



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

NORMAL ERKEK VE VARİKOSEL HASTA GRUPLARINDA
SPERM DNA FRAGMENTASYONU, SPERM KROMATİN
KONDENSASYONU VE SPERM MİTOKONDRIYAL
MEMBRAN POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

Bahar SARIKAYA

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

Ekim, 2019



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

NORMAL ERKEK VE VARİKOSEL HASTA GRUPLARINDA
SPERM DNA FRAGMENTASYONU, SPERM KROMATİN
KONDENSASYONU VE SPERM MİTOKONDRIYAL
MEMBRAN POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

Bahar SARIKAYA

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

Ekim, 2019

TEZ ONAY SAYFASI



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı her hangi bir davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, çalışma ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar listesi şeklinde eklediğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Bahar SARIKAYA



TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımda başından itibaren en büyük desteğini gösteren, tecrübelerini ve değerli fikirlerini benden esirgemeyen saygı değer danışman hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Tülay İREZ başta olmak üzere Biruni Üniversitesi Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı' ndaki tüm hocalarıma, her zaman yanımda olan, beni daima destekleyen aileme, çalışmalarım boyunca bana destek olan sevgili arkadaşlarım Ayşegül AVCI ve Ecem ASLAN' a, saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bahar SARIKAYA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ONAY SAYFASI	
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
TÜRKÇE ÖZET VE ANAHTAR KELİMELEER	xi
İNGİLİZCE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELEER	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek Üreme Sistemi	3
2.1.1. Skrotum	3
2.1.2. Testis	4
2.1.3. Sertoli Hücreleri	5
2.1.4. Leydig Hücreleri	5
2.1.5. Epididim Rolü	6
2.1.6. Erkek Genital Kanal Sistemi	6
2.1.7. Seminal Veziküller	7
2.1.8. Prostat Bezi	7
2.1.9. Bulboüretal Bezler	7
2.1.10. Penis	7
2.2. İnfertilite	7
2.3. Varikosel	8
2.3.1. Varikoselin hasar oluşturma mekanizmaları	13
2.4. Spermatogenez	15
2.5. Sperm Dna Yapısı	17
2.6. Sperm Dna Hasarı	17
2.6.1. Asidik Anilin Blue (Mavisi) Boyama	18
2.6.2. Acridine Orange (Akridin Turuncusu) Boyama	18

2.6.3. CMA3 (Kromomisin A3) Boyama	18
2.7. Apoptoz.....	18
2.7.1. Propidyum İyodür	19
2.8. Sperm Mitokondri Membran Potansiyeli.....	19
2.8.1. Rhodamine 123 Boyama.....	20
2.9. Normal Sperm Yapısı.....	20
2.10. Semen Toplanması (WHO 5. Baskı, 2010).....	21
2.11. Makroskobik İnceleme.....	21
2.12. Mikroskobik İnceleme	22
2.12.1. Konsantrasyon.....	23
2.12.2. Motilite.....	23
2.12.3. Morfoloji	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Çalışmanın Tasarımı	25
3.2. Hasta Seçimi.....	25
3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	26
3.3.1. Sperm DNA Maturasyonunun Anilin Blue Boyama İle Gösterilmesi.....	26
3.3.2. Sperm DNA Fragmentasyonu'nun Acridine Orange (Akridin Turuncusu) İle Floresan Mikroskobunda Değerlendirilmesi.....	27
3.3.3. Sperm Kromatin Kondensasyonunun CMA3 (Kromomisin A3) İle Floresan Mikroskopta Değerlendirilmesi.....	27
3.3.4. Rhodamine 123/Propidyum İyodür İle Sperm Mitokondri Membran Potansiyelinin ve Apoptotik Spermilerin Belirlenmesi.....	28
3.3.5. İstatistiksel Analiz.....	29
4. BULGULAR	30
4.1. Sperm Konsantrasyon Değerlendirme Sonuçları	31
4.2. Sperm Motilite Değerlendirme Sonuçları	32
4.3. Sperm Morfoloji Değerlendirme Sonuçları	33
4.4. Sperm DNA Maturasyon Defekti Sonuçları (Anilin Blue (Mavisi) %).	34
4.5. Sperm DNA Fragmentasyon İndeksi Sonuçları(Acridine Orange/Akridin Turuncusu %).....	35
4.6. Sperm Kromatin Kondensasyon Defekti Sonuçları (Cma3 (Kromomisin A3) %)	37

4.7. Sperm Mitokondriyel Membran Potansiyeli Sonuçları	38
4.8. Apoptotik Sperm Değerlendirmesi Sonuçları Propidyum İyodür (%).....	39
5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
5.1. Öneriler	42
6. KAYNAKLAR	43
7. EKLER.....	50
EK 1. Gönüllü Olur Formu	50
EK 2. Etik Kurul Onayı.....	54
Ek 4. Hastane Onay Formu	56
8. ÖZGEÇMİŞ	57
9. İNTİHAL RAPORU	58

SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

AB	Anilin Blue (Anilin Mavisi)
AO	Acridine orange (Akridin Turuncusu)
AR	Androjen Reseptörü
CD2 +	Kadmiyum
CMA3	Chromamycine A3 (Kromamisin A3)
DFI	DNA Fragmentasyon İndeksi
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
LH	Luteinize Edici Hormon
mL	Mililitre
pH	Power of Hydrogen
Pi	Propidyum İyodür
Rh123	Rhodamine 123
ROS	Ractive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türevleri)
µL	Mikrolitre
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

TABLO LİSTESİ

Tablo No Tablo İsmi	Sayfa No
Tablo 2.1: Semen analizi normal referans değerleri	22
Tablo 4.1: Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm konsantrasyonu değerlerinin karşılaştırılması.....	31
Tablo 4.2: Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm motilitesi değerlerinin karşılaştırılması	32
Tablo 4.3: Normal erkek ve varikosel hastalarda morfoloji değerlerinin karşılaştırılması	33
Tablo 4.4: Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm DNA maturasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması.....	34
Tablo 4.5: Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm DNA Fragmentasyon indeksi değerlerinin karşılaştırılması	36
Tablo 4.6: Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm kromatin kondensasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması.....	37
Tablo 4.7: Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm mitokondri membran potansiyelinin karşılaştırılması	38
Tablo 4.8: Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında apoptotik sperm değerlerinin karşılaştırılması	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Şekil İsmi	Sayfa No
Şekil 2.1:	Erkek Üreme Sistemi	3
Şekil 2.2:	Testisin Anatomisi	4
Şekil 2.3:	Erkek Üreme Sistemi ve Kanal Sistemi.....	6
Şekil 2.4:	Varikozel Damar Yapısı	9
Şekil 2.5:	Sağ ve Sol Testis Arasındaki Anatomik Farklılık	10
Şekil 2.6:	Testis kapakçıklarında işlevsel eksiklik.....	11
Şekil 2.7:	Testiküler Yapı	11
Şekil 2.8:	Varikozele Bağlı Kısırlığa Yol Açan Patofizyolojik Nedenler.....	12
Şekil 2.9:	Spermatogenez.....	16
Şekil 2.10:	Sperm Yapısı	20
Şekil 4.1:	Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm konsantrasyonu değerlerinin karşılaştırılması.....	31
Şekil 4.2:	Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm motilitesi değerlerinin karşılaştırılması	32
Şekil 4.3:	Normal erkek ve varikozel hastalarda morfoloji değerlerinin karşılaştırılması	33
Şekil 4.4:	Asidik Anilin Blue (Mavisi) Boyama.....	34
Şekil 4.5:	Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm kromatin maturasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması.....	35
Şekil 4.6:	Acridin Orange (Turuncusu) Boyama	35
Şekil 4.7:	Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm DNA Fragmentasyon indeksi değerlerinin karşılaştırılması	36
Şekil 4.8:	CMA3 Boyama.....	37
Şekil 4.9:	Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm kromatin kondensasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.10:	Rhodamine 123/ Propidyum İyodür Boyama	38
Şekil 4.11:	Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm mitokondri membran potansiyelinin karşılaştırılması	38
Şekil 4.12:	Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında apoptotik sperm değerlerinin karşılaştırılması	39

