



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN SPERM KROMATİN
KONDENZASYONU VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ

ECEM ASLAN

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL

2019



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN SPERM KROMATİN
KONDENZASYONU VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ

ECEM ASLAN

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Tülay İREZ

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI: Dr.Öğr.Üyesi Meryem ALAGÖZ

İSTANBUL,2019

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Program Adı: Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Öğrencinin Adı Soyadı: Ecem ASLAN

Danışman: Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Ecem ASLAN tarafından hazırlanan "Sperm Hazırlama Yöntemlerinin Sperm Kromatin Kondenzasyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:07/03/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Melike ERKAN

İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Yusuf ÇELİK

Biruni Üniversitesi

İmza

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Leman Şenturk
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

I. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı herhangi bir davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, çalışma ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar listesi şeklinde eklediğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ecem ASLAN



II. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından itibaren en büyük katkıyı ve desteği gösteren saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof.Dr. Tülay İREZ başta olmak üzere Biruni Üniversitesi Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı'ndaki tüm hocalarıma, Dr.Öğr.Üyesi Emre SALABAŞ'a , bu aşamaya gelebilmemde emeği olan tüm hocalarıma ve her zaman yanımda olan, beni daima destekleyen aileme saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ecem ASLAN

III.İÇİNDEKİLER

I. BEYAN

.....**Hata!**

Yer işareti tanımlanmamış.

II. TEŞEKKÜR IV

III.İÇİNDEKİLER V

IV. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ VIII

V. TABLO VE GRAFİK LİSTESİ X

VI. ŞEKİL LİSTESİ XII

1.ÖZET 1

2.ABSTRACT 3

3.GİRİŞ VE AMAÇ 5

4. GENEL BİLGİLER 7

4.1.Erkek Üreme Sistemi 7

4.1.1. Testis 8

4.1.2.Seminifer tübüller 9

4.1.3.Sertoli hücreleri 9

4.1.4.Leydig hücreleri 10

4.1.2.Erkek Genital Kanal Sistemi 11

4.1.2.1.Duktili eferentes 11

4.1.2.2.Epididimis 11

4.1.2.3.Duktus deferens 11

4.1.2.4.Penis ve üretra 11

4.1.3.Erkek Genital Sistemin Yardımcı Bezleri 12

4.1.3.1.Prostat bezi 12

4.1.3.2.Seminal vezikül 12

4.1.3.3.Bulboüretal bezler(Cowper bezleri) 12

4.2.Spermatogenez	13
4.3.Sperm Kromatin Yapısı.....	16
4.4.Sperm DNA Hasarı	17
4.4.1.Anormal veya düzensiz kromatin paketlenmesi.....	17
4.4.2.Apoptozis.....	18
4.4.3.Oksidatif stres	18
4.5.Sperm DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri	19
4.5.1.Sperm kromatin yapısı analizi-SCSA.....	20
4.5.2.COMET analizi	20
4.5.3.Terminal transferaz (TUNEL) analizi	20
4.5.4.Sperm kromatin dağılımı analizi-SCD	21
4.5.5.Asidik anilin mavisi boyama	21
4.5.6.Akridin oranj(turuncu) boyama	21
4.5.7.Kromomisin A3 boyama	22
4.5.8.Toluidin mavisi boyama	22
4.6.Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	22
2.6.1.Semen toplanması (WHO 5.baskı ,2010)	25
2.6.1.1.Makroskopik inceleme	25
2.6.1.2.Mikroskopik inceleme	26
5.GEREÇ VE YÖNTEM	30
5.1.Çalışmanın Tasarımı.....	30
5.2.Hasta Seçimi.....	30
5.3.Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	31
5.3.1.Swim-up yöntemi:	31
5.3.2.Gradient+Swim-up yöntemi:	32
5.3.3.Sperm maturasyonunun anilin mavisi boyası ile gösterilmesi	32

5.3.4.Sperm DNA fragmantasyonunun akridin oranj ile floresan mikroskobunda değerlendirilmesi	33
5.3.5.İstatistiksel yöntemler:	36
6. BULGULAR:.....	36
7. TARTIŞMA:	51
8. SONUÇ VE ÖNERİLER:	55
9. KAYNAKLAR:	56
10.EKLER.....	63
EK 1 Gönüllü Onam Formu	63
EK 2 Etik Kurul Onayı.....	67
11.ÖZGEÇMİŞ	70

IV. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat derece
µl	: mikrolitre
AB	:Anilin Blue
AMH	:Anti-müllerian Hormon
AO	:Akridin Orange
Br-dUTP	: 5-Bromo-2'-Deoxyuridine 5'-Triphosphate
Caspas	:cysteinyl aspartate-specific proteinases
cc	: cubic centrimetre
CMA3	:Kromomisin A3
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
DFI	: DNA fragmentation index
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNAaz	:Deoksiribonükleaz
dsDNA	:Double-Stranded Deoksiribonükleik Asit
DSÖ-WHO	: Dünya Sağlık Örgütü, World Health Organization
FITC	: Fluorescein-5-isothiocyanate
FSH	:Folikül Stimülan Hormon
ICSI	: İntracytoplasmic Sperm İnjection
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
LH	:Lüteinizan Hormon

ml	: mililitre
O2-	: Süperoksit radikali
OAT	: Oligoastenoteratospermi
pH	: Power of Hydrogen
ROS	:Reactive Oxygen Species
Rpm	: Revolutions per minute
SCD	:Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	:Sperm Chromatin Structure Assay
TdT	:Terminal nukletidil transferaz
TUNEL	:Terminal Uridine Nick- End Labeling
YÜT	: Yardımla Üreme Teknikleri

V. TABLO VE GRAFİK LİSTESİ

TABLO 1: Sperm Kromatin Hasarını Belirleme Yöntemleri

TABLO 2: Semen Analizi Normal Referans Değerleri

TABLO 3: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.

TABLO 4: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi motilite değerlerinin karşılaştırılması.

TABLO 5: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi morfoloji değerlerinin karşılaştırılması.

TABLO 6: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama sonrası konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.

TABLO 7: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama sonrası motilite değerlerinin karşılaştırılması.

TABLO 8: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi yıkama sonrası sperm maturasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması

TABLO 9: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi yıkama sonrası sperm DNA fragmantasyon indeksi değerlerinin karşılaştırılması

GRAFİK1: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.

GRAFİK2: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama sonrası konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.

GRAFİK3: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi ve yıkama sonrası konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.

GRAFİK4: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi motilite değerlerinin karşılaştırılması.

GRAFİK5: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama sonrası motilite değerlerinin karşılaştırılması.

GRAFİK6: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi ve yıkama sonrası motilite değerlerinin karşılaştırılması.

GRAFİK7: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi morfoloji değerlerinin karşılaştırılması.

GRAFİK8: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi yıkama sonrası sperm maturasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması.

GRAFİK 9: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi yıkama sonrası sperm DNA fragmantasyon indeksi değerlerinin karşılaştırılması.

VI. ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL1: Erkek üreme sistemi anatomisi

ŞEKİL2: Testis yapısı ve seminifer túbüller

ŞEKİL3: Testisin histolojik yapısı

ŞEKİL4: Seminifer túbül ve çevresindeki dokunun bir bölümü

ŞEKİL5: Erkek germ hücrelerinin oluşumu

ŞEKİL6: Sperm hücresinin yapısı

ŞEKİL7: Makler sayım kamerası

ŞEKİL 8: Sperm morfoloji değerlendirmesi, anormal morfolojik yapıdaki spermilerin gösterimi (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü)

ŞEKİL 9: Sperm morfoloji değerlendirmesi, anormal morfolojik yapıdaki spermilerin gösterimi (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü)

ŞEKİL10: Asidik anilin boyama koyu mavi boyanan pozitif (+) spermeler maturasyon defektini yansıtmakta olup, boyanmayan negatif (-) olarak gösterilmektedir. (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü)

ŞEKİL 11: Acridin orange boyama yeşil (normal), kavuniçi ve turuncu (defekli) DNA fragmentasyonunu göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskobu görüntüsü)

ŞEKİL 12: Acridin orange boyama kontrol yeşil (normal) DNA ya sahip spermeleri göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskobu görüntüsü)

1. ÖZET

İnfertilite günümüzde giderek artan bir sorun haline gelmekte olup infertil çiftlerin yaklaşık %20'si yalnızca erkek faktörden kaynaklanmaktadır. Erkek faktör değerlendirilmesinde sıklıkla DSÖ (WHO) kriterlerine uygun standart semen analizi yapılmaktadır. Fakat semen analizi sperm DNA hasarları hakkında bilgi vermemektedir.

Sperm DNA hasar mekanizmalarından en önemlilerinden biri anormal ya da düzensiz kromatin paketlenmesidir. Spermatogenez sürecinde spermatid kromatini kompaksiyon süreci geçirir ve histon proteinleri sperme özgü protamin proteinleri ile yer değiştirerek sperm kromatin kondensasyonunu gerçekleştirir. Kromatin kondensasyon sürecinin normal olmaması spermelerde gelişimsel anomalilere neden olur. Sperm DNA fragmantasyon indeksi ve maturasyon defekti oranlarına bakılarak fertilizasyonda kullanılacak sperm hakkında bir öngörü sağlanabilir. Gradient ve swim-up yöntemleri günümüzde IVF laboratuvarlarında rutin olarak uygulanan IVF-ICSI öncesi sperm hazırlama teknikleridir. Gradient yöntemi anormal ve normal spermelerin yoğunluk farklılıklarından faydalanarak ayırma işlemi sağlarken, swim-up yöntemi spermelerin hızlı olanlarının üst faza yüzmesi ile ayrışmayı sağlar. Her iki yöntem de en kaliteli, yüksek motilite ve normal morfolojiye sahip spermeleri elde etmeyi amaçlarken semenden sperm dışı hücrelerle birlikte ölü, hareketsiz spermeleri ayırmayı sağlar. Çoğunlukla IVF laboratuvarlarında spermle ilgili yapılan tüm işlemler 37° C gerçekleştirilir.

Bu çalışmada normospermi ve oligoastenoteratospermi olgularında farklı semen hazırlama yöntemleri kullanarak, hazırlama işleminin maturasyon defekti olan spermeleri ayrıştırması ve aynı zamanda oda sıcaklığı (22 °C) ve 37° C 'nin sperm DNA fragmantasyonuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma 'Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul'una sunuldu ve 2018-12-9 sayı ve 29.01.2018 tarihli etik kurul onayı alındı. Çalışma Ocak 2018-Haziran 2018 tarihleri arasında Biruni Üniversite Hastanesi'ne spermiyogram analizi için başvuran hastalarda uygulandı.

Bu çalışmada; Biruni Üniversite Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan normospermi(n:20) ve oligoastenoteratospermi gruplarında (n:20) WHO kriterlerine uygun standart semen analizi uygulanarak ardından asidik anilin mavisi boyama yöntemi ile sperm maturasyon defekti ve acridin orange boyama yöntemi ile sperm DNA fragmantasyon hasarı değerlendirilmiştir. Gradient ve swim-up yöntemleri kullanılarak yapılan sperm ayrıştırma sonrası gruplar kendi içinden ayrılarak oda sıcaklığı (22 °C) ve 37° C 'de 1 saat inkübasyon yapılmış olup inkübasyon sonrası yeniden asidik anilin mavisi boyama ve acridin orange boyama yapılarak öncesindeki DNA fragmantasyon indeksi ve sperm maturasyon defekti ile uygulama sonrası elde edilen değerler karşılaştırılmıştır.

Bu tez çalışmasına göre sperm hazırlama yöntemi olarak swim-up ve gradient yöntemlerinin arasında motil sperm, sperm sayısı ve morfolojisi açısından anlamlı farklılık bulunmamış olup motilite ve konsantrasyon parametreleri gözönüne alınarak iki yöntem de olgunun durumuna göre tercih edilebilir. Sperm immatürasyonu ve DNA fragmantasyonu açısından da gerek dansite gradient ve gerekse swim up yöntemi ile azaldığı gösterilmiştir. Özellikle oligoastenoteratospermi olgularında normospermiye kıyasla, 37°C de inkübasyonun özellikle DNA fragmantasyonu açısından kötü etkileri ortaya çıkmıştır.

Sperm DNA hasarını en aza indirmek için inkübasyon 37°C ye göre oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir. En fonksiyonel ve DNA hasarının en az olduğu ayrıştırma ve inkübasyon sıcaklığının swim-up ve oda sıcaklığı (22°) olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: DNA hasarı, gradient, swim-up, DNA fragmantasyonu

2. ABSTRACT

Infertility problem is a increasing day by day, approximately 20% of infertile couples are caused only by male factor). In the evaluation of the male factor, standard semen analysis is performed according to WHO criteria. However, semen analysis does not provide information about sperm DNA damage. One of the most important mechanisms of sperm DNA damage is abnormal or irregular chromatin packaging. In the process of spermatogenesis, the spermatid chromatin undergoes a compaction process and the histone proteins carry out the condensation of sperm chromatin by replacing them with sperm specific protamine proteins. Abnormal chromatin condensation process causes developmental anomalies in sperm. Sperm DNA fragmentation index and maturation defect rates can be related with infertility. Gradient and swim-up methods are the pre-IVF-ICSI sperm preparation techniques that applied routinely in IVF laboratories. Swim-up method allows the separation of the spermatozoa from the fast ones to the upper phase while the gradient method provides separation by utilizing the density differences of abnormal and normal sperm. Both methods aimed to obtain the highest quality, high motility and normal morphology. Semen with non-sperm cell allows to eliminate dead immobilized sperm. Mostly, all procedures are performed at 37 ° C in IVF laboratories .The aim of study was to investigate the effect of different semen preparation in different temperatures on the separation of sperm, control in with maturation defect and DNA fragmentation.

The study was submitted to the Biruni University Ethics Committee and was approved in 2018-12-9 and dated 29.01.2018. The study was applied to the Biruni University Hospital between January 2018 and June 2018 in patients who applied for spermogram analysis. In study; Patients admitted to the Biruni University Hospital Urology outpatient clinic. Standard semen analysis was performed according to WHO criteria in normospermia (n: 20) and oligoasthenoteratospermia (n: 20) groups, followed by sperm maturation defect with acidic aniline blue staining method and sperm DNA fragmentation damage by acridin orange staining method. After separation of the sperm by using gradient and swim-up methods, the groups were separated from them and incubated at room temperature (22 ° C) and 37 ° C for 1 hour, followed by incubation with acidic aniline blue staining and acridin orange

staining prior to DNA fragmentation index. Sperm maturation defect was compared with the values obtained after the application.

According to this thesis, there is no significant difference between the swim-up and gradient methods in terms of motile sperm, sperm number and morphology as a sperm preparation method and it can be preferred according to the condition of motility and concentration parameters. In terms of sperm immaturation and DNA fragmentation, it has been shown to decrease with density gradient and swim up method. Especially in cases of oligoasthenoteratospermia, the incubation at 37 ° C had bad effects especially on DNA fragmentation compared to normospermia.

Incubation can be carried out at room temperature to minimize sperm DNA damage. In this study it has been shown that the most functional incubation temperature at the swim-up or gradient technique are room temperature (22 °C).

Key words: DNA damage, *gradient*, *swim-up*, DNA fragmentation

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Fertilizasyon sperm ve oositin doğrudan etkileşimi sonucu hücre membranlarının füzyonuyla beraber erkek ve dişi gametlerin birleşmesi şeklinde meydana gelmektedir. Bu sürecin tamamlanması ve bunu takiben normal embriyo gelişimi sperm DNA bütünlüğüne bağlıdır. Kondanse sperm DNA'sı genetik materyalin hatasız geçişi için önem arz etmektedir. Sperm DNA hasarı erkek infertilitesinin önemli bir nedenidir (Kara M. Ve ark. , 2011).

Spermiyogenez sürecinde protamin proteinleri spermatid kromatin kondensasyonunda önemli rol oynarlar. Spermiyogenez sırasında spermatid kromatini kompaksiyon sürecine girer ve histonların protaminlerle yer değiştirmesi ile kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Normal kromatin kondensasyonu'nun olmaması spermlerde gelişim anomalilerine neden olmaktadır (Erimşah S. ve ark. , 2008)

Standart semen analizinde spermi değerlendirmek için bazı kriterler bulunmaktadır. Bunların arasında; konsantrasyon, motilite ve morfoloji başta gelmektedir (WHO,2010). Fakat bu kriterler spermdeki DNA hasarı ve sperm maturasyonu hakkında bilgi vermemektedir. Standart semen analizinde kullanılan parametrelere ek olarak sperm maturasyon, kromatin kondansasyon testinin de rutin laboratuvar uygulamalarında yer alması sperm DNA'sı hakkında öngörü olarak kabul edilebilir (Hammadeh M.E. et al. ,2001). Ayrıca ICSI ve IVF sonuçlarında blastokist aşamasına gelinmesinde öngörü sağlayabileceğini düşündürmektedir (Foresta C. et al. ,1992; Hammadeh M.E et al. ,1996; Zini et al. ,2001).

Ortam sıcaklığının spermlerin testiküler maturasyonunu etkilediği bilinmektedir (Hamilton TRDS et al. ,2018). Memeli spermatogenezinde, geçiş proteinleri, nükleozomları kararsızlaştıran, DNA burulmasını önleyen, iplik kopmalarının DNA onarımını kolaylaştıran ve kromatin yoğunlaşmasına katkıda bulunan spermatidlerdeki histonların çoğunun yerini alır (Sakkas D. et al. ,2010; Wouters-Tyrou D. et al. ,1998). Daha sonra, protaminler adı verilen pozitif yüklü proteinler protaminasyon adı verilen bir süreçte bu geçiş proteinlerinin yerini alır (Carrell D.T et al. , 2007; Gosalvez J. et al. ,2011). Protaminasyon yanlış gerçekleştiğinde, sperm kromatin yoğunlaşmasındaki bozukluklar, doğurganlık üzerindeki etkileri ile ortaya

çıkabilir (Balhorn R. ,1982; Balhorn R. ,2007). Sperm kromatin paketlenmesi sadece genetik materyalin sıkışmasına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda fiziksel ve kimyasal hasarın etkilediği sperm DNA'sını da korur (Sotolongo B. Et al. ,2005; Aitken R.J et al. ,1992). Protamin eksikliği, spermatozoayı serbest radikallerin etkisine karşı daha savunmasız hale getirir (Aitken R.J. et al. ,1988); bu nedenle, ısı stres koşullarında anormal sperm kromatini tarif edildiğinden, ısı stresinin protaminasyon sürecini etkilemesi muhtemeldir.

