



T.C.

İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**OLİGOZOOSPERMİK ERKEKLERDE SPERM KROMATİN
KONDENSASYONU VE SPERM KREATİN KİNAZ AKTİVİTESİNİN
SİGARA İÇİMİNE BAĞLI OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DUYGU KÜTÜK

Tez Danışmanı

Prof.Dr. Tülay İrez

İSTANBUL

Şubat 2016

T.C. İSTANBUL YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/02/2016

Prof. Dr. Tülay İrez

Biruni Üniversitesi

Danışman

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Asiye Nurten

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Prof. Dr. Melike Erkan

İstanbul Üniversitesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurullar çerçevesinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesinde belirttiğimi, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

DUYGU KÜTÜK

Bana inanan ve beni yürekten destekleyen Babam ve Annem'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi birikimi ve deneyimleriyle beni aydınlatan, her konuda çok büyük desteğini gördüğüm Hocam Klinik Embriyoloji Bölüm Başkanı Sayın **Prof.Dr. Tülay İrez'e**;

Tezimin deneysel çalışmasının gerçekleştirilmesi aşamasında yardım ve desteğini benden esirgemeyen, Androloji laboratuvarını bana açan İstanbul Tüp Bebek ve Kadın Sağlığı Merkezi Genel Koordinatörü **Emb. Dr. Faruk Bener'e**, Kalite ve Eğitim Koordinatörü **Emel Tüylü'ye**, içten davranışları ve yardımları için merkezin tüm personeline;

Tezimin hazırlanma sürecinde yardımlarını esirgemeyen **Emb. Ferhat Cengiz'e**;

Daima yanımda olan ve desteklerini esirmeyen **Canım Ailem'e**;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Beyan	i
Teşekkür	iii
İçindekiler	iv
Şekiller Listesi	vii
Resimler Listesi	vii
Grafikler Listesi	vii
Tablolar Listesi	viii
Semboller, Kısaltmalar	ix
Özet	xI
Abstract	xIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Spermatogenez.....	4
2.1.1. Spermatositogenez	5
2.1.2. Mayoz Bölünme	5
2.1.3. Spermiyogenez	6
2.1.3.1. Golgi Evresi.....	6
2.1.3.2. Kep Evresi	6
2.1.3.3. Akrozomal Evre.....	6
2.1.3.4. Maturasyon (Olgunlaşma) Evresi	7
2.2. Normal Sperm Hücresinin Yapısı.....	8
2.2.1. Baş.....	9
2.2.1.1. Akrozom.....	9
2.2.1.2. Çekirdek.....	9
2.2.2. Boyun.....	10
2.2.3. Kuyruk.....	10
2.2.3.1. Orta Parça.....	10
2.2.3.2. Esas Parça.....	10
2.2.3.3. Son Parça	11
2.3. Sperm DNA'sı ve Nükleer Proteinleri	11

2.4. Sperm DNA Hasarı	14
2.4.1. Nükleer DNA Hasarı.....	14
2.4.1.1. Apoptoz.....	14
2.4.1.2. Oksidatif Stres.....	15
2.5.Kromatin Kondensasyonu ve Kusurları	16
2.5.1. Anilin Mavisi Testi	18
2.6. Kreatin Kinaz.....	19
2.6.1. Sperm Kreatin Kinaz Aktivitesi	20
2.7. İnfertilite	22
2.7.1. Erkek İnfertilitesi.....	22
2.7.1.1. Erkek İnfertilitesi Nedenleri	22
2.8. Sigara ve Sperm DNA Hasarı	24
2.8.1. Sigara ve Erkek İnfertilitesi.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Gereçler	28
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler	28
3.1.1.1. Kimyasal Maddeler.....	28
3.1.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler	29
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	29
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Denekler	29
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler	30
3.1.4.1. Anilin Mavisi İçin Kullanılan Çözeltiler	30
3.1.4.2. CK Aktivitesinin Gösterilmesinde Kullanılan Çözeltiler.....	31
3.2. Yöntemler.....	32
3.2.1.Sperm Hazırlama	32
3.2.2. Spermin Fiziksel Olarak İncelemesi	32
3.2.2.1. Likefaksiyon (Sıvılaşma)	32
3.2.2.2. Görünüm	32
3.2.2.3. Hacim.....	32
3.2.2.4. Viskozite.....	33
3.2.2.5. pH	33
3.2.3. Spermin Mikroskopik Olarak İncelenmesi	33

3.2.3.1.Sperm Sayısı	33
3.2.3.2. Motilite Tayini	33
3.2.3.3. Diff-Quick Boyama ile Morfoloji Tayini.....	34
3.2.3. Sperm Hücrelerinde Kreatin Kinaz İzolasyonu	34
3.2.3.1.Kreatinin Kinaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	34
3.2.4. Anilin Mavisi ile Kromatin Kondensasyonunun Gösterilmesi.....	35
4. BULGULAR	36
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	50
7. KAYNAKLAR	51
8. ETİK KURUL KARARI	61
9. ONAM FORMU	63
10. ÖZGEÇMİŞ.....	66

Şekiller Listesi	Sayfa
Şekil 2.1 Spermatogenez	5
Şekil 2.1.3 Spermioyogenez.....	8
Şekil 2.2 Sperm morfolojisi	8
Şekil 2.3 Paternal kromozomların spermioyogenez sırasında yeniden düzenlenmesi	12
Şekil 2.6.1 Sperm kreatin fosfat modeli	20

Resimler Listesi

Resim 4.1. Anilin mavisi ile sperm kromatin kondensasyonunun gösterilmesi.....	44
--	-----------

Grafikler Listesi

Grafik 4.1. Normozoospermik bireylerde sigara kullanımına bağlı olarak semen parametrelerinin karşılaştırılması	39
Grafik 4.2. Oligozoospermik bireylerde sigara kullanımına bağlı olarak sperm kromatini ve semen volümünün karşılaştırılması	41
Grafik 4.3. Tüm olgularda semen parametrelerinin sigara içimine bağlı olarak karşılaştırılması	43

Tablolar Listesi	Sayfa
Tablo 2.5.1. Sperm kromatin anomalilerinin araştırılmasında kullanılan çeşitli metotlar	19
Tablo 2.8. Sigara dumanında bulunan bazı gaz ve partiküler faz komponentleri.....	25
Tablo 4.1. Çalışmaya dahil edilen vakaların sigara kullanım bilgileri (a,b)	37
Tablo 4.2. Sigara kullanımına bağlı olarak normozoospermik bireylerde semen parametrelerinin karşılaştırılması.....	39
Tablo 4.3. Oligozoospermik olgularda sigara içimine bağlı olarak semen parametrelerinin karşılaştırılması.....	40
Tablo 4.4. Olguların sperm morfolojisine ve motilitesine göre CK aktiviteleri (a,b)	41
Tablo 4.5. 80 olguda sigara içen ve içmeyen hastaların semen parametrelerinin karşılaştırılması	42

Semboller ve Kısaltmalar

<	: Küçük
>	:Büyük
%	: Yüzde
ADP	: Adenozin Difosfat
ATP	: Adenozin Trifosfat
ASRM	: American Society for Reproductive Medicine (Amerikan Üreme Tıbbı Derneği)
AO	: Akridin Oranj
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
CAT	: Kloramfenikol Asiltransferaz
CK	: Kreatin Kinaz
CO₂	: Karbondioksit
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
ESHRE	: European Society of Human Reproduction and Embryology (Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği)
H1/H2A/H2B/H4	: Histon Geçiş Proteinleri
H₂O	: Su
HCl	: Hidroklorik Asit

ICSI	:İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Mikroenjeksiyon)
IUI	: İntra Uterin İnseminasyon
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
KH₂PO₄	: Potasyum Dihidrojen Fosfat
KCl	: Potasyum Klorür
Na₂HPO₄	: Sodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NADP	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
OAT	: Oligoastenoteratospermi
OPU	: Oosit Pick Up (Oosit Toplama)
PAS	: Periyodik Asit Schiff
P1/P2	: Protamin Molekülleri
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tuzu Tamponu)
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
TH1/ TH2B	: Testis-Spesifik Histon (Testise özel histon)
TP1/TP2	: Transition Proteins (Geçiş Proteinleri)
WHO	: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

ÖZET

Oligozoospermik Erkeklerde Sperm Kromatin Kondensasyonu ve Sperm Kreatin Kinaz Aktivitesinin Sigara İçimine Bağlı Olarak Değerlendirilmesi

Amaç: Kreatin fosfat tarafından üretilen kreatin kinaz, ATP'nin hızlı bir şekilde tamponlama ve yenilenmesi için enerji deposudur ve sperm hareketinde önemli bir rol oynamaktadır. Kromatin yoğunlaşması paternal kaynaklı genomun taşınmasında ve erken embriyo gelişiminde hayati önem taşımaktadır. Sperm kromatin yoğunlaşması ve kreatin kinaz aktivitesi bireysel sigara üzerindeki etkisinin yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, sigaranın insan sperm CK aktivitesi ve kromatin yoğunlaşması üzerine etkileri incelenmiştir.

Materyal – Metot: İnfertil çiftler (80) 2014-2015 arasında İstanbul Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran IVF adayları arasından rastgele seçildi. Bu çalışmada, normozoospermik sigara içen (n=18) ve içmeyen erkekler (n=23) ile oligozoospermik sigara içen (n=18) ve içmeyen erkeklerden (n=21) meni örnekleri alındı. 80 hastadan alınan semen örnekleri sigara içimine göre karşılaştırıldığında, kromatin yoğunlaşması, geleneksel sperm parametreleri, özellikle sperm morfolojisinin, sperm sayısı ve progresif motilite ve sperm kreatin kinaz aktivitesi yönünden incelendi. Asidik anilin mavisi boyama DNA ile ilişkili olarak nükleoprotein içeriği ile ilgili spermin çekirdeklerinin kromatin kusurlarını tespit etmek için kullanıldı. Kreatin kinaz aktivitesi homojenize sperm örneklerinde spektrofotometrik yöntemle incelendi.

Bulgular: Sigara'nın, normozoospermik olgularda sperm konsantrasyonu ve morfolojisi üzerine olumsuz etkisi gözlenmiştir ($p<0,05$). Oligozoospermik olgularda ise semen volümü ($p<0,001$) ve kromatin kondansasyonunun ($p<0,05$) sigara içimi ile negatif etkilendiği görülmüştür.

Tüm olgular sigara içimine göre karşılaştırıldıklarında sperm konsantrasyonu ve kromatin kondansasyon oranının sigara içimi ile azaldığı gözlendi. Sigara'nın, sperm konsantrasyonu ($p<0,05$), motilitesi ($p<0,05$), morfoloji ve kromatin bütünlüğü üzerine olumsuz etkisi gözlenmiştir ($p<0,05$). Sperm kreatin kinaz aktivitesinin tüm olgularda sigara içimi ile negatif etkilendiği görülmüştür ($p<0,05$). Tüm olgular dikkate alındığında sperm kreatin kinaz aktivitesinin, sperm morfolojisi ve sperm motilitesi ile ilişkisi gözlenmemiştir.

Tartışma: Çalışmamızda analiz edilen normospermik ve oligospermik olgularda, sperm morfolojisi, motilitesi, kromatin bütünlüğü ve kreatin kinaz aktivitesinin sigara içimi ile etkilendiği gösterilmiştir. Sigaranın bırakılması infertilite tedavisinde başarıyı arttırabilir.

Anahtar Kelimeler: Kromatin Kondansasyonu, Erkek İnfertilitesi, Sperm Kreatin Kinaz, Sigara İçimi

ABSTRACT

The Evaluation Of Sperm Chromatin Condensation and Total Creatine Kinase Activity in Oligozoospermic Patients and the Relationship With Smoking

Purpose: Creatine kinase, produced by creatine phosphate, is an energy reservoir for the rapid buffering and regeneration of ATP and can play an important role in sperm motility. Chromatin condensation is vital for the function of sperm which is the motile carrier of paternal genome and sperm genome quality has been emphasized for several years as playing a major role in early embryogenesis. There are no adequate studies of the effect on individual smoking on sperm chromatin condensation and creatin kinase activity. Therefore, this study investigates the effects of cigarette smoking on human sperm CK activity and chromatin condensation in males who smoke.

Materials and Method: Infertile couples (80) were randomly selected from IVF candidates referred to Istanbul IVF Center between 2014-2015 years. In this study, we obtained semen samples from oligozoospermic male smokers (n=18) and nonsmokers (n=21) with normozoospermic male smokers (n=18) and nonsmokers (n=23). Semen samples from 80 patients were examined for chromatin condensation, as well as conventional sperm parameters, notably sperm morphology, sperm count, and progressive motility and sperm creatine kinase activity, compared for cigarette smoking. Acidic aniline blue staining was used to detect chromatin defects of sperm nuclei related to their nucleoprotein content as associated with DNA. Sperm creatin kinase activity was examined with spectrophotometric method in homogenized samples.

Results: Negative effect of smoking on sperm concentration and morphology were observed in patients normozoospermic ($p < 0,05$). In oligozoospermic cases it was observed that of semen volume ($p < 0,001$) and chromatin condensation ($p < 0,05$) were negatively affected by smoking. All patients were compared according to smoking , sperm concentration, percentage of chromatin condensation was diminished by cigarette smoking. In summary; Smoking, sperm concentration ($p < 0,05$), motility ($p < 0,05$), morphology and negative effects on chromatin integrity was observed ($p < 0,05$).

In all cases, the sperm creatine kinase activity has been shown to negatively effected by smoking ($p < 0,05$).

Discussion: In conclusion, the analyzed normozoospermic and oligozoospermic cases, sperm morphology, motility, chromatin integrity and creatin kinase activity has been shown to be affected by smoking. The cessation of smoking can increase the success of infertility treatment.

Key words: Sperm Chromatin Condensation, Male Infertility, Sperm Creatine Kinase, Cigarette Smoking

1.GİRİŞ

İnfertilite, hayati tehlike arz eden bir sorun olarak kabul edilmemesine rağmen hem bireyi hem de toplumu etkileyen, psikolojik, sosyo-kültürel ve biyolojik bir sağlık sorunudur.

Nikotin, erkek infertilitesinde sigaranın etkilerinden sorumlu en büyük faktördür. Sigara kullanmanın ve sigara dumanına maruz kalmanın insanda seminal kaliteyi etkilediği ve erkek kaynaklı infertilite'ye neden oluşu ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır (1). ASRM (Amerikan Üreme Tıbbı Derneği) sigara içiminin erkek infertilitesi'ne neden olabilecek faktörlerden biri olabileceğini ve infertilite tedavisinde 1988 de sigara içiminin sonlandırılması gerektiği konusunda karar vermiştir (2). Yapılan bazı araştırmalar sonucunda sperm parametrelerinin sigara kullanımına bağlı olarak etkilendiği savunulurken, bazı araştırmalarda sigarayla sperm parametreleri arasında orantılı bir ilişkinin olmadığı sonuçları elde edilmiştir (3,4).

Semen analizi erkekte infertilite durumunun araştırılmasında, klinik tedavinin planlanması ve alınan cevabın değerlendirilmesinde büyük bir önem teşkil etmektedir. Semen analizi ejakülatın, makroskobik ve mikroskobik olarak değerlendirilmesinde renk, pH, ejakülat hacmi, sperm konsantrasyonu, sperm hareketliliği, likefaksiyon süresi, lökosit sayısı, vitalite ve morfolojisi hakkında bilgi verir. Semen analizi, klinikte tedavinin planlanması ve alınan cevabın değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır. Kadına ait bir anormal bir bulgu söz konusu değil ise, yapılan semen analizi sonucunda, androlojik patolojilerin yarısı tanımlanabilmektedir (5,6). Erkek infertilitesiyle ilgili yapılan çalışmaların sonucunda elde edilen verilerin büyük bir çoğunlukla sperm parametrelerindeki bozulmalar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (7).

Bazı durumlarda infertilite nedeni erkek üreme organ bozuklukları ya da cinsel işlev bozukluklarından da kaynaklandığı düşünülmektedir (8). Geri kalan % 50'lik kısımda sorunun ana kaynağı tespit edilemediği için idiopatik infertilite olarak adlandırılmakta ve bu grupta tanı koymaya yardımcı olabilecek ve tedaviye yön verecek yeni testlere ihtiyaç duyulmaktadır (9). Bu anlamda son yıllarda sperm DNA hasarı üzerinde durulmaktadır. Sperm DNA hasarının in vivo ve in vitro ortamlarda yapılan çalışmalarda sperm parametreleri üzerine etkisinin önemi belirtilmiştir (10,11).

Erkek infertilitesinde sperm DNA hasarına neden olan mekanizmalar üzerinde pek çok çalışma yapılmaktadır. Bunlardan ilki, spermiyogenez esnasında sperm kromatin paketlenmesinde protaminasyon hatasının DNA hasarını oluşturduğu görüşüdür (12,13). İkincisi, oksidatif stres kaynaklı ROS üretiminin sperm fonksiyon bozukluğuna sebep olarak DNA hasarına dolayısıyla da erkek infertilitesine sebep olduğu görüşüdür(14 -16). Üçüncü olarak, apoptoz mekanizmasındaki hasarlı germ hücrelerinin eliminasyonunun sağlandığı endonukleaz kırık oranının artmasıyla meydana gelen DNA hasarının olduğu görüşüdür (17,18). Katayose ve arkadaşları 2004'te yaptıkları bir çalışmada açıklanamayan infertilite olgularında Akridin oranj (AO) boyası kullanarak fertilizasyon yetersizliklerinde sperm maturasyon kusurlarının rolü olabileceğini ileri sürdüler (19). Spermiyogenez sürecinde sperm kromatin modifikasyonu ve kondensasyonu önemli bir aşamadır. Sperm DNA'sının kıvrılması çok özel proteinler ile gerçekleşmektedir. Kondensasyon işleminde % 90-95 civarında histon, protaminler ile yer değiştirir (20). Protaminasyon işleminin sperm motilitesinin ve sperm genomunun korunmasında önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir (20). Sperm kreatin kinaz aktivitesi (CK) ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır (21-24). CK aktivitesi sperm flagellum motilitesi için gerekli olan ATP'nin hidrolizinde görev aldığı ve izoformlarının insanda sperm immatüritesiyle ilişkisinin bulunduğunu içeren çalışmalar mevcuttur (23,25-28).

Bu çalışmada sigara içimi ile ilişkili olarak sperm fizyolojisini ilgilendiren ve sperm maturasyonunun histokimyasal analizini içeren testler ile sigaranın oligozoospermik ve normozoospermik olgulardaki fizyolojik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda sperm maturitesinin histokimyasal incelenmesi asidik anilin mavisi testi ile sperm total kreatinin kinaz aktivitesi ölçümü spektrofotometrik yöntem ile yapılmıştır. Her hasta rneğinde Dünya Sağlık rgt (WHO) kriterlerine göre semen analiz tayini yapılarak sonuçların analizi için hazırlanmıştır.

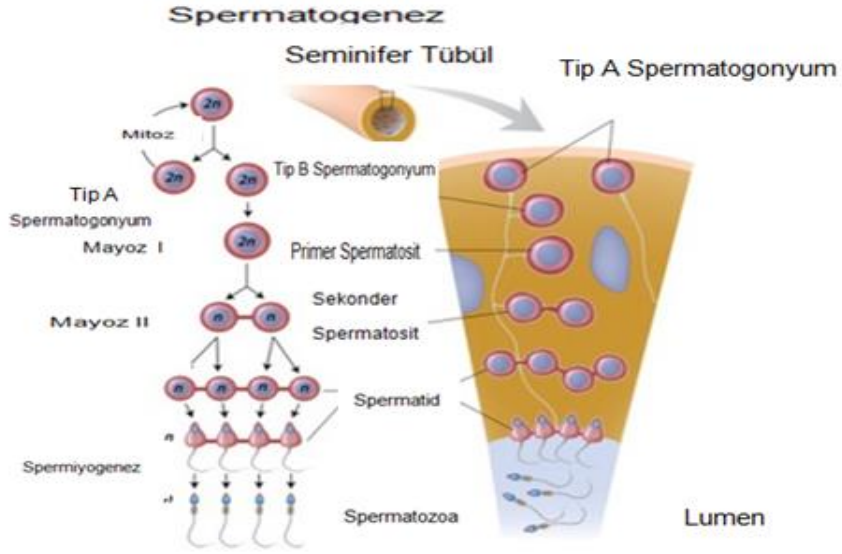
2.GENEL BİLGİLER

2.1.SPERMATOGENEZ

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler ile hücre farklılaşması sonucu olgun sperm oluşmasıdır. Bu sırada sitoplazmik yapı değişir, somatik hücre histonları protaminlerle yer değiştirir. Spermatogenez puberte ile birlikte başlar, yükselen gonadotropinin etkisiyle yaşam boyu devam eder (29).Spermatogenez sürecinde, germ hücreleri mayoz bölünme sonrası 46 kromozumlu diploid yapıdan 23 kromozumlu haploid yapıya gelirler ve yine 23 kromozumlu haploid yumurta hücresi ile birleşerek 46 kromozumlu yeni bir bireyin oluşmasına imkân sağlarlar. Hücreler her bir aşamada spermatogonya, spermatosit ve spermatid gibi isimler alırlar (Şekil 2.1). Farklılaşma sürecini tamamlayan hücreler seminifer tübül içine bırakılır. Spermatogenez yaklaşık olarak 64 gün sürer. Olgun spermin ejakülatta görülmesi ise 74 gün alır (30-32).

Spermatogenez süreci farklı özellikte 3 evreden oluşur (33):

1. Spermatositogenez
2. Mayoz Bölünme
3. Spermiyogenez



Şekil 2.1. Spermatogenez (33)

2.1.1. Spermatozitojeniz

Spermatogonyumlar, mitoz bölünme ile çoğalıp A tipi spermatogonyum olarak adlandırılan kök hücreleri ya da primer spermatozitelere farklılaşan B tipi spermatogonyum'ları oluştururlar (33). Spermatogonyum B'ye dönüşemeyen spermatogonyum A'lar ana hücre olarak kalır. Spermatozitojeniz B tipi hücrelerin mayoz sürecine girmesi ile tamamlanır (34-36).

2.1.2 Mayoz Bölünme

Primer spermatozite'ler, birinci mayoz bölünmeyle sekonder spermatoziti oluştururlar. Birinci mayozun 22 gün süren profaz evresinde görülen crossing-over aşaması sayesinde genetik çeşitlilik sağlanır. Mayoz I başında diploid kromozom yapısı mayoz sürecinin sonunda haploid kromozom yapısına dönüşür. Sonrasında sekonder spermatozitin mayoz II'yi geçirmesiyle birlikte yuvarlak spermatozid adı verilen hücreler oluşur. Mayoz II de kromozom sayısı değişmez fakat DNA sayısı yarıya iner. Her bir diploid sekonder spermatozitten iki adet monoploid spermatozid oluşur.

Birinci mayoz bölünme günler bazında bir süreç olmasına rağmen ikinci mayoz bölünme dakikalar bazında olmasından dolayı seminifer tübüllerde primer spermatositler en çok gözlenen hücrelerdir (36).

2.1.3.Spermiyogenez

Spermiyogenez, sperm üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için özelleşmiş sperm hücresine dönüşüm sürecini kapsamaktadır. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermiyogenez esnasında yuvarlak spermatitler uzamaya başlayarak uzamış (elongated) spermatid halini alır. Sertoli hücresi sitoplazmasında gerçekleşen bu dönüşüm sürecinde çekirdek karakteristik halini alır, sitoplazma kaybolur, akrozom ve kuyruk gelişir. İnsanlarda bu aşama yaklaşık olarak 16 - 22 gün sürer. Spermatid'lerin farklılaşma süreci 4 evreden oluşur (Şekil 2.1.3) (33,34). Bunlar;

2.1.3.1. Golgi Evresi: Yuvarlak spermatid sitoplazması golgi aygıtı, mitokondriler, bir çift sentriol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum içerir. PAS (Periyodik-Asit Schiff) ile boyanan bol glikoproteinli proakzomal granüller golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek akrozomal vezikül adı verilen bir zarla çevrilir ve tek bir akrozomal granülü oluştururlar (36,37).

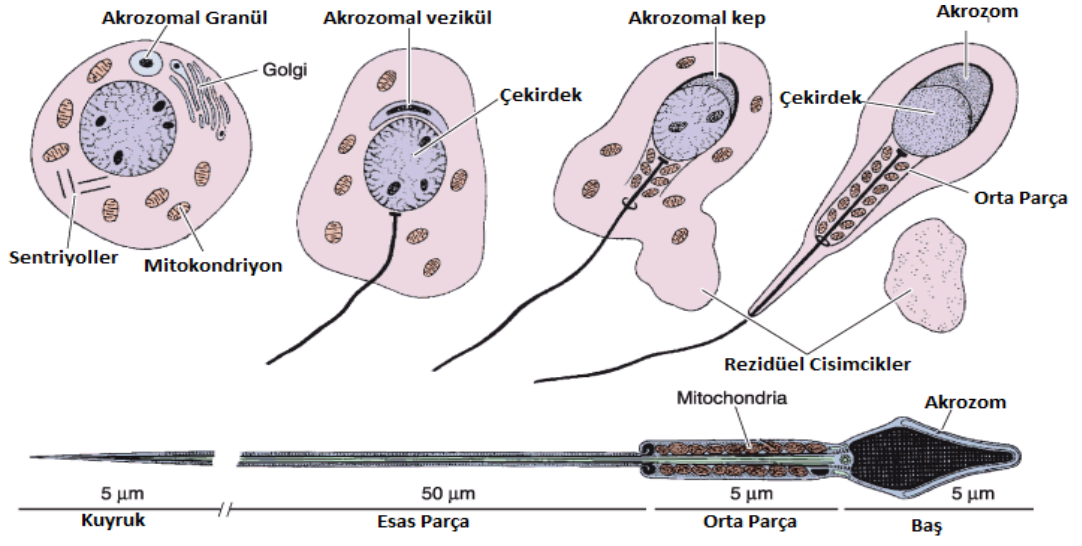
2.1.3.2. Kep Evresi: Akrozom vezikülü ve granülünden akrozom başlığı oluşur ve çekirdeğin tüm ön kısmını kaplar. Akrozom başlığı akrozom içeriğini saracak biçimde iç ve dış akrozom zarlarını oluşturur. Çekirdek zarı ve iç akrozom zarı arasında granüler filamentöz bir madde meydana gelir. İç taraftaki kromatin yoğunlaşmasından dolayı daha yoğun görünür. (36,37).

2.1.3.3. Akrozomal Evre: Bu aşamada spermatid yapısında birçok değişiklik meydana gelir. Çekirdek ve çekirdeğin üzerindeki akrozom yapısı, üstteki plazma membranının hemen altına doğru hareket ederken, sitoplazma arka tarafa doğru yer değiştirir. Sitoplazmadaki hücre iskeleti elemanı olan mikrotübüller, silindirik bir yapı oluştururlar.

Gelişmekte olan kuyruğu saran plazma membranı, arkaya doğru hareket ettikçe silindirik yapı kaybolur. Mitokondriler sitoplazmanın arka kısmına doğru hareket ederek, heliks yapısındaki fibrilleri sarar. Spermiyumun hareketi için gereken enerjinin sağlanmasında mitokondriler anahtar rol oynamaktadır. Mitokondrial kılıfın oluşumu sırasında, nükleusla birlikte spermiyumun bağlantı parçasını oluşturacak sentriol'den, aksonemin etrafına yerleşen 9 adet dış koyu kılıf meydana gelir. Bu bölge spermiyum kuyruğunun orta parçasını oluşturmaktadır. Orta parçanın merkezden uzak kısmında, iki adet uzunlamasına piramit ve çok sayıda bağlantı biriminden oluşan fibröz bir kılıf, esas parçanın 9 uzun fibrilini sarar ve neredeyse kuyruğun sonuna kadar uzanarak esas parçayı oluşturur. Fibröz kılıfın uzağında kalan kısa kuyruk parçası ise son parça adını alır (32,33).

2.1.3.4. Olgunlaşma Evresi: Fazla sitoplazmayı azaltmaya yönelik bu işlem, spermatid şekillenmesindeki son aşamadır. Sertoli hücreleri tarafından artık cisim olarak nitelendirilen fazla sitoplazma fagosite edilir. Hücreler arası köprüler de fagosite edilen artık cisimlerde kaldığı için spermatidler artık birbirlerine bağlı değildirler. Spermiyumun farklılaşma işlemi sona erince tübül lümenine salınması işlemine spermiyasyon adı verilir. Bu yeni oluşan spermiyum hareketsizdir ve fertilize etme yeteneğine sahip değildir. Spermiyasyon işleminden sonra sperm 2-4 haftalık bir evreden geçerek epididime ulaşır. Bu süreçte sperm ileri olgunlaşmaya uğrayarak, hareketlilik kazanır ve sitoplazmasının tamamını kaybeder. Sperm epididime peritübüler myoid hücreler ve testis kapsülünün kasılmasıyla sağlanan seminal sıvı akıntısıyla taşınır. Epididim özgülleşmiş epitel hücreleriyle kaplıdır ve kasılabilen kas hücreleriyle sarmalanmıştır (32,33).

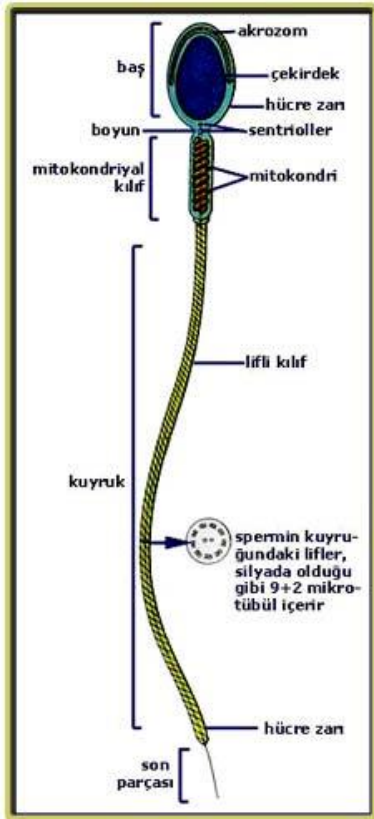
Androjen bağımlı olarak gelişen ve fonksiyon gösteren epididim boyunca sıvı osmolaritesi, elektrolitler ve birçok küçük molekülün konsantrasyonlarında değişiklik olur. Epididimal ve seminifer tübül sıvıları tarafından sağlanan proteinler spermin zarlarına bağlanır ve hareketlilik ile döllenme becerilerini artırır. Epididimin ilk kısmında hareket kabiliyeti olmayan sperm, epididime geldikten 18-24 saat sonra hareket yeteneğini kazanabilmektedir (32,33).



Şekil 2.1.3. Spermiyogenez (33)

2.2.NORMAL SPERM HÜCRESİNİN YAPISI

Sperm baş, boyun ve kuyruk bölgesinden oluşur.



Şekil 2.2 Sperm Morfolojisi (34)

2.2.1.Baş

Toplam uzunluğu yaklaşık 60 µm kadar olan spermin baş kısmının boyu 3-5 µm, eni 2-3 µm'dir. Başın esas görevi; DNA materyalini taşımak ve korumaktır. Baş bölgesi, lizozomal organelin bulunduğu akrozom, fertilizasyon için oosite tutunma bölgesi olan ekvator bölgesi ve akrozom sonrası bölgeyi içerir.

İnsan sperminin başı 4-5 µm uzunluğunda, 2.5-3.5 µm genişliğinde olup, akrozom ve çekirdek olmak üzere iki kısımda incelenir.

2.2.1.1. Akrozom: Sperm başının %40-70'ini kaplayan ve başın ön kısmında bulunan oval yapıdır. Dış ve iç olmak üzere iki membran tarafından sarılmıştır. Fertilizasyon için gerekli olan birçok hidrolitik enzimi içerir. Akrozom yapısında bulunan en önemli enzimler hiyaluridaz, proakrozin, esteraz, akrozin, nöraminidaz, asit fosfataz, fosfolipaz, arilsülfataz B, N-asetil glukozaminidaz, arilamidaz ve kollejenazdır. Ovumun fertilizasyonu esnasında akrozomal membranın oosit plazma membranıyla birçok bölgeden birleşmesi sonucu akrozom reaksiyonu gerçekleşmekte ve enzimatik yapı serbestleşmektedir. Akrozinin tarafından aktifleştirilen proakrozin, ejakülasyondan sonra akrozin haline dönüşerek servikal kanaldaki mukus viskozitesinin düşürülmesinde rol oynamaktadır. Akrozin granüloza hücrelerinin çevresinde bulunan proteinlerin ayrılmasında da görev alır. Akrozomal bölgede vakuoller de bulunmaktadır (13,36,38).

2.2.1.2. Çekirdek: Sperm DNA'sı sistein ve arginin yönünden oldukça zengin proteinler olan protaminlerle kompleks halde bulunurlar. Sistein miktarından dolayı disülfid çapraz bağları fazladır. Bu çekirdek yapısına dayanıklılık ve sağlamlılık kazandırır. Çekirdek haploid sayıda kromozom içerir ve oosite girmeden ve protaminler ayrılmadan DNA aktive olamaz (36,37,39).

2.2.2.Boyun

Uzunluğu yaklaşık olarak 0, 3 μm olup, yapısındaki segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriolden oluşur. Proksimalde bölünmüş iki çift sütun, iki majör ve iki minör sütun oluşturup başın alt kısmında birleşirler. Distal sentriol ise spermiyogenezin ileri evrelerinde ortadan kalkmaktadır. Bunlar aksonemin oluşumu sırasında önemli bir rol oynamaktadır. Proksimal sentriol 9 adet dış mikrotübül içerir. Ortadaysa mikrotübül çifti yoktur (36,37).

