



YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ

KUZEY KIBRIS TÜRK CUMHURİYETİ

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FERTİL VE İNFERTİL BİREYLERDE SPERMİYUM
KROMATİN BÜTÜNLÜĞÜNÜN IŞIK MİKROSKOBU
DÜZEYİNDE KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

AYŞE SAVAŞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. ESİN AŞAN

Yrd. Doç. Dr. SEVİNÇ EGE

2019-LEFKOŞA

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ayşe SAVAŞAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimine başladığım ilk günden itibaren benimle çok ilgilenen, tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan, engin bilgilerini ve değerli görüşlerini paylaşan, eğitimimde büyük bir payı bulunan çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Esin AŞAN'a, tecrübelerini benimle paylaşan, yol gösteren, desteğini ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen eş danışmanım Yrd. Doç. Dr. Sevinç EGE'ye, tezimin ilerlemesinde bana verdiği destek ve katkılarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Aysel KÜKNER'e saygılarımı ve tüm kalbimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamda gerekli materyali sağlayan Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali Ulvi Önder'e, Mikrobiyoloji laboratuvar çalışanlarına ve örneklerin toplanması konusunda bana yardımcı olan Kolan Hastanesi Kadın Doğum Ünitesi Üremeye Yardımcı Teknikler Merkezi çalışanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübe ve destekleriyle her türlü yardımda bulunan, görev aldığım Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Patoloji Laboratuvarı sorumlum, Yrd. Doç. Dr. Hanife ÖZKAYALAR'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmanın materyalleri boyama aşamasında gerekli olan malzemelerimi karşılayan Abant İzzet Baysal Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bölümüne katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tezimin istatistiksel değerlendirmelerde katkısını esirgemeyen Sedat YÜCE'ye teşekkür ederim.

Bana verdikleri sevgi ve maddi-manevi destek ile bugünlere gelmemde büyük özverileri olan, varlıklarıyla bana güç veren annem Nuray Savaşan'a, babam Tugay Savaşan'a, kardeşlerim Nermin Savaşan'a ve Hüseyin Savaşan'a, hayatımın her anında yanımda olan ve desteğini hiç esirgemeyen sevgili eşim Özgün Erdenizci'ye bana olan güveni, sevgisi ve anlayışı için sonsuz minnettarım.

Bu tez, Yakın Doğu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-2017-2-030 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER	iv
TABLolar	v
KISALTMA ve SİMGELER	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Spermin Yapısı	6
2.2. Spermatogenez	7
2.2.1 Spermatositogenez (Spermatogonyanın farklılaşması)	8
2.2.2 Mayoz	8
2.2.3 Spermiyogenez (Spermatid fazı)	10
2.2.4 Spermatogenez hormonal faktörler	11
2.3. Spermiyogenez Sırasında Histon-Protamin Değişimleri	12
2.4. Sperm Kromatin Yapısı	14
2.5. Sperm DNA Hasarı	15
2.6. Sperm DNA Bütünlüğünü Değerlendiren Testler	18
2.6.1 Anilin blue (AB)	18
2.6.2 Toluidin blue (TB)	18
2.6.3 CMA3 (Kromomisin A3)	19
2.6.4 COMET analizi (Tek hücre jel elektroforezi)	19
2.6.5 Akridin orange (AO)	19
2.6.6 Sperm kromatin dispersiyon (SCD)	19
2.6.7 Sperm kromatin yapısı analizi (SCSA)	20
2.6.8 TUNEL analizi	20
2.7. İnfertilite ve Erkek İnfertilitesi	21
2.7.1 Erkek infertilitesinin nedenleri	24
2.7.1.1 Varikosel	24
2.7.1.2 Kriptorşidizm	24
2.7.1.3 Diabetes mellitus (DM)	25

2.7.1.4 Yaşam biçimi	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1.Semen Analizi Makroskopik Değerlendirme	29
3.1.1 Likefaksiyon	29
3.1.2 Viskozite	29
3.1.3 pH	29
3.1.4 Görünüm	30
3.1.5 Hacim	30
3.2.Semen Analizi Mikroskopik Değerlendirme	30
3.2.1 Konsantrasyon	30
3.2.2. Motilite	31
3.2.3 Aglütinasyon	31
3.2.4 Morfoloji	31
3.3. Boyaların Hazırlanışı ve Boyama Yöntemleri	32
3.3.1. Asidik Anilin Mavisi Boyama	32
3.3.2. Toluidin Mavisi Boyama	32
3.3.3. TUNEL Floresan Boyama	33
3.6. Verilerin İstatiksel Analizi	34
4. BULGULAR	35
4.1. Sperm Konsantrasyonu ve Hareketlilik	37
4.2. Sperm Morfolojisi	42
4.3. Sperm Kromatin Kondensasyonu ve Sperm DNA Fragmentasyonu	45
4.4. Sperm Parametreleri ile AB, TB ve TUNEL Değerleri Arasındaki Korelasyonlar	48
4.5. Gruplar İçinde AB, TB ve TUNEL Değerleri Arasındaki Korelasyonlar	50
4.6. Işık Mikroskopik Bulgular	52
4.7. Floresan Mikroskopik Bulgular	60
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	62
6. KAYNAKLAR	73
7. EKLER	86
EK 1: Etik Kurul Onayı	86
EK 2: Aydınlatılmış Onam Formu	87
EK 3: Orjinallik Raporu	89
8. ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Spermin yapısı	7
Şekil 2.2. Spermatogenez	9
Şekil 2.3. Spermin oluşumundan fertilizasyon sonrasına kadar olan süre içindeki DNA'da meydana gelen değişiklikler	13
Şekil 2.4. Sperm kromatinin başlıca üç ana yapısal elementi	15
Şekil 2.5. TUNEL yönteminin mekanizması	21
Şekil 4.1. Katılımcıların gruplarına göre yaş ortalamaları	36
Şekil 4.2. Katılımcıların gruplarına göre sperm konsantrasyonu ortalamaları	38
Şekil 4.3. Katılımcıların gruplarına göre hızlı ileri hareketli sperm ortalamaları	39
Şekil 4.4. Katılımcıların gruplarına göre yavaş ileri hareketli sperm ortalamaları	39
Şekil 4.5. Katılımcıların gruplarına göre yerinde hareketli sperm ortalamaları	40
Şekil 4.6. Katılımcıların gruplarına göre hareketsiz sperm ortalamaları	40
Şekil 4.7. Katılımcıların gruplarına göre toplam hareketlilik ortalamaları	41
Şekil 4.8. Katılımcıların gruplarına göre ilerleyici hareketlilik ortalamaları	41
Şekil 4.9. Katılımcıların gruplarına göre normal morfoloji ortalamaları	43
Şekil 4.10. Katılımcıların gruplarına göre baş defekti ortalamaları	44
Şekil 4.11. Katılımcıların gruplarına göre boyun defekti ortalamaları	44
Şekil 4.12. Katılımcıların gruplarına göre kuyruk defekti ortalamaları	45
Şekil 4.13. Katılımcıların gruplarına göre Asidik Anilin blue+ ortalamaları	46
Şekil 4.14. Katılımcıların gruplarına göre Toluidin blue+ ortalamaları	47
Şekil 4.15. Katılımcıların gruplarına göre TUNEL+ ortalamaları	47
Şekil 4.16. Fertil grubuna ait asidik anilin blue boyanması	52
Şekil 4.17. Fertil grubuna ait asidik anilin blue boyanması	53
Şekil 4.18. İnfertil grubuna ait asidik anilin blue boyanması	54
Şekil 4.19. İnfertil grubuna ait asidik anilin blue boyanması	55
Şekil 4.20. Fertil grubuna ait toluidin blue boyanması	56
Şekil 4.21. Fertil grubuna ait toluidin blue boyanması	57
Şekil 4.22. İnfertil grubuna ait toluidin blue boyanması	58
Şekil 4.23. İnfertil grubuna ait toluidin blue boyanması	59
Şekil 4.24. Fertil grubuna ait floresan TUNEL boyaması	60
Şekil 4.25. İnfertil grubuna ait floresan TUNEL boyaması	61

TABLÖLAR

Tablo 2.1. Erkeklerde öykü	22
Tablo 2.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2010) normal semen referans değerleri	23
Tablo 2.3. Semen Sınıflaması Terminolojisi	23
Tablo 3.1. Fertil ve İnfertil grubu tayini için kullanılan anket formu	28
Tablo 4.1. Katılımcıların yaş ve sperm parametrelerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler	35
Tablo 4.2. Katılımcıların gruplarına göre yaşlarının karşılaştırılması	36
Tablo 4.3. Katılımcıların gruplarına göre sperm konsantrasyonu ve hareketlilik değerlerinin karşılaştırılması	38
Tablo 4.4. Katılımcıların gruplarına göre normal morfoloji ve defekt değerlerinin karşılaştırılması	43
Tablo 4.5. Katılımcıların gruplarına göre asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL değerlerinin karşılaştırılması	46
Tablo 4.6. Fertil bireylerin sperm konsantrasyonu, hareketlilik, normal morfoloji ve defekt değerleri ile asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL değerleri arasındaki korelasyonlar	48
Tablo 4.7. İnfertil bireylerin sperm konsantrasyonu, hareketlilik, normal morfoloji ve defekt değerleri ile asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL değerleri arasındaki korelasyonlar	49
Tablo 4.8. Fertil bireylerin asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL değerleri arasındaki korelasyonlar	50
Tablo 4.9. İnfertil bireylerin asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL değerleri arasındaki korelasyonlar	51

KISALTMA ve SİMGELER

AB	Anilin blue
ABP	Androjen bağlayıcı protein
AO	Akridin orange
ART	Yardımcı üreme teknikleri
CASA	Bilgisayar yardımlı sperm analizi
CMA3	Kromomisin A3
COMET	Tek hücreli jel elektroforezi
DFI	DNA fragmantasyon indeksi
DNA	Deoksiribonükleik asit
DM	Diabetes mellitus
dUTP	Deoksiuridin trifosfat
FSH	Folikül uyarıcı hormon
HCL	Hidroklorik asit
ICSI	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	In vitro fertilizasyon
LH	Lutein yapıcı hormon
MAR	Matriks bağlayıcı bölge
NP	Yerinde hareketli sperm
NT	In situ Nick Translation
PBS	Fosfatlı tuz çözeltisi
PR	İleri hareketli sperm
P1	Protamin 1
P2	Protamin 2
ROS	Reaktif oksijen türleri
RSA	Recurrent (tekrarlayan) spontan abortus
SCSA	Sperm kromatin yapısal analizi
SCI	Spinal kord hasarı
SCD	Sperm kromatin dağılımı
SDF	Sperm DNA fragmantasyon

SPSS	Statistical package for the social sciences
TB	Toluidin blue
TdT	Terminal deoksinükleotidiltransferaz
TUNEL	Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı “Nick-end Labelling” Assay
TNP	Transizyon (geçiş) proteinler
ZP3	Zona pellusida 3
WHO	Dünya sağlık örgütü

Fertil ve İnfertil bireylerde spermiyum kromatin bütünlüğünün ışık mikroskobu düzeyinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi

Ayşe SAVAŞAN

Danışmanlar:

Prof. Dr. Esin AŞAN

Yrd. Doç. Dr. Sevinç EGE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: KKTC’de spermiyogram değerlerine göre infertil ve fertil olarak ayrılan bireylerde sperm DNA/kromatin integritesinin veya bütünlüğünün toluidin mavisi, anilin mavisi ve TUNEL boyaması kullanılarak karşılaştırması ve DNA bütünlüğünün infertilite ile olan ilişkisinin saptanması ve istatistiki olarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 35 infertil ve 35 fertil bireylere ait semen örneklerine spermiyogram testi yapıldı. Her 2 gruba ait sperm DNA/kromatin bütünlüğü ve DNA fragmentasyonu değerlendirmek için asidik anilin mavisi, toluidin mavisi ve TUNEL yöntemi uygulandı.

Bulgular: İnfertil ve fertil bireylerin sperm konsantrasyonu, motilite ve normal morfoloji gibi parametreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu saptanmış ve çalışmaya ait gruplar bu değerlere göre ikiye ayrılmıştır ($p<0,05$). İnfertil bireylerin anilin mavi, toluidin mavi ve TUNEL değerleri, fertil bireylere göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca infertil bireylerin TUNEL+ değerleri ile asidik anilin mavi+ ve toluidin mavi+ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Ancak fertil bireylerin TUNEL+ değerleri ile asidik anilin mavi+ ve toluidin mavi+ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Sonuçlar: Bu çalışmada infertil gurupda DNA kromatin bütünlüğünün fertil gurupla kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı ölçüde bozulduğu saptanmıştır. Ulaşılan sonuçlar erkek infertilitesini değerlendirmede ve özellikle ART kliniklerine başvuran hastaların tedavi protokollerini saptamada DNA integritesi veya bütünlüğünün önemini ortaya koymuştur. Sonuçlar ayrıca DNA/kromatin integritesini gösteren parametrelerin normal semen değerlerinden bağımsız ayrı bir parametre olarak değerlendirmesinin uygun olduğunu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: İnsan Spermi, DNA kromatin, Anilin mavi, Toluidin mavi, TUNEL

Comparative evaluation of spermium chromatin integrity at the light microscopic level in fertile and infertile individuals

Ayşe SAVAŞAN

Advisors:

Prof. Dr. Esin AŞAN

Yrd. Doç. Dr. Sevinç EGE

Department of Histology and Embryology

ABSTRACT

Objective: The aim of this project is to compare the chromatin/DNA integrity of the sperm between a group of infertile and fertile males in Northern Cyprus using aniline blue, toluidine blue staining and TUNEL method. The purpose of the study is to determine the relationship between male infertility and sperm chromatin/DNA integrity. The results will be evaluated by using statistical methods.

Material and Method: 35 infertile and 35 fertile individuals semen samples were used in spermiogram tests. Acidic aniline blue, toluidine blue and TUNEL staining methods performed to evaluate the sperm DNA/chromatin integrity and the DNA fragmentation of each group.

Results: Statistically significant differences found between infertile and fertile individuals, such as sperm concentration, motility and normal morphology parameters. According to these different values, groups in the study divided as 'infertile and fertile' ($p < 0,05$). Aniline blue, toluidine blue and TUNEL results of the infertile individuals were found to be higher than that of the fertile individuals. Also, statistically significant correlations were detected between TUNEL+, acidic aniline blue+ and toluidine blue+ results of the infertile individuals ($p < 0,05$). However, there were no significant correlations between TUNEL+, acidic aniline blue+ and toluidine blue+ results in fertile individuals ($p > 0,05$).

Conclusions: Results of the present study indicated that disruption of DNA/chromatin integrity showed statistically important correlation with male infertility. It can be concluded that, DNA/chromatin integrity of the sperm is an important parameter in the evaluation of male infertility including unexplained infertility, for both diagnostic and prognostic purposes. Results of the DNA integrity assays are independent from the conventional semen analysis. Therefore can also be used as a valuable parameter in the evaluation of different treatment protocols in art clinics.

Keywords: Human sperm, DNA chromatin, Aniline blue, Toluidine blue, TUNEL

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite üretken çağdaki çiftlerde bir yıllık korunmasız beraberliğe karşın gebeliğin oluşmamasıdır (Boivin ve ark., 2007). Dünyada 48,5 milyon çift üzerinden yapılan değerlendirmede infertilitenin çiftlerin %15'inde görüldüğü bildirilmiştir (Agarwal ve ark., 2015; Rives, 2014). Tek başına erkek faktörünün infertilitenin %20-30'undan, kadın faktörünün %40-50'sinden, %20-30'un da ise erkek ve kadın faktörünün birlikte sorumlu olduğu rapor edilmektedir (Agarwal ve ark., 2015). Bu oranlar sadece kliniğe başvuranlara ilişkindir. Değerlendirme dışında kalanlarla birlikte oranların daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Toplumların gelişmişlik, kültürel ve etnik değerlerine bağlı olarak gelişen kişisel çekinceler nedeniyle de özellikle erkek egemen temelli toplumlarda doğru değerlendirme güçtür. Tek başına erkek infertilitesinin %40 ve %50 olduğunu rapor eden yayınlar da vardır. Heterojen ve multi faktöriyel bir patoloji olarak erkek infertilitesinde bilinen faktörler %30-50 oranında olup geriye kalan yarısı ise nedeni bilinmeyen veya idiyopatik grubu oluşturmaktadır (Zeqiraj ve ark., 2018).

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde Yardımla Üreme Teknikleri veya IVF kliniklerine başvuran hastalarda spermiyogram analizi rutin ve ilk değerlendirmedir. Semen değerlendirilmesindeki konsantrasyon, motilite, morfoloji gibi parametrelerin eşik değerleri WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından tayin edilir ve kitapçık şeklinde yayınlanır (World Health Organization, 2010). Parametreler hem kalitatif hem de kantitatif yönden fertil erkeklerde infertil olanlara göre yüksek değerler gösterir. Ancak fertilite değerlendirilmesinde tam ayırt edici sınırlar oluşturmaz. Fertil ve infertil grup parametreleri arasında örtüşmeler olabileceği bildirilmektedir ki bunun da nedeni genellikle konsantrasyon, motilite, morfoloji gibi parametrelerin eşik değerlerinin gebeliğin oluşması için en düşük sınırdan seçilmesinden kaynaklanmaktadır (Guzick ve ark., 2001). Yaklaşık olarak infertil erkeklerin %15'i normal spermiyogram değerleri gösterir (Guzick ve ark., 1998). Bu nedenle kadın faktörünün tamamen normal ve erkeğinde fertil spermiyogram değerleri gösterdiği çiftlerde, gebelik başarısızlığı erkeğe bağlı idiyopatik veya açıklanamayan

infertiliteyi tanımlar ve oranı oldukça fazladır (Shamsi ve ark., 2011; Zeqiraj ve ark., 2018).

Spermiyogram analizi IVF laboratuvarlarında altın bir standart olarak tedavi protokollerinin yönlendirilmesindeki ilk adımdır. Ancak spermiyumun bir hücre olarak, DNA'sında yazılı ile bireysel fonksiyonel yetisine ilişkin detaylı bilgi veremez. Bu nedenle uzun bir süredir erkek infertilite çalışmaları sperm DNA/kromatin bütünlüğü ve fragmentasyonu ile ilişkili tekniklere yönelmiştir. Bu konuda araştırmaların 2018'i (Zeqiraj ve ark., 2018) de kapsayacak şekilde devam etmesi konunun önemine kadar karşıt görüşlerinde bulunduğu bir alan olmasındandır (Agarwal ve ark., 2016; Kim, 2018).

Günümüzde sperm DNA/kromatin yapısının ve hasarını/fragmentasyonunu ölçen yöntemler direkt sperm DNA bütünlüğünü ölçen metodlar ve anormal sperm kromatin paketlenmesini tayin eden yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Direkt DNA bütünlüğü terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL) assay ve in situ nick translation (NT) olup, kromatin veya DNA üzerindeki hasarlı veya kırık bölgeyi gösterir. İndirekt yoldan DNA bütünlüğü ise sperm chromatin structure assay (SCSA) ve sperm chromatin dispersion (SCD) assay ve COMET yöntemidir. İndirekt testlerde asidik ortamda protein denatürasyonu ile dolaylı yoldan DNA veya kromatin üzerindeki hasarlı bölge ortaya çıkarılır, bu metotla ölçülen sperm DNA fragmentasyonu olduğundan testler sperm DNA fragmentation (SDF) olarak adlandırılmıştır (Kim, 2018).

Kromatinin doğru paketlenip kompaktlaşmasını ise anilin mavisi, toluidin mavisi ve cromomisin A3 gibi sitokimyasal boyalarla gösterilir (Agarwal ve ark., 2016; Kim, 2018; Shamsi ve ark., 2011). Doğru paketlenip kendine özgü korumalı kompakt yapısını kazanmamış olan sperm DNA'sı hasarlara açıktır. Anormal kromatin yapısı artan DNA parçalanması ve yüksek oranda DNA hasarı ile birlikte görülür. Bu durum ise bozulmuş semen parametrelerine ve erkek infertilitesine işaret eder (Ajina ve ark., 2017).

Son araştırmaların çoğu heterojen, multi faktöriyel bir patoloji olan erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden birinin sperm DNA'sındaki yapılanma sorunu

ve parçalanmalar olduğunu göstermektedir. Buna karşılık erkek infertilitesinde DNA/kromatinle ilgili testlerin tekrarlayan spontan abortus (RSA) ve açıklanamayan infertilite vakalarında daha uygun olduğu ileri sürülmektedir (Ajina ve ark., 2017). Erkeğe bağlı infertilenin yaklaşık %40 yüksek bir oranda olduğu ve infertilite nedenlerinin yine büyük bir bölümünün idiyopatik veya nedeni bilinmeyen guruba dahil olduğu bilinmektedir. Bu nedenle ART kliniklerine müracaat eden çiftlerde spermiyogram analizinden sonra uygulaması kolay bir DNA/kromatin testinin yapılması uygulanacak tedavi protokolünde yol gösterici olmaktadır (O'Neill ve ark., 2018).

Bu çalışma KKTC'de spermiyogram değerlerine göre infertil olan erkeklerde sperm DNA integritesinin anilin mavisi, toluidin mavisi ve TUNEL tekniği ile incelenmesi ve normal fertil değerlerle karşılaştırılıp istatistiksel yöntemle değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır. Böylece anilin mavisi ve toluidin mavisi ile spermiyum kromatin yapılanmasının uygunluğu ve matürasyonu test edilirken, TUNEL metodu ile de DNA da tekli ve çiftli kırıklar gösterilecektir.

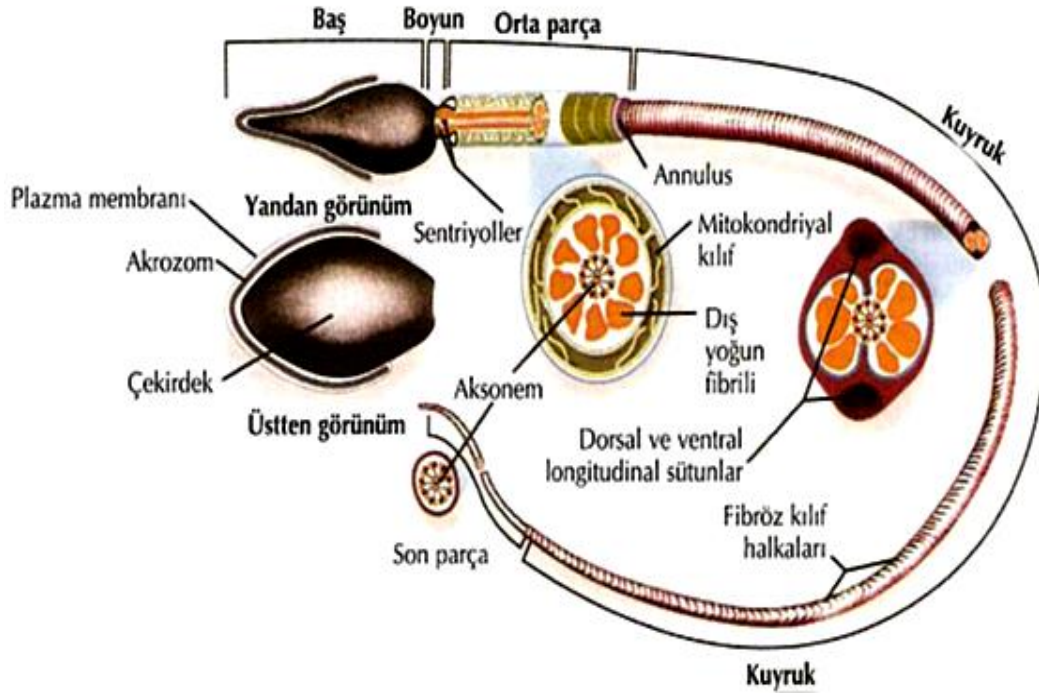
Metodların avantajı DNA'nın her iki özelliğini de test etmesi nedeni ile anlamlı, uygulamasının ise kolay, pahalı yazılım programları gerektirmeyen ucuz ve pratik bir yöntem olması nedeniyle değerlidir ve amaca uygundur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spermin Yapısı

İnsan sperm hücresi 60 µm uzunlukta olup baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur. Oval ve yassı olan baş kısmı 4,5x3 µm boyutundadır. Başın büyük kısmını 23 kromozom içeren transkripsiyona kapalı elektron yoğun bir nükleus kaplar, DNA ve ilişkili proteinlerden oluşur. Başın 2/3 ön kısmı akrozom denir ve fertilizasyon için gerekli hidrolitik enzimleri içeren bir kılıf ile örtülüdür. Bu yapı spermatidin Golgi cisimciğinden oluşur. Akrozomun iç ve dış olmak üzere 2 tabakası vardır. İç akrozomal membran nükleusa sıkıca tutunurken, dış akrozomal membran da hücre zarına bakar. Kapasitasyon yeteneğini kazanan spermilerin oosite penetre olabilmesi için akrozom reaksiyonu gerçekleşir. Oosit plazma membranı ile sperm dış akrozomal membranının birleşmesiyle, ekzositoz sonucu akrozomal içerik dış ortama boşaltılır. Hücre zarı ve akrozom dış zarı erir ve sadece akrozomun iç zarı kalır. Böylece akrozomal reaksiyon gerçekleşir ve sperm oosit çevresindeki korona hücrelerini geçerek zona pellusidadaki ZP3 molekülüne bağlanır.

Kuyruk dört parçaya ayrılır; boyun, orta parça, esas parça ve son parça. Sperm boynu çekirdeğe tutunmuş proksimal sentriyol ve aksoneme kaynaklık eden distal sentriyolden oluşur. Spermin orta parçasında 9+2 mikrotübüler aksonem, aksonemi çevreleyen kalın dış fibriller ve hareketlilik için gerekli enerjiyi sağlayan mitokondrial kılıf bulunur. Annulus, mitokondriyon sarmalın son dönümünün altında yoğun bir halka olup orta parçanın esas parçaya dönüştüğü bölgedir. Spermin esas parçası annulustan uzanır ve mitokondriyal kılıf içermez. Esas parçanın yapısı aksonem, aksonemi çevreleyen kalın dış fibriller, fibröz tabaka ve plazma membranından oluşur. Spermin son parçasında sadece plazma membranı ile sarılmış 9+2 mikrotübüler aksonem bulunur (Şekil 2.1) (William ve ark., 2009).



Şekil 2.1. Spermin yapısı (William ve ark., 2009).

2.2. Spermatogenez

Spermatogonyumdan mitoz ve mayoz bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşma sürecine spermatogenez denir (Liu ve ark., 2004; Sakkas ve ark., 2002). Hücreler farklılaşma süreci boyunca Sertoli hücrelerinin sitoplazmadaki girintilerine gömülü halde bulunurlar. Sertoli hücreleri spermatogenik hücrelerin korunması ve beslenmesini sağlarken aynı zamanda kan-testis bariyerini de oluştururlar. İnsanlarda tüm spermatogenik süreç yaklaşık olarak 64 gün sürer ve olgun sperm hücresinin ejakülatta görülmesi ise 74 gün alır. Spermatogenez puberteden itibaren başlar, 45 yaşına kadar aktif şekilde sürer ve 45 yaşından sonra hızı yavaşlamakla birlikte yaşam boyu sürer (Clermont, 1972; Fawcett, 1975).

