz önüne alındığında 1980'lerde WHO, semen analizi kriterlerini ayrıntılı olarak anlattığı bir el kitabı çıkarmış ve böylece semen analizini standardize etmiştir (Çelik Ö, 2011; WHO, 2010).

Erkek infertilitesinden şüphelenilen durumda, son 6 ay içerisinde yapılmış olma ve en az 1 ay ara ile yapılmış olma şartı sağlanarak ortalama 3 ay ara ile en az 2 semen analizi yapılmalıdır. Semen analizi androloji laboratuvarı standardının sağlandığı bir laboratuvarında, gerekli kriterlere uyulmak koşulu ile yapılmalıdır. Semen analizi, sperm ve semenin karakteristik özelliklerinin belirlenmesini ve uzman bir hekim tarafından değerlendirilebilmesini sağlayan bir laboratuvar test yöntemidir (Çiçek NM, 2008).

WHO semen analizinin yapılması gerekli görüldüğü durumlarda cinsel perhiz süresinin ortalama 2 ile 7 gün arasında olmasını ön görmektedir (WHO, 2010). Bu sürenin 7 gün ve üzeri uzaması durumunda, total semen volümü içerisindeki hareketsiz spermatogonium sayısı artmakta ve total motil sperm sayısında düşüş gözlenmektedir; bu durumun tam tersi olarak perhiz süresinin 2 günden daha az olduğu durumlarda, mililitredeki sperm sayısında ve buna bağlı olarak total mililitredeki sperm sayısında azalma gözlenebilmektedir. Bu iki durumda testin sonucunu ve testi yorumlayacak uzmanı yanlış yönlendirebileceği için perhiz süresine uyulması semen analizinde büyük önem taşımaktadır. Semen analizi için androloji laboratuvarına yönlendirilen hasta laboratuvara yakın özel bir odada masturbasyon yöntemi ile örneği kendisine verilen kaba koymalı ve ilgili personele teslim etmelidir. Semen analizi iki aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk olarak mikroskopik bir inceleme yapılır ve akabinde de mikroskopik olarak değerlendirilme altına alınır. Alınan örnek mikroskopik değerlendirilme öncesi en az 15 dakika 37 °C deki bir inkübatörde inkübasyona bırakılır daha sonra ejakulatın mililitresi, viskozitesi, rengi kokusu ph metre ölçümleri, uzman bir kişi tarafından değerlendirilerek not edilir. Daha sonra ise ışık mikroskobu altında bir makrel kamera yardımı ile x 20 büyütmede mikroskopik olarak ml'deki sperm sayısı, total sperm sayısı, total sperm sayısının hareket yüzdeleri ve spermlerdeki vitalite oranı değerlendirilir. Aynı ejakulattan hazırlanan yayma preparatların uygun boyalar ile boyanması sonucu morfolojik inceleme yine ışık mikroskobu altında x 100 büyütmede yapılır. Semen analizi; 2010 yılında yayınlanan ve Tablo 2'te yer alan, WHO semen analizleri el kitabındaki referans değerleri baz alınarak yapılmaktadır (WHO, 2010).

Tablo 2. WHO'ya göre semen analizinin en düşük referans değer aralıkları (WHO, 2010)

Parametreler	En Düşük Referans Değer
Semen Volümü (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Total Sperm Sayısı (10 <sup>6</sup> )	39 (33-46)
Sperm Konsantrasyonu (10 <sup>6</sup> /ml)	15 (12-16)
Total Motilite (PR, NP, %)	40 (38-42)
Progresesive Motilite (PR, %)	32(31-34)
Vitalite (Canlı Sperm, %)	58(55-63)
Sperm Morfolojisi (Normal Formlar, %)	4 (3,0-4,0)
pH	>7,2
Peroksidaz-pozitif Lökosit (10 <sup>6</sup> per ml)	<1,0
MAR Testi (%)	<50
Immubead testi (%)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2,4
Seminal früktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	>20

Semen analizi ile ilgili bazı tanımlamaları içeren terminoloji aşağıda yer almaktadır:

- Normozoospermi: Sperm sayı, hareket ve morfolojisinin alt referans değerlerinin üzerinde olduğu normal ejakülat
- Oligozoospermi: Sperm sayısının baz alınan referans değerlerinin altında olduğu, referans değerinden daha az sperm konsantrasyonu
- Astenozoospermi: Sperm sayısının alt referans değeri ve bu değerinin üzerinde olmasına rağmen, alt referans değerinden daha az motil sperm olması durumunda kullanılan terimdir.
- Teratozoospermi: Sperm sayı ve hareketinin normal olduğu fakat sperm morfolojinin referans değerinin altında olduğu durumlarda kullanılan terimdir.
- Oligoastenoteratozoospermi: Hem sperm sayısını, hem hareket yüzdesinin hem de morfolojinin referans değerlerinin altında olduğu durumlarda kullanılan bir terimdir.
- Azospermi: Ejakülat var fakat içerisinde hiç sperm bulunmuyorsa azospermi olarak tanımlanır.
- Aspermi: Ereksiyon sonrası hiç ejakülat yok ise aspermi olarak tanımlanır.
- Kriptoospermi: Ejakülatta, normal sayım yöntemleri ile sperm gözlenmiyor fakat özel
- Yıkama teknikleri sonrası sperm gözleniyorsa kriptoospermi olarak adlandırılır (WHO, 2010; Çiçek NM, 2008).

#### 2.2.2.2. Semen makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirilmesi

Semen analizi; hacim, konsantrasyon, motilite ve morfoloji gibi önemli bilgileri içeren bir testtir. Analiz için hastadan alınan örnek likefiye olması için 37 °C'lik inkübatöre bırakılarak

15 dakikada bir likefaksiyon değerlendirilmesine alınmalı likefiye olduğu saat dilimi not alınmalıdır. Semen analizi ile azoospermi tanısı konulurken örnek konsantrasyon yıkama tekniği ile (2000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılarak) yıkanmalı ve oluşan pellet değerlendirilerek sonuç verilmelidir (Çiçek NM, 2008)

Likefiye olan örnek makroskopik değerlendirmeye alınmalı, makroskopik değerlendirme sonrası ışık mikroskobu altında 20x büyütmede makler kamera yardımı ile mikroskopik olarak incelenmelidir. Makroskopik ve mikroskopik değerlendirmede inceleme altına alınan kriterler aşağıda verilmiştir (WHO, 2010).

Makroskopik değerlendirme;

- a) Likefaksiyon
- b) Viskozite
- c) Görünüm
- d) Hacim

Mikroskopik değerlendirme;

- a) Spermiyogram
- b) Vitalite
- c) Sperm Morfoloji Testi (Kruger testine göre)

**Likefaksiyon:** Koagüle bir kitle şeklinde olan ejakulat inkübatör içerisine alınarak likefaksiyon tayini yapılır. Normal şartlarda ejakulat 37 °C de 5 dakika içerisinde likefiye olmaya başlar ve yaklaşık 15 dakika içerisinde likefaksiyon tamamen gerçekleşir. Eğer ejakulat 60 dakikadan daha uzun bir sürede likefiye oluyorsa ya da hiç likefiye olmuyorsa bu örnek visközite yönünden değerlendirme altına alınmalıdır (Gökçe A, 2011).

**Visközite:** Ejakulat likefaksiyonunu tamamladıktan sonra uygun bir pipet yardımı ile homojenize edilerek örnek kabı içerisine geri damla damla dökülmesi beklenir. Damla damla düşme gözlenmiyor, örnek 2 cm ve daha fazla uzama göstererek akıyorsa visköz olarak kabul edilir (WHO, 2010).

**Görünüm:** Ejakulat kendine has gri renkte ve opalesan bir görünümüne sahiptir. Eğer ejakulat içerisinde sperm sayısında anormal bir azalma söz konusu ise, beyazımtırak bir renk ve daha az opak bir görünüm gözlenebilir, ejakulat içerisinde eritrosit yoğunluğu fazla ise, kırmızı-kahverengi bir renk ve pıhtılı bir görünümüne sahiptir. Ejakulat rengi sarımtırak bir renk almışsa da bir enfeksiyon durumundan şüphelenilebilir (Vicdan K ve Işık AZ, 1999).

**Hacim:** Spermin testislerden penise ulaşana kadar kat ettiği yolda seminal keselerden, prostattan ve az miktarda da bulbouretral bezler ve epididimlerden eklenen seminal plazma ile ejakulat son halini alır. Bu kanal ve bezlerde meydana gelebilecek bir anomali sonucu ejakulat hacminde azalma ya da artma gözlenebilmektedir. Semen analizi ile ejakulat hacmi ölçülmek istenirse örnek kaba koyulmadan önce ve örnek kaba koyulduktan sonra iki ölçüm yapılarak aradaki fark semenin net ağırlığı olarak kayıt edilir. (WHO, 2010).

**Spermiyogram:** Spermiyogram mikroskopik değerlendirmenin ilk ve en önemli ayağıdır. İlk olarak mikroskopik değerlendirme ışık mikroskobu altında ve 20x büyütmede makler kamera yardımı ile yapılmaktadır. 0,4 mikrolitrelik örnek mikro pipet yardımı ile alınır ve makler kameranın cam olan orta kısmına damlatılır makler kameranın cam olan üst aparatı kenarındaki yuvarlak çıkıntılar saat 12 veya saat 6 hizasına getirilerek sıkıca kapatılır.

**Sperm Sayısı:** Mikroskop altında makler kamera üzerinde bulunan kareli alandan toplam 100 kare incelenir kareler içerisinde bulunan spermlerin sayısı ve hareket özellikleri WHO 2010 parametreleri baz alınarak sayılır. Elde edilen sonuç ml'deki sperm sayısını verir. Mililitredeki sperm sayısı total hacim ile çarpılarak total sperm sayısı elde edilmiş olur (Çelik Ö, 2011).

**Sperm motilitesi:** Sperm motilitesi oda ısısında (20- 24 °C) ışık mikroskobu altında makler kamera yardımı ile değerlendirilir (Delilbaşı L, 2008). 100 kare içerisinde bulunan spermler WHO 2010 motiliteyi üç ayrı kritere göre değerlendirmektedir. Bu kriterler, progresif motilite (PR), nonprogresif motilite (NP) ve immotilite olarak sınıflandırmıştır (WHO, 2010).

1. Progresif motilite (PR): Makler kamera içerisinde görüntülenen karelerden bir kareden diğer bir kareye geçebilecek ileri hareketin bulunduğu spermlerin dahil edildiği gruptur. Spermlerin ileri hareketlerinin hızlı mı, yoksa yavaş mı olduğuna bakılmaksızın ileri doğru hareketinin değerlendirilmesi ile elde edilir.

2. Nonprogresif motilite (NP): Spermde gözlenen bir hareket mevcuttur fakat spermler sadece bir kare içerisinde olduğu alanda hareket göstermektedir. Spermde ileri doğru hareket gözlenmez.

3. İmmotilite: Bir kare içerisinde duran ve mikroskopik olarak hiçbir hareketin gözlenmediği spermleri belirtmektedir. Bu spermler hareketsiz olarak değerlendirilirler fakat cansız olarak nitelendirilemezler. Bir sperm canlı olup olmadığı sadece vitalite testi ile anlaşılabilir. WHO 2010 kriterlerine göre sayımı yapılan spermlerin %32'i progresif motil (PR) olmalıdır (Çelik Ö, 2011).

**Vitalite değerlendirilmesi:** Sperm vitalitesi hipoozmatik basınç testi ya da spermi supravital bir boya (eozin, tripan mavisi) ile boyayarak değerlendirilir. Bu yöntemlerde hücre zarı intakt olan spermier saptanır ve böylece canlı olup olmadıkları anlaşılır. HOS testi ile vitalite testi özellikle ÜYTE merkezlerinde tercih edilir çünkü canlı olduğu anlaşılan spermier seçilerek ICSI de kullanılır (Çolgar U ve Arıcı A, 2006).

**Semende sperm dışı hücreler:** Semen örneği içerisinde yuvarlak hücre olarak adlandırılan epitelyum hücreleri, spermatogenetik seriye ait hücreler ya da inflamasyon yanıtına ait lökositler gibi hücreler bulunabilir. Bir semen analizi sonucu yuvarlak hücre sayısının ml’de 5 milyonun üzerine çıkmaması beklenir. Semen içerisinde bulunan ve bir enfeksiyon belirtici olan lökositleri de yuvarlak hücrelerden ayrı olarak değerlendirilir. Semen içerisindeki lökosit sayısı alt referans değeri olarak mililitrede 1 milyonun altıdır. Semende bulunan lökositler, oksidatif stres oluşturarak DNA üzerinde olumsuz etki gösterirler sperm DNA bütünlüğünü bozabildikleri gibi sperm hareketi üzerine de olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (Tomlinson MJ ve ark, 1993; WHO, 2010; Wolff H, 1990).

**Sperm morfoloji testi:** Sperm başı, boynu, orta parçası ve kuyruğu normal olarak gözlenen sperm normal olarak kabul edilebilmektedir. Hazırlanan yayma preparatlardan boyama sonrası ışık mikroskobu altında incelenen spermier, fiksasyona bağlı olarak biraz daha küçük gözlenmekteyse de bu fark göz ardı edilebilir oranlardadır.

Sperm morfolojik değerlendirmesi şu aşamalardan oluşmaktadır (WHO, 2010).

- Semen analizi sonrası lam üzerine yayma preparatlarının hazırlanması,
- Kurutma işlemi sonrası, fiksasyon ve sperm boyama işlemlerinin yapılması,
- Işık mikroskobu altında ile 100x büyütmede preparatın incelenmesi,
- Mikroskop altında normal ya da normal olmayan bölgelerinin (baş, boyun, kuyruk) neresi olduğu belirtilerek en az 100 spermin sayılması
- Kontrollü bir şekilde sayımın en az iki defa yapılması birbirine yakın sonuçlar çıkması halinde iki sonucun ortalamasının aksi takdirde gerekli kontrollerin yapılarak sayımının tekrarlanması

Bu kriterlere göre yapılan sayımlarda WHO 2010 kriterlerine göre en düşük referans değeri %4 olarak belirlenmiştir (Delilbaşı L, 2008; WHO, 2010).

Normal Kruger kriterleri için (Kruger TF ve ark, 1988; Kruger TF ve ark, 1986):

Baş: Oval ve 5-6 µm, uzunluğu ve 2,5- 3,5 µm genişliğinde olmalıdır.



Akrozom: %40-70 oranında sperm başının ön kısmını kaplamalıdır.

Gövde: başın uzun eksenine boyunca bağlanmış ince, sitoplazmasında damlacık içermeyen 1,5-1,75 µm genişliğinde olmalıdır.

Kuyruk: Tek, kıvrılmamış, kırksız ve yaklaşık olarak 45 µm uzunluğunda olmalıdır (Çolgar U ve Arıcı A, 2006).

### 3. OTOFAJİ

Otofaji, kelime anlamı olarak yunanca kendi kendini (auto), yeme (phagy) anlamına gelen kelimelerin bir araya gelmesi sonucu türemiş bir kelimedir. Uzun ömürlü proteinlerin ve hasarlı organellerin geri dönüşümünün yüksek oranda korunduğu hücrenel bir mekanizmadır (Ohsumi Y, 2011).

Otofaji; aynı zamanda hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyolojik koşullarda, ihtiyaç duyduğu besin öğelerini kazanabilmek için sitoplazmada bulunan bazı proteinlerin, hücreye ait organellerin ve diğer hücre içerisinde bulunan yapıların lizozomal kompartıman içinde yıkıma uğratıldığı hücrenel bir yolağı da ifade etmektedir (İzmirli M, 2014).

Hücre içerisinde olması istenmeyen ya da gereksiz olan organeller otofaji mekanizması ile sindirilir ve bu sindirim sonu ortaya çıkan hücrenin yapı taşları tekrar hücre homestazını korumak için kullanılmaktadır. Otofaji açlık hücre yaşlanması ve hücre ölümünde temel bir rol oynamaktadır. Otofaji, evrimsel süreçte mayalardan insanlara kadar olan ökaryot canlılarda korunmuş katabolik bir mekanizmadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda aslında mayalar için geliştirilen genetik tarama testlerinin bulunması ile memeli hücre genomunda 'otofaji ile ilgili genler' (ATG) ortaya çıkmıştır (Ross MH, 2006).

#### 3.1. Otofaji Mekanizmaları

Otofaji iyi tanımlanmış üç ayrı mekanizma ile gerçekleşmektedir;

1- Makrootofaji; basit otofaji olarak adlandırılan bu otofaji mekanizmasında, sitoplazmanın bir kısmının ya da bir organelin tamamının endoplazmik retikulumdan oluşan ve 2 ya da daha çok tabakalı intraselüler bir zar tarafından sarılarak otofagozomun oluşturulduğu nonspesifik bir süreçtir.

2- Mikrootofaji; normal fizyolojik koşullar altında küçük sitoplazmik çözünebilen proteinlerin membran invajinasyonu ile lizozom içine taşınarak yıkıma uğratıldığı süreçtir.

3- Şaperon aracılı otofaji; HSC 73 adı verilen 73 kDa ısı-şok şaperon proteini gibi spesifik sitosolik şaperonların yardımına ihtiyaç duyan otofajidir. Besin yokluğu, açlık durumunda aktive olur, bu süreçte hem yıkılan proteinler üzerinde hedefleme sinyallerinin olması hem de lizozom membranının üzerinde de spesifik bir reseptörün bulunması gerekmektedir (Ross MH ve Pawlina W, 2014). Makrootofaji bir diğer genel adı ile otofaji; Atg gen ailesinin kodladığı

proteinler ile gerçekleşmektedir. Mayalar üzerine yapılan bir dizi çalışma sonucunda bulunan ve 30'dan fazla tanımlanmış türü vardır (Xie Z ve Klionsky DJ, 2007). Atg proteinlerinin birçoğu ve bir araya gelerek oluşturdukları protein kopleksleri izolasyon membranları (otofajik kesecik) ve otofagozomların oluşumundan sorumludurlar. Hücrede otofagozomlar “otofaji oluşum merkezi” adı verilen ve memelilerde endoplazmik retikulum ile golgi aygıtı arasında dağıntık olarak bulunan otofaji oluşum merkezlerinde ortaya çıkarlar (Arslan DÖ ve ark, 2011).

Kökeninin; endoplazmik retikulum, mitokondri dışı membranı ve plazma membranı olabileceği varsayılan izolasyon membranının, otofagozom oluşumu ve otofajik yükün lizozomal iletimi için gerekli olan fiziksel ve fonksiyonel etkileşimi;

I- Tetiklenme (indüksiyon) fazı

II- Vezikül nükleasyon (çekirdeklenme) fazı

III- Vezikül uzama fazı

IV- Lizozomla birleşme ve yıkım fazı olmak üzere 4 fazda özetlenebilmektedir (Arslan DÖ ve ark, 2011).

I. Tetiklenme (indüksiyon) fazı:

Hücre yeterli bir besin ve büyüme faktörlerine sahip olduğunda mTOR (Rapamisin'in memeli hedefi) olarak adlandırılan ve memeli rapamicin hedefi olarak bilinen bir serin/treonin kinazın enzimatik aktivitesini stimüle eden mTOR aktivitesinin yüksek olması otofaji üzerinde inhibitör bir etki göstermektedir. Besin azlığı yüksek ateş, hipoksi gibi durumlar sonucu mTOR aktivitesinin olmaması durumu Atg genlerinin aktivasyonuna neden olur ve bunun sonucunda da otofaji aktif hale gelir. mTORC1 inaktif halde iken ULK (Uncoordinated-51-Like Kinase)1/2-ATG13 fosforile olmaz ve mTORC1'den ayrılır. ULK1/2 kendi kendini, Atg13, FIP200 (Fokal adhezyon kinaz ailesi 200 kDA'lık Protein) fosforilleyerek aktifleşmesi ile otofaji tetiklenmiş olur (Chen Y ve Klionsky DJ, 2011; Honscheid P ve ark 2014).

II. Vezikül nükleasyon (çekirdeklenme) fazı

PI3K (fosfatidilinozitol 3-kinaz) izolasyon membranı oluşumunda rol oynayan protein ve protein gruplarını kendisine bağlanma özelliği ile kendisine bağlayarak PAS'a (pre-autophagosomal structure) yönlendirmektedir. Böylelikle izolasyon membranının çekirdek yapısı oluşmuş olur. mTORC1'in inhibisyonu PI3K VPS34 (Vacuolar protein sorting 34) aktivasyonu ve fosfatidilinozitolün fosforilasyonu ile otofagozom membranının temel yapıtaşı olan fosfolipidlerin üretilmesini sağlar. ULK (Beclin-1, Vps34/PI3KC3, p150, Vps15/PI3KR4,

Uvrag, Atg14L, Bif-1) bileşenlerinin aktivasyonu ile PI3K bileşenlerini aktifleştirir ve otofagozom oluşumu başlatılmış olur. İzolasyon membranı üzerinde toplanan Atg proteinleri fagofordenilen küçük hilal şeklinde keseciğin oluşmasını sağlamaktadır (Aita VM ve ark, 1999).

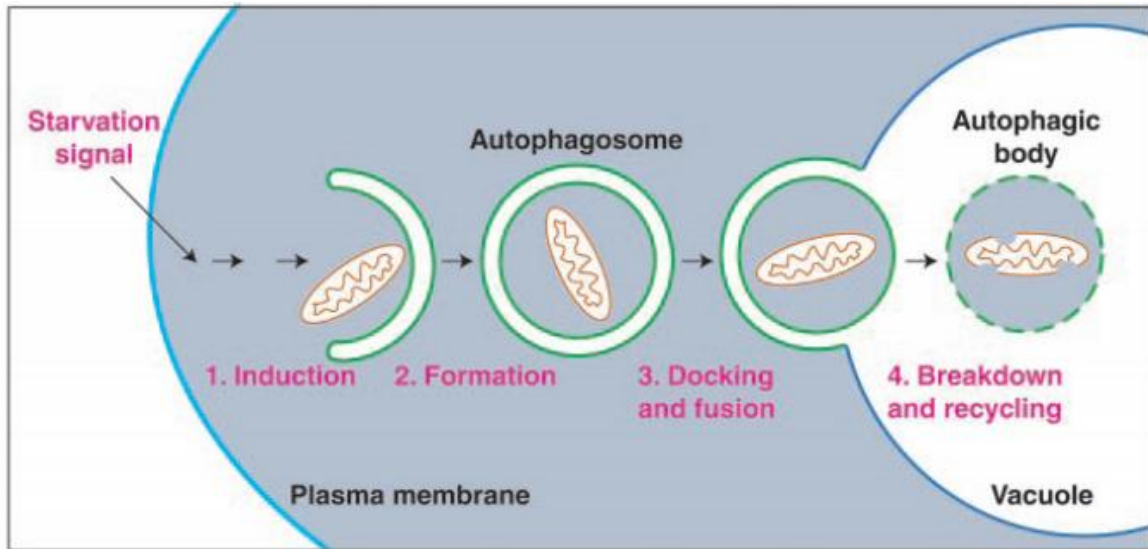
### III. Vezikül uzama fazı

Çekirdeği meydana gelmiş olan otofagozom membranının uzaması ve akabinde bir kese halini alması iki übikitinlenme benzeri sistem tarafından kontrol edilmektedir. Atg12- Atg5 ve Atg8-FE (fosfatidiletanolamin) ve bu iki sistem birbiri ile ilişkilidir (Dikic I ve Elazar Z, 2018; Arslan DÖ ve ark, 2011). Atg12- Atg5 ubiquitin benzeri sistem; bir kovalent bağlanma ile Atg7 tarafından aktive edilen Atg12 proteininin Atg5 proteinine bağlanması katalizlenir (Arslan DÖ ve ark, 2011). Atg12 ilk olarak, Atg7 ubiquitin-aktive eden enzim E1 olarak aktive gösterir (Carew JS, 2012). Atg12' nin, Atg10 bağlanması sonucu Atg7 serbest kalır. Atg10 ubiquitin-konjuge enzim E2 olarak görev yapar. Sonuç olarak Atg12'nin C ucundaki glisin aminoasidi, Atg5'in lizin aminoasidi ile bağlanır. Atg10'un serbest kalması ve Atg16'nin, Atg5'e bağlanması ile otofagozom membranı PAS üzerinde uzar (Qu X ve ark, 2003). Otofagozomlar PAS ya da izolasyon membranı denilen yapılarda ortaya çıkarlar. Otofagozom membranının kaynağı henüz net olmamakla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar ile ER (endoplazmik retikulum) kaynaklı olabileceği gösterilmiştir (Chen Y ve Klionsky DJ, 2011). İkinci olarak, Atg8 proteini (memelilerde LC3 olarak adlandırılmaktadır), FE ile bir kovalent bağ yapmaktadır. Bu ikinci ubiquitin benzeri sistemin gerçekleşebilmesi için Atg12-Atg5-Atg16 kompleksinin oluşmuş olması gerekmektedir. Anca bu kompleks oluşuktan sonra LC3 FE'ye bağlanabilmektedir. Bu kompleksinde bağlanabilmesi için Atg4 proteazının LC3'ün C ucundaki beş aminoasiti kesmesi ve FE molekülünün bağlanabildiği 6. aminoasit olan glisinin açığa çıkması gerekmektedir. LC3' ün C ucundaki arginin aminoasidi Atg4 (sisteinproteazlar) enzimi tarafından kesilir ve LC3-I tipi oluşturulur. LC3-I, FE bağlanarak LC3-II oluşturur. Bu süreç E1-benzeri Atg7 ve E2 benzeri Atg3 konjugasyon sistemleri tarafından gerçekleştirilir (Ichimura Y, 2000; Tanida I, 2003). Atg4, LC3 tekrar tekrar kullanılabilmesi için görevini tamamladıktan sonra yağdan kopararak tekrar kullanıma uygun hale getirmektedir. FE'ye LC3'ün bağlanması, PAS'da zar uzaması için gereklidir. LC3' ün C ucundaki arginin aminoasidi LC3-I sitoplazmada bulunur ve 18 kDa'dur, oysa LC3-II otofaji membranının dış yüzeyinde bulunur, 16 kDa'dur ve otofaji belirteci olarak tanımlanır (Qu X ve ark, 2003)

Özellikle Atg 9 ve otofaji ile ilgili proteinlerin çoğu otofagozom oluşumu için otofajik membran ve otofajik kesecik oluşumunda görev almaktadır (Mehrpour M ve ark, 2010).

#### IV. Lizozomla birleşme ve yıkım fazı

Otofagozom içeriğinin yıkılması için lizozom ile birleşmesi gereklidir. Lizozom ile birleşmeden önce otofagozomun olgunlaşması gereklidir. Bu aşamada GTPaz (Rab22,Rab24), SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor), NSF (N-ethylmaleimide Duyarlı Faktör) gibi proteinler rol alırlar. Rab7 otofagozomun olgunlaşmasında rol alır, Rab7 mutant hücrelerde otofagozomun lizozom ile birleşmesini engellediği ve otofagozomların birikmesine yol açtığı gösterilmiştir (Yang YP, 2005). Otofagozomun dış zarı lizozomla birleşerek otolizozomu oluşturur. Bu süreçte lizozomal transmembran proteinleri, LAMP2 (lizozom ilişkili membran proteini tip2) gibi proteinler de fonksiyon gösterir. Otofagozom oluşumu sonrası taşıdığı kargonun parçalanması lizozoma bağlanması ile olmaktadır. Bu protein ve organellerden oluşmuş olan kargonun yıkımı lizozomal enzimlerin yardımı ile gerçekleşir ve açığa çıkan aminoasit yağ asidi gibi yapı taşları tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılmaktadır. (Shintani T ve Klionsky DJ, 2004; Mehrpour M ve ark, 2010; Ohsumi Y, 2001; Xie Z ve Klionsky DJ,2007).



Şekil 10. Mayalarda makrotofajinin şematik diyagramı (Klionsky DJ ve Emr SD, 2000)

### 3.2. Otofajinin Düzenlenmesi

#### 3.2.1. Fagofor ve Otofagozom Oluşumu

LC3 konjugasyon ve dekonjugasyon sistemi, ATG12 konjugasyon sistemi, ULK (Uncoordinated-51-Like Kinase) kinaz kompleksi, PI3-kinaz kompleksi ve mATG9/ATG9L1

döngü sistemi tümü birden ATG protein kompleksini oluşturmaktadır (Kraft C ve Martens S, 2012; Lamb CA ve ark. 2013; Mizushima N ve ark, 2011). Golgi ile otofagozomların oluşumu arasındaki ana bağlantıyı sağlayan protein yine golgide bulunan ATG9 adı verilen bir membran proteindir. ATG9 ile işaretlenmiş bir endoplazmikretikulumun ULK kompleksi tarafından aktive edilmesiyle fagoforun oluşumu başlatılmış olur (Lamb CA ve ark, 2016; Longatti A ve ark, 2012; Webber JL ve Tooze SA, 2009, Yamamoto H ve ark, 2012; Takahashi Y ve ark, 2016). Hücre zarının klatrin kaplı bölgelerinden hücre içerisine alınan ATG9 ilk olarak erken endozomlara iletilir daha sonrada transferin reseptörü vasıtası ile geri dönüşüm endozomlara iletimi sağlanır. Bu işlem gerçekleşirken ATG16L1 de hücre zarında bulunan AP2-klatrin yapılarıyla etkileşim içerisindedir. Fagoforun oluşumu sırasında omegazom adı verilen endoplazmikretikulum domainleri de oluşur ve böylece ATG12-ATG5-ATG16L1 protein kompleksinde toplanması kolaylaştırılmış olur (Davis S ve ark, 2017; Karanasios E ve ark, 2016; Ge L ve ark, 2013).

