

T.C.

YENİYÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Programı



**ANİLİN MAVİSİ BOYASININ FARKLI FİKSATİFLERLE UYGULANMASI
İLE SPERM KROMATİN KONDANSASYONUNUN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuğçe Durmuş

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL-2018

T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “ **ANILIN MAVİSİ BOYASININ FARKLI FİKSATİFLERLE UYGULANMASI İLE SPERM KROMATİN KONDANSASYONUNUN İNCELENMESİ** ” isimli çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma tarihi; 31.01.2018

Jüri Başkanı

Danışman

Prof.Dr.Tülay İrez

Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi



Üye

Prof.Dr. Hüsniye Doğruman

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Tıp Fakültesi

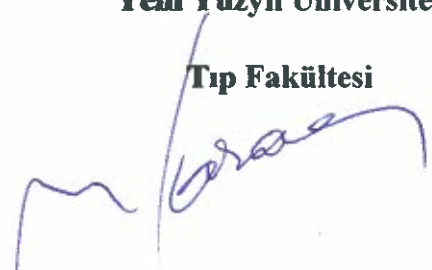


Üye

Doç.Dr. Meriç Karacan

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Tıp Fakültesi



BEYAN

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

Tuğçe Durmuş

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde bana her zaman destek olan, deneysel ve teorik çalışmalarında beni yönlendiren, deneyimleri ve bilgi birikimi ile beni aydınlatan tez danışmanım ve değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Tülay İrez**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Benim için zorlu bir döneme denk gelen tezimin hazırlanmasında verdiğiniz destek için ve zaman ayırdığınız için sonsuz saygılarımı sunarım.

Tez dönemim boyunca laboratuvarının kapılarını bana açan ve tez çalışmama destek olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Üniversitesi Embriyoloji Laboratuvar Sorumlusu Sayın **Emb. Gülçin Ekter Kanten**'e ve Tüp Bebek Ünitesindeki tüm çalışanlara sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana destek olan ve bu zorlu süreçte bana yardımlarını esirgemeyen arkadaşım **Bio. Bahar Demir Gül**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin bitmesinde manevi destek olan üniversite arkadaşlarım Aysel Çamdeviren, Havva Yiğit, Selma Çelik, Mehmet Uygur ve Celal Acar'a sonsuz teşekkür ederim.

İş arkadaşım, dostum ve her zaman yanımda olan manevi kardeşim Büşra Bal bu zorlu süreçte yanımda olduğu için sonsuz teşekkür ederim.

Daima yanımda olan ve her türlü fedakarlıkta bulunan annem **Pakize Durmuş** ve babam **Ömer Durmuş**'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEZ ONAYI.....	II
BEYAN.....	III
İTHAF.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VIII
RESİMLER LİSTESİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
ÖZET.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİ.....	3
2.1.Spermatogenez.....	3
2.2. Spermiyogenez ve Semen Analizi.....	4
2.3. Sperm Kromatin Kondansasyonu.....	11
2.4.Sperm Kromatin Kondansasyon Testleri.....	15
2.5.Sperm DNA Hasarları ve Erkek İnfertilitesi.....	15
2.6. Anilin Mavisi Histokimyası.....	19
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	20

3.1. Data'nın Temini	20
3.2. Hasta Seçimi.....	20
3.3. Anilin Blue Testi	21
3.4. İstatistik Yöntemler	21
4. BULGULAR.....	21
5.TARTIŞMA	27
6. KAYNAKLAR	30
7.ETİK KURUL ONAYI.....	37
8. ÖZGEÇMİŞ	38

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa No
TABLO 1: Semen Analizi İçin En Düşük Referans Parametreleri (WHO, 2010)..7	
TABLO 2: Sperm Konsantrasyonuna Göre Sınıflama.....	8
TABLO 3: Kruger Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi.....	10
TABLO 4: 7057 Erkeğin Değerlendirilmesiyle Saptanan İnfertilite Nedenleri ve Oranları	17
TABLO 5: Sperm Parametreleri Ve Normal Referans Değerleri	18
TABLO 6: Çalışmada Kullanılan Semen Örneklerine Ait Verilerin Ortalama Ve Standart Sapmaları	22
TABLO 7: Fiksatif Yöntemlerine İlişkin Korelasyon Analizi.....	24

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Spermatogenez; Germ Hücrelerinin Gamete Dönüşmesi	5
Şekil 2: Sperm Maturasyonunun Aşamaları	5
Şekil 3: Sperm Hücresinin Çizimle Görünüşü.....	6
Şekil 4: Farklı Fiksatiflerde Kromatin Kondansasyon Miktarlarının Karşılaştırılması	23

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Normal Sperm Şekli.....	9
Resim 2: Normal Spermin Bölümleri.....	9
Resim 3-6: Farklı fiksatiflerde sperm anilin blue test	25-26

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAB: Anilin Mavisı Boyası

WHO : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

DNA : Deoksiribonükleik Asit

ICSI : İncrytoplasmic Sperm İncryection

FSH : Foliküler Stimulan Hormon

TP: Transition Nuclear Protein (Geçiş Nüklear Proteinleri)

P1: Protamin-1

P2:Protamin-2

ÖZET

Amaç: Sperm kromatini DNA ve nükleer proteinlerinin sıkı bağ yapması ve kompaktlaşması ile düzenlenmektedir. Bu kompaktlaşma sonrası normal kişilerde yaklaşık olarak %85-%15 protamin ve histon olacak şekilde nükleer protein yapısı kurulmaktadır. Yapılan çalışmalar sperm nukleusundaki protamin ve histon düzeyinin DNA hasarları ve infertilite ile yakın ilişkisi olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada klasik histon boyama yöntemi olan Anilin mavisi yönteminin dört farklı fiksatif uygulayarak kantitatif olarak kromatin kondansasyon oranlarını ne düzeyde etkilediğini araştırmayı amaçladık.

Materyal Metod: Bu çalışmada 42 semen örneğinde yayma preparatlar yapılarak ,her örnek için 4 ayrı semen yayması hazırlandı . Bu preparatlar ,glutaraldehit (%2,5), Formaldehit (% 10), Etil alkol (%98) ve metanol+asetik asit (3/1) ile fikse edildi. Fikse edilen her örnek asidik anilin mavisi ile 7 dakika boyandı ve fosfat tampon ile yıkandı, kurutuldu ve immersiyon objektifinde incelendi . Analiz için her preparatta 200 sperm sayıldı, boya alan ve almayan sperm oranları çıkarıldı. Farklı fiksatifler arasında kromatin kondansasyon (anilin negatif) oranları arasındaki farklılıkları hesaplama amacı ile student's -T testi ve tekrarlı ölçümlerde varyans analizi uygulandı.

Bulgular: Dört fiksatif arasından Glutaraldehit ve Formaldehit arasında pozitif korelasyon ($p=0,051$), Glutaraldehit ve formaldehit ile metanol+asetik asit ve alkol fiksasyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur ($p=0,0005$, $p=0,0005$ ve $p=0,0005$, $p=0,007$).

Tartışma: Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre sperm kromatin kondansasyonu için uygulanabilecek olan boya Anilin mavisi boyası için hücrelerin % 2,5 Glutaraldehit ve % 10 formaldehit fiksasyonunun uygun olabileceği , metanol+asetik asit ve etil alkol fiksasyonunun ise uygun olmadığı kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Erkek infertilitesi, kromatin kondansasyonu, Anilin mavisi Testi

ABSTRACT

Objective:Sperm chromatin is formed by tight injunction and compactness of DNA and nuclear proteins. Approximately 85%-15% protamin and nuclear protein structure is formed to be histone in normal people after compactness. Researches have shown that level of protamin and histone in sperm nucleus has a close relationship with DNA damage and infertility. In this study, we aim to research to what extent aniline blue method which is the common histone dying method affects the chromatin condensation rates quantitatively by applying four different fixatives.

Material and Methods:In this study, 4 different semen smear is prepared for each sample by making smear prepares in 42 semen samples. These prepares are fixed with Glutaraldehyde (2,5%), Formaldehyde (10%), Ethyl alcohol (98%) and methanol+acetic acid (3/1). Each sample fixed is dyed for 7 minutes for acidic aniline blue and washed with phosphate buffer, dried and examined at immersion objective. 200 sperms are counted at each prepare for analysis, sperm rates receiving and not receiving dye are removed. Student's -T test and variance analysis was applied with repeated measures in order to calculate differences between chromatin condensation (aniline negative) rates among different fixatives.

Results: Positive correlation between Glutaraldehyde and Formaldehyde ($p=0,51$), and negative correlation between Glutaraldehyde and Formaldehyde and methanol+acetic acid and alcohol fixation ($p==,0005, p=0,0005$ ve $p=0,0005, p=0,007$) is observed.

Conclusion:According to results obtained from this study, it is pointed out that 2,5% Glutaraldehyde and 10% Formaldehyde fixation of cells may be suitable, but methanol+acetic acid and ethyl alcohol fixation are not suitable for Aniline blue dye to be applied for sperm chromatin condensation.

Key words:Sperm chromatin condensation, Aniline blue staining, different fixatives

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, çiftlerin herhangi bir korunma yöntemine başvurmadan bir yıl boyunca düzenli cinsel ilişki yaşamasına rağmen gebe kalınmaması durumudur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, infertilitenin %40-50 oranında erkek faktörüne bağlı olduğu belirtilmektedir (1).

Erkek faktörü infertilitede en büyük problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Erkek üreme yetmezliği ya da fonksiyon bozukluğu olarak görülmektedir. Bu problemlerin bir kısmı erkeklerde sonradan görülürken, bir kısmı da genetik kökenlidir (2). Erkek üreme sisteminin sağlıklı ve iyi oluşu androjene bağlıdır(3). Androjen üretimi için de erkek gonadlarının gelişimi önemlidir (4). İnfertilite durumu göz önüne alındığında sperm morfoloji anormalliğinin olması ciddi sorunlardan biri olarak düşünülmektedir(5).