Bu çalışmada oligoastenoteratospermi ve normospermi gruplarında farklı semen hazırlama yöntemleri kullanılarak, farklı sıcaklık değerleri ile birlikte, baştaki konsantrasyon, motilite ,morfoloji, sperm maturasyon değeri ve DNA fragmantasyon değeri parametreleri ele alınarak sperm hazırlama ve sıcaklık inkübasyonun sperm maturasyon değeri ve DNA fragmantasyon değeri işlem öncesi ve işlem sonrası maturasyon ve DNA fragmantasyonu incelenerek sperm hazırlanması sırasındaki uygulanan ısı stresinin etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

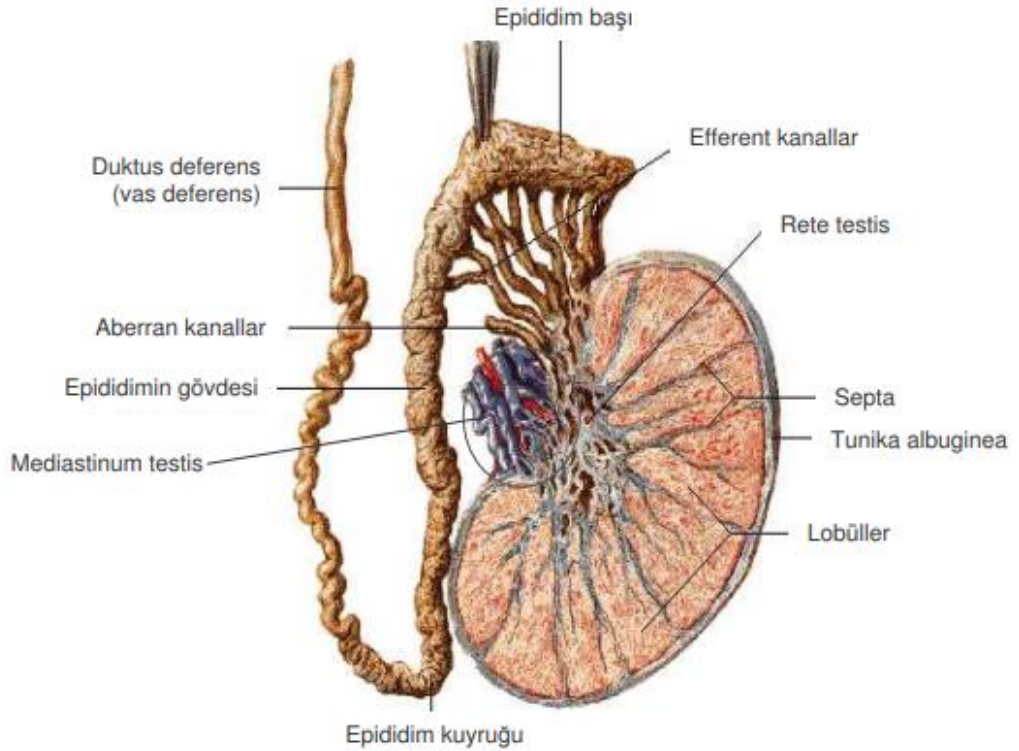
Her grup için optimize semen hazırlama yöntemi ve DNA fragmantasyonunun ve maturasyon defektinin en az görüldüğü sıcaklık ve sperm hazırlama yöntemi belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi; germ hücresi olan spermın devamlı olarak üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından ayrıca androjen biyosentezi ve sekresyonundan sorumludur.

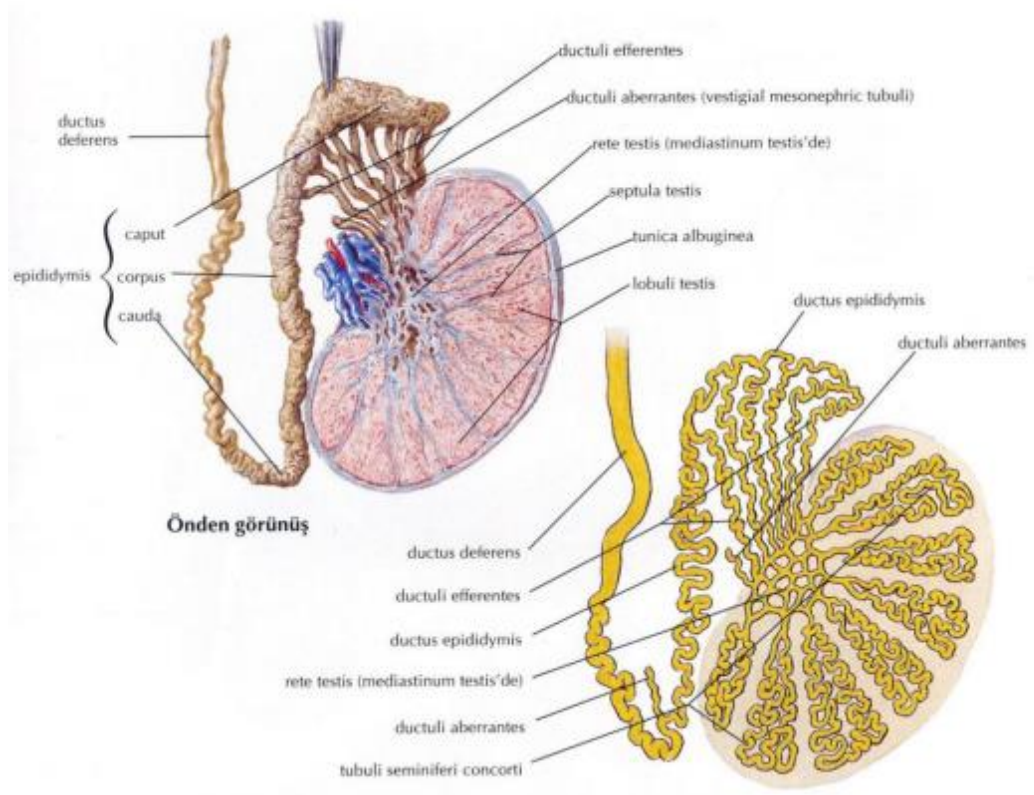
Erkek üreme sisteminin dış üreme organları olan skrotum ve penisten oluşmaktadır. İç genital sistem ise hem sperm hem de üreme hormonlarını üreten gonadlar, sperm hareketi için gerekli salgıları sağlayan yardımcı bezler ve spermle birlikte bu salgıları ileten kanallardan meydana gelmektedir (Reece J.B. and Campbell N.A. ,2015).



Şekil 1: Erkek üreme sistemi anatomisi (Netter F.H. ,2005)

4.1.1. Testis

Skrotal kavitede bulunan erkek primer üreme organı olan testisler, yoğun kollojenöz bağ dokusundan oluşan tunica albuginea ile çevrili olup funikulus spermaticus asılı olarak bulunmaktadır. Skrotum içinde yer alan testisler dıştan içe doğru tunica vaginalis, tunica albuginea, tunica vasküloza olmak üzere üç tabaka ile çevrilidir (Junqueira L.C. et al. ,1998). Testisler yaklaşık olarak 4- 5 cm uzunlukta, 2. 5 cm genişlikte, 3 cm kalınlıkta ve 10-15 gr ağırlığındadır. Her testis testiküler lobüller denilen yaklaşık olarak 250 adet piramidal lobüle ayrılır ve her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller kalın bir bazal lamina ve miyoid hücrelerle sarılmış olup testis hacminin yaklaşık %80'ini oluşturur. Testiküler hacim ile sperm konsantrasyonu, Folikül Stimulan Hormon (FSH), Lüteinizan Hormon (LH) ve prolaktin düzeyleri arasında doğrusal bir ilişki bulunduğu gösterilmektedir (Jensen C.E. et al. ,1995).



Şekil 2: Testis yapısı ve seminifer tübüller (Netter F.H. ,2008)

4.1.2.Seminifer tübüller

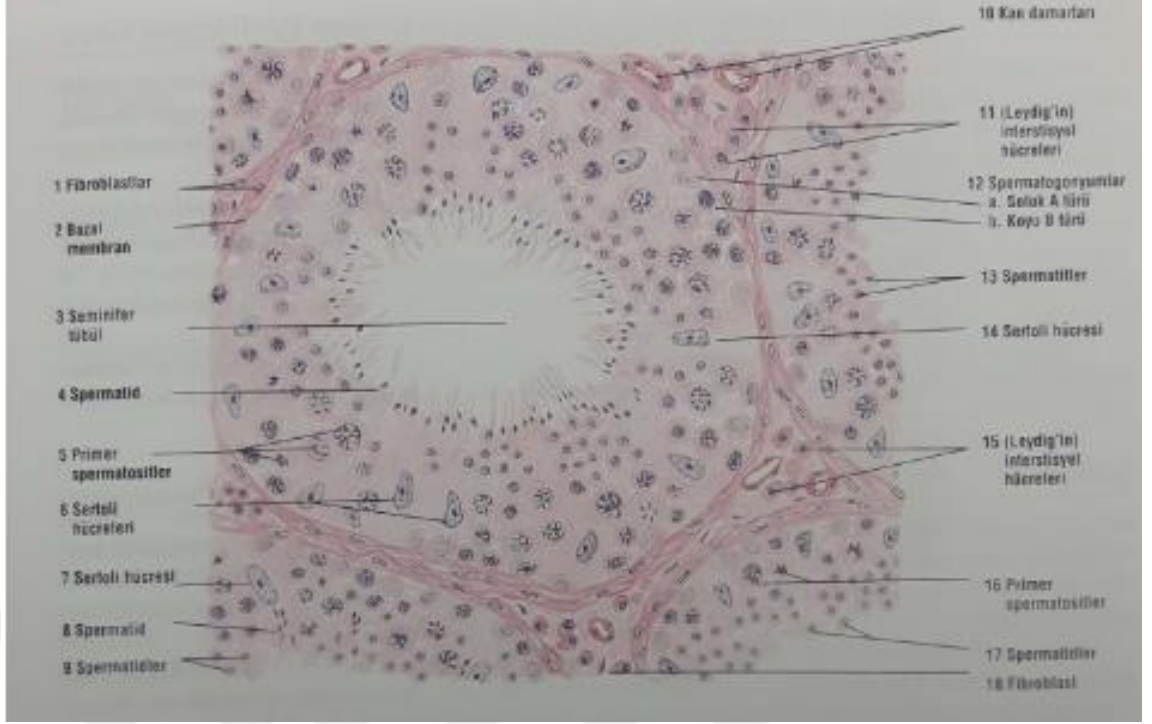
Testis hacminin büyük bir kısmını oluŐturan seminifer tübüller spermilerin üretildiği kırımlı seyreden kanallardır (Kierszenbaum A. L. , 2006). Salgılama biğimi aktif holokrin olup, salgılama materyali canlı hücre spermiumdur. Tek bir insan testisinde seminifer tübüllerin toplam uzunluğu 250 metreyi bulmaktadır (Junqueira L.C. et al. ,1998). Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bazal lamina ve germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tubullerin iğeriği rete testis kanallarına boŐaltılır. Rete testis, seminifer epitelyumun testiküler sperm, salgısal protein ve iyonlar gibi ürünlerini toplayan kanallar ağıdır (Chung K.W. , 2005).

4.1.3.Sertoli hücreleri

Germ hücrelerine destek olan ve onları besleyen sertoli hücreleri, bazal membran üzerine yerleŐmiŐ olup seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir (EŞrefoğlu M. ,2016). Sitoplazmasının apikal yüzünde spermiumların yerleŐimine uygun girintiler iğerirler ve yan uzantılarla spermatogonium ve spermatisitler arasına uzanır ve onlara mekanik olarak destek olup otoimmün reaksiyonlardan korunmasını ve beslenmesini sağlarlar.

Sertoli hücreleri;

- 1-GeliŐmekte olan spermatogonik hücreleri destekler, korur ve besler.
- 2-Spermiyogenezin sonunda atılan rezidual cisimcikleri fagositoz ile elimine eder.
- 3-Olgun spermatidlerin aktin-aracılı kasılmalarla seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaŐtırır.
- 4-Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlarca zengin bir sıvı salgılar.
- 5-Androjen bağlayan protein,inhibin,plazminojen aktivator ve transferrin salgılar.
- 6-Anti-Müllerian hormon(AMH) salgılar.
- 7-Kan testis bariyerini oluŐtururlar (Kierszenbaum A. L. , 2006, EŞrefoğlu M. ,2016).



Şekil 3: Testisin histolojik yapısı (Eroschenko P.V. ,2001)

4.1.4. Leydig hücreleri

İntertübüler alanda bulunan kan damarları ve lenfatik sinüzoidlerle yakın ilişkide olan Leydig hücreleri testosteron hormonunu sentezleyerek kan ve lenf kapillerlerine boşaltarak endokrin sekresyon yaparlar. Leydig hücreleri diğer tüm steroid üreten hormonlar gibi bolca lipid damlacıkları, düz endoplazmik retikulum ve tübüler kristallı mitokondriyonlara sahiptir (Kierszenbaum A. L, 2006). Embriyoda testosteron ve diğer androjenler erkek fetüsün gonadlarının gelişmesi için esastır. Pubertede ise spermiyum üretiminin ve aksesuar bezlerin sekresyonunun başlaması ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi için gereklidir. Erişkinlerde spermatogenezin, bezlerin sekretuar aktivitelerini ve sekonder seks karakterlerinin devam etmesi için gerekmektedir (Gartner L.P. ,2016).

4.1.2.Erkek Genital Kanal Sistemi

4.1.2.1.Duktili eferentes

Rete testis epididimisin başına yaklaşık 20 adet kıvrımlı seyreden duktili eferentes adı verilen kanallarla açılır. Bu kanallar yalancı çok katlı prizmatik epitel, prizmatik ve kübik hücrelerden oluşmaktadır. Hücre boylarının eşit olmaması sebebiyle epitel yüzeyi girintili çıkıntılı olarak görülür. Spermin bu kanallar boyunca ilerlemesi silyumların hareketi ve kas tabakası sayesinde gerçekleşir (Gartner L.P. ,2016).

4.1.2.2.Epididimis

Duktili eferentes ve duktus epididimisten oluşan bir organdır. Duktus epididimis yaklaşık 4-6 metre uzunluğunda, tek ve oldukça kıvrımlı bir tüptür. Bu uzun kanal, çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları ile birlikte epididimisin kuyruk ve gövdesini oluşturur (Junqueira L.C. et al. ,1998). Epididimis testisin arka üst yüzü boyunca uzanır ve baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşur. Duktili eferentes epididimisin baş kısmında bulunur.

4.1.2.3.Duktus deferens

Epididimisin kuyruğundan sonra kanal kalınlaşarak musküler bir boru şeklinde olan duktus deferens oluşturur. 2 mm çapında 40 cm uzunluğundadır. Testisin arka yüzünden aşağı doğru uzanır ve spermatik kordonun bir elemanı olarak inguinal kanaldan geçerek karın boşluğuna ulaşır. Mesane seviyesinde genişleyerek ampullayı oluşturur. Ampullanın son kısmında seminal vezikülün kanallarını da alarak prostata girer ve ejakulatuar duktus olarak üretraya açılır (Junqueira L.C. et al. ,1998).

4.1.2.4.Penis ve üretra

Penis, idrarın ve semenin vücut dışına atılmasını sağlayan organdır. Mesaneden başlayan ve penis içerisinde ilerleyen üretra, idrarı ve semeni dış ortama taşır (Eşrefoğlu M. ,2016). Penis başlıca üç silindirik erektil doku kitlesi ile üretrayı içermekte olup, dıştan deri ile sarılmıştır (Junqueira L.C. et al ,1998).

4.1.3.Erkek Genital Sistemin Yardımcı Bezleri

4.1.3.1.Prostat bezi

En büyük yardımcı genital bez olan prostat bezi pelviste mesanenin altında yer alır ve üretranın ilk parçasını sarar. Prostat, düz kas liflerince zengin, fibroelastik bağ dokusundan bir kapsül ile kuşatılmıştır. Prostat bezi ürünlerini uzun boşaltım kanalları aracılığıyla prostatik üretraya salgılar (Gartner L.P. ,2016).

Prostat bezi günlük salgısı 0.5- 2 ml kadardır. Ejakulatın %20-30'unu oluşturur. Bazik prostat salgısı vajinanın asit ortamını nötralize ederek spermiumların vajina içerisinde yaşamasını sağlar. Prostat sekresyonu parasempatik stimülasyon ile artar. Sekresyonun içinde asit fosfataz, prostatik antibakteriyel faktör, sitrik asit, spermin, lipid, fruktoz, çinko, proteolitik enzimler, immunglobulinler, sodyum, klor ve bikarbonat bulunmaktadır.

4.1.3.2.Seminal vezikül

Mesanenin arkasında yer alan oldukça kıvrımlı seyreden yaklaşık uzunlukları 15 cm ye ulaşan bir çift tübüler bezdir. Kanalları duktus deferensin ampullasıyla birleşerek duktus ejakulatoryusu oluşturur. Seminal vezikülden salgılanan sıvı spermiumları aktive eden früktoz, sitrat ve prostoglandinlerden zengindir (Kierszenbaum A. L, 2006).

Seminal veziküller androjene bağımlı organlardır.

4.1.3.3.Bulboüretal bezler(Cowper bezleri)

Bulboüretal bezler, prostatın altında üretra boyunca yer alan iki adet küçük tübüloalveoler bezdir. Kanalları penil üretra ile birleşir. Ejekülasyon öncesi üretrada kalmış olabilecek asidik idrar kalıntısını nötralleştirme işlevi gören saydam bir mukus salgılar. Bu salgı galaktoz, galaktozamin ve siyalik asitten zengindir (Kierszenbaum A. L. ,2006).

4.2.Spermatogenez

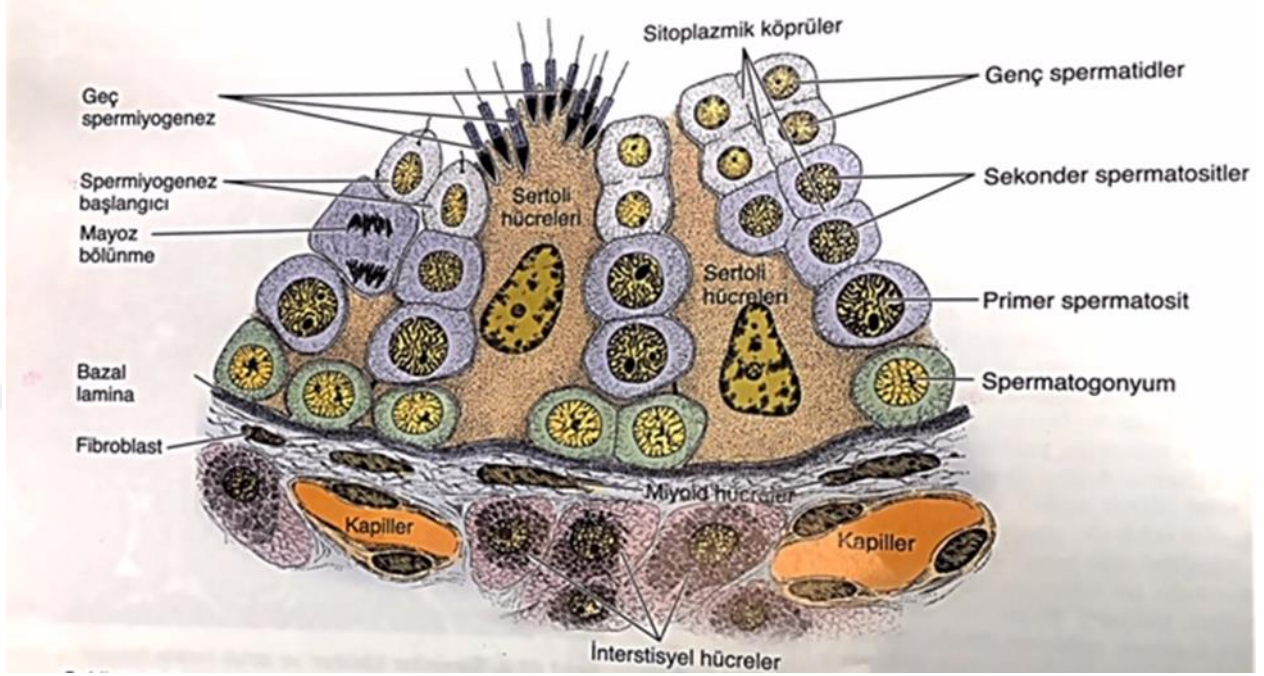
Erkek gameti olan spermatozoanın testislerde oluşumu spermatogenez olarak adlandırılır ve puberteden kısa bir süre önce pitüitar bezden salınan gonadotropinler ile başlayarak hayat boyu devam eder (Mawhinney M. and Mariotti A., 2013; Ross H.M. ve et al. , 2015). Spermatogenez, spermatid oluşumuna kadar olan spermositogenezis ve spermatozoa oluşumuna kadar süren spermiyogenezis olarak iki evrede incelenir.