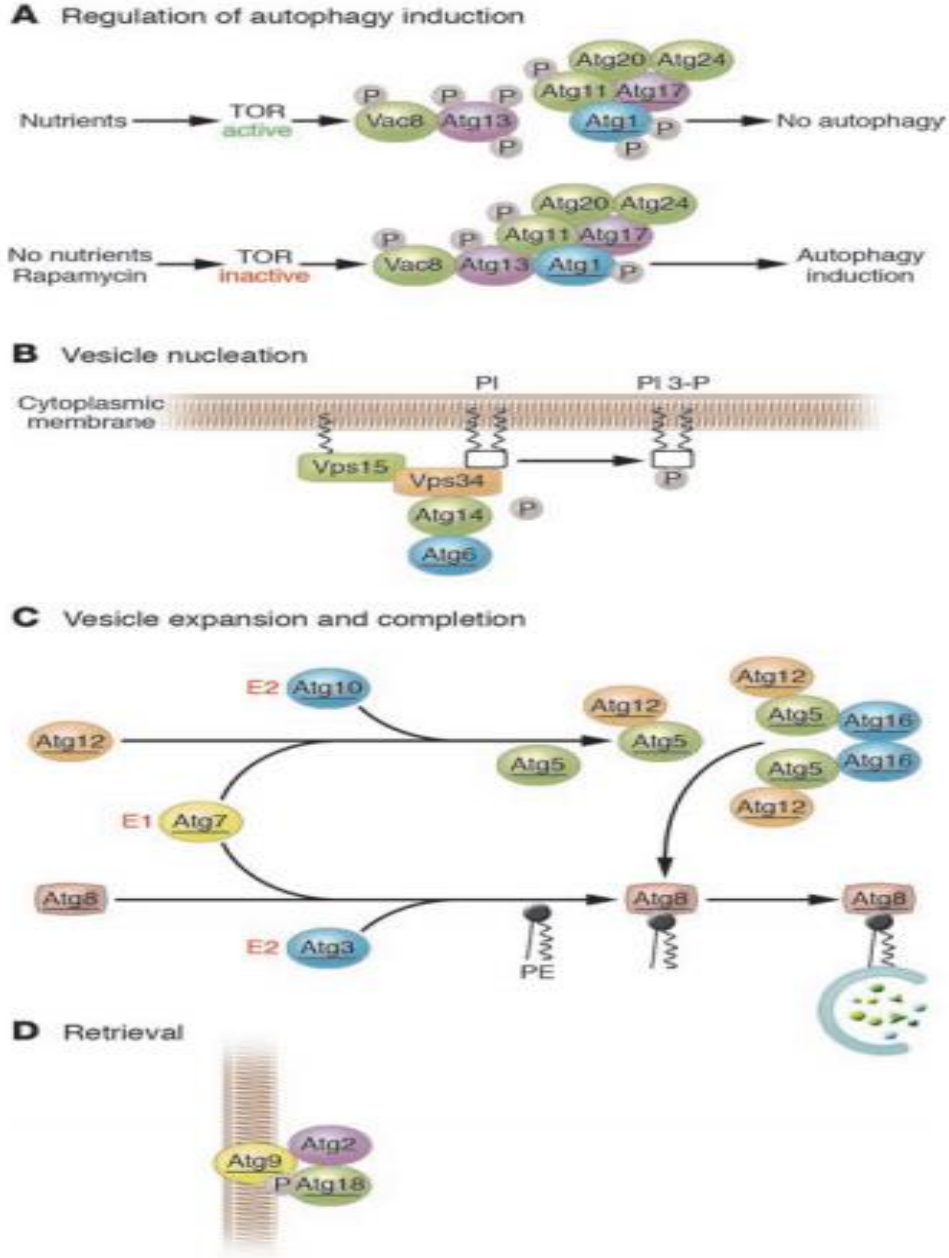
Mitokondri ilişkili membranlar bir başka deyişle mitokondri endoplazmikretikulum bağlantı bölgeleri otofagozomların oluşumuna ATG oluşum mekanizmalarının yoğunlaştığı alanlar olarak katkı sağlamaktadırlar (Tsuboyama K ve ark, 2016; Steegmaier M ve ark, 1998). Hücre içerisinde açlığa bağlı oluşan streste rol alan sinyal yollarının başında mTORC1 gelmektedir. mTORC1 memelilerde otofaji aktivitesini etkileyen transkripsiyon sonrası düzenlemelerden sorumludur (Noda T, 2017). Besin yetersizliğinde özellikle kısıtlı aminoasit varlığında mTORC1, ULK1 kompleksinin aktivasyonunu sağlayan hücre içi bir sinyal ileti zincirini başlatır (Bento C ve ark, 2016). ULK1 kompleksi de fosforilasyon, ubikutinizasyon ve asetilasyona uğrar ve bu düzeneğin sonunda da diğer otofaji düzenleyici faktörlerle etkileşim sağlanmış olur. Besinlerin varlığında ise mTORC1, ULK1 i fosforile ederek otofajinin inhibe edilmesini sağlamış olur (Bento ve ark. 2016). mTORC1'in en önemli substratı olan ATG13 ise defosforilasyonu ile otofagozom oluşumunda görev alarak otofaji mekanizmasına katkı sağlamaktadır. Memelilerde otofagozom oluşumuna katılan başka bir komplekste VPS34 kompleksidir. VPS34 kompleksinin oluşumu ile otofaji indüklenir. Beclin-1 bu kompleksin bir alt birimidir ve açlık anında ULK1 tarafından fosforile edilir (Russell RC ve ark, 2013).

### **3.2.2. Otofagozomun Taşınması**

Otofagozomun kapanma sürecinde rol oynayan ve genellikle endoplazmikretikuluma bulunan STX17, SNARE protein kompleksinin bir üyesidir ve birleşme mekanizmasının ana bileşeni olarak görev yapmaktadır (Tsuboyama K ve ark, 2016). ATG14L proteinin STX17

proteinine bağlanması ile oluşan STX17 ve SNAP29 proteinleri birlikte Q-SNARE kompleksinin otofagozomlar üzerinde dengeli dağılımını sağlayarak membran bağını artırır ve birleşmenin gerçekleşmesine katkıda bulunur. Birleşme aşamasında ilk olarak otofagozomun dış membranı, lizozom membranı ile birleşir. Lizozomal hidrolazların otofagozom iç membranını sindirmesi ve otofagozom içeriğinin lizozom lümenine ulaşması ile tam bir birleşme gerçekleşmiş olur. Bu mekanizmanın kusursuz işlemesi otofagozomal bir Q-SNARE proteini olan STX1'in koordineli bir şekilde çalışması ile gerçekleşir (Diao JJ ve ark. 2015; Tsuboyama K ve ark, 2016).

RAB7, FYCO1'in LC3 ve otofagozom zarının bir bileşeni olan PI3P 'e bağlanması ile otofagozomu bir mikrotübül motora bağlar ve hücre çevresine doğru kinesin esaslı hareketi kolaylaştırır. Kolesterolün normal seviyelerde tutulduğu süreçlerde RAB7, PILP ve ORP1L'ye bağlanarak perinükleer bölgeye doğru dynein aracılı harekete katılır. Düşük seviyelerde kolesterol varlığında, ORP1L dynein alımını önleyen bir temas bölgesi oluşturur ve perinükleer bölgeye doğru dynein aracılı hareket kısıtlanmış olur. (Nakamura ve Yoshimori, 2017).



Şekil 11. Otofajinin moleküler düzenlenmesi gösteren şematik diyagramı (Levine B, Yua J, 2005)

### 3.3. Otofaji ve Erkek Üreme Sistemi

Otofaji, çoklu proteinler tarafından kontrol edilen ve çok ilgi çekici bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Otofagozomun oluşumunun düzenlenmesi ile ilgili olarak en az 30 adet Atg proteini, 3PI3K, m-TOR, AMPK (AMP-aktif protein kinaz), Beclin-1, gibi otofaji aktivasyonunda görev alan proteinler bulunmaktadır (Aparicio IM ve ark, 2016). Hasarlanmış



ya da işlevselliği bozulmuş proteinlerin ortadan kaldırılması otofaji yolu ile gerçekleşmektedir. Çevresel birçok etken de hücrelerde otofaji mekanizmasını tetiklemektedir (Komatsu M ve ark, 2007). Hücre içerisinde sitoplazmik bileşenlerin süregelen döngüsünü sağlayarak işlev gören otofajiyi etkileyen çevresel etkenler, açlık, hipoksi ve strestir. Bu çevresel faktörlere karşı hücre homeostazını koruyan ve hücrelerin stres karşısında sağ kalımını sağlayan otofaji, bu gibi stres durumlarının yanısıra, meydana gelebilecek birçok patolojik oluşumda ve yaşın ilerlemesine bağlı meydana gelebilecek durumlarda önemli bir biyolojik olay olarak ortaya çıkmaktadır (Bellot G ve ark, 2009; Chen Y, 2008).

Aparicio ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış olduğu bir çalışmada ilk kez sağlık insan sperminde otofajinin düzenlenmesinde görev alan otofaji protein serilerinin varlığı gösterilmiştir. Atg 5, Atg 16, p62 ve LC3 otofagozomun oluşumunda rol oynarken, m-TOR, Beclin 1 ve AMPK, otofajinin ana düzenleyicileri olarak tanımlanmaktadır. LC-3 otofaji de görev alan proteinler arasında bu yolun düzenlenmesinde en önemli proteinler arasında bulunmaktadır ve otofajinin akışını izlemek için en çok LC3-II / LC3-I oranı kullanılmaktadır. LC3-I sitoplazmada lokalizedir ve otofaji aktivasyonundan sonra, otofagozom içeriğinin tamamı ile daha da bozularak otofagozomal membranlara işlenen LC3-fosfatidiletanolamin konjugatı (LC3-II) oluşturmak üzere fosfatidiletanolamine konjuge edilir. Bu çalışma, LC3-I'in LC3-II 'ye dönüşümünün insan spermatozoasında da gerçekleştiğini ve LC3-II 'nin daha sonra bozulduğunu göstermiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada; tüm vücut ve skrotal ısı maruziyetinin, testis ağırlığı, oksidatif stres, apoptotik leydig hücrelerinde gözlenen apoptozda artış ve germ hücrelerinin azalması dahil olmak üzere, farelerin testislerine zararlı etkileriyle sonuçlandığını bildirilmiştir (Li ve ark, 2013).

Geçici olarak ısıya maruz bırakılan fareler üzerine yapılan bir çalışmada da fare testislerinde otofaji belirteçleri incelenmiş ve çalışmanın sonucunda, tüm vücudun maruz kaldığı ısı maruziyetinin Nrf2 antioksidan sistemini ve otofaji değişimini tetiklediği, sitoplazma p62 proteinini biriktiren ve Nrf2 antioksidatif sistemi aktive eden otofaji inhibisyonu ile otofaji indüksiyonunu tetiklediği ve otofaji indüksiyonunun mTOR'un disregülasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir (Li Z, 2018).

## 4. GEREÇ ve YÖNTEM

### 4.1. Materyallerin Toplanması ve Örneklerin Hazırlanması

Çalışma, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnsan Etik Kurulu'nun 28.11.2016 tarihli 07/V numaralı karar onayı ile yapılmıştır. Çalışma için gerekli kimyasal ve histokimyasal sarf malzemeleri Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) TPF-17038 numaralı proje kapsamında sağlanmıştır.

Çalışmaya 1 Ocak 2017- 1 Ocak 2018 tarihleri arasında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniğinden Androloji laboratuvarına yönlendirilen çalışma gruplarına uygun 18-45 yaş arası gönüllü katılımcılar dâhil edilmiştir. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına bağlı Androloji Laboratuvarına üroloji polikliniğinden semen analiz tetkikleri için yönlendirilen hastalar, perhiz süresi hakkında bilgi ve randevu almak için androloji laboratuvarına başvurmaktadır. Hastalara 3 günlük cinsel perhiz uygulamaları bu perhiz sonunda randevu verilen gün ve saatte androloji laboratuvarına gelmeleri söylenmektedir.

Hastalara verilen randevu kâğıtlarında örnek verirken dikkat edilecek hususlar ayrıntılı olarak yazılmaktadır. Randevu gün ve saatinde androloji laboratuvarına gelen hastalardan çalışma gruplarına uygun olan ve çalışma için gönüllü olan katılımcılara çalışma ile ilgili bilgi verilerek "Onam Formu" ve "Hasta Anamnez Formu" nu doldurarak imzalamaları istenmiştir. Hastalara rutin androloji laboratuvarında örnek verirken dikkat edilecek hususlar hatırlatılarak, örnek vermek için yönlendirildikleri 'Androloji laboratuvarı örnek odasında' da bu kuralların yazılı olduğu tekrar belirtilmiştir.

Gönüllü katılımcılardan alınan örnekler Nüve marka 37 °C'lik inkübatör içerisinde 15 dakika inkübasyona bırakılmış, likefiye olan semen örneklerinden 0,4 mikrolitre makler sayım kamerasının uygun bölümüne damlatılarak ışık mikroskobu altında x20 lik objektifte sperm sayısı, sperm hareketliliği, lökosit sayısı, değerlendirilmiştir. Bu örneklerden hazırlanan yayma preparatları "Spermac Stain sperm morfoloji boyama kiti" ile boyanarak, boyama sonrası morfolojik olarak Kruger kesin kriterlerine göre değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular 'Semen Analiz Formuna' kaydedilmiştir.

Homojenize olmuş her bir hasta örneği; immunohistokimyasal değerlendirme, western blot ve ultrastrüktürel inceleme için eşit olarak üçe bölünmüş ve 3 ayrı 15' lik falkon tüpe alınarak 1000 rpm 'de nüve marka santrifüjde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hasta örneklerinin immunohistokimyasal olarak primer antikolar ile değerlendirilmesinden elde edilen H-Score sonuçları Spss 22 programına yüklenerek kayıt edilmiştir. Western blot için ayrılan pelletler buz üzerine alınmış ve protein izolasyonu sonrası western blot protokolü uygulanmıştır. Ultrastrüktürel görüntüleme için ayrılan semen örnekleri elde edilen pellet agar içerisine gömülüş ve bu karışım %2,5 gluteraldehit içerisine alınmış ve akabinde elektron mikroskopi doku takibi prosedürü uygulanmıştır.

Literatürler doğrultusunda, çalışmamız için 4 grup oluşturulmuştur. Çalışmaya 1 Ocak 2017-1 Ocak 2018 tarihleri arasında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Androloji Laboratuvarı 'na Üroloji Polikliniğinden yönlendirilen çalışma gruplarına uygun 18-45 yaş arası gönüllü katılımcılar dahil edilmiştir. Çalışmaya katılmayı kabul ederek onam formunu doldurup imzalayan gönüllü katılımcılardan hasta anamnez formunu da doldurulmaları istenmiştir. Genel muayene şikayeti ile üroloji polikliniğine başvuran hastalar; tüm hasta gruplarına dahil edilecek olan gönüllü katılımcılar üroloji polikliniğine başvurduklarında üroloji polikliniği tarafından ilk olarak ayrıntılı anamnez alınarak, daha sonra el ile muayene edilmişler ve gerekli laboratuvar testleri ve radyolojik görüntüleme istemleri yapıldıktan sonra semen parametrelerinin değerlendirilmesi istemi ile androloji laboratuvarına yönlendirilmişlerdir.

Hiçbir şikayeti olmayan sadece genel muayene için başvuran, üroloji polikliniği tarafından da üremeyi etkileyecek bir rahatsızlığı bulunmayan, androloji laboratuvarında da doldurması istenen anamnez formunda çalışma için uygun kriterleri sağlayan gönüllü katılımcılar kontrol grubuna dahil edilmiştir.

Üroloji polikliniğine bebek istemi şikayeti ile başvuran ve yukarıda bahsedilen tetkikler yapıldıktan sonra **Grade 2** (Valsalva manevrası olmaksızın da palpe edilebilen ancak göz ile görülemeyen) varikozel teşhisi konan, androloji laboratuvarında doldurmuş olduğu anamnez formunda da başka hiçbir üremeyi etkileyen rahatsızlığı bulunmayan hastalar varikozel grubuna dahil edilmiştir.

Üroloji polikliniğine bebek istemi şikayeti ile başvuran ve yukarıda bahsedilen tetkikler yapıldıktan sonra orşit- epididimit teşhisi alan ve androloji laboratuvarında doldurmuş olduğu

anamnez formunda da başka hiçbir üremeyi etkileyen rahatsızlığı bulunmayan hastalar enfeksiyon grubuna dahil edilmiştir.

Üroloji polikliniğine bebek istemi şikayeti ile başvuran ve yukarıda bahsedilen tetkikler yapıldıktan sonra idiopatik erkek infertilitesi teşhisi alan ve androloji laboratuvarında doldurmuş olduğu anamnez formunda da başka hiçbir üremeyi etkileyen rahatsızlığı bulunmayan hastalar açıklanamayan erkek infertilitesi grubuna dahil edilmiştir.

Kontrol grubuna dahil olan hastalardan genel muayene dışında herhangi bir şikayet ile başvuran hastalar, sigara ve/veya alkol kullananlar, herhangi bir ürogenital sistem operasyonu geçirenler ve üremeyi etkilecek sistemik bir rahatsızlığı bulunanlar çalışma dışı bırakılmıştır. Diğer hasta gruplarına dahil edilecek olan hastalardan grup için belirtilen kriterleri sağladıkları halde, sigara ve/veya alkol kullananlar, herhangi bir ürogenital sistem operasyonu geçirenler ve üremeyi etkilecek sistemik bir rahatsızlığı bulunanlar çalışma dışı bırakılmıştır. Bu kriter göz önüne alınarak çalışmamız için 4 grup oluşturulmuştur.

**Grup1 (30 hasta): Kontrol Grubu:** Hiçbir infertilite rahatsızlığı bulunmayan Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2010) semen parametrelerine göre normal kabul edilen hastalar,

**Grup 2 (30 hasta): Varikozel Grubu:** Grade 2 varikozel teşhisi almış ve diğer infertilite nedeni olan hastalıkları bulunmayan Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2010) semen parametrelerine göre referans değerinin altında sperm parametreleri olan hastalar,

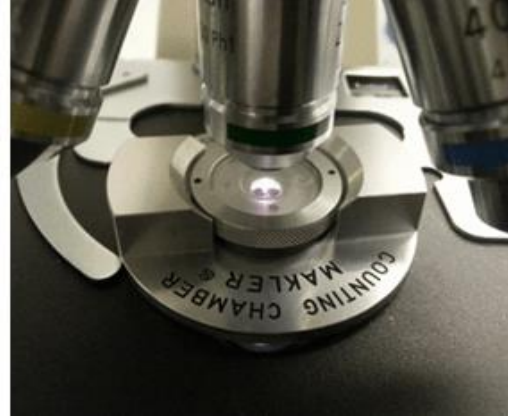
**Grup 3 (30 hasta): Enfeksiyon Grubu:** Orşit-Epididimit teşhisi almış ve diğer infertilite nedeni olan hastalıkları bulunmayan Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2010) semen parametrelerine göre referans değerinin altında sperm parametreleri olan hastalar,

**Grup 4 (30 hasta): Açıklanamayan İnfertilite Grubu:** Açıklanamayan İnfertilite teşhisi almış (diğer infertilite nedeni olan hastalıkları bulunmayan) Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2010) semen parametrelerine göre referans değerinin altında sperm parametreleri olan hastalar dahil edilmiştir.

#### **4.1.1. Makler Kamera ile Sperm Sayımı**

Çalışma gruplarına dahil edilen her bir örnek likefiye olduktan sonra ilk önce makroskobik olarak inceleme altına alındı ve akabinde de mikroskobik olarak değerlendirilmesi yapıldı. Alınan örneklerin makroskobik değerlendirilme öncesi 15 dk Nüve marka bir inkübatörde 37 °C' de inkübasyona bırakıldı ve daha sonra ejakulatın mililitresi, viskozitesi, rengi kokusu ph metre ölçümleri değerlendirilerek semen analiz formuna not edildi. Daha sonra

ise ışık mikroskobu altında bir makler kamera yardımı ile 20x büyütmede mikroskopik olarak ml'deki sperm sayısı, total sperm sayısı, total sperm sayısının hareket yüzdeleri ve spermlerdeki vitalite oranı değerlendirildi.



Resim 1. Işık Mikroskop Ataçmanlı Makler Kamera

Sperm hareketleri 4 kategoride değerlendirildi;

- +4: Hızlı, ilerleyici hareketlilik
- +3: Yavaş hızlı hareketlilik
- +2: Yerinde hareketlilik
- +1: Hareketsiz sperm

Elde edilen sperm sayısı ml' deki sperm sayısı olarak, bu sayının hastaya ait total semen volümü ile çarpılması ile total sperm sayısı elde edildi. Mililitredeki sperm sayısının yukarıda belirtilen 4 ayrı kriterde yüzdeleri alınarak motil sperm yüzdeleri ayrı ayrı hesaplandı ve son olarakta, +4 ve +3 motil spermelerin yüzdeleri toplanarak total motil sperm yüzdesi elde edilmiş oldu.

#### 4.1.2. Spermilerin Morfolojik Değerlendirilmesi

Çalışma gruplarına dahil edilen her bir hastadan elde edilen semen örneklerinden 0,5 mikrolitre rodajlı lam üzerine damlatılarak 45 derecelik açı ile yayma preparatlar hazırlandı. Havada kurutulma sağlandıktan sonra Tablo 3'de gösterilen, Spermac Stain (FertiPro Spermac Stain # FB18S04) boyası ile boya protokolüne uygun olarak boyandı. Boyama sonrası 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde 5 dakika kuruması sağlanan yayma preparatlar ışık mikroskobu altında x100 objektifde incelendi. Tüm sahada toplam 100 hücre değerlendirmeye alınarak baş, boyun

ve kuyruk anomalileri incelendi ve kruger kesin kriterlerine göre yüzde değer verilerek kayıt altına alındı.

Tablo 3. Spermac Stain boyası ile Kruger' e göre morfoloji boyama protokolü

Yapılan İşlem	Uygulama süresi	Boyanan bölge
Tespit	5 Dakika	
Solüsyon A	2 Dakika	nükleus
Solüsyon B	1 Dakika	Boyun ve kuyruk
Solüsyon C	1 Dakika	akrozom
Kurutma	Tespit sonrası 5 dakika Boyama sonrası 37°C de 5 dakika	
İnceleme:	X100 objektifte ışık mikroskobu	

#### 4.1.3. İmmunohistokimyasal Boyama Teknikleri

İmmunohistokimyasal boyama ile gerçekleştirilen analizlerde, hücre içerisinde var olan makromoleküllerin ilk olarak işaretlenmesi ve akabinde boyama işlemleri ile görünür hale getirilerek incelenmesi esas alınmaktadır.

Aşağıda belirtilen üç temel unsur işaretlemenin ana prensibidir.

1. Primer bir antikorun özel bir antijene bağlanması
2. Antikor ve antijen kompleksinin özel bir konjugasyon enzimi yardımı ile diğer ikincil bir antikorla bağlanması
3. Substrat ve kromojen varlığında eklenmiş olan enzimin, antikor ile antijenin bağlanma bölgesinde renkli (kahverengi) bir görüntü vermesi ve ışık mikroskobu altında histopatolojik inceleme yapılması

LC3A/B (D3U4C) XP (Cell Signaling #12741), Beclin 1 (Cell Signaling, CBOW0115051), SQSTM1/p62 D5L7G (Cell Signaling #88588) anti-h/m/rATG5 (R&D System Minneapolis, CEDH011712A), ATG12 (Cell Signaling #2010S), ATG16L1 D6D5 (Cell Signaling #8089S) antikorları kullanılmak üzere her bir gruba dahil toplam 120 yayma preparat hazırlanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan yayma preparatlar şalelelere dizilerek Spermac Stain (FertiPro Spermac Stain # FB18S04) marka sperm fiksasyon solüsyonu içerisinde 15 dakika bekletildi. Fiksatif içerisinden çıkarılan yayma preparatlar PBS (Fosfat buffer salin) solüsyonu ile yıkanarak kurulandı ve Pap-pen kalem ile sınırları belirlenerek çizildi.

Daha sonra örnekler üzerine %3' lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hidrojen peroksit) konularak oda ısısında 10 dakika bekletildi. Bekleme işleminden sonra PBS ile üçer defa iyice yıkanan örneklerin

kurutma kâğıdı ile nazikçe suyu alındı. Daha sonra uygun retrieval yöntemi uygulanan örnekler 20 dakıla 37 °C derecelik etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda örnekler tekrar PBS solüsyonu ile üçer kez yıkanarak fazla sıvı kurulandı. Örnekler üzerinde Pab-pen ile çizili alanı kapatacak şekilde peroxidaz dizileme solüsyonu damlatıldı. 6 dk sonra PBS ile yıkanan örnekler kurulandıktan sonra üzerlerine bloking solüsyonu damlatıldı ve oda ısısında 30 dk süre ile bekletildi. Blok solüsyonu yıkama yapılmadan dikkatlice uzaklaştırıldı ve üzerine uygun şekilde dilüe edilen primer antikor konularak +4 derecede bir gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile iyice yıkaması yapılan preparatlar üzerine primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatıldı ve kapalı nemli kutuda oda ısısında 30 dakika bekletildi. PBS solüsyonu ile 3 kez yıkaması yapıp kurutulmuş preparatlar üzerine streptavidin peroksidaz konjuget eklendi ve oda ısısında kapalı nemli ortam kabında 15 dakika bekletildi. 1000 mikrolitre (µl) DAB dilisyonu içerisinde 27 µl DAB substratı olacak şekilde örnek sayısına göre DAP karışımı hazırlandı ve inkübasyon süresi sonunda 3 'er kez PBS ile yıkanıp fazla suyu alınan lamlar üzerine, DAP karışımı koyulup ortalama 2 dk beklenildi. Preparatlar distile suyla yıkandı. Yayma preparatların üzerine Harris Hematoksilin konulup 40 saniye beklenerek zemin boyaması yapıldı ve yine distile suyla yıkama yapılan yayma preparatlar kurutulmadan alkol ve ksilol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.

#### **4.1.4. Ultrastrüktürel İnceleme Ve Elektron Mikroskopik Doku Takibi**

Almış olduğumuz semen örnekleri 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra falkon tüpün konik kısmında oluşan pelletler agar agar içerisinde gömüldü ve akabinde % 2,5 'lik fosfat tamponlu glutraldehit içerisinde 48 saat 4 °C'lik buzdolabında fikasyona bırakıldı. Daha sonra ultrastrüktürel görüntüleme için TEM doku takibi protokolü uygulandı. Her bir örnek doku takibi için uygun küçük cam şişeler içerisinde alındı ve üzerlerine soreson fosfat buffer eklenerek 20 dakika yıkama işlemi 3 kez tekrarlanarak yapıldı. Üzerlerindeki soreson fosfat buffer dökülen şişelerin içerisinde bire bir oranında PBS- OsO<sub>4</sub> (osmium tetroksit, TAAB®) karışımı eklendi ve içerisinde örneklerin olduğu şişeler aliminyum folyaya sarılarak karanlık bir ortamda 60 dakika bekletildi. 60 dakikalık sürenin dolmasına yakın küçük 3 adet beher alınır ve içerlerine PBS solüsyonu konulur. 60 dakikalık süre dolduğunda PBS-OsO<sub>4</sub> karışımından alınan örnekler PBS solüsyonları içerisinde geçirilerek kurutma kâğıdı üzerinde kurutulur ve epondorf içerisindeki tampon solüsyonu içerisinde 60 dakika bırakıldı.

Dehidratasyon işlemi için aşağıdaki basamaklar uygulandı;

%70' lik Alkol	10 dakika
%100' lük Alkol	10 dakika

%100' lük Alkol	10 dakika
Propilen oksit	15 dakika
Propilen oksit	15 dakika



(a)



(b)

Resim 2. (a) Elektron mikroskobu takip protokolünden bir görüntü (b) Elektron mikroskobu kesit almak için kullanılan ultratom cihazı

Dehidratasyon işleminden sonra infiltrasyon işlemi için dokular birebir oranında hazırlanmış olan propin oksit-araldit karışımı içerisine alınarak oda ısısında arada hafif bir şekilde karıştırılarak 60 dakika bekletildi. Daha sonra araldit DDSA (Dodesenil Süksinik Anhidrit) karışımı birebir oranında hazırlandı ve örnekler bu yeni karışım içerisine alınarak bir gece +4 °C de buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkarılan örnekler içerisine birebir oranında BDMA eklenen yeni araldit karışımı içerisine alındı ve bu karışım içerisine gömülerek polimerizasyon işlemi için 60°C 'lik etüvde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Araldite gömülmüş örneklerden yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı mikroskop altında ultrastrüktürel görüntü alınacak alanlar belirlendi ve ince kesitler alınarak formuar kaplı gritler üzerine örnekler alındı. Kurşun sitrat ve uranil asetat ile kontrastlaması yapılan kesitlerin TEM altında görüntülenmesi yapılarak değerlendirildi (Carl Zeiss Libra 1200).

#### 4.1.5 Western Blot Analizi

Hastalardan alınan semen örnekleri kuru buz üzerine alınmış ve Bio-Rad Protein Extraction Kit (Soluble/İnsoluble) (USA) kullanılarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Protein miktarları hesaplanan ve numune, distile su, laemmlı buffer (Bio-rad 2xlaemmlı Sample Buffer cat.161-0737) kullanılarak aynı orana getirilen numuneler 95 °C de 5 dakika süre ile



ısıtıldı. Kilo dalton ağırlığı göz önünde bulundurularak değerlendirilmeye alınacak olan proteinler için uygun yüzde de jel hazırlığı yapıldı. Her bir kuyucuk için toplamda 20 mikrogram/ml oranında protein içeren örnekler sırası ile yüklendi. İlk olarak 100V 30mA'de de ayarlanan örnekler elektroforezde 15 dakika, daha sonra ise jelin sonuna kadar 80V 30mA'de yürütüldü. Jelin sonuna kadar yürüyen proteinlerin elektroforez sonrası membrana geçebilmesi için immunoblotting işlemi yapıldı. Blotlama işlemi 30V 90mA'de 3 saat boyunca kuru buz içerisinde gerçekleşti.

Nitrosellüloz membrana proteinlerin transferinin sağlanmasının ardından, membran 60 dakika boyunca karıştırıcı üzerinde 10x TBS (Bio Rad, #170-6435) ve 10% Tween 20 (Bio-Rad, #161-0781) solüsyonlarının karışımı ile elde edilen TBS-T solüsyonu kullanılarak hazırlanan %5'lik süt tozu ile oda ısısında blokladı. Süt tozu ile bloklama sonrası ilgili oranlarda seyreltilen LC3A/B (D3U4C) XP (Cell Signaling #12741), Beclin 1 (Cell Signaling, CBOW0115051) antikorları ile ayrı ayrı muamele edilen membranlar, +4 C'de overnight karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra TBS-T ile üçer kez 5 dakika karıştırıcı üzerinde yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra membranlar, sekonder antikor ile oda ısısında karıştırıcı üzerinde 60 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile üçer kez 10 dakika karıştırıcı üzerinde yıkama yapıldı. Yıkama işlemi sonrası membranlardaki bantların görüntüleri alınarak kayıt edildi. Aynı membranlara striping protokü uygulanarak membranlar Beta-actin (Cell Signaling #4967S) antikoruna muamele edildi ve membranlardaki bantların görüntüleri alınarak kayıt altına alındı.



(a)



(b)

Resim 3. (a) Elektroforez sistemi (b) Western blot işlemi görüntüleme cihazı

#### **4.1. H Skorlaması**

Her bir çalışma grubunda bulunan her bir hasta için yapılan immunohistokimyasal değerlendirme için, her bir hastaya ait yayma preparatlarda rastgele 10 alan seçilmiş ve bu 10 ayrı alanda otofaji açısından hem pozitif hem de negatif hücreler olmak üzere tüm hücreler sayılmış ve yüzdeleri alınmıştır. Pozitif boyanan hücrelerin ise boyanma yoğunluğu 'H-score yöntemi' kriterlerine göre, zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli (+++) olacak şekilde 3 kategoride değerlendirilmiştir (Detre Sve ark, 1995; Mazieres J ve ark, 2013).

#### **4.2. İstatistiksel Analizler**

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler SPSS 22.0 programına da istatistiksel olarak değerlendirildi. Her bir sperm parametresi için Normal Dağılıma Uygunluk analizi yapıldı. Normal dağılıma uymayan veriler Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. İkili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi yapıldı. Normal dağılıma uygunluk analizi yapılan ve normal dağılıma uyan H-skor sonuçları için, One Way Anova tek yönlü varyans analizi yapıldı. Elde edilen veriler de  $p < 0.05$  olan değerler istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. Çalışmamın sonunda elde edilen veriler doğrultusunda Post Hoc Power analizi yapıldı.

## 5. BULGULAR

Bu çalışmada Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Androloji Laboratuvarına, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi Üroloji polikliniklerinden yönlendirilen 120 çalışma kriterlerine uygun erkek katılımcıdan alınan semen örnekleri, ışık mikroskobu altında makler kamera yardımı ile spermiyogram değerlendirmesi, hazırlanan yayma preparatlar ile morfoloji değerlendirmesi, indirek immunohistokimya yöntemi ile immünohistokimyasal inceleme, Western Blot ve TEM ile ultrastrüktürel incelemeler yapılarak değerlendirilmiştir.

### 5.1. Spermiyogram Sonuçları

Hastalardan alınan detaylı anamnez sonrası, üç günlük cinsel perhiz süresini tamamlamış hastalardan alınan semen örnekleri incelenmiştir. Örnekler alındıktan hemen sonra minimum 15 dakika 37°C'de liklefaksiyon için bekletilmiş likefiye olmayan örnekler her 15 dakikada kontrol edilmek üzere maksimum 60'dakika etüv içerisinde bekletilmiştir. Likefiye olma zamanı not alındıktan sonra makroskobik olarak, renk, koku, pH, likefaksiyon süreleri ve hacim özellikleri yönünden değerlendirmeye alınmıştır.

Likefaksiyon süresi sonunda visköz olan örnekler visközite yönünden grade1, grade2, grade3 olarak değerlendirilmiş ve mikroskobik incelemeye geçmeden önce 5 ml enjektör ucu ile mekanik inceltilmiş ve mikroskobik incelemeye daha sonra geçilmiştir. Mikroskobik inceleme makler kamera ile ışık mikroskobu altında x20'lik büyütmede yapılmış ve sperm sayı ve hareketliliği değerlendirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalardan semen örnekleri cinsel perhiz süresinin 3. günü alınmıştır. Tüm gruplar için ortalama yaş 32, ortalama volüm 3 ml olarak bulunmuştur. Volüm değeri gruplar arasında istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Viskosite değerlendirilmesinde normal yapıya sahip hasta oranı tüm gruplar için, %88,3 olarak bulunmuş artış sırasına göre, grade1 visköz; %8 grade 2 visköz; %4,2 ve grade3 visköz; %6,7 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile varikosel ve açıklanamayan İnfertilite grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiş kontrol grubu ve infeksiyon grubu arasında ve hasta grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ( $p<0,05$ ).

Lökosit değerlendirilmesinde; Kontrol Grubu için ortalama lökosit değeri;  $1 \times 10^6$ , Varikosel Grubu için ortalama lökosit değeri;  $1 \times 10^6$ , Enfeksiyon grubu için ortalama lökosit değeri  $3 \times 10^6$ , Grup 4: Açıklanamayan İnfertilite Grubu için ortalama enfeksiyon değeri  $1 \times 10^6$  olarak bulunmuştur.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, Enfeksiyon grubu lökosit değerleri kontrol ve diğer hasta gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0,05$ ).

Kontrol Grubu için; mililitredeki ortalama sperm sayısı  $65,5 \times 10^5$ ; ortalama total sperm sayısı  $177,5 \times 10^5$ ; ortalama total sperm hareketi %69; +4 (ileri hızlı) hareketli sperm sayısı %30; +3 (yavaş ileri) hareketli sperm sayısı %40; +2 (yerinde) hareketli sperm sayısı %5; +1 hareketsiz sperm sayısı %30; olarak belirlenmiştir.

Varikosel Grubu için; mililitredeki ortalama sperm sayısı  $5 \times 10^6$ ; ortalama total sperm sayısı  $20 \times 10^6$ ; ortalama total sperm hareketi %30; +4 (ileri hızlı) hareketli sperm sayısı %0; +3 (yavaş ileri) hareketli sperm sayısı %30; +2 (yerinde) hareketli sperm sayısı %6; +1 hareketsiz sperm sayısı %60; olarak belirlenmiştir.

Enfeksiyon Grubu için; mililitredeki ortalama sperm sayısı  $8 \times 10^6$ ; ortalama total sperm sayısı  $17 \times 10^6$ , ortalama total sperm hareketi %30; +4 (ileri hızlı) hareketli sperm sayısı %0; +3 (yavaş ileri) hareketli sperm sayısı %25; +2 (yerinde) hareketli sperm sayısı %5; +1 hareketsiz sperm sayısı %65; olarak belirlenmiştir.

Açıklanamayan İnfertilite Grubu için; mililitredeki ortalama sperm sayısı  $7,5 \times 10^5$ ; ortalama total sperm sayısı  $22 \times 10^6$ ; ortalama total sperm hareketi %30; +4 (ileri hızlı) hareketli sperm sayısı %1; +3 (yavaş ileri) hareketli sperm sayısı %29; +2 (yerinde) hareketli sperm sayısı %7,5; +1 hareketsiz sperm sayısı %60; olarak belirlenmiştir.

Mililitredeki sperm sayısı hasta grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki mililitredeki sperm sayısı varikosel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p = 0,000$ ). Hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Total sperm sayısı istatistiksel olarak hasta grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki total sperm sayısı varikosel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p = 0,000$ ). Hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Total motil sperm sayısı istatistiksel olarak hasta grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki total motil sperm sayısı varikosel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek

bulunmuştur (p=0,000). Hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. +4 hızlı ileri sperm sayısı varikozel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,000). Hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. +3 yavaş ileri sperm sayısı hasta grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki, +3 yavaş ileri sperm sayısı varikozel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,000). Hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. +2 yerinde hareketli sperm sayısı hasta grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki +2 yerinde hareketli sperm sayısı varikozel (p=0,14), enfeksiyon (p=0,12) ve açıklanamayan infertilite (p=0,000), gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. +1 hareketsiz sperm sayısı hasta grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki +1 hareketsiz sperm sayısı varikozel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,000). Hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hastalardan elde edilen Spermiyogram sonuçları Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Spermiyogram Sonuçları

Grup/Sperm Parametreleri	Kontrol Med. (Min-Max)	Varikozel Med. (Min-Max)	Enfeksiyon Med. (Min-Max)	Açıklanamayan Med. (Min-Max)
Volüm (ml)	3 (2-5)	3 (2-7)	3 (2-6)	3 (2-6)
Viskozite	0 (0-0)	0 (0-3)	0 (0-3)	0 (0-3)
Sperm/ml	65.500.00* (40x10 <sup>6</sup> -100x10 <sup>6</sup> )	5x10 <sup>6</sup> * (1x10 <sup>5</sup> -10x10 <sup>6</sup> )	8x10 <sup>6</sup> * (1x10 <sup>5</sup> -15x10 <sup>6</sup> )	7.500.00* (1x10 <sup>5</sup> -14x10 <sup>6</sup> )
Total Sperm	177.500.00* (88x10 <sup>6</sup> -340x10 <sup>6</sup> )	20x10 <sup>6</sup> * (4x10 <sup>5</sup> -42x10 <sup>6</sup> )	17x10 <sup>6</sup> * (4x10 <sup>5</sup> -60x10 <sup>6</sup> )	22x10 <sup>6</sup> * (1.5x10 <sup>5</sup> -104x10 <sup>6</sup> )
Total Hareket%	69 (69-76) *	30 (0-40) *	30 (0-40) *	30 (0-40) *
+4 %	30 (15-45)	0 (0-18)	0 (0-19)	1 (0-15)
+3 %	40 (30-50)	30 (0-40)	25 (0-39)	29 (0-37)
+2 %	5 (0-10)	6 (0-10)	5 (0-15)	7,5 (0-20)
+1 %	30 (20-40) *	60 (50-95) *	65 (50-100) *	60 (40-90) *
Lökosit %	1x10 <sup>6</sup> * (1x10 <sup>6</sup> -1x10 <sup>6</sup> )	1x10 <sup>6</sup> ** (1x10 <sup>6</sup> -2x10 <sup>6</sup> )	3x10 <sup>6</sup> *,**,*** (2x10 <sup>6</sup> -20x10 <sup>6</sup> )	1x10 <sup>6</sup> *** (1x10 <sup>6</sup> -2x10 <sup>6</sup> )
*Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)				
** Enfeksiyon grubu ve Varikozel grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık(p=0,000)				
***Enfeksiyon grubu ve Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)				

## 5.2. Yayma Preparatların Spermac Stain Boyaması ile Krugere Göre Değerlendirilmesi

Mikroskopik değerlendirme sonrası her bir örnekten biri inceleme üçü yedek olacak şekilde 4 yayma preparat hazırlandı. Hazırlanan yayma preparatlar kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar morfolojik incele için Spermac Stain boyası ile boya protokolüne göre boyandı ve boyama sonrası elde edilen yayma preparatlar kurumaya bırakıldı. X100 objektifte immersiyon yağı kullanılarak ışık mikrokobu ile Krugere göre morfolojik inceleme yapıldı. (Resim 4, 5, 6, 7) Spermiler; normal, amorf baş, büyük baş, küçük baş, uzun baş, çift baş, boyun ve mibple, kuyruk, sitoplazmik droplet, serbest baş olmak üzere 10 ayrı kriterde incelendi ve sonuçlar % değeri olarak verildi.

Normal morfolojiye sahip sperm sayısı istatistiksel olarak gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki normal morfolojiye sahip sperm sayısı varikosel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,000$ ). Hasta grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Amorf başa sahip sperm sayısı gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki amorf başa sahip sperm sayısı varikosel ( $p=0,000$ ), enfeksiyon ( $p=0,025$ ) ve açıklanamayan infertilite ( $p=0,000$ ) gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Hasta grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede enfeksiyon grubundaki amorf başa sahip sperm sayısı varikosel grubuna göre anlamlı derecede az bulunmuştur ( $p=0,000$ ), yine hasta grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede enfeksiyon grubundaki amorf başa sahip sperm sayısı açıklanamayan infertilite grubuna göre anlamlı derecede az bulunmuştur ( $p=0,03$ ).

Büyük başa sahip sperm sayısı gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki büyük başa sahip sperm sayısı açıklanamayan infertilite grubuna göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p=0,19$ ). Kontrol grubu ile varikosel ( $p=0,831$ ) ve enfeksiyon ( $p=0,410$ ) grupları arasında büyük başa sahip sperm sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hasta grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede açıklanamayan infertilite grubundaki büyük başa sahip sperm sayısı varikosel grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p=0,021$ ), yine hasta grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede açıklanamayan infertilite grubundaki büyük başa sahip sperm sayısı enfeksiyon grubuna göre anlamlı fark göstermemiştir ( $p=0,140$ ).

Çift başa sahip sperm sayısı gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki çift başa sahip sperm sayısı açıklanamayan infertilite gruplarına göre

anlamli derecede yuksek bulunmuştur ( $p=0,034$ ). Kontrol grubu ile varikozel grubu( $p=0,348$ ) ve enfeksiyon grubu ( $p=0,95$ ) arasında çift başa sahip sperm sayısı arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunamamıştır Hasta grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede gruplar arasında anlamli bir fark bulunamamıştır.

Boyun ve mibple anomalisine sahip sperm sayısı gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak kontrol grubundaki boyun ve mibple anomalisine sahip sperm sayısı enfeksiyon grubuna göre anlamli derecede düşük bulunmuştur ( $p=0,000$ ). Kontrol grubu ile açıklanamayan infertilite grubu ( $p=0,261$ ) ve varikozel grubu ( $p=0,084$ ) arasında boyun ve mibple anomalisine sahip sperm sayısı arasında istatistiksel olarak anlamli bir fark bulunamamıştır. Hasta grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede enfeksiyon grubundaki boyun ve mibple anomalisine sahip sperm sayısı varikozel ( $p=0,000$ ) grubuna ve açıklanamayan infertilite ( $p=0,000$ ) grubuna göre anlamli derecede yuksek bulunmuştur.

Küçük başa sahip sperm sayısı ve uzun başa sahip sperm sayısı, gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamli bir fark görülememiştir. Kuyruk anomalisine sahip sperm sayısı gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamli bir fark görülememiştir. Kontrol grubu ile hasta gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırıldıkları grafik Tablo 5’de, hasta gruplarının kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırıldıkları grafik Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 5. Kontrol grubu ile hasta gruplarının karşılaştırıldıkları krugere göre morfoloji sonuçları

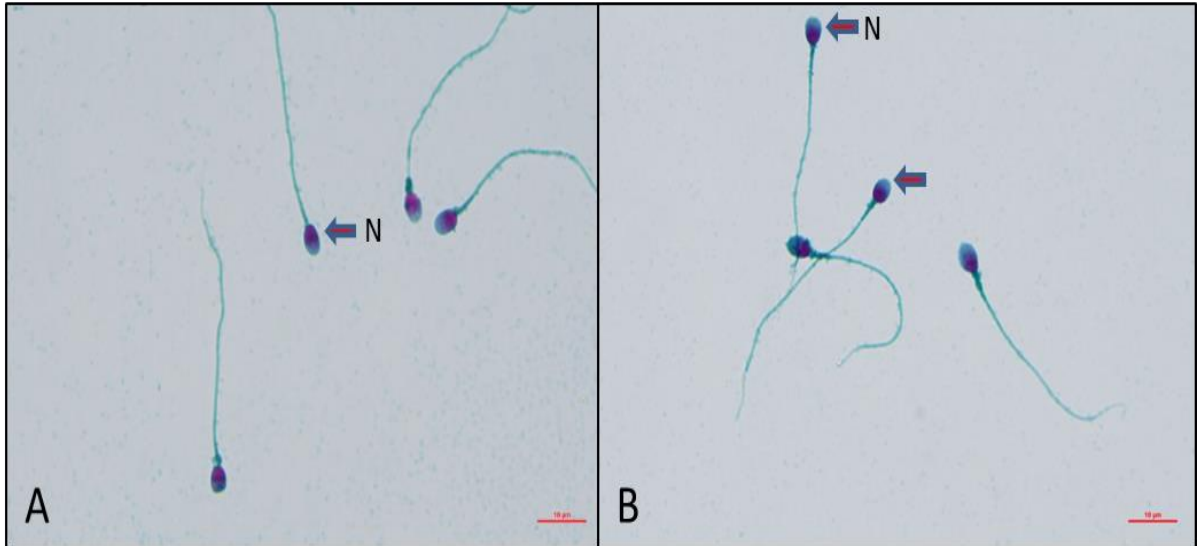
Grup/Sperm Parametreleri	Kontrol Med. (Min-Max)	Varikozel Med. (Min-Max)	Enfeksiyon Med. (Min-Max)	Açıklanamayan Med. (Min-Max)
Normal	17 (5-36) *	1 (1-3) *	1 (1-3) *	1 (1-3) *
Amorf baş	19 (8-40) *	34 (18-64) *	20 (10-60) *	30 (2-60) *
Büyük baş	5 (0-20) *	6 (0-10) *	8 (0-10) *	9,5 (0-34) *
Küçük baş	4 (0-18)	5 (0-20)	5 (1-20)	6,5 (0-18)
Uzun baş	5 (0-20)	5 (0-21)	5 (0-17)	5 (0-18)
Çift baş	6 (1-20) *	5 (0-40)	4,5 (0-10)	2,5 (0-10) *
Boyun mibple	15 (0-40) *	20 (0-40) *	38 (10-50) *	19,5 (0-39) *
Kuyruk	10 (5-30)	10 (0-20)	10 (0-30)	10 (0-40)
Sitop. droplet	9 (0-20)	5 (0-20)	6 (0-19)	5 (0-20)
Serbest baş	0 (0-20)	0 (0-20)	0 (0-19)	0 (0-13)

\* Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık ( $p<0,05$ )

Tablo 6. Hasta gruplarının karşılaştırıldıkları krugere göre morfoloji sonuçları

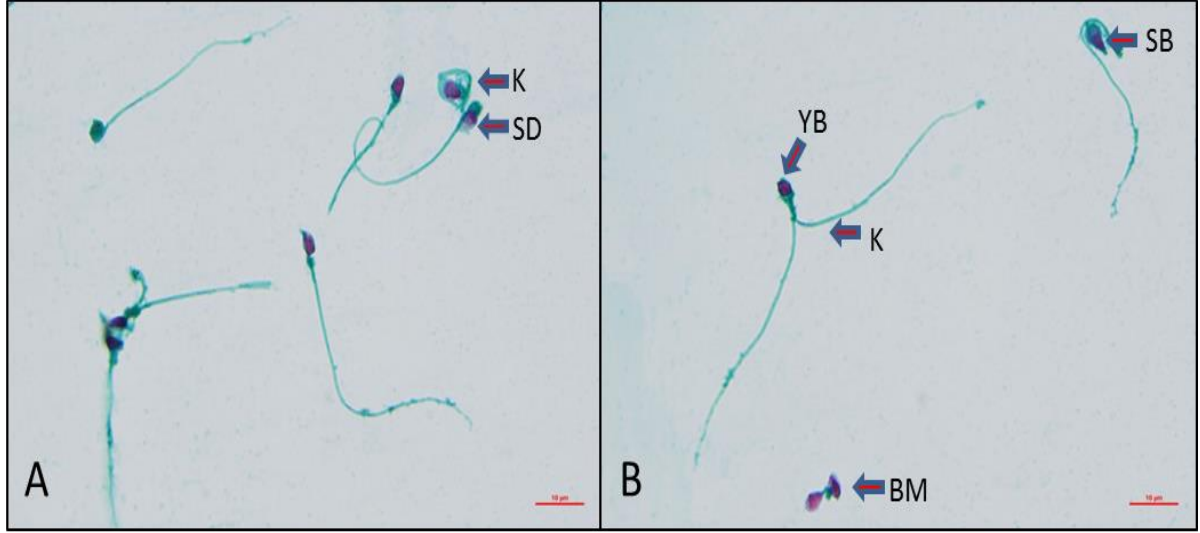
Grup/Sperm Parametreleri	Varikozel Med. (Min-Max)	Enfeksiyon Med. (Min-Max)	Açıklanamayan Med. (Min-Max)
Normal	1 (1-3)	1 (1-3)	1 (1-3)
Amorf baş	34 (18-64) *	20 (10-60) *,**	30 (2-60) **
Büyük baş	6 (0-10) +	8 (0-10) ++	9,5 (0-34) ++
Küçük baş	5(0-20)	5 (1-20)	6,5 (0-18)
Uzun baş	5 (0-21)	5 (0-17)	5 (0-18)
Çift baş	5 (0-40)	4,5 (0-10)	2,5 (0-10)
Boyun mibple	20 (0-40) *	38 (10-50) *,**	19,5 (0-39) **
Kuyruk	10 (0-20)	10 (0-30)	10 (0-40)
Sitop. droplet	5 (0-20)	6 (0-19)	5 (0-20)
Serbest baş	0 (0-20)	0 (0-19)	0 (0-13)

\* Enfeksiyon grubu ile Varikozel grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık  
 \*\* Enfeksiyon grubu ile Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık  
 + Açıklanamayan infertilite grubu ile Varikozel grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık  
 ++ Açıklanamayan infertilite grubu ile Varikozel grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p<0,05)

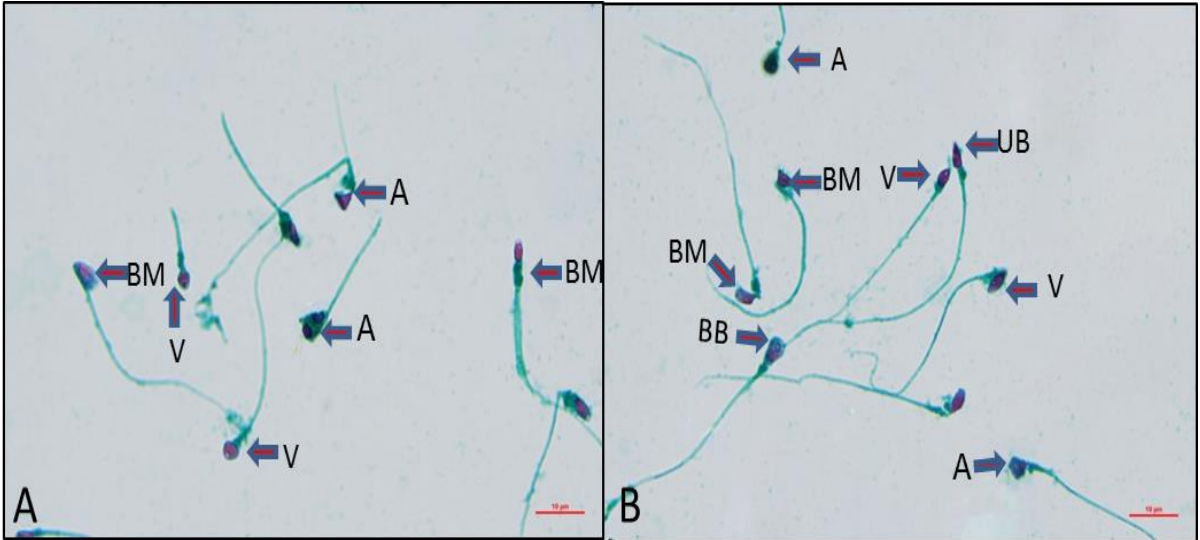


Resim 4. Kontrol grubuna ait krugere göre sperm stain boyama morfoloji sonuçları: (N; Normal)

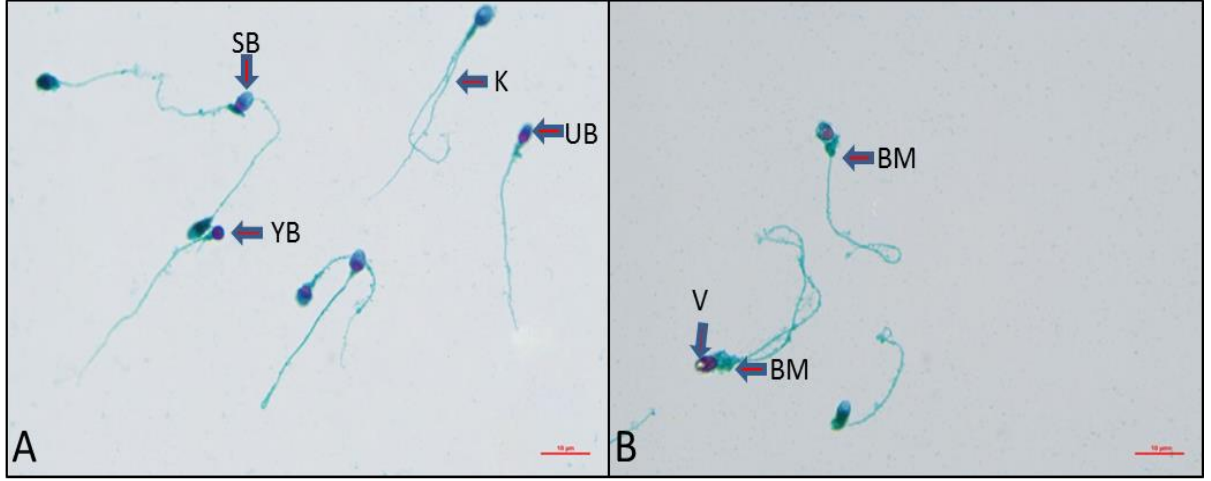




Resim 5. Varikozel grubuna ait krugere göre spermac stain boyama morfoloji sonuçları: (N; Normal, BM; Boyun ve Mibple, K; Kuyruk, SD; Sitoplazmik Droplet, SB; Serbest Baş)



Resim 6. Enfeksiyon grubuna ait krugere göre spermac stain boyama morfoloji sonuçları: (A; Amorf Baş, BB; Büyük Baş, UB; Uzun Baş, BM; Boyun ve Mibple, V; Vakuol)



Resim 7. Açıktanmayan infertilite grubuna ait krugere göre spermac stain boyama morfoloji sonuçları: (BM; Boyun ve Mibple, K; Kuyruk, YB; Yuvarlak Baş, SB; Serbest Baş, V; Vakuol)

### 5.3. Yayma preparatların İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi İle Değerlendirilmesi

Poli lizimli lamalar üzerine hazırlanan yayma preparatlar kurumaya bırakıldı. Fiksasyon işleminden sonra immunohistokimyasal boyama yapılan preparatlar, her bir grup için 6 ayrı otofaji belirteci ile incelendi (Belcin-1, SQSTM1/p62, LC3A/B, Atg5, ATG12, ATG16L1). Boyama sonrası immersiyon yağı yardımıyla X100 objektifte Nikon marka ışık mikroskobu altında görüntülenen örneklerin her biri için H skorlaması yapıldı. Bu skorlama yöntemi ile boyama derecesine göre her bir sperme bir değer verildi.

(+) zayıf pozitif

(++) orta pozitif

(+++) kuvvetli pozitif

Her örnek için; zayıf (+) pozitif boyanan hücrelerin yüzdesi hesaplandı ve çıkan sonuç 1 ile çarpılarak bir değer elde edildi. Daha sonra orta (++) pozitiflikte boyanan hücrelerin yüzdesi hesaplandı ve bu sonucun 2 ile çarpılması ile de bir değer elde edildi. Kuvvetli (+++) pozitiflikte boyanan hücreler için de bu hücrelerin yüzdesi hesaplanmış ve sonuç 3 ile çarpılarak üçüncü bir değer elde edilmiş oldu. Daha sonra elde edilen bu 3 değer toplandı ve her hasta için bir "H-skor değeri" elde edildi. Her bir hasta için H-score değerinin hesaplamasında aşağıda belirtilen formül kullanılmıştır:

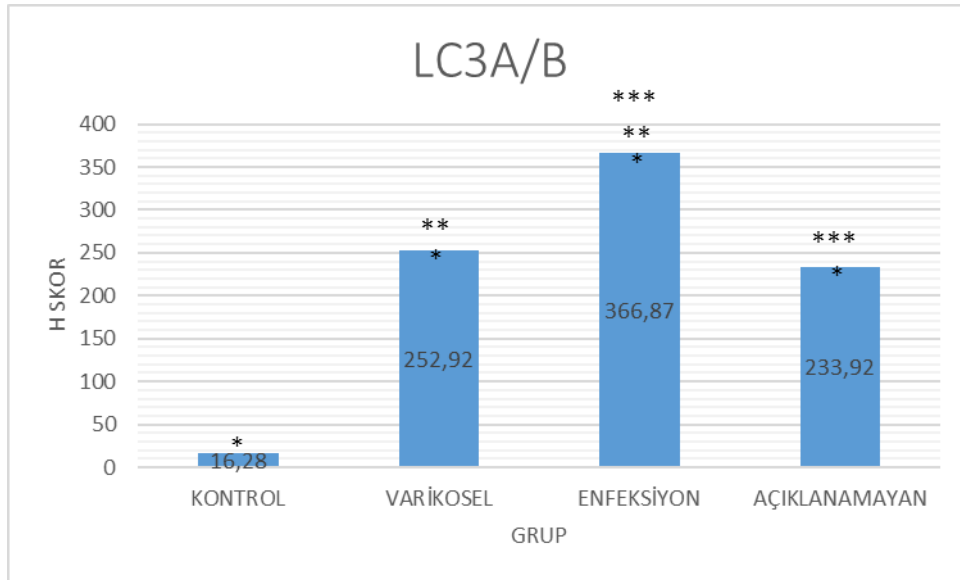
H-score = 1 × [zayıf (+) pozitiflikte boyanan hücrelerin % si] + 2 × [orta (++) pozitiflikte boyanan hücrelerin % si] + 3 × [kuvvetli (+++) pozitiflikte boyanan hücrelerin % si]

### 5.3.1 LC3 A/B primer antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme;

LC3 A/B primer antikoru kullanılarak yapılan boyamalar sonucu elde edilen H-skorumları değerlendirildiğinde; kontrol grubu H-skor değerlerinin varikozel grubuna göre (p=0,000), enfeksiyon grubuna göre (p=0,000) ve açıklanamayan infertilite (p=0,000) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derece az olduğu gösterilmiştir. Gruplara ait ortalama H-skor değerleri ve en düşük en yüksek H-skoru değerleri Tablo 7 ve Şekil 12’de gösterilmiştir.

Tablo 7. LC3 A/B primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi

Antikor (LC3A/B)	Ortalama± SS (Min.-Max.)
Kontrol (n=30)	16,28±6,438 (7,23-32,11)
Varikozel (n=30)	252,92±112,838 (20,60-210-78)
Enfeksiyon (n=30)	366,86±141,309 (25,80-314,1)
Açıklanamayan (n=30)	233,92±52,305 (14,4-189)



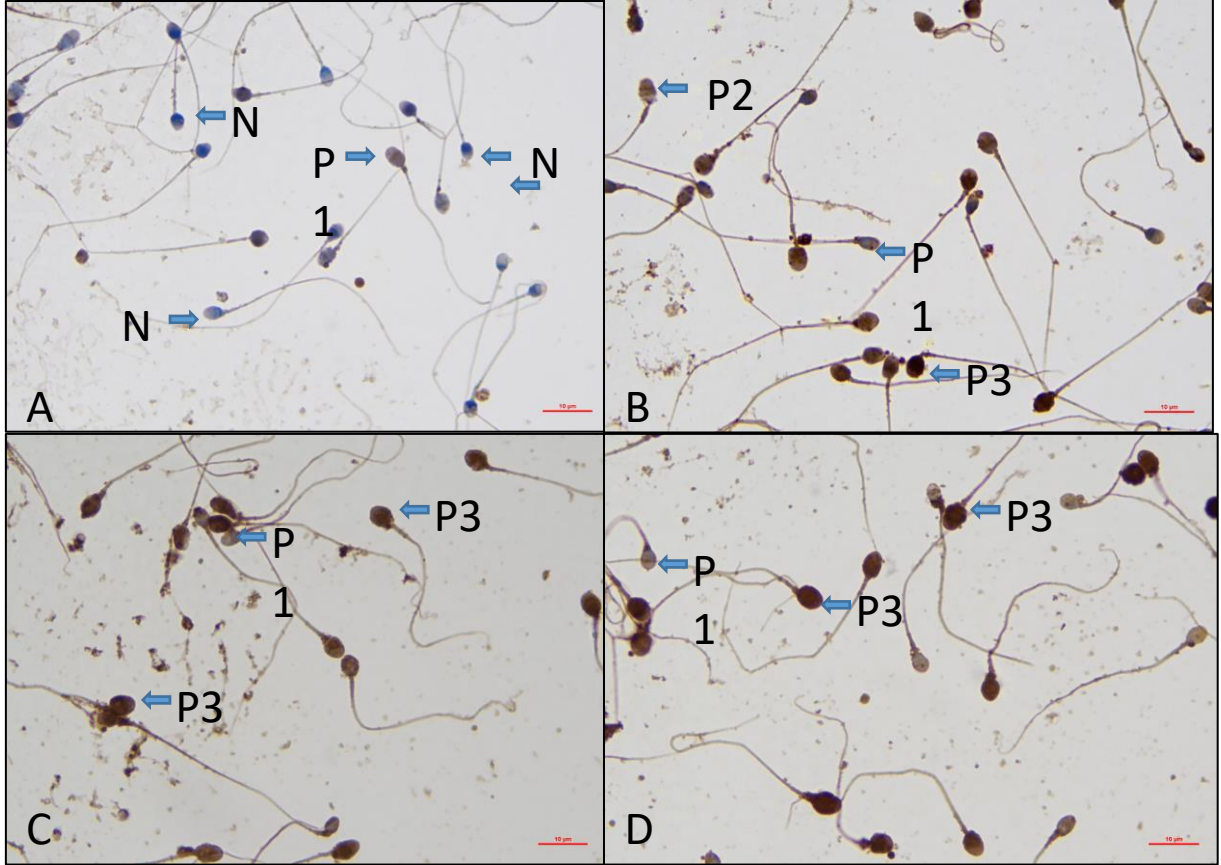
\* Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

\*\* Enfeksiyon grubu ve Varikozel grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

\*\*\* Enfeksiyon grubu ve Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

Şekil 12. LC3 A/B primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri

Kontrol grubunda bulunan spermelerde (-) ve (+) zayıf boyanma daha yoğun izlenirken, varikozel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite teşhisi almış hasta gruplarında (++, +++) pozitif boyanan sperm sayısının artmış olduğu gözlemlendi. En yoğun boyanmanın enfeksiyon grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Işık mikroskobu altında x100 objektifte immersiyon yağı kullanılarak alınan görüntüler Resim 8’ de verilmiştir.



Resim 8. LC3A/B, x100 büyütme. (A; Kontrol Grubu, B; Varikozel Grubu, C; Enfeksiyon Grubu, D; Açıklanamayan İnfertilite Grubu, N; negatif boyanma, P1; zayıf boyanma, P2; orta boyanma, P3; yoğun boyanma)

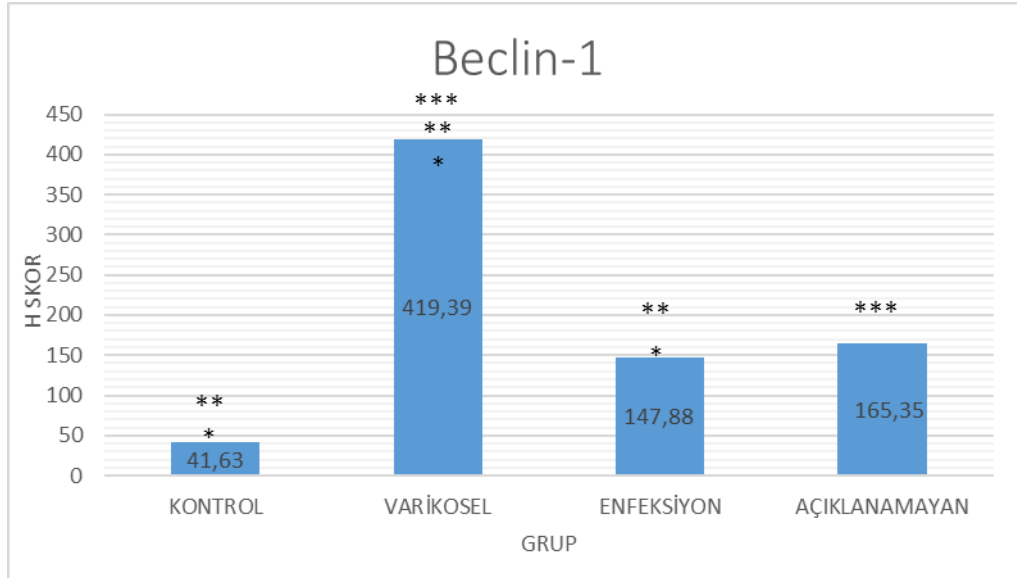
### 5.3.2 Beclin-1 primer antikorunu kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme;

Beclin-1 primer antikorunu kullanılarak yapılan boyamalar sonucu elde edilen H-skorumları değerlendirildiğinde; kontrol grubu H-skor değerlerinin varikozel grubuna göre ( $p=0,000$ ), enfeksiyon grubuna göre ( $p=0,000$ ) ve açıklanamayan infertilite ( $p=0,000$ ) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derece az olduğu gösterilmiştir. Hasta grupları kendi arasında değerlendirildiğinde; varikozel grubu ile enfeksiyon grubu ( $p=0,000$ ) ve varikozel grubu ile açıklanamayan infertilite grubu ( $p=0,000$ ) karşılaştırıldığında varikozel grubunda H-skor değeri

istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Açıklanamayan infertilite grubu ile enfeksiyon grubu değerlendirildiğinde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p=0,059$ ). Gruplara ait ortalama H-skor değerleri ve en düşük en yüksek H-skoru değerleri Tablo 8 ve Şekil 13’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Beclin-1 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi

Antikor (BECLİN-1)	Median (Min.-Max.)
Kontrol (n=30)	41,63±16,417 (19,70-89,78)
Varikozel (n=30)	419,40±46,605 (318,25-494,89)
Enfeksiyon (n=30)	147,88±44,083 (62,77-229,93)
Açıklanamayan (n=30)	193,56±25,506 (117,51-205,84)



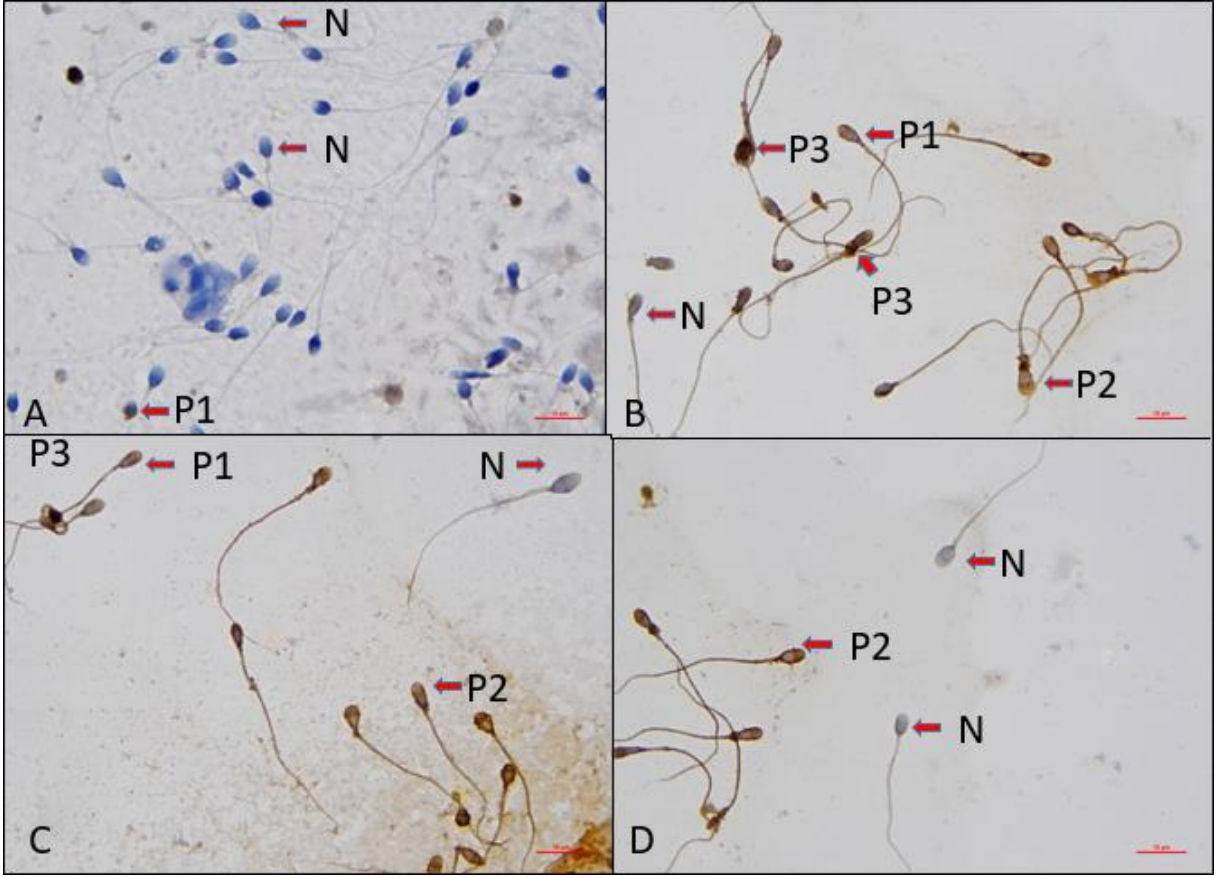
\*Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık ( $p=0,000$ )

\*\* Varikozel grubu ve Enfeksiyon grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık ( $p=0,000$ )

\*\*\* Varikozel grubu ve Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık ( $p=0,000$ )

Şekil 13. Beclin-1 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri

Kontrol grubunda bulunan spermelerde (-) ve (+) zayıf boyanma daha yoğun izlenirken, varikozel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite teşhisi almış hasta gruplarında (++, +++) pozitif boyanan sperm sayısının artmış olduğu gözlemlendi. En yoğun boyanmanın varikozel grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Işık mikroskobu altında x100 objektifte immersiyon yağı kullanılarak alınan görüntüler Resim 9’ da verilmiştir.



Resim 9. Beclin-1, x100 büyütme. (A; Kontrol Grubu, B; Varikozel Grubu, C; Enfeksiyon Grubu, D; Açıklanamayan İnfertilite Grubu, N; negatif boyanma, P1; zayıf boyanma, P2; orta boyanma, P3; yoğun boyanma)

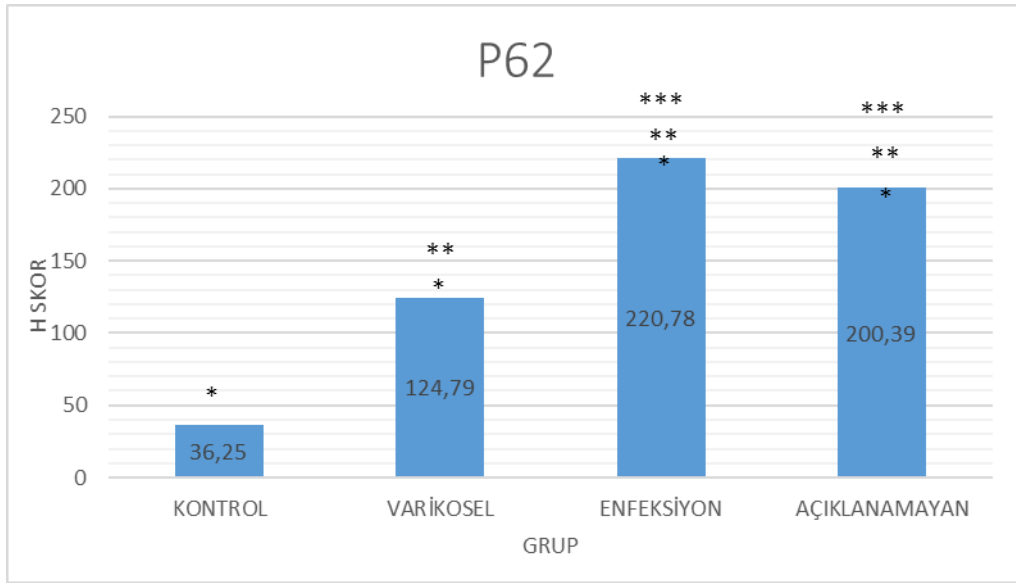
### 5.3.3. P62 primer antikoru kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme;

P-62 primer antikoru kullanılarak yapılan boyamalar sonucu elde edilen H-skorumları değerlendirildiğinde; kontrol grubu H-skor değerlerinin varikozel grubuna göre ( $p=0,000$ ), enfeksiyon grubuna göre ( $p=0,000$ ) ve açıklanamayan infertilite ( $p=0,000$ ) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derece az olduğu gösterilmiştir. Hasta grupları kendi arasında değerlendirildiğinde; enfeksiyon grubu ile varikozel grubu ( $p=0,000$ ) ve enfeksiyon grubu ile açıklanamayan infertilite grubu ( $p=0,028$ ) karşılaştırıldığında enfeksiyon grubunun H skor değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Yine açıklanamayan infertilite ve enfeksiyon grubu karşılaştırıldığında açıklanamayan infertilite grubunun H skor değerlerinin enfeksiyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede

daha yüksek olduğu gösterilmiştir (p=0,028). Gruplara ait ortalama H-skor değerleri ve en düşük en yüksek H-skoru değerleri Tablo 9 ve Şekil 14’de gösterilmiştir.

Tablo 9. P62 primer antikorunu kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi

Antikor (p62)	Median (Min.-Max.)
Kontrol (n=30)	36,25±17,301 (9,49-81-75)
Varikozel (n=30)	124,77± 21,224 (91,24-189,05)
Enfeksiyon (n=30)	220,79±37,788 (142,34-294,16)
Açıklanamayan (n=30)	200,39±157,676 (117,52-352,55)



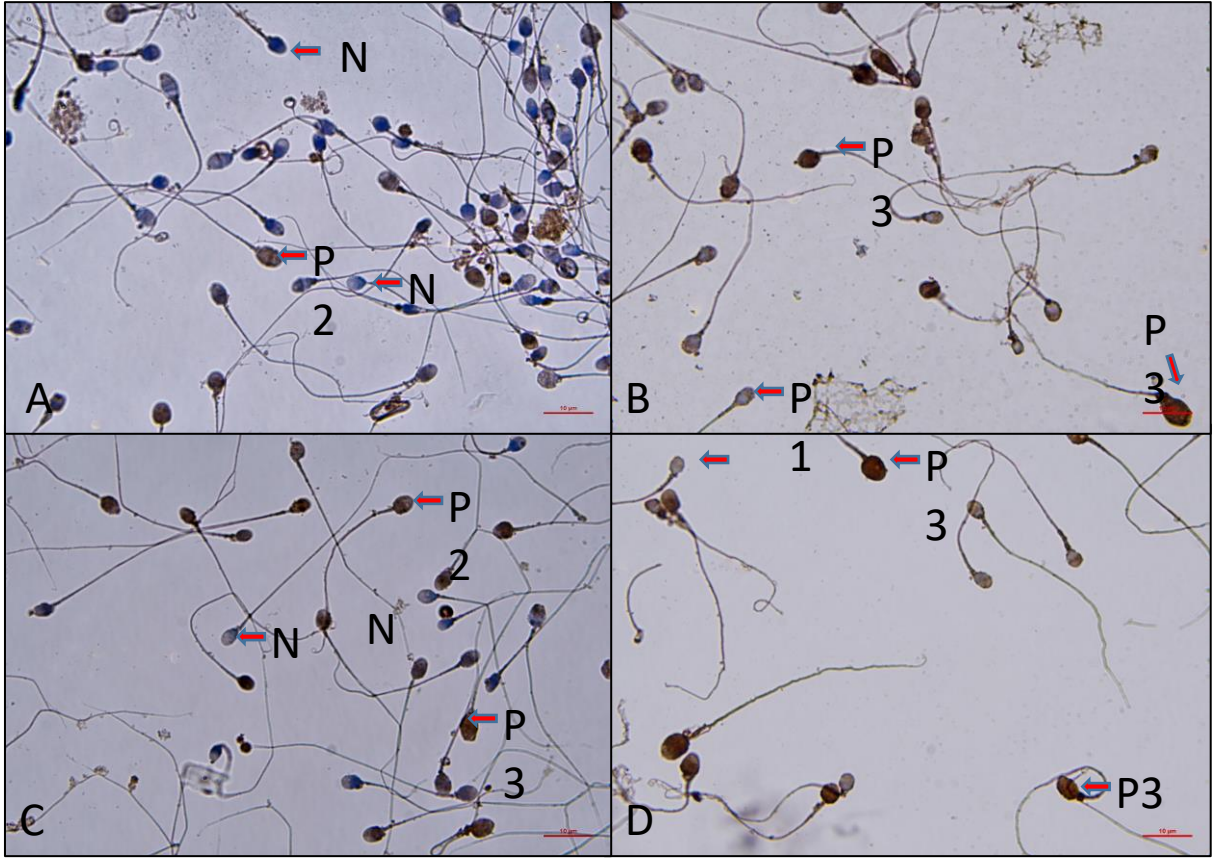
\* Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

\*\* Varikozel grubu ile Enfeksiyon grubu ve Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

\*\*\* Enfeksiyon grubu ve Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,028)

Şekil 14. P62 primer antikorunu kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri

Kontrol grubunda bulunan spermelerde (-) ve (+) zayıf boyanma daha yoğun izlenirken, varikozel, orşit-epididimit ve açıklanamayan infertilite teşhisi almış hasta gruplarında (++, +++) pozitif boyanan sperm sayısının artmış olduğu gözlemlendi. En yoğun boyanmanın enfeksiyon grubunda olduğu gözlemlenmiştir. Işık mikroskobu altında x100 objektifte immersiyon yağı kullanılarak alınan görüntüler Resim 10’da verilmiştir.



Resim 10. P62, x100 büyütme. (A; Kontrol Grubu, B; Varikosel Grubu, C; Enfeksiyon Grubu, D; Açıklanamayan İnfertilite Grubu, N; negatif boyanma, P1; zayıf boyanma, P2; orta boyanma, P3; yoğun boyanma)

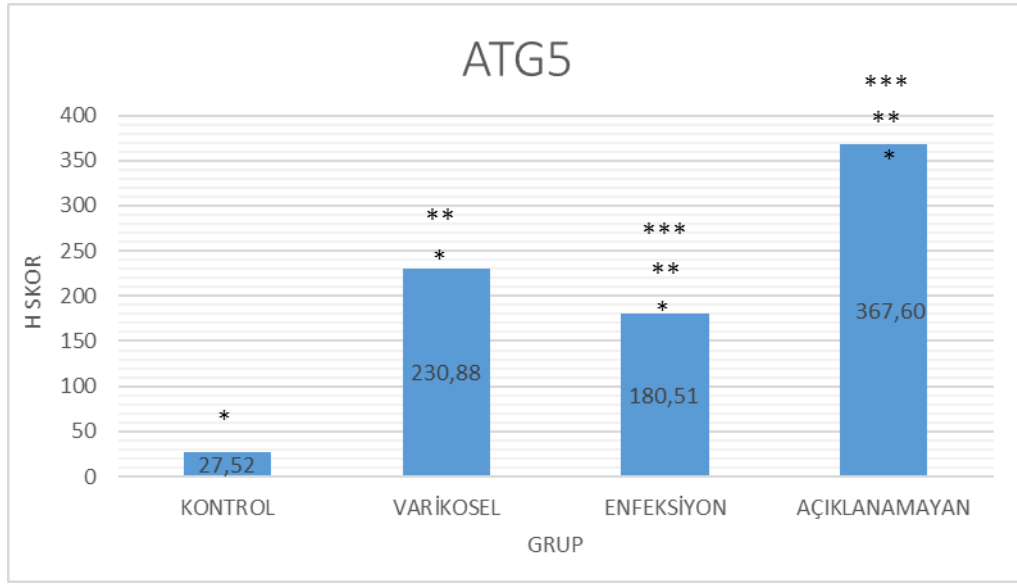
#### 5.3.4. ATG5 primer antikorunu kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme;

ATG5 primer antikorunu kullanılarak yapılan boyamalar sonucu elde edilen H-skorumları değerlendirildiğinde; kontrol grubu H-skor değerlerinin varikosel grubuna göre ( $p=0,000$ ), enfeksiyon grubuna göre ( $p=0,000$ ) ve açıklanamayan infertilite ( $p=0,000$ ) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derece az olduğu gösterilmiştir. Hasta grupları kendi arasında değerlendirildiğinde; açıklanamayan infertilite grubu ile varikosel grubu ( $p=0,000$ ) ve enfeksiyon grubu ( $p=0,000$ ) karşılaştırıldığında açıklanamayan infertilite grubunun H skor değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Yine varikosel ve enfeksiyon grupları karşılaştırıldığında varikosel grubunun H skor değerlerinin enfeksiyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir. ( $p=0,000$ ). Gruplara ait ortalama H-skor değerleri ve en düşük en yüksek H-skorumları değerleri Tablo 10 ve Şekil 15’de gösterilmiştir.



Tablo 10. ATG 5 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirilmesi

Antikor (ATG 5)	Median (Min.-Max.)
Kontrol (n=30)	27,52±13,554 (10,22-51,83)
Varikozel (n=30)	230,85±36,720 (162,77-318,98)
Enfeksiyon (n=30)	180,51±31,924 (124,82-278,83)
Açıklanamayan (n=30)	367,59±57,518 (251,09-486,86)



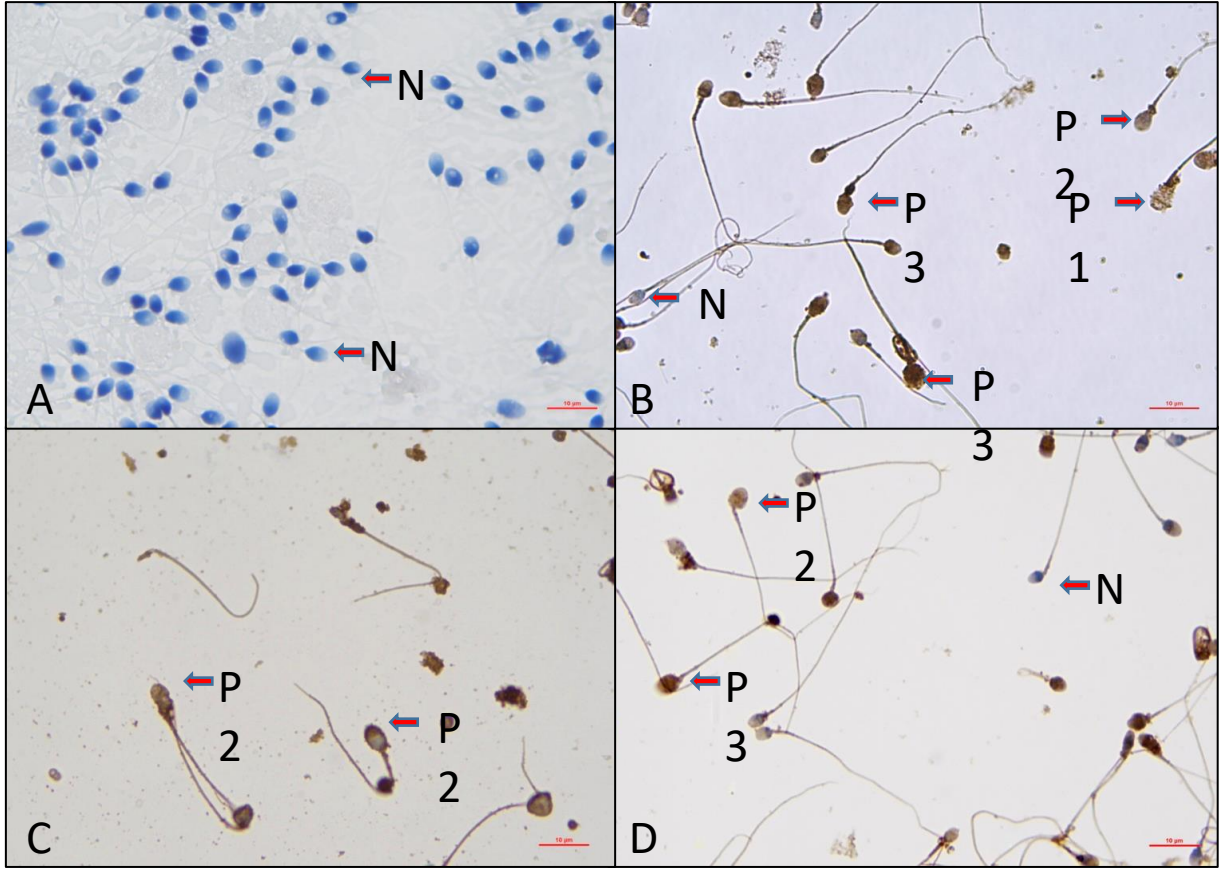
\* Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

\*\* Varikozel grubu ile Enfeksiyon grubu ve Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

\*\*\* Enfeksiyon grubu ve Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,028)

Şekil 15. ATG 5 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri

Kontrol grubunda bulunan spermelerde (-) ve (+) zayıf boyanma daha yoğun izlenirken, varikozel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite teşhisi almış hasta gruplarında (++, +++) pozitif boyanan sperm sayısının artmış olduğu gözlemlendi. En yoğun boyanmanın açıklanamayan infertilite grubunda olduğu gözlemlenmiştir.



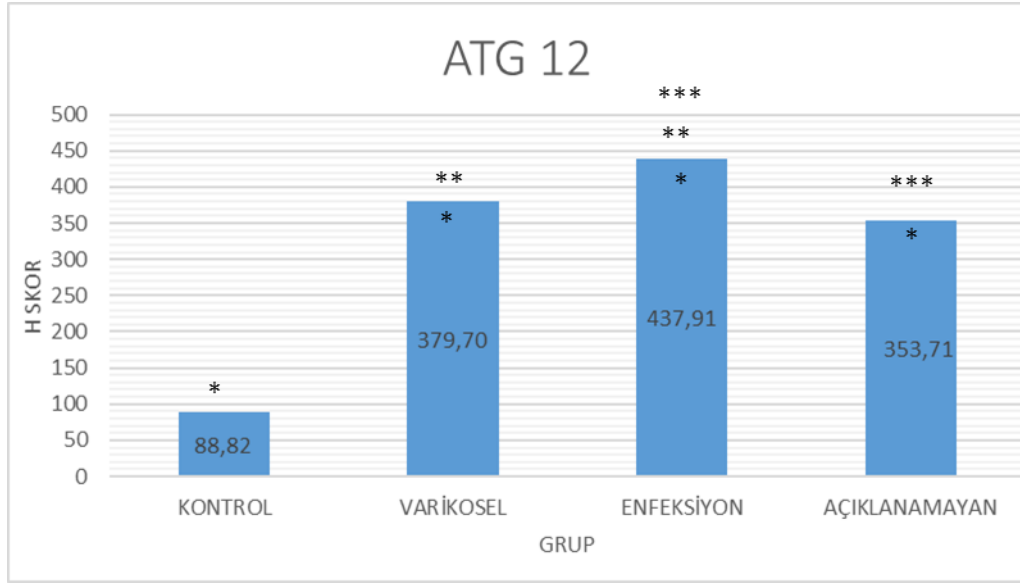
Resim 11. P62, x100 büyütme. (A; Kontrol Grubu, B; Varikosel Grubu, C; Enfeksiyon Grubu, D; Açıklanamayan İnfertilite Grubu, N; negatif boyanma, P1; zayıf boyanma, P2; orta boyanma, P3; yoğun boyanma)

### 5.3.5. ATG12 primer antikorunu kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme

ATG12 primer antikorunu kullanılarak yapılan boyamalar sonucu elde edilen H-skorumları değerlendirildiğinde; kontrol grubu H-skor değerlerinin varikosel grubuna göre ( $p=0,000$ ), enfeksiyon grubuna göre ( $p=0,000$ ) ve açıklanamayan infertilite ( $p=0,000$ ) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu gösterilmiştir. Hasta grupları kendi arasında değerlendirildiğinde; açıklanamayan infertilite grubu ile varikosel grubu ( $p=0,000$ ) ve enfeksiyon grubu ( $p=0,000$ ) karşılaştırıldığında açıklanamayan infertilite grubunun H skor değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir. Yine varikosel ve enfeksiyon grupları karşılaştırıldığında varikosel grubunun H skor değerlerinin enfeksiyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir. ( $p=0,000$ ). Gruplara ait ortalama H-skor değerleri ve en düşük en yüksek H-skorumları Tablo 11 ve Şekil 16'da gösterilmiştir.

Tablo 11. ATG 12 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirilmesi

Antikor (ATG12)	Median (Min.-Max.)
Kontrol (n=30)	45,89±30,233 (11,68-183,21)
Varikozel (n=30)	196,18±48,770 (95,62- 299,27)
Enfeksiyon (n=30)	226,25±41,722 (160,58-327,01)
Açıklanamayan (n=30)	182,75±33,434 (89,05-269,34)



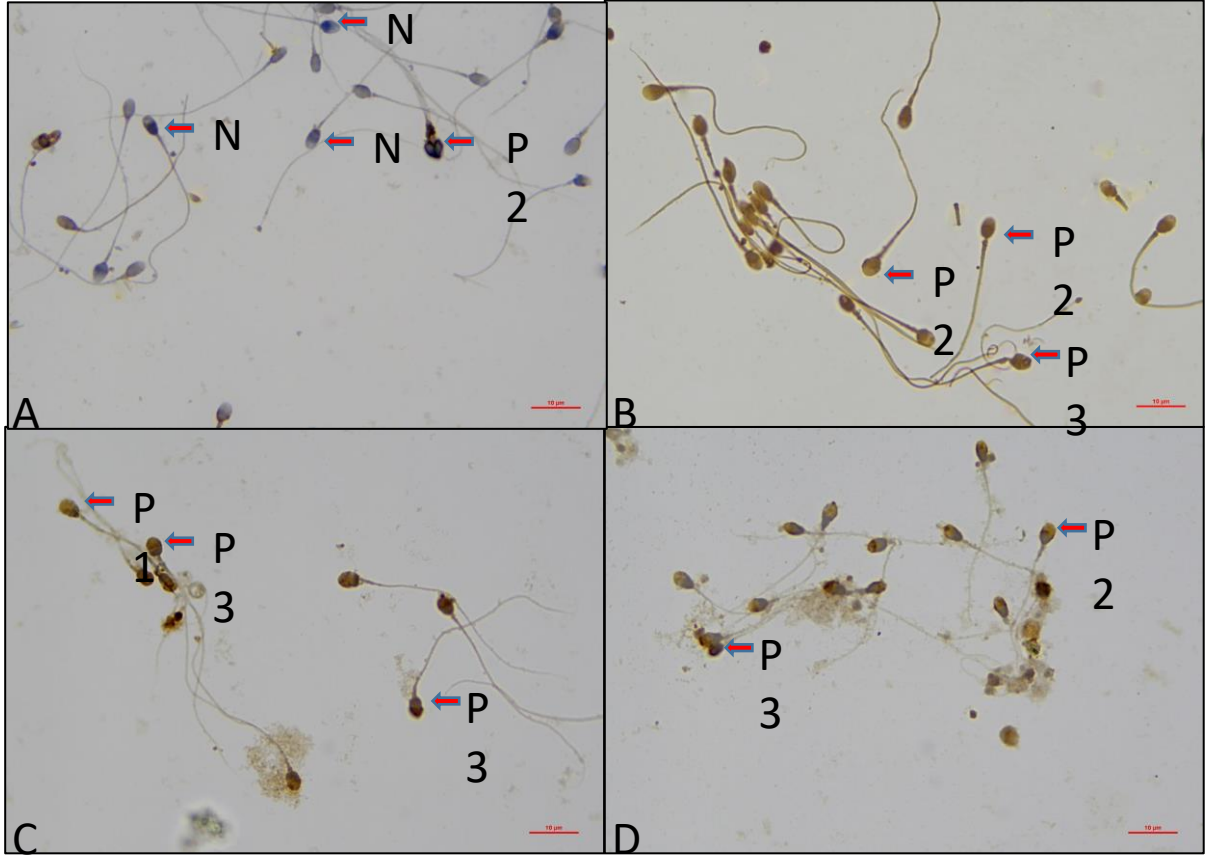
\* Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

\*\* Varikozel grubu ve Enfeksiyon grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,004)

\*\*\* Enfeksiyon grubu ve Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

Şekil 16. ATG 12 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri

Kontrol grubunda bulunan spermelerde (-) ve (+) zayıf boyanma daha yoğun izlenirken, varikozel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite teşhisi almış hasta gruplarında (++, +++) pozitif boyanan sperm sayısının artmış olduğu gözlemlendi. En yoğun boyanmanın enfeksiyon grubunda olduğu gözlemlenmiştir.



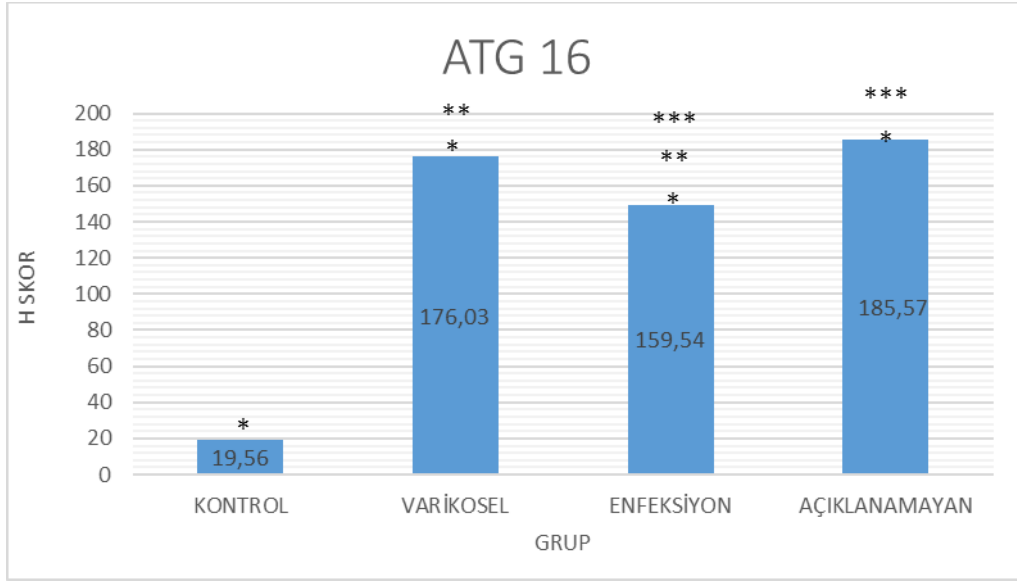
Resim 12. ATG12, x100 büyütme. (A; Kontrol Grubu, B; Varikozel Grubu, C; Enfeksiyon Grubu, D; Açıklanamayan İnfertilite Grubu, N; negatif boyanma, P1; zayıf boyanma, P2; orta boyanma, P3; yoğun boyanma)

### 5.3.6. ATG16 primer antikorunu kullanılarak immunohistokimyasal yöntem ile değerlendirme;

ATG16 primer antikorunu kullanılarak yapılan boyamalar sonucu elde edilen H-skorumları değerlendirildiğinde; kontrol grubu H-skor değerlerinin varikozel grubuna göre ( $p=0,000$ ), enfeksiyon grubuna göre ( $p=0,000$ ) ve açıklanamayan infertilite ( $p=0,000$ ) gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derece az olduğu gösterilmiştir. Hasta grupları kendi arasında değerlendirildiğinde; enfeksiyon grubu açıklanamayan infertilite grubu ( $p=0,000$ ) ve varikozel grubu ( $p=0,001$ ) ile karşılaştırıldığında enfeksiyon grubunun H-skor değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi. Varikozel ve açıklanamayan infertilite grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,211$ ). Gruplara ait ortalama H-skor değerleri ve en düşük en yüksek H-skoru değerleri Tablo 12 ve Şekil 17’de gösterilmiştir.

Tablo 12. ATG 16 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerlendirmesi

Antikor (ATG16)	Median (Min.-Max.)
Kontrol (n=30)	19,56±8,459 (7,30-45,98)
Varikozel (n=30)	176,03±32,836 (113,14-249,63)
Enfeksiyon (n=30)	149,54±39,446 (94,89-259,12)
Açıklanamayan (n=30)	185,75±27,398 (132,85-231,39)



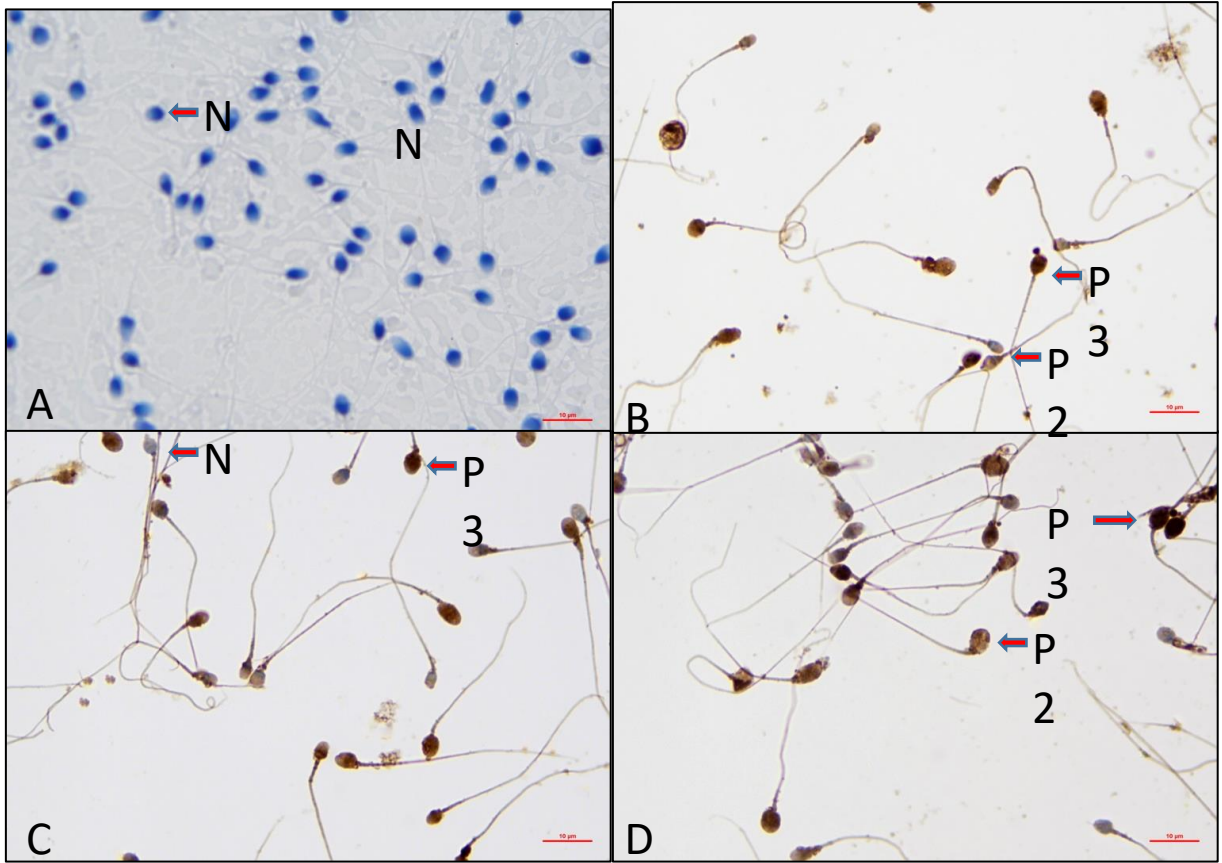
\*Kontrol grubu ile Hasta grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

\*\* Varikozel grubu ve Enfeksiyon grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,001)

\*\*\* Enfeksiyon grubu ve Açıklanamayan infertilite grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık (p=0,000)

Şekil 17. ATG 16 primer antikoru kullanılarak yapılan boyama sonrası elde edilen H-skor değerleri

Kontrol grubunda bulunan spermelerde (-) ve (+) zayıf boyanma daha yoğun izlenirken, varikozel, enfeksiyon ve açıklanamayan infertilite teşhisi almış hasta gruplarında (++, +++) pozitif boyanan sperm sayısının artmış olduğu gözlemlendi.



Resim 13. ATG16, x100 büyütme. (A; Kontrol Grubu, B; Varikosal Grubu, C; Enfeksiyon Grubu, D; Açıklanamayan İnfertilite Grubu, N; negatif boyanma, P1; zayıf boyanma, P2; orta boyanma, P3; yoğun boyanma)

### 5.3.7. Post Hoc Power Test Sonuçları

Çalışmamızda, LC3A/B antikoru ile elde ettiğimiz H-skor değerleri üzerinden etki büyüklüğü hesaplandığında, etki büyüklüğü Anova testine göre 0,40 üzerindedir. G-power programında en üst sınır olarak kabul edilen 0,40 etki büyüklüğü değeri altında yapılan Post-Hoc power analiz değeri 0,96 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Tablo 13' de gösterilmiştir.

Tablo 13. Post Hoc Power analiz sonuçları

<b>F tests:</b>	ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way
<b>Analysis:</b>	Post hoc: Compute achieved power
<b>Input:</b>	Effect size f = 0.40
	$\alpha$ err prob = 0.05
	Total sample size = 120
	Number of groups = 4
<b>Output:</b>	Noncentrality parameter $\lambda$ = 19.2000000
	Critical F = 2.6828094
	Numerator df = 3
	Denominator df = 116
	Power (1- $\beta$ err prob) = 0.9643178

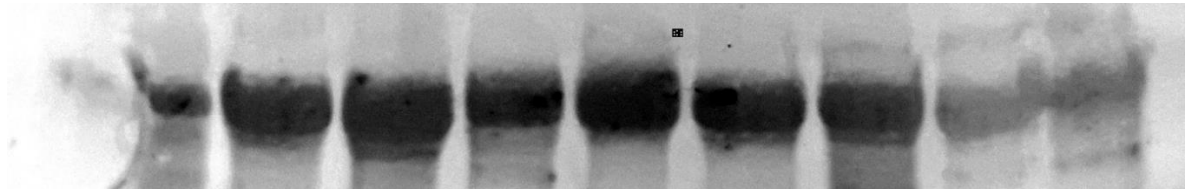
## 5.4. Western Blot Yöntemi ile Bulguların Değerlendirilmesi

### 5.4.1. Beclin-1 bulguları

Spermde Beclin-1 antikoru ile yapılan Western blot analizinden elde edilen bant görüntüleri Resim14’de verilmiştir. Kontrol grubu ile hasta grupları karşılaştırıldığında Beclin-1’in hasta gruplarında ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlendi. Yapılan bant yoğunluğu analizi değerlendirmesinde hasta gruplarındaki Beclin-1 ekspresyonundaki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu belirlendi (Tablo 14,  $p<0.05$ ).

Tablo 14. Gruplara ait 1. Jel Beclin-1 bant yoğunlukları

Gruplar	Alan	Yüzde
Varikosel	53176.472	8.104
Varikosel	96346.032	14.682
Enfeksiyon	105295.404	16.046
Enfeksiyon	77778.383	11.853
Açıklanamayan infertilite	82207.241	12.528
Açıklanamayan infertilite	84052.647	12.809
Açıklanamayan infertilite	84326.392	12.851
Kontrol	25833.848	3.937
Kontrol	39790.701	6.064



Resim 14. Gruplara ait Western blot analizi Beclin-1 bantları (Western blot membranında Beclin-1 için sırayla yüklenmiş olanlar: leader, Varikosel-1, Varikosel-2, Enfeksiyon-1, Enfeksiyon-2, Açıklanamayan infertilite-1, Açıklanamayan infertilite-2, Kontrol-1, K

Aynı membran üzerinde yapılan beta-aktin antikoru ile western blot analizinden elde edilen bant görüntüleri Resim 15’ de, 1. Jel beta-aktin bant yoğunlukları Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. Gruplara ait 1. Jel beta-aktin bant yoğunlukları

Gruplar	Alan	Yüzde
Varikosel	9466.719	6.886
Varikosel	18709.711	13.608
Enfeksiyon	19251.640	14.002
Enfeksiyon	15348.033	11.163
Açıklanamayan infertilite	16295.619	11.852
Açıklanamayan infertilite	16287.560	11.847
Açıklanamayan infertilite	17863.246	12.993
Kontrol	11228.397	8.167
Kontrol	11750.560	8.547



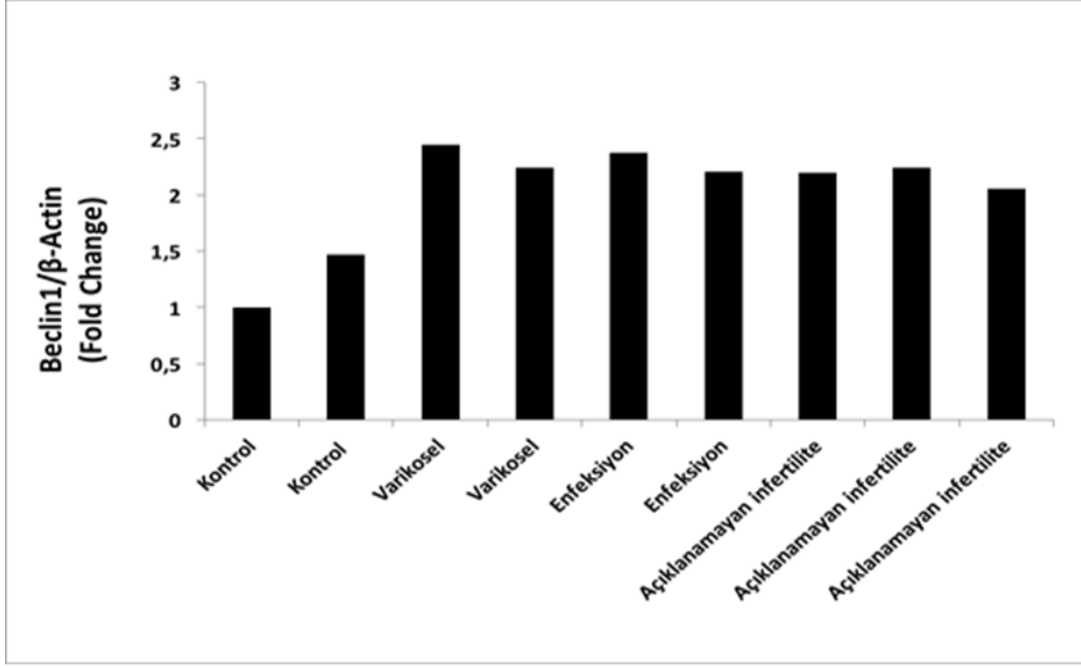
Resim 15. Gruplara ait Western blot analizi 1. Jel Beta-aktin bantları (Western blot membranında beta-aktin için sırayla yüklenmiş olanlar: leader, Varikosel-1, Varikosel-2, Enfeksiyon-1, Enfeksiyon-2, Açıklanamayan infertilite-1, Açıklanamayan infertilite-2, Ko

Her bir örneğe ait Beclin-1/Beta-aktin oranları ile elde edilen ortalama, yüzde ve kat değişim değerleri Tablo 16' de ve Beclin-1 ile beta-aktin oranlanması sonrası görülen kat değişimleri Şekil 18' de verilmiştir.

Tablo 16. Beclin-1/Beta-aktin ortalama yüzde değer ve kat değişim oranları

Beclin1/B-Actin	Oran	% Yüzde	Kat Değişimi
Kontrol	2,300760117	100	1
Kontrol	3,38628125	147,1809783	1,471809783
Varikosel	5,617201905	244,1454832	2,441454832
Varikosel	5,149520054	223,8182075	2,238182075
Enfeksiyon	5,46942515	237,7225296	2,377225296
Enfeksiyon	5,06764502	220,2595995	2,202595995
Açıklanamayan infertilite	5,04474491	219,2642715	2,192642715
Açıklanamayan infertilite	5,160542586	224,2972897	2,242972897
Açıklanamayan infertilite	4,720664542	205,1784759	2,051784759





Şekil 18. Beclin-1 ile beta-aktin oranlanması sonrası görülen kat değişimleri

Beclin-1 antikoru ve Beta-aktin antikoru ile yapılan Western blot analizinden elde edilen ortalama değerler ve standart sapma oranları Tablo 17’ da gösterilmiştir.

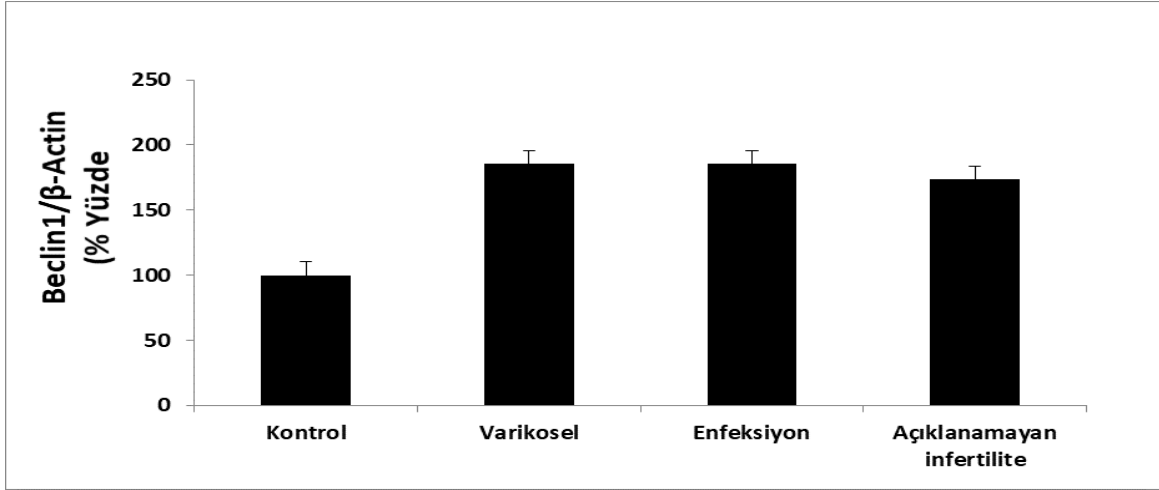
Tablo 17. Beclin-1, Beta-aktin ortalama değer ve standart sapma oranları

<b>Beclin-1</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Standart Sapma</b>
Kontrol	32812,2745	9868,9854
Varikosel	74761,252	30525,48862
Enfeksiyon	91536,8935	19457,47215
Açıklanamayan infertilite	83528,76	1152,624584
<b>Beta aktin</b>	<b>Ortalama</b>	<b>Standart Sapma</b>
Kontrol	11489,4785	369,2249982
Varikosel	14088,215	6535,782322
Enfeksiyon	17299,8365	2760,266981
Açıklanamayan infertilite	16815,475	907,4052503

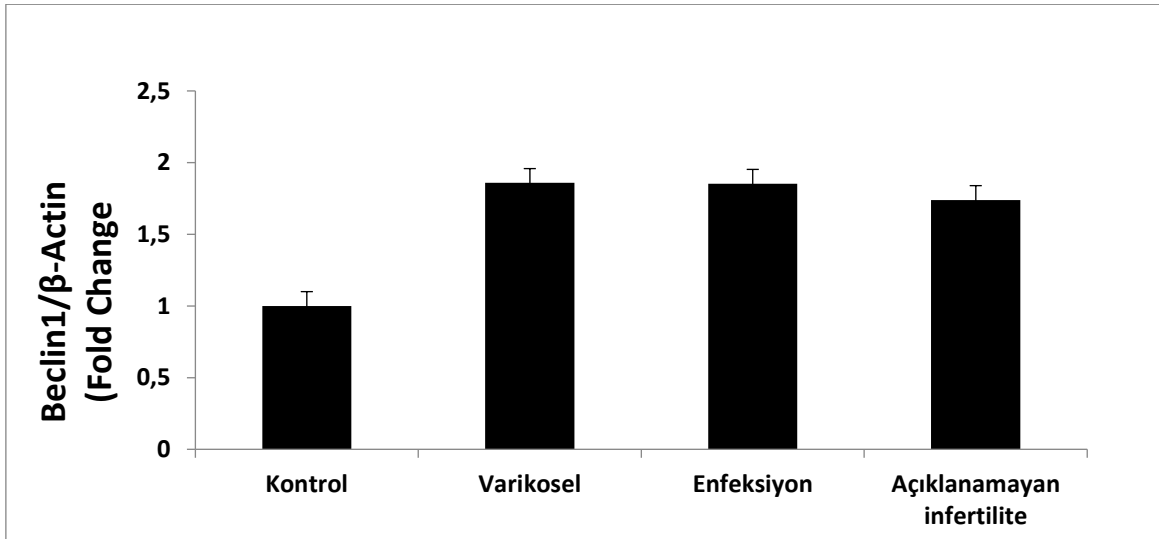
Beclin 1 ile beta aktin oranlanması sonrası görülen ortalama, yüzde ve kat değişim değerleri Tablo 18’ de verilmiştir. Gruplara ait Beclin-1/Beta-aktin oranlanması sonrası belirlenen yüzde değerleri gösteren grafik Şekil 19 ‘da ve gruplara ait Beclin-1/Beta-aktin oranlanması sonrası belirlenen kat değişim değerlerini gösteren grafik Şekil 20 ‘de verilmiştir.

