

T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**İZOLE TERATOZOOSPERMİ OLGULARINDA
FARKLI SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİNİN
KROMATİN KONDENZASYON DEFEKTİ SONUÇLARINA
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATİCE ŞAHİN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İskender Sinan ÖZKAVUKCU

İSTANBUL
Ocak 2016

T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**İZOLE TERATOZOOSPERMİ OLGULARINDA
FARKLI SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİNİN
KROMATİN KONDENZASYON DEFEKTİ SONUÇLARINA
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATİCE ŞAHİN

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İskender Sinan ÖZKAVUKCU

İSTANBUL
Ocak 2016

T.C.
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: 15.01.2016

İmza
Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKCU
Ankara Üniversitesi

İmza
Prof. Dr. Tülay İREZ
Biruni Üniversitesi

İmza
Prof. Dr. İmer OKAR
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Resimler, Grafikler, Tablolar Listesi	IV
Kısaltmalar	V
Beyan	VI
Önsöz	VII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Testis Gelişimi ve Histolojisi.....	2
2.2. İlkel Eşey Hücreleri.....	8
2.3. Testis Anatomisi.....	11
2.4. Sertoli Hücreleri.....	12
2.5. Spermatogenezis.....	13
2.6. Spermiyogenezis.....	20
2.7. Spermde Bulunan Nükleer Proteinler ve Spermatogenez Sırasında Histon-Protamin Değişimleri.....	26
2.8. Sperm İnceleme Yöntemleri.....	29
2.9. Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Yayma Preparat Hazırlama.....	36
3.2. Dört Farklı Grup için Sperm Hazırlama Metodu.....	36
3.3. İstatistiksel Analizler.....	38
4. BULGULAR	38

5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ.....	47
7. ÖZET.....	48
8. SUMMARY.....	49
9. KAYNAKLAR.....	50
10. EKLER.....	56
11. ÖZGEÇMİŞ.....	57

ŞEKİLLER, RESİMLER, GRAFİKLER, TABLOLAR LİSTESİ

Şekil 1	A. Testisin 8. Haftadaki enine kesiti. Tunica albuginea, testis kordonları, rete testis ve primordiyal germ hücreleri. B. Dördüncü aydaki testis ve genital kanallar, ductus deferens	4
Şekil 2	A. Beş haftalık embriyoda, primordial germ hücrelerinin yolk kesesi duvarından embriyo içerisine göçü izlenmektedir. B ve C. Beş haftalık embriyo kaudalının üç boyutlu çiziminde, gonadal (genital) kabartılar ve primordial germ hücrelerinin, gelişen gonadlara göçleri izlenmektedir. D. Altı haftalık embriyonun transvers kesitinde primer seks kordonları görülmektedir. E. Bir sonraki safhanın transvers kesitinde, farklanmamış gonadlar ve paramezonefrik duktuslar izlenmektedir	5
Şekil 3	Fotomikrografta, yaklaşık 40 günlük embriyo abdomeninin transvers kesitinde, embriyonu genetik cinsiyetine göre bir testis veya ovaryum olarak gelişecek gonadal kabartı gösterilmektedir. Gelişmekte olan bu gonadın çoğunluğu gonadal kabartının sölom epitelinden köken alan mezenşimden oluşmuştur. Gonad içerisindeki büyük yuvarlak hücreler, primordiyal germ hücreleridir	6
Şekil 4	Farklılanmamış Gonadın Testise Dönüşmesi	7
Şekil 5	Primordial Germ Hücrelerinin Farklılaşmamış Gonada etkisi	9
Şekil 6	Testis ve Overin Gelişimi (Seminifer tübül ve over korteks kesiti)	10
Şekil 7	Mayoz Bölünme	14
Şekil 8	İnterfaz evresi	15
Şekil 9	Profaz I	15
Şekil 10	Sinapsis	16
Şekil 11	Metafaz I	16
Şekil 12	Anafaz I	17
Şekil 13	Telofaz I	17
Şekil 14	Sitoplazma bölünmesi (sitokinez I)	17
Şekil 15	Mayoz II	18
Şekil 16	Mayoz bölünmede kromozom sayısının ve DNA miktarının evrelere göre değişimi	19
Şekil 17	Crossing over sonrasında ortaya çıkan yavru hücrelerdeki genotipik çeşitlilik	19
Şekil 18	Tek bir spermatogonyumdan mayoz bölünmelerle meydana gelen 4 adet spermatozoa	21
Şekil 19	Testislerin yapısını ve spermatogonyumdan olgun spermatozoa oluşumunu gösteren çizim	22
Şekil 20	Spermatogenik seri hücrelerinin Sertoli hücreleri ile komşuluğu ve spermatidlerin Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasında olgun spermatozoona dönüşümü	23
Şekil 21	Spermiyogenezisde olgun bir spermatidten spermiyumun oluşması	24
Şekil 22	Spermin Yapısal Özelliklerini Gösteren Şematik Çizim	26
Resim 1	Anilin mavisiyle boyanmış semen preparatı. Baş kısmı koyu renkte boyanan spermatozoon persiste histon açısından pozitif olarak değerlendirilmekte	29
Tablo 1	Çeşitli Sperm Morfoloji Değerlendirmelerinde Esas Alınan Değerler	32
Tablo 2	Çalışmaya Dahil Olan Hastaların Demografik Bilgilerinin Ve Seminal Parametrelerinin Ortalama Değerleri	39
Tablo 3	Hastaların Bazal, Anilin mavisi Değerlerinin (Farklı) Yöntemlerin Kullanılmasıyla Ne Şekilde Değiştiğini Gösteren Tablo	40
Tablo 4	Sigara Tiryakiliğine Göre Çalışma Grupları Arasında Sigara İçen ve İçmeyen Hastalara Ait Anilin Mavisi Persiste Histon Yüzdesi	41
Tablo 5	Sigara Tiryakiliğine Göre Bazal ile Farklar. Sigara İçen ve İçmeyen Gruplarda AB Skor Yüzdelinde Yöntemlerin Değerlere Göre Ortaya Çıkarttığı Değişiklikler	41
Tablo 6	Bazale Göre Farklar ile Korelasyonlar. AB Skorlarında 3 Farklı Yöntemde Ortaya Çıkan Değişimin Hasta Yaşı, Semen Volümü, Sperm Konsantrasyonu, Molilite ve Morfolojiye Göre Korelasyonu	42

KISALTMALAR

AAB	-	Anilin Mavisi Boyası
AMH	-	Anti-Müllerian Hormon
CMA3	-	Kromomisin boyası
DNA	-	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	-	Dünya Sağlık Örgütü
hCG	-	insan koryonik gonadotropini (human chorionic gonadotropin)
ICSI	-	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (Intracytoplasmic sperm injection)
IVF	-	İn vitro Fertilizasyon
LH	-	Luteinize edici hormon
MIS	-	Müllerian inhibe edici madde (Müllerian-inhibiting substance)
SRY	-	Y kromozomu üzerindeki seks bölgesi (Sex region on Y Chromosome)
TDF	-	Testis Belirleyici Faktör (Testis determining factor)
TH1	-	T Helper-1 lenfosit
TP2	-	Geçiş proteini-2 (Transition protein-2)

BEYAN

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

Hatice ŞAHİN

ÖNSÖZ

İTHAF

Değerli anneme, babama, ağabeylerim Ümit ve Taylan Şahin'e, sevgili yeğenlerim Uğur ve Ufuk Şahin'e ve çok sevdiğim arkadaşım Oskar Öğüten'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tezime başladığım günden beri yanımda olan ve benimle canıgönülden ilgilenen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Sayın Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKCU'ya, lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Tülay İREZ'e, bu çalışmanın yürütülmesine olanak sağlayan ve halen çalışmakta olduğum HRS Kadın Hastanesi İcra Kurulu Başkanı Sayın Prof. Dr. A. Tarık AKSU'ya, çalışmam boyunca değerli fikirlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Kaan AYDOS ve Sayın Doç. Dr. Ahmet Hakan HALİLOĞLU'na, istatistiksel değerlendirmelerde bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Kenan KÖSE'ye, yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yardımına koşan, zor günlerimde yanımda olan ve hayatımın her anında yanımda olmasını istediğim değerli arkadaşım Opr.Dr. Oskar Öğüten'e, mesleki hayatım boyunca yardım ve tecrübelerini esirgemeyen HRS Ankara Kadın Hastanesi IVF Laboratuvar Sorumlusu Sayın Aykut GÜREL'e ve tüm embriyolog arkadaşlarıma, hayatım boyunca hep yanımda olan, beni destekleyen babam Hüseyin ŞAHİN, annem Lütfiye ŞAHİN, ağabeylerim Ümit ŞAHİN ve Dr. Taylan ŞAHİN'e,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Sperm nükleuslarında kromatinin gevşek paketlenmiş olması ve bozuk DNA, genellikle baş anomali gösteren spermelerde gözlenir. IVF uygulamaları bu tip spermelerin fertilizasyon potansiyellerinin düşük olduğunu göstermekte ve yine bu olgularda doğal yolla gebe kalma şansının da azaldığını belirtmektedir. Aynı konuyu inceleyen diğer çalışmalarda sperm nükleusunda; hasarlı DNA'nın gebeliğin erken dönemlerinde düşüğe de neden olduğu gösterilmiştir¹⁻⁵.

IVF uygulamalarında önem kazanan bu anomaliler sperm bir gelişim anomali olarak ortaya çıkar ve ışık mikroskobu düzeyinde anilin mavisi ve toluidin mavisi boyamalarıyla gösterilebilir.

IVF uygulamalarında ejakulat örneği veya testiküler sperm işleminden önce servikal mukusun seçiciliğini taklit eden yöntemlerle hazırlanır. Kısaca sperm yıkama olarak adlandırılan bu işlemler sonucunda seminal plazmanın dekapasitasyon faktörlerinden arındırılmış, motilitesi artmış ve normal morfolojideki sperm çok olduğu bir sperm popülasyonu elde edilmiş olur. Bazal semenin özelliklerine ve laboratuvar prensiplerine göre değişmekle birlikte; günümüzde dansite, gradient santrifügasyon, swim-up ve benzeri yöntemler kullanılmaktadır.

Bu çalışmaya merkezimize infertilite şikayeti ile başvuran ve izole teratozoospermi tanısı alan bireyler dahil edilmiştir. Hastaların bazal semen örneklerinden ve üç farklı yıkama yönteminden (dansite gradient santrifügasyonu, swim-up ve ikisinin kombinasyonu) elde edilen sperm anilin mavisi ile boyanmıştır. Böylece yıkama yöntemlerinin persiste histona sahip spermelerin eliminasyonuna etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Gelişimi ve Histolojisi

Genital sistem, erken dönemde her iki cinstede birbirine benzer. Bundan dolayı, genital sistemin gelişiminin başlangıç dönemi, cinsel gelişimin farklılaşmamış safhası olarak adlandırılır.

Erkek ve dişi morfolojik özellikleri 7. embriyonik haftadan itibaren gelişmeye başlarlar. X kromozomuna sahip ovumun, X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllenmesi ile fertilizasyon gerçekleşir, böylece cinsiyet belirlenir. Gelişmekte olan gonadlar XY veya XX kromozom çiftine sahip olurlar^{6,7}. Primordiyal (ilkel) germ hücreleri ilk kez gelişimin dördüncü haftasında vitellüs kesesi duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanmaları sırasında vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Bu sırada, primordiyal germ hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteriy boyunca gonadal kabartılara göç ederler. Altıncı haftada primordiyal germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve primer seks kordonlarının yapısına katılırlar^{6,8}.

Gonadlar (testisler ve ovaryumlar), üç kaynaktan köken alır:

- Posteriyör karın duvarını döşeyen sölom epiteli
- Bunun altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- İlkel cinsiyet hücreleri

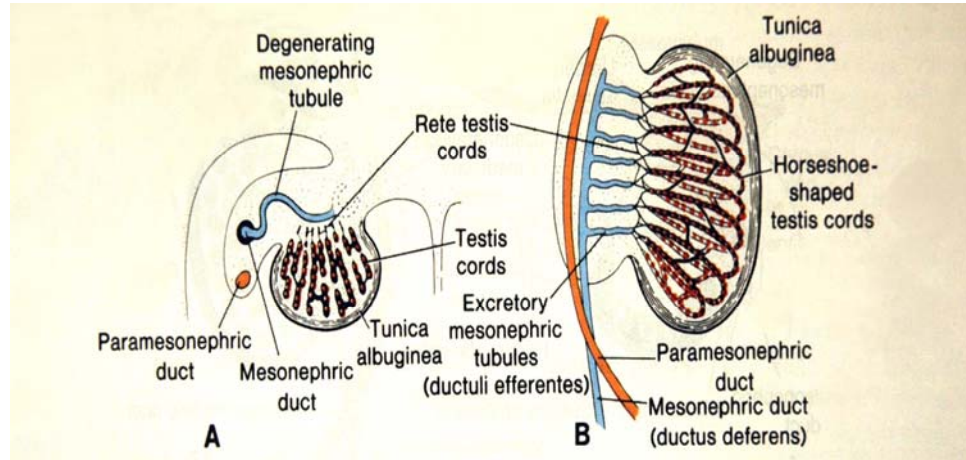
Gonad gelişiminin ilk safhaları, beşinci haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun mediyalinde, sölom epitelinde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin çoğalımıyla, mezonefrozun mediyalinde bir gonadal (genital) kabartı oluşur. Parmak şeklindeki epitel kordonları

(birincil cinsiyet kordonları), alttaki mezenşimin içine doğru kısa sürede büyürler.