Spermatogenez süreci üç evreden oluşur; spermatositogenez, mayoz ve spermiyogenez evresi.

2.2.1 Spermatositogenez (Spermatogonyanın farklılaşması)

Spermatogonyum olarak adlandırılan immatür (olgunlaşmamış) spermatogenik hücreler, küçük, yuvarlak, diploid germ hücreleridir. Seminifer tübül bazal membranı üzerinde yer alırlar ve puberteye kadar bölünmezler (Gartner ve Hiatt, 2009). Spermatogonyumlar, ışık mikroskopik incelemede nükleuslarının belirgin koyu görünümleriyle ayırt edilir ve üç tip spermatogonya vardır; Tip A koyu, Tip A açık ve Tip B (De Kretser ve ark., 1998).

Koyu Tip A spermatogonyumlar: İnce granüler, yoğun bazofilik oval nükleuslara sahiptirler. Bu spermatogonyumların seminifer epitelin kök ya da rezerv hücreleri olduğu düşünülmektedir (Ross ve Pawlina, 2017). Mitoz bölünme ile kendilerini yenileyerek yeni Tip A koyu spermatogonyum ile Tip A açık spermatogonyumları oluşturabilirler.

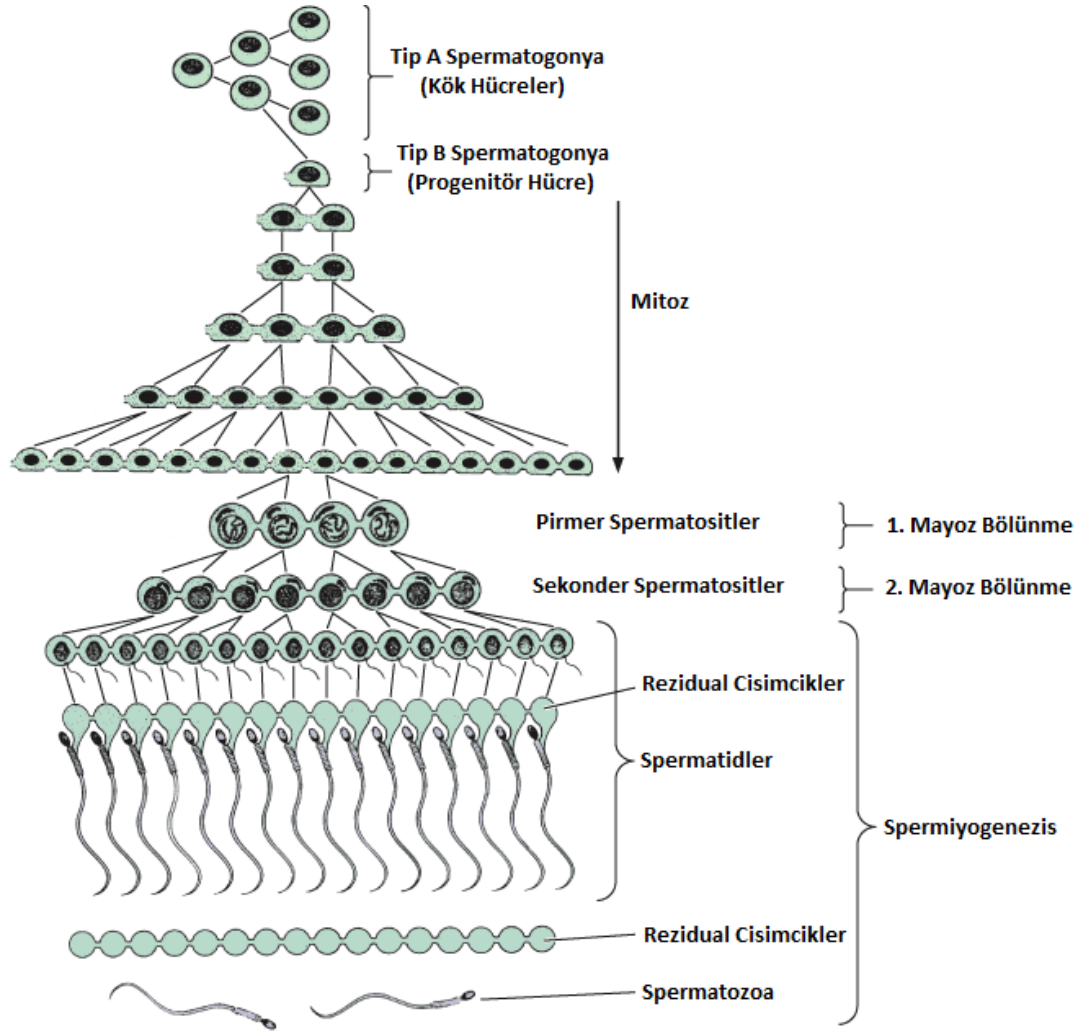
Açık Tip A spermatogonyumlar: İnce granül kromatinli, soluk boyalı oval nükleuslara sahiptirler (Ross ve Pawlina, 2017). Testosteronun etkisiyle mitoz bölünmeyle çoğalırlar ve yeni Tip A açık hücreleri ve Tip B hücreleri oluştururlar.

Tip B spermatogonyumlar: Açık Tip A spermatogonyumlara benzerler. Daha yuvarlak şekilli ve merkezde yerleşen nükleus daha kaba heterokromatini ile ayırt edilir. Mitozla bölünerek primer spermatositleri meydana getirirler (Ross ve Pawlina, 2017).

2.2.2 Mayoz

Mitotik bölünmelerini tamamlayan Tip B spermatogonyumlar, son S fazını (DNA sentezini) tamamladıktan sonra primer spermatositi oluşturmak üzere mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Spermatositler iki mayotik hücre bölünmesi geçirirler. Bir primer spermatosit, iki adet sekonder spermatositi oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye girer. Bu aşama yaklaşık 22 gün sürdüğünden primer spermatositler, seminifer tübüllerde çok sayıda gözlenen hücrelerdir. Birinci mayoz bölünmenin sonunda sekonder spermatositler oluşur. Bu hücreler hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve ikinci mayoz bölünmeyi geçirir (Şekil 2.2). Bu nedenle testis

doku kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi oldukça zordur. Her bir sekonder spermatosit, iki adet haploid spermatid meydana getirir. Sertoli hücre çöküntülerine yerleşmiş spermatidler, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren çekirdeklere sahiptirler. Meydana gelen spermatidler spermiyogenez sürecine girerler (Kierszenbaum ve Tres, 2004; Sadler, 1985).



Şekil 2.2. Spermatogenez (Junqueira ve Carneiro, 2009).

2.2.3 Spermiyogenez (Spermatid fazı)

Spermatidler 8 µ çapında, küçük, yuvarlak, haploid hücrelerdir. Bu süreçte hücre bölünmesi olmaz. Spermiyogenez, haploid spermatidin yapısal değişimler geçirerek spermiyuma dönüşmesini tanımlayan, hücre biçim değişimleri ile birlikte epigenetik ve kromatinin yeniden yapılanmasını da içeren çok dinamik bir süreçtir. Bu süreç Sertoli hücrelerinin desteğinde gerçekleşir (Kierszenbaum ve Tres, 2004; Kimmins ve Sassone-Corsi, 2005; Oliva, 2006; Rousseaux ve ark., 2005). Bu sırada meydana gelen değişiklikler nükleus kondenzasyonu ve hücrenin periferine gitmesi, akrozom oluşması, flagellum oluşumu, sentriyolden aksonem gelişmesi ve sitoplazmanın çoğunun kaybı ve yeniden organizasyonu ile karakterizedir. Sonuçta spermiyum Sertoli hücre yüzeyinden ayrılır ve seminifer tübül lümenine atılır. Bu olaya spermiyasyon denir.

Spermiyogenez 4 evrede incelenir:

Golgi evresi: Spermatid sitoplazmasında, nükleusun yanında bulunan Golgi aygıtı, mitokondri, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve endoplazmik retikulum bulunur. Glikoproteinden zengin olan proakrozom granülleri birbirleriyle birleşerek akrozomal vezikülü oluşturur. Çekirdek membranı ile ilişkili olan bu vezikülün yerleşimi spermin ön kutbunu belirler. Aynı zamanda sentrioller, oluşan akrozomun aksi yönünde çekirdeğin arkasına doğru göç ederler. Sentriollerden bir tanesi bazal cisimcik olarak davranır diğeri spermin kuyruğunun aksonemini oluşturmaya başlar.

Kep evresi: Akrozomal vezikül, çekirdeğin ön yarısı üzerine doğru yayılır ve akrozomal kep adını alır. Akrozom, hyaluronidaz, akrozin, nörominidaz, asit fosfotaz ve tripsin benzeri proteaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler ovumun zona pellusidasının delinmesi için gereklidir. Sperm oosite temas ettiğinde akrozomal enzimler dışarı salınır. Bu olaya akrozom reaksiyonu denir. Akrozom reaksiyonu ile dışarı salınan enzimler spermiyumun ovumu çevreleyen zona pellusidaya penetre olmasını sağlar.

Akrozom evresi: Spermiyogenezisin en önemli aşaması olan bu evrede spermatid morfolojisinde birçok değişiklikler meydana gelir. Hücre çekirdeği uzar, nükleozomların histon proteinleri protaminler ile yer değiştirir ve kromatin

yoğunlaşması olur. Bu değişim sonucunda nükleusta transkripsiyon sona erer. Spermatid sitoplazması, seminifer tübül epitelinin luminal bölgesine doğru yer değiştirir. Kuyruğun gelişimi devam eder. Flagellum hareketi için enerji kaynağı olan mitokondriler flagellumun proksimal kısmında toplanırlar ve spermin orta parça bölgesini oluştururlar.

Olgunlaşma evresi: Bu evrede spermatid sitoplazması ve hücreler arası oluşan köprüler uzaklaştırılır. Sertoli hücreleri fazla sitoplazma kısmını fagosite eder. Hareketsiz ve henüz fertilizasyon yeteneğine sahip olmayan spermiyumlar seminifer tübül lümenine salınır. Seminifer tübüle salınan spermiler, epididimise taşınırlar. Burada yaklaşık 2 haftalık bir olgunlaşma sürecine girerler ve ileri hareket yeteneği kazanırlar. Dölleme yeteneklerini ise dişi genital yollarındaki kapasitasyondan sonra kazanırlar.

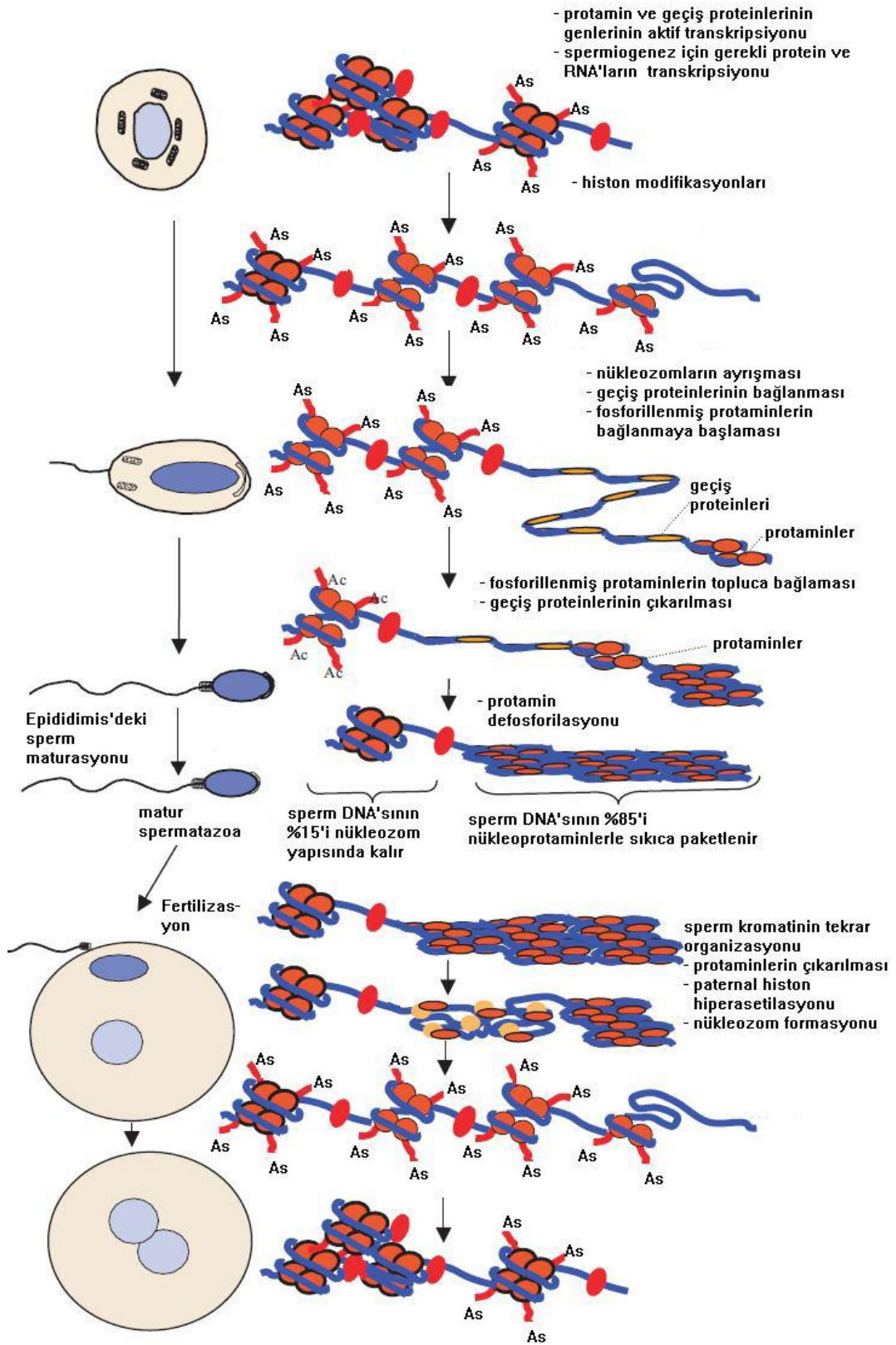
2.2.4 Spermatogenez hormonal faktörler

Spermatogenezin gerçekleşmesinde FSH, LH, testosteron ve androjen taşıyıcı proteinlerin önemli rolleri vardır. Pubertede LH, seminifer tübüllerin arasında yer alan interstisyel dokudaki Leydig hücrelerini uyararak testosteron salgılanmasını sağlar. FSH ve testosteron normal spermatogenez için yaşamsal öneme sahiptir. Germ hücrelerinde FSH ve testosteron reseptörleri bulunmaz. Seminifer tübüller içinde sadece Sertoli hücreleri testosteron ve FSH için reseptörlere sahiptir. Bu nedenle Sertoli hücreleri, spermatogenez düzenleyen hormonal sinyaller için ana hedef ve spermatogenezin primer düzenleyicisidir. Seminifer tübül içinde yüksek testosteron seviyesi (dolaşımdaki miktarının yaklaşık 200 kat fazlası), sperm üretiminin devamlılığını sağlar ve spermatogenik hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için gereklidir. Sertoli hücreleri, androjen bağlayıcı proteini salgılar. ABP, androjenleri (testosteron veya dihidrotestosteron) bağlar ve ABP-androjen kompleksi gelişen spermatogenik hücrelerin çevresinde yüksek androjen seviyelerini sağlar. FSH, Sertoli hücrelerinden inhibin ve aktivin üretimini başlatır. İnhibin, hipofizyal FSH salınımı üzerine negatif feed-back etkisi yapar. Aktivin ise ters bir etkiye sahiptir.

2.3. Spermiyogenez Sırasında Histon-Protamin Değişimleri

Spermiyogenezin ilk evrelerinde, haploid spermatidler, tüm somatik hücrelere benzer bir nükleozomal kromatin yapısına sahiptir ve RNA transkripsiyon aktiviteleri vardır. Daha sonra spermiyogenez ilerledikçe spermatid nükleusu yeniden düzenlenir ve nükleer yoğunlaşma gerçekleşir. Bu süreçte önce spermatid DNA'sında histon hiperasetilasyonu gerçekleşir. Sonra nükleozomlar yavaş yavaş ayrışır. Topoizomeraz II adlı endonükleaz, DNA'nın süper heliks yapısını gevşetir. Bu arada transizyon (geçiş) proteinleri (TNP'ler), DNA'ya bağlanır ve kompleks oluşturur. Spermiyogenezin son safhasında ise TNP'ler, protaminlerle yer değiştirerek oldukça sıkı bir nükleoprotamin kompleksi oluştururlar. Böylece DNA'nın yüksek derecede sıkılaştırılması transkripsiyonu engellemektedir. Protaminler DNA'ya bağlanmadan önce fosforillenir ve nükleoprotamin olgunlaşmasıyla birlikte protaminler defosforile olurlar (Şekil 2.3). Protaminler DNA'ya bağlandıktan sonra kurulan disülfid bağları, nükleoprotamin kompleksini daha da sağlamlaştırır (Akama ve ark., 2010). Sperm kromatinin protaminasyonu, sperme özgü bir epigenetik düzenlemedir. Böylece sperm DNA'sını nükleaz sindirimine ve radyasyona karşı dirençli hale getirir (Rathke ve ark., 2010).

Spermin çekirdek hacmi somatik hücrelerin çekirdeğine göre küçük yapıdadır ve çekirdek DNA'sının sarmallanması somatik hücrelerden çok farklıdır. Spermiyogenezis sırasında spermatid kromatin yapısı yeniden düzenlenmekte ve çekirdek DNA'sı protaminler tarafından sarılarak yeniden paketlenmektedir. Sperm çekirdek DNA'sının somatik histonlar yerine protaminler ile sarmallanması, DNA'yı oldukça sıkılaştırmakta ve böylece DNA hasarına yol açan ajanların geçişini azaltmaktadır. Protamin sarılması ve DNA halkalarının da disülfid bağları ile çapraz bağlanması, sperm çekirdeğindeki olgunlaşmanın son safhası ve epididimal geçiş sırasında çekirdek stabilitesinin daha da fazla artmasını sağlamaktadır (Loir ve Lanneau, 1984).



Şekil 2.3. Spermin oluşumundan fertilizasyon sonrasına kadar olan süre içindeki DNA'da meydana gelen değişiklikler (Mezquita, 1985; Poccia, 1986).

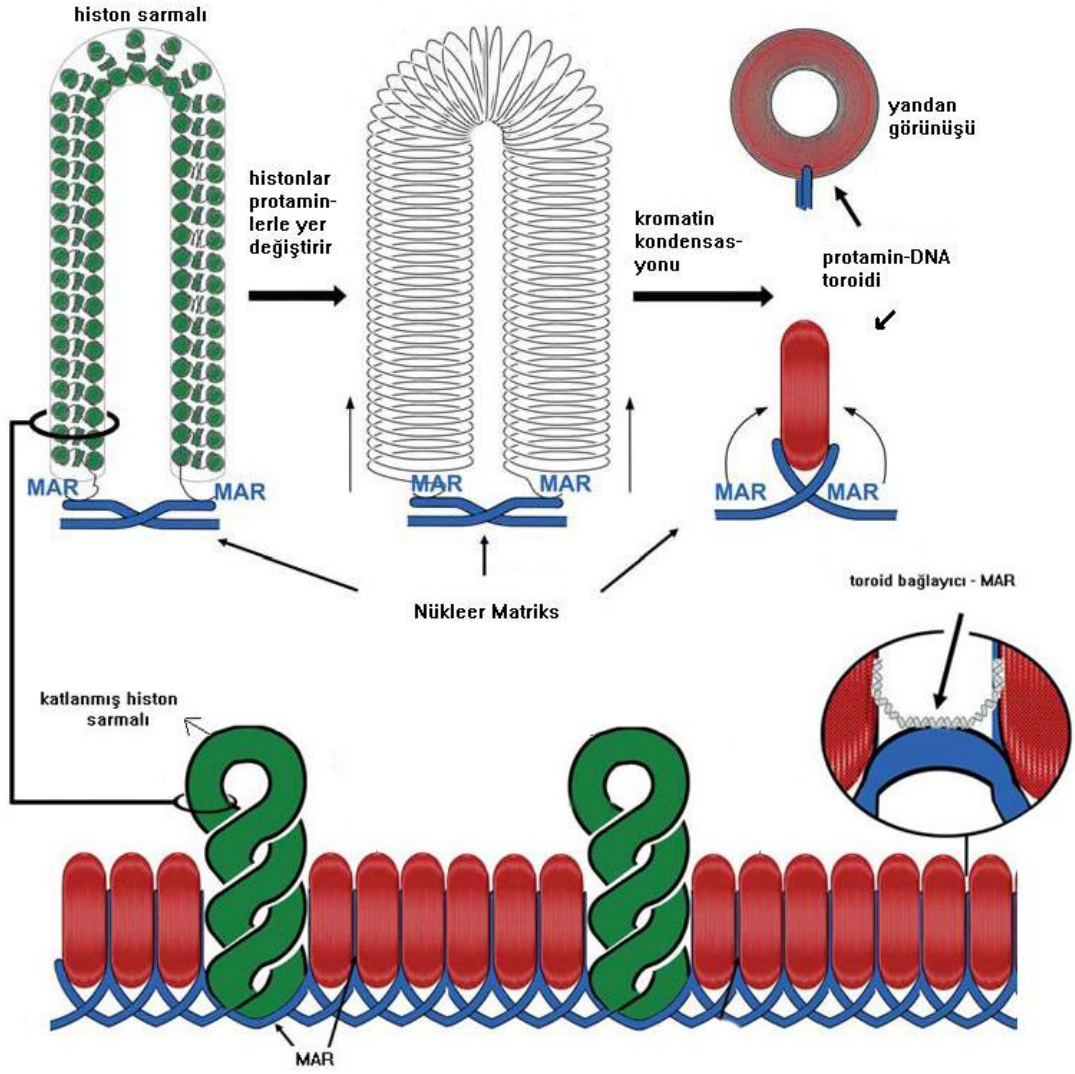
2.4. Sperm Kromatin Yapısı

Memeli sperm kromatini başlıca üç ana yapısal bölgeye ayırılır: protamine bağlı DNA, histona bağlı DNA ve nükleer matriks tutunma bölgeleri (MAR) (Ward, 2009). Mevcut veriler, son iki yapısal elementin fertilizasyon sonrasında erkek pronükleusuna aktarıldığını ve önemli işlevsel rolleri olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.4).

Sperm hücresinde bulunan histonların %90-95'i arjininden zengin ve sperm hücresine özgü olan protamin adı verilen nükleer proteinlerle yer değiştirmektedir. Sperm DNA'sında histonların protaminlerle yer değiştirmesi spermatozoayı kimyasal ve fiziksel hasarlardan korunmada önemlidir. Sperm DNA'sı protaminler ile 'can simidi' gibi yan yana dizilim gösteren 50 kb büyüklükte toroidler şeklinde sarmalanmıştır (Mudrak ve ark., 2009).

Sperm DNA'sının yaklaşık %10-15'i histonlara bağlı kalır ve daha gevşek bir yapıya sahip olan bu kromatin dizileri fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminde rol almaktadır (Gatewood ve ark., 1987; Gineitis ve ark., 2000).

Sperm ve somatik hücrelerde kromatin her 20-120 kb boyunca, proteinli nükleer matriks adı verilen bir yapıya bağlı DNA düğüm bölgesi oluştururlar. Her bir protamin toroidi tek bir DNA düğüm bölgesi içerir. Her bir protamin toroidi arasında nükleaza duyarlı bir kromatin segmenti bulunur (Sotolongo ve ark., 2005). Bu 'toroid bağlayıcı' olarak isimlendirilmiştir. Bu bölge ayrıca DNA'nın nükleer matrikse bağlanma bölgesi yani MAR'dır. Bu bağlayıcı bölgeler, DNA hasarına karşı oldukça eğilimlidir. Enzimatik veya oksidatif hasar, tekli (ssDNA) veya çift iplikli kopmalara (dsDNA) neden olabilir (Lone ve ark., 2017). Bu bölgenin iki önemli görevi vardır. Birincisi DNA ve nükleer matriks arasındaki ilişkiyi sağlar. İkincisi MAR döllemeden sonra sperm DNA bütünlüğü için kontrol noktası olarak görev yapmaktadır (Ward, 2009).



Şekil 2.4. Sperm kromatinin başlıca üç ana yapısal elementi (Ward, 2009).

2.5. Sperm DNA Hasarı

Sperm DNA bütünlüğü genetik materyalin gelecek nesillere başarılı bir şekilde aktarılması, fertilizasyonun düzgün bir şekilde gerçekleşmesi, kaliteli embriyo gelişimi ve gebeliğin sağlanması açısından önemlidir. Sperm oluşumu sürecinde DNA’da çeşitli sebeplerden dolayı farklı düzeylerde hasarlar meydana gelmekte ve bütünlüğünü kaybedebilmektedir. Kromatin ve DNA bütünlüğünün incelenmesi klinik olarak iki ana nedenden dolayı büyük öneme sahiptir. İlk olarak, insan

spermiyumunda DNA onarım sistemi yoktur ve bu nedenle DNA hasarlı spermiyum, normal ve ART (Yardımcı Üreme Teknikleri) ile oluşan gebelik sırasında fertilizasyon sürecine katılabilir. Bu, DNA hasarlı spermiyum gebelikten sonra embriyo gelişimini etkilemesine veya bu hasarların bir sonraki nesillere aktarılmasına yol açabilir. Dolayısıyla infertil çiftlerin tedavisinde, sperm DNA hasarının değerlendirilmesi çocukluk çağı kanser ve doğum defektleri riskinin belirlenmesinde önem taşımaktadır. İkincisi DNA fragmentasyon oranının, normal ve ART gebelik sonrası infertilite, fertilizasyon başarısızlığı ve düşüklerle güçlü pozitif korelasyona sahip olduğu tanımlanmıştır (Simon ve ark., 2014). Sperm DNA hasarının oluşmasını sağlayan üç mekanizma öne sürülmüştür. Bunlar: anormal kromatin paketlenmesi, başarısız apoptozis ve oksidatif stres.

Anormal kromatin paketlenmesi: Spermiyogenez sırasında, haploid spermatidler, kromatinin DNA'dan histonların çıkartılıp, geçiş proteinleriyle ve daha sonra protaminler ile yer değiştirildiği bir dizi modifikasyon geçirmektedir (Schulte ve ark., 2010). Protaminler tarafından sağlanan sıkı paketlenme sebebiyle, bu proteinlerin herhangi bir modifikasyonu veya yokluğu, spermiyum nükleusunun paketlenme işleminde bir anormalliğe yol açmaktadır ve sperm morfolojisi ile fertilizasyon kapasitesini etkilemektedir (Kazerooni, 2009). Yüksek oranda arjinin amino asiti içeren, pozitif yüklü olan protaminler sadece olgun spermiyumlarda bulunur ve paternal genomun paketlenmesinde görev alırlar. P1 ve P2 olmak üzere 2 çeşit insan protamini bulunmaktadır. P1/P2 oranı fertil bireylerde yaklaşık bire eşittir ve bu oran spermin dölleme kabiliyeti ile önemli bir ilişkiye sahiptir (Aoki ve ark., 2006). Protamin eksikliği ve protamin paketlenme yetersizliği infertil erkeklerde gözlenmiş olup anormal protaminasyon ile sperm DNA hasarı arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar değişmiş P1/P2 oranı ya da P2 yokluğunun olması halinde artmış sperm DNA fragmentasyonu, düşük dölleme oranları, düşük embriyo kalitesi ve düşük gebelik oranları gözlenmiştir (Simon ve ark., 2011). Ayrıca infertil erkeklerde sperm histon-protamin değişimi oranının artmış olduğu, infertil erkeklerin %5-15'inde protamin eksikliği bulunduğu tespit edilmiştir (Tesarik ve ark., 2002).