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulması gereken kriterler vardır. Sperm; baş, orta kısım ve kuyruk olmak üzere üç ana parçadan oluşmaktadır. Spermin normal kabul edilebilmesi için baş, orta kısım ve kuyruğunun belirtilen kriterlerde olması gerekmektedir(6,7,8). Baş, düzgün ve oval biçimli, kuyruk ise tek, kıvrılmamış, düz ya da kırılmamış şekilde olmalıdır, orta kısım ise kuyruktan daha kalın ve düzgün, sitoplazmik artık içermemelidir(9,10).

Erkek infertilitesi kompleks bir durum olmakla beraber çeşitli patolojileri de içermektedir. Sperm fonksiyonlarının incelenmesinde sperm kromatin anormalliklerinin saptanması infertilite çalışmalarının önemli bir kısmını oluşturur (11,12,13,14,15). Açıklanamayan infertilite olguları ile normospermik fertil erkeklerin spermleri karşılaştırıldığında, sperm DNA hasarının infertil olgularda artmış olduğu görülmektedir (16). Sperm DNA hasarına neden olan faktörler arasında ilerleyen baba yaşı, genital sistem infeksiyonları ve radyasyona maruziyet sayılabilir (17).

Anilin mavisi boyası; lizinden zengin histonlar ile argininden zengin proteinler arasındaki farkı belirlememize yardımcı olur. Bu teknik, lizin için pozitif reaksiyon ihtiyacını karşılayarak spermin temel proteinindeki farklılıkları ortaya koymaktadır. Kısaca anilin mavisi boyası, DNA protein yapısını,histonları belirlemekte yardımcıdır (18).

Bu çalışmadaki amacımız, normospermik hastalarda sperm kromatin kondensasyonunu, anilin mavisi boyasını farklı fiksatiflerle uygulayarak değerlendirmektir. Farklı fiksatif olarak; %25 glutaraldehit, metanol+asetikasit, %4 formaldehit ve %98 etil alkol kullanılmıştır. Bu şekilde, anilin mavisinin hangi fiksatifler kullanıldığında sperm kromatin kondensasyonunu daha iyi bir şekilde gösterdiğinin ve maliyet açısından hangisinin daha uygun olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. SPERMATOGENEZ:

Spermatogenez; spermatogonia'nın olgun sperme dönüşmesi sırasındaki olaylardır. Germ hücrelerinin olgunlaşma süreci pubertede başlar. Fetal hayatta testis seminifer tübüllerinde spermatogonia inaktif halde bulunur. Puberteye kadar sayıları birden artmaya başlar. Spermatogonia mitoz bölünmeler geçirerek çoğalır ve değişikliğe uğrar, bir kısmı da dejenere olur (Şekil 1) .Spermiogenez ise haploid spermatidlerin uzayarak sperm hücresi üretim sürecidir (19).

Spermatogenez dört büyük farklılaşma aşamalarından,hücrelerden oluşan bir süreçtir. Spermatogonium(mitoz), spermatosit (mayoz), spermatid (postmayotik; spermiogenik) ve spermatozoa (sperm) (Şekil 2) (19)

Spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme ile çoğalarak yeni hücreler oluşturur. Bu oluşan hücreler iki yoldan birini takip eder; A tipi spermatogonyumlar olarak bilinen kök hücreler bölünmeyi sürdürebilir veya devam eden mitoz bölünme boyunca farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluşturur. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Başlangıçta 46 kromozom ve 2n DNA içeren primer spermatositler I. Mayoz bölünmenin profaz evresine girip DNA'larını replike ederek 4n DNA'ya çıkarırlar. Profaz safhası yaklaşık olarak 22 gün sürer. I. mayoz bölünme sonucunda primer spermatosit bölünerek 2 adet sekonder spermatosit oluşur. Bunlar, 23 kromozom içeren daha küçük hücrelerdir. Sekonder spermatositler interfazda çok kısa süre kaldıkları ve hızlı bir şekilde II. mayoz bölünmeye girdikleri için gözlenmeleri çok zordur. (19)

II. mayoz bölünmeye giren sekonder spermatositlerin her biri 23 kromozom içeren spermatidleri oluşturur. Spermatositlerde I.ve II. mayoz arasında S fazı yani DNA sentezi görülmediği için, ikinci bölünmeden hemen sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid hücreler oluşur. (19)

2.2. SPERMİYOGENEZ

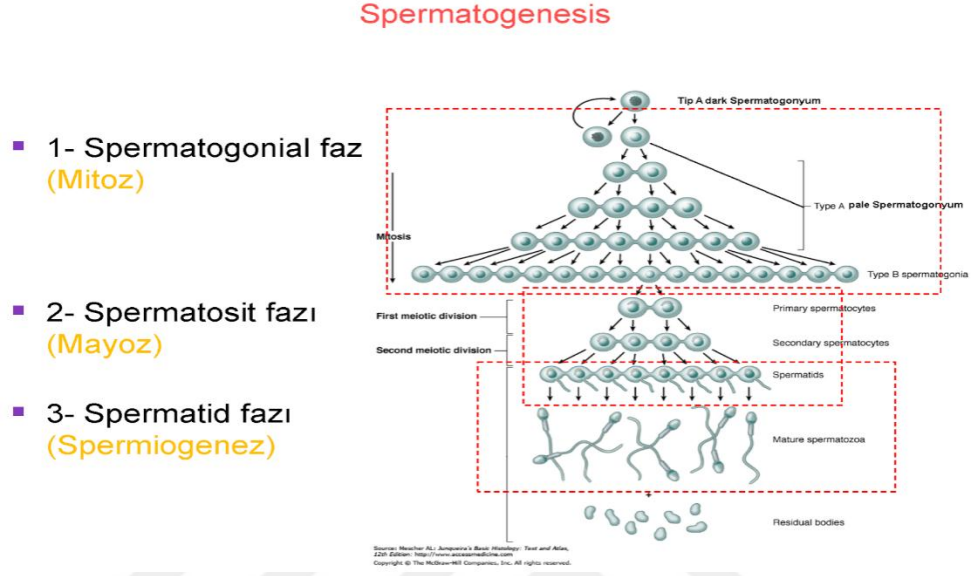
Spermatozoon üretiminin son aşamasıdır. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler; küçük boyutta, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilirler. Seminifer tübüllerde lümene yakın kısımda yer alırlar. Spermioyenez; akrozom oluşumu, çekirdek yoğunlaşması ve uzaması, kamçı gelişmesi ve sitoplazmanın büyük bir bölümünün kaybolmasını içeren karmaşık bir süreç olarak bilinir. Bunun sonucunda, seminifer tübül lümenine bırakılan olgun bir spermatozoon oluşur. (19)

Spermioyenez 3 evreye ayrılır;

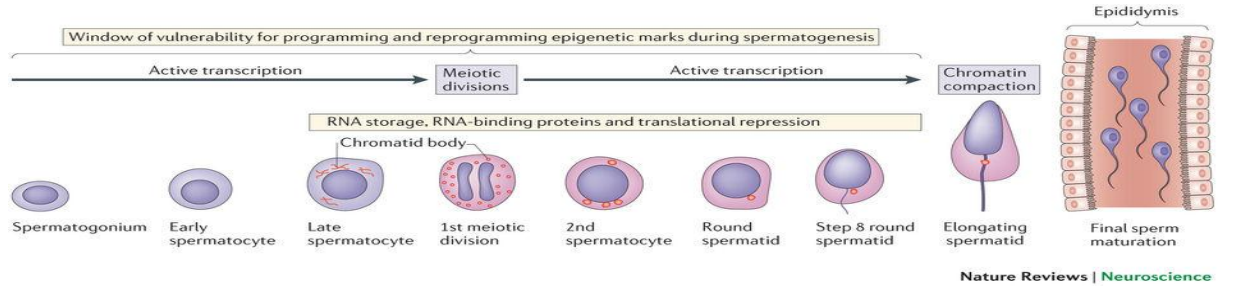
1) Golgi fazı; spermatidin sitoplazmasında, çekirdeğin yakınında belirgin bir golgi kompleksi izlenir. Mitokondriyuma, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum içerir. Proakrozomal granüller olarak bilinen PAS-pozitif küçük granüller golgi kompleksinde birikir. Daha sonra birleşerek zarla sınırlı bir akrozom vezikülünün içinde yer alarak tek bir akrozom granülünü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek, oluşan akrozomun karşı tarafından hücre yüzeyine yakın bir konumuna yerleşir. Kamçı aksonemi oluşmaya başlar. Sentriyoller yeniden çekirdeğe doğru göç ederken hareket ettikçe aksonem bileşenlerin çevresine sarılır.(19)

2) Akrozomal evre; akrozom vezikülü, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom; hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozom işlevi görür. Bu enzimlerin, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Spermioyenezin bu evresinde spermatid seminifer tübülün tabanına doğru yönelir ve aksonem lümene doğru uzanır. Çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Sentriyollerden biri gelişip kamçıyı oluşturur. Mitokondriyumlar ise kamçının proksimal kısmı etrafında toplanarak orta parça diye bilinen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge ise spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağıdır. Kamçı hareketi, mikrotübüller, ATP ve dynein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur. (19)

3) Olgunlaşma evresi; geriye kalan artık sitoplazma sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatozoonlar seminifer tübül'ün lümenine bırakılır.



Şekil 1: Spermatogenez; germ hücrelerinin gamete dönüşmesi (19)



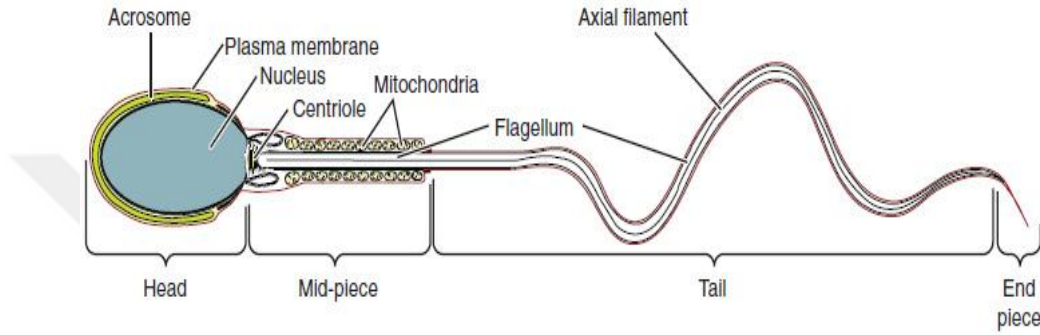
Şekil 2: Sperm maturasyonu'nun aşamaları (19)

Spermiogenezis dahil olmak üzere spermatogenezis yaklaşık olarak iki veya üç ay sürer. Spermiogenezis tamamlandığında spermier seminifer tübüllerin lümenine geçer. (19)

Sertoli hücreleri, seminifer tübüldeki germ hücrelerini besler ve destekler. Spermier seminifer tübülden depolanacakları ve işlevsel olarak olgun hale

getirilecekleri *epididimise* pasif olarak taşınır. Epididimis testisin arka kısmına yerleşmiş uzun kıvrıntılı kanallardan oluşur. (19)

Olgun sperm; baş ve kuyruktan oluşan, serbest yüzebilen, aktif olarak hareketli bir hücredir (Şekil 3).



Şekil 3: Sperm Hücresi'nin çizimle görünüşü (20).

Spermin başı ile kuyruğunun birleştiği yere **boyun** denir. Spermin başı, spermin en büyük kısmıdır ve haploid nükleus içerir. Nükleusun 2/3 ön kısmı **akrozom** oluşturur. Bu yapının içinde birçok enzim vardır. Ve bunlardan en önemlisi **akrozindir**. Bu enzimler spermin fertilizasyon sırasında korona radiata ve zona pellusidayı geçmesini kolaylaştırır. **Spermin kuyruğu;** orta parça, esas parça, son parça olmak üzere üç kısımdan oluşur. Kuyruk spermin hareketini sağlar ve fertilizasyonun gerçekleşeceği yere gitmesine yardımcı olur. Kuyruğun orta kısmında bulunan mitokondriler ise hareket için gerekli adenosin trifosfatı (ATP) sağlar. (20)

2.2. Semen Analizi (Spermiyogram):

- Erkek infertilite tanısı için ilk yapılması gereken ve en basit test spermiyogram analizidir.
- Erkek infertilite araştırılmasındaki ilk adım en az 4 hafta ara ile uygun yapılmış 2 semen analizi olmasıdır.
- Semen analizi için incelenecek ejakülat 3-4 günlük cinsel perhiz sonrasında, steril bir kaba alınmalı ve cinsel perhiz 7 günü geçmemelidir.

d) Örnek en geç 30 dakika içerisinde tetkik yapılacak laboratuvara getirilmiş olmalıdır.

e) Ejakülâtın makroskopik görünümü, miktarı, likefaksiyon zamanı, viskozitesi ve ph'ı değerlendirilir. İlk değerlendirme için iki örnek alınmalıdır. İki örnek arasında geçen zaman 7 günden az, 3 haftadan çok olmamalıdır. Semen analizinin en önemli kısmını ise mikroskopik inceleme oluşturmaktadır. (21)

Semenin Mikroskopik İncelenmesi:

Mikroskopik değerlendirme sonucunda spermiyogram WHO parametrelerine göre yorumlanır (Tablo 1-2).

TABLO 1: Semen Analizi İçin En Düşük Referans Parametreleri (21)

Semen hacmi	1.5ml
Total sperm (10^6 /ejakülât)	39 (33-46)
Sperm sayısı/ml (10^6 /ml)	15 (12-16)
Total motilite (%)	40 (38-42)
Progresif hareketli (%)	32 (31-34)
Canlılık (vitalite) testi (%)	58 (55-63)
Normal morfolojide sperm (%)	4 (3.0-4.0)
Ph	≥ 7.2
Peroxidaz pozitif lökosit(10^6 /ml)	< 1

TABLO 2: Sperm Konsantrasyonuna Göre Sınıflama (21)

Tanım	Sperm Sayısı (milyon/ml)
Azoospermi	0
Şiddetli Oligospermi	<1
Orta Oligospermi	1-5
Hafif Oligospermi	5-15
Normospermi	>15

1978 yılında Makler tarafından sperm sayımı için özel tasarlanmış Makler sperm sayım kamaraları kullanılmaktadır. Makler sayım kamarası ile sayım yapıldığında 10 tane orta boy karedeki toplam sperm sayısı milyon/ml olarak kaydedilir. Semen örneğinin incelendiği gözeneğin 10 µm derinliğinde olması spermatozoanın tek bir düzlemde serbest hareketine olanak sağlamakta, ayrıca sayım daha kolay yapılabilir. Bu alet ile hareketlilik yüzdeleri de daha kesin olarak saptanabilmektedir (22).

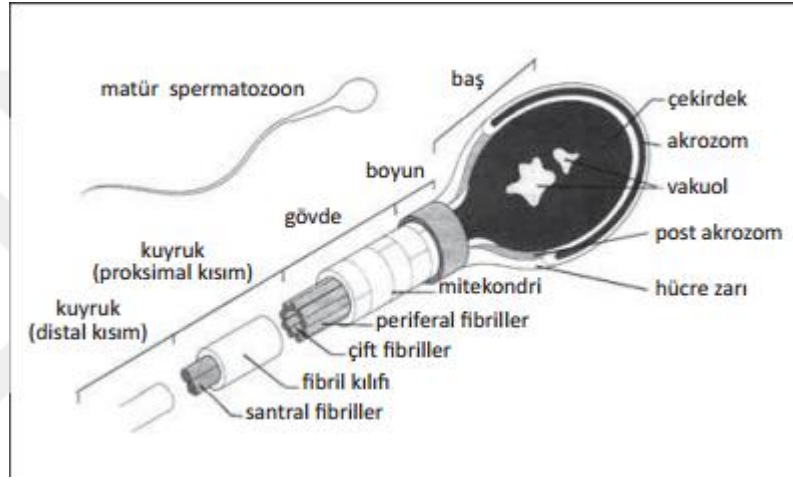
Mikroskopik incelemede sperm sayısı, hareketliliği, yuvarlak hücre sayısı ve morfoloji incelenir. Güvenilir bir değerlendirme için ideal olan 100 karedeki spermleri saymaktır. Tek karedeki ortalama sperm sayısı temel alınır sayım milyon/ml olarak ifade edilir. Sperm konsantrasyonu, total ejakülattaki 1 ml deki sperm sayısı olarak tanımlanır. Eğer 100 karelik alan içerisinde sperm görülmemiş ise alan dışındaki bölgeler de taranmalıdır. Ejakulatta sperm görülmez ise santrifüj edilerek pellete bakılmalıdır. Eğer santrifüj sonunda da sperm görülmez ise ‘‘azoospermik örnek’’ denilmektedir (23,24)

Sperm Morfolojisinin Değerlendirmesi

Sperm baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç ana parçadan oluşmaktadır. Baş kısmında akrozom, post akrozomal parça ve çekirdek (nükleus) bulunur. Kuyruk ise boyunla birlikte, orta parça, ana parça ve son parçadan meydana gelmiştir. Orta parçada spermin hareketi için enerji üreten mitokondriler yer alır. Spermin kuyruk kısmında oluşan anomaliler spermin motilitesi üzerine olumsuz etki oluşturur.

Spermin normal kabul edilebilmesi için baş ve kuyruğunun belirtilen kriterlerde olması gerekmektedir (6,7,8).

Sperm hücresi yaklaşık 60 µm uzunluğunda olup , . Baş bölgesi düzgün, sınırları düzenli ve çoğunlukla oval şekilli olmalıdır. Baş alanında %40-70'ini kaplayan akrozom bölgesi bulunmalıdır (9). Spermin hareketininden sorumlu olan kuyruk kısmı ise 45 µm uzunluğunda ve 0.4-0.5 µm çapında olmalıdır. Spermin kuyruk kısmı orta parçadan ince ve tek parça halinde ayrılmaktadır (25).



Resim 1. Normal sperm şekli görülmektedir (25).



Resim 2. Normal spermin bölümleri çizimde görülmektedir (25).

TABLO 3: Kruger Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi (21)

Baş	Uzunluk 5-6 mikron Genişlik 2.5-3.5 mikron
Akrozom	Başın %40-%70'ini oluşturmali
Orta Parça	Genişlik 1 mikron Uzunluk 1.5 x baş uzunluğu
Kuyruk	Boyu yaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış Kırık içermeyen
Sitoplazmik damlacık	Baş alanının %30-70'inden az Sadece orta parçada lokalize

Morfolojik değerlendirme için en az 200 sperm hücresinin incelenmesi gereklidir. İmmersiyon objektifi kullanılmalıdır, anormal sperm formları baş, ana parça ve kuyruk anormalliklerini içerir (Şekil 4)

Normal Spermin Morfolojik Özellikleri

Kruger kriterleri ve WHO kriterleri ile belirlenmiştir (Tablo 3). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre spermelerin en az %30 'unun morfolojisinin normal

olması gerekirken, Kruger kriterlerine göre $>4\%$ normal morfolojili sperm olması gereklidir (21).

Sperm Hareketliliği ve Motilitenin Değerlendirilmesi

Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen ve hareketliliği dört dereceyle değerlendiren sistem uygulamasının kolay olması nedeniyle rutin semen analizinde tercih edilmektedir. Hareketlilik WHO kriterlerine göre 0 (hiç sperm yok) ile 4 (iyi ileri hareketli) arasında dört sınıfta değerlendirilmektedir:

- a- Hızlı doğrusal ilerleyici hareket (+4)
- b- Yavaş doğrusal ya da doğrusal olmayan ilerleyici hareket (+3)
- c- Yerinde hareket (+2)
- d- Hareketsiz anormal (+1)

Motilite $\% 0$ olduğu durumlarda vitalite (canlılık) testi yapılmalıdır. Bazı örneklerde spermelerin büyük çoğunluğu vital fakat hareketsiz olabilmektedir. Vitalite testinde canlı sperm oranı $> 70\%$ olmalıdır (21).

2.3. SPERM KROMATİNİ VE KROMATİN KONDANSASYONU

Sperm hücrelerinin nükleus yapısı ,spermiogenez sırasında kromatinin sıkı paketlenmesi sonucu histonların protaminler ile yer değiştirmesi ile şekillenir. Sperm DNA'sı kromatini oluşturan proteinlerin sıkı paketlenmesi ile korunmaktadır . Bu yapı mitotik kromozomlardan altı kat yoğun bir şekilde olup tüm nükleer yapının tamamını kaplar (26). Fakat somatik hücre DNA'sı sadece sperm çekirdek yapısının bir kısmını kaplar(26) Sperm çekirdek yapısının somatik hücrelerde görülen paketlenme şekli için gerekli yapıya sahip değildir. Bunun nedeni; DNA'nın tek ve sıkıca paketlenmiş nükleozom içerisinde $9.9 \mu\text{m}^3$ hacime sahip olması gerekir ki bu ortalama bir sperm nükleer yapısının iki katından fazladır. (27)

Sperm kromatin paketlenmesi 4 farklı şekilde olur. Kromozomun sıkıca bağlanması, DNA'nın nükleer matriksine tutunup DNA halka bölgesini oluşturması, histonların proteinler ile yer değiştirmesi, DNA'nın kalın bir şekilde yoğunlaşması ve kromozomlarının yerlerinin belirlenmesidir (27). Paketlenmede geçiş proteinleri (T1,T2) yer almaktadır.Geçiş proteinleri histon proteinlerini yerlerinden çıkarmasına neden olur. Bu olay ileri bir aşamada yoğunlaşan kromatinden çıkarılırlar böylece protaminler ile yer değiştirirler. Kromatin yoğunlaşması ise posterior kutupta başlayıp apikal kısma doğru ilerler. Bu olay sadece insanlarda görülmekte, diğer memeli türlerinde görülmemektedir (28).Epididimde sperm olgunlaşmasının son kromatin organizasyonu görülür. Burada disülfid bağlarının meydana gelmesiyle birlikte protaminlerin çapraz olarak bağlanmasını sağlar. Sperm kromatin kondansasyonunda etkili olan protaminlerin sisteinlere sahip olmaları nedeni ile desteklenir ve bunların iç ve ara protamin disülfid çapraz bağlantılarıyla sperm kromatin kondansasyonuna neden olurlar(29).

Memeli spermi, kromatin yapı ve kompozisyonu bakımından somatik hücrelerden farklıdır. Sperm kromatin yapısı erkek ve dişi üreme kanallarından geçerken, paternal genomun genetik bütünlüğünü koruyacak şekilde yapılanmıştır (30,31).

Memelilerde spermiyogenez 3 önemli olay ile gerçekleşir:

- 1) Akrozom gelişimi;
- 2) Keratin kılıf içine yerleşmiş, dinamik bir aksonemden oluşan kuyruğun organizasyonu;
- 3) Nukleusun kondansasyonu ve uzaması ile birlikte, etrafının mikrotubuller/keratin yapısında bir kılıf ile çevrenmesi.

Spermde yüksek kondansasyon gösteren türe özgü nukleus şekli oluşurken, somatik tip histonlar ve protamin adı verilen bazı nuklear proteinlerle yer değiştirir ve kromatin sıkı şekilde paketlenir. İnsanın da yer aldığı bazı memeli türlerinde bu değişim sırasında, geçiş nuklear proteinleri (transition nuclear protein- TP) olarak bilinen özel proteinler görev alır. (32,33,34)

P1 protamin ve P2 protamin olmak üzere iki tip protamin vardır. P1 ve P2 proteinlerinin ekspresyon değişikliğinin erkek infertilitesi ile bağlantısı olduğu ve infertil hasta gruplarında protamin genlerinde mutasyon olduğu saptanmıştır. Transgenik farelerde yapılan bazı çalışmalar sonucunda; protamin ekspresyonlarındaki farklılıkların sperm nükleusunda yapısal defektlere yol açtığı ve infertiliteye sebep olduğu görülmüştür. Protamin ekspresyon değişikliğinin sperm DNA hasarını arttırdığı görülmüştür (35,36).

İnsanda 16. Kromozomda, her haploid genom için bir kopya protamin 1 geni ve bir kopya da protamin 2 geni bulunmakta ve bu genler tek bir intron içermektedir. P1 olgun protein olarak sentezlenirken, P2 tek bir gen tarafından kodlanan öncül proteinden proteolizisle oluşturulur (37,38).

İnsan sperm nükleusunda P1 miktarı P2 miktarına yakındır. Bu yüzden P1/P2 oranı yaklaşık 1'dir.(39,40) İnfertil hastalarda saptanan P1/P2 oranı değişikliklerinin sperm DNA'sını etkilediğine ve DNA hasarını arttırdığına dair bulgular vardır (41,42).

Protaminler DNA'ya bağlanmadan önce fosforile olur ve nükleoprotamin oluşmasıyla defosforile olur (43). DNA'ya bağlandıktan sonra protaminler arasında disülfid bağları nükleoprotamin kompleksini daha kararlı hale getirir (44).

Spermatogenezin son safhasında nükleozomal yapı parçalara ayrılarak önce geçiş proteinleri yerleşmekte ve daha sonra da protaminlerle yer değiştirilmektedir. Geçiş proteinlerinin spermiyogenezde önemi büyüktür. Yapılan çalışmalar TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin DNA'nın bütünlüğünü koruduğunu ve protaminlerin kromatin üzerinde sağlam yerleşmelerini sağladığını ortaya koymuştur. TP2 genin regülatör bölümü spermatidlerde CAT genini etkileyerek mRNA translasyonunu geçici olarak 6 gün geciktirir (45).

Bu süreçte, konfigürasyonundaki değişiklikler nedeniyle kromatinin dış faktörlere hassasiyeti artar. Transkripsiyondaki duraklama sayesinde, DNA'da meydana gelebilecek hasarlara da izin verilmez. TP1'in de DNA kırıklarında tamir edici rolü olduğu görülmüştür (46) .

Normal spermiyogenezde spermatidlerde histonların uzaklaştırılması sırasında, endonukleaz olan topoizomeraz-II, DNA iplikçilerinden birini keserek aradan bir parçayı çıkarır. TP1 araya girer ve DNA'nın fosfat gruplarıyla etkileşerek açıklığı doldurur. DNA ligaz enzimi de TP1'in iki ucunun orijinal DNA iplikçisine bağlanmasını sağlar. Ortama gelen protaminler de TP1 üzerine tutunurlar. Yan yana gelen kromatinler üzerindeki protaminler arasında disülfid bağları oluşarak, kromatin iplikçilerinin yakınlaşması sonucunda kondensasyon gerçekleşir. Bu mekanizma TP1'in eksikliğinde neden kromatin kondensasyonunun bozulduğunu göstermektedir. Bütün bu olaylar, geçiş proteinlerinden TP1'in DNA tamirinde rolü olduğunu göstermektedir. Fizyolojik şartlarda ortaya çıkan DNA kırıklarının tamir mekanizmasındaki yetersizlikler ve patolojik durumlarda meydana gelen DNA hasarlarındaki artış, fertilizasyonda olumsuz bir etkiye sahiptir.

Başlangıç kromatin değişikliklerinin biri de histon çeşitlerinin birleştirilmesidir. Diğer önemli bir olay da in vivo nükleozom ayrılmasında önce spermiyogenez sırasında oluşan histon hiperasetilasyonudur. In vitro olarak nükleozomların ayrılmasında histon hiperasetilasyonu ve histonların protaminlerle yer değiştirmesi gösterilmiştir. Testis-spesifik bromodomain içeren protein hiperasetile histon 4'e bağlanarak kromatinin yeniden organizasyonu tetikler. Çiftlenmiş olan H4 hiperasetilasyonu infertil hastalarda tesbit edilmiştir. Nükleozom parçalanmasıyla, sperm DNA'sı geçiş proteinleri ile kompleks oluşturularak uzar. Geçiş proteinleri nükleoprotamin formu oluşturur ve protaminlerle yer değiştirir. Protaminler DNA'ya bağlanmadan önce fosforile olur ve DNA'ya bağlandıktan sonra protaminler arasında disülfid bağları oluşarak ve daha kararlı nükleoprotaminler oluşur (35,47,48,49,50).

Sperm nükleolusundaki DNA, nükleoprotaminle organize olmamıştır. DNA'nın %85'i protaminlerle, %15'i histon veya diğer proteinlerle birleşmiştir

2.4. SPERM KROMATİN KONDANSASYON TESTLERİ

DNA'nın bütünlüğü ve kalitesinin analiz edildiği test sistemlerinden, DNA paketlenmesi ve matürasyonunun incelendiği testler geliştirilmiştir. Spermiyogenez sırasında protaminler ile yer değiştiren, somatik hücrede predominant olan ve histon olarak adlandırılan nükleer proteinler spermatozoada önemli parçadır.

Disülfid köprülü protaminler DNA'nın minör parçalarına uyan temel proteinlerdir. Fosfat gruplarının negatif yüklerini nötralize ederler ve böylece DNA'nın komşu zincirindeki majör parçasına uyum sağlamak için lineer dizilim oluşturmasını sağlarlar. Bu da yoğunlaşmış sperm nükleusunda DNA'nın total volümün %90'dan fazlasını oluşturması ile sonuçlanır. Diğer taraftan, mitotik kromozomlardaki DNA %15 ve somatik hücrelerde %5 civarındadır (27) .

Dengesiz kromatin dağılımında; histonlar sperm nükleusuna girer ve spermatozoon oosite girdikten sonra, erkek genomundaki dekondansasyon problemine neden olur. Bu nedenle spermiyogenez sırasında, sperm maturasyon sürecinde anormallikler gösteren bu hastalar subfertil veya infertildir (18,51,52).

Sperm kromatin dağılımının değerlendirilmesinde çeşitli metotlar vardır. Anilin mavisi boyası, Toluidin mavisi boyası ve Kromomisin A3 boyası bunlara örnektir.

2.5. SPERM DNA HASARLARI

Erkek infertilitesi kompleks bir hastalık olmakla beraber çeşitli patolojileri de içermektedir. Sperm fonksiyonlarının incelenmesinde sperm kromatin anormallikleri incelenmesi infertilite çalışmalarının bir kısmını oluşturur. Sperm nükleusunda ortaya çıkan DNA hasarları ile infertilite ve gebelik oluşumu arasında bir ilişki olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (11,12,13,14,15) .

Zini; denatüre ve fragmente DNA taşıyan spermatozoa oranlarının, sperm parametrelerindeki bozulma ile orantılı olarak anlamlı bir ilişki gösterdiğini, infertil erkeklerde (sırasıyla %25 ve %27) fertillere göre (sırasıyla %10 ve %13) hasarlı DNA oranının daha yüksek bulunduğunu ($p=0.028$ ve $p=0.016$) bildirmektedir (30) .

Elde edilen sonuçlar, fertilité potansiyelinin belirlenmesinde sperm DNA'sı sağlamlığının değerlendirilmesinin standart sperm analizi sonuçlarından daha anlamlı olduğunu dűşündürmektedir.

İdiopatik infertilite olguları ile karşılaştırıldığı zaman, normospermik fertil erkeklerin spermlerinde DNA hasarının bulunma oranlarının anlamlı ölçűde azaldığı görűlmektedir (53).

Sperm DNA hasarının oluşumunda başlıca üç önemli mekanizma üzerinde durulur. Bunlardan birincisi matür spermde anormal kromatin paketlenmesidir. Yapılan çalışmalar sperm DNA hasarının çoğunun, spermde anormal kromatin paketlenmesi olduğunu göstermiştir (54,55,56).

Sperm DNA hasarının görűlmesine neden olan ikinci mekanizma ise; spermatogenez sırasında hasarlı germ hűcresinin genetik havuzdan fonksiyonel olarak elimine olabildiđi programlı hűcre ölűmü olan apoptozisten, hasarlı DNA'ya sahip spermatozoaların kaçmasıdır (abortive apoptozis) (57,58,59).

Üçüncü mekanizma ise; kötü semen kalitesine eşlik eden, özellikle azalmış protaminasyon ve disűlfid bađ yapımı varlığında reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesidir (60) .

Bunun yanı sıra; ilerleyen baba yaşı, lökosperminin eşlik ettiği genital sistem enfeksiyonları ve spermatogenez sürecine etki yapan çeşitli ilaç veya toksik ajanların etkisi ile sperm DNA hasarının ortaya çıktığı bilinmektedir (10). Reaktif oksijen türleri de sperm indüklenmiş çapraz hasarına neden olabilir (61). Sigara içen ve içmeyenlerde görűlen DNA kırıklarının sebebinin oksidatif stres olma olasılığı vardır (62). Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi ve ışın tedavisi de sperm DNA hasarına neden olabilmekte ve bu olay bir süre devam edebilmektedir. Son olarak sperm hazırlama tekniğinde yüksek hızda santrifűj işleminde sperm DNA hasarına neden olabilir (63-64).

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sırasında, hasarlı DNA'nın fertilizasyonunun önlenemeyeceği ve bu genetik materyali taşıyan embriyoların oluşabileceği vurgulanmıştır (60,10,65). Bu olay doğal yolla fallop tüplerine tutunan

spermatozoaların, tutunmayanlara göre daha fazla oranda sağlam DNA'ya sahip olduklarını göstermektedir (66).

2.5. ERKEK İNFERTİLİTESİ

İnfertilite, 1 yıl boyunca korunmasız düzenli ilişkiye rağmen gebelik oluşmamasıdır. İnfertilite nedeniyle başvuran çiftlerin yaklaşık %50'sinde neden olarak erkek faktörü rol oynamaktadır (67). Erkek infertilitesine yol açan başlıca nedenler Tablo 4'de verilmektedir.

Tablo 4. 7057 erkeğin değerlendirilmesiyle saptanan infertilite nedenleri ve oranları (world health organization,2000) (67).

ETYOLOJİ	% ORAN
SEKSÜEL NEDENLER	1,7
ÜROGENİTAL ENFEKSİYON	6,6
KONJENİTAL ANOMALİLER	2,1
KAZANILMIŞ FAKTÖRLER	2,6
VARİKOSEL	12,3
ENDOKRİN PATOLOJİLER	0,6
İMMÜNOLOJİK FAKTÖRLER	3,1
DİĞER ANOMALİLER	3
AÇIKLANAMAYAN ANORMAL SEMEN (OAT) VEYA KANITLAMAYAN NEDENLER	75,1

Bu infertilite nedenlerinin bir kısmı tanımlanabilir ve düzeltilme olasılığı vardır (hipogonadotropik hipogonadizm), bazılarının tanımlanabilmesine düzeltilme

olasılığı yoktur (Orşite bağlı bilateral testis atrofisi) . Normal semen analizinde gebelik oluşmuyor ise açıklanamayan infertilite tanısı konur. Erkek infertilisinde tedaviyi belirleyen faktörler vardır. Bunlar; infertilite süresi, primer veya sekonder infertilite, semen analizi sonuçları ve eşinin yaşıdır. Değerlendirme sırasında; reproduktif hikaye, muayene ve en az iki semen analizi yapılmalıdır. Bu iki semen analizi arasında en az bir aylık arayla değerlendirme baz alınmalıdır (68).

Dünya Sağlık Örgütü 2010 kriterlerine göre normal semen analizi bulguları aşağıdaki tabloda belirtilmektedir:

Tablo No 5: Sperm Parametreleri Ve Normal Referans Değerleri (21)

Sperm parametreleri	Normal referans değerleri
Ejakülat volümü	< 1,5 ml
Sperm konsantrasyonu	➤ 15 milyon/ml
Total sperm sayısı	➤ 22,5 milyon/ejakülat
Motilite	➤ %40
İleri hareket skoru (0-4)	➤ 2
Normal morfoloji (WHO)	➤ %50
Normal Morfoloji Kruger	➤ %4
Sperm Aglutinasyonu(skor 0-3)	< 2
Yuvarlak hücreler	< 1 milyon/ml
Vizkozite (0-4)	< 3

Erkek fertilitesinde azalma; konjenital ya da kazanılmış ürogenital bozukluklardan, genital sistem enfeksiyonlarından, skrotal ısı artımından (varikozel),

endokrin bozukluklardan, genetik hastalıklardan ve immünolojik faktörlerden kaynaklanabilir (69). Olguların %60-75'inde sorumlu bir faktör bulunmaz (idiyopatik erkek infertilitesi). Böyle erkekler fertilité problemiyle ilgili olabilecek geçmişe ait bir hikaye vermeksizin, normal fizik muayene bulguları ve endokrin laboratuvar sonuçlarıyla başvururlar.

Semen analizi sonucu mililitredeki spermatozoa sayısı 15 milyondan az ise oligozoospermi, motil sperm oranı %40'dan küçükse astenozoospermi , normal morfolojiye sahip sperm oranı Kruger kriterlerine göre %4'ten, Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre %30'dan az ise teratozoospermi tanımları yapılır. Semen analizinde sperme rastlanmadığı zaman semen 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilmeli ve oluşan pellet mikroskop altında incelenerek sperm aranmalıdır. Pellet içinde eğer sperme rastlanılmazsa bu durumda *azoospermi* tanısı konur. *Azoospermik* vakalar kendi içerisinde obstrüktif ve non-obstrüktif *azoospermi* olarak ikiye ayrılmaktadır. Obstrüktif azoospermi de sperm üretimi normal bir şekilde olmasına rağmen proksimal veya distal ejakülator kanal obstrüksiyonu (tıkanma) nedeniyle kesintiye uğramasıdır. Non-obstrüktif azoospermi durumunda ise sorun primer testiküler yetmezlik, hormonal patolojiler ve genetik anomaliler olabilir (70).

Erkek üreme ve cinsel fonksiyon hipotalamo-hipofizer-gonadal sisteme bağlıdır. İnfertil erkeklerin endokrinolojik incelenmesi sonucunda %0,6 hastada endokrinolojik bir anomali olduğu ortaya çıkmıştır (71). Endokrinolojik inceleme anormal semen analizi, bozulmuş cinsel fonksiyon ve endokrin bir hastalığı düşünüldüğü zaman yapılmalıdır. İlk incelemede ise FSH (Folikül sitümüle edici hormon) ve total testosteron incelenmesi yapılır. Endokrinolojik inceleme azospermi hastalarda da çok önemlidir. Azospermi vakalarında eğer FSH değeri 7,6 mIU/ml'nin altında ise obstrüktif azospermi gösterirken, FSH değeri 7,6 mIU/ml'nin üzerinde ise non- obstrüktif olduğunu göstermektedir (72).

2.6. ANİLİN MAVİSİ HİSTOKİMYASI

Anilin mavisi boyası; lizinden zengin histonlar ile arginin zengin proteinler arasındaki farkı belirlememize yardımcı olur. Bu teknik lizin için pozitif reaksiyon ihtiyacını karşılayarak spermin temel proteinindeki farklılıklarını ortaya koymaktadır. Kısacası DNA protein yapısını belirlememize yardımcı olur. Sperm hücresinde, histon proteinlerinin çok olması lizin proteinlerinin de çok olduğu anlamına gelmektedir. Bu sebeple mavi boyanır. Ancak protamin bakımından zengin sperm hücrelerinde arginin/sistein proteinleri bulunduğundan mavi renkle boyanma görülmez (18) .

Anilin mavisi Sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla kullanılan asidik bir boyadır. Hasarlı DNA'ya sahip spermler rezidüel histonları açığa çıkararak anilin mavisi boyasına bağlanma da yatkınlık sağlar (18).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Data'nın Temini

Çalışma datası, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi laboratuvarına 2016-2017 yılları arasında infertilite şikayeti ile başvuran erkek hastaların sperm örneklerinden elde edilmiştir. Çalışma için Bezmialem Vakıf Üniversitesi etik kurulundan 14.10.2015 tarihinde 71306642-050.01.04 sayı ile onay raporu alınmıştır.

3.2. Örneklerde semen analizi ve fiksasyon tiplerinin uygulanma

Semen analizi; İnfertilite kliniğine başvuran 42 hastadan alınan semen örneklerinden (3-5 günlük abstinens) likefiye olmalarını takiben 5 ayrı yayma preparat hazırlandı. Semenden alınan 20 şer mikrolitre örneklerde sperm motilitesi ve konsantrasyonu bakıldı. Semen volümü ve Ph sı not edildi. Semen parametreleri için WHO 2010 kriterleri uygulandı.Sperm motilitesi için lam lamel arası 15 mikrolitre örneklerde progressif motil ,yerinde ve duran sperm yüzdeleri hesaplandı. 1. Yayma preparat Diff Quick boyası ile boyanarak sperm morfolojisi bakıldı. Diğer 4 örnekten

1. örnek % 2,5 glutaraldehit, 2. örnek % 10 formaldehit,3. örnek % 98 etil alkol ve 4. Örnek metanol+asetik asit(3/1) ile 30 dakika fikse edildi.

3.3. Asidik anilin mavisi boyasının uygulanması;

Fikse edilen her lam 5 er dakika % 5 anilin mavisi solüsyonunda tutuldu (pH 3,5). Fosfat tampon ile yıkandı, kurutuldu. İmmersiyon objektifi ile x100 büyütmede boyanan ve boyanmayan spermlerin yüzdesi 200 adet sperm sayılarak hesaplandı. Bu değer % kromatin kondansasyonu olarak değerlendirildi.

3.4 İstatistik Yöntemler:

Hasta verileri SPSS 21.0 (SPSS Inc) istatistik programına kaydedildi. Tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma hesaplanmıştır. Dört fiksatif yöntemini kromatin kondansasyon değerleri bakımından karşılaştırmak için Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi uygulanmış, anlamlılık düzeyi 0.05 olarak seçilmiştir.

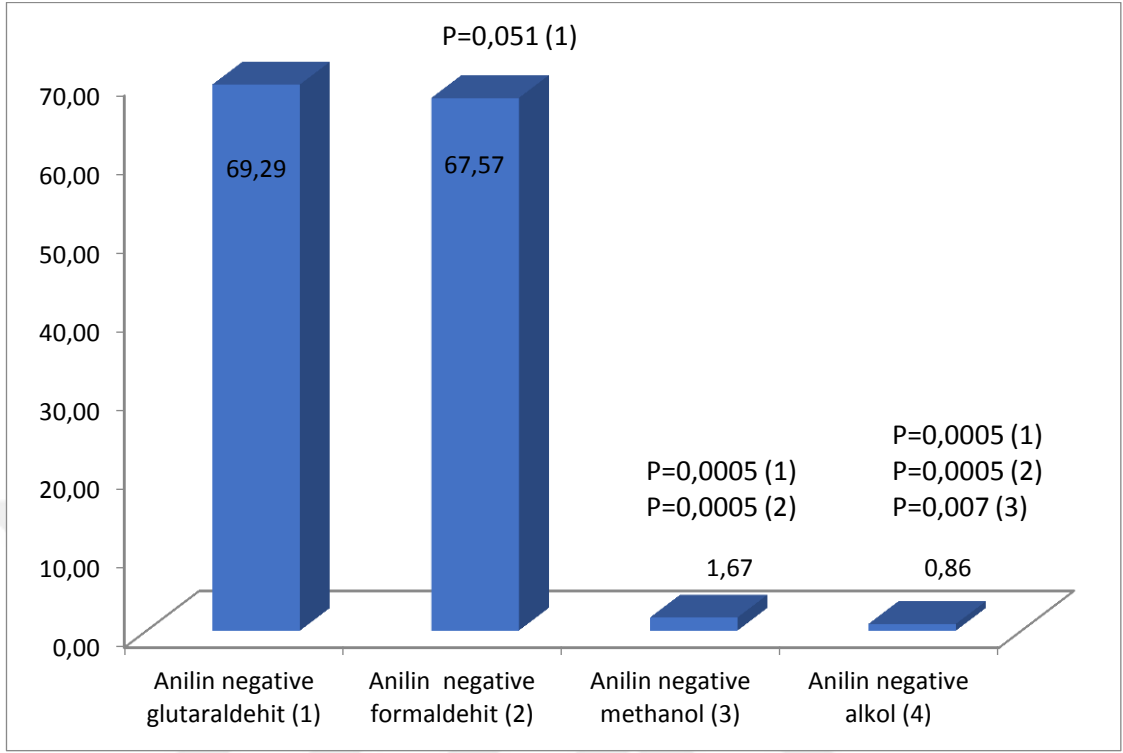
4. BULGULAR:

Bu çalışma; 2016-2017 tarihleri arasında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Merkezi laboratuvarına infertilite şikayeti ile başvuran çiftlerden alınan spermiogram örneklerinde yapıldı ve aynı örneklere farklı fiksatifler kullanılarak asidik anilin mavisi testinin farklı fiksatiflerde kromatin kondansasyonu sonuçlarına etkisi incelendi.

Anilin blue test uygulamasının formaldehit, methanol ve etil alkol fiksasyon sonucunda elde edilen anilin negatif hücre yüzdesinin, başka bir deyişle kromatin kondansasyon oranlarının glutaraldehit fiksasyonu ile elde edilen negatif hücre oranı ile karşılaştırması yapıldı.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan semen örneklerine ait verilerin ortalama ve standart sapmalar.

n=42	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma
Sperm konsantrasyonu x106	2,60	135,00	44,07	34,19
Total sperm x106	13,00	441,00	158,74	121,72
İleri hareket	9,00	71,00	48,48	14,04
Yerinde hareket	4,00	17,00	7,69	3,08
Hareketsiz	25,00	78,00	43,83	11,62
Normal morfoloji	1,00	8,00	3,36	1,97
Anilin pozitif glutaraldehit	22,00	48,00	30,71	5,93
Anilin negatif glutaraldehit	52,00	78,00	69,29	5,93
Anilin pozitif metanol	85,00	100,00	98,33	2,92
Anilin negative metanol	0,00	15,00	1,67	2,92
Anilin pozitif formaldehit	24,00	43,00	32,43	5,19
Anilin negatif formaldehit	57,00	76,00	67,57	5,19
Anilin pozitif alkol	95,00	100,00	99,14	1,63
Anilin negatif alkol	0,00	5,00	0,86	1,63

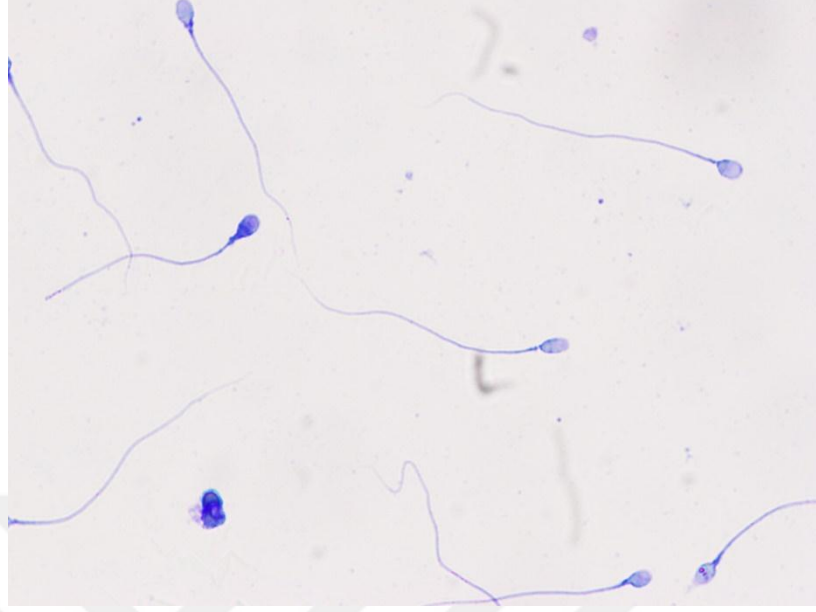


Şekil 4: Farklı fiksatiflerde kromatin kondansasyon miktarlarının karşılaştırması (Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi).

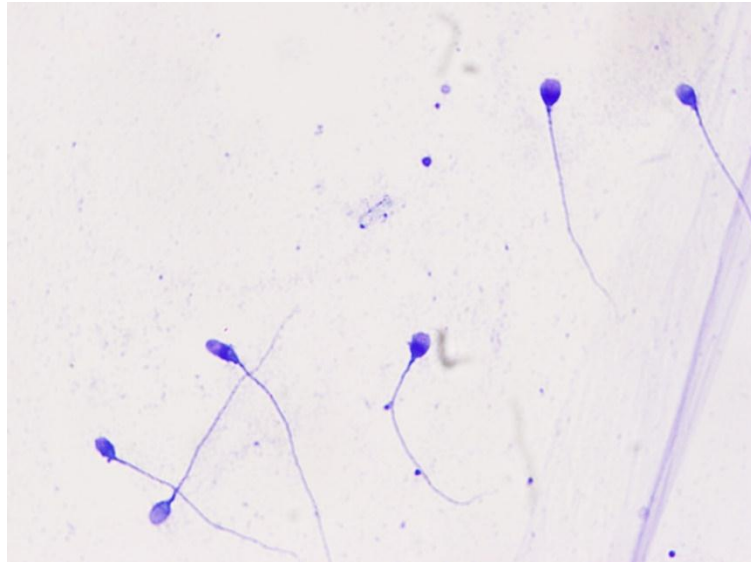
Tablo 7 : Fiksatif yöntemlerine ilişkin korelasyon analizi.

	Anilin negatif glutaraldehit	Anilin negatif metanol	Anilin negatif formaldehit	
Anilin negatif metanol	r	-0,483**		
	p	0,001		
	n	42		
Anilin negatif formaldehit	r	0,849**	-0,393*	
	p	0,051	0,010	
	n	42	42	
Anilin negatif alkol	r	-0,452**	0,809**	-0,347*
	p	0,003	0,0005	0,024
	n	42	42	42

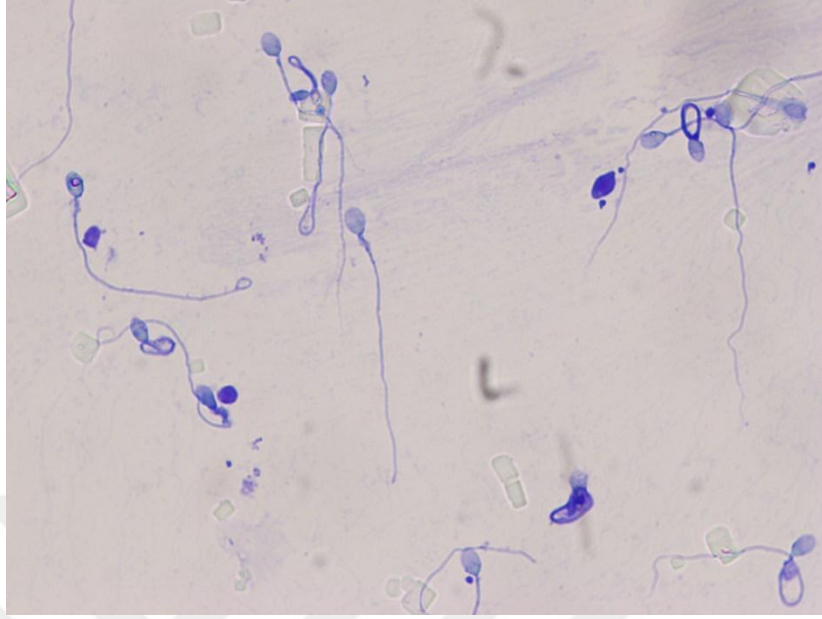
Dört fiksatif yöntemi arasında da korelasyon saptanmıştır. Glutaraldehit ile metanol ve glutaraldehit ile alkol arasında ters yönde ilişki bulunmuştur; glutaraldehitte kromatin kondansasyon miktarları artarken metanol ve alkolde azalmaktadır. Buna karşın glutaraldehit ile formaldehit arasında ve metanol ile alkol arasında pozitif yönde ilişki bulunmaktadır. Formaldehit ile metanol ve formaldehit ile alkol arasında negatif yönde ilişki saptanmıştır; formaldehitte kromatin kondansasyon miktarları artarken metanol ve alkolde azalmaktadır.



Resim 3. Glutaraldehit fiksasyonu ile anilin blue testinin gösterilmesi X400



Resim 4. Metanol fiksasyonu ile kromatin kondansasyonunun anilin mavisi ile gösterilmesi X400



Resim 5. Formaldehit fiksasyonu ile anilin blue testi X400



Resim 6. Etil alkol fiksasyonu ile anilin mavisi testi X400

5.TARTIŞMA:

Erkek infertilitesi kompleks bir hastalık olmakla beraber çeşitli patolojileri de içermektedir. Sperm fonksiyonlarının incelenmesinde sperm kromatin anormallikleri incelenmesi infertilite çalışmalarının bir kısmını oluşturur(11,12,13,14,15). DNA'nın bütünlüğü ve kalitesinin analiz edildiği test sistemlerinden, DNA paketlenmesi ve matürasyonunun incelendiği testler geliştirilmiştir. Spermiyogenez sırasında protaminler ile yer değiştiren, somatik hücrede predominant olan ve histon olarak adlandırılan nükleer proteinler spermatozoada önemli parçadır.

Disülfid köprülü protaminler DNA'nın minör parçalarına uyan temel proteinlerdir. Fosfat gruplarının negatif yüklerini nötralize ederler ve böylece DNA'nın komşu zincirindeki majör parçasına uyum sağlamak için lineer dizilim oluşturmasını sağlarlar. Bu da yoğunlaşmış sperm nükleusunda DNA'nın total volümün %90'dan fazlasını oluşturması ile sonuçlanır. Diğer taraftan, mitotik kromozomlardaki DNA %15 ve somatik hücrelerde %5 civarındadır (27). Dengesiz kromatin dağılımında; histonlar sperm nükleusuna girer ve spermatozoon oosite girdikten sonra, erkek genomundaki decondensasyon problemine neden olur. Bu nedenle spermiyogenez sırasında, sperm maturasyon sürecinde anormallikler gösteren bu hastalar subfertil veya infertildir (18,51,52). Sperm kromatin anormalliklerinin nedeni; spermiyogenez sırasında DNA paketlenmesi sırasında yada paketlenmesi sonucu gerçekleşir. Çevresel faktörler, gen mutasyonları ve kromozom anormallikleri spermiyogenez sırasında meydana gelirse kromatin yapıda anormal bir yapıya neden olur. İnsan spermünde görülen kromatin anormalliklerin neden kaynaklandığı tam olarak bilinmemektedir. Bu konuda başlıca 3 mekanizmadan söz edilir. Bunlar; sperm kromatin paketlenmesi, programlanmış hücre ölümü ve oksidatif stres (73).

Sperm kromatin hasarında en önemli etken olarak lökositospermi'dir. Reaktif oksijen türleri de sperm indüklenmiş çapraz hasarına neden olabilir. Sigara içen ve içmeyenlerde görülen DNA kırıklarının sebebi oksidatif stres olma olasılığı vardır. Kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi ve ışın tedavisi gibi olaylara maruz

kalındığında sperm DNA hasarı görülür ve bu olay bir süre devam edebilir. Son olarak sperm hazırlama tekniğinde yüksek hız santrifüj işlemi de sperm DNA hasarına neden olabilir(10,61,62,63,64).

Sperm kromatin dağılımının değerlendirilmesinde önce de belirttiğimiz gibi çeşitli metotlar vardır. Anilin mavisi boyası, Toluidin mavisi boyası ve Kromomisin A3 boyası bunlara örnektir.

Anilin mavisi boyası, lizinden zengin histonlar ile arginin zengin proteinler arasındaki farkı belirlememize yardımcı olmaktadır. Bu teknik lizin için pozitif reaksiyon ihtiyacını karşılayarak spermin temel proteinindeki farklılıklarını ortaya koymaktadır. Kısacası DNA protein yapısını belirlenmesinde yardımcı olmaktadır. Sperm hücresinde, histon proteinlerinin çok olması lizin proteinlerinin de çok olduğu anlamına gelmektedir. Bu nedenle mavi boyanır. Ancak protamin bakımından zengin sperm hücrelerinde arginin/sistein proteinleri bulunduğundan mavi renkle boyanma görülmez (18).

Anilin mavisi Sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla laboratuvarında kullanılan asidik bir boyadır. Hasarlı DNA'ya sahip spermier rezidüel histonları açığa çıkararak anilin mavisi boyasına bağlanmada yatkınlık sağlamaktadır(18). Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde,bazı çalışmalarda sperm kromatin kondensasyon anomalilerinin sperm motilitesi ,morfolojisi ve konsantrasyonu ile ilişkisi gösterilemedi, buna karşılık diğer çalışmalarda ise kondansasyon anomalilerinin DNA fragmentasyonu ile korelasyon gösterdiği bulundu (74).

A. Sellami ve arkadaşları 2013 de yaptıkları çalışmada kromatin matüritesi ile sperm parametrelerini karşılaştırdılar , araştırmacılar bazı spesifik baş anomalilerinin kondansasyon defekti ile korelasyon gösterdiğini, özellikle akrozomal anormalliklerinin bu konuda önemi olduğunu gösterdiler (75). Araştırmacılar genel olarak protaminasyon anomalilerinin spermatogenezde ortaya çıkan bir hata ile ilişkili olduğu konusunda hemfikirdirler.Aoki ve Irez ve ark. Tarafından yapılan çalışmalar sperm protamin yetersizliklerinin sperm konsantrasyonu, motilitesi ,morfolojisi ve DNA fragmentasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (74-76).

Kromatin yapısının anormal oluşu ile DNA hasarlarının paralel seyrettiği pek çok araştırmada gösterilmiştir (77).

Çalışmamızda Anilin mavisi testinin farklı fiksatifler ile histonların görülebilmelerini test etme amacı ile kantitatif bir işlem gerçekleştirdik. Kuşkusuz bu testin doğru sonuç vermesi çok önemlidir. Çalışmamızda glutaraldehit fiksasyonu gibi formaldehit fiksasyonunun da benzer sonuç vermesi, yöntemin uygulanmasında hem ekonomik hem de çok bulunan bir fiksatif olması açısından formaldehitin avantajını ortaya çıkarmıştır.

Sonuç olarak sperm kromatin matüritesini gösteren bir test olan anilin mavisi testinin glutaraldehit fiksasyonu ile birlikte formaldehit fiksasyonu ile de güvenle kullanılabileceği çalışmamızda ortaya çıkmıştır.

6.KAYNAKLAR:

1. Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi Ve Klinik Önemi. Türk Ürol Sem 2011; 2:11-7
2. Koşar AP, Özçelik N. Erkek İnfertilitesinde Genetik Değerlendirme. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
3. Q'Hara L, Smith BL. Androgen Receptor Roles In Spermatogenesis And Infertility. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2015; 26: 595-605
4. Akman AH, Erden FH, Tosun BS, Bayazıt N, Aksoy E Ve Bahçeci M. Comparison Of Agonistic Flare-Up-Protocol And Antagonistic Multiple Dose Protocol In Ovarian Stimulation Of Poor Responders: Results Of A Prospective Randomized Triol. Hum Rep. 2001; 868-870
5. Yumru EA, Öndeş B. İnfertil Çifte Yaklaşım Ve İn Vitro Fertilizasyon'a Doğru Hasta Seçimi. Jarem 2011; 1: 57-60
6. Kruger TF et al. Sperm Morphologic Features As A Prognostic Factor In In Vitro Fertilization. Fertility And Sterility, 46 1118-1123
7. Menkveld R, Kruger TF Basic Semen Analysis. In: Acosta AA et al., EDS. Human Spermatozoa In Assisted Reproduction. Baltimore, Williams & Wilkins: 68-84
8. Coetzee K et al. Predictive Value Of Normal Sperm Morphology: A Structured Literature Review. Human Reproduction Update, 4:73-82
9. Menkveld R et al. Semen Parameters, Including WHO And Strict Criteria Morphology, In A Fertile And Subfertile Population: An Effort Towards Standardization Of In-Vivo Thresholds. Human Reproduction, 16: 1165-1171
10. Mortimer D, Menkveld R. Sperm Morphology Assessment – Historical Perspectives And Current Opinions. Journal Of Andrology, 22: 192-205
11. Sakkas D. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. Hum Reprod 1999; 14: 4-5

12. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-1049
13. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15: 1717-1722
14. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73: 43-50
15. Edwards RG, Beard HK. Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts? *Hum Reprod* 1999; 14: 1-4
16. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33-44
17. Aitken RJ and De Luliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells 2007, *Reprod Biomed online* 14; 6:727-733
18. Hammadeh M, Zeginiadv T, Rosenbaum P. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl* 2001; 46: 99-104
19. Jungueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji Text ve Atlas*. Solakoğlu S, Aytekin Y. (Çev), 10. baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2006.
20. Ross HM, Kaye G, Pawlina W, *Histology, a text and atlas*, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 2003; 689-696.
21. World Health Organization. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction*. 5th. Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
22. Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*. 2005 1;63(4):992-1003
23. *Androloji Laboratuvarı el Kitabı* T.İrez,M.Kucur, F.Isman ,2007 sayfa 89-97,Nobel Tıp Kitapevi

24. Yardımla üreme teknikleri temel kitabı D.K.Gardner,A.Weissmann çeviri Ed. T.İrez, Oktay Arda, Semih Kaleli,2010 Nobel Tıp Kitapevi
25. Ford WC. World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. 2010;56-63.
26. Fuentes-Mascorro G. Serrano H. Rosado A. Sperm chromatin. Arch Androl 2000; 45: 215-25
27. Ward W, Coffey D. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biol Reprod 1991; 44: 569-74
28. Dadoune , J. Nuclear status of human sperm cells. Micron 1995; 26: 323-45
29. Ward W, Coffey D. Specific organization of genes in relation to the sperm nuclear matrix. Biochem Biophys Res Commun 1994; 173: 20-5
30. Zini A, Bielcki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation, DNA fragmentation in fertile and infertile men. Fertil Steril 2001; 75: 674-677
31. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. J Androl 2002; 23: 25-43
32. Akama K, Sato H, Furihata-Yamauchi M, Komatsu Y, Tobita T, Nakano M. Interaction of nucleosome core DNA with transition proteins 1 and 3 from boar late spermatid nuclei. J Biochem 1996;119:448-5
33. Chevaillier P, Chirat F, Sautiere P. The amino acid sequence of the ram spermatidal protein 3-a transition protein TP3 or TP4? Eur J Biochem 1998; 258: 460-4
34. Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. Mol Hum Reprod 1998; 4: 939-45
35. Oliva R and Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone -to-protamine replacement reaction. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1991; 40,25-94
36. Rooney AP and Zhang J. Rapid evolution of a primate sperm protein : relaxation of functional constraint or positive Darwinian selection? Mol Biol Evol 1999; 16: 706-710

37. McKay DJ, Renaux BS and Dixon GH. Human sperm protamines. Amino-acid sequences of two forms of protamine P2. *Eur J Biochem* 1986; 156: 5-8
38. Yelick PC, Balhorn R, Johnson PA, Corzett M, Mazrimas JA, Kleene KC, Hecht NB. Mouse protamine 2 is synthesized as a precursor whereas mouse protamine 1 is not. *Mol Cell Biol* 1987 ; 7: 2173-2179
39. Balhorn R, Reed S and Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/ protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988; 44: 52-55
40. Yebra L and Oliva R. Rapid analysis of mammalian sperm nuclear proteins. *Anal Biochem* 1993; 209: 201-203
41. Bianchi F, Rousseaux – Prevost R, Sautiere P and Rousseaux J. P2 protamines from human sperm are zinc-finger proteins with one CYS2/HIS2 motif. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 182: 540-547
42. Aoki VW Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod* 2005; 20: 1298-1306
43. Ingles CJ and Dixon GH. Phosphorylation of protamine during spermatogenesis in trout testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; 58: 1011-1018
44. Balhorn R, Corzett M, Mazrimas JA. Formation of intraprotamine disulfides in vitro *Arch Biochem Biophys* 1992; 296: 384-393
45. Nayernia K, Bohm D, Topaloglu O, Schluter G, Engel W. Rat transition nuclear protein 2 regulatory region directs haploid expression of reporter gene in male germ cells of transgenic mice. *Mol Reprod Dev* 2001; 58(4): 437-43
46. Caron N, Veilleux S, Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol Reprod Dev* 2001; 58(4): 437-43
47. Hecht NB. Gene expression during male germ cell development. In Desjardins C and Ewing LL (eds), *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Oxford University Press, New York, 1993; 400-432
48. Candido EP and Dixon GH. Trout testis cells. 3. Acetylation of histones in different cell types from developing trout testis. *J Biol Chem* 1972; 247: 5506-5510


49. Poccia D. Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization and early development. In *Rev Cytol* 1986; 105: 1-65
50. Pivot- Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S and Khochbin S. Acetylation- dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain -containing protein. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5354-5365
51. Steger K, et al. Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and-2 m RNA. *Hum Reprod* 2001; 16: 709
52. Braun RE. Packaging paternal genome with protamine. *Nat Genet* 2001; 28: 10
53. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33-44
54. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993;207: 202-205
55. Bianchi PG, Manicardi GC, Uner F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 139-144
56. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995; 52: 864-867
57. Sakkas D. The use of blastocyst culture avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod* 1999;14: 4-5
58. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 529-536
59. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 428-432
60. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen


- samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69: 528-532
61. Comhaire F, Mahmoud A, Depuydt C, et al. Mechanism and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Hum Reprod Update* 1999; 5: 393-8
 62. Potts R, Newbury C, Smith G, et al. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999; 423: 103-11.
 63. Arnon J, Meirou D, Lewis-Roness H. Et al. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 394-403.
 64. Zalata A, Hafez T, Comhaire F. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod* 1995; 10: 1444-51.
 65. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999; 284: 696-704
 66. Ellington JE, Evenson DP, Wright RW Jr, Jones AE, Schneider CS, Hiss GA, Brisbois RS. Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro. *Fertil Steril* 1999; 71 (5): 924-9
 67. World Health Organization. WHO Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
 68. Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on optimal evaluation of the infertile male. *Fertil Steril*. 2006; 86(5 Suppl):202-209
 69. Lipshultz LI, Corriere JN. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol* 1977; 117: 175-176
 70. Dohle G.R, Jungwirth A, Kopa Z, Giwercman A, Diemer T, Hargreave T.B. EAU Guidelines on male infertility , Update 2009.
 71. Sigman M, Jarow JP. Endocrine evaluation of infertile man. *Urology*. 1997; 50: 659-64

72. Schoor RA, Elhanbly S, Niederberger CS, Ross LS. The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility, *J Urol.* 2002; 167: 197-200.
73. Saleh R, Agarwal A, Nada E, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79(Suppl 3): 79-87
74. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl.* 2006;27:890–898. doi: 10.2164/jandrol.106.000703
75. Afifa Sellami, Nozha Chakroun, Soumaya Ben Zarrouk, Hanen Sellami, Sahbi Kebaili, Tarek Rebai, and Leila Keskes Assessment of Chromatin Maturity in Human Spermatozoa: Useful Aniline Blue Assay for Routine Diagnosis of Male Infertility *Advances in Urology* Volume 2013, Article ID 578631, 8 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/578631>
76. . Irez T., Sahmay, Ocal P., Goymen A., Senol H., Erol N., Kaleli S., Guralp, Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques *Andrologia* Volume 47, Issue 4, May 2015 Pages 438–447)
77. . Irez T., Sahmay, Ocal P., Goymen A., Senol H., Erol N., Kaleli S., Guralp, Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques *Andrologia* Volume 47, Issue 4, May 2015 Pages 438–447)

7.ETİK KURUL ONAYI

Evrak Tarih ve Sayısı: 23/10/2015-4663



**BEZMİALEM**
VAKIF ÜNİVERSİTESİ

T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 71306642-050.01.04-
Konu : Etik Kurul Kararı

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE

Sayın Prof. Dr. Tülay İREZ,
14.10.2015 tarihinde yapılan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında "Anilin Mavis Boyasının Farklı Fiksatiflerle Uygulanması İle Sperm Kromatin Kondensasyonunun İncelenmesi" başlıklı başvurunuz değerlendirilmiş olup karar yazısı ektedir.
Bilgilerinize.

e-İmzalıdır
Prof.Dr.Orhan ÖZTURAN
Başkan V.

EK :
Karar yazısı (3 sayfa)


23/10/2015 Mem. : M.İNCE

Mevcut Elektronik İmzalar
ORHAN ÖZTURAN (Klinik Araştırmalar Etik Kurulu - Başkan V.) 23/10/2015 16:31

Evrakı Doğrulamak İçin : <https://ebys.bezmialem.edu.tr/Dogrula/NFN8TY>

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) Fatih / İstanbul
Tel: 0 (212) 523 22 88
E-Posta: info@bezmialem.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için irtibat: Merve İnce
Faks: 0 (212) 533 23 26
Elektronik ağ: www.bezmialem.edu.tr



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : TUĞÇE DURMUŞ

İletişim Bilgileri

Telefon : 0555-732-12-51

Mail : tugcedrmsss@gmail.com

2. Doğum Tarihi : 30.11.1989

3. Öğrenim Durumu : Yüksek Lisans

Derece	Alan		Yıl
Lise	Fen Bilimleri	Sabri Çalışkan Lisesi	2007
Lisans	Biyoloji	Dumlupınar Üniversitesi	2008- 2012
Yüksek Lisans	Klinik Embriyoloji	Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2014- 2017

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Biyolog (Tüp Bebek)	Özel 29 Mayıs Hastanesi	2013-2014
2. Biyolog (Tüp Bebek)	Süleymaniye Kadın Doğum Hastanesi	2014-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Orta	Zayıf	Orta		65

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	63	59	52
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok iyi
Biyoinformatik Programları	Çok iyi

Özel İlgi Alanları (Hobileri):