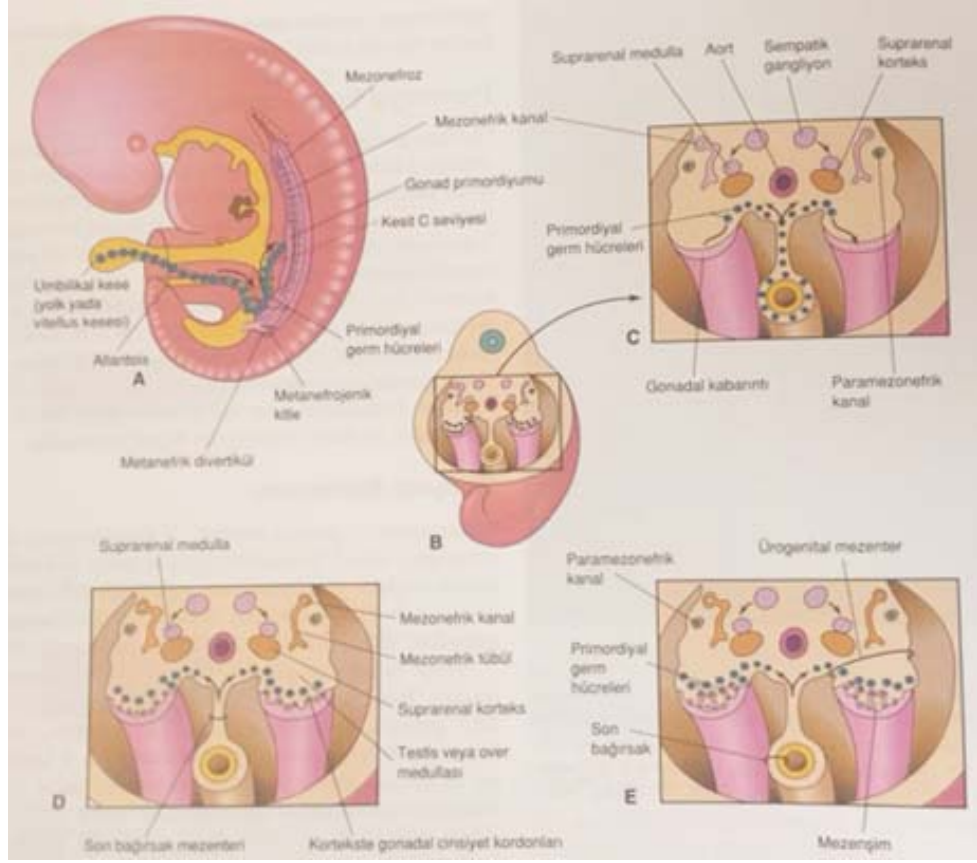
Gonadların görünümü yedinci haftaya kadar her iki cinste de aynıdır ve "farklanmamış gonadlar" olarak adlandırılırlar. Gonadal gelişimin ilk safhaları beşinci haftada ortaya çıkar; mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık, gonadal (genital) kabartı oluşur. Parmak şeklindeki epitel kordonları primer seks kordonları altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede ilerler. Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomun kısa kolu seks tayini için önemlidir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geni, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleşiktir. Farklanmamış gonadın medullası üzerinde testise farklanmasında belirleyici Y kromozomudur. Y kromozomu tarafından düzenlenen TDF, testiküler farklılaşmayı sağlar. Bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılıklar. Farklanmamış gonad bu aşamada, dışta yer alan medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılık, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklılık, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur. On ikinci haftada gelişmekte olan gonadın kalın bir fibröz kapsül olan tunika albugineasının belirginleşmesi erkek fetüs için karakteristiktir. Kapsülün gelişmesi sonucunda seks kordonlarının (seminifer-testiküler- kordonların), yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Bu arada genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdan ayrılır ve kendi mezenteri olan mezorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar; seminifer tübüllere, tübüli rekti ve rete testise farklılıklar. Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genital organlar erkek cinse uygun farklılaşmasını

indükler. Testosteron üretimini insan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşmıştır.

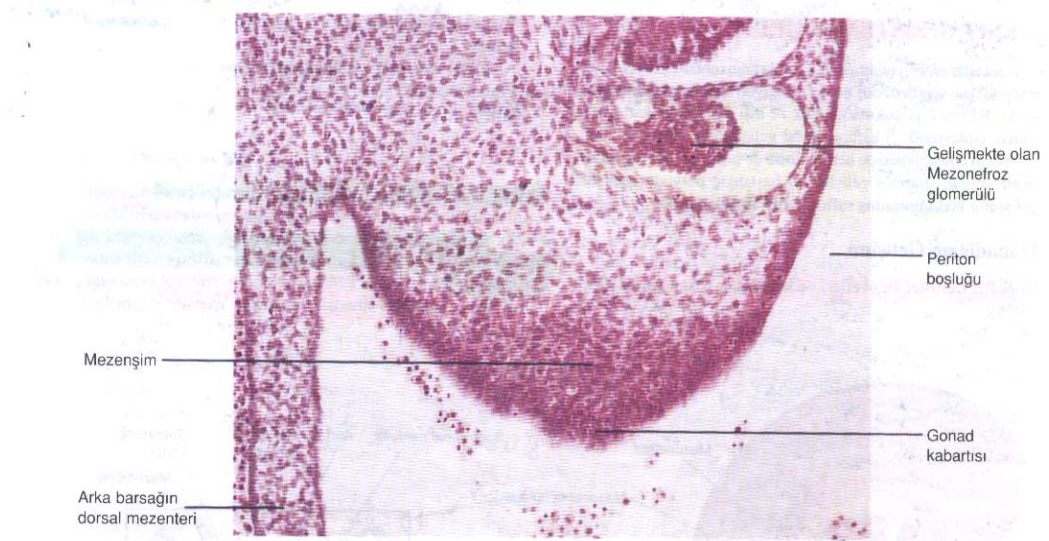
Primordiyal germ hücrelerinin göçü stella, fragilis genleri ve BMP-4 tarafından kontrol edilir. Sertoli hücreleri; dorsal sölom epitelinden (mezodermal), spermatogonyumlar; primordiyal germ hücrelerinden (endodermal), primordiyal germ hücreleri; vitellus kesesi endoderminden köken alır. Dışta korteks ve içte de medulladan oluşur. Eğer embriyo XX cinsiyet kromozomuna sahipse, farklılaşmamış gonadın korteksi over yönünde değişim gösterir ve medulla geriler. Eğer embriyo XY cinsiyet kromozomuna sahipse, medulla testise farklılaşır ve korteks, bir takım kalıntılar dışında geriler⁹.



Şekil 1. A. Sekiz haftalık embriyoda testisin transvers kesitinde tunica albuginea, testisin kordonları, rete testis ve primordial germ hücreleri gösterilmektedir. Mezonefrik sekretuar tübüllerin glomeruler ve Bowman kapsulleri dejenere olur. B. Dördüncü aydaki testis ve genital kanallar gösterilmektedir. Atrofik şekilli testis kordonları rete testis kanallarıyla birleşir. Duktuli efferentes mesonefrik kanallara girmektedir⁹.



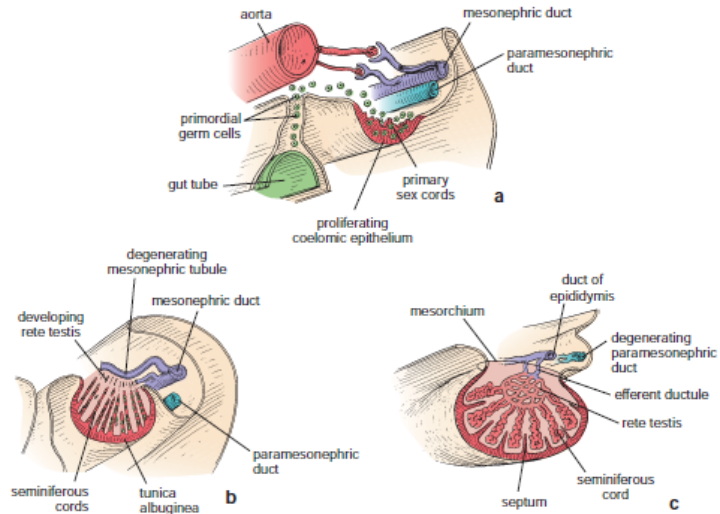
Şekil 2. A. Beş haftalık embriyoda, primordial germ hücrelerinin yolk kesesi duvarından embriyo içerisine göçü izlenmektedir. B ve C. Beş haftalık embriyo kaudalinin üç boyutlu çiziminde, gonadal (genital) kabartılar ve primordial germ hücrelerinin, gelişen gonadlara göçleri izlenmektedir. D. Altı haftalık embriyonun transvers kesitinde primer seks kordonları görülmektedir. E. Bir sonraki safhanın transvers kesitinde, farklanmamış gonadlar ve paramezonefrik duktuslar izlenmektedir¹⁰.



Şekil 3. Fotomikrografta, yaklaşık 40 günlük embriyo abdomeninin transvers kesitinde, embriyonun genetik cinsiyetine göre bir testis veya ovaryum olarak gelişecek gonadal kabartısı gösterilmektedir. Gelişmekte olan bu gonadın çoğunluğu gonadal kabartının sölom epitelinden köken alan mezenşimden oluşmuştur. Gonad içerisindeki büyük yuvarlak hücreler, primordiyal germ hücreleridir¹⁰.

Daha sonra; hipofizden salınan luteinize edici hormon (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar. Testosterona ek olarak embriyoda interstisyel hücreler hamileliğin 18. haftasına kadar işlevlerini sürdürürler; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler fetal testisler glikoprotein yapıda bir hormon olan anti-Müllerian hormon (AMH) veya Müllerian inhibitör madde (Mullerian Inhibitory Substance: MIS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. AMH, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salgılanması puberteye kadar devam eder, daha sonra seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik kanalların gelişimini baskılar^{6,8}. Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar, lümenleri yoktur, puberteden itibaren lümen gelişir. Fetal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisinin dış yüzeyindeki

mezoteli oluşturur. Rete testis, duktuli efferentese farklılaşacak olan 15-20 adet mezonefrik tübül ile devam eder. Bu kanallar (duktuli efferentes), duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar¹¹. Dişi ya da erkek embriyolar birer çift genital kanala sahiptir. Mezonefrik kanal (Wolf kanalı) erkek üreme sistemi iç organlarının önemli bir bölümüne farklılaşırken, paramezonefrik kanal (Müller kanalı) dişi iç genital organlarının gelişimine katılır. Beş ila altıncı haftalarda genital sistem farklılaşmamış aşamada olduğundan genital kanalların her iki çifti de bulunur. Sekizinci haftada fetal testislerden salgılanan testosteronun etkisi altında, mezonefrik kanalların proksimal parçaları, oldukça kıvrıntılı bir hal alır ve epididimise farklılaşır. Mezonefrik kanalın diğer bölümlerinden duktus deferens ve duktus ejakülatoryus gelişir^{6,7}. Leydig hücrelerinin hem aktiviteleri hem de sayıları hormon uyarısına bağlıdır. İnsanda gebelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon anne kanından fetüse geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Androjenik hormonların varlığı embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir.



Şekil 4. Farklılaşmamış Gonadın Testise Dönüşmesi¹¹.

2.2. İlkel Eşey Hücreleri

Dördüncü haftanın başında, vitellüs kesesinin duvarında ve allantoisin başlangıç yerine yakın yerleşimde olan endodermal hücreler arasında belirirler. Daha sonra, arka barsağın dorsal mezenteri boyunca gonad kabartılarına göç ederler. Altıncı haftada, ilkel eşey hücreleri alttaki mezenşimin içine girerler ve birincil cinsiyet kordonlarının yapısına katılırlar.

Testis Belirleyici Faktör (TDF), testis farklılaşmasını sağlar. Bu düzenleyici unsurun etkisi altında, birincil cinsiyet kordonları seminifer tübüllere farklılaşır. Y kromozomunun olmaması, over gelişimiyle neticelenir.

Testislerin Gelişimi bazı genlerin koordinasyonlu uyarımıyla başlar. SRY Geni Y kromozomunun kısa kolunda bulunur ve anahtar role sahiptir. TDF birincil cinsiyet kordonlarını uyarır, kordonlar medullanın derinliklerine doğru uzamaya başlar dallanırlar ve anastomoz yaparlar. Rete testis oluşur. Tunika albuginea gelişince cinsiyet kordonlarının (seminifer kordonların) yüzey epiteliyle olan bağlantısı sona erer. Tunika albugineanın yoğunluk kazanması testis gelişimi için oldukça önemlidir.

Testis genişledikçe mezonefrozdaki ayrılır mezonşiyuma tutunur.

Seminifer kordonlardan gelişen yapılar ve aşamaları şöyledir:

- Seminifer Tübüller
- Tubuli Rekti
- Rete Testis
- Seminifer tübül mezenşimden ayrılır.
- Leydig hücreleri mezenşimden gelişirler ve 8. haftadan itibaren androjenik hormon salgılamaya başlar.

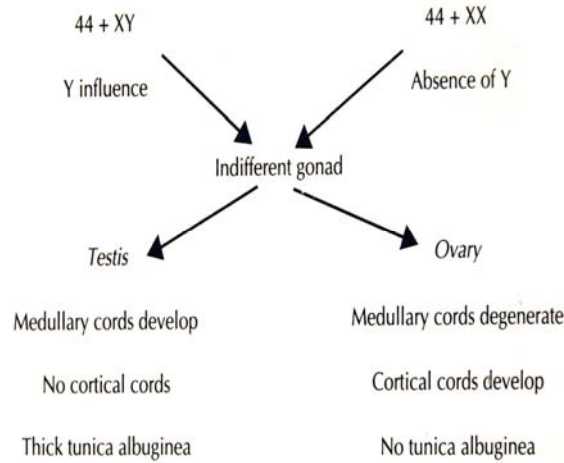
- Androjen hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin farklılaşmasını uyarır.
- İnsan koryonik gonadotropin (hCG) testosteron üretimini uyarır 8-12. haftalarda pik yapar.

Fetal testislerden salınan hormonlar

- Testosteron
- Antimülleryan Hormon (AMH)

AMH Sertoli hücrelerince salınır puberteye kadar devam eder. Mülleryan (paramezonefrik kanalların) gelişimini baskılar.