Oksidatif stres: Araştırmalarda infertil erkeklerin %25-40'ının spermiyumunda ROS düzeyinin yüksek bulunduğu ve sperm morfoloji ile motilitesi üzerine olumsuz

etkileri olduğu bildirilmiştir (Moein ve ark., 2007; Sharma ve Agarwal, 1996). Olgunlaşmamış spermelerde DNA hasarı ve ROS üretimi yüksektir. Bu artış özellikle disülfid bağlarının ve protaminasyonun azalmasıyla görülen DNA fragmentasyonu ve kötü semen kalitesiyle ilişkilendirilmiştir (Agarwal ve Said, 2005). Ayrıca aşırı ROS üretimi, sperm morfolojisi, motilitesi ve sayısını olumsuz etkilemektedir (Agarwal ve Said, 2005; Maneesh ve Jayalekshmi, 2006). Genellikle prostat ve seminal bezden köken alan lökositler yüksek düzeyde ROS üretmektedirler. Kontrolsüz ve aşırı ROS üretimi spermelerde lipid, protein ve karbonhidrat peroksidasyonuna, DNA hasarı ve apoptoz gibi patolojik etkilere sebep olur. Fizyolojik etki ise düşük seviyelerde ROS üretimi ile ilişkilidir. Düşük ROS üretimi olgunlaşma, kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyonu gibi birçok olayda gereklidir (Baker ve Aitken, 2004; Ford, 2004; Hammadeh ve Hamad, 2009; Kothari ve ark., 2010; Pourova ve ark., 2010; Tvrdá ve ark., 2011). Spermium, oksidatif strese DNA'sını iki savunma mekanizması ile korur. Bunlardan biri DNA'nın sıkı yapıda olması, diğeri ise seminal plazmadaki antioksidanların bulunmasıdır.

Apoptozis: Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis hücre membran bütünlüğünün korunduğu, fizyolojik ve patolojik şartlarda ortaya çıkabilen, enerji gerektiren bir hücresel süreçtir. Apoptozise uğrayan hücreler morfolojik ve biyokimyasal değışiklikler gösterirler ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Ancak komşu hücrelere zarar verilmez. Apoptozis sırasında gerçekteşen morfolojik olaylar; hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin oluşmasıdır. Biyokimyasal değışiklikler ise DNA fragmentasyonu, hücre iskeletinin yıkılması ve hücre membranı değışiklikleridir. Erkek üreme sisteminde apoptozis, anormal gelişim gösteren ve yaşlanan spermatogenik hücrelerin eliminasyonunu sağlar, bu tip hücrelerin aşırı üretimini engeller ve testis içerisindeki hücre üretim dengesini korur. Apoptozisin spermatogenez sırasında iki görevi vardır. Bunlardan biri anormal spermatozoonları elimine etmek diğeri ise germ hücrelerinin sayısını Sertoli hücrelerinin destekleyebileceği sayıda sınırlandırmaktır. Testiste germ hücrelerinin %75'i apoptozise uğrar ve bu mekanizma ile bozuk germ hücreleri yok edilmiş olur. Radyasyon veya toksinlere maruz kalma gibi dış faktörler de germ hücre ölümüne sebep olur. Bunun yanısıra Fas-FasL etkileşimi sonucu germ hücre

ölümü gerçekleşmektedir (Lee ve ark., 1997). Apoptozis ile oluşan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında oluşur ve p53, p21, kaspaz, Bcl-2, Bcl-xl ve Fas ekspresyon düzeylerince değişik yollarla gerçekleşmektedir (Martincic ve ark., 2001; Print ve Loveland, 2000; Said ve ark., 2004). Anormal sperm parametrelerine (düşük sperm konsantrasyonu ve morfoloji) sahip kişilerde Fas ve p53 ekspresyon seviyeleri yüksek, normal değerlere sahip kişilerde ise düşük bulunmuştur (Sakkas ve ark., 2002).

2.6. Sperm DNA Bütünlüğünü Değerlendiren Testler

2.6.1 Anilin blue (AB)

Bu teknik lizin için spesifik bir pozitif reaksiyon sağlar ve insan spermatozoasının temel nükleer protamin bileşimindeki farklılıkları ortaya çıkarır. Anilin blue boyama ile arginin ve sistein bakımından zengin protaminlerin, lizin açısından zengin histonlardan ayrımı gerçekleştirilir. İmmatür sperm nükleuslar lizin içeren histonlar bulunduğundan daha koyu mavi renkte boyanırken, matür sperm nükleuslar arginin ve sisteinden zengin protamin içerdiklerinden daha açık renkte boyanırlar. Analiz için ışık mikroskobu yeterlidir. Anilin mavisi asidik bir boya olup basit ve ucuz bir tekniktir. Tekniğin en önemli dezavantajı heterojen boyanma olmasıdır. Spermde güçlü anilin mavi boyanması kromatinin gevşek paketlendiğini gösterir.

2.6.2 Toluidin blue (TB)

Katyonik, nükleer bir boya olan TB, sperm DNA'sında bulunan histonların fosfat gruplarına bağlanarak sperm kromatin yoğunlaşmasını açığa çıkarır. Işık mikroskopta kromatin yapısı sağlam spermiler açık mavi boyanırken, bütünlüğü bozulmuş kromatinler ise koyu mavi boyanır. Toluidin mavi boyama yöntemi ile akridine orange, sperm kromatin yapısı analizi ve TUNEL testleri arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir (Erenpreiss ve ark., 2004).

2.6.3 CMA3 (Kromomisin A3)

Kromomisin A3 guanin-sitozinden zengin bölgelere spesifik bir florokrom olup protaminden fakir DNA'nın indirek gözlenmesi yoluyla anormal kromatin paketlenmesini gösterir. CMA3 ve protaminler DNA içinde aynı bölgelere bağlanırlar. Bu nedenle güçlü CMA3 floresansı az protaminasyon düzeyini ve dolayısıyla gevşek paketlenmiş kromatin yapısını ortaya çıkarır.

2.6.4 COMET analizi (Tek hücre jel elektroforezi)

Prensip olarak yöntemde sperm hücreleri lam üzerinde agaroz içine gömülür ve alkali koşullarda lizis edilir. Lizise uğrayan hücrelerin elektroforezi yapılır ve DNA, floresan bir boya ile boyanır. Hasarlı DNA'lar mikroskopta kuyruklu yıldız şeklinde bir görüntü oluştururken, hasarsız DNA'lar kuyruk oluşturmazlar. Comet analizi nükleus çapı ve kuyruk uzunluğu esas alınarak yorumlanır.

2.6.5 Akridin orange (AO)

AO, nükleik asite özgü katyonik, floresan bir boya olup asit uygulanması sonrası oluşan DNA denatürasyonunu ölçer. Çift sarmal ya da tek sarmal DNA'ya bağlandığında eksitasyon ve emisyonu farklıdır. Metakromatik AO boyası çift zincir DNA'ya monomerik bağlanması sonucunda yeşil, tek zincir yani denatüre DNA'ya agregasyonu sonucunda ise kırmızı renkte floresan oluşur. Mikroskopik inceleme sırasında heterojen boyanmanın görüntüyü kötüleştirilmesi ve renklerin hızlı solması tekniğin dezavantajlarıdır.

2.6.6 Sperm kromatin dispersiyon (SCD)

SCD, sperm DNA fragmentasyonunu belirlemek için kullanılan basit, hızlı, pahalı olmayan, kesin ve tekrarlanabilir son zamanlarda tanımlanan yeni bir

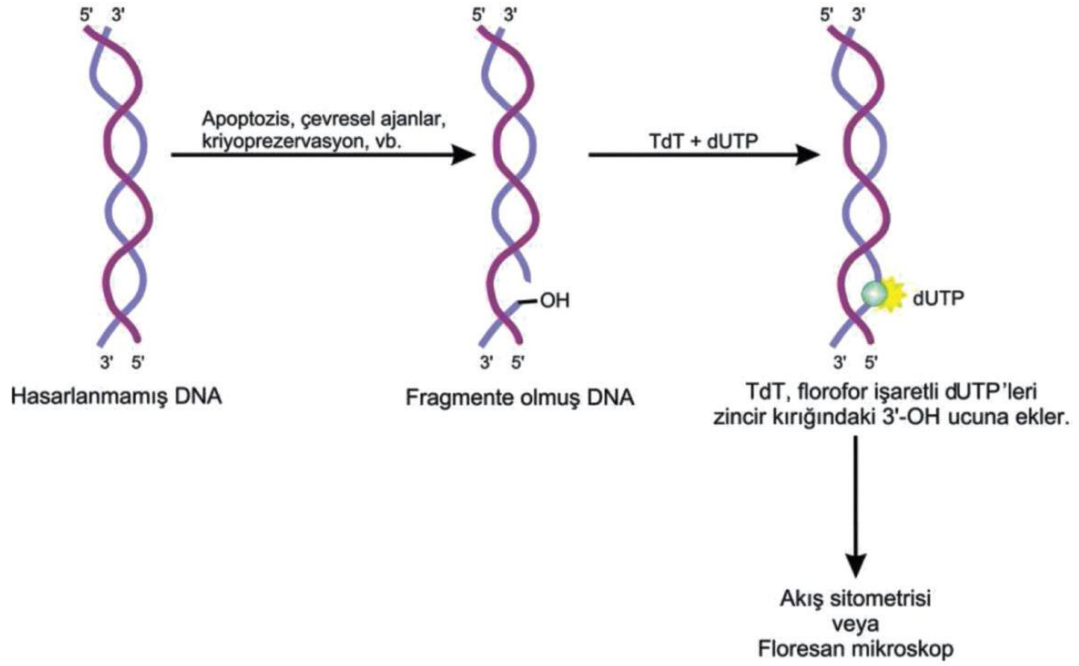
yöntemdir. Bu yöntem, denatürasyona bağlı olarak dağılmış DNA'nın oluşturduğu hale yapısının kontrolü prensibine dayanır. Oluşan haleler floresan ya da ışık mikroskopunda incelenir. Normal DNA'ya sahip spermiler geniş haleler oluşturur. Yoğun DNA fragmentasyonuna sahip spermelerde ise hale yoktur ya da çok küçüktür.

2.6.7 Sperm kromatin yapısı analizi (SCSA)

SCSA testi klinik olarak anlamlı dünyada en yaygın olarak kullanılan özel ekipman ve deneyimli personel gerektiren pahalı bir yöntemdir. SCSA analizi, denatüre olan DNA ısı veya asit ile mumele edildikten sonra akrinin oranı ile boyanması ve flow sitometrik analizine dayanmaktadır. Bu boya ile çift zincirli DNA yeşil floresan, tek zincirli DNA kırmızı floresan ışımı yapar. Bu analiz sonucunda DNA fragmentasyon indeksi (DFI) hesaplanır.

2.6.8 TUNEL analizi

Direkt olarak sperm DNA fragmentasyonunu gösteren ve apoptozu işaret eden TUNEL testi, tek ve çift zincir DNA kırıklarını belirlemek için flow sitometri ya da floresan mikroskop aracılığı ile doğrudan ölçme yöntemidir. Bu yöntem TdT enzimi tarafından katalize edilen bir reaksiyonla dUTP ile işaretlenmiş tek veya çift iplikli DNA kırıklarının saptanması prensibine dayanır (Şekil 2.5). Değerlendirme TUNEL pozitif ya da negatif sperm hücrelerinin yüzdesi şeklinde ifade edilir.



Şekil 2.5. TUNEL yönteminin mekanizması (Pınar İLİ, 2017).

2.7. İnfertilite ve Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, çocuk sahibi olmak isteyen evli çiftlerde bir yıl süre ile düzenli, korunmasız cinsel ilişkide bulunulmasına rağmen, gebelik gerçekleşmemesi durumudur. İnfertilite, primer ve sekonder olarak iki şekilde incelenir. Primer infertilite, hiç çocuk sahibi olunamaması, sekonder infertilite ise daha önce gebe kalmış daha sonra gebelik olmamasını tanımlamaktadır.

Normal bir çiftin gebe kalma şansı bir ay içerisinde %20-25, altı ay içerisinde %75, bir yıl içerisinde ise %90'dır (Gnoth ve ark., 2003; Wang ve ark., 2003). Kadın ve erkek için 24-25 yaşları fertilitenin en yüksek olduğu yaşlardır. Fertilité oranları kadınlarda 30 yaştan sonra, erkeklerde ise 40 yaştan sonra azalmaktadır. Ancak erkeğin üreme yeteneği ileri yaşlara kadar devam etmektedir (Denson, 2006). Genellikle bir yıl içerisinde korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalmayan çiftlerin oranı yaklaşık %15'dir. İnfertilite vakalarının yaklaşık yarısından erkek faktörü sorumlu tutulmaktadır.

İnfertilitede erkeğin değerlendirilmesi öykü, fizik muayene, semen analizi, genetik ve endokrin tetkiklerini kapsar. Erkek infertilitesinde öykü alırken değerlendirilecek faktörler Tablo 2.1’de listelenmiştir.

Semen analizi, erkek infertilitesini değerlendirmede en önemli tanısal yöntemdir. Semen analizi için örnek 2-7 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyonla alınmalı ve en geç 1 saat içinde değerlendirilmelidir. Semen analizleri arasındaki değişkenliklerden dolayı bir ay ara ile en az iki kez test yapılması önerilir. Semen analizinde WHO, Tablo 2.2’deki referans değerleri önermektedir. Semen incelenmesinde parametrelerden biri tanımlanan referans değerinin altında ise örnek anormal olarak adlandırılır. Sperm anormalliklerine ait tanımlamalar Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Erkek öykü

Yaş
Cinsel öykü
Genel sağlık (sistemlerin sorgulanması, bilinen sistemik hastalıklar)
Çocukluk hastalıkları ve gelişim öyküsü
Konjenital anormallikler
Toksinlere maruz kalma durumu (sitotoksik kemoterapi, pestisid, radyasyon)
Geçirilmiş operasyonlar (vazektomi, orşiektomi)
Geçirilmiş enfeksiyonlar ve tedavisi (kabakulak orşiti, seksüel geçişli hastalıklar, genitoüriner enfeksiyonlar)
Kullanılan ilaçlar ve allerjiler

Tablo 2.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2010) normal semen referans değerleri

Parametreler	En düşük referans değerleri
Semen hacmi (ml)	$\geq 1,5$
Total sperm sayısı (10^6)	≥ 39
Sperm konsantrasyonu ($10^6/\text{ml}$)	≥ 15
Toplam hareketlilik oranı (ileri hareketli (PR)+yerinde hareketli (NP))	$\geq 40\%$
Progresif motilite oranı (PR, %)	$\geq 32\%$
Canlılık testi	$\geq 58\%$
Normal morfolojide sperm	$\geq 4\%$ (Krugerin kriteri)
Ejakulat pH	$\geq 7,2$
Lökosit ($10^6/\text{ml}$)	< 1

Tablo 2.3. Semen Sınıflaması Terminolojisi

Normozoospermi: Sperm sayısı, hareketlilik ve morfolojinin normal referans değerlerinin üstünde olması.
Oligozoospermi: Sperm hücrelerinin sayı olarak azlığını ifade eder.
Astenozoospermi: Sperm hücrelerinin hareket azlığını ifade eder.
Teratozoospermi: Normal morfoloji yüzdesinin, referans değerinin altında olmasını ifade eder.
Oligoastenoteratozoospermi: Sperm sayısı, hareketlilik ve morfolojinin normal referans değerinin altında olması.
Azospermi: Ejakülatta hiç sperm bulunmaması
Aspermi: Hiç ejakulat elde edilememesi durumu
Kriptoospermi: Santrifüj sonrası ilk değerlendirmeye göre ejakülatta birkaç sperm elde edilmesi
Lökospermi: Ejakülatta lökosit bulunması.

2.7.1 Erkek infertilitesinin nedenleri

Erkek infertilitesine; varikozel, açıklanamayan infertilite, ileri yaş, inmemiş testis, immünolojik faktörler, ejakülasyon bozukluğu, genetik hastalıklar, testis kanseri, ilaç kullanımı, madde bağımlılığı, kemoterapi, radyasyon etkisi, sigara, alkol kullanımı ve endokrin bozukluklar vs. neden olabilmektedir.

2.7.1.1 Varikozel

Varikozel spermatik kordun pampiniform pleksusunun dilatasyonu olarak tanımlanır. İnfertil erkeklerde daha yaygın görülmektedir ve semen analizlerinde de anormallikler tespit edilmiştir. Boman ve arkadaşları, toplam 118 klinik varikozel ve astenozoospermi (%50'den az motil sperm) infertil çiftlerin klinik sonuçlarını bildirmişlerdir. Toplam hareketli sperm sayısı ve gebelik oranı varikozel ameliyat olan erkeklerde ameliyat olmayan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Boman ve ark., 2008). Benzer şekilde Baazeem ve arkadaşları, toplam 460 varikozeli bulunan oligozoospermi erkeklerin klinik sonuçlarını bildirmiştir. Çalışmada varikozel tamiri, ortalama sperm konsantrasyonu ve motilitede anlamlı bir artışa neden olmuştur ($p<0,05$). Ancak gruplar arasında gebelik oranlarında herhangi bir farklılık kaydedilmemiştir (Baazeem ve ark., 2009).

2.7.1.2 Kriptorşidizm

Testisin karın içerisinde ve inguinal kanalda kalarak skrotum içine olan inişini tamamlayamadığı, en sık görülen konjenital genitoüriner sistem anomalisidir. Kriptorşidizm, spermatogenezisde bozulma ve testiküler tümör riskinde artış ile ilişkilidir.

2.7.1.3 Diabetes mellitus (DM)

Yapılan çalışmalarda DM'nin spermatogenez ve sperm kalitesinde bozulmaya, yüksek oranda nükleer DNA hasarlı spermilere, kan-testis bariyerinde değişmiş glukoz metabolizmasına, testosteron sentez ve salgısında azalma ve libidoyu azaltarak erkek infertilitesine neden olduğu bildirilmiştir. Bu değişimlere DM'ye bağlı oksidatif stres ve hormonal değişikliklerin sebep olduğu düşünülmektedir (Alves ve ark., 2013; Khaki ve ark., 2009; Singh ve ark., 2016). Diyabetik hastalarda genellikle aşırı ROS üretiminin yanı sıra antioksidan savunma seviyelerinde azalma görülmektedir. DM'nin görülme oranındaki artışın fertilitede azalmayla yakından ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Dias ve ark., 2014; Jangir ve Jain, 2014). Tip I ve Tip II DM'li genç erkeklerde artan diyabet oranı üreme sağlığını negatif etkiliyor olması, yakın gelecekte DM'ye bağlı fertilité problemlerinin artacağı tahmin edilmektedir.

2.7.1.4 Yaşam biçimi

Son zamanlarda araştırılan yaşam biçimi davranışları erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmiştir ve bunlar sigara, alkol, madde bağımlılığı, obezite, stres, ısı ve elektromanyetik radyasyona maruz kalma ile ilgilidir.

Sigara; sigara kullanımının seminal plazma, sperm parametreleri ve infertilite ile ilişkisi olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Ramlau-Hansen ve arkadaşları sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı ve sperm motilitesinin sigara içenlerde önemli oranda düştüğünü bildirmişlerdir (Ramlau-Hansen ve ark., 2007). Ghaffari ve Rostami, sigara içenlerde spermdeki kreatin kinaz aktivitesinin azaldığını ve sperm motilitesini etkilediğini göstermişlerdir (Ghaffari ve Rostami, 2013). Sigara içenlerin semen örneklerinde lökosit konsantrasyonlarında ve ROS seviyelerinde artış gözlenmiştir. Aynı zamanda sigara dumanı ve içerikleri oksidatif DNA hasarına yol açmaktadır (Perrin ve ark., 2011; Phillips ve Venitt, 2012).

Alkol; aşırı alkol kullanımı erkeklerde testis atrofisine, libidonun azalmasına ve sperm hacmi, sayısı ve hareketinde azalma ve sperm morfolojisinde bozulmaya yol açarak infertiliteye neden olmaktadır.

Obezite; adipoz dokunun kasık bölgesinde birikmesi, testisin ısınmasına neden olup sperm üretim ve kalitesinin düşmesine yol açmaktadır. Obezitenin infertilite üzerine etkileri tam olarak aydınlatılmamıştır. Erkek obezitesi ile ilişkili olduğu sperm sayı ve hareketinin azaldığı gözlenmiştir.

Çevresel Zararlı Maddeler; organik civa, pestisitler, kurşun, uçucu organik çözücüler, yapıştırıcılar, böcek ilaçları ve silikon gibi maddeler erkek infertilitesine neden olan faktörlerdir.

Elektromanyetik Radyasyon; uzun süre cep telefonu kullanımı sperm sayısını, motilitesini azalttığı ve normal morfolojiyi bozduğu bildirilmiştir. Bu etkilere ROS seviyesindeki yükselme ve total antioksidanlardaki düşme sebep olabilmektedir (Agarwal ve ark., 2009).

Enfeksiyonlar; genital sistem enfeksiyonları, erkek fertilite bozukluklarının yaygın nedeni olarak kabul edilir ve %6-10'luk bir sıklığa sahiptir (Schuppe ve ark., 2017). Semende artmış lökosit sayısı azalmış sperm kalitesi ile ilişkilidir. Semende lökosit varlığı ROS üretimine neden olan başlıca kaynaktır. Bu nedenle sperm hareketini ve DNA bütünlüğünü bozabilir (Kessopoulou ve ark., 1992). Yakın dönemde yapılan çalışmalarda Chlamydia trachomatis, Ureaplasma spp., human papilloma virüs, HIV, hepatit B ve C virüsü ve human sitomegalovirüs sperm kalitesi, konsantrasyonu ve motilitesini azaltarak infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (Gimenes ve ark., 2014).

İmmünolojik Faktörler; erkeklerde orşit, testiküler travma veya torsiyon, vazektomi uygulamaları, genital yol ve prostat enfeksiyonları, testis biyopsi ve varikosel gibi problemler sperm hücrelerine karşı antikor oluşmasına sebep olabilir. Bu antisperm antikorlar, sperm fonksiyonunu bozabilir ve sperm parametrelerini olumsuz yönde etkileyebilir dolayısıyla infertiliteye neden olabilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi Üroloji Polikliniğine ve özel bir hastanenin kadın doğum ünitesi üremeye yardımcı teknikler merkezine başvuran erkek hastalara ait arta kalan semen örnekleri kullanıldı. Çalışma için Yakın Doğu Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Etik Kurul’undan onay alınmıştır (Ek 1). Örnek alınan her hastaya Bilgilendirme Formu verildi (Ek 2). Kendi rızasıyla kabul eden ve imzalayan gönüllü hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastaların semen örnekleri en az 3 günlük cinsel perhiz sonrası steril kaplara alındı. Örnekler likefiye olması için 37 °C’lik etüvde 30 dakika kadar bekletildi. Hastalara ait spermiyogram değerlendirmeleri için Dünya Sağlık Örgütü WHO, 2010 kriterlerine göre yapıldı. Sperm örneklerinden alınan ince yaymalar fiksasyondan sonra Spermac boyası ile boyandı ve sperm morfolojileri ışık mikroskopta x100 objektif büyütmesi ile incelendi. Değerlendirmelere göre 70 hastaya ait semen örnekleri; 35 fertil grup ve 35 infertil grup olacak şekilde iki gruba ayrıldı. Gruplara ait hasta tayini için anket formu hazırlandı (Tablo 3.1). Fertil ve infertil gruplara sperm DNA bütünlüğünü belirlemek için asidik Anilin blue (AB), Toludin blue (TB) ve TUNEL boyamaları yapılarak ışık ve floresan mikroskobu ile değerlendirildi. x100 objektif büyütmesi ile rastgele seçilen alanlardan (+) veya (-) boyanan toplam 100 adet sperm sayıldı. Gruplar arası anlamlı fark olup olmadığı ve boyamaların birbirleriyle korelasyonu istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Tablo 3.1. Fertil ve İnfertil grubu tayini için kullanılan anket formu

ADINIZ, SOYADINIZ:				
YAŞINIZ:				
MESLEĞİNİZ:				
KİLONUZ:				
BOYUNUZ:				
Evli misiniz?	Evet ☐	Hayır ☐		
Çocuğunuz var mı?	Evet ☐	Hayır ☐		
İş yerinizde direk ya da indirek kimyasal maddelerle (kurşun, civa, pestisitler vs.) temasınız var mı?				
	Evet ☐	Hayır ☐		
İş yerinizde radyasyona maruz kalıyor musunuz?	Evet ☐	Hayır ☐		
Ağır stres, yorgunluk, uykusuzluk probleminiz var mı?	Evet ☐	Hayır ☐		
Kemoterapi veya Radyasyon tedavisi aldınız mı?	Evet ☐	Hayır ☐		
Sigara içiyor musunuz?				
Evet ()	Hayır ()		Bırakmış ()	
Evet veya bırakmış ise günde kaç adet ve süresi:				
Alkol kullanıyor musunuz?				
	Evet ☐	Hayır ☐		
Evet ise günlük miktarı ve süresi:				
Sürekli kullandığınız ilaç var mı?				
	Evet ☐	Hayır ☐		
Varsa nedir ve ne kadar zamandır kullanıyorsunuz?				
Allerjiniz var mı? İlaç, Astım, Penisilin vs.				
	Evet ☐	Hayır ☐		
Evet ise neye karşı?				
Sistemik bir hastalığınız var mı? Yüksek tansiyon, şeker hastalığı vs.				
	Evet ☐	Hayır ☐		
Evet ise nedir?				
Son 3 ay içinde geçirdiğiniz ateşli hastalık var mı?				
	Evet ☐	Hayır ☐		
Herhangi bir nedenle ameliyat oldunuz mu?				
	Evet ☐	Hayır ☐		
Ameliyat olduysanız tarih ve buna bağlı tedavi gördünüz mü?				
Varikosel var mı?				
	Evet ☐	Hayır ☐		
Evet ise derecesi nedir ve neyle (Fizik muayene/Skrotal doppler USG) tanı konuldu?				
Varikosel ameliyatı (tek taraflı/çift taraflı) oldunuz mu?				
	Evet ☐	Hayır ☐		
Evet ise ne zaman ve kaç defa oldunuz (2 veya daha fazla)?				
Cinsel perhiz süreniz?	1 gün ☐	2 gün ☐	3 gün ☐	4gün ☐
5 gün ve daha fazla ☐				

3.1.Semen Analizi Makroskopik Değerlendirme

Semen örnekleri, likefaksiyon, görünüm, hacim, viskozite ve pH açısından makroskopik olarak değerlendirildi.