Tablo 18. Beclin-1/Beta-aktin oranının, ortalama, yüzde ve kat değişim değerleri

Beclin1/B-Actin	Ratio	Yüzde (%) ortalama	Kat Değişimi
Kontrol	2,855854119	100	1
Varikosel	5,306651836	185,8166284	1,858166284
Enfeksiyon	5,29119992	185,2755673	1,852755673
Açıklanamayan infertilite	4,967374398	173,9365595	1,739365595



şekil 19. Örneklerin ortalaması ile Beclin 1 - beta aktin oranlanması sonrası belirlenen yüzdeler



şekil 20. Örneklerin ortalaması ile Beclin 1 - beta aktin oranlanması sonrası belirlenen kat değişim değerleri.

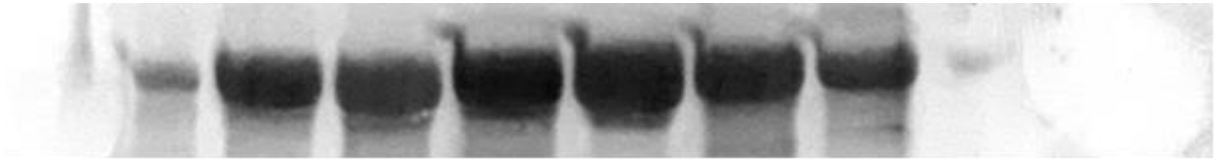
#### 5.4.2. LC3A/B Bulguları

Spermde LC3A/B antikoruna ile yapılan Western blot analizinden elde edilen bant görüntüleri Resim 16'da verilmiştir. Kontrol grubu ile hasta grupları karşılaştırıldığında LC3A/B ifadesinin hasta gruplarında ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlendi. Yapılan

bant yoğunluğu analizi değerlendirmesinde hasta gruplarındaki LC3 ekspresyonundaki artışın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek olduğu gösterilmiştir (Tablo 19,  $p<0.05$ ).

Tablo 19. Gruplara ait 2. Jel LC3A/B bant yoğunlukları

Gruplar	Alan	Yüzde
Varikosel	30843.262	5.780
Varikosel	90361.203	16.934
Enfeksiyon	70961.851	13.299
Enfeksiyon	87187.312	16.340
Açıklanamayan infertilite	81613.614	15.295
Açıklanamayan infertilite	82065.739	15.380
Açıklanamayan infertilite	82629.357	15.485
Kontrol	2506.418	0.470
Kontrol	560.154	0.105



Resim 16. Gruplara ait Western blot analizi LC3A/B bantları (Western blot membranında LC3A/B antikoru için sırayla yüklenmiş olanlar: leader, varikosel-1, varikosel-2, enfeksiyon-1, enfeksiyon-2, açıklanamayan infertilite-1, açıklanamayan infertilite-2, kontrol-

Aynı membran üzerinde yapılan beta-aktin antikoru ile western blot analizinden elde edilen bant görüntüleri Resim 17’ de verilmiştir. Gruplara ait 2. Jel beta-aktin bant yoğunlukları Tablo 20’da ve LC3A/B ile beta-aktin oranlanması sonrası görülen kat değişimleri Şekil 21’ de gösterilmiştir.

Tablo 20. Gruplara ait 2. Jel beta-aktin bant yoğunlukları

Gruplar	Alan	Yüzde
Varikosel	8197.581	7.696
Varikosel	11590.832	10.882
Enfeksiyon	10725.489	10.069
Enfeksiyon	13427.912	12.606
Açıklanamayan infertilite	11399.225	10.702
Açıklanamayan infertilite	14325.267	13.449
Açıklanamayan infertilite	11358.024	10.663
Kontrol	13135.953	12.332
Kontrol	11793.702	11.072

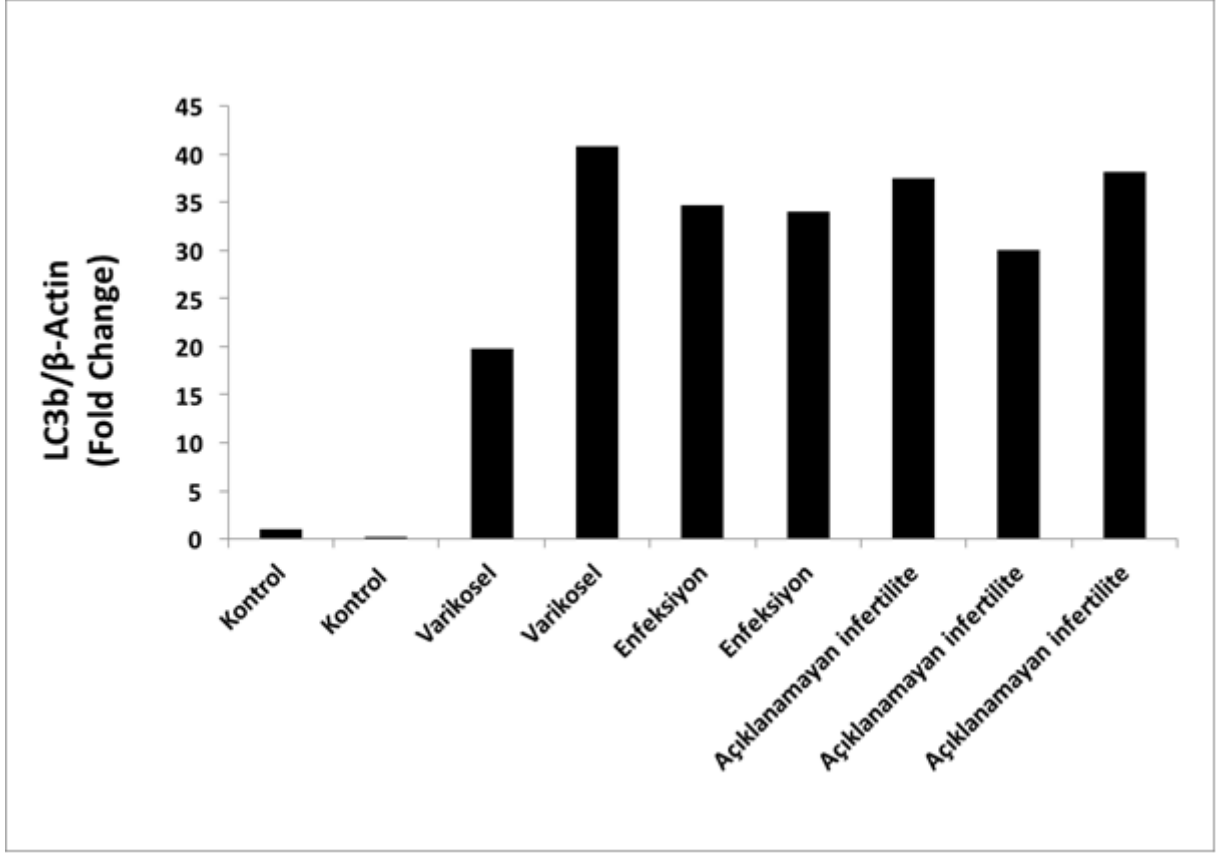


Resim 17. Gruplara ait Western blot analizi 2. Jel Beta-aktin bantları (Western blot membranında beta-aktin için sırayla yüklenmiş olanlar: leader, Varikosel-1, Varikosel-2, Enfeksiyon-1, Enfeksiyon-2, Açıklanamayan infertilite-1, Açıklanamayan infertilite-2, Ko

Her bir örneğe ait LC3b/B-Actin oranları ile elde edilen ortalama, yüzde ve kat değişim değerleri Tablo 21’ de ve LC3b ile beta-aktin oranlanması sonrası görülen kat değişimleri Şekil 21’ de verilmiştir.

Tablo 21. LC3b/B-Actin ortalama yüzde değer ve kat değişim oranları

LC3b/B-Actin	Ratio	% Yüzde	Kat Değişimi
Kontrol	0,190805951	100	1
Kontrol	0,047496028	24,89232008	0,248923201
Varikosel	3,762483347	1971,889941	19,71889941
Varikosel	7,795920345	4085,784703	40,85784703
Enfeksiyon	6,616187943	3467,495599	34,67495599
Enfeksiyon	6,492991018	3402,928994	34,02928994
Açıklanamayan infertilite	7,159575673	3752,281125	37,52281125
Açıklanamayan infertilite	5,728740623	3002,390965	30,02390965
Açıklanamayan infertilite	7,27497644	3812,761821	38,12761821



Şekil 21. LC3A/B ile beta-aktin oranlanması sonrası görülen kat değişimleri

LC3A/B antikor ve Beta-aktin antikor ile yapılan Western blot analizinden elde edilen ortalama değerler ve standart sapma oranları Tablo 22’ de gösterilmiştir.

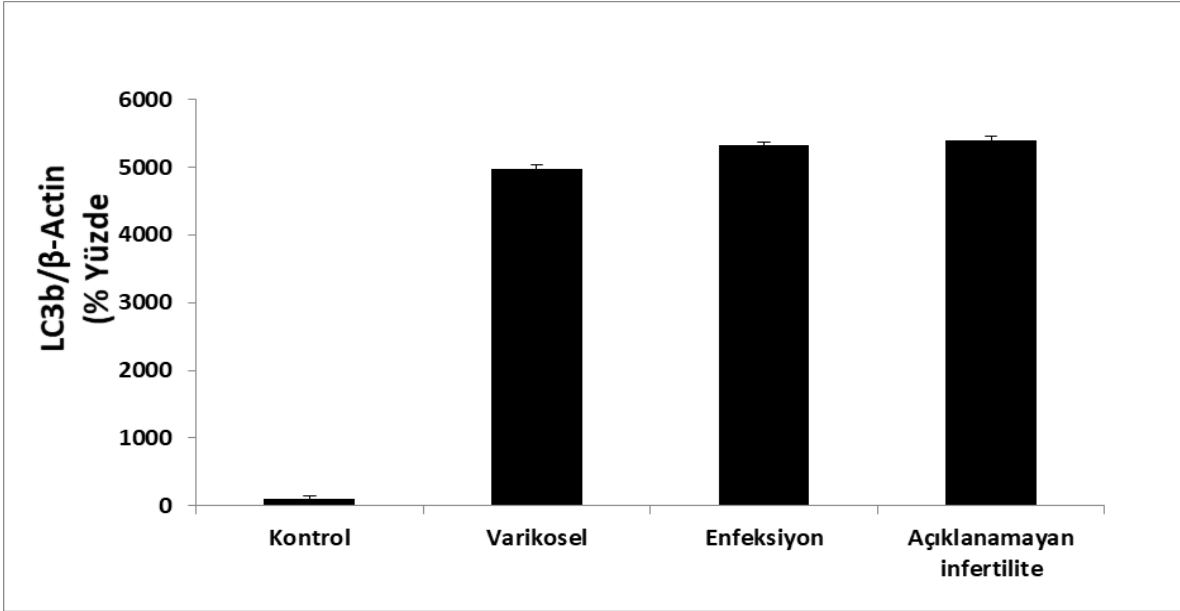
Tablo 22. LC3A/B Beta-aktin ortalama değer ve standart sapma oranları

LC3A/B	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	1533,286	1376,216472
Varikosel	60602,2325	42085,53968
Enfeksiyon	79074,5815	11473,1335
Açıklanamayan infertilite	82102,90333	508,8903136
Beta aktin	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol	12464,8275	949,1147842
Varikosel	9894,2065	2399,390792
Enfeksiyon	12076,7005	1910,901629
Açıklanamayan infertilite	12360,83867	1701,369563

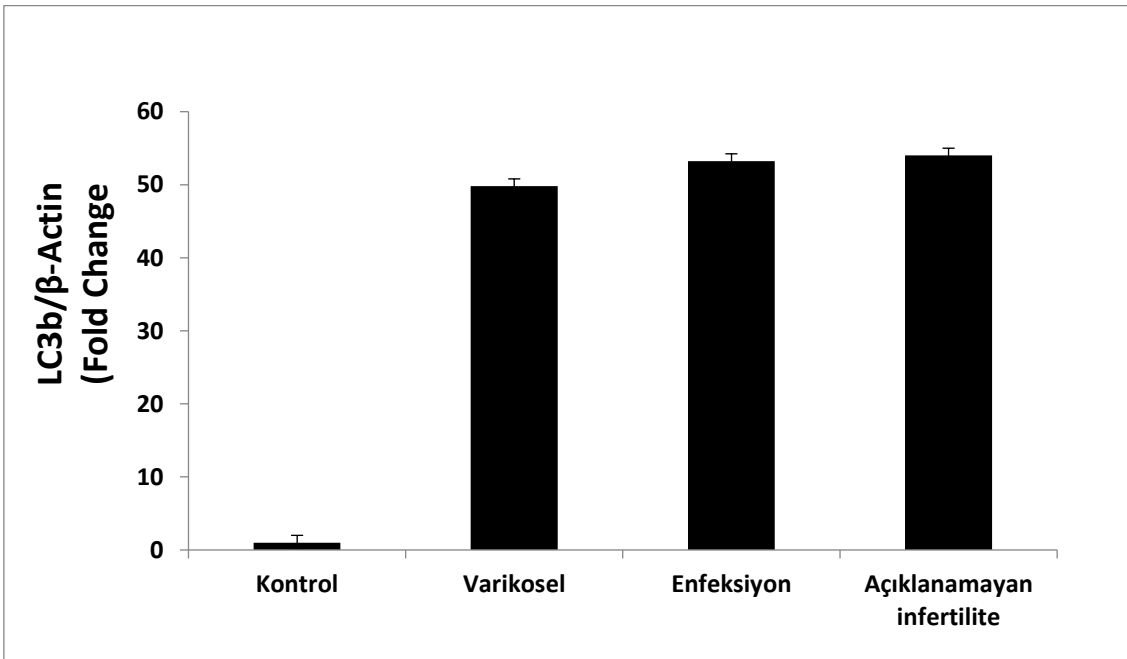
LC3A/B ile beta aktin oranlanması sonrası görülen ortalama, yüzde ve kat değişim değerleri Tablo 23’ de verilmiştir. Gruplara ait LC3A/B /Beta-aktin oranlaması sonrası belirlenen yüzde değerleri gösteren grafik Şekil’ 22 da ve gruplara ait LC3A/B /Beta-aktin oranlaması sonrası belirlenen kat değişim değerlerini gösteren grafik Şekil 23 ‘de verilmiştir.

Tablo 23. LC3AB/Beta-aktin oranının, ortalama, yüzde ve kat değişim değerleri

LC3AB/B-Actin Ortalama	Ratio	Yüzde (%) ortalama	Kat Değişimi
Kontrol	0,123009003	100	1
Varikosel	6,125022002	4979,328232	49,79328232
Enfeksiyon	6,547697486	5322,941687	53,22941687
Açıklanamayan infertilite	6,642179026	5399,750326	53,99750326



Şekil 22. Örneklerin ortalaması ile LC3A/B-beta aktin oranlanması sonrası belirlenen yüzdeler



Şekil 23. Örneklerin ortalaması ile LC3A/B-beta aktin oranlanması sonrası belirlenen kat değişim değerleri

## 5.5. Transmising Elektron Mikroskobu (TEM) ile Değerlendirilmesi

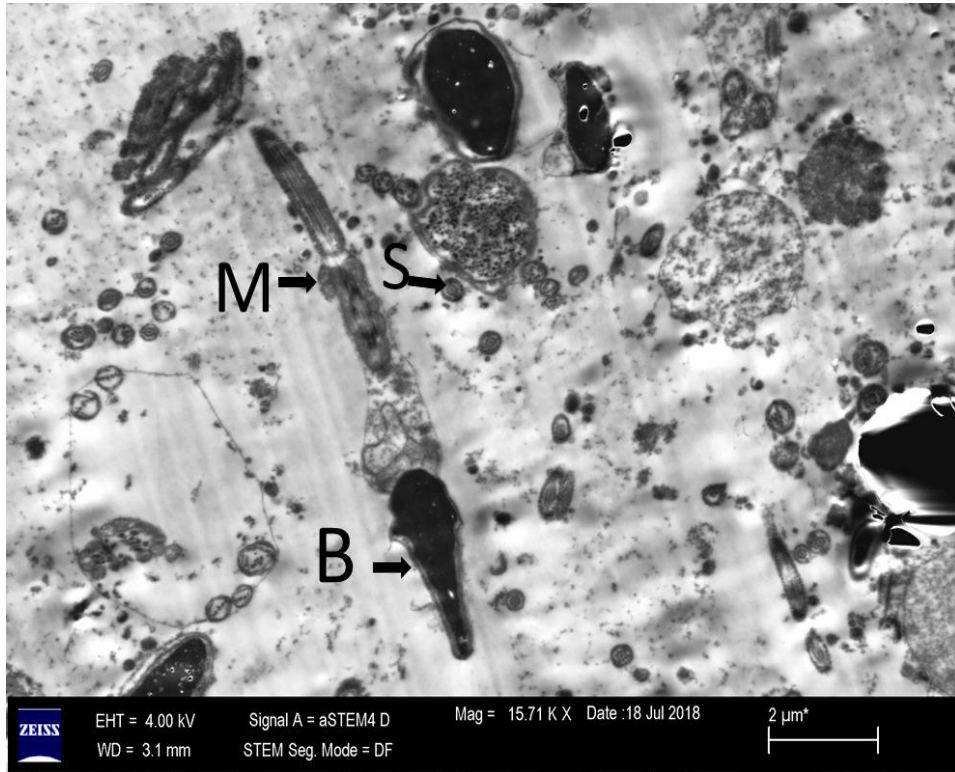
Tüm hasta gruplarında TEM mikroskobu ile sperm yapıları incelendi.

Grup1: Kontrol grubunda; düzenli morfolojiye sahip, sperm baş, akrozom, boyun ve orta kısım bütünlüğü korunmuş spermatozoalar gözlendi (Resim 18).

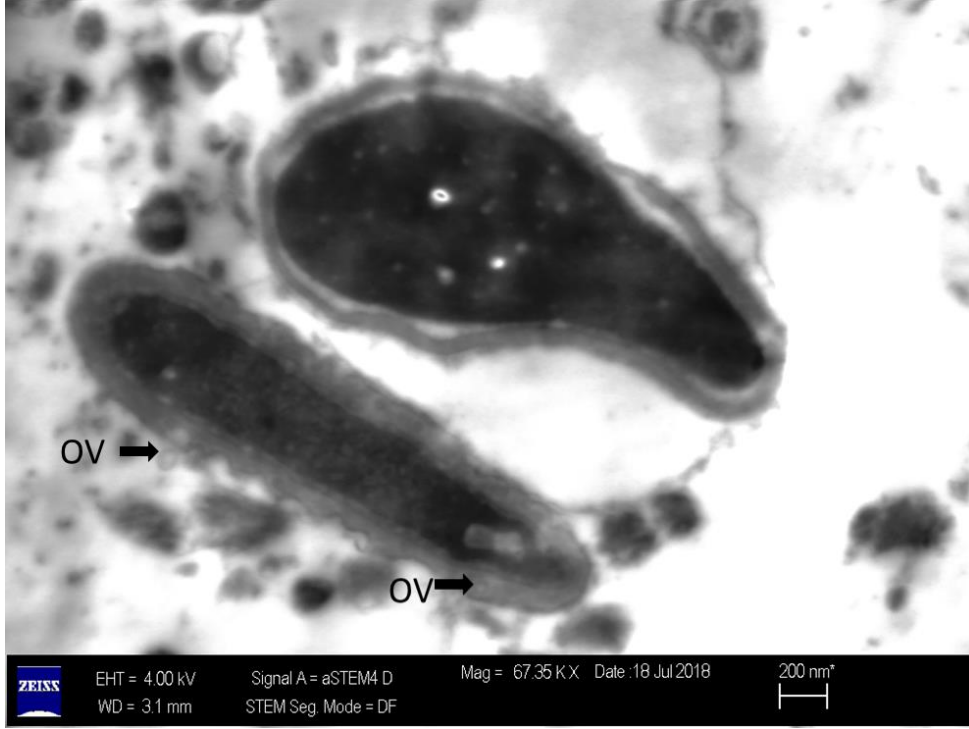
Grup2: Varikozel grubunda, spermatozoaların morfolojik yapılarında bozulmalar gözlendi. Sperm baş, akrozom, boyun ve orta kısım bütünlüğü bozulmuş spermatozoalar çoğunlukta. Yine bu grupta artmış otofajik veziküller özellikle baş ve boyun kısmında yoğunlaşmaktaydı (Resim 19 ve Resim 20).

Grup3: Enfeksiyon grubunda, spermatozoaların morfolojik yapılarında bozulmalar gözlendi. Sperm baş, akrozom, boyun ve orta kısım bütünlüğü bozulmuş spermatozoalar çoğunlukta. Yine bu grupta artmış otofajik veziküller özellikle baş ve boyun kısmında yoğunlaşmaktaydı (Resim 21).

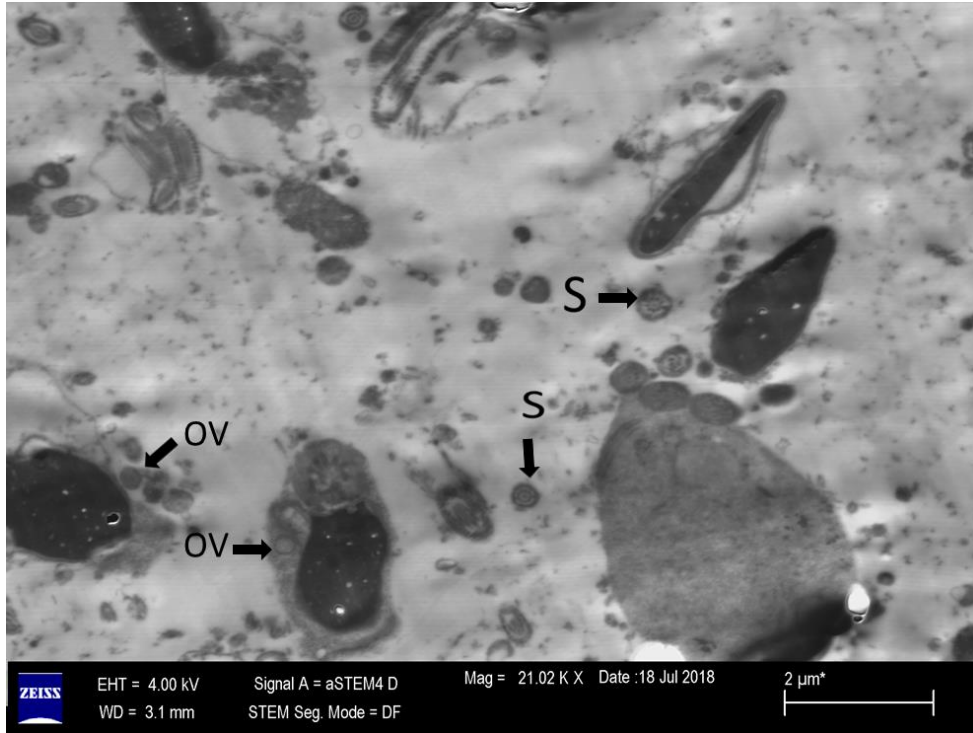
Grup4: Açıklanamayan İnfertilite grubunda, spermatozoaların morfolojik yapılarında bozulmalar gözlendi. Sperm baş, akrozom, boyun ve orta kısım bütünlüğü bozulmuş spermatozoalar çoğunlukta. Yine bu grupta artmış otofajik veziküller özellikle baş ve boyun kısmında yoğunlaşmaktaydı (Resim 22).



Resim 18. Kontrol grubunda düzenli yapıda gözlenen bir spermatozoa (B; Baş, M; Mitokontri, S; Sentriol)

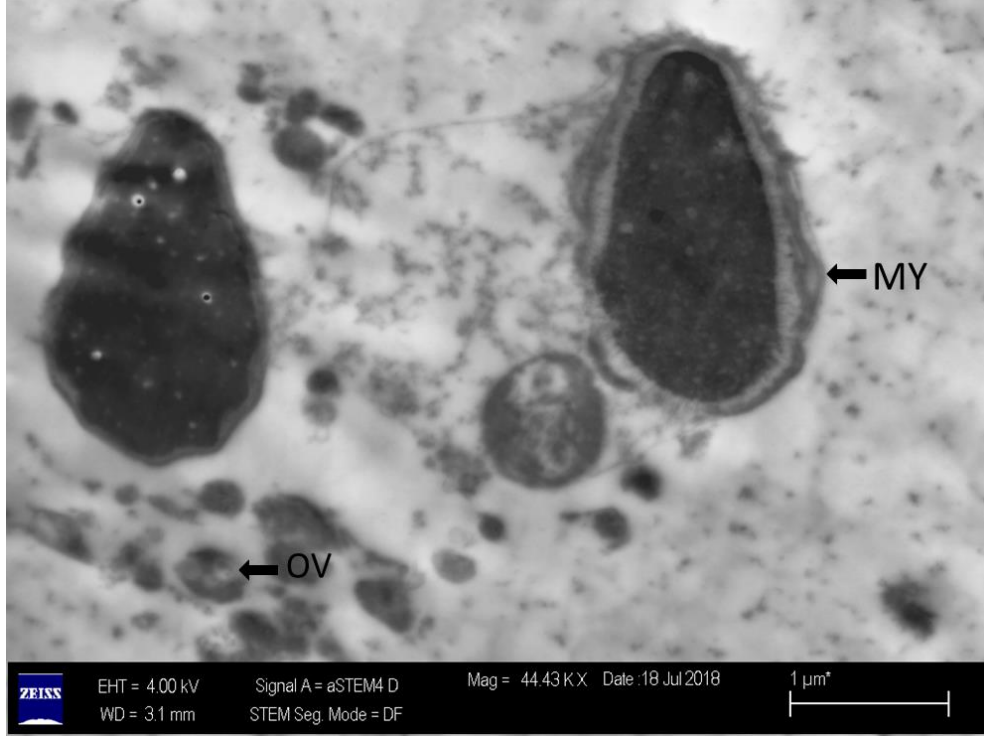


Resim 19. Varikosel grubunda artmış otofagozomal veziküller (OV; Otofagozomal Vezikül)

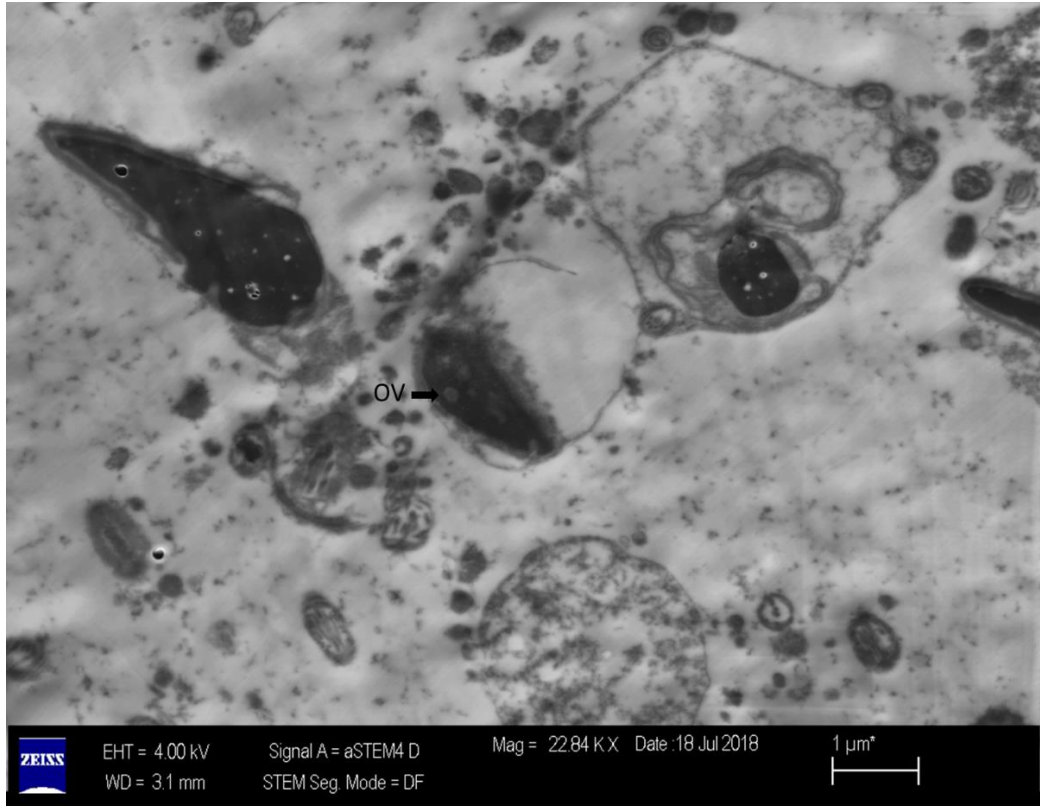


Resim 20. Varikosel grubunda artmış otofagozomal veziküller (S; Sentriol, OV; Otofagozomal Vezikül)





Resim 21. Enfeksiyon grubunda artmış otofagozomal veziküller (OV; Otofagozomal Vezikül, MY; Multilameller yapı)



Resim 22. Açıklanamayan İnfertilite grubunda artmış otofagozomal veziküller (OV; Otofagozomal Vezikül)

## 6. TARTIŞMA

Normal bir süreç olarak spermatogenez üç farklı aşamada ilerler; farklanmamış spermatogoniumların hızlı proliferasyona uğradığı mitotik faz; spermatozoidlerin haploid spermatozoidleri oluşturduğu mayotik faz ve spermatozoidlerin karmaşık bir farklılaşma sürecine girdiği sonuç olarakta olgun spermatozoanın olduğu spermiogenez fazı (Griswold MD, 2016). Spermatogenez sürekli olarak çok sayıda gametin üretimini içeren komplike bir mekanizmadır. İlk olarak, bir canlının üreme ömrü boyunca spermatogonik kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin devamlılığı gerekmektedir. İkinci olarakta, terminal diferansiye spermatozoanın sürekliliğini sağlayabilmek için yüksek düzeyde fonksiyonel organizasyon ve hassas kontrol gereklidir. Ayrıca, spermatogenezin düzgün olarak gerçekleşebilmesi, uzamış formdaki spermatozoidleri tutan sertoli hücrelerinin ektoplazmik bağlantılarına, sertoli-sertoli hücre bağlantılarının oluşturduğu kan-testis bariyerinin (KTB) yapısal bütünlüğüne de bağlıdır (Cheng CY, 2010; Griswold MD, 2016). KTB seminifer tübüleri bazal ve luminal olmak üzere iki kompartmana ayırmaktadır. Bazal kompartman içerisinde, spermatogoniumlar ve genç spermatozoidleri (leptoten, zigoten) barındırırken luminal kompartman ise olgun spermatozoidler (pakiten), spermatozoidler ve spermatozoidleri barındırır (Endo T ve ark,2015). Spermatozoidler sertoli hücrelerinin lümene bakan kısımlarına yerleştikten sonra, haploid hücreler olan spermatozoaya farklılaşırlar ve epididime doğru ilerlemek üzere seminifer tübül lümenine geçerler. Yapılmış birçok çalışma endoplazmik bağlantıların yapısal bütünlüğünün, yeterli sayıda ve kaliteli spermatozoa oluşumu için gerekli düzenleyici bir faktör olduğunu göstermektedir (Smith LB, 2016).

Otofaji hücre içi makromoleküllerin ve organellerin hücre içine çekildikten sonra lizozomlarla birleşerek otofagozom olarak adlandırılan çift zar kesecikleri ile karakterize edilen katabolik bir işlemdir (İzmirli M, 2014). Spermatogenez, büyük oranda enerjiye yani besine ihtiyaç duyulan bir süreç olması sebebi ile açlık, kimyasal kirlilik ve radyasyonun neden olduğu patofizyolojik uyarılara oldukça açık bir mekanizmadır. Bu patofizyolojik koşullar varlığında, otofajik ve apoptotik moleküler mekanizmalar arasında çapraz etkileşim olduğu yapılan daha önceki çalışmalarla bildirilmiştir (Zhang N, ve ark; Gallagher LE, 2016).

Otofajinin spermatogenez üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmalarda, otofaji aktivasyonunun, spermatogonik kök hücrelerin devamlılığında ve spermatogenezin korunmasında düzenleyici bir rol oynadığı gösterilmiştir. Liu ML ve ark. (2015) üreme sistemi

üzerine toksik olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiş bir organofosfat olan tri-orto-kresil fosfatı (TOCP) spermatogenik kök hücre kültür ortamına eklemişler ve LC3-II, LC3-II / LC3-I, ATG5 ve Beclin-1 otofajik belirteçlerinin aktivasyonunu incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda sıçan spermatogenik kök hücrelerinde bu belirteçlerin tümünde artış olduğunu bildirmişlerdir. TEM incelemesinde mitokondri ve endoplazmik retikulumda bozulmalar gözlemlendiği ve sitoplazmada içerisinde yoğun miktarda otofajik vesiküllerin olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli konsantrasyonlarda TOCP eklenerek yapılan bu çalışmada otofajideki artış ve hücre canlılığında azalmaya karşın apoptotik hücrelerin sayısında önemli bir farklılık olmadığı gösterilmiştir. Yine Xu ve ark. (2016) üreme sistemi üzerine toksik etkisi bilinen farklı bir organofosfat (saligenin siklik-o-tolil fosfat) ile spermatogenik kök hücreler üzerine bir çalışma yapmışlar ve bu organofosfatında otofaji aktivasyonunu belirgin şekilde indüklediğini görmüşlerdir. Ayrıca, TEM ile yapmış oldukları ultrastrüktürel incelemede sitoplazma içerisinde otofajik vakuollerin olduğunu doğrulamışlardır. Bu çalışmada kontrol grubuna ait hücreler ile organofosfat eklenen gruptaki hücreler arasındaki apoptoz oranı benzerlik göstermiştir.

Erkek germ hücrelerinin gelişimi ve hayatta kalması seminifer tübülün antioksidan kapasitesine bağlıdır. Glutasyon (GSH) spermatogenik epitelyumun antioksidan savunmasında önemli bir rol oynar. Spermatogenik hücrelerde GSH eksikliğinin otofaji üzerine olası etkilerini inceleyen bir çalışmada, LC3-II ifadesinde ve otofajik veziküllerin birikiminde anlamlı bir artış gözlenirken, AMPK ya da ATP içeriğinin fosforilasyon seviyesinde bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen kolektif bulgular, spermatogenik hücrelerde indüklenen otofajinin, apoptozis-inhibitif aktiviteler ile çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında sitoprotektif bir rol oynadığını göstermektedir (Mancilla H. ve ark,2015).

Erkek üreme sistemi üzerindeki elektromanyetik alana maruz kalmanın DNA hasarı ve otofajiye neden olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Fare spermatositlerinden türetilen hücre hattı ile yapılan bir çalışmada, LC3-II ifadesinde ve LC3-II/LC3-I oranında bir artış gözlenirken, nükleoporin proteini p62' nin ekspresyonunda bir azalma olduğunu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, manyetik alana maruz kalan spermatositlerde ROS' taki artışa bağlı olarak AMPK/mTOR sinyal yolu üzerinden otofajide anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir (Liu K ve ark, 2014). Dondurma-çözdürme gibi spermatozoa üzerinde hasara neden olabilecek stres ortamlarında otofaji mekanizmasının spermatozoa üzerinde koruyucu etkisinin olduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Stres koşullarında LC3-II ifadesindeki artışın sperm

sağ kalımı ve hareketinin korunması ile ilişkili olduğu savunulan çalışmalar mevcuttur (Gallardo ve ark, 2012).

Kaliteli bir spermatozoanın oluşumundaki ana prensip, düzgün olarak gerçekleşen bir spermatogenezisidir. Varikosel, orşit-epididimit gibi rahatsızlıkların neden olduğu anormal spermatogenez, spermatogenik hücrelerin korunmasında görev alan apoptoz mekanizmasında bozulmaya, sertoli hücreleri ile olan endoplazmik bağlantılarında kopukluklara neden olarak, oligospermi, azospermi, astenospermi, kriptorşizim gibi ileri erkek infertilitesine neden olmaktadır (Eskandari M, 2016; Lin CY, 2016). Üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık % 10-15'inde infertiliteye rastlanır. Bu çiftlerinde % 30-40'ında erkek kaynaklı infertilite mevcuttur. (Speroff L ve Fritz MA, 2011). Erkek infertilitesi nedenleri arasında ise en büyük oranı açıklanamayan infertilite (%75,1) oluşturmaktadır. Daha sonra sırası ile varikosel; (%12,6) ve üriner enfeksiyonlar (%6,6) gelmektedir. Günümüzde yapılan birçok kolektif çalışma, infertil erkeklerde fertilitiyi indüklemek veya infertilite tedavileri için alternatif olabilecek potansiyel hedefleri açıklamaya yöneliktir. Son dönemde, spermatogenik kök hücreler, spermatogonium, spermatosit ve spermatozoa dahil olmak üzere, spermatogenik hücreler üzerindeki otofajinin etkilerini ve altta yatan mekanizmalarını fizyolojik ve patofizyolojik koşullar altında göstermeyi hedefleyen çalışmalarda literatüre eklenmektedir (Powell MJ,2011).

Testislerde sıcaklık artışına bağlı olarak hipoksi, oksidatif stres ve abnormal sperm fonksiyonu gibi varikoselin neden olduğu birçok patoloji spermatogenezis sürecinde geri dönüşümsüz hasara neden olabilmektedir. Varikosel süresinin uzaması ile testis yapısında bozulmalar gerçekleşir, seminifer epitelyum tabakası incilir seminifer tübül boyutunda azalma ve lümeninde düzensizlik gözlenir ve lümeninde gözlenen spermatid sayısı varikosel süresi ile doğru orantılı olarak azalır ( Lessene G ve ark, 2008). Bizde yapmış olduğumuz çalışmada grade-2 varikosel teşhisi almış hastaların sperm parametrelerini WHO 2010 kriterlerine göre incelediğimizde, kontrol grubuna kıyasla total ve mililitredeki sperm sayısında anlamlı bir düşüş gözlemledik. Yine aynı şekilde total hareket, ileri hızlı hareket ve yavaş hareket yüzdeleri de kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşmüştü. Kruger kesin kriterlerine göre yapmış olduğumuz morfolojik incelemede normal morfolojiye sahip sperm sayısı kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşüktü. Amorf baş anomalisi kontrol grubuna ve diğer hasta gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksekti. Buda bize grade-2 varikosel rahatsızlığı bulunan bireylerde testislerdeki ısı artışının özellikle akrozom ve baş kısmında hasara neden olduğunu düşündürmektedir. Varikosel, testiküler doku hipoksisine yol açabilir ve hipoksinin derecesi varikosel süresi ile yüksek oranda doğru orantılıdır. Yapılan araştırmalar, hipoksinin varikosele

bağlı oluşan erkek infertilitesi için önemli bir faktör olabileceğini göstermektedir. Hipoksinin önemli bir rolü, BNIP3 gibi bir dizi otofaji ile ilişkili genleri aktive eden HIF-1a' yı indüklemektir. Fizyolojik koşullar altında, Beclin-1 ve Bcl-2, otofaji yolunun aktivasyonunu inhibe eden kompleks bir bileşik oluşturur. Hipoksi koşullarında ise, HIF-1a' nın ekspresyonu, BNIP3'ü önemli ölçüde artırır. BNIP3, Bcl-2 veya Bcl-XL ile reaksiyona girer ve sonunda, Beclin-1 / Bcl-2 kompleks bileşiminden Beclin-1'i serbest bırakacak olan heterodimeri oluşturur. Ardından, serbest kalan Beclin-1 otofaji yolunu aktive eder ( Lessene G ve ark, 2008). Yapmış olduğumuz immunohistokimyasal boyamalar neticesinde Beclin-1 ifadesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını gözlemledik. Hasta grupları arasındada Beclin-1 ifadesi varikozel grubunda anlamlı olarak yüksekti. Bizim çalışmamızda Lessene G ve ark (2008) yapmış olduğu çalışmayı destekler nitelikteydi. Otofaji, hücre içi organellerin ve uzun ömürlü proteinlerin parçalanması ve sonrasında ortaya çıkan hücresel bileşenlerin enerji üretiminde tekrar kullanılmak üzere geri dönüşümünün sağlandığı bir süreçtir (Zhang M ve ark, 2012). Bu yol varikozele bağlı oluşabilecek ısı stresi ile aktive edildiğinde, LC3B-I sitosolik formunun, membrana bağlı bir form olan LC3B-II ye dönüşümünü modifiye eder ve böylelikle ubiquitin-proteozom sistemine benzeyen bir konjugasyon sistemi de aktive edilmiş olur. LC3B-II' nin oluşumu, otofagozomların uygun şekilde gelişimine ve otofajinin doğru bir şekilde gerçekleşmesine yardımcı olur. Ayrıca konjugasyon sistemi ile otofagozom oluşumu, otofaji sürecinin bir belirteci olarak düşünülür (Zhang ve ark, 2012). Çalışmamızda LC3A/B ifadesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksekti buda bize varikozel bağlı oluşabilecek ısı stresinin otofaji mekanizmasını tetiklediği yönünde bilgi vermektedir.

Blackshaw ve Hamilton (1970), asit fosfataz ve amino-peptidaz reaksiyonlarındaki hızlı DNA yıkımı ve değişiminin, sıçanlarda ısı stresine hücresel bir yanıt olarak lizozomlarda gerçekleşen hücre yıkımını işaret ettiğini ileri sürmüşlerdir. Dahası, otofaji apoptosis ile birlikte ya da apoptoz başarısız olduğu durumlarda yedek bir mekanizma olarak da çalışabilmektedir (Durairajanayagam D ve ark, 2015). Otofaji; tetiklenme (indüksiyon) fazı, vezikül nükleasyon (çekirdeklenme) fazı, vezikül uzama fazı, lizozomla birleşme ve yıkım fazı basamaklarından oluşur. Otofajinin oluşumunda bir dizi ATG ürünü bulunmaktadır. Beclin 1, otofaji sürecinin başlatılmasında önemli bir rol oynar. Nükleasyon aşamasında, Beclin1 Vps34 ve UVRAG ile birleşerek sınıf 3 PI3K kompleksini oluşturur. Sınıf 3 PI3K Kompleksi otofaji sürecinde çok önemli olan Fosfatidilinositol 3-fosfatın (PI3P) oluşumunu indükler. LC3II, otofagozom membranının yüzeyinin içinde ve dışında otofagozom seviyesini yansıtan bir biyobelirteç olarak görev yapar. p62, LC3II ile etkileşir ve otofagozom içerisindeki ubiquitin substratlara aracılık

eder. Dahası, kendisi ve substratlar, daha sonra, otofagozomda bozunmaktadır (Zhu SM ve ark,2017).

Zhu SM ve ark (2017) yapmış oldukları bir çalışmada; ratlarda deneysel olarak varikozel modeli oluşturmuş ve kontrol grubu ile HIF-1 $\alpha$ , BNIP3 ve Beclin-1 ve LC3II 'in ekspresyonu western blot yöntemi ile test etmişlerdir. Kontrol grubuna kıyasla varikozel grubunda bu protein ekspresyonlarının arttığını göstermişlerdir. Yapmış olduğumuz western blot analizinde Beclin-1 ve LC3A/B ifadelerindeki artış bu çalışma ile uyumluluk göstermektedir.

Erkek üreme sistemi organları, testisler, epididim ve prostatlarda meydana gelebilecek bir enfeksiyon ve buna bağlı olarak gelişecek olan inflamasyon, spermatogenik hücre serilerinde ve spermatogenezde bozulma, sperm üretiminde azalma ve olgun sperm fonksiyonlarında gözlenebilecek bozukluklar arasında sıkı bir ilişki olduğu düşünülmekteyse de bu konu ile ilgili yapılan çalışmaların yetersiz olması nedeniyle erkek üreme sistemi organlarında görülen enfeksiyonlar ve erkek infertilitesi arasındaki ilişki halen net olarak ortaya konamamıştır. Aslani F ve ark (2017) testis enfeksiyonuna bağlı olarak sertoli hücrelerinin hücre bütünlüğü ve fonksiyonu korunurken spermatogenik seri hücrelerde bozulmaların olduğunu bildirmişlerdir. Bizde çalışmamızda kontrol grubuna kıyasla enfeksiyon grubunda semen parametrelerinde düşüş gözlemledik. Testislerdeki enfeksiyon apoptoz mekanizmasını tetikleyerek Bcl-2 seviyesinde artışa neden olabilmektedir. Bcl-2'nin, Beclin-1 ile ULK1 aktivasyonu ve LC3 lipidasyonundan önceki bir adımda etkileşime girerek otofajiyi inhibe ettiğine dair çalışmalar mevcuttur.

Han Wu ve ark (2017) 4 haftalık, C57BL/6 farelerden izole ettikleri seminifer tüpül epitel hücrelerinden bir hücre kültürü ortamı hazırlamışlardır. Bu kültür ortamını kabakulak virüsü (MuV) ile enfekte ederek testiküler hücrelerde meydana gelebilecek olası değişiklikleri ve otofaji mekanizmasını incelemişlerdir. Yapmış oldukları bu çalışmada; enfekte olan spermatogoniumlarda ve makrofajlarda, Beclin-1 ve LC3' ü yoğun miktarlarda ifade edildiğini gözlenilerek bu hücrelerde otofaji mekanizmasının aktif olarak rol aldığını göstermişlerdir. Bizde çalışmamızda Beclin-1 ifadesinin kontrol grubuna kıyasla enfeksiyon grubunda anlamlı derecede arttığını, MuV ile enfekte hücre ortamına otofajinin bir inhibitörü olan 3-MA'nın eklenmesi ile LC3-II düzeyleri inhibe edilmiştir. LC3-II aktif otofajinin bir göstergesidir (McLeland CB ve ark, 2012). Dikkat çekici bir şekilde, 3-MA'nın varlığı spermatogoniumlarda ve makrofajlarda MuV yayılımını önemli ölçüde artırmıştır. Bu sonuçlar otofajinin bu hücre tiplerinde MuV yayılımını kısıtladığını göstermektedir. Bu çalışmada ayrıca; Beclin-1 ve LC3 ekspresyonu qRT-PCR ile incelenerek araştırılmış ve elde edilen sonuçlara göre, erken dönem

spermatogenik hücrelerin mRNA seviyelerinde Beclin-1 ve LC3 proteinlerinin bol miktarda ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca leyding hücrelerinde ve sertoli hücrelerinde ekspresyon düzeylerinin nisbeten daha düşük olduğu, makrofajlarda ise, Beclin-1 ve LC3 ifadelerinin belirgin olarak daha fazla olduğu bulunmuştur. Western blot ile ayrıca testiküler hücrelerde Beclin-1 ve LC3'ün proteinleri incelenmiş ve çalışma gruplarında tip II LC3 (LC3-II) ifadesinin varlığı bu hücrelerin otofaji mekanizmasına sahip olduklarını düşündürmektedir. Biz de çalışmamızda enfeksiyon grubunda LC3A/B ifadesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını hem IHC olarak hemde westen blot analizleri ile gözlemledik. Çalışmamızda hasta grupları arasında da en yüksek LC3A/B düzeyleri enfeksiyon grubuna aitti ve diğer hasta gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksekti. Ayrıca, Beclin-1 ve LC3 ifadelerinin, makrofajlarda da belirgin bir şekilde saptanması testiküler makrofajların da otofajik makineler ile iyi bir şekilde donatıldığının bir göstergesidir. İmmünohistokimyasal olarak yapılan analizlerde, Beclin-1'in spermatogenik hücre serileri ve interstisyel hücreler içerisinde lokalize olduğunu doğrulamıştır. Daha önceki çalışmalar, otofajinin mikrobiyal enfeksiyonlara karşı hücrel savunmaya da dahil edildiğini göstermiştir. Otofagozomlar, enfekte olan dokudaki virüsleri doğrudan hücre içine alabilir ve bozabilirler (Deretic V, 2011). Otofaji yolağında ifade edilen proteinler ile immün yanıt arasında karşılıklı bir etkileşim olduğu yapılan çalışmalarca gösterilmiştir. Otofajinin immün yanıtta indirekt olarak yer almasının yanı sıra ATG 16 gibi otofaji ifadeleri bazı immün sinyal moleküllerine direkt olarakta bağlanabilmektedirler (Kroemer G ve ark, 2010). İmmün yanıtın oluşumunda, otofaji, ubikuitin-proteozom sistemi ile birlikte çalışmaktadır (Bhoj VG ve Chen ZJ, 2009). Otofaji mekanizması hücre içi patojenlerin doğrudan yok edilmesinde görev yaptığı gibi, özellikle hücre içi parazit antijenlerinin olgunlaştırılmasında da önemli bir rol oynamaktadır (Virgin HW ve Levine B, 2009). Örneğin, otofaji enfekte hücrelerde Strep. pyogenes gibi bakterilerin hücre içinde yok edilmesi için gereklidir (Beron W ve ark, 2002). İmmün yanıt ile ilişkili p47 guanosine trifosfatlar (IRG), hücre içi patojenlere karşı savunmada rol oynar. İnsanda otofaji ile ilişkili bir IRG proteini olan IRGM, otofajiyi uyarmakta ve makrofajlarda bulunan ve bir zatürre etkeni olan mikobakterilerin otofaji yoluyla yok edilmesinde görev almaktadır. (Singh SB ve ark, 2006). Otofaji gen ailesinden olan Atg5 proteini, otofagozom oluşumunda görev almakta bu görevinin yanı sıra, patojenik ajanlara karşı savunmada da aktif bir rol üstlenmektedir. Otofaji sürecinde hücre içi patojenlerin otofajik veziküller tarafından nasıl tanındığı ve vezikül içerisine alındıkları hala tam olarak aydınlatılmamış olsa da bir otofaji reseptörü olan p62 proteininin ve übikuitinleşmenin patojenlerin otofajik zarlar tarafından sarılmasında etkili olduğuna dair veriler mevcuttur (Ponpuak M, 2010). Patojenlerin otofajik zarlar tarafından sarılması ile ilgili

3 yöntem tanımlanabilir. Bunlar; patojenlerin otofaji bağlantılı proteinler tarafından direkt olarak sarılması, içerisinde patojen barındıran endozom veya fagozomların otofagozom zarları tarafından dıştan sarılması ve son olarak içerisinde patojen barındıran endozom veya fagozomların, otofagozomlar ile birleşmesi sıralanabilir (Nakagawa I, 2004). Birçok bakteri için otofaji sürecinin nasıl işlediğine dair moleküler mekanizmalar ayrıntılı olarak tanımlanamamıştır. Otofaji proteinleri, otofaji yolakları ve immün yanıt arasındaki karmaşık bağlantılar henüz netlik kazanamamıştır. Bu nedenle otofaji, enfeksiyon hastalıkları sırasında bilinen tedavi yöntemlerinin yanı sıra alternatif tedavi yöntemleri için de araştırmacıların ilgi odağı durumundadır.

Açıklanamayan erkek infertilitesinin tam olarak etiyojisi bilinmemekle birlikte, bazı kimyasallara maruz kalma, ağır metaller, pestisitler, elektromanyetik radyasyon, sigara, alkol kullanımı, kronik stres ve erkek üreme sisteminde görülen enfeksiyonlar gibi birçok çevresel etkene bağlanmaktadır (Agarwal A ve ark, 2009) Bu faktörlerin çoğu da sonunda oksidatif strese neden olurlar. Ortaya çıkan çok sayıdaki serbest radikaller, sperm sayısında ve motilitesinde azalmaya ve anormal sperm morfolojisinin gelişmesine yol açabilen patolojik bir cevap oluştururlar (Walczak JR ve ark, 2013). Yapmış olduğumuz çalışmada açıklanamayan erkek infertilite grubunda kontrol grubuna kıyasla azalmış sperm sayısı ve motilitesi gözlemledik. Normal morfolojiye sahip sperm sayısı kontrol grubuna kıyasla dramatik olarak azalmıştı. Sperm parametrelerindeki bu düşüşe ROS birikiminin etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Otofaji mekanizmasında ROS, otofagozom oluşumunda önemli bir rol oynayan Atg4 proteini üzerinden mekanizmaya dahil olmaktadır. ATG4 proteini LC3 proteininin LC3-I formuna olgunlaşmasında ve LC3' ün tekrar tekrar kullanılabilmesi için görevini tamamladıktan sonra yağdan kopararak tekrar kullanıma uygun hale getirilmesinde görev almaktadır. ROS ile Atg4 regülasyonu, Atg4' ün katalitik bölgesindeki sistein amino asitini oksidasyonu ile gerçekleşmektedir. Böylelikle inaktive olan Atg4 otofagozom oluşumunu baskılanmaktadır (Scherz SR ve ark,2007). Otofajinin, enzimatik bir ROS temizleyici olan katalazın bozulmasına yol açtığı bilinmektedir. Hücrede ortaya çıkan ROS birikimi, zar peroksidasyonuna, zar bütünlüğünün kaybına ve sonuçta hücre ölümüne yol açar. Otofaji tarafından katalaz yıkımı ve ROS birikiminin, bu sistemde otofaji tarafında hücre ölümüne katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Yu L ve ark, 2006). Yapmış olduğumuz çalışmada açıklanamayan erkek infertilitesi grubunda kontrol grubuna kıyasla tüm otofaji ifadelerinde artış gözlenmiştir. ROS otofaji ile bağlantılı olarak hücre ölüm ya da hayatta kalmasını değişik düzeylerde regüle eden bir sinyal molekülüdür (Yu L ve ark, 2004). Çalışmamızda



gözlemlediğimiz bu artışın açıklanamayan erkek infertilitesinde meydana gelebilecek oksidatif strese bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Özellikle, hasta grupları kendi aralarında kıyaslandığında, ATG5 ve ATG16 ifadeleri en yüksek açıklanamayan infertilite grubunda gözlenmiştir. Atg5, Atg12 ile bir dimer oluşturarak Atg16 ile bağlanmakta ve otofajik izolasyon zarının oluşumunda rol oynamaktadır. Çekirdeği meydana gelmiş olan otofagazom membranının uzaması ve akabinde bir kese halini alması iki übikitinlenme benzeri sistem tarafından kontrol edilmektedir. İkinci ubikitin sisteminin başlatılabilmesi için Atg5, Atg12, Atg16 kompleksinin oluşmuş olması gerekmektedir. Bu kompleks oluşuktan sonra LC3 formu LC3-1 ve akabinde LC3-II formunu oluşturabilmektedir (Qu X ve ark, 2003). Ortamda bafilomisin A1 varlığında ultrastrüktürel olarak yapılan incelemerde sperm baş ve boyun bölgesinde otofagozom ve otolizozomlara karşılık gelen veziküler yapılar olduğu gösterilmiştir (Pajak B ve ark, 2012). Yine başka bir çalışmada, akrozomda, otofajik vakuol içerisinde lizozomal degradasyona karşı selektif direnç meydana geldiğinde oluşan çoklu lamel gövdelere (MLB) benzer yapılar olduğu gösterilmiştir (Aparicio IM ve ark, 2016).

Bizde çalışmamızda her bir gruba ait sperm örneklerini ultrasitruktürel olarak inceledik. Kontrol grubuna ait örneklerde, sperm bütünlüğünün korunduğunu morfolojik yapının düzgün olduğu gözlemledik. Varikozel grubuna ait örneklerde, özellikle amorf baş yapısına sahip spermiler çoğunlukta idi. Özellikle baş kısmında otofagozomal veziküller olduğu düşünülen veziküler kesecikler bulunmaktaydı. Enfeksiyon grubuna ait örneklerde de yine amorf baş ve akrozomal anomaliler gözlenmekteydi. Boyun bölgesinde ise otofagozomal veziküller olduğunu düşündüğümüz yapılar mevcuttu. Açıklanamayan infertilite grubuna ait örneklerde yine diğer hasta gruplarına benzer yapılar gözlenmekteydi.

İlerleyen çalışmalarda otofaji yollarının daha ayrıntılı olarak incelenmesi, farklı otofaji belirteçlerinin RT q-PCR gibi moleküler yöntemlerle de incelenerek desteklenmesi otofaji mekanizması ile diğer programlı ölüm mekanizmalarının erkek infertilitesinde birbiri ile ilişkilerinin karşılaştırılmalı olarak incelenmesi erkek infertilitesi ile otofaji ilişkisine daha çok açıklık getirecek olup yeni teşhis ve tedavi yöntemlerinin önünü açacaktır.