Spermatogonia diploit (2n) kromozomludur. Spermatogonia erginlik çağına kadar, vücut hücreleri gibi mitozla bölünerek yeni spermatogonia meydana getirir ve testisin hacim olarak büyümesini sağlarlar. Eşeyssel olgunluğa ulaştıktan sonra bazı spermatogonia mitoz yerine, mayoz bölünme geçirerek spermaları meydana getirirler. Spermatogoniadan spermatozoa oluşuncaya kadar geçen olaylara spermatogenez denir (Gedikli S. ve ark. ,2013). Mayoz geçirecek olan spermatogoniumuna primer (birincil) spermatosit adı verilir. Bunlar 2n (diploid) kromozomludurlar. Her primer spermatosit birinci mayoz bölünme ile büyüklükleri birbirine eşit olan iki sekonder spermatosit oluşturur. İkincil spermatositler de ikinci mayoz bölünme ile büyüklükleri birbirine eşit olan dört tane spermatid oluşturur. Spermatitler haploit kromozomlu ve bol miktarda sitoplazma içeren küre biçimindeki hücrelerdir.

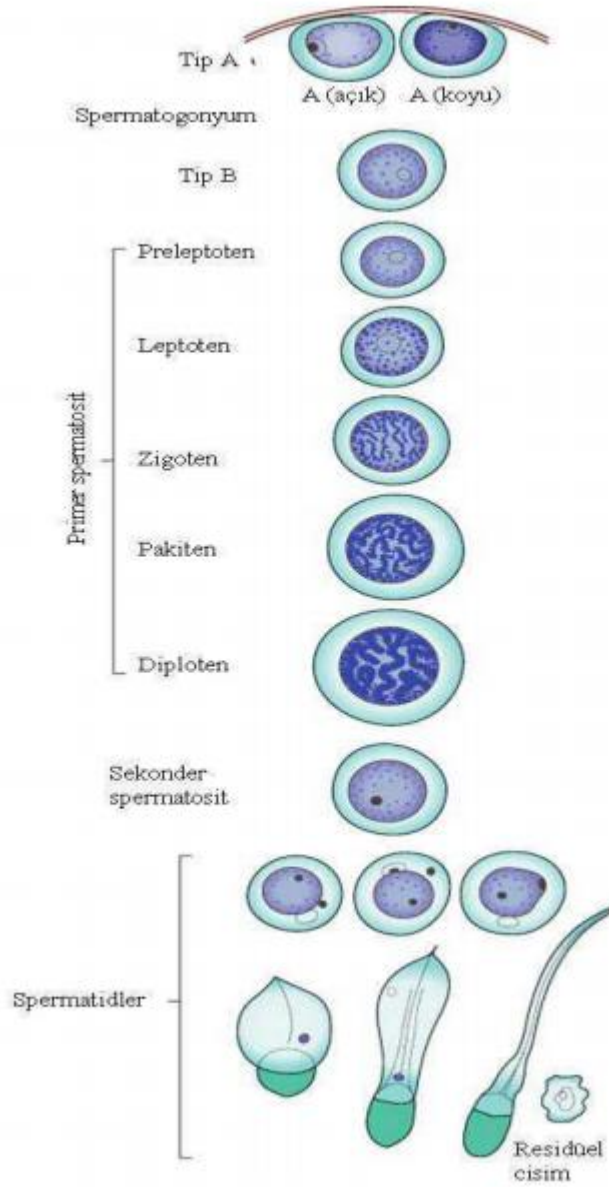
Spermatidler sperme dönüşürken hücre şekli ve organizasyonu bakımından önemli başkalaşımalar geçirirler ve bu olaya spermiyogenezis adı verilir. Spermatidlerin spermatozoonlara dönüşümü sertoli hücreleri içerisinde meydana gelir. Spermiyogenez dört evreden oluşmaktadır; golgi evresi, kap evresi, akrozomal evre ve maturasyon evresi.

Olgun bir sperm; baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan oluşur. Değişim sırasında önce spermatidin çekirdeğinin hacmi küçülür, daha yoğun hale geçer ve çevresine bir miktar sitoplazma alarak spermanın başını oluşturur. Sitoplazmanın büyük bir kısmı dışarı atılır. Golgi kompleksleri başın ön kısmına toplanarak bir burun oluşturur. Bu kısma akrozom adı verilir. Akrozom yumurta zarını eritecek enzimler içerir. Spermatitte bulunan sentrioller çekirdeğin alt kısmında boyun bölgesinde yerleşmişlerdir. Mitokondriyumlar boyun bölgesinde toplanarak, kuyruğun

hareketi için gerekli enerjiyi sağlarlar. Boynun arkasından geriye doğru kuyruk uzanır. (Gartner L.P. ,2016).



Şekil 4: Seminifer tübül ve çevresindeki dokunun bir bölümü(Junqueira L.C. et al. ,1998).



Şekil 5: Erkek germ hücrelerinin oluşumu (Rosai J. , 2004).

Olgun sperm baş ve kuyruk olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır.

Baş bölgesinde; nukleus, nuklear membran ve akrozomal kısım bulunur. Lizozomal organelin bulunduğu akrozom nukleusun 2/3'ünü kaplar ve hyalürinidaz, aril sülfataz, akrosin, asit fosfataz, nöroaminidaz gibi hidrolitik enzimler içerir.

Kuyruk bölgesi 45-50 µm uzunluğundadır ve orta parça, esas parça ve son parça olarak üç bölüme ayrılır. Kuruğun merkezinde bir çift periferinde 9 çift aksonem olarak adlandırılan mikrotübül yapıları bulunmaktadır. Mikrotübül yapısının etrafı

kalın fibrillerde çevrili olup bu dış fibriller kuyruğa diklik kazandırmaktadır. Aksonem ise hareketlilik sağlar. Spermatozoa hareketini flagellum ile gerçekleştirir.



ŞEKİL6: Sperm hücresinin yapısı(Junqueira L.C. et al. ,1998).

4.3.Sperm Kromatin Yapısı

Sperm DNA'sı nukleus içerisinde sıkı ve yoğun bir biçimde paketlenmiştir. Somatik hücre DNA'ları nukleusun yalnızca bir bölümü doldurulan sperm DNA'sı nukleusun neredeyse tamamını kaplamaktadır. Sperm DNA'sındaki bu şekilde düzenlenme oosite aktarılacak genetik bilginin sıkıca paketlenmesi ve dolayısıyla embriyonun gelişmesine olanak sağlamaktadır. Spermatozoada sperm kromatin paketlenmesi DNA'nın nukleus membranına bağlanması, DNA'nın nukleusa bağlandıktan sonra DNA kümelerinin oluşumu, histonların protaminlerle yer değiştirmesi ve kromozomal pozisyon olmak üzere dört basamakta meydana gelmektedir.

Sperm hücresinde somatik hücrelerde bulunan ve DNA paketlenmesinde görev alan histonların %90-95'i sperm hücresine özgü olan protaminlerle yer değiştirmektedir. Protaminler; histonların yarı büyüklüğünde, arjinin bakımından zengin, sperm nukleusunda yer alan ve spermatogenezin ileri evrelerinde sentezlenen proteinlerdir. Protaminasyon, sperm hücrelerine özgü epigenetik düzenlemedir (Güneş S. ve ark. ,2013).

Protaminler arasındaki disülfid çapraz bağlar sperm nukleusunun yoğunlaşmasında önemli rol almaktadır. Histonlar tarafından paketlenen kromatin dizileri protaminlere

göre daha gevşektir. Histonların artışı sperm kromatininin sıkı paketlenmesini engelleyerek DNA hasarına yatkınlığını artırır.

4.4.Sperm DNA Hasarı

Sperm DNA hasarının temelinde spermatogenezin geç dönemde DNA tamir mekanizmalarının azaltılarak düzenlenmesi yatmaktadır. Ayrıca spermatogenez sırasında hücrelerin apoptozis yeteneklerini kaybetmeleri genetik hasara yol açmaktadır. Spermatozoadaki DNA hasarı nedenleri ve mekanizması hakkında günümüzde yeterli bilgi birikimi bulunmasa da üzerinde durulan üç temel mekanizma; sperm kromatin paketlenmesinde meydana gelen hasar, başarısız apoptozis ve oksidatif strestir (Agarwal A. and Allamaneni SS. , 2005).

4.4.1.Anormal veya düzensiz kromatin paketlenmesi

Sperm kromatin yapısı DNA ve sperm nükleer proteinleri arasındaki ilişkiyi sağlamak amacıyla sıkı bir biçimde paketlenmiştir. Bu proteinler ağırlıklı olarak bazik özellik gösteren protaminlerden oluşur. Sperm DNA'ları sıkı ve düzenli şekilde protaminler etrafında sarmalanmıştır. Stabilizasyon sistein bakımından zengin disülfid çapraz bağlarıyla sağlanır. Spermatozoa kromatin yapısının büyük bir bölümü protaminlerle paketlenmişken %15'lik bir bölümü histonlarla paketlenmiştir. (Aoki V.W. and Carrell D.T. ,2003). İnfertil erkeklerde histon/protamin oranının fertil erkeklere oranla artmış olduğu gösterilmiştir (Foresta C. et al. ,1992). Bu durum anormal kromatin paketlenmesi olarak adlandırılır ve spermin dış strese karşı duyarlılığını artırır. Ayrıca infertil erkeklerde %5-%15 oranında protamin eksikliği olduğu gösterilmiştir (Tesarik J. et al. ,2002).

4.4.2. Apoptozis

Apoptozis spermatogenez sürecinde germ hücre popülasyonunu sertoli hücreleri tarafından destekleyebilecek sayıya indirmek ve anormal spermatozoaları seçerek yok etmekle görevlidir (Dunkel L. et al. ,1997).

Yaşam boyunca hasarlı ya da mutasyona uğramış hücreler apoptozisle seçilerek yok edilirler. Apoptoziste hücre boyutları küçülür, hücre zarı parçalanır, hücre iskeleti yeniden düzenlenir, nükleer yoğunlaşma ve intranukleosomal DNA fragmentasyonu oluşur (Nagata S. ,2000). Apoptozis normal kabul edilen fizyolojik bir süreç olup aşırıya kaçması sperm sayısında azalma ve dolayısıyla infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir. Caspas (cysteinyl aspartate-specific proteinases) olarak bilinen spesifik proteinazlar apoptozis regülasyonunda önemlidir. İnsan seminifer tübül epitelinde inaktif proenzimler olarak eksprese edilen proapoptotik sinyallerle aktive olan birçok proteinazın varlığını bilinmekle beraber en önemlisi caspas-3'tür (Peasch U. et al. ,2004). Caspas'lar tarafından aktive edilen DNaz'lar DNA fragmentasyonundan sorumludur.

4.4.3. Oksidatif stres

Bir ya da birden fazla eşleşmemiş elektronu bulunan atom veya moleküller serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri (ROS) ileri derecede reaktif oksijenlenmiş ajanlara sahip serbest radikaller sınıfıdır (Aitken R.J. and Clarkson J.S. ,1988). ROS hasarı ;kanser ,inflamatuvar hastalıklar ve yaşlanma başta olmak üzere birçok patolojiden sorumlu tutulmaktadır (Lenzi A et al. ,1998).

ROS sperm plasma membranında lipid peroksidasyonuna neden olarak sperm fonksiyonu ve fertilizasyonda görevli bazı protein aktivitelerinin değişmesine, tek iplik ve çift iplik DNA hasarına neden olurlar(Duru N.K. ve ark. ,2000; Twigg J.P. et al. ,1998). Süperoksit (O_2^-) ve hidroksil radikallerinin mutajenik oldukları, kromozom delesyonlarına ve kardeş kromatin değişikliklerine neden oldukları bilinmektedir (Shamsi M.N. ,2011). Fertil erkeklerde semen sıvısındaki antioksidanlar spermi ROS hasarından korumaktadır. Antioksidanların koruma kapasitesini aşan düzeyde ROS üretimi olan olgularda ise reproduktif kapasite

azalmaktadır (Aitken RJ et al. ,1992). Ancak bu olgularda daha çok kabul gören mekanizma azalmış antioksidan üretimidir (Zini A et al. , 1993).

Spermatozoalar ve lökositler semende yüksek oranda ROS kaynağıdır (Plante M. et al. ,1994). Anormal semen parametrelerine sahip erkeklerde sperm DNA'sı lökosit bağlı ROS hasarına karşı daha duyarlıdır. Semendeki lökosit konsantrasyonunun 3 milyon/ml'yi geçmesi durumunda fertilizasyonda anlamlı derecede bozulmaların meydana geldiği gözlenmiştir (WHO 5.baskı,2010).

4.5.Sperm DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri

YÖNTEM	ANALİZ METODU	PARAMETRE
Sperm kromatin yapı analizi (SCSA)	Akış sitometrisi	DNA sarmalının ayrılması(asit/ısı)
Comet analizi	Floresan mikroskopu	DNA parçalanması(dsDNA)
Terminal transferaz analizi(TUNEL)	Işık mikroskopu, Floresan mikroskopu, Akış sitometrisi	DNA parçalanması
Sperm kromatin dağılımı analizi(SCD)	Floresan mikroskopu	DNA parçalanması(tek sarmal)
Asidik anilin mavisi boyama	Işık mikroskopu	DNA yapısı/Nüklear maturasyon
Akridin oranj boyama	Floresan mikroskopu, Akış sitometrisi	DNA çift iplik sarmalının birbirinden ayrılması
Kromomisin A3 boyama	Floresan mikroskopu	DNA yapısı/Nüklear maturasyon
Toluidin mavisi boyama	Işık mikroskopu	DNA yapısı/Nüklear maturasyon

TABLO1: Sperm Kromatin Hasarını Belirleme Yöntemleri

4.5.1.Sperm kromatin yapısı analizi-SCSA

SCSA analizi normal sperm kromatini denaturasyon indüksiyonuna duyarlı olan bir akış sitometrisi yöntemidir. Bu yöntem anormal kromatin yapısının asit ve ısı ile denaturasyonuna yatkın olması prensibine dayanmaktadır. Denature DNA ısı veya asit ile muamele edilerek akrinin oranj boya ile boyanır. Çift zincirli normal DNA yeşil renkte floresan özellik gösterirken tek zincirli (hasarlı) DNA kırmızı floresan ışığa göstermektedir. Değerlendirme sonunda DNA fragmentasyon indeksi (DNA fragmentation Index, DFI) hesaplanır (Aktan G. ve Şanlı Ö. ,2004).

4.5.2.COMET analizi

COMET analizi tek hücre jel elektroforez yöntemi olarak bilinir ve DNA hasarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Diğer yöntemlere kıyasla daha basit bir yöntemdir (Singh N.P. and Stephens R.E. ,1998). Sperm hücreleri çözünmüş agaroz ile karıştırılır ve lamel üzerine yayılır. Daha sonra lizis yapılır ve elektroforez yapılır. DNA floresan bir boya ile boyanır (Shen H. and Ong C. ,2000). DNA hasarı olan hücreler mikroskopta kuyruklu yıldız gibi görünür ve comet ismini bu nedenle almıştır. Kuyruk uzunluğu kırık sayısı ile doğru orantılı olarak artış gösterir. DNA hasarı görmüş hücrelerde çift sarmallı DNA spirallerinin göçünü göstermek amacıyla kullanılır (Tamburrino L. et al. ,2012).

4.5.3.Terminal transferaz (TUNEL) analizi

Tunel yöntemi, kalıba bağımsız olarak çalışan terminal nukletidil transferaz (TdT) enzimi katalizörlüğünde, çift sarmal DNA kırıklarında birleşen dUTP'lerin inkorporasyon miktarını belirler (Gorczyca W. et al. ,1993). Sperm kromatin/DNA anomalilerine bağlı erkek infertilitesini belirlemek amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. TUNEL yönteminde DNA kırıkları DNA'yı denature etmeden, akış sitometrisi veya floresan mikroskobu ile ölçülebilmektedir. Br-dUTP, eşit olmayan DNA uçlarına katılarak DNA kırıklarını yansıtmakta ve ışımının yoğunluğu eşleşmemiş dUTP'leri yani DNA'daki çentik sayısını göstermektedir. FITC, DAPI, PI gibi floresan boyalar kullanılır ve pozitif hücrelerde yüksek yoğunlukta sinyaller alınabilir (Schlegel P.N. and Paduch D.A. ,2005).

4.5.4.Sperm kromatin dağılımı analizi-SCD

Nükleer proteinler uzaklaştırılır ve spermin baş kısmının etrafındaki halo oluşumu değerlendirilir. Agaroz jel kullanılarak spermin asit veya alkaliye maruz bırakılması sonucu normal DNA'ya sahip spermelerde halo halkaları gözlenir. DNA fragmentasyonu olan spermelerde bu halo çok küçüktür yada yoktur. Yöntem, denaturasyona bağlı sperm DNA'sının karakteristik olarak oluşturduğu halo yapısının hasarlı DNA'da daha küçük çaplı olarak görünmesi prensibine dayanmaktadır.

Spermde DNA dağılımını gözleyebilmek amacıyla denature edici asit çözeltisi ve sonrasında lizis tamponu uygulanır. DNA'dan nükleer proteinler uzaklaştırılır ve halolar görüntülenir. Floresan veya ışık mikroskopunda görüntüleme yapılabilir. Halolar skorlanır ve DNA hasar oranı hesaplanır (Fernandez J.L. , 2005).

4.5.5.Asidik anilin mavisi boyama

Anilin mavisi sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla kullanılan asidik bir boyadır. İmmatur DNA'ya sahip spermelerde zayıf kromatin paketlenmesinden dolayı koyu mavi renkte boyanma gözlenir.

Asidik anilin mavisi boyama tekniği, ejakülattaki spermatozoaların nükleer protein bileşiminin farklılıklarını belirleyerek lizinden zengin histonlara bağlanarak histon fazlalığını gösterme prensibine dayanmaktadır. Anilin boyama ile kondensasyon anomalisinin yanı sıra morfolojisini de değerlendirmek mümkündür (Chapman J.C. ,2003; Avcı B. ,2006).

4.5.6.Akridin oranj(turuncu) boyama

Akridin oranj testi (AOT), asit koşullarına dayanan ve denaturant DNA'ya dayanan basit bir mikroskopik prosedürdür ve denature DNA akridin turuncu ile boyanır. AOT, AO floresanının yeşilden (doğal DNA) kırmızıya (denatüre edilmiş DNA) metakromatik kaymasını ölçer. Acridine Orange, parçalanmış DNA'ya bağlandığında

kırmızı doğal DNA'ya bağlandığı zaman yeşil ışık saçar. Birçok yazar, örnekte \geq % 50 yeşil flüoresansın, infertil vericilerden alınan örnekte AOT için normal bir cut-off değeri olduğunu gözlemlemiştir (Tejada R.I. et al. ,1984). Floresan mikroskobu kullanarak AOT, DNA denatürasyonunun durumunun genel bir resmini sağlar. Benzer şekilde, sitometri ve SCSA Yazılım kullanılarak sperm kromatin yapı analizi (SCSA), Akridin oranj (AO) floresan yoğunluğunu ölçer. Kırmızı / kırmızı + yeşil oranı, DNA fragmentasyon indeksi (DFI%) olarak adlandırılan DNA fragmentasyonunun yüzdesini verir (Evenson D.P. et al. , 1999) SCSA değeri% 15 veya daha düşük DFI değerine sahip olan semen numuneleri düşük seviyeli,% 15'ten büyük veya eşit % 30 DFI değerleri orta,% 30'dan fazla veya eşit DFI değerleri ise yüksek seviyede DNA fragmentasyonunu temsil eder (Claassens O.E. et al. , 1992)

4.5.7.Kromomisin A3 boyama

CMA3 gevşek bağlı paketlenmiş kromatinde protamin eksikliğini gösteren bir florokromdur (Marchiani S. , 2017).

4.5.8.Toluidin mavisi boyama

Toluidin mavisi spermin kromatin bütünlüğünü gösterebilmek için kullanılan bir boyadır. Matur spermiler açık mavi, immatur spermiler koyu mavi renkte gözlenir.(Zahedi A. et al. ,2013; Avcı S. et al. ,2006)

4.6.Sperm Hazırlama Yöntemleri

Yardımcı üreme tekniklerinde ejakülataki en kaliteli spermilerin seçilmesi amacıyla birkaç temel teknik kullanılmaktadır. Sperm yıkama teknikleri kaliteli sperm seçimi sağlamayı, fertilizasyon kapasitesi düşük spermeleri elemeyi amaçlamaktadır. Spermin fertilizasyon kapasitesini belirlemede morfoloji ve motilite parametreleri başta olmak üzere reaktif oksijen türevlerinin varlığı ve DNA fragmentasyonu önemini arz etmektedir.

Swim-up tekniğinde spermier kendi motiliteleri ile semenden ayrılırlar. Ejekülatta motilite yüksek ise bu teknik daha sıklıkla tercih edilmektedir.

Gradient tekniğinde normal sperm ve anormal spermierin yoğunluklarının farklı olması nedeniyle ayırıştırma mümkün hale gelir. Çift faz gradient metodunda en yoğun tabaka alt kısımda konumlandırılır üzerine daha az yoğunluk tabakası konulur ve en üstte semen olacak şekilde konumlandırılır. Semen içerisindeki atıklar ve anormal spermier daha az yoğun tabakaya göç ederler ve bu şekilde bir ayırıştırma sağlanır.

Bu iki sperm yıkama yönteminde de immotil spermier ayırıştırılır, immatür spermier ortamdaki uzaklaştırılır, anormal morfolojiye sahip spermier uzaklaştırılır ve kromatin hasarı olan spermier ortadan kaldırılır. Aynı zamanda bakteri ve virüslerin de uzaklaştırılması sağlanır (Özkavukçu S. ve Aras D. ,2017).

PARAMETRE	REFERANS DEĞER
VOLÜM	>1,5 ml
PH	7.2-8.0
VİSKOZİTE	<3
KONSANTRASYON	>15x10 ⁶ /ml
TOTAL KONSANTRASYON	>39x10 ⁶ /ml
TOTAL MOTİLİTE (Progresif+Nonprogresif)	>%40
PROGRESİF HAREKETLİLİK	%32
MORFOLOJİ	%4 Normal
VİTALİTE	%58
LÖKOSİT	<1

TABLO 2: Semen Analizi Normal Referans Değerleri (WHO 5.Baskı ,2010)

WHO parametrelerine göre sperm analizi terminolojilerinin tanımları ve nedenleri :

1. **Aspermi:** Hiç ejakülat olmaması durumudur. Aspermi nedenleri arasında retrograd ejakülasyon, vasküler nedenler, hormonal nedenler ve ereksiyon bozuklukları bulunmaktadır.
2. **Azospermi:** Ejakulatta sperm yokluğu anlamına gelmektedir. Azospermi yapan nedenler arasında genetik bozukluklar, hormonal değişiklikler, germinal aplazi, bilateral vas deferens yokluğu ve ejakülatör kanallarda tıkanıklıklar sayılabilir.
3. **Hipospermi:** Ejakulatın hacminin 1,5 ml'den az olması durumudur. Hipospermi nedenleri arasında prostat, seminal vezikül ve vas deferensin enfeksiyonu, travma ve tümörlerinin yanı sıra; androjen eksikliği, ejakülatör kanalların tıkanıklıkları ve retrograd ejakülasyon da bulunmaktadır.
4. **Oligozoospermi:** Sperm sayısının 15 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.
 - a. Hafif Oligozoospermi: Sperm sayısının 5- 15 milyon/ ml' nin arasında olmasıdır.
 - b. Şiddetli Oligozoospermi: Sperm sayısının 5 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

Oligozoospermi idiyopatik olabildiği gibi; sistemik enfeksiyonlar, kromozomal bozukluklar, inmemiş testis, ilaçlar, kronik sistemik hastalıklar ve koit sıklığına bağlı olarak da gelişebilir.
5. **Astenozoospermi:** İleri hareketli spermatozoa' nın < % 40 olması ya da ileri hızlı hareketli olanların < % 32 olması anlamına gelir. Pek çok konjenital nedenle veya enfeksiyon, ilaç, ısı sebebiyle oluşabilir.
6. **Teratozoospermi:** Normal spermatozoa morfolojisinin < %4 olması durumudur. Teratozoospermi yapan nedenler arasında kromozomal bozukluklar, toksik maddeler, seminal kanallarda deformasyon ve epididim enfeksiyonu bulunmaktadır.
7. **Astenoteratozoospermi:** Spermilerin motilite ve morfolojik incelemesinin her ikisinde normal sınırların altında olmasıdır.
8. **Oligostenoteratozoospermi:** Spermilerin sayı, motilite ve morfolojik incelemesinde üçünün birden normal sınırların altında olmasıdır.

9. **Nekrozoospermi:** Ejekulatta % 25' ten fazla ölü sperm hücresi bulunması anlamına gelir. İdiyopatik olabildiği gibi; toksik maddelerle temas, Kartagener Sendromu ve cinsel ilişki sıklığında azalma nedeniyle de oluşabilir.

2.6.1.Semen toplanması (WHO 5.baskı ,2010)

Genellikle 3-5 günlük cinsel perhiz döneminden sonra semen örneği alınması tavsiye edilmektedir. Normal erkeklerde her bir günlük cinsel perhizde semen volümü 0.4 ml, semen konsantrasyonu 10-15 milyon/ml artar ki bu artış 5 güne kadar devam eder. Sperm motilite ve morfolojisi 5-7 günlük cinsel perhizde etkilenmez. Bir haftadan sonra ise motilitede yavaşlama meydana gelir.

En uygun semen örneği laboratuvarında mastürbasyonla elde edilir. Bu şekilde semenin genel muayenesi, koagülasyon ve likefaksiyon olaylarının gözlenmesi ve motilitenin doğru bir şekilde değerlendirilmesi mümkün olur.

Semen örneği laboratuvarında özel olarak hazırlanmış odalarda alınmalıdır. Burada gerekli tüm temizlik imkanları, uygun ısı ve ses ortamı sağlanmalıdır. Örnek almak için geniş ağızlı ve poliprolen, polietilen kaplar kullanılabilir. Bu kaplar kesinlikle deterjan ve diğer zararlı maddeler içermemeli, vücut ısısında olmalıdır.

2.6.1.1.Makroskopik inceleme

Renk: Semen rengi mat beyazdır. Cinsel perhiz süresi ve enfeksiyona bağlı olarak renk sarımsı veya gri-krem renkte olabilmektedir.

Koagülasyon: Ejakulasyondan hemen sonra semen sıvı haldeyken hızla koagüle haline gelir. Bu geçiş çok kısa zamanda meydana gelir.

Likefaksiyon: Normal bir semen örneğinde 37°C'de likefaksiyon yaklaşık 10-20 dakika içinde gerçekleşir. Bu olay prostattan salgılanan enzimlere bağlıdır. Likefaksiyon, normal prostat fonksiyonunun bir göstergesidir. Likefaksiyon sonrası, semen yapı ve renk olarak homojen görünümündedir. Eğer likefaksiyon hiç olmuyorsa ya da 30 dakikadan uzun sürüyorsa, bu muhtemel geçirilmiş prostatite bağlı prostatın

normal işlev görmediğinin bir belirtisidir. Likefaksiyon süresi spermatozoonun hareketlik kazanması açısından önemlidir.

Hacim: Semen hacmi 1,5 ml ve üstünde olmalıdır.

Viskozite: Viskozite semen akışkanlığına karşı oluşan direnç anlamındadır. Likefaksiyonu başlatan proteolitik enzimler prostatta bulunur ve seminal veziküllerden salgılanan maddeler semeni koagüle eder. Yetersiz likefaksiyon hipervisköz semene yol açar. Yüksek viskozite spermi olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle motiliteyi, konsantrasyonu ve spermin antikorla kaplanmasını etkileyebilmektedir.

pH: Normal ejakülatın pH değeri 7,2 ile 8.0 arasında değişir. Akut prostat, vezikula seminalis, epididim enfeksiyonlarında pH 8.0'in üzerinde saptanabilir. Bu organların kronik enfeksiyonlarında ise pH 7,2 altında saptanabilir. Semen analizinin en önemli kısmını ise mikroskopik inceleme oluşturmaktadır .

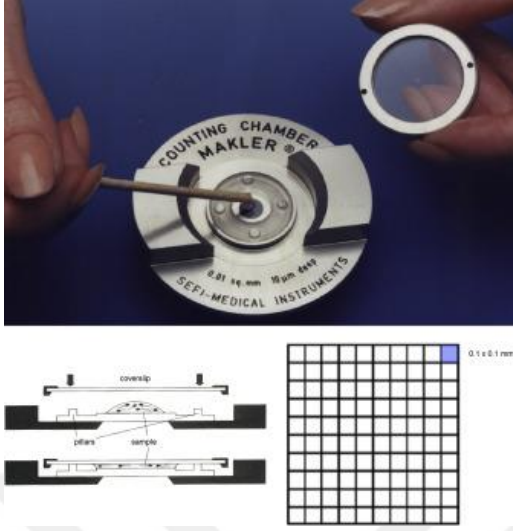
2.6.1.2.Mikroskopik inceleme

Konsantrasyon: Sperm konsantrasyonu ile erkek fertilitesi arasında direnkt olarak bağlantı bulunmaktadır. Fertilité için sperm sayısının olması gereken alt limiti 15 milyon/mL'dir . Bunun altındaki değerler oligozoospermik olarak sınıflandırılırlar, 5 milyon/mL' nin altında ise şiddetli oligospermi olarak değerlendirilir.

Azoospermi tanısı konulurken son derece dikkatli olunmalıdır. Ejekülatta hiç sperm örneğine rastlanmadığı durumlarda sperm örneği 3000 rpm de 10 dk santrifüjlenerek konsantre hale getirilmeli ve pellette inceleme yapılmalıdır. Azospermi tanısı alan erkeklerin bu şekilde ayrıntılı incelenmeleri sonucu sperme rastlanabilir (Olshan AF. ,1995)

Total sperm sayısı basitçe sperm hacmi ile sperm konsantrasyonun çarpımı ile elde edilir. Konsantrasyon hesaplanırken, sulandırılmış semen örneği, x400 büyütmeli bir mikroskop altında Neubauer sayım kamarasıyla (hemositometre) incelenbildiği gibi, sperm sayımı için özel üretilmiş olan ve sulandırılmadan sayıma olanak veren Horwell veya Makler sayım kamaraları da kullanılabilir. Bu özel kamaralar aynı

anda motilite ve morfolojinin de saptanmasına izin verdiğinden sıklıkla tercih edilirler (WHO 5.baskı ,2010)



Şekil 7: Makler sayım kamerası (Brito F.C.L. et al. ,2016).

Motilite: Sperm motilitesi total sperm popülasyonunda hareketli olan spermelerin yüzdesidir. Dünya Sağlık Örgütü hareketliliği 3 sınıfta değerlendirmektedir: a) İlerleyici (progresif) hareket b) İlerleyici (progresif) olmayan hareket c) Hareketsiz DSÖ kriterlerine göre motilitenin (a+b) < %40 ve/veya ileri doğru hareketin (a) < 32% olduğu erkekler astenozoospermik olarak sınıflandırılırlar (WHO 5.baskı ,2010)

Morfoloji: Sperm morfolojisi spermatogenezin kalitesini yansıtır, morfoloji anormallikleri (teratospermi) baş, boyun ve kuyruğa göre sınıflandırılır. DSÖ kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %30'un üzerinde olmalıdır. DSÖ'nün önerdiği morfolojik değerlendirme özelliklerini aynı alan ancak sınırda kabul edilen spermatozoayı da anormal gruba sokan daha kesin ölçütlerin kullanıldığı değerlendirme sistemi Kruger'in kesin ölçütleri olarak bilinir (Kruger T.F. ,1988)

Baş, düz oval yapıda olmalı, başın eni uzunluğunun 3/5 -2/3'ü arasında değişmeli ve uzunluk 5-7 µm, en 2,5-3,5 µm arasında olmalıdır. Akrozom başın ön kısmının %40-70'ini oluşturmalıdır. Sınırdaki normal baş şekilleri ve/veya oval şekle yakın ise beraberinde bir şekil bozukluğu olmasa da bu anormal kabul edilmelidir.

Boyun; implantasyon basın uzun ekseni boyunca ve intakt olmalıdır. Orta kısım; silindirik şekilli ve basın uzun ekseni doğrultusunda bağlanmış olmalıdır. Eni yaklaşık 1 µm, boyu ise başın uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır. Başın büyüklüğünün ½' sini geçen sitoplazmik artıklar ya da sayıca 3 adet üzerinde olanlar anormal kabul edilmelidir. Kuyruk; düzgün yapıda ve orta kısmından biraz daha ince olmalı, kıvrım ve bükülme olmamalıdır. Uzunluğu 45 µm olmalıdır.

Bu değerlendirmeye göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %14'ün üzerinde olmalıdır. %14 ve altındaki değerler anormal kabul edilir (Teratozoospermi). Prognoza göre 2'ye ayrılır: İyi prognoz (G pattern): Normal morfolojili sperm oranı %5-14 arası, Kötü prognoz (P patern): Oran %4'den azdır. Kruger kesin kriterlerinde belirtilen normal morfoloji sınırı WHO'nun son sınıflamasında %4 olarak kabul edilmiştir.

Dünya Sağlık Örgütü 2010 semen analizi

Parametreler	En düşük referans değer
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (10^6)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10^6 / ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (10^6 / ml)	<1.0
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (μ mol/ejakülat)	>2.4
Seminal fruktoz (μ mol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	>20

5.GEREÇ VE YÖNTEM

5.1.Çalışmanın Tasarımı

Bu çalışmada sperm yıkama yöntemi olarak “swim-up” (sperm yüzdürme) ve “gradient” (farklı yoğunluk ayırma) teknikleri kullanılarak Normospermi ve Oligoastenoteratospermi çalışma grupları kriterlerine uyan 40 hastada sperm maturasyon defekti ve sperm DNA fragmentasyon oranları ile oda sıcaklığı (22°C) ve 37°C uygulanarak karşılaştırıldı.

Çalışma Ocak 2018-Haziran 2018 tarihleri arasında Biruni Üniversite Hastanesi’ne spermiyogram analizi için başvuran hastalarda uygulandı.

Çalışmada önce ‘Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul’una sunuldu ve 2018-12-9 sayı ve 29.01.2018 tarihli etik kurul onayı alındı.

5.2.Hasta Seçimi

Çalışmaya dahil olma kriterleri:

Oligoastenoteratospermi Grubu için;

Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre yıkama işlemi öncesi sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml az olması, normal morfolojinin %4 den az olması ve ileri hareketli sperm yüzdesinin %32 den az olması

Normospermi Grubu için;

Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre yıkama işlemi öncesi sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml fazla olması, normal morfolojinin %4 den fazla olması ve ileri hareketli sperm yüzdesinin %32 den fazla olması

Her iki grup için;

- Erkeğin yaşının en az 20 en fazla 45 olması
- Endokrinolojik ve/veya metabolik bozukluklar göstermemesi
- Varikosel ve/veya prostat tanısı konulmamış olması
- En az 3 en fazla 7 gün cinsel perhiz süresi uygulanması

5.3.Çalışmada Kullanılan Yöntemler

5.3.1.Swim-up yöntemi:

Likefiye olması sağlanan semen örnekleri, sperm hazırlama işlemine alındı. Bazal semen örneğinde işlem öncesi volüm, konsantrasyon, motilite, lökosit parametreleri değerlendirildi. Ardından hematoksin boyama yapılarak morfoloji değerlendirilmesi yapıldı. Ayrıca sperm maturasyon testi ve DNA fragmantasyon testi için anilin mavisi ve akrinin oranj boyaması yapılarak değerlendirildi.

Semenin yapılan mikroskopik incelemesinin ardından swim-up yöntemi ile yıkandı. Progresif motiliteye sahip spermlerin medyum içerisinde yüzdürülmesi yöntemi olan swim-up işlemine, semen örneği falcon konik tüpe konularak başlandı. Üzerine 1/1 oranında sperm yıkama medyumunu eklendi. 1600 rpm'de 8 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pipet yardımıyla alındı. Tüp spora 45 derece açı ile yerleştirilip, pellet üzerine 1 ml medyum eklendi. Açı bozulmadan 1 saat 37° C'de inkübe edildi. Supernatan'dan bir miktar alınarak, sperm sayı ve motilitesi tekrar incelendi ve kaydedildi. Son olarak, tüpün açısı bozulmadan pipet yardımı ile toplam 0,5 ml olacak şekilde tüp yüzeyinden sperm solusyonu çekilerek 37°C ve 22°C de bekletilmek üzere falcon 15 ml tüpe aktarıldı. Belirlenen sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilen hazırlanmış sperm maturasyon defekti ve DNA fragmantasyonu belirlemede kullanıldı.

5.3.2.Gradient+Swim-up yöntemi:

Likefiye olması sağlanan semen örnekleri, sperm hazırlama işlemine alındı. Bazal semen örneğinde işlem öncesi volüm, konsantrasyon, motilite, lökosit parametreleri değerlendirildi. Ardından hematoksinin boyama yapılarak morfoloji değerlendirilmesi yapıldı. Ayrıca sperm maturasyon testi ve DNA fragmentasyon testi için anilin mavisi ve akrinin oranj boyaması yapılarak değerlendirildi.

Semenin yapılan mikroskopik incelemesinin ardından semen gradient+swim-up yöntemi ile yıkandı.

Gradient solüsyonu olarak %100 Grad (lifeglobal) kullanılarak %80 olacak şekilde medium ile seyreltildi. Tek faz %80 gradient kullanıldı. 15 ml falcon tüpe 1 ml gradient solüsyonu eklendi ve üzerine dikkatlice 1 ml semen örneğinden eklendi. 2000 rpm de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernant atılarak 1 ml medium eklendi ve 1600 rpm de 8 dk santrifüj yapılarak yıkandı. Üst faz atılarak 1 ml medium eklendi ve 1 saat 37C de inkübe edildi.

Supernatan'dan bir miktar alınarak, sperm sayısı ve motilitesi tekrar incelendi ve kaydedildi. Son olarak, pipet yardımı ile toplam 0,5 ml olacak şekilde tüp yüzeyinden sperm solusyonu çekilerek 37°C ve 22°C de bekletilmek üzere falcon 15 ml tüpe aktarıldı. Belirlenen sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilen yıkanmış sperm maturasyon defkti ve DNA fragmentasyonu belirlemede kullanıldı.

5.3.3.Sperm maturasyonunun anilin mavisi boyası ile gösterilmesi

Semen örnekleri hiçbir işlem yapılmadan önce yayma preparat yapılarak sperm maturasyon defkti değerlendirmek amacı ile asidik anilin mavisi boyaması yapılarak değerlendirilmiştir. Gradient ve swim up işlemlerinden sonra elde edilen örnekten yeniden bir yayma preparat hazırlanarak değerlendirilmiş ve karşılaştırma yapılmıştır.

Anilin mavisi boyama;

Yirmi mikrolitrelik semen örneği temizlenmiş lam üzerine yayılıp kurutulur. Oda sıcaklığında %2 glutaraldehit içinde 30 dakika fikse edilir. Fiksasyon sonrası %5 anilin mavisi ve %2 asetik asit içeren boya solüsyonunda 5 dakika boyanır ve distile su ile yıkanır (Henkel R. Et al. , 2001). Nukleusları boyanmış hücreler pozitif ve boyanmamış spermier negatif, yani matür olarak değerlendirilir. 100 sperm sayılarak boyanmamış sperm yüzdesi çıkarılarak sperm maturasyon defekti oranı hesaplanır.

5.3.4.Sperm DNA fragmentasyonunun akridin oranj ile floresan mikroskobunda değerlendirilmesi

Semen örnekleri hiçbir işlem yapılmadan önce DNA fragmentasyonu değerlendirmesi için Carnoy Fiksatifii ile fikse edilir ve Akridin Oranj boyaması yapılır. Semen örneklerinin semen hazırlama işlemleri ve sıcaklık işlemlerinde geçtikten sonra elde edilen kısımda yeniden yayma preparat hazırlanarak DNA fragmentasyonu değerlendirilmek üzere boyanır.

Mikroskopik-akridin oranj testi;

(M-AOT)

Tejada ve arkadaşları, 1984; Liu ve Baker, 1992 tarafından geliştirilen test DNA normalliğinin değerlendirilmesi için yapılır. Smearlar Carnoy fiksatifinde (3: 1 oranında, metanol: glasiyal asetik asit en az 3 saat süreyle) tutulur ve hava ile kurutulur. Slaytlar daha sonra AO boyasına alınır.

STOK AO çözeltisi ve diğer solüsyonlar

% 1 AO distile suda hazırlanır (1gr AO/100 ml distile suda çözülür)

0,1 Molar sitrik asit (19,212gr/ 1 litre distile suda)

0,3 molarNa₂HPO₄.H₂O (47,991gr/ litre distile suda)

Carnoy fiksatifii (metanol 75 ml, asetik asit 25 ml)

BOYA çözeltilisi

%1 Akridin Oranj..... 2,5 ml

0,1 Mol/L sitrik asit..... 10 ml

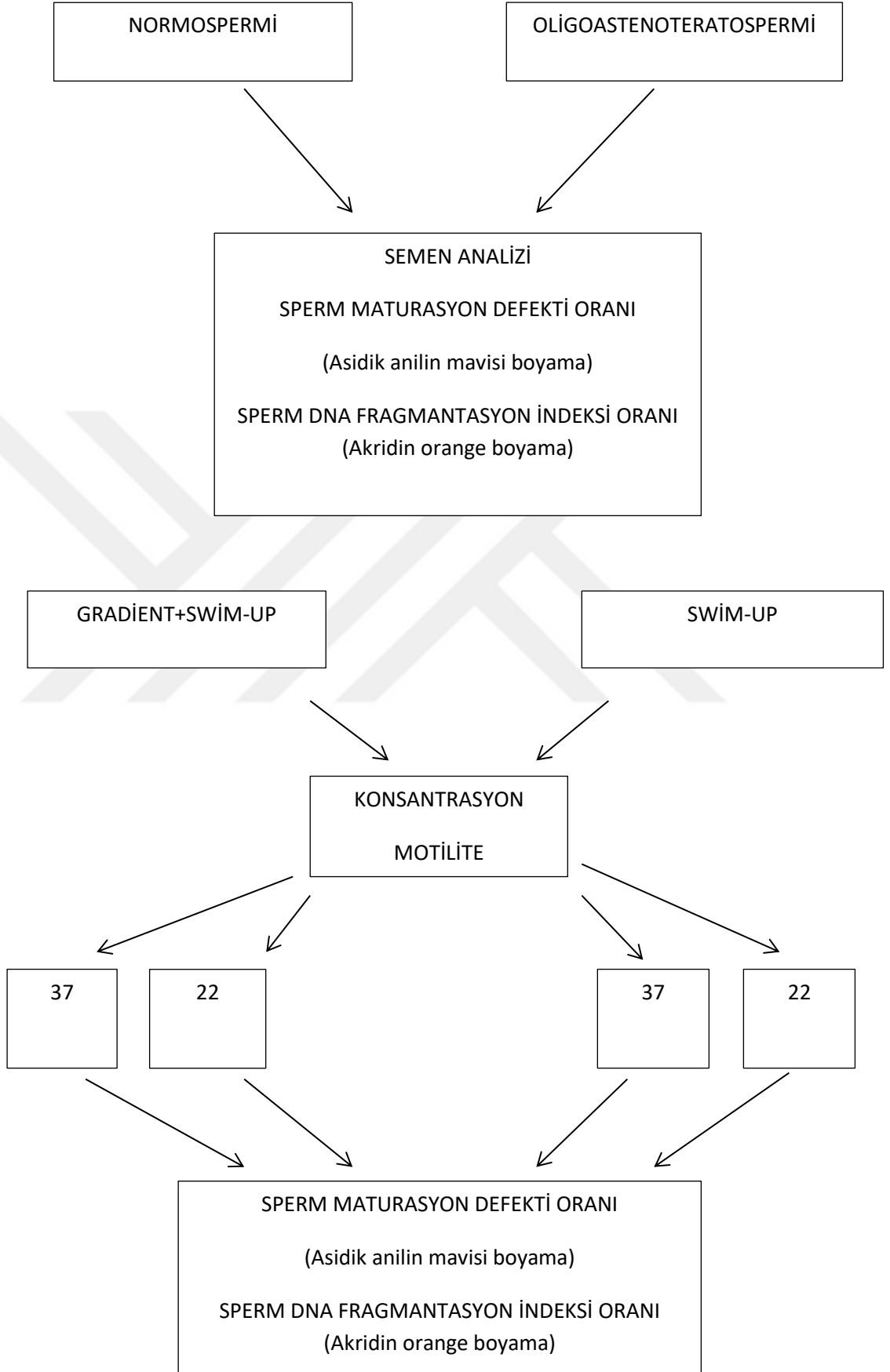
0,3 M Na₂HPO₄.....400 µl

Günlük hazırlanır.

Boyanın uygulanması:

20 µl sperm süspansiyonu önceden temizlenmiş lam üzerine yayılır, kurutulur. Kurumuş örnek Carnoy fiksatif ile 1 saat fikse edilir. Fiksasyon sonrası akridin oranj boyası ile 5 dakika karanlıkta boyanır, distile su ile yıkanır, kurutulur ve floresan mikroskopunda incelenir. Yeşil boyalı hücreler normal DNA, sarı-kavuniçi boyalı hücreler fragmente DNA taşımaktadır. Ortalama 100 hücre sayılarak yüzde fragmentasyon çıkarılır.

ÇALIŞMA ŞEMASI



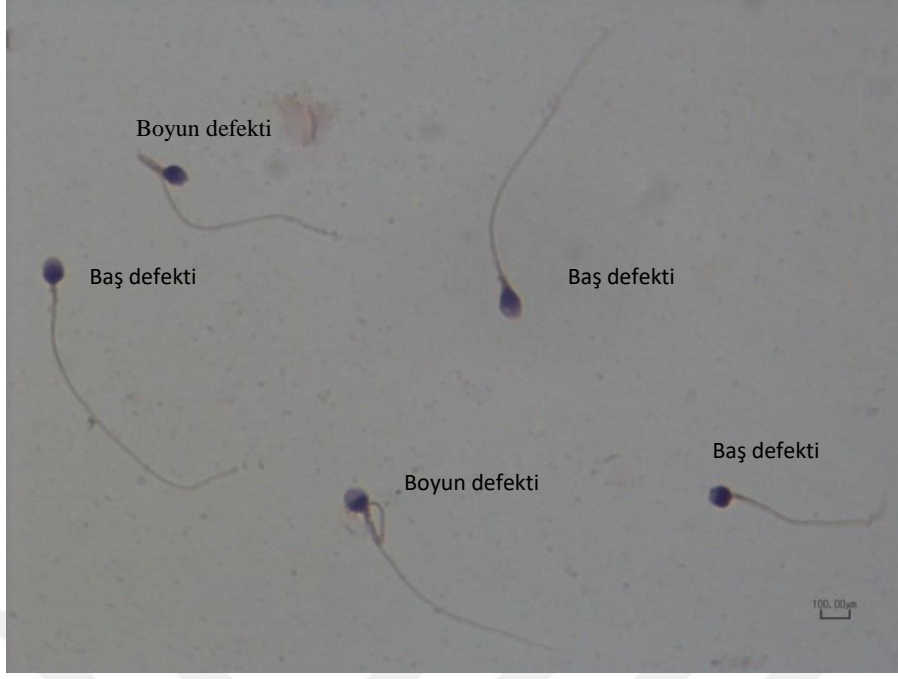
5.3.5.İstatistiksel yöntemler:

Bu çalışmada iki grup karşılaştırılması için student's t testi, ikiden çok grup karşılaştırması için ANOVA- Dunnett t testi kullanılmıştır.

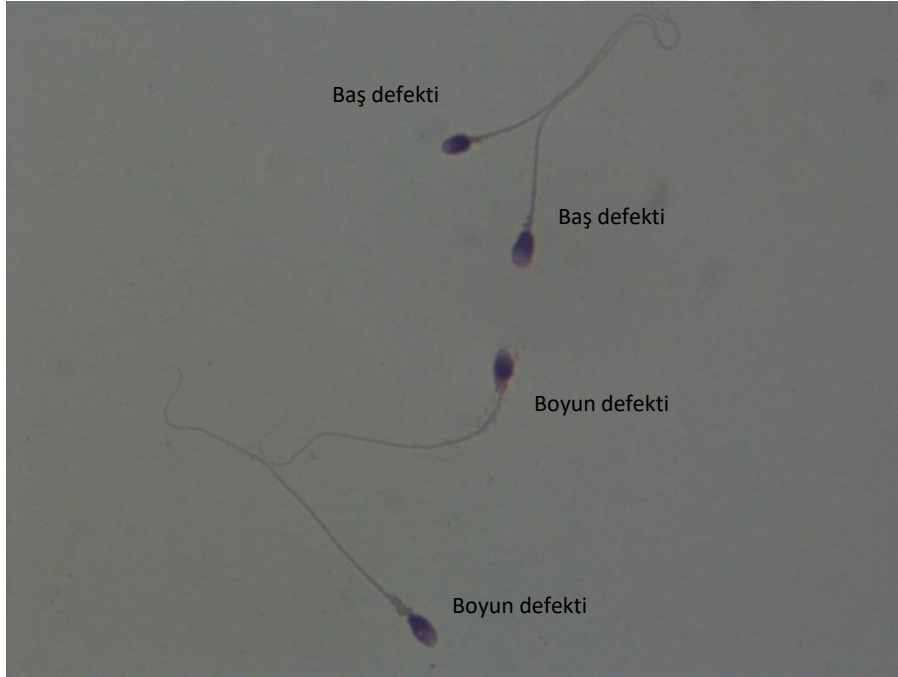
6. BULGULAR:

Bu prospektif kontrollü çalışmada, Ocak 2018 ve Haziran 2018 tarihleri arasında 'Biruni Üniversitesi Hastanesi' Üroloji kliniğine başvuran hastalardan çalışma kriterlerine uyan kontrol grubu normospermik (n:20), deney grubu oligoastenoteratospermik (n:20) tanısı olan toplam 40 hastadan iki farklı sperm hazırlama yöntemi olan swim-up ve dansite gradient yöntemlerinin ve iki farklı sıcaklık parametresi olan oda sıcaklığı (22°C) ve 37°C olan farklı gruplarının etkilerinin sperm kromatin kondensasyonu ve DNA fragmantasyonu üzerine etkileri araştırıldı.

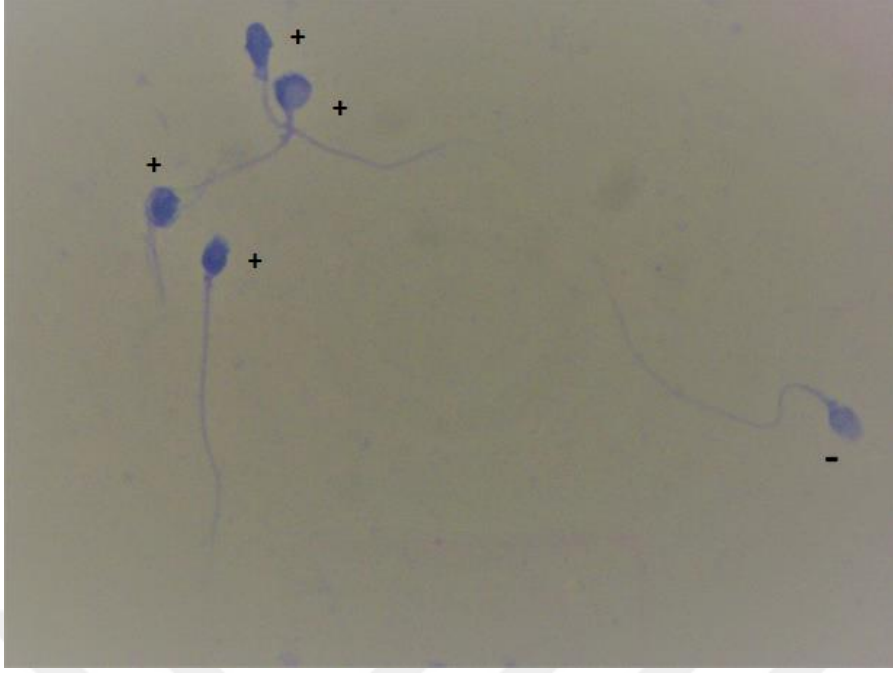
40 hastanın yıkama öncesi semen parametreleri, sperm maturasyon defekti ve sperm DNA fragmantasyon indeksi hesaplanarak tüm sperm örneklerine swim-up ve dansite gradient yöntemleri ayrı ayrı uygulandı ve tüm hasta gruplarında yıkama sonrası oda sıcaklığında (22° C) ve 37° C de 1 saat inkübasyon yapıldı. Yıkama sonrası sperm parametreleri değerlendirilerek her grup için yıkama yöntemleri, sperm maturasyon defekti ve DNA fragmantasyon indeksi yüzdeleri hesaplanarak yıkama öncesi yıkama sonrası ile, kontrol ve deney grupları arasında, sıcaklık farkları arasında, yıkama yöntemleri arasında ve gruplar kendi içerisinde karşılaştırıldı.



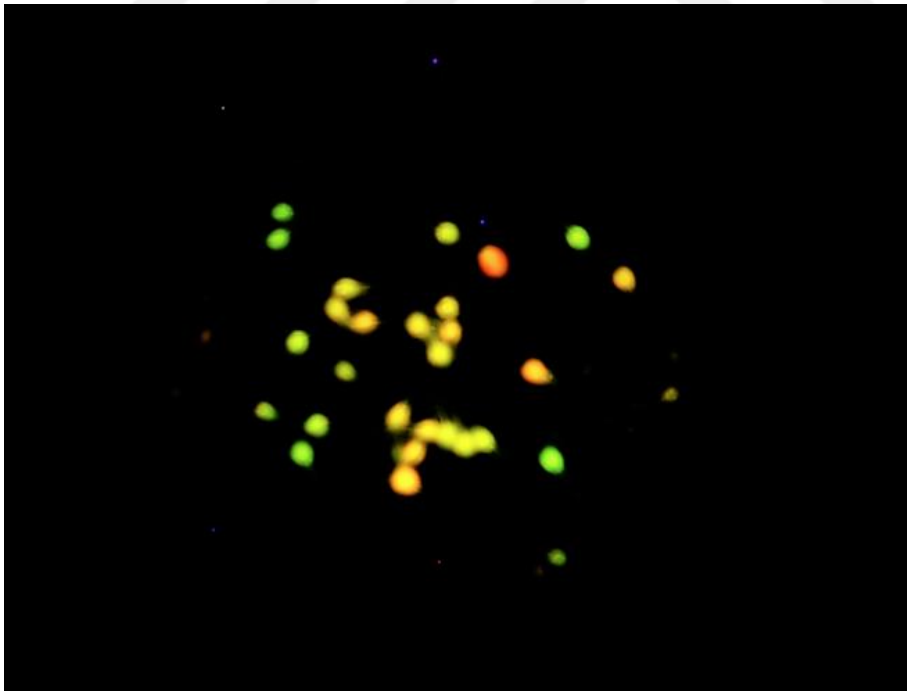
Şekil 8: Sperm morfoloji değerlendirmesi, anormal morfolojik yapıdaki spermilerin gösterimi (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü)



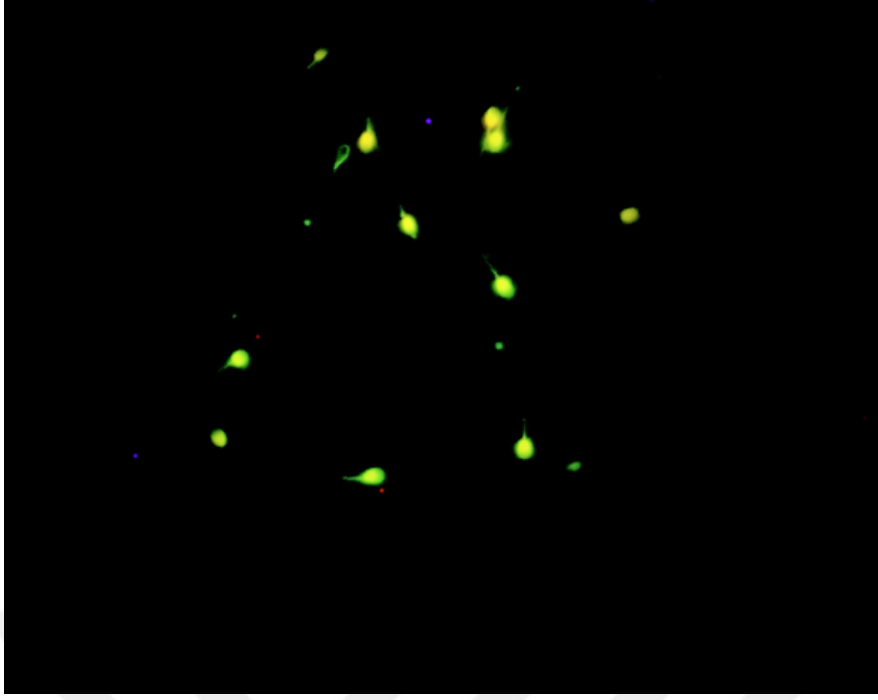
Şekil 9: Sperm morfoloji değerlendirmesi, anormal morfolojik yapıdaki spermilerin gösterimi (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü)



Şekil 10: Asidik anilin boyama koyu mavi boyanan pozitif (+) spermeler maturasyon defektini yansıtmakta olup, boyanmayan negatif (-) olarak gösterilmektedir. (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü)



Şekil 11: Acridin orange boyama yeşil (normal), kavuniçi ve turuncu (defekli) DNA fragmantasyonunu göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskobi görüntüsü)



Şekil 12: Acridin orange boyama kontrol yeşil (normal) DNA ya sahip spermleri göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskopi görüntüsü)

P değeri Yorumu

$p < 0.05$ İstatistiksel anlamlılık *

$p < 0.01$ Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık **

$p < 0.001$ Çok yüksek istatistiksel anlamlılık ***

$0.05 \leq p < 0.10$ Anlamlılık eğilimi (sınırdan anlamlılık)

$p > 0.10$ Fark tesadüften ileri gelmiştir (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır)

	Normospermi ($\bar{x} \pm SD$)	OAT ($\bar{x} \pm SD$)	t	p
Konsantrasyon (1 cc)	69,600 \pm 41,6848	10,275 \pm 3,3618	6,344	<0,001

Tablo 3 : Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.

Tablo 3'te konsantrasyon değişkeni açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur($p>0,05$). WHO 2010 kriterlerine göre beklenildiği gibi 1.grup normospermik örneklerde konsantrasyon değeri 15 milyon/ml'nin üzerinde görülürken, oligoastenoteratospermik örneklerde konsantrasyon değeri 15 milyon/ml'nin altında görülmektedir.