2.2.3.Kuyruk

Yaklaşık olarak 55 μm uzunluğunda olan kuyruğun merkezi kısmını bir çift merkezi, dokuz çift çevresel mikrotübüler yapıdan oluşan aksonem adı verilen yapı oluşturur. Aksonem yapısı önemli bir değişim olmadan, boyundan başlayıp kuyruğun son uç kısmına kadar uzanır. Kuyruğa hareket özelliğini kazandıran aksonem, dik durmasını sağlayan yapı ise iç ve dış fibrillerdir. Kuyruğun başa yakın kısmında, aksonemin çevresinde heliks yapıda sıralanmış mitokondriler ve arka kısımda yoğun fibrilleri çevreleyen fibröz bir kılıf bulunur. Kuyruğun iskelet yapısını bu fibriller ile fibröz kılıf meydana getirir (38). Sperm kuyruğu orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3'e ayrılır:

2.2.3.1.Orta Parça: Yaklaşık 3,5 μm uzunluğunda olan orta parça, aksonemle çevresindeki dokuz kalın dış fibril ve bunları saran helikal yapıdaki mitokondrion tabakasından oluşur. Sarmalın 11-15 döngüsü vardır ve dönemecin her birine 2 mitokondri denk gelir. Mitokondri sperm hareketinde gerekli olan enerjiyi üretir.

2.2.3.2.Esas Parça: Hücrenin hareketli kısmı olan esas parça, 0,5 μm çapında ve 40 μm uzunluğundadır. Aksonem yapısı, onu çevreleyen kalın fibriller, fibröz tabaka ve en dıştaki plazma membranından oluşur.

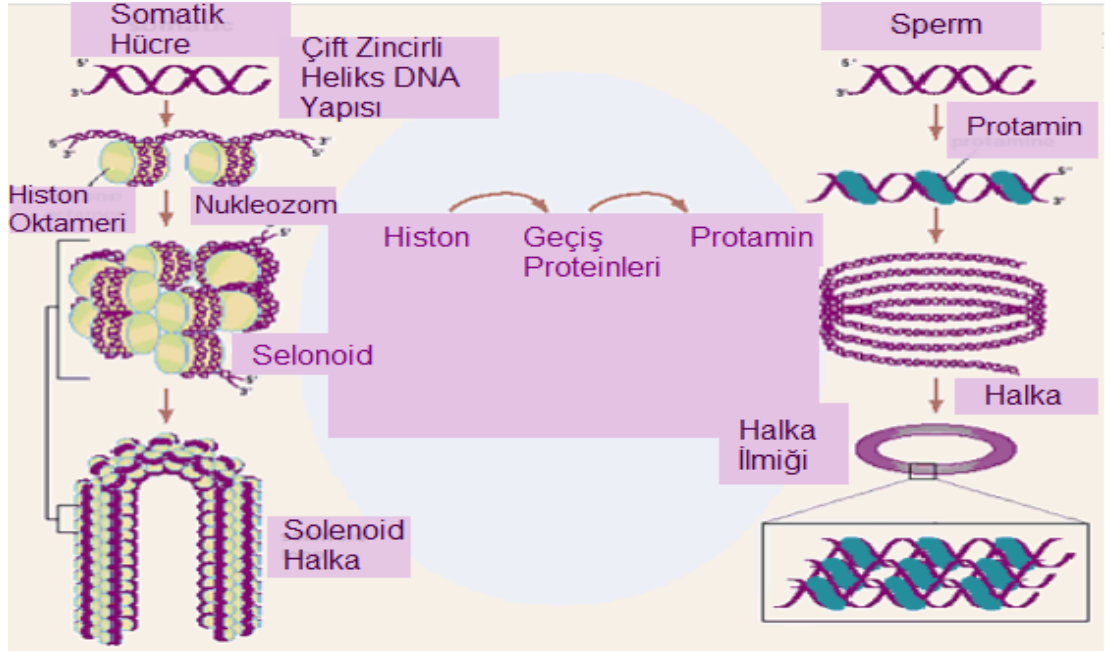
2.2.3.3.Son Parça: 3 µm uzunluğundadır. Kalın fibriller ve fibröz tabaka kuyruğun son kısmında kaybolurken, bölgede önce dynein kolları yok olur, daha sonra merkezdeki mikrotübül çiftleri kaybolur. Dıştaki çiftlerin ikisi ortaya hareket ederken kalan 7'si ise onların etrafını sarar. Bu sırada B tübüleri de açılarak kaybolur. Kuyruğun ucuna gelindikçe aksonemin mikrotübüler yapısı sona erer(36,37).

2.3.Sperm DNA'sı ve Nükleer Proteinleri

Erkek gamet yapısındaki nukleusun kondensasyonu sürecinde etken olan faktör, spermatogenik seri hücrelerin kromatin yapısında diğer somatik hücrelerden farklı olarak bazı olayların geliştiği ultrastrüktürel düzeyde ortaya çıkmıştır (40).

Somatik hücrelerdeki gevşek kromatin yapısına göre sperm hücresinin kromatini oldukça sıkı bir yapıya sahiptir. Spermiyogenez esnasında spermatid nukleusu tekrar düzenlenir ve nükleer yoğunlaşma meydana gelir. Bu süreçte somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) ilk olarak geçiş proteinleriyle daha sonrada arjinin, lizin ve sistein yönünden zengin protaminlerle (Protamin 1 ve Protamin 2) yer değiştirir. DNA iplikçikleri protamin molekülleriyle sıkıca sarılmış haldedir. Sistein yönünden zengin olan bu protamin molekülleri arasındaki intermoleküler ve intramoleküler disülfid köprüleri sperm nukleusunun kompaktlaşmasından ve stabilizasyonundan sorumludur (41-44).

Kedi, yaban domuzu ve koç sperminde sadece protamin 1 (P1) bulunur iken, fare ve insan sperminde protamin 2 (P2) formu da bulunmaktadır. Protamin 2'de sistein içeriğinin daha az olmasından dolayı disülfid köprüsü oluşturma potansiyeli ve buna bağlı olarak da kompaktlaşmadaki etkisi daha azdır.P1 içeriği fazla olan türlerde sperm DNA'sı daha stabil iken, P1/P2 oranında değişim ya da P2 formunun yokluğu erkek infertilitesi ile ilişkilidir (17).



Şekil 2.3. Paternal kromozomların spermiyogenez sırasında yeniden düzenlenmesi (45)

Spermiyogenez evresinin başlangıcında haploid yapıdaki spermatidler tipik nükleozomal kromatin yapısındadırlar. Bu evrede bol miktarda ribozomal olmayan RNA transkripsiyon aktiviteleri vardır. Spermiyogenez ilerledikçe klasik nükleozomal yapısında görülen boncuk dizilimi yerini düz kromatin liflerine bırakır. Bu kromatin yapısı artık transkripsiyon yapmaz ve yan yana iplikçikler halinde toplanır. Spermatogenez ve spermiyogenez esnasında kromozomal proteinler üzerine yapılan çalışmalar, spermatosit ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde somatik histonların ve testise özgü H1t ve TH2B histonlarının bulunduğunu, ileri evre spermatidlerde ise TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin, daha ileri evrelerde artık protamin 1 (P1) ve protamin 2 (P2) proteinlerinin yer aldığını göstermiştir. Sıçanlarda spermatogenezin 12. ve 16. Basamakları arasında nukleusta TP1 ve TP2 proteinleri bulunurken, 16. basamaktan sonra P1 ve P2 proteinleri ortaya çıkmaktadır (41). Spermde, somatik hücrelerde bulunan histonların daha dayanıklı olan protaminlerle yer değiştirmeden önce, testise özgü histonlar ve geçiş proteinleri TP1 ve TP2'ye neden ihtiyaç duyduğu izah edilememiştir.

Yapılan deneysel çalışmalarda, H1t gen ekspresyonu önlendiği zaman fertilitenin devam ettiği gösterilmiştir. TP1 gen delesyonu varlığında komplet spermatogenez süreci tamamlanabilmekteyse de TP2 ve P2 prekürsörlerinin ortamdaki miktarları artmakta, matür P2 gelişmemekte ve kromatin kondense olamamaktadır (12,44). TP1 eksikliğinde sperm hareketliliği bozulur ve fertilizasyon kapasitesi azalır. Bu sonuçlar doğrultusunda: H1t ve TP1 proteinlerinin kromatin kondensasyonunda ve genin inaktivasyonunda rolleri kısıtlıdır. Yapılan çalışmalar TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin DNA'nın bütünlüğünü koruyarak, protaminlerin kromatin üzerinde daha sağlam yerleşmelerini sağladığını ortaya çıkarmıştır. TP2 geninin regülatör bölümü spermatidlerde kloramfenikol asiltransferaz (CAT) düzenleyici genini etkileyerek mRNA translasyonunu geçici olarak 6 gün geciktirir (12,44).

Öte yandan, TP1'in de DNA kırıklarında tamir edici rol üstlendiği gösterilmiştir. Normal spermiyogenez de spermatidlerde histonların uzaklaştırılması esnasında, bir endonükleaz olan topoizomeraz-II, DNA iplikçiklerinden birini keserek aradan bir parça çıkarır. TP1 bu araya girer ve DNA'nın fosfat gruplarıyla etkileşime girerek bu açıklığı doldurur (15). Bu esnada bir DNA ligaz enzimi de TP1'in iki ucunun orijinal DNA iplikçikğine bağlanmasını sağlar. Daha sonra ortama gelen protaminlerde TP1'e tutunurlar. Yan yana gelen kromatinler üzerindeki protaminler arasında oluşan disülfid bağlarıyla, kromatin iplikçiklerinin birbirlerine yaklaşması ve sonuç olarak da kondensasyonun gerçekleşmesi sağlanır. Bu mekanizma, TP1 eksikliğinde kromatin kondensasyonunun bozulmasını izah ederken, TP1'in DNA tamirinde temel rol oynadığını da göstermektedir (15). İnsanlarda sperm kromatini protaminlerce sıkıca paketlenmiştir ancak spesifik DNA dizilerinde, sperm DNA'sının yaklaşık olarak % 15'lik kısmında, DNA histon proteinleri tarafından paketlenmiş durumdadır. Histon bağlı DNA dizileri daha gevşek bir yapıya sahiptir ve bu DNA dizilerinin ve/veya genlerinin fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminde rol aldığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, infertil erkeklerdeki sperm histon/protamin oranının fertil bireylerdekinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Spermdeki artmış histon oranının kromatin yoğunlaşmasını engellediği ve DNA'yı hasara açık hale getirdiği düşünülmektedir (43-51).

2.4.Sperm DNA Hasarı

Sperm DNA hasarlarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı tam olarak açıklanamamış değildir. DNA hasarına uğrayan sperm tamir kapasitesini aşmamış ise tamir olabilir, tamir kapasitesini aşmış ise hasarlı olarak çoğalmasını sürdürebilir, spermatogenez bir seviyede duraklayabilir ya da hücre ölümü gerçekleşebilir (46).

2.4.1.Nükleer DNA Hasarı

Erkek germ hücre hattında iki tip DNA hasarı tanımlanmıştır. Birincisi, replikasyon hataları ve ikincisi de DNA fragmantasyonudur. İnsan ejakülat örneğindeki bu anomalilerin nedenleri: sperm olgunlaşması esnasındaki hatalı paketlenme, apoptozun neden olduğu DNA fragmantasyonu ve oksidatif stres'tir (9,10,14,31).

2.4.1.1.Apoptoz: Normal fizyolojik ortamın devamlılığının sağlanmasında, doku canlılığında ve enfekte hücrelerin yok edilmesinde etkili olan apoptoz, testiküler dokuda da saptanan bir süreçtir (52,53). Spermatogenez esnasında, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ek olarak germ hücre ölümü de gözlemlenir ve bu olay sperm oluşumunda önemli rol oynamaktadır (31,52).

Apoptoz, spermatogenez esnasında programlı hücre ölümüne neden olur ve bu durum sperm normal gelişimi için gereklidir (54,55). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste sürekli olarak apoptoz olayının gerçekleştiği ortaya konmuştur (20).Germ hücrelerinin %75'i testiste apoptoza maruz kalır (56). Apoptoz sürecindeki hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleriyle sertoli hücreleri arasında sayısal olarak uygun oranı sağlamaya yönelik fizyolojik yanıt olarak tanımlanmıştır (52,57).

Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligozoospermik hasta gruplarında, deneysel kriptorşitizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışı olduğu durumlarda testislerde programlı hücre ölümlerinde artma olabilir (55,58). Spermatogenez sürecinde apoptozun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (59). Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere maruz kalması da germ hücrelerindeki apoptozu arttıran bir diğer faktördür (60). Sonuç olarak, testiküler fizyolojiyi bozan dış faktörlerin varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz gerçekleşir ve bu durum klinik açıdan spermatogenezde bozulma ve infertiliteye neden olabilir (61).

2.4.1.2.Oksidatif Stres: Yaşayan tüm aerobik hücreler gibi sperm hücresinde de hayatın devamı için oksijen gereklidir fakat oksijenin yıkım ürünü olan reaktif oksijen türevleri düzeyinde artış meydana gelirse, hücre işlevi ve yaşamı için zararlı etkiler oluşturabilecek oksidatif stres oluşur. Oksijen ve oksijen kaynaklı oksidanlar, hücresel hasar oranlarının artmasına sebep olur. İnfertil erkeklerin büyük bir kısmında ROS düzeylerinin yüksek seviyelerde olduğu ve oksidatif stresin önemli bir infertilite sebebi olduğu gösterilmiştir. Reaktif oksijen türlerine bağlı olarak, DNA zincirinin kırılması, kromozom yapısında delesyon, kromatin yapısının çapraz bağlanması, DNA baz oksidasyonu gibi çeşitli sperm DNA hasarı formları ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca ROS, apoptoz mekanizmasında aracılık eden sitokrom c ve kaspaz 3-9 'u uyararak, tek ve çift iplikçikli DNA zincir kırıklarının büyük oranlarda artmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle, seminal oksidatif stres, sperm DNA hasarı ve apoptoz birbirleriyle, erkek infertilitesi açısından önem arz eden, patojenik moleküler mekanizmayı oluşturmaktadırlar. İnfertilite, oksidatif stres, sperm DNA hasarı ve apoptoz düzeyi yüksek olan hastalarda ortaya çıkan ana komplikasyondur. Fakat bu değişkenlere sperm kalitesinden bağımsız olarak da dikkat edilmesi gerekmektedir. Bundan dolayı patojenik ROS seviyeleri veya düşük kalitedeki sperm kromatin yapısı, erkek subfertilitesinin göstergesi olarak kabul edilebilir. Erkek infertilitesi üzerine bu faktörlerin etkisi her zaman tartışma konusu olmuştur (9,14,62).

2.5.KROMATİN KONDENSASYONU ve KUSURLARI

Kromatin Yapılanması: Spermiyogenez evresinin başlangıcında haploid yapıdaki spermatidler tipik nükleozomal kromatin yapısındadırlar. Bu evrede bol miktarda ribozomal olmayan RNA transkripsiyon aktiviteleri vardır. Spermiyogenez ilerledikçe klasik nükleozomal yapısında görülen boncuk dizilimi yerini düz kromatin liflerine bırakır. Bu kromatin yapısı artık transkripsiyon yapmaz ve yan yana iplikçikler halinde toplanır. Spermatogenez ve spermiyogenez esnasında kromozomal proteinler üzerinde yapılan çalışmalarda, spermatosit ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde histon ve testise özgü TH1 ve TH2B histon yapılarının bulunduğunu, fakat ileri evde spermatidlerde TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin ve daha ileri evrelerde ise protamin P1 ve P2 proteinlerinin yer aldığı gösterilmiştir (24).

Sperm hücresinin fertilizasyon işlemini gerçekleştirebilmesi için dişi üreme sistemi boyunca hareket etme, zona pellusidaya bağlanma ve oosit içerisine penetrasyon gibi süreçleri tamamlayabilmesi gerekmektedir (63). Bu süreçlerin başarıyla gerçekleşmesi için sperm DNA'sı nukleus içerisinde sıkı ve yoğun bir şekilde paketlenmiş haldedir. Sperm kromozomları, mitotik kromozomlara oranla 6 kat daha sıkı paketlenmiştir. Öte yandan, somatik hücre DNA'sı nukleusun bir bölümünü kaplarken, sperm DNA'sı neredeyse nukleusun tamamını kaplar (64). Sperm DNA'sının bu yapıda düzenlenmiş olması, yumurtaya aktarılacak paternal kaynaklı genetik bilginin sıkıca paketlenmesine ve embriyonun gelişmesine imkân sağlar. Sperm kromatin paketlenmesi 4 aşamada gerçekleşir:

- DNA'nın çekirdek zarına bağlanması,
- DNA'nın çekirdeğe bağlandıktan sonra DNA halkalarının oluşumu,
- Histonların protaminlerle yer değiştirmesi ve
- Kromozomal pozisyonudur (48,65).

Spermin somatik hücrelerinde bulunan ve DNA'nın paketlenmesinde görevli histon proteinlerinin yaklaşık olarak % 90-95'i protamin denilen ve sperme özgü olan proteinlerle yer değiştirmektedir. Protaminler, sperm nukleusu içinde yer alan, arjinin yönünden zengin, histon proteinlerinin yarısı büyüklüğünde ve spermatogenez sürecinin ileri evrelerinde sentezlenen küçük proteinlerdir (50).

Sperm kromatin yapısının protaminasyonu, sperm hareketliliği için gereken nukleusun sıkılaştırılmasını kolaylaştırırken, sıcaklık artışı gibi çevresel stresten ve dişi üreme sistemindeki zararlı moleküllerden, sperm genomunu oksitlenmekten korur. Protaminasyon, sperm hücrelerine özgü epigenetik bir düzenlemedir (50). Arjinin yönünden zengin protaminler arasındaki intermoleküler ve intramoleküler disülfid çapraz bağlantılar, sperm nukleusunun yoğunlaşmasında büyük bir önem arz etmektedir. Kromatin yapısında protamin yerine histonlarca paketlenen kromatin dizileri daha gevşektir. Oluşan bu diziler döllenme ve erken embriyo gelişiminde görev almaktadır (66,67). Sperm kromatininin paketlenme aşamasında histon proteinlerinin artışı, kromatin yapısının sıkı paketlenmesini engelleyerek DNA hasarına yatkınlığın artmasına sebep olabilir. Sperm DNA hasarı erkeklerde üreme kapasitesini, intrauterin inseminasyon başarısını ve IVF/ICSI işlemleri sonrası fertilizasyon oranlarını olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (18,68).

Spermiyogenez esnasında DNA paketlenmesinde görev alan histonların büyük bir kısmının varyantlarıyla yer değiştirmesinin sonucunda, histonların hiperasetilasyonu artmaktadır. Bu durum, kromatin yapısında gevşemeye yol açmaktadır. Gevşek paketlenen kromatin yapısı, topoizomerez kaynaklı zincir kırıklarını uyararak histonların ayrılmasını, önce geçiş proteinlerinin (TP) ve sonrasında da protaminlerle yer değiştirmesini de kolaylaştırmaktadır. Bu kırık yapılar, histonların fosforilasyonu ile işaretlenir ve spermiyogenez esnasında germinal epitelyumu terk etmeden topoizomerezlar tarafından ortadan kaldırılır. Bu zincir kırıkları, gama H2AX tarafından histon fosforilasyonu ile işaretlenir ve sperm germinal epitelyumdan salınmadan önce topoizomerezlarca kararlı hale getirilir.

Bu tamir mekanizması eğer herhangi bir sebepten ötürü çalışmazsa, spermde yüksek oranda DNA hasarı oluşumuna sebep olabilir. Topoizomeraz kırıklarının bulunması, spermiyogenez esnasındaki anormallikleri ve tamamlanmamış maturasyon sürecini ifade eder. Çift zincir kırıkları, erkek germ hattında kromozomların yoğun paketlenmesi sürecinde oluşmaktadır ve spermatogenezin doğal bir parçasıdır (17,69).

2.5.1. ANİLİN MAVİSİ (ANILIN BLUE) TESTİ

Spermatogenezde spermler morfolojik değişime uğrarken nükleer protein yapısını da değiştirirler. DNA histonları protaminlerle yer değiştirerek, epididimal pasajda protaminler arasında disülfid bağları oluşmakta ve kromatin yapısı stabilize hale gelmektedir. Böylece maturasyonunu tamamlamış spermatozoların gelişimi sağlanır. Sperm kromatin yapısının normal oluşu başarılı bir fertilizasyon işlemi sağlamaktadır. Sperm nukleuslarında histonların bulunuşu immatürite kriteridir ve bu test immatür spermleri işaretleyerek (histon pozitif) spermiyohistogenez hatalarını belirlemektedir (70) (Tablo 2.5.1.).Anilin mavisi ile boyanmamış spermlerin yüzdesi ise sperm kromatin kondensasyonu değerini vermektedir.

Tablo 2.5.1. Sperm kromatin anomalilerinin araştırılmasında kullanılan çeşitli metotlar (14)

Test	Parametre	Analiz Metodu
Asidik Anilin Mavis	Nükleer Maturite (DNA protein kompozisyonu)	Işık Mikroskobu
Toluidin Mavis	DNA fragmentasyonu	Işık Mikroskobu
Kromomisin	Nükleer Maturite (DNA protein Kompozisyonu)	Fluoreusan Mikroskobu
Sperm Kromatin Dispersiyon Testi	DNA fragmentasyonu	Fluoresan Mikroskobu
DNA kırılımı Tayini (FISH)	DNA fragmentasyonu (ss DNA)	Fluoresan Mikroskobu

In Situ Nick Translation	DNA fragmentasyonu (ss DNA)	Fluoresan Mikroskobu
Akridin Oranj	DNA denaturasyonu (asit)	Fluoresan Mikroskobu
TUNEL	DNA fragmentasyonu	Işık Mikroskobu
Comet	DNA fragmentasyonu (ds DNA)	Fluoresan Mikroskobu
Sperm Kromatin Strüktür	DNA denaturasyonu (Asit/Sıcak)	Fluoresan/Flow
8-OhdG Ölçümü	8-OhdG (8-hidroksi-2'- deoksiganosin)	HPLC

2.6. KREATİN KİNAZ

Kreatin kinaz (CK), fosfokreatin kinaz veya Kreatin fosfokinaz olarak adlandırılan ve 86.000 Dalton molekül ağırlığına sahip olan bir proteindir. İki subüniteden oluşan bu dimerik yapıdan 19.kromozom sorumludur. İntraselüler enzim kreatin'i, ATP'nin tüketimiyle, reversibl fosforilasyon sonucu olarak fosfokreatine katalize etmektedir. Kreatin kinaz aktivitesinin en yüksek olduğu dokular kas ,beyin ve kalptir. Böbrek dokusunda CK aktivitesi düşük olup, karaciğer ve eritrositler ise CK aktivitesinden yoksundur (71-73).

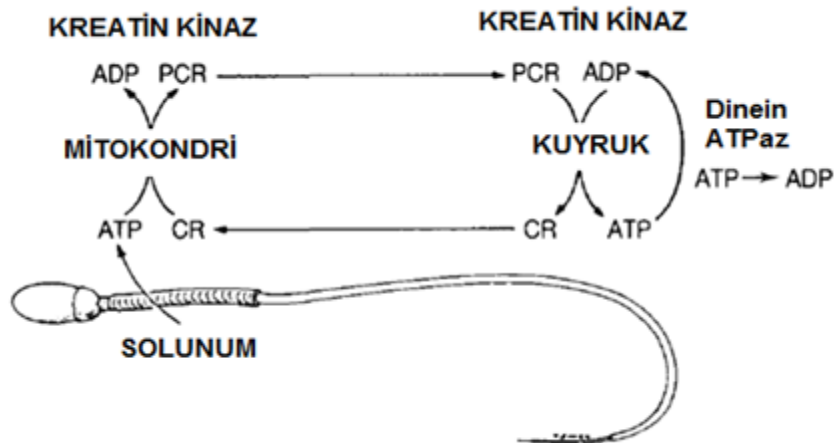
CK'nın 3 tipi (izoenzimi) mevcuttur:

- CK-1 ya da BB primer olarak beyin ve düz kaslarda,
- CK-2 ya da MB primer olarak kalpte,
- CK-3 ya da MM primer olarak iskelet kasında bulunmaktadır (71-73).

CK, miyometriyum, endotelial hücreler, makrofajlar, kan trombositleri, kemik ve kıkırdak hücreleri, retina fotoreseptörleri, böbrek, plasenta, pankreas, tiroid ve sperm hücrelerinin enerji gereksinimleri ile karakterizedir (74).

2.6.1. SPERM KREATİN KİNAZ AKTİVİTESİ

Sperm dölleme potansiyelinin güvenilir metodlar kullanılarak değerlendirilmesindeki eksiklikler uzun yıllar boyunca hem hekimler hem de infertil çiftler için sorun teşkil etmektedir. En yaygın olarak kullanılan sperm konsantrasyonu, hareketliliği ve morfolojisi hakkındaki testlerde de kısıtlı bilgiler elde edilmektedir. Diğer kullanılan akrozom enzim aktivitesi, servikal mukus penetrasyon testi, oosit penetrasyon testi gibi yöntemlerle de sperm fonksiyonu hakkında bilgi sahibi olunarak, erkek infertilitesinde tanıya yönelik tedavi uygulanmaya çalışılmıştır. Ejakülataın biyokimyasal yöntemler ile araştırılması 1986 yıllarında yapılan çalışmalar ile çeşitli erkek nüfuslarında fertilizasyon potansiyellerindeki farklılıkların ortaya çıkarılması ile başladı (26). Spermin orta kısmında bulunan mitokondri, sperm hareketliliği için ATP üretir. ATP enerjisi Kreatin- Kreatin fosfat ile sperm kuyruğuna kanalize edilmekte, kreatin fosfattan, kreatinin fosforilasyonu ile elde edilen ATP enerjisi spermin kuyruğunun hareketi için kullanılmaktadır (25). Bir ATP molekülü tubulin-dynein kompleksi ile hidrolize edildiğinde, elde edilen ADP fosfat transferi ile tekrar fosforile edilir (Şekil 2.6.1). Elde edilen kreatin mitokondride tekrar fosforillenir. Mitokondri ve sperm kuyruğunda kreatin kinaz enzimi sayesinde fosfat transferi kolaylaşır (25, 75).



Şekil 2.6.1. Sperm Kreatin Fosfat Modeli (26)

Denizkestanesi spermi üzerinde yapılan bir dizi çalışmalar, Kreatin kinaz(CK) izoenzimlerinin 2,4-dinitroflorobenzen tarafından inhibisyonu, ATP ve ADP difüzyonuyla elde edilen, yüksek enerjili fosfat gruplarının yeterli düzeyde olmaması, sperm kuyruğundaki flagellaların üçte ikisinde hareket kaybına neden olduğu gösterilmiştir. Benzer bulgular Wallimann ve arkadaşları (1986) tarafından horoz spermi üzerinde yapılan çalışmalarda da elde edilmiştir (27). Horoz ve insan sperminde kuyruk ve orta parça kısmında B-CK ve tanımlanmamış Mi-CK izoformları tespit edildi (27,28). Mi-CK oranının, insan sperminde fertilizasyon potansiyelini belirlemede tanısal değeri olduğu gösterilmiştir (28).

Sperm hareketliliğinde, kimyasal enerjinin ATP formunda bulunması, erkek üreme sağlığı açısından büyük önem arz etmektedir. Kreatin kinaz, sperm enerji sentezi ve transportu açısından anahtar rol oynayan bir enzimdir.

Aynı sperm konsantrasyonuna sahip fertil oligozoospermik erkekler, infertil erkeklere göre daha düşük sperm kreatin kinaz enzim aktivitesine sahiptir. Normal spermatogenez sürecinde, sperm olgunlaşırken hücrel artıklar sitoplazmaya dökülür. Yükselen kreatin kinaz seviyesi, sitoplazmadaki hücrel artıklar ile ilişkilidir. Yüksek kreatin kinaz seviyesi, sperm konsantrasyonunun aksine fertilizasyon potansiyeli ile hücrenin immatürite derecesi ters korelasyon gösterir (21).

Prostat dokusu ve seminal plazmada bulunan CK enzimi özel olarak ya da ağırlıklı olarak BB türüdür. Prostat kanseri hastası erkeklerde, prostat sıvısında Kreatin kinazın BB formunun serum düzeyinin yüksek olması, prostat kanseri tanısının konulmasında klinik açıdan yararlı olacağı ileri sürülmüştür (22).

2.7. İNFERTİLİTE

İnfertilite, çiftlerin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın cinsel yönden aktif olmalarına rağmen en az bir yıl süresince gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır (76). Korunmasız geçen bir yıllık süre sonunda çiftlerin %80'i ilk 6 ay içinde gebe kalabilmektedir. İnfertilite reproduktif çağıdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Tüm infertil çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü rol oynamaktadır. %20-25 çiftte ise hem erkek hem de kadına ait bulgular birlikte gözlenir. %15 çiftte ise tüm tanısal tetkikler sonucunda bir infertilite nedeni tanımlanamaz (77,78).

2.7.1. Erkek İnfertilitesi

2.7.1.1. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri

Erkek fertilitesinde azalma; doğuştan ya da kazanılmış ürogenital bozukluklardan, genital sistem enfeksiyonlarından, varikozel, endokrin bozukluklardan, genetik hastalıklardan ve immünolojik faktörlerden kaynaklanabilmektedir (79). Olguların %60-75'inde sorumlu bir faktör bulunmaz (açıklanamayan infertilite). Bu bulgulara sahip erkeklerde fertilitite problemiyle alakalı geçmişe ait bir hikaye vermeksizin, normal fiziki muayene bulguları ve endokrin laboratuvar sonuçlarıyla başvururlar. Semen analizinde sperm sayısında azalma (oligozoospermi), sperm hareketinin azalması (astenozoospermi) ve anormal yapıdaki sperm formları (teratozoospermi) görülür. Genellikle bu bozukluklar bir arada bulunur ve oligo-asteno-teratozoospermi (OAT) sendromu olarak tanımlanır (77).

ESHRE (Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği) tarafından infertil erkekler üzerinde yapılan geniş ölçekli çalışmada, hastaların yaklaşık olarak 1/3'üne tanı konulamamıştır. Bundan sonraki ikinci geniş grup ise varikozel grubudur (80).

Aşağıda bu çalışma baz alınarak erkek infertilitesinin başlıca nedenleri ve dağılımı listelenmiştir. Bunlar;

1. Nedeni açıklanamayan grup % 31.1
2. Varikosel % 15.6
3. Endokrin hipogonadizm % 9.0
4. Subklinik enfeksiyonlar % 8.0
5. İnmemis testis % 7.8
6. Malign hastalıklarda semen dondurulması % 6.5
7. Erektile disfonksiyon, hipospadias % 6.0
8. Diğer çeşitli nedenler % 5.5
9. İmmünolojik % 4.5
10. Genel ve sistemik hastalıklar % 3.1
11. Obstrüktif patolojiler % 1.7
12. Jinekomasti % 1.1
13. Testis tümörleri % 0.3

Açıklanamayan erkek infertilitesine kronik stres, çevresel kirlenmeye bağlı endokrin bozukluklar, oksidatif stres (ROS) ve genetik bozukluklar gibi çeşitli faktörler de etken olabilmektedir (5).

Erkek infertilitesi klinik açıdan 5 ana grupta sınıflandırılmaktadır (5).

1. Mekanik İnfertilite (kanal tıkanıkları)
2. Azoospermi
3. İmmünolojik İnfertilite
4. Anormal Semen Kalitesi
5. Sperm fonksiyon bozuklukları (Açıklanamayan İnfertilite)

2.8. SİĞARA VE SPERM DNA HASARI

Tütün, dünyanın neredeyse her yerinde üretilmekte olup, kolaylıkla elde edilebildiğinden çeşitli biçimlerde kullanılmaktadır. Tütün enfiye, sigara, tütün çiğneme, puro, nargile ve pipo gibi değişik kullanım biçimleriyle tüketilmektedir. Günümüzde tütünün en yaygın kullanış biçimi sigaradır. Sigara birçok hastalığa yol açması ya da tedaviyi olumsuz etkilemesi açısından günümüzün en önemli halk sağlığı problemlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından sigara içme, biyo-sosyo-psikolojik zehirlenme hali olarak tanımlanmaktadır (81). Sigara dünyada en yaygın kullanılan bağımlılık yapan madde olarak kabul edilmektedir (82).

Sigara ve sigaranın dumanında çok fazla sayıda zararlı kimyasal madde bulunmaktadır. Kurutulmuş tütün büyük miktarda karbonhidrat ve proteinden oluşur. Alkaloidler % 0.5-5, bunların da % 95'i nikotindir; terpenler % 0.1-3; polifenoller % 0.1-2.5, karboksilik asitler: % 0.1-0.7; alkanlar: % 0.1-0.4; alkali nitratlar: % 0.01-5; aromatik hidrokarbonlar; Aldehitler; Ketonlar; Aminler; nitriller; N- ve O- heterosiklik bileşikler; pestisitler; 30'dan fazla metalik bileşik içerir (83). Sigara dumanı partikül ve gaz formunda olmak üzere bazıları farmakolojik açıdan aktif, antijenik, mutajenik, sitotoksik ve karsinogenik olan 4000'den fazla madde içermektedir (83-86). Fazların içerdiği kimyasal maddelerden bazıları Tablo 1'de gösterilmiştir (83-86). Bu kimyasal maddelerden 43'ünün karsinogen olduğu bilinmektedir. Partikül formunda bulunanlar; değişik kimyasal maddelerin karışımı şeklinde olan katran, nitrozaminler, benzen, benzopiren, dioksinler ile krom, kurşun, kadmiyum gibi ağır metallerdir. Gazlar arasında da karbon monoksit, amonyak, kükürt dioksit, dimetilnitrozamin, formaldehit, hidrojen siyanür ve akrolein gibi maddeler bulunur. Gaz fazı içeriğinde, yüksek konsantrasyonda serbest radikaller ve nitrik oksit bulunur. Bu radikallerin yarı ömürleri kısadır. Gaz fazındaki nitrik oksit oksidasyonla nitrojen dioksite dönüşür. Nitrojen dioksit organlara karşı daha reaktiftir.

Partiküler fazda ise bol miktarda nikotin ve nitrozamin bulunur. Bu maddeler suda çözünebilir ve DNA yapısında değişikliğe sebep olabilirler(84,85).

Sigara dumanının en etkili bileşenleri: nikotin ve karbonmonoksittir. Nikotin, renksiz, uçucu bir sıvı olarak sigara içimiyle birlikte alveollere ulaşarak hızlı bir şekilde absorbe olur. Dolaşıma geçen nikotin seviyesi 10-20 dakika iken sigara içimiyle birlikte bu süre 20-40 dakikaya kadar çıkar. Nikotin, otonom ve merkezi sinir sisteminde asetilkolin reseptörleriyle birleşerek uyarıcı etki yapar, karaciğerde metabolize edilerek, kotinin ve nikotin-N-oksit halinde idrarla atılır (87,88). Adrenalin, nöradrenalin salgısını artırır. Dolaşım sisteminde kalp frekanslarını arttırıcı ve damar daraltıcı etkisi gösterir. Nikotin sigaradaki bağımlılığı oluşturan maddedir ve sigara bırakıldığında yoksunluk belirtileri gelişir (88).

ABD Sağlık Bakanlığı'nın hazırlamış olduğu raporda, sigara içindeki nikotinin bağımlılık yapan madde olduğu ve bu bağımlılığın eroin ve kokain bağımlılığına benzer etkide olduğu bildirilmiştir (86).

Karbonmonoksit; Kokusuz, renksiz, tatsız, rahatsız edici olmayan ve karbonlu bileşiklerin tam olarak yanmaması sonucu açığa çıkan bir gazdır (87). Sigara dumanının gaz fazında bulunur. Karbonmonoksit sigara içenlerin kanında, sigara içmeyenlere oranla 2-15 kat daha fazladır. Bu bileşik, kolaylıkla kan hemoglobinine bağlanarak, kanın dokulara en üst düzeyde taşınmasını engeller. Karbonmonoksit - nikotin birlikteliği, koroner kalp hastalığı ve serebrovasküler hastalıklara yol açabilir (89).

Tablo 2.8. Sigara dumanında bulunan bazı gaz ve partiküler faz komponentleri (83)

Gaz Faz	Partiküler Faz
Karbonmonoksit	Nikotin
Karbondioksit	Fenol
Formaldehit	Katekol
Akrolein	Anilin

Aseton	2-toluidin
Piridin	2-naftilamin
Ammonia	Benz(a)antrasen
3-vinilpiridin	Benzo(a)piren
Hidrojen Siyanid	Kinolin
Nitrojen Oksit	N-nitrozonornikotin
N-nitrozdimetilamin	N-nitrozodietanolamin
N-nitrozpirolidin	Polonyum -210

Tütün ürünü olan sigara, birçok hayati tehlike arz eden önemli hastalıklara yol açmaktadır. Sigara onkogenleri aktive etmekte ve kanser baskılayıcı genleri suprese etmektedir. Bununla birlikte onkogen veya tümör baskılayıcı gen sisteminde 10-20 arasında mutasyona sebep olduğu ve buna bağlı olarak akciğer kanserine neden olduğu düşünülmektedir (88).

Dil, larinks, özofagus, mesane, renal pelvis, pankreas, kemik ve serviks kanserleri gibi çeşitli kanserlerle ateroskleroz ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olarak bilinen solunum yoluyla ilgili hastalıklar da sigara kullanımına bağlı olarak ortaya çıkabilir (90-92).

2.8.1. Sigara ve Erkek İnfertilitesi

Sigara üreme sağlığını etkileyen ve erkek infertilitesi için risk oluşturan toksik bir maddedir. Yüksek konsantrasyonda serbest radikal içeren sigara dumanı plazma membrandaki yüksek çoklu doymamış yağ asidi konsantrasyonu sebebiyle sperme daha fazla oksidatif hasar vermektedir (93).

Bir babanın sigara içmesi, kendi androjen seviyesinde değişime neden olmakla birlikte bu babadan olan çocuklarda da doğumsal anomaliler ve hatta çocukluk çağında çeşitli kanserlere neden olabilmektedir (94). Genotoksik maddeler sperm hücresinde mutasyonu indükleyebilir ve yavruya geçerek gelişimini etkileyerek, kanser meydana getirebilir.

Kimyasal karsinojenlerin DNA'yı etkileyen metabolitleri kan yoluyla diğer doku ve organlara taşınabilmektedir. Fakat sertoli hücrelerindeki kan-testis bariyerinden dolayı gelişen cinsiyet hücreleriyle kan dolaşımı doğrudan temas içerisinde değildir. Bununla birlikte nikotin ve nikotin metabolitlerine sigara kullanan kişilerin spermasında rastlanması DNA'yı etkileyen metabolitlerin kan-testis bariyerini aşmış cinsiyet hücrelerini etkilediğini göstermiştir (95-97). Sigara içenlerde, içmeyenlere oranla fertilitte ve yardımcı üreme teknikleri tedavisinin etkilenme riski 1.6 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (98).

İçilen sigara sayısı 20'den fazla olan insanlarda seminal sıvıdaki kadmiyum oranı artmıştır. Yaş, sigara içme süresi, seminal kadmiyum ile semen vizkozitesi arasında negatif korelasyon bulunmuştur (98).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇLER

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

3.1.1.1. Kimyasal Maddeler

Anilin Mavisi (Merck, Almanya)

Asetik Asit (Tekkim, Türkiye)

CaCl₂ (Tekkim, Türkiye)

Deiyonize Su

Diff-Quick Sperm Boyama Seti (GBL, Türkiye)

EDTA (Sigma, Amerika)

Glutaraldehit (Sigma, Amerika)

İmmersiyon yağı (Nikon, Japonya)

KH₂HPO₄ (Merck, Almanya)

KCl (Tekkim, Türkiye)

Na₂HPO₄ (Merck, Almanya)

NaCl (Tekkim, Türkiye)

Sperm Yıkama Mediumu (Biltek-Gynemed, Türkiye)

Sodyum Azid (Merck, Almanya)

Sodyum Fosfat (Tekkim, Türkiye)

Tris HCl (Sigma, Amerika)

Triton X-100 (Sigma, Amerika)

3.1.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler

Creatine Kinase Activity Assay Kit (Biltek- Spin React, Türkiye)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Isıtıcı Tabla (Laborteks, Almanya)

Işık Mikroskobu (Nikon, Japonya)

İnkübatör (Laborteks, Almanya)

Lam (İnterlab, Türkiye)

Lamel (İnterlab, Türkiye)

pH metre (Merck, Almanya)

Santrifüj (Nüve Spin Art, Türkiye)

Spektrofotometre (SOİF, Çin)

Ultrasantrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22R Centrifuge, Amerika)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Denekler

Araştırmada kullanılan insan semen örnekleri İstanbul Tüp Bebek ve Kadın Sağlığı Merkezi Androloji Ünitesinden temin edilmiş ve Yeni Yüzyıl Üniversitesi Öğrenci Laboratuarında çalışılmıştır. Çalışmaya 18-50 yaş aralığında Oligozoospermik sigara içen 18, sigara içmeyen 21 erkek ve normozoospermik sigara içmeyen 18, sigara içen 23 erkek olmak üzere çalışmaya 80 hasta dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan tüm hastaların klinik bilgileri eksiksiz alınmıştır. Tez çalışmasına başlamadan önce, etik kurul onayı alınarak yapılan çalışmalar prosedüre uygun şekilde beyan edilmiştir(Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Tarih;06.03.2015 Sayı;25).

Bu çalışmada istatistiksel değerlendirmeler için Bağımsız Değişken t testi uygulanmıştır. $p < 0,05$ durumunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

3.1.4.1. Anilin Mavisi İçin Kullanılan Çözeltiler

PBS (Fosfat tampon çözeltisi)

1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 g/l KH_2HPO_4

8,0 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

800 ml distile su ile çözülerek pH:7.4 olacak şekilde ayarlanır ve son hacim 1 litre'ye tamamlanır.

Anilin Mavisi

5 g Anilin Mavisi

100 ml PBS

PBS 100° C'de kaynayıncaya kadar ısıtılır, Anilin Mavisi eklenir ve sonra soğumaya bırakılır. Filtre kağıdı ile süzülür

Boyanın pH'sı % 100 Asetik Asit ile 2,5'e ayarlanır.

Glutaraldehit (% 3)

6 ml % 50'lik hazır glutaraldehit, 100 ml'ye PBS ile tamamlanır.

3.1.4.2. Kreatin Kinaz Aktivitesinin Gösterilmesinde Kullanılan Çözeltiler

Sperm Hücrelerinin İzolasyonu İçin

30 mM Tris HCl

80 mM NaCl

40 mM KCl

0,1 mM CaCl₂

pH 8,2 olacak şekilde ayarlanır ve son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Lizis Tamponu

50 mM Sodyum Fosfat,

150 mM NaCl

0,2 mM EDTA

1mM Sodyum Azid

Triton X-100

pH 7,2 olacak şekilde ayarlanır ve son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Sperm Hazırlama

Çalışmaya katılan tüm hastaların oosit toplama (OPU) günü 3 ile 5 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyonla toplanan semen örnekleri yoğunluk sıralayıcısı (gradient) yöntemiyle hazırlandı. Bu işlemde % 90'lık ve % 45'lik gradient mediumları hazırlandı. Konik tüpe sırasıyla % 90'lık üzerine % 45'lik sperm gradient mediumu ve bu mediumların üzerine de 1 ml semen örneği konuldu. Konik tüpler 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası konik tüp içerisindeki gradient ve semen kısmı geçilerek pipet yardımıyla dipteki pellet alınarak temiz bir tüpe aktarılıp 2 ml yıkama mediumu ile karıştırılarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, yapılacak analizler de kullanılmak üzere pellet kısmına sperm sayısına bağlı olarak 0,5-1 ml kültür mediumu eklenerek ,% 5 CO₂ ortamlı inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.Semen'in Fiziksel İncelemesi

3.2.2.1.Likefaksiyon

Sperm örneği oda ısısındaki inkübatörde 30 – 60 dakika içerisinde likefiye edildi.

3.2.2.2.Görünüm

Spermin incelenmesi likefikasyondan hemen sonra yapıldı. Homojen ve gri-opak görünümde idi. Toplanan sperm örnekleri bu bilgiler dahilinde değerlendirildi.

3.2.2.3.Hacim

Ejakülatın hacim değerlendirilmesi konik tabanlı silindir tüplerde yapıldı.

3.2.2.4.Vizkozite

Likefiye olan ejakülat örneğinin 5 ml'lik ipete çekilerek, kendi ağırlığı ile pipetin ucundan damlaması sağlandı. Normal ejakülat örneği pipetin ucundan küçük damlalar halinde döküldü. Bununla birlikte akarak uzayan ejakülat örneklerinin fazla uzaması da vizkozitenin artmış olduğunu gösterdi.

3.2.2.5.pH

Bu işlem ejakülat örneği alındıktan sonra 1 saat içerisinde 6.1 – 10.0 arasında pH ölçebilen indikatör kağıtlar kullanılarak yapıldı. Pipet yardımıyla alınan sperm örneği indikatör kağıt üzerine damlatıldı. Oluşan renk değişimi, skala ile karşılaştırılarak pH tayini yapıldı.

3.2.3. Spermin Mikroskopik İncelemesi

İlk olarak sperm konsantrasyonu, hareketliliği, aglütinasyon derecesi ve sperm dışı hücrelerin varlığı araştırıldı.

3.2.3.1.Sperm Sayısı

Sperm hücrelerinin ejakulattaki sayısını belirlemek için makler kamera kullanıldı. Makler sperm sayma kamerasında spermeler üst camın üzerinde 0,1x0,1 mm karelik 100 kareden oluşan bir ızgara ile sayılır. 10 adet karede sayılan sperm sayısı milyon olarak ml başına düşen sperm sayısını verir.

3.2.3.2. Motilite Tayini

Her bir spermin motilite 4 derece üzerinden değerlendirilerek kaydedildi:

- a. İleri-Hızlı
- b. İleri-Yavaş
- c. Yerinde Hareketli
- d. Hareketsiz

Mikroskop alanı taranarak 100 sperm sayıldı. Her bir sperm hangi kategoriye göre hareket ediyorsa kaydedildi. Her kategori için ortalama yüzde değerleri hesaplandı.

3.2.3.3. Diff-Quick Boyama ile Morfoloji Tayini

Lam üzerine semen örneğinden bir damla damlatıldı, diğer lam ile semenin damlatıldığı lama 45° 'lik açıyla yayma yapıldı. Yayımlar ilk olarak Diff- Quick fiksatifinde fikse edildi. Daha sonra solüsyon 1 (Eosin) ve solüsyon 2 (Azur)'de 5'er saniye bekletilerek boyandı. Üçüncü adım sonrası lamlar, deiyonize suyla yıkandı ve fazla boya uzaklaştırıldı. Son olarak lamlar, lamel ile kapatıldı. Sperm morfolojik özellikleri Kruger kriterleri kullanılarak belirlendi. % 4 veya üzeri normal sperm'e sahip olan örnekler morfolojik olarak normal kabul edildi.

3.2.4.Sperm Hücrelerinden Kreatin Kinaz İzolasyonu

Likefiye edilen semen örneği; 30mM Tris HCl,80mM NaCl, 40 mM KCl, 0,1 mM CaCl₂'den oluşan soğuk çözeltide pH=8,2'de 20 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen pelet süspansiyon olarak, 50 mM sodyum fosfat, 150 mM NaCl, 0,2 Mm EDTA, 1mM Sodyum Azid, Triton X-100 soğuk solüsyon ile muamele edilip pH=7,2'de 30 dakika 20000 rpm'de santrifüj edildi. Sperm hücrelerinden kreatin kinaz enzim izolasyonu için süpernatant kısmından kreatin kinaz toplanarak, izolasyon işlemi tamamlandı.

3.2.4.1. Kreatin Kinaz aktivitesinin Belirlenmesi

Sperm Kreatin kinaz aktivite ölçümünde Rosalki metodu baz alınmıştır. Toplanan her semen örneği için ayrı ayrı ölçüm yapılmıştır. Kreatin Kinaz aktivitesinin belirlenmesinde CK kiti (Spin React) kullanılarak glukoz, heksokinaz ve glukoz 6- fosfat dehidrogenaz düzeylerinin spektrofotometrik yöntemle 37°C'de pH=6,8'de ölçüldü.

Ölçüm yapılırken her örnekte değerin sıfırlanması için distile su kullanıldı. Her hasta için 1 milyon/ml'ye ayarlanmış sperm örneğinden 20µL ve CK kitinden 1ml alınarak, spektrofotometre küvetinde pipetleme yapıldı. İnkübatörde 2 dakika bekletildi. Her bir örnek 1 dakika aralıklarla 3 kez 340 nm'de NADP'nin optik yoğunluğu ölçüldü. Absorbans değerleri arasındaki fark hesaplanarak, ortalama absorbans değeri belirlendi. Kreatin Kinaz aktivitesi CK Kiti prosedüründe belirtilen formül ile U/L CK cinsinden hesaplandı.

37°C

$\Delta A/\text{min} \times 8095 = \text{U/L CK}$

3.2.5. Anilin Mavisi ile Kromatin Kondensasyonunun Gösterilmesi

0,5 ml semen fosfat tampon solüsyonu ile 1500 rpm'de santrifüjlenerek dipte kalan çökelti üstündeki süpernatant atılır. Çökelti üzerine 0,5 ml fosfat tampon ilave edilerek süspansiyon haline getirilir. Bu karışımdan alınan 20 µl'lik örnek lamlara damlatılıp, lamel yardımıyla lamın ucuna kadar yayılıp, kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlar bir kaptaki % 3 glutaraldehit içine alınarak, +4°C'de 60 dakika bekletildi. Fiksasyon sonrası lamın ön ve arka yüzü izotonikle yıkanarak fiksatif giderilmesi sağlandı. % 5'lik asidik Anilin mavi boyası (pH 3,5) lamların üzerini kaplayacak kadar damlatılıp, 10 dakika bekletildi. Lamın ön ve arka yüzü izotonik ile yıkanarak, örnekler kuruması için eğik biçimde oda sıcaklığında bırakıldı. Lam örneğinin üzerine immersiyon yağı damlatılarak 100X'de ışık mikroskopunda 100 sperm seçilerek boyanma durumlarına göre kromatin yapıları değerlendirildi. Nukleusları boyanmamış olan sperm yüzdesi, yüzde olarak kromatin kondensasyonu değeri olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Sigara içiminin normozoospermik erkeklerde sperm konsantrasyonu ve morfolojisi üzerine ve tüm olgular karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı negatif etkisi gözlenmiştir ($p < 0,05$, Tablo 4.2, Tablo 4.5, Grafik 4.1,). Oligozoospermik olgularda semen volümü ve kromatin kondensasyonunun sigara içimi ile negatif etkilendiği görülmüştür (Tablo 4.3, Grafik 4.2, $p < 0,01$). Tüm olgular sigara içimine göre karşılaştırıldıklarında sperm konsantrasyonu ve % kromatin kondensasyonunun sigara içimi ile azaldığı gözlemlendi (Tablo 4.5, $p < 0,05$, Resim 4.1, Grafik 4.3). Özetle sigara içiminin sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfolojisi ve kromatin bütünlüğü üzerine negatif etkisi gözlenmiştir. Sperm kreatin kinaz aktivitesinin tüm olgularda sigara içimi ile negatif etkilendiği görülmüştür (Tablo 4.5, Grafik 4.3 a). Sperm total kreatin kinaz aktivitesinin tüm olgularda sperm morfolojisi ve sperm motilitesi ile ilişkisi bulunmamıştır (Tablo 4.4, a,b).

Tablo 4.1 Çalışmaya dahil edilen vakaların sigara kullanım bilgileri (a)

Oligozoospermik Hasta Grubu	Günde İçilen Sigara Sayısı (Adet)	Sigara Kullanım Süresi (Yıl)
1	15-20	15
2	20	10
3	20	10
4	10-15	17
5	15	10
6	20	21
7	30	12
8	40	15
9	10	10
10	10	20
11	10-15	12
12	10-20	15
13	50-60	25
14	15	13
15	10-20	18
16	10-15	10
17	10	14
18	20-30	10

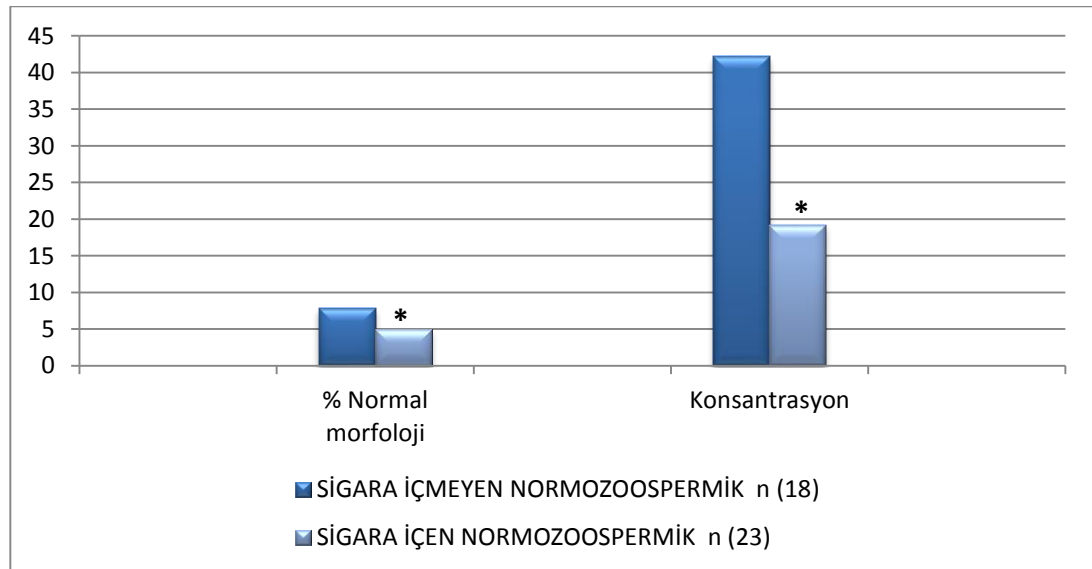
Tablo 4.1 Çalışmaya dahil edilen vakaların sigara kullanım bilgileri (b)

Normozoospermik Hasta Grubu	Günde İçilen Sigara Sayısı (Adet)	Sigara Kullanım Süresi (Yıl)
1	10	20
2	20-30	15
3	15-25	25
4	40	13
5	10	25
6	15	15
7	30-35	15
8	10	25
9	10	20
10	20	10
11	15	14
12	80-100	35
13	40	15
14	20	10
15	20	25
16	10-15	10
17	20	12
18	20	14
19	60-80	15
20	15	10
21	30	17
22	40	20
23	10	15

Tablo 4.2. Sigara kullanımına bağlı olarak normozoospermik bireylerde semen parametrelerinin karşılaştırılması.

	Sigara İçmeyen Normozoospermik (n=18)	Sigara İçen Normozoospermik (n=23)
Yaş	35,5 ± 1,87	31,5 ± 12,02
Konsantrasyon	42,16 ± 12,54	19,2 ± 1,1*
Volüm	3,08 ± 0,66	4,00 ± 2,82
Total MotilSperm(tms)	131,25 ± 47,51	76,00 ± 53,74
% Total Motil	51,66 ± 5,16	47,50 ± 3,53
% Progresif Motilite	36,66 ± 10,80	27,5 ± 3,53
% Normal Morfoloji	7,83 ± 1,47	5,01 ± 1,51*
Kreatin Kinaz Aktivitesi	214,33 ± 63,16	160,55 ± 38,1
Anilin Mavisi Negatif %	34,82 ± 23,24	29,63 ± 21,28

*p<0,05 Normozoospermik sigara içmeyen grupta bağımsız değişken t testine göre istatistiksel olarak anlamlı



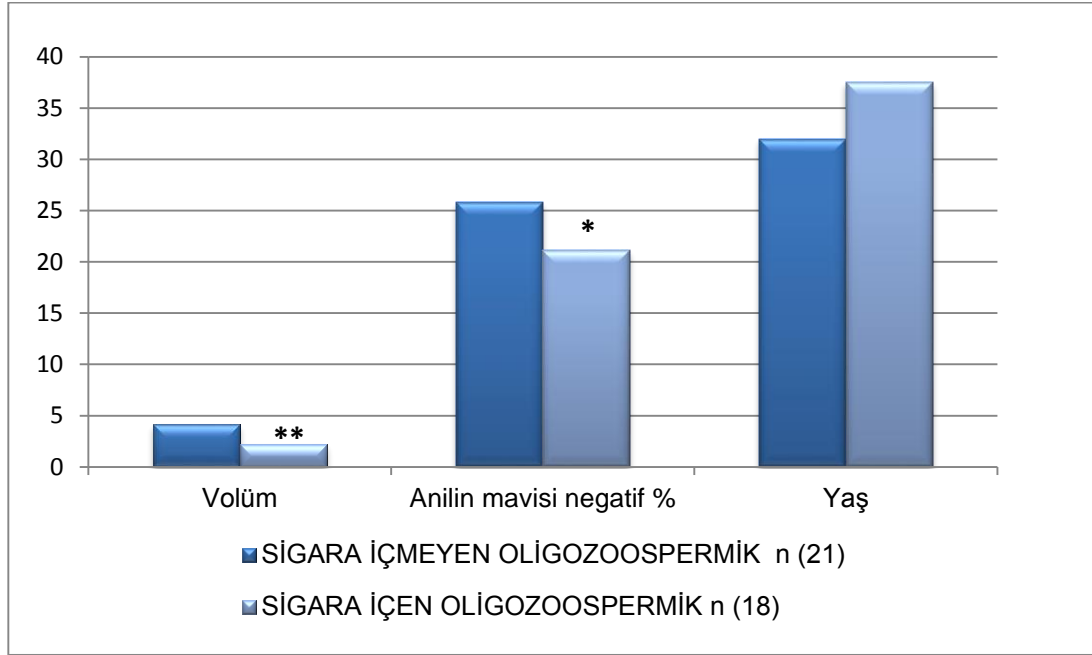
Grafik 4.1. Normozoospermik bireylerde sigara kullanımına bağlı olarak semen parametrelerinin karşılaştırılması (*p<0,05)

Tablo 4.3. Oligozoospermik bireylerde sigara kullanımına bağı olarak semen parametrelerinin karşılaştırılması

	Sigara İçmeyen Oligozoospermik (n=21)	Sigara İçen Oligozoospermik (n=18)
Yaş	32,00 ± 7,46	37,5 ± 4,93*
Sperm Konsantrasyonu	6,85 ± 2,93	9,5 ± 4,34
Volüm	4,14 ± 1,61	2,18 ± 0,86**
Total Motil Sperm(tms)	27,48 ± 13,75	20,32 ± 12,85
%Total motil (tm)	51,55 ± 9,95	42,22 ± 14,37
% Progressif Motil (pm)	35,22 ± 8,12	29,16 ± 11,4
% Normal Morfoloji	1,77 ± 0,66	2,55 ± 1,19
Kreatin Kinaz	191,79 ± 13,39	197,10 ± 30,06
Anilin Mavisi Negatif %	25,80 ± 19,13	21,13 ± 15,66*

*p<0,05 Oligoozoospermik sigara içmeyen grupta bağımsız değişken t testine göre istatistiksel olarak anlamlı

**p<0,01 Oligoozoospermik sigara içmeyen grupta bağımsız değişken t testine göre istatistiksel olarak anlamlı



Grafik 4.2. Oligozoospermik bireylerde sigara kullanımına bağlı olarak sperm kromatini ve semen volümünün karşılaştırılması (* $p < 0,05$ - ** $p < 0,01$)

Tablo 4.4. Olguların sperm morfolojisine ve motilitesine göre CK aktiviteleri (a)

CK/ 10 ⁶	Morfoloji	N	Ort ± SD
	>4	19	216,69 ± 47,73
	< 4	61	208,10 ± 32,62

Tablo 4.4. Olguların sperm morfolojisine ve motilitesine göre CK aktiviteleri (b)

CK /10 ⁶	Motilite	N	Ort ± SD
	>50	52	212,74 ± 40,05
	<50	28	201,92 ± 27,95

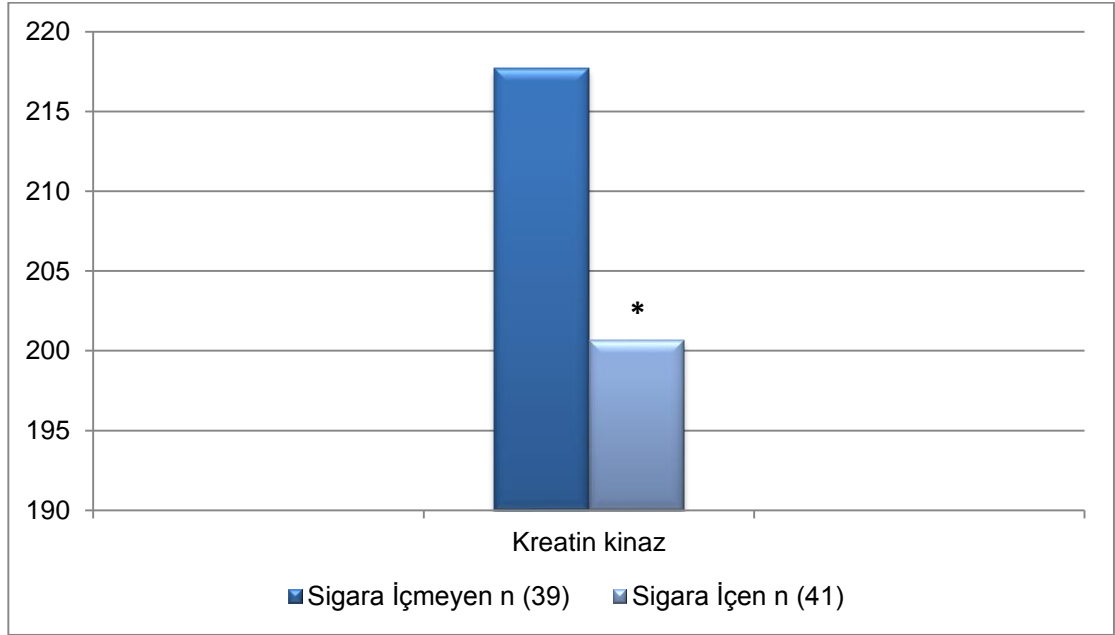
$p < 0,05$ Tüm olguların sperm morfolojisine ve motilitesine göre CK aktiviteleri bağımsız değişken t testi açısından istatistiksel olarak anlamlı değildir (a,b).

Tablo 4.5. 80 olguda sigara içen ve sigara içmeyen hastaların semen parametrelerinin karşılaştırılması

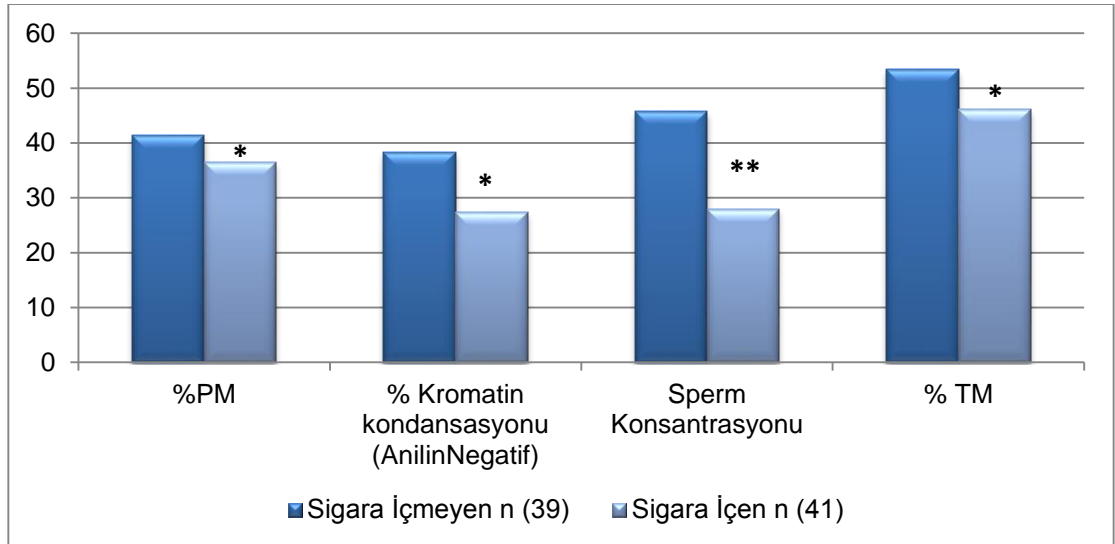
	Sigara içmeyen (n=39)	Sigara içen (n=41)
Yaş	34,71 ± 5,74	36,09 ± 5,37
Sperm konsantrasyonu	45,78 ± 31,92	27,97 ± 32,48**
Semen volümü	3,30 ± 1,28	2,88 ± 1,40
Total Motil Sperm Sayısı	141,21 ± 106,21	100,78 ± 151,34
% Total Motilite	53,43 ± 7,52	46,43 ± 12,79*
%Progressif Motilite	36,5 ± 8,18	41,29 ± 12,85*
% Normal Morfoloji	2,97 ± 2,44	2,65 ± 1,94
Kreatin kinaz	217,69 ± 42,09	200,64 ± 28,24*
% Kromatin kondensasyonu (Anilin negatif)	38,26 ± 17,21	27,28 ± 14,34*

*p<0,05 Tüm olgularda sigara içmeyenlerde bağımsız değişken t testine göre istatistiksel olarak anlamlı

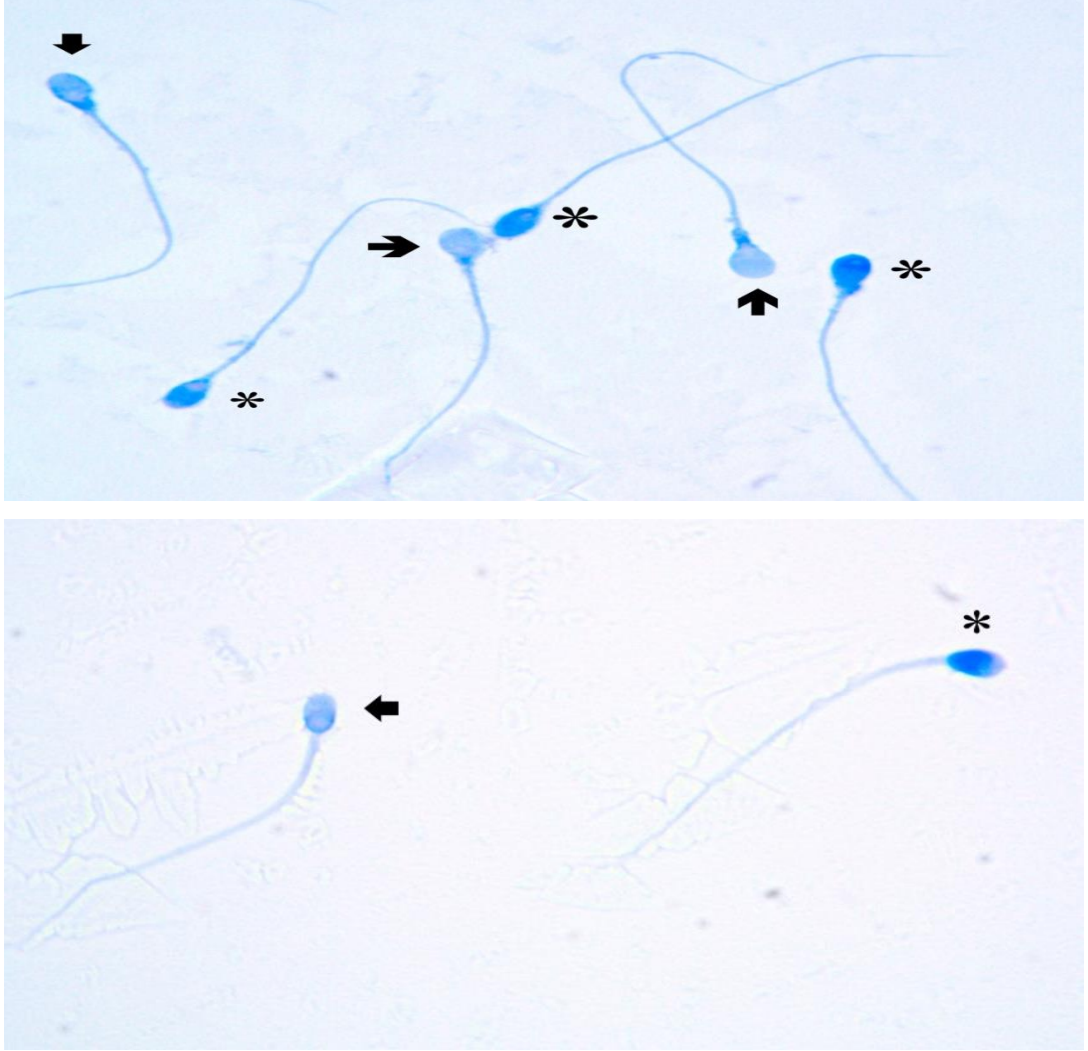
**p>0,01 Tüm olgularda sigara içmeyenlerde bağımsız değişken t testine göre istatistiksel olarak anlamlı



Grafik 4.3. Tüm olgularda semen parametrelerinin sigara içimine bağlı olarak gösterdiği değişimin karşılaştırılması (a) (* $p < 0,05$)



Grafik 4.3. Tüm olgularda semen parametrelerinin sigara içimine bağlı olarak gösterdiği değişimin karşılaştırılması (b) (* $p < 0,05$ - ** $p > 0,01$)



Resim 4.1. Anilin mavisi ile sperm kromatin kondensasyonunun gösterilmesi.
(* pozitif, ← negatif)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada sigara içiminin semen volümü, sperm konsantrasyonu ve motilitesi, sperm kromatin kondensasyonunu negatif etkilediği ortaya çıkmıştır.

Nikotin, erkek infertilitesinde sigaranın etkilerinden sorumlu en büyük faktördür. Sigara kullanmanın ve sigara dumanına maruz kalmanın insanda seminal kaliteyi ve erkek kaynaklı fertilitiyi etkilediği ile ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur (99,100). Speniak ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sigarının semen parametrelerini etkilemediği sonucuna ulaşmışlardır. Ramlau- Hansen 2007 yılında yaptıkları çalışmalarında sigara içiminin semen kalitesini tek başına olumsuz yönde etkilemediğini ileri sürmüşlerdir (101).Fertil erkeklerde sigara içimi semen kalitesi ve hormon düzeylerinin incelendiği başka bir araştırmada sigara kullanımının konsantrasyon, motilite ve üreme hormonları seviyelerinin üzerine belirgin bir etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (3,4). Wang ve ark. Sigara içiminin tek başına semen parametrelerini etkilemediğini ancak sigara içimine diğer faktörlerin (alkol, kafein, toksin maddelere maruz kalma gibi) eklenmesiyle sperm sayı ve hareketlerinde istatistiksel anlamda negatif etkilenmenin olduğunu bildirmişlerdir (102). Trummer ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın sonucunda sigara içen erkeklerde sigara içmeyenlere göre semen parametrelerinde fark gözlenmemiştir. Ancak yuvarlak hücre ve lökosit oranının sigara içen grupta anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (4).

Çalışmamızda oligozoospermik grupta semen hacminde sigara içimi ile birlikte anlamlı bir azalma saptadık ancak bu durum normozoospermik hasta grubunda görülmedi. Marshburn ve ark. ise semen volümünün sigara içenlerde normal sınıra göre azaldığını fakat sayı, hareketlilik ve morfolojik özelliklerinde bir değişiklik saptanmadığını bildirmişlerdir (103).

Vine ve ark. sperm sayısı, hareketlilik ve morfoloji parametrelerinde negatif bir etkilenmenin olduğu ancak bunun istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (104).

Pasqualotto ve ark, içilen sigara sayısının artmasıyla, semen hacminin azaldığını bildirdiler. Fakat araştırmacılar artan sigara sayısı ile sperm konsantrasyonu, motilite veya morfoloji arasında anlamlı bir farklılık gözlemleyemediler (99).

İnfertil Türk erkeklerinde günde 20 adet ve daha fazla sigara içenlerde sperm kuyruk defektlerinin fazla olduğu gözlemlenmiştir (15). Sigara kullanımının morfolojiye olan etkisiyle ilgili diğer çalışmalarda ise sigara içen infertil olguların normal morfolojideki sperm oranlarında azalma saptanmış, canlılık oranlarında farklılık saptanmıştır (105,106). Bizim çalışmamızda da normozoospermik erkeklerde sperm morfolojisinin istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gösterdiği görülmüştür (Tablo 4.2, Grafik 4.1, $p < 0,05$). Ancak morfolojik bozulmanın oligozoospermik bireylerde görülmediği, sigara içen ve içmeyen grupta benzerlik olduğu anlaşılmıştır (Tablo 4.5). Bu durum oligozoospermide sperm morfolojisinin normal sınırların altında olması ile açıklanabilir.

Sigaranın içerisindeki tütün, özellikle akciğer kanserinde birincil neden olarak bilinmesine rağmen, birçok çalışmada da sigara kullanımının semen parametreleri ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, insan sperm hücreleri, seminal plazma ve toplam meni CK aktivitesinin sigara kullanımına bağlı etkileriyle ilgili yapılan çalışmalar daha azdır (107).

Sigara içiminin, sperm kalitesi ve özellikle sperm hareket mekanizması üzerine etkileri tam olarak anlaşılmış değildir. Örneğin, nikotin ve nikotinin metabolitleri sigara içenlerin seminal plazmasında saptanabilir. Bundan dolayı, tütün dumanının zararlı bileşenlerinin kan- testis bariyerinden geçmesinin mümkün olduğu ileri sürülmüştür (105,108).

Zavos ve ark, spermin kuyruğunun aksonemal yapıları ve flagellumun ultrastrüktür anormalliklerinin, sperm hareketinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir(109).

Marshburn ve ark. ise semen hacminin sigara içenlerde normal sınıra göre azaldığını fakat sayı, hareketlilik ve morfolojik özelliklerinde bir değişiklik saptanmadığını bildirmişlerdir (103). Vine ve ark. sperm sayısı, hareketlilik ve morfoloji parametrelerinde negatif bir etkilenmenin olduğu ancak bunun istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (104). Bizim çalışmamızda da sigara içiminin oligozoospermik erkeklerde semen hacmini azalttığı görüldü, bu durum normozoospermik bireylerde görülmedi (Tablo 4.3, Grafik 4.2). Bunun Mashburn ve arkadaşlarının bulgusu ile paralel bir sonuç olduğu görülmektedir.

Wang ve ark. sigara içiminin tek başına semen parametrelerini etkilemediğini ancak sigara içimine diğer faktörlerin (alkol, kafein, toksin maddelere maruz kalma gibi) eklenmesiyle sperm sayı ve hareketlerinde istatistiksel anlamda negatif etkilenmenin olduğunu bildirmişlerdir (102). Trummer ve ark. sigaranın standart semen parametrelerine olumsuz etkisinin olmadığını fakat lökositospermiye sebep olarak serbest oksijen radikallerinin artışına yol açtığı saptanmıştır (4).

Sigara DNA hasarını arttıran mutajenik ve karsinojenik maddeler olarak bilinen ve varsayılan maddeleri (nitrozaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar-PAH) içermektedir. Sigara dumanındaki mutajenik etkiye sahip maddelere bağlı olarak sperma kalitesinde sperm sayısı, motilite oranı ve anormal sperm oranında önemli düşüşler meydana gelmektedir. Sigara içimine bağlı olarak insan spermasında anöploid oranı da artmaktadır (101). Ayrıca sigara kullanımına bağlı olarak seminal plazmadaki antioksidan seviyesinin düşmesi sebebiyle de DNA hasarının arttığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sigara içimine bağlı olarak sperm DNA'sında meydana gelen hasar oranı arasında önemli kabul edilebilecek düzeyde pozitif ilişkinin olduğunu ortaya koymaktadır (95,96).

Gaspari ve ark. yaptıkları araştırma sonucunda tespit etmiş oldukları PAH-DNA kompleksinin sperm DNA'sındaki hasarın bir kanıtı olarak göstermişlerdir. Aynı araştırmacılar sigara kullanmamasına rağmen PAH bileşiklerine maruz kalan insanlarda da PAH-DNA kompleksinin yüksek bulunduğunu iddia etmektedirler. Erkek cinsiyet hücresinin DNA'sındaki hasar spermatogenez esnasında tamir edilmezse bu hasar birikerek artış gösterir (110). Olgun sperm hücresinin hasara karşı küçük çaplı tamir mekanizmasına sahip olup olmadığı halen tartışılmaktadır (111,112). Fraga ve ark sperm DNA'sının hasara uğraması için oksidatif hasarın gerekli olmadığını ve DNA'sı hasarlı bir spermın da fertilizasyonu başarabildiğini, askorbik asitin de insan spermında oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ileri sürmektedir (113).

Sigara süresinin ve sayısının seminal plazma ve sperm hücresinin toplam kreatin kinaz (CK) aktivitesi ile arasındaki ilişki hakkında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar normozoospermik, oligozoospermik ve astenozoospermik erkeklerde sperm hücresi ve / veya seminal plazma CK aktivitesi üzerinde durulmuştur (22-26). Sperm orta parça bölgesi ve kuyruğunda mevcut CK sırasıyla olan, Beyin CK (B-CK) ve Kas CK (M-CK) formunda iki farklı izomer biçimlerine sahiptir. M-CK izoformu, spermatogenezin son aşamasında uzamış spermatidlerin ve olgun spermaların yapısında daha yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır. Huszar ve arkadaşları, sperm M-CK yoğunluğunun sperm kalitesini daha iyi yansıttığını göstermiştir (24,28).Wallimann ve ark. tarafından yapılan bir çalışmanın sonucuna göre, mitokondriden gelen fosfokreatinin ve aksonemden gelen kreatinin ters akım difüzyonunun gösterilmesiyle mitokondrinin sperm hücresi progresif hareketi için önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (27).

Ghaffari ve arkadaşları nikotin, kotinin ve kadmiyum gibi bazı sigara bileşenlerinin insan sperm CK aktivitesini azalttığını ileri sürmüşlerdir. İçilen sigaranın süresinin ve sayısının, seminal plazma, toplam meni ve sperm hücrelerinin CK aktivitesini azalttığını gösteren araştırmalar gösterilmiştir (114).

Sperm enerji transport sisteminde fosfokreatinin (PCr) ATP bazlı enerjinin mitokondrilerden kuyruğa iletilmesinde rol almaktadır (115). Kreatin kinaz (CK) enziminin sperm kuyruk ve baş kısımlarında lokalize olduğu gösterilmiştir (115). Spesifik olarak CK inhibisyonunun sperm motilitesi ve solunumunu inhibe ettiği ve aksonem fonksiyonlarını negatif etkilediği aynı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Çalışmamızda 80 olgunun total CK aktivitesinin analizinde sigara içen grupta azalma olduğu gözlemlendi (Tablo 4.5, $p < 0,05$). Yine bu analizde % total motilitede sigara içimi ile anlamlı azalma saptandı (Tablo 4.5, $p < 0,05$). Elde edilen bu sonuç literatür ile uyumlu görülmektedir. Çalışmamızda sperm total kreatinin kinaz aktivitesinin tüm olgularda sperm morfoloji ve motilitesi ile ilişkisi gösterilememiştir (Tablo 4.4 ,a,b). Bu sonuç kreatinin izoformlarının kullanılmaması olarak değerlendirilmelidir.

Sonuç olarak çalışmamızda analiz ettiğimiz normozoospermik ve oligozoospermik olgularda, sigara içimi ile sperm morfolojisinin, motilitesinin ve kromatin bütünlüğünün sigara içimi ile etkilendiği, sperm enerji mekanizması üzerine sigara bileşenlerinin olumsuz etkileri bulunduğu gösterilmiştir.

6.SONUÇ

Sigaranın tek başına infertilite sebebi olmadığı, infertilite için bir risk faktörü olarak algılanması gerektiği ve bu risk faktörlerinin bir araya gelmesi durumunda infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir. Yardımcı üreme tekniklerinde uygulanan rutin analizlere ek olarak yapılan sitokimyasal testler ile sperm maturasyonunun belirlenmesi, biyokimyasal enzim çalışmaları ile sperm enerji metabolizmasının araştırılması, sperm kaynaklı infertilite sorununun kaynağının anlaşılmasında kolaylık ve katkı sağlayabileceği yönünde düşüncemizi desteklemektedir.

İnfertilite tedavisinde başarı oranını arttırmak için bilinen bir faktör olarak sigara kullanımının terk edilmesi, sadece fertilitte şansını arttırmakla kalmayıp, aynı zamanda sağlıklı nesillerin yetişmesine de olanak sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Sorahan T, Lancashire RJ, Hulten MA, Peck IM, Stewart AM. Childhood cancer and parental use of tobacco: deaths from 1953 to 1955. *Br J Cancer* 1997;75: 134–8.
2. Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum reprod* 1998; 13:1532-1539.
3. Dikshit RK, Buch JG, Mansuri SM. Effect of tobacco consumption on semen quality of a population of hypofertile males. *Fertil Steril* 1987; 48: 334–6
4. Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod* 2002;17:1554–9.
5. Aydos K. EAU İnfertilite Kılavuzu. Türk androloji Derneği.1992; 7-13.
6. Ozgur K, Isikoglu M, Seleker M, Donmez L. Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Turkish population. *Arch Gynecol Obstet* 2005;271(2):109-12.
7. Rantala L, Koskimies L. Semen quality of infertile couples comparison between smokers and nonsmokers. *Andrologia* 1986;1:42-6.
8. Saaranen M, Suonio S, Kauhanen O, Saarikoski S. Cigarette smoking and Semen quality in men of reproductive age. *Andrologia* 1987;19:670-6.
9. Sakkas D, Moffat O. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. *Biol reprod* 2002;66:1061-67.
10. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC: Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164: 542–551.
11. Aziz N, Buchan I, Taylor C, Kingsland CR, Lewis-Jones I. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertil Steril* 1996;66:1000–8.

12. Fantz DA, Hatfield WR, Horvath G, Kistler MK, Kistler WS. Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol Reprod* 2001; 64: 425- 31.
13. Ford WC. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Beşinci Baskı. World Health Organization (WHO).2010;56-63.
14. Agarwal A, Saik TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *Human Reproduction* 2004;95:503-507.
15. Caron N, Veilleux S, Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol Reprod Dev* 2001;58: 437- 43.
16. Mac S, Bhattacharyya AK, Joyce C, Van der Ven H, Zaneveld LJD. Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol Reprod* 1983;28:1032-1042.
17. Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, Liu L, Mullen JB, Carrell DT. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl* 2005;26(6):741-8.
18. Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 1987;236(4804):962-4.
19. Katayose H, Yanagida K, Hayashi S, ve ark. Fertilization failure from a sperm chromatin defect in couples with unexplained infertility. *J.Rep.Med.* 2004;49(9):727-32.
20. Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil* 1992;95: 825-830.
21. Sidhu RS, Yongjin W, Agarwal A. Creatine kinase level and lipid peroxidation rate in human spermatozoa from patients with cancer. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14:538-542.
22. Kavanagh JP, Darby C. Creatine kinase and ATPase in human seminal fluid and prostatic fluid. *J Reprod Fertil* 1983;68:51– 6.

23. Gergely A, Szollosi J, Falaki G, et al: Sperm creatine kinase activity in normospermic and oligozoospermic Hungarian men. *J Assist Reprod Genet* ,1999,16: 35–40
24. Huszar G and Vigue L. Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1990; 25:258-62.
25. Huszar G. The role of sperm creatine kinase in the assessment of male fertility. *Reproductive Medicine Review* 1994; 3: 179-197.
26. Huszar G, Corrales M, Vigue L. Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normozoospermic and oligozoospermic men. *Gamete Res* 1988;19:67–75.
27. Wallimann T, Moser H, Zurbriggen B, Wegmann G, Eppenberger HM. Creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *J Muscle Res Cell Motil* 1986;7:25–34.
28. Huszar G, Vigue L, Morshedi M. Sperm creatine phosphokinase M isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992;57:882– 8.
29. Levy R, Seifer-Aknin I. Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin* 2001 ; 59 (5): 531–45.
30. Liu M, Ma C, Tang L, Wen R, Deng S, Wang Q, ve ark. Quality analysis of the primary semen samples from 512 donors. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 2004;10(10): 734–6.
31. Sharpe RM, Kerr JB, McKinnell C, Millar M. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *J Reprod Fertil* 1994;101(1): 193–8.
32. Aras İ. Erkek İnfertilitesinde Semen Parametreleri İle Sperm Kromozom Anöploidi Sıklığı İlişkisinin Araştırılması. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi; 2009; 15-17.

33. Junqueira LC, Carneiro J. Junqueira's Temel Histoloji. Solakoğlu S (Çev), Bölüm 22. On Üçüncü Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2006; 431-449.
34. Guyton & Hall. Human Physiology and Mechanisms of Disease. Altıncı Baskı. ABD. 12; Gerard J. Tortora. Introduction to the Human Body The Essentials of Anatomy and Physiology, Biological Science Textbooks, Philadelphia : Saunders; 1997; 527.
35. Yen & Jaffe . Üreme Endokrinolojisi Fizyoloji, Patofizyoloji ve Klinik Muayene. Günalp S (Çev), Bölüm 21. Beşinci Baskı. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2006; 3- 74.
36. Ross MH, Pawlina W, Kaye G. Histology, a text and atlas. Dördüncü Baskı. Philadelphia, USA ; Lippincott Williams & Wilkins. 2003;690-96.
37. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Üçüncü Baskı. Pennsylvania, USA; W.B. Saunders Company. 2006;493-98.
38. Phadke, Acyhut M. Clinical Atlas of Sperm Morphology. Birinci Baskı. UK: Anshan; 2008; 12-18.
39. Toshimori K. Dynamics of the Mammalian Sperm Head Advances in Anatomy. Embryology and Cell Biology Volume 2009; 204:45-51.
40. Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: Unrepaired DNA breaks not allowed. Mol Reprod Dev 2001; 58: 357- 8.
41. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Demir R (Çev), Birinci Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006: 531- 64
42. Kierszenbaum AL. Histology and Cell Biology, İkinci Baskı. Mosby: 2002; 529-550.
43. Zini A, Philips S, Courchesne A, Boman JM, Baazeem A, Bissonette F, Kadoch IJ, Gabriel M. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. Fertil Steril, 2009; 91: 2495- 500.
44. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. CMAJ, 2006; 175: 495- 9.
45. Erişim: http://www.nature.com/ng/journal/v28/n1/images/ng0501_10_I1.gif
Erişim tarihi: 28.03.2015

46. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol reprod* 1997;56:602-07.
47. 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;58:368-75.
48. Ward WS, Coffey DS. DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 569- 74.
49. Zini A, Sigman M. Are Tests of Sperm DNA Damage Clinically Useful? Pros and Cons. *J Androl* 2009; 30: 219- 29.
50. Oliva R. Protamines and Male Infertility. *Human Reproduction Update* 2006; 12: 417 – 35.
51. Zhang X, San Gabriel M, Zini A. Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous sub-populations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl* 2006; 27: 414- 20.
52. Hikim S, Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff R S. Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. 2000; 57: 136-141.
53. Sakkas D, Mariethoz E., Manicardi G, Bizzaro D ve ark. Origin of dna damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4:31-37.
54. Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW, Tycho KB, Kal HB, Rooij DG. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development* 2000; 56: 353-359.
55. Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol* 2000; 86: 598-606.
56. Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal Cell Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research* 1996;51: 432-457.
57. Ayashoğlu E. Apoptoz. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2001; 21: 57-62.

58. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr* 1999; 61:393-399.
59. Yin Y, Hawkins KL, Devwolf WC, Morgentaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997;18: 159-165.
60. Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl* 1998;19:487-497.
61. Cohen J J. Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:126-130.
62. Demirtaş A, Üntan İ. Seminal Sıvı ve Spermde Oksidatif Stres ve Antioksidanlar. *Türk Urol Sem* 2011; 2: 24-30.
63. Yamauchi Y, Riel JM, Ward MA. Paternal DNA damage resulting from various sperm treatments persists after fertilization and is similar before and after DNA replication. *J Androl* 2012;33(2):229-38.
64. Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000;45(3):215-25.
65. Poccia D. Remodelling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int Rev Cytol* 1986;105:1-65.
66. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982;93(2):298-305.
67. Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992;13(4):342-8.
68. Gineitis AA, Zalenskaya IA, Yau PM, Bradbury EM, Zalensky AO. Human sperm telomere binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J Cell Biol* 2000;151(7):1591-8.
69. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of fertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 2006;27(6):890-8.
70. İrez T, Kucur M, İşman FK. *Androloji Laboratuvarı El Kitabı*. İstanbul, Türkiye: Nobel Tıp Kitabevleri. 2007; 76-77.

- 71.Lang HH, editör. Creatin kinase isoenzymes. Pathology and clinical application. Birinci Baskı. Berlin: Springer Verlag; 1981.
- 72.Jones MMG, Swaminathan R. The clinical biochemistry of creatine kinase. J Int Fed Clin Chem 1990; 2: 108-114.
- 73.Lang HH, Wurzburg U. Creatine kinase, an enzyme of many forms. Clin Chem 1989; 2(28): 1131-1447.
- 74.Teixeira AM, Borges GF. Creatine Kinase: Structure and Function. Brazilian Journal of Biomotricity 2012; 6(2): 53-65.
- 75.Gonzales Buitrago JM, Miralles JM, Munoz MH, Meza S, Alonsa MT, Garcia Diez LC. Seminal plasma creatine kinase activity in fertility studies. Arch Androl 1980; 5(4):355-360.
- 76.Poongathai J, Gopenath T S, Mononayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J 2009; 50(4): 336.
- 77.Yumru A,Öndeş B, İnfertil Çifte Yaklaşım ve İn Vitro Fertilizasyon'a Doğru Hasta Seçimi. JAREM 2011; 1: 57-60.
- 78.Erdemir F. Obezite ve Erkek İnfertilitesi, J Clin Anal Med 2013;4(1):76
- 79.Stanwell-Smith RE, Hendry WF. The prognosis of male subfertility: a survey of 1025 men referred to a fertility clinic. Br J Urol 1984;56:422-428.
- 80.The ESHRE Capri workshop. Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility. Hum Reprod 1996;11:1775-807.
- 81.Ernster VL. Impact of tobacco on women's health. Samet JM, Yoon S-Y, editorler. Women and the tobacco epidemic: Challenges for the 21st century: World Health Organization; 2001.
- 82.Fahn H-J,Wang L-S, Kao S-H, Chang S-C, Huang M-H, Wei YH. Smoking-Associated Mitochondrial DNA Mutations and Lipid Peroxidation in Human Lung Tissues. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol 1998;19(6): 901-909.
- 83.Golding Jf, In Gibson GJ, Geddes DM, Cosabel U, Sterk PJ, Corrin B. Respiratory Medicine, Üçüncü Baskı. United Kingdom: Saunders. 2003;445-60.
- 84.Bilir N, Aslan D. Sigara Dumanından Pasif Etkilenim Ne Kadar Zararlı?. 2006; 15(9): 4-5.

85. Cooper RG. Effect of tobacco smoking on renal function. *Indian J Med Res* 2006;124:261-268.
86. Demir T. Sigara Bağımlılığı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri 2008; 62(1):231-238.
87. Besli G. Çocuklarda Karbon Monoksit Zehirlenmesi. *Akademik Acil Tıp Dergisi* 2010;9:1.
88. Öztuna F. Sigaranın Hücresel Etkileri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2004;52(1):69-74.
89. Özen Aşut. Hekim ve Sigara. *Türk Tabipler Birliği Yayınları* 1993;1:13-14
90. Doll, R. Cancers weakly related to smoking. *Br Med Bull* 1996; 52: 35-49.
91. Hoffman D, Hoffman I. The changing cigarette, 1950-1995, *J. Toxicol Environ Health* 1997; 50: 307-364.
92. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg, EC, Wesseling, G, Wouters EFM. Systemic Effects of Smoking. *Chest* 2007;131;1557-1566.
93. Yu B. Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *Biomed Res Int* 2015;2015:513196
94. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, et al. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res-Fund Mol M* 1999; 423: 103-111.
95. Horak S, Polanska J, Widlak P. Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. *Mutat Res Gen Tox En* 2003; 537: 53- 65.
96. Gaspari L, Chang SS, Santelle RM, Garte S, Pedotti P, Taioli E. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutat Res-Gen Tox Env* 2003; 535: 155- 60.
97. Fraser L, Strzezek J. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochem Cytobiol*, 2004; 42: 49- 55.
98. Mostafa, T. Cigarette smoking and male infertility. *Journal of Advanced Research* 2010; 1(3): 179–186.

99. Pasqualotto FF, Sobreiro BO, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int* 2006; 97:324-6.
100. Gaur DS, Talekar M, Pathak VP. Effect of cigarette smoking on semen quality of infertile men. *Singapore Med J* 2007;48(2):119-23.
101. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod* 2007;22(1):188-96.
102. Wang SL, Wang XR, Chia SE, Shen HM, Song L, Xing HX, Chen HY, Ong CN. A study on occupational exposure to petrochemicals and smoking on seminal quality. *J Androl.* 2001; 22(1):73-8.
103. Marshburn PB, Sloan CS, Hammond MG. Semen quality and association with coffee drinking, cigarette smoking, and ethanol consumption. *Fertil Steril.* 1989;52(1):162-5.
104. Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, Hulka BS. Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1994; 61(1):35-43.
105. İrez T, Öcal P. Effects of smoking cigarette on intrauterine insemination outcomes *Basic Clin Sci* 2013; 2: 20-24
106. Wong WY, Thomas CM, Merkus HM, Zielhuis GA, Doesburg WH, Steegers-Theunissen RP. Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology. *Fertil Steril* 2000;74(5):930-5.
107. Ghaffari MA, Rostami M. The effect of cigarette smoking on human sperm creatine kinase activity: As an ATP buffering system in sperm. *Int J Fertil Steril.* 2013; 6(4): 258-265.
108. Koksall IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl* 2003; 2:95-9.

109. Zavos PM, Correa JR, Karagounis CS, Ahparaki A, Phoroglou C, Hicks CL, Zarmakoupis - Zavos PN ve ark. An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril* 1998;69:430-434.
110. 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.
111. Aktaş RG, Özdemir A. Sperm DNA yapısı: Önemi ve değerlendirilme teknikleri. *Androloji Bülteni*, 2009; 36: 39- 41.
112. Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratio in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988; 44: 52- 5.
113. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga HJ, ve ark. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11003-11006.
114. Ghaffari MA. In Vitro Inhibition of Human Sperm Creatine Kinase by Nicotine, Cotinine and Cadmium, as a Mechanism in Smoker Men Infertility. *IJFS* 2008;2:125-130.
115. Tombes RM, Shapiro BM. Metabolite channelling: a phosphocreatine shuttle to mediate high energy phosphate transport between sperm mitochondrion and tail. *Cell*. 1985;41:325-334.

8.ETİK KURUL KARARI

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Oligozoospermik erkeklerde sperm kromatin kondansasyonu ve sperm kreatin kinaz aktivitesinin sigara içimine bağlı olarak değerlendirilmesi"	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	Zeynep Kamil Mah. Op.Dr.Burhanettin Üstünel Sok. No:4/3 Üsküdar 34668
	TELEFON	0216 391 06 80
	FAKS	0216 343 92 51
	E-POSTA	www.etikkurulsekretarya@zeynepkamil.gov.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Tülay İREZ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Klinik Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Yeni Yüzyıl Üniversitesi			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç.Dr. Murat MUHCU
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer olmadığı her sayfaya imza atmalıdır.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Oligozoospermik erkeklerde sperm kromatin kondansasyonu ve sperm kreatin kinaz aktivitesinin sigara içimine bağlı olarak değerlendirilmesi"
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ				Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>
	İLAN	<input type="checkbox"/>
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>
DİĞER:	<input type="checkbox"/>	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 25	Tarih: 06.03.2015
Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıyla katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç.Dr. Murat MUHCU

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Başkan Doç.Dr. Murat MUHCU	Kad. Hast. ve Doğum	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Murat API	Kad. Hast. ve Doğum	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ayşenur CELAYİR	Çocuk Cerrahisi	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Arif Aktuğ ERTEKİN	Kad. Hast. ve Doğum	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Güner KARATEKİN	Neonatoloji	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Çetin ÇAM	Kad. Hast. ve Doğum	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Handan ÇETİNER	Patoloji	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Meral İNALHAN	Çoc. Sağ. ve Hast.	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Sağ. Bak. Hizm. Müdürü Dr. Yeliz DOĞAN MERİH	Doğum ve Kadın Hastalıkları	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Hülya CABADAK	Biyofizik	Marmara Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Fulya İlçin GÖNENÇ	Hukuk	Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Günay CAN	Halk Sağlığı	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yard. Doç.Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ	Farmakoloji	Marmara Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yard.Doç.Dr. Ayten ARIKAN	Tıp Tarihi ve Tıp Etiği	Yeni Yüzyıl Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Huriye ÖLGE	Emekli	Emekli	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç.Dr. Murat MUHCU
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

9.ONAM FORMU

Tarih:

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM **FORMU**

Araştırmanın Adı: Oligozoospermik erkeklerde sperm kromatin kondensasyonu ve sperm kreatin kinaz aktivitesinin sigara içimine bağlı olarak değerlendirilmesi

Araştırmanın Amacı: Sigara içiminin sperm fizyolojik parametrelerine, kreatin kinaz düzeyine ve kromatin kondensasyonu üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Araştırmanın Süresi: Çalışmanın bir buçuk yıl içerisinde bitirilmesi planlanmaktadır.

Araştırmaya Katılan Gönüllü Sayısı: Bu çalışmaya seksen (80) hasta dahil edilecektir.

Bilimsel Araştırma ile İlgili Bilgiler: Bu çalışmaya davet edilmeniz sebebi, 25-50 yaş aralığında Sigara kullanan ve sigara kullanmayan infertilite tanısı konmuş ya da fertiliğinin azalmış olması sebebiyle klinik açıdan uygun olmanızdan dolayı katılmanızı istiyoruz. Bu araştırma İstanbul Tüp Bebek ve Kadın Sağlığı Merkezi ve Yeni Yüzyıl Üniversitesi Öğrenci Laboratuvarı işbirliği ile gerçekleştirilecektir.

Araştırmada İzlenecek Yöntem: Kreatin kinaz enzim aktivitesinin spektrofotometrik olarak ölçümü ve kromatin kondensasyon defektlerinin Anilin mavi boyama yapılarak tespiti için sizden daha önceden alınmış olan spermogram örneğinden arta kalan miktar üzerinden çalışmamız gerçekleştirilecektir. Bu analizler haricinde sizden kesinlikle ilave örnek alınmayacaktır.

Alternatif Tedavi veya Girişimler:

Araştırma Sırasında Karşılaşılabilecek Riskler:

Temel araştırmadır. Tedavi uygulanmamaktadır. Hastaya verilebilecek herhangi bir risk yoktur.

Araştırma Süresince 24 Saat Ulaşılabilecek Kişi Adı / Soyadı / Telefonu:

Duygu Kütük

Araştırmaya katılmanız durumunda,

- Sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir.
- Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme yapılmayacaktır.
- Hekim ile aranızda kalması gereken size ait bilgilerin gizliliğine büyük özen ve saygı gösterilecektir.
- Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgileriniz büyük bir hassasiyetle korunacaktır.
- Gönüllü olarak katıldığınız çalışmanın herhangi bir aşamasında araştırmadan ayrılabilirsiniz. Ancak ayrılmadan önce araştırmacılara bu durumu bildirmeniz önemlidir.
- Çalışmaya katılmayı kabul etmemeniz durumunda tedavinizde ve klinik izlemlerinizde hiçbir değişiklik olmayacak, her zaman olduğu gibi aynı özen ve ihtimam ile hastalığınızın tedavisi sürdürülecektir.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen kişi 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. Araştırmaya dahil olduğumda herhangi bir ücret almayacağımı biliyorum.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

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

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

GÖNÜLLÜ KATILIMCININ;

Tarih:

CİNSİYET:	DOĞUM TARİHİ:
EĞİTİM DURUMU:	MESLEĞİ:
DAHA ÖNCE HERHANGİ BİR TEDAVİ / CERRAHİ İŞLEM UYGULANMA DURUMU:	DAHA ÖNCE YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİNİN UYGULANMA DURUMU:
CİNSEL PERHİZ SÜRESİ:	SİGARA KULLANIYOR MUSUNUZ?
KAÇ SENEDİR SİGARA KULLANIYORSUNUZ?	GÜNDE KAÇ ADET SİGARA İÇİYORSUNUZ?

Kimliğimin gizli tutulması ve yalnızca eğitim, araştırma ve bilimsel amaçlı kullanılması koşuluyla tıbbi kayıtlarımın kullanılmasına izin veriyorum.

Gönüllünün Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

Açıklamaları Yapan Kişinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

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

Gerekliyse Yasal Temsilcinin Adı / Soyadı / İmzası / Tarih

10.ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi: 21.08.1989

Doğum Yeri: İstanbul

Uyruğu: T.C

Medeni Hali: Bekâr

e-mail: duygukutukk@gmail.com

EĞİTİM DURUMU

2013-2016	Yeni yüzyıl Üniversitesi Klinik Embriyoloji Oligozoospermik Erkeklerde Sperm Kromatin Kondensasyonu ve Sperm Kreatin Kinaz Aktivitesinin Sigara İçimine Bağlı Olarak Değerlendirilmesi
2007-2011	Fatih Üniversitesi Biyoloji
2003-2006	Tuna Lisesi Fen Bilimleri
1997-2003	Adnan Menderes İlköğretim Okulu İlköğretim-Ortaöğretim

YABANCI DİL

İngilizce

İŞ DENEYİMİ

2013-2014 Avicenna Hastanesi
Yeni Doğan Yoğun Bakım Ünitesi – TPN

STAJ DENEYİMLERİ

06.07.2015 - 30.01.2016 **Göztepe Medical Park Hastanesi** – Androloji
Laboratuvarı

30.06.2014 - 14.07.2014 **Bahçelievler Medical Park Hastanesi-** Androloji-
Embriyoloji Laboratuvarı

03.08.2009 - 04.09.2009 **Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi-** Histoloji-
Embriyoloji A.B.D

01.08.2008 - 29.08.2008 **Bakirköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları**
Eğitim Araştırma Hastanesi –Mikrobiyoloji Laboratuvarı