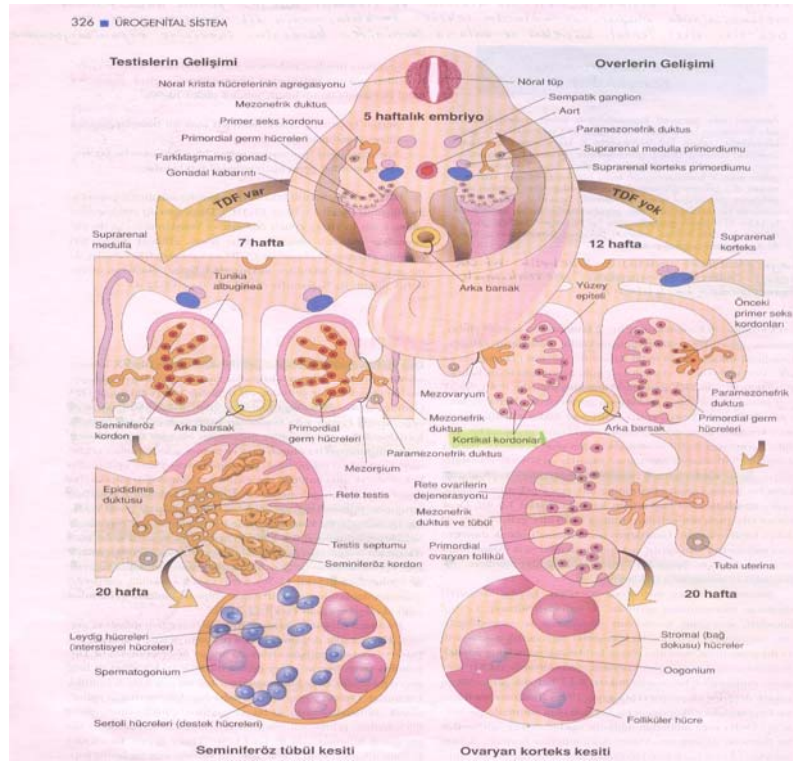
Seminifer tübüller puberteye kadar lümensizdir daha sonra lümenleri gelişir.



Şekil 5. Primordial germ hücrelerinin farklılaşmamış gonada etkisi⁹.

Fetal Testis

Sertoli hücreleri seminifer tüplerde çoğunluktadır. Daha sonraki gelişimde testis yüzey epiteli düzleşir yetişkin testisin dış yüzey mezotelini oluşturur. Rete testis efferent duktulileri oluşturan 15 – 20 adet mezonefrik tübüllerle devam eder.



Şekil 6. Testis ve overin gelişimi (seminifer tübül ve over korteksi kesiti)¹⁰.

Fetal testislerde Sertoli hücreleri 6.-7. haftalarda AMH'yi sentezler. Sekizinci haftada Leydig hücreleri testosteron salgılar ve hCG, testosteron salınımını uyarır. Testosteron mezonefrik kanallardan erkek genital kanal oluşumunu uyarırken; AMH, paramezonefrik kanalların epitelyal-mezenşimal dönüşümle kaybolmasına yol açar. Mezonefroz dejenere olunca mezonefrik kanallardan bazıları kalır duktuli efferentesi oluştururlar. Duktuli efferentes mezonefrik kanala açılır, bu bölgede duktus

epididimise dönüşür. Mezonefrik kanal epididimisin distalinde kalın ve kaslı bir hale gelir ve duktus deferens oluşur.

2.3. Testis Anatomisi

Testis işlevsel olarak iki anatomik yapıya ayrılmaktadır. Bu bölgeler interstisyum ve seminifer tübüllerdir. İnterstisyumda Leydig hücreleri bulunur ve bu hücreler testosteron hormonu salgırlar. Seminifer tübüllerin epitelinde ise Sertoli hücreleriyle desteklenen spermatogonial kök hücreleri bulunmaktadır ve bu hücreler sperm üretimini sağlamaktadır. Testisin yapısındaki spermatogoniumlar bazal lamina üzerinde yer almaktadır. Bu hücreler lümene doğru hareket ettikçe olgunlaşmaktadırlar. Spermatogenik hücrelerin arasında onlara destek olan Sertoli hücreleri bulunmaktadır¹².

Bir testisteki seminifer tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir ve tübüller kıvrımlı ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümeni daralır ve düz tübüller ya da tübüli rekti adıyla bilinen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanır^{11,13}. Her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında olup 30-80 cm uzunluktadır ve bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir seminifer epitelden (germinal epitel) oluşur. Seminifer tübülü saran tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış miyoid hücrelerden oluşur. Seminifer tübül epiteli iki tip hücreden meydana gelir. Bunlar destek hücreleri (Sertoli hücreleri) ile spermatogenik seri hücreleridir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgırlar¹⁴. Testislerin karın boşluğunun dışında skrotum içinde yerleşimleri vücut ısısından 2-3°C düşük ısıda olmalarını sağlar. Testislerin

boyu 4-5 cm, eni 2,5 cm ve ön arka çapı 3 cm olup ortalama ağırlıkları 14 gramdır.

Seminifer tübül duvarında bulunan spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak dört-sekiz tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşarak spermatozoonları oluştururlar^{11,13,14}.

2.4. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri seminifer tübüllerin bazal membranından lümene doğru uzanan somatik bileşenlerdir.

FSH ve testosteron gibi faktörler tarafından gelen endokrin ve parakrin uyarıya yanıt olarak germ hücrelerinin farklılaşması için destek sağlamaktadırlar. Sertoli hücreleri düzensiz çekirdeğe sahip olarak daha kompleks bir epitelium oluşturmak üzere germ hücrelerine yapışmaktadırlar. Bu bağlantıların arasında kan testis bariyeri de yer almakta ve germ hücrelerinin farklılaşması sırasındaki immün sistem hücrelerinden haploid germ hücrelerini korumaktadır. Ayrıca germ hücrelerinin gelişmelerinde ve hareket kazanmalarında da önemli role sahip oldukları gösterilmiştir¹⁵.

Sertoli hücreleri Tip A ve Tip B olarak iki kategoriye ayrılabilir¹⁶. Tip A Sertoli hücrelerinde serbest halde lümene bırakılmaya hazır olan olgun spermatidler sitoplazmik kriptlerin derinlerinde iken Tip B Sertoli hücrelerinde bu kriptler zor görülürler. Bu nedenle epitelyum döngüsünün 14 aşaması boyunca Tip A Sertoli hücrelerinin Tip B Sertoli hücrelerine kendilerini dönüştürmeleri, germ hücreleri gelişme ve hareketleri sırasında oluşan hücresel değişikliklere adapte olmaları için gereklidir^{4,17}.

Geçirimsiz bir bariyer oluşturmak

Kan testis bariyeri epitelyumu spermatogonyum ve adluminal bölge olmak üzere iki bölüme ayırmaktadır. Spermatogonyum bölgesi, pre-

leptoten ve leptoten spermatositlerin yerleştigi bazal bölmedir. Adluminal bölge ise spermatogenez ve spermiogenezin çeşitli aşamalarında olan mayotik spermatositler ve spermatidlerin olduğu bölgedir¹⁸.

Kan testis bariyeri;

- Germ hücre gelişim ve hareketi ile ilgili özel bir ortam sağlar
- Moleküllerin geçişini düzenler
- İmmunolojik olarak bariyerdir

Sertoli hücreleri olgun spermatidlerin seminifer epitelinden serbest bırakılması için gereklidirler. Bu serbest bırakılma sonrasında Sertoli hücreleri, spermatogenez sırasında dejenere olan spermatidleri ve diğer germ hücrelerinden serbest kalan atık organları fagosite etmektedir. Ayrıca germ hücrelerinin sağ kalımı için gerekli olan protein, proteaz, karbonhidrat, vitamin ve metal iyonların germ hücrelerine ulaştırılması ve sentezi işlerini de sağlar.

2.5. Spermatogenezis

Mayoz

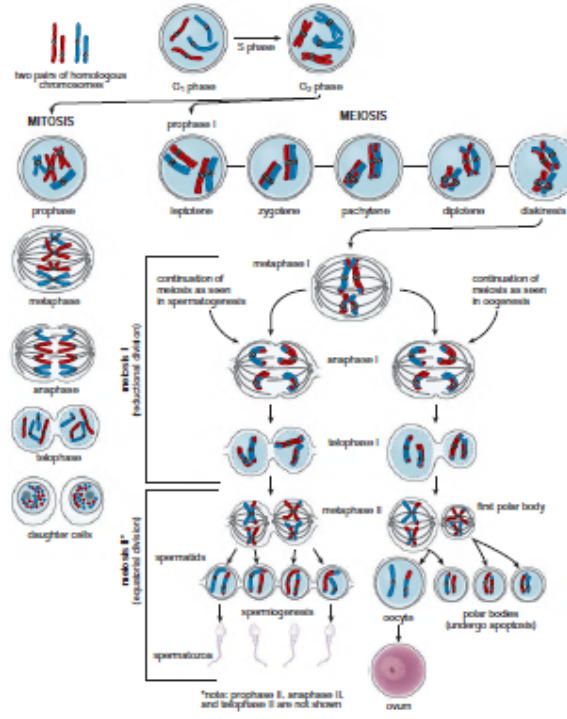
- Mayoz bölünme üremeyi sağlayan eşey hücrelerinin oluşumunu sağlar.
- İnsan ve hayvanlarda sperm ve ovumun oluşumunu
- Çiçekli bitkilerde yumurta ve polenin oluşumunu
- Çiçeksiz bitkilerde sporların oluşumunu sağlar.

Mayoz sadece ovaryumlarda ve testislerde gerçekleşir. Tek tur DNA replikasyonu ve iki hücre bölünmesi gerçekleşir, sonuçta haploid ürünler oluşur. Özel kromozom homologlarını çiftleştirerek DNA parçalarının karşılıklı

değişimini (genetik rekombinasyon) kapsar. Böylece kardeş hücreler orijinal üreme hücrelerinden genetik olarak farklı olur.

Kadınlarda mayoz gestasyonu ilk üç aylık döneminde başlar ve erkeklerde ergenliği izler. Mayoz, çakışan kardeş kromatidler arasında DNA değişimine izin verir, sonraki rekombinasyonun iki yeni kromatid arasında gerçekleşmesi ile birlikte yeni ancak bağlantılı gen kombinasyonu oluşturabilir bu da genetik çeşitliliği artırır¹⁹.

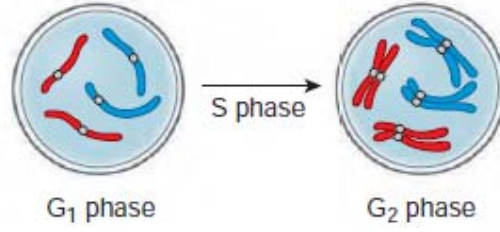
Mayoz bölünme; mayoz I ve mayoz II olmak üzere iki aşamada gerçekleşir.



Şekil 7. Mayoz Bölünme²⁰.

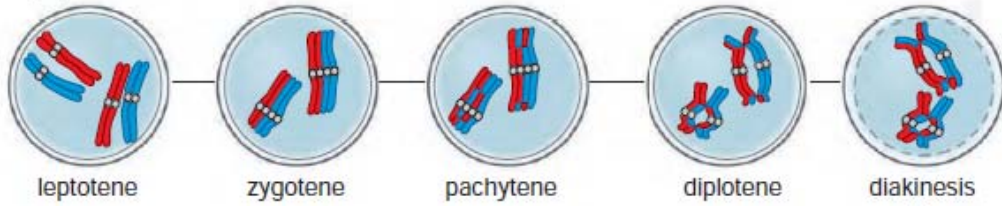
MAYOZ I

İnterfaz, profaz I, metafaz I, anafaz I, telofaz I olmak üzere 5 evrede gerçekleşir.



Şekil 8. İnterfaz evresi²⁰.

Hücrenin bölünme için hazırlık evresidir. Bu evrede hücre büyür. Sitoplazma ve organel miktarı iki katına çıkar. DNA kendini eşler.



Şekil 9. Profaz I²⁰.

Kromatin iplik, kısalıp kalınlaşarak kromozomları oluşturur. Çekirdek zarı ve çekirdekçik kaybolur.

Sentrozomlar iğ iplikliklerini oluşturur ve hücrenin zıt kutuplarına doğru çekilir.

Homolog kromozomlar, yan yana dizilir. Homolog kromozomlar: biri anneden, diğeri babadan gelen ve aynı karakterlerle ilgili genleri taşıyan kromozomlardır. Homolog kromozomların dörtlü kromatid şeklindeki görünüşüne, tetrat adı verilir.

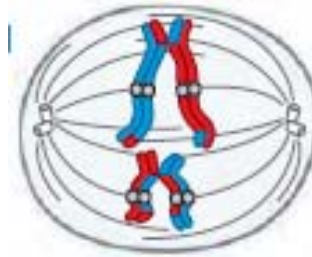


Şekil 10. Sinapsis ve tetrad oluşumu²⁰.

Homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri birbirine sarılır. Bu olaya sinapsis denir. Kromatidlerin birbirine temas ettikleri bölgeye kiazma denir. Daha sonra kardeş olmayan kromatidler arasında gen alış-verişi olur. Bu olaya, crossing-over adı verilir.

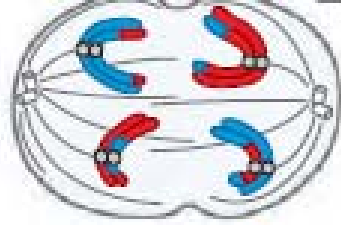
Crossing over, çeşitliliği artırır.

Profaz I sonunda çekirdek zarı, tamamen kaybolur ve iç iplikleri kromozomların kinetokorlarına bağlanır.



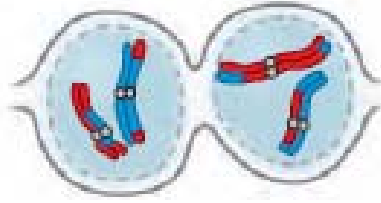
Şekil 11. Metafaz I²⁰.

Homolog kromozomlar, hücrenin ortasında karşı karşıya dizilirler.



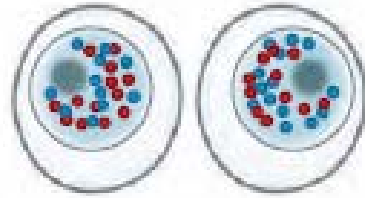
Şekil 12. Anafaz I²⁰.

Sentrozom, iç iplikleri ile homolog kromozomları çekerek birbirinden ayırır. Homolog kromozomlar zıt kutuplarda toplanır. Homolog kromozomlar ayrıldığı için, kromozom sayısı yarıya iner. Homolog kromozomların ayrılması aynı zamanda, çeşitliliğin oluşmasını sağlar.



Şekil 13. Telofaz I²⁰.

Kromozomlar tekrar kromatin iplik haline geri döner. Kromatin iplik etrafında çekirdek zarı oluşur. Bir hücrede iki çekirdek görülür.

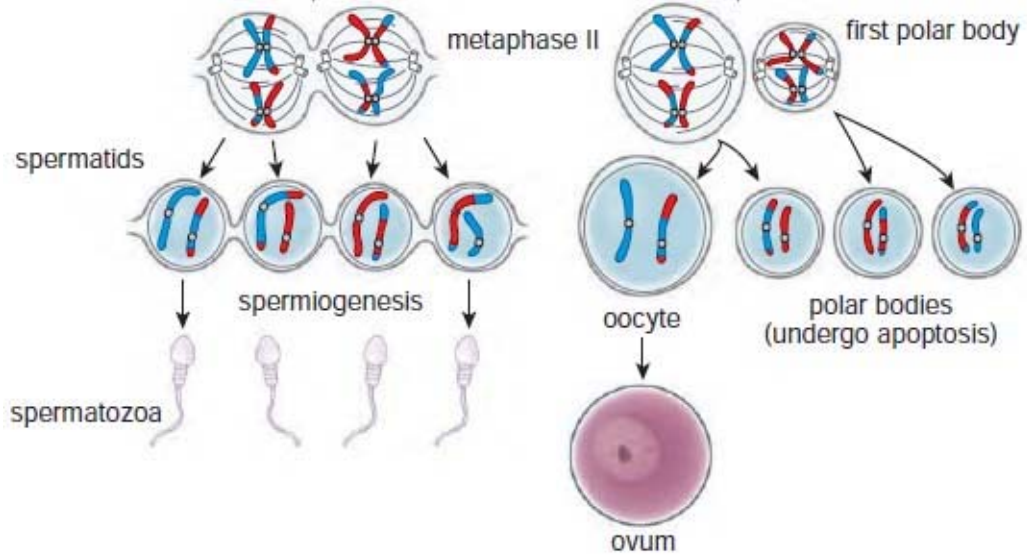


Şekil 14. Sitoplazma bölünmesi (sitokinez I)²⁰.

Çekirdek bölünmesinden sonra sitoplazma bölünmesi gerçekleşir. Böylece mayoz I'in sonunda, bir hücreden iki hücre oluşur. Kromozom sayısı yarıya iner.

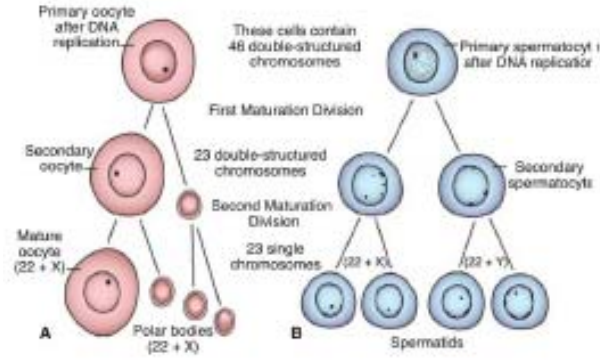
MAYOZ II:

Mayoz I sonucunda oluşan, n kromozomlu iki hücre; mayoz II'yi geçirir. Mayoz II'de interfaz evresi görülmez. Mayoz II'nin geri kalan tüm evreleri mitoz bölünme gibi gerçekleşir.



Şekil 15. Mayoz II²⁰.

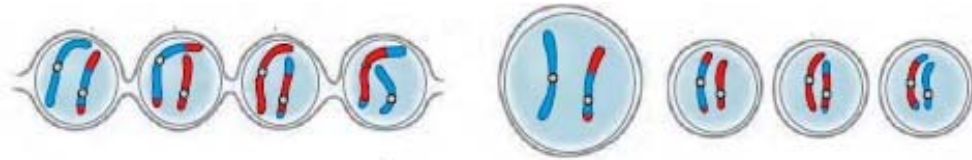
Mayoz II'nin sonunda 2 hücreden, 4 hücre oluşur. Kromozom sayısı değişmez.



Şekil 16. Mayoz bölünmede kromozom sayısının ve DNA miktarının evrelere göre değişimi⁹.

Mayoz bölünmede çeşitlilik oluşumu

Mayoz bölünmede, crossing-over gerçekleşmezse bile, çeşitlilik oluşur. Çünkü mayoz bölünmenin anafaz I evresinde, homolog kromozomların ayrılması çeşitliliği sağlar. Mayoz bölünmede crossing-over gerçekleşirse, oluşan çeşitlilik daha da artar.



Şekil 17. Crossing over sonrasında ortaya çıkan yavru hücrelerdeki genotipik çeşitlilik²⁰.

2.6. Spermijogenezis

Spermatogenezis tam farklanmamış diploid (2n) spermatogenetik hücrelerden özelleşmiş haploid (n) spermatozoonların geliştiği bir olaylar dizisidir. Bu hücrelerin geçirdiği evreleri; spermatogonial evre (spermatogenezis), mayoz bölünme evresi ve spermatid evresi (spermiogenezis) olmak üzere üç evrede incelenir. Spermiogenezis sürecini tamamlayan spermatidlerin Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasından serbest kalması ise spermiasyon olarak tanımlanır.

Embriyonik ve fetal gelişim döneminde spermatogonium hücreleri primordial germ hücrelerinden köken alırlar. Yeni doğan bir erkek çocuğunda seminifer tübüller, germinal epitelden köken alan Sertoli hücreleri ve daha az olmak üzere gonositlerle (spermatogonia) çevrilidir. Puberteye yaklaşıldıkça spermatogonyumların sayısı artar ve gelişme bununla sınırlı kalır. Puberteden itibaren başlayan spermatozoa üretimi 45 yaşına kadar aktif olarak sürer ve 45 yaşından sonra azalarak da olsa devam eder²¹⁻²⁵.

Spermatogonial Evre

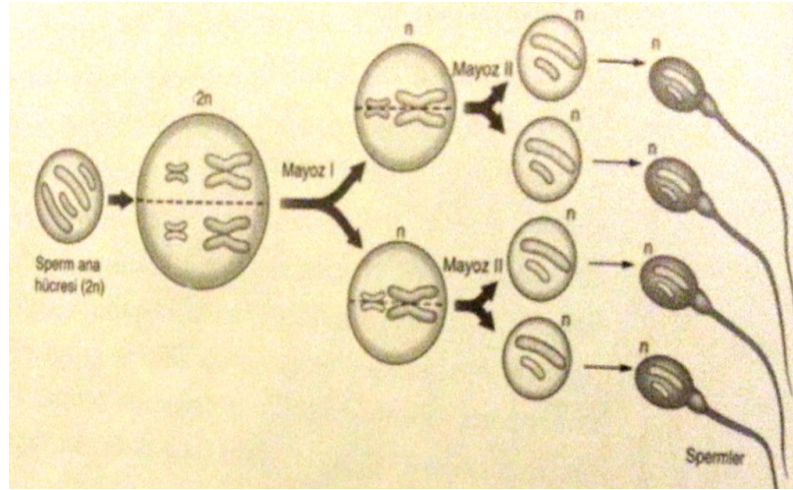
Seminifer epitelde bazal mebran üzerinde bulunan ve diploid olan spermatogoniumlar mitotik aktivite ile birkaç kez çoğalırlar. Bu çoğalma ile spermatogenezis için yeterli sayıda hücre sağlanırken bir bölümü de kaynak hücre olarak iş görür. Kaynak hücreleri yedektir. Yeniden çoğalabilir ve yaşam süreleri oldukça uzundur. Yeni oluşan hücrelerin bir bölümü çoğalarak spermatogenezis evresine girerken bir bölümü de dejenere olur^{21,26}.

İnsanda spermatogenetik hücrelerin 3 tipi ayırt edilmiştir:

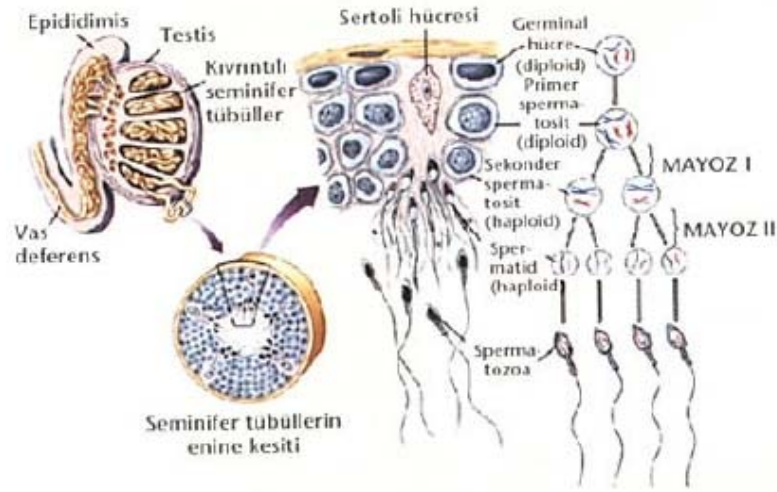
- Koyu tip A
- Açık tip A

- Tip B

Koyu tip A spermatogoniumlar kaynak hücrelerdir ve gereğinde açık hücreleri oluştururlar. Her üç tip de bazal membran üzerine yerleşik iri yuvarlak hücrelerdir ve boyanma özellikleriyle histolojik kesitlerde ayırt edilebilirler. B gurubu spermatogonyumların mitoz ile çoğalmasıyla spermatozidler meydana gelecektir ve bu yeni hücrelerin oluşumuyla mayoz dönemi başlar²³ (Şekil 18).



Şekil 18. Tek bir spermatogonyumdan mayoz bölünmelerle meydana gelen 4 adet spermatozoa²⁷.



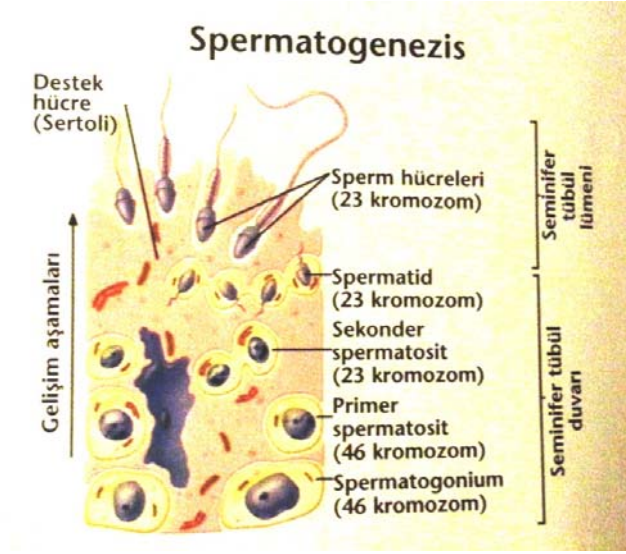
Şekil 19. Testislerin yapısını ve spermatogonyumdan olgun spermatozoa oluşumunu gösteren çizim²⁷.

Mayoz Bölünme Evresi:

Erken evredeki yani preleptoten spermatositler spermatogonyumlarla aynı yapısal özellikleri taşırlar. Sertoli hücrelerinin oluşturduğu kompartmanların alt bölümünde yer alarak gelişim süreci içerisinde lümeneye doğru ilerlerler. Bu sırada, hücre hacmi belirgin olarak artmıştır ve çekirdek morfolojisi mayoz bölünmenin profaz evresine (leptoten, zigoten, pakiten ve diploten) uygun yapısal özellikler gösterir. Spermatogonyumların mitoz bölünme geçirdikten sonraki oluşan yeni hücreler primer spermatosit olarak adlandırılır ve pakiten evresi yaklaşık 16 gün sürer. Primer spermatositlerin mayoz bölünmeyi geçirerek oluşturdukları yeni hücreler sekonder spermatositlerdir. Sekonder spermatositlerin hücre döngü süresi 8 saat sürdüğü için histolojik kesitlerde görülemezler. Sekonder spermatozoitler 2. mayoz bölünme ya da ekvatoriyal bölünme ile spermatidleri meydana getirirler ve böylece spermiogenezis evresi başlar^{23,28,29} (Şekil 19).

Spermiyogenezis

Spermatidler Sertoli hücreleri arasındaki kompartmanların lümene en yakın bölümünde bulunur ve erken evre spermatid olarak isimlendirilirler. Daha sonra Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarına göç ederek bir dizi yapısal değişikliğe uğrarlar (Şekil 20).



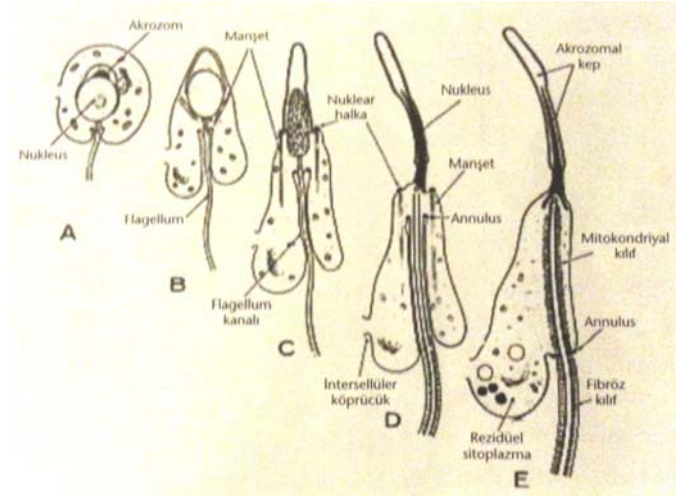
Şekil 20. Spermatogenezis serisi hücrelerinin Sertoli hücreleri ile komşuluğu ve spermatidlerin Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasında olgun spermatozoona dönüşümü²⁷.

Bu yapısal değişiklikler; akrozom oluşumu, flagellum şekillenmesi, kromatin kondensasyonu ve fazla sitoplazmanın atılmasıdır. Spermatidin bu yapısal değişikliği geçirdiği dönem, geç spermatid evresi olarak bilinir.

Spermatidlerde spermiyogenezisin ilk belirtileri hücre organellerinde gözlenir. Golgi kompleksinde oluşturulan veziküller çekirdeğin ön kısmına doğru hareket eder ve birbirleriyle birleşerek çekirdeğin ön kısmında akrozomal kepi oluştururlar. Akrozomal kepi karbonhidratlardan

zengin, hyalüronidaz, nörominidaz ve akrozin gibi enzimler içeren, hücre içindeyken inaktif olan bir yapıdır^{28,30}.

Golgi kompleksinden akrozomal kep gelişirken, sentriyol çifti de hücrenin karşı kutbuna doğru göç ederek hücre zarına yakın bir yere yerleşir. Distal sentriyolden gelişen aksonem bir çift santral tübülüs ve bunları çevreleyen dokuz çift periferal tübülüsten meydana gelmiştir. Bu yapıyla aksonem, flagellumun özünü oluşturur. Bu sırada akrozomal kep de çekirdeğin her iki yanında incelerek uzar ve çekirdek çevresindeki son konumunu alır. Proksimal sentriyol çekirdeğin kaudal kısmındaki girintiye yerleşir. Eş zamanlı olarak sitoplazmik mikrotübülüsler organize olarak akrozomal kepin her iki ucundan hücrenin kaudal uzantısına doğru yerleşerek manşeti şekillendirirler. Manşetin şekillenmesiyle, çekirdek hücre şekline uyarak yassılaşıyor ve uzar. Sitoplazma da kaudalde uzayarak spermatidin sperm şeklini almasına katkıda bulunur (Şekil 21).

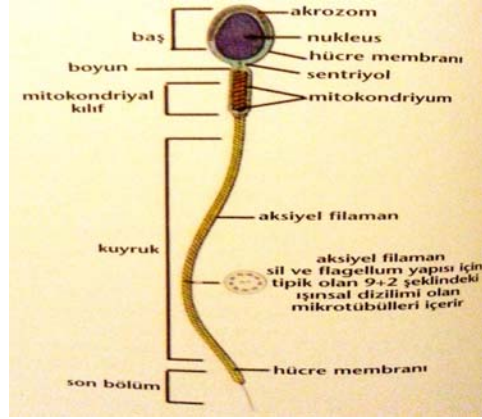


Şekil 21. Spermijenezisde olgun bir spermatidden spermijumun oluşması²⁷.

Spermijenezis sırasında spermatid çekirdeğindeki histonlar protaminlerle yer değiştirir, protaminlerdeki disülfid çapraz bağları kromatinin yapısını sağlamlaştırır ve kromatin yoğunlaşarak çekirdek zarında ekzantrik bir yerleşim gösterir^{23,28}.

Spermiasyonda Sertoli hücrelerinden ayrılırken spermatidlerin boyun kısmında bir miktar sitoplazmik artık (sitoplazmik droplet) vardır. Spermiyogenezis evresinin sonunda sitoplazmanın fazlası atılır ve bu sitoplazma parçacıkları Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Bu dönemde spermlerde halen atılmayan sitoplazmik droplet bulunabilir ve bunlar da spermin epididimisteki hareketi sırasında kuyruk boyunca ilerleyerek sonuçta tamamen atılır. Spermlerde sitoplazma, spermin baş ve kuyruk kısmın çevreleyen çok ince bir halka olarak kalır. Bu dar alanda spermin hareketini sağlayan organeller vardır.

Spermler, oosite haploid sayıda kromozom aktaran hücrelerdir ve işlevine uygun olacak şekilde yapısal farklanmalar geçirirken hareketi sağlayacak organellerin dizilimi de gerçekleşir. Olgun bir sperm 60 µm. uzunluğuna, baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç bölümden meydana gelmiştir. Baş kısmı oval ve yassıdır. Akrozomal kep çekirdeğin önünde yerleşik olup baş kısmının yaklaşık 2/3'ünü kaplar^{23,25} (Şekil 21- 22). Boyun kısmı kısa olup bağlantı parçasını da içerir. Kuyruk, 50-55 µm uzunluğundadır, orta ve esas parçalarla son kısmından oluşmuştur. Orta parçada aksonem, dış yoğun fibriller ve bunun da dışından mitokondriyonlarla sarılmıştır. Esas parça orta parçaya göre daha incedir ve iki longitudinal kolon ve bunların bağlantılarından oluşur, son kısım ise sadece aksonem ve çevreleyen dar sitoplazmadan meydana gelmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. Spermin Yapısal Özelliklerini Gösteren Şematik Çizim²⁷.

2.7. Spermde Bulunan Nükleer Proteinler ve Spermatogenez Sırasında Histon-Protamin Değişimleri

Spermatogenezis tek sıra Sertoli hücreleri ve spermatogenetik seriye ait hücrelerle çevrili seminifer tübüllerde gerçekleşen ve erkek germ hücrelerinin oluşmasını, sayılarının artmasını ve olgun spermatozoonlara dönüşmesini sağlayan bir süreçtir^{28,31}.

Memelilerde sperm gelişimi 3 önemli olay ile karakterizedir;

- 1- Akrozom gelişimi
- 2- Keratin kılıf içine yerleşmiş, dinamik bir aksonemden oluşan kuyruğun organizasyonu.
- 3- Nükleusun kondensasyonu ve uzaması ile birlikte etrafının mikrotubuler/keratin yapısında bir kılıf ile çevrelenmesi.

Nükleus kondensasyonunda etken olan faktör, spermatogenik seri hücrelerinin kromatin yapısında diğer somatik hücrelerinden farklı olarak bazı olayların gerçekleşmesidir. Bu olaylar son 40 yıldır ultrastrüktürel metotlarla ortaya çıkartılabilmektedir. Haploid spermatidler tipik bir nükleozomal

kromatin yapısı gösterir. Bu evrede bol miktarda nonribozomal RNA aktiviteleri vardır³². Spermiyogenez süresince protamin proteinleri spermatid kromatin kondensasyonunda önemli rol oynarlar. Paternal genomun taşınmasında rol alan sperm için kromatin kondensasyonu önem taşır³³.

Spermiyogenez ilerledikçe boncuk dizilimi şeklinde görünüm veren kromatin yapısı yerini düz kromatin liflerine bırakır. Bunlar artık transkripsiyon yapamaz ve yan yana iplikçikler şeklinde toplanırlar³².

Erken evre spermatosit ve erken evre spermatidlerin kromatinleri üzerinde somatik histonlar ve testise spesifik TH1 ve TH2B histonları bulunmaktadır. İleri evre spermatidlerde ise TP1 ve TP2 geçiş proteinleri bulunmaktadır³⁴. Spermde somatik hücrelerde bulunan histonların daha dayanıklı olan protaminlerle yer değiştirmeden önce testise spesifik histonlar ve geçiş proteinleri TP1 ve TP2'ye neden ihtiyaç duydukları tam açıklanamamıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda TH1 gen ekspresyonu önlendiğinde fertilitenin devam ettiği gösterilmiştir³⁵.

Her ne kadar TP1 gen delesyonu varlığında spermatogenezis tamamlanabilmekte ise de, TP2 ve P2 prekürsörlerinin ortamdaki miktarları artmakta ve matür P2 gelişmeyerek kromatin kondensasyonu olamamaktadır.

TP1 eksikliğinde sperm motilitesi bozulur ve fertilizasyon kapasitesi azalır³⁶.

TH1 ve TP1 proteinlerinin kromatin kondensasyonunda ve genin aktivasyonunda rolleri kısıtlıdır. Geçiş proteinlerinin spermatogeneziste önemi ve rolü büyüktür. Yapılan çalışmalar TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin DNA'nın bütünlüğünü koruyarak protaminlerin kromatin üzerinde daha sağlam yerleşmelerini sağladığını ortaya çıkartmıştır³⁷.

Diğer yandan, TP1'in de DNA kırıklarında tamir edici olduğu gösterilmiştir³⁸.

Spermiyogenezde, spermatidlerde histonların uzaklaştırılması sırasında topoizomeraz-II adlı endonukleaz, DNA iplikçiklerini keserek aradan bir parçayı çıkartır. TP1 bu araya girer ve DNA'nın fosfat gruplarıyla etkileşerek açıklıkları doldurur. Bu arada başka bir DNA ligaz enzimi de TP1'in iki ucunun orijinal DNA'ya bağlanmasını sağlar. Histonlar ile protaminlerin yer değiştirmesi sayesinde kromatin kondensasyonu gerçekleşir³⁹.

Spermatogenezin son aşamasında somatik nükleoproteinler yüksek oranda arginin ve sistein içerirler. Sistein molekülleri disulfid bağları ile birleşirler ve mekanik ve kimyasal stabiliteyi sağlarlar. Pozitif yüklü protamin ve negatif yüklü DNA iskeleti arasında moleküller arası kuvvetli etkileşim DNA'nın bazik karakterli protamine bağlanmasını kolaylaştırarak kromatinin yoğunlaşmasına sebep olmaktadır⁴⁰.

İşte bu mekanizma TP1 eksikliğinde neden kromatin kondensasyonunun bozulduğunu açıklamaktadır. Bütün bu çalışmalar, geçiş proteinlerinden TP1'in DNA tamirinde esas rolü bulunduğunu göstermektedir.

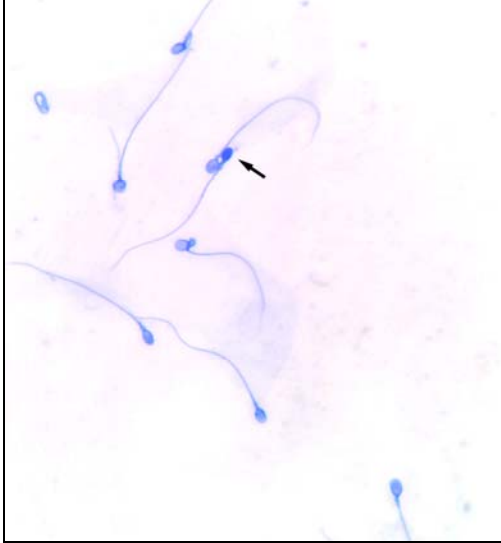
Spermde DNA hasarlarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı konusu tam olarak açıklanamamıştır. Değişik çalışmalarda, apoptoz, inflamasyon, sigara ve oksidanların spermde kromatinin kondanse hale geçmesini engelledikleri gösterilmiştir⁴¹.

IVF ve ICSI işlemlerinde semen değerleri bozuk olan erkeklerde hasarlı genetik materyal içeren hücre sıklığı da artmış olacağından, bunlarda DNA hasarlı hücre kullanımı riski de ortaya çıkmaktadır⁴².

Ayrıntılı ve değişik boyama teknikleri ile daha spesifik olarak bu DNA hasarlarının gösterilmesi ve saptanmasında daha güvenilir sistemlerin

ortaya çıkartılması fertilizasyon kapasitelerinin artmasında önem kazanmaktadır.

Normal kromatin kondensasyonunun olmaması spermlerde gelişim anomalilerinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Sperm kromatini çeşitli testler ile incelenebilmektedir. Bunlardan birisi anilin mavisi boyası, bir diğeri toluidin mavisi boyası'dır (Resim 1). Nükleusun anilin mavisi ile boyanması ve toluidin mavisi ile koyu mavi veya mor boyanması spermin DNA kondensasyonunda hatalar olduğunun belirtisidir⁴.



Resim 1: Anilin mavisiyle boyanmış semen preparatı. Baş kısmı koyu renkte boyanan spermatozoon persiste histon açısından pozitif olarak değerlendirilmekte (ok).

2.8. Sperm İnceleme Yöntemleri

Spermiogram (semen analizi, sperm tahlili) sperm sayısını, şeklini hareketini değerlendirmeye yönelik bir testtir. Sperm sayısı, normal spermilerin anormal şekilli spermilere oranı, hareket derecesi iyi olan sperm miktarı değerlendirilir. Verilen semen örneğinin miktarı, PH'sı, rengi, lökosit varlığı, fruktoz miktarı, likefaksiyonu gibi özellikleri değerlendirilir. Belli zaman

dilimlerinde spermlerin hareketliliği incelenir. Hareketlerine göre sınıflama yapılır.

Sperm değerlendirme kriterleri olarak birkaç farklı değer aralığı kullanılır. Kruger kriterleri özellikle sperm şekil bozukluklarını göz önüne alan bir değerlendirme yöntemidir. Özel bir boyama sonrası sperm şekil (morfoloji) özellikleri incelenerek sperm örneğinin fertilitite (doğurganlık) kapasitesi belirlenir.

Normal Sperm Analizi için En Düşük Referans Değerleri:

1. Hacim: 1,5 ml
2. Ph: 7,2'den büyük
3. Viskosite 2'den az
4. Sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml'den fazla
5. Total sperm sayısı 39 milyon'dan fazla
6. Motilite yüzdesi (ileri hareketli + yerinde hareketli) % 40'dan fazla olmalı.
7. Morfoloji %4'den fazla normal olmalıdır (Kruger kriterlerine göre)
8. Lökosit 1 milyon/ml'den az olmalıdır⁴³.

Morfoloji

Morfolojik değerlendirme, lam üzerine ince bir şekilde yayılan semenin boyandıktan sonra immersiyon yağı altında x100'lük büyütme ile incelenmesini gerektirir. Boya kitleri spermlerde büzülmeye neden olarak boyutlarının farklı görünmesine neden olmamalı, ayrıca yayma, temiz bir lam üzerine alınan taze örneğin (10-20 µl) 45 derecelik açıyla ince bir şekilde yayılmasıyla gerçekleştirilmelidir. Boyalı preparatlarda 100 veya 200 sperm değerlendirilerek sonuç verilmelidir.

Sperm başı 2-3 µm. uzunluğunda olmalı, sınırları düzgün ve oval bir görünüm sergilemelidir. Akrozom, başın %40-70'ini oluşturmali, vakuol içermemeli ve postekvatoriyal segment düzgün olmalıdır. Baş büyük, küçük, yuvarlak, uzun, yassı, vakuollü veya çift olarak gözlenebilir. Sperm morfoloji değerlendirilmesinde anomalili spermilerin çoğunlukta olması teratozoospermi olarak isimlendirilir.

Boyun 4-5 µm. uzunluğunda ve düzgün olmalı ve başın alt kısmına, aksiyal konumda bağlanmalıdır. Boyun bölgesinde bulunabilecek sitoplazmik artıklar (sitoplazmik droplet) başın yarısından daha büyük olmamalı, boyun kalın ya da irregüler yapılanma göstermemelidir.

Kuyruk 45-55 µm. uzunluğunda, düzgün tek sayıda ve giderek incelenen yapısıyla gözlenmelidir. Kısa, kıvrık, kırık kuyruklar anomali olarak kabul edilir²⁷.

Tablo 1. Çeşitli Sperm Morfoloji Değerlendirmelerinde Esas Alınan Değerler⁴⁴.

	Eliasson (1971)	WHO (1980-1987)	Kruger (1986) Menkveld (1990)	WHO (1992)
Baş				
Şekli	Düzenli, oval	Düzenli, oval	Düzgün, oval	Oval
Akrozom	Tanımlanmamış	$\geq 1/3$ uzunlukta	Başın % 40-70'i	Başın % 40-70'i
Uzunluk	3-5 μm	3-5 μm	3-5 μm	4-5,5 μm
Genişlik	2-3 μm	2-3 μm	2-3 μm	2.5-3-5 μm
Borderline formlar	Normal	Normal	Anormal	Normal
Orta Parça				
Uzunluk	5-7 μm	7-8 μm	1,5xbaş uzunluğu	Düzenli, kıvrık değil, baş aksına 90 ⁰ ile bağlı
Genişlik	1 μm	Düzenli, düz, baş genişliğinin 1/3'ü	<1 μm , yuvarlak,	
Sitoplazmik Droplet	<1/2 baş	Tanımlanmamış	Aksiyel bağlı	1/3 baş
Kuyruk	Tanımlanmamış	>45 μm Yuvarlak, düz	<1/2 baş = 45 μm Yuvarlak, düz	Kıvrık değil, düz, düzgün, Terminal droplet yok
Eşik Değer	>% 40	>% 50	> % 14	> % 30

Teratozoospermi

Teratozoospermi sperm morfolojisinin %4'den daha az olduğu durumlar için yapılan bir tanımlamadır.

İnfertil erkeklerin %85'inde teratozoospermi en büyük grubu teşkil eder. Yüzde 54'ünde ise ağır derecede izole teratozoospermi sorumludur⁴⁵.

Etiyolojide değişik faktörler saptanmıştır:

1. Diabetes Mellitus
2. Varikosel
3. Beş yıl ve üzeri vazektomi sonrası
4. Seminal enfeksiyonlar
5. Travma
6. Bozuk beslenme

7. Sigara ve alkol kullanımı
8. 45 ve yaş üzeri olmak
9. Kronik sıcağa maruz kalmak

Kruger kriterlerine göre;

Sağlıklı sperm örneğinde en az %14 normal morfoloji olmalı. Yüzde 4-14 arasında ise orta dercede teratozoospermiden bahsedilir. Yüzde 4 ve altı ciddi izole teratozoospermi diye tanımlanır.

Spermilerin başları oval, 5-6 µm uzunluğunda, 2,5-3,5 µm çapında, orta bölüm ve kuyruk 50 µm uzunluğunda olması normal olarak değerlendirilir⁴⁶.

Teratozoospermi İndeksi (TZI)

TZI, DSÖ tarafından önerilmiş, Kruger ve Menkveld'in daha önce üzerinde çalıştığı ve pratik kullanımı üzerinde fikir birliğine varılmış bir yöntemdir. Tanım olarak sperm başına düşen anomali sayısını gösterir. Spermde birden fazla morfoloji bozukluğu olabilir. Hem baş hem de kuyruk anomalisi varsa anomali Sayısı/bozuk morfolojili sperm sayısı formülüne göre hem baş hem de kuyruk anomalisi varsa oran $2/1 = 2$ dir. Sadece bir anomali varsa $1/1 = 1$ 'dir.

Normalde 100 sperm sayılmalı bu 100 spermdeki toplam anomali sayısı bu 100 sperm içindeki anomalili sperm sayısına oranı hesaplanmalıdır.

Bunun değerini DSÖ 1.60 Menkveld ise 2.09 olarak bildirmiştir.

Eğer TZI değeri DSÖ değeri olan 1.60'dan ya da Menkveld'e göre olan 2.09 un altında ise normal kabul edilmelidir⁴⁷.

2.9. Sperm Hazırlama Yöntemleri

Sperm yıkama protokolleri; spermlerin medyum veya hyalüronat tampon içinde yüzdürülerek medyum yüzeyine toplanması (yüzdürme, swim-up), semenin medyuma karıştırılıp santrifüj edildikten sonra (yıkama, washing) elde edilen peletten medyum yüzeyine spermlerin yüzdürülmesi, gradientlerden, albumin kolonlarından veya cam yününden (glass wool) süzülmesi esaslarına dayanır^{48,49,50,51}.

Yüzdürme (swim-up) yöntemi: Motil spermlerin immotil spermlerden ayırılabilmesi için geliştirilen bir yöntemdir. Bu yöntemde taze semen örneği, Petri kabına genişçe bir damla şeklinde hazırlanan medyumun alt kısmına bırakılır ve spermlerin kendi motilite özellikleriyle medyum yüzeyine doğru yüzmesi beklenir.

Swim-up yönteminde, her birinde 2-4 ml medyum olan tüplerin dibine 1-2 ml semen örneği bırakılır ve spermlerin medyum yüzeyinde toplanması için tüpler inkübatörde bekletilir. Tabandaki motil spermlerin birikeceği yüzeyi arttırabilmek için tüpler inkübatöre 30-40 derecelik açıyla yerleştirilir ve böylece spermlerin toplanacağı yüzey genişletilirken inkübatör ısı da sperm hareketlerini aktive eder⁵⁰⁻⁵³.

Swim-up yöntemi kullanıldığında bazal semen değerlendirmesine göre; yeterli sayıda motil ve normal morfolojide sperm elde etmek için tüp sayısı arttırılabilir. Semen üzerine koyulan medyum miktarı ve tüplerin inkübatörde tutulma süresi sonuçları değiştirebilir.

Standart yöntemde (yıkama+swim-up), sperm hazırlanırken büyük tüplere 4 ml medyum koyulur ve üzerine eklenen semenle karışması sağlanır. Karışım 15 dakika 1700 devirde (rpm) santrifüj edilir ve üzerindeki süpernatant alınarak sperm kabına boşaltılır. Temiz bir pipetle pelletin üzerine 2 ml medyum koyularak tekrar aynı süre ve hızda santrifüj edilir. Son santrifüjden sonra pelletin dağılmasını önlemek için yavaş bir şekilde ve tüp

eğimle tutularak 0,5 ml medyum eklenir ve inkübatürde 30-45 derecelik eğimle yarım saat kadar bekletilir. Yüzeyde toplanan sperm en hareketli spermelerdir.

Dansite Gradient Santrifügasyon Yöntemleri; Percoll, albumin ve ficoll polimerlerini içeren medyumlarla gradientler oluşturularak semenin santrifügasyon sırasında bu kolonlardan süzülmesi sağlanarak yapılır²⁷.

Polivinilpirolidon kaplı koloidal silika partükülleri içeren percoll, solüsyonu, sperm yıkama işleminde ilk kez 1981'de Gorus ve Pipeleers tarafından kullanılmıştır⁵⁴.

Gradient uygulamalarında genellikle gradientler 2 tabaka olarak hazırlanır. Tüpün dibine daha yoğun olan katman 1 ml olacak şekilde koyulur ve bunun üzerine ikinci tabaka karışmalarına dikkat edilerek yavaş bir şekilde yerleştirilir. Katmanların üzerine koyulan semenin en fazla 2 ml olmasına özen gösterilmeli ve yine karışmadan, pipetle yavaş yavaş yerleştirilmelidir. Tüp 1500-1700 rpm'de 8-10 dakika santrifüj edildikten sonra üzerindeki kısım atılır ve temiz tüplere her iki tabaka (yaklaşık 0,3 ml) ayrı ayrı alınır. Üzerlerine 2-3 ml yıkama medyumu koyularak tekrar aynı süre ve hızda santrifüj edilir. Tüplerin üzerindeki kısım atılır ve dipte kalan kısım klasik IVF'de inseminasyon ve mikroenjeksiyon için hazırlanır²⁷.

Cam yününden (Glass wool) süzme; semen örneği cam yününden süzdürülerek sonuçta ölü ve aglütine spermle döküntü ve lökositlerden arınmış motil sperm popülasyonu elde edilir²⁷.

Konsantrasyon Yöntemi; semende sperm yok (azoospermi) ise uygulanır. Semen örneği eşit volümde yıkama medyumu ile 15 ml lik tüpe konulup 2400 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve pellete 1 ml yıkama medyumu ile karıştırılır, tekrar dakikada 2500 devirde santrifüj edilir. Süpernatant atılır ve pellet mikroskop altında incelenir⁵⁵.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda HRS (Health Research System) Ankara Kadın Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedavi ünitesine infertilite nedeniyle başvuran teratazoospermik vakaların semen örnekleri kullanıldı. Toplam 50 hastanın semen örneği 3-5 günlük cinsel perhiz süresi sonrasında mastürbasyon yoluyla toplandı.

3.1. Yayma Preparat Hazırlama

Temiz bir lam üzerine alınan taze örnek (10-20 µl) 45 derecelik açıyla ince bir şekilde yayıldı. Bu işlem her bir hasta için 4 farklı gruba (Bazal, swim-up, dansite gradient, dansite gradient+swim-up) uygulandı.

Örnekler 15-30 dakika likefiye olması için bekletildi. Her bir hastadan alınan örnekler; swim-up, dansite gradient, dansite gradient+swim-up teknikleri sonrasında ve işlenmemiş bazal örnekten olmak üzere 4'er preparat olacak şekilde hazırlandı. Preparatlar 30 dakika süreyle formaldehit içerisinde fikse edildikten sonra 5 dakika süreyle anilin mavisi ile boyandı. Yıkandıktan sonra havada kurutulup Entellan™ (Merck Millipore, Massachusetts, ABD) ile lamelle yapıştırılıp, immersiye yağ damlatılıp ışık mikroskopunda x100 büyütme objektif altında değerlendirildi (Zeiss, Axioplan, Jena, Almanya). Her preparat için 200 spermdeki anilin mavisiyle pozitif boyanan sperm oranları hesaplandı. Sperm başlarından koyu boyananlar histon (+), açık boyananlar histon (-) olarak değerlendirildi (Resim 1).

3.2. Dört farklı grup için sperm hazırlama metodu

1) Dansite Gradyent

Gradyentler (Sperm Grad, Vitrolife, Göteborg, İsveç) konik dipli tüpün tabanına önce %80 sonra %40 olarak katmanlandırıldı. Üzerine 1 ml

semen örneği ve 1 ml kültür sıvısı pipetlenip yavaşça yayıldı. Örnekler 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 1 ml kültür sıvısı eklenip pipetlendi ve 1300 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı pellet üzerine 0,5 ml kültür sıvısı eklenerek yayma preparat hazırlandı.

1. Bazal: 10 µl. Likefiye semen örneği lam üzerine yayıldı.
2. Swim-up: Konik dipli tüp üzerine 1 ml semen örneği ve 1 ml kültür sıvısı pipetlenip koyuldu. Örnek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp 1 ml kültür sıvısı eklenip pipetlendi ve 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp 0,5 ml kültür sıvısı eklenip yayma preparat hazırlandı.
3. Dansite Gradyent + Swim-up: Dansite Gradyent sonrası kalan pellet üzerine 1 ml kültür sıvısı eklenip pipetlendi. Örnek 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet üzerine 0,5 ml kültür sıvısı eklenip yayma preparat hazırlandı.

2) Anilin Blue Boyasının Hazırlanması

1. 0,5 gr anilin mavisi
2. 48 ml distile su
3. 2 ml glasiyel asetik asit

3) Boyama

1. Bazal Semen/yıkanmış sperm slaytlara ince tabaka halinde yayıldı.
2. Oda ısısında kurutuldu.
3. Slaytlar 5 dk. anilin mavisi solüsyonunun içinde bekletildi.
4. Daha sonra slaytlara zarar vermeyecek şekilde bol su ile yıkama yapıldı.
5. Slaytlar oda ısısında kurumaya bırakıldı.
6. Kuruduktan sonra entellan ile kapatma yapıldı.

3.2. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi "SPSS for Windows 11,5" paket programında yapılmıştır. Değerlendirmede diğer yöntemlerle bazal arasındaki karşılaştırmalarda Paired-t testi her bir yöntem için sigara içen ve içmeyenlerin karşılaştırmalarında Student's t testi, diğer yöntemler ile bazal değerler arasındaki farkların sigara içme durumuna göre karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi, yöntemlerin bazale göre farkları ile yaş, volüm, konsantrasyon, motilite ve Kruger skoru ile arasındaki ilişkilerin araştırılmasında Spearman Rank korelasyon analizi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı 0,05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen hastaların (n=50) ortalama yaşı $34,60 \pm 5,35$ (min-maks. 34-47) idi. Bu hastaların içinde sigara kullanımı %72 seviyesindeydi. Ortalama semen hacmi $3,23 \pm 1,11$ ml (1-6,5 ml) idi. Ortalama sperm konsantrasyonu $82,54 \pm 17,92$ (57-148) milyon/ml düzeyindeydi. Ortalama sperm motilitesi $\%73,50 \pm 9,87$ (55-93) olarak ölçüldü. rnekerin ortalama Kruger skoru $\%1,28 \pm 1,01$ (medyan=1) idi (Tablo 2).

Tablo 2. Çalışmaya Dahil Olan Hastaların Demografik Bilgilerinin Ve Seminal Parametrelerinin Ortalama Değerleri.

	Ort.±SS	Min.-Max.
Yaş	34,60 ± 5,35	34-47
Sigara İçme n(%)	36(72,0)	
Volun	3,23 ± 1,11	1-6,5
Konsantrasyon	82,54 ± 17,92	57-148
Motilite	73,50 ± 9,87	55-93
Kruger	1,28 ± 1,01 (Medyan=1)	

Yöntemlere göre anilin mavisi skoru (histon +) bazal örneklerde 21,29 ± 9,53 olarak tespit edilirken, gradiyent yöntemi sonrası 19,10 ± 9,33, swim-up sonrası 17,64 ± 8,44, gradiyent+swim-up sonrası 16,22 ± 9,06 şeklinde bulundu. Bazale göre anilin mavisi skorları gradiyent yönteminde 2,19 ± 9,23, swim-up yönteminde 3,65 ± 8,93 ve gradiyent+swim-up yönteminde 5,07 ± 9,33'lük azalma görüldü. Bu değişim miktarları gradient sonrası anlamlı olarak bulunmazken (p=0,100) swim-up ve gradiyent + swim-up sonrası istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla, p=0,006 ve P=0,001) (Tablo 3).

Tablo 3. Hastaların Bazal Anilin mavisi Değerlerinin (Farklı) Yöntemlerin Kullanılmasıyla Ne Şekilde Değiştiğini Gösteren Tablo.

Yöntem	Grupların AB Skor	Bazal Değerlere Göre Farklar					
		Gra.	P	SwimUp	P	Gra._Swim	P
	Ort. ± SS	Ort. ± SS		Ort. ± SS		Ort. ± SS	
Bazal	21,29 ± 9,53						
Gradient	19,10 ± 9,33	2,19 ± 9,23	0,100				
Swim-up	17,64 ± 8,44			3,65±8,93	0,006		
Gra.+Swim-up	16,22 ± 9,06					5,07 ± 9,33	0,001

Hasta grupları arasında alt grup olarak belirlenen sigara tüketimine göre bazal anilin mavisi skorları sigara içmeyen grupta $20,61 \pm 9,24$, içen grupta $21,56 \pm 9,75$ olarak tespit edildi, fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu gruplar arasında sperm seçme yöntemlerine bağlı olarak anilin mavisi skorlarında azalma tespit edildiyse de fark anlamlı değildi (Tablo 4). Ancak, yöntemler sonrası bazal değerlerle ortaya çıkan farklar karşılaştırıldığında (bazal skor – yöntem skor), sigara içmeyen grupta anilin mavisi skorları sadece gradiyent + swim-up yönteminde anlamlı olarak iyileşme gösterirken ($6,50 \pm 7,96$, $p=0,009$), sigara içen grupta anlamlı fark swim-up yöntemiyle birlikte ortaya çıkmakta ($3,25 \pm 8,71$, $p=0,032$) ve gradiyent + swim-up yönteminde iyileşme daha da belirgin olarak izlenmekteydi ($4,51 \pm 9,85$, $p=0,009$) (Tablo 5).

Tablo 4. Sigara Tiryakiliğine Göre Çalışma Grupları Arasında Sigara İçen ve İçmeyen Hastalara Ait Anilin Mavisi Persiste Histon Yüzdesi.

	Sigara		
	İçmiyor	İçiyor	P
	Ort. ± SS	Ort. ± SS	
Bazal	20,61 ± 9,24	21,56 ± 9,75	0,756
Gradient	19,36 ± 8,23	19,00 ± 9,83	0,905
Swim-up	15,93 ± 8,82	18,31 ± 8,32	0,377
Gra.+Swim-up	14,11 ± 7,48	17,04 ± 9,58	0,309

Tablo 5. Sigara Tiryakiliğine Göre Bazal ile Farklar. Sigara İçen ve İçmeyen Gruplarda AB Skor Yüzdelerinde Yöntemlerin Değerlere Göre Ortaya Çıkarttığı Değişiklikler.

	Sigara			
	İçmiyor	p*	İçiyor	p*
	Ort. ± SS		Ort.±SS	
Bazal - Gradient	1,25 ± 8,96	0,611	2,56 ± 9,43	0,113
Bazal - Swim-up	4,67 ± 9,72	0,095	3,25 ± 8,71	0,032
Bazal - Gra.+swim-up	6,50 ± 7,96	0,009	4,51 ± 9,85	0,009

* : Her grup için bazal değerlere göre karşılaştırma sonuçları,

Hasta grupları yaş ve semen parametrelerine göre sınıflandırıldığında üç farklı yöntemin bazale göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya koymadığı izlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Bazale Göre Farklar ile Korelasyonlar. AB Skorlarında 3 Farklı Yöntemde Ortaya Çıkan Değişimin Hasta Yaşı, Semen Volümü, Sperm Konsantrasyonu, Molilite ve Morfolojiye Göre Korelasyonu.

	Gradient		Swim-up		Gra.-Swim_up	
	r	p	r	p	r	p
Yaş	-0,111	0,445	-0,130	0,369	-0,258	0,070
Volun	-0,045	0,756	-0,047	0,744	0,009	0,949
Konsantrasyon	0,046	0,750	0,058	0,688	-0,038	0,794
Motilite	0,093	0,520	-0,020	0,888	0,092	0,524
Kruger	-0,130	0,368	-0,012	0,935	0,065	0,656

5. TARTIŞMA

Sperm nükleuslarında kromatinin gevşek paketlenmiş olması ve bozuk DNA genellikle baş anomali gösteren spermelerde gözlenir. IVF uygulamaları bu tip spermelerin fertilizasyon potansiyellerinin düşük olduğunu göstermekte ve yine bu olgularda doğal yolla gebe kalma şansının da azaldığı bilinmektedir. Aynı konuyu inceleyen diğer çalışmalar sperm nükleusunda hasarlı DNA'nın gebeliğin erken dönemlerinde düşüğe de neden olabileceğini göstermiştir¹⁻⁵.

IVF uygulamalarında önem kazanan bu anomaliler sperm bir gelişim anomali olarak ortaya çıkar ve ışık mikroskobu düzeyinde anilin mavisi ve toluidin mavisi boyamalarıyla gösterilebilir.

Pratikte ejakulat örneği veya testiküler sperm işlemden önce servikal mukusun seçiciliğini taklit eden yöntemlerle hazırlanır. Kısaca sperm yıkama olarak adlandırılan bu işlemler sonucunda seminal plazmanın dekapasitasyon faktörlerinden arındırılmış, motilitesi yüksek ve normal morfolojideki spermelerin çok olduğu bir sperm popülasyonu elde edilmiş olur. Bazal semenin özelliklerine ve laboratuvar prensiplerine göre değişmekle birlikte; günümüzde dansite gradient santrifügasyon, swim-up ve benzeri yöntemler kullanılmaktadır.

Yapılan bir çok çalışmada hangi yöntemin en uygun olduğu konusunda bir görüş birliği yoktur^{56,57}. Ana hedef, en fazla hareketli sperm oranını sağlayan ve en iyi morfolojiye sahip spermelerin seçilebilmesine olanak veren tekniği uygulamaktır.

Sperm kondensasyon kalitesi ve sperm morfolojisi ile yapılan çalışmalar sonucunda, insan spermelerinin kromatin paketleme kalitesinin spesifik boyalar ve florokrom kullanılarak yapılan değerlendirmelerinin, morfoloji değerlendirmelerine katkıda bulunacak bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Morfolojisi kötü olan spermeler gevşek paketlenmiş kromatin

içerebilmekte ve bu fertilizasyon esnasında sperm decondansasyonuna engel olabilmektedir. Hasarlı kromatinler; kromamisin A₃ boyası ve Anilin mavisi boyası tutabilmektedir.

Anilin mavisi boyası ile ilgili yapılan bir çalışmada varikosel tanısı olan kişilerde operasyon öncesi anilin mavisi boyasıyla boyanmış sperm başları anlamlı şekilde yüksekken, ameliyattan sonraki veriler incelendiğinde anilin mavisi pozitif sperm yüzdesi anlamlı bir şekilde azalmıştır⁵⁸.

Yine başka bir çalışmada erkek yaşının, sperm morfolojisinin ve anormal sperm kromatin yapısı gibi özelliklerinin toluidin mavisi ve aniline mavisi testleriyle belirgin bir ilişki göstermediği görülmüştür⁵⁹. Benzer olarak çalışmamızda da dahil edilen hastaların yaşlarının, persiste histon oranlarıyla ilişkisi tespit edilmemiştir.

Sperm kromatin kondansasyonu sırasında histon retansiyonu erkek üremesinde kritik rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada histon retansiyonu ile değişkenlik gösteren kromatin kondansasyonunun büyük baş hayvanlarda üreme yetisiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir⁶⁰.

Bizim yaptığımız çalışmada yöntemlerin, bazal değerlere göre AB skorunu nasıl etkilediği ve anilin mavisi skoruna katkısı istatistiksel olarak gösterilmiş ve buna göre tek başına swim-up ve gradiyent+swim-up yöntemleri bazal değerler ile kıyaslandığında persisten histon varlığı açısından daha etkin bir iyileşmeye neden olduğu görülmüştür. Gradient+swim-up grubundaki iyileşme oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen bu etkinliğin swim-up yöntemlerinin getirdiği faydadan dolayı olduğu anlaşılmaktadır (Tablo 3).

Jayaraman ve ark. infertilite kliniğine başvuran 51 hastada yaptığı bir çalışmada normo_, oligo_, teratozoospermik hasta örneklerini kabul etmiş ve terminal deoksinükleotidil transferaz aracılıklı dUTP etiketleme

tayiniyle (TUNEL), DNA hasarlarını değerlendirmiştir. Bu örneklerin bizim çalışmamızda olduğu gibi gradiyent, swim-up ve kombinasyonlarıyla işleme sokulduktan sonra DNA hasarında belirgin azalma tespit etmişler, ancak yöntemler arasında bir üstünlük bulmamışlardır⁶¹. Literatürde çalışma metodumuz ve bulgularımıza en benzeyen rapor olduğu düşünöldüğünde, DNA kırıklarına yol açması muhtemel bir patoloji olan persiste histon varlığının tespiti ve eliminasyonu DNA hasarı oluşmadan bir önceki adım olarak değerlendirilebilir. Bu anlamda hasta grubumuzda gradiyent yönteminin swim-up ve kombine yöntemden daha yetersiz kaldığını tespit ettik. İzole teratozoospermi hastalarında bu nedenle gradiyent yöntemine mutlaka swim-up eklenmesi gerekliliğini vurgulamak isteriz.

Le Lannou ve ark. yayınladıkları bir çalışmada fertil ve infertil semen numunelerinde, gradiyent santrifügasyon ya da swim-up prosedürünü sperm seçim yöntemi olarak kullanarak karşılaştırmışlardır. Seçilen spermatozoa; motilitesine, normal formların yüzdesine, nükleer matüritesine (anilin mavisi boyaması, akridin orange boyaması, etidyum bromid alımı ve SDS nükleer dekondeksasyon) göre değerlendirilmiştir. Nükleer matürite seviyesi, her iki yöntem ile de iyileşme göstermiştir. Ancak çalışmamızın tam tersi bir bulgu olarak dansite gradiyentle elde edilen spermlerin nükleer matüritesinin swim-up'a göre daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir⁶². Bizim yaptığımız çalışmada üç farklı yöntemle elde edilen sperm hücrelerinin persiste histon yüzdeleri, ilk alınan işlenmemiş semen örneğindeki oranlarla karşılaştırılarak hangi yöntemin persiste histonları içeren spermlerin eliminasyonunda daha etkili olduğu değerlendirilmiştir.

Buna göre seçilen hasta grubunda işlem görmemiş ejakülatta persiste histon oranı yüzde $21,29 \pm 9.53$ bulunmuştur. Gradiyent yöntemi kullanılarak elde edilen spermatozoonlarda bu oran yüzde $19,10 \pm 9.33$ olarak değerlendirilmiş ve işlem görmemiş ejakülattaki (bazal) orana göre iyileşme tespit edilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Swim-up yöntemi ve gradient+swim-up yöntemi kullanıldığında persiste

histon oranları bazal ortalamalara göre anlamlı derecede azalma göstermiştir (sırasıyla, $3,65 \pm 8,93$ ve $5,07 \pm 9,33$) (sırasıyla, $p=0,006$ ve $p=0,001$). Bu durum seçtiğimiz hasta populasyonunun izole teratozoospermi grubu olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu hasta grubunu doğrudan hedef alan çalışmalar literatürde bulunmamaktadır ve diğer hasta grupları ile incelendiğinde semen hazırlama yöntemlerinden elde edilen fayda değişken olabilmektedir.

Çalışmaya dahil edilen hastalar birarada değerlendirildiğinde bazale göre swim-up anilin mavisi skorları anlamlı derecede değişikliğe uğramıştır. Hasta grubumuzda sigara içme oranı %72 olarak tespit edilmiş ve bu değişkenin (sigara tiryakiliği), kullanılan yöntemlerde bir fark oluşturup oluşturmadığının tespiti amacıyla hastalar iki grupta incelenmiştir. Buna göre genel hasta grubunda swim-up yöntemiyle bazale göre anlamlı bir fark ortaya çıkmışken, sigara içmeyen hastalar ele alındığında swim-up için bu fark ortadan kalkmış sadece gradient+swim-up yönteminde bazale göre anlamlı fark tespit edilmiştir. Ancak sigara içen grup ele alındığında anilin mavisi skorlarındaki farkın swim-up yöntemiyle birlikte anlamlı bir iyileşmeye kavuştuğu görülmüştür (Tablo 5). Bu sonuç, sigara tiryakisi hastalarda bazal sperm kalitesinin persiste histon açısından daha kötü olduğu ve tek başına swim-up yöntemine bile olumlu yönde yanıt verdiği şeklinde yorumlanabilir. Dolayısıyla sigara içen hastaların sperm anilin mavisi skorlarındaki iyileşme, sadece swim-up ile, içmeyen gruba göre nispeten daha kolay olmuştur. Her ne kadar bazal anilin mavisi skorları iki grup için anlamlı derecede fark göstermemiş olsa da (Tablo 4) bu durum çalışmaya dahil edilebilen kısıtlı hasta sayısından kaynaklanıyor olabilir.

6. SONUÇ

İzole teratozoospermili hastaların spermatozoonları persiste histonların varlığı nedeniyle DNA kırıkları ve epigenetik değişiklikler gibi tehditlere açıktır. Bu durum IVF başarısını da etkileyebileceğinden ICSI/IUI sikluslarında sperm seçme yöntemlerinin kullanılması ve özellikle swim-up yöntemini içeren bir protokolün tercih edilmesi önerilir.

7. ÖZET

İZOLE TERATOZOOSPERMİ OLGULARINDA FARKLI SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİNİN KROMATİN KONDENZASYON DEFECTİ SONUÇLARINA ETKİSİ

İnfertil erkeklerin %85'inde teratozoospermi en önemli patoloji olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu hastaların %54'ünde ise ağır derecede izole teratozoospermi etkendir. IVF uygulamalarında önem kazanan bu patolojiler, sperm bir gelişim anomalisi olarak görülür. Ancak sperm olgunlaşmasında büyük önem taşıyan ve paternal DNA'nın paketlenmesinde bir sorun olarak karşımıza çıkan histon-protamin değişimin izole teratozoospermi vakalarında ne düzeyde olduğu bilinmemektedir. Bu düzeyin tespiti ışık mikroskobu düzeyinde anilin mavisi ve toluidin mavisi boyamalarıyla gösterilebilir. Semen hazırlama yöntemlerinin bu hasta grubunda persiste histon düzeylerine ne şekilde etkide bulunduğu çalışmamızın temel amacını oluşturmaktadır. Bu çalışmada izole teratozoospermi tanısı alan 50 bireyin semen numuneleri üç farklı semen hazırlama yönteminden geçirilmiştir (dansite gradient santrifügasyonu, swim-up ve ikisinin kombinasyon). Üç farklı yöntemle elde edilen sperm hücrelerinin persiste histon yüzdeleri, işlenmemiş semen örneğindeki oranlarla karşılaştırılarak hangi yöntemin persiste histonları içeren spermlerin eliminasyonunda daha etkili olduğu değerlendirilmiştir. Buna göre seçilen hasta grubunda işlem görmemiş ejakülatta persiste histon oranı yüzde $21,29 \pm 9,53$ bulunmuştur. Gradyent yöntemi kullanılarak elde edilen spermatozoonlarda bu oran yüzde $19,10 \pm 9,33$ olarak değerlendirilmiş ve işlem görmemiş ejakülattaki (bazal) orana göre iyileşme tespit edilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Swim-up yöntemi ve gradient+swim-up yöntemi kullanıldığında persiste histon oranlarındaki azalma farkı anlamlı bulunmuştur (persiste histon yüzdesi sırasıyla, $\%17,64 \pm 8,44$ ve $\%16,22 \pm 9,06$) (bazal ile ortaya çıkan fark sırasıyla, $\%3,65 \pm 8,93$ ve $\%5,07 \pm 9,33$, $p=0,006$ ve $p=0,001$). Teratozoospermili hastaların spermatozoonları persiste histonların varlığı nedeniyle DNA kırıkları ve epigenetik değişikliklere açıktır. Sonuç olarak, ICSI/IVF sikluslarında sperm seçme yöntemlerinin kullanılması ve özellikle swim-up yöntemini içeren bir protokolün tercih edilmesi önerilir.

Anahtar kelimeler: spermatozoon, anilin mavisi, persiste histon, gradient, swim-up, infertilite.

8. SUMMARY

EFFECT OF DIFFERENT SPERM PREPARATION TECHNIQUES ON CHROMATIN CONDENSATION DEFECTS IN PATIENTS WITH ISOLATED TERATOZOOSPERMIA

In male infertility, teratozoospermia is one of the most common pathology with the incidence of 85%. Among them, 54% show severe isolated teratozoospermia. Besides, the effect of the histone-protamine exchange; that has a great importance in the maturation of the sperm and packing the paternal DNA; on the teratozoospermia cases is not known yet. The main purpose of this study was to determine the effect of the sperm preparation methods on the persistent histone levels of teratozoospermic patients. Sperm samples of 50 men; who were diagnosed with isolated teratozoospermia; were subjected to three different sperm preparation methods (density gradient centrifugation, swim-up and combination of two methods). The effectiveness of these methods on the elimination of the sperms containing the persistent histones was evaluated by comparing them with the raw sperm preparations. In this context, 4 preparations were prepared per patient and stained with aniline blue and 200 spermatozoa are evaluated for each one. The persistent histone ratio in the raw ejaculate was determined as $21,29 \pm 9,53\%$. This ratio was $19,10 \pm 9,33\%$ in the spermatozoa obtained by the gradient method. The decrease in the persistent histone ratio between basal (raw) and gradient-selected sperms was not statistically significant. However, when swim-up and gradient + swim-up methods were used, the persistent histone ratios showed a significant decrease in comparison with the basal averages ($3,65 \pm 8,93\%$ and $5,07 \pm 9,33\%$, $p= 0,006$ and $p= 0.001$, respectively). The spermatozoa of the patients with teratozoospermia are open for the effects such as DNA breaks and epigenetic variations due to the existence of the persistent histones. In consideration with our findings, it is recommended to use sperm selection methods in ICSI/IUI cycles, particularly a protocol containing the swim-up method.

Key words: spermatozoa, aniline blue, persistent histone, gradient, swim-up, infertility.

9. KAYNAKLAR

1. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14(4): 1039-49.
2. 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(1): 43-50.
3. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000; 79(7): 559-63.
4. Liu DY, Baker HW. Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1990; 5(3): 298-303.
5. Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relation between morphologically abnormal spermatozoa and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. *Int J Androl* 1982; 5 (4): 379-86.
6. Sadler TW. *Langman's medical embryology*. 13. baskı, Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015. s. 15-25.
7. Moore KL, Persoud TVN. *Klinik yönleriyle insan embriyolojisi*. Dalçık H, Yıldırım M. (Çev), 2. baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri; 2009. s. 15-20.
8. Carlson MB. *Human Embryology and developmental biology*. 4. Baskı, Çin: Moosby; 2009. s. 19-27.
9. Sadler TW. *Langman's medical embryology*. 13. baskı, Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015. s. 263.
10. Moore KL, Persoud TVN. *Klinik yönleriyle insan embriyolojisi*. Dalçık H, Yıldırım M. (Çev), 2. baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2009. s. 264-6.

11. Ross MH, Powlina W. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 5. baskı, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011, s. 786-8.
12. Lee NP, Wong EW, Mruk DD, Cheng CY. Testicular cell junction: a novel target for male contraception. *Curr Med Chem* 2009; 16(7): 906-15.
13. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas and Text of Histology 6. baskı, Baltimore MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2014 s. 436.
14. Jungueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji Text ve Atlas. Solakoğlu S, Aytekin Y. (Çev), 10. baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2006. s. 431-9.
15. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 1998; 9(4): 411-46.
16. Russell LD. Role in Spermiation. içinde: Russell LD, Griswold MD, editörler. *The Sertoli Cell*. 1. baskı. Clearwater. FL: Coche River Press; 1993. s. 269-303.
17. Parvinen M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev* 1982; 3(4): 404-17.
18. Cavicchia JC, Sacerdote FL. Topography of the rat blood-testis barrier after intratubular administration of intercellular tracers. *Tissue Cell* 1998; 20(4): 577-86.
19. Elder K, Dale B. İn-vitro fertilizasyon. İrez T (Çev), 3. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2013. s. 16-8.
20. Ross MH, Powlina W. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 5. baskı, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011, s. 90.
21. Means AR, Fakunding JL, Huckins C, Tindall DJ, Vitale R. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell, and spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res* 1976; 32: 477-527.
22. Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 1975; 44(2): 394-436.

23. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* 1972; 52(1): 198-236.
24. Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology*. 1. baskı, New York: Oxford University Press; 1994. s. 79-87.
25. Bras M. *IVF Lab: Laboratory Aspects of In-vitro Fertilization*. 1. baskı, NV: Organon; 1996. s. 54-8.
26. Rainsbury PA, Viniker DA. *Practical Guide to Reproductive Medicine*. 1. baskı, New York: The Parthenon Publishing Group; 1997. s. 29-33.
27. Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvarı. 1. baskı, İstanbul: Veri Medikal Yayıncılık; 2008. s. 55-72.
28. Sadler TW. *Langman's medical embryology*. 13. baskı, Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2015. s. 14-33.
29. Grudzinkas JG, Yovich JL. *Gametes-The Spermatozoon*. 1. baskı, Cambridge: Cambridge University Press; 1995. s. 43-51.
30. de Kretzer DM, Laveland KL, Meinhardt A. Spermatogenesis. içinde: van Steirteghem A, Devroey P, Tarlatzis BC, European Society of Human Reproduction and Embryology. *Current theory and practice of ICSI*, Oxford, UK: Oxford University Press; 1998. s.1-10.
31. Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler (sperm/oosit) fertilizasyon ve embriyoner gelişim. 1. baskı, İstanbul: Serono Yayınları; 2000. s. 1-30.
32. Kierszenbaum AL, Tres LL. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome *J Cell Biol* 1975; 65(2): 258-70.
33. Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 1991; 6(7): 979-82.
34. Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev* 2001; 58 (4): 357-8.
35. 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(2): 425-31.

36. Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weil MM, Behringer RR, Meistrich ML. Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(9): 4683-8.

37. Nayernia K, Bohm D, Topaloglu O, Schluter G, Engel W. Rat transition nuclear protein 2 regulatory region directs haploid expression of reporter gene in male germ cells of transgenic mice. *Mol Reprod Dev* 2001; 58(4): 368-75.

38. Caron N, Veilleux S, Boissonneault G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol Reprod Dev* 2001; 58(4): 437-43.

39. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992; 15(4): 330-7.

40. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4(1): 31-37.

41. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56(3): 602-7.

42. Ellington JE, Evenson DP, Wright RW, Jr, Jones AE, Schneider CS, Hiss GA, Brisbois RS. Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro. *Fertil Steril* 1999; 71(5): 924-9.

43. World Health Organization. Examination and processing of human semen. 5. baskı, Geneva: WHO Press; 2010. s. 224.

44. Ombelet W. The value of sperm morphology and other semen parameters in diagnosis and treatment of human subfertility. Doktora tezi. Leuven: University of Leuven; 1998.

45. Hotaling JM, Smith JF, Rosen M, Muller CH, Walsh TJ. The relationship between isolated teratozoospermia and clinical pregnancy after in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2011; 95(3): 1141-5.
46. Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl* 2008; 29(5): 469-87.
47. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod* 2001; 16(6): 1165-71.
48. Gellert-Mortimer ST, Clarke GN, Baker HW, Hyne RV, Johnston WI. Evaluation of Nycodenz and Percoll density gradients for the selection of motile human spermatozoa. *Fertil Steril* 1988; 49(2): 335-41.
49. Lopez O, Mata A, Antich M, Bassas L. Sperm selection by PD-10 sephadex columns: comparison with SpermPrep filtration and Percoll centrifugation. *Hum Reprod* 1993; 8(5): 732-6.
50. Wikland M, Wik O, Steen Y, Qvist K, Soderlund B, Janson PO. A self-migration method for preparation of sperm for in-vitro fertilization *Hum Reprod* 1987; 2(3): 191-5.
51. Wood C, Trounson A. *Clinical in vitro fertilization*. 2. baskı. Londra: Springer; 1989. S. 121-32.
52. Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril* 1985; 43(2): 268-73.
53. Andolz P, Bielsa MA, Genesca A, Benet J, Egozcue J. Improvement of sperm quality in abnormal semen samples using a modified swim-up procedure. *Hum Reprod* 1987; 2(2): 99-101.
54. Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionating of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril* 1981; 35(6): 662-5.

55. Vicdan K, Işık AZ. İnvitro fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar. 1. baskı. Ankara: Çağdaş Medikal Kitabevi; 1999. s. 79-97.
56. Dorado J, Galvez MJ, Demyda-Peyras S, Ortiz I, Morrell JM, Crespo F, Gosalvez J, Hidalgo M. Differences in preservation of canine chilled semen using simple sperm washing, single-layer centrifugation and modified swim-up preparation techniques. *Reprod Fertil Dev*. 2015 Epub 2015/04/17, doi: 10.1071/rd15071.
57. Kim EK, Kim EH, Kim EA, Lee KA, Shin JE, Kwon H. Comparison of the effect of different media on the clinical outcomes of the density-gradient centrifugation/swim-up and swim-up methods. *Clin Exp Reprod Med* 2015; 42(1): 22-9.
58. Sadek A, Almohamdy AS, Zaki A, Aref M, Ibrahim SM, Mostafa T. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. *Fertil Steril* 2011; 95(5): 1705-8.
59. Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, Kim SH, Moon SY, Choi YM. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis *Clin Exp Reprod Med* 2013; 40(1): 23-8.
60. de Oliveira RV, Dogan S, Belser LE, Kaya A, Topper E, Moura A, Thibaudeau G, Memili E. Molecular morphology and function of bull spermatozoa linked to histones and associated with fertility. *Reproduction* 2013; 146(3): 263-72.
61. Jayaraman. V, Upadhya D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29(6): 557-63.
62. Le Lannou D, Blanchard Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 1988; 84(2): 551-6.

10. EKLER



02.09.2014

İlgili Makama,

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programında öğrenci olarak yer alan Hatice Şahin'in "İzole teratozoospermi olgularında farklı sperm hazırlama tekniklerinin kromatin kondensasyon defekti sonuçlarına etkisi" isimli tez araştırması hastanemiz bünyesinde bulunan ÜYTE merkezi androloji laboratuvarına başvuran hastaların atık semen numuneleri kullanılarak yürütülecektir. Bu çalışılma merkezimizin işleyişi ve etik açıdan bir sakınca içermemektedir ve yürütülmesinde sakınca yoktur.

Bilgilerinize arz ederim.

Prof. Dr. A. Tarık AKSU
Özel HRS Ankara Kadın Hastanesi
ÜYTE Merkezi Sorumlusu

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Hatice ŞAHİN

Uyruğu : (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 01.09.1980/MALATYA

Medeni Durumu: Bekar

[Tel:05059408603](tel:05059408603)

Email: htcshn.bio44@hotmail.com

Yazışma Adresi: HRS Ankara Kadın Hastanesi Güneş Sok No:14 Çankaya/Ankara

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Malatya Hacı Ahmet Akıncı Lisesi	1997

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2010	Dr. Fethiye Ersan Tüp Bebek Merkezi Malatya	Biyolog
2014-halen	HRS Ankara Kadın Hastanesi	Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce