



**T. C.**

**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ**

**İDİYOPATİK VE İDİYOPATİK OLMAYAN  
ASTENOZOOSPERMİK İNFERTİL HASTALARDA SPERM  
DNA BÜTÜNLÜĞÜ VE OKSİDATİF HASARIN İNCELENMESİ**

**Esra FİDAN**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ŞUBAT 2018**

**BOLU**





**T. C.**

**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ**

**İDİYOPATİK VE İDİYOPATİK OLMAYAN  
ASTENOZOOSPERMİK İNFERTİL HASTALARDA SPERM  
DNA BÜTÜNLÜĞÜ VE OKSİDATİF HASARIN İNCELENMESİ**

**Esra FİDAN**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK  
LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof.Dr. Aysel KÜKNER**

**ŞUBAT 2018**

**BOLU**

Abant İzzet Baysal Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysel KÜKNER  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yakın Doğu Üniversitesi  
Prof. Dr. Meryem ÇAM  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Düzce Üniversitesi  
Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Abant İzzet Baysal Üniversitesi

(imza)

(imza)

(imza)

Tarih:02/02/2018

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu, Esra FİDAN'ın Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYAZ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

(imza)

## ÖZET

İdiyopatik ve idiyopatik olmayan astenozoospermik infertil hastalarda düşük sperm hareketliliği ile ilişkisi olan sperm DNA bütünlüğünün ve oksidatif hasarının incelenmesi amaçlandı.

20 normozoospermik fertil, 20 idiyopatik astenozoospermik ve 20 idiyopatik olmayan astenozoospermik infertil hastaya ait semen örneklerine spermiyogram değerlendirmeleri ve canlılık testi yapıldı. Gruplara ait sperm DNA bütünlüğü analizi için asidik anilin mavisi ile kromatin kondensasyon defektleri ve floresan TUNEL yöntemi ile DNA fragmentasyonu değerlendirildi. Oksidatif hasarın incelenmesi için DCFH ile boyanan spermier flow sitometrik olarak analiz edildi.

İdiyopatik ve idiyopatik olmayan astenozoospermik infertil grup arasında sperm konsantrasyonu, toplam hareketlilik, ilerleyici hareketlilik, canlılık ve normal morfoloji değerlendirmelerinde anlamlı fark olmamasına karşın bu gruplar ile normozoospermik fertil grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edildi ( $p \leq 0,05$ ). Anormal kromatin kondensasyonu, DNA fragmentasyonu ve hücre içi yüksek ROS değerleri istatistiksel olarak en yüksek idiyopatik astenozoospermik infertil grupta, en düşük ise normozoospermik fertil grupta belirlendi ve tüm gruplar arasında anlamlı fark bulundu ( $p \leq 0,05$ ).

Bu çalışmanın sonuçlarına göre; düşük sperm hareketliliğine dayalı erkek infertilitesinde idiyopatik astenozoospermik infertil hasta grubunun sperm DNA bütünlüğü ve ROS açısından daha çok etkilendiği tespit edildi. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda sperm DNA bütünlüğü ve oksidatif hasar analizinin yardımıyla üreme tekniklerinde özellikle idiyopatik astenozoospermik erkek infertilite değerlendirilmesi ve tedavisi için yararlı bir tanı olabileceği düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler;** İdiyopatik astenozoospermi, ROS, Sperm DNA bütünlüğü, flow sitometri, TUNEL

## ABSTRACT

It was aimed to examine the integrity of sperm DNA and oxidative damage in idiopathic and non-idiopathic asthenozoospermic infertile patients.

Spermogram evaluations and viability tests were performed on 20 normozoospermic fertile, 20 idiopathic asthenozoospermic and 20 non-idiopathic asthenozoospermic infertile patients. DNA fragmentation was assessed by the TUNEL method. For DCFH-stained sperm, flow cytometric analysis was performed for the examination.

Although there was no significant difference in sperm concentration, total motility, progressive motility, viability and normal morphology evaluations between idiopathic and non-idiopathic asthenozoospermic infertile groups, there was a statistically significant difference between these groups and normozoospermic fertile group ( $p \leq 0,05$ ).

The highest statistical significance was found in the idiopathic asthenozoospermic infertile group and the lowest in the normozoospermic fertile group for abnormal chromatin condensation, DNA fragmentation and intracellular high ROS values, and there was a significant difference between all groups ( $p \leq 0,05$ ).

As a result; According to the results of this study; the sperm DNA integrity and ROS of the group of idiopathic asthenozoospermic infertile patients in male infertility were found to be more affected by low sperm motility. It is thought that the results obtained may be a useful diagnosis for the evaluation and treatment of idiopathic asthenozoospermic male infertility with the help of analysis of sperm DNA integrity and oxidative damage.

**Keywords;** Idiopathic asthenozoospermic (IDA) , ROS, sperm DNA integrity, flow cytometry, TUNEL.

## TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji bölümüne ilk geldiğim günden bugüne kadar her zaman güler yüzüyle beni anne gibi karşılayan, hoşgörüsü, anlayışı ve umut dolu yaklaşımıyla hiçbir yardımı esirgemeyen, mükemmel bir deneyim edinmemi sağlayan, danışmanım Sayın Prof. Dr. Aysel KÜKNER ve yüksek lisans sürecimde güler yüzüyle, anlayışıyla bana çok şey katan, güzel deneyimlere kapı aralayan, Sayın Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT hocama çok teşekkür ederim.

Her anımda sabırla ve itinayla benimle ilgilenen, tez sürecimin akışının değişmesine imkan tanıyan, beni benden daha çok düşünen özverili anlayışıyla, üzerimde çok emeği geçen ablam, Sayın Uzman Dr. Sevilay ERİMŞAH'a, Uzun süredir, arkadaşlığımı paylaştığım, bana hep teselli ve umut kaynağı olan, her konuda destek ve yardımını gördüğüm canım arkadaşlarım Gizem İLTER AKTAŞ ve Esra TÜRK'e, çocukluğumdan bugünüme her adımı birlikte attığımız, yüzümde kocaman bir gülümseyi anımsatan çocukluk arkadaşlarım Kübra FİDAN, Huri FİDAN, Nuray OFLAZ CAN, Öznur ÇİÇEKDENK ve Hatice KIRIM'a daima yanımda oldukları için çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitim sürecimi daha eğlenceli hale getiren beraber paylaştığımız güzel anılar biriktirmemi sağlayan, kısa sürede arkadaşlıklarıyla ve insanlıklarıyla bana destek olan bölüm arkadaşlarım Havva İmran Özdemir, Serhat GÖKDAŞ, Cemre Nur BALCI, Hande YILMAZ, Gizem DEDE ve Melek USTA'ya çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olmaya çalışan, beni fazlasıyla gülümseten AİBÜ Tıp Fakültesi Biyokimya bölümünün güzel yürekli bütün personeline çok teşekkür ederim. Tez çalışmamın bir kısmında bana yardımlarını eksik etmeyen Kocaeli Üniversitesinin KOGEM birimindeki personeline ve Gülay ERMAN'a çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim sırasında tanımaktan mutluluk duyduğum AİBÜ Tıp Fakültesi Öğretim üyelerine ve her biri mutluluk kaynağı olan sevgili öğrencilere çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman arkamda olan, koşulsuz sevgi ve destekleriyle yanımda olan canım ailem; Zehra FİDAN, Necati FİDAN ve Seda FİDAN'a sonsuz teşekkürler.

Esra FİDAN

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                         |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                                                               | iv   |
| ABSTRACT .....                                                                                                          | v    |
| TEŞEKKÜR .....                                                                                                          | vi   |
| ŞEKİLLER .....                                                                                                          | x    |
| TABLolar .....                                                                                                          | xii  |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                                                           | xiii |
| 1.GİRİŞ .....                                                                                                           | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                                                                                  | 3    |
| 2.1. Spermatogenez .....                                                                                                | 3    |
| 2.1.1. Spermatogonyal evre .....                                                                                        | 3    |
| 2.1.2. Spermatosit evre .....                                                                                           | 3    |
| 2.1.3. Spermatid evresi (Spermiyogenezis) .....                                                                         | 5    |
| 2.2. Epididimis bezinde olgunlaşma.....                                                                                 | 6    |
| 2.3. Sperm yapısı .....                                                                                                 | 6    |
| 2.4. Sperm DNA bütünlüğü.....                                                                                           | 7    |
| 2.4.1. Sperm kromatin kondensasyonu .....                                                                               | 8    |
| 2.4.1.1. Protamin bağlı DNA .....                                                                                       | 9    |
| 2.4.1.2. Histon bağlı DNA .....                                                                                         | 10   |
| 2.4.1.3. Matriks bağlayıcı bölgeler (MARs) .....                                                                        | 10   |
| 2.4.2. Reaktif oksijen türleri (ROS).....                                                                               | 11   |
| 2.4.2.1. Sperm DNA bütünlüğünde ROS hasarının rolü.....                                                                 | 12   |
| 2.4.2.2. Sperm hareketliliğinde ROS hasarının rolü .....                                                                | 12   |
| 2.4.3. Apoptoz.....                                                                                                     | 12   |
| 2.5. Sperm DNA bütünlüğüne özgü testler .....                                                                           | 13   |
| 2.5.1. Asidik Anilin mavisi .....                                                                                       | 13   |
| 2.5.2. Kromomisin A3 (CMA3).....                                                                                        | 13   |
| 2.5.3. Toluidin mavisi .....                                                                                            | 14   |
| 2.5.4. Sperm kromatin yapısı analizi (SCSA).....                                                                        | 14   |
| 2.5.5. Terminal deoxynucleotidyl transferase deoksiuridin trifosfatın (dUTP)<br>nick end labeling (TUNEL) analizi ..... | 14   |
| 2.5.7. Sperm chromatin dispersion (SCD).....                                                                            | 15   |
| 2.5.8. Akridin orange (AO).....                                                                                         | 15   |

|                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6. Erkek infertilitesi .....                                                   | 16        |
| 2.6.1. Astenozoospermi .....                                                     | 20        |
| 2.6.2. İdiyopatik erkek infertilitesi.....                                       | 20        |
| 2.6.3. İdiyopatik astenozoospermik (İDA) infertilite .....                       | 21        |
| 2.6.4. İdiyopatik olmayan astenozoospermik (NİDA) infertilite.....               | 21        |
| 2.6.4.1. Varikosel .....                                                         | 21        |
| 2.6.4.2. Kriptorşidizm .....                                                     | 22        |
| 2.6.4.3. Diabetes Mellitus (DM) .....                                            | 22        |
| 2.6.4.4. Yaşam biçimi .....                                                      | 22        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                                   | <b>26</b> |
| 3.1. Semen analizi .....                                                         | 29        |
| 3.1.1. Konsantrasyon .....                                                       | 29        |
| 3.1.2. Hareketlilik .....                                                        | 29        |
| 3.1.3. Sperm canlılık testi işlemi (GM501 SpermMobil ) .....                     | 30        |
| 3.1.3.1. PBS ( Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ) hazırlanışı .....                 | 30        |
| 3.1.4. Sperm morfolojisi .....                                                   | 30        |
| 3.2. Spermin vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması işlemi .....                 | 31        |
| 3.3. Asidik Anilin mavisi boyaması .....                                         | 32        |
| 3.3.1. Sperm kromatin kondensasyonun değerlendirilmesi.....                      | 32        |
| 3.4. TUNEL Floresan boyama .....                                                 | 32        |
| 3.4.1. %4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu hazırlanması (100 ml).....        | 32        |
| 3.4.2. %0,1 Triton X-100 ile permeabilizasyon solüsyonu hazırlanması .....       | 33        |
| 3.4.3. TUNEL karışım solüsyonu .....                                             | 33        |
| 3.4.4. Floresan boyama basamakları.....                                          | 33        |
| 3.4.5. TUNEL Floresan boyama yöntemi ile DNA fragmentasyonunun incelenmesi ..... | 33        |
| 3.5. Reaktif oksijen türleri (ROS ) oluşumu etkisi .....                         | 34        |
| 3.5.1. DCFH-DA/PI ile flow sitometrik boyama.....                                | 34        |
| 3.5.2 Flow sitometrik analiz .....                                               | 34        |
| 3.6. İstatistiksel analiz .....                                                  | 36        |
| <b>4.BULGULAR .....</b>                                                          | <b>37</b> |
| 4.1. Sperm konsantrasyonu .....                                                  | 38        |
| 4.2. Sperm hareketliliği .....                                                   | 39        |
| 4.3. Sperm morfolojisi.....                                                      | 43        |
| 4.4. Sperm canlılığı .....                                                       | 44        |

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5. Sperm kromatin kondensasyonu .....                        | 45        |
| 4.6. Floresan TUNEL boyaması ile sperm DNA fragmentasyonu..... | 46        |
| 4.7. Flow sitometrik ROS analizi .....                         | 47        |
| 4.8. Işıık mikroskopik bulgular.....                           | 50        |
| 4.9. Floresan mikroskopik bulgular.....                        | 52        |
| <b>5.TARTIŞMA .....</b>                                        | <b>54</b> |
| 5.1. Sperm DNA bütünlüğü.....                                  | 55        |
| 5.1.1. Sperm kromatin kondensasyonu .....                      | 55        |
| 5.1.2. Apoptoz.....                                            | 57        |
| 5.1.3. ROS.....                                                | 57        |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                               | <b>60</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR .....</b>                                      | <b>62</b> |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>                                        | <b>69</b> |
| <b>9. EKLER</b>                                                |           |
| <b>EK-1 : Etik Kurul Onayı</b>                                 |           |
| <b>EK-2 : Orjinallik Raporu</b>                                |           |
| <b>EK-3 : Bilgilendirme Olur Formu</b>                         |           |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1.</b> Spermatogenez şeması.....                                                                                                                                          | 4  |
| <b>Şekil 2.2.</b> Sperm yapısı .....                                                                                                                                                 | 7  |
| <b>Şekil 2.3.</b> Sperm kromatin kondensasyonu için üç ana yapısal element .....                                                                                                     | 9  |
| <b>Şekil 2.4.</b> Embriyo tarafından sperm kromatin yapısal elemetlerinin kalıtımı .....                                                                                             | 9  |
| <b>Şekil 2.5.</b> Yardımcı üreme biriminde incelenen semen anormalliklerine ait 552 (%58,5) hastanın yüzde dağılımları .....                                                         | 18 |
| <b>Şekil 3.1.</b> Hasta grupları ve yapılan analizlere ait deney düzeneği .....                                                                                                      | 27 |
| <b>Şekil 3.2.</b> Spermilerin dondurulması için SpermCryo™ All-round vitrifikasyon solüsyonu .....                                                                                   | 31 |
| <b>Şekil 3.3.</b> Becton Dickinson FACS Calibur akış sitometrisi .....                                                                                                               | 35 |
| <b>Şekil 3.4.</b> Propidium İyodid ile (PI) zıt boyaması .....                                                                                                                       | 37 |
| <b>Şekil 4.1.</b> Gruplar ve sperm konsantrasyon yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki .....                                                                     | 38 |
| <b>Şekil 4.2.</b> Gruplara ait hareketlilik sperm yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki .....                                                                    | 39 |
| <b>Şekil 4.3.</b> Gruplara ait a sınıfı ileri hareketli sperm yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki .....                                                        | 40 |
| <b>Şekil 4.4.</b> Gruplara ait b sınıfı yavaş hareketli sperm yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki .....                                                        | 41 |
| <b>Şekil 4.5.</b> Gruplara ait a+b sınıfı hareketli sperm yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki .....                                                            | 42 |
| <b>Şekil 4.6.</b> Gruplara ait normal morfoloji sperm yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki .....                                                                | 43 |
| <b>Şekil 4.7.</b> Gruplara ait sperm canlılığı yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki.....                                                                        | 44 |
| <b>Şekil 4.8.</b> Asidik anilin mavisi ile pozitif (+) boyanan kromatin kondensasyon defekti gösteren grupların sperm yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki..... | 45 |
| <b>Şekil 4.9.</b> Floresan TUNEL ile pozitif (+) boyanan DNA fragmentasyonuna ait grupların sperm yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki.....                     | 46 |
| <b>Şekil 4.10.</b> Sperm DNA bütünlüğü açısından DCFH, Floresan TUNEL ve Anilin Mavisi değerlerinin kıyaslanması .....                                                               | 47 |
| <b>Şekil 4.11.</b> Gruplara ait DCFH pozitif (+) hücre içi ROS düzeyi yüzde ortalamaları $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki. ....                                                | 48 |
| <b>Şekil 4.12.</b> Gruplara ait DCFH ve propidium iyodid ile boyanan spermelerde flow sitometrik ROS ölçüm analiz verileri.....                                                      | 49 |
| <b>Şekil 4.13.</b> Kontrol grubuna ait asidik anilin mavisi boyaması .....                                                                                                           | 50 |

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 4.14.</b> NİDA grubuna ait asidik anilin mavisi boyaması ..... | 50 |
| <b>Şekil 4.15.</b> İDA grubuna ait asidik anilin mavisi boyaması .....  | 51 |
| <b>Şekil 4.16.</b> Kontrol grubuna ait TUNEL floresan boyaması .....    | 52 |
| <b>Şekil 4.17.</b> İDA grubuna ait TUNEL floresan boyaması.....         | 52 |
| <b>Şekil 4.18.</b> NİDA grubuna ait TUNEL floresan boyaması.....        | 53 |



## TABLÖLAR

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> Sperm kalitesi değerlendirilmesine ait referans değerleri (WHO) 2010.....                                                            | 17 |
| <b>Tablo 2.2.</b> Sperm anormalliklerine ait tanımlamalar.....                                                                                         | 19 |
| <b>Tablo 3.1.</b> Kontrol, İDA ve NİDA grubu tayini için kullanılan anket formu.....                                                                   | 28 |
| <b>Tablo 4.1</b> Tüm hastalara ait spermiyogram parametreleri ve değerleri.....                                                                        | 37 |
| <b>Tablo 4.2.</b> Tüm grupların konsantrasyonuna ait istatistiksel verileri .....                                                                      | 38 |
| <b>Tablo 4.3.</b> Gruplara ait sperm hareketlilik yüzdelerini gösteren istatistiksel verileri ..                                                       | 39 |
| <b>Tablo 4.4.</b> Gruplara ait a sınıfı ileri hareketli sperm yüzdelerini gösteren istatistiksel veriler .....                                         | 40 |
| <b>Tablo 4.5.</b> Gruplara ait b sınıfı yavaş hareketli sperm yüzdelerini gösteren istatistiksel veriler. ....                                         | 41 |
| <b>Tablo 4.6.</b> Gruplara ait a+b sınıfı sperm yüzdelerini gösteren istatistiksel verileri .....                                                      | 42 |
| <b>Tablo 4.7.</b> Gruplara ait normal morfolojili sperm yüzdelerini gösteren istatistiksel verileri .....                                              | 43 |
| <b>Tablo 4.8.</b> Gruplara ait sperm canlılık yüzdelerine ilişkin istatistiksel veriler.....                                                           | 44 |
| <b>Tablo 4.9.</b> Tüm grupların Anilin mavisi ile kromatin defektli sperm hücrelerinin pozitif (+) boyanma yüzdelerine ait istatistiksel verileri..... | 45 |
| <b>Tablo 4.10.</b> Gruplara ait Floresan TUNEL ile pozitif (+) boyanma yüzdelerine ait istatistiksel verileri .....                                    | 46 |
| <b>Tablo 4.11.</b> Gruplara ait DCFH pozitif (+) boyanma yüzdeleri, yüzdelerine ilişkin istatistiksel verileri .....                                   | 47 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                        |                                                                                          |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>AO:</b>             | Akridin Orange                                                                           |
| <b>CMA3:</b>           | Kromomisin A3                                                                            |
| <b>COMET:</b>          | Tek Hücreli Jel Elektroforezi                                                            |
| <b>DCFH-DA:</b>        | 2,7-dichloro dihydrofluorescein asetat                                                   |
| <b>DCFH:</b>           | Dichlorofluorescein                                                                      |
| <b>DFI:</b>            | DNA Fragmantasyon İndeksi                                                                |
| <b>DM:</b>             | Diabetes Mellitus                                                                        |
| <b>DM1:</b>            | Tip 1 DM                                                                                 |
| <b>DMSO:</b>           | Dimethyl Sulfoxide                                                                       |
| <b>DNA:</b>            | Deoksiribonükleik asit                                                                   |
| <b>DTT:</b>            | Dithiothreitol                                                                           |
| <b>GC:</b>             | Guanin Sitozin                                                                           |
| <b>HOST:</b>           | Hipo-ozmotik Şişme Testi                                                                 |
| <b>HspA2:</b>          | Heat shock protein gene                                                                  |
| <b>H2O2:</b>           | Hidrojen Peroksit                                                                        |
| <b>ICSI:</b>           | İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu                                                       |
| <b>İDA:</b>            | İdiyopatik Astenozoospermik                                                              |
| <b>KOGEM:</b>          | Kök Hücre Gen Tedavileri ve Araştırma ve Uygulama Merkezi                                |
| <b>LPO:</b>            | Lipidperoksidaz                                                                          |
| <b>MARs:</b>           | Matriks Bağlayıcı Bölgeler                                                               |
| <b>NADH:</b>           | Nicotinamid Adenine Dinükleotid Fosfat                                                   |
| <b>NBT:</b>            | Nitroblue Tetrazolium                                                                    |
| <b>NİDA:</b>           | İdiyopatik Olmayan Astenozoospermik                                                      |
| <b>NO:</b>             | Nitrik Oksit                                                                             |
| <b>O2<sup>-</sup>:</b> | Süper Oksit                                                                              |
| <b>OS:</b>             | Oksidatif Stres                                                                          |
| <b>P1:</b>             | Protamin 1                                                                               |
| <b>P2:</b>             | Protamin 2                                                                               |
| <b>PBS:</b>            | Fosfatlı Tuz Çözeltisi                                                                   |
| <b>PI:</b>             | Propidium İyodid                                                                         |
| <b>ROS:</b>            | Reaktif Oksijen Türleri                                                                  |
| <b>SCSA:</b>           | Sperm Kromatin Yapısal Analizi                                                           |
| <b>SCD:</b>            | Sperm Kromatin Dağılımı                                                                  |
| <b>SCGE:</b>           | Single-cell gel electrophoresis                                                          |
| <b>SPSS:</b>           | Statistical Package for the Social Sciences                                              |
| <b>TBA:</b>            | Tiyobarbütirik Asit                                                                      |
| <b>TP1:</b>            | Transizyonel Protein 1                                                                   |
| <b>TP2:</b>            | Transizyonel Protein 2                                                                   |
| <b>TUNEL:</b>          | Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling |
| <b>YÜT:</b>            | Yardımla Üreme Teknikleri                                                                |
| <b>WHO:</b>            | Dünya Sağlık Örgütü                                                                      |

## 1.GİRİŞ

İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2010 kılavuzuna göre bir yıl süre ile düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrasında çocuk sahibi olamama durumudur. İnfertilite vakalarının %50'sine erkek faktörünün neden olduğu belirtilmiştir (1). Erkek infertilite tanısı; sperm sayısı, morfolojisi, hareketliliği ve ejakülat miktarı gibi rutin sperm analizi değerlendirmesine göre yapılmaktadır. Erkek infertilitesinin bilinen nedenleri; sigara ve alkol kullanımı, madde bağımlılığı, varikosel, kistik fibrozis, enfeksiyon, şeker hastalığı, nörolojik hastalıklar, obezite, travma sonucu bel omurlarının hasar görmesi vs. gibidir. Bu nedenlerden bağımsız olarak %25 oranda idiyopatik infertilite görülmektedir. İdiyopatik infertilite, infertil çiftlerde yapılan temel değerlendirmede rutin spermiyogram, ovulasyon testleri, kavite ve tubalarda patoloji olmadığını gösteren histerosalpingogram gibi parametrelerde herhangi bir patolojik bulgunun olmaması durumudur (2,3). İdiyopatik infertilitenin etiyolojisi tam olarak açıklanamamasına karşın genetik, çevresel ve hormonal parametreleri içeren multifaktöriyel bir etkisinin olduğu öngörülmektedir. Özellikle reaktif oksijen türleri (ROS), idiyopatik infertiliteye neden olabilecek mekanizmalardan biri olarak sorumlu tutulmaktadır (4-6). ROS, spermatozoa olgunlaşma süreci, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi normal sperm fonksiyonları için gerekli olduğundan büyük önem taşımaktadır. ROS'un aşırı yüksek olduğu durumlar oksidatif stresi tetikler. Oksidatif stresin oluşması da DNA bütünlüğünde hasar oluşmasına, lipid peroksidasyonuna, sperm hareketliliğinde azalmaya ve sayı kaybına neden olmaktadır (7,8).

Dünya Sağlık Örgütü 2010 kılavuzunda astenozoospermiyi; a (+4) ve b (+3) sperm ilerleyici hareketliliğinin %32 referans değerinin altında olması olarak tanımlamıştır. Astenozoospermi olgularını tetikleyen nedenler arasında çoğunlukla; spermiyumun yapısal bozuklukları, genital sistem enfeksiyonları, varikosel, parsiyel duktal obstrüksiyon, nörolojik hastalıklar, anti-sperm antikorların varlığı, toksik ajanlar, uzamış epididimal taşınma süresi, uzamış cinsel perhiz süresi, sperm kriyoprezervasyonu ve idiyopatik infertilite gibi nedenler sayılabilir (9). İdiyopatik infertil astenozoospermik hasta grubunda sperm ilerleyici hareketliliğinde azalma olduğu için akla gelen nedenlerden birisinin de reaktif oksijen türleriyle (ROS) ilişkisi olduğu sonucuna varılmaktadır.

Yapılan çalışmalarda; olgunlaşmamış ya da anormal sperm hücrelerinin DNA bütünlüğünün kaybolmasının, kromatin kondensasyon defektleri, apoptoz, ROS retimi, ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (11-16). Sperm DNA bütünlüğü erkek fertilit potansiyelinin bir işareti olarak düşünülmektedir. DNA hasarı, anormal sperm morfolojisi ve düşük hareketlilik ile ilişkilidir (17). Düşük sperm motilitesi olan hastaların semeninde çok sayıda anormal sperm bulunmasına neden olan DNA fragmentasyonu döllenme ve embriyo gelişimini önleyebilir ve genetik defekt riskini artırabilir (18). Bu alışma; spermiyogram sonuçlarına göre seçilen idiyopatik ve idiyopatik olmayan astenozoospermik infertil hastalar arasındaki farklılıkları değerlendirmeye yönelik olup, özellikle reaktif oksijen türlerinin bu hasta gruplarında sperm DNA bütünlüğü üzerine etkisini araştırmayı amaçlamaktadır. Aynı zamanda kaynak taramalarına göre bu konudaki çalışmaların az sayıda olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçların klinik yaklaşıma katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Spermatogenez

Spermatogenez, sperm üretim ve gelişim sürecinin ilk aşamasıdır (18). Puberteden kısa bir süre önce adenohipofizden salgılanan gonadotropinlerin seviyeleri artar (19). Pubertede progenitör hücreler olan spermatogonyumların mitoz ile çoğalması ile spermatogenez başlar ve yaşam boyu devam eder (18). Spermatogenez üç farklı evreden oluşur; Spermatogonyal evre, spermatosit evresi ve spermatid evresi (19).

#### 2.1.1. Spermatogonyal evre

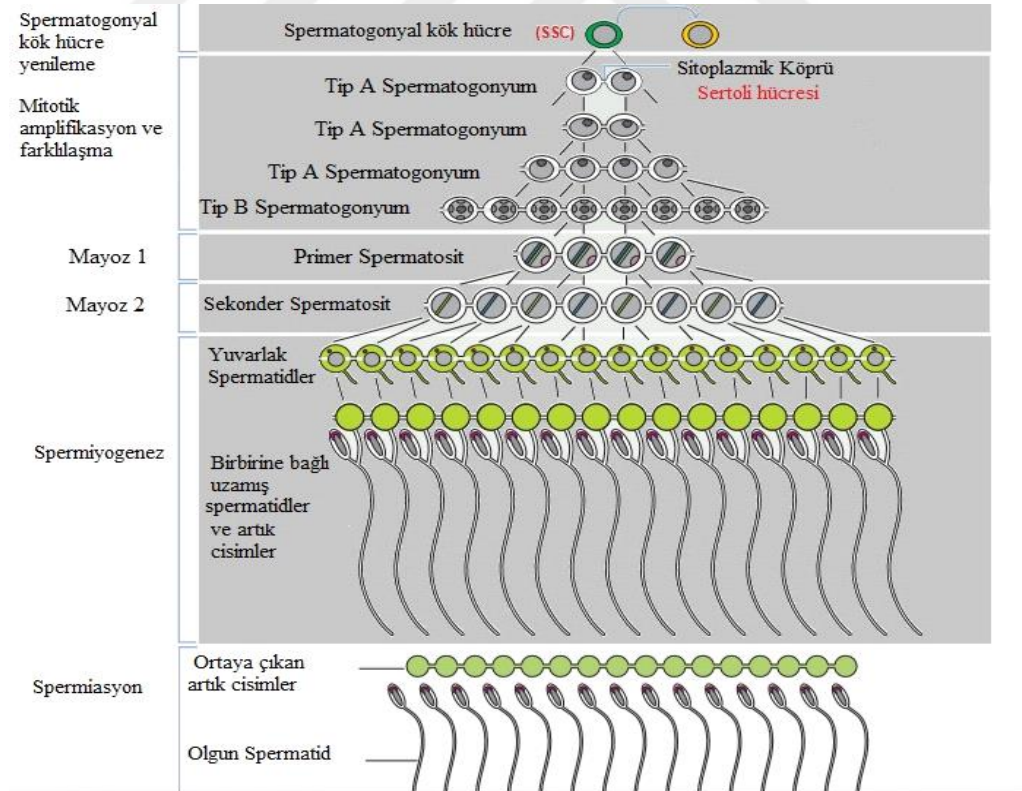
Spermatogonyumlar küçük, yuvarlak ve 12 µm çapında hücrelerdir. Bu hücreler testis dokusunda bazal membranın hemen üstünde yer alır ve Sertoli hücreleri ile yakın ilişkili haldedirler (18). Spermatogonyum gelişiminin farklı basamakları, küçük farklılıklara ve çekirdeğinin boyanma özelliklerine göre tanımlanır. Koyu renkli ve oval şekilli olanlar kök hücre olarak davranır ve mitoz bölünme gösterir. Bu hücrenin bölünmesi sonucunda iki tip hücre oluşur. Birincisi kök hücre karakterindedir ve Tip A spermatogonyum olarak tanımlanır. İkincisi ise daha soluk boyanan oval çekirdekli, progenitör hücrelerde olduğu gibi daha hızlı bölünebilen hücrelerdir ve Tip B spermatogonyum olarak tanımlanır. Tip A spermatogonyumlar birbiriyle sitoplazmik köprüler ile bağlantı kurarak çok sayıda klonal bölünme geçirirler. Tip A spermatogonyumlar bölünmelerini tamamladıktan sonra Tip B spermatogonyumlar olarak farklılaşırlar. Tip B spermatogonyumlar son bir mitoz bölünme daha geçirirler ve iki hücre meydana getirirler, bu hücreler olgunlaşarak ökromatik çekirdekli hücreler olan primer spermatositleri oluştururlar Şekil 2.1 (18).

#### 2.1.2. Spermatosit evre

Spermatosit fazında, primer spermatositler DNA'larını eşlerler ve her bir kromozom iki kromatidden oluşur. Daha sonra mayoz bölünme geçirirler. Bu safhada homolog kromozomlar bir araya gelerek sinaps oluştururlar, DNA rekombinasyonu olur ve iki hücre bölünmesiyle haploid hücreler oluşur. Primer spermatositler diploiddir, 46 kromozom (44+XY) ve 4N DNA içerir. Haploid n kromozom sayısını (insanlarda 23 kromozom) ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını gösterir. Primer spermatositler hemen birinci mayoz bölünmenin profaz

evresine girerler. Bu aşama yaklaşık olarak üç hafta devam ettiğinden, testisin ışık mikroskobik görünümünde çok sayıda primer spermatositler gözlenir. Primer spermatositler spermatogenik hücre serisinin en büyük hücreleridir.

Birinci mayoz bölünmenin sonunda, homolog kromozomlar ayrılırlar ve sekonder spermatositler oluşur. Bu hücreler 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücrelerdir. Kromozomlardaki sayıya yarıya düşme (46'dan 23'e) olayı her hücredeki DNA miktarının da yarıya (4N'den 2N'e) inmesiyle sonuçlanır. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi oldukça zordur, bunun nedeni interfazda çok kısa süre kalmaları ve hızlı bir şekilde ikinci mayoz bölünmeye girmeleridir (19). Sekonder spermatosit S fazı (DNA sentezi) olmadan ikinci mayoz bölünmenin profaz evresine geçer (20). İkinci mayoz bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid hücreler meydana gelir. Böylece mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid kromozom içeren spermatitler oluşur. Döllenme ile haploid ovum ve sperm birleşir ve normal diploid kromozom sayısı sağlanır (18).



Şekil 2. 1. Spermatogenez şeması (20).

### 2.1.3. Spermatid evresi (Spermiyogenezis)

Spermiyogenezis spermatogenezisin son aşaması olup erkek DNA'sını oosite aktarmak için özelleşmiş hücreler olan spermiyumlara dönüşüm sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez ve haploid Spermatidler küçüktür. 7-8 µm çapında ve seminifer tübül lümenine yakındır. Spermiyogenezis, akrozom (Yun. akros, ekstremite + soma, gövde) oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum gelişimini ve sitoplazmanın çoğunun kaybolmasını içeren bir evredir. Sonuçta olgun spermiyum Sertoli hücre yüzeyinden ayrılır tübül lümenine geçer. Spermiyogenezis 4 evrede incelenir:

**Golgi Evresi;** Spermatid sitoplazmasında, çekirdeğin yakınında bulunan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriyonlar, bir çift sentriyol, endoplazmik retikulum ve serbest ribozomlar bulunur. Golgi kompleksinden gelen küçük proakrozomal mitokondriyonlar, birleşerek çekirdeğin bir ucuna yakın bölgede tek katlı bir zarla sınırlı akrozomal başlığı (kep) oluşturur. Sentriyoller akrozomal başlıktan en uzak noktaya göç ederler ve bir tanesi bazal cisimcik olarak davranır. Yapısal ve işlevsel olarak silyuma benzer olan flagella aksonemini oluşturmaya başlar.

**Kep Evresi;** Akrozom yoğunlaşan çekirdeğin yarısını kaplayacak şekilde yayılır. Akrozom, hiyaluronidaz, nöroaminidaz ve tripsin benzeri proteaz olan akrozin gibi hidrolitik enzimleri içeren son derece özelleşmiş bir yapıdır. Bu enzimler spermiyum oosite karşılaştığında salgılanır ve akrozomun dış zarı spermatozoonun hücre zarı ile kaynaşır. Enzimler oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırır ve zona pellusidayı sindirir. Bu olaya akrozomal reaksiyon denir ve döllenmenin ilk basamaklarından biridir.

**Akrozom Evresi;** Gelişen spermin akrozomu yoğunlaşmış çekirdek içeren başı, Sertoli hücresinin apikal sitoplazmasında gömülü kalır, bu sırada gelişen aksonem seminifer tübülün lümenine uzanır. Hücre çekirdeği yüksek oranda yoğunlaşır ve uzar, nükleozomların histon proteinleri küçük bazik peptidler olan protaminler ile yer değiştirir. Flagellumun kuyruk olarak gelişimi devam ederken, proksimalde iyonların karşılıklı yerleşmesiyle oluşan orta parça bölgesi oluşur. Bu bölgede flagellum hareketi için gerekli olan ATP üretilir.

**Olgunlaşma Evresi;** Spermiyogenezisin olgunlaşma evresinde geç spermatitlerden geriye kalan artık sitoplazma ve hücreler arası oluşan köprüler

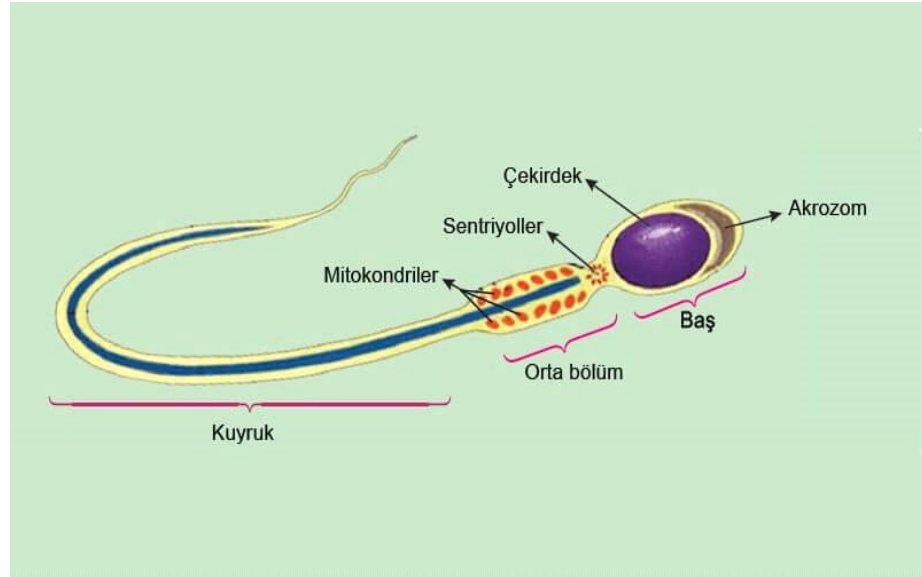
uzaklaştırılır. Olgun ancak işlevsel olmayan spermiyum tübül lümenine salınır. (18,21).

## **2.2. Epididimis bezinde olgunlaşma**

Epididimis bezi baş (kaput), gövde (korpus) ve kuyruk (kauda) olmak üzere üç bölgeye ayrılır (22). Seminifer tübüllerden ayrılan spermiyumlar ve bir miktar testis sıvısı kaput kısmına gelir, testis sıvıları/proteinleri uzaklaştırılır. Spermiler korpus epididimise girerken, motilite ve dölleme yeteneğini kazanmaya başlarlar. Spermiler korpus içerisinden geçerken gelişmeye devam eder ve ejakülasyondan önce depolandıkları kauda bölgesine ulaştıklarında optimum seviyeye ulaşırlar. İnsanlarda bu süreç (2-6 gün), kemirgenlere (10-31 gün) kıyasla daha hızlıdır (23-25). Düşük sıcaklık, androjene bağımlı bir çevre ve lokal ürünler gibi önemli faktörlerin, spermin uzun süreli depolanması (26) ve ileri hareketlilik özelliği kazanabilmesi için epididim içerisinde olması gereklidir (27, 28). İlerleyici hareketliliğin, spermilerin kadın üreme sisteminde yol almasının yanı sıra kumulus oophorus ve zona pellusida da dâhil olmak üzere oosit membranındaki koruyucu bariyere nüfuz etmesinde rol oynadıkları bildirilmiştir (23). Bugüne kadar, kaudada ileri hareketliliğin kazanılmasının altında yatan mekanizmalar tamamen aydınlatılamamıştır (29).

## **2.3. Sperm yapısı**

Spermiler vücuttaki hücrelerin çoğundan daha küçüktür. Aynı zamanda bir sperm hücresinin hacmi dişi yumurtasından 85.000 kere daha küçüktür. Kadınlarda her ay sadece bir oosit ovulasyonla atılırken, erkeklerde her gün yaklaşık 100-300 milyon sperm üretilir. Sperm hücrelerinin yapısı, işlevine göre şekillenmiştir. Sperm ayırt edici bir baş, orta parça ve kuyruk bölgesine sahiptir. Sperm başı, çok az sitoplazma ile birlikte son derece kompakt bir haploid çekirdek içermektedir. Spermin fertilizasyona katılmasında önemli olan lizozomal enzimlerle dolu olan ve akrozom adı verilen yapı sperm başının büyük bir bölümünü bir kep gibi çevreler. Sıkıca paketlenmiş mitokondriler spermin orta parçasında yerleşmiştir. Bu mitokondriyonlar tarafından üretilen ATP, flagelluma enerji sağlayarak sperm hücresinin hareket etmesine olanak sağlar. Spermatogenezin son aşaması boyunca, flagellumun merkezindeki aksial filament, olgunlaşan sperm hücresinin distal sentriyolünden biçimlenir Şekil 2.2 (30).



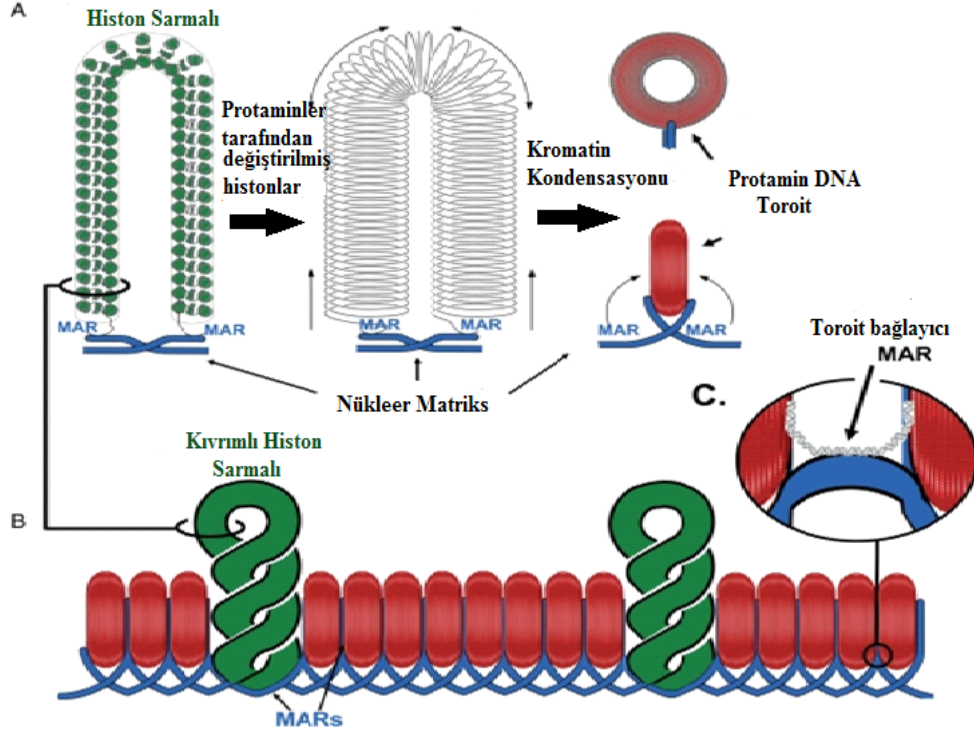
Şekil 2.2. Sperm yapısı (31).

#### 2.4. Sperm DNA bütünlüğü

Gerek klinik gerek deneysel araştırmalarda gerekse yardımcı üreme tekniklerinde doğurganlığı tahmin etmek için morfolojik parametrelerin, motilite yüzdesinin ve sperm konsantrasyonunun değerlendirilmesinde DNA bütünlüğünün incelenmesi çoğunlukla gözden kaçmaktadır (32). Bununla birlikte, son zamanlarda, bu tür hasarın önemi ve erkek infertilitesine ilişkin sonuçları ve gelişim kusurlarıyla ilgili artan bir endişe bulunmaktadır. Doğurganlık çağındaki altı çiftten biri, en yaygın tek faktör olan anormal semen kalitesine sahip olup infertiliteden etkilenmektedir (33). Aslında, artan DNA fragmentasyonu oranı semen kalitesiyle ilişkilendirilmiştir (34). Yapılan çalışmalarda, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), yüksek DNA parçalanma indeksine (DFI) sahip spermiyumlardan üretilen farelerin %14'ünde, anormal davranışlar, malformasyonlar, tümörler ve erken yaşlanma belirtilerinde önemli bir artış olduğu görülmüştür (35). Dolayısıyla, DNA hasar değerlendirilmesi, infertil çiftlerin tedavisinde, gelecek nesillerde çocukların sağlığı ve kanser riskinin belirlenmesinde son derece önemli bir yaklaşımdır (36, 37). Sperm DNA hasarını daha iyi anlamak gereklidir. Üç temel nedene bağlı olarak sperm DNA hasarı sınıflandırılmıştır; anormal kromatin paketlenmesi, reaktif oksijen türleri ve apoptozdur (38).

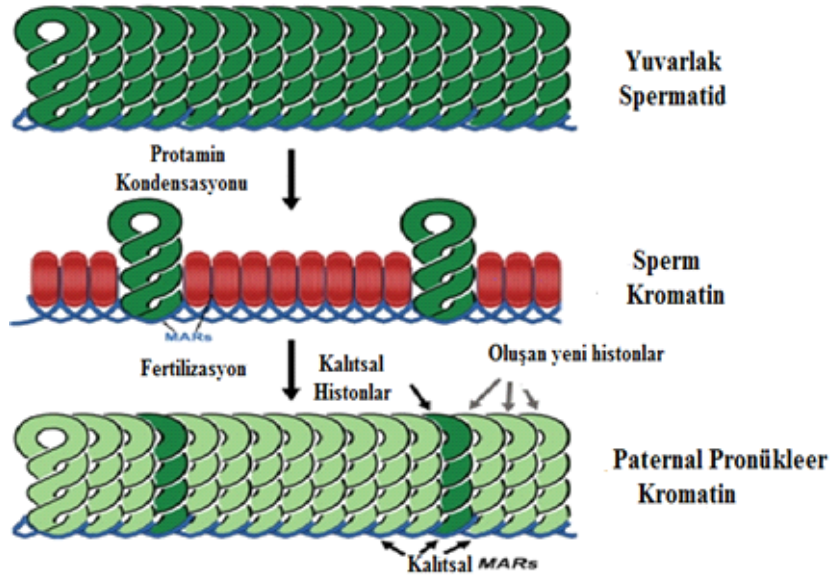
### 2.4.1. Sperm kromatin kondensasyonu

Sperm kromatin kondensasyonunda protamin bağı DNA, histon bağı DNA ve matriks bağlanma bölgeleri (MARs) olmak üzere üç ana yapısal element rol oynar (Şekil2.3).



Şekil 2.3. Sperm kromatin kondensasyonu için üç ana yapısal element şeklindeki gibidir (39).

Spermiyogenez boyunca, histonlar ile protaminler yer değiştirirler, kondense olmuş DNA ve sıkıca paketlenmiş toroitler. Her protamin toroitleri kıvrımlı sarmal alandır. (B) Protamin toroitleri yan yana dizilim gösterirler. Son çalışmalara göre bazı büyük DNA parçaları histonları korur (yeşil sarmal). Bu DNA parçaları protaminler tarafından kondense olmamış sarmal alanların içine girmiş olabilir (C) DNA iplikleri protamin toroitlere ve aynı zamanda histonlara bağlanırlar. Bu alan ise MARs (matriks bağlayıcı bölgeler) olarak adlandırılır.



Şekil 2.4. Embryo tarafından sperm kromatin yapısal elemetlerinin kalıtımı (39).

Erken spermatidlere ait DNA'lar histonlar tarafından paketlenirler (üst kısımdaki koyu yeşil alan) ancak spermiyogenezis süresince, bunların çoğu protaminler ile yer değiştirirler (orta kırmızı renkli alan). Döllenmeden sonra ise protaminler ile oosite ait yeni oluşan histonlar yer değiştirilirler (alt açık yeşil alan). Yeni oluşan pronükleus içindeki değişim sonrasında geride kalan histonların bir kısmı babaya ait olabilir (orta kırmızı alandaki, koyu yeşil alan). Sperm nükleer matriks bağlayıcı bölgeleri (MARs) ise büyük olasılıkla erkek pronükleus içinde korunurlar Şekil 2.4 (39).

#### 2.4.1.1. Protamin bağlı DNA

Protamin bağlı DNA sperm DNA'sının sıkı paketlenmiş toroitlerinde bulunmaktadır. Protaminlerle paketlenmiş DNA, daha sıkı kondensasyona olanak sağlar ve DNA'yı nükleaz sindirimine karşı dirençli yapar.

Protaminler, DNA yapısı için sıkı bir paketlenme sağlamanın yanı sıra hasara karşı koruma da sağlamaktadırlar. Spermatozoon oosite birleştiğinde, protaminlerin histon proteinleriyle tamamen yer değiştirmesi oosit tarafından ilk 4 saat içerisinde gerçekleştirilir. Yeniden yapım süreci protamin toroitlerinin spermi dışı ve erkek üreme kanallarındaki yolculuğu boyunca koruma fonksiyonunu göstermektedir ve embriyonik gelişimde herhangi bir rol almamaktadır (39).

#### 2.4.1.2. Histon bağı DNA

İkinci olarak en yaygın sperm DNA formu yapısı histon bağı DNA'dır. %2 ile %15 arasında oluşan toplam sperm kromatinin farklı memeli türlerindeki histonlara bağlanabilir olmasına rağmen yaklaşık olarak olgun spermiyumun içindeki DNA'nın %4'ü histonlara bağlanır. Histonlar primer olarak gen başlama yeri ile etkileşim halledirler. Bütün gen aileleri, spermiyogenezis ve erken dölleme için hayati olan insan spermiyum histonları ile ilişkilidir (39).

#### 2.4.1.3. Matriks bağlayıcı bölgeler (MARs)

Spermiyumların DNA organizasyonunun üçüncü formu nükleer bağlantı bölgesidir. MARs kromatin sarmalındaki bölgenin proteinli nükleer matriksine bağlı olduğu DNA segmentleridir. MARs her bir protamin toroitinin bağlandığı yere yerleşmişlerdir. Bu rolüyle toroit bağlayıcıları olarak adlandırılırlar. Toroit bağlayıcılar histon içerirler ve nükleaz aktivitesine son derece duyarlıdırlar. Ayrıca DNA ve nükleer matriks arasındaki ilişkiyi sağlarlar. Buna ek olarak MARs döllemeden sonra sperm DNA bütünlüğü için kontrol noktası olarak görev yapmasıyla dikkat çekmektedir (40).

**Anormal Kromatin Paketlenmesinde;** Sperm kromatin kondensasyonundaki değişiklikler sırasında, histonlar geçiş proteinleriyle (TP1 ve TP2) yer değiştirirler. Geçiş proteinlerinin yerini de sperm DNA'sının yoğunlaşmasından ve stabilizasyonundan sorumlu olan protamin (P1, P2) adlı bazik proteinler alır (41). Protaminler, sperm DNA'sı ile kondense yapı oluşturmalarını sağlayan pozitif yüklü uçlardan zengindir. Bu sürecin herhangi bir aşamasında problemler ortaya çıkabilir; bunlar sıklıkla DNA'nın kıvrımlı dölgesel yapı oluşumu ve histon-protamin değişimi sırasında meydana gelmektedir (41). DNA'nın kıvrımlı dölgesel yapı oluşumu topoizomerez II tarafından oluşturulur ve kontrol edilir (42,43). Sonuç olarak bu enzim fonksiyonunu normal gerçekleştiremez ise sperm DNA'larının paketlenmesinde defektler meydana gelebilmektedir.

Son çalışmalar P1/P2 oranının spermin dölleme kabiliyeti için kritik olduğunu göstermektedir. Ayrıca, P2 öncüllerinin bu oranın korunmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. P2 öncesi mRNA translasyonu meydana gelen herhangi bir defektin, anormal sperm morfogenezisine, azalmış sperm hareketliliğine neden olduğu gösterilmiştir (44,45). Anormal derecede yüksek veya düşük P1/P2 oranlarının olması halinde artmış sperm DNA fragmantasyonu, düşük dölleme

oranları, düşük embriyo kalitesi ve düşük gebelik oranları gözlenmiştir (46). Fertilizasyonun gerçekleşmesi için histon protamin değişimi ile DNA'nın ileri derecede paketlenmesi gerekmektedir. Kromatin kondensasyonu ile spermin ilerleyici hareketi için gerekli olan baş yapısının şekillenmesi kolaylaşırken, sperme ait genom oksitlenmekten ve kadın üreme sistemi içerisindeki zararlı moleküllerden korunabilmektedir (47).

#### **2.4.2. Reaktif oksijen türleri (ROS)**

Reaktif oksijen türleri bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip herhangi bir atom veya molekül olarak tanımlanır (48). Reaktif oksijen türleri, serbest radikal sınıfına ait reaktif yükseltgen maddelerdir (49). Bunlar, karşılaştığı her biyokimyasal maddeyle reaksiyona giren son derece kararsız oksidanlardır. Spermlerde serbest radikallerin varlığı McLeod tarafından 50 yıl önce bildirilmesine rağmen, erkek üreme fizyolojisindeki rolünden 1989'da yeniden bahsedilmiştir. Agarwal ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, spermiyumların, plazma zarında nicotinamid adenine dinükleotid fosfat (NADH) oksidaz sistemi ve mitokondri seviyesindeki oksido-redüktaza bağlı nicotinamid adenine dinükleotidi ile ROS üretebildiği tanımlanmıştır (50).

Griveau, düşük konsantrasyonda hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyonunun uyarıldığını bildirmiştir. Nitrik oksit (NO) ve süperoksit ( $O_2^-$ ) gibi diğer reaktif oksijen türlerinin de sperm kapasitasyonuna ve akrozom reaksiyonuna katkısı olduğu rapor edilmiştir. İnsan spermiyumunun normal işlevi için ROS üretilebileceği gösterilmiş olmasına rağmen bazı patolojik koşullarda da ROS üretiminin sperm fonksiyonu üzerinde zararlı etkileri olabilmektedir (51). Bu etki sperm plazma zarında ROS ile indüklenen yağ peroksidasyonuna bağlı gerçekleşmektedir. Buna ek olarak, ROS'un sperm aksonemini, mitokondriyal fonksiyonunu ve DNA, RNA ve proteinlerin sentezini etkileyebileceği bildirilmiştir. Kontrolsüz ve aşırı ROS üretimi infertiliteye yol açan başlıca faktörlerden biri olabilmektedir. Semende aşırı ROS üretiminin nedenleri seminal lökositler ve anormal yapıli spermler olarak tanımlanmıştır. Hidrojen peroksitin semende ROS üretiminin ana kaynağı olduğu tespit edilmiştir (50).

#### **2.4.2.1. Sperm DNA bütünlüğünde ROS hasarının rolü**

DNA fragmantasyonu, erkek infertilitesinin göstergesi olarak bilinmektedir; bazı çalışmalarda sperm kromatin yapısı açısından infertil erkeklerde karşılaştırıldığında, DNA fragmantasyonu indeksinin (DFI) daha yüksek derecede olduğu ölçülmüştür. DNA hasarının alternatif ölçümlerinden birisi olan tek hücre jel elektroforez analizi sonucunda bozulmuş DNA'nın infertilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (52). Birçok çalışma, oksidatif stresin sperm fonksiyonu ve DNA bütünlüğü üzerindeki zararlı etkisini bildirmektedir. Seminal plazmanın antioksidan kapasitesine ek olarak, etkin kromatin yoğunlaşması DNA'nın oksidatif saldırıdan korunması için gereklidir. Anormal kromatin kondensasyonuna sahip spermiyumların seminal plazmada ROS tarafından oksidatif saldırıya uğrama eğiliminin daha fazla olduğu gözlenmiştir (53).

#### **2.4.2.2. Sperm hareketliliğinde ROS hasarının rolü**

Oksidatif stresin sperm hareketini bozduğu bilinmektedir (54-56). Bununla birlikte, hareketlilik mekanizmasının tüm bileşenleri henüz belirlenememiştir. Oksidatif strese bağlı tubulin oksidasyonu farklı hücre tiplerinde gözlenmiştir. Tübülünün daha yüksek katlı protein kompleksleşmesi ve tubulin dimerizasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, sperm hareketliliğinin bozulmasının temelinde oksidatif stresin tubulin yapısını etkilemesi gösterilmektedir (57, 58).

#### **2.4.3. Apoptoz**

Spermatogenez sırasında apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, spermlerin %75'inin tahrip edilmesine ve sperm DNA hasarına neden olur. Germ hücrelerinin aşırı çoğalmasını önleyen erken germ hücrelerinin seçici apoptozu klonal büyümeye neden olur. Bu klonal büyüme hücre yüzey proteini Fas ile spesifik olarak kontrol edilmektedir. Apoptoz mediatörü olan Fas ligandının Fas'a bağlanması ile hücre ölümü oluşmaktadır (59). Apoptoz başlamış DNA hasarına sahip spermlerin bazıları sonradan apoptozdan kaçmaktadır. Bu teori abortif apoptoz olarak bilinir ve diğer araştırmacılar tarafından sorgulanmıştır. Spermiyumların apoptoz kapasitesine sahip olup olmadığı konusunda bazı tartışmalar mevcuttur, çünkü farklılaşmış bu hücreler yeni proteinlerin kontrollü üretimi için gerçek bir kapasiteye sahip değildir (60).

Ayrıca heat shock protein gene (HspA2) ekspresyonu ve p53'ün DNA hasarı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. HspA2'nin ekspresyon seviyeleri, dölleme potansiyeli de dâhil olmak üzere, sperm olgunluğu, DNA bütünlüğü, kromatin olgunluğu, kromozomal anöploidi sıklığı ve sperm fonksiyonuyla ilişkilidir. p53'ün ekspresyonu, apoptotik mekanizma ile ejakülattaki DNA hasarlı spermelerin yok edilmesi için gereklidir (61-63).

## **2.5. Sperm DNA bütünlüğüne özgü testler**

Sperm DNA bütünlüğünü belirlemek için birbirinden farklı mekanizmalar ile çalışan bazı testler geliştirilmiştir.

### **2.5.1. Asidik Anilin mavisi**

Anilin mavisi, sperm çekirdeğinin gevşek kromatinindeki (DNA'daki histonların açılmış genin ortaya çıkmış hali) proteinler için daha fazla afiniteye sahip olan asidik bir boyadır. Bunun nedeni, histonların varlığı ve çekirdekteki proteinin temel gruplarının erişilebilirliğinin artmasıdır. Spermdeki anilin mavisi ile boyanmanın artışı kromatinin gevşek bağlandığını gösterir. Analiz için aydınlık alan mikroskopunun kullanıldığı basit ve ucuz bir yöntemdir.

### **2.5.2. Kromomisin A3 (CMA3)**

CMA3, GC (guanin ve sitozin) bakımından zengin DNA dizileri için spesifik olan bir florokromdur ve protamin ile DNA'nın bağlandığı yerde DNA ile etkileşime girer. Boyamanın derecesi olgun spermiyumun protaminasyon derecesine bağlıdır. Bu nedenle CMA3 boyamasının daha yoğun olması protamin eksikliğini veya anormal kromatin paketlenmesini gösterir. CMA3 boyaması floresan mikroskobu ile incelenmektedir.

### **2.5.3. Toluidin mavisi**

Toluidin mavisi sıkı paketlenmemiş sperm DNA'sının fosfat kalıntılarını ve parçalanmış uçlarını boyayan temel bir boyadır. Boya, lizince zengin histonlarla etkileştiğinde, mor-mavimsi yoğun renk verir, kromatin içindeki protaminlerle etkileşimler sonucu ise soluk mavi boyanır (38).

### **2.5.4. Sperm kromatin yapısı analizi (SCSA)**

SCSA, yaklaşık 30 yıl önce geliştirilmiş olup bugün hakkında en çok bilgi sahibi olunan ve dünyada en yaygın olarak kullanılan sperm DNA hasarını ölçen bir testtir. Daha çok insan spermalarının DNA hasarlarını belirlemek için kullanılsa da hayvan sperm örnekleri için de kullanılmıştır. Bu test ile DNA'yı denatüre eden asit veya sıcaklık ölçülerek anormal paketlenmiş kromatinler tespit edilir (64). Bu testte, semen örnekleri düşük pH'lı bir buffer ile muamele edilir, DNA çift sarmallı yapı daha fazla hasarlanır ve zayıf olarak paketlenmiş kromatinler açığa çıkar. Ardından örnekler akrinin orange ile boyanıp, flow sitometride işleme tabi tutulur. Akrinin orange DNA'nın çift sarmallı yapılarını boyayan metakromatik bir boyadır. Bu boya ile tek sarmallı DNA yapısı yeşil renkli floresan ile bakıldığında kırmızı gözükmektedir (65). Bu test DNA fragmentasyon indeksi olarak ifade edilir ve sperm hücrelerindeki tek sarmallı DNA kırılmalarını ve yüksek DNA boyanabilirliğini gösterir.

### **2.5.5. Terminal deoxynucleotidyl transferase deoksiuridin trifosfatın (dUTP) nick end labeling (TUNEL) analizi**

TUNEL yöntemi ilk kez insan spermelerindeki DNA sarmal kırıklarını belirlemek için Gorczyca ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem DNA kırılmalarını ve bükülmelerini belirlemektedir (66). Deoksiuridin trifosfatın birleşimi floresan mikroskopta ve flow sitometride sayılır ve sonuçlar TUNEL (+) sperm hücrelerinin yüzdesi şeklinde ifade edilir (67). TUNEL analizi tekrar edilebilir ve pahalı sayılmayan bir tekniktir. Ayrıca TUNEL analizinin sonuçları ile SCSA analizinin sonuçları arasında pozitif bir korelasyon olduğu insan spermi üzerine yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (66). Ancak bu yöntemin farklı laboratuvarlarda farklı sonuçlar verebildiği belirtilmiştir (67).

### **2.5.6. Single-cell gel electrophoresis (SCGE) comet analizi**

Bu yöntem nükleer proteinleri çözünmüş özgül bir hücredeki DNA'ya bağlanarak DNA hasarını belirler. Elektroforez, DNA parçalarının merkezden göç edip uzaklaşmasını sağlamaktadır. Lezyon içermeyen çift sarmallı DNA, elektroforezin başında kalır, kıvrılmış tek ya da çift sarmallı kısa DNA parçaları damla şeklinde comet kuyruğu oluşturmak üzere göç ederler. DNA kırılmaları göç eden cometteki sperm hücrelerinin sayısı, aynı zamandaki cometin uzunluğu ve kuyrukta bulunan DNA'nın yüzdesi ölçülerek değerlendirilir. 2 boyutlu comet analizi aynı anda tek ve çift sarmallı DNA kırılmalarına ulaşmayı sağlayarak tek bir sperm hücresi için daha kesin ve kapsamlı bir veri elde edilmesini sağlar. Hem çift hem de tek sarmallı DNA kırıklarını birbirinden ayırabilmek için DNA hasarının potansiyel infertiliteyle ilişki olduğunu göstermektedir. Çift sarmallı DNA kırılmaları genellikle DNA hasarının en genotoksik formu olarak düşünülmektedir. Fertilite üzerinde büyük bir etkisi vardır (60).

### **2.5.7. Sperm chromatin dispersion (SCD)**

Sperm DNA bütünlüğünü belirlemede kullanılan tekniklere eklenen yeni bir tekniktir. Bu yöntem sperm DNA'sının fragmentasyona yatkınlığını belirler. Nükleer proteinlerin denatüre edilip ortadan kaldırılmasına yol açan çekirdekteki nükleotidlerin ve periferik halo kromatinlerinin dağılmasının kontrolü prensibine dayanır (68).

### **2.5.8. Akridin orange (AO)**

Akridin Orange (AO) boyaması, sperm DNA'sının asit kaynaklı denatürasyonuna yatkınlığını ve çift sarmallı DNA ile tek sarmallı DNA fluoresansının arasındaki kaymayı ölçmektedir. Çift sarmallı DNA'ya bağlanan moleküler AO, yeşil floresanları üretirken, bozulmuş DNA agregatı olmuş AO'ya bağlanır ve kırmızı floresan üretir (60).

### **2.5.9. Sperm ROS ölçüm testleri**

**Flow sitometri**, spermde hücre içi ROS'u ölçmek için kullanılabilecek alternatif hassas bir yöntemdir. Her hücredeki floresan miktarını ölçer. Flow sitometri geniş kapsamlı klinik kullanım için pratik olmayan pahalı bir araçtır.

**Nitroblue tetrazolium (NBT) analizi**, ROS seviyelerini tam olarak doğru tahmin edebilen ve potansiyel oksidatif stres kaynaklarını anlamayı sağlayan, uygun

maliyetli bir yöntemdir. Bu testin temeli, spermiyum ya da lökositlerden salınan superoksitle etkileşime girdikten sonra NBT'nin mavi bir pigment olan diformazama dönüştürülmesine dayanmaktadır. Diformazam konsantrasyonu ölçülebilir ve hücre içi ROS konsantrasyonu ile ilişkilendirilebilir.

En sık kullanılan yöntemlerden birisi de **tiyobarbütirik asit (TBA) testi** ile malondialdehit (MDA) seviyesinin ölçülmesidir. Seminal plazma MDA düzeyleri spermden 5-10 kat daha fazladır ve standart spektrofotometreler ile ölçüm yapmak mümkündür. MDA ölçümünün klinik önemi, infertil erkeklerde, seminal ROS seviyeleri, fertil kontrol veya normozoospermik bireylere göre belirgin artış göstermektedir (69, 70). In vitro çalışmalarda, ROS'un neden olduğu sperm hareketi ve DNA bütünlüğünün bozulması ve sperm-oosit füzyonu bozuklukları ile MDA konsantrasyonundaki artış arasında paralellik olduğu gösterilmiştir (71, 72).

**Kemiluminesans testi**, androloji laboratuvarlarında seminal ROS ölçümü için kullanılan en yaygın tekniktir. Bu analiz, hem hücre içi hem de hücre dışı ROS'u ölçer. Doğru sonuçların alınması için semen örnekleri toplandıktan sonra bir saat içinde analiz edilmeli ve en az  $1 \times 10^6$  ml sperm konsantrasyonu içermelidir. Kemilüminesans kullanarak değerlendirilen ROS'un ölçümü oldukça hassastır (73).

## 2.6. Erkek infertilitesi

İnfertilite, WHO 2013 kılavuzuna göre iki yıl süre ile düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrasında çocuk sahibi olamama durumudur. İnfertilite vakalarının %50'sine erkek faktörünün neden olduğu belirtilmiştir (1). Kısırlığın nedeni kadın faktörü, erkek faktörü ya da her ikisi birden olabilir. Günümüzde erkek infertilitesi tanısı, WHO kılavuzuna ve referans değerlerine dayanan yerli örneklemdeki standart semen parametrelerinin mikroskopik olarak değerlendirilmesine dayanmaktadır. Buna dayanarak, bir sperm örneği mililitre başına  $\geq 15$  milyon spermatozoa, spermin %32'sinden fazlasının ilerleyici harekete sahip olduğu ve morfolojik olarak normal formların %4'ü ya da fazlasını, normal (normozoospermik) kabul edilir (74). Bu parametrelerden biri tanımlanan referans değerinin altında ise, örnek anormal ve sırasıyla oligozoospermik, astenozoospermik veya teratozoospermik olarak adlandırılır (düşük konsantrasyon, hareketlilik ve morfoloji değerleri) (Tablo 2.1) (Şekil 2.5) (74,75).

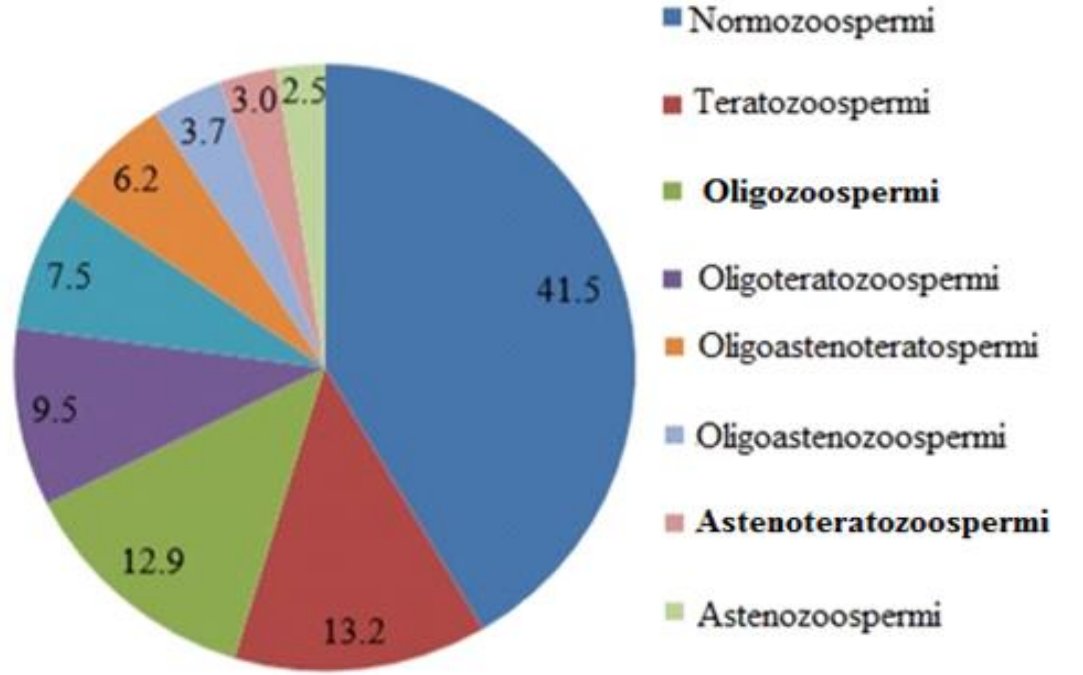
Erkek infertilitesinin bilinen nedenleri; sigara ve alkol kullanımı, madde bağımlılığı, varikosel, kistik fibrozis, enfeksiyon, şeker hastalığı, nörolojik

hastalıklar, obezite, travma sonucu bel omurlarının hasar görmesi vs. gibidir. Bu nedenlerden bağımsız olarak %25 oranda idiyopatik infertilite görülmektedir (2).

**Tablo 2.1.** Sperm kalitesi değerlendirilmesine ait referans değerleri (WHO, 2010) (74)

| Prametreler                      | Referans Değerleri (WHO,2010)  |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Ejakulat Hacmi                   | $\geq 1.5$ ml                  |
| Ejakulat pH                      | $\geq 7.2$                     |
| Toplam Hareketlilik Spem Oranı   | $\geq 40$                      |
| Toplam Sperm Sayısı              | $\geq 39$ milyon               |
| Sperm Konsantrasyonu             | $\geq 15$ milyon /ml           |
| İlerleyici Hareketli Sperm Oranı | $\geq \%32$                    |
| Sperm Morfolojisi*               | $\geq \%4$ normal şekilli      |
| Sperm Canlılığı                  | $\geq \%58$ canlı sperm sayısı |

\*Krugerin sıkı kriteri



**Şekil 2.5.** Yardımcı üreme teknikleri merkezlerinde incelenen semen anormalliklerine ait 552 (%58,5) hastanın yüzde dağılımları (76).

**Tablo 2.2.** Sperm anormalliklerine ait tanımlamalar (74).

| <b>Semen Tipi</b>               | <b>Tanımlama</b>                                                                                                      |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Aspermi</b>                  | Semen miktarının ve sperm sayısının hiç olmaması                                                                      |
| <b>Astenozoospermi</b>          | Progresif hareketli yüzdesinin referans değerinin altında olması                                                      |
| <b>Asteneratozoospermi</b>      | Progresif hareketli yüzdesinin ve normal morfolojinin referans değerinin altında olması                               |
| <b>Azospermi</b>                | Ejekülatta hiç sperm olmaması                                                                                         |
| <b>Kriptoospermi</b>            | Santrifüj sonrası ilk değerlendirmeye göre ejekülatta bir milyondan daha az sayıda sperm olması                       |
| <b>Hemospermi</b>               | Ejekülatta eritrosit bulunması                                                                                        |
| <b>Lökospermi</b>               | Ejekülatta lökosit bulunması                                                                                          |
| <b>Nekrozoospermi</b>           | Ejekülattaki canlı sperm yüzdesinin referans değerinin altında olması ve hareketsiz/ölü sperm sayısının yüksek olması |
| <b>Normozoospermi</b>           | Normal sperm sayısı, progresif hareketli yüzdesi ve normal morfolojinin referans değerlerinin üstünde olması          |
| <b>Oligoastenozoospermi</b>     | Progresif hareketli sperm sayısı ve toplam sperm sayısının 20 milyondan az olması                                     |
| <b>Oligoasteneratozoospermi</b> | Toplam sperm sayısı, progresif hareketlilik ve normal morfoloji referans değerlerinin altında olması                  |
| <b>Oligoteratozoospermi</b>     | Toplam sperm sayısının ve normal morfoloji referans değerlerinin altında olması                                       |
| <b>Oligozoospermi</b>           | Toplam sperm sayısının referans değerinin altında olması                                                              |
| <b>Tetrazoospermi</b>           | Normal morfoloji yüzdesinin referans değerinin altında olması                                                         |

### **2.6.1. Astenozoospermi**

Dünya Sağlık Örgütü 2010 kılavuzunda astenozoospermiyi; a (+4) ve b (+3) sperm ilerleyici hareketliliğinin %32 referans değerinin altında olması olarak tanımlamıştır (74).

Spermiyum, oositle buluşmak ve döllenmek için uzun mesafeler kat eder; bu nedenle, normal döllenme için sperm motilitesi ön şarttır ve sperm motilitesi erkek fertilitésinin en önemli belirleyicilerinden biridir (77, 78). Erkek infertilitesinin en yaygın sebeplerinden biri olan astenozoospermi, ultrastrüktürel anormallikler, fonksiyonel yetersizlikler, anormal semen likefaksiyonu, antisperm antikorları, seminal plazmanın zararlı etkileri, varikosel, endokrin anormallikler, fiziksel ve kimyasal faktörler gibi çeşitli nedenlere bağlı azalmış sperm motilitesi ile karakterizedir (79). Sperm hareketliliği, substratların enerji oksidasyonu, plazma zarından sinyal iletiminde yer alan proteinlerin fosforilasyonu ve kimyasal enerjinin aksonemde mekanik enerjiye dönüştürülmesi gibi içeren karmaşık moleküler olayların sonucudur. ATP, sperme hareket enerjisi verir. ATP üretimi, flagellumun çeşitli bölgelerinde mitokondriyal solunum ve glikolizden elde edilir. Bazı çalışmalar, sperm motilitesi ile solunum zinciri enzimatik aktiviteleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir ki, fonksiyonel mitokondriyal değişimlerin astenozoosperminin nedeni olabileceği bildirilmiştir (80).

### **2.6.2. İdiyopatik erkek infertilitesi**

İdiyopatik infertilite, infertil çiftlerde yapılan temel değerlendirmede rutin spermiyogram, ovulasyon testleri, kavite ve tubalarda patoloji olmadığını gösteren histerosalpingogram gibi parametrelerde herhangi bir patolojik bulgunun olmaması durumudur (2, 3). İdiyopatik infertilitenin etiyolojisi tam olarak açıklanamamasına karşın genetik, çevresel ve hormonal parametreleri içeren multifaktöriyel bir etkisinin olduğu öngörülmektedir (2). Kaynak taramalarına göre bu hastalara genellikle yardımcı üreme yöntemleri (YÜT) önerilmektedir (4). İdiyopatik infertilitenin moleküler temeli, multifaktöriyel etiyolojisi tam olarak tanımlanmamış olsa da oksidatif stres altta yatan mekanizmalardan biri olarak öne çıkmaktadır. Reaktif oksijen türleri, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi normal sperm fonksiyonları için gerekli olmasının yanı sıra, bu faktörlerin aşırı olması sperm DNA bütünlüğü ve işlevinin kaybına neden olmaktadır (81). Bunun aksine oksidatif stresin

idiyopatik infertilitenin etiyolojisinde yer almadığını belirten çalışmalar da mevcuttur (8).

### **2.6.3. İdiyopatik astenozoospermik (İDA) infertilite**

Erkek infertilitesinin en yaygın sebeplerinden biri olan astenozoospermi ultrastrüktürel anormallikler, anormal semen likefaksiyonları, anti-sperm antikorları gibi çeşitli faktörlerden dolayı azalmış sperm motilitesi ile ilişkilidir. İdiyopatik astenozoospermi olarak adlandırılan bulgulara sperm konsantrasyonu normaldir, ancak progresif motilitesi olan spermiyum oranı düşük olup hiçbir nedene bağlı değildir. (82). Bununla birlikte idiyopatik astenozoospermi tanısı bulunan bazı olguların rutin klinik muayene bulgularında kesin bir neden bulunamamıştır (83).

### **2.6.4. İdiyopatik olmayan astenozoospermik (NİDA) infertilite**

İdiyopatik olmayan astenozoospermi, varikosel, kriptorşidizm, diabetes mellitus, yaşam biçimine bağlı faktörler, enfeksiyon, genetik, sperm disfonksiyonu, gibi faktörlerden kaynaklanabilen NİDA infertil erkeklerin %24'ünde görülmektedir (84-88).

#### **2.6.4.1. Varikosel**

Varikosellerin veya pampiniform pleksusta anormal olarak genişleyen damarların, infertil erkeklerde daha yaygın görüldüğü ve semen analizlerinde anormallikler olduğu gözlenmiştir (89, 90). Klinik varikoseli bulunan subfertil erkeklerin yaklaşık %19'unda sperm hareketliliğinde izole anormallikler görülmüştür. Boman ve arkadaşları, toplam 118 infertil erkeğin varikoselle ilişkili astenozoospermi gösterdiğini bildirmiştir. Varikosel tamiri, toplam hareketli sperm sayısında anlamlı artışlara neden olmuştur. İlginç olarak, tedavi almayanların, IVF/ICSI'yı yüksek oranda tercih ettiği gebelik oranlarında herhangi bir farklılık kaydedilmemiştir (91). Benzer şekilde Schatte ve ark., mikrocerrahi inguinal varikoselektomi uygulanan ve postoperatif olarak sperm parametrelerindeki artış izlenen klinik varikoselli 61 subfertil erkek üzerinde araştırma yapmışlardır. Çalışma, normal sperm konsantrasyonlarına sahip erkekleri içermekte ve motilitede ameliyat öncesinde %39, ameliyat sonrası %45'e kadar, anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir ( $p \leq 0,008$ ). Bu gözlem, Schlesinger'in daha önce 12 çalışmadan elde ettiği sonuçları desteklemektedir (92).

#### 2.6.4.2. Kriptorşidizm

Testislerin doğru anatomik yol boyunca normal konumuna inemediği konjenital ve genetik hastalıklardan kaynaklanan bir durum olan kriptorşidizm erkeklerin fertilitelerini de etkileyebilir. Dört bin kişiden biri bu durumdan etkilenmekte ve bu durumun etkisi oligospermi, astenozoospermi ve obstrüktif olmayan azospermiyi içermektedir (93).

#### 2.6.4.3. Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes mellitus (DM) oranı dünyada artmaktadır. 2025 yılına kadar 300 milyondan fazla kişinin diyabetik olacağı tahmin edilmektedir (94). DM, erkek cinsel işlev bozukluğunun bilinen bir nedeni olmasına karşın, spermatogenezin endokrin kontrolünü ve spermatogenez sürecini de etkileyebilir (95, 96). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda diyabetik erkek hayvanlar ile çiftleştirilen dişilerde doğurganlığın belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Genç erkeklerde artan diyabet oranı, üreme sağlığı üzerinde önemli negatif etkilere sahiptir. Tekrarlayan düşüklerin erken gebelik kaybının tekrarlanması riskinin anormal sperm karakterleriyle arttığı gösterilmiştir (97).

Yapılan bir çalışmada, Tip 1 DM'li (DM1) hastalarda spermelerde azalmış ileri motilitenin ve anormal spermiyumun mitokondriyal fonksiyonunu etkilediği düşünülmektedir. Bu parametreler açlık glisemisi ile anlamlı olarak ilişkilidir ve mitokondriyal disfonksiyonun ilk kez olması dikkat çekmektedir. Bu bulgular, son zamanlarda DM1'li erkeklerde infertiliteyi düşündürmektedir. (98).

#### 2.6.4.4. Yaşam biçimi

Belli yaşam tarzı faktörleri son zamanlarda erkek infertilitesiyle ilişkilendirilmiştir ve bunlar obezite, sigara içimi, alkol kullanımı, stresli faaliyetler, ısı ve elektromanyetik radyasyona maruz kalma ve madde bağımlılığı ile ilgilidir.

**Obezite;** erkeklerde bilindik bir subfertiliteye neden olmaktadır (99). Obez erkeklerde sperm konsantrasyonunda, motilitede ve sperm sayısında belirgin azalmalar bildirilmiştir. Obezite ile ilişkili infertilitenin tam mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ancak obez erkeklerin hormonal olarak belirgin bir değişikliğe sahip olduğu bilinmektedir.

**Alkol;** doğrudan testiküler ve Leydig hücre toksini olarak görülmüştür (100). Etanol metabolizmasının bir yan ürünü olan asetaldehid, protein, lipid ve DNA da

moleküler hasara neden olarak özellikle ROS üretimine etki etmektedir. Saalu, üreme yaşındaki alkolik erkeklerle yaptığı çalışmada serumdaki lipid peroksidaz yan ürünlerinde belirgin bir artış ve antioksidanlarda azalma olduğunu tespit etmiştir. Bu sonuç, testislerde alkol tüketimi ile oksidatif stres arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Alkol kullanan erkeklerde alkol kullanmayan erkeklere göre daha fazla infertilite olduğu gözlemlendiği bildirilmektedir (101).

Ayrıca diğer bir çalışmada, alkol kullanan erkeklerde sperm konsantrasyonunda ve hacminde bir azalma olmasının yanı sıra hareketsiz sperm sayısında da belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir (102). Alkol kullanımı, sperm hacmi, sperm sayısı, motilite ve morfolojik olarak normal sperm sayısının önemli derecede azalmasına neden olan düşük testosteron ve değişmiş folikül uyarıcı hormon (FSH) ve Lutein Hormon (LH) seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir (103).

**Sigara;** Birkaç yolla fertilitiyi olumsuz yönde etkileyen alkaloidler, nitrosaminler ve inorganik moleküller de dâhil olmak üzere 7000'den fazla kimyasal bileşik içeren sigara tüketiminin semen üzerinde oldukça fazla olumsuz etkisi bulunmaktadır. Birçok kimyasal maddenin sigara içenlerin semeninde ROS ve antioksidanlar arasında bir dengesizlik oluşturduğu gösterilmiştir. Sigara içenlerin semen örneklerinde lökosit konsantrasyonlarında ve ROS düzeylerinde artış belirlenmiştir. Hareketli silya ve flagellanın temel yapısal organı olan aksonem, mikrotübüllerden oluşmaktadır. Sigara içenlerde aksonemal mikrotübüllerin hem miktarı hem de konumlanmasının varyasyonları tanımlanmıştır (73). Reina ve ark.'nın yaptığı bir çalışma, sigara içenlerin semen örneklerinde, içmeyenlere kıyasla düşük sperm konsantrasyonuna, zayıf sperm motilitesine ve anormal sperm morfolojisine rastlanmaktadır (104). Yine bir başka çalışmada, hastaların seminal sıvısında daha düşük bir sperm penetrasyon testi skoru ve daha fazla sayıda lökosit saptanmıştır. Shen ve ark., hücrelerdeki DNA hasarının da sigara içenlerde sigara içmeyenlere kıyasla yaygın olduğu rapor edilmiştir (105).

Fertilizasyon için en önemli biyolojik aktivitelerden biri de sperm motilitesidir. Bir çalışmada, aksonemin ultrayapısal olarak değerlendirilmesi sonucunda, sigara içenlerin %99'unda ve sigara içmeyenlerin %26'sında sapmalar ortaya konulmuştur. Normal aksonem yapısındaki sigara kaynaklı değişiklikler, sigara içenlerde görülen sperm motilite patolojilerine neden olmakta ve flagellar hareketleri bozmaktadır. Kreatin kinaz, spermatozoa gibi büyük miktarda enerji

ihtiyacı olan hücreler tarafından eksprese edilen bir enzimdir. Ghaffari ve Rostami, spermdeki kreatin kinaz aktivitesinin sigara içenlerde azaldığını ve sperm hareketliliğini etkilediğini bildirmiştir. Astenozoospermi hastalarında sigara içimi önemli bir role sahiptir (106).

**Enfeksiyonlar;** gelişmekte olan ülkelerde erkek üreme sistemindeki enfeksiyonlar başlıca infertilite nedeni olarak gösterilmiştir (Geelhoed ve ark., 2002, Ombelet ve ark., 2008). İdrar yolu enfeksiyonları hem erkeklerde hem de kadınlarda infertiliteye neden olmaktadır. *Ureaplasma urealyticum*, *Enterococcus faecalis* gibi mikroorganizmalar, *Staphylococcus aureus*, *Escherica coli*, *Chlamydia trachomartitis* inflamasyona neden olur (107). Birçok çalışmada, enfeksiyonların spermilerin hareketliliğini etkilediği bildirilmektedir (108-110). Erkek hastaların yaklaşık % 11'inde görülen infertiliteye sebep olan bir diğer faktör seminal kanal enfeksiyonudur. Semende lökositlerin varlığı söz konusudur ve lökositospermi olarak da bilinir. Astenozoospermi sıklıkla enfeksiyonla beraber oluşan lökositlerin varlığı ile ilişkilidir. Bununla birlikte astenozoospermi ile lököspermi arasındaki ilişki büyük oranda keşfedilmemiştir (111).

**Stres;** genellikle, üreme sağlığını olumsuz yönde etkileyebilir. Ancak çalışmalar, bir erkeğin günlük hayatta psikolojik stresinin semen kalitesine etkisi olmadığını göstermiştir (112).

**İmmunolojik faktörler;** hem fertil hem de infertil erkeklerin semeninde sperm antikorları olabilmektedir, ancak hareketli spermiyumların %50 veya daha fazlası antikorla kaplandığında erkek infertilitesinin immünolojik nedeni olarak tanımlanabilir (113). İnfertil erkeklerin %3-7'sinde sperm antikorları bulunur ve bu antikorlar önceden vazektomi, genital yol enfeksiyonu ve testiküler yaralanma veya torsiyon gibi patolojilere sahip bazı erkeklerde sperm fonksiyonunu bozabilir ve kısırılığa neden olabilir (114).

**İlaçlar;** erkeklerin cinsel işlevlerini etkileyebilecek başlıca ilaç grupları madde bağımlılığı yapan ilaçlar, santral sinir sistemi depresanları, antihipertansif ilaçlar, antikolinerjik ve psikoterapötiklerdir (115).

**Çevresel toksinler;** tutkal, uçucu organik çözücüler, silikonlar, fiziksel ajanlar, kimyasal tozlar ve böcek ilaçları gibi toksinlere maruz kalma erkek infertilitesine neden olabilecek faktörlerden bazılarıdır (116). Yüksek sıcaklıktaki ve

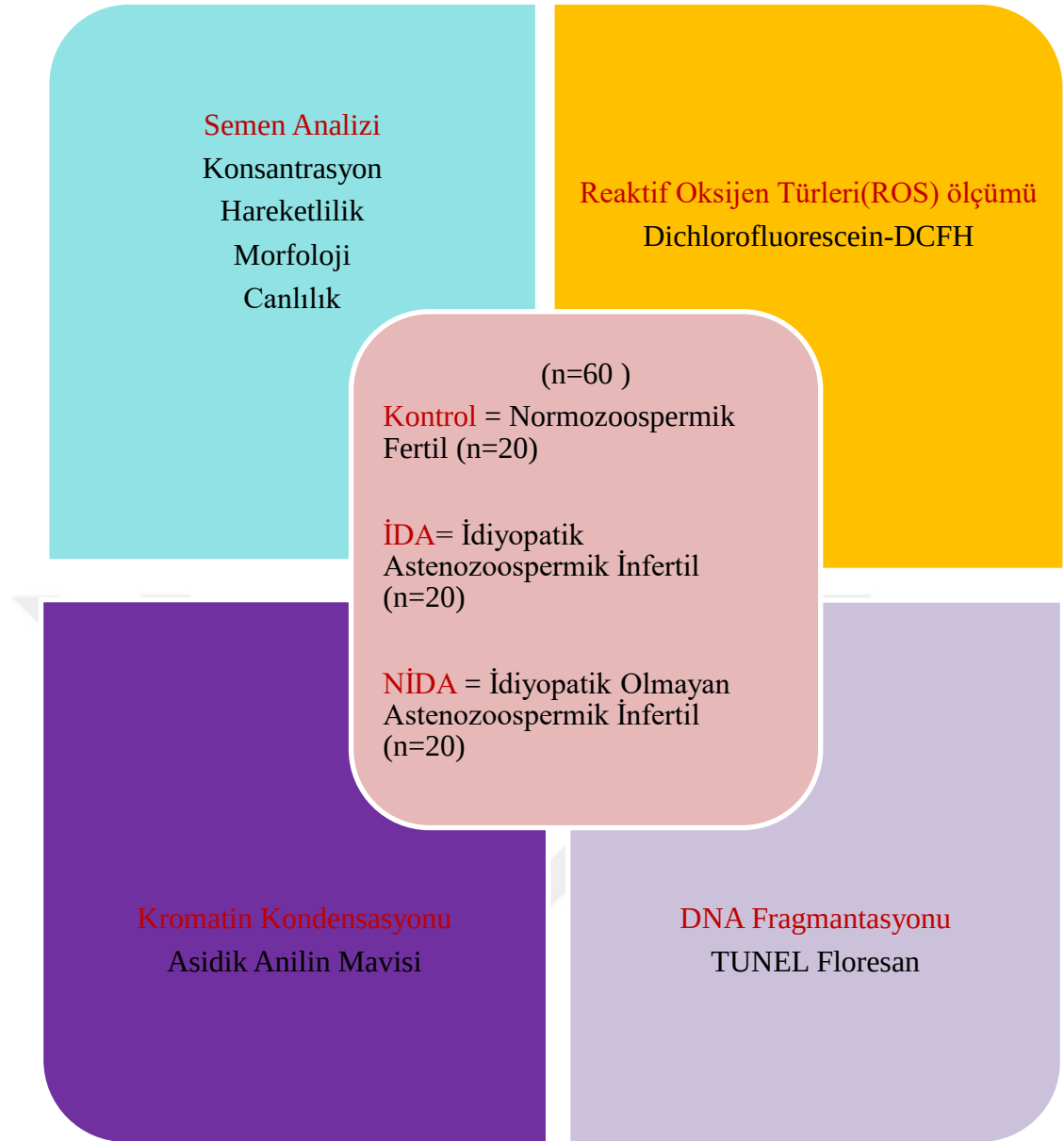
uzun saatler çalışan erkeklerin anormal sperm parametrelerine sahip olma riski daha yüksektir (117).

**Elektromanyetizma;** ultraviyole, görünür ışık, kızılötesi, mikrodalgalar, radyasyon dalgaları ve statik alanların bulunduğu her türlü elektromanyetik radyasyona karşılık gelir. Cep telefonları tarafından yayılan elektromanyetik radyasyonun, insan sperm hareketliliğini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Cep telefonlarının kullanımı ve cep telefonlarına günlük maruz kalma süresinin artması, sperm sayısını, motilitesini, yaşayabilirliğini ve normal morfolojiyi bozmaktadır. Cep telefonlarından yayılan elektromanyetik dalgalar, insan sperminde oksidatif strese neden olabilmektedir (118).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurul onayı (2016/93 karar) alınan çalışma için, 01.02.2017-15.06.2017 tarihleri arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Üroloji Kliniğinden Biyokimya Laboratuvarına infertilite nedeni ile yönlendirilen erkek hastalara ait semen örnekleri kullanıldı. Bilgilendirme formunu imzalayan gönüllü hastalar çalışmaya dâhil edildi. Üç günlük cinsel perhiz sonrası hastaların semen örnekleri steril kaplara alındı. Örnekler likefiye olması için 37°C'lik ısıtıcı tablada 20-30 dakika kadar bekletildi. Hastalara ait spermiyogram değerlendirmeleri Dünya Sağlık Örgütü laboratuvar kılavuzuna uygun olarak yapıldı. Değerlendirmelere göre 60 hastaya ait olan semen örnekleri; 20 normozoospermik fertil (Kontrol), 20 idiyopatik astenozoospermik infertil (İDA), 20 idiyopatik olmayan astenozoospermik infertil (NİDA) olacak şekilde gruplara ayrıldı (Şekil 3.1). Gruplara ait hasta tayini ise Tablo 3.1'e göre belirlendi. Gruplara ROS ölçümü için 2,7-dichloro dihydrofluorescein asetat (DCFH2-DA) kullanılarak çözdürülen spermelerin flow sitometrik analizi yapıldı. Sperm DNA bütünlüğünü belirlemek için asidik anilin mavisi boyaması ve TUNEL floresan boyaması yapıldı. Ayrıca her örnek için GM501 SpemMobil ile canlılık testi ve sonrasında semen örneklerine SpermCryo™ All-round ile vitrifikasyon uygulandı.



**Şekil 3.1.** Hasta grupları ve yapılan analizlere ait deney düzeneği

**Tablo 3.1.** Kontrol, İDA ve NİDA grubu tayini için kullanılan anket formu.

|                                                                                                                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>GÖNÜLLÜNÜN;</b><br><b>1. Yaşı:</b><br><b>2. Evlilik Süresi:</b>                                                                            |
| <b>Tarih:</b>                                                                                                                                 |
| <b>İmza:</b>                                                                                                                                  |
| Çalışmanın adı: “İdiyopatik ve İdiyopatik Olmayan Astenozoospermik İnfertil Hastalarda Sperm DNA Bütünlüğü ve Oksidatif Hasarın İncelenmesi ” |
| 1) Sigara kullanıyorum. Evet( ) Hayır ( )                                                                                                     |
| Kullanıyorsanız kaç yıl ve miktarı? .....                                                                                                     |
| 2) Alkol kullanıyorum. Evet( ) Hayır ( )                                                                                                      |
| Kullanıyorsanız kaç yıl ve miktarı? .....                                                                                                     |
| 3) Herhangi bir madde bağımlılığınız var mı? Evet( ) Hayır ( )                                                                                |
| 4) İlaç kullanıyorum. Evet ( ) Hayır ( )                                                                                                      |
| Kullanıyorsanız ne kadar süreyle?                                                                                                             |
| 5) Kronik bir hastalığınız var mı? Evet ( ) Hayır ( )                                                                                         |
| .....                                                                                                                                         |
| 6) Aşağıdaki hastalıklardan herhangi biri var mı?                                                                                             |
| a) Varikosel b) Şeker hastalığı c) Kistik fibrozis d ) Bel omuru hasarı e) Polikistik böbrek f) Diğer .....                                   |
| 7) Ailenizde infertil olan (çocuk sahibi olamayan ) kişi var mı ? Evet ( ) Hayır ( )                                                          |
| Yakınlığı .....                                                                                                                               |
| Kişi sayısı .....                                                                                                                             |
| 8) Son üç ayda enfeksiyon geçirdiniz mi? Evet( ) Hayır ( )                                                                                    |

### **3.1. Semen analizi**

#### **3.1.1. Konsantrasyon**

Sperm konsantrasyon değeriendirilmesi için derinliği 0.01 mm ve üst lamelinde 100 kare bölmeye sahip Makler sayma kamarası kullanıldı. Makler kamarasının ortasına 1 µl semen damlatılıp 100 kareli lamelin üst ve alt 10 karesinde yer alan sperm sayısı x20'lik büyültmede incelenerek hesaplandı. Toplam sayı 2'ye bölünerek elde edilen sperm sayısı milyon (M) ile çarpıldı. Sperm konsantrasyonu 15 M/ml üzerinde olan hastalara ait semen örnekleri çalışmaya dâhil edildi.

#### **3.1.2. Hareketlilik**

Hareketlilik değeriendirilmesi için hastalara ait sperm örneklerinden 20 µl lam üzerine damlatılarak lamel ile kapatıldı, oda sıcaklığında x20'lik objektif büyültmede 4-5 farklı alan incelenerek yaklaşık olarak 200 sperm sayıldı.

Dünya Sağlık Örgütüünün kriterlerine göre semen örnekleri;

- +4 (a) İleri hızlı hareketli
- +3 (b) İleri yavaş hareketli
- +2 (c) Yerinde hareketli
- +1 (d) Hareketsiz olarak sınıflandırılmaktadır.

Hızlı ileri hareketli sperm saniyede 25 µm'lik bir yol kat etmesi gereklidir. Toplam hareketli sperm yüzdesi, ileri hareketli ve yerinde hareketli toplamının tüm sperm sayısına oranı ile çözümlendi. WHO kriterlerine göre astenozoospermik hasta tayini a+b değeri %32'den az olan hastalar dikkate alınarak çalışmaya dâhil edildi.

### **3.1.3. Sperm canlılık testi işlemi (GM501 SpermMobil )**

**GM501 SpermMobil** yardımıyla üreme teknikleri için kullanılan hareketsiz ancak canlı olan spermilere hareket kazandırmak için kullanılan bir solüsyondur. Teofilin içeren bu solüsyon aynı zamanda canlılık testleri için de kullanılmaktadır. Teofilin hücre içi cAMP miktarına etki ederek sperm hareketliliğini artırmaktadır (2).

1. Sperm aktivasyonunun gerçekleşebilmesi için sperm hazırlama medyumunu olan Petri- dish içerisine GM501 SpermMobil'den 2.0 µl ve sperm içeren damlacığa yaklaşık 30-40 µl fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) eklendi (PBS 1:20 oranında olacak şekilde hazırlandı).
2. Prosedüre uymak koşuluyla GM501 SpemMobil solüsyonu, spermilerin aspire olduğu tarafın tam tersine doğru eklendi. Sonrasında 10-15 dakika kadar beklendi.
3. Son olarak Petri Dish 37°C'lik ısı tablası üzerine alındı ve canlılık testi değerlendirilmesi için her bir örnek makler kamerasında ayrı ayrı değerlendirildi.
4. Çalışmamızda GM501 SpermMobil (GYNEMED MediaLine, product no. 4 GM501 SMOBIL5) kullanıldı.

#### **3.1.3.1. PBS ( Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi ) hazırlanışı**

1. 500 ml PBS (Thermo Fisher Scientific) çözeltisi hazırlamak için 25 ml PBS ve 475 ml distile sudan ilave edilerek karıştırılır. (1:20 oranında)

#### **3.1.4. Sperm morfolojisi**

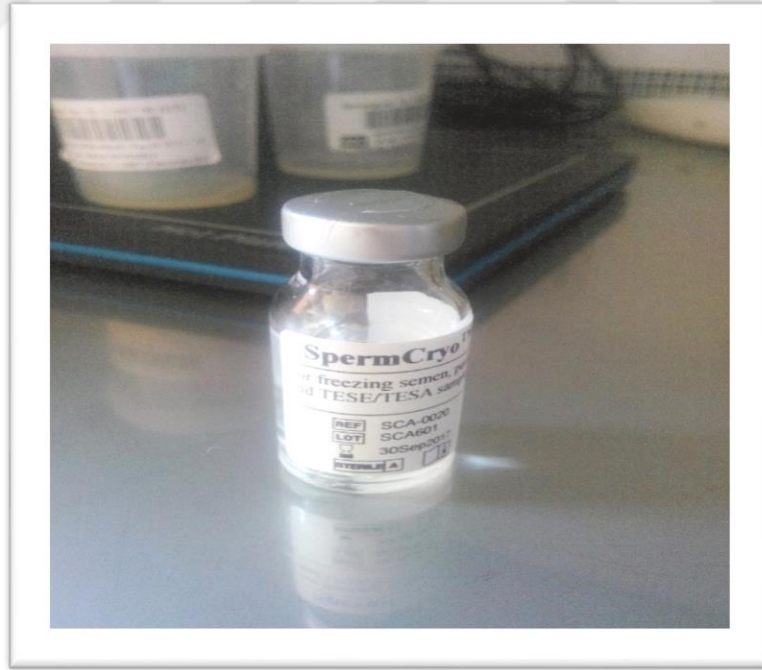
WHO 2010 kılavuzuna göre sperm morfolojisi değerlendirildi. Değerlendirme sonrası normal sperm morfolojisi %3-4 üzerinde olan hasta grupları çalışmaya dâhil edildi.

### 3.2. Spermin vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması işlemi

1. Semen örnekleri 1200 devirde 5 dk santifiruj edildi.
2. Supernatant atılıp, geriye kalan pellet (sediment) sperm yıkama medyumuna olan PBS eklenerek yıkandı.
3. SpermCryo™ All-round (product no.SPCA-0020, Denmark) prosedüründeki tabloya göre her bir hasta örneği için 0,8 ml yıkanmış spermden, 0,27 ml ise SpermCryo™ solüsyonundan alınarak 1 ml'lik ependorflara konuldu (Şekil 3.2).
4. Dikkatlice pipetaj yapıldıktan sonra -80°C'de saklanmak üzere donduruldu.

Yıkanan spermelerden 0,20 ml alınarak yayma preparatları hazırlandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopik olarak Anilin mavisi ile boyanmak üzere ve floresan mikroskopik olarak TUNEL boyaması için ayrıldı.

Sonrasında 37°'de çözündürülen örnekler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma hastanesinin Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KOGEM)'de flow sitometrik analiz yapılarak değerlendirildi.



Şekil 3.2. Spermilerin dondurulması için SpermCryo™ All-round vitrifikasyon solüsyonu

### **3.3. Asidik Anilin mavisini boyaması**

1. İlk olarak fosfatlı tampon çözeltisi hazırlandı. 1 lt. distile suya 10 adet hazırlanmış tabletlerden atıldı. Bu hazırlanan solüsyonun pH'ı 7,2'ye ayarlandı.
2. Anilin mavisinden 5 gr alınarak 100 ml PBS ile karıştırıldı. Bu boya çözeltisi 100°C'de kaynatılınca kadar ısıtıldı. Kaynadıktan sonra soğumaya bırakıldı. Daha sonra bu karışım filtre kâğıdı ile süzülerek 2 ay süre ile muhafaza edildi.
3. Boyanın pH'ı %100'lük asetik asitle titre edilerek 3,5'e getirildi.
4. %25'lik hazır gluteraldehitden 12 ml alınıp 100 ml'ye PBS ile karıştırılarak tamamlandı, %3'lük gluteraldehit elde edildi.
5. Bu üç solüsyon hazırlandıktan sonra boyanacak spermlerin hazırlanmasına geçildi.
6. 1200 devirde 5 dk santrifüj sonrası PBS ile yıkanan ejakülat lamın üzerine ince yayma şeklinde yayıldı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı.
7. Kuruyan preparat 30 dk süre ile % 3'lük gluteraldehit ile fiske edildi.
8. 8- 10 dk pH 3,5 olan anilin mavisini içinde bekletildi.
9. 2 kez PBS de yıkandı ve kurutma kâğıdı ile iyice kurutuldu.
10. Mikroskopta x100 objektif ile çeşitli alanlardan iyi yapıya sahip 100 adet sperm seçilerek pozitif ve negatif şeklinde skorlandı.

#### **3.3.1. Sperm kromatin kondensasyonunun değerlendirilmesi**

Işık mikroskopun x100'lik objektif büyültmesinde incelenen örneklerde, anilin mavisini ile normal kromatin kondensasyonuna sahip sperm hücreleri açık mavi (negatif) boyanırken, anormal kromatin kondensasyonuna sahip sperm hücreleri koyu mavi (pozitif) olarak tespit edildi. Sperm oranı hesaplanırken her bir preparattaki 200 sperm sayısına bakıldı. Anilin boyaması ile koyu boyanan spermler kromatin kondensasyon defektli olarak tanımlandı.

### **3.4. TUNEL Floresan boyama**

Çalışmada In situ cell death detection kit, fluorescein (Roche, Catalog No. 11 684 795 910, Germany) kullanıldı. Boyama öncesi taze hazırlanan preparatlar %4'lük paraformaldehit solüsyonu ile tespit edildi.

#### **3.4.1. %4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu hazırlanması (100 ml)**

1. Çeker ocakta 4,0 gram toz paraformaldehit tartılarak cam şişe içerisine konuldu.
2. Cam mezür ile 100 ml PBS ölçüldü ve kapaklı cam şişe içerisine konuldu.

3. Hazırlanan solüsyon içerisine 100 µl 10 M NaOH eklendi. Hazırlanan solüsyon, manyetik bir karıştırıcı ile 60°C’de çözülünceye dek karıştırıldı.
4. Oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. pH’sı 7,4 olarak ayarlandı. +4°C’de saklandı.

#### **3.4.2. %0,1 Triton X-100 ile permeabilizasyon solüsyonu hazırlanması**

1. Öncelikle 10 kat distile su ile seyreltilen %0,1’lik sodyum sitrat solüsyonu hazırlandı.
2. %0,1’lik Triton X-100 ve seyreltilmiş sodyum sitrat buffer ile karıştırılarak permeabilizasyon solüsyonu hazırlandı.

#### **3.4.3. TUNEL karışım solüsyonu**

Vial 1 (enzim solüsyonu) solüsyonundan 50 µl ve vial 2 (label solüsyonu) solüsyonundan ise 450 µl alınarak TUNEL karışım solüsyonu hazırlandı. Her bir örneğe ise 50 µl olacak şekilde damlatıldı.

#### **3.4.4. Floresan boyama basamakları**

1. Fiksasyon için yayma preparatları %4’lük paraformaldehit (pH: 7,4) ile 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
2. PBS ile üç kez yıkandı. Pap-Pen kalem ile her bir preparat işaretlendi.
3. Permeabilizasyon solüsyonu (%0,1 Triton X-100) ile 2 dakika buz üzerinde inkübe edildi.
4. PBS ile üç kez yıkandı.
5. 50 µl kadar TUNELkarışım solüsyonundan damlatıldı. Sonrasında işaretli alanların üzeri parafilm ile kapatıldı ve 1 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi.
6. Örnekler PBS ile üç kez yıkandı.
7. Örnekler floresan mikroskopunda 450-500 nm ve 515-565 nm yeşil dalga boyu ışığında incelenerek sayımı yapıldı.

#### **3.4.5. TUNEL Floresan boyama yöntemi ile DNA fragmentasyonunun incelenmesi**

Sperm örnekleri x20’lik objektif büyültmesinde incelendi. Normal hücre başına sahip spermiler soluk yeşil floresan boyanırken apoptotik hücre başına sahip spermiler parlak yeşil floresan boyama gösterdi. Yeşil floresan boyanmış spermiler TUNEL pozitif (+) olarak tanımlandı. Sperm oranı hesaplanırken her bir örnekten 200 tane sperm değerlendirildi. TUNEL (+) boyanan spermiler DNA

fragmentasyonlu olarak tanımlandı. Boyanma sonrası değerlendirme KOGEM biriminde yapıldı.

### **3.5. Reaktif oksijen türleri (ROS ) oluşumu etkisi**

Akışkan sistemlerde, ROS oluşum etkisi Dichlorofluorescein (DCFH) ile analiz edilmektedir. DCFH'nin diasetat formu serbestçe hücre zarından geçebilmektedir. DCFH2-DA enzimatik olarak hidrolize uğrayarak floresan yeteneği olmayan DCFH'ye dönüşür. DCFH ise ROS ile karşılaştığında DCF'ye okside olmakta ve floresan (yeşil) yeteneği kazanmaktadır (17, 119).

#### **3.5.1. DCFH-DA/PI ile flow sitometrik boyama**

Her gruba ait dondurulmuş sperm örnekleri 37°C'de çözündürüldükten sonra sperm konsantrasyonu  $5 \times 10^6$  sperm /ml olacak şekilde cam tüplere konularak seyreltildi.

1. Dimethyl Sulfoxide ( DMSO ) ile 25 mg/ml olacak şekilde çözündürüldü.
2. 3µl propidiyum iyodid (PI) (PI zıt boyama için kullanıldı) ve 5 µl DCFH-DA (10 mM) cam tüp içerisindeki 492 µl seyreltilmiş sperm üzerine eklendi.
3. İyice karıştırılan sperm örnekleri 37°C'de 30 dk kadar inkübe edildi.
4. DCFH pozitif ve PI negatif sperm miktarı ölçüldü. Ayrıca DCFH Floresan yoğunluğu ölçümü yapıldı.

#### **3.5.2 Flow sitometrik analiz**

1. Sperm örneklerinde ROS Ölçümü 488-nm argon laser ışın ile Becton Dickinson FACS Calibur akış sitometrisi (BD Biosciences, Singapore) kullanılarak yapıldı (Şekil 3.3).
2. Her bir sperm örneği için yaklaşık 100 hücre/saniye akış hızında minimum 10.000 sperm hücresi değerlendirildi.
3. Floresan olmayan DFHD-DA nın hücre içi  $H_2O_2$  ile etkileşerek yeşil floresan renge sahip DCFH'ye dönüşümü ile 500-530nm dalga boyu aralığında boyanan spermler değerlendirildi.
4. DCFH boyaması ile beraber nükleik asit boyası olan PI zıt boyaması yapıldı (Şekil 3.4).
5. PI kırmızı floresan 580-630 nm dalga boyu aralığında FL-2 kanalında analiz edildi. PI pozitif hücreler (apoptotik) değerlendirme dışı tutuldu. Verilerin analizleri akış sitometri CellQuest Pro yazılımı ile yapıldı.



Şekil 3.3. Becton Dickinson FACS Calibur akış sitometrisi



Şekil 3.4. Propidium İyodid ile (PI) zıt boyaması

### **3.6. İstatistiksel analiz**

Elde edilen verilere ait tanımlayıcı değerler için ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum olarak tablolar oluşturuldu. Veriler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), Version 20.0 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Normal dağılım Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Tüm gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirmesi için non-parametrik Kruskal-Wallis testi, parametrik veriler için OneWay ANOVA testi uygulandı. Sonuçların istatistiksel olarak, anlamlılık düzeyi  $p \leq 0,05$  kabul edilerek değerlendirildi.



#### 4.BULGULAR

Çalışmada 20 normozoospermik fertil, 20 idiyopatik ve 20 idiyopatik olmayan astenozoospermik infertil 60 hastanın yaş ortalamaları  $32,53 \pm 4,82$  (21-42) olarak hesaplandı. Hastalara ait rutin spermiyogram sonucunda elde edilen parametreler ve tanımlayıcı istatistiksel değerleri; ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum olarak verilmektedir (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1** Tüm hastalara ait spermiyogram parametreleri ve değerleri

| Parametreler                                  | Değerler                   |
|-----------------------------------------------|----------------------------|
| Hasta Sayısı                                  | 60                         |
| Yaş                                           | $32,53 \pm 4,82$ (21-42 )  |
| Konsantrasyon (xM/ml)                         | $44,12 \pm 25,82$ (18-123) |
| Toplam Hareketlilik (%)                       | $49,22 \pm 20,16$ (9-100)  |
| Hızlı progresif Hareketlilik (%) <sup>a</sup> | $19,38 \pm 20,355$ (0-83)  |
| Yavaş progresif Hareketlilik (%) <sup>b</sup> | $8,67 \pm 11,324$ (2-56 )  |
| Normal Morfoloji (%) <sup>c</sup>             | $13,48 \pm 8,67$ (3-38)    |
| Canlılık (%)                                  | $80,00 \pm 5,60$ (58-100)  |

---

Ortalama değerler  $\pm$  SD (aralık)

---

M milyon

a<sub>a</sub> sınıfı hareket

b<sub>b</sub> sınıfı hareket

<sup>c</sup>Kruger'in sıkı (strict kriteria) kriterlerine göre ifade edildi

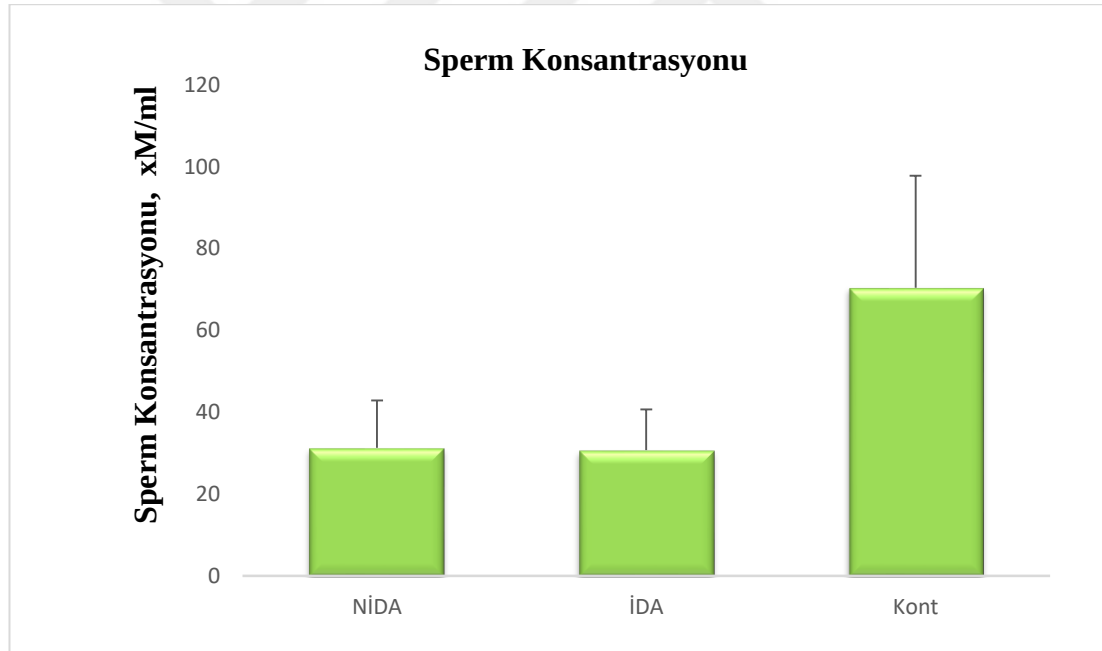
---

#### 4.1. Sperm konsantrasyonu

Çalışmaya dâhil edilen 60 hastaya ait sperm konsantrasyon ortalaması  $44,12 \pm 25,82$  xM/ml olarak hesaplandı. Tüm grupların ayrı ayrı ortalama semen konsantrasyonlarına ait değerleri Tablo 4.2’de verilmektedir. Normozoospermik fertil (Kont), idiyopatik (İDA) ve idiyopatik olmayan (NİDA) astenozoospermik gruplar kendi aralarında konsantrasyon bakımından karşılaştırıldığında; İDA ve NİDA arasında anlamlı fark olmadığı ( $p=0,983$ ), ancak NİDA ve İDA grubunun Kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu bulundu. ( $p \leq 0,05$ ) (Şekil 4.1).

**Tablo 4.2.** Tüm grupların sperm konsantrasyonuna ait istatistiksel verileri.

| Sperm Konsantrasyonu (xM/ml) |          |    |        |         |          |
|------------------------------|----------|----|--------|---------|----------|
| Gruplar                      | Ortalama | N  | SD     | Minimum | Maksimum |
| NİDA                         | 31,30    | 20 | 11,549 | 18      | 59       |
| İDA                          | 30,70    | 20 | 9,995  | 18      | 51       |
| Kont                         | 70,35    | 20 | 27,394 | 30      | 123      |



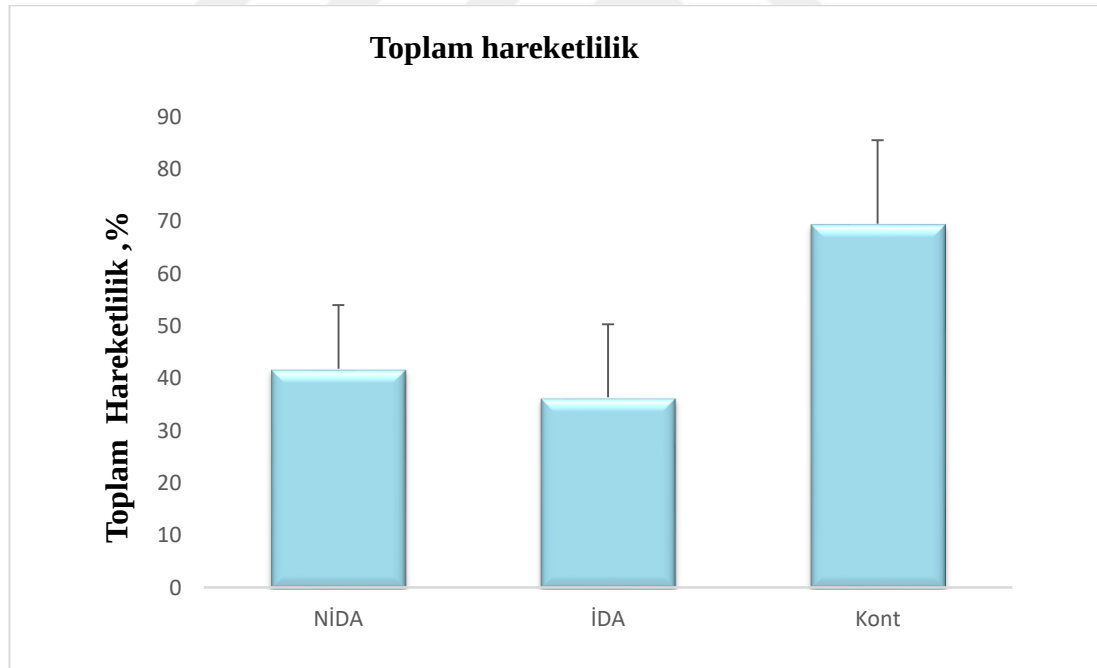
**Şekil 4.1.** Gruplara ait sperm konsantrasyon yüzde ortalamaları  $\pm$ standart sapma arasındaki ilişki.

#### 4.2. Sperm hareketliliği

Çalışmada 60 hastanın toplam hareketlilik yüzdelerinin ortalaması  $49,22 \pm 20,16$  (9-100) olarak hesaplandı (Tablo 4.3). Hareketlilik bakımından gruplara ait yüzde ortalamaları; NİDA %41,8, İDA %36,35 ve Kontrol ise %69,5 olarak tespit edildi. İstatistiksel olarak, NİDA ve İDA arasında anlamlı fark olmadığı ( $p=0,445$ ), ancak NİDA ve İDA grubunun Kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu bulundu. ( $p \leq 0,05$ ) (Şekil 4.2).

**Tablo 4.3.** Gruplara ait sperm hareketlilik yüzdelerini gösteren istatistiksel veriler.

| Toplam sperm hareketlilik (%) |          |    |        |         |          |
|-------------------------------|----------|----|--------|---------|----------|
| Gruplar                       | Ortalama | N  | SD     | Minimum | Maksimum |
| NİDA                          | 41,8     | 20 | 12,155 | 10      | 63       |
| İDA                           | 36,35    | 20 | 13,941 | 9       | 57       |
| Kont                          | 69,5     | 20 | 15,962 | 48      | 100      |

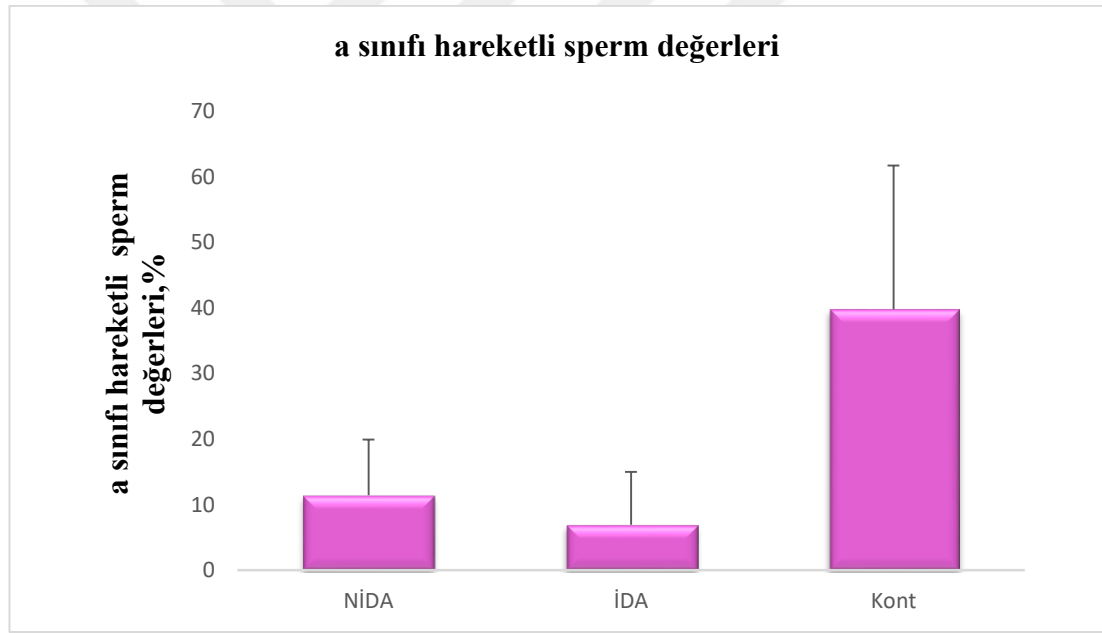


**Şekil 4.2.** Gruplara ait hareketlilik sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.

Üç gruba ait a sınıfı ileri hareketli yüzde ortalamaları; NİDA %11,4, İDA %6,95 ve Kont ise %39,8 olarak hesaplandı (Tablo 4.4). İstatistiksel düzeyde, NİDA ve İDA arasında anlamlı fark olmadığı ( $p=0,218$ ), ancak NİDA ve İDA grubunun Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür. ( $p\leq 0,05$ ) (Şekil 4.3).

**Tablo 4.4.** Gruplara ait a sınıfı ileri hareketli sperm yüzdeleri gösteren istatistiksel veriler.

| a sınıfı hareketli sperm değerleri (%) |          |    |        |         |          |
|----------------------------------------|----------|----|--------|---------|----------|
| Gruplar                                | Ortalama | N  | SD     | Minimum | Maksimum |
| NİDA                                   | 11,4     | 20 | 8,513  | 0       | 26       |
| İDA                                    | 6,95     | 20 | 8,036  | 0       | 25       |
| Kont                                   | 39,8     | 20 | 21,932 | 3       | 83       |

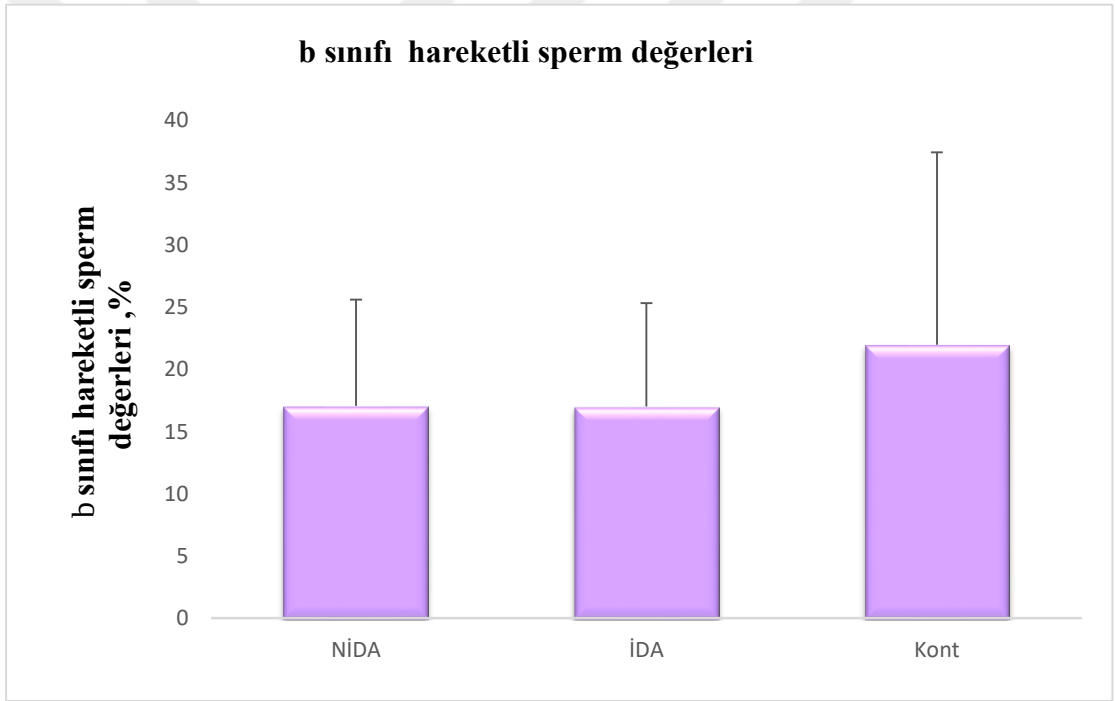


**Şekil 4.3.** Gruplara ait a sınıfı ileri hareketli sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.

Üç gruba ait b sınıfı yavaş hareketli yüzde ortalamaları; NİDA %17,0, İDA %17,05 ve Kont ise %21,95 olarak hesaplandı (Tablo 4.5). İstatistiksel anlamda, üç grup arasında da anlamlı fark olmadığı bulundu ( $p=1,000$ ) (Şekil 4.4).

**Tablo 4.5.** Gruplara ait b sınıfı yavaş hareketli sperm yüzdelerini gösteren istatistiksel veriler.

| <b>b sınıfı hareketli sperm değerleri (%)</b> |                 |          |           |                |                 |
|-----------------------------------------------|-----------------|----------|-----------|----------------|-----------------|
| <b>Gruplar</b>                                | <b>Ortalama</b> | <b>N</b> | <b>SD</b> | <b>Minimum</b> | <b>Maksimum</b> |
| NİDA                                          | 17              | 20       | 8,547     | 4              | 33              |
| İDA                                           | 17,05           | 20       | 8,3       | 2              | 30              |
| Kont                                          | 21,95           | 20       | 15,466    | 4              | 56              |

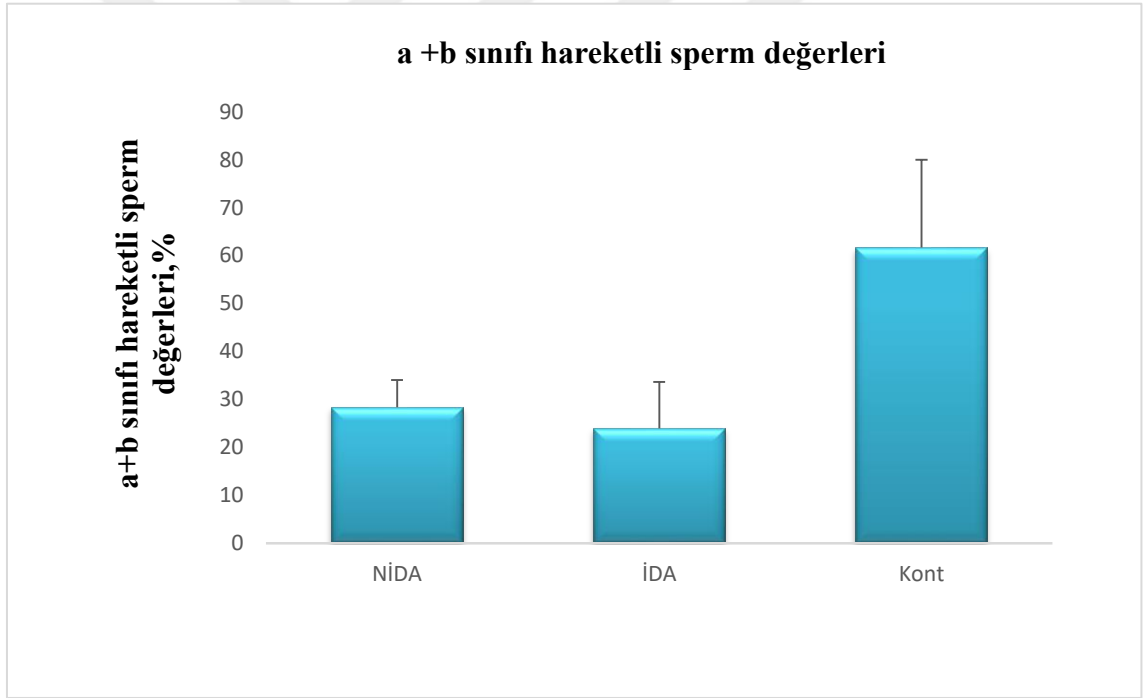


**Şekil 4.4.** Gruplara ait b sınıfı yavaş hareketli sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.

Üç gruba ait a+b sınıfı hareketli sperm yüzde ortalamaları; NİDA %28,4, İDA %24 ve Kont ise %61,75 olarak hesaplandı (Tablo 4.6). İstatistiksel anlamda, NİDA ve İDA arasında anlamlı fark olmadığı ( $p=1,000$ ), ancak NİDA ve İDA grubunun Kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür ( $p\leq 0,05$ ), (Şekil 4.5).

**Tablo 4.6.** Gruplara ait a+b sınıfı sperm yüzdeleri gösteren istatistiksel verileri

| <b>a+b sınıfı hareketli sperm değerleri (%)</b> |                 |          |           |                |                 |
|-------------------------------------------------|-----------------|----------|-----------|----------------|-----------------|
| <b>Gruplar</b>                                  | <b>Ortalama</b> | <b>N</b> | <b>SD</b> | <b>Minimum</b> | <b>Maksimum</b> |
| NİDA                                            | 28,4            | 20       | 5,66986   | 7              | 33              |
| İDA                                             | 24              | 20       | 9,65183   | 3              | 32              |
| Kont                                            | 61,75           | 20       | 18,2494   | 38             | 100             |



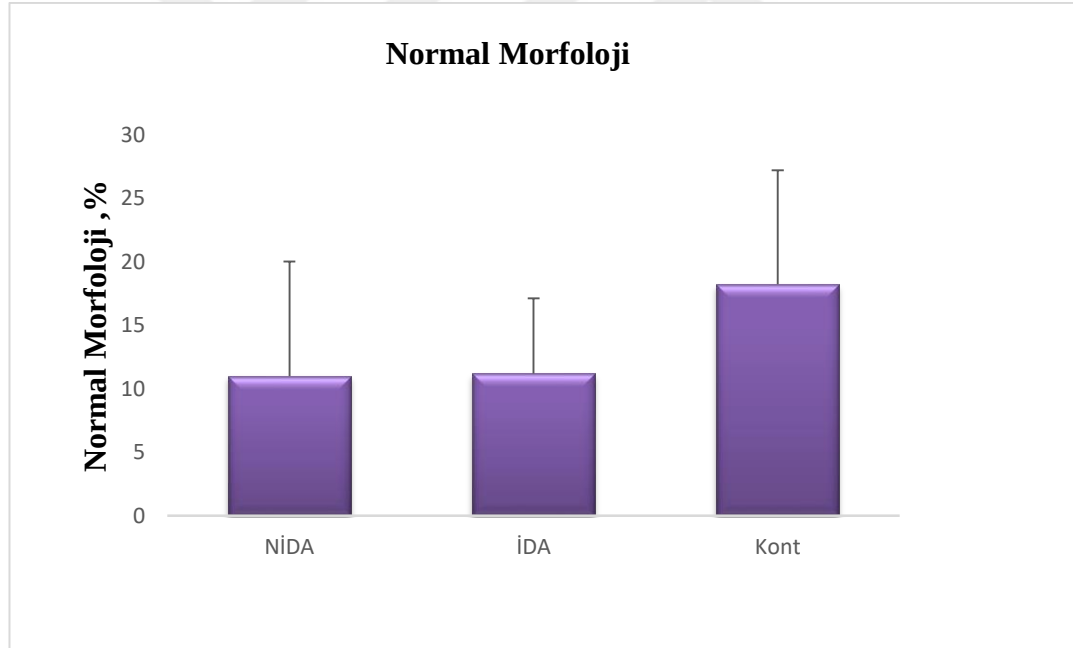
**Şekil 4.5.** Gruplara ait a+b sınıfı hareketli sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki

### 4.3. Sperm morfolojisi

Tüm grupların sperm morfolojisine ait ortalama değerleri Tablo 4.7’de verilmektedir. Gruplar kendi aralarında normal morfolojileri bakımından kıyaslandığında; İDA ve NİDA arasında anlamlı bir fark olmadığı ( $p=0,997$  ancak NİDA ve İDA grubunun Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür ( $p\leq 0,05$ ), (Şekil 4. 6).

**Tablo 4.7.** Gruplara ait normal morfolojili sperm yüzdelerini gösteren istatistiksel verileri.

| Normal Morfoloji (%) |          |    |       |         |          |
|----------------------|----------|----|-------|---------|----------|
| Gruplar              | Ortalama | N  | SD    | Minimum | Maksimum |
| NİDA                 | 11,00    | 20 | 9,020 | 3       | 36       |
| İDA                  | 11,20    | 20 | 5,917 | 3       | 26       |
| Kont                 | 18,25    | 20 | 8,979 | 6       | 38       |



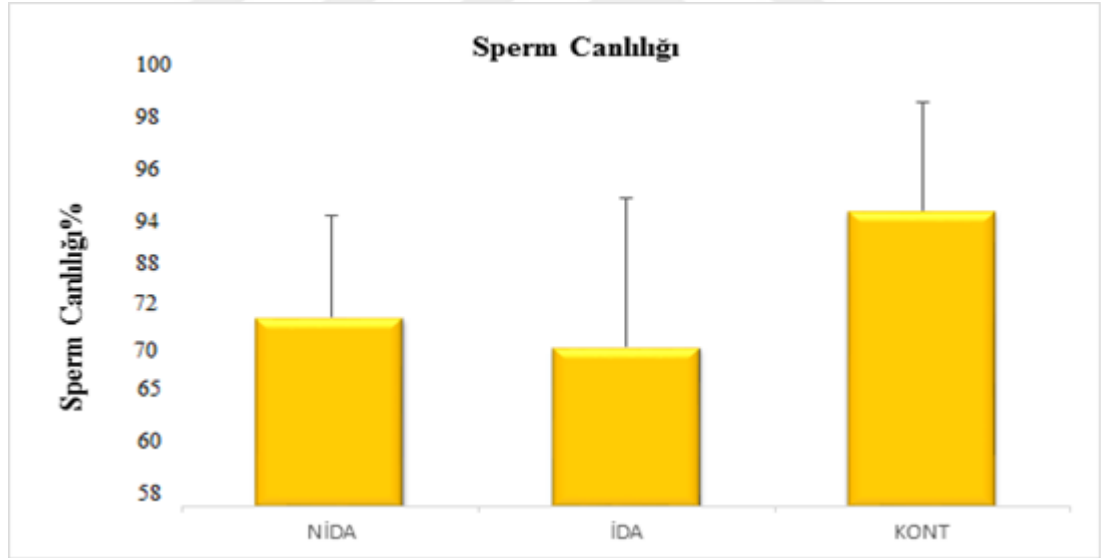
**Şekil 4.6.** Gruplara ait normal morfolojili sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.

#### 4.4. Sperm canlılığı

Gruplara ait sperm canlılık testi yüzde ortalamaları ve standart sapmaları  $80,00 \pm 5,60$  (58-100) olarak Tablo 4.8’de verilmektedir. Tüm grupların ayrı ayrı ortalama sperm canlılık değerleri Tablo 4.8’de de verilmektedir. Kontrol, İDA ve NİDA grupları kendi aralarında canlılık açısından kıyaslandığında; İDA ve NİDA arasında anlamlı bir fark olmadığı ( $p=1.000$ ), ancak NİDA ve İDA grubunun Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu görülmüştür ( $p \leq 0,05$ ), (Şekil 4.7).

**Tablo 4. 8.** Gruplara ait sperm canlılık yüzdelere ilişkin istatistiksel veriler.

| Sperm Canlılık Testi Değerleri (%) |          |    |         |         |          |
|------------------------------------|----------|----|---------|---------|----------|
| Gruplar                            | Ortalama | N  | SD      | Minimum | Maksimum |
| NİDA                               | 72,7500  | 20 | 6,25658 | 60,00   | 80,00    |
| İDA                                | 70,0000  | 20 | 4,29198 | 58,00   | 95,00    |
| Kont                               | 94,5000  | 20 | 4,55955 | 90,00   | 100,00   |



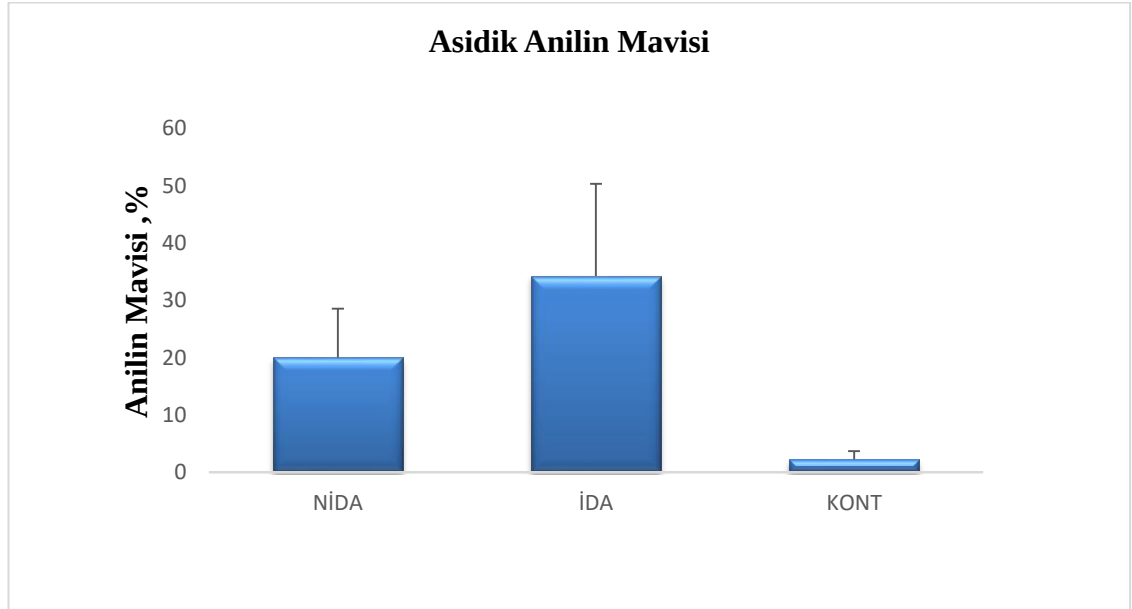
**Şekil 4.7.** Gruplara ait sperm canlılığı yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.

#### 4.5. Sperm kromatin kondensasyonu

Sperm kromatin kondensasyonu defektini tanımlayabilmek için ışık mikroskopik olarak asidik anilin mavisi kullanıldı. Gruplara ait pozitif boyanan sperm başları kromatin kondensasyon defektli spermiler olarak değerlendirildi (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15). İDA, NİDA ve Kontrol gruplarına ait pozitif boyanma yüzdeleri hesaplandı. İDA, NİDA ve Kontrol grupları için elde edilen değerler Tablo 4.9’da verilmiştir. İDA, NİDA ve Kontrol grubu pozitif boyanma yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında anlamlı fark olduğu ve kromatin kondensasyon defekti ortalamasının en yüksek İDA (%34,25) grubunda, en düşük (%2,25) ise Kontrol grubunda olduğu bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ), (Şekil 4.8).

**Tablo 4.9.** Tüm gruplara ait Anilin mavisi ile kromatin kondensasyon defektli spermilerin pozitif (+) boyanma yüzdelere ait istatistiksel verileri.

| Asidik Anilin mavisi ile pozitif (+) boyanma (%) |          |    |          |         |          |
|--------------------------------------------------|----------|----|----------|---------|----------|
| Gruplar                                          | Ortalama | N  | SD       | Minimum | Maksimum |
| NİDA                                             | 20,0000  | 20 | 8,58395  | 10,00   | 35,00    |
| İDA                                              | 34,2500  | 20 | 16,08162 | 10,00   | 60,00    |
| Kont                                             | 2,2500   | 20 | 1,44641  | 1,00    | 5,00     |



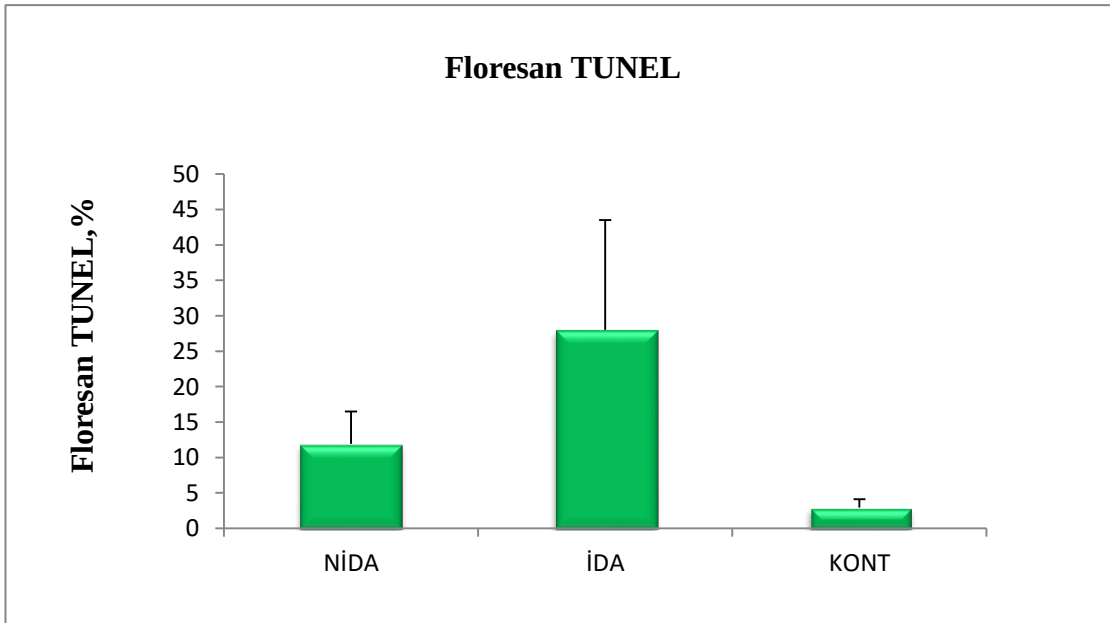
**Şekil 4.8.** Asidik anilin mavisi ile pozitif (+) boyanan kromatin kondensasyon defekti gösteren grupların sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.

#### 4.6. Floresan TUNEL boyaması ile sperm DNA fragmentasyonu

Apoptotik değerlendirme için TUNEL boyaması ile yeşil floresan boyanma gösteren sperm başları pozitif (+) olarak değerlendirildi (Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18). İDA, NİDA ve Kontrol grupları için ayrı ayrı apoptotik hücre pozitif boyanma yüzdeleri hesaplandı (Tablo 4.10). İDA, NİDA ve Kontrol grubu apoptotik sperm yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında anlamlı fark olduğu bununla beraber en yüksek apoptotik sperm ortalamasının %28,00 ile İDA grubunda, en düşük ise %2,95 değerinde Kontrol grubunda olduğu bulunmuştur ( $p<0,05$ ) (Şekil 4. 9).

**Tablo 4.10.** Gruplara ait Floresan TUNEL ile pozitif (+) boyanma yüzdelere ait istatistiksel verileri

| Floresan TUNEL (+) boyanma (%) |          |    |          |         |          |
|--------------------------------|----------|----|----------|---------|----------|
| Gruplar                        | Ortalama | N  | SD       | Minimum | Maksimum |
| NİDA                           | 11,95    | 20 | 4,52449  | 8       | 25       |
| İDA                            | 28       | 20 | 15,50891 | 15      | 60       |
| Kont                           | 2,95     | 20 | 1,14593  | 1       | 5        |



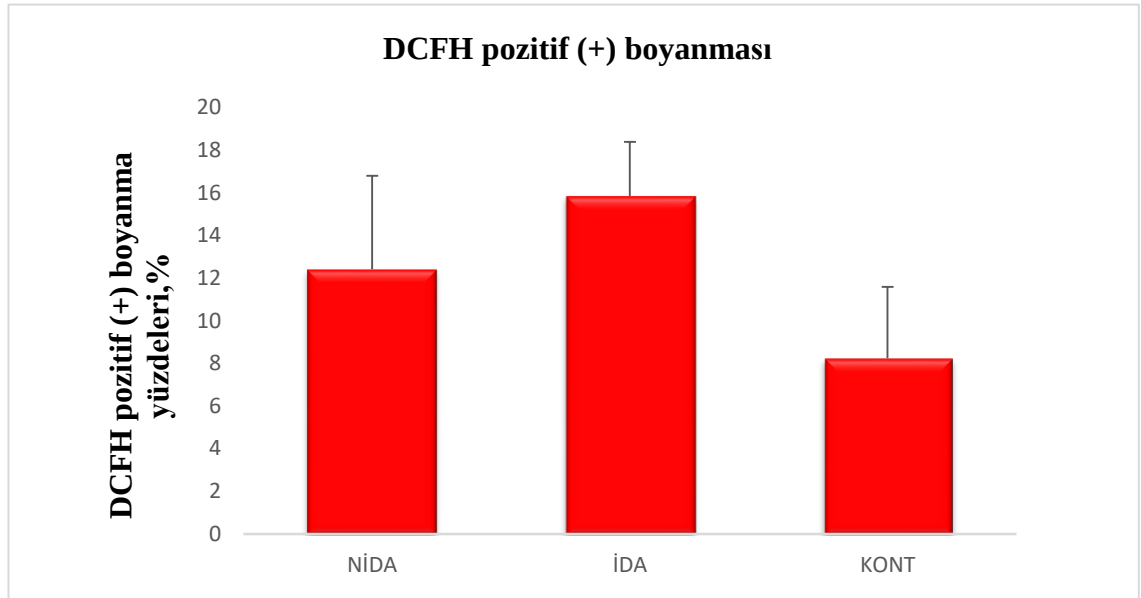
**Şekil 4.9.** Floresan TUNEL ile pozitif (+) boyanan DNA fragmentasyonuna ait grupların sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.

#### 4.7. Flow sitometrik ROS analizi

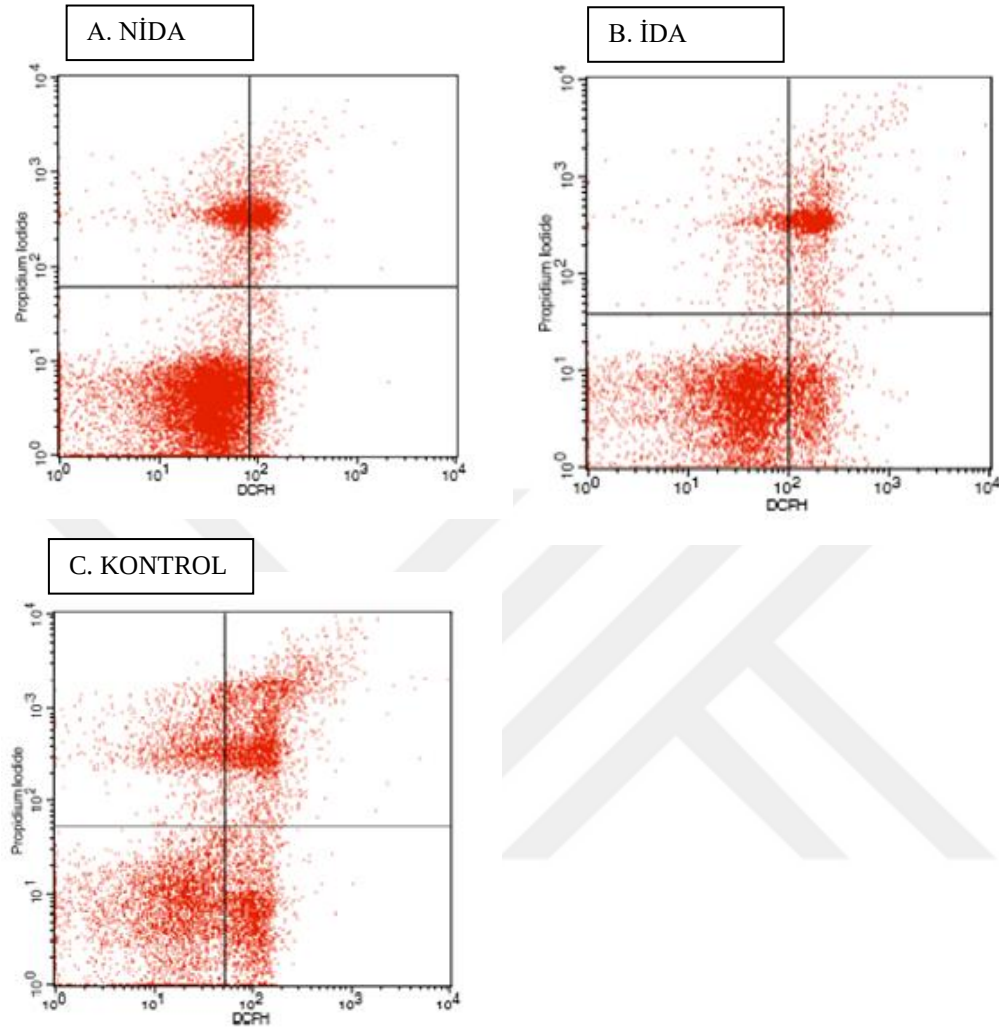
Elde edilen veriler doğrultusunda gruplara ait sperm dışı yapılar, gerekli hücre popülasyonunu çevreleyen bölge çizilerek ön ve yan saçma nokta çizimi kullanılarak değerlendirme dışında tutulmuştur (Şekil 4.11). Hücre içi ROS seviyesi analizlerine göre DCFH ile boyanan sperm sayısı, İDA grubunda anlamlı olarak en yüksek (%15, 86) kontrol grubunda ise en düşük (%8,25) olarak hesaplandı (Tablo 4.11). DCFH ile boyanma verilerine göre gruplar kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı fark olduğu bulundu ( $p \leq 0,05$ ), (Şekil 4.10).

**Tablo 4.11.** Gruplara ait DCFH pozitif (+) boyanma yüzdelere ilişkin istatistiksel verileri

| DCFH pozitif (+) boyanma yüzdeleri, % |          |    |         |         |          |
|---------------------------------------|----------|----|---------|---------|----------|
| Gruplar                               | Ortalama | N  | SD      | Minimum | Maksimum |
| NİDA                                  | 12,4195  | 20 | 4,38497 | 2,89    | 25,18    |
| İDA                                   | 15,859   | 20 | 2,54067 | 7,99    | 20,81    |
| Kont                                  | 8,251    | 20 | 3,34769 | 2,15    | 12,5     |

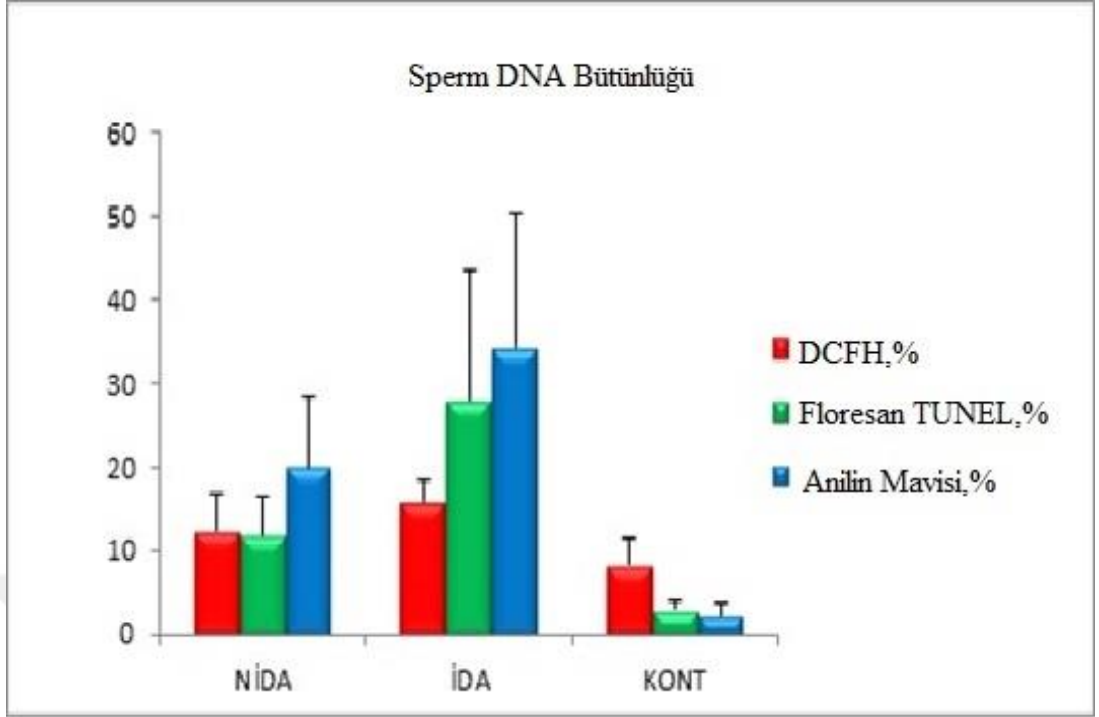


**Şekil 4.10.** Gruplara ait DCFH pozitif (+) hücre içi ROS düzeyi yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.



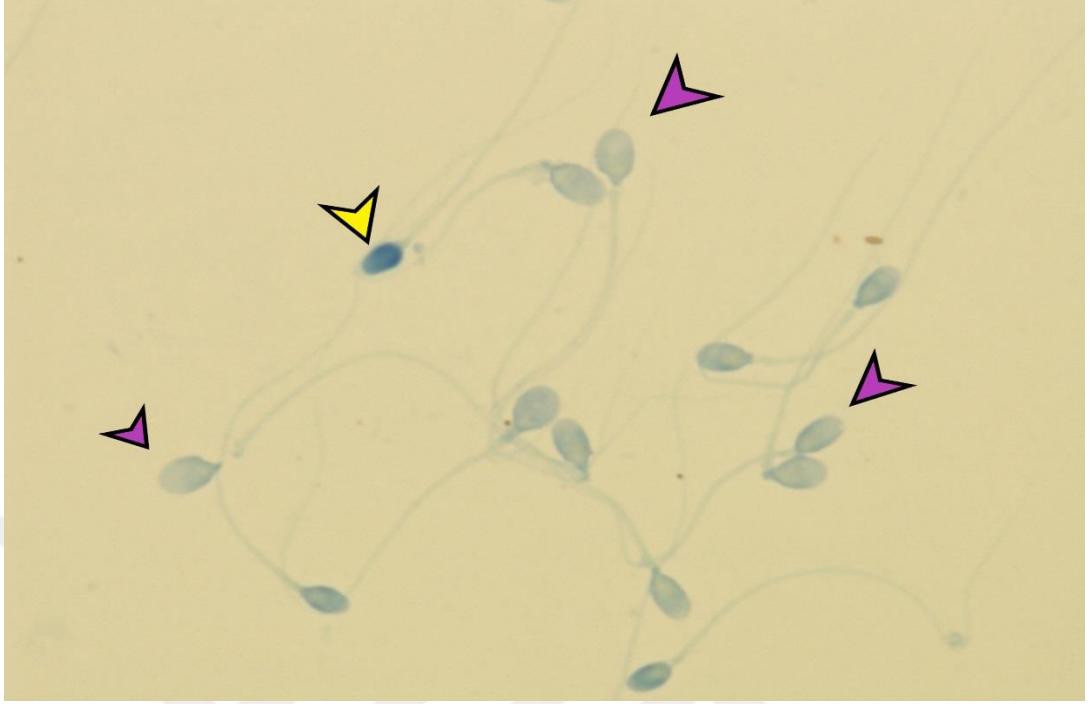
**Şekil 4.11.** Gruplara ait DCFH ve propidium iyodid ile boyanan spermelerde flow sitometrik ROS analiz sonuçları

Şekil 4.11'e bakıldığı zaman gruplara ait hücre içi hidrojen peroksit ölçümlerinin nokta çizim histogramları oluşturulmuştur. Histogramların üst sol dörtgeni hidrojen peroksit bulundurmeyen apoptotik sperm hücrelerini, üst sağ ise hücre içi yüksek hidrojen peroksit bulunan apoptotik sperm hücrelerini göstermektedir. Ayrıca alt sol dörtgen canlı boyanmayan spermeleri, alt sağ dörtgen ise canlı ve hücre içi yüksek hidrojen peroksit bulunduran hücreleri göstermektedir. Değerlendirmede; alt sağ dörtgene ait DCFH (+) ve PI (-) dikkate alınarak spermelere ait ortalama DCFH floresan yoğunluğu hesaplandı.

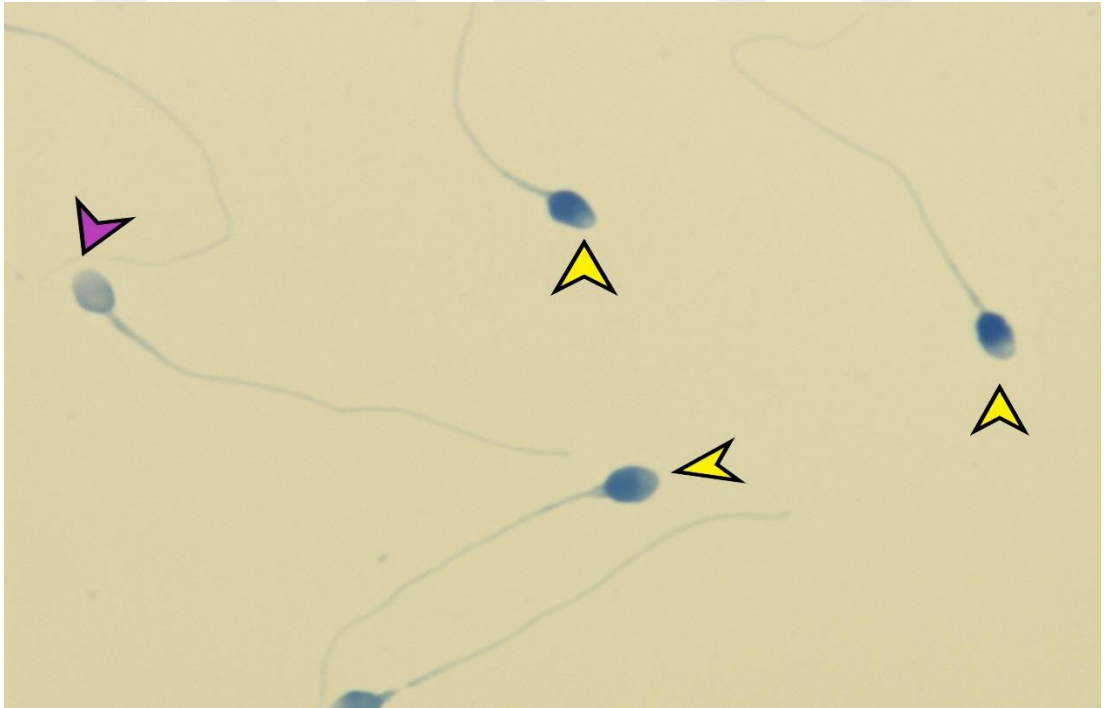


**Şekil 4.12.** Sperm DNA bütünlüğü açısından bakıldığında istatistiksel düzeyde elde edilen gruplara ait bulgular birbirini desteklemektedir ( $p \leq 0,05$ ).

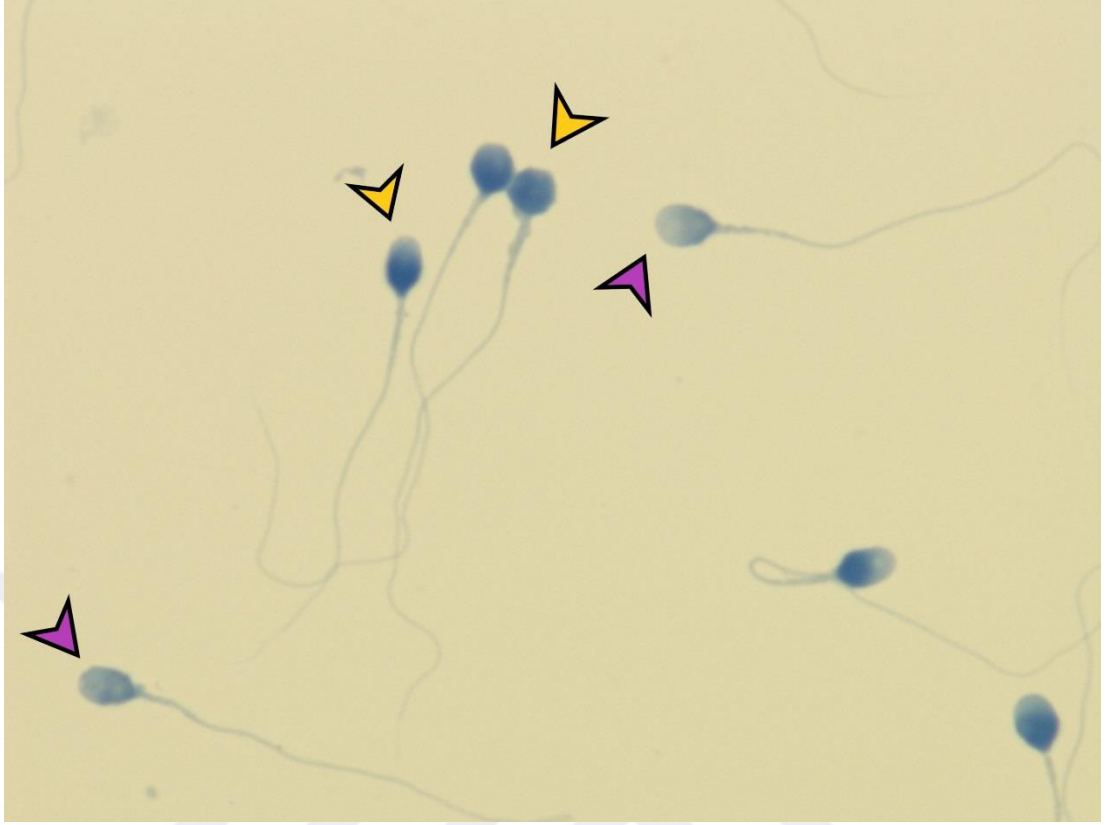
#### 4.8. Işıık mikroskobik bulgular



**Şekil 4.13.** Kontrol grubuna ait asidik Anilin mavisi ile boyama sonucu anormal kromatin kondensasyonuna sahip (sarı ok) spermiler koyu mavi, normal kromatin kondensasyonuna sahip (mor ok) spermiler açık mavi gözlenmektedir.

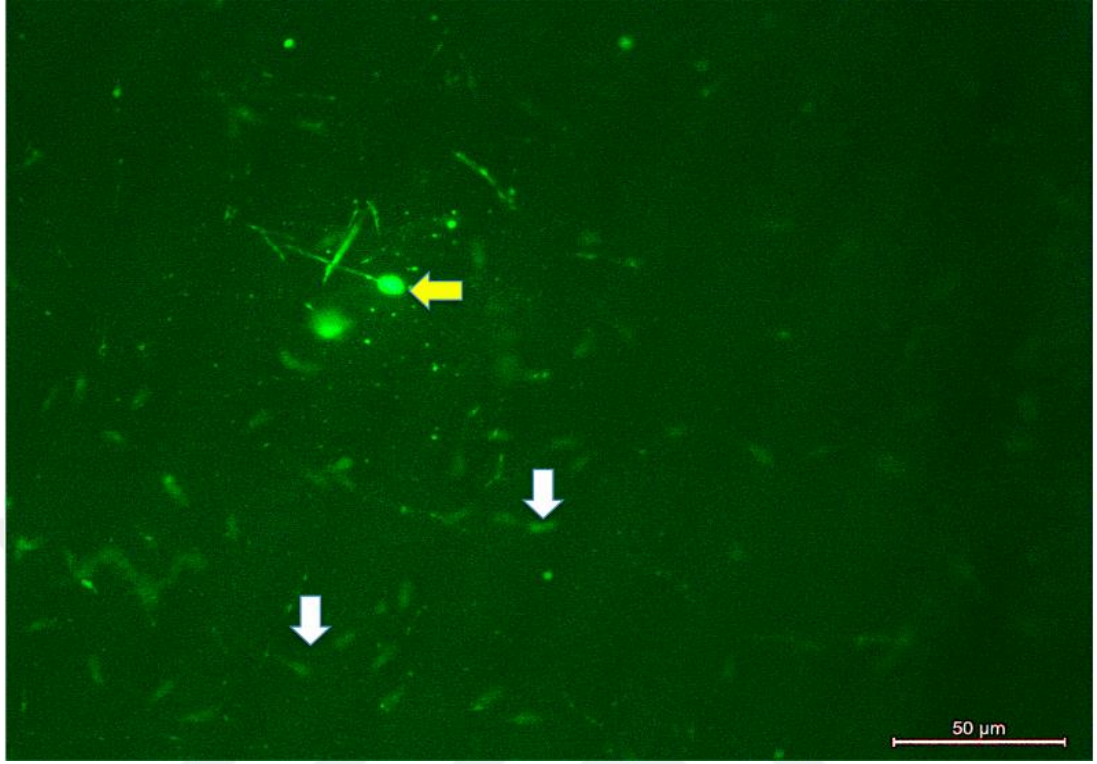


**Şekil 4.14.** NİDA grubuna ait asidik Anilin mavisi ile boyama sonucu anormal kromatin kondensasyonuna sahip (sarı ok) spermiler koyu mavi, normal kromatin kondensasyonuna sahip (mor ok) spermiler açık mavi görülmektedir.

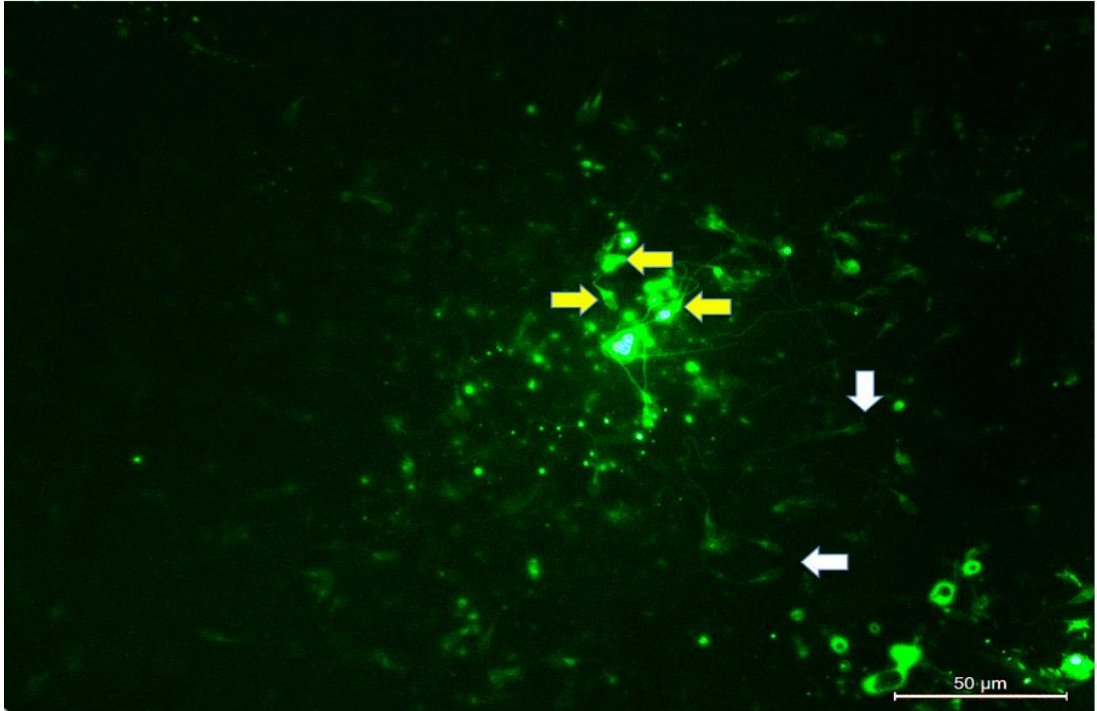


**Şekil 4.15.** İDA grubuna ait asidik Anilin mavisi ile boyama sonucu anormal kromatin kondensasyonuna sahip (sarı ok) spermiler koyu mavi, normal kromatin kondensasyonuna sahip (mor ok) spermiler açık mavi görülmektedir.

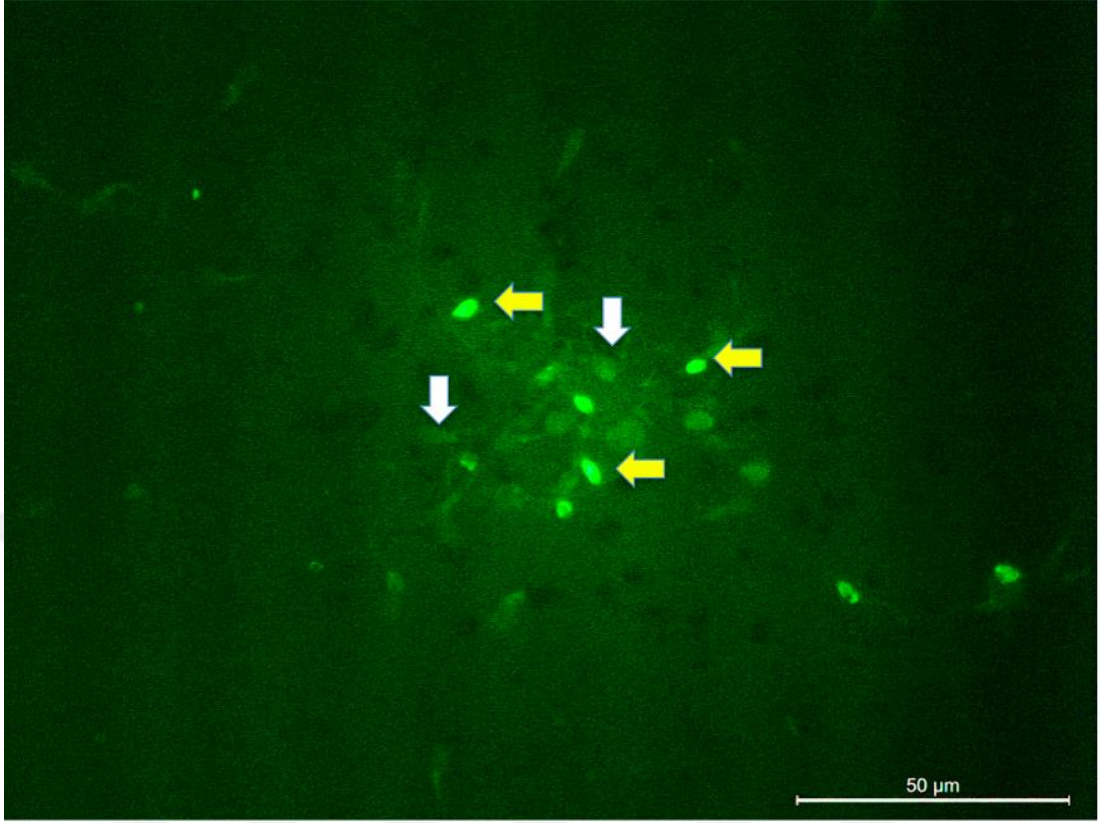
#### 4.9. Floresan mikroskopik bulgular



**Şekil 4.16.** Kontrol grubuna ait Floresan TUNEL yöntemi ile pozitif (+) boyanan spermiler (sarı ok) ve negatif (-) boyanan spermiler (beyaz ok) görülmektedir.



**Şekil 4.17.** İDA grubuna ait Floresan TUNEL yöntemi ile pozitif (+) boyanan spermiler (sarı ok) ve negatif (-) boyanan spermiler (beyaz ok) görülmektedir.



**Şekil 4.18.** NİDA grubuna ait Floresan TUNEL yöntemi ile pozitif (+) boyanan spermiler (sarı ok) ve negatif (-) boyanan spermiler (beyaz ok) görülmektedir.

## 5.TARTIŞMA

Astenozoospermi, sıklıkla erkek infertilitesine yol açan, spermiyumun ileri hareketinin azalması ile karakterize olup nedeni ve patogenezi tam olarak anlaşılamamış bir tablodur (120).

Sperm hareketliliği, epididimal olgunlaşma ve taşınma sürecinde kazanılmaktadır. Spermin dişi üreme sistemi içerisinde ilerlemesi, kumulus ooforusa penetrasyonu ve döllenme sürecinde, hareketliliğin önemi oldukça fazladır. Bu nedenle sperm hareketliliği ve gebelik oluşma şansı arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır (121,122). Çalışmalarda spermlerde, aktin, tektin ve tübülün gibi çeşitli sitoskeleton proteinlerin farklı eksprese edildiği bulunmuştur, sperm hareketindeki azalmanın buna bağlı olabileceği düşünülmüştür (123). Normal harekete sahip spermler ile idiyopatik astenozoospermi vakaları karşılaştırıldığında, astenozoospermide sitoskeleton proteinlerin anormal ekspresyonu klinik olarak gözlenmiştir (124).

Sperm hareketliliği üzerine yapılan çalışmalarda; anormal sperm hücrelerinin DNA bütünlüğünün bozulmasında, kromatin kondensasyon defektlerinin, apoptozun ve yüksek ROS üretiminin etkisi olabileceği bildirilmiştir (125-130). Çalışma sonuçlarımız yapılan çalışmalar ile uyumlu olup (120, 131-138); çeşitli nedenlere bağlı olarak (NİDA) veya nedeni bilinmeyen (İDA) gruplarda düşük hareketli sperm oranının yüksek olduğu astenozoospermik hastalarda sperm DNA bütünlüğünün bozulduğunu ve hücre içi ROS oranının yüksek olduğu belirlenmiştir. Konsantrasyon açısından ise İDA ve NİDA grubunda sperm sayısının normozoospermik fertil gruba göre anlamlı olarak daha düşük olduğu, hareketlilik yüzde ortalamaları açısından NİDA (%41,8) ve İDA (%36,35) grupları ile kontrol grubu (%69,5) arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır ( $p \leq 0,05$ ). Kontrol grubunda a+b sınıfı hareketlilik yüzde ortalamaları % 61,75 iken bu değer astenozoospermik gruplarda; NİDA (%28,4) İDA (%24,5) oranında oldukça düşük olduğu belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ). Sonuçlar diğer çalışmalarla uyumlu olup, istatistiksel olarak, NİDA ve İDA arasında anlamlı fark olmadığı ( $p=0,218$ ), diğer gruplar arasında anlamlı fark olduğu bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). Morfolojik değerlendirmede ise İDA ve NİDA gruplarında normal yapıya sahip sperm yüzdesi daha düşük olarak gözlenmiştir.

DNA bütünlüğünün bozulduğu bununla beraber kromatin kondensasyon defektlerinin daha yüksek oranda görüldüğü astenozoospermik vakalarda normal

morfolojili sperm oranının azaldığı bildirilmiştir. Düşük DNA fragmentasyonu görülen spermelerde normal morfoloji ve yüksek hareketli sperm oranının olduğu gözlenmiştir (139-140).

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yöntemi geliştirilmeden önce astenozoosperminin; fertilizasyon başarısındaki yetersizliği yüzünden erkek infertilitesinin önde gelen nedenleri arasında olduğu, hareketi az olan spermelerin yumurtaya ulaşamadıkları ve/veya penetrasyon bozuklukları olduğu tespit edilmiştir. Sperm mikroenjeksiyonunun uygulanmasından sonra bu vakalarda önemli ölçüde fertilizasyon artışı ortaya çıkmıştır. Hareketsiz spermeler arasından canlı spermelerin ayırımında karşılaşılan zorlukların çözümü için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bazı çalışmalarda, Hipo-ozmotik şişme testi (HOST), Eozin-Y, pentoksifilin ve temassız diyet lazer ile sperm hareketliliğinin uyarılması, cansız spermi ayırt etmek için kullanılmıştır (141). Çalışmamızda canlı spermeleri ayırt edebilmek için pentoksifiline benzer mekanizma ile etki gösteren teofilin kullanılmıştır. Canlılık testi ile tüm gruplarda sperm hareketliliğinde belirgin artış olduğu, İDA ve NİDA grupları arasında anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen ( $p=1.000$ ), kontrol grubu ile astenozoospermik gruplar arasında anlamlı fark olduğu saptanmıştır. ( $p\leq 0,05$ ) (142,143).

### **5.1. Sperm DNA bütünlüğü**

Sperm DNA bütünlüğü, erkek fertilité potansiyelini gösteren bir parametredir. DNA hasarının, anormal sperm morfolojisi ve düşük hareketlilikle ilişkili olduğu bildirilmektedir (16). Düşük sperm motilitesi olan hastaların semeninde çok sayıda anormal sperm bulunmasına neden olan DNA fragmentasyonu spermin fertilizasyon yeteneğini ve embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilemekle beraber genetik defekt riskini de artırmaktadır (145-150).

Çalışmamızda asidik anilin mavisi, floresan TUNEL, DCFH yöntemleri ile sperm DNA bütünlüğü değerlendirilmiş, istatistiksel anlamda elde edilen sonuçların birbirini desteklediği, her üç değerlendirmede İDA grubunda DNA bütünlüğü bozuk spermelerin en yüksek değerde olduğu tespit edilmiştir ( $p\leq 0,05$ ).

#### **5.1.1. Sperm kromatin kondensasyonu**

Protaminler, sperm kromatin yoğunlaşmasında ve babadan gelen genomun DNA hasarından korunmasında hayati bir rol oynamaktadır (151, 152). Düşük

seviyedeki protamin 1 ve protamin 2 transkripti, spermde DNA hasar birikimi, morfolojik anormallikler, mitokondrinin inaktive olması; apoptotik yolağın başlamasına ve sperm hareketliliğinin azalmasına yol açabilir. Bartosz Kempist ve ark., normozoospermik ve astenozoospermik erkeklerin spermelerindeki protamin 1 ve protamin 2 transkripti arasındaki farkı araştırmışlardır. Astenozoospermi hastalarında hem protamin 1 hem de protamin 2 transkript düzeylerinde azalma olduğunu, bunun da sperm hareketinde düşmeye neden olabileceğini ve üreme yeteneğini azaltabileceğini ileri sürmüşlerdir (153). Ayrıca, Carrell ve arkadaşları düşük protamin 2 seviyelerinin, düşük sperm sayısı, azalmış hareketlilik ve morfolojik anormalliklerle ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir (154). Histonlar ve protaminler hem normal spermde hem de özellikle hareketlilik açısından bozuk olan spermelerde görülür. D. Colletu ve ark., astenozoospermik örneklerin yapısal olarak olgunlaşmamış bir kromatin içerebildiğini ve oluşan anormalliklerin epididimal transport sırasında olabileceğini, sıklıkla erkek infertilitesinden sorumlu olan bu patolojiyi anlamak için araştırılması gerektiğini savunmuşlardır. Astenozoospermik hastalarda anilin mavisi ile sperm başlarında yüksek oranda + boyanma nedeninin anormal nükleer olgunlaşmadan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda bu bulgunun, erkek infertilitesinden sorumlu olan astenozoospermiyi daha iyi tanımlamak için önemli olduğunu vurgulamışlardır (155). Magorzata Piaseckal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, semen örneklerinde sperm DNA bozukluklarının düşük sperm hareketi ile ilişkili olduğunu gözlemişlerdir. Sonuç olarak astenozoosperminin, sperm genomik bütünlüğünün bozulması ve orta parçanın kusurları ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Oluşan hareket anormalliklerinin spermelerdeki histon protamin şekillenme sürecindeki hatalardan kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Ayrıca astenozoospermik hastalarda, spermin yalnızca yetersiz konsantrasyon, morfoloji ve hareket ile değil aynı zamanda çekirdek olgunlaşması ile karakterize edilebildiği rapor edilmiştir (17).

İDA ve NİDA hastalardan elde edilen ve asidik anilin mavisi boyaması ile kromatin defektlerini değerlendirdiğimiz bu çalışmada, kromatin defektli sperm ortalamasının en yüksek İDA grubunda %34,25, en düşük ise %2,25 kontrol grubunda olduğu bulunmuştur. Ayrıca NİDA ve İDA gruplarını kendi aralarında karşılaştırdığımızda kromatin kondensasyon defektlerinin NİDA grubunda %20 daha

düşük olduğu belirlenmiştir. Her üç grup arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.2. Apoptoz

Astenozoospermli hastalarda kaspazlar gibi apoptotik araçlar düşük harekete sahip spermelerde yüksek düzeyde tespit edilmiştir (156). Miyagawa ve ark. artan DNA kırıkları sayısı ile mitokondriyon içeren kuyruk orta parçasındaki anormallikler arasında bir ilişki bulmuştur. Bu bulgu, artmış DNA kırıklıklarının apoptotik sinyal yolunu başlatarak mitokondriyonların inaktivasyonunu ve spermiyum immotilitesini uyurabileceğini göstermektedir (153).

Yang Yang ve arkadaşlarının astenozoospermi hastalarında apoptotik hücre varlığını belirlemek için Anneksin V/PI boyamasıyla flow sitometrik analiz yapmışlardır. Astenozoospermi grubunda ( $n=25$ ,  $Q4:14.36 \pm 4.54$ ), normozoospermi grubuna göre ( $n=20$ ,  $Q4:7.19 \pm 3.27$ ,  $p \leq 0.01$ ) belirgin bir şekilde daha fazla apoptotik hücre bulmuşlardır. Bu sonuçlar, artmış bir apoptoz düzeyinin sperm parametreleriyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca diğer çalışmalar da sperm apoptozunun, hareket, canlılık ve morfoloji bozukluğu gibi sperm kalitesini gösteren parametrelere olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir. Tuba uterina ve seminal plazmada artmış ROS ve artmış apoptozun, sperm konsantrasyonunu, hareketini ve morfolojisini etkilediği düşünülmektedir. Bunlara ek olarak yapılan kaynak taramalarında sperm ultrastrüktürel özelliklerinin apoptoz veya olgulaşmamış spermle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (120).

Çalışmamızda, bu konudaki literatürlere benzer sonuçlar elde edilmiştir. Floresan TUNEL boyaması ile İDA, NİDA ve kontrol grubu pozitif boyanan apoptotik sperm yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olduğu ve apoptotik hücre varlığı ortalamasının en yüksek %28,00 İDA grubunda, en düşük %2,95 ile kontrol grubunda olduğu bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ). Kromatin kondensasyon defektlerine ait bulgulara apoptotik sperm oranının NİDA grubunda İDA grubundan daha düşük olduğu belirlenmiştir.

### 5.1.3. ROS

Oksidatif stresin astenozoospermi ile ilişkili en önemli konulardan biri olduğu bildirilmiştir (157). Artan ROS düzeylerinin sperm DNA fragmentasyonu, lipid peroksidasyon hasarı, artmış apoptoz ve azalmış hareket ile ilişkili olabileceğini

göstermektedir. Önceki çalışmalara göre, özellikle elektron transfer zincirinde süperoksit oluşumunun ROS'un ana kaynağı olduğu gösterilmiştir (120). ROS'un, lipid içeren sperm plazma membranının peroksidasyonunu indükleyerek spermiyumda hasara neden olabileceği, bunun da hem DNA bütünlüğünü hem de aksonemal yapıyı bozarak sperm hareketliliğini etkileyeceği bildirilmiştir (158).

Astenozoospermik hastalarda yapılan çalışmalarda ROS düzeylerinin anlamlı olarak artmış olduğu gözlenmiştir (120, 159). D. S. Amarasekara ve ark. yaptığı çalışmada, idiyopatik astenozoospermik infertiliteye sahip bireylerin fertil bireylere göre daha yüksek ROS seviyesine sahip olduğu bildirilmiştir. Nitroblue tetrazolium testi ile yapılan bu çalışmanın sonuçlarında anlamlı olarak artış olduğu ve semen ROS düzeylerinin astenozoospermiye dayalı erkek infertilitesi ve idiyopatik infertilitenin teşhisinde potansiyel bir belirteç olarak geliştirilebileceğini bildirilmiştir (160).

G. Balercia ve ark.'nın çalışmasına göre idiyopatik astenozoospermik ve varikoselli astenozoospermik hastaların semenlerinde ROS'un çok yüksek olmasının birincil neden olup olmadığı henüz aydınlatılamamıştır. Astenozoospermi (idiyopatik astenozoospermi ve varikoselli astenozoospermi hasta grupları) olan tüm hastaların, normal sperm hareketliliğine sahip hastalara kıyasla, toplam CoQ10 ve QH2 düzeylerinin daha düşük olduğunu ve CoQ10'un ağırlıklı olarak hücre fraksiyonunda yoğunlaştığını açıkça bildirmişlerdir (135).

Bu bulgulara paralel olarak, bizim çalışmamızda da astenozoospermik gruplarda (NİDA ve İDA) flow sitometrik olarak ROS değerlendirilmesinde her iki grupta da belirgin bir artış gözlenmiştir. Ancak özellikle idiyopatik astenozoospermik grupta NİDA grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek düzeyde ROS oluşumu meydana gelmiştir ( $p \leq 0,05$ ).

Yapılan çalışmalara göre; İDA vakalarında hücre içi ROS etkisinin varikoselli astenozoospermik vakalara göre belirgin artış göstermesi, özellikle DNA bütünlüğü; kromatin kondensasyon defekti ve DNA fragmantasyonu için yapılan testlerin geliştirilmesi ve idiyopatik astenozoospermik mekanizmada birincil neden olup olmadığı konusunda tartışmalar bulunmaktadır (135, 160). Bu çalışma sonucunda sperm DNA bütünlüğündeki bozulmanın yüksek ROS düzeyiyle ilişkili olabileceği buna bağlı olarak yüksek oranda kromatin kondensasyon defekti ve apoptotik sperm olduğu tespit edilmiştir.

Erkek infertilitesinin etiyolojisinde önemli rolü olan sperm DNA bütünlüğü ve oksidatif hasar açısından idiyopatik ve idiyopatik olmayan (varikosel, sigara, alkol, diyabet, enfeksiyon, genetik gibi) astenozoospermik infertil hastalar ilk olarak bu çalışma ile karşılaştırıldı. İdiyopatik astenozoospermik infertilitede altta yatan sebeplerin daha iyi anlaşılabilmesi için genetik ve ultrastrüktürel değerlendirmelerin yapılması gerekmektedir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda sperm DNA bütünlüğü ve oksidatif hasar analizinin yardımcıyla üreme tekniklerinde özellikle idiyopatik astenozoospermik erkek infertilite değerlendirilmesi ve tedavisi için yararlı bir tanı olabileceği düşünülmektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

20 normozoospermik fertil, 20 idiyopatik ve 20 idiyopatik olmayan astenozoospermik infertil hastaların, sperm örnekleri ışık mikroskopik olarak Anilin Mavisi, Floresan mikroskopik olarak TUNEL boyaması ve ROS ölçümü için Flowsitometrik analizi kullanılarak incelenen çalışmamızda;

**1. Konsantrasyon** bakımından Normozoospermik fertil, İdiyopatik ve İdiyopatik olmayan Astenozoospermik gruplar kendi aralarında kıyaslandığında yüzde ortalamaları NİDA %31,30, İDA %30,70 ve Kont %70,35 olarak bulundu. İDA ve NİDA arasında anlamlı fark olmadığı ( $p=0,983$ ), ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ( $p\leq 0,05$ ).

**2. Hareketlilik** bakımından gruplara ait yüzde ortalamaları; NİDA %41,8, İDA %36,35 ve Kont ise %69,5 olarak tespit edildi. İstatistiksel olarak, NİDA ve İDA arasında anlamlı fark olmadığı ( $p=0,445$ ), diğer gruplar arasında anlamlı fark olduğu bulundu ( $p\leq 0,05$ ).

**3. Üç gruba ait a sınıfı** ileri hareketli yüzde ortalamaları; NİDA %11,4, İDA %6,95 ve kontrol ise %39,8 olarak hesaplandı. İstatistiksel düzeyde, NİDA ve İDA arasında anlamlı fark olmadığı ( $p=0,218$ ), ancak NİDA ve İDA grubunun Kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür ( $p\leq 0,05$ ).

**4. Üç gruba ait b sınıfı** yavaş hareketli yüzde ortalamaları; NİDA %17,0, İDA %17,05 ve Kont ise %21,95 olarak hesaplandı. İstatistiksel anlamda, üç grup arasında da anlamlı fark olmadığı belirlendi ( $p=1,000$ ).

**5. Üç gruba ait a+b sınıfı** hareketli yüzde ortalamaları; NİDA %28,4, İDA %24 ve Kont ise %61,75 olarak hesaplandı (Tablo4.6). İstatistiksel anlamda, NİDA ve İDA arasında anlamlı fark olmadığı ( $p=1,000$ ), diğer gruplar arasında anlamlı fark olduğu belirlendi ( $p\leq 0,05$ ).

**6. Normal morfolojileri** bakımından gruplar kendi aralarında kıyaslandığında; İDA ve NİDA arasında anlamlı bir fark olmadığı ( $p=0,997$ ), ancak diğer gruplar arasında anlamlı fark olduğu görüldü ( $p\leq 0,05$ ).

**7. Kontrol, İDA ve NİDA** grupları kendi aralarında **sperm canlılık** açısından karşılaştırıldığında İDA ve NİDA arasında anlamlı bir fark olmadığı ( $p=1,000$ ), ancak diğer gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür ( $p\leq 0,05$ ).

**8. Asidik Anilin mavisi** ile İDA, NİDA ve Kontrol grubu pozitif boyanma yüzdeleri bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında anlamlı fark olduğu ve kromatin kondensasyon defekti ortalaması en yüksek İDA (%34,25) grubunda, en düşük ise Kontrol (%2,25 ) grubunda olduğu bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

**9. Floresan TUNEL** boyaması ile İDA, NİDA ve Kontrol grubu apoptotik hücre pozitif boyanma yüzdeleri bakımından kıyaslandığında tüm gruplar arasında anlamlı fark olduğu ve apoptotik hücre varlığı ortalamasının en yüksek (%28,00) İDA grubunda, en düşük ise kontrol (%2,95) grubunda olduğu bulunmuştur ( $p \leq 0,05$ ).

**10. ROS seviyesi** ölçümlerine göre DCFH ile boyanan sperm sayısı, İDA grubunda anlamlı olarak en yüksek (%15,86) kontrol grubunda ise en düşük (%8,25) olarak tespit edildi. DCFH ile boyanma verilerine göre gruplar kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı fark olduğu bulundu ( $p \leq 0,05$ ).

**11. Sperm DNA bütünlüğü** açısından bakıldığında; Asidik Anilin mavisi, DCFH ve Floresan TUNEL için istatistiksel anlamda elde edilen gruplara ait bulgular birbirini desteklemekte olup her üç parametre için de İDA grubunun en yüksek olması dikkat çekmektedir ( $p \leq 0,05$ ).

**12.** Bu çalışmanın sonuçlarına göre; sperm konsantrasyonu, toplam hareketlilik, ilerleyici hareketlilik, canlılık ve morfoloji açısından bulgular birbirlerini desteklemektedir. Bu parametrelerin hepsinde İDA ve NİDA arasında anlamlı fark olmamasına karşın, kontrol ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark elde edilmiştir. Sperm DNA bütünlüğü olarak bakıldığında diğer gruplara kıyasla en çok idiyopatik astenozoospermik hastalar etkilenmektedir. Bu da akla astenozoospermi vakalarının herhangi bir nedene bağlı olmasından daha çok açıklanamayan astenozoosperminin altında yatan apoptotik mekanizmalarının daha iyi açıklanması, sperm DNA bütünlüğü, ROS varlığı ve canlılık testlerinin geliştirilmesi, gibi çalışmaların yapılması gerektiğini getirmektedir.

**13.** Kaynak taramalarına göre bu çalışma İDA ve NİDA gruplarının karşılaştırıldığı ilk çalışma olup, idiyopatik astenozoospermide altta yatan sebeplerin daha iyi anlaşılabilmesi için genetik ve ultrastrüktürel değerlendirmelerin yapılacağı ileri çalışmalar gerektiğini ortaya koymaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Menkveld R.** Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. *Asian journal of andrology*, **2010**; 12 (1), 47.
2. **Alkan E, Başar MM.** Sperm motilite bozuklukları: Terminoloji, etiyoloji ve tedavide yenilikler.
3. **Cocuzza M and Agarwal A.** Nonsurgical treatment of male infertility: spesific and empiric therapy. *Biologics* **2007**; 1: 259.
4. **Mutlu MF, Baştu E, Öktem M.** Açıklanamayan İnfertiliteye Güncel Bakış. *Gazi Medical Journal*, **2013**; 24(1).
5. **Abid S, Maitra A, Meherji P, Patel Z, Kadam S, Shah J.** Clinical and laboratory evaluation of idiopathic male infertility in a secondary referral center in India. *J Clin Lab Anal* **2008**; 22:29–38.
6. **Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ.** Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **1998**;13:1864–71.
7. **Tremellen K.** Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. *Hum Reprod Update* **2008**;14:243–58.
8. **Verit FF, Verit A, Kocyigit A, Ciftci H, Celik H, Koksall M.** No increase in sperm DNA damage and seminal oxidative stress in patients with idiopathic infertility. *Arch Gynecol Obstet* **2006**; 274:339–44.
9. **Du Plessis SS, Agarwal, A, Halabi, J, Tvrda E.** Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **2015**; 32(4), 509-520.
10. **Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A.** Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl*, **2006**; 8:11-29.
11. **Zini A, Libman J.** Sperm DNA damage: clinical significance in theera of assisted reproduction. *CMAJ*. **2006**;175:495-500.
12. **Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A.** Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. **2000**; 15:830-839.
13. **Barroso G, Morshedi M, Oehninger S.** Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in humanspermatozoa. *Human Reproduction*, **2000**; 15:1338-1344.
14. **Ramos L, Wetzels AMM.** Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by TUNEL assay. *Human reproduction*,. **2001**;16:1703-1707
15. **Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Sikka SC.** Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stres induced by  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril*, **2005**;83:95-103
16. **Mahfouz RM.** Oxidative stres and apoptotic biomarkers in human semen. Sl: sn].**2012**
17. **Piaseckal M, Gaczarzewicz D, Laszczyńska M, Starczewski A, Brodowska A.** Flow cytometry application in the assessment of sperm DNA integrity of men with asthenozoospermia. *Foliahistochemica et cytobiologica*, **2007**;45(I), 127-136.
18. **Mescher A.** Junquiera's Temel Histoloji Atlas Kitap, Nobel Kitapevleri, **2015**.
19. **Ross M, Pavlina W.** Histology; A text and atlas with correlated cell and moleculer biology, Lippincont Williams and Wilkins, Philadelphia: Lippincott W&W, **2014**
20. **Kierszenbaum AL and Tres LL.** Histology and Cell Biology: An İntroduction to Pathology. 6th edition, *Philadelphia, PA: Elsevier Saunders*, **2012**.
21. **Temel ÖÇYÜT.** Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar, Adana, Nobel Kitabevi. **2011**.
22. **Harper MJK.** Sperm and egg transport. *Reproduction in Mammals. I. Germ Cells and Fertilization*, **1982**; 102-127.
23. **Redgrove KA, Aitken RJ, Nixon B.** More than a simple lock and key mechanism: unraveling the intricacies of sperm-zona pellucida binding. *In Binding ProteinInTech*, **2012**
24. **Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Metayer S, Thimon V, Dacheux JL.**(Post-testicular sperm environment and fertility. *Animal reproduction science*, **2004**; 82:321-339.
25. **Cornwall Gail A,** New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update*, **2009**;15 (2), 213-227
26. **Björndahl L, Mortimer D, Barratt CL, Castilla JA, Menkvel R, Kvist U, Haugen TB.** A practical guide to basic laboratory andrology. **2010**; Cambridge University Press.
27. **Amann RP, Hammerstedt RH, Veeramachaneni DN.** The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reproduction, fertilityan development*, **1993**; 5.4: 361-381.

28. **Cooper TG.** The human epididymis-is it necessary?. *International journal of andrology*, 1993;16(4), 245-250.
29. **Zigo, M.** Isolation and study of proteins with zona pellucida binding activity 2014.
30. **Betts, J. G.** Anatomy and physiology: Open Stax College, 2013.
31. **WEB\_1.**(2016). Webbilge's web site. <http://www.webbilge.net/erkek-ve-disi-ureme-hucrerlerin-olusumu/> 21.10.2017.
32. **Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis, SE.** Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction out come. *Human Reproduction*, 2010; 25(7), 1594-1608.
33. **Campbell AJ, Irvine DS.** Male infertility and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *British medicalbulletin*, 2000; 56(3), 616-629.
34. **Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF.** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, 1998; 69(3), 528-532.
35. **Fernández Gonzalez R, Moreira PN, Pérez Crespo M, Sánchez Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Gutiérrez Adán A.** Long-term effects of Mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of reproduction*, 2008; 78(4), 761-772.
36. **Perreault, SD, Aitken RJ, Baker HG, Evenson, DP, Huszar, G, Irvine, D Spano M.** Integrating new tests of sperm genetic integrity into semen analysis: breakout group discussion. *In Advances in Male Mediated Developmental Toxicity*, 2003; 253-268.
37. **Sharma RK, Said T, Agarwal, A.** Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian journal of andrology*, 2004;6(2), 139-148.
38. **Hekmatdoost A, Lakpour N, Sadeghi MR.** Sperm chromatin integrity: etiologies and mechanisms of abnormality, assays, clinical importance, preventing and repairing damage. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 2009; 1(3), 147.
39. **Ward, WS.** Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 2009; 16(1), 30-36.
40. **Singh A, Agarwal A.** The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility. *Open ReprodSci J*, 2011; 65-71.
41. **D'Occhio MJ, Hengstberger KJ, Johnston SD.** Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reprod Science*, 2007;101(1-2), 1-17.
42. **Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U.** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*, 1999; 4:31-
43. **Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Menkveld R, Gips H.** Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and sterility*, 2004; 81(4), 965-972.
44. **Vogt PH.** Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Current pharmaceutical design*, 2004; 10(5), 471-500.
45. **Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM,** Sperm protamine1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and sterility*, 2006; 86(5), 1408-1415.
46. **Simon, L, Castillo, J, Oliva, Lewis, SE.** Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive biomedicine online*, 2011; 23(6), 724-734.
47. **Yamauchi, Y, Shaman, JA, Ward, WS.** Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian journal of andrology*, 2011;13(1), 31.
48. **Aitken J, Fisher, H.** Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays*, 1994; 16(4), 259-267.
49. **Warren JS, Johnson KJ, Ward PA.** Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathology and immunopathology research*, 1987; 6(5,6), 301-315.
50. **Saleh RA, HCLD, AA** Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*, 2002; 23(6), 737-752.
51. **Aitken RJ, Baker, MA.** Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development*, 2004; 16(5), 581-588.
52. **Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, FULTON N, MILNE PA, Aitken R.** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of andrology*, 2000; 21(1), 33-44.
53. **Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed, MR.** Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210 1980; (4474), 1131-1133.

54. Balercia G, Moretti S, Vignini A, Magagnini M, Mantero F, Boscaro M, Mazzanti, L. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *Journal of Andrology*, **2004**; 25(2), 245-249.
55. Nobunaga T, Tokugawa Y, Hashimoto K, Kubota Y, Sawai, K, Kimura T, Saji, F. Elevated nitric oxide concentration in the seminal plasma of infertile males: nitric oxide inhibits sperm motility. *American Journal of Reproductive Immunology*, **1996** ; 36(4), 193-197.
56. Rosselli M, Dubey RK, Imthurn B, Macas E, Keller, PJ. Andrology: Effects of nitric oxide on human spermatozoa: evidence that nitric oxide decreases sperm motility and induces sperm toxicity. *Human Reproduction*, **1995**; 10(7), 1786-1790.
57. Landino LM, Hagedorn TD, KIM SB HOGAN, KM. Inhibition of tubulin polymerization by hypochlorous acid and chloramines. *Free Radic Biol Med*, **2011**; 50:1000-8.
58. Clark HM, Hagedorn TD, Landino LM. Hypothiocyanous acid oxidation of tubulin cysteines inhibits microtubule polymerization. *Arch Biochem Biophys*, **2014**; 541 :67-73.
59. Agarwal A, Allameneni SSR. The effect of sperm DNA damage in assisted reproduction outcomes. *Mineva Ginecol*, **2004**; 56:235-45.
60. Shamsi MB, Imam SN, Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **2011**; 28(11), 1073-1085.
61. Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Huszar G. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reproductive biomedicine online*, **2003**; 7(4), 462-468.
62. Chang FW, Sun GH, Cheng YY, Chen IC, Chien HH, Wu GJ. Effects of varicocele upon the expression of apoptosis-related proteins. *Andrologia*, **2010**; 42(4), 225-30.
63. Paul C, Povey JE, Lawrence NJ, Selfridge J, Melton DW, Saunders PT. Deletion of genes implicated in protecting the integrity of male germ cells has differential effects on the incidence of DNA breaks and germ cell loss. *PLoS One*, **2007**; 2 (10), e989.
64. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, Claussen, OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, **1999**;14(4), 1039-1049.
65. Marchesi DE, Feng, HL. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *Journal of andrology*, **2007**; 28(4), 481-489.
66. Chohan KR, Griffin, JT, Lafromboise M, Jonge CJ, Carrell, DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of andrology*, **2006**; 27(1), 53-59.
67. Muratori M, Tamburrino L, Tocci V, Costantino A, Marchiani S, Giachini C, Baldi E. Small variations in crucial steps of TUNEL assay coupled to flow cytometry greatly affect measures of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, **2010**; 31(4), 336-345.
68. Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, **2003**; 24(1), 59-66.
69. Tavailani H, Doosti M, Saeidi H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. *Clin Chim Acta*, **2005**; 356:199-203
70. Hsieh YY, Chang CC, Lin CS. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *International journal of biological sciences*, **2006**; 2:23-9
71. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of reproduction*, **1989**; 41:183-97
72. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility*, **1993**; 98: 257-65.
73. Agarwal A, Majzoub A. Laboratory tests for oxidative stress. *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India*, **2017**; 33(3), 199.
74. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition, Cambridge: *Cambridge University Press*, **2010**.
75. Dada R, Mahfouz RZ, Kumar R, Venkatesh S, Shamsi MB, Agarwal a, Talwar P, Sharma RK. A comprehensive work up for an asthenozoospermic man with repeated intracytoplasmic sperm injection (ICSI) failure. *Andrologia* **2011**; 43:368-372.
76. Biryukov, A. Novel method of selecting human spermatozoa for *In Vitro fertilization* **2013**.
77. Curi SM, Ariagno, JI, Chenlo PH, Mendeluk, GR Pugliese, MN, Sardi Segovia, L M, & Blanco, AM. Asthenozoospermia: Analysis of a large population. *Archives of Andrology*, **2003**; 49, 343-349.

78. **Wei YH, & Kao SH.** Mitochondrial DNA mutation and depletion are associated with decline of fertility and motility of human sperm. *Zoological Studies- Taipei*, **2000**;39, 1–12.
79. **Shen S, Wang J, Liang J, He, D.** Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World Journal of Urology*, **31**, **2013**; 1395–1401.
80. **Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Baldi E, Francavilla S, Lenzi A, Gandini L.** Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertility and Sterility*, **2011**; 95, 2315–2319.
81. **Sağlıç, EÜ.** İdiopatik erkek infertilitesinin gizemi: Oksidatif stres gerçek bir risk mi?. *Fertil Steril*, **2013**; 99(5), 1211-5.
82. **Verit FF, Verit A, Kocyigit A, Ciftci H, Celik H, Koksall M.** No increase in sperm DNA damage and seminal oxidative stress in patients with idiopathic infertility. *Archives of gynecology and obstetrics*, **2006**; 274(6), 339-344.
83. **Liu B, Wang P, Wang, Z Jia Y, Niu X, Wang W, Zhang W.** Analysis and difference of voltage-dependent anion channel mRNA in ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile donors and infertile patients with idiopathic asthenozoospermia. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **2010**; 27(12), 719.
84. **Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, Hammami, A.** *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* infections and semen quality of infertile men. *BMC Infectious Diseases*, **2007**;7(1), 129.
85. **Martini AC, Tissera A, Estofán D, Molina RI, Mangeaud A, de Cuneo MF, Ruiz, R. D.** Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertility and sterility*, **2010**; 94(5), 1739-1743.
86. **Pasqualotto FF, Sharma RK, Pasqualotto EB, Agarwal A.** Poor semen quality and ROS-TAC scores in patients with idiopathic infertility. *Urologia internationalis*, **2008**; 81(3), 263-270.
87. **Zuccarello D, Ferlin A, Garolla A, Pati MA, Moretti A, Cazzadore C, Foresta, C.** A possible association of a human tektin-t gene mutation (A229V) with isolated non-syndromic asthenozoospermia: case report. *Human reproduction*, **2008**; 23(4), 996-1001.
88. **Jaiswal D, Sah R, Agrawal, NK, Dwivedi U, Trivedi S, Singh K.** Combined effect of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms on human male infertility in north Indian population. *Reproductive Sciences*, **2012**; 19(3), 312-316.
89. **Russeli JK.** Varicocele in groups of fertile and subfertile males. *British medical journal*, **1954**; 1.4873: 1231.
90. World Health Organization The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertility Sterility*, **1992**; 57(6),1289–93. [
91. **Boman JM, Libman J, Zini A.** Microsurgical varicocelectomy for isolated asthenospermia. *J Urol.*, **2008**;180(5):2129–32.
92. **Schlesinger MH, Wilets IF, Nagler HM.** Treatment outcome after varicocelectomy. A critical analysis. *Urol Clin North Am*, **1994**; 21(3):517–29.
93. **Singh R, Hamada AJ, Bukavina L, Agarwal A.** Physical deformities relevant to male infertility. *Nature Reviews. Urology*, **2012**; 9(3), 156–74.
94. World Health Organization. Diabetes: The cost of diabetes *Fact sheet* 236,**2010**.
95. **Baccetti B, La Marca A, Piomboni P.** Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Human Reproduction*, **2002**; 17: 2673–2677.
96. **Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, Rigan T, Guinovart JJ, Rodriguez-Gil JE.** Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH and LH-linked mechanism. *Journal Andrology*, **2004**; 25: 706–719.
97. **Bhattacharya SM, Ghosh M, Nandi N.** Diabetes mellitus and abnormalities in semen analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, **2014**; 40(1), 167-171.
98. **Sjöberg L, Pitkaniemi J, Haapala L, Kaaja R Tuomilehto J.** Fertility in people with childhood-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* **2013**; 56, 78–81.
99. **Norman RJ, Clark, AM.** Obesity and reproductive disorders: a review. *Reproduction, Fertility, and Development*,**1998**; 10(1), 55–63.
100. **Lipsett, MB.** Physiology and pathology of the Leydig cell. *The New England Journal of Medicine*, **1980**; 303(12), 682–8.
101. **Tsujimura A, Matsumiya K, Takahashi T, Yamanaka M, Koga M, Miura H, Okuyama A.** Effect of lifestyle factors on infertility in men. *Archives of Andrology*, **2004**; 50(1), 15–7.

102. Martini AC, Molina RI, Estofán D, Senestrari D, Fiol de Cuneo M, Ruiz, R. D. Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality. *2004; Fertility and Sterility*, 82(2), 374–377.
103. Muthusami KR, Chinnaswamy P. Effect of chronic alcoholism on male fertility hormones and semen quality. *Fertility and Sterility*, **2005**; 84(4), 919–24.
104. Reina BB, Vicenta Paparella C, Nestor Feldman R. Effect of tobacco consumption on the spermatogenesis in males with idiopathic infertility *Archivos espanoles de urologia*, **2007**; 60(3), 273–7.
105. Shen HM, Chia SE, Ni Z, New AL, Lee BL, Ong, CN Detection of oxidative dna damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reproductive Toxicology*, **1997**
106. Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian journal of Pathology and Microbiology*, **2010**; 53(1), 35.
107. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Kruger, T. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Human Reproduction (Oxford, England)*, **1997**; 12(5), 987–9
108. Olooto W. Infertility in male; risk factors, causes and management- A review. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, **2012**; 2(4), 641–645.
109. Weidner W, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Pomerol, JM, Ghosh C, EAU Working Group on Male Infertility. *EAU guidelines on male infertility*, *European Urology*, **2002**; 42(4), 313–22.
110. Yeboah ED, Wadhwani, JM, & Wilson, JB. Etiological factors of male infertility in Africa. *International Journal of Fertility*, **1992**; 37(5), 300–7.
111. Diao R, Fok KL, Chen H, Yu MK, Duan Y, Chung CM, Ji Z. Deficient human  $\beta$ -defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection. *Science translational medicine*, **2014**; 6(249), 108-249.
112. Hjollund NHI, Bonde JPE, Henriksen TB, Giwercman A, Olsen J. Reproductive effects of male psychologic stress. *Epidemiology* 85 (Cambridge, Mass.), **2004**; 15(1), 21–7.
113. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AM. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. UK: Cambridge University press; **2000**; p91.
114. Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR. Infertility evaluation and treatment. USA: W.B.Saunders company. **1995**; P 62-76.
115. Wilson B. The effect of drugs on male sexual function and fertility. *The Nurse Practitioner*, **1991**; 16(9), 12–7, 21–4.
116. Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudová Z, Rubeš J, Evenson DP, Perreault SD. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environmental Health Perspectives*, **2000**; 108(9), 887.
117. Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieusset R. Occupational heat exposure and male fertility: A review. *Human Reproduction*, **1998**; 13(8), 2122–2125.
118. Agarwal A, Bragais FM, Sabanegh E. Assessing Sperm Function. *Urologic Clinics of North America*, **2008**; 35(2), 157-171.
119. Mahfouz RZ, du Plessis SS, Aziz N, Sharm R, Sabaneg E, Agarwal A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Fertility and sterility*, **2010**; 93(3), 814-821.
120. Yang Y, Cheng L, Wang Y, Han Y, Liu J Deng X, Chao L. Expression of NDUFA13 in asthenozoospermia and possible pathogenesis. *Reproductive biomedicine online*, **2017**; 34(1), 66-74.
121. Beauchamp PJ, Galle, PC, Blasco, L. Human sperm velocity and post insemination cervical mucus test in the evaluation of the infertile couple. *Archives of andrology*, **1984**; 13(2-3), 107-112
122. Ortega C, Verheyen, G Raick D, Camus M, Devroey P, Tournaye, H. Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options?. *Human reproduction update*, **2011**; 17(5), 684-692.
123. Siva AB, Kameshwari DB, Singh V, Pavani K, Sundaram CS, Rangaraj N, Deenadayal M, Shivaji S Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. *Molecular human reproduction*, **2010**; 16:452–462
124. Shen S, Wang, J, Liang J, He, D. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. *World journal of urology*, **2013**; 31(6), 1395-1401.
125. Spano M, Seli E, Bizzaro D, Manicardi GC, Sakkas D. The significance of sperm DNA strandbreaks on reproductive outcome. *Curr Opin Obstet Gynecol.*, **2005**; 17:255-260.

126. **Benchai M, Braun V, Lornage J.** Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Human Reproduction*, **2003**;18:1023-1028.
127. **Huang CC, Lin DPC, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS.** Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility Sterility*, **2005**;84:130-140.8
128. **Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P.** Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction*, **2002**;17:1257-1265.
129. **Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D. et al.** Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction*, **2006**; 21:2876-2881.
130. **Tesarik J.** Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reproduction Biomed Online*, **2005**;10: 370-375.
131. **Diao R, Fok KL, Chen H Yu MK, Duan Y, Chung CM, Ji, Z.** Deficient human  $\beta$ -defensin 1 underlies male infertility associated with poor sperm motility and genital tract infection. *Science translational medicine*, **2014**; 6(249),108-249.
132. **Balercia G, Mosca F, Mantero F, Boscaro M, Mancini A, Ricciardo-Lamonica G, Littarru G.** Coenzyme q 10 supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertility and sterility*, **2004**; 81(1), 93-98.
133. **Guo J, Zhao Y, Huang W, Hu W, Gu J, Chen C, Wang Z.** Sperm motility inversely correlates with seminal leptin levels in idiopathic asthenozoospermia. *International journal of clinical and experimental medicine*, **2014**; 7(10), 3550
134. **Eslamian G, Amirjannati N, Rashidkhani B, Sadeghi MR, Hekmatdoost A.** Intake of food groups and idiopathic asthenozoospermia: a case-control study. *Human reproduction*, **2012**; 27(11), 3328-3336.
135. **Balercia, G, Arnaldi, G, Fazioli, F, Serresi, M, Alleva, R, Mancini, A, Littarru, G. P.** Coenzyme Q10 levels in idiopathic and varicocele-associated asthenozoospermia. *Andrologia*, **2002**; 34(2),107-111.
136. **Tirabassi G, Vignini A, Tiano L, Buldreggini E, Brugè F, Silvestri, S, Balercia G.** 2015; Protective effects of coenzyme Q10 and aspartic acid on oxidative stress and DNA damage in subjects affected by idiopathic asthenozoospermia. *Endocrine*, 49(2), 549-552.
137. **Shu F, Zhou X, Li F, Lu D, Lei B, Li Q, Mao X.** Analysis of the correlation of CATSPER single nucleotide polymorphisms (SNPs) with idiopathic asthenospermia. *Journal of assisted reproduction and genetics*, **2015**; 32(11), 1643-1649.
138. **Martinez Heredia J, de Mateo S, Vidal-Taboada JM, Balleca JL, Oliva R.** Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. *Human reproduction*, **2008**;23:783-791
139. **Menkveld R, Schill WB, Kruger TF.** DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online*, **2003**;7:477-484
140. **Barroso G, Morshedi M, Oehninger S.** Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*, **2000**; 15:1338-1344.
141. **Chemes HE, Sedo, CA.** Tales of the tail and sperm headaches changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian journal of andrology*, **2012**; 14(1), 14
142. **Zhang L, Liu Z, Li X, Zhang P, Wang J, Zhu D, Ye L.** Low long non-coding RNA HOTAIR expression is associated with down-regulation of Nrf2 in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia or oligoasthenozoospermia. *International journal of clinical and experimental pathology*, **2015**; 8(11), 14198.
143. **Khalili MA, Mir-Rokni F, Kalantar SM.** Application of vitality tests on asthenozoospermic semen from infertile men. *Iranian Biomedical Journal*, **1999**; 3(3), 77-81.
144. **Zini A, Libman J.** Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*. **2006**;175:495-500.
145. **Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A.** Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, **2000**; 15:830-839.
146. **Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, Kruger TF.** DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reproductive biomedicine online*, **2003**; 7(4), 477-484.

147. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.*, **2002**;66:1061-1067.
148. Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*, **2005**;332:33-41.
149. Ramos L, Wetzels AMM. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by TUNEL assay. *Human reproduction.*, **2001**;16:1703-1707
150. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Sikka SC. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril.*, **2005**;83:95-103
151. Laberge RM, Boissonneault G. Chromatin remodeling in spermatids: a sensitive step for the genetic integrity of the male gamete. *ArchAndrol.* **2005**;51:125-133.
152. Kempisty B, Jedrzejczak P, Jagodzinski PP. Structure and role of protamines 1 and 2 in spermatogenesis and male infertility. *Ginek Pol*, **2006**;77:238-245
153. Miyagawa Y, Nishimura H, Tsujimura A. Single nucleotide polymorphisms and mutation analyses of the TNP1 and TNP2 genes of fertile and infertile human male populations. *J Androl.* **2005**;26:779-786.
154. Kempisty B, Depa Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, Jagodzinski PP. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *FoliaHistochemica et cytobiologica*, **(2007)**;45(I), 109-113
155. Collet D, Lescoat D, Boujard D, Lannou DL. Human spermatozoal nuclear maturity in normozoospermia and asthenozoospermia. *Archives of andrology*, 21(3), **1988**; 155-162.
156. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU international*, **2005**; 95(4), 503-507.
157. Sun Y, Zhang WJ, Zhao X, Yuan RP, Jiang H, Pu XP. PARK7 protein translocating into spermatozoa mitochondria in Chinese asthenozoospermia *Human Reproduction*, **2014**; 148: 249-257.
158. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility*, **2003**; 79 (3), 79-8.
159. Vatannejad A, Tavilani H, Sadeghi MR, Amanpour S, Shapourizadeh S, Doosti M. Evaluation of ROS-TAC Score and DNA Damage in Fertile Normozoospermic and Infertile Asthenozoospermic Males. *Urologyjournal*, **2017**; 14(1), 2973.
160. Amarasekara DS, Wijerathna S, Fernando C, Udagama PV. Cost-effective diagnosis of male oxidative stress using the nitrobluetetrazolium test: useful application for the developing world. *Andrologia*, **2014**; 46(2), 73-79.

## **8. ÖZGEÇMİŞ**

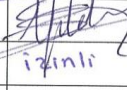
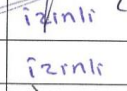
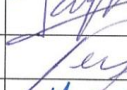
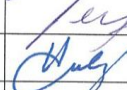
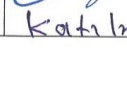
1990 yılında Bolu’da doğdum. İlköğretim ve Ortaöğretim eğitimlerimi Bolu’da tamamladım. 2008 yılında Bolu Atatürk (Y. Dil Ağırlıklı) lisesinden mezun oldum. 2009 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji (İngilizce) bölümünde eğitim almaya hak kazandım. Lisans eğitimim sırasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda staj eğitimimi tamamladım. 2014 yılında Erasmus Öğrenci Değişim Programıyla Macaristan’ın Szeged Üniversitesinde eğitim alarak 2015 yılında Biyoloji Bölümü’nden mezun oldum. Aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesi’nde Pedagojik Formasyon eğitimimi aldım ve Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.

**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU ONAYI**  
**ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY CLINICAL RESEARCHES ETHICS COMMITTEE APPROVAL**  
Sayı : 11 05/1/2017

Konu: Kararlar

|                                                |                                                 |                                                                                                                             |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BAŞVURU BİLGİLERİ<br>(APPLICATION INFORMATION) | ARAŞTIRMANIN ADI<br>(TITLE OF THE PROJECT)      | İdiyopatik ve İdiyopatik Olmayan Astenozoospermik İnfertil Hastalarda Sperm DNA bütünlüğü ve Oksidatif Hasarın incelenmesi. |
|                                                | SORUMLU ARAŞTIRMACI<br>(PRINCIPAL INVESTIGATOR) | Prof.Dr.Aysel KÜKNER                                                                                                        |
|                                                | DİĞER ARAŞTIRMACILAR<br>(OTHER INVESTIGATORS)   | Y.Lisan.Öğr.Esra FİDAN, Uzm.Sevilay ERİMSAH,<br>DoçDr.Yusufhan YAZIR, Yrd.Doç.Dr.Gülçin GACAR                               |
|                                                | ARAŞTIRMA MERKEZİ<br>(RESEARCH CENTER)          | AİBÜ Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı                                                                                  |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                          |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| KARAR<br>(DECISION) | Karar no (Decision No): 2016/93                                                                                                                                                                                                                                                        | Tarih (Date):22.12..2016 |
|                     | Prof.Dr.Aysel KÜKNER'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir. |                          |

| Üyeler                                  | Uzmanlık alanı                   | Kurumu                  | İmza                                                                                  |
|-----------------------------------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Prof. Dr. Nimet KABAKUŞ<br>(Başkan)     | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD | Tıp Fakültesi           |   |
| Prof. Dr. Safiye GÜREL<br>(Başkan Yrd.) | Radyoloji AD                     | Tıp Fakültesi           |  |
| Prof. Dr. Akçahan GEPEĞREMEN<br>(Üye)   | Farmakoloji AD                   | Tıp Fakültesi           |  |
| Doç. Dr. Hüsamettin ÇAKICI<br>(Üye)     | Ortopedi ve Travmatoloji AD      | Tıp Fakültesi           |  |
| Yrd. Doç. Dr. Mervan BEKDAŞ<br>(Üye)    | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD | Tıp Fakültesi           |  |
| Yrd. Doç. Dr. Erkan KILINÇ<br>(Üye)     | Fizyoloji AD                     | Tıp Fakültesi           |  |
| Oya KALAYCIOĞLU<br>(Üye)                | Bioistatistik                    | AİBÜ                    |  |
| Hatice Selen SÖYLEMEZ<br>(Üye)          | Eczacı                           | Özel                    |  |
| Av.Huri Hülya GÜNEŞ COŞKUN<br>(Üye)     | Hukukçu                          | Özel Hukuk Bürosu       |  |
| Abdurrahman ÇANKALOĞLU<br>(Üye)         | Öğretmen                         | İ.B Halk Eğitim Merkezi |  |



T.C.  
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOKTORA / YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI  
ORJİNALLİK RAPORU

AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

02/02/2018

Öğrencinin Adı Soyadı: Esra FİDAN  
Numarası: 17557662650  
Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji  
Lisansüstü Eğitim Düzeyi: Yüksek Lisans ☒  
Doktora ☐

Tez Başlığı: İDİYOPATİK VE İDİYOPATİK OLMAYAN ASTENOZOOSPERMİK İNFERTİL HASTALARDA SPERM DNA BÜTÜNLÜĞÜ VE OKSİDATİF HASARIN İNCELENMESİ

Yukarıda başlığı yazılı olan tez çalışmasının kapsamı sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan 84 sayfalık kısmına ilişkin 4/01/2018 tarihinde tarafımdan/tez danışmanımca Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı "alıntılar hariç" yapıldığında % 10, "alıntılar dahil" yapıldığında ise % 10 olarak tespit edilmiştir.

Uygulanan Filtrelemeler:

- 1- Kaynakça Hariç,
- 2- Alıntılar Hariç / Dahil
- 3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç.

"AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması Ve Kullanılması Uygulama Esasları" nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin tespit edileceği durumda her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bilgilerinize arz ederim.

Esra FİDAN

Öğrencinin Ad Soyad ve İmza

EK: 1 adet tezin tam başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve tezin toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde raporlama işlemi bittikten sonra alınmış ekran görüntüsü eklenecektir.

TEZ DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR  
02/02/2018  
Prof. Dr. S. K. KURBAN  
(Unvan, Ad Soyad, Tarih, İmza)

**BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU**  
(Tek sayfa olarak hazırlanacaktır)  
(Örnektir)

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı **İdiyopatik ve İdiyopatik Olmayan Astenozoospermik İnfertil Hastalarda Sperm DNA bütünlüğü ve Oksidatif Hasarın İncelenmesi** 'dir. Bu araştırmanın amacı; Geniş kapsamlı hasta anketi ve spermiyogram sonuçlarına göre seçilecek olan idiyopatik ve idiyopatik olmayan astenozoospermik infertil hastalar arasındaki farklılıkları değerlendirmeye yönelik olup, özellikle reaktif oksijen türlerinin bu hasta gruplarında sperm DNA bütünlüğü üzerine etkisini araştırmayı amaçlamaktadır. Yapılacak olan değerlendirme sonuçlarına göre idiyopatik ve idiyopatik olmayan infertilite ile ilgili elde edilecek bilgilerin bu konuda literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 05334850623 no.lu telefondan Esra FİDAN 'a başvurabilirsiniz.

Bu çalışmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır ; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı olduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Araştırmacı bilginiz dahilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Siz aittüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayımlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz (tedavinin gizli olması durumunda, gönüllüye kendine ait tıbbi bilgilere ancak verilerin analizinden sonra ulaşabileceği bildirilmelidir).

**Çalışmaya Katılma Onayı:**

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Akıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanıdı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılıma davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

|                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Gönüllünün,</b><br>Adı-Soyadı:<br>Adresi:<br>Tel.-Faks:<br><br>Tarih ve İmza:                                                         | <b>Açıklamaları yapan araştırmacının,</b><br>Adı-Soyadı: Esra FİDAN<br>Görevi: Yüksek lisans Öğrencisi<br>Adresi: A.İ.B.Ü Histoloji & Embriyoloji Anabilim Dalı<br>Tel.-Faks: 05334850623<br><br>Tarih ve İmza: |
| <b>Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasisin,</b><br><br>Adı-Soyadı:<br>Adresi:<br>Tel.-Faks:<br><br>Tarih ve İmza: | <b>Olur alma işlemine başından sonuna kadar tamkılık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,</b><br>Adı-Soyadı:<br>Görevi:<br>Adresi:<br>Tel.-Faks:<br><br>Tarih ve İmza:                                  |

\* Bu örnek form araştırmacılara fikir vermek için formda bulunması gereken asgari bilgiler verilerek hazırlanmıştır, gerektiğinde eklemeler yapılmalıdır. İstendiğinde Etik Kurul sekreterliğinden ya da Tıp Fakültesi web sayfasından temin edilerek ve üzerinde gerekli düzenlemeler yapılmak suretiyle kullanılabilir (örn. bu paragraf, metindeki noktalı kısımlar ve parantezler çıkarılmalı ve uygun şekilde düzenlenmelidir). Gönüllünün beyan ve imzası, bilgilendirme metninin devamı şeklinde olmalıdır; kesinlikle ayrı sayfalarda olmamalıdır.  
Güncelleme tarihi 28.11.2013