TÜRKÇE ÖZET VE ANAHTAR KELİMELELER

SARIKAYA, B (2019). Normal Erkek Ve Varikosel Hasta Gruplarında Sperm Dna Fragmentasyonu, Sperm Kromatin Kondensasyonu Ve Sperm Mitokondriyal Membran Potansiyelinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tez, Biruni Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.

Varikosel olgularında testis hasarı ile ilgili mekanizmalar halen tartışmalıdır. Sperm DNA hasarlarının infertilitenin nedeni olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada varikosel olgularında sperm DNA fragmentasyonunun kromatin kondansasyonu, sperm apoptozu ve sperm mitokondriyal membran potansiyelinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada; Biruni Üniversite Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan semen analizi normal (n:22) grup ve klinik varikosel (n:22) hasta gruplarında WHO kriterlerine uygun standart semen analizi uygulandı. Sperm maturasyonu asidik anilin blue (mavisi) boyama yöntemi ile ve CMA3 floresan boya yöntemi ile, sperm DNA fragmentasyonu Akridin oranj floresan boyama yöntemi ile ve rhodamine123/propidyum iyodür boyama yöntem ile sperm mitokondri membran potansiyeli ve apoptotik sperm oranları değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda varikosel olguları normal olgular ile kıyaslandığında, sperm morfolojisi ve sperm motilitesinin istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdiği görülmüştür ($p<0,0001$). Sperm boyun anomalilerinin varikosel olgularında daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,0001$). Sperm immatürasyonunun ve DNA fragmentasyonunun varikosel olgularında daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,0001$). Rhodamine 123 ile ölçülen sperm mitokondri membran potansiyeli ve apoptotik sperm oranının (propidyum iyodür ile ölçülen) varikosel olgularında yüksek olduğu gösterilmiştir ($p<0,0001$). Varikoselin sperm maturasyonu ve mitokondri fizyolojisi üzerine negatif etkileri görülmüştür ($p<0,0001$). Varikosel olgularında yüksek oranda apoptotik sperm bulunmuştur ($p<0,0001$).

Sonuç olarak testis venlerinin dilatasyonu ve testis temperaturünün yükselmesi ile karakterize olan varikozel ; sperm maturasyonu , sperm DNA'sını ve mitokondriyel aktiviteyi olumsuz etkilemiştir.

Anahtar Kelimeler: Varikozel, Sperm DNA Hasarı, Rhodamine123/Propidyum İyodür Boyama



İNGİLİZCE ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER

Sarıkaya, B (2019). Investigation Of Sperm Dna Fragmentation, Sperm Chromatin Condensation And Sperm Mitochondrial Membrane Potential In Normal Male And Varicocele Patient Groups. Master Thesis, Biruni University, Institute of Graduate Education, Istanbul

The mechanisms of testicular damage in varicocele cases are still controversial. Many studies have shown that sperm DNA damage is the cause of infertility. In this study, we aimed to investigate the chromatin condensation, sperm apoptosis and sperm mitochondrial membrane potential of sperm DNA fragmentation in varicocele cases. In this study; Standard semen analysis was performed in patients who applied to Biruni University Hospital Urology Outpatient Clinic in normal (n: 22) group and clinical varicocele (n: 22) group according to WHO criteria. Sperm maturation was evaluated by acidic aniline blue (blue) staining method and CMA3 fluorescent dye method, sperm DNA fragmentation by acridine orange fluorescent staining method and rhodamine123 / propidium iodide staining method and sperm mitochondria membrane potential and apoptotic sperms were evaluated. Evaluation results were compared between groups. In our study, it was observed that sperm morphology and sperm motility showed a statistically significant decrease when varicocele cases were compared with normal cases ($p < 0.0001$). Sperm neck anomalies were higher in varicocele cases ($p < 0.0001$). Sperm immaturation and DNA fragmentation were higher in varicocele cases ($p < 0.0001$). Sperm mitochondria membrane potential and apoptotic sperm ratio (measured by propidium iodide) measured by Rhodamine 123 was shown to be high in varicocele cases ($p < 0.0001$). Varicocele had negative effects on sperm maturation and mitochondrial physiology ($p < 0.0001$). A high rate of apoptotic sperm was found in varicocele cases ($p < 0.0001$). As a result, varicocele characterized by dilatation of testicular veins and elevated testicular temperature; sperm maturation sperm DNA and mitochondrial activity have been affected negatively.

Key words : Varicocele, sperm DNA damage, Rhodamine123/propidium iodide Staining

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, reproduktif çağıdaki çiftlerin herhangi bir doğum kontrol yöntemi uygulanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması durumudur. İnfertil çiftlerin %40-%50' sini kadın faktörü oluştururken, % 30-%40' lık kısmını erkek faktörü oluşturmaktadır (Esteves ve ark., 2013). İnfertil erkeğin değerlendirmesinde hikaye, fizik muayene ve standart semen analizi göz önünde bulundurulmalıdır. İnfertil erkeğin varikosel yönünden değerlendirilmesi de önemlidir (Gomel ve ark., 2005).

Varikosel erkeğin testislerinde bulunan toplardamarların genişlemesi sonucu meydana gelen bir kısırlık nedenidir (Lundy ve ark., 2017). İnfertil erkeklerin %40' nda varikosele rastlanır. Varikosel genel olarak sol testiste meydana gelir ancak sağ testiste de rastlanabilir. Varikosel gelişiminde 3 ana teori öne sürülmektedir; sağ ve sol testislerdeki toplayıcı damarlar arasındaki anatomik farklılıklar, toplayıcı damardaki kanın geri akımı ve sol testis toplayıcı damarın baskıya uğraması ve sonuç olarak testis drenajının bozulmasıdır (toplayıcı damarların kısmi tıkanıklığı) (Sheehan ve ark., 2014). Hipoksiye yol açan hipoperfüzyon ve ısı stresi, oksidatif stres, hormonal dengesizlikler ve ekzojen toksik maddelerin varikoselin patogenezinde katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Naughton ve ark., 2001).

Klinikte yapılan çalışma raporlarında varikosel hastalarının sperm sayısı, motilite ve morfolojisinde kalıcı anormallikler bildirilmiştir (Marmar ve ark., 2007). Varikosel sonucu spermden meydana gelen anomalilerin ise sperm DNA' sında meydana gelen hasardan dolayı olabileceği düşünülmektedir (Aoki ve ark., 2003). Ayrıca sperm mitokondri membran potansiyelinde de azalma olduğu bildirilmiştir (Zou ve ark., 2010).

Sperm DNA' sında meydana gelen hasar sonucu spermler apoptotik ölüm mekanizmasını da kullanabilirler. Spermatogenezde 2 tip apoptotik görev vardır. Birinci apoptotik görev spermatozoonları yok etmek ikincisi ise sertoli hücreleri tarafından desteklenen germ hücrelerinin sayısını sınırlamaktır. Sperm DNA hasarını belirlemeye yönelik bazı yöntemler vardır. Bunlardan bir kaçısı anilin blue boyama, acridine orange boyama ve chromamycine A3 boyama yöntemleridir.

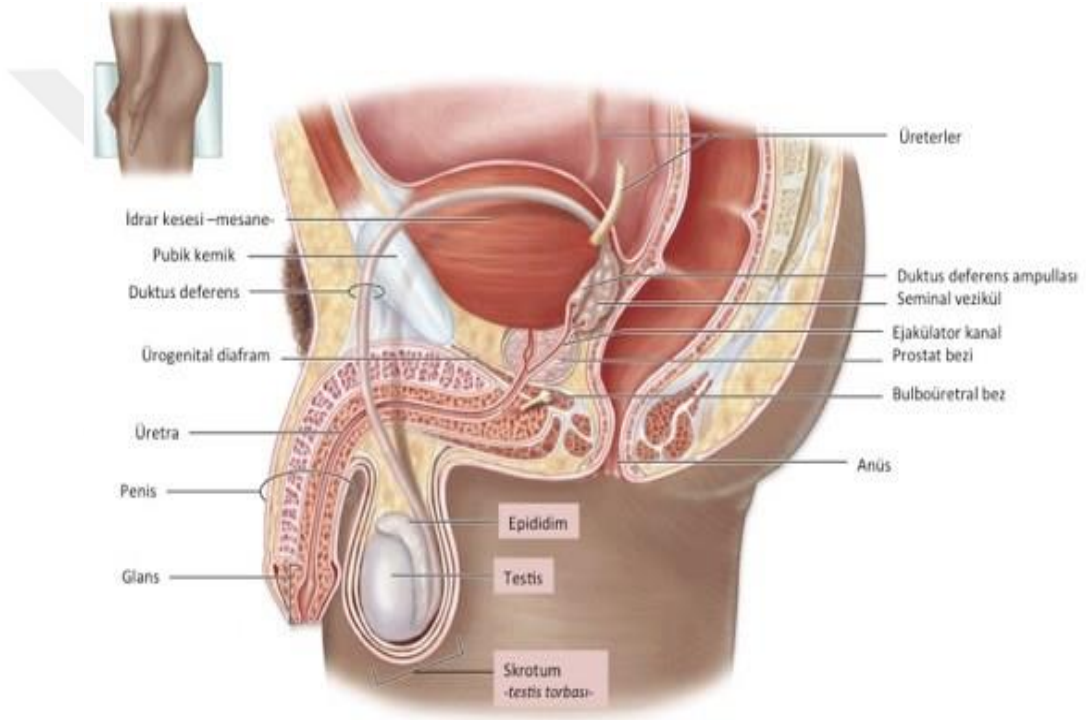
Bu çalışmada, normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm DNA hasarı belirleme yöntemleri ile sperm DNA fragmentasyonu, sperm kromatin kondensasyonu ve sperm DNA maturasyonu incelenecektir. Ayrıca rhodamine123/propidyum iyodür boyama yöntemleri kullanılarak sperm mitokondri membran potansiyeli ve sperm apoptozunun araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sisteminin işlevi sperm üretiminin devamını sağlamak ve spermleri dişi üreme sistemine aktarmaktır. Testisler, erkek üreme fizyolojisini destekleyen hormonların üretimi, androjen üretimi ve sperm üretimi için önemli bir faktördür. Erkek üreme sistemi skrotum ve penisten oluşur. Sperm olgunlaşma sürecinde iç genital sistem ve sperm üretiminde işlevi olan kanallar ve yardımcı bezlerde önemlidir (Reece ve ark., 2015).



Şekil 2.1: Erkek Üreme Sistemi

(Ürolinik Ürolojide Robotik Cerrahi Merkezi, 2018)

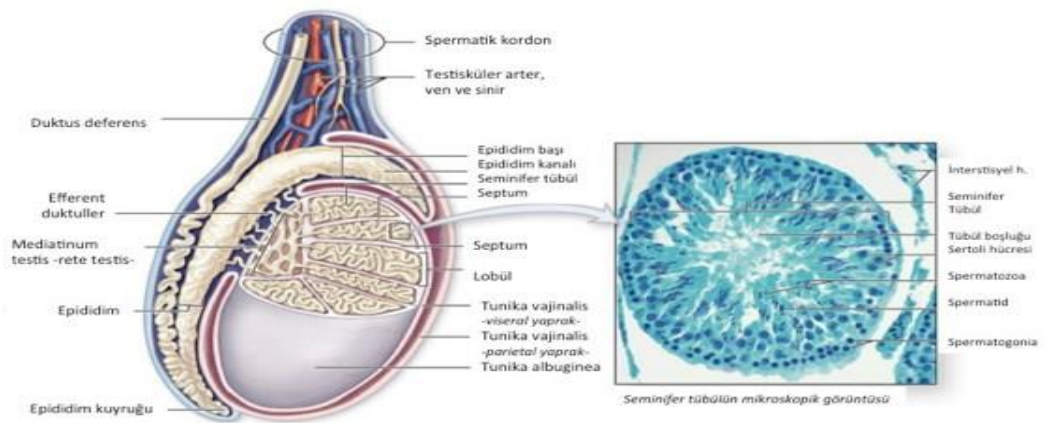
2.1.1. Skrotum

Testisler penisin arkasından uzanan skrotum adı verilen deri kaplı, yüksek pigmentli, kaslı bir yapının içinde bulunur. Bu konum testislerde oluşan sperm üretimi için önemlidir ve testisler vücut sıcaklığının 2-4 °C altında tutulduğunda sperm üretimi daha verimli olur. Dartos kası, skrotumun deri altı kas katmanını oluşturur. Her biri bir testis barındıran, skrotumu iki bölmeye ayıran bir duvar olan skrotal septumu

oluşturmak için devam eder. Karın duvarının iç tarafından aşağı inen her testis kasını örten iki tane kas yapısı vardır. Bu kaslar aynı anda kasılma yaparak soğuk havalarda testislerin yükselmesini sağlar. Testisleri vücuda yaklaştırarak sıcaklığı korumak için skrotumun yüzey alanını azaltır. Alternatif olarak ortam sıcaklığı arttıkça, skrotum gevşer, testisleri vücut merkezinden uzağa hareket ettirir ve ısı kaybını teşvik eden skrotal yüzey alanını artırır. Dışarıdan skrotum, rapha olarak adlandırılan yüzeyde yükselmiş bir medial kalınlaşmaya sahiptir (Syed ve ark., 2019).

2.1.2. Testis

Testislerin her biri yaklaşık 4-5 cm uzunluğundadır ve skrotum içinde yerleştirilmiştir. İki ayrı koruyucu bağ dokusu katmanıyla çevrilidirler. Dış tunica vaginalis, hem pariyetal hem de ince visceral bir tabakaya sahip seröz bir zardır. Tunica vaginalis' in altında, testisin kendisini kaplayan sert, beyaz yoğun bir bağ dokusu tabası olan tunica albuginea bulunur. Tunica albuginea sadece testisin dışını örtmekle kalmaz, aynı zamanda testisi lobül adı verilen 300-400 yapıya bölen septa oluşturmaya da başlar. Lobüllerde sperm seminifer tübülleri denilen yapılarda gelişir. Bir erkek fetüsün gelişim periyodunun 7. ayında, her testis skrotal boşluğa inmek için karın kas sisteminin içinden geçer. Buna “testisin inişi” denir. Kriptorşidizm testislerden biri veya her ikisi de doğumdan önce skrotuma inmediği zaman kullanılan klinik terimdir (Junquera ve ark., 1998).



Şekil 2.2: Testisin Anatomisi

Kaynak: (Ürolinik Ürolojide Robotik Cerrahi Merkezi, 2018)

Sıkıca sarılmış tübüller her bir testisin kütlesini oluşturur. Oluşan spermin testisin kanal sistemine bırakıldığı tübülün içi gelişmekte olan sperm hücrelerinden oluşur. Spesifik olarak, seminifer tübüllerin lümenindeki sperm, düz borulara ve oradan da rete testis denilen ince bir boru ağına ilerler. Sperm retina testislerