



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**SPERM DNA FRAGMENTASYONU, DNA HASARI VE
PROTAMİN ORANININ BELİRLENMESİ VE SPERM
PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilara EMİRZEOĞLU

Samsun

Nisan-2019



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**SPERM DNA FRAGMENTASYONU, DNA HASARI VE
PROTAMİN ORANININ BELİRLENMESİ VE SPERM
PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilara EMİRZEOĞLU

**Danışman
Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ**

**Samsun
Nisan-2019**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Dilara EMİRZEOĞLU tarafından, Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ Danışmanlığında hazırlanan '**Sperm DNA Fragmantasyonu, DNA Hasarı ve Protamin Oranının Belirlenmesi ve Sperm Parametrelerine etkisi**' başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından /..... /..... tarihinde yapılan sınav ile Moleküler Tıp Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ramazan AŞÇI, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Sercan ERGÜN

ONAY

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, kıymetli bilgi, birikim ve tecrübelerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle yardımcı olan, zor zamanlarda destekçim olup sorunlarıma çözüm bulan ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e teşekkürü bir borç bilirim. Bu akademik dünyada ilerlememi sağlayan bana olan inancıyla her zaman yanımda duran ve tez çalışmam süresi boyunca büyük desteği sayesinde çalışmamın aksamaması için tüm olanaklarını sağlayıp tezin bir nebze olsun daha kolay ilerlemesini sağlayan babam Prof. Dr. Mehmet EMİRZEOĞLU'na minnetlerimi sunuyorum. Çalışmanın anlam kazanmasında büyük emeği olan değerli hocamız Prof. Dr. Ramazan AŞÇI'ya, bilgi ve tecrübeleriyle çekinmeden yanlarına gidip sürekli yardım istediğim sevgili büyüklerim Araş. Gör. Aslı METİN MAHMUTOĞLU ve Araş. Gör. Neslihan HEKİM'e, sperm analizlerini yaparak, önemli verilerin elde edilmesini sağlayan biyolog Gökhan ZENGİN'e, yine kıymetli bilgi ve tecrübesini benimle paylaşıp laboratuvar analizlerinde bana yol gösteren Prof. Dr. Tolga GÜVENÇ'e, çalışmanın istatistiksel analiz kısmında bizden yardımlarını esirgemeyen Dr. Ralf HENKEL'e ,

Son olarak her zaman yanımda olup manevi desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Emre HOLOĞLU ve annem Esra EMİRZEOĞLU'na teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışması, PYO.TIP.1904.17.012 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

SPERM DNA FRAGMENTASYONU, DNA HASARI VE PROTAMİN ORANININ BELİRLENMESİ VE SPERM PARAMETRELERİNE ETKİSİ

Amaç: Tezde amacımız infertilite tanısı konulan ve etiyolojisi açıklanamayan hastalarda sperm dna fragmentasyonu (SDF), DNA hasarı ve protamin oranının belirlenmesidir. Ayrıca, SDF, DNA hasarı ve protamin oranını sperm parametreleri ile karşılaştırması amaçlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmaya toplam 33 idiyopatik infertil hasta ve 10 fertil erkek kontrol grubu olarak dahil edildi. Semen parametreleri Dünya sağlık örgütü (World Health Organisation, WHO) kriterlerine göre değerlendirildi. Hastaların ve kontrollerin sperm protamin seviyeleri anilin mavisiyle boyama ile analiz edildi. SDF belirlemek için TUNEL testi, sperm DNA hasarını ölçmek amacıyla ELISA testi uygulandı. Değerlendirilen veriler semen parametreleriyle kıyaslandı.

Bulgular: Protamin seviyelerinin artışının fertil grup ve infertil grup arasında anlamlı bir ilişki göstermiştir ($p < 0,0001$). TUNEL testi sonucunda SDF ölçümü yapılan infertil ve fertil bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p = 0,829$). İnfertil bireyler ve fertil bireyler arasında DNA hasarı değerleri bakımından bir fark bulunamadı ($p = 0,119$). SDF ve DNA hasarı ile sperm parametreleri değerlendirildiğinde aralarında ilişki belirlenemedi. Histon yüzdesinin artışı ile sperm parametreleri değerlendirildiğinde yaş ($p = 0,01$), motilite ($p = 0,0006$), konsantrasyon ($p < 0,0001$) ve sperm morfolojisiyle ($p < 0,0001$) ilişki saptanmadı. DNA hasarı ve sperm parametreleri arasında bir ilişki bulunması ($p > 0,05$).

Sonuç: Bu tez çalışması, infertil ve fertil erkeklerin protamin oranlarının farklılık gösterdiğini ortaya koydu hipotezimizi destekler nitelikte bulundu. Ancak, sperm DNA hasarı ve fragmentasyonunun infertilite ile ilişkisini tam olarak ortaya koymak için çalışmadaki hasta sayısının artırılması ve daha kapsamlı bir çalışma yapılması yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Erkek infertilitesi; protaminasyon; sperm DNA hasarı; sperm DNA fragmentasyonu

Dilara EMİRZEOĞLU, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Samsun, Mayıs, 2019

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SPERM DNA FRAGMENTATION AND DAMAGE, PROTAMINE RATIO AND THEIR RELATIONSHIP TO SEMEN PARAMETERS

Aim: The aim of this thesis is evaluating sperm DNA fragmentation, sperm DNA damage protamine ratio and comparing these results in idiopathic oligoasthenozoospermic (OAT) infertile patients and normozoospermic patients who are not certainly diagnosed with infertility and fertile men. In addition, we aimed to compare DNA fragmentation, sperm DNA damage, protamine deficiency and sperm parameters.

Material and Method: Thirty three idiopathic infertile patients and 10 fertile men was included as control group. Semen parameters was evaluated according to World Health Organisation criteria. TUNEL assay ELISA analysis and aniline blue staining methods were used to investigate sperm DNA fragmentation, DNA damage and protamination, respectively. These data were compared with semen parameters.

Results: Protamine analysis demonstrated a significant association between infertile patients and fertile men ($p < 0.0001$). There was no correlation in results of TUNEL test between infertile men and fertile men ($p = 0.829$). Sperm DNA damage results demonstrated no association ($p = 0.119$). There was no correlation between sperm DNA fragmentation and sperm DNA damage. A significant association was found among increase in histone ratio and age ($p = 0.01$) and semen parameters, motility ($p = 0.0006$) and sperm morphology ($p < 0.0001$). No correlation was found between sperm DNA damage and sperm parameters ($p > 0.05$).

Conclusion: The thesis demonstrated discrepancy in protamine levels of infertile patients and fertile controls and support our hypothesis. To understand better the relationship between sperm DNA fragmentation and sperm DNA protamination in male infertility, additional studies are required.

Keywords: Male infertility; protamination; sperm DNA; sperm DNA fragmentation

Dilara EMIRZEOGLU, Master Thesis
Ondokuz Mayıs University-Samsun, May-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

- WHO** : Dünya sağlık örgütü (World health organisation)
- CFTR** : Kistik fibrozis transmembran regülatörü
- SDF** : Sperm DNA fragmantasyonu
- OAT** : Oligoastenoteratozoospermi
- KS** : Klinefelter sendromu
- RT** : Robertsonian translokasyonu
- AZF** : Azospermik faktör bölgesi
- CF** : Kistik fibrozis
- AR** : Androjen reseptörü
- AIS** : Androjen duyarsızlığı sendromu
- IVF** : *In vitro* fertilizasyon
- ICSI** : Intrasitoplamik sperm enjeksiyonu
- ROS** : Reaktif oksijen türleri
- CMA3** : Floresan prob kromomisin
- TUNEL** : Thermal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling
- SCD** : Sperm kromatin dağılımı testi
- SCSA** : Sperm kromatin yapısı testi
- dUTP** : Deoksiüridin trifosfat
- TP** : Geçiş proteinleri
- P1** : Protamin 1
- P2** : Protamin 2

cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat

PBS : Fosfat tamponlu salin

PFA : Paraformaldehit

FSH : Folikül stimüle edici hormon



İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1. Erkek İnfertilitesi | 3 |
| 2.1.1. Klinefelter Sendromu | 4 |
| 2.1.2. Robertsonian Translokasyonu | 4 |
| 2.1.3. Otozomal İnversiyonlar | 5 |
| 2.1.4. Y-Kromozomu Mikrodelesyonları | 5 |
| 2.1.5. Tek Gen Mutasyonları | 6 |
| 2.1.6. Androjen Reseptör Geni Mutasyonları | 6 |
| 2.2. Sperm DNA Fragmantasyonu | 6 |
| 2.2.1. Sperm Kromatin Dağılımı Testi | 10 |
| 2.2.2. Sperm Kromatin Yapısı Testi | 10 |
| 2.2.3. TUNEL | 10 |
| 2.3. DNA Hasarı | 11 |
| 2.4. Spermatogonez | 13 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.1. Spermiyogenez | 15 |
| 2.5. Protaminasyon | 15 |
| 2.5.1. Sperm Nükleoproteinleri | 16 |
| 2.5.2. Protaminasyon | 20 |
| 2.5.3. Histonların Protaminlerle Yer Değişimi | 21 |
| 2.5.4. Protaminler ve Erkek İnfertilitesi | 23 |
| 3. MATERYAL VE METOD | 23 |
| 3.1. Materyal | 24 |
| 3.1.1. Çalışma grubu | 24 |
| 3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler | 25 |
| 3.2. Metod | 26 |
| 3.2.1. Anilin Mavisi ile Boyama | 27 |
| 3.2.2. TUNEL Testi | 28 |
| 3.2.3. ELISA Testi | 30 |
| 3.2.4. İstatistiksel Değerlendirme | 32 |
| 4. BULGULAR | 33 |
| 5. TARTIŞMA | 39 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 46 |
| 7. KAYNAKLAR | 49 |
| EKLER | 62 |
| ÖZGEÇMİŞ | 69 |

1.GİRİŞ

İnfertilite genetik ve epigenetik nedenlerden kaynaklanan karmaşık etiyojili bir hastalıktır. WHO'ya göre infertilite, 12 ay veya daha uzun süreyle düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrasında klinik bir gebelik elde etmedeki yetersizlik olarak tanımlanan bir üreme sistemi hastalığıdır (Zegers-Hochschild ve ark., 2009). Üretken yaştaki çiftlerin %10-15'i infertilite sorunuyla karşılaşmaktadır ve bu çiftlerin yarısındaki sorun erkek faktörü kaynaklıdır (Neto ve ark., 2016a). Genel erkek popülasyonunun yaklaşık %7'si infertildir (Krausz ve ark., 2015). Çiftlerin yaklaşık olarak %15'inde ikinci yıl, %14'ünde üçüncü yıl kendiliğinden gebelik oluşmakta geriye kalanların ise %5'i infertil olarak kalmaktadır (Jungwirth ve ark., 2012). İnfertilitenin heterojenliği nedeniyle bazen altında yatan nedenleri saptamak oldukça zordur. İnfertilite sorununu, sosyo-ekonomik, demografik ve bölgesel sağlık farklılıklar açısından değişiklik göstermektedir. Hipogonadotropik hipogonadizm, kongenital vaz deferans eksikliği, varikosel, kriptorşidizm ve testiküler tümörler erkek infertilitesinin fenotipi etkileyen faktörleridir. Diğer yandan erkek infertilitesinde bilinen genetik nedenler infertilitenin yaklaşık %15'inden sorumludur (Krausz ve ark., 2015). En sık görülen genetik nedenler kromozom anomalileri, Y-kromozomu mikrodelsyonları, kistik fibrosis regülatör geni mutasyonlarıdır (Gunes ve ark., 2016). Ancak bu bilinen genetik nedenlerin yanı sıra infertilitenin yaklaşık %30'luk kısmının etiyojisi hala bilinmemekte ve idiyopatik infertilite olarak adlandırılır (Krausz, 2011).

Spermiyogenezde, mayozun tamamlanması ile oluşan immatür spermatidler olgunlaşarak testiküler ya da olgun sperm formunu alırlar. Bu süreçte spermatid çekirdeğindeki histonların yerini protaminler alır (Gunes ve Kulaç, 2014). İnsanlarda, sperm DNA'sının yaklaşık olarak %10-15'i histonlarla paketlenirken DNA'nın geriye kalan bölümünün pakenlenme işlenimini daha sıkıca yapan protaminler üstlenir (Wykes and Krawetz, 2003). Protaminasyon sürecindeki bozukluk sperm çekirdeğinde protamin oranında eksikliğe yol açabilir. Sperm protamin oranındaki eksiklik önemli ölçüde sperm kalitesi, işlevi ve sperm konsantrasyonunun azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Aoki ve ark., 2005a). Aynı zamanda protamindeki eksikliğin DNA hasarıyla da ilişkili olduğu kabul

edilmektedir. Son yıllarda, DNA hasarı ve infertiliteyle ilgili çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (Sharma ve ark., 2010, Simon ve ark., 2011). Bu nedenlerden dolayı protamin seviyesindeki anormalliklerle erkek infertilitesi ilişkilendirilmiştir (Chevaillier ve ark., 1987).

Erkek infertilitesindeki diğer bir belirteç SDF'dir. DNA fragmantasyonu DNA'daki tek zincir veya çift zincir kırıkları olarak tanımlanır (Evenson, 2016). SDF, fertilizasyon, erken dönem embriyo gelişimini, implantasyonu ve gebeliği engelleyerek fertiliteyi etkiler (Lewis ve ark., 2013). SDF'nin etiyojisi multifaktöriyeldir. Bir takım hücrel olaylar fertilite bozulmasına ve sperm DNA hasarına katkıda bulunur. Bu olaylardan başlıcaları, kromatinin anormal paketlenmesi veya spermatogenezde tekrar modellenmesi, reaktif oksijen türlerinin (reactive oxygen species, ROS) aşırı üretimi veya seminal antioksidanların azalması ve epididimide sperm maturasyonu sırasındaki apoptotik olaylardır (Agarwal ve ark., 2016b). Çevresel toksinler ve kirlilik, ilaçlar, kemo-radyasyon, sigara kullanımı, ateşli hastalıklar, varikozel ve ilerleri yaş SDF'yi artıran faktörler olarak ortaya konulmaktadır (Sharma ve ark., 2013a, Sharma ve ark., 2016b, Rubes ve ark., 2005). Yüksek seviyede SDF ise anormal semen parametreleri görülen erkeklerde ve infertil çiftlerdeki normozospermik partnerlerde bulunur gözlenir (Saleh ve ark., 2002).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, SDF, sperm DNA hasarı ve sperm protamin oranının erkek infertilitesiyle ilişkili olabileceğini göstermektedir (Hammadeh ve ark., 2010). Ancak, erkek infertilitesinin büyük oranda heterojenite göstermesi nedeniyle sperm DNA fragmantasyonu, DNA hasarı ve protamin oranının semen parametreleri ve farklı özellikteki hastalarla ilişkisi tam olarak ortaya konulamamıştır. Dolayısıyla, tezde amacımız infertilite tanısı konulan ve oligoastenoteratozoospermi (OAT) tanısı alan hastalarda SDF, sperm DNA hasarı ve protamin oranının belirlenmesidir. Ayrıca, SDF, sperm DNA hasarı ve protamin oranını sperm parametreleri ile karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek İnfertilitesi

Dünya sağlık örgütünün tanımına göre infertilite, 12 ay veya daha uzun süreyle düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrasında klinik bir gebelik elde etmedeki başarısızlık olarak tanımlanan bir üreme sistemi hastalığıdır (Zegers-Hochschild ve ark., 2009). Dünya genelinde yaklaşık 140 milyon insan infertiliteyle karşı karşıya kalmaktadır (Esteves, 2013). İnfertilite sorunuyla karşılaşan çiftlerin yarısında erkeğe ait patolojiler söz konusudur. Bu sayı toplam erkek popülasyonunun yaklaşık %7'sini oluşturmaktadır (Krausz ve ark., 2015). Çiftlerdeki infertilitenin yaklaşık %30'undan erkek faktörü tek başına sorumlu olurken yaklaşık %20'sinden erkek faktörü ve kadın faktörü birlikte sorumludur (Leaver, 2016).

Erkek infertilitesi global popülasyon sağlık sorunudur. Agarwal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan elde ettikleri veriler doğrultusunda erkek infertilitesinin dünya genelinde 2,5%-12,0% aralığında değiştiğini ve en yüksek oranların Doğu Avrupa ve Afrika'da görüldüğünü göstermektedir (Agarwal ve ark., 2015). Dolayısıyla infertilite sorununun etkisinin sosyo-ekonomik, demografik ve bölgesel sağlık farklılıkları açısından değişiklik gösterdiğini bu tarz çalışmalarla görmekteyiz.

Erkek infertilitesinin çeşitli nedenleri vardır. Bunlardan başlıcaları endokrinopatiler, gelişimsel ve anatomik bozukluklar, spermatogenezin azalması ve anormal sperm işlevleri bozukluklarıdır. Erkek infertilitesiyle ilişkilendirilen çeşitli patolojiler ya doğrudan ya da spermatogenezde rol alan çok sayıdaki genin veya bu proteinlerin anormallikleri ile ilişkilidir (Carrell ve ark., 2006).

Semen analizi erkek faktörünü belirleme ve tanı koymadaki en temel yöntemdir. Ancak, semen analizi sonucu normal olması durumunda bile birey infertilite sorunuyla karşılaşabilir (idiyopatik infertil birey).

Anormal semen analizi çeşitli formlarda ifade edilebilir. Oligozospermi (sperm konsantrasyonu < 15 milyon/ml), astenozospermi (sperm motilitesi < %32), teratazospermi (sperm morfolojisi < %4), oligoastenoteratozospermi (3 parametrede de bozukluk) ve

azospermi (ejakulatta sperm olmaması) ve aspermi (ejekulat bulunmama durumu) ve lökositospermi (ejakulattaki lökosit sayısı > 1 milyon ml) (Krausz, 2011).

Erkek infertilitesinin %15-30'u genetik nedenlerden kaynaklanmaktadır (Krausz ve ark., 2015, O'Flynn O'Brien ve ark., 2010). Somatik ve gametik hücrelerde bulunan sitogenetik anomaliler erkek infertilitesinin primer nedenleridir. Bunların ardından Y-kromozomu mikrolezyonları ve tek gen mutasyonları gelir (Gunes ve ark., 2016). Erkek infertilitesinde görülen kromozom anomalilerine aşağıda yer verilmektedir:

2.1.1. Klinefelter Sendromu (47,XXY)

Klinefelter Sendromunun (KS) prevalansı yaklaşık 600 canlı doğumda bir olup erkeklerde en çok karşılaşılan kromozom anomalisidir (Groth ve ark., 2013). Bu sendrom, şiddetli oligozospermik ve azospermik erkeklerde sırasıyla %5,4 ve %14,8, infertil erkeklerde ise genel olarak %4 olarak saptanmıştır (Stahl and Schlegel, 2012, Van Assche ve ark., 1996). KS, erkek faktörünün neden olduğu infertilitenin en yaygın genetik nedenidir. KS'li erkeklerin %80'i 47,XXY karyotipine sahipken, %20'si 47,XXY/46,XY mosaisizmi veya yapısal kromozomal bozukluklara sahiptirler (Neto ve ark., 2016a). KS'nin nedeni mayoz sırasındaki paternal veya maternal nondisjunction'dır (Neto ve ark., 2016a). Küçük testisler, jinekomasti, spermatogenez yokluğu, hipergonadotropik hipogonadizm, folikül stimüle edici hormon (Follicle Stimulating Hormone, FSH) salınımında artış ve algisal bozukluklar KS'li hastaların klinik semptomlarıdır. KS hastaların bir kısmı mikro cerrahi yöntemleri (microTESE) ve *in vitro* fertilizasyon teknikleri çocuk sahibi olabilmektedir (Madureira ve ark., 2014).

2.1.2. Robertsonian Translokasyonu

Robertsonian translokasyonu (RT) iki akrosentrik kromozomun kısa kolunu kaybederek kaynaşması sonucu oluşmaktadır (13, 14, 15, 21 ve 22 numaralı kromozomlar). Derivatif kromozom iki kromozomun uzun kollarından meydana gelir ve oluşan dengeli karyotip sadece 45 kromozoma sahiptir. Ribozomal RNA'nın (rRNA) kopyaları akrosentrik kromozomların kısa kollarında bulundurmaları nedeniyle kromozomların kısa kollarının kaybı zarar verici bir etki meydana getirmemektedir. RT en sık görülen yapısal kromozomal anormalliktir ve yaklaşık 1000 yeni doğanda bir görülür (Therman and

Susman, 1993). RT'nin dengesiz gametler oluşturması infertilite sorununa da yol açabilmektedir. Semen analizi sonucunda oligozospermi tanısı alan erkeklerde RT prevalansı %1,5 ve azospermik erkeklerde ise %0,2'dir (Stahl and Schlegel, 2012). Robertsonian dengeli kromozom taşıyıcılarında fertilitenin azalmasının nedeni mayozda trivalan kromozom yapısıdır (Mayeur ve ark., 2019).

2.1.3. Otozomal İnverson

İnverson, bir kromozomda iki kırık meydana gelmesi ve bu iki kırık arasındaki bölgenin 180⁰ dönmesiyle oluşan bir kromozomal yeniden düzenlemelerdir. Perisentrik inverson sentromer bölgesi içerirken, parasentrik inversonlar sentromer bölgesini içermez. Çoğunlukla inversonlar fonksiyon değişimine yol açmazlar ve polimorfiktirler (Anton ve ark., 2005). Bazı alışmalar, zararsız bir inverson örneği olan 9 numaralı kromozomun perisentrik inversonunu erkek infertilitesiyle ilişkilendirmiştir. İnfertil erkeklerin yaklaşık %3-5'i kromozom 9 inversonunu barındırır ve genel populyasyondan 13 kat daha yüksek seviyede görülür (Mozdarani ve ark., 2007, Collodel ve ark., 2006, De Braekeleer and Dao, 1991) .

2.1.4. Y-Kromozomu Mikrodelesyonları

Y-kromozomunun uzun kolunda (q) lokalize olan azospermi faktörü (AZF) bölgesi sperm gelişimi ve maturasyonundan sorumludur. AZF bölgesi bulunduğu yere göre üç gruba ayrılır. Bunlar AZFa, AZFb ve AZFc bölgeleridir (Vogt ve ark., 1996, Skaletsky ve ark., 2003). Y-kromozomunun q kolundaki bu mikrodelesyonlar erkek infertilitesinin en çok bilinen ikinci nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu AZF delesyonları bir ya da daha fazla bölgeyi kısmen veya tamamen bozmaktadırlar. Azospermik erkeklerde Y-kromozomu mikrodelesyonu insidansı yaklaşık %10 iken oligozospermik erkeklerde insidans yaklaşık %5'tir (Krausz ve ark., 2014, Neto ve ark., 2016a).

2.1.5. Tek Gen Mutasyonları

Kistik fibroz transmembran regülatör (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, *CFTR*) geni kromozomun 7q31.2 bölgesine lokalizedir ve 230 kb genomik DNA ve 27 ekzondan oluşur. *CFTR* genindeki mutasyonlar sonucunda kistik fibrozis (CF) oluşur. CF, Kafkas Irkında görülen en yaygın genetik bozukluktur ve görülme sıklığı 3500 canlı

doğumda 1'dir (Castellani ve ark., 2009). *CFTR* geni üzerinde 1950'den fazla mutasyon tanımlanmıştır (Pankow ve ark., 2015). CF'nin genital formu olan kongenital bilateral vaz deferens yokluğu infertile erkeklerin %1'inde görülür ve obstrüktif azospermik erkeklerin %25 inden sorumludur (Yu ve ark., 2012). Erkek infertilitesi ve *CFTR* arasındaki ilişkinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (Sharma ve ark., 2014), araştırmacılar wolf kanalındaki bozukluk (Claustres, 2005), Wnt/ β -katenin sinyal sistemi aktivitesinde bir azalmanın (Chen ve ark., 2012) nedenler arasında olabileceği belirtilmektedir.

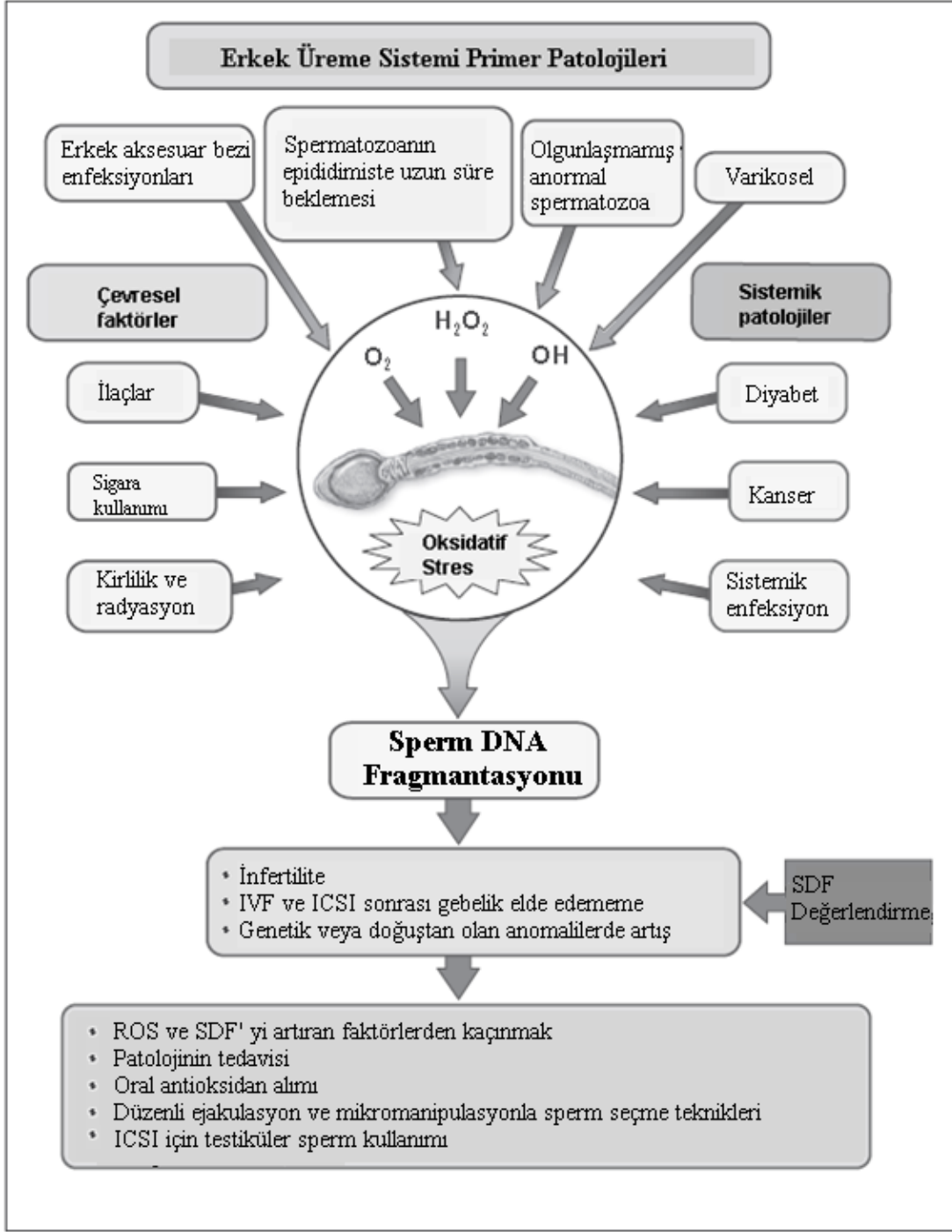
2.1.6. Androjen Reseptör Geni Mutasyonları

Androjen reseptörü (*AR*) geni, birçok diğer X'e bağlı gende olduğu gibi, testisten eksprese edilir ve X kromozomunun uzun kolunda lokalizedir (Xq11-q12) (Nutti and Krausz, 2008). *AR* geni mayozda ve spermatogenezde çok önemli rol oynar, spermatositlerin yuvarlak spermatidlere dönüşümünden sorumludur (De Gendt ve ark., 2004). Çok sayıda androjen reseptörü geni mutasyonları, veritabanlarında tanımlanmıştır (Gottlieb ve ark., 2004). Bu mutasyonlar, 60:1 sıklığındadır ve fonksiyon değişimine ya da *AR* yokluğuna sebep olmaktadır (Walsh ve ark., 2009). *AR* mutasyonları Kennedy Sendromu ve androjen duyarsızlığı sendromuna (androjen insensitivity syndrome, AIS) da yol açmaktadır. Kennedy sendromlu veya AIS'li hastalar sperm anormalliğine sahiptir azospermi ya da oligospermi ve rastgele bakılan %2 infertil erkekte bulunur (Ferlin ve ark., 2006).

2.2. Sperm DNA Fragmentasyonu

Genetik bütünlüğün değerlendirmesini içeren rutin semen analizinin genişleyen parametreleri, semen öreğini tanımlamada temeldir. Buna rağmen, sperm DNA hasarının derecesini belirlemek, fertilite ve embriyo sağlığını belirlemede önemli rol oynadığı belirtilmektedir (De Iuliis ve ark., 2009). DNA hasarı tek zincir kırıkları ya da çentiklerini, çift zincir kırıkları veya fragmanlarını, delesyon\eklemeleri ve baz modifikasyonlarını içerebilir. DNA fragmentasyon terimi teknik olarak apoptotik programlı hücre ölümü sonucunda endonükleaz- aracılı çift zincir DNA kırılmasıyla ilişkilendirilmiştir (Sharma ve ark., 2013b) ve erkek subfertilitesinin nedenlerinden biri olarak gösterilmektedir (Osman ve ark., 2015). Yüksek SDF, fertilizasyonu engelleyerek fertiliteyi (Zini, 2011), *in vitro*

fertilizasyon/intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF/ICSI) sonrası fertilizasyon oranlarını (Zini ve ark., 2008), intrauterin inseminasyon başarısını (Borini ve ark., 2006) ve gebeliği (Henkel ve ark., 2003) etkilemektedir. SDF ve anormal semen parametreleri arasında pozitif bir korelasyon gözükmemektedir (Osman ve ark., 2015). İnfertil erkeklerin, fertil erkeklere oranla daha yüksek seviyede DNA zincir kırıkları ya da diğer DNA bozukluklarına sahip oldukları açıkça belirtilmektedir (Zini ve ark., 2001). Aynı zamanda, yüksek seviyede SDF normal semen parametrelerine sahip erkeklerde (Huang ve ark., 2005) ve infertil çiftlerin normozospermik partnerlerinde (Saleh ve ark., 2002) de bulunmuştur. SDF multifaktöriyel etiyolojili bir hasardır (**Şekil 1**). Spermatogenez sırasında anormal kromatin paketlenmesi (Sakkas ve ark., 2002, Shamsi ve ark., 2008), aşırı ROS üretimi (Moustafa ve ark., 2004), seminal antioksidan kapasitesinin azalması (Shamsi ve ark., 2010) ve epididimiste sperm maturasyonu sırasındaki apoptotik olaylar (Gosalvez ve ark., 2015) fertilite bozulmasına ve sperm DNA hasarına katkıda bulunur. Çevresel toksinlere ve kirliliğe maruz kalmak, ilaçlar, kemo-radyasyon, sigara kullanımı, ateşli hastalıklar, varikosel ve ilerleyen yaş gibi faktörler SDF düzeyini artırır (Sharma ve ark., 2013a, Sharma ve ark., 2016b).



Şekil 1: Erkek üreme sisteminin primer patolojileri ile oksidatif stres ve SDF ilişkisi (Agarwal ve ark., 2016a)

Hücreler yaşantıları boyunca aerobik koşullarda sıkça oksijen paradoksuyla karşılaşır. Oksijen yaşamın devamı için gereklidir, ancak ROS gibi oksijen metabolitlerin aşırı üretimi hücre fonksiyonunu modifiye edebilir ve yaşam mücadelesini tehlikeye atabilir (de Lamirande and Gagnon, 1995). Yani, ROS normal hücre fonksiyonlarını devam ettirmek için gerekli olup düşük konsantrasyonlarda tutulması için sürekli olarak inaktive edilmelidir (Agarwal ve ark., 2003). Oksidatif stres aşırı ROS üretimi ve/veya antioksidan savunma mekanizmasının bozulmasıyla oluşur (Sharma ve ark., 2013b, Sikka, 2001). Son yayınlarda, infertil erkeklerin %25-40'ının semen örneğinde yüksek düzeyde ROS saptandığı bildirilmiştir (Padron ve ark., 1997). ROS'un en yaygın türleri H₂O₂, nitrik oksit ve superoksit anyonudur (O₂•) (Zini ve ark., 1995). ROS, infertiliteye iki mekanizmayla yol açar, bunlardan ilki sperm membranına zarar verip spermin oositle birleşme motilitesini ve yeteneğini azaltmakta, ikincisi ise doğrudan sperm DNA'sına zarar vermektedir (Tremellen, 2008). Spermatozoa özellikle oksidatif stresle indüklenen hasara karşı hassastır. Bunun nedeni spermatozoanın plazma zarının yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi ve sitoplazmasının düşük konsantrasyonda enzim içermesidir (Alvarez and Storey, 1995, de Lamirande and Gagnon, 1995). Spermatozoanın aşırı ROS ile indüklenen hasarı onarma yeteneği yoktur çünkü spermatozoada bu onarımı başarıyla sonuçlandırmak için ihtiyaç duyulan sitoplazmik enzim sistemi yoktur (Aitken ve ark., 1989). Bu durum, spermatozoanın oksidatif hasara olan hassasiyetini açıklamaktadır. SDF düzeyini hafifletmek için birçok strateji ortaya konulmuştur. Oral antioksidan alınımı, varikozel tedavisi, sperm seleksiyon teknikleri ve ICSI ya da morfolojik olarak seçilen sperm enjeksiyonu SDF'i tedavi etmedeki seçenekler olarak sunulmuştur (Agarwal ve ark., 2016a).

Son yirmi yılda SDF'in analiz edilmesi için çeşitli yöntemler ortaya koyulmuştur. Bu yöntemlerin başlıcaları TUNEL, COMET, floresan prob kromomisin (CMA3), in-situ nick translasyonu, DNA kırık belirleme-floresan in situ hibridizasyon (DBD-FISH), sperm kromatin dağılımı (sperm chromatin dispersion, SCD) ve sperm kromatin yapısı testi (Sperm chromatin structure assay, SCSA) dir. Bunlar arasında en sık kullanılan yöntemler TUNEL, SCD ve SCSA'dır (Zini ve ark., 2008).

2.2.1. Sperm Kromatin Dağılımı Testi

SCD testi, ilk kez 2003 yılında Fernandez ve arkadaşları tarafından SDF'nun analizinde kullanılabilir bir yöntem olarak tanımlanmıştır (Fernandez ve ark., 2003). Test, denatüre edilmiş hasarlı DNA'dan dolayı oluşan karakteristik halo yapının, normalden daha küçük çaplı görüntülenmesine dayanır (Chohan ve ark., 2006). SCD testi, semenden SDF analizi için kullanılabilir basit, hızlı, doğru ve tekrarlanabilir bir metottur. Bir saatten daha kısa bir sürede işlem tamamlanır. SCD testinin dezavantajları, DNA hasarını belirleyen halo çaplarına ilişkin belirli bir standart ölçüt olmaması ve yüksek sayıda hücreyle çalışılmasının gereğidir (Agarwal ve ark., 2016b).

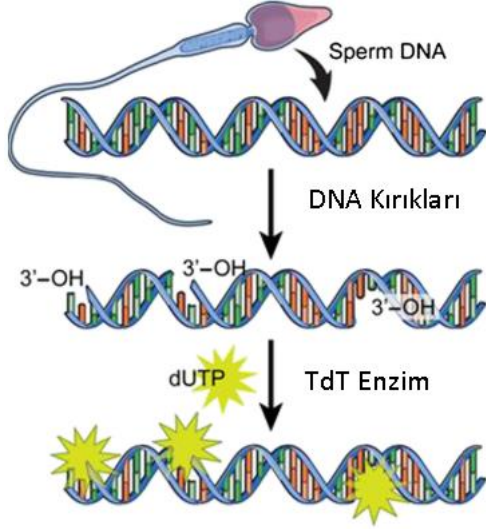
2.2.2. Sperm Kromatin Yapısı Testi

Sperm kromatin yapısı testi 1980 yılında Evenson tarafından bulunan akım sitometri temelli bir metottur. SCSA, sperm DNA'sının ısıya ya da aside maruz kalması durumundaki, hassasiyetinin denatürasyonunu ölçer. Test, akım sitometreye bağlıdır ve çok sayıda hücreyi (10.000 hücre) hızlıca değerlendirir (Lewis ve ark., 2013). Bu metod, akrinin turuncusu belirtecinin çift zincirli DNA'ya bağlandığında yeşil, tek zincirli DNA'ya bağlandığında ise kırmızı floresan ışımaya yapmasıyla tanımlanır (Darzynkiewicz ve ark., 1975). SCSA'nın avantajı, her kullanıcı için standart bir protokolünün olmasıdır. Klinik eşik değeri %30 SDF indeksidir, semen örneklerinin %30'a kadar hasarlı DNA içerebileceği ve bunun normal olduğu anlamına gelmektedir. Testin dezavantajı ise akım sitometri gerektirmesi ve yüksek maliyetli bir yöntem olmasıdır (Agarwal ve ark., 2016b).

2.2.3. TUNEL

TUNEL yöntemi, DNA fragmentasyonu spermatozoada bulunan çift ve tek zincir kırıklarının terminal nükleotidil transferaz (TdT) katalizörlüğünde dUTP ile işaretlenmesine bağlı olarak değerlendirilmesi prensibine dayanır (**Şekil 2**). Floresan etiketli dUTPler DNA'nın serbest 3'OH uçlarına bağlanarak DNA kırıklarının tanımlanmasını sağlar. Işıma miktarının artması DNA'daki kırık sayısı da artış olduğunu

göstermektedir. TUNEL testi sperm kromatin/DNA bozukluğunu tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. TUNEL yönteminin birçok avantajı vardır. En önemlilerinden biri de akım sitometri veya floresan mikroskopundan herhangi birinin analizde kullanılabilmesidir. Az sayıda sperm yeterli olup doğruluğu ve hassasiyeti yüksektir.



Şekil 2: TUNEL çalışma prensibi (Malvezzi ve ark., 2014)

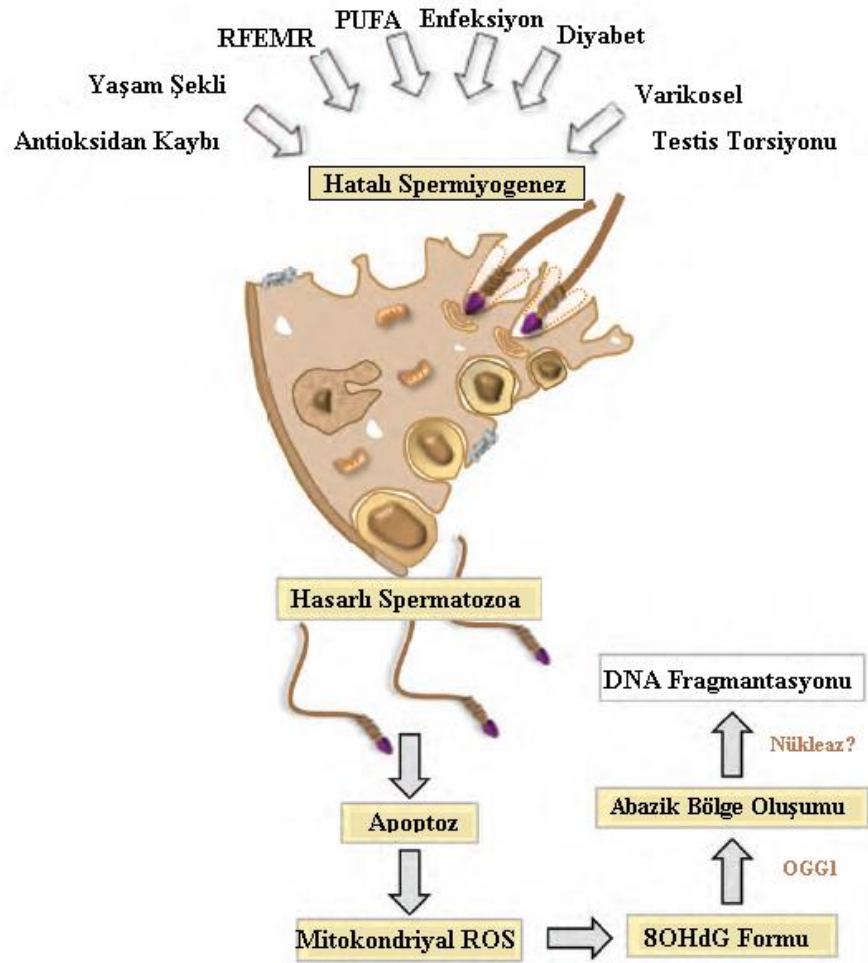
2.3. DNA Hasarı

Spermatazoadaki DNA hasarı fertilizasyonun azalması, embriyonik gelişme sırasında preimplantasyonda bozulma, düşük implantasyon, düşük artış, gelecek nesillere aktarılan hastalıklarda artış ve *in vitro* ve *in vivo* fertilizasyondaki azalmayla ilişkilendirilmiştir (Lewis and Aitken, 2005).

DNA hasarına neden olan etkenlerin hepsinin bilinmemesine rağmen ısı ve elektromanyetik radyasyon gibi fiziksel etkenler bunun yanı sıra zenebiyotikler, yağ metabolizmasındaki bozukluklar ve yaşın bu süreci etkilediği ortaya konmuştur (Aitken ve ark., 2004, Aitken and De Iuliis, 2007).

Aitken (2017) DNA hasarı etiyojisi için iki adım hipotezi ortaya koymuştur (Aitken, 2017) (Şekil 3). Germ hücrenin spermatid evresindeki bir bozulma, kromatin yeniden düzenlenmesi bununla birlikte spermiyogenezde bozulmaya yol açar. Bu durum ikinci adım olarak, sperm çekirdek DNA'sının yapısına ve bütünlüğüne etki eden ROS

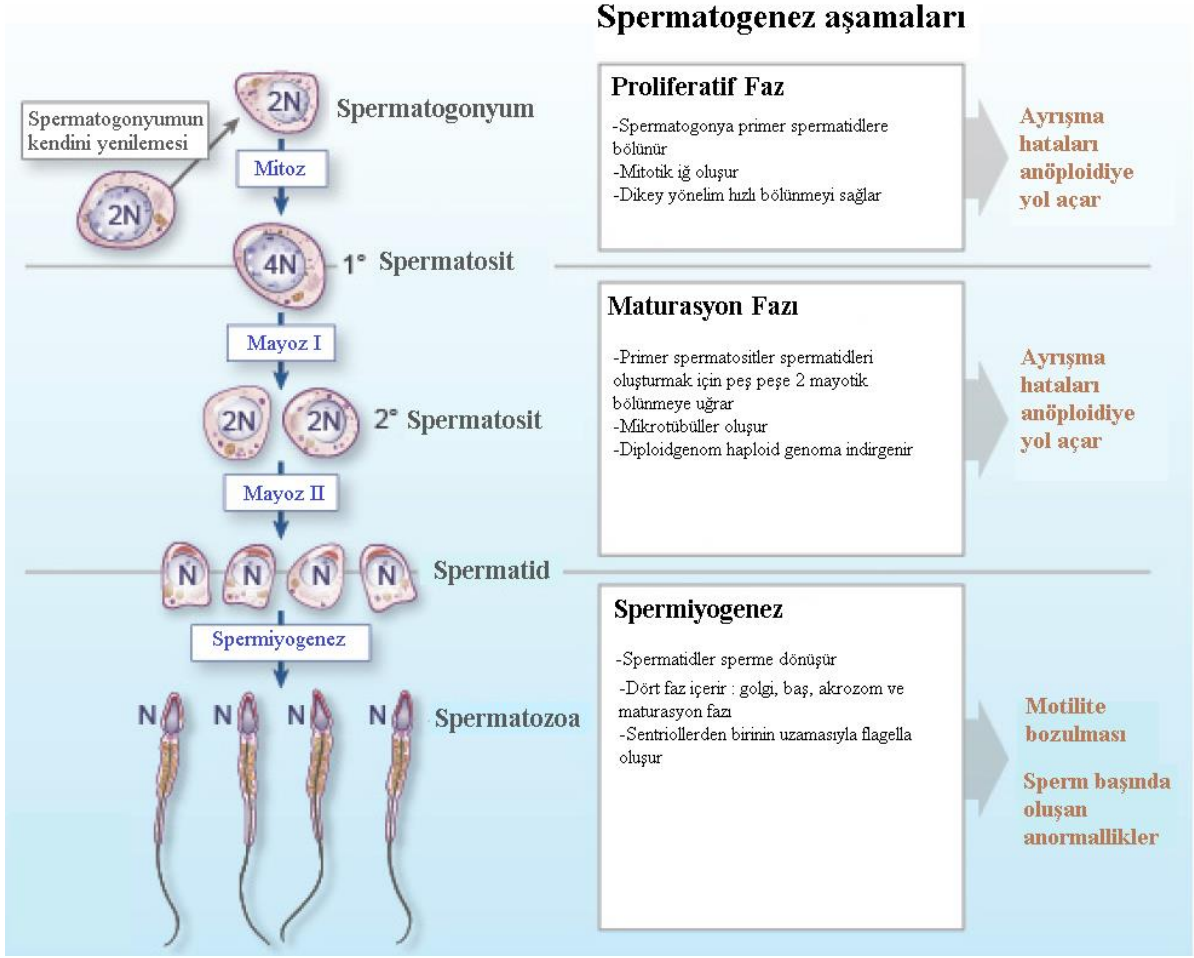
ataklarına karşı savunmasız hücrelerin oluşumuna neden olur (Bennetts and Aitken, 2005). Spermatozoon yaşamı boyunca spermiyogenezdeki başkalaşımından epididimisteki maturasyonu ve depolanmasına kadar herhangi bir zaman diliminde oksidatif saldırıyla karşılaşabilir (Bromfield ve ark., 2017, Chabory ve ark., 2010). Sperm DNA'sına olan oksidatif atak 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8OHdG) gibi oksidatif baz eklentilerinin oluşumuna yol açabilir (Aitken, 2017). Bu tarz hasarlara cevaben spermatozoa baz kesip-çıkarma onarım yolağındaki ilk enzime başvurur [8-okzoguanin DNA glikosilaz(OGG-1)] (Smith ve ark., 2013). Bu glikosilaz, okside bir baza β -eliminasyonu ya da ribozun halka açma reaksiyonu ve zincir kırığına yol açan riboz-fosfat destabilizasyonu yapan abazik bölgeyi oluşturmak için yapışır ve DNA dubleksi dışında bırakır (Aitken, 2017). Bu değişimler en sonunda DNA'yı destabilize eder ve yüksek oranda fragmantasyona yol açar.



Şekil 3: Spermde DNA fragmantasyonu oluşum aşamaları (Aitken ve ark., 2013)

2.4. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyum adı verilen farklılaşmamış bir diploid sperm kök hücrelerinin yavaşça spermatozoon adını alan oldukça özellikli haploid hücreye evrilmesini içeren oldukça karmaşık bir olaydır. Spermatogenezin amacı ovumu dölleyebilen ve yavrular üretebilen erkek gamet hücreleri üretmektir. Puberteden kısa bir süre önce, pitüiter gonadotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisiyle başlar ve yaşam boyunca devam eder. Mitotik ve mayotik bölünmelerin olduğu bu süreç 3 evreden oluşur (**Şekil 4**). Spermatogonyanın farklılaşmasını içeren bir seri mitotik bölünmenin gerçekleştiği proliferatif evre, primer spermatositlerin mayotik bölünmeye uğrayarak kromozom sayılarını azaltarak spermatidlere dönüştüğü mayotik evre ve spermatidlerin matür spermatozoaya farklılaştığı spermiyogenez evresi (Chocu ve ark., 2012). İnsanlarda spermatogenezin tamamlanma süresi yaklaşık olarak 74 gün sürmektedir (Heller and Clermont, 1964). Ancak, daha yakın yıllarda yapılan ve normal erkeklerin katıldığı çalışmada ejaküle edilen sperm oluşumunun toplam süresinin 42-76 gün arasında değişebileceğini göstermektedir (Misell ve ark., 2006). Tahmini günlük sperm üretimi miktarı 150 milyon ile 275 milyon arasında değişmektedir (Amann, 2008). Seminifer tübül, pretübular myoid hücreler, leyding hücreleri, sertoli hücreleri gibi birçok testiküler yapı ve hücreler spermatogenez sürecinde önemli rol oynamaktadırlar (Neto ve ark., 2016b) .



Şekil 4: Spermatogenezin fazları (Gunes ve ark., 2018)

Seminifer tübülde germ hücreleri bazal membrandan lümeneye kadar oldukça düzgün bir sırayla dizilirler. Spermatogonya direkt olarak bazal membranına yatar, primer spermatoz, sekonder spermatoz ve spermatoz olarak tübül lümenine doğru gelişim gösterirler (Zini and Agarwal, 2011). Spermatogonyalar heterokromatin içeriğine bağlı olarak 3 alt birime ayrılırlar: A tipi koyu, A tipi açık ve B tipi spermatozonyalar (Goossens and Tournaye, 2013). Yoğun şekilde koyu boyanmış yumurtamsı çekirdek içeren iyi bir granuler kromatine sahip A tipi koyu spermatozonyalar seminifer tübüllerin kök hücreleridirler (Zini and Agarwal, 2011). Bu hücreler mitozla bölünerek A tipi açık spermatozonyaları meydana getirirler. A tipi açık spermatozonyalar ise mitozla B tipi spermatozonyalara dönüşürler. Daha sonra B tipi spermatozonyalar mitozla bölünerek primer spermatoz, sekonder spermatoz ve spermatozları oluştururlar.

Spermatositogenez, bazal kompartmanda primer spermatositin mayoz I ve mayoz II ye uğrayarak haploid spermatidi meydana getirmesini içeren mayotik fazdan oluşur. Primer spermatosit ilk mayotik bölünmeye girer ve sekonder spermatosit formunu alır. Sekonder spermatosit ise ikinci mayotik bölünmeye uğrayarak spermatidi oluşturur (Suresh ve ark., 2015).

2.4.1. Spermiyogenez

Yuvarlak spermatid, üreme özelliklerine sahip, oldukça kompakt ve motil hücrelere başkalaşır ve oositi fertilize eder. Bu dönüşüm, spermiyogenez ve spermiyasyon olarak iki evreye ayrılır. Spermiyogenez, germ hücrelerinin birçok organel ve akrozom ve kamçı gibi aksesuar yapılarının kazanımını ifade etmektedir. İnsanlarda, spermatid maturasyonunda morfolojik özelliklerine göre tanımlanan 6 farklı evre ortaya konmuştur. Bu evreler, S_{a-1} ve S_{a-2} , S_{b-1} ve S_{b-2} , S_{c-1} ve S_{c-2} S_{a-1} evresinde golgi kompleksi ve mitokondri gelişmiş ve farklılaşmıştır. Akrozomal veziküllerin görünümüne ek olarak akrozomal veziküllere zıt hücrenin bir kutbunda kromatoid cismi gelişir ve proksimal sentriol ve aksiyal filament görünür. S_{b-1} ve S_{b-2} evrelerinde akrozom oluşumu tamamlanarak, ara parçalar oluşur ve kuyruk gelişir. Bu süreç S_c fazlarında tamamlanır. Post-mayotik fazda histonlar transisyonel proteinler aracılığıyla yerlerini protaminlere bırakırlar (du Plessis ve ark., 2014).

2.5. Protaminasyon

Sperm kromatin DNA'sının protaminlere bağlanmasıyla oluşan oldukça sıkıştırılmış ve özelleştirilmiş bir yapısı vardır. Protaminler birçok canlı çeşidinin matür sperm nükleusunda en çok bulunan nükleoproteinlerdir. Bu küçük ve temel proteinler ilk kez 1872 yılında Friedrich Miescher tarafından somon sperminde keşfedilmişlerdir (Miescher, 1874, Dahm, 2005). Spermatogenez sırasında, spermatid kromatini temel bir sıkıştırılma süreci geçirir. Testise özgü çekirdek proteinleri, geçiş proteinleri (transition proteins, TP) ve protaminlerin sorumlu olduğu bu sıkıştırılma sürecine protaminasyon evresi denir. Bu süreçte ilk adım haploid yuvarlak spermatidlerde, somatik histon proteinleri ile geçiş proteinlerinin (TP1 ve TP2) yer değiştirmesidir. İkinci adım, uzamış spermatidlerde geçiş proteinlerinin protaminler (P1 ve P2) ile yer değiştirmesidir. Sonuçta

somatik hücrelerden 6 kat daha yoğun ve transkripsiyonel olarak susturulmuş kromatin oluşur (Balhorn ve ark., 2000).

2.5.1. Sperm Nükleoproteinleri

Histonlar

Histonlar, insanlarda temel sperm çekirdek proteinlerinin yaklaşık %20'sini temsil ederler ve 3 gruba ayrılırlar (D'Occhio ve ark., 2007).

Tablo 1: Histonlar ve nükleoproteinler (D'Occhio ve ark., 2007)

| Nükleoproteinler | |
|-------------------------------|--|
| Spermatogonya | H1c,H1a,H2A.2,H2A.X,H2B,TH2B,TH2A,TH3,H3.2,HMG1,HMG2 |
| Spermatosit | H1t,TH2A,TH2B,H2A.1,H2A.2,H2A.Z,H4,HMG2 |
| Yuvarlak Spermatid | H1t,TH2A,TH2B,H2A.1,H2A.2,H2A.Z,H4,HMG1,HMG2 |
| Uzayan ve Sıkışılan Spermatid | TP1,TP2,TP4 ^a |
| Sıkışmış Spermatid | TP3 ^a ,P1,P2 ^b |

| Histon | Somatik tip | Germ hücrelerinde bulunan | Testise spesifik |
|--------|---------------------------------|---------------------------|------------------|
| H1 | H1b,H1c,H1d,H1e,H1 ^a | H1a | H1t |
| H2A | H2A.1,H2A.2,H2A.Z | H2A.X | TH2A |
| H2B | H2B.1 | - | TH2B |
| H3 | H31.1,H3.2,H3.3 | - | TH3 |
| H4 | Tür yok | - | - |

H:histon ; TH: Testis-spesifik histon ; HGM; Yüksek mobilite grup protein TP: geçiş proteini; P:protamine

^a Yaban domuzu, boğa, erkekler, fareler, ve koyun hücrelerinde, ^b insan, aygır ve fare spermelerinde

Somatik histonlar somatik hücrelerde ve testislerin spermatogenik hücrelerinin çoğunda bulunurlar. Germ hücrelerinde, zengin histonlar adını alan diğer bir grubu ise somatik hücrelerde bulunur fakat testislerin sperm hücrelerinde çokça bulunurlar. Üçüncü grup olan testise özel histonlar sadece sperm hücrelerinde ve testiste bulunurlar (Meistrich, 1989).

Histon asetilasyonu ve ubikütinasyonunun, spermiyogenezde nükleozom yapısından nükleoprotamin yapısına, sperm kromatin transformasyonunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Dadoune, 2003). Özellikle histon 4'ün lizinden zengin amino-terminal ucu, DNA'ya karşı olan afinitesini düşürmek için hiperasetilasyona uğrar (McCarrey, 1998).

Geçiş Proteinleri

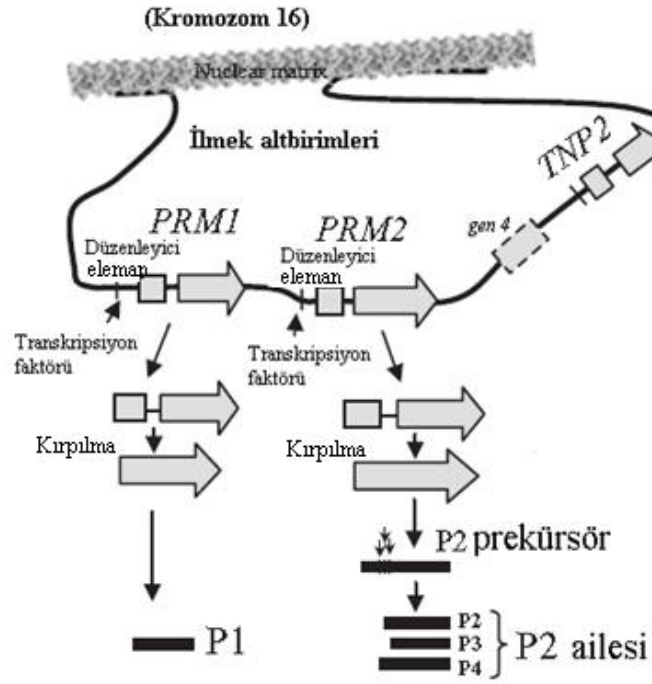
Geçiş proteinleri, histon-protamin transferi sırasında spermatidin en temel proteinleridir (Meistrich, 1989). Erkeklerde en az dört tane geçiş proteini bulunmasına rağmen TP1 ve TP2 en iyi karakterize edilenlerdir (Luerssen ve ark., 1988). TP1, arjinin, lizin, histidin ve serin bakımından zengin olan 54 amino asitlik bir proteindir (D'Occhio ve ark., 2007). TP2 ise TP1'den daha büyüktür (117-138 amino asit) ve serin, prolin ve sisteince zengindir (Dadoune, 2003). Diğer geçiş proteinlerinden TP3 (76-103 amino asit) ve TP4 domuzlarda ve farelerde bulunur (Akama ve ark., 1995). TP1 DNA'nın erime noktası sıcaklığını düşürür ve nükleozom çekirdek partiküllerinde lokal dengesizliğe sebep olur (Akama ve ark., 1998, Singh and Rao, 1988). Buna karşın çinko metalloprotein olan TP2 nükleozom çekirdeklerindeki DNA'yı sıkıştırır ve DNA'nın erime noktası sıcaklığını artırır (Kundu and Rao, 1996). Son bulgulara göre, DNA sıkışmasındaki görevleri haricinde geçiş proteinleri TP1 ve TP2 spermatid nükleusunda normal olarak oluşan DNA kırıklarıyla da ilgili olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (de Saint Groth and Tees, 1975, Kierszenbaum, 2001).

Protaminler

Protaminler, sperm nukleusunun özellikle arjinince (insanda %48 oranında) zengin proteinleri olup (Oliva, 2006), yüksek oranda pozitif yüklü major proteinleridir. Protaminlerin histon H1'den evrimleştiğinin kanıtı Ausio tarafından bulunmuştur (Ausio,

1999). Memelilerde, P1 ve protamin3 (P3) ile protamin 4'ün (P4) oluşturduğu P2 ailesi olmak üzere iki tip protamin bulunmaktadır. Bu güne kadar yapılan çalışmalarda P1 bütün omurgalılarda bulunurken, P2 fareler ve insanları da içeren belirli omurgalılarda bulunmuştur (Oliva, 2006, Balhorn, 2007) . P1 ve P2 genleri (*PRM1* ve *PRM2*) 16p13.3 bölgesinde lokalize olmuştur (**Şekil 5**). İnsan haploid genomda *PRM1* ve *PRM2*'nin tek kopya olarak bulunur (Domenjoud ve ark., 1991) ve her iki gen de tek intron içerir. Bunlara ek olarak TP2 ve *gene4*'de aynı lokusta bulunmaktadır (Schluter ve ark., 1992). P1-P2-TP2 lokusu 28,5 kb uzunluğundadır (Aoki and Carrell, 2003). P1 bir matür protein iken, P2 ailesi öncül proteindir (Francis ve ark., 2014). P3 proteini aynı zamanda *gene4* olarak adlandırılır (Oliva, 2006) ve P3 ifadesi yanlıtıcıdır. P3 asidiktir ve introndan yoksundur. Arjinin kümelenmeleri olmadığı ve bunun yerine glutamik asitçe zengin olduğu için P3'ün tahmin edilen amino asit dizisinin protaminlerle ilgisi yoktur (Oliva, 2006).

P1, arjinin ve sisteince zengin 50 amino asit uzunluğunda ve 3 farklı yapısal domain içeren bir proteindir (Balhorn, 2007). P1'in arjinince zengin bölgesinin merkezi, DNA'ya ve sisteince zengin bölgesinin de çinkoya bağlanmasına imkan sağladığı öngörülmektedir (Dadoune, 2003). Daha değişken görünen C-terminal bölgesi hidrofobik amino asitleri içerir (Dadoune, 2003).



Protamin 1 (P1) ARYRCCRSQSRSRYYRQRQRSRRRRRRRSCQTRRRAMRCCRPRYRFRCRRH

Protamin 2 ailesi

P2 RTHGQSHYRRRHCSRRRLHRIHRRQHRSCRRRKRRSCRHRRRHRRGCRTRKRTCRRH

P3 GQSHYRRRHCSRRRLHRIHRRQHRSCRRRKRRSCRHRRRHRRGCRTRKRTCRRH

P4 ERTHGQSHYRRRHCSRRRLHRIHRRQHRSCRRRKRRSCRHRRRHRRGCRTRKRTCRRH

Şekil 5: Kromozom 16 üzerinde protaminlerin lokasyonları (Oliva, 2006)

P2 histidin bakımından zengindir ve türlere bağlı olarak 54-63 civarında amino asit içerir (D'Occhio ve ark., 2007). Üç-dört arjininden oluşan amino asitler çoğunlukla merkezine kümelenmiştir, histidin ve sistein ise molekül boyunca düzensiz aralıklarla konumlanmıştır (Dadoue, 2003).

Protamin genlerinin yapısı, transkripsiyonel düzenlemelerinde önemli rol oynar. İlk olarak, P1 ve P2 genleri yuvarlak spermatid nükleusunda metillenmiş bölgede yerleşiktirler ve bu lokalizasyon nükleer matriks bağlantısını ve P1-P2-TP2 gen lokusunda potansiyel artışını kolaylaştırır (Choi ve ark., 1997). P1-P2-TP2 çok genli lokus metilasyon

yerini oluşturan alanin (Alu) tekrarlarını içeren matriks bağlantı bölgesiyle kuşatılmıştır (Schmid ve ark., 2001). İkincisi, bütün protamin genleri transkripsiyon faktörlerinin promotörlerine bağlanmasını kolaylaştıran TATA kutuları içerirler. Bu sebeple transkripsiyonun başlamasında önemli rol üstlenirler. Üçüncü olarak, cAMP cevap elementi (cAMP-response element, CRE) bütün protamin genlerinde bulunur ve dizisi oldukça korunmuştur ve -57'den -48'e kadar olan bölgede yer alır (Johnson ve ark., 1988). CRE, çeşitli CRE proteinlerinin bu düzenleyici bölgeye bağlanmasıyla transkripsiyonu düzenler (Delmas ve ark., 1992, de Groot ve ark., 1993, Delmas ve ark., 1993). Son olarak, P1 ve P2 promotörleri düzenleyici dizilerinin yukarısı, diğer düzenleyici proteinlere bağlanarak transkripsiyonel aktivasyon ya da baskılamayı yönetir (Aoki and Carrell, 2003).

Protaminlerin başlıca işlevleri (Oliva, 2006):

- (i) Daha sıkı ve hidrodinamik çekirdekli paternal genom nesli oluşturmak. Hidrodinamik çekirdekli spermatozoa daha hızlı hareket eder ve oositi ilk olarak fertilize edebilir. Dolayısıyla faydalı özellikleri gelecek nesillere aktarabilir.
- (ii) Spermatozoa tarafından taşınan paternal genetik bilginin korunması, dış ya da iç ortamda bulunan potansiyel mutajen veya nükleazların, paternal DNA'ya erişmemesini sağlar.
- (iii) Paternal genomun mühürlenmesine dahil olma. Protaminlerin kendileri de sperm genomunun bazı alanlarında fertilizasyon sırasında tekrar etkinleşmesini etkileyen epigenetik izler bırakabilir.

2.5.2. Protaminasyon

Protaminler haploid spermatidin post mayotik evresinde ifade edilirler (Aoki and Carrell, 2003). Spermatogenezdeki gen ifadesinin esas düzenlenmesi üç aşamada meydana gelir: transkripsiyon, translasyon ve post translasyon (Eddy, 2002). Yuvarlak spermatid evresinde proteinlerin yokluğu barizken, P1 ve P2 mRNA yuvarlak spermatidde saptanmıştır (Stewart ve ark., 1999). Bu mRNA'ların translasyonu spermatidin uzama safhasına kadar geciktirilir (Morales ve ark., 1991, Kleene, 1996). Yani uzama safhasından birkaç gün öncesinde sentezlenen mRNA'lar bu safhaya kadar depo edilir.

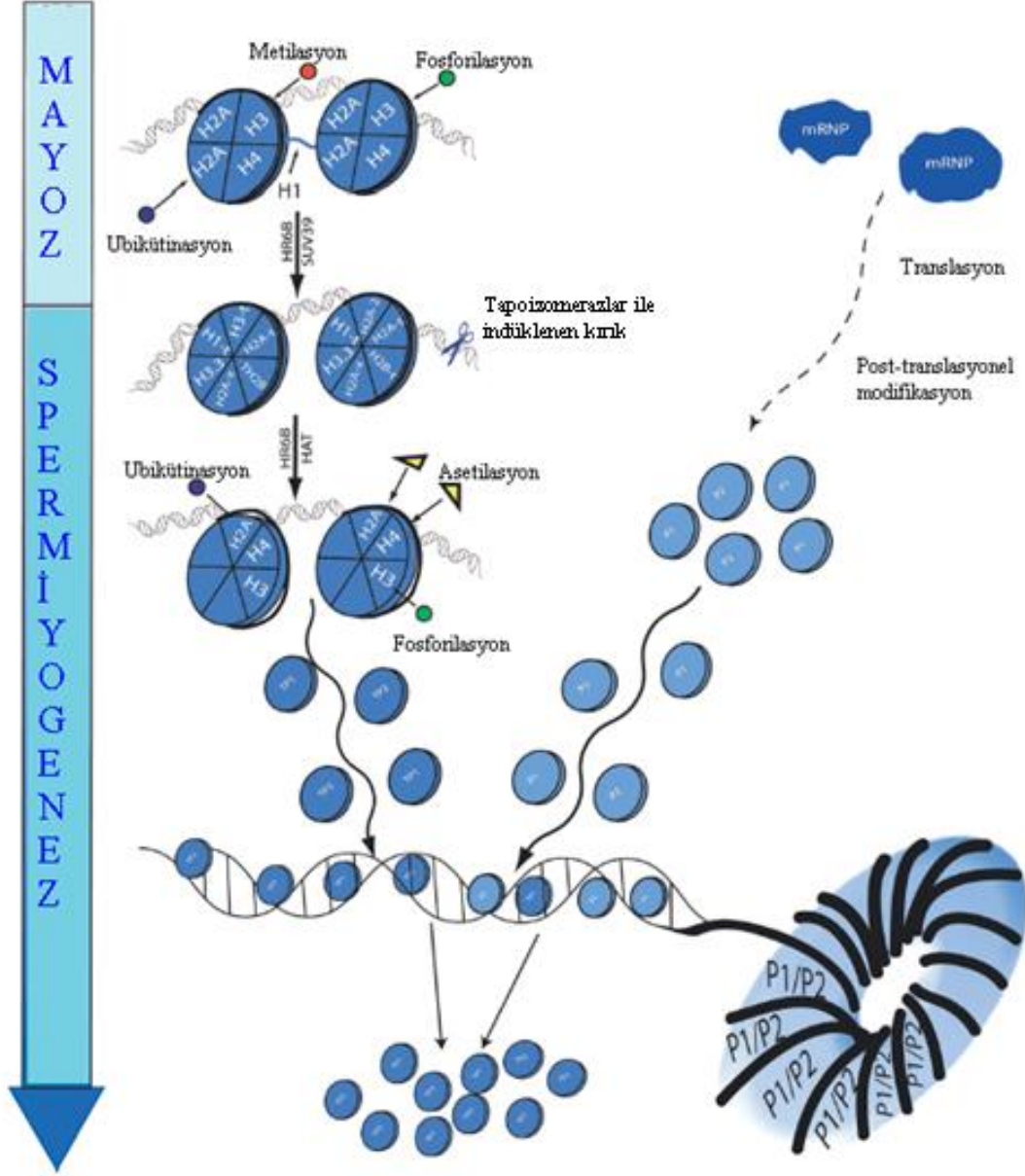
Transkripsiyonel düzenleme üç mekanizma ile düzenlenmektedir. Bunlar, DNA metilasyonu, trans-acting elementlerin TATA kutusuna bağlanması, protamin genlerinin CRE kutusu veya diğer belirli promotor bölgeleri ve çekirdek matriksi ile potansiyalizasyonu (Sassone-Corsi, 2005). Bazı spermatozoal genlerdeki metilasyon artışı transkripsiyonun inhibisyonu ile ilişkilidir. *P1*, *P2* ve *TP2* transkripsiyonda tamamıyla metillenir (Choi ve ark., 1997). Buna karşın 5' bölgede demetilasyon gösteren *TP1* geni artan gen ifadesiyle ilişkilendirilir (D'Occhio ve ark., 2007). TATA kutusu, tüm protamin genlerinde bulunmaktadır (Oliva and Dixon, 1991). TATA'ya bağlanan proteinlerin TATA kutusuna bağlanması *P1/P2* transkripsiyonun aktivasyonu ile sonuçlanır (Schmidt and Schibler, 1997). CRE çekirdek faktörü adenil siklaz yolu üzerinden transkripsiyonel düzenlemeye aracı olur. Bu çekirdek faktörü cAMP yanıt elementine bağlanan proteinleri (cAMP-response element binding, CREB) ve cAMP yanıt elementi modülatör proteinleri (cAMP-response element modulator, CREM) içerir (Steger, 1999). cAMP protein kinaz A yolağını takiben, CREB ve CREM fosforillenir ve CRE'ye bağlanmalarına izin verir. Bu bağlanma da *P1/P2* genleri transkripsiyonunu aktive eder (Aoki and Carrell, 2003).

Son olarak uzama fazında *P1-P2-TP2* lokusunun potansiyalizasyonu çekirdek matriksi ile ilişkisi tarafından sağlanmış olmaktadır (Aoki and Carrell, 2003). *P1-P2-TP2* lokusunun vaktinden önce translasyonu hücre ölümüne ve gelişimsel duraklamaya neden olur (Lee ve ark., 1995). Spermiyogenezde kromatinin seçici olarak belirli bölgelere açık olması başkalaşım sırasında bu genlerin ifadesini gerektirir. *P1-P2-TP2* lokusunda gen potansiyalizasyonu kromatinin çekirdek matriksine bağlanmasından sonra olur (Oliva, 2006).

2.5.3. Histonların Protaminlerle yer değişimi

Öncelikle testis histonları DNA bünyesine dahil edilirler; histon H2B varyantı çekirdek histonların yerdeğişiminden sorumludurlar (Montellier ve ark., 2013). Histonların hiperasetilasyonu onların DNA'ya bağlanma afinitelerini azaltır. Bu hiperasetilasyon da topoisomerez aktivasyonu yoluyla DNA'nın gevşemesine katkıda bulunur (Carrell ve ark., 2007) ve histonların TP1 ve TP2 ile yer değiştirmesine olanak sağlar (Francis ve ark., 2014). Sonrasında TP'ler fosforillenmiş protaminlerle yer değiştirir ve nükleusta

kromatinin toroidal yapısını oluşturur. DNA paketlenmesinin daha sıkı oluşu ve kromatin yoğunluğunun somatik hücrelere oranla 6 kat daha fazla olmasıyla sonuçlanır (Balhorn ve ark., 2000) (Şekil 6).



Şekil 6: Somatik histonlar ile protaminlerin yer değişimi (Carrell ve ark., 2007)

2.5.4. Protaminler ve Erkek infertilitesi

İnsanlarda P1/P2 oranı 1:1'dir ve 0,8 ile 1,2 arasındaki değerler dışında görülen oranlar anormal ifadeyi gösterir (Aoki ve ark., 2006a). P1/P2 oranındaki sapma erkek infertilitesiyle ilişkilendirilir (Carrell and Liu, 2001, Balhorn ve ark., 1988). İnfertil bireylerde fertillerle kıyaslandığında P2 eksikliği veya yoksunluğundan oluşan P1/P2 oranında artış gözlenir (Carrell and Liu, 2001, de Yebra ve ark., 1998). Yükselmiş P1/P2 oranı genellikle P2'deki düşüşün sonucudur fakat bazı çalışmalarda P1'deki yeniden düzenlenmeleri bazı anormalliklere neden olduğu gösterilmiştir (Torres-Moreno ve ark., 1992). P1:P2 oranındaki değişim sperm morfolojisi, sperm sayısında azalma ve motiliteyle bağlantılıdır (Aoki ve ark., 2006c). Ayrıca 0,8'den daha az olan P1:P2 değerinin DNA fragmentasyonunda artışla ve sperm kalitesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Aoki ve ark., 2005b).

Sperm morfolojisi, spermiyogenez boyunca devam eden sürecin son ürünüdür, bu nedenle bu süreçteki değişim morfolojik anormalliklere yol açabilir (Auger, 2010). Protamin eksikliği, anormal başlı spermelerde normallere göre daha sık rastlanmaktadır (Bianchi ve ark., 1996b). Fakat çeşitli çalışmalarda, normal başlı spermelerde de protamin eksikliği gözlemlenmiştir (Bianchi ve ark., 1996a).

Azalan P2 değerinden farklı olarak, P1:P2 oranındaki değişim spermiyogenez sırasındaki histon yerdeğişimindeki bir bozukluktan da kaynaklı olabilir ve fertil kontrollere oranla histon seviyesinin infertil erkeklerde daha fazla olduğu gösterilmiştir (Montellier ve ark., 2013). Fertil bireylerde çekirdekte histon oranı yaklaşık %20'dir (Dadoune, 2003).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma grubu

Bu çalışmaya, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'na başvuran, klinik olarak infertilite tanısı alan toplam 32 erkek çalışma grubu ve 10 sağlıklı fertil erkek de kontrol grubu olarak dahil edildi. Tez çalışmasının etik açıdan uygunluğu, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulun'unun 08.12.2016 tarihli Etik Komisyonunda incelenmiş ve oy birliğiyle onaylanmıştır (OMU KAEK: 2016/372). Hasta ve kontrol grubundaki bireyler çalışma konusunda bilgilendirildikten sonra kendilerine 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' imzalatıldı.

Gönüllülerden 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası masturbasyon yoluyla semen örnekleri alınarak Üroloji Polikliniğinin Androloji Laboratuvarında WHO kriterlerine (2010) uygun olarak semen analizleri yapıldı (Cooper ve ark., 2010). Semen analizinde sperm konsantrasyonunun 15 milyon/ml, sperm motilitesinin %32 ve sperm morfolojisinin %4'den daha az olması kriterlerine uygun olarak oligo, terato ve astenozoospermi özellikleri gösteren bireyler hasta grubuna dahil edildi. Azoospermik hastalar çalışmada yer almadı.

Çalışmamızda, histon/protamin oranlarını belirlemek amacıyla anilin mavisiyle boyama, sperm DNA fragmentasyonunu belirlemek için TUNEL yöntemi ve DNA hasarını belirlemek için ELISA Kiti kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen bireylerden 32 infertil erkek ve 10 fertil erkekten alınan sperm örnekleri histon-protamin oranlarını belirlemek amacıyla anilin mavisi ile boyandı, 16 infertil ve 9 fertil kontrolün DNA fragmentasyonunun belirlenmesi için TUNEL testi uygulandı, son olarak 26 infertil erkek ve 10 fertil kontrole DNA hasarını belirlemek amacıyla ELISA testi uygulandı. Tezin akış şeması **Şekil 7**'de gösterilmektedir.

Semen analizi sonrasında örnekler alındı ve örneklerin bir bölümü bekletilmeden anilin mavisi ile boyandı. Yarım saat içerisinde geriye kalan bölümü TUNEL testi uygulanıncaya kadar fikse edildi ve +4°C'de bekletildi. ELISA testi için ise seminal plazma bekletilmeden -80°C'ye kaldırıldı ve yöntem uygulanıncaya kadar bekletildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Kimyasal Maddeler

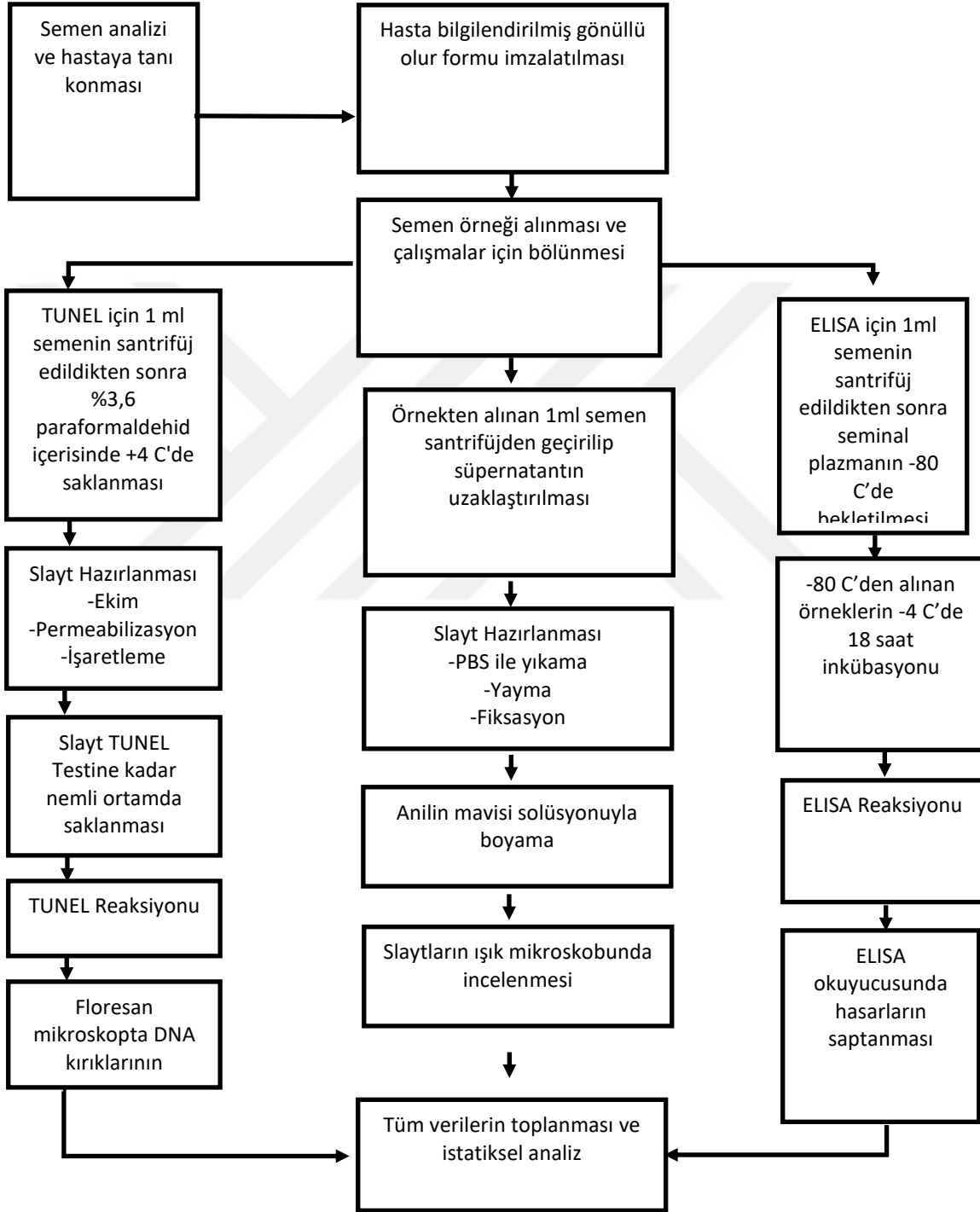
- Triton-X-100 (Amresco)
- Fosfat-tuz tamponu (phosphate buffered saline, PBS) (10X), (Gibco Bylife Technologies)
- Tri-sodyum Sitrat (Surechem Products, Amerika)
- Pol-lizin solüsyonu (Sigma-Aldrich, Amerika)
- Hidrojen per oksit (%30) (MERCK, Almanya)
- Asetik asit (%99) (Sigma-Aldrich, Amerika)
- Glutaraldehit (%25) (Merck, Almanya)
- Anilin mavi boyası (toz) (Merck, Almanya)
- PB-Sükroz, Fosfat şeker tamponu
- Yapıştırıcı (CC/Mount) (Sigma, Amerika)
- Etil alkol (Sigma-Aldrich, Amerika)
- TUNEL kiti (Roche, Almanya)
- ELİSA kiti (Cayman, Amerika)

Cihazlar

- Hassas terazi
- Otomatik pipetler
- Çoklu pipetör
- Vortex (Velp Scientific, Amerika)
- Etüv (Dedeoğlu, Türkiye)
- İnkübasyon cihazı (Innogenetics, Amerika)
- Mikrosantrifüj
- Florasan mikroskobu (Nikon Eclipse E600, Japonya)
- Işık mikroskobu (Olympus Cx31, Hamburg)
- +4 buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- -20°C buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- -80°C Derin dondurucu (Revco, Amerika)

- ELISA okuyucu (Thermo Scientific, Finlandiya)

3.2. Metot



Şekil 7: Tezde kullanılan yöntemlerin akış şeması

3.2.1. Anilin Mavisini ile Boyama

Sperm hücrelerinin kromatin yoğunlukları, anilin mavisini ile boyama yapılan önceki çalışmaların protokolünü optimizasyonu yapılarak test uygulandı (Irez ve ark., 2015).

Ön hazırlık:

- 1) 1ml semen örneği 1,5 ml'lik santrifüj tüpü içine alınarak 2000 rpm'de oda sıcaklığında 7 dakika santrifüj edildi.
- 2) Süpernatant pipetör ile tüpten uzaklaştırıldı ve pellete 1 ml 1X fosfat-tuz tamponu (Phosphate Buffered Saline, PBS) PBS ekleyip hafifçe pipetaj yaparak resuspanse edildi.
- 3) Örnek tekrar 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.
- 4) Bu işlem iki kez tekrar edilerek örneğin yıkanması işlemi gerçekleştirildi.

Boyanın hazırlanması:

- 1) Toz anilin mavisini asetik asit içinde çözündürerek %5'lik sıvı anilin mavisini elde edildi.
- 2) Bu sıvı anilin mavisini 50 ml'lik şalelerde %4'lük asetik asitle karıştırıldı ve boyama solüsyonu hazır hale getirildi.

Boyama işlemi:

- 1) İki kez PBS ile yıkanan örnekten 10 µl alınarak slaydın tam ortasına damlatıldı.
- 2) Başka bir slayt kullanılarak 45°'lik açı ile yayma işlemi gerçekleştirildi.
- 3) Slayt kurumaya bırakıldı.
- 4) Tamamen kurutulmuş slayt, 0,2 M PBS ile yapılan %3'lük glutaraldehit ile fikse edildi ve 30 dakika bekletildi.
- 5) Slayt hazırlanan boya şalesi içine daldırıldı ve 15 dakika beklendi.

Testin analizi:

Işık mikroskopunda, 100X büyütme kullanılarak 200 tane sperm hücresi seçildi. Seçilen hücreler boyanmamışsa anilin negatif yani protamine zengin olarak kabul edildi. Eğer hücreler az boyanmış ya da tamamen boyanmışsa anilin pozitif yani histonca zengin olarak kabul edildi.

3.2.2. TUNEL Testi

SDF analizi yapmak amacıyla Insitu Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostic, Almanya) kullanılarak kit protokülüne uygun olarak yapıldı (Sharma and Agarwal, 2011).

Ön Hazırlık:

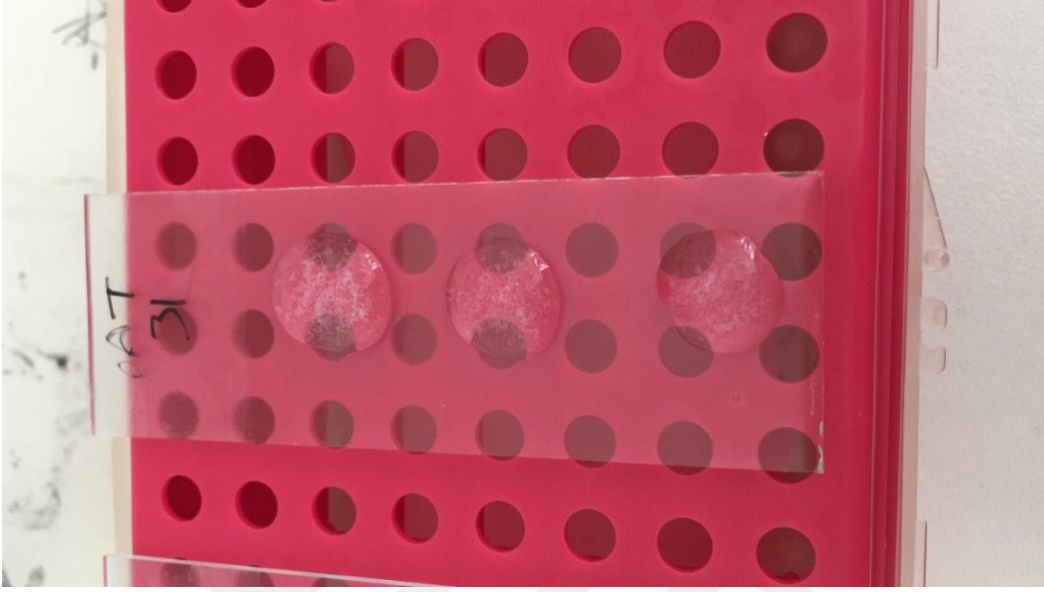
- 1) 1 ml taze semen örneği dibi konik şekildeki 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.
- 2) Süpernatant pipetör yardımı ile dikkatlice uzaklaştırıldı ve pelet 1 ml PBS ile pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- 3) Örnek 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi ve tekrar pipetör yardımıyla süpernatant uzaklaştırıldı.
- 4) Hücrelerin fiksasyon işlemi için pelet 1 ml %3,6'lık paraformaldehit (PFA) ile hafifçe pipetaj yapılarak yeniden suspanse edildi.
- 5) Örnek bir sonraki aşamada kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.
- 6) Ekim işlemine kadar örnek her gün ters düz edilerek çalkalandı.

Lamların Poli L-Lizin ile Kaplanması:

- 1) Temiz lamlar 1:9 distile su: poli L-lizin içerisinde 5 dakika bekletildi.
- 2) Lamlar süzöldükten sonra 60°C'de 1 saat etüvde bekletilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Örneklerin Ekim İşlemi:

- 1) Ekim yapılacak bölgeleri belirlemek için lamların üzerine hidrofobik kalemle 3 tane halka çizildi (**Şekil 8**).
- 2) Daha önceden PFA ile fiksasyonu yapılan örnek +4°C'den alınarak 2000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi.
- 3) Süpernatant pipetör ile uzaklaştırılarak pelet 1-5 milyon sperm bulunacak şekilde 1X PBS ile resuspanse edildi.
- 4) Hidrofobik kalemle çizilen halkaya 10 µl PB-sükroz damlatıldıktan sonra üzerine 300 µl örnek yüklendi.
- 5) Slaytlar +4°C'de bir gece saklandı.
- 6) Ertesi gün lamlar PBS ile ikişer kere yıkanarak ekim aşaması tamamlandı.



Şekil 8: Hasta grubuna ait bir örneğim slayta ekimi

Pozitif Kontrolün Hazırlanması:

- 1) Ekimi yapılan normozospermik örnek pozitif kontrol olarak kullanıldı.
- 2) Hasarı oluşturmak için %30'luk H_2O_2 çözeltisi yuvarlak alanlara damlatıldı.
- 3) Slayt etüvde 1 saat bekletildi ve sonrasında PBS ile iki kez yıkandı.

Permeabilizasyon:

- 1) %0,1 sodyum sitrat, %0,1 Triton X-100 çözeltisi ile karıştırılarak taze hazırlandı.
- 2) Karışım her bir halka içine eşit oranda damlatıldı.
- 3) Slayt $+4^{\circ}C$ 'de 15 dakika nemli ortamda inkübe edildi ve 1X PBS ile iki kez yıkandı.

TUNEL Reaksiyonu:

- 1) TUNEL reaksiyonu karanlık ortamda yapıldı.
- 2) Işık mikroskopunda TUNEL reaksiyonu için uygun halka işaretlendi.
- 3) 1:9 Enzim: Label olacak şekilde TUNEL karışımı hazırlandı.
- 4) TUNEL reaksiyon karışımı kısa bir süre vortex işleminden geçirildi.
- 5) İşaretli halkaya 50 μ l TUNEL reaksiyon karışımı damlatıldı.
- 6) Slayt karanlık ve nemli ortamda 1,5 saat oda sıcaklığında reaksiyona bırakıldı.

Reaksiyonun Görüntülenmesi:

- 1) 1,5 saat sonrasında reaksiyonun gerçekleştiği halka pipetör yardımıyla 1X PBS ile birkaç defa yıkandı.
- 2) Slayt tamamen kuruduktan sonra su bazlı yapıştırıcıdan (CC Mount, Amerika) birkaç damla halkaya damlatıldı ve lamel ile dikkatlice kapatıldı.
- 3) Slaytlar floresan mikroskop altında 180X büyütme kullanılarak incelendi.
- 4) Her slayttan en az 500 hücreyi kapsayacak 3 alan seçildi.
- 5) Seçilen alanların her hangi bir ışımaya olmadan yalın haldeki görüntüleri çekildikten sonra uygun filtreye FITC sinyallerinin algılandığı ışımaya yapan görüntüleri çekildi.

Görüntülerin Analizi:

- 1) Işımalı ve ışımsız görüntüler BS Pro 2000 programı kullanılarak üst üste çakıştırıldı.
- 2) Görüntüler manuel olarak iki farklı kör gözlemci tarafından sayıldı.
- 3) Sayılan hücrelerin SDF hesabı şu şekilde yapıldı:
$$\%SDF = (\text{FITC ışımaya yapan yeşil renkteki sperm hücreleri} / \text{tüm sperm hücreleri}) \times 100$$

3.2.3. ELISA Testi

ELISA testi, Oksidatif DNA/RNA Hasarı Değerlendirme Kiti (Cayman Chemical, ABD) kullanılarak sperm DNA hasarını tespit etmek için kit protokolüne uygun olarak yapıldı (Hosen ve ark., 2015).

Ön Hazırlık:

- 1) Taze alınan örnekler 2500 rpm'de 8 dakika santrifüj edilerek 1000 µl'lik pipetörle seminal plazma dikkatlice alındı.
- 2) Alınan seminal plazma örnekleri bir sonraki aşamada kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

Standartların Hazırlanması:

- 1) Tüpler 1'den 8'e kadar numaralandırıldı.

- 2) Bir numaralı tüpe 900 µl ELISA tamponu diğer tüplere ise 500 µl ELISA tamponu eklendi.
- 3) Bir numaralı tüpe 100 µl bulk standart transfer edildi.
- 4) Bir numaralı tüpten seri bir şekilde 400 µl karışım alınarak 2 numaralı aktarıldı hafifçe çalkalandı.
- 5) İki numaralı tüpten 400 µl karışım alınarak 3 numaralı tüpe aktarıldı ve hafifçe çalkalandı.
- 6) Aktarma işlemi 8 numaralı tüpe kadar aynı şekilde devam ettirildi.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------------|----------------|----|----|----|-----|-------------------|------|----|-----|----|-----|-----|
| A | Blk | S1 | S1 | K2 | K2½ | K10 | K10½ | 15 | 15½ | 24 | 24½ | 32 |
| B | Blk | S2 | S2 | K3 | K3½ | 2 | 2½ | 16 | 16½ | 25 | 25½ | 32½ |
| C | NSB | S3 | S3 | K4 | K4½ | 7 | 7½ | 17 | 17½ | 26 | 26½ | 33 |
| D | NSB | S4 | S4 | K5 | K5½ | 8 | 8½ | 18 | 18½ | 27 | 27½ | 33½ |
| E | B ₀ | S5 | S5 | K6 | K6½ | 10 | 10½ | 19 | 19½ | 28 | 28½ | 1 |
| F | B ₀ | S6 | S6 | K7 | K7½ | 12 | 12½ | 20 | 20½ | 29 | 29½ | 1½ |
| G | TA | S7 | S7 | K8 | K8½ | 13 | 13½ | 22 | 22½ | 30 | 30½ | K1 |
| H | K2 | S8 | S8 | K9 | K9½ | 14 | 14½ | 23 | 23½ | 31 | 31½ | K1½ |
| S1 – S8: Standartlar | | | | | | Blk: Blank | | | | | | |
| K1-K10: Kontrol grubu | | | | | | 1-33: Hasta grubu | | | | | | |

Şekil 9: Örneklerin plaka üzerine yerleşim tablosu

Örneklerin Yerleştirilmesi:

- 1) Her bir örnek bir kez seyreltildi.
- 2) Standartlar ve diğer reaktifler protokole uygun olarak belirlenen kuyulara eklendi.
- 3) 50 µl örnekler ve seyreltikleri ait oldukları kuyulara eklendi (Şekil 9).

4) Plaka plastik film ile tamamen kaplandı ve 4°C’de 18 saat inkübasyon edildi.

ELISA Reaksiyonu:

- 1) Reaksiyona başlamadan hemen önce Ellman’s reaktifi karanlık ortamda hazırlandı.
- 2) Kuyular boşaltıldı ve tampon ile 5 kez yıkandı.
- 3) Çoklu pipetör ile her kuyucuğa Ellman’s reaktifi hızlı bir şekilde eklendi.
- 4) Plaka tekrar plastik film ile kaplandı.
- 5) Plaka orbital çalkalayıcıda oda ısısında 2 saat bekletildi.

Değerlerin Okunması:

- 1) Plakanın dibi parmak izleri yok olacak şekilde tamamen temizlendi.
- 2) Plastik film yavaşça açıldı ve plaka ELISA okuyucusuna (Thermo Scientific MultiscanGo, USA) yerleştirildi.
- 3) Okuma 405 ve 420 nm arasında gerçekleştirildi.

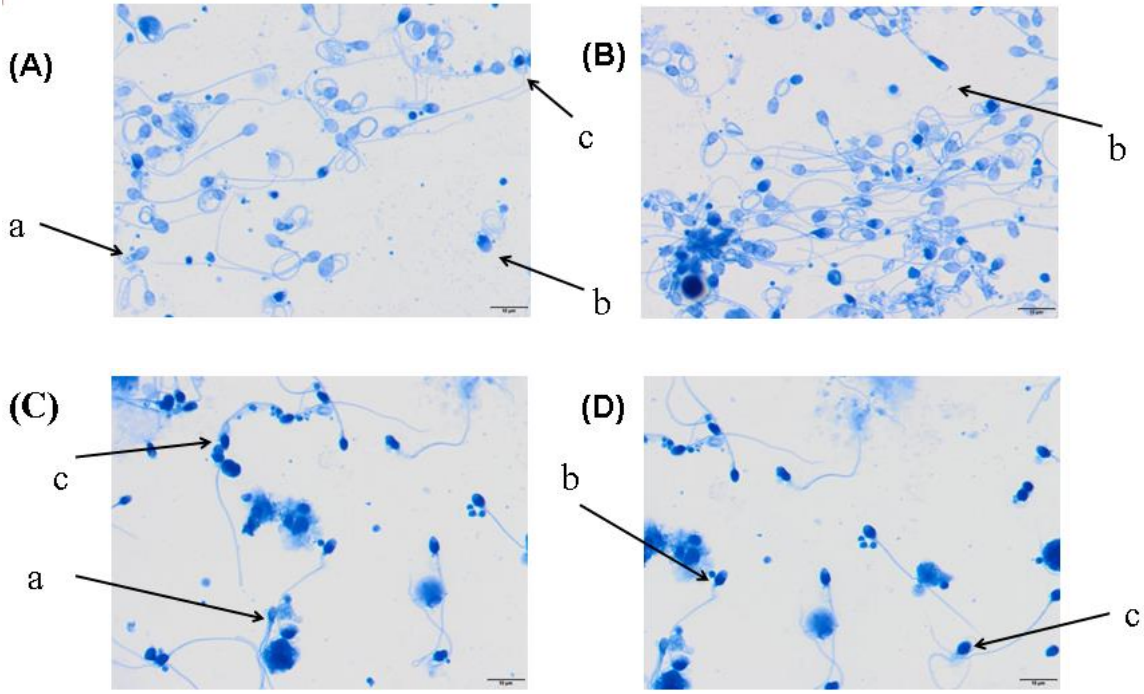
3.2.4.İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmadan elde edilen verilerin analizi istatistiksel paket programı SPSS V20 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı test edildikten sonra parametreler arasındaki ilişki X^2 veya Fisher exact test kullanılarak değerlendirildi. Farklı grupların parametrelerini karşılaştırmak için ANOVA, Mann-Whitney U testi ve kullanıldı. Sonuçlar istatistiksel yöntemlerle değerlendirilerek hipoteze uygunluk bakımından test edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmaya, 2017-2018 yılları arasında yaşları 26 ile 48 arasında değişen toplam 42 erkek dahil edildi. Oligozoteratozosperti tanısı alan 32 infertil erkek hasta grubunu oluşturdu. Çalışmaya dahil edilen erkeklerden 10'u iki yaşından küçük çocuğa sahip fertil erkeklerdi ve kontrol grubunu oluşturdu. Çalışmaya dahil edilen bütün bireylerin semen örnekleri anilin mavisi ile boyanarak histon-protamin oranları ölçüldü (**Şekil 10**). Çalışmadaki bazı semen örneklerinin ön hazırlık sırasında kontamine olması ve bazı hastalarda yeterli sperm bulunamaması nedeniyle 16 infertil erkek ve 9 kontrol olmak üzere 25 semen örneğinde TUNEL yöntemi kullanılarak ve SDF değerleri ölçüldü. DNA hasarı, 26 infertil erkek ve 10 fertil erkekte toplam 36 erkekte ELİSA testi ile ölçüldü.

Protamin seviyelerinin artışı T- testine göre karşılaştırıldığında infertil ve fertil grup arasında anlamlı bir ilişki göstermiştir ($p < 0,0001$) (**Tablo 2**). Anilin mavisi ile boyama analizi sonucunda 32 infertil erkekte 31'i anilin pozitif, biri anilin negatif olarak değerlendirildi. Fertil grupta ise 10 erkekte 9'u anilin negatif, biri anilin pozitif olarak değerlendirildi. İnfertil erkeklerde histon yüzde ortalaması %57,5 bulundu, fertil bireylerde ise bu değer %13,2 bulundu. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda histon yüzdesi ile DNA hasarı arasında bir ilişki bulunamadı [$p = 0,3052$, $p = 0,2278$ (seyreltilmiş)]. Histon yüzdesi ile DNA fragmentasyonu arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p = 0,796$). Histon yüzdesinin artışı ile bireylerin yaşları arasında ters bir ilişki bulundu (korelasyon katsayısı = $-0,393$, $p = 0,01$). Histon yüzdesinin artışı ve motilite değerlendirildiğinde ise aralarında ters bir ilişki bulundu (korelasyon katsayısı = $-0,510$, $p = 0,0006$). Ayrıca, histon yüzdesinin artışı ile bireylerin semen konsantrasyonları arasında yüksek düzeyde ters bir ilişki bulundu (korelasyon katsayısı = $-0,733$, $p < 0,0001$). Bunlara ek olarak, sperm morfolojisiyle histon yüzdesi arasında çok yüksek düzeyde bir ilişki bulundu ($p < 0,0001$). Fertil bireyler ile infertil bireyler arasında da sperm morfolojisi açısından çok yüksek düzeyde anlamlı fark saptandı ($p < 0,0001$).



Şekil 10: Kontrol grubuna ait bir örneğin ışık mikroskobu altındaki farklı alanlardan alınan görüntüleri (A)(B). Hasta grubuna ait bir örneğin ışık mikroskobu altındaki farklı alanlardan alınmış görüntüleri (C)(D).
a: Boyanmamış sperm; b: Yarı boyanmış sperm; c: Boyanmış sperm

TUNEL testi sonucunda SDF ölçümü yapılan infertil ve fertil bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p= 0,829$). Gruplar değerlendirildiğinde SDF değeri %0 ile %82 arasında değişkenlik göstermiş olup ortalaması %25,4'tür. SDF değerlerinin yaş, motilite, konsantrasyon, sigara durumu, DNA hasarı ve histon yüzdesiyle ilişkisine bakıldı ve bu parametrelerle bir ilişki saptanmadı. Seyreltilmiş örneklerin DNA hasarına bakıldığında ise istatistiksel olarak anlamlılığa yakın bir değer bulundu ($p=0,052$). Hasta ve kontrol grubuna ait TUNEL fotoğrafları **Şekil 11-14** yer almaktadır.

Tablo 2: TUNEL testinin semen parametreleri, DNA hasarı ve histon oranı arasındaki istatistiksel ilişki

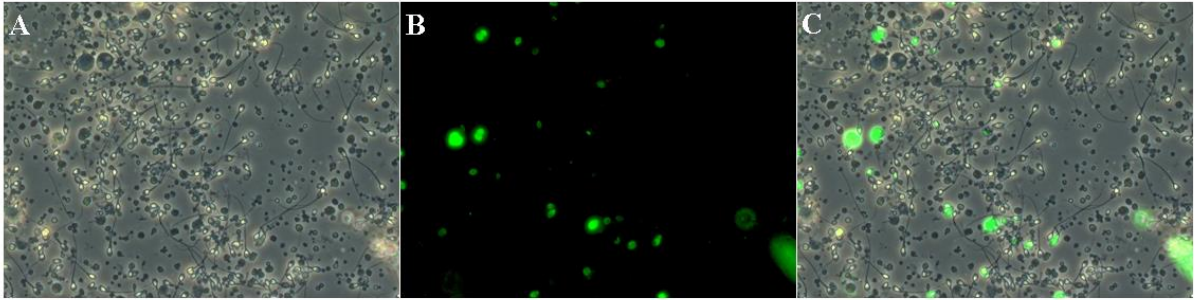
| p değeri | Yaş | Histon (%) | Motilite | Sigara Durumu | Konsantrasyon | DNA Hasarı | DNA Hasarı (Seyreltik) |
|-----------|-------|------------|----------|---------------|---------------|------------|------------------------|
| TUNEL (%) | 0.920 | 0.796 | 0.117 | 0.926 | 0.870 | 0.857 | 0.052 |

Tablo 3: Histon yüzdesi, SDF, DNA hasarı ve semen parametrelerinin iki grup arasındaki istatistiksel ilişkileri

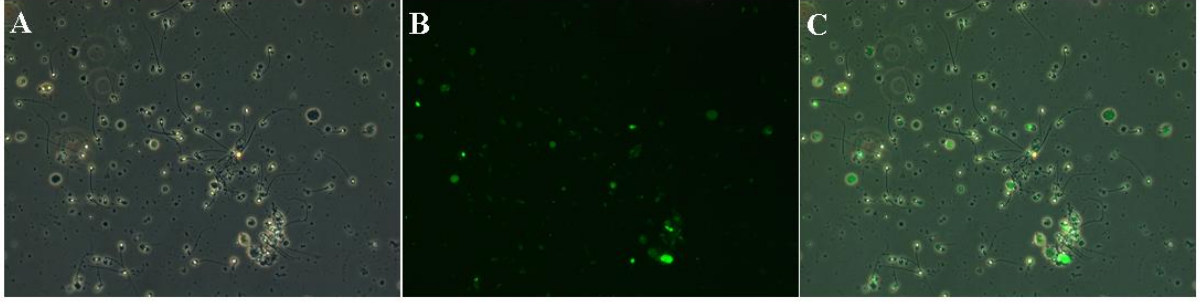
| Parametre | İnfertil Erkekler | Fertil Erkekler | P değeri |
|------------------|-------------------|-----------------|----------|
| Motilite (%) | | | < 0.0001 |
| Ortalama | 26.2 ± 15.7 | 54.8 ± 5.9 | |
| Aralık | 3 - 59 | 45 - 63 | |
| Morfoloji | | | 0.491 |
| Ortalama | 2.75±1.68 | 6.90±1.96 | |
| Aralık | 0- 6 | 6 -12 | |
| Yaş | | | 0.2285 |
| Ortalama | 32.3 ± 5.6 | 34.8 ± 4.4 | |
| Aralık | 26 - 48 | 29 - 42 | |
| Sigara Durumu | | | 0.7059 |
| Ortalama | 0.4 ± 0.5 | 0.3 ± 0.5 | |
| Aralık | | | |
| Histon Oranı (%) | | | <0.0001 |
| Ortalama | 57.5 ± 18.5 | 13.2 ± 5.2 | |
| Aralık | 18 - 90 | 6 - 24 | |

Tablo3 (devam):

| | | | |
|-------------------------------|---------------|---------------|--------|
| DNA Hasarı | | | |
| Ortalama | 0.2 ± 0.0 | 0.2 ± 0.28 | 0.1199 |
| Aralık | 0.174 - 0.219 | 0.187 - 0.839 | |
| DNA Hasarı (Seyreltik) | | | |
| Ortalama | 0.2 ± 0.0 | 0.2 ± 0.2 | 0.1355 |
| Aralık | 0.19 - 0.215 | 0.15 - 1.10 | |
| TUNEL (%) | | | |
| Ortalama | 24.8 ± 20.2 | 26.7 ± 21.3 | 0.8292 |
| Aralık | 0 - 82 | 0 - 65 | |



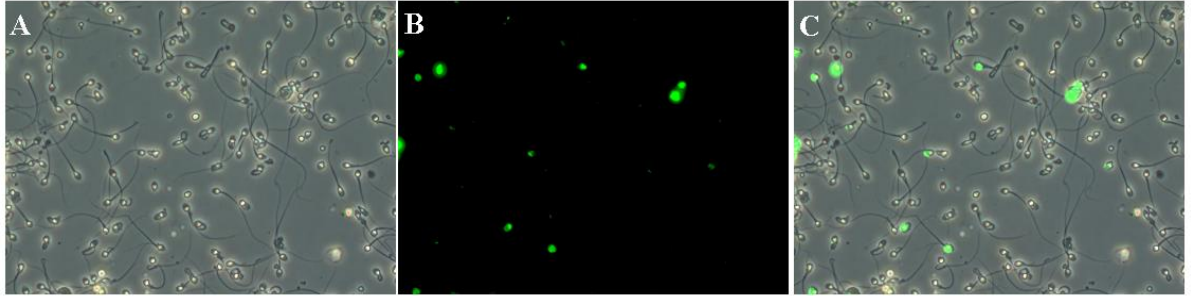
Şekil 11: Hasta grubuna ait bir örneğin ışık mikroskobu altındaki örneğin görüntüsü (A), floresan mikroskobu altında FITC ışımaya yapan fragmente spermelerin görüntüsü (B) ve ışımaya yapan görüntü ile asıl görüntünün üst üste çakıştırılması (C)



Şekil 12: Hasta grubuna ait bir örneğin ışık mikroskobu altındaki örneğin görüntüsü (A), florasan mikroskobu altında FITC ışıma yapan fragmante spermelerin görüntüsü (B) ve ışıma yapan görüntü ile asıl görüntünün üst üste çakıştırılması (C)



Şekil 13: Kontrol grubuna ait bir örneğin ışık mikroskobu altındaki örneğin görüntüsü (A), florasan mikroskobu altında FITC ışıma yapan fragmante spermelerin görüntüsü (B) ve ışıma yapan görüntü ile asıl görüntünün üst üste çakıştırılması (C)



Şekil 14: Kontrol grubuna ait ve sigara kullanan bir bireyden alınan örneğin ışık mikroskobu altındaki örneğin görüntüsü (A), florasan mikroskobu altında FITC ışıma yapan fragmante spermelerin görüntüsü (B) ve ışıma yapan görüntü ile asıl görüntünün üst üste çakıştırılması (C).

DNA hasarı verilerinin istatistiksel analizi sonucunda seyreltilmiş örneklerin DNA hasarı ve seyreltik olmayanların DNA hasarının motilite, yaş, sigara durumu, histon yüzdesi, morfoloji ve konsantrasyon ile aralarında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Fakat seyreltilmiş örneklerdeki DNA hasarı ile DNA fragmantasyonu arasında anlamlılığa yakın derecede bir ilişki saptandı ($p = 0.052$). İnfertil bireyler ve fertil bireyler arasında DNA hasarı değerleri bakımından bir fark bulunmadı ($p = 0.1199$).



5. TARTIŞMA

Erkeklerin yaklaşık %40'ı normal semen parametrelerine sahiptirler (Esteves ve ark., 2012). WHO semen analizi parametrelerinin infertilite tanımını yapmakta yetersiz kaldığını bildirmekte ve bu durum tedaviyi olumsuz yönde etkilemektedir. Sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi gerek *in vivo* gerekse *in vitro* fertilizasyon başarısıyla korelasyon göstermektedir (Evgeni ve ark., 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalar sperm DNA hasarının erkek infertilitesindeki rolünü ortaya koymaktadır (Sharma ve ark., 2010, Simon ve ark., 2011). Erkek infertilitenin etiolojisinde rol alan unsurlardan biri de SDF'tir (Evgeni ve ark., 2014). Yapılan çalışmalar, SDF değerinin %30'un üzerinde olmasının gebelik başarısını azalttığını göstermektedir (Virro ve ark., 2004, Bungum ve ark., 2004).

Çalışmamız, TUNEL yöntemi ile analiz ettiğimiz SDF değerinin hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdi ($p=0,829$). TUNEL sonuçlarıyla DNA hasarı ve histon-protamin oranı karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark elde edilemedi. Fakat DNA hasarı sonuçlarına baktığımızda seyreltilmiş örnekler ile SDF arasında anlamlılığa yakın bir ilişki elde edildi ($p=0,052$). Ayrıca, sperm motilitesi ve konsantrasyonu, yaş ve sigara kullanımı gibi parametreler incelendiğinde, bu parametreler ve SDF değerleri arasında bir ilişki kurulamadı. Daha önce yapılan çalışmalar, bu parametreler ve SDF değerleri arasında anlamlı bir korelasyonun varlığını ortaya koymuştur (Sharma ve ark., 2016a, Simon ve ark., 2014). Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol sayısının az olması bu konuda yapılan önceki çalışmalarla bizim çalışmamızın farklılığında önemli bir ölçüt olmuştur.

Sharma ve arkadaşları (2016), 95 kontrol ve 261 infertil erkeği dahil ettiği çalışmada SDF indeksini TUNEL testini kullanarak akım sitometrisiyle belirlemişlerdir. Bu çalışmada, TUNEL testinin referans değerini %16,8, özgüllüğünü %91,6 ve duyarlılığını %32,6 olarak belirlemişler ve test sonucu pozitif olan erkeklerde görülen infertilitenin SDF ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (Sharma ve ark., 2016a).

Sharma ve arkadaşları (2010) çalışmalarında 194 infertil hasta ve 25 kontrolü dahil etmişlerdir. Hasta ve kontrol grubu arasında TUNEL analiziyle bakılan SDF değerlerinde önemli bir fark elde etmişlerdir (Sharma ve ark., 2010). Hasta grubu sayısının yüksek olması ve çalışmada akım sitometrisiyle TUNEL analizi yapılması bizim çalışmamızla bu çalışma arasındaki farklılığı gösterir niteliktedir.

Simon ve arkadaşları (2014), sperm DNA hasarı ve ART sonuçları arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla hastalarda DNA hasarını üç farklı yöntem kullanarak test etmişlerdir. İki yüz otuz sekiz infertil erkek hastada COMET, TUNEL ve akım sitometresi kullanılarak kromatin değerlendirilmesi (FCCE) testleriyle, SDF ve anilin mavisiyle boyama analizi ile histon-protamin oranına bakılmıştır. Çalışmada, TUNEL ve FCCE ile analiz edilen örneklerde SDF ve ART sonuçları arasında ilişki varken COMET ile analiz edildiğinde ilişki bulunamamıştır. SDF seviyesinin yüksek olmasıyla histon-protamin oranındaki arasındaki ilişki üç testte de analiz edilmiştir. Hastalardaki SDF eşik değerleri üç testte de birbirinden farklı bulunmuştur. TUNEL testinin eşik değeri %10'dan fazla olduğunda gebelik başarısının önemli ölçüde düştüğü gözlemlenmiştir. Diğer yandan, COMET ile değerlendirildiğinde eşik değerinin %82 ve FCCE ile bakıldığında %27 olduğu gözlemlenmiştir. Sonuçlardaki farklılıklar, COMET testinin tüm DNA hasarına bakarken FCCE testi ve TUNEL testinin potansiyel DNA hasarını göstermesi olarak açıklanmıştır (Simon ve ark., 2014).

Bir diğer çalışmada, Aoki ve arkadaşları (2005) ilk kez 149 infertil erkek hastada SCSA testiyle SDF ve asit üre jel elektroforezi ile P1/P2 oranlarını karşılaştırmışlardır. Hastalar, normal ve normalden biraz yüksek ve yüksek P1/P2 oranı gözlenenler olarak gruplandırılmıştır. Gruplardaki sperm P1 ve P2 konsantrasyonlarının SDF ile ters bir ilişki bulunduğu gösterilmiş ve protaminlerin DNA hasarı için koruyucu olabileceği belirtilmiştir (Aoki ve ark., 2005b).

Yapılan çalışmalarda semen parametreleriyle SDF arasında bir ilişki olduğu gözlenirken Utsuno ve arkadaşları (2014) yaş, sperm konsantrasyon, motilite ve morfoloji ile SDF ve protamin eksikliği arasındaki ilişkiyi TUNEL ve CMA3 ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonuçları, yalnızca SDF ve sperm morfolojisi arasında bir ilişki olduğunu

ortaya koymuştur (Utsuno ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde bu parametreler değerlendirildiğinde bir ilişki saptanamamıştır.

Çalışmamızda erkek infertilitesiyle ilişkilendirdiğimiz diğer hipotez sperm kromatin bütünlüğü ve bunun sperm fragmantasyonu ve sperm hasarıyla ilişkisi ve semen parametrelerine etkisidir. Spermatogenezde, histon-protamin değişimi sırasındaki nükleer kromatin kondensyonundaki azalış ve semen örneğinde anormal histon bulunması diğer sperm hücrelerine göre daha dayanıksız ve kalitesiz olmasını ifade eder.

Elde ettiğimiz verilerde anilin mavisi ile boyama tekniğiyle elde ettiğimiz sonuçlara göre protamin seviyeleri karşılaştırıldığında fertil grup ve infertil grup arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p < 0,0001$). Gruplar arasında 32 hasta birey içerisinde 31'i anilin pozitif, 1 birey anilin negatif olarak değerlendirilmiştir ve fertil grupta ise 10 kontrol arasından 9'u anilin negatif ve 1 birey anilin pozitif olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede, histon-protamin oranı seviyesi ile DNA hasarı, seyreltilmiş örneklerdeki DNA hasarı ($p=0,1184$, $p=0,1378$) ve DNA fragmantasyonu ile histon yüzdesi arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,796$). Semen parametrelerine bakıldığında histon yüzdesi ile bireylerin yaşları arasında ($p=0,01$) ve motilite değerlendirildiğinde ise aralarında ters bir ilişki bulunmuştur ($p=0,0006$). Ayrıca, histon yüzdesi ile bireylerin semen konsantrasyonları arasında yüksek düzeyde ters bir ilişki bulunmuştur ($p < 0,0001$). Bunlara ek olarak sperm morfolojisiyle histon yüzdesi artışı arasında çok yüksek düzeyde bir ilişki bulunmuştur ($p < 0,0001$). Fertil bireyler ile infertil bireyler arasında da morfolojik açıdan çok yüksek düzeyde anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,0001$).

İnfertil grup içerisinde bir bireyin anilin negatif olmasının nedenini sigara içmemesi veya diğer sigara içmeyen infertil hastalara göre daha az sigara dumanına ya da kimyasal ajanlara vb. maruz kalmamasıyla açıklanabilir. Ayrıca, bu hastanın yaşı grup içerisindeki en yüksek yaş olarak verilere geçmiştir. Bu da bireyin sperm kalitesindeki ileri yaş ilişkili bozukluk olmasından dolayı infertil olmasını açıklayabilir. Fakat bu bireyde histon oranı %18 olarak değerlendirilmiş, bu değerde zaten %20 olarak aldığımız histon pozitif değerine de oldukça yakın bir değerdir. Bazı çalışmalarda (Hammoud ve ark., 2009, Yu ve ark., 2014) histon yüzdesinin eşik değerini %15 olarak almışlardır. Buna göre

baktığımızda bu değer yine histon pozitif olarak görülse de bizim çalışmamızdaki eşik değeri %20 olduğundan biz bunu negatif olarak değerlendirdik. Kontrol grubundaki bir bireyin anilin pozitif değerlendirmesi histon yüzdesinin %24 olmasından kaynaklıdır. Yine bu değer eşik değeri olarak kabul ettiğimiz %20 oranına oldukça yakın bir değerdir.

Yüksek P1/P2 oranının infertiliteyle ilişkisi bilinmektedir. Aoki ve arkadaşları (2005) yaptıkları çalışmada düşük P1/P2 oranının infertiliteyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmaya 272 infertil hasta ve 87 kontrol dahil edilerek 4 farklı çalışma grubu oluşturulmuştur. Bu gruplar normal P1/P2 orana sahip fertil bireyler, normal P1/P2 orana sahip infertil bireyler, düşük P1/P2 oranlı olan infertiller ve yüksek P1/P2 orana sahip infertil hastalar olarak belirlenmiştir. Çalışmada P1/P2 kantifikasyonu ürik asit jel elektroforezis ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubundaki P1/P2 aralığı 0,75-1,26 bulunmuş, hastalarda da benzer bir oran bulduysa da alt ve üst sınırları oldukça geniştir (0,0-2,82). Hasta grubunda 37 bireyde düşük P1/P2 oranı, 108 bireyde ise yüksek P1/P2 oranı saptanmıştır. Ayrıca kontrol grubunda ise 5 fertil erkeğin düşük orana, 7 fertil erkeğin ise yüksek orana sahip oldukları belirtilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak önemli ölçüde anlamlı fark bulmuşlardır ($p < 0,0001$). Semen parametrelerine göre değerlendirdiklerinde ise sperm konsantrasyonun, düşük ve yüksek P1/P2 oranlı hastalarda, normal orana sahip olanlara göre daha düşük olduğu belirtilmiştir ($p < 0,005$). Motilite değerine baktıklarında yine istatistiksel anlamlı farklılık bulmuşlardır ($P < 0.005$) (Aoki ve ark., 2005a) . Birçok çalışma (Carrell and Liu, 2001, Mengual ve ark., 2003) sadece yüksek P1/P2 oranının infertilite ile ilişkisi gösterilirken, Aoki ve arkadaşları bu çalışmalarlarıyla düşük P1/P2 oranının da infertiliteyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Aoki ve arkadaşlarının (2006) bir diğer çalışmasında (Aoki ve ark., 2006b), 10 fertil erkek ve 69 infertil hasta dahil edilerek jel elektroforezis ile çekirdek protein ekstrasyonu, immunoflorasan mikroskop ile protamin kantifikasyonu ve TUNEL metodu ile DNA hasarını değerlendirmişlerdir. Fertil donörlerde P1/P2 oranı normallik gösterirken hasta grubunda 14 bireyin düşük, 26 bireyin yüksek ve 29 bireyin ise normal P1/P2 oranına sahip olduklarını jel elektroforezi ile belirlenmiştir. DNA hasarı, düşük ve yüksek P1/P2 oranlı hastalarda normal oranlılara kıyasla daha yüksek çıkmıştır ($p < 0.001$). Toplam protamin

konsantrasyonu ve DNA hasarı arasında ise istatistiksel olarak ters bir ilişki saptamışlardır ($p<0.005$).

Hammoud ve arkadaşları (2009) çalışmalarına 78 infertil hasta dahil ederek anilin mavisi boyama ile histon yüzdelerini ve ürik asit jel elektroforezi ile protamin ekstrasyonlarını değerlendirmişlerdir. Sonuçları histon oranı ile infertilite arasında önemli ölçüde ilişki saptanmıştır ($p<0,0001$). Diğer yandan, semen parametreleri değerlendirildiğinde normal P1/P2 oranı olan hastalar ile anormal P1/P2 oranı olan hastalar arasında morfoloji ve motilite değerlerinde bir fark bulunamamıştır (sırasıyla $p= 0,39$ ve $p= 0, 66$) (Hammoud ve ark., 2009).

Aoki ve arkadaşlarının bir diğer çalışmasında (Aoki ve ark., 2005b), 149 infertil hastada DNA bütünlük yöntemi ile SDF ve CMA3 ile protamin seviyesi bakılmıştır. Toplam protamin seviyesi ile SDF arasında anlamlı fark bulmuşlardır ($p<0,001$).

Hammadeh ve arkadaşları (2010) çalışmalarında, 116 infertil hastayı sigara kullanmayan ($N=63$) ve ağır içici ($N=53$) olarak iki gruba ayırmışlardır. Bu hasta grubunda kromatin kondansasyonu CMA3, SDF TUNEL, çekirdek proteinleri ekstrasyonu jel elektroforezi ve DNA hasarı ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar, sigara kullanımı ile semen hacmi ve sperm konsantrasyonu arasında bir ilişki bulunamamış (sırasıyla $p=0,169$ ve $p=0,940$) fakat sperm canlılığı, motilite ve morfoloji ile önemli ölçüde ilişki bulmuşlardır (sırasıyla $p=0,03$, $p<0,001$ ve $p<0,0005$). P1 değeri ile SDF ve histon-protamin oranı arasında bir ilişki bulunamamış ($p > 0,005$), diğer yandan P2 değeri ile histon-protamin oranı arasında ters bir ilişki bulmuşlardır ($p < 0,05$) fakat P2 değeri ile SDF arasında bir ilişki belirleyememişlerdi ($p >0,05$). Sigara kullananların seminal plazmalarındaki 8-OHdG değerleri içmeyenlere göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,01$) (Hammadeh ve ark., 2010).

Bir başka çalışmada Bolan ve arkadaşları (2014) 322 infertil hastayı, 147 ağır içiciler ve 175 sigara kullanmayanlar olarak gruplara ayırmışlardır (Yu ve ark., 2014). Histon-protamin oranına anilin mavisi boyama yöntemiyle bakılmıştır. Sperm sayısı gruplar arasında farklılık gösterirken ($p>0,05$) sperm konsantrasyonu, motilite ve sperm

canlılığı gruplar arasında fark göstermemiştir ($p > 0,05$). Ayrıca ağır içicilerdeki histon-protamin oranı içmeyenlere göre istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir ($p < 0,01$).

Bugüne kadar yapılan çalışmaları değerlendirdiğimizde, çalışmamızda P1 ve P2 oranının bakılması durumunda sonuçlarımızın daha farklı olacağını gözlemlemiş bulunmaktayız. Ayrıca, bizim histon-protamin oranı ile SDF ve DNA hasarında bir ilişki bulunamamasının nedeninin hasta grubu sayısının çok az olmasıyla ilişkilendirmekteyiz.

Çalışmamızda ELISA yöntemiyle analiz ettiğimiz, 26 infertil erkek ve 10 fertil bireyden alınan örneklerde DNA hasarı iki kez çalışıldı ve ikincisinde örnekler bir kez daha seyreltilerek çalışmaya dahil edildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, DNA hasarı ile sperm parametreleriyle arasında bir ilişki saptanamadı. Benzer şekilde, DNA hasarı ile histon-protamin oranı ve SDF arasında da bir ilişki bulunamadı. Ancak, seyreltilmiş örneklerdeki DNA hasarı ile DNA fragmantasyonu arasında anlamlılığa yakın bir ilişki saptandıysa da gruplar arasında DNA hasarı bakımından bir fark bulunamamıştır. Bunun nedenini kitimizin 96'lık olması ve sadece bazı örnekleri çalışmamız gerekmesi nedeniyle oldukça az erkeğin DNA hasarının ölçülebilmesi ile açıklayabiliriz. Seyreltilmiş örneklerde istatistiksel anlamlılık çıkmasa da seyreltildiğinde anlamlı yakın bir farka ulaşılabileceğini bize göstermektedir.

Hosen ve arkadaşlarının çalışmalarında (Hosen ve ark., 2015), 41 infertil ve 25 fertil olmak üzere 66 birey ile çalışılmıştır. Çalışmada infertil ve fertil bireylerde ELISA testi (Cayman) ile 8-OHdG bakıldı. Sonuç olarak gruplar arasında anlamlı ilişki saptamışlardır ($p = 0,02$).

Geoffrey ve arkadaşlarının (2009) çalışmalarında (De Iuliis ve ark., 2009) 95 fertilité durumu bilinmeyen donör ve 130 infertil hasta dahil edilmiştir. SDF TUNEL yöntemiyle, histon-protamin oranına CMA3 yöntemiyle ve DNA hasarı Biotrin OxyDNA kiti ile analiz edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde histon-protamin oranı ile DNA hasarı arasında önemli ölçüde korelasyon olduğu gösterilmiştir ($p < 0,001$). Ayrıca, DNA hasarı ile SDF arasında da güçlü bir korelasyon olduğunu saptamışlardır ($p < 0,001$) (De Iuliis ve ark., 2009).

DNA hasarı ile ilgili bir diğerk çalışma ise Micillo ve arkadaşlarının (Micillo ve ark., 2016) 111 infertil hastada SDF ve 8-OHdG baktıkları çalışmadır. Bulgularına göre pozitif 8-OHdG yüzdesi ile TUNEL pozitif yüzdesi güçlü korelasyon göstermektedir ($p < 0.0001$). Çalışmanın sonucunda oksidatif kaynaklı hasarın zayıf semen kalitesiyle ilişkili olduğunu vurgulamışlardır.

Yapılan çalışmalara bakıldığında SDF, histon-protamin oranı ve DNA hasarı arasında korelasyon olduğu görölüyor. Bizim çalışmamızda korelasyon bulunamamasının nedeni analiz ettiğimiz hasta sayısının azlığıyla diğerlendirilebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Erkek infertilitesi heterojen ve multifaktöriyel bir bozukluktur. Bu olguların %30-50'sinin etiyojisi tam olarak açıklanamamaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar SDF, sperm DNA hasarı ve sperm protamin oranının erkek infertilitesiyle ilişkili olabileceğini göstermektedir. Tez çalışmasında, sperm DNA hasarı, SDF, ve sperm protamin oranının erkek infertilitesindeki rolü araştırıldı. Ayrıca, SDF, sperm DNA hasarı ve protamin oranını sperm parametreleri ile karşılaştırıldı. Elde edilen veriler, sperm protamin ve histon oranlarının infertil ve fertil erkekler arasında anlamlı ölçüde farklılık gösterdiğini göstermektedir. Ancak, SDF ve sperm DNA hasarı ile infertilite arasında korelasyon gözlenmedi. Daha büyük çalışma gruplarıyla yapılan çalışmalar erkek infertilitesiyle SDF ve sperm DNA hasarı arasında anlamlı bir ilişki varlığını göstermiştir. Çalışmamızda, SDF ve sperm DNA hasarının diğer semen parametreleri arasında korelasyonu tespit edilemedi.

Çalışmamıza dahil edilen infertil ve fertil erkek sayısının az olması nedeniyle istatistiksel anlamlılık yakalanamamış olabilir. Ayrıca, ileri teknolojiler kullanılarak yapılacak analizlerin sonuçları belirli bir ölçüde sonuçları modifiye edebilir. Çalışmamızda değerlendirilen bu üç parametrenin sigara kullanımıyla olan ilişkisi de tam olarak ortaya konulmadır.

SDF, sperm DNA hasarı ve protaminyasyon oranlarının infertilite etiyojisindeki rolünün tam olarak belirlenebilmesi daha geniş ölçekli çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Agarwal, A., cho, C. L. & Esteves, S. C. 2016a. Should we evaluate and treat sperm dna fragmentation? *Curr opin obstet gynecol*, 28, 164-71.
- Agarwal, A., majzoub, A., Esteves, S. C., ko, E., Ramasamy, R. & Zini, A. 2016b. Clinical utility of sperm dna fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl androl urol*, 5, 935-950.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A. & Chyatte, M. R. 2015. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod biol endocrinol*, 13, 37.
- Agarwal, A., Saleh, R. A. & Bedaiwy, M. A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil steril*, 79, 829-43.
- Aitken, R. J. 2017. Dna damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring. *Transl androl urol*, 6, s761-s764.
- Aitken, R. J., Bronson, R., Smith, T. B. & De iuliis, G. N. 2013. The source and significance of dna damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol hum reprod*, 19, 475-85.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S. & Fishel, S. 1989. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol reprod*, 41, 183-97.
- Aitken, R. J. & De İuliis, G. N. 2007. Origins and consequences of dna damage in male germ cells. *Reprod biomed online*, 14, 727-33.
- Aitken, R. J., Koopman, P. & Lewis, S. E. 2004. Seeds of concern. *Nature*, 432, 48-52.
- Akama, K., Ichimura, H., Sato, H., Kojima, S., Miura, K., Hayashi, H., Komatsu, Y. & Nakano, M. 1995. The amino acid sequence and interaction with the nucleosome core dna of transition protein 4 from boar late spermatid nuclei. *Eur j biochem*, 233, 179-85.
- Akama, K., Sato, H., Hasegawa, S., Shimada, I. & Nakano, M. 1998. Transition protein 1 from boar late spermatid nuclei having dna-melting activity is a dimeric protein. *Biochem mol biol int*, 44, 315-23.
- Alvarez, J. G. & Storey, B. T. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol reprod dev*, 42, 334-46.

- Amann, R. P. 2008. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J androl*, 29, 469-87.
- Anton, E., Blanco, J., Egozcue, J. & Vidal, F. 2005. Sperm studies in heterozygote inversion carriers: a review. *Cytogenet genome res*, 111, 297-304.
- Aoki, V. W. & Carrell, D. T. 2003. Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian j androl*, 5, 315-24.
- Aoki, V. W., Christensen, G. L., Atkins, J. F. & Carrell, D. T. 2006a. Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil steril*, 86, 1416-22.
- Aoki, V. W., Emery, B. R., Liu, L. & Carrell, D. T. 2006b. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and dna integrity. *J androl*, 27, 890-8.
- Aoki, V. W., Liu, L. & Carrell, D. T. 2005a. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum reprod*, 20, 1298-306.
- Aoki, V. W., Liu, L. & carrell, D. T. 2006c. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol hum reprod*, 12, 41-50.
- Aoki, V. W., Moskovtsev, S. I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J. B. & Carrell, D. T. 2005b. Dna integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J androl*, 26, 741-8.
- Auger, J. 2010. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian j androl*, 12, 36-46.
- Ausio, J. 1999. Histone h1 and evolution of sperm nuclear basic proteins. *J biol chem*, 274, 31115-8.
- Balhorn, R. 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biol*, 8, 227.
- Balhorn, R., Brewer, L. & Corzett, M. 2000. Dna condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single dna molecules. *Mol reprod dev*, 56, 230-4.

- Balhorn, R., Reed, S. & Tanphaichitr, N. 1988. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia*, 44, 52-5.
- Bennetts, L. E. & Aitken, R. J. 2005. A comparative study of oxidative dna damage in mammalian spermatozoa. *Mol reprod dev*, 71, 77-87.
- Bianchi, P. G., Manicardi, G., Bizzaro, D., Campana, A., Bianchi, U. & Sakkas, D. 1996a. Use of the guanine-cytosine (gc) specific fluorochrome, chromomycin a3, as an indicator of poor sperm morphology. *J assist reprod genet*, 13, 246-50.
- Bianchi, P. G., Manicardi, G. C., Urner, F., Campana, A. & Sakkas, D. 1996b. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol hum reprod*, 2, 139-44.
- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M. A., Fava, L., Flamigni, C. & Coticchio, G. 2006. Sperm dna fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in art. *Hum reprod*, 21, 2876-81.
- Bromfield, E. G., Mihalas, B. P., Dun, M. D., Aitken, R. J., Mclaughlin, E. A., Walters, J. L. & Nixon, B. 2017. Inhibition of arachidonate 15-lipoxygenase prevents 4-hydroxynonenal-induced protein damage in male germ cells. *Biol reprod*, 96, 598-609.
- Bungum, M., Humaidan, P., Spano, M., Jepson, K., Bungum, L. & Giwercman, A. 2004. The predictive value of sperm chromatin structure assay (scca) parameters for the outcome of intrauterine insemination, ivf and icsi. *Hum reprod*, 19, 1401-8.
- Carrell, D. T., De Jonge, C. & Lamb, D. J. 2006. The genetics of male infertility: a field of study whose time is now. *Arch androl*, 52, 269-74.
- Carrell, D. T., Emery, B. R. & Hammoud, S. 2007. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum reprod update*, 13, 313-27.
- Carrell, D. T. & Liu, L. 2001. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J androl*, 22, 604-10.
- Castellani, C., Picci, L., Tamanini, A., Girardi, P., Rizzotti, P. & Assael, B. M. 2009. Association between carrier screening and incidence of cystic fibrosis. *Jama*, 302, 2573-9.

- Chabory, E., Damon, C., Lenoir, A., Henry-berger, J., Vernet, P., Cadet, R., Saez, F. & Drevet, J. R. 2010. Mammalian glutathione peroxidases control acquisition and maintenance of spermatozoa integrity. *J anim sci*, 88, 1321-31.
- Chen, H., Ruan, Y. C., Xu, W. M., Chen, J. & Chan, H. C. 2012. Regulation of male fertility by cftr and implications in male infertility. *Hum reprod update*, 18, 703-13.
- Chevaillier, P., Mauro, N., Feneux, D., Jouannet, P. & David, G. 1987. Anomalous protein complement of sperm nuclei in some infertile men. *Lancet*, 2, 806-7.
- Chocu, S., Calvel, P., Rolland, A. D. & Pineau, C. 2012. Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Syst biol reprod med*, 58, 179-90.
- Chohan, K. R., Griffin, J. T., Lafromboise, M., De jonge, C. J. & carrell, D. T. 2006. Comparison of chromatin assays for dna fragmentation evaluation in human sperm. *J androl*, 27, 53-9.
- Choi, Y. C., Aizawa, A. & Hecht, N. B. 1997. Genomic analysis of the mouse protamine 1, protamine 2, and transition protein 2 gene cluster reveals hypermethylation in expressing cells. *Mamm genome*, 8, 317-23.
- Claustres, M. 2005. Molecular pathology of the cftr locus in male infertility. *Reprod biomed online*, 10, 14-41.
- Collodel, G., Moretti, E., Capitani, S., Piomboni, P., Anichini, C., Estenoz, M. & Baccetti, B. 2006. Tem, fish and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia*, 38, 122-7.
- Cooper, T. G., Noonan, E., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M., Haugen, t. B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M. T. & Vogelsong, K. M. 2010. World health organization reference values for human semen characteristics. *Hum reprod update*, 16, 231-45.
- D'occhio, M. J., Hengstberger, K. J. & Johnston, S. D. 2007. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim reprod sci*, 101, 1-17.
- Dadoue, j. P. 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc res tech*, 61, 56-75.
- Dahm, R. 2005. Friedrich miescher and the discovery of dna. *Dev biol*, 278, 274-88.

- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. & Melamed, M. R. 1975. Thermal denaturation of dna in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp cell res*, 90, 411-28.
- De Braekeleer, M. & Dao, T. N. 1991. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum reprod*, 6, 245-50.
- De Gendt, K., Swinnen, J. V., Saunders, P. T., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lecureuil, C., Heyns, W., Carmeliet, P., Guillou, F., Sharpe, R. M. & verhoeven, g. 2004. A sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc natl acad sci u s a*, 101, 1327-32.
- De groot, R. P., Den hertog, J., Vandenheede, J. R., Goris, J. & Sassone-corsi, P. 1993. Multiple and cooperative phosphorylation events regulate the crem activator function. *Embo j*, 12, 3903-11.
- De iuliis, G. N., Thomson, L. K., Mitchell, L. A., Finnie, J. M., Koppers, A. J., Hedges, A., Nixon, B. & Aitken, R. J. 2009. Dna damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol reprod*, 81, 517-24.
- De lamirande, E. & Gagnon, C. 1995. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum reprod*, 10 suppl 1, 15-21.
- De saint Groth, S. F. & Tees, R. 1975. Skim passage: a rapid method of adapting influenza viruses to new host tissues. *Intervirolgy*, 5, 335-41.
- De yebra, L., Balleca, J. L., Vanrell, J. A., Corzett, M., Balhorn, R. & Oliva, R. 1998. Detection of p2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine p2 levels. *Fertil steril*, 69, 755-9.
- Delmas, V., Laoide, B. M., Masquillier, D., De Groot, R. P., Foulkes, N. S. & Sassone-corsi, P. 1992. Alternative usage of initiation codons in mrna encoding the camp-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc natl acad sci u s a*, 89, 4226-30.

- Delmas, V., Van der hoorn, F., Mellstrom, B., Jegou, B. & Sassone-corsi, P. 1993. Induction of crem activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Mol endocrinol*, 7, 1502-14.
- Domenjoud, L., Kremling, H., Burfeind, P., Maier, W. M. & Engel, W. 1991. On the expression of protamine genes in the testis of man and other mammals. *Andrologia*, 23, 333-7.
- Du plessis, S. A. S., Agarwal, A. & Sabanegh jr, E. S. 2014. *Male infertility*, springer.
- Eddy, E. M. 2002. Male germ cell gene expression. *Recent prog horm res*, 57, 103-28.
- Esteves, S. C. 2013. A clinical appraisal of the genetic basis in unexplained male infertility. *J hum reprod sci*, 6, 176-82.
- Esteves, S. C., Zini, A., Aziz, N., Alvarez, J. G., Sabanegh, E. S., Jr. & Agarwal, A. 2012. Critical appraisal of world health organization's new reference values for human semen characteristics and effect on diagnosis and treatment of subfertile men. *Urology*, 79, 16-22.
- Evenson, D. P. 2016. The sperm chromatin structure assay (scca®) and other sperm dna fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear dna integrity as related to fertility. *Animal reproduction science*, 169, 56-75.
- Evgeni, E., Charalabopoulos, K. & Asimakopoulos, B. 2014. Human sperm dna fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J reprod infertil*, 15, 2-14.
- Ferlin, A., Vinanzi, C., Garolla, A., Selice, R., Zuccarello, D., Cazzadore, C. & Foresta, C. 2006. Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin endocrinol (oxf)*, 65, 606-10.
- Fernandez, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R. & Alvarez, J. G. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm dna fragmentation. *J androl*, 24, 59-66.
- Francis, S., Yelumalai, S., Jones, C. & Coward, k. 2014. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum fertil (camb)*, 17, 80-9.

- Goossens, E. & Tournaye, H. 2013. Adult stem cells in the human testis. *Semin reprod med*, 31, 39-48.
- Gottlieb, B., Beitel, L. K., Wu, J. H. & Trifiro, M. 2004. The androgen receptor gene mutations database (ar db): 2004 update. *Hum mutat*, 23, 527-33.
- Groth, k. A., Skakkebaek, A., Host, C., Gravholt, C. H. & Bojesen, A. 2013. Clinical review: klinefelter syndrome--a clinical update. *J clin endocrinol metab*, 98, 20-30.
- Gunes, S., Sengupta, P., Henkel, R., Alguraigari, A., Sinigaglia, M. M., Kayal, M., Joumah, A. & Agarwal, A. 2018. Microtubular dysfunction and male infertility. *World j mens health*.
- Hammadeh, M. E., Hamad, M. F., Montenarh, M. & Fischer-hammadeh, C. 2010. Protamine contents and p1/p2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Hum reprod*, 25, 2708-20.
- Hammoud, S., Liu, L. & Carrell, D. T. 2009. Protamine ratio and the level of histone retention in sperm selected from a density gradient preparation. *Andrologia*, 41, 88-94.
- Heller, C. H. & Clermont, Y. 1964. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent prog horm res*, 20, 545-75.
- Henkel, R., Kierspel, E., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Schill, W. B. & Kruger, T. F. 2003. Dna fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod biomed online*, 7, 477-84.
- Hosen, M. B., Islam, M. R., Begum, F., Kabir, Y. & Howlader, M. Z. 2015. Oxidative stress induced sperm dna damage, a possible reason for male infertility. *Iran j reprod med*, 13, 525-32.
- Huang, C. C., Lin, D. P., Tsao, H. M., Cheng, T. C., Liu, C. H. & Lee, M. S. 2005. Sperm dna fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil steril*, 84, 130-40.
- 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*, 47, 438-47.
- Johnson, P. A., Peschon, J. J., Yelick, P. C., Palmiter, R. D. & Hecht, N. B. 1988. Sequence homologies in the mouse protamine 1 and 2 genes. *Biochim biophys acta*, 950, 45-53.
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C. & european association of urology working group on male, i. 2012. European association of urology guidelines on male infertility: the 2012 update. *Eur urol*, 62, 324-32.
- Kierszenbaum, A. L. 2001. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired dna breaks not allowed. *Mol reprod dev*, 58, 357-8.
- Kleene, K. C. 1996. Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol reprod dev*, 43, 268-81.
- Krausz, C. 2011. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best pract res clin endocrinol metab*, 25, 271-85.
- Krausz, C., Escamilla, A. R. & Chianese, C. 2015. Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 150, r159-74.
- Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., Tuttelmann, F., european academy of, a. & european molecular genetics quality, n. 2014. Eaa/emqn best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2, 5-19.
- Kundu, T. K. & Rao, M. R. 1996. Zinc dependent recognition of a human cpg island sequence by the mammalian spermatidal protein tp2. *Biochemistry*, 35, 15626-32.
- Leaver, R. B. 2016. Male infertility: an overview of causes and treatment options. *Br j nurs*, 25, s35-s40.
- Lee, K., Haugen, H. S., Clegg, . H. & Braun, R. E. 1995. Premature translation of protamine 1 mrna causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc natl acad sci u s a*, 92, 12451-5.
- Lewis, S. E. & Aitken, R. J. 2005. Dna damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell tissue res*, 322, 33-41.

- Lewis, S. E., John Aitken, R., Conner, S. J., Iulii, G. D., Evenson, D. P., Henkel, R., Giwercman, A. & Gharagozloo, P. 2013. The impact of sperm dna damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod biomed online*, 27, 325-37.
- Luerssen, H., Hoyer-fender, S. & Engel, W. 1988. The nucleotide sequence of human transition protein 1 cdna. *Nucleic acids res*, 16, 7723.
- Madureira, C., Cunha, M., Sousa, M., Neto, A. P., Pinho, M. J., Viana, P., Goncalves, A., Silva, J., Teixeira da Silva, J., Oliveira, C., Ferraz, L., Doria, S., Carvalho, F. & Barros, A. 2014. Treatment by testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection of 65 azoospermic patients with non-mosaic klinefelter syndrome with birth of 17 healthy children. *Andrology*, 2, 623-31.
- Malvezzi, H., Sharma, R., Agarwal, A., Abuzenadah, A. M. & Abu-elmagd, M. 2014. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. *Reprod biol endocrinol*, 12, 121.
- Mayeur, A., aAdad, N., Hesters, L., Brisset, S., Romana, S., Tosca, L., Tachdjian, G. & Frydman, N. 2019. Chromosomal translocations and semen quality: a study on 144 male translocation carriers. *Reprod biomed online*, 38, 46-55.
- Mccarrey, J. R. 1998. Spermatogenesis as a model system for developmental analysis of regulatory mechanisms associated with tissue-specific gene expression. *Semin cell dev biol*, 9, 459-66.
- Meistrich, M. L. 1989. Histone and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. *Histones and other basic nuclear proteins*, 165-182.
- Mengual, L., Balleca, J. L., Ascaso, C. & Oliva, R. 2003. Marked differences in protamine content and p1/p2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J androl*, 24, 438-47.
- Micillo, A., Vassallo, M. R., Cordeschi, G., D'andrea, S., Necozone, S., Francavilla, fF, Francavilla, S. & Barbonetti, A. 2016. Semen leukocytes and oxidative-dependent dna damage of spermatozoa in male partners of subfertile couples with no symptoms of genital tract infection. *Andrology*, 4, 808-15.

- Miescher, F 1874. Das protamin, eine neue organische base aus den samenfäden des rheinlachs. *Berichte der deutschen chemischen gesellschaft*, 7, 376-379.
- Misell, L. M., Holochwost, D., Boban, D., Santi, N., Shefi, S., Hellerstein, M. K. & Turek, P. J. 2006. A stable isotope-mass spectrometric method for measuring human spermatogenesis kinetics in vivo. *J urol*, 175, 242-6; discussion 246.
- Montellier, E., Boussouar, F., Rousseaux, S., Zhang, K., Buchou, T., Fenaille, F., Shiota, H., Debernardi, A., Hery, P., Curtet, S., Jamshidikia, M., Barral, S., Holota, H., Bergon, A., Lopez, F., Guardiola, P., Pernet, K., Imbert, J., Petosa, C., Tan, M., Zhao, Y., Gerard, M. & Khochbin, S. 2013. Chromatin-to-nucleoprotamine transition is controlled by the histone h2b variant th2b. *Genes dev*, 27, 1680-92.
- Morales, C. R., Kwon, Y. K. & Hecht, N. B. 1991. Cytoplasmic localization during storage and translation of the mrnas of transition protein 1 and protamine 1, two translationally regulated transcripts of the mammalian testis. *J cell sci*, 100 (pt 1), 119-31.
- Moustafa, M. H., Sharma, R. K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-hafez, M. A., Thomas, A. J., Jr. & Agarwal, A. 2004. Relationship between ros production, apoptosis and dna denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum reprod*, 19, 129-38.
- Mozdarani, H., Meybodi, A. M. & Karimi, H. 2007. Impact of pericentric inversion of chromosome 9 [inv (9) (p11q12)] on infertility. *Indian j hum genet*, 13, 26-9.
- Neto, F. T., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S. & Goldstein, M. 2016a. Genetics of male infertility. *Curr urol rep*, 17, 70.
- Neto, F. T., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S. & Goldstein, M. 2016b. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin cell dev biol*, 59, 10-26.
- Nuti, F. & Krausz, C. 2008. Gene polymorphisms/mutations relevant to abnormal spermatogenesis. *Reprod biomed online*, 16, 504-13.
- O'flynn O'brien, K. L., Varghese, A. C. & Agarwal, A. 2010. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil steril*, 93, 1-12.
- Oliva, R. 2006. Protamines and male infertility. *Hum reprod update*, 12, 417-35.

- Oliva, r. & dixon, g. H. 1991. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog nucleic acid res mol biol*, 40, 25-94.
- Osman, A., Alsomait, H., Seshadri, S., El-toukhy, T. & Khalaf, Y. 2015. The effect of sperm dna fragmentation on live birth rate after ivf or icsi: a systematic review and meta-analysis. *Reprod biomed online*, 30, 120-7.
- Padron, O. F., Brackett, N. L., Sharma, R. K., Lynne, C. M., Thomas, A. J., Jr. & Agarwal, A. 1997. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil steril*, 67, 1115-20.
- Pankow, S., Bamberger, C., Calzolari, D., Martinez-bartolome, S., Lavallee-adam, M., Balch, W. E. & Yates, J. R., 3rd 2015. F508 cftr interactome remodelling promotes rescue of cystic fibrosis. *Nature*, 528, 510-6.
- Rubes, J., Selevan, S. G., Evenson, D. P., Zudova, D., Vozdova, M., Zudova, Z., Robbins, W. A. & Perreault, S. D. 2005. Episodic air pollution is associated with increased dna fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum reprod*, 20, 2776-83.
- Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N. & Bizzaro, D. 2002. Nature of dna damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol reprod*, 66, 1061-7.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nelson, D. R., Nada, E. A., El-tonsy, M. H., Alvarez, J. G., Thomas, A. J., Jr. & Sharma, R. K. 2002. Increased sperm nuclear dna damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil steril*, 78, 313-8.
- Sassone-corsi, P. 2005. Transcription factors governing male fertility. *Andrologia*, 37, 228-9.
- Schluter, G., Kremling, H. & Engel, W. 1992. The gene for human transition protein 2: nucleotide sequence, assignment to the protamine gene cluster, and evidence for its low expression. *Genomics*, 14, 377-83.
- Schmid, C., Heng, H. H., Rubin, C., Ye, C. J. & Krawetz, S. A. 2001. Sperm nuclear matrix association of the prm1-->prm2-->tnp2 domain is independent of alu methylation. *Mol hum reprod*, 7, 903-11.

- Schmidt, E. E. & Schibler, U. 1997. Developmental testis-specific regulation of mrna levels and mrna translational efficiencies for tata-binding protein mrna isoforms. *Dev Biol*, 184, 138-49.
- Shamsi, M. B., Kumar, R. & Dada, R. 2008. Evaluation of nuclear dna damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian j med res*, 127, 115-23.
- Shamsi, M. B., Venkatesh, S., Kumar, R., Gupta, N. P., Malhotra, N., Singh, N., Mittal, S., Arora, S., Arya, D. S., Talwar, P., Sharma, R. K. & Dada, R. 2010. Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. *Indian j biochem biophys*, 47, 38-43.
- Sharma, H., Mavuduru, R. S., Singh, S. K. & Prasad, R. 2014. Increased frequency of cftr gene mutations identified in indian infertile men with non-obstructive azoospermia and spermatogenic failure. *Gene*, 548, 43-7.
- Sharma, R. & Agarwal, A. 2011. Laboratory evaluation of sperm chromatin: tunel assay. *Sperm chromatin*. Springer.
- Sharma, R., Ahmad, G., Esteves, S. C. & Agarwal, A. 2016a. Terminal deoxynucleotidyl transferase dntp nick end labeling (tunel) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm dna fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *J assist reprod genet*, 33, 291-300.
- Sharma, R., Biedenharn, K. R., Fedor, J. M. & Agarwal, A. 2013a. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol*, 11, 66.
- Sharma, R., Harlev, A., Agarwal, A. & Esteves, S. C. 2016b. Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 world health organization laboratory methods for the examination of human semen. *Eur Urol*, 70, 635-645.
- Sharma, R., Masaki, J. & Agarwal, A. 2013b. Sperm dna fragmentation analysis using the tunel assay. *Methods Mol Biol*, 927, 121-36.
- Sharma, R. K., Sabanegh, E., Mahfouz, R., Gupta, S., Thiyagarajan, A. & Agarwal, A. 2010. Tunel as a test for sperm dna damage in the evaluation of male infertility. *Urology*, 76, 1380-6.

- Sikka, s. C. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr med chem*, 8, 851-62.
- Simon, L., Liu, L., Murphy, K., Ge, S., Hotaling, J., Aston, K. I., Emery, B. & Carrell, D. T. 2014. Comparative analysis of three sperm dna damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum reprod*, 29, 904-17.
- Simon, L., Lutton, D., Mcmanus, J. & Lewis, S. E. 2011. Sperm dna damage measured by the alkaline comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil steril*, 95, 652-7.
- Singh, J. & Rao, M. R. 1988. Interaction of rat testis protein, tp, with nucleosome core particle. *Biochem int*, 17, 701-10.
- Skaletsky, H., Kuroda-kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S. F., Iatrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., maupin, r., mcpherson, j., miner, t., nash, w., nguyen, c., ozersky, p., pepin, k., rock, s., rohlfig, t., scott, k., schultz, b., strong, c., tin-wollam, a., yang, s. P., waterston, r. H., wilson, r. K., rozen, s. & page, d. C. 2003. The male-specific region of the human y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423, 825-37.
- Smith, T. B., Dun, M. D., Smith, N. D., Curry, B. J., Connaughton, H. S. & Aitken, R. J. 2013. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by ogg1. *J cell sci*, 126, 1488-97.
- Stahl, P. J. & Schlegel, P. N. 2012. Genetic evaluation of the azoospermic or severely oligozoospermic male. *Curr opin obstet gynecol*, 24, 221-8.
- Steger, K. 1999. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat embryol (berl)*, 199, 471-87.
- Stewart, K. S., Kramer, J. A., Evans, M. I. & Krawetz, S. A. 1999. Temporal expression of the transgenic human protamine gene cluster. *Fertil steril*, 71, 739-45.
- Suresh, B., Lee, J., Hong, S. H., Kim, K. S. & Ramakrishna, S. 2015. The role of deubiquitinating enzymes in spermatogenesis. *Cell mol life sci*, 72, 4711-20.

- Therman, E. & Susman, M. 1993. Robertsonian translocations. *Human chromosomes*. Springer.
- Torres-moreno, r., morrison, j. B., cooper, d., saunders, c. G. & foort, j. 1992. A computer-aided socket design procedure for above-knee prostheses. *J rehabil res dev*, 29, 35-44.
- Tremellen, K. 2008. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. *Hum reprod update*, 14, 243-58.
- Utsuno, H., Miyamoto, T., Oka, K. & Shiozawa, T. 2014. Morphological alterations in protamine-deficient spermatozoa. *Hum reprod*, 29, 2374-81.
- Van Assche, E., Bonduelle, M., Tournaye, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., Van Steirteghem, A. & Liebaers, i. 1996. Cytogenetics of infertile men. *Hum reprod*, 11 suppl 4, 1-24; discussion 25-6.
- Virro, M. R., Larson-cook, K. L. & Evenson, D. P. 2004. Sperm chromatin structure assay (scca) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil steril*, 81, 1289-95.
- Vogt, P. H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., Kohn, F. M., Schill, W. B., Farah, S., Ramos, C., Hartmann, M., Hartschuh, W., Meschede, D., Behre, H. M., Castel, A., Nieschlag, E., Weidner, W., Grone, H. J., Jung, A., Engel, W. & Haidl, G. 1996. Human y chromosome azoospermia factors (azf) mapped to different subregions in yq11. *Hum mol genet*, 5, 933-43.
- Walsh, T. J., Pera, R. R. & Turek, P. J. 2009. The genetics of male infertility. *Semin reprod med*, 27, 124-36.
- Wykes, S. M. & Krawetz, S. A. 2003. The structural organization of sperm chromatin. *J biol chem*, 278, 29471-7.
- Yu, B., Qi, Y., Liu, D., Gao, X., Chen, H., Bai, C. & Huang, Z. 2014. Cigarette smoking is associated with abnormal histone-to-protamine transition in human sperm. *Fertil steril*, 101, 51-57 e1.

- Yu, J., Chen, Z., Ni, Y. & Li, Z. 2012. Cftr mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (cbavd): a systemic review and meta-analysis. *Hum reprod*, 27, 25-35.
- Zegers-hochschild, F., Adamson, G. D., De Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Van Der Poel, S., international committee for monitoring assisted reproductive, t. & world health, o. 2009. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (icmart) and the world health organization (who) revised glossary on art terminology, 2009. *Hum reprod*, 24, 2683-7.
- Zini, A. 2011. Are sperm chromatin and dna defects relevant in the clinic? *Syst biol reprod med*, 57, 78-85.
- Zini, A. & Agarwal, A. 2011. *Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*, springer new york.
- 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*, 75, 674-7.
- Zini, A., Boman, J. M., Belzile, E. & Ciampi, A. 2008. Sperm dna damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after ivf and icsi: systematic review and meta-analysis. *Hum reprod*, 23, 2663-8.
- Zini, A., De Lamirande, E. & Gagnon, C. 1995. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J androl*, 16, 424-31.

EKLER

Ek 1 : Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu

HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ *

ARAŞTIRMANIN ADI:

Sperm DNA Fragmantasyonu, DNA Hasarı ve Protamin Oranının Belirlenmesi ve Sperm Parametrelerine Etkisi

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağını çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Katılmaya karar verirsiniz, çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Bu durum sizin aldığınız tedavinin standardını etkilemeyecektir. Eğer isterseniz, bu klinik çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

Çalışmada oligospermi tanısı konulmuş ve çocuk sahibi olamayan hastalardan semen örnekleri alınacaktır. Bu örneklerde DNA hasarı ve fragmantasyonu ve protamin oranları belirlenip analiz edilecektir. Bu yöntemlerle açıklanamayan erkek kısırlığının nedenlerinin araştırılması planlanmaktadır.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Araştırma sürecinde hastaya herhangi bir tedavi veya işlem uygulanmayacaktır. Hastadan alınacak semen örneği üzerinden çalışma yürütülecek olup genetik analizleri yapılacaktır.

BENİM NE YAPMAM GEREKİYOR?

Çalışma doktorunuzun talimatlarına uymaya, randevu ve vizitelere katılmaya ve yukarıda anlatılan çalışmayla ilgili tüm işlemlere uymaya istekli olmalısınız. Çalışma doktorunuzu ziyarete belirlenen günlerde gelmelisiniz ve bir sonraki ziyaretiniz de, ziyaretten ayrılmadan önce planlanmalıdır. Yine çalışmadan önce veya çalışma sırasında aldığımız başka herhangi bir tıbbi tedaviyi de çalışma doktoruna söylemeniz önemlidir.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Çalışmaya katılarak başvurmuş olduğunuz merkezde size uygulanacak olan ve sizin teşhis ve tedavi sürecinde uygulanacak işlemler haricinde herhangi bir uygulama yapılmayacağı için bu çalışmanın size bir yan etkisi söz konusu değildir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Bu çalışma ile kısırlıkla ilgili olarak rutin laboratuvarda yapılmayan testler yapılacaktır. Test sonuçlarınıza göre semen örneğiniz değerlendirilecektir.

GÖNÜLLÜ KATILIM

Bu araştırmaya katılma kararımı tamamen gönüllü olarak veriyorum. Bu çalışmaya katılmayı reddedebileceğim veya katıldıktan sonra istediğim zaman, bu tedavi kurumunda göreceğim bakım ve tedaviler etkilenmeksizin ve hiçbir sorumluluk almadan ayrılabilirim bilincindeyim. Çalışmadan her hangi bir zamanda ayrılırsam, ayrılma nedenlerimi, ayrılışımın sonuçlarını ve izleyen dönemde alacağım tedavileri doktorumla tartışacağım.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışmayla ilgili olan tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyici proje tarafından karşılanacak ve size veya bağlı olduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir.

Herhangi bir yan etki veya fiziksel zarar gelişirse hemen çalışma doktorunuzu gereken tıbbi tedavinin uygulanabilmesi için bilgilendiriniz.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Bu formu imzalayarak doktorunuzun ve onun kadrosunun çalışma için sizin kişisel bilgilerinizi (“Çalışma Verileri”) toplamalarına ve kullanmalarına onay vermiş olacaksınız. Bu durum doğum tarihiniz, cinsiyetiniz, sigara ve alkol kullanma durumunuz, etnik kökeniniz ayrıca çalışma verilerinizin kullanımı ile ilgili verdiğiniz onayın herhangi bir belirlenmiş birim tarihi yoktur, ancak doktorunuzu haberdar ederek bu onayınızdan herhangi bir zamanda vazgeçebilirsiniz.

Çalışmanın sonuçları tıbbi yayınlarda yayımlanabilir, ancak sizin kimlik bilgileriniz bu yayınlarda açıklanmayacaktır.

Doktorunuzdan toplanan çalışma verileriniz hakkında bilgi isteme hakkında sahipsiniz. Aynı zamanda bu verilerdeki herhangi bir hatanın düzeltilmesini isteme hakkında da sahipsiniz. Eğer bu konuda bir isteğiniz olursa lütfen doktorunuzla görüşünüz.

Eğer onayınızda vazgeçerseniz, doktorunuz çalışma verilerinizi artık kullanamayacak ya da diğer kişilerle paylaşamayacaktır.

Bu formu imzalayarak, çalışma verilerinizin bu formda tanımlandığı şekilde kullanımına onay vermekteyim.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE 24 SAAT ULAŞILABİLECEK KİŞİLER:

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof. Dr. Ramazan Aşçı'yı 0 (362) 3121919 / 2255 telefon numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji ABD'den arayabileceğimi biliyorum.

ÇALIŞMADAN AYRILMAMI GEREKTİRECEK DURUMLAR:

Yoktur.

YENİ BİLGİLER ÇALIŞMADAKİ ROLÜMÜ NASIL ETKİLEYEBİLİR

Çalışma sürerken ortaya çıkmış olan bütün yeni bilgiler bana derhal iletilecektir.

Çalışmaya Katılma Onayı

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekliyse Olur İşlemine Tanık Olan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Gerekirse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih





T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/581-641

22.12.2016

Sayın Doç. Dr. Sezgin GÜNEŞ

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz **Sperm DNA Fragmentasyonu, DNA Hasarı ve Protamin Oranının Belirlenmesi ve Sperm Parametrelerine Etkisi** başlıklı OMÜ KA EK 2016/372 Karar nolu Genetik çalışma çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 08.12.2016 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof. Dr. Dursun AYGÜN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Dilara EMİRZEOĞLU

Doğum Yeri: TRABZON

Doğum Tarihi: 26.01.1993

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Ondokuz Mayıs Üniversitesi – Moleküler Tıp Anabilim Dalı (2015)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi (2017-2018)

E-posta: dilaraemirzeoglu@gmail.com