

İNFERTİL BİREYLERDE SEMEN HACİM VE SPERM UZUNLUK ÖLÇÜMLERİNİN EZRİN VE N-KADERİN PROTEİNLERİ İLE İLİSKİLENDİRİLMESİ

Association of Semen Volume and Sperm Length Measurements with Ezrin and N-Cadherin Proteins in Infertile Men

Esra İBİŞ¹(0000-0001-9030-9068), Nazlı Ece GÜNGÖR ORDUERİ²(0000-0003-1868-4140)

ÖZET

Amaç: İnfertil bireylere ait sperm hacim/uzunluk oranları ve spermiyogenezin fizyolojik sürecinde aktin bağlayıcı protein olan ve bir çapraz bağlayıcı olarak kortikal hücre iskeleti ile plazma membran proteinleri arasında bulunan ezrin, ile bir transmembran glikoproteinleri olan N-kaderin kolakizasyonlarının araştırılması gerçekleştirilmiştir.

Gereç ve Yöntemler: N= 18 infertil bireyde hacim/uzunluk oranları ve sperm sayımı gerçekleştirilen semen örnekleri sperm yayma preparatları Kruger Kriterlerine göre mikroskop altında incelendi. Her grup için sperm uzunluk ölçümleri gerçekleştirildi, immüno Floresan boyama ile ezrin ve N-kaderin lokalizasyon ve ekspresyonları değerlendirildi.

Bulgular: Sperm uzunluklarının hacim yoğunluklarına oranla azaldığı ve sperm uzunluğunun sperm sayısı ile arasında anlamlı korelasyon olduğu tespit edildi. Sperm kuyruk uzunluğu anomalisinin infertilite üzerinde etkin bir durum olduğu ancak ezrin ve N-kaderin lokalizasyon ve ekspresyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı fark olmadığı tespit edildi.

Sonuç: Sperm sayısı/hacim ve sperm uzunluk oranlarının infertil bireylerde spermiyogenezin fizyolojik sürecine bağlı olarak gelişebileceği ilk kez bu proje ile gösterilmiş olup, sperm morfolojik özelliklerinin semen hacmi ile ilişkili olabileceği ve infertil bireylerde belirli fonksiyonel proteinlerin tespitinin gerçekleşmesine yönelik çalışmaların gerekliliği vurgulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi; Semen analizi; Sperm uzunluğu; Ezrin, N-kaderin

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to investigate the sperm volume/length ratios of infertility individuals and N-cadherin co-localizations, which are the actin binding protein in the process of spermiogenesis, and ezrin, which are between the cortical cell skeleton and plasma membrane proteins, as a cross-linker.

Material- Method: Semen samples taken from infertile individuals (N=18) examined by microscopy after staining and fixation. The volume/length ratio was performed. Sperm morphology was examined as sperm smear preparations according to Kruger Criteria. Sperm length measurements were performed for localization and expression parameters of ezrin and N-cadherin were examined by immunofluorescence staining.

Results: The sperm length of the patients with similar morphological criteria decreased with respect to volume and there was a significant correlation between sperm length and sperm count. It was found that sperm tail length anomaly was effective on infertility, but there was no significant difference in localization and expression of ezrin and N-cadherin compared to control group.

Conclusion: It has been shown for the first time that sperm count/volume and sperm length ratios may develop depending on the process of spermiogenesis in infertile individuals, it is emphasized that sperm morphological features may be related to semen volumes and necessity of studies for the detection of certain functional proteins in infertile individuals is emphasized.

Key Words: Male infertility; Semen analysis; Sperm length; Ezrin; N-cadherin

¹Biruni Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

²Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Esra İBİŞ, Bilim Uzm.
Nazlı Ece GÜNGÖR ORDUERİ, Dr. Öğr. Ü.

İletişim:

Dr. Öğr. Üyesi Nazlı Ece ORDUERİ
Biruni Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Protokol Yolu No: 45, 10. Cd.
2. kat 34010 Zeytinburnu/İstanbul
Tel: 444 8 276
e-mail:
nordueri@biruni.edu.tr

Geliş tarihi/Received: 14.06.2019
Kabul tarihi/Accepted: 04.11.2019
DOI: 10.16919/bozoktip.578028

Bozok Tıp Derg 2020;10(1):115-21
Bozok Med J 2020;10(1):115-21

GİRİŞ

Sperm morfolojisi değerlendirmesi infertil bireylerde sperm fiziksel özelliklerini içeren bir testtir. Rutin semen analizinde morfoloji sperm fiziksel özelliklerinin görsel olarak değerlendirilmesidir. Mikroskopik inceleme, sperm sayısı, hareketliliği, yuvarlak hücre sayısı, aglünitasyonun varsa derecelendirilmesi, morfoloji ve yuvarlak hücrelerin sınıflandırılmasını kapsar (Tablo 1). Sağlıklı bir bireye ait sperm hücresi baş, boyun ve kuyruk olarak 3 bölümden oluşur. Normal bir sperm morfoloji özellikleri Kruger strict parametreleri ve WHO kriterleri ile belirlenmiştir. WHO kriterlerine göre spermelerin en az %30 unun morfolojisinin iyi olması gereklidir. Belirlenen kriterlere göre baş uzunluğu 5-6 µm genişliği ise 2,5-3,5 mikron olmalıdır. Akrozom başın %40-%70 ini oluşturmalıdır. Orta parçanın genişliği 1 mikron uzunluğu ise 1.5 x baş uzunluğu olmalıdır. Kuyruk boyu yaklaşık 45 mikron uniform, orta parçadan daha ince, kıvrılmamış, kırık içermeyen boyu yaklaşık 45 mikron olmalıdır (1). Testis, immünolojik olarak ayrıcalıklıdır, ve kan-testis bariyeri seminifer tübüllerde spermatogenez sürecine katkıda bulunur. Bu bariyerin kontrol mekanizmasında yer alan pek çok protein vardır (2). Ezrin bir çapraz bağlayıcı olarak kortikal hücre iskeleti ile plazma membran proteinleri arasında bulunur ve membrane yüzey yapısına katkıda bulunur. Yapılan çalışmalar insan testisinde ezrin ekspresyonunun varlığını göstermiştir. Ezrin plazma zarının yeniden şekillenmesi ile görevli olarak proteindir ve insan spermünde bulunup kapasitasyonda görevlidir (3). N-kaderin kalsiyum bağımlı hücre-hücre yapışması ve hücre içi sinyalde görevli transmembran glikoproteindir. Yapılan çalışmalarda N-kaderin sübselüler lokalizasyonu ve dölleme ile ilişkisi belirlenmiştir. N-kaderin gamet etkileşimi ile ilgili hücresel bölgelerde lokalize edilmiş testis kökenli bir sperm proteini olarak belirlenmiştir. Görev olarak sperm-zona pellisuda etkileşimine katılmaz ancak sperm-olemma adezyon ve füzyon olaylarında görevlidir (4). Mikroskopik değerlendirme sonucunda spermiyogram WHO parametrelerine göre değerlendirilir (5). Bu bilgilerin ışığında bu çalışma ile N-kaderin ve ezrin proteinlerinin varlığı ile birlikte sperm hacim/uzunluk değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 1. Normal Spermiyogram Parametreleri

Parametreler	Normal Değer
Semen volümü (ml)	1.5
Total sperm sayısı	39 milyon
Sperm konsantrasyonu	15 milyon/ml
Total motilite	40 (%)
Progressive motilite	32 (%)
Vitalite	58 canlı sperm (%)
Sperm morfolojisi	4 normal formlar (%)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit	<1.0 milyon/ml
MAR testi	<50 (%)
Immunobead test	< 50 (%)
Seminal çinko	>2.4 (umol/ejakülat)
Seminal fruktoz	>13 (umol/ejakülat)
Seminal nötral glikozidaz	29 (mU/ejakülat)

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Sperm morfolojik analizleri

N=18 infertil, N=18 kontrol bireyin semen analizi gerçekleştirilmiştir. 45 derecelik açı ile sperm smear yapılarak Maygrünwald boyası ve Giemsa boyası uygulanmıştır. Nikon Eclipse E100 mikroskop ile kontrolü yapılarak sperm yapılarının; baş, boyun ve kuyruk uzunlukları, Nikon DSL arayüzünde ölçülmüştür.

İmmüno Floresan analizleri

Preparatlar 1X Tris Buffer içerisinde bekletilen 10 mM proteinaz K ile nemli ortamda 2 saat inkübe edildikten sonra %4 formaldehit ile 1 saat fikse edilmiştir. %0.1 Triton 0.1 ml BSA inkübasyonundan sonra Anti-ezrin (Kat no: abcam 231907) ve N-kaderin (Kat no: abcam 76057) hazırlanan 1:100 oranda antikorlarda gece boyu inkübe edilmiş ve PBS ile yıkanmıştır. İmmüno Floresan mikroskop olan Olympus BX61 ile fotoğraflandı. Görüntüler, Photoshop Adobe (version 3.0) ile birleştirilmiştir.

Floresan yoğunluk analizleri

Sperm yayma preparatlarında gerçekleştirilen ezrin ve N-kaderin hedef proteinin floresan yoğunluğu ImageJ 1.45 programı (US National Institutes of Health, Bethesda, MD;http://rsbweb.nih.gov/ij) kullanılarak ölçülmüştür.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler GBSTAT bilgisayar programı kullanılarak Dunnett's test devamında two-way ANOVA kullanılarak Student's t testi çiftli karşılaştırmaları ile gerçekleştirilmiştir. (*: p<0.05)

Tablo 2. İnfertil Bireylere ait S permiyogram Analizleri

Örnek numaraları	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Renk Parametreleri	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak	Opak
Koku	Özgül	Özgül	Özgül	Özgül	Özgül	Özgül	Özgül	Özgül	Özgül	Özgül	Özgül	Özgül
pH	8	7,5	7	8	8,5	8	7	8	8,5	8	8	8
İleri Hızlı Hareketli	50	4	37	54	33	62	75	53	55	55	30	54
Yerinde Hareketli	10	3	12	1	15		1	1	7	1	2	1
Hareketsiz	40	93	51	45	52	37	24	46	38	43	68	45
Normal	2	1	1	46	37	35	58	40	25	50	45	36
Baş Anomali	78	92	81	32	19	26	22	40	65	34	15	43
Gövde Anomali	8	5	12	10	9	13	7	8	3	10	10	9
Kuyruk Anomali	12	2	6	12	35	26	13	22	7	16	30	12
Volüm (ml)	4	4,5	9	2,5	1	2,5	7	3	3	2	5	1,5
Lifefaksiyon	45	30	-	35	35	40	25	40	-	-	-	40
Tüm ejakülat (ml)	192	13,5	153	137,5	35	75	476	249	135	60	355	130
1 cc ejakülat	48	3	17	55	35	30	68	83*	45	120*	71*	87*

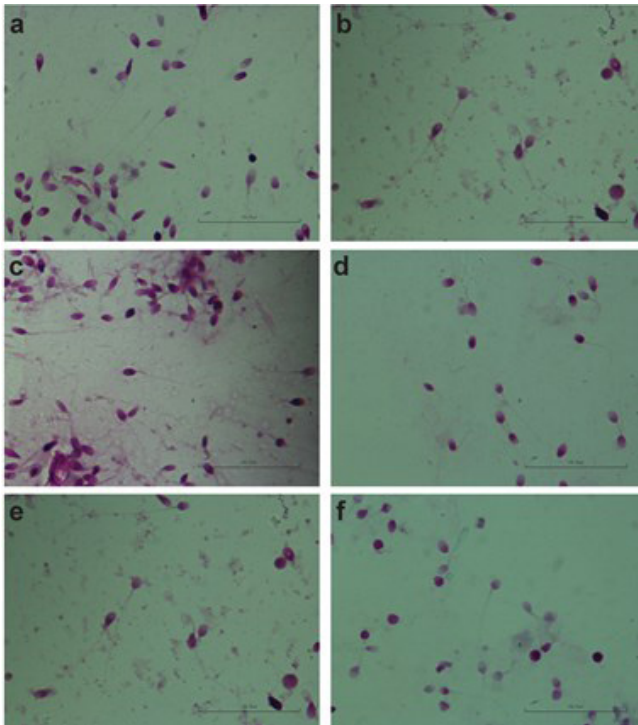
BULGULAR

İnfertil Bireylere ait Semen Hacim ve Karakteristik Sperm Analizleri

Semen analizleri gerçekleştirilen infertil bireylerde WHO parametrelerine göre hacimsel ve morfolojik özellikleri izlenen ve yoğun hacimde ki hastaların değerlendirildiği sayısal değerler Tablo 2' de sunulmuştur. Örneklerden 8, 10, 11 ve 12'de digger infertil bireylere göre 1 cc'de olması gerekenden daha yüksek hacim tespit edilmiştir. (*: p < 0.05)

Yüksek Semen Hacmine Sahip İnfertil Bireylerde Morfolojik Boyanma Paterni

Tablo 2'de tespit edilen infertil bireylerde hacimsel analizlere ek olarak WHO parametrelerine özgün morfolojik değişiklikler izlenmiş (Şekil 1) ve kontrol bireylere göre (Şekil 1a ve 1b) olarak izlenen hacimsel yoğunluğun olduğu semen örneklerinde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. (*: p < 0.05)



Şekil 1. Morfolojik boyama protokolü uygulanmış sperm yayma preparatları. a ve b; Kontrol (fertil birey), c; örnek no 8, d; örnek no 10, e; örnek no 11, örnek no 12. Fotoğraflar 10x büyütme ile gösterilmektedir. Skala bar: 50 um.

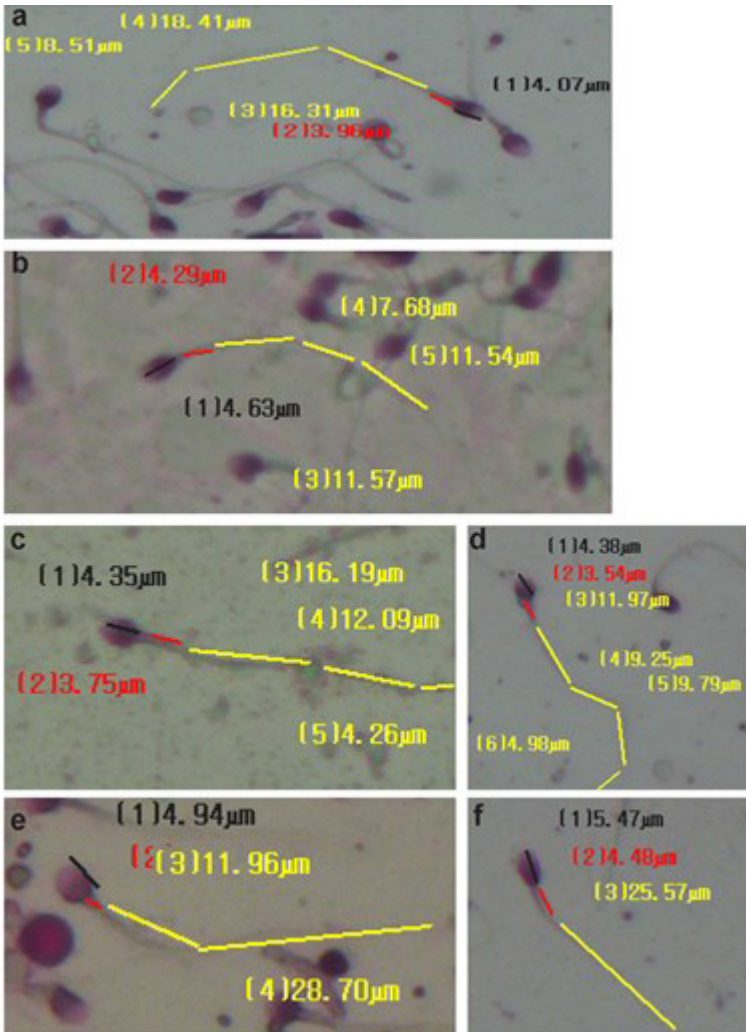
Yüksek Semen Hacmine Sahip Olan İnfertil Bireylerde Sperm Uzunluk Ölçümleri

Şekil 1’de sperm yayma tekniği ile tespit edilen sperm genel morfolojilerine ek olarak infertile bireylerde sperm uzunluk ölçümleri gerçekleştirilmiş (Şekil 2) ve sayısal değerleri Tablo 3’de sunulmuştur. Kontrol bireylere göre (Şekil 2a ve 2b) olarak izlenen hacimsel yoğunluğun olduğu sperm uzunluklarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 3). (*; $p < 0.05$)

Semen Analizi ve Uzunluk Ölçümlerinin İstatistiksel Analizi

Hacim yoğunluğu tespit edilen infertil bireylerde sperm sayısı ve iyi morfolojideki sperm uzunlukları arasında zıt korelasyon olduğu tespit edildi. Sperm sayısı fazla olan bireylerde sperm uzunluklarının daha kısa olduğu tespit edildi. Sperm olgunlaşma sürecinde önemli olduğu bilinen boyun ve kuyruk uzunluklarının yüksek hacimli semen analizlerinde düşük olduğu tespit edildi. (*; $p < 0.05$).

Şekil 2. Sperm baş, boyun ve kuyruk ölçümlerinin yoğun hacimli semen örneklerinde incelenmesi. a; örnek no 8, b; örnek no 10, c;örnek no 11, d;örnek no 12. Fotoğraflar 40x büyütme ile gösterilmektedir.



Yüksek Semen Hacmine Sahip Olan İnfertil Bireylerde N-kaderin Ekspresyonu ve Lokalizasyonu

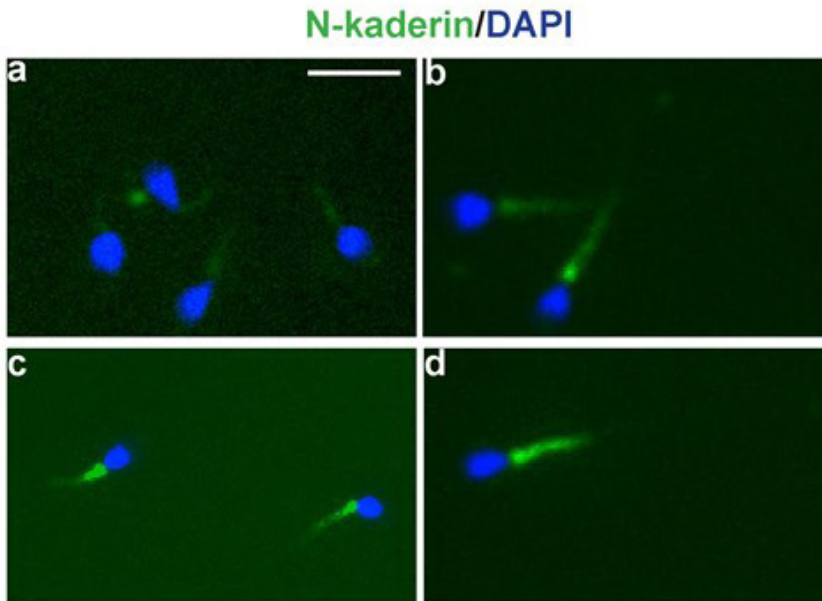
Şekil 2' te gözlenen morfolojik özelliklere ek olarak sperm ölçümlerinde düşük uzunluk tespiti gözlenen hacimsel olarak yoğun semenlere ait sperm analizlerinde boyun bölgelerinde ezrin ekspresyonu gösterilmiştir (Şekil 3). Seçilen örnek semenlere ait sperm bölgesel ekspresyonları boyun bölgesinde tespit edildi ve ekspresyon şiddetinde örnek 8 ile örnek 10,11 ve 12 arasında ekspresyon şiddetinde artış gözlenirken, diğer 3 infertil bireyde anlamlı N-kaderin ekspresyon farkı gözlenmedi. (Şekil 3a, b, c ve d.)

Yüksek Semen Hacmine Sahip Olan Hastalarda Ezrin Ekspresyonu ve Lokalizasyonu

Detaylı morfolojik sperm ölçümlerinde düşük uzunluk tespiti gözlenen hacimsel olarak yoğun semenlere ait sperm analizlerinde boyun bölgelerinde ezrin ekspresyonu gösterildi. (Şekil 4.) Seçilen örnek semenlere ait boyun bölgesindeki lokalizasyonu tespit edildi ve anlamlı bir ekspresyonu şiddetinde fark gözlenmedi (Tablo 4).

Tablo 3. İnterfil Bireylere ait Sperm Uzunluk Ölçümleri

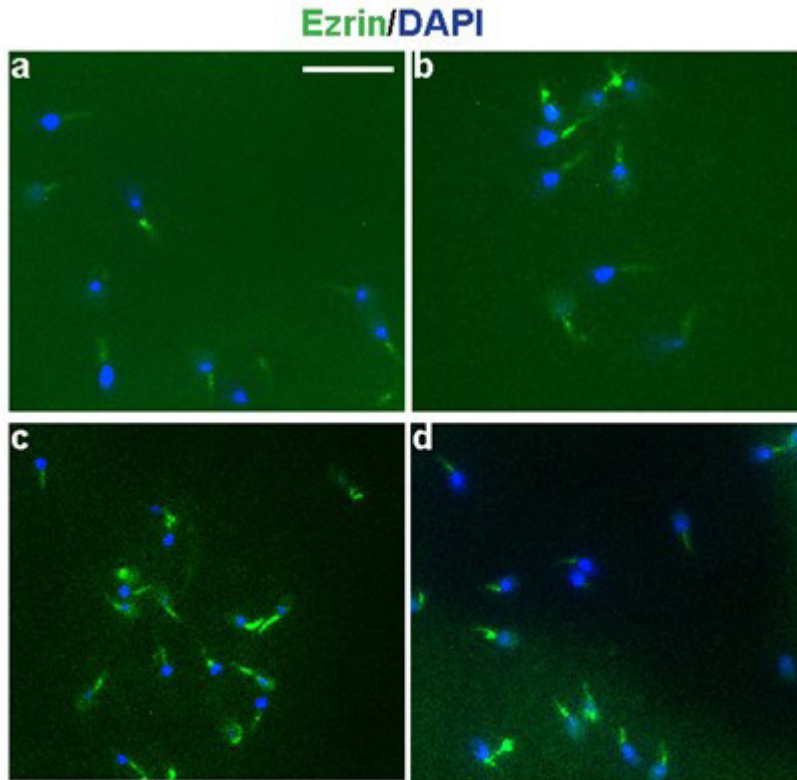
Sperm/Ejakülat	Hasta Sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Referans Aralık
Baş uzunluğu (µm)	17	4,05	1,12	3.46-5.11
Boyun uzunluğu (µm)	12	3,96*	2,43	1.62-2.63
Kuyruk uzunluğu (µm)	12	25,18*	2,56	36.18-49.75
Total sperm uzunluğu (µm)	17	36,26	11,93	40.45-54.04
Sperm konsantrasyonu (milyon)	12	3,75	2,34	1.2-243
Motil sperm konsantrasyonu (milyon/ml)	12	4,90	5,20	0.075-121.91
Total sperm (milyon)	12	170	141	3-891
Baş anomalisi (%)	12	45,5	26,5	2.5-16



Şekil 3. Yoğun hacimli semen örneklerinde sperm immünofloresan boyamaları a; örnek no 8, b; örnek no 10, c; örnek no 11, d; örnek no 12. Fotoğraflar 40 x büyütme ile gösterilmektedir. N-kaderin (FITC), Nükleus boyası (DAPI).

Tablo 4. Total Ezrin ve N-kaderin ekspresyonunun yoğun hacimli semen örneklerinde sperm immüno-floresan boyama seviyeleri. *:p>0.05

	Kontrd	İnfertil
Ezrin	1.23 ± 0.04	4.35 ± 0.13*
N-kaderin	1.57 ± 0.34	3.17 ± 0.09 *
sperm sayısı, n=100 her bir yayma preparatında		



Resim 4. Yoğun hacimli semen örneklerinde sperm immünofloresan boyamaları a; örnek no 8, b; örnek no 10, c; örnek no 11, d;örnek no 12. Fotoğraflar 20x büyütme ile gösterilmektedir. Ezrin (FITC), Nükleus boyası (DAPI)

TARTIŞMA

Spermatogenez ve daha spesifik olarak spermiyogenez sırasında kuyruk uzaması Sertoli ve germ hücrelerinden oluşan seminifer tübüllerin germinal epitelinde ortaya çıkar bununla birlikte Sertoli hücre fonksiyonu başarılı sperm gelişimi ve spermatogenezin tamamlanmasını belirler (6). Sperm bileşenlerinin toplam uzunluklarını, ve ejakülat içindeki değişkenlik dereceleri semen analizinde elde edilen karakteristik özellikler ile etkileşimdedir. Benzer şekilde daha düzgün sperm uzunluğu ölçümlenen sperm hareketli olma olasılığı daha yüksektir. CASA verileri PC1 tarafından

değerlendirildiği üzere toplam uzunluk ölçümlerinin başka bir bileşenle etkisi yoktur (7). İnsan sperm uzunlukları ile hacimsel yoğunluk arasında fazla bilgi yoktur ve semen karakteristik özelliklerinin karşılaştırıldığı herhangi bir çalışma yoktur. Bu çalışma ile sperm bileşenlerinin uzunluklarının ölçümleri belirlenmiş ve önemli regülatör proteinlerin immünohistokimyasal analizleri yapılmıştır. Bu çalışma ile ilk kez, infertil bireylerde daha yüksek sperm konsantrasyonunun ortalamasının altında flagellum ölçütlerine sahip olduğu gösterilmiştir ve bu durumun ejakülat içeriğine bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu

çalışmanın amacı testislerdeki farklı sperm ölçütlerinin ejakülat içeriğine bağlı olarak değişiminin ve sperm gelişimindeki testise-özgün önemli motor proteinler arasındaki ilişkinin saptanması olarak kurgulanmıştır. Bulgularımıza göre farklı semen analizine sahip farklı sperm ölçütleri olduğu tespit edilmiştir. WHO kriterlerine göre hareketlilik değişiklikleri için flagellum ortalama uzunlukları ve toplam sperm uzunluğu ile pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Hem flagellum hemde toplam uzunluk arasında anlamlı bir ilişki belirlenmiştir. Ortalama sperm uzunlukları ve sperm karakteristik özellikleri arasında bir korelasyon olduğu belirlenmiştir (8). Bulgularımıza göre, infertile bireylerde ortalama sperm baş ve kuyruk uzunluğunun yoğun konsantrasyonlu semende düşük olduğu tespiti yapılmıştır. Bu durumun spermiyogenezin fizyolojik süreciyle ve Sertoli-germ hücre bağlantı kompleksleri etkileşimiyle olduğu düşünülmektedir. Bu çalışma ile birlikte sperm uzunluğu ile sperm gelişimi arasında bir bağlantı olduğu belirlenmiş sperm morfolojik ölçütleri analiz edilmiştir. Bu ölçütler istatistiksel olarak belirlenmiştir ve sperm hücre fonksiyonu ile bağlantısı olabileceğini düşündürmektedir. Sperm konsantrasyonu ve sperm aktin bağlayıcı proteinler ile Sertoli ilişkili proteinler incelenmiş buna ek olarak sperm kuyruk ölçümlerinin bağlantılı olduğu belirlenmiştir.

Ortalama flagellum ve total sperm uzunlukları tüm semen özellikleri ile fertil bireylerde pozitif yönde anlamlı olarak ilişkisi olduğu bilinmekte iken infertile bireylerde protein regülasyonunun etkisi gözlenmiştir. Sperm konsantrasyonu ile protein ekspresyon ve lokalizasyonlarında anlamlı bir fark gözlenememekle birlikte sperm bileşenlerinin uzunluklarındaki değişikliklerin farklı regülatör proteinleri etkisinde olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇ

Sonuçlarımızda ezrinin özellikle boyun ve kuyruk bölgesinde ekspresyonu gösterilmiştir. Böylece ezrin lokasyonu ile semen analizlerinin ilişkisi kurgulanmış ve ileri çalışmalar için semen hacim, sperm uzunluk, ve regülatör protein ekspresyonlarının araştırılmasına olanak sağlanacağı düşünülmüştür. Belirli morfolojik özelliklere sahip spermin fertilizasyonu sağladığı

ancak ejakülat içeriğine bağlı olarak morfolojik özelliklerinin normalden düşük syrettiğinin gözlenmesi, spermiyogenez sırasında belirli düzenleyici proteinlerin de rolleri olduğunu düşündürmekte ve spermiyogenez fizyolojisi odaklı, ejakülat spermdeki rollerinin araştırılması ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Erdemir, F., F. Fırat, and Y. Gençten, Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Turk Urol Sem*, 2011. 2: p. 11-7.
2. Cheng, C.Y. and D.D. Mruk, The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, 2012. 64(1): p. 16-64.
3. Wang, L., et al., The role of ezrin-associated protein network in human sperm capacitation. *Asian journal of andrology*, 2010. 12(5): p. 667.
4. Marín-Briggiler, C., et al., Neural cadherin is expressed in human gametes and participates in sperm-oocyte interaction events. *International journal of andrology*, 2010. 33(1): p. e228-e239.
5. Organization, W.H., WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
6. Cheng, C.Y. and D.D. Mruk, Actin binding proteins and spermiogenesis: Some unexpected findings. *Spermatogenesis*, 2011. 1(2): p. 99-104.
7. Ben, M.R., et al., Genetic aspects of male infertility: From bench to clinic. *Gynecologie, obstetrique, fertilité & senologie*, 2019. 47(1): p. 54-62.
8. Lu, J.-C., Y.-F. Huang, and N.-Q. Lü, WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen: its applicability to andrology laboratories in China. *Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology*, 2010. 16(10): p. 867-871.
9. Nakagawa, S. and M. Takeichi, Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development*, 1998. 125(15): p. 2963-2971.
10. O'shaughnessy, P., et al., Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophindeficient hypogonadal mice lacking androgen receptors. *Reproduction (Cambridge, England)*, 2010. 139(1): p. 177.