Motilite%	Normospermi ($x\pm SD$)	OAT ($x\pm SD$)	t	p
İleri hareketli	44,60 \pm 7,584	22,75 \pm 7,217	9,334	<0,001
Yerinde hareketli	19,25 \pm 7,18	18,80 \pm 6,195	0,212	0,833
Hareketsiz	36,15 \pm 12,136	58,80 \pm 12,136	5,817	<0,001

Tablo 4 : Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi motilite değerlerinin karşılaştırılması.

Tablo 4'te progresif hareket (ileri hareketli motilite yüzdesi) ve non-progressif hareket (hareketsiz sperm yüzdesi) değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p>0,05$). Yerinde hareketli motilite yüzdesi değişkeni açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır($p<0,05$). WHO 2010 kriterlerine göre beklenildiği gibi 1.grup normospermik örneklerde beklenildiği gibi %32 in üzerinde ileri hareket görülürken , oligoastenoteratospermik örneklerde ileri hareket değeri %32'in altında görülmektedir.

Morfoloji %	Normospermi ($x\pm SD$)	OAT ($x\pm SD$)	t	p
Normal	6,25 \pm 1,88	2,55 \pm 1,91	7,412	<0,001
Baş	53,55 \pm 7,571	53,55 \pm 7,997	<0,001	1,000
Orta kısım	21,950 \pm 5,5201	19,160 \pm 8,8464	1,197	0,239
Kuyruk	18,35 \pm 4,771	22,40 \pm 5,567	-2,468	0,018

Tablo 5 : Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi morfoloji değerlerinin karşılaştırılması.

Tablo 5'te normal ve kuyruk morfoloji değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur($p>0,05$). Baş ve orta kısım morfoloji değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır($p<0,05$).). WHO 2010 kriterlerine göre beklenildiği gibi 1.grup normospermik örneklerde beklenildiği gibi %4'ün üzerinde normal morfolojiye sahip sperm değeri görülürken, oligoastenoteratospermik örneklerde %4'ün altında görülmektedir.

Konsantrasyon	Normospermi ($x\pm SD$)	Oligoastenoteratospermi ($x\pm SD$)	t	p
Yıkama öncesi	69,600 \pm 41,6848	10,275 \pm 3,3618	6,344	<0,001
Gradient	18,90 \pm 13,345	2,05 \pm 1,276	5,621	<0,001
Swim-up	23,75 \pm 15,801	2,90 \pm 1,804	5,863	<0,001

Tablo 6 : Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama sonrası konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.

Tablo 6'da gradient yöntemi ve swim-up yöntemi sonrası konsantrasyon değerleri değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur($p>0,05$). Gradient yöntemine kıyasla swim-up yönteminde her iki grupta da daha yüksek konsantrasyon elde edilmiştir.

Motilite	Normospermi ($x\pm SD$)	Oligoastenoteratospermi ($x\pm SD$)	t	p
Yıkama öncesi	44,60 \pm 7,584	22,75 \pm 7,217	9,334	<0,001
Gradient	78,15 \pm 7,659	59,60 \pm 15,278	4,854	<0,001
Swim-up	80,80 \pm 7,925	63,05 \pm 15,605	4,535	<0,001

Tablo 7: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama sonrası motilite değerlerinin karşılaştırılması.

Tablo 7'de gradient yöntemi ve swim-up yöntemi sonrası progresif motilite değerleri değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur($p>0,05$). Gradient yöntemine kıyasla swim-up yönteminde her iki grupta da daha yüksek progressif motilite değeri elde edilmiştir.

Sperm maturasyon defekti oranı%	Normospermi (x±SD)	OAT (x±SD)	t	p
Yıkama öncesi	21,05±7,193	50,55±10,738	-10,207	<0,001
Gradient/Oda sıcaklığı	16,30±7,027	42,60±9,877*	-9,736	<0,001
Gradient/37	15,35±862	40,70±9,587*	-9,616	<0,001
Swim-up/Oda sıcaklığı	16,75±6,965	46,50±10,216	-10,760	<0,001
Swim-up/37	15,25±7,018	45,50±9,671	-11,3220	<0,001

Tablo 8 : Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi yıkama sonrası sperm maturasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması.

*grup içi değerlendirme

Tablo 8’da kromatin kondensasyon defekti oranları değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur($p<0,05$).Kromatin kondensasyon defekti normospermik 1.grupta oligoastenoteratospermik olan 2. Gruba göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca yıkama sonrası her iki yöntemde de kromatin kondensasyon defekti oranlarının düştüğü görülmektedir. Her grup kendi içinde değerlendirildiğinde sperm hazırlama yöntemlerine göre kromatin kondensasyon defektinin normospermi olgularında farklılık göstermediği, ancak oligospermik olgularda gradient yönteminin swim up yöntemine göre kondensasyon defekli spermleri ayıklamada daha başarılı olduğu görülmüştür.

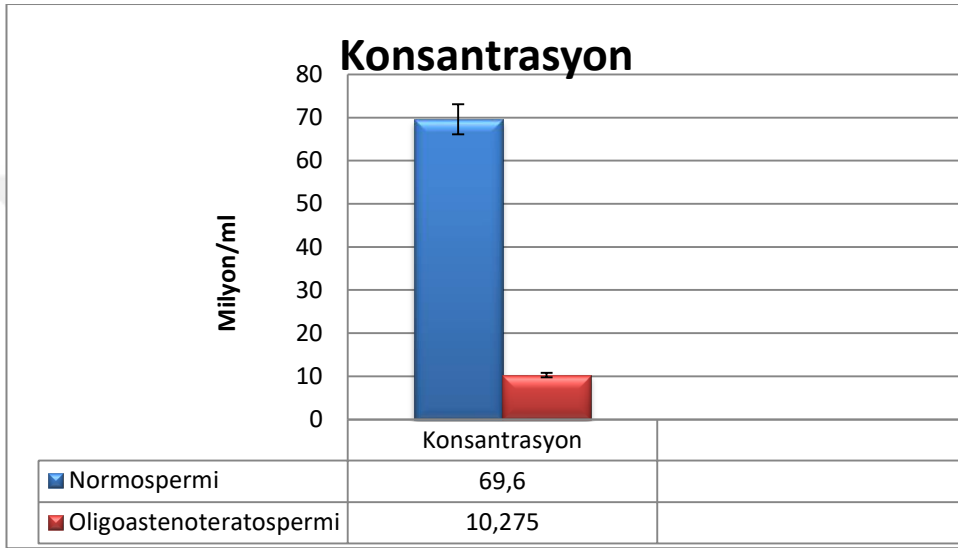
DFI%	Normospermi (x±SD)	OAT (x±SD)	t	p
Yıkama öncesi	21,50±6,605	30,85±10,644	-3,3380	0,002
Gradient/Oda sıcaklığı	18,00±6,224	28,35±10,946	-3,676	0,001
Gradient/37	19,55±6,224	32,55±10,889	-4,518	<0,001
Swim-up/Oda sıcaklığı	16,60±6,402*	25,50±10,455*	-3,247	0,002
Swim up/37	19,90±6,790	29,67±10,23	-3870	0,001

Tablo 9 : Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi yıkama sonrası sperm DNA fragmentasyon indeksi değerlerinin karşılaştırılması.(*gruplar içi anlamlılık)

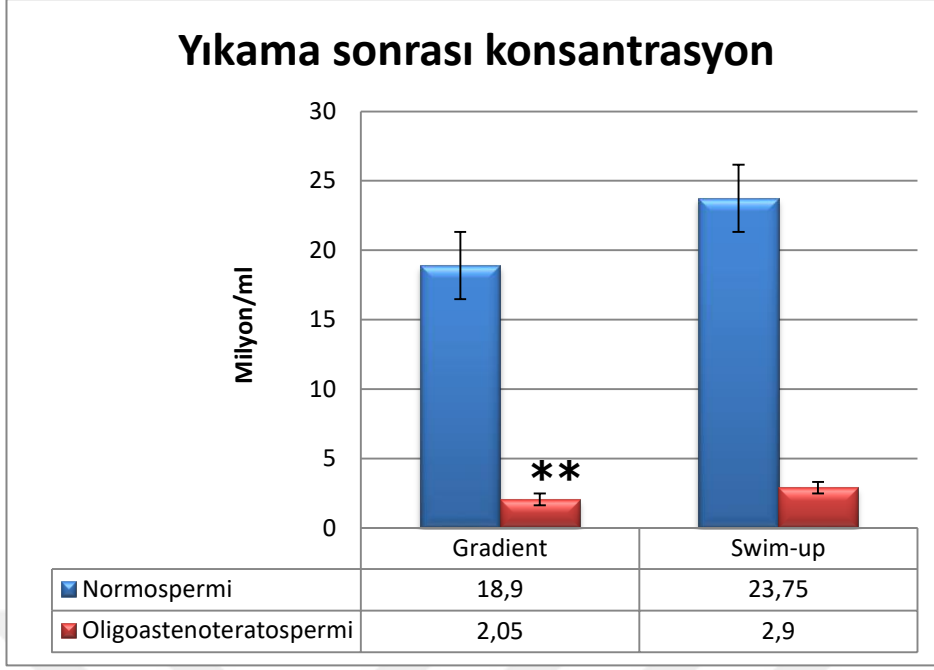
Tablo 9’da DNA fragmentasyon indeksi değerleri değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur($p<0,05$). DNA fragmentasyon indeksi normospermik 1.grupta oligoastenoteratospermik olan 2. Gruba göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca yıkama sonrası swim-up yönteminde DNA fragmentasyon indeksi yüzdelerinin düştüğü görülmektedir. Gradient yönteminde 2.grupta 37⁰ de DNA fragmentasyon indeksi artış göstermektedir. Oda sıcaklığı inkübasyonunda ise yıkama öncesine oranla çok düşük bir azalış görülmektedir.

Normospermi ve oligoastenoteratospermi grupları arasında yıkama öncesi konsantrasyon açısından beklenildiği gibi anlamlı bir fark görülmektedir (Grafik1).Yıkama sonrası ile karşılaştırıldığında her iki grupta da konsantrasyonda anlamlı derecede düşüş görülmekte olup, her iki grupta da gradient yönteminde swim-up yöntemine göre daha düşük konsantrasyon görülmektedir(Grafik2). Gradient ve swim-up yöntemleri kendi içinde karşılaştırıldığında normospermi grubunda daha fazla sayıda sperm elde edildiği görülmekte fakat oligoastenoteratospermi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemektedir(Grafik3).

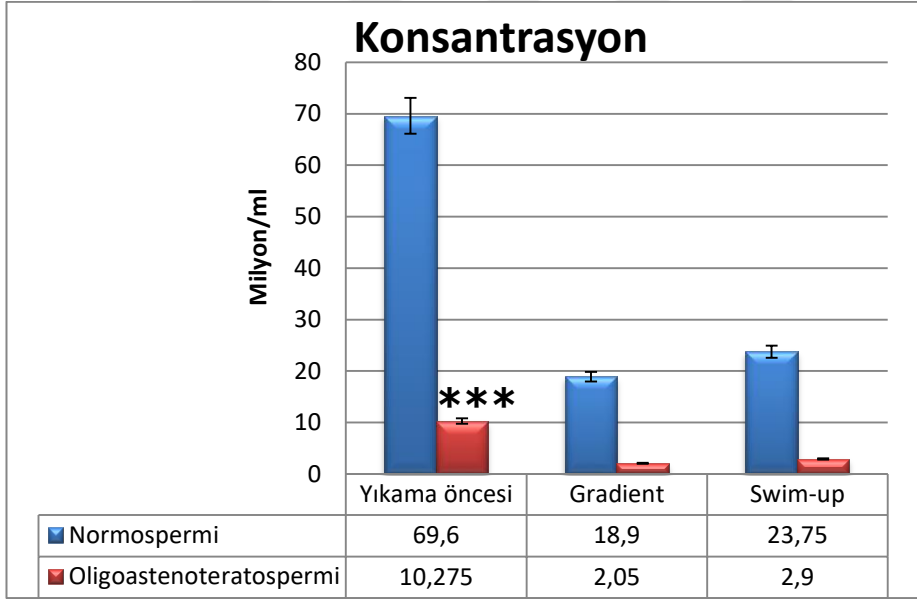
Normospermi ve oligoastenoteratospermi grupları arasında yıkama öncesi motilite açısından anlamlı bir fark görülmektedir (Grafik4).Yıkama sonrası ile karşılaştırıldığında her iki grupta da anlamlı derecede motilitede artış görülmekte olup, gradient ve swim-up yöntemleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Grafik5). Oligoastenoteratospermi grubunda motilite oranının normospermi grubuna göre daha fazla artmış olduğu görülmektedir(Grafik6).



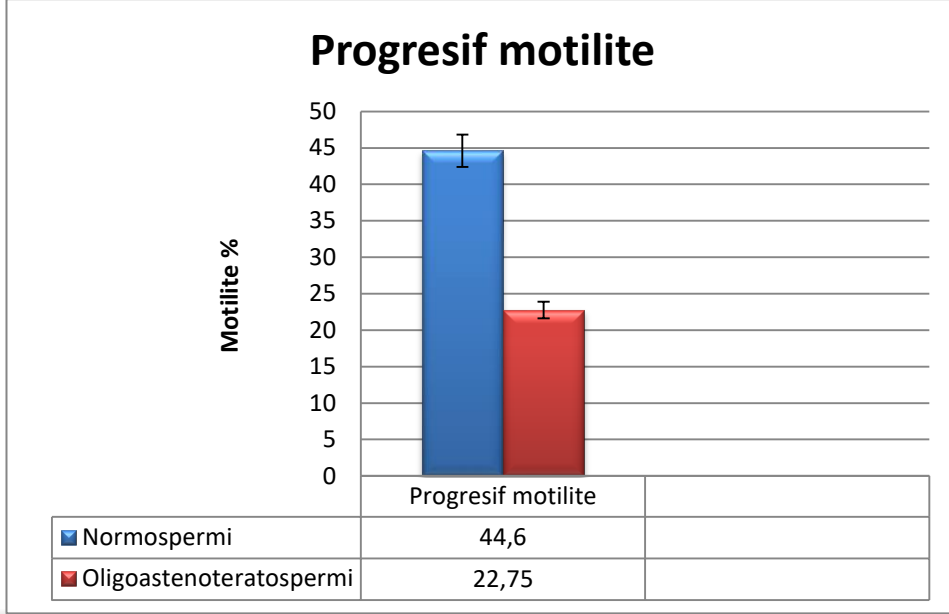
Grafik 1: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.



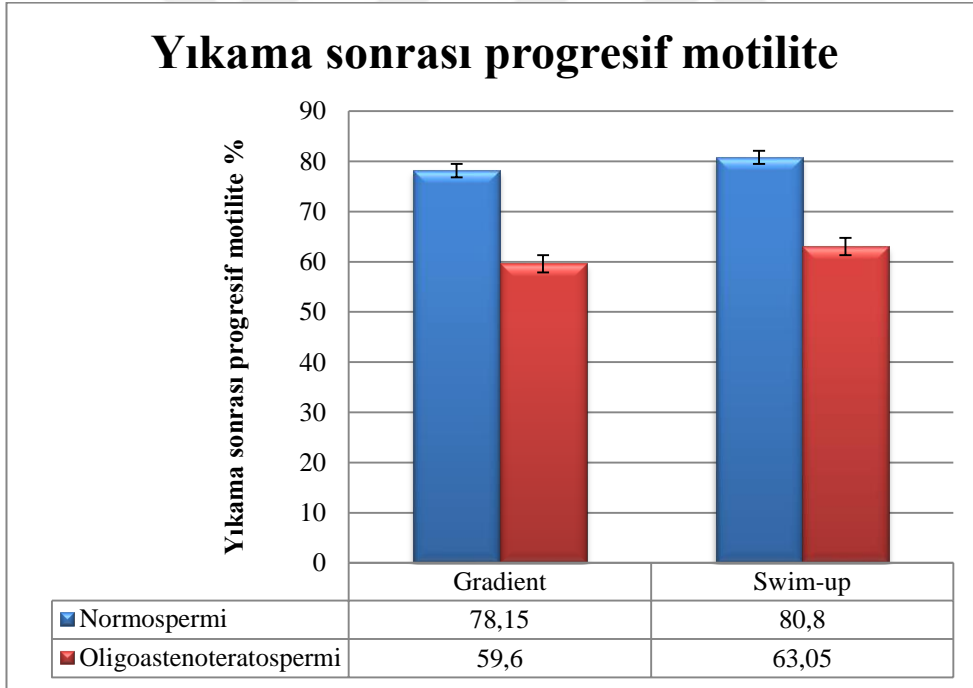
Grafik 2: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama sonrası konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.



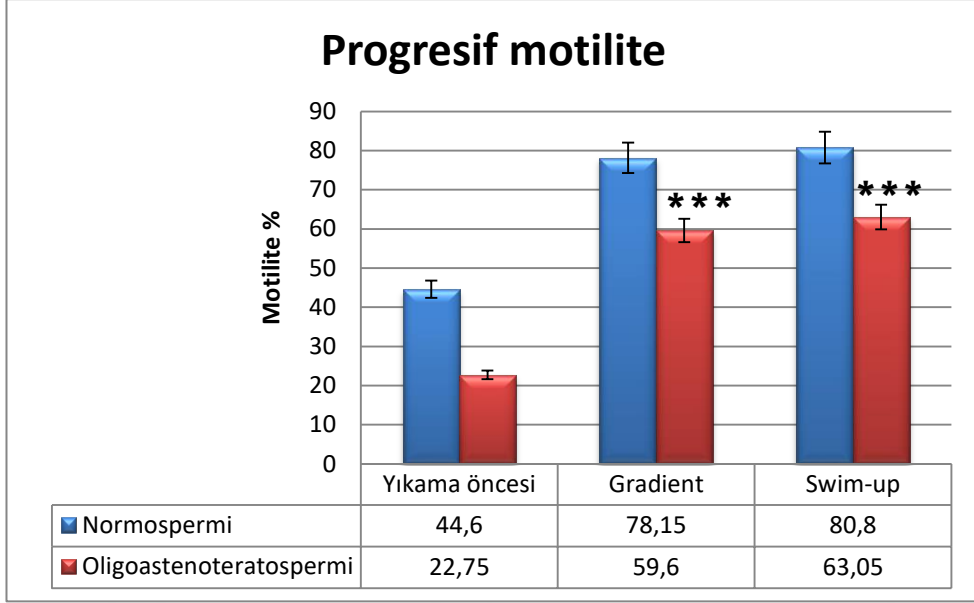
Grafik 3: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi ve yıkama sonrası konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması.



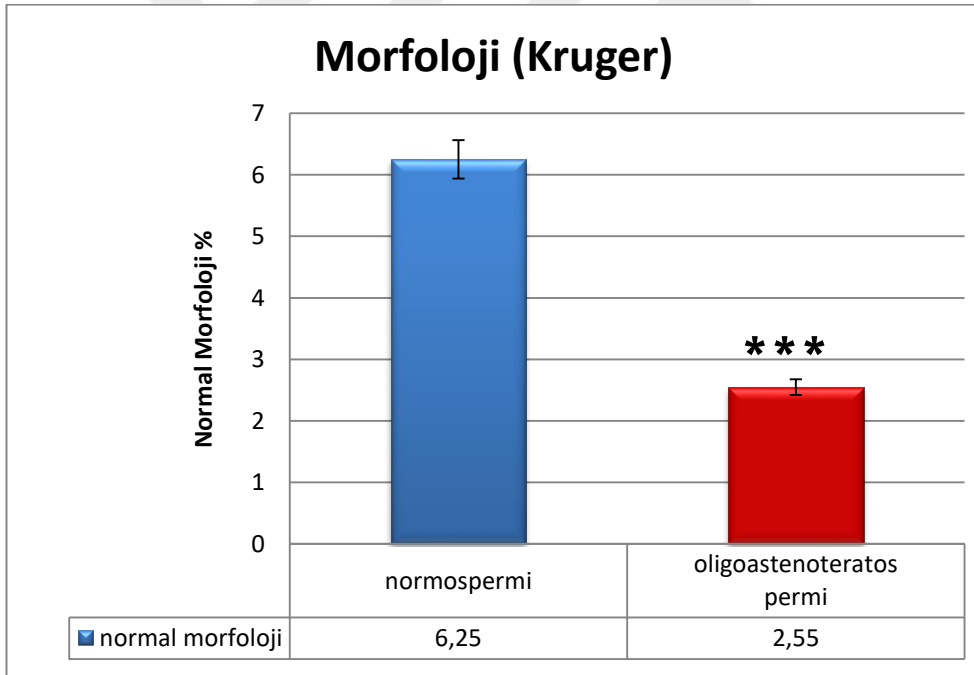
Grafik 4: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi motilite değerlerinin karşılaştırılması.



Grafik 5: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama sonrası motilite değerlerinin karşılaştırılması.

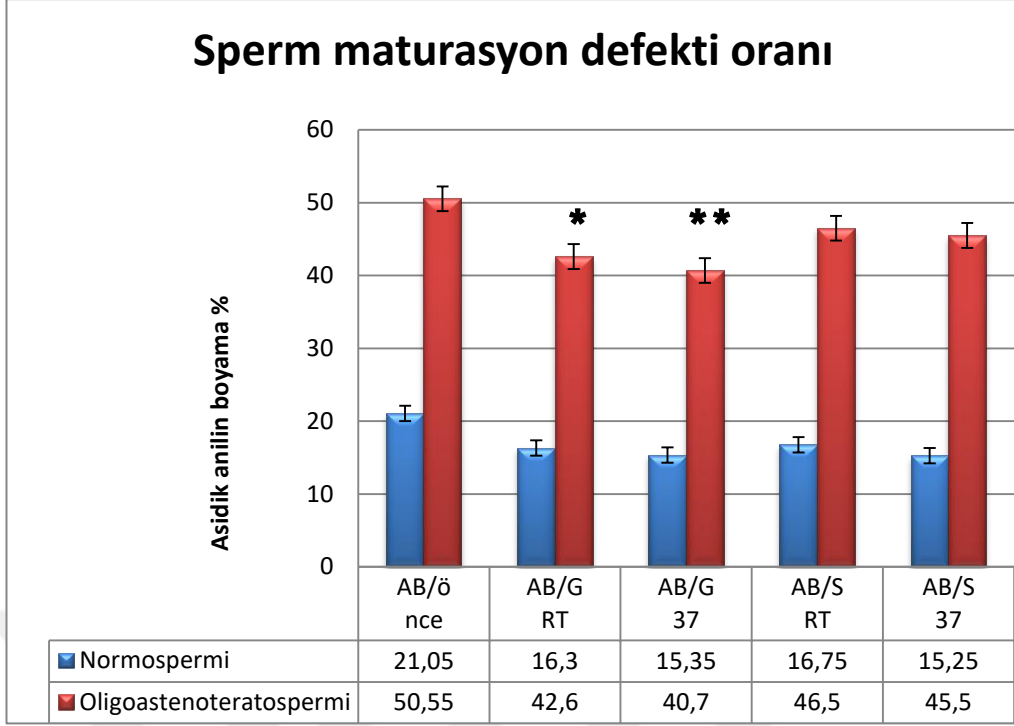


Grafik 6: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi ve yıkama sonrası motilite değerlerinin karşılaştırılması

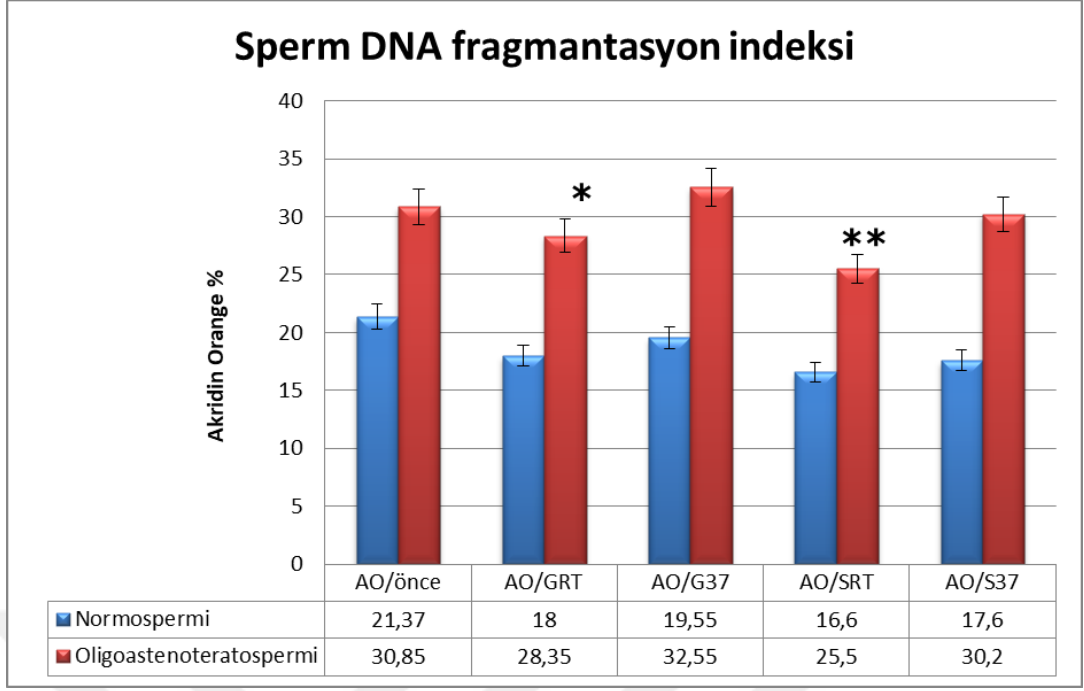


Grafik 7: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi morfoloji değerlerinin karşılaştırılması

Normospermi ve oligoastenoteratospermi grupları arasında yıkama öncesi morfoloji açısından anlamlı bir fark görülmektedir ($p < 0,01$).



Grafik 8: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi yıkama sonrası sperm maturasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması. Normospermik olgularda sperm seçim yöntemlerinden ikisinin'de de kromatin kondansasyon defektinin aynı düzeyde azaldığı gözlenmiştir($p<0,05$). Oligospermik olgularda ise gradient yöntemi ile seçilmiş spermelerde kondansasyon defektinin azaldığı, bu sonucun swim up örneklerinde görülmediği anlaşılmıştır.



Grafik 9: Normospermi ve Oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi yıkama sonrası sperm DNA fragmentasyon indeksi değerlerinin karşılaştırılması. Normospermi ve oligoastenoteratospermi olguları önceki değer (semen) ile karşılaştırılmıştır.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$

Normospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi asidik anilin mavisi ile sperm maturasyon defekti oranına bakıldığında, oligoastenoteratospermi grubunda normospermi grubuna göre anlamlı derecede yüksek maturasyon defekti görülmüştür. Yıkama sonrası gradient ve swim-up grupları 37°C ve oda sıcaklığında (RT) inkübe edilerek değerlendirildiğinde yıkama sonrası tüm gruplarda maturasyon defektinde azalma görülmekte olup gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında maturasyon defektinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamaktadır. Yıkama sonrası tüm gruplarda oligoastenoteratospermi olgularında normospermiye göre maturasyon defektinin daha fazla azalma gösterdiği görülmektedir (Grafik8).

Normospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında yıkama öncesi akridin orange boyama ile sperm DNA fragmentasyon indeksi oranına bakıldığında, oligoastenoteratospermi grubunda normospermi grubuna göre anlamlı derecede yüksek DNA fragmentasyonu görülmektedir. Normospermi olgularında yıkama sonrası tüm gruplarda DFI oranında düşüş görülmektedir. Oligoastenoteratospermi

olgularında yıkama sonrası gradient ve swim-up grupları 37°C ve oda sıcaklığında da inkübe edilerek değerlendirildiğinde yıkama sonrası G/37°C hariç diğer gruplarda DNA fragmentasyonunda düşüş gözlenmektedir. Gruplar arasında en fazla DFI düşüşü S/RT' de görülürken, DFI artışı yalnızca G/37°C de görülmektedir (Grafik9).



7. TARTIŞMA:

İnfertil erkek olgularda sperm DNA hasarı yüksek olarak saptanmakta ve yardımcı üreme tekniklerinin başarı oranları ile ters ilişki göstermektedir. Buna rağmen, sperm DNA hasarının yardımcı üreme tekniklerine olan etkisi halen bir tartışma konusu olup sperm DNA hasarı tespit yöntemi rutin uygulamalarda kullanılmamaktadır. İnfertil çiftlerin yaklaşık %20'si yalnızca erkek faktör olup günümüzde erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde rutin semen analizi kullanılmaktadır. Ancak infertil erkeklerin yaklaşık %15'inde normal semen analizi sonuçları görülmektedir (Koyuncu H. ,2011; Agarwall A. and Allamaneni S.S. , 1996) .

Son yıllarda infertilitenin tanısında, gebelik sonuçlarını öngörmede yeni belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Konsantrasyon, hareketlilik ve morfoloji, bir semenin dölleme potansiyelini belirlemek için yaygın olarak kullanılan parametrelerdir. Bu parametreler spermin kalitesi hakkında genel bir fikir verir, ancak üreme sonucunun en önemli bileşenlerinden biri hakkında bilgi sağlamaz. Bu nedenle sperm DNA hasarları üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır. İnfertil erkeklerde fertil erkeklere kıyasla sperm DNA hasarının daha yüksek olduğu ve fertilizasyon potansiyelini olumsuz yönde etkilediği kanıtlanmıştır (Evenson D.P. et al. ,1999) Düşük konsantrasyon, düşük motilite ve anormal morfoloji parametreleri ile yüksek sperm DNA hasarı birlikte gösterilmektedir. Aynı zamanda normal semen analizi sonuçları görülen hastaların %8'inde de sperm DNA hasarı olduğu gösterilmiştir (Zini A et al. ,2001).

Bu çalışmada normospermik hasta grubunda sperm maturasyonu ve DNA fragmentasyonu açısından oligoastenoteratospermik gruba göre daha düşük fragmentasyonlu ve daha düşük maturasyon defektli sperm taşıdığı gösterilmiştir. Dansite gradient tekniğinin histon pozitif spermleri elimine etmede gradient tekniğine göre daha başarılı olduğu görülmüştür. Sperm DNA fragmentasyonunun azalmasında dansite gradient veya swim up yönteminin benzer düzeyde etki yaptığı ancak ortam sıcaklığının DNA fragmentasyonu açısından negatif etki yaptığı görülmüştür.

Sperm DNA'sı tek veya çift DNA iplik kopması, fertil ve infertil erkekler arasındaki farkı açıklayabilmektedir. Sperm DNA fragmentasyonuna abortif apoptoz, rekombinasyondaki eksiklikler, protamin yetersizlikleri veya oksidatif stres gibi yapısal faktörler neden olabilir (Agarwall A and Allamanni S.S. ,2005) Hasar ayrıca, depolama sıcaklıkları, uzatma maddeleri, kullanım koşulları, boşalma sonrasındaki süre, enfeksiyonlar ve ilaçlara reaksiyon ya da testis sonrası oksidatif stres gibi dış etkenler nedeniyle de oluşabilir(Agarwall A and Allamanni S.S. ,2005). İki özellik spermi somatik hücrelerden ayırır: Protaminasyon ve DNA onarımının olmaması. Spermdeki DNA onarımı, transkripsiyon ve spermiyogenez sonrası durduğundan sona erer, bu nedenle bu hücrelerin epididim ve ejakülasyon sonrası geçişleri sırasında meydana gelen hasarı onarmak için hiçbir mekanizması yoktur (Champroux A. et al. ,2016). Oositlerin ve erken embriyoların sperm DNA hasarını onardığı gösterilmiştir, bu nedenle sperm DNA fragmentasyonunun etkisinin, sperm kromatin hasarının ve kapasitenin kombine etkilerine bağlı olması ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (David W. and Clarke H.J. , 2003).

İrez ve arkadaşlarının 2015 ve 2018 de yaptıkları çalışmalara göre hafif erkek faktörlü ve açıklanamayan infertil olgularda sperm kromatin kondansasyonu değerlerinin (anilin mavisi negatif sperm oranı) yani protaminasyonun klinik gebeliği öngörebileceği gösterilmiştir (İrez T. ve ark. ,2015; 2018). Araştırmacılar sperm nükleer proteinlerinin ,yani histonların protaminasyonunun fertilizasyon sonrası embriyo gelişiminde çok önemli rol üstlendiğini ve gebelikle sonuçlanan intrauterin inseminasyon ve ICSI olgularında pozitif gebeliği öngörebilecek değerleri göstermişlerdir (İrez T. ve ark. ,2015 ; 2018).

Protaminler, spermelerde ana nükleer proteinleridir. İnsan sperm çekirdeği iki tip protamin içerir: tek kopya gen tarafından kodlanan protamin 1 (P1) ve protamin 2 (P2) proteinleri (P2, P3 ve P4) ailesi ve bir öncü proteine çevrilmiştir. Protaminler bir asırdan daha önce keşfedilmiş olup işlevleri henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Oliva R. 2006 da açıkladığı gibi gerçekte, protaminler için farklı hipotezler önerilmiştir: sperm çekirdeğinin kompakt bir hidrodinamik şekle yoğunlaşması, spermatozoa tarafından iletilen genetik mesajın korunması, nükleohiston-nükleoprotamin geçişi sırasında veya sonrasında DNA'nın bütünlüğünü ve onarımını sürdüren işlemlere dahil olma ve Spermatozoanın epigenetik baskısında yer alma(Oliva R. ,2006). Protaminler ayrıca pozitif bir Darwinist seçimi destekleyen

verilerle birlikte doğada bulunan en değişken proteinlerden biridir. P1 ve P2 protaminlerin ifadesindeki değişikliklerin insanda kısırlıkla ilişkili olduğu bulunmuştur (Oliva R. ,2006). Bazı infertil hastalarda protamin genlerindeki mutasyonlar da bulunmuştur. Protaminlerin ekspresyonunda kusurlu olan transgenik fareler ayrıca sperm çekirdeğinde çeşitli yapısal kusurlar gösterir ve değişken derecelerde kısırlığa sahiptir (Balhorn R. ,2007). Değişen protamin seviyelerinin, spermatozoan DNA'da hasarlanmaya karşı duyarlılığın artmasına neden olabileceğine dair kanıtlar vardır, ayrıca yardımcı üremede kısırlığa veya kötü YÜT sonuçlarına neden olduğu gösterilmiştir (Angelopoulos R. et al. ,2007).

Ortam sıcaklığının sperm DNA fragmentasyonu, sperm anöplidisi, seminal alfa glukozidaz düzeyi (NAG) ,sperm maturasyonu ve akrozin aktivitesi üzerine etkisini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada, gönüllü deneklerde skrotum sıcaklığı 43 dereceye kadar ısıtılmış ve haftalık 30-40 dakikalık süreler içinde 3 aylık semen sonuçları değerlendirilmiştir (Zhang M.H. , 2018). Isıtılmış süreç sonrası sperm akrozin aktivitesinde ve nötral alfa glukozidaz düzeyinde azalma gözlenmiştir. Sperm aneuploidisinde ve DNA fragmentasyonunda artış görülmüştür (Zhang M.H. , 2018).

Wach-Gygax L. ve arkadaşlarının 2017 de yaptıkları bir çalışmada at spermalarının yıllık takibinde DNA fragmentasyonlarına ve membran bütünlüğüne bakıldı (Wach-Gygax L. , 2017). Çalışmada sperm konsantrasyonu ve motilitesinin bahar aylarında en yüksek düzeyde olduğu, yaz aylarında ise düştüğünü gösterdiler. Sperm kalitesinin mevsimsel olarak değiştiğini ileri sürdüler.

Yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında sperm hazırlama metodları önemli basamaklardan biridir. IVF ve ICSI uygulamaları öncesi WHO kriterlerine uygun olarak standart semen analizi yapıldıktan sonra semen örneği hazırlanarak en kaliteli en yüksek motiliteye sahip sperm elde edilmesi amaçlanırken aynı zamanda lökositler ve sperm dışı hücre atıklarından kurtulmak mümkün hale gelir. Tüm sperm hazırlama yöntemlerinin ortak amacı seminal plazma ve sperm dışı hücrelerden kurtulmak aynı zamanda en yüksek kapasiteye sahip sperm elde etmektir (Mortimer , D. ,2000 and Henkel R.R, Schill W.B. ,2003). Sperm hazırlama yöntemi tercih edilirken sperme en az zararı veren ve en yüksek konsantrasyona, motiliteye ve morfolojiye sahip sperm elde etmek amaçlanmaktadır. Bu tez çalışmasında

amaçlanan farklı sperm hazırlama yöntemlerinin ve sıcaklıkların kullanılması en ideal fonksiyonel spermleri elde edebilmede hangi sperm hazırlama yönteminin ve ortam sıcaklığı ile inkübasyonunun ICSI ve IVF öncesi DNA hasarını en aza indirgeyerek en fonksiyonel spermleri elde edebilmede yol gösterici olmasıdır. Günümüzde rutin olarak IVF laboratuvarlarında sperm hazırlama işlemi için gradient ve swim-up teknikleri kullanılmaktadır. Genellikle düşük konsantrasyon ve motiliteye sahip numunelerde gradient yöntemi tercih edilirken yüksek motiliteye ve konsantrasyona sahip numunelerde swim-up yöntemi yeterli görülmektedir. Bu tez çalışmasında normospermi ve oligoastenoteratospermi gruplarında her iki yöntem de kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Bu tez çalışmasına göre sperm hazırlama yöntemi olarak swim-up ve gradient yöntemlerinin arasında motil sperm, sperm sayısı ve morfolojisi açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır. Motilite ve konsantrasyon parametreleri gözönüne alınarak iki yöntem de olgunun durumuna göre tercih edilebilir. Spano ve ark. 1999 yılında yaptığı çalışmaya göre swim-up yöntemi sperm kromatin yapı bozukluğu olmayan spermlerin seçiminde kullanılabilir (Spano M. et al. , 1999). Gradient yönteminin sperm DNA fragmentasyonunu anlamlı olarak azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Zini A. et al. ,2011). Diğer çalışmalara göre ise Gradient yönteminin swim-up yöntemine göre daha yüksek DNA hasarı göstermesinin nedeni ise daha fazla santrifüj uygulaması olduğu düşünülmektedir (Stevanato J. et al. , 2008). Santrifüj uygulamalarının DNA hasarını arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Youngai E.V et al. ,2001)

Bu çalışmada sperm immatürasyonu ve DNA fragmentasyonu gerek dansite gradient ve gerekse swim up yöntemi ile azaldığı gösterilmiştir. Özellikle oligoastenoteratospermik örneklerde normospermi'ye kıyasla, 37°C de inkübasyonun özellikle DNA fragmentasyonu açısından kötü etkileri ortaya çıkmıştır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER:

En iyi morfolojiye sahip spermeler yıkama yöntemleri ile seçilmesine rağmen sperm DNA hasarının dışlandığı söylenememektedir. Rutin IVF-ICSI uygulamalarında sperm DNA hasarı bilinmemekte ve bu nedenle iyi morfolojiye sahip spermeler seçilerek fertilizasyonda kullanılmaktadır. Fakat yalnızca iyi morfoloji sperm DNA hasarının düşük olduğunu göstermekte yeterli değildir. Bu çalışmaya göre sperm yıkama yapıldıktan sonra asidik anilin mavisi ile boyama yapılarak sperm maturasyon defektleri tespit edilebilir. Bu boyama tekniği oldukça pratik olup rutin IVF laboratuvarlarında uygulamak için uygundur. Böylece asidik anilin mavisi boyama sonuçları ile fertilizasyonda kullanılacak spermelerin maturasyon defektleri hakkında bilgi sahibi olunarak sperm kaynaklı fertilizasyon oranları öngörülebilir. Yıkama yöntemi olarak swim-up ya da gradient yöntemlerinin her ikisi de tercih edilebilir. Sperm DNA hasarını en aza indirmek için inkübasyon 37°C ye göre oda sıcaklığında gerçekleştirilebilir.

9. KAYNAKLAR:

1. Agarwal A. , Allamaneni S.S. , (2005), Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril*.
2. Aitken R.J , Buckingham D. , West K. , Wu F.C. , Zikopoulos K. , Richardson D.W. , (1992), ‘Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligospermic patients and fertile donors’, *J.Reprod. Fertil*,1992 Mar 94(2):451-62.
3. Aitken R.J. , Clarkson J.S. , (1988), ‘Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques’, *J.Androl* 1988 Nov-Dec;9(6):367-76.
4. Aksoy E. , Aktan T.M. , Duman S., Dursunoğlu D. ,Cüce G, (2009), Farklı Semen Parametrelerinde Işık Mikroskobu Düzeyinde Spermatozoa Morfolojisi ve Nükleer Kondensasyon Değerlendirmesi, *Zeynep Kamil Tıp Bülteni* ,Cilt:40 Yıl:2009 Sayı:3.
5. Aktan G. , Şanlı Ö., Kadioğlu A., (2015),‘Sperm kromatin hasarının tespit edilmesinde kullanılan yöntemler’, *Androloji Bülteni*, Kasım , Sayı 19. *Andrologia*. 2015 May;47(4):438-47. doi: 10.1111/and.12286. Epub 2014 Apr 27
6. Angelopoulou R. , Konstantina Plastira, Pavlos Msaouel Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA, (2007), *Reproductive biology and endocrinology :RB&E*
7. Aoki VW, Carrell DT. , (2003) , ‘Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility’, *Asian J. Androl* 2003 Dec.5(4): 315-24
8. Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. , (1990) ,Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl*. 1990;13:452–462

9. Avcı B. , (2006) , Farklı fiksasyon protokolleri ile sperm kromatin kondensasyon anomalisinin değerlendirilmesi, *Uludağ Üniversitesi Tıp Dergisi*, 32(2) 55-59,2006
10. Balhorn R. , (1982) , A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *Journal of Cell Biology*. 1982;93(2):298–305. doi: 10.1083/jcb.93.2.298.
11. Balhorn R. , (2007) , The protamine family of sperm nuclear proteins , *Genome Biology* , BioMed Central
12. Brito F.C.L. ,Althouse G.C. ,Aurich C. , Chenoweth P.J. ,Eilts B.E. ,Love C.C. Luvoni G.C. ,Mitchell J.R. ,Peter A.T. ,Pugh D.G. ,Waberski D. , (2016) *Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration, Theriogenology*, Volume 85, Issue 9, June 2016, Pages 1507-1527
13. Carrell D. T. ,Emery B. R. ,Hammoud S. , (2007) ,Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Human Reproduction Update*. 2007;13(3):313–327. doi: 10.1093/humupd/dml057
14. Champroux A. ,J. Torres-Carreira ,P. Gharagozloo, J. R. Drevet, A. Kocer (2016), *Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. Basic Clin Androl*. 2016; 26: 17. Published online 2016 Dec 21. doi: 10.1186/s12610-016-0044-5
15. Chung, K.W. , (2005) ,*Gross Anatomy*, 5. Baskı, London, Lippincott Williams &Wilkins, 2005
16. David W. McLay and Hugh J. Clarke , (2003) , Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals *Reproduction*. 2003 May; 125(5): 625–633.
17. Dunkel L. , Hirvonen V. , Erkkila K. ,(1997), ‘Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis’, *Cell Death Differ* 1997 Apr;4(3):171-9.
18. Duru N.K , Morshedi M. , Schuffer A. , Oehninger S. , (2000), ‘Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation- thawing’ , *Fertil Steril*.2000 Oct;74(4):715-20.
19. Erimşah S. , Seçkin İ. , Uludağ S. , İrez T. , (2008) , ‘Sperm Morfolojisi ve Kromatin Kondensasyon Defektleri Arasındaki Korelasyon’, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 2008,39(4):128-135.

20. Eşrefoğlu M. , (2016) , ‘Bölüm 9 Erkek Genital Sistemi’, ‘Özel Histoloji 2. Baskı’, İstanbul Tıp Kitabevi.
21. Evenson D.P. ,Jost L.K. ,Marshall D. ,Zinaman M.J. ,Clegg E. ,Purvis K. , (1999) , Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999;14:1039-49
22. Foresta C. ,Zorzi M. ,Rossato M. ,Varotto A. , (1992) , Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl.* 1992;15:330–337.
23. Garczyca W. ,Gong J. , Darzynkiewicz Z. , (1993) , Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays, *Cancer Res* 1993 Apr 15;53(8):1945-51
24. Gartner P.L. ,Hiatt L.J. ,Çeviri Ed.Canan Hürdağ, Hücre Biyolojisi ve Histolojisi, 7.Baskı, İstanbul Tıp Kitabevi,2016
25. Gedikli S, Özbek E. , Demirci T. , (2013), ‘Fertilizasyonun Moleküler Temeli’, *Van Tıp Dergisi*: 20(4): 294-301
26. Gilbert F.S. , *Developmental Biology*, 6th edition ,Chapter:19, 2000, Swarthmore Collage
27. Gosálvez J. ,López-Fernández C. ,Fernández J. L. ,Gouraud A. ,Holt W. V. , (2011)Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. *Molecular Reproduction and Development*.
28. Güneş S. ,Sevgili E. ,Aşçı R. , (2013), ‘Sperm DNA Hasarı Mekanizmaları ve Değerlendirme Yöntemleri(Sperm DNA Damage Mechanisms and Evaluation Assays: Review)’, *Türkiye Klinikleri J. Urology* 2013,4(3):107-14
29. Hamilton T.R.D.S. ,Siqueira A.F.P. ,de Castro LS, Mendes C.M. ,Delgado J.C. , de Assis P.M.,Mesquita L.P., Maiorka P.C.,Nichi M., Goissis M.D.,Visintin J.A., (2018) ,Effect of Heat Stress on Sperm DNA: Protamine Assessment in Ram Spermatozoa and Testicle Oxid Med Cell Longev , Mar 25;2018:5413056. doi: 10.1155/2018/5413056. eCollection 2018.
30. Hammadeh M.E. , al-Hasani S. ,Stieber M. ,Rosenbaum P. ,Küpker D. , Diedrich K. , (1996) , The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod.* 1996;11:2468–2471

31. Hammadeh M.E. ,Zeginiadov T. ,Rosenbaum P. ,Georg T. ,Schmidt W. , Strehler E. ,(2001) , Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. Arch Androl. 2001;46:99–104.
32. Henkel R.R. ,Menveld R. ,Kleinhapfl M. ,S. Wolf-Bernhard, (2001) ,Seasonal Changes in Human Sperm Chromatin Condensation, Journal of Assisted Reproduction and Genetics, July 2001, Volume 18, Issue 7, pp 371-377.
33. Henkel R.R. ,Schill W.B. , (2003) , Sperm preparation for ART. Reprod Biol Endocrinol 2003;1:108-129.
34. Irez T. ,Dayioglu N. ,Alagöz M. ,Karatas S. ,Güralp O. ,(2018) , The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. Andrologia. 2018 Dec;50(10):e13111. doi: 10.1111/and.13111. Epub 2018 Jul 19
35. Irez T. ,Sahmay S. ,Ocal P. ,Goymen A. ,Senol H. ,Erol N. ,Kaleli S. ,Guralp O. , (2015) , Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques , Andrologia
36. Jensen C.E. ,Wiswedel K. ,McLoughlin J. ,van der Spuy Z. , (1995), ‘Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners’, Fertil Steril, Dec;64(6):1189-96.
37. Junqueira L.C. , Carneiro J ,Kelley R O. , (1998) , ‘22. Bölüm Erkek Üreme Sistemi’, ‘Basic Histology 8th edition’, Aytekin Y., Barış Kitabevi
38. Kierszenbaum A. L, (2006) , ‘Bölüm 20:Spermatogenez’, ‘Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş’, Çev.Ed. Demir R., Palme Yayıncılık, Ankara
39. Kruger T.F. , Acosta A.A. , Simmons K.F. , (1988) , Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro fertilization. Fertil Steril 1988;49:112-7.
40. Lenzi A,Gandini L. ,Picardi M. ,(1998), ‘A rationale for glutathione therapy’, Human Reprod. 1998 Jun, 13(6):1419-22.
41. Luvoni G.C ,Mitchell J.R.,Peter A.T. ,Pugh D.G. , Waberski D. ,(2016) , Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration, Theriogenology, Volume 85, Issue 9, June 2016, Pages 1507-1527.
42. Mariotti A, Mawhinney M. , (2013), ‘Endocrinology of sex steroid hormones and cell dynamic in the peridontium’, Periodontol 2000. 2013 Feb;61(1):69-88.

43. Nagata S. ,(2000), ‘Apoptotic DNA Fragmentation, Experimental Cell Research’, Volume 256, Issue 1, 10 April 2000, Pages 12-18.
44. Netter F.H., (2005) , Atlas of Human Anatomy, 3. Baskı, 2005
45. Oliva R. , (2006) , Protamines and male infertility. Hum Reprod Update. 2006 Jul-Aug;12(4):417-35. Epub 2006 Mar 31.
- Özkavukçu S. ,Aras D. , (2017) , Sperm Preparation Methods for IUI and IVF, TJRMS2017;1(2)
46. Peasch U. ,Granewald S. ,Agarwall A. ,Glandera H.J. ,(2004), ‘Activation pattern of caspases in human spermatozoa’, Fertil Steril 2004, Mar;81 Suppl 1:802-9.
47. Plante M. ,de Lamirande E. ,Gagnon C. ,(1994), ‘Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal motility’, Fertil Steril 1994 Aug;62(2):387-93.
48. Reece J.B. , N.A.Campbell, (2015) , ‘Ünite 7 Hayvan Yapı ve İşlevi’, ‘Campbell Biyoloji’, Çev.Ed. Gündüz E. , Türkan İ. , Palme Yayıncılık, Ankara
- Reprod Biol Endocrinol. 2007; 5: 36. Published online 2007 Aug 30. doi: 10.1186/1477-7827-5-36
49. Rosai J. (2004) ,In Acerman’s Surgical Pathology, Vol.1, 9th Edition St. Louis, Mosby Company, 2004; pp:1412-1456.
50. Ross H.M. ,Kaye G. ,Pawlina W, (2003), ‘Histology, a text and atlas 4th edition’, Lippincott Williams&Wilkins Philadelphia,2003;689-696.
51. Royere S. , Hamamah J. C. ,Nicolle C. ,Barthelemy J. Lansac, (1988), Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: Fluorescence acridine orange staining and Feulgen-DNA cytophotometric studies, Molecular Reproduction Development, Volume21 Issue1 September 1988 Pages 51-57.
52. Sakkas D. ,Alvarez J. G. ,(2010) ,Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. Fertility and Sterility. 2010;93(4):1027–1036. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046.
53. Shamsi M.N. , Venkatesh S. ,Pathak D. ,Deka D. ,Doda R. ,(2011), ‘Sperm DNA damage&oxidative stress in recurrent spontaneous abortion (RSA)’ , Indian J.Med Res. 2011 May;133(5):550-551

54. Shen H. , Ong C. , (2000), 'Detection of oxidation DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility', *Free Radic Biol Med*,2000 Feb 15;28(4):529-36.
55. Singh N.P. , Stephans R.E. ,(1998), 'X-Ray induced DNA double-strand breaks in human sperm', *Mutagenesis* 1998 Jan;13(1):75-9.
56. Sotolongo B. , Huang T. T. F., Isenberger E., Ward W. S. , (2005) ,An endogenous nuclease in hamster, mouse, and human spermatozoa cleaves DNA into loop-sized fragments. *Journal of Andrology*. 2005;26(2):272–280. doi: 10.1002/j.1939-4640.2005.tb01095.x
57. Spano M. ,Cordelli E. ,Leter G. ,Lombardo F. ,Lenzi A. ,Gandini L. , (1999) ,Nuclearchromatin variations in the human spermatozoa which underwent swim-upand cryopreservation, which were evaluated by the flow cytometric spermchromatin structure assay. *Mol Hum Reprod* 1999; 5 : 29-37.
58. Stevanato J. ,Ricardo Pimenta Bertolla, Valeria Barradas, (2008) ,Semen processing by density gradient centrifugation does not improve sperm apoptotic deoxyribonucleic, *Feril Steril*
59. Tamburrino L. , Montoya M. , Elia Morino F, Natali L. , Cambi M. , Forti G. , Baldi E. ,Muratari M. , (2012) ,Mechanism and Clinical correlates of sperm DNa damage, *Asian J. Androl* 2012 Jan;14(1):24-31
60. Tesarik J. , Mendoza C. , Greco E. , (2002), 'Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ics1', *Human Reproduction*, Voleme 17, Issue 1,1 January 2002,Pages 184,189.
61. Twigg J.P. , Irvine D.S. ,Aitken R.J. ,(1998), 'Oxidative damage yo DNA in human spermatozoa does not prclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection', *Hum. Reprod* 1998 Jul;13(7):1864-71
62. Wach-Gygax L. ,Burger D. ,Malama E. ,Bollwein H. ,Fleisch A. ,Jeannerat E. , Thomas S. ,Schuler G. ,Janett F. ,(2017), Seasonal changes of DNA fragmentation and quality of raw and cold-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 10.1016/j.theriogenology.2017.05.025. Epub 2017 May 30.
63. World Health Organization , (2010) , 'WHO Laboratory Manual fort the Examination of Human Semen and Sperm-Carvical Mucus Interaction 5th Edition' Cambridge, Cambridge University Press

64. Wouters-Tyrou D. , Martinage A. , Chevaillier P. , Sautière P. ,(1998), Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie*. 1998;80(2):117–128. doi: 10.1016/S0300-9084(98)80018-7.
65. Younglai E.V. ,Holt D. ,Brown P. ,Jurisicova A. ,Casper R.F. ,(2001), Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1950-53.
66. Zhang M.H. ,Zhai L.P. ,Fang Z.Y. ,Li A.N. ,Qiu Y. ,Liu Y.X. ,(2018), Impact of a mild scrotal heating on sperm chromosomal abnormality, acrosin activity and seminal alpha-glucosidase in human fertile males. *Andrologia*. 2018 Feb 22. doi: 10.1111/and.12985
67. Zini A. ,Bielecki R. ,Phang D. ,Zenzes M.T. ,(2001), Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 2001;75:674–677.
68. Zini A. ,de Lamirande E. ,Gagnon C. , (1993), ‘Reactive oxygen species in semen of fertile patient: level of superoxide dismutase-and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa’, *Int J. Androl* 1993 Jun;16(3):183:8.
69. Zini A. ,Kamal K. ,Phang D. ,Willis J. ,Jarvi K. ,(2001) , Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology* 2001;58:258-61.

10.EKLER

EK 1

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: Sperm hazırlama yöntemlerinin sperm kromatin kondenzasyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi “

Sizi, ‘Sperm hazırlama yöntemlerinin sperm kromatin kondenzasyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi’ başlıklı bir araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Bu anket çalışmasına katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama hakkına sahipsiniz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır.

Sorumlu Araştırmacı: Prof.Dr.Tülay İREZ

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Farklı sperm hazırlama yöntemleri kullanılarak farklı sıcaklıkların da etkisiyle normazoospermik ve oligoastenoteratospermik olmak üzere deney gruplarında bu koşulların sperm kromatin kondenzasyonu ve DNA hasarı üzerine etkilerini incelemek amaçlanmıştır. Çalışmanın ortalama altı ay sürmesi ve yaklaşık 40 kişinin katılması planlanmaktadır.

Bu çalışmaya katılmamalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, vermiş olduğunuz doku örneğinin analiziyle ilgili süreç rutin olarak devam edecek ve işlem sonucunuzu yine planlanan tarihte almış olabileceksiniz. Kısacası bu çalışmaya katılıp katılmamanız analiz sürecini pozitif ya da negatif herhangi bir şekilde etkilemeyecektir.

Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?

Bu çalışmaya katılmanız halinde herhangi bir maddi sorumluluk altına girmeyeceksiniz.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Araştırma sorumlusu, kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde yalnızca bu araştırmada olmak üzere tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Ecem ASLAN

GÖREVİ : Biyolog

TELEFON : 05337040724

Biruni Üniversitesi'nde Biyolog Ecem ASLAN tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakıma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağını bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun 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 sorun ile karşılaştığımda; Bio. Ecem ASLAN'ı 05337040724 nolu telefonda arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Tel:

İmza:

EK 2

ETİK KURUL ONAYI



Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

29.01.2018

Sayın: Ecem ASLAN

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda '**Sperm hazırlama yöntemlerinin sperm kromatin kondenzasyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi**' isimli araştırmanızın kurulumuzun 29.01.2018 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Tarih:29.01.2018 Toplantı Sayısı:12	Karar No: 2018/12-9 Araştırmacı Ecem ASLAN'ın planladığı 'Sprem hazırlama yöntemlerinin sperm kromatin kondenzasyonu ve DNA hasarı üzerine etkisi' konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmannın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.
----------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

ÜYELER

Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Can Polat EYİGÜN	Tıp Fakültesi	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D	Etik Kurul Başkanı	<i>iznli</i>
Doç.Dr.Leman ŞENTURAN	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Hemşirelik Bölümü	Etik Kurul Başkan Yardımcısı	<i>L. Şenturan</i>
Prof.Dr.Fatma ÇELİK	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Beslenme ve Diyetetik Bölümü	Üye	<i>Fatma Çelik</i>
Doç.Dr.Şölen HİMMETOĞLU	Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya A.D.	Raportör	<i>Şölen Himmetoğlu</i>
Doç.Dr.Burcu KARADUMAN	Diş Hekimliği Fakültesi	Periodontoloji A.D.	Üye	<i>Burcu Karaduman</i>
Yrd.Doç.Dr.Ayşe Tuba CEYHUN	Eğitim Fakültesi	Zihin Engelliler Bölümü	Üye	<i>Ayşe Tuba Ceyhun</i>
Yrd.Doç.Dr.Yonca ZENGİNLER	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü	Üye	<i>Yonca Zenginler</i>

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: ECEM ASLAN

Doğum Tarihi ve Yeri : 30/11/1992

Mail Adresi: ecemmasl@gmail.com

Unvanı: Biyolog

Öğrenim Durumu: Lisans

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
Önlisans	Anadolu Üniversitesi/Laborant ve Veteriner Sağlık	2017
Lisans	İstanbul Kültür Üniversitesi / Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015

İNTİHAL RAPORU

SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN SPERM KROMATİN KONDEZASYONU VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 14 BENZERLİK ENDEKSİ	% 13 İNTERNET KAYNAKLARI	% 3 YAYINLAR	% 5 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	---------------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİ KAYNAKLAR

1	maksfarma.com İnternet Kaynağı	%7
2	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	%2
3	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	%1
5	www.uroturk.org.tr İnternet Kaynağı	%1
6	www.toraks.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1