3.1.1 Likefaksiyon

Sperm örnekleri oda ısısında veya 37 °C'lık etüvde 15-60 dakika likefiye olması beklendi.

3.1.2 Viskozite

Likefaksiyondan sonra semen örneği 5 ml'lik bir pipete çekildi. Yer çekimi etkisiyle damlamaya bırakıldı ve oluşan ipliği gözleyerek örneğin viskozitesi değerlendirildi. Anormal viskozite artışında damla 2 cm'den uzun iplikcik oluşturmaktadır. Viskozite; 1-2 cm'lik bir uzama varsa +1, 2-4 cm'lik bir uzama varsa +2, 4 cm üzeri bir uzama varsa +3 şeklinde değerlendirildi.

3.1.3 pH

Likefaksiyondan sonra bir damla semen örneği pH kağıdı üzerine damlatıldı ve 30 saniye içinde renk değişimi kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırılarak pH tayin edildi. Semen pH değeri 7,2-8,0 arasındadır.

3.1.4 Görünüm

Normal likefiye olmuş semen örneği homojen ve gri-opelesan görünümündedir. Semen rengi sarı-yeşil ise enfeksiyon lehine, kahverengi-kırmızı ise eritrosit lehine yorumlanır.

3.1.5 Hacim

Steril enjektör veya dereceli pipete çekilerek semen örneğinin hacmi ölçüldü.

3.2.Semen Analizi Mikroskopik Değerlendirme

Sperm konsantrasyonu ve motilite WHO kriterlerine göre belirlenerek Makler sayım kamarası kullanılarak faz-kontrast mikroskobu ile değerlendirildi.

3.2.1 Konsantrasyon

Makler sayım kamarasının ortasına 1 damla semen örneği damlatılıp üst kapak kapatılarak x20 objektif büyütmesinde en az 10 karede sayım yapılarak mililitredeki sperm sayısı tespit edildi. Sperm konsantrasyonunun total hacim ile çarpımından total sperm sayısı hesaplandı. İnfertil gruba sperm konsantrasyonu 30 M/ml altında olan hastalara ait semen örnekleri çalışmaya dâhil edildi.

3.2.2. Motilite

Hareketlilik değeriendirilmesi için numunenin likefaksiyonundan 30 dakika sonra faz-kontrast mikroskobu ile x20 objektif büyütmesinde makler sayım kamarası kullanılarak sperm hareketliliği saptanmıştır. Spermiler ileri (progresif) hareketli, yerinde (nonprogresif) hareketli ve hareketsiz (immotil) şeklinde sınıflandırıldı. WHO kriterlerine göre infertil gruba ilerleyici hareketlilik değeri %32'den az olan hastalar alınarak çalışmaya dâhil edildi.

3.2.3 Aglütinasyon

Hareketli spermilerin antisperm antikorlarının bağlanmaları nedeni ile baş-başa, kuyruk-kuyruğa veya karışık şekilde birbirlerine yapışmalarıdır. İmmünolojik infertilite nedeni ile kümelenme olabilir.

3.2.4 Morfoloji

Morfolojik değeriendirme için semen örneğinden lam üzerine 1 damla damlatılıp lamelle yayılarak havada kurutuldu ve Spermac boyama yöntemi ile boyandı. Hazırlanan yaymalar fiksatif solüsyonunda 5 dakika bekletildi. Fiksatif, su ile uzaklaştırıldıktan sonra sırasıyla A, B ve C solüsyonlarında 1,5 dakika boyama işlemi yapıldı. Her solüsyondan sonra yıkama işlemi yapıldı. Yaymalar iyice kuruduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak x100 objektif büyütmesinde en az 100 sperm hücresi incelenerek baş, boyun, kuyruk anomalileri ve normal morfolojideki spermilerin yüzdesi hesaplandı. Değeriendirme sonrası infertil grup için normal sperm morfolojisi %4'ün altında olan hastalar çalışmaya dâhil edildi.

3.3. Boyaların Hazırlanışı ve Boyama Yöntemleri

3.3.1. Asidik Anilin Mavisi Boyama

1. Öncelikle fosfatlı tampon çözeltisi pH'sı 7,2 olan PBS solüsyonu hazırlandı.
2. 5 gr Anilin mavisi 100 ml PBS ile karıştırılıp boya çözeltisi kaynayınca kadar ısıtıldı ve soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra karışım filtre kağıdı ile süzülerek bir şişede 2 ay süre ile muhafaza edildi.
3. Boya %100'lük asetik asitle titre edilerek pH'sı 3,5'e getirildi.
4. Tespit için %25'lik hazır gluteraldehitden 12 ml alınıp PBS ile karıştırılarak 100 ml'ye tamamlandı ve %3'lük gluteraldehit elde edildi.
5. Her hastaya ait semen örnekleri 1200 devirde 5 dakika santrifüj sonrası PBS ile yıkama yapılarak lam üzerine 1 damla örnek damlatılıp ince yaymalar hazırlandı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.
6. Kuruyan preperatlar %3'lük gluteraldehit ile 30 dakika tespit edildi.
7. Fiksasyon sonrası 10 dakika pH 3,5 olan asidik anilin mavisi ile boyama işlemi yapıldı.
8. Preperatlar 2 kez PBS de yıkandı ve kurumaya bırakıldı.
9. Mikroskopta immersiyon yağı damlatılarak x100 objektif büyütmesinde rastgele seçilen alanlardan toplam 100 adet sperm incelenerek pozitif ve negatif şeklinde değerlendirildi.
10. İncelenen örneklerde anormal kromatin kondensasyonu gösteren sperm hücreleri asidik Anilin mavisi ile koyu mavi (+) boyanırken, normal kromatin kondensasyonu gösteren sperm hücreleri ise açık mavi (-) boyandı. Asidik Anilin mavi boyaması ile koyu boyanan (+) spermler kromatin kondensasyonu bozuk şeklinde değerlendirildi.

3.3.2. Toluidin Mavisi Boyama

1. Öncelikle %50'lik Mcvallin tamponu (pH=3,5) hazırlandı. 1,395 gr sitrik asit ile 1,272 gr disodyum hidrojen fosfat karışımı üzerine 100 ml distile su eklendi.
2. Hazırlanan 100 ml Mcvallin tampon ile 50 mg toluidin mavisi karıştırılıp boya hazırlandı.

3. Zayıf asit olarak 0,1 N HCL ve tespit için etanol/aseton (1:1) karışımı hazırlandı.
4. Her hastaya ait semen örnekleri 1200 devirde 5 dakika santrifüj sonrası PBS ile yıkama yapılarak lam üzerine 1 damla örnek damlatılıp ince yaymalar hazırlandı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.
5. Kuruyan preparatlar 1 saat süre ile etanol/aseton (1:1) karışımı ile fiks edildi.
6. Fiksasyon sonrası havada kurutulan preparatlar +4 derecede bulunan 0,1 N HCL içerisinde 5 dakika hidroliz edildi.
7. Preparatlar 3 kez 2'şer dakika distile su ile yıkandı.
8. 5 dakika %0,05 toluidin mavisi içinde bekletildi ve distile su ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakıldı.
9. Mikroskopta immersiyon yağı damlatılarak x100 objektif büyütmesinde rastgele seçilen alanlardan toplam 100 adet sperm incelenerek pozitif ve negatif şeklinde değerlendirildi.
10. İncelenen örneklerde anormal kromatin kondensasyonu gösteren sperm hücreleri Toluidin mavisi ile koyu mavi (+) boyanırken, normal kromatin kondensasyonu gösteren sperm hücreleri ise açık mavi (-) boyandı. Toluidin mavi boyaması ile koyu boyanan (+) spermler kromatin kondensasyonu bozuk şeklinde değerlendirildi.

3.3.3. TUNEL Floresan Boyama

1. Her hastaya ait semen örnekleri 1200 devirde 5 dakika santrifüj sonrası PBS ile yıkama yapılarak pozitif şarjlı lam üzerine 1 damla örnek damlatılıp ince yaymalar hazırlandı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.
2. TUNEL floresan boyaması için çalışmada In situ cell death detection kit (Roche, Germany, Catolog No. 11 684 795 910) kullanıldı.
3. Tespit için yayma preparatları %4'lük paraformaldehit (ph=7,4) ile 1 saat oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletildi.
4. Fiksasyon sonrası preparatlar PBS ile 3 kez yıkandı ve Pap-Pen kalemi ile incelenecek alanlar işaretlendi.
5. %10'luk sodyum sitrat ile %0,1'lik Triton X-100 ile karıştırılarak hazırlanan geçirgenlik solüsyonu içinde 2 dakika buz üzerinde bekletildi.
6. Permeabilizasyon sonrası preparatlar PBS ile 3 kez yıkandı.

7. 50 µl Vial 1 enzim solüsyonu ile 450 µl Vial 2 label solüsyonu karıştırılarak hazırlanan TUNEL karışım solüsyonundan her bir örneğe 50 µl damlatıldı. Sonra işaretli alanların üzeri parafilm ile kapatılıp 1 saat 37 derece etüvde bekletildi.
8. PBS ile 3 kez yıkama yapıldı.
9. Hazırlanan örnekler 1 damla horseradish peroxidase damlatılarak lamel ile kapatıldı.
10. Örnekler floresan mikroskop ile x100 objektif büyütmesinde toplam 100 adet sperm incelenerek sayım yapıldı.
11. Normal hücre DNA'sına sahip sperm başları soluk yeşil floresan boyama, apoptotik hücre DNA'sına sahip sperm başları ise parlak yeşil floresan boyama (TUNEL pozitif) gösterdi.

3.6. Verilerin İstatiksel Analizi

Araştırma verileri istatistiksel açıdan SPSS 24,0 veri analizi yazılımıyla çözümlenmiştir. Araştırma kapsamına alınan katılımcıların yaş ve sperm parametrelerine (sperm konsantrasyonu, morfoloji, hareketlilik) ilişkin tanımlayıcı istatistikler için ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler tablolarda gösterilmiştir. Fertil ve infertil grup arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Fertil ve infertil grupların spermiyogram parametrelerinin (sperm konsantrasyonu, hareketlilik, morfoloji ve defektler) değerleri ile AB, TB ve TUNEL boyama değerleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi ve boyamaların birbirleriyle korelasyonu için Spearman testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Araştırma kapsamına alınan katılımcıların yaş ve sperm parametrelerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler Tablo 4.1.'de sunulmuştur.

Tablo 4.1. incelendiğinde araştırmaya dahil edilen bireylerin yaşlarının $\bar{x}=35,97\pm5,30$, sperm konsantrasyonu $\bar{x}=43,76\pm26,42$ (xM/ml), normal morfoloji $\bar{x}=3,55\pm1,39$ (%), hızlı ileri hareketli $\bar{x}=18,87\pm9,84$ (%), yavaş ileri hareketli $\bar{x}=17,66\pm8,48$ (%), yerinde hareketli $\bar{x}=14,40\pm7,57$ (%), hareketsiz sperm $\bar{x}=49,07\pm19,47$ (%), toplam hareketlilik $\bar{x}=50,93\pm19,47$ (%), ilerleyici hareketlilik $\bar{x}=36,53\pm16,95$ (%) ve TUNEL+ $\bar{x}=15,00\pm13,36$ (%) bulunmuştur.

Tablo 4.1. Katılımcıların yaş ve sperm parametrelerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler

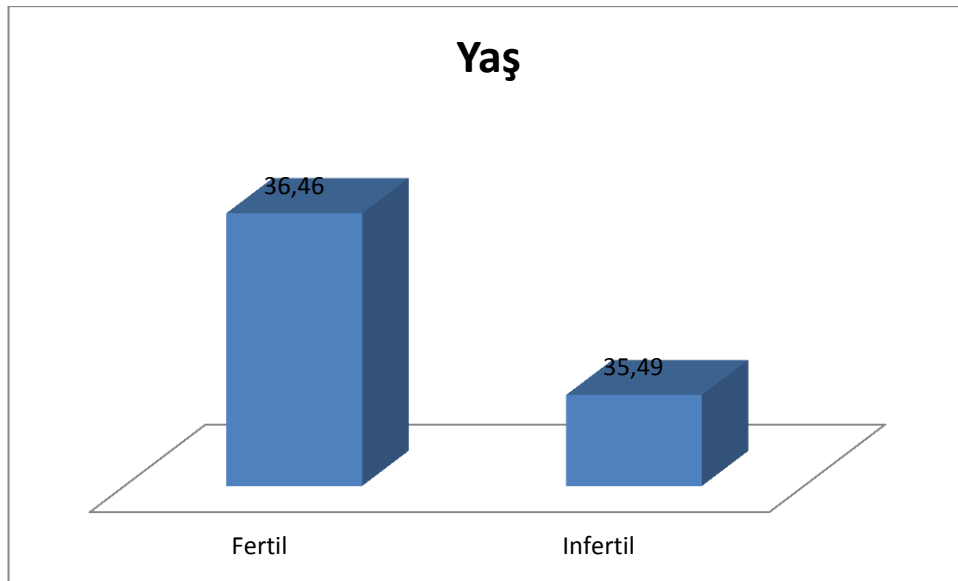
	n	$\bar{x}$	s	Min	Max
Yaş	70	35,97	5,30	27	49
Sperm Konsantrasyonu (xM/ml)	70	43,76	26,42	1,2	100
Normal Morfoloji (%)	70	3,55	1,39	0	6
Hızlı İleri Hareketli (%)	70	18,87	9,84	0	45
Yavaş İleri Hareketli (%)	70	17,66	8,48	0	45
Yerinde Hareketli (%)	70	14,40	7,57	4	40
Hareketsiz sperm (%)	70	49,07	19,47	0	80
Toplam Hareketlilik (%)	70	50,93	19,47	20	100
İlerleyici Hareketlilik (%)	70	36,53	16,95	0	80
TUNEL+ (%)	40	15,00	13,36	2	58

Tablo 4.2. Katılımcıların gruplarına göre yaşlarının karşılaştırılmasına ilişkin Mann-Whitney U testi sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.2. incelendiğinde araştırma kapsamına alınan fertil ve infertil grupta yer alan bireylerin yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Araştırmaya katılan fertil ve infertil bireylerin benzer yaşta olduğu görülmüştür.

Tablo 4.2. Katılımcıların gruplarına göre yaşlarının karşılaştırılması (n=70)

	Grup	n	$\bar{x}$	s	Medyan	Min	Max	Sıra Ort.	Z	p
Yaş	Fertil	35	36,46	5,59	36	28	46	37,23	-0,713	0,476
	Infertil	35	35,49	5,03	35	27	49	33,77		



Şekil 4.1. Katılımcıların gruplarına göre yaş ortalamaları

4.1. Sperm Konsantrasyonu ve Hareketlilik

Tablo 4.3.'te araştırma kapsamına alınan fertil ve infertil bireylerin sperm konsantrasyonu ve hareketlilik değerlerinin karşılaştırılmasına ilişkin yapılan Mann-Whitney U testi sonuçları gösterilmiştir.

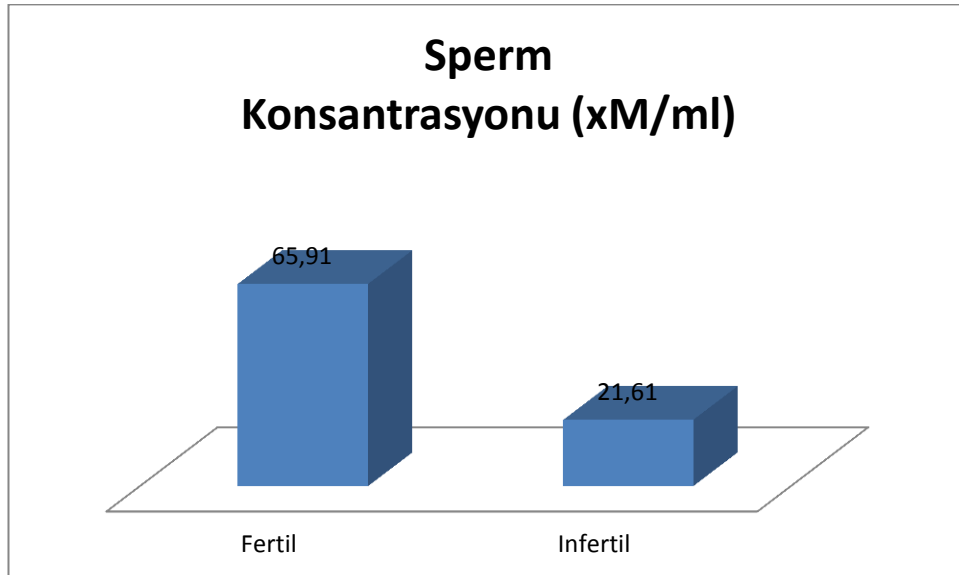
Araştırmaya katılan fertil bireylerin sperm konsantrasyonu $\bar{x}=65,91\pm17,57$ (xM/ml), hızlı ileri hareketli $\bar{x}=26,46\pm7,89$ (%), yavaş ileri hareketli $\bar{x}=23,14\pm8,14$ (%), yerinde hareketli $\bar{x}=17,74\pm6,87$ (%), hareketsiz sperm $\bar{x}=32,66\pm13,61$ (%), toplam hareketlilik $\bar{x}=67,34\pm13,61$ (%), ilerleyici hareketlilik $\bar{x}=49,60\pm13,81$ (%) bulunmuştur. Araştırmaya alınan infertil bireylerin ise sperm konsantrasyonu $\bar{x}=21,61\pm9,85$ (xM/ml), hızlı ileri hareketli $\bar{x}=11,29\pm3,99$ (%), yavaş ileri hareketli $\bar{x}=12,17\pm4,20$ (%), yerinde hareketli $\bar{x}=11,06\pm6,80$ (%), hareketsiz sperm $\bar{x}=65,49\pm5,41$ (%), toplam hareketlilik $\bar{x}=34,51\pm5,41$ (%), ilerleyici hareketlilik $\bar{x}=23,46\pm 6,40$ (%) bulunmuştur.

Araştırma kapsamına alınan fertil ve infertil bireylerin sperm konsantrasyonu, hızlı ileri hareketli, yavaş ileri hareketli, yerinde hareketli, hareketsiz sperm, toplam hareketlilik ve ilerleyici hareketlilik değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Fertil bireylerin sperm konsantrasyonu, hızlı ileri hareketli, yavaş ileri hareketli, yerinde hareketli, toplam hareketlilik ve ilerleyici hareketlilik değerleri infertil bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek, hareketsiz sperm değerleri ise düşük bulunmuştur.

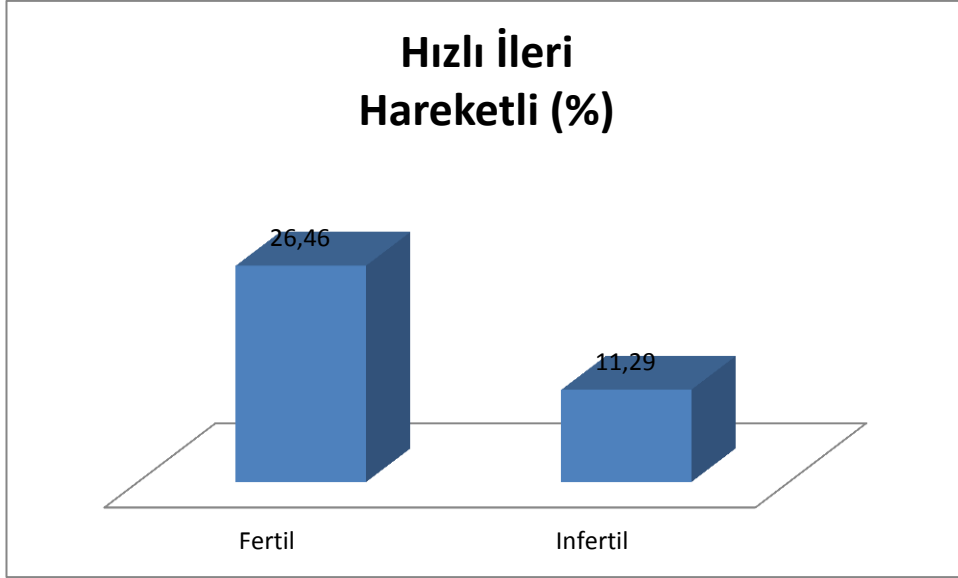
Tablo 4.3. Katılımcıların gruplarına göre sperm konsantrasyonu ve hareketlilik değerlerinin karşılaştırılması (n=70)

	Grup	n	$\bar{x}$	s	Medyan	Min	Max	Sıra Ort.	Z	p
Sperm	Fertil	35	65,91	17,57	60	45	100	53,00	-7,259	0,000*
Kons.(xM/ml)	Infertil	35	21,61	9,85	26	1	30	18,00		
Hızlılıeri	Fertil	35	26,46	7,89	24	15	45	52,37	-6,947	0,000*
Hareketli (%)	Infertil	35	11,29	3,99	12	0	20	18,63		
Yavaşlıeri	Fertil	35	23,14	8,14	21	10	45	49,81	-5,898	0,000*
Hareketli (%)	Infertil	35	12,17	4,20	12	0	20	21,19		
Yerinde	Fertil	35	17,74	6,87	20	6	30	44,99	-3,990	0,000*
Hareketli (%)	Infertil	35	11,06	6,80	10	4	40	26,01		
Hareketsiz sperm (%)	Fertil	35	32,66	13,61	31	0	55	18,00	-7,222	0,000*
	Infertil	35	65,49	5,41	65	60	80	53,00		
Toplam	Fertil	35	67,34	13,61	69	45	100	53,00	-7,237	0,000*
Hareketlilik (%)	Infertil	35	34,51	5,41	35	20	40	18,00		
İlerleyici	Fertil	35	49,60	13,81	40	35	80	53,00	-7,222	0,000*
Hareketlilik (%)	Infertil	35	23,46	6,40	25	0	32	18,00		

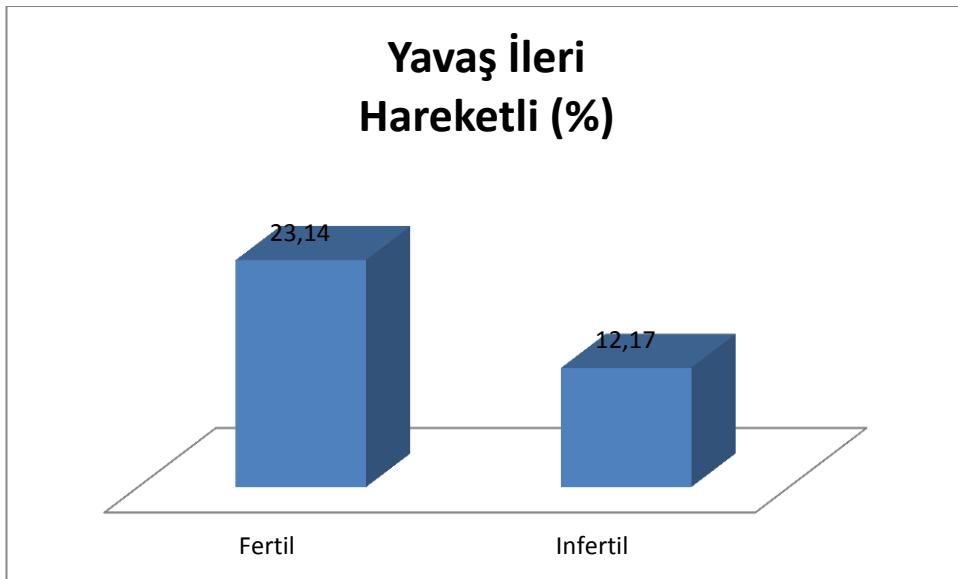
* $p < 0,05$



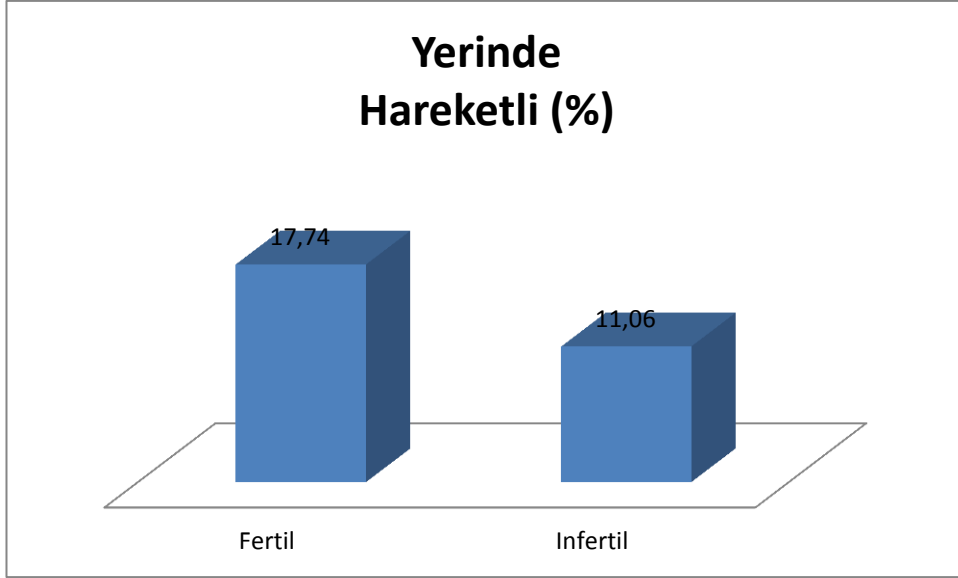
Şekil 4.2. Katılımcıların gruplarına göre sperm konsantrasyonu ortalamaları



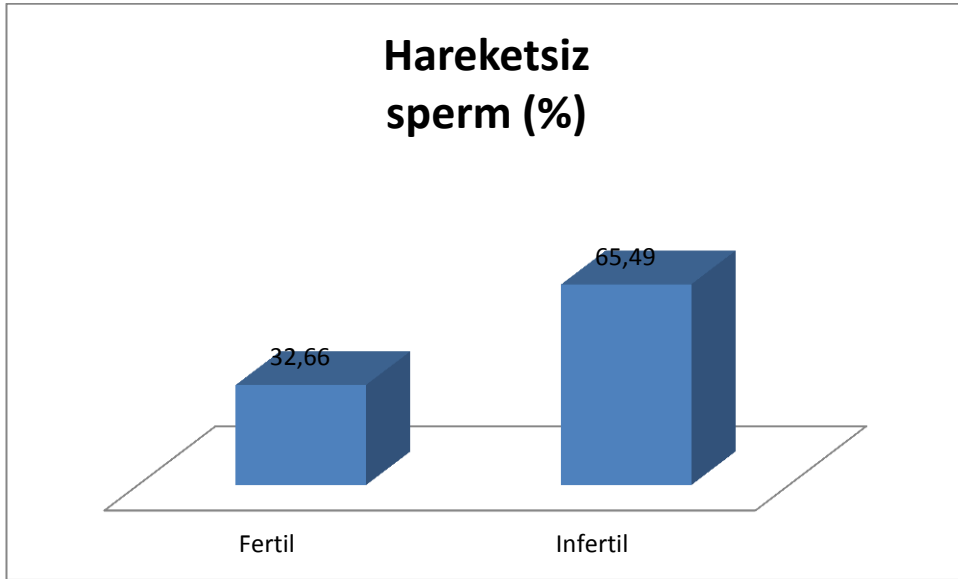
Şekil 4.3. Katılımcıların gruplarına göre hızlı ileri hareketli sperm ortalamaları



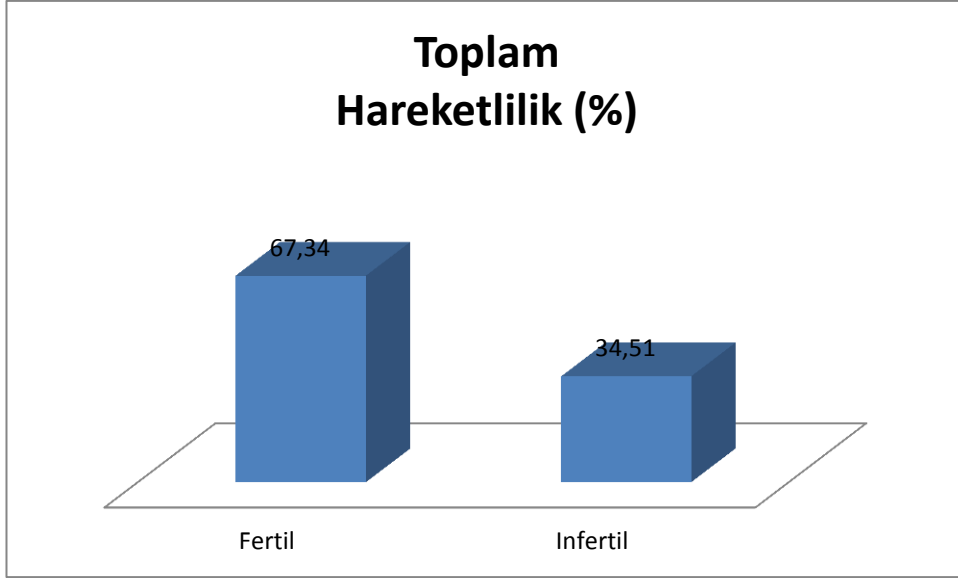
Şekil 4.4. Katılımcıların gruplarına göre yavaş ileri hareketli sperm ortalamaları



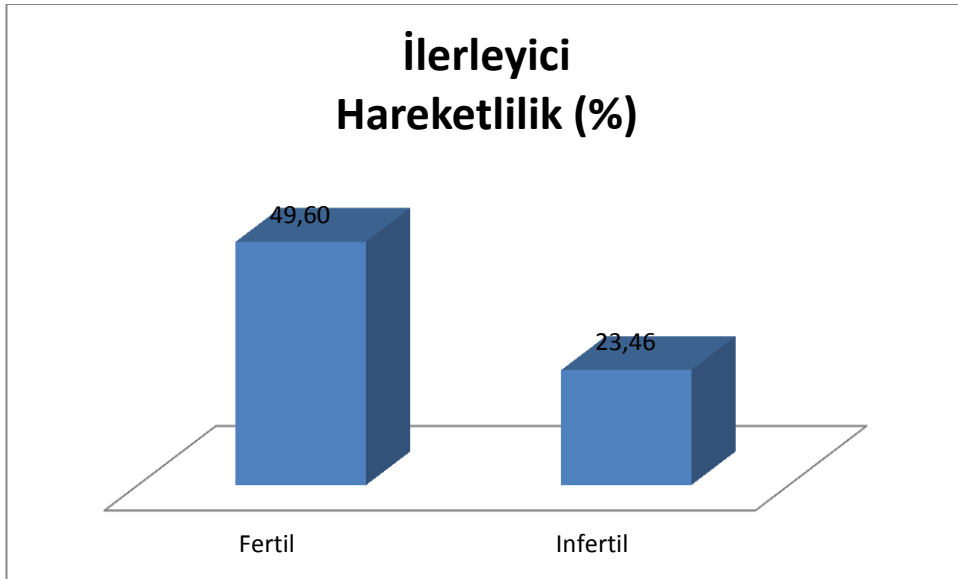
Şekil 4.5. Katılımcıların gruplarına göre yerinde hareketli sperm ortalamaları



Şekil 4.6. Katılımcıların gruplarına göre hareketsiz sperm ortalamaları



Şekil 4.7. Katılımcıların gruplarına göre toplam hareketlilik ortalamaları



Şekil 4.8. Katılımcıların gruplarına göre ilerleyici hareketlilik ortalamaları

4.2. Sperm Morfolojisi

Tablo 4.4. araştırmaya dahil edilen fertil ve infertil bireylerin normal morfoloji ve defekt değerlerinin karşılaştırılmasına ilişkin Mann-Whitney U testi sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.4. incelendiğinde, araştırmaya dahil edilen fertil bireylerin normal morfoloji değerlerinin $\bar{x}=4,74\pm0,78(\%)$, baş defekti değerlerinin $\bar{x}=49,57\pm11,00(\%)$, boyun defekti değerlerinin $\bar{x}=15,11\pm7,58 (\%)$ ve kuyruk defekti değerlerinin $\bar{x}=26,34\pm13,85(\%)$ olduğu saptanmıştır. İnfertil bireylerin normal morfoloji değerlerinin $\bar{x}=2,37\pm0,65(\%)$, baş defekti değerlerinin $\bar{x}=51,69\pm15,09(\%)$, boyun defekti değerlerinin $\bar{x}=19,34\pm6,01 (\%)$ ve kuyruk defekti değerlerinin $\bar{x}=30,83\pm17,88(\%)$ olduğu tespit edilmiştir.

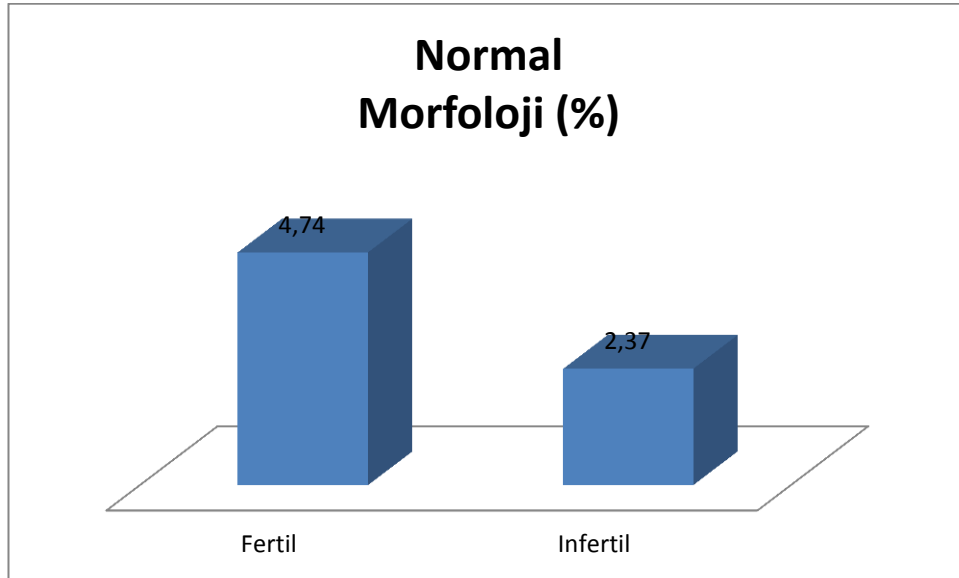
Araştırma kapsamına alınan fertil ve infertil bireylerin normal morfoloji ve boyun defekti değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Fertil bireylerin normal morfoloji değerleri infertil bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. İnfertil bireylerin boyun defekti değerleri fertil bireylere göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.

Araştırma kapsamına alınan fertil ve infertil bireylerin baş ve kuyruk defekti değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

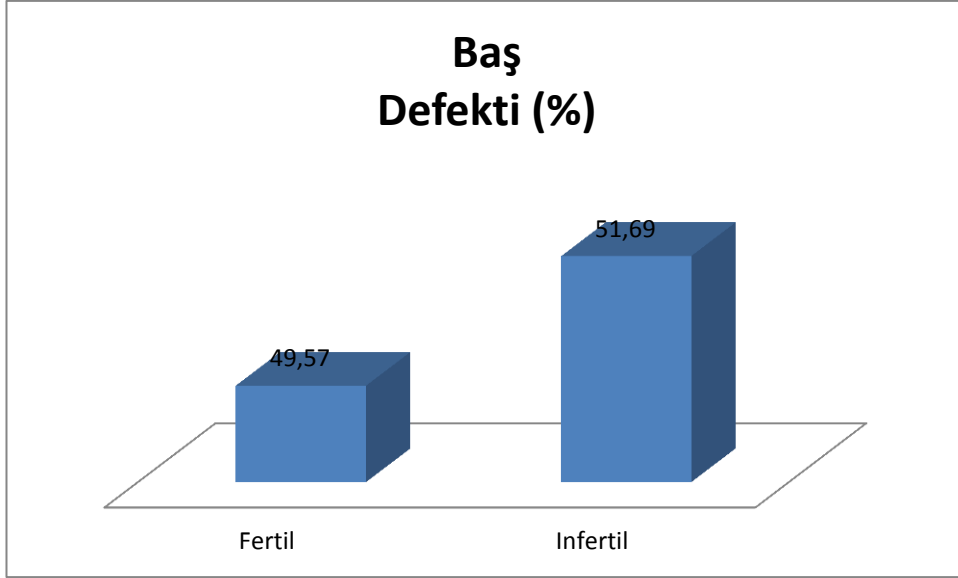
Tablo 4.4. Katılımcıların gruplarına göre normal morfoloji ve defekt değerlerinin karşılaştırılması (n=70)

	Grup	n	$\bar{x}$	s	M	Min	Max	Sıra Ort.	Z	p
Normal	Fertil	35	4,74	0,78	5	4	6	53,00	-7,372	0,000*
Morfoloji (%)	Infertil	35	2,37	0,65	2	0	3	18,00		
Baş	Fertil	35	49,57	11,00	50	20	66	33,19	-0,953	0,341
Defekti (%)	Infertil	35	51,69	15,09	54	18	74	37,81		
Boyun	Fertil	35	15,11	7,58	15	4	39	28,10	-3,058	0,002*
Defekti (%)	Infertil	35	19,34	6,01	20	8	35	42,90		
Kuyruk	Fertil	35	26,34	13,85	20	10	62	33,39	-0,871	0,384
Defekti (%)	Infertil	35	30,83	17,88	24	4	72	37,61		

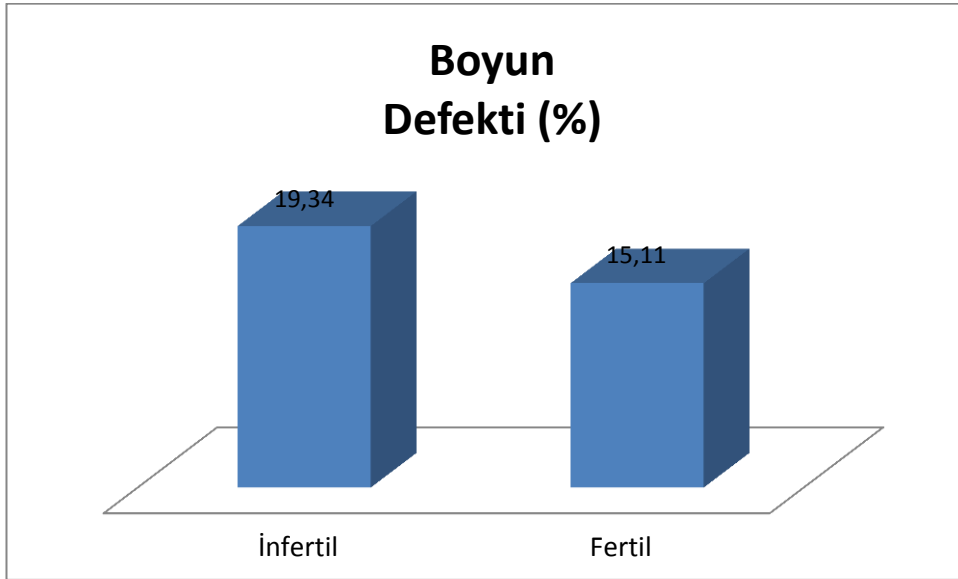
* $p < 0,05$



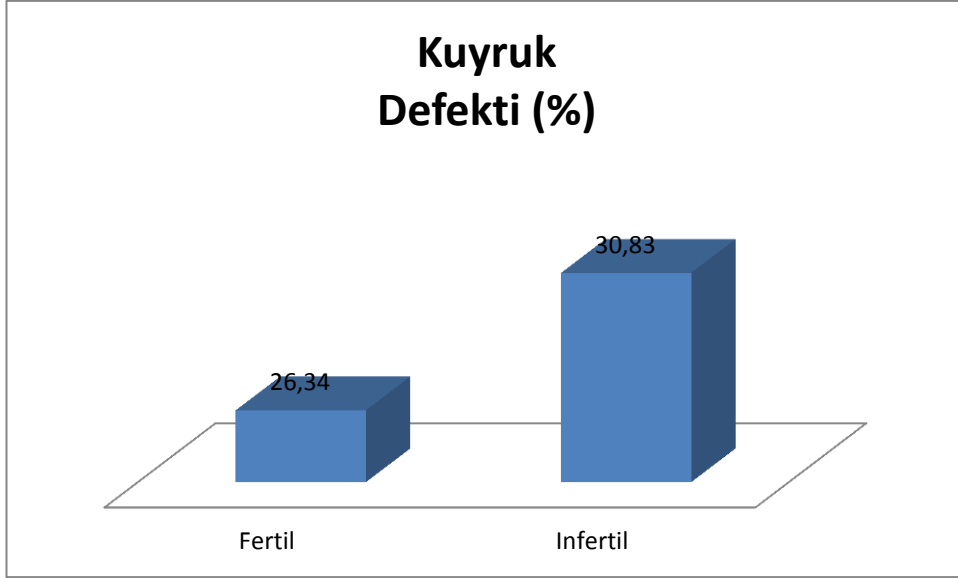
Şekil 4.9. Katılımcıların gruplarına göre normal morfoloji ortalamaları



Şekil 4.10. Katılımcıların gruplarına göre baş defekti ortalamaları



Şekil 4.11. Katılımcıların gruplarına göre boyun defekti ortalamaları



Şekil 4.12. Katılımcıların gruplarına göre kuyruk defekti ortalamaları

4.3. Sperm Kromatin Kondensasyonu ve Sperm DNA Fragmentasyonu

Tablo 4.5. katılımcıların gruplarına göre asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL değerlerinin karşılaştırılmasına ilişkin Mann-Whitney U testi sonuçları gösterilmiştir.

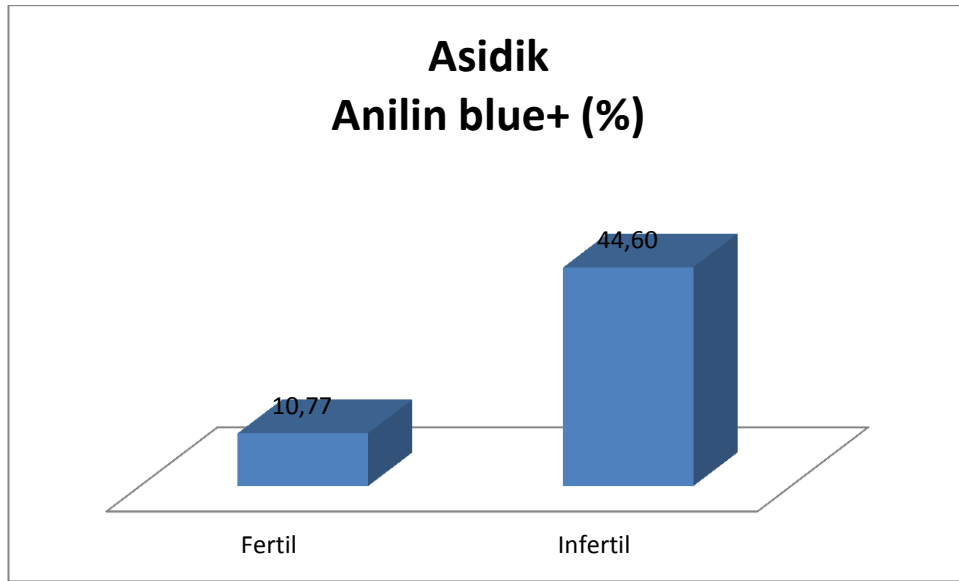
Tablo 4.5. incelendiğinde araştırmaya dahil edilen fertil bireylerin asidik anilin blue+ değerlerinin $\bar{x}=10,77\pm 8,19(\%)$, toluidin blue+ değerlerinin $\bar{x}=16,54\pm 13,23(\%)$ ve TUNEL+ değerlerinin $\bar{x}=3,65\pm 1,09 (\%)$ olduğu saptanmıştır. Infertil bireylerin asidik anilin blue+ değerlerinin $\bar{x}=44,60\pm 13,66(\%)$, toluidin blue+ değerlerinin $\bar{x}=42,57\pm 14,98(\%)$ ve TUNEL+ değerlerinin $\bar{x}=26,35\pm 9,70(\%)$ olduğu görülmüştür.

Araştırma kapsamına alınan fertil ve infertil bireylerin Anilin blue+, Toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Araştırmaya alınan infertil bireylerin Anilin blue+, Toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri fertil bireylere göre daha yüksek bulunmuştur.

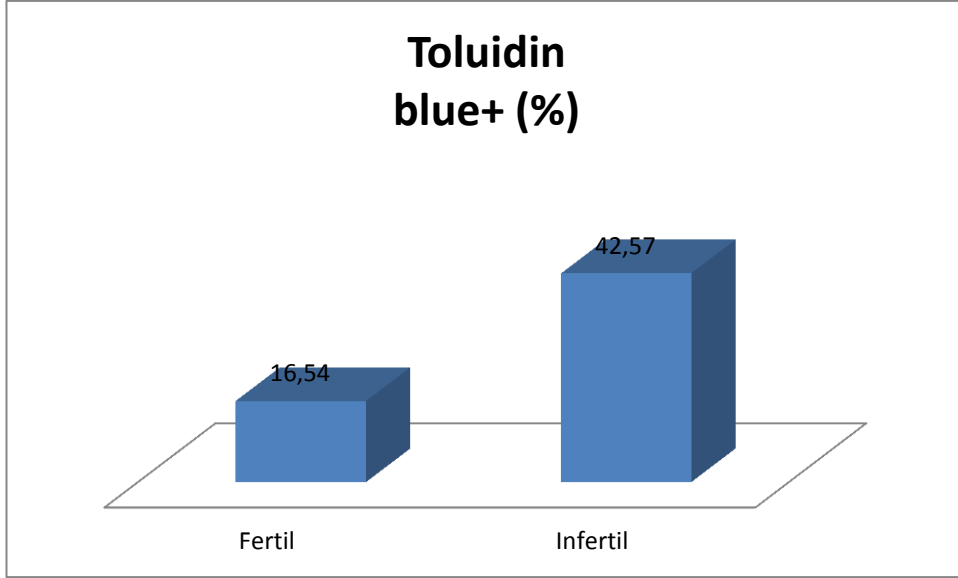
Tablo 4.5. Katılımcıların gruplarına göre asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerlerinin karşılaştırılması (n=70)

	Grup	n	$\bar{x}$	s	M	Min	Max	Sıra Ort.	Z	p
Asidik	Fertil	35	10,77	8,19	10	2	36	18,96		
Anilin blue+ (%)	Infertil	35	44,60	13,66	46	12	63	52,04	-6,807	0,000*
Toluidin	Fertil	35	16,54	13,23	12	2	39	21,39		
blue+ (%)	Infertil	35	42,57	14,98	44	15	65	49,61	-5,807	0,000*
TUNEL+ (%)	Fertil	20	3,65	1,09	3,5	2	5	10,50		
	Infertil	20	26,35	9,70	24,5	15	58	30,50	-5,441	0,000*

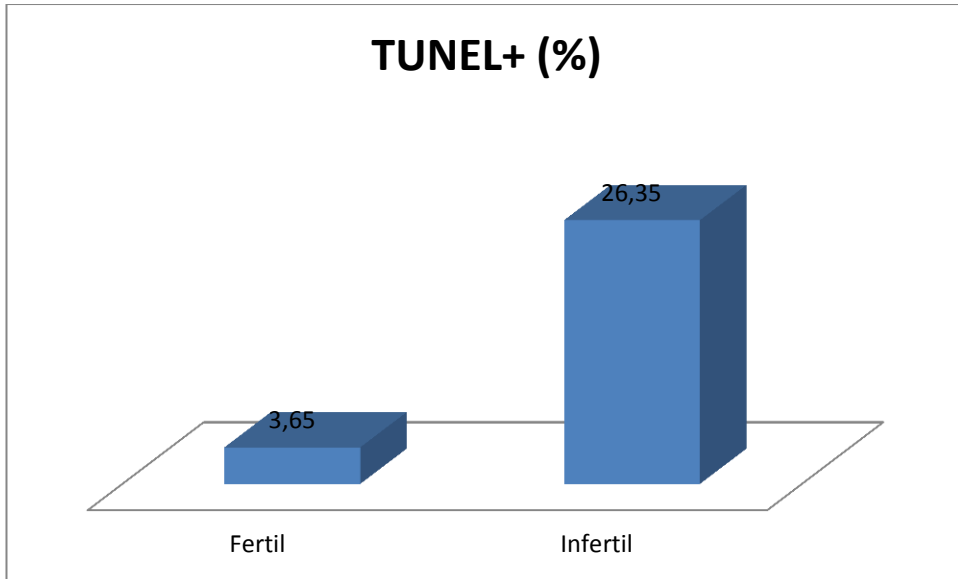
* $p < 0,05$



Şekil 4.13. Katılımcıların gruplarına göre Asidik Anilin blue+ ortalamaları



Şekil 4.14. Katılımcıların gruplarına göre Toluidin blue+ ortalamaları



Şekil 4.15. Katılımcıların gruplarına göre TUNEL+ ortalamaları

4.4. Sperm Parametreleri ile AB, TB ve TUNEL Değerleri Arasındaki Korelasyonlar

Tablo 4.6.'da araştırma kapsamına alınan fertil bireylerin sperm konantrasyonu, hareketlilik, normal morfoloji ve defekt değerleri ile asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasındaki korelasyonların incelenmesine dair Spearman korelasyon analizi sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.6. incelendiğinde fertil bireylerin sperm konantrasyonu, hareketlilik, normal morfoloji ve defekt değerleri ile asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.6. Fertil bireylerin sperm konantrasyonu, hareketlilik, normal morfoloji ve defekt değerleri ile asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL değerleri arasındaki korelasyonlar

		Asidik Anilin Blue+ (%)	Toluidin Blue+ (%)	TUNEL+ (%)
Sperm	r	0,04	0,00	0,19
Konsantrasyonu (xM/ml)	p	0,82	1,00	0,41
Toplam	r	-0,06	-0,01	0,29
Hareketlilik (%)	p	0,75	0,96	0,21
İlerleyici	r	0,07	-0,06	0,18
Hareketlilik (%)	p	0,67	0,74	0,45
Normal	r	-0,13	0,24	0,14
Morfoloji (%)	p	0,46	0,17	0,56
Baş	r	-0,11	-0,06	0,03
Defekti (%)	p	0,53	0,73	0,89
Boyun	r	0,09	0,18	0,20
Defekti (%)	p	0,61	0,29	0,40
Kuyruk	r	0,12	-0,10	-0,12
Defekti (%)	p	0,49	0,55	0,62

Tablo 4.7.'de infertil bireylerin sperm konsantrasyonu, hareketlilik, normal morfoloji ve defekt değerleri ile asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasındaki korelasyonların incelenmesine dair Spearman korelasyon analizi sonuçları gösterilmiştir.

Araştırma kapsamına alınan infertil bireylerin sperm konsantrasyonu, hareketlilik, normal morfoloji ve defekt değerleri ile asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.7. Infertil bireylerin sperm konsantrasyonu, hareketlilik, normal morfoloji ve defekt değerleri ile asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasındaki korelasyonlar

		Asidik Anilin blue+ (%)	Toluidin blue+ (%)	TUNEL+ (%)
Sperm	r	0,12	0,01	-0,05
Konsantrasyonu (xM/ml)	p	0,49	0,94	0,82
Toplam	r	-0,10	0,12	-0,07
Hareketlilik (%)	p	0,59	0,47	0,75
İlerleyici	r	0,25	0,42	0,13
Hareketlilik (%)	p	0,16	0,01	0,58
Normal	r	0,33	0,14	0,02
Morfoloji (%)	p	0,06	0,41	0,94
Baş	r	0,05	0,02	0,21
Defekti(%)	p	0,78	0,92	0,37
Boyun	r	0,18	-0,03	-0,01
Defekti (%)	p	0,30	0,88	0,97
Kuyruk	r	-0,12	0,00	-0,29
Defekti (%)	p	0,49	1,00	0,22

4.5. Gruplar İçinde AB, TB ve TUNEL Değerleri Arasındaki Korelasyonlar

Tablo 4.8.'de araştırmaya dahil edilen fertil bireylerin asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasındaki korelasyonların belirlenmesi amacıyla yapılan Spearman korelasyon analizi sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.8.'e göre araştırmaya katılan fertil bireylerin asidik anilin blue+ değerleri ile toluidin blue+ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönlü korelasyonlar bulunduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Buna göre fertil bireylerin asidik anilin blue+ değerleri arttıkça, toluidin blue+ değerleri de artmaktadır.

Fertil bireylerin TUNEL+ değerleri ile asidik anilin blue+ ve toluidin blue+ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar tespit edilememiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.8. Fertil bireylerin asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasındaki korelasyonlar (n=20)

		Asidik AnilinBlue+(%)	Toluidin Blue+(%)	TUNEL+(%)
Asidik	r	1,00		
Anilin blue+ (%)	p			
Toluidin blue+ (%)	r	0,43	1,00	
	p	0,01*		
TUNEL+ (%)	r	0,35	0,40	1,00
	p	0,13	0,08	

* $p<0,05$

Tablo 4.9.'da infertil bireylerin asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasındaki korelasyonların belirlenmesi amacıyla yapılan Spearman korelasyon analizi sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.9. incelendiğinde infertil bireylerin asidik anilin blue+ değerleri ile toluidin blue+ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif yönlü korelasyonlar bulunduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Buna göre infertil bireylerin asidik anilin blue+ değerleri arttıkça, toluidin blue+ değerleri de artmaktadır.

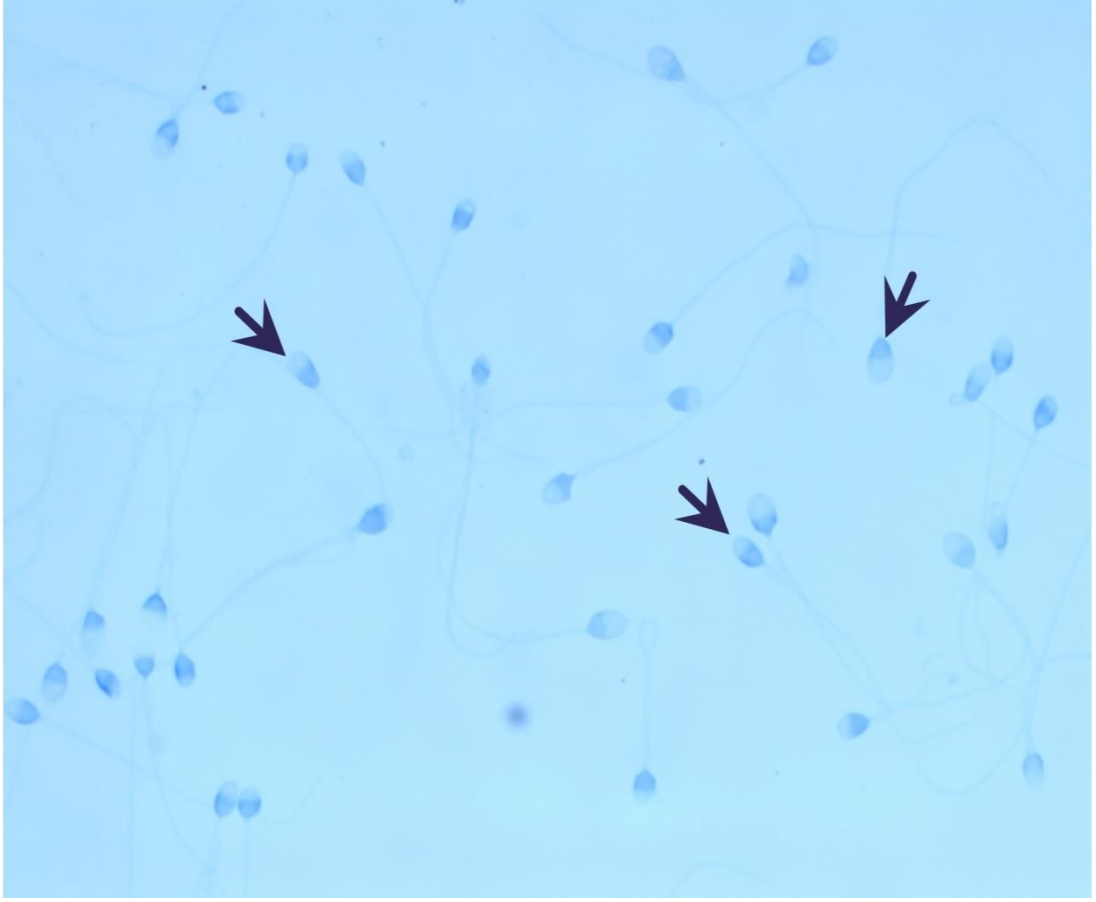
Araştırma kapsamına alınan infertil bireylerin TUNEL+ değerleri ile asidik anilin blue+ ve toluidin blue+ değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Infertil bireylerin TUNEL+ değerleri arttıkça asidik anilin blue+ ve toluidin blue+ değerleri de artmaktadır.

Tablo 4.9. Infertil bireylerin asidik anilin blue+, toluidin blue+ ve TUNEL+ değerleri arasındaki korelasyonlar (n=20)

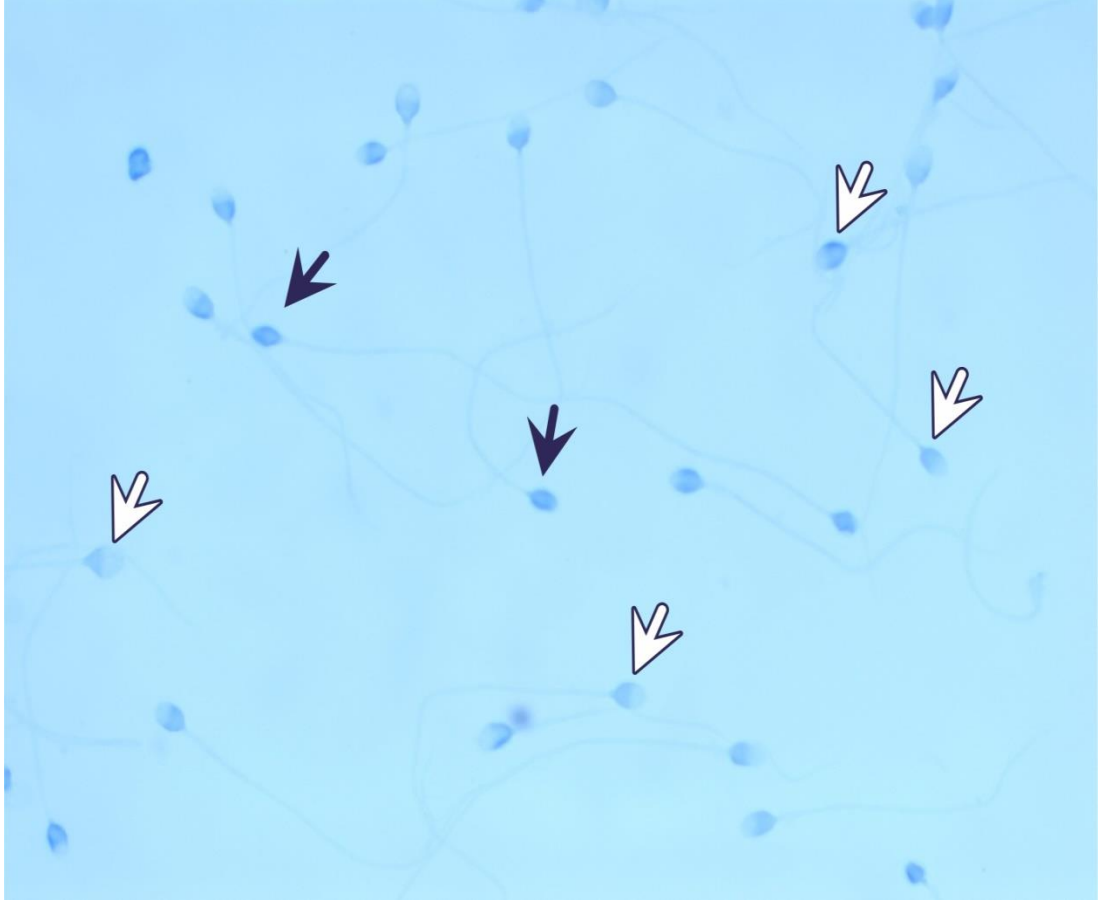
		Asidik Anilin Blue+ (%)	Toluidin Blue+ (%)	TUNEL+ (%)
Asidik Anilin blue+ (%)	r	1,00		
	p			
Toluidin blue+ (%)	r	0,607	1,00	
	p	0,000*		
TUNEL+ (%)	r	0,567	0,611	1,00
	p	0,009*	0,004*	

* $p<0,05$

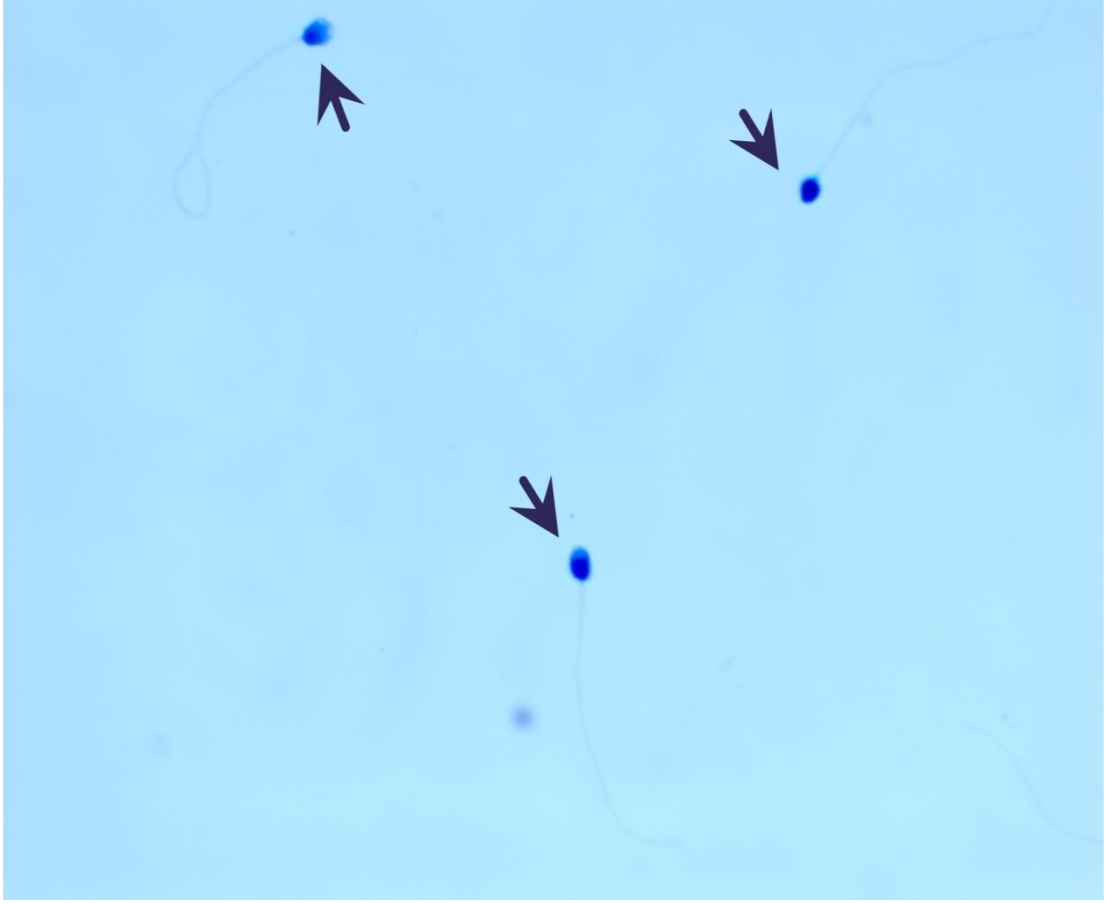
4.6. Işık Mikroskopik Bulgular



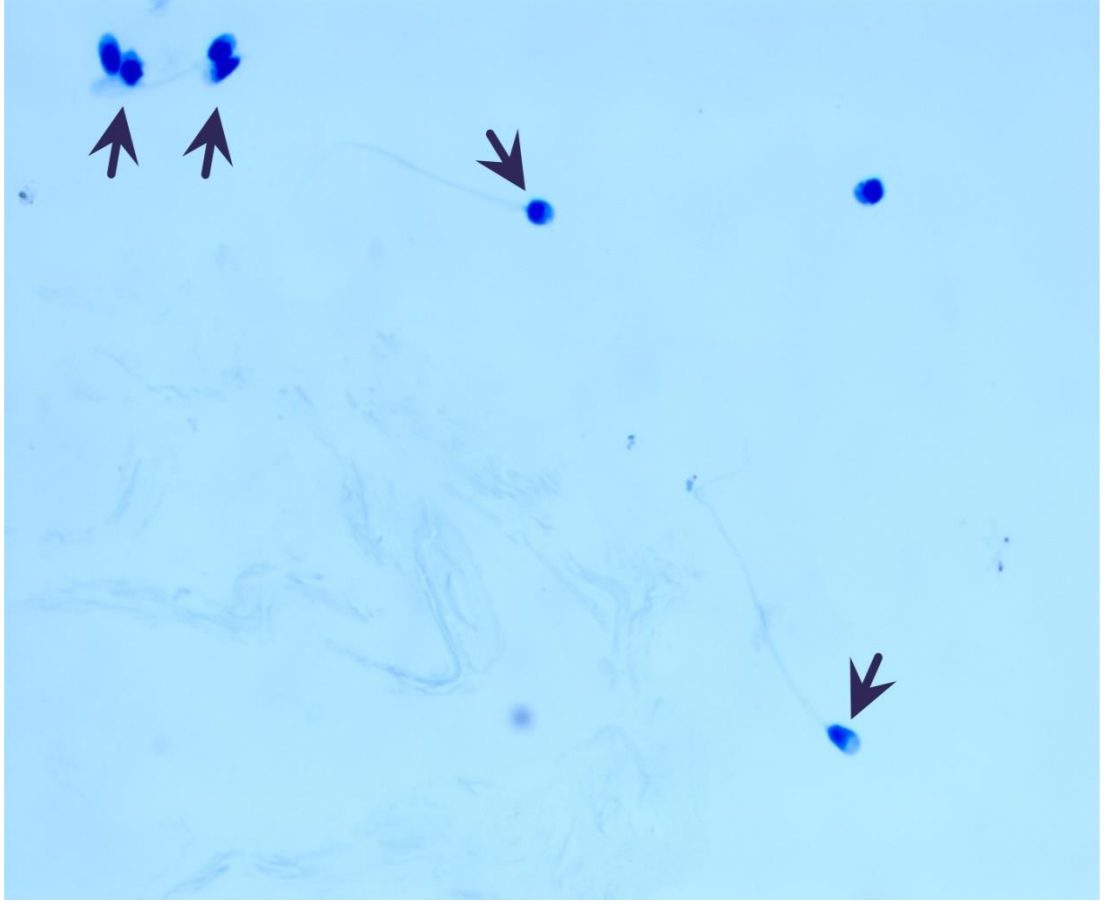
Şekil 4.16. Fertil grubuna ait asidik anilin blue boyama sonucu normal kromatin kondensasyonuna sahip spermiler (lacivert ok ile gösterilen) açık mavi görülmektedir.



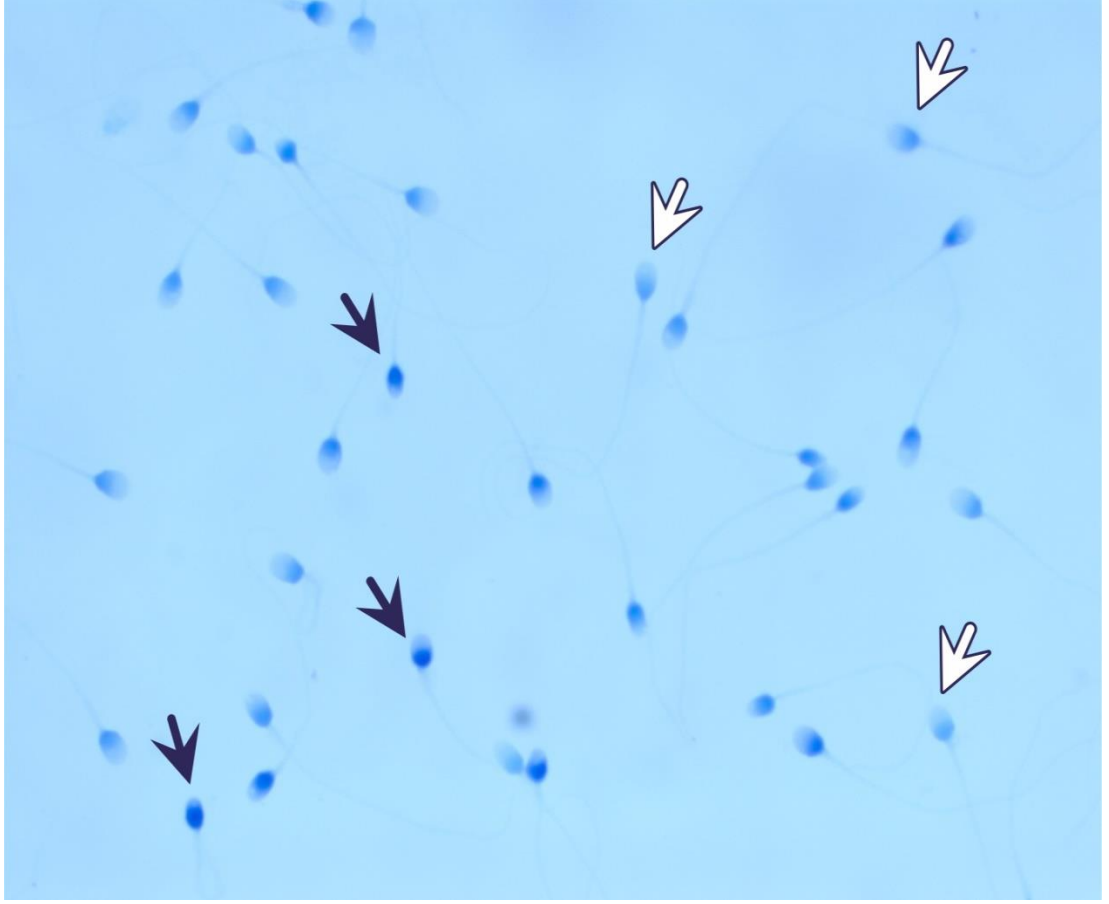
Şekil 4.17. Fertil grubuna ait asidik anilin blue boyama sonucu normal kromatin kondensasyonuna sahip spermler (beyaz ok ile gösterilen) açık mavi, anormal kromatin kondensasyonuna sahip spermler (lacivert ok ile gösterilen) koyu mavi görülmektedir.



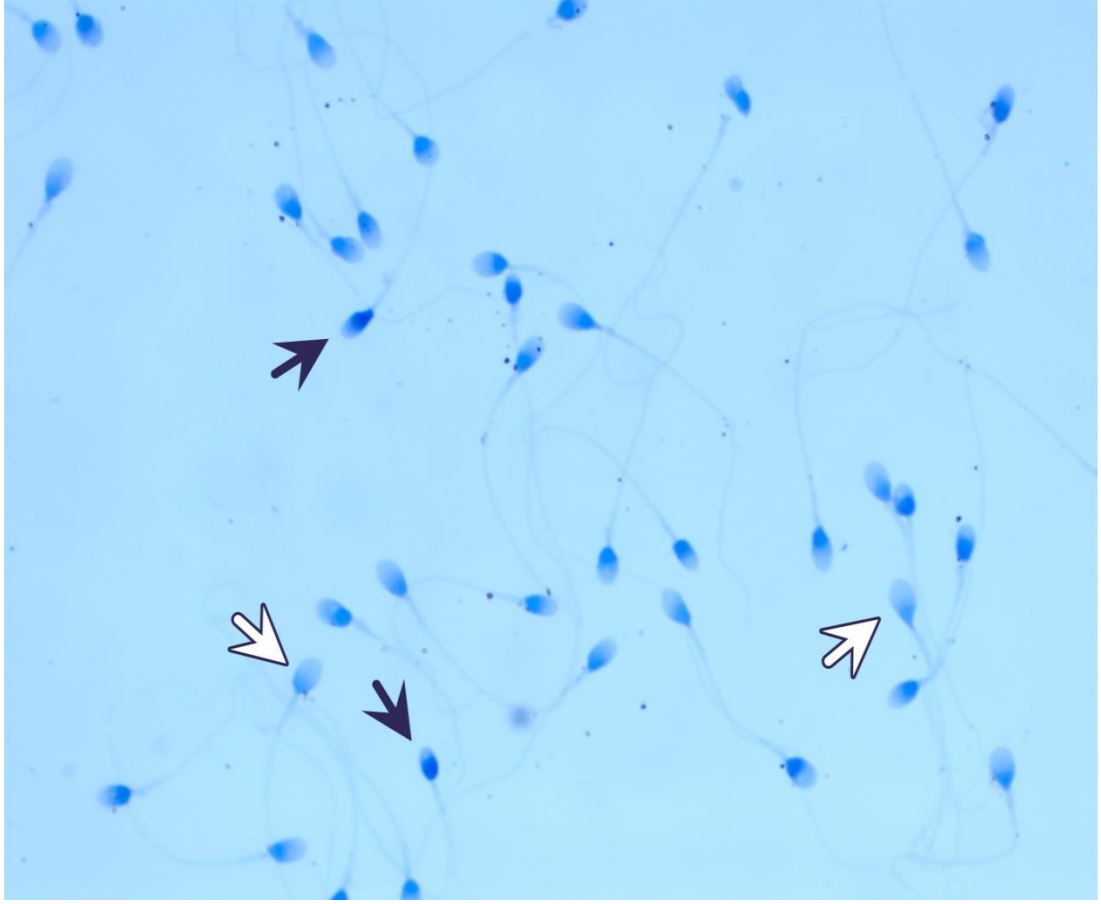
Şekil 4.18. **İnfertil** grubuna ait asidik anilin blue boyama sonucu anormal kromatin kondensasyonuna sahip sperm (lacivert ok) koyu mavi gözlenmektedir.



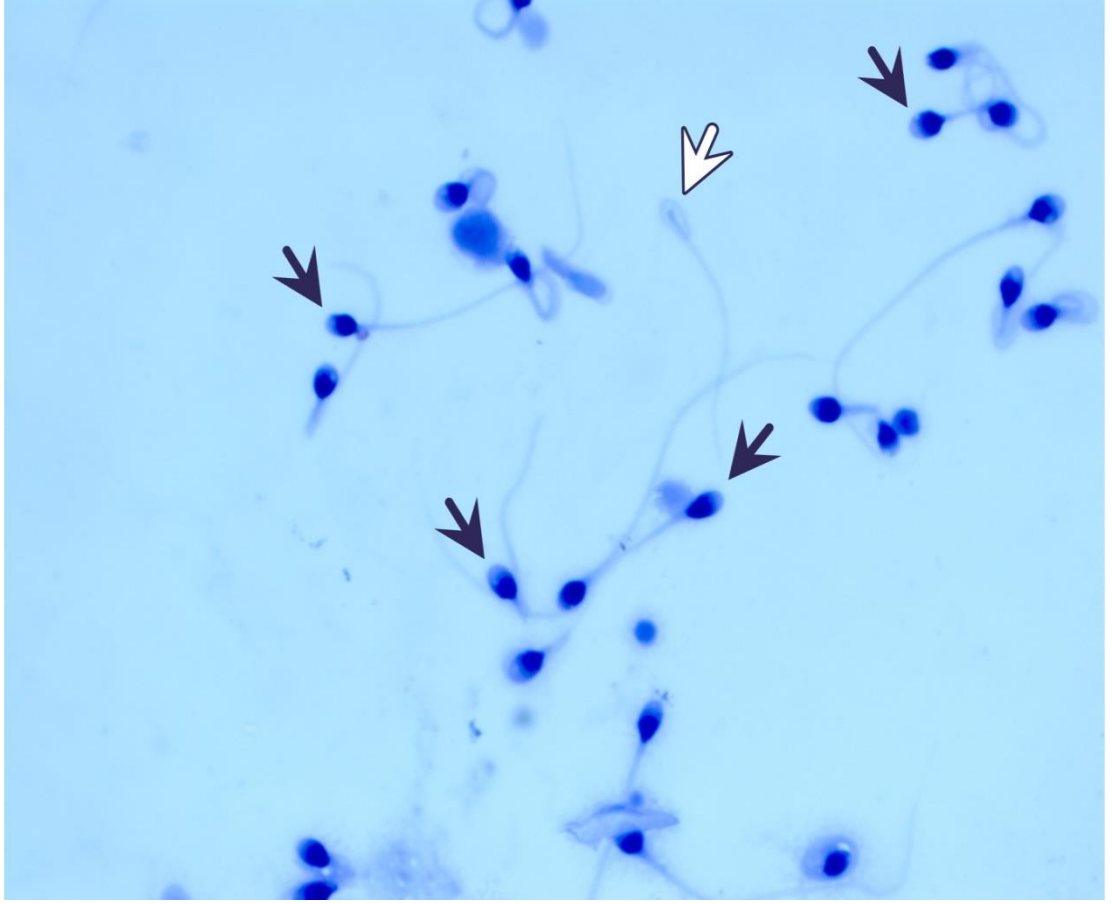
Şekil 4.19. İnfertil grubuna ait asidik anilin blue boyama sonucu anormal kromatin kondensasyonuna sahip spermeler (lacivert ok) koyu mavi gözlenmektedir.



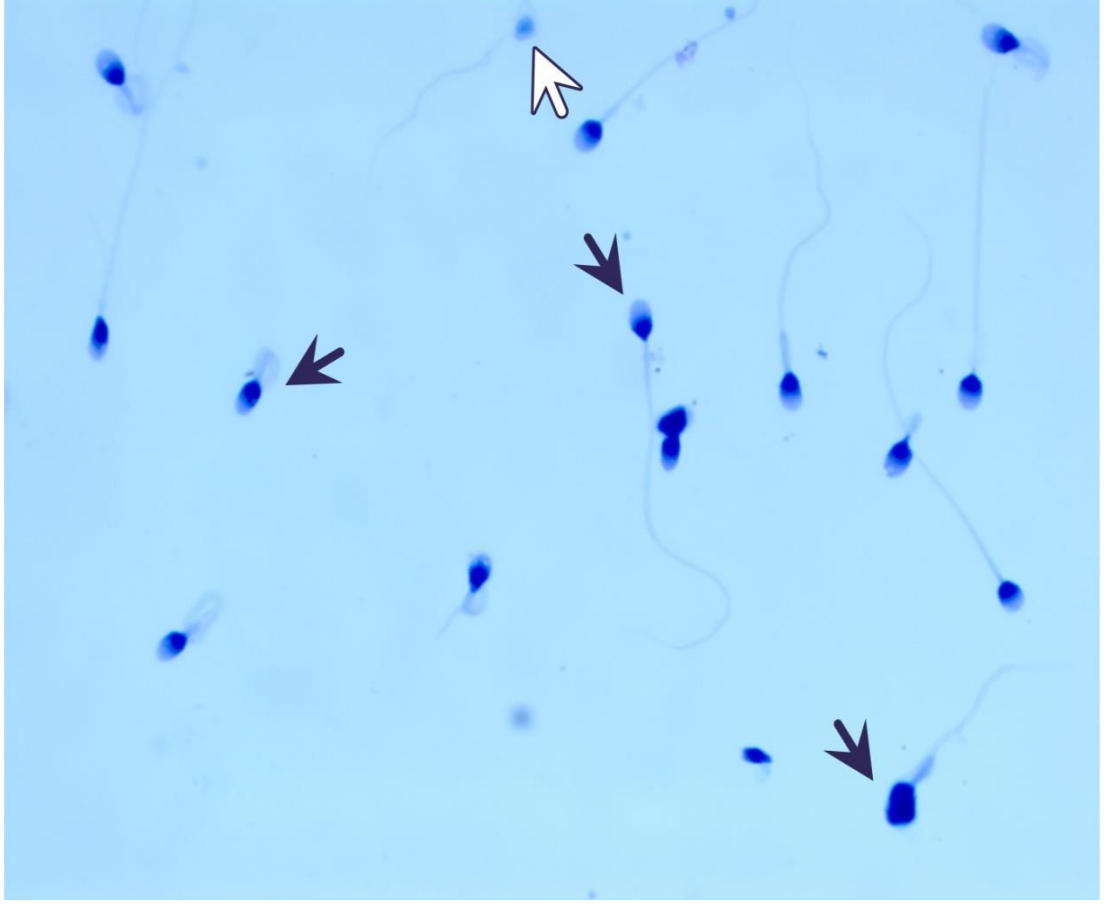
Şekil 4.20. Fertil grubuna ait toluidin blue boyama sonucu normal kromatin kondensasyonuna sahip sperm (beyaz ok ile gösterilen) açık mavi, anormal kromatin kondensasyonuna sahip sperm (lacivert ok ile gösterilen) koyu mavi görülmektedir.



Şekil 4.21. Fertil grubuna ait toluidin blue boyama sonucu normal kromatin kondensasyonuna sahip spermler (beyaz ok ile gösterilen) açık mavi, anormal kromatin kondensasyonuna sahip spermler (lacivert ok ile gösterilen) koyu mavi görülmektedir.

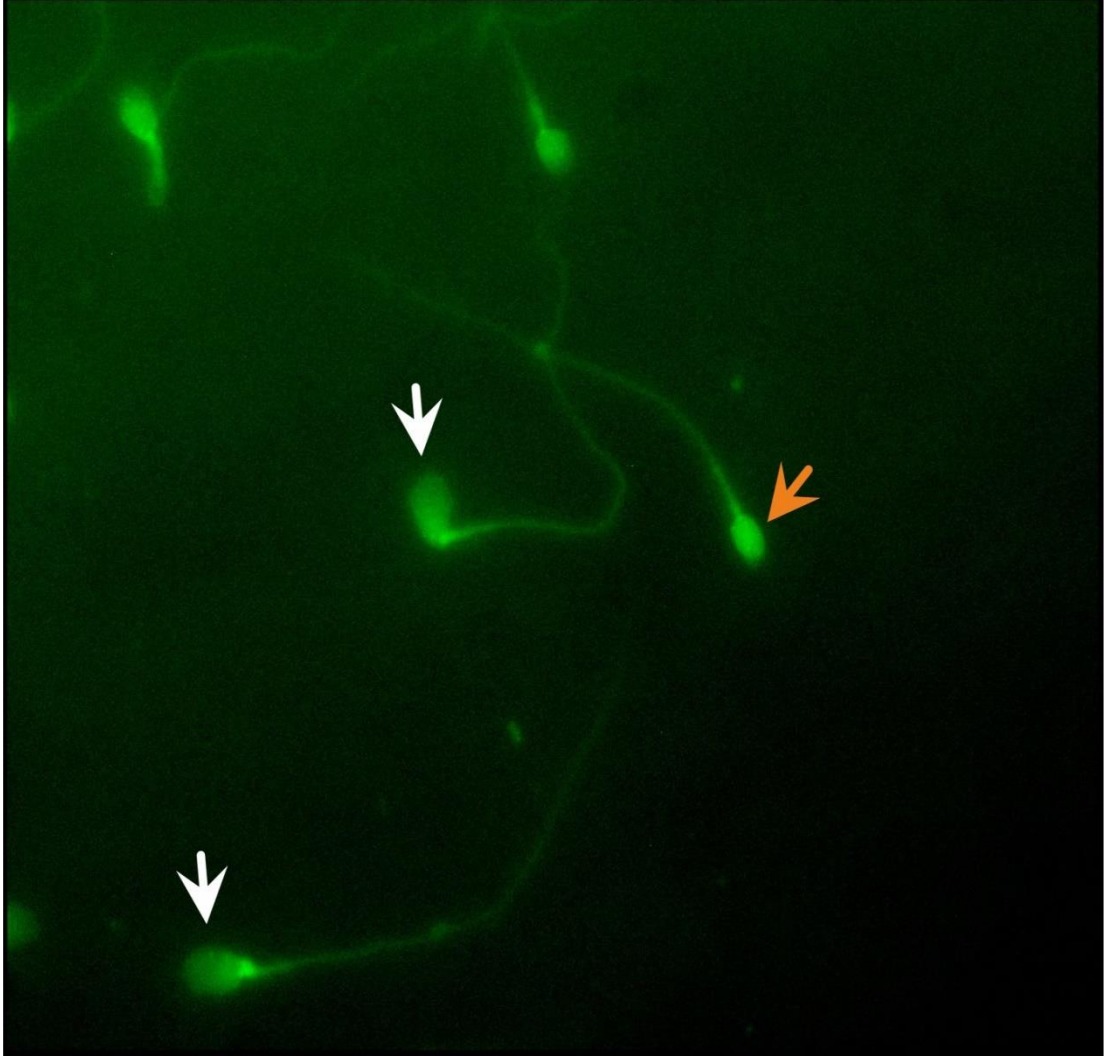


Şekil 4.22. İnfertil grubuna ait toluidin blue boyama sonucu normal kromatin kondensasyonuna sahip spermler (beyaz ok ile gösterilen) açık mavi, anormal kromatin kondensasyonuna sahip spermler (lacivert ok ile gösterilen) koyu mavi görülmektedir.

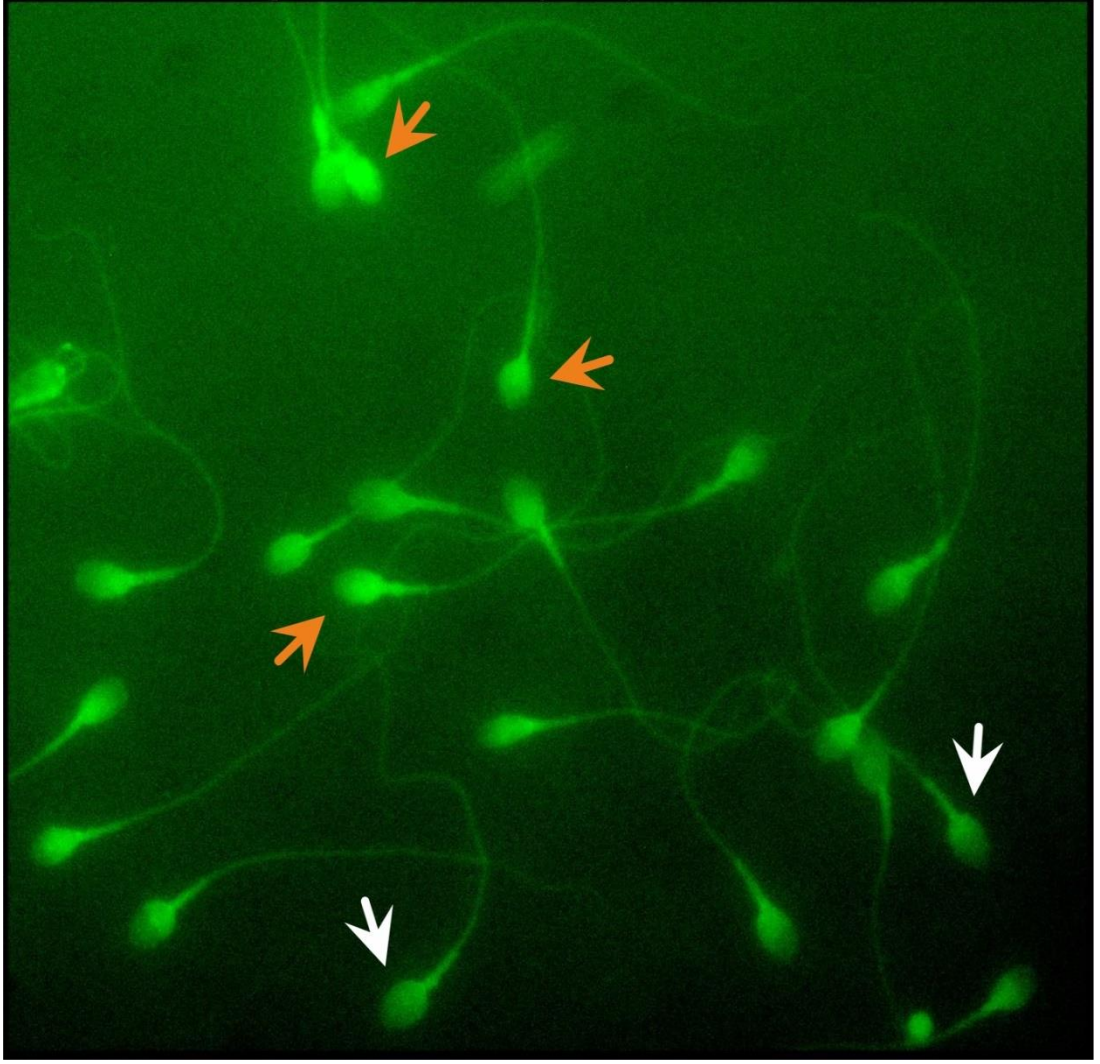


Şekil 4.23. İnfertil grubuna ait toluidin blue boyama sonucu normal kromatin kondensasyonuna sahip spermler (beyaz ok ile gösterilen) açık mavi, anormal kromatin kondensasyonuna sahip spermler (lacivert ok ile gösterilen) koyu mavi görülmektedir.

4.7. Floresan Mikroskopik Bulgular



Şekil 4.24. Fertil grubuna ait floresan TUNEL boyama sonucu pozitif (+) boyanan spermler (turuncu ok ile gösterilen) ve negatif (-) boyanan spermler (beyaz ok) gözlenmektedir.



Şekil 4.25. İnfertil grubuna ait floresan TUNEL boyama sonucu pozitif (+) boyanan spermler (turuncu ok) ve negatif (-) boyanan spermler (beyaz ok) gözlenmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Erkek infertilitesi multifaktöriyel, heterojen, genetik ve çevresel faktörlerin etkisiyle oluşan bir patolojidir. Rapor edilen oranlar değişkenlik göstermekle birlikte yaklaşık infertil çiftlerin %50'sinde erkek faktörü vardır denilebilir. Erkek infertilitesinde bilinen nedenler %30 ile %50 arasındadır ve kongenital veya sonradan kazanılmış ürogenital anomaliler sonucu oluşurlar. Maligniteler, ürogenital sistemdeki enfeksiyonlar, varikozel de olduğu gibi artan testis ısı, endokrin bozukluklar, kromozom delesyonları, tek gen mutasyonları gibi bilinen genetik bozukluklar, immünolojik faktörler başlıca bilinen nedenler arasında sayılır (Esteves, 2016; Güneş ve ark., 2016; Zeqiraj ve ark., 2018). Çoğu kez spermiyogram parametrelerindeki bozulmalarla paralellik gösterir ve geri dönüşü ileri tetkiklerle patolojiye ulaşılabilir.

Bilinmeyen nedenler ise bilinenlerin dışında kalan yaklaşık yarısını (%30-50) oluşturacak kadar fazladır ve idiyopatik veya açıklanamayan infertilite olarak bilinir. Her zaman spermiyogram parametreleriyle paralel seyretmezler. Bu durumdaki erkeklerde patolojiyi etkileyecek geçirilmiş bir hastalık yoktur. Fizik muayene, endokrin ve kalıtsal genetik biyokimyasal laboratuvar değerleri normaldir. İdiyopatik erkek infertilitesi kadın faktörünün tamamen normal ve spermiyogram değerlerinin bazen ileri derecede bozuk, %15 kadar vakada ise normal olmasıyla karakterizedir (Esteves, 2016; Güneş ve ark., 2016; Zeqiraj ve ark., 2018). Bu durumdaki hastalar da normozoospermic infertilite tanısını alırlar (Bracke ve ark., 2018).

Erkek infertilitesinin etiyolojisindeki bu belirsizlikler araştırmacıları semen analiziyle birlikte sperm DNA/kromatin yapısını incelemeye yöneltmiştir. Son 20-25 yıldır bu konuda yapılan çalışmalar devam etmektedir. Kaynakların çokluğu kullanılan yöntemlerin çeşitliliği nedeniyle yapılan taramalarda nisbeten daha güncel ve konuyla direkt ilişkili olan kaynakların bu çalışma için ayrıştırılması zaruri olmuştur. 2016 yılında yayınlanan oldukça geniş kapsamlı derleme makaleye göre son 20 yıl içinde bu konuda 1500'den fazla çalışma yayınlanmış 2016 yılı itibarıyla bunların 1000 adedi ise son altı yıla aittir (Steger ve Balhorn, 2018).

Çalışmaya konu olan erkek üreme hücresi sperm, spermiyum veya spermatozoa yaklaşık 60 µm uzunluğunda baş, boyun, orta parça ve kuyruk olmak üzere 4 bölümden oluşan yapısal ve işlevsel olarak ileri derecede polarlaşmış bir hücredir. Baş bölümünün büyük kısmını, içerisinde sıkıca paketlenmiş DNA ve ilişkili proteinlerin oluşturduğu transkripsiyona yani gen açılımına kapalı kompakt kromatin oluşturur.

Spermiyum, testis seminifer tübüllerinde spermatogenez ve spermiyogenez denilen birbirini izleyen iki farklılaşma süreciyle gelişir. Spermatogenez başlıca haploid spermatidin oluşmasını, spermiyogenez ise haploid spermatidin yapısal değişimler geçirerek spermiyuma dönüşmesini tanımlayan süreçlerdir (Kierszenbaum ve Tres, 2004). Spermiyogenez çok dinamik hücre biçim değişimleri ile birlikte epigenetik ve kromatinin yeniden yapılanmasını da içeren çok dinamik bir süreçtir.

Spermatogenezde başlayan kromatin yapılanması spermiyogenezde de devam eder, kromatin kompaktlaşır. Normal somatik hücrelerdeki histon proteinlerinin yerini testise özgü bazik bir protein olan protamin alır (Kierszenbaum ve Tres, 2004; Kimmins ve Sassone-Corsi, 2005). İnsan spermiyumda DNA'yı yapılandıran DNA ipliği ile ilgili proteinlerin %85-95 kadarını protamin oluşturur. Ancak fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi ile ilgili DNA segmenti veya genler %5-15 oranında bulunan histon proteinlerine bağlı olarak kalır yani bir değişime uğramazlar. Protaminler ufak bazik proteinlerdir, asidik DNA'ya yüksek afiniteyle bağlanır. Protaminler pozitif yüklü arginin rezidülerinden zengin olduğu için DNA ipliğindeki fosfodiester bandlarını nötralize eder. Bu yolla DNA daha esnek bir yapı kazanır ve kendi üzerine kıvrılıp katlanarak kompakt sıkı bobin gibi sarmallanmış bir yapı oluşturur. Buna tight toroidal complex denir. Bobindeki her bir sarmal diğerine sıkıca yapışmıştır. Böylece DNA ve protaminden oluşan genetik materyal veya kromatin iyice sıkıştırılarak normal vücut hücresi çekirdeğinin yaklaşık kırkda biri boyutundaki küçük spermiyum çekirdeği içine sığar. Protaminler sistein rezidülerinden zengindir. Bunların aralarında çapraz disülfid bağları oluşur bu yolla kromatin daha kompakt transkripsiyona kapalı dışardan gelebilecek örseleyici etkilere dayanıklı sağlam yapısını kazanır (Kimmins ve Sassone-Corsi, 2005).

Bu yapılanmanın paternal DNA'yı oositle buluşana kadar, fertilizasyona kadar dıştan gelecek örseleyici/zararlı etkilerden korumak gen ifadesini de açılıma kapatarak kromatini daha zor ulaşılabilir hale getirmektir. Zira transkripsiyon veya genlerin kullanıma açılımı kromatinin daha gevşek yapılandığı bölgelerde başlar. Kompakt kromatin heterokromatinde olduğu gibi transkripsiyona yani gen açılımına kapalıdır. Erkek üreme hücresi testisi geçtikten sonra epidimise, ductus deferens ve ejakulator kanala ulaşan uzun bir yol izler. Ayrıca dişi üreme yollarında da bir seri değişimden geçerek fertilizasyon yeteneğini kazanır. Gerek erkek gerekse dişi üreme yollarındaki bu uzun yolculuk spermiyumun oositle buluşana kadar dış etkenlerle karşılaşma olasılığını arttırır (Singh ve Agarwal, 2011).

Fertilizasyonu takiben sperm DNA'sındaki protaminler ortadan kaldırılır. Yerini oositten sağlanan histonlar alır ve kromatinin kompakt yapısı açılır. Bu süreçte artık protaminin koruyucu görevi sona ermiştir. Sperm DNA'sı da transkripsiyon ve protein sentezine uygun hale gelmiştir. Bu değişimler fertilizasyonu başarı ile tamamlandığını göstermektedir. Sperm DNA'sında orjinal olarak bulunan ve protaminle yer değiştirmemiş histonlarda bir değişim olmaz. Bu histonlara bağlı olarak erken gelişim, implantasyon gibi önemli süreçlerde rol oynayan paternal kaynaklı genler bulunur. Ancak bu paternal genler daha az korumalı histonlarla ilişkili olduğundan fertilizasyona kadar geçen sürede daha kolay etkilenebilir bir pozisyonadadır (Singh ve Agarwal, 2011).

Protamin toroidlerin, geçici olarak yani oositle buluşana kadar sperm DNA'sının yapısal sağlamlığını veya integritesini sağlayan önemli moleküller olduğu ortaya çıkar. Bu değişim sperm kromatinin uygun kompaktlaşıp tekrar dekonpanse olarak açılmasını kontrol eden önemli bir epigenetik düzenlemedir. Buradaki herhangi bir bozukluk kromatin yapısını bozar ve genetik materyali dış etkilerden kolay etkilenebilir duruma getirir. Histon protamin değişimindeki bozukluklar veya yetersiz değişim kromatin kompaktlaşmasının bozulmasına neden olur. Buna gelişimini tamamlayamamış/olgunlaşmamış/immatür kromatin denir. Kondensasyonun bozulmasıyla örseleyici etkilere daha açık olan genetik materyal hasarlanır ve fragmentasyon veya tekli veya çiftli kırıklar gösterir. Kromatinin integrasyonu veya bütünlüğü bozulur (Erenpreiss ve ark., 2006; Shamsi ve ark., 2008; Singh ve Agarwal, 2011; Steger ve Balhorn, 2018). Bu durum erkek infertilitesinin en önemli

nedenlerinden biridir. DNA'daki hasarın temel nedenleri arasında uygun kromatin paketlenmesinin olmaması ve buna bağılı gelişen fragmentasyon, tamamlanmamış veya abortiv apoptoz, antioksidan kapasiteyi aşan reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşturduğu DNA hasarı ve oksidatif stres sayılabilir (Erenpreiss ve ark., 2006; Singh ve Agarwal, 2011; Shamsi ve ark., 2008; 2011).

Sperm hem gelişimi sürecinde testiste hem de erkek ve dişi üreme yollarındaki olgunlaşması sürecinde pek çok radikal hücresel değişimlerden geçer. Bu nedenle üreme/fertilizasyon kapasitesini bozacak etkilere açıktır. Spermde sitoplazma çok az olduğundan hücre tamiri antioksidan kapasite ile ilgili enzimler çok azdır. Hücre zarı içeriğindeki doymamış fosfolipidler nedeniyle daha akışkan ve dışsal etkilere açıktır (Erenpreiss ve ark., 2006; Singh ve Agarwal, 2011).

Füzyonla oositin başka bir görevi daha ortaya çıkar. Sperm DNA'sındaki bazı defektler oosit tarafından onarılabilir ancak bunlar oositin tamir kapasitesi ile sınırlıdır. Oositte bulunan DNA polimeraz gibi enzimler ile bazı defektler kapatılabilir (Erenpreiss ve ark., 2006; Singh ve Agarwal, 2011; Steger ve Balhorn, 2018). Bu durum DNA integritesi bozuk olsa bile fertilizasyon sürecine kadar erişmiş tek bir spermiyumla elde edilebilecek gebeliğin sorunsuz sürmesini sağlayabilir.

Erkek infertilitesindeki bilinmeyenlerin yaklaşık %30-50 arasında olması spermiyum DNA/kromatin defektleri ile infertilite arasındaki ilişkiyi araştıran sayısı giderek artan pek çok çalışmaya konu olmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmaların hemen hepsi denecek kadar büyük çoğunluğu erkek infertilitesinin ise DNA/kromozom yapısındaki bozulmalarla doğrudan bağlantılı olduğunu göstermektedir. Kullanılan yöntemlerin çeşitliliği nedeniyle bu konuda varılan sonuçları değerlendirmede yöntemle bağılı bazı farklı yorumlara neden olmaktadır (Diallo ve ark., 2015; Shamsi ve ark., 2008; 2011; Sergerie ve ark., 2005; Zeqiraj ve ark., 2018). Özellikle bu tekniklerin ART laboratuvarlarında normal semen analizlerini tamamlayıcı bir prognostik ve diagnostik parametre olarak rutin kullanımı üzerinde görüş birliği yoktur (Shamsi ve ark., 2008; 2011).

Bu çalışma KKTC'de spermiyogram değerlerine göre infertil olan erkeklerde sperm DNA integritesinin anilin mavisi, toluidin mavisi ve TUNEL tekniği ile

incelenmesi ve normal fertil değerlerle karşılaştırılıp istatistiksel yöntemle değerlendirmesi amacıyla planlanmıştır.

Spermde kromatinin uygun paketlenip yeterli kondensasyonu sağlayıp sağlayamadığı asidik anilin mavi boyamasıyla ayırt edilir. Anilin mavi boyaması lizinden zengin histonlarla arginin ve sisteinden zengin protaminleri birbirinden ayırır ve lizine bağlanarak boyamayı gerçekleştirir. Histondan zengin immatür veya olgunlaşmamış kromatin lizinden zengindir bu nedenle koyu mavi görünür. İmmatür kromatin histon protamin değişiminin tam başarılamadığını, histon fazlalığını gösterir. Protaminden zengin olgun çekirdek ise arginin ve sisteinden zengin göreceli olarak daha az lizin içerir bu nedenle anilin mavisi ile boyanmadığı için soluk mavimsi bir renkte görünür. Olgun/matür çekirdekte protamin histon değişimi olağan biçimde gerçekleşmiştir. Anilin mavisi ile boyanma sperm kromatin kondensasyonu için iyi bir belirteçtir. Koyu boyanmış çekirdeklerde histon fazlalığı vardır yeterli histon protamin değişimi olmadığı için kromatin tam kompaktlaşmamış gevşek bir yapıdadır (Shamsi ve ark., 2011). Kırılma ve bozulmalara açıktır.

Bu çalışmada anilin mavisi ile boyanarak immatür yeterli derecede kondanse olmamış protaminden fakir gevşek kromatin içeren sperm oranının infertil grupta, normale göre anlamlı ölçüde fazla oranda bulunduğu gösterilmiştir. Böylece iyi yapılanma göstermeyen kromatinin DNA hasarlarına açık olduğu ve bunların da erkekteki fertilitiyi negatif etkilediği sonucuna varılmıştır. Bu konudaki bulgularımız literatürdeki diğer alışmalar (Hammadeh ve ark., 2001; Hofmann ve Hilscher, 1991; Salsabili ve ark., 2009) ile uyumludur.

Toluidin mavisi DNA'daki fosfat rezidülerine bağlanan bazik bir boyadır. DNA'nın yapısında fosfat rezidülerinin bulunması kromatinin tam kompaktlaşmayıp daha gevşek bir yapı göstdediğini ve DNA da fragmentasyonlar olduğunu gösterir. Çünkü fosfat içeren deoksiriboz şekeri fosfodiester bağlarla birbirine bağlanarak DNA zincirinin çatısını oluştururlar, fosfat rezidülerinin ortaya çıkması DNA'daki yapının hasara uğradığını gösterir. Boya histonların lizinden zengin bölgelerine bağlanınca koyu mavi mor bir metakromazi gösterir. Boya molekülleri protamine bağlanınca ise çekirdek soluk mavi görünür (Ajina ve ark., 2017; Shamsi ve ark., 2011). Koyu mavi mor metakromatik boyanan çekirdekler kromatin

kondensasyonunun tam olmadığı gevşek bir yapılanmayı ve DNA bozulmalarını da birlikte gösterir. Bu şekildeki çekirdek kromatini anormal kromatin olarak adlandırılır ve bu yönüyle sonuçlar TUNEL testiyle de uyum gösterir.

Bu çalışmada anormal kromatin yapısı gösteren koyu mavi mor çekirdeklerin infertil grupta oran olarak anlamlı biçimde fazla olduğu gösterilmiştir. Böylece bozuk kromatin yapısının veya anormal çekirdek kromatininin erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu en azından faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmanın bulguları 2017’de Ajina ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmayla tam uyum göstermekte ve bizim bulgularımızı desteklemektedir. Ajina ve arkadaşları, infertil erkeklerde toluidin mavisi ile kromatin yapısını, akridin orange ile DNA denatürasyonunu gösterip sonuçları istatistiki olarak fertil erkeklerle karşılaştırıp değerlendirmiştir. Hem kromatin yapısındaki bozulmanın hem de DNA parçalanmasının infertil grupta anlamlı olarak fazla olduğu gösterilmiştir. Ayrıca anormal kromatin yapısının (toluidin mavi ile) sperm DNA parçalanma oranı (akridin orange ile) önemli ölçüde korelasyon gösterdiği saptanmıştır (Ajina ve ark., 2017). Bu çalışmanın bulgularının bizim çalışma ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Her iki sitokimyasal boyama (toluidin mavi ve anilin mavi) erkek infertilitesini göstermede önemli parametrelerdir. Ayrıca bozuk yapılanma gösteren kromatinin kırılma, parçalanma gibi etkenlere açık olduğu da görülmektedir. Çalışmanın sonuçları DNA protaminasyonunu, kromatin kompaktlaşması ve uygun yapılanmanın fertilite değerlendirmesindeki primer önemini ortaya koyması açısından da önemlidir. Çünkü kromatin paketlenmesi ve kondensasyonundaki bozulmalar genomu hasarlara açık korumasız bırakıp DNA fragmentasyonu ve infertiliteye neden olurlar. Bunun başka bir önemli sonucu da vardır. Bu yapı bozulmaları füzyon sonucu gelişmesi gereken kromatin dekontensasyonunu da engelleyerek fertilizasyonu durdurur (Hammadeh ve ark., 2001). İmplantasyon ve gebeliği önleyerek infertiliteye neden olur.

Bu çalışmanın bulguları anilin mavisinde olduğu gibi toluidin mavisi ile sperm kromatin boyamasının da her yerde uygulanabilecek ve basit bir teknik olmasına karşın sonuçlarının pahalı ve uzun süren tekniklerden daha pratik ve anlamlı olduğunu ortaya koymaktadır.

Kim ve arkadaşları 2013 yılında yaptığı bir çalışmada toluidin mavi ve anilin mavi boyamasının göstergelerinin rutin semen tekniği ile birlikte kullanılıp kullanılmayacağını araştıran bir makale yayınlamıştır. Bu makalede yaş, strict morfoloji (sperm yapısının dünya sağlık örgütü veya başka kuruluşlar tarafından saptanan morfolojideki iyilik ve kötülüğü gösteren çok belirgin yapısal kriterler üzerinden bir alt değer oluşturulmasıdır), sperm kromatin yapısı ve kondensasyonu toluidin mavisi ve anilin mavisi ile boyanıp korele edilmiş. Ayrıca rutin semen incelemesi bilgisayar yardımı ile yapılan özel bir analiz ile yapılmıştır (CASA computer assisted semen analysis). Anormal morfoloji oranı ve sperm kondensasyonu 3 gruba ayrılan hasta yaşı ile istatistiksel olarak önemli fark göstermemektedir yani yaşa bağlı olmaksızın bu değişiklikler 3 yaş grubunda da gözükmemektedir. Ancak strict morfoloji ile sperm kromatin kondensasyonu ve yapısı arasında önemli pozitif korelasyon saptanmıştır. Sonuç olarak eğer çalışmalarda CASA ve strict morfoloji kullanıldıysa bunun hastanın fertilitasını gösterebileceği için yeterli olduğu düşünülmüş ancak sperm kromatin testlerinin RSA (recurrent spontan abortus) tekrarlayan düşükler ve idiyopatik infertilite gibi seçilmiş bazı olgularda kullanılması uygun olduğu ileri sürülmüştür (Kim ve ark., 2013).

Salsabili ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı bir çalışma eski olmasına karşın sonuçları açısından bizim çalışmamız için önemli bir kaynaktır. Araştırmacılar spinal kord hasarı (SCI), varikosel ve idiyopatik infertilite hastalarında çekirdek kromatin kondensasyonunu anilin mavi ile boyayarak değerlendirmiştir. İmmatüritenin yani çekirdek kondensasyon bozukluğunun en fazla SCI'da %98, daha sonra idiyopatik infertilitede %89 ve varikoselde %88 oranında bulunduğunu rapor etmişlerdir. Hastaların normale yakın semen parametreleri vardı. Semen parametrelerinde morfoloji için strict morfoloji kullanılmıştır. Bizim araştırmalarımıza göre ilk kez veya erken tarihte konsantrasyon, motilite ve morfoloji gibi semen parametreleri ile nükleer kromatin kondensasyonu arasında korelasyon olmadığını söylemiştir. Bu ve bundan sonraki diğer çalışmaların hepsinde sperm fertilitate potansiyelini ölçen metodların hiçbirinin sonuçlarının semen parametreleri ile korele olmadığı, bunlardan bağımsız ayrı parametreler olduğu ileri sürülmüştür (Salsabili ve ark., 2009).

Bu yorumlar bizim çalışmamızla tamamen uyumlu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda fertil ve infertil bireyler arasında kullanılan her 3 metotla da varılan sonuçların infertiliteyi işaret ettiği gösterilmiş ancak semen parametreleri ile korelasyonu olmadığı bulunmuştur. Bu nedenle sperm DNA integritesinin semen analizlerinden bağımsız olarak infertiliteyi değerlendirmede önemli bir ölçüt olduğu düşünülmektedir. Salsabili'nin çalışmasındaki diğer önemli bir sonuç ise idiyopatik infertilite tanısında sadece anilin mavi ile boyanmanın tanıya götürebilecek önemli bir kriter olduğu saptanmıştır.

2011 yılında Shamsi ve arkadaşlarının yayınladığı derleme makalenin sonuçları aşağıdaki şekildedir. Sperm DNA'sındaki çeşitli integrite testlerinin konuya olan katkısı tartışılmıştır. Sperm DNA'sındaki kırılma ve parçalanmaların fertilizasyon, implantasyon, embriyo kalitesi, spontan abortuslar, konjenital malformasyonlarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir. İnfertil erkeklerin yaklaşık %15'inde normal spermiyogram değerleri olduğu için gebelik değerlendirilmesinde kromatin integrite testlerinin önemine değinilmiştir. Sperm DNA yapısının ve bütünlüğünün özellikle ART uygulamaları için çok önemli olduğu düşünülmektedir. Çünkü buradaki uygulamalar doğal sperm oosit buluşma yollarını atlayarak 2 hücreyi yani oositle spermi buluşturur. Bu durum özellikle ICSI için önemlidir. Kullanılan tek bir spermin iyi kalitede olması DNA integrasyonunun tam olduğu anlamına da gelmez (Shamsi ve ark., 2011). Sperm DNA'sındaki fragmentasyon idiyopatik infertilite gösteren erkeklerde incelenmiştir. Çalışmalarda normal sperm parametreleri gösteren idiyopatik infertil erkeklerle anormal sperm parametreleri gösteren idiyopatik infertil erkekler karşılaştırılmıştır (Host ve ark., 1999 ve 2000; Saleh ve ark., 2002). Her iki grupta da fertil grupla karşılaştırıldığında sperm DNA integritesinin bozulduğu ve DNA'nın fragmente olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu çalışmalar sperm DNA incelemelerinin idiyopatik infertilite denen yaklaşık tüm infertilitenin yarısını oluşturan bozukluğun incelenmesinde de önemli olduğunu göstermiştir.

TUNEL testi direkt olarak DNA'daki tekli veya çiftli kırıkları göstermektedir. Terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biotinli dUTP) kullanılarak işaretli nükleotidin kırık bölgelerine tutunması sağlanır. Daha sonra biotinli nükleotidin bulunduğu bölgeler floresan veya enzimatik yöntemle görüntülenir. Enzim işaretli yapıldıysa ışık mikroskopunda veya

floresan işaretli belirteç kullanıldıysa floresan mikroskopta işaretli hücreler sayılır. TUNEL pozitif olarak değerlendirilir.

Atig ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, 100 infertil hasta ve 50 fertil erkek arasında sperm DNA fragmentasyonunu TUNEL testi kullanarak değerlendirmişler ve infertil hastalarda fertil bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Atig ve ark., 2017).

Cui ve arkadaşları 2015 yılında yaptığı çalışmada DNA parçalanmasını gösteren TUNEL, SCD ve COMET gibi metodların erkek infertilitesini değerlendirmedeki önemine göre karşılaştırmıştır. Araştırmacılar yapılan bu meta analiz sonucu TUNEL metodunun hızlı, kolay uygulanan, hızlı sonuç veren, diğerlerine göre spesifitesi veya özgüllüğü yüksek bir yöntem olduğunu rapor etmiştir. (Cui ve ark., 2015).

Yapılan bu çalışmada TUNEL tekniği ile gösterilen çiftli ve tekli DNA kırıklarının sonuçları fertil ve infertil bireyler arasında anlamlı farklılık göstermektedir. Şöyle ki infertil bireylerde TUNEL+ hücreler fertil gruba göre daha fazladır bu fark istatistiki olarak önemlidir. Bulgularımız infertilite değerlendirilmesinde DNA kırıklarının/fragmentasyonunun önemli bir parametre olduğunu göstermiştir. Bulgularımız bu yönüyle anilin mavisi ve toluidin mavisi ile de uyumludur. Kromatin yapısının bozulmuş spermiyumda bunu izleyen süreçte DNA kırıkları oluşmaktadır. Çalışmanın bulguları DNA integritesi ve fragmentasyonunu gösteren yöntemler arasında TUNEL kullanılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (Shamsi ve ark., 2011).

Bizim çalışmamızda infertil ve fertil grupta immatür ve anormal çekirdek yapısı gösteren sperm oranının TUNEL tekniği ile korelasyonu çalışılmıştır. Hem infertil hem de fertil bireylerin asidik anilin blue, toluidin blue ve TUNEL değerleri arasındaki korelasyonların belirlenmesi Spearman korelasyon analizi ile yapılmış ve şu sonuçlar verilmiştir; infertil ve fertil bireylerin asidik anilin blue değerleri ile toluidin blue değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif korelasyonlar ($p<0,05$) saptanmıştır. Buna göre infertil ve fertil bireylerin asidik anilin blue değerleri arttıkça toluidin blue değerleri de artmaktadır. İnfertil bireylerin TUNEL değerleri ile asidik anilin blue ve toluidin blue değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar olduğu tespit edilmiş ($p<0,05$) ve infertil bireylerin TUNEL

değerleri arttıkça asidik anilin blue ve toluidin blue değerleri de artmaktadır. Sadece fertil bireylerin TUNEL değerleri ile asidik anilin blue ve toluidin blue değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyonlar tespit edilememiştir ($p>0,05$). Böylece hem fertil hem infertil grupta anilin mavi ile elde edilen immatür (histondan zengin) çekirdek, toluidin mavi ile elde edilen gevşek kromatin yapısı birbirlerini tamamlayıcı kromatin yapı bozulmaları olup, fertiliteden bağımsız olarak birbirleriyle korelasyon göstermeleri, seçilen boyama yönteminin sperm DNA/kromatin yapılanmasını göstermesi bir bütün olarak değerlendirmede önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Fertil bireylerde hem kromatin olgunlaşması (anilin mavi) hem de kompaktlaşması (toluidin mavi) normal olduğundan bu değerler TUNEL ile istatistiksel olarak korelasyon göstermemesi normal bir kromatin yapısının TUNEL ile gösterilen DNA kırıklarından etkilenmediğini göstermesi açısından önemlidir.

Bu çalışmanın sonuçları ve son zamanda bu konuda yapılan diğer çalışmalarla uyum halinde olup erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde ve özellikle idiyopatik erkek infertilitesinde sperm DNA integritesinin bozulmasının fertilitayı negatif yönde etkilediğini göstermiştir. Kromatin integritesini ve kırıklarını gösteren çalışmaların sonuçlarının konvansiyonel semen parametrelerinden bağımsız olduğu da gösterilmiştir. Şöyle ki semen parametreleri normal veya bozuk çiftlerde de sperm DNA integritesi ve kırıkları her 2 grupta da görülebilmektedir. Bu nedenle infertiliteyi değerlendirmede kromatin integritesinin çok önemli bir parametre olduğu ortaya çıkmıştır. Bu değerlendirmenin androloji laboratuvarlarında semen analizleri ile birlikte rutin tetkike girmemesinin nedeni çalışmaların implantasyon ve gebelik gibi sonuçların olmaması nedeniyledir.

2018 yılında yapılan kapsamlı bir çalışmada, açıklanamayan infertiliteye ilişkin kromatin bozulmalarının fertilizasyon hızı, implantasyon hızı, gebelik özellikleri ve doğum oranı açısından incelenmiştir. Bunlara göre bir tedavi sonucu önermiştir. Yapılan çalışma 354 adet nedeni bilinmeyen çifte ait olup sperm kırığı gösteren hastaların yukardaki değerlerin normale oranla önemli ölçüde bozulduğunu göstermiş ve buna dayalı olarak da klinisyenlere bir tedavi protokolü önermiştir. Bu çalışmanın sonuçları ve amacı tedavi protokollerini tartışmak olmamasına rağmen uygulanan yöntemin gebelik ve doğum oranlarını da içermesi nedeniyle rutine

girmesi gerekli önemli bir parametre olduğunu göstermektedir (O'Neill ve ark., 2018).

Bu çalışmanın sonuçları, erkek infertilitesini değerlendirmede ve özellikle ART kliniklerine başvuran hastaların tedavi protokollerini saptamada DNA integritesi veya bütünlüğünün önemini ortaya koymuştur. Bu değerlendirmenin normal spermiyogram sonuçlarından bağımsız ayrı parametre olması önemini, kullanılabilirliğini ve değerini göstermektedir.

DNA integritesi veya bütünlüğünün bozulmasında DNA/kromatin yapılanması ve kondensasyonun önemi, bu değerleri ölçen anilin mavi ve toluidin mavi teknikleri ile gösterilmiş infertil erkeklerde bu değerlerin anlamlı ölçüde azaldığı ve bununla paralel olarak DNA kırıklarının da anlamlı ölçüde arttığı belirlenmiştir.

Çalışmanın orijinalliği, DNA'daki kırıkların, hasarların tamamen çekirdek kromatinindeki yapılanmanın ve kompaktlaşmanın tam olmaması nedeni ile oluştuğunun açıkça ortaya konmasıdır.

Örnek sayısının az olmasına karşın bu çalışmadaki istatistiksel değerlendirmenin KKTC toplumuna özgü olması ve sonuçların tüm dünya genelindeki çalışmalarla paralellik göstermesidir. Bu nedenle ilerde ART kliniklerine başvuran hastalarda uygun DNA hasarı olmayan spermin seçimi için yapılacak çalışmalara öncü yol gösterici olabilecektir.

Bu çalışmada varılan sonuçların ışığında özellikle tekrarlayan düşükler, erken gebelik kaybı, fertilizasyon ve implantasyon bozuklukları gibi bazı mekanizmaların ciddi genetik bozuklukla doğacak bebeği engelleme mekanizması olabileceği düşünülmüştür (Zeqiraj ve ark., 2018).

Ayrıca oositin fertilizasyon sonrası bazı DNA kırıklarını tamir etme yeteneğinin yine benzer biçimde genetik kusurlu doğacak bebeği sağlıklı olmasını sağlayacak doğal bir iyileştirme olduğu düşünülebilir (Steger ve Balhorn, 2018).

6. KAYNAKLAR

Agarwal A, Cho CL, Esteves SC. Should we evaluate and treat sperm DNA fragmentation? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2016;28(3), 164-171.

Agarwal A, Desai NR, Makker K, Varghese A, Mouradi R, Sabanegh E, et al. Effects of radiofrequency electromagnetic waves (RF-EMW) from cellular phones on human ejaculated semen: an in vitro pilot study. *Fertility and sterility*. 2009;92(4):1318–25.

Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2015;13(1), 37.

Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU international*. 2005;95(4), 503-507.

Ajina T, Ammar O, Haouas Z, Sallem A, Ezzi L, Grissa I, Mehdi M. Assessment of human sperm DNA integrity using two cytochemical tests: Acridine orange test and toluidine blue assay. *Andrologia*. 2017;49(10), e12765.

Akama K, Horikoshi T, Sugiyama A, Nakahata S, Akitsu A, Niwa N, Imaizumi N. Protein disulfide isomerase-P5, down-regulated in the final stage of boar epididymal sperm maturation, catalyzes disulfide formation to inhibit protein function in oxidative refolding of reduced denatured lysozyme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2010;1804(6), 1272-1284.

Alves M, Martins A, Rato L, Moreira P, Socorro S, Oliveira P. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013;1832(5), 626-635.

Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, Carrell DT. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and sterility*. 2006;86(5), 1408-1415.

Atig F, Kerkeni A, Saad A, Ajina M. Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2017;34(3), 373-381.

Baazeem A, Boman JM, Libman J, Jarvi K, Zini A. Microsurgical varicocelectomy for infertile men with oligospermia: differential effect of bilateral and unilateral varicocele on pregnancy outcomes. 2009;104(4):524-8.

Baker MA, Aitken RJ. The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;216(1-2), 47-54.

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction*. 2007;22(6), 1506-1512.

Boman JM, Libman J, Zini A. Microsurgical varicocelectomy for isolated asthenospermia. *The Journal of urology*. 2008;180(5), 2129-2132.

Bracke A, Peeters K, Punjabi U, Hoogewijs D, Dewilde S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive biomedicine online*. 2018;36(3), 327-339.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews*. 1972;52(1), 198-236.

Cui ZL, Zheng DZ, Liu YH, Chen LY, Lin DH, Feng-Hua L. Diagnostic accuracies of the TUNEL, SCD, and Comet based sperm DNA fragmentation assays for male infertility: a metaanalysis study. *Clin Lab*. 2015;61(5-6):525-35.

De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Human reproduction*. 1998;13 (Suppl 1): 1-8.

Denson V. Diagnosis and management of infertility. *J Nurse Pract*. 2006;1: 380-386.

Diallo MS, Faye O, Diallo AS, Diallo Y, Diao B. Increased DNA fragmentation in patients with infertility in Dakar (Senegal). *Advances in Reproductive Sciences*. 2015;3(04), 97.

Dias TR, Alves MG, Silva BM, Oliveira PF. Sperm glucose transport and metabolism in diabetic individuals. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014;396(1), 37-45.

Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod*. 2004;19: 2277- 82.

Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian journal of andrology*. 2006;8(1), 11-29.

Esteves SC. Novel concepts in male factor infertility: clinical and laboratory perspectives. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33(10), 1319-1335.

Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Developmental biology*. 1975;44(2), 394-436.

Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 2004;10(5), 387-399.

Gartner LP, Hiatt JL. *Renkli Histoloji Atlası Çeviren: Dağdeviren A, Müftüoğlu FS, Karabay G. Güneş Tıp Kitabevi, Ankara; 2009.*

Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science*. 1987;236(4804), 962-964.

Ghaffari MA, Rostami M. The effect of cigarette smoking on human sperm creatine kinase activity: as an ATP buffering system in sperm. *Int J Fertil Steril*. 2013;6: 258–65.

Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJ, Maria-Engler SS, Bonini MG, Consolaro ME. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nature Reviews Urology*. 2014;11(12), 672.

Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Zalensky AO. Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *The Journal of cell biology*. 2000;151(7), 1591-1598.

Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum Reprod*. 2003;18: 1959- 66.

Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Xu D. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(19), 1388-1393.

Guzick D, Sullivan M, Adamson GD, Cedars M, Falk R, Peterson E, Steinkampf M. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertility and sterility*. 1998;70(2), 207-213.

Güneş S, Arslan MA, Hekim GNT, Asci R. The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33(5), 553-569.

Hammadeh ME, Hamad MF. Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *Int J Fertil Steril*. 2009;3(3).

Hammadeh ME, Zeginiadv T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Archives of andrology*. 2001;46(2), 99-104.

Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Human Reproduction*. 1991;6(7), 979-982.

Host E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F. DNA strand breaks in human spermatozoa, a possible factor, to be considered in couples suffering from unexplained infertility. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 1999;78(7), 622-625.

Host E, Lindenberg S, Smidt-jensen S. DNA strand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 2000;79(3), 189-193.

Jangir R, Jain G. Diabetes mellitus induced impairment of male reproductive functions: a review. *Current diabetes reviews*. 2014;10(3), 147-157.

Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S.* 10. basım, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; 2009, s: 135.

Kazerooni T. Evaluation of sperm's chromatin quality with acridin orange test, Chromomycine A3 and aniline blue staining in couple with recurrent abortion. *Fertility and Sterility*. 2009;92(3), S206.

Kessopoulou E, Tomlinson MJ, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? *J Reprod Fertil*. 1992;94(2): 463-70.

Khaki A, Nouri M, Fathiazad F, Ahmadi-Ashtiani H, Rastgar H, Rezazadeh S. Protective effects of quercetin on spermatogenesis in streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Medicinal Plants*. 2009;1(29), 57-64.

Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Archives of histology and cytology*. 2004;67(4), 271-284.

Kim GY. What should be done for men with sperm DNA fragmentation? *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2018;45(3), 101-109.

Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, Choi YM. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2013;40(1), 23-28.

Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*. 2005;434(7033), 583.

Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function, 2010.

Lee J, Richburg J H, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*. 1997;138(5), 2081-2088.

Liu CH, Tsao HM, Cheng TC, Wu HM, Huang CC, Chen CI, Lee MS. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2004;21(4), 119-126.

Loir M, Lanneau M. Structural function of the basic nuclear proteins in ram spermatids. *Journal of ultrastructure research*. 1984;86(3), 262-276.

Lone SA, Shah N, Yadav HP, Wagay MA, Singh A, Sinha R. Sperm DNA damage causes, assessment and relationship with fertility: A review. *Theriogenology Insight: An International Journal of Reproduction in all Animals*. 2017;7(1), 13.

Maneesh M, Jayalekshmi H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2006;21(2), 80-89.

Martincic DS, Klun IV, Zorn B, Vrtovec HM. Germ cell apoptosis in the human testis. *Pflügers Archiv*. 2001;442(1), r159-r160.

Mezquita C. Chromatin composition, structure and function in spermatogenesis, 1985.

Moein MR, Dehghaniv, Tabibnezhad N, Vahidi SAD. Reactive oxygen species (ROS) level in seminal plasma of infertile men and healthy donors, 2007; 51-55.

Mudrak O, Chandra R, Jones E, Godfrey E, Zalensky A. Reorganisation of human sperm nuclear architecture during formation of pronuclei in a model system. *Reproduction, Fertility and Development*. 2009;21(5), 665-671.

Oliva R. Protamines and male infertility. *Human reproduction update*. 2006;12(4), 417-435.

O'Neill CL, Parrella A, Keating D, Cheung S, Rosenwaks Z, Palermo GD. A treatment algorithm for couples with unexplained infertility based on sperm chromatin assessment. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018;35(10), 1911-1917.

Perrin J, Tassistro V, Mandon M, Grillo JM, Botta A, Sari-Minodier I. Tobacco consumption and benzo(a)pyrene-diol-epoxide-DNA adducts in spermatozoa: in smokers, swim-up procedure selects spermatozoa with decreased DNA damage. *Fertil Steril*. 2011;95: 2013–7.

Phillips DH, Venitt S. DNA and protein adducts in human tissues resulting from exposure to tobacco smoke. *Int J Cancer*. 2012;131:2733–53.

Pınar İLİ. Sperm Kriyoprezervasyonunda DNA Fragmentasyonunun Araştırılması: TUNEL Yöntemi. *Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics*. 2017;3(2), 96-104.

Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development. In *International review of cytology*. Academic Press; 1986; p: 1-65.

Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta physiologica*. 2010;198(1), 15-35.

Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*. 2000;22(5), 423-430.

Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A crosssectional analysis. *Hum Reprod.* 2007;22: 188–96.

Rathke C, Barckmann B, Burkhard S, Jayaramaiah-Raja S, Roote J, Renkawitz-Pohl R. Distinct functions of Mst77F and protamines in nuclear shaping and chromatin condensation during *Drosophila* spermiogenesis. *European journal of cell biology.* 2010;89(4), 326-338.

Rives N. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis, patient approach and genetic counseling. In *Annales d'endocrinologie.* Elsevier Masson; 2014; p:112-114.

Ross M, Pawlina W. *Histology, A text and atlas, with correlated cell and molecular biology.* Lippincott Williams & Wilkins, 2017.

Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S. Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene.* 2005;345(2), 139-153.

Sadler TW, Langman J. *Medical embryology.* Williams and Williams, 1985.

Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction Update,* 2004;10(1), 39-51.

Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Sharma RK. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and sterility*. 2002;78(2), 313-318.

Salsabili N, Mehraei A, Jalalizadeh B, Pourmand G, Jalaie S. Correlation of sperm nuclear chromatin condensation staining method with semen parameters and sperm functional tests in patients with spinal cord injury, varicocele, and idiopathic infertility. *Urology journal*. 2009;3(1), 32-37.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of reproduction*. 2002;66(4), 1061-1067.

Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human reproduction*. 2005;20(12), 3446-3451.

Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2010;27(1), 3-12.

Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital Infection as a Risk Factor for Male Infertility. 2017;114(19): 339-346.

Shamsi MB, Imam SN, Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2011;28(11), 1073-1085.

Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian Journal of Medical Research*. 2008;127(2).

Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996;48(6), 835-850.

Simon L, Castillo J, Oliva R, Lewis SE. Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive biomedicine online*. 2011;23(6), 724-734.

Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, Carrell DT. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*. 2014;29(11), 2402-2412.

Singh A, Agarwal A. The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility. *Open Reprod Sci J*. 2011;3, 65-71.

Singh K, Devi S, Pankaj P.P. Diabetes Associated Male Reproductive Dysfunctions: Prevalence, Diagnosis and Risk Factors. *International Journal of Drug Development and Research*, 2016.

Sotolongo B, Huang TT, Isenberger E, Ward WS. An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *Journal of Andrology*. 2005;26(2), 272-280.

Steger K, Balhorn R. Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Anatomia, histologia, embryologia*. 2018;47(4), 273-279.

Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*. 2002;17(1), 184-189.

Tvrda E, Knazicka Z, Bardos L, Massanyi P, Lukac N. Impact of oxidative stress on male fertility-a review. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2011;59(4), 465-484.

Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a populationbased prospective study. *Fertil Steril*. 2003;79: 577-84.

Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2009;16(1), 30-36.

William KO, Patrick CN. *Netter Temel Histoloji Çeviren: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara; 2009.*

World Health Organization. Examination and processing human semen. Geneva: World Health Organization. 2010;1-287.

Zeqiraj A, Beadini S, Beadini N, Aliu H, Gashi Z, Elezaj S, Shabani A. Male Infertility and Sperm DNA Fragmentation. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 2018;6(8), 1342.

7. EKLER

Ek 1. Etik kurul onayı



EK- 554-2017

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 21.09.2017
Toplantı No : 2017/50
Proje No : 456

Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. Esin Aşan'ın sorumlu araştırmacısı olduğu, YDU/2017/50-456 proje numaralı ve "Fertil ve infertil bireylerde spermiyum kromatin bütünlüğünün ışık mikroskobu düzeyinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi" başlıklı proje önerisi kurulumuzca değerlendirilmiş olup, etik olarak uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Rüştü Onur
2. Prof. Dr. Nerin Bahçeciler Önder
3. Prof. Dr. Tamer Yılmaz
4. Prof. Dr. Şahan Saygı
5. Prof. Dr. Şanda Çalı
6. Prof. Dr. Nedim Çakır
7. Prof. Dr. Kaan Erler
8. Doç. Dr. Ümran Dal Yılmaz
9. Doç. Dr. Eyüp Yayı
10. Doç. Dr. Nilüfer Galip Çelik
11. Yrd. Doç. Dr. Emil Mammadov

(BAŞKAN)

(ÜYE) KATILMADI

(ÜYE)

(ÜYE)

(ÜYE) KATILMADI

(ÜYE)

(ÜYE)

(ÜYE) KATILMADI

(ÜYE)

(ÜYE)

(ÜYE)

Ek 2. Aydınlatılmış onam formu

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

(Araştırmacının Açıklaması)

Sperm testi ile ilgili yeni bir araştırma yapmaktayız. Araştırmanın ismi ‘Fertil ve İnfertil bireylerde spermiyum kromatin bütünlüğünün ışık mikroskobu düzeyinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi’. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, sperm testinizin infertilite açısından değerlendirmektir. Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Kadın Doğum İnfertilite Anabilim Dalları’nın ortak katılımı ile gerçekleştirilecek bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz; örneğinizi testi yapacak olan arkadaşına (kabın üzerinde isim soyadı ve veriliş saati kayıt edilerek) teslim ediniz. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır. Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Araştırmacı

Adı, soyadı: Ayşe Savaşan

Adres: YDÜ Hastanesi

Tel. 0533 869 1828

İmza

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Sayın Prof. Dr. Esin AŞAN tarafından Histoloji ve Embriyoloji/Kadın Doğum Anabilim Dalları'nda 'Fertil ve İnfertil bireylerde spermiyum kromatin bütünlüğünün ışık mikroskobu düzeyinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi' konusunda bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam araştırmacı ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güvence verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim (ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda herhangi bir saatte Ayşe Savaşan'ı 0392 675 1000/1026 (iş) veya 0533 869 1828 (cep) no'lu telefonlardan veya YDÜ Mikrobiyoloji laboratuvar adresinden arayabileceğimi biliyorum. Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti kabul ediyorum. İmzalı bu form kâğıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Araştırmacı

Adı, soyadı: Ayşe Savaşan

Adres: YDÜ Hastanesi

Tel. 0533 869 1828

İmza

Ek 3. Orjinallik Raporu

Ayşe Savaşan - FERTİL VE İNFERTİL BİREYLERDE SPERMİYUM KROMATİN

ORIGINALITY REPORT

7 %	6 %	3 %	%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	docs.neu.edu.tr Internet Source	2 %
2	acikerisim.deu.edu.tr Internet Source	1 %
3	www.jarem.org Internet Source	<1 %
4	www.journalagent.com Internet Source	<1 %
5	acikerisim.istanbulbilim.edu.tr:8080 Internet Source	<1 %
6	library.neu.edu.tr Internet Source	<1 %
7	www.cappsy.org Internet Source	<1 %
8	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	<1 %
9	www.thed.org.tr	

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Ayşe	Soyadı	SAVAŞAN
Doğum Yeri	Girne	Doğum Tarihi	7/10/1986
Uyruğu	KKTC	Tel	0533 869 1828
E-mail	aysesavasani86@gmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Yakındoğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2019
Lisans	Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	20 Temmuz Fen Lisesi	2003

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Biyolog	Lamel Tıbbi Tahlil Laboratuvarı	2008-2014
Patoloji Teknikeri	YDÜ Hastanesi Patoloji Laboratuvarı	2014-Halen