## 7. SONUÇ ve ÖNERİLER

Biz bu çalışmada fertil erkeklerin sperm parametreleri ile fertil erkek spermelerinde işlevsel olarak bulunduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olan otofajik belirteçlerdeki olası değişiklikleri farklı temele dayalı infertilite sorunu bulunan hasta grupları ile karşılaştırmalı olarak incelemeyi amaçladık. Yapmış olduğumuz bu çalışmamın sonucunda fertil erkekler ile infertilite sorunu bulunan bireyler arasında; sperm sayısı, hareketli ve hareketsiz sperm oranları arasında anlamlı farklılıklar bulduk. Krugerin kesin kriterlerine göre sperm morfolojilerini değerlendirdiğimizde normal morfolojiye sahip sperm oranının kontrol grubunda diğer hasta gruplarına oranla anlamlı derecede yüksek olduğunu bulduk. En önemli erkek infertilitesi nedenleri olarak karşımıza çıkan varikozel, orşit-epididimit ve açıklanamayan infertilite olgularında sperm parametrelerinde önemli ölçüde düşüş olduğunu gözlemledik. Yapmış olduğumuz immünohistokimyasal boyamalar sonucu elde ettiğimiz verilerde tüm otofaji belirteçlerinin hasta gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını gözlemledik. Bu sonuçlarda bize varikozel, orşit-epididimit gibi erkek infertilitesinin temelini oluşturan sağlık sorunlarının otofaji mekanizmasında değişikliklere neden olabileceğini göstermiştir. Ayrıca yapılan tüm araştırmalara rağmen nedeni bulunamamış erkek infertilitesi vakalarında da otofaji belirteçlerindeki bu artış açıklanamayan infertilite olguları için geliştirilecek olan teşhis ve tedavi yöntemlerinde yeni bir umut ışığı olacaktır. Elde ettiğimiz sonuçlar ışığı altında spermde işlevsel olarak görev alan otofaji mekanizmalarının infertil bireylere ait spermelerin morfolojisinde, hareket kabiliyetinde oluşturmuş olduğu bozulmaların, spermelerin gerçekleştirmiş olduğu akrozom reaksiyonu, kapasitasyon gibi moleküler mekanizmaları üzerinden etkilerinin olabileceği gerçeği her zaman göz önünde bulundurulmalıdır. Bu mekanizmalar üzerine otofajik sürecin etkilerinin açığa çıkarılması bu mekanizmanın kullanılacağı yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasının önünü açacağı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Abid S, Maitra A, Meherji P, Patel Z, Kadam S, Shah J, Shah R, Kulkarni V, Baburao V.** Jyotsna Gokral Clinical and laboratory evaluation of idiopathic male infertility in a secondary referral center in India. *J Clin Lab Anal* 2008; 22:29–38.
- Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, Sabanegh E.** Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology*. 2009;73: 461–469
- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B.** Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 1999, 59: 59-65
- Aktan G, S. Doğru-Abbasoğlu, C. Küçükgergin, A. Kadioğlu, G. Ozdemirler-Erata, and N. Koçak-Toker,** “Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk?” *Fertility and Sterility*, vol. 99, no. 5, pp. 2013. 1211–1215.
- Aparicio IM, Espino J, Bejarano I, Gallardo-Soler A, Campo ML, Salido GM, Pariente JA, Peña FJ, Tapia JA.** Autophagy-related proteins are functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility. *Scientific Reports* volume 6, Article number: 33647 (2016).
- Arslan DÖ, Korkmaz G, Gözüaçık D.** Otofaji: Bir Hücresel Stres Yanıtı ve Ölüm Mekanizması. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2011, 2: 184-194.
- Atan A, Aslan Y, Tuncel A, Güzel Ö.** Varikoselde güncel görüşler, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, S:180-184  
[www.journalagent.com/androloji/pdfs/AND\\_2013\\_54\\_180\\_184.pdf](http://www.journalagent.com/androloji/pdfs/AND_2013_54_180_184.pdf) Erişim Tarihi: 05.03.2018.
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Mazure MN.** Hypoxia-induced autophagy is mediated through Hypoxia-Inducible Factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol. Cell Biol*. 2009; 29: 2570-2581. 23.
- Bento C, Renna M, Ghislat G.** Mammalian autophagy: how does it work? *Annu. Rev. Biochem.* 2016, 85: 685–713.
- Beron, W, Gutierrez MG, Rabinovitch M.** *Coxiella burnetii* localizes in a Rab7-labeled compartment with autophagic characteristics. *Infect Immun*. 2002; 70: 5816–5821.

- Berruti G, Paiardi C.** The dynamic of the apical ectoplasmic specialization between spermatids and Sertoli cells: the case of the small GTPase Rap1. *Biomed Res Int.* 2014;1-11.
- Bhoj VG, and Chen ZJ.** Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 2009; 458:430-437.
- Blackshaw AW ve Hamilton D.** The Effect of Heat on Hydrolytic Enzymes and Spermatogenesis in the Rat Testis. *The Journal of the Society for Reproduction and Fertility.* (1970). 22, 569-571.
- Carew JS, Kelly KR, Nawrocki ST.** Autophagy as a target for cancer therapy: new developments. *Cancer Management and Research*, 2012, 4: 357-365.
- Carew JS, Nawrocki ST, Cleveland JL.** Modulating Autophagy for Therapeutic Benefit Volume 3, 2007 - Issue 5 p: 464-467.
- Chen Y, Klionsky DJ.** The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci.* 124 (Pt 2): 2011. p. 161-70.
- Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB.** Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 171-182.
- Cheng CY, Wong EW, Yan HH, Mruk DD.** Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 315 (1–2): 49–56.
- Cocuzza M, Agarwal A.** Nonsurgical treatment of male infertility: specific and empiric therapy. *Biologics* 2007; 1: 259.
- Çelik Ö.** Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik Ve Embriyolojik Uygulamalar, Nobel Kitabevi, 2011, Adana.
- Çiçek M.N.** Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite, Palme yayıncılık, Ankara. (2008).
- Çolgar U ve Arıcı A.** Reprodüktif endokrinoloji ve infertilite. İstanbul Medikal Yayıncılık. 2006.
- Davis S, Wang J, Ferro-Novick S.** Crosstalk between the secretory and autophagy pathways regulates autophagosome formation. *Dev. Cell.* 2017, 41: 23-32.

- De Bruin EC, Medema JP.** Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* 2008; 34: 737-49.
- Delilbaşı L.** *İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008; s: 61-83.
- Deretic V.** Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr Opin Immunol.* 2012, 24:21-31.
- Deretic V.** Autophagy in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2005; 26: 523–528.
- Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M.** A “quickscore” for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas, *Journal of clinical pathology*, 1995, 48(9), 876-878.
- Diao JJ, Liu R, Rong YG.** ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature.* 2015, 520: 563-566.
- Dik P, Lock TM, Schrier BP, Zeijlemaker BY, Boon TA.** Transurethral marsupialization of a medial prostatic cyst with prostatitis-like symptoms. *J Urol* 1996;155:1301-4
- Dikic I, Elazar Z.** Mechanism and medical implications of mammalian autophagy, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2018, 19: 349–364.
- Doğan E.** İnfertil çiftin araştırılmasında tanısal yöntemler. *Üreme Endokrinolojisi Teknikleri ve Cerrahisi. Üreme Tıbbı Derneği Kitabı* 2011; s:362-363.
- Doshi SB, Khullar K, Sharma RK, Agarwal A.** Role of reactive nitrogen species in male infertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2012; 10:109
- Dousset B, Hussenet F, Daudin M, Bujan L, Foliguet B, Nabet P.** Seminal cytokine concentrations (IL-1beta, IL-2, IL-6, sRIL-2, sR IL-6), semen parameters and blood hormonal status in male infertility. *Hum Reprod* 1997Jul; 12(7):1476-9.
- Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C.** Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress, *Reproductive BioMedicine Online*, 2015, 30, 14–27.
- Endo T, Romer KA, Anderson EL, Baltus AE, de Rooij DG, Page DC.** Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(18):E2347–E2356.
- Eskandari M, Ghalyanchi Langeroudi A, Zeighami H, Rostami A, Kazemi M, Eyni H, Shokri S.** Co-administration of ginseng and ciprofloxacin ameliorates epididymo orchitis

induced alterations in sperm quality and spermatogenic cells apoptosis following infection in rats. *Andrologia* 2016;0.1111/and.12621.

**Famurewa AC, Ugwuja EI.** Association of Blood and Seminal Plasma Cadmium and Lead Levels With Semen Quality in Non-Occupationally Exposed Infertile Men in Abakaliki, South East Nigeria. *J Family Reprod Health.* 2017 Jun; 11(2): 97–103.

**Fawcett DW.** The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology.*1975: 44(2). p: 394-436

**Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, Lenzi A, Foresta C.** Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007; 92(3): 762-70.

**Gallagher LE, Williamson LE, Chan EY.** Advances in autophagy regulatory mechanisms. *Cells* 2016; 5(2):1–30.

**Ge L, Melville D, Zhang M.** The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *eLife.* 2013, 2: e00947.

**Gökçe A.** Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre standart semen analizi. *Türk Ürol Sem;* 2011, 2:1-7

**Gözükara KH, Görür S.** Ürogenital enfeksiyonlar ve erkek infertilitesi. *Androloji Bülteni.* 2015; 17(60): 43-48

**Grabe M, Bartoletti R, Bjerklund Johansen TE.** Guidelines on urological infections. European Association of Urology,2015 [www.uroweb.org/gls/pdf/19%20Urological%20infections\\_LR.pdf](http://www.uroweb.org/gls/pdf/19%20Urological%20infections_LR.pdf) Erişim Tarihi: 05.06.2018.

**Griffin JE.** Androgen resistance-the clinical and molecular spectrum. *New England Journal of Medicine* 1992; 326(9): 611-8.

**Griswold MD.** Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiol Rev.* 2016; 96(1):1–17.

**Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT.** Obesity and male reproductive potential. *Journal of andrology* 2006; 27(5): 619-26.

**Han Wu, Xiang Z, Fei W, Qian J, Lili S, Maolei G, Weihua L, Bo G, Chengyi S, Qihan L, Yongmei C, Daishu H.** Mouse Testicular cell Type-specific antiviral response against Mumps Virus replication 2017 *Front. Immunol.* 8.117

**Honscheid P, Datta K, Muders MH.** Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response. *Int J Radiat Biol.* 90(8): p. 628-35,2014

**Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda M, Ohsumi Y.** A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 2000. 408(6811): 488-92. 66.

**İzmirli M, Ecevit H, Göğebakan B.** Autophagy to Survive, *Archives Medical Review Journal.* 2014; 23(3): 411-419

**Jangueria LC, Carneiro J, Kelley OR.** Temel histoloji (Çev: Aytekin Y., Solakoğlu S., Ahışalı B.), Barış kitabevi, 2006. s: 407-419, 431-433.

**Jangueria LC, Carneiro J.** Temel histoloji Text&Atlas (Çev: Aytekin Y., Solakoğlu S., Ahışalı B.), Nobel kitabevi, 2003. s: 431

**Karakeçi A, Fırdolaş F, Orhan İ.** Ejakülator kanal obstrüksiyonlarında tanı ve cerrahi yöntemler, *Erkek Üreme Sağlığı, Elazığ Harput Devlet Hastanesi Üroloji Kliniği, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Elazığ* [https://www.journalagent.com/androloji/pdfs/AND\\_2014\\_56\\_31\\_37.pdf](https://www.journalagent.com/androloji/pdfs/AND_2014_56_31_37.pdf) Erişim Tarihi: 05.27.2018.

**Karanasios E, Walker SA, Okkenhaug H.** Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nat. Commun.* 2016, 7: 12420.

**Kierszenbaum AL.** Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş, Palme Yayıncılık, Ankara, (Çeviri Editörü: Demir R.) 2006. S: 672-683.

**Kişnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Öneroğlu LS.** Erkeğe bağlı infertilite, *Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi.* Ed. Ankara: Güneş, 1996.s 1119-1129,1287.

**Klionsky DJ, Emr SD.** Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *NIH Public Access* 2000;Dec. 290(5497): 1717-1721.

**Ko EY, Siddiqi K, Brannigan RE, Sabanegh Jr ES.** Empirical medical therapy for idiopathic male infertility: a survey of the American Urological Association. *J Urol.* 2012 Mar;187(3):973–8.

- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Warabi E, Uwayama T, Ezaki J, Ueno T, Hara T, Sou Y.** Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 2007; Dec. 14:131(6):1149-1163.
- Kraft C, Martens S.** Mechanisms and regulation of autophagosome formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012, 24: 496-501. 36.
- Kroemer G, Marino G and Levine B.** Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* 2010;40: 280–293.
- Kroemer G, Marino G, Levine B.** Autophagy and integrated stress response. *Mol Cell* 2010;40(2):280-293.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta FJ, Oehninger S.** Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization, *Fertil Steril*, 1988, 49:112-117
- Kruger TF, Menkveld R., Stander FS., Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA.** Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization, *Fertil Steril*, (1986). 46:1118-1123
- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA.** The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013, 14: 759-774.
- Lessene G, Czabotar PE, Colman PM.** BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008, 7: 989-1000.
- Levine B, Yuan J.** Autophagy in cell death: an innocent convict? *Clinical Investigation*. Oct. 2005,115:10
- Li L, Chen Y, Gibson SB.** Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cellular Sign.* 2013, 25(1):50-65
- Li Z, Li Y, Zhou X, Dai P, Li C.** Autophagy involved in the activation of the Nrf2-antioxidant system in testes of heat-exposed mice. *Journal of Thermal Bio.* 2018; 71(7): 142-152
- Liew SH, Meachem SJ, Hedger MP.** A stereological analysis of the response of spermatogenesis to an acute inflammatory episode in adult rats. *J Androl* 2007; 28(1): 176–85
- Lin CY, Chen CY, Yu CH, Yu IS, Lin SR, Wu JT, Lin YH, Kuo PL, Wu JC, Lin SW.** Human X-linked intellectual disability factor CUL4B is required for post-meiotic sperm development and male fertility. *Sci Rep* 2016; 6:1–17.



- Liu K, Zhang G, Wang Z, Liu Y, Dong J, Dong X, Liu J, Cao J, Ao L, Zhang S.** The protective effect of autophagy on mouse spermatocyte derived cells exposure to 1800MHz radiofrequency electromagnetic radiation. *Toxicol Lett* 2014; 228(3):216–224
- Liu ML, Wang JL, Wei J, Xu LL, Yu M, Liu XM, Ruan WL, Chen JX.** Tri-ortho-cresyl phosphate induces autophagy of rat spermatogonial stem cells. *Reproduction* 2015; 149(2):163–170.
- Longatti A, Lamb CA, Razi M.** TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11 and recycling endosomes. *J. Cell Biol.* 2012, 197: 659-75.
- Ludwig M, Vidal A, Huwe P, Diemer T, Pabst W.** Significance of inflammation on standard semen analysis in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Andrologia* 2003; 35(3):152–6.
- Mancilla H, Maldonado R, Cereceda K, Villarroel-Espindola F, Montes de Oca M, Angulo C, Castro MA, Slebe JC, Vera JC, Lavandero S, Concha II.** Glutathione depletion induces spermatogonial cell autophagy. *J Cell Biochem* 2015; 116(10):2283–2292.
- Mazières J, Brugger W, Cappuzzo F, Middel P, Frosch A, Bara I, Klingelschmitt G, Klughammer BA.** Evaluation of the EGFR protein expression by immunohistochemistry using H-score and the magnification rule: re-analysis of the SATURN study, *Lung Cancer*, November 2013, 82(2), 231-237.
- McLeland CB, Rodriguez J, Stern ST.** Autophagy monitoring assay: qualitative analysis of MAP LC3-I to II conversion by immunoblot. *Methods Mol Biol.* 2011, 697:199-206.
- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P.** Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research* 2010; 20: 748-762.
- Mizushima N, Komatsu M.** Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011,147: 728-741.
- Moore KM, Persaud TVN.** Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi. (Eds, Yıldırım M.) İkinci baskı. Nobel Tıp Kitabevi, 2002. S:323- 325.
- Nailwal M, Chauhan JB.** Azoospermia factor C subregion of the Y chromosome. Chauhan Department of Genetics, Ashok and Rita Patel Institute of Integrated Study and Research in Biotechnology and Allied Sciences, Anand, Gujarat, India 2017,10:4 P: 256-260.

- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, et al.** Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*. 2004; 306:1037–1040.
- Nakamura S, Yoshimori T.** New insights into autophagosome–lysosome fusion. *J. Cell Sci*. 2017, 1209-1216.
- Noda T.** Regulation of autophagy through TORC1 and mTORC, *biomolecules*. 2017, 7(3): 52.
- Ohsumi Y.** Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:211-6.
- Ovalle WK ve Nahirney PC.** Temel histoloji (Netter). Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2009
- Öber A, Turgay G.** Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara 2006.
- Pajak B, Kania E, Gajkowska B, Orzechowski A.** Verapamil-induced autophagy-like process in colon adenocarcinoma COLO 205 cells; the ultrastructural studies. *Pharmacol Rep* 2012, 64, 991-996.
- Papandreou ME, Tavernarakis N,** *Biotechnol J*. [Epubahead of print]. Autophagy and the endo/exosomal pathways in health and disease, 2016 Dec 15, doi: 10.1002/biot.201600175.
- Papinski D, Schuschnig M, Reiter, W, Wilhelm L, Barnes C. A, Maiolica A, Hansmann I, Pfaffenwimmer T, Kijanska M, Stoffel I, SikLee S, Brezovich A, HuaLou J, Turk B E, Aebersold R, Ammerer G, Peter M, Kraft C.** Early Steps In Autophagy Depend On Direct Phosphorylation Of Atg9 by The Atg1 Kinase. *Molecular Cell*, 2014; 53(3), 471–483.
- Ponpuak, M, Davis AS, Roberts EA, et al.** Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity*. 2010;32: 329–341.
- Powell MJ, Casimiro MC, Cordon-Cardo C, He X, Yeow WS, Wang C, McCue PA, McBurney MW, Pestell RG.** Disruption of a Sirt1-dependent autophagy checkpoint in the prostate results in prostatic intraepithelial neoplasia lesion formation. *Cancer Res* 2011; 71(3):964–975
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B.** Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the *belcin1* autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, 112: 1809-1820.

**Raheem AA, Ralph D.** Male infertility: causes and investigations. Trends in Urology & Men's Health 2011; 2(5): 8-11.

**Rajfer J, Handelsman DJ, Swerdloff RS, Hurwitz R, Kaplan H, Vandergast T, Ehrlich RM.** Hormonal therapy of cryptorchidism: A randomized, double-blind study comparing human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone. Obstetrical & Gynecological Survey, 1986. 314(8): 466-70.

**Ross HM, Pawlina W.** Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile Çeviri Editörü: Barış Baykal 6. baskı. 2014. S:784-809

**Russell RC, Tian Y, Yuan H.** ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. Nat. Cell Biol. 2013, 15: 741–750.

**Sadler TW.** Langman's Essential Medical Embryology Çeviri Editörü: Başaklar AC 9. Baskı Palme Yayıncılık Ankara. 2005.

**Scherz SR, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z.** Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. EMBO J 2007; 4:1749-60

**Schiff JD, Ramirez ML, Bar-Chama N.** Medical and surgical management male infertility. Endocrinol Metab Clin N Am 2007; 36: 313.

**Shintani T, Klionsky DJ.** Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science 2004;306:990-5.

**Singh SB, Davis AS, Taylor GA, et al.** Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. Science. 2006; 313:1438-1441.

**Smith LB.** Nonclassical testosterone signaling: a new pathway controlling spermatogenesis? Biol Reprod 2016; 94(2):1–2.

**Song WH, Yi YJ, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P.** “The ART and science of sperm mitophagy” Autophagy, Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(36):E5261-70. p: 2510-2511.

**Song WH, Yi YJ, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P.** Autophagy and ubiquitin–proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. National Acad Sciences USA. 2016 Aug 22. <http://www.pnas.org/content/pnas/113/36/E5261.full.pdf> Erişim Tarihi: 07.26.2017.

**Speroff L, Fritz MA.** Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility. 8nd edition. 2011.

- Spratt DI, Carr DB, Merriam GR, Scully ER, Rao PN, Crowley JR WF.** The spectrum of abnormal patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical and laboratory correlations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1987; 64(2): 283-91.
- Stegmaier M, Yang B, Yoo JS.** Three novel proteins of the Syntaxin/SNAP-25 family. *Journal of Biological Chemistry.* 1998, 273: 34171-9.
- Subedi S, Lamichhane S, Chhetry M.** Study of Infertile Couples Attending a Teaching Hospital in Eastern Nepal. *JNMA J Nepal Med Assoc.* 2016 Jul-Sep;55(203):22-25.
- Sutovsky P ve Manandhar G.** The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Cambridge University Press 2006. 1-30.
- Takahashi Y, Tsotakos N, Liu Y.** The Bif-1-Dynamin 2 membrane fission machinery regulates Atg9-containing vesicle generation at the Rab11-positive reservoirs. *Oncotarget.* 2016, 7(15): 20855-68
- Tanida I, Komatsu M, Ueno T, Kominami E.** GATE-16 and GABARAP are authentic modifiers mediated by Apg7 and Apg3. *Biochem Biophys Res Commun,* 2003. 300(3): 637-44.
- Tomlinson MJ, Barrat CLR, Cook ID.** Prospective study of leukocytes and leukocyte sub-populations in semen suggests they are not a cause of male infertility, *Fertil Steril,* 1993, 60: 1069-75.
- Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y.** The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science.* 2016, 354: 1036-41.
- Türk H, Çelik O, İsoğlu S, Tarhan H, İlbey YÖ.** Erişkinde Testis Torsiyonu, Tepecik Eğit. *Hast. Derg.* 2014; 24 (1): 73-76.
- Vicdan K, Işık AZ.** İnvitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar. 1. Baskı. Ankara, Çağdaş Medikal Yayın Dağıtım, 1999, 79-101.
- Virgin HW, and Levine B.** Autophagy genes in immunity. *Nat. Immunol.* 2009;10:461–470.
- Walczak JR, Karol WJ, Slowikowska HJ.** The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Cent European J Urol.* 2013;66: 60-67
- Webber JL, Tooze SA.** Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J.* 2009, 29: 27-40

**Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ.** Leukospermia is associated with poor sperm quality, *Fertil Steril*, 1990, 53: 528-36

**Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D.** LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Current biology*, 2003, 13: 2004- 2008.

**World Health Organization:** Laboratory manual for the examination and processing of human semen and Sperm Cervikal Mucus Interaction, 5th ed. Cambridge: Cambridge Uni. WHO Press, 2010

**Wu H, Zhao X, Wang F, Jiang Q, Shi L, Gong M, Liu W, Gao B, Song C, Li Q, Chen Y, Han D.** Mouse Testicular Cell Type-Specific Antiviral Response against Mumps Virus *Front Immunol.* 2017,10;8:117

**Xiao X, Cheng CY, Mruk DD.** Intercellular adhesion molecule-2 is involved in apical ectoplasmic specialization dynamics during spermatogenesis in the rat. *J Endocrinol* 2013; 216(1):73–86.

**Xie Z, Klionsky DJ.** Autophagosome formation: core machinery and adaptaion. *Nat Cell Biol* 2007;9:1102-9.

**Xu LL, Liu ML, Wang JL, Yu M, Chen JX.** Saligenin cyclic-o-tolyl phosphate (SCOTP) induces autophagy of rat spermatogonial stem cells. *Reprod Toxicol* 2016; 60:62–68.

**Yamamoto H, Kakuta S, Watanabe TM, Kitamura A, Sekito T, Kakuta CK, Ichikawa R, Kinjo M, Ohsumi Y.** Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *J. Cell Biol.* 2012, 198: 219-33.

**Yang YP.** Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin.* 2005, 26: 1421-34.

**Yla-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen EL.** Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells. *Methods Enzymol* 2009; 452(2):143–164.

**Zhang M, Jiang M, Bi Y, Zhu H, Zhou Z, Sha J.** Autophagy and apoptosis act as partners to induce germ cell death after heat stress in mice. *Plos One.*2012, 7: 7

**Zhang N, Ji N, Jiang WM, Li ZY, Wang M, Wen JM, Li Y, Chen X, Chen JM.** Hypoxia-induced autophagy promotes human prostate stromal cells survival and ER-stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;464(4):1107–1112.

**Zhu SM, Rao T, Yang X, Ning JZ, Yu WM, Ruan Y, Yuan R, Li CL, Jiang K, Hu W, Li HY, Cheng F.** Autophagy may play an important role in varicocele. *Mol Med Rep.* 2017 Oct; 16(4):5471-5479

## EKLER

### ANAMNEZ FORMU

Çalışma Adı: ERKEK İNFERTİLİTESİ TANISI ALMIŞ BİREYLERİN SPERMLERİNDE  
OTOFAJİ BELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Hastanın Adı Soyadı:	Dosya Numarası:	
Yaş:		
Mesleği:		
Evlilik süresi:	Korunma süresi :	İnfertilite Süresi:
İnfertilite Çeşidi:	Primer :	Sekonder:
Geçirmiş olduğu operasyonlar:		
Travma:		
İnguinal Herniorafi:		
Hidroselektomi:		
Varikoselektomi:		
Vazektomi:		
Geçirmiş olduğu hastalıklar:		
Ateşli Hastalıklar:		
Kabakulak:		
Spinal kord Yaralanması:		
Tümöral Hastalıklar:		
Radtoterapi:		
Diğer:		
Sistemik Hastalıklar:		
Diabetes mellitus:		
Multiple Sklerozis:		
Tüberklozis:		
Diğer:		
Alışkanlıklar		
Alkol: Günde:		
Sigara:	Adet/gün	yıl
Kahve:	Gün	
Diğer:		
Genetik yatkınlık		
Kistik Fibrozis		
Y kromozomu Delesyon		

## ÖZGEÇMİŞ

**Soyadı, Adı** : Karagöz Can, Nazlı  
**Uyruk** : T.C.  
**Doğum yeri ve tarihi** : Muğla, 26/07/1983  
**Telefon** : 0505 758 64 34  
**E-mail** : nazlican@mu.edu.tr  
**Yabancı Dil** : İngilizce

## EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji AD	2010
Lisans	Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji	2005

## İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2013-Halen	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD	Öğr. Gör.
2006-2010	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji AD	Arş. Gör.



## AKADEMİK YAYINLAR

### 1. MAKALELER

**CAN M, KÖSE DURUKAN S, KARAGÖZ CAN N.** Bir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Üremeye Yardımcı Tedavi (Üyte) Uygulamalarının Faaliyet Tabanlı Maliyetleme Yöntemi ile Analizi. Akademik Sosyal Araştırmalar Dergisi, Yıl: 5, Sayı: 56, Ekim 2017, s. 241-266

### 2. PROJELER

### 3. BİLDİRİLER

#### A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

**Poster:** Embriyo gelişiminde transkripsiyon ve metilasyon ile ilgili genlerin araştırılması (XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 27 - 30 Mayıs 2014)

Gökay Bozkurt, Nazlı Can, Kemal Ergin

**Poster:** Metil Pration'un Karaciğerde Oluşturduğu Toksik Hasara Likopenin Koruyucu Etkisi, (2. Uluslararası Karaciğer Sempozyumu 20 – 22 Mayıs 2009, Isparta)

Nazlı Can, Bekir Uğur Ergür, Candan Özoğul

#### B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

**Sözlü Sunum:** Metil Paration' un Sıçan Testisinde Oluşturduğu Toksik Hasara Likopenin Koruyucu Etkisinin Histolojik ve Elektromikroskopik Düzeyde İncelenmesi (GABİMAK, Ekim 2010)

Nazlı Can, Bekir Uğur Ergür, Candan Özoğul

**Sözlü Sunum:** Metil Paration' un Sıçan Testisinde Oluşturduğu Toksik Hasara Likopenin Koruyucu Etkisinin Histomorfolojik, İmmunohistokimyasal ve Biyokimyasal Düzeyde İncelenmesi (10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 20 – 23 Mayıs 2010, İzmir)

Nazlı Can, Bekir Uğur Ergür, Soner Atmaca, Müge Kiray, Candan Özoğul

**Sözlü Sunum:** Morfometride Üç Boyutlu Rekonstrüksiyon (9. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 20 – 23 Mayıs 2008, Adana)

Soner Atmaca, Alper Bağrıyanık, Nazlı Can, Ziya Denek, Candan Özoğul

**Poster;** Deneysel Tek Taraflı Testiküler Torsiyon Oluşturulan Ratlarda Eritropoetin'in Kontrolateral Testis Hasarındaki Rolü. (9. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 20 – 23 Mayıs 2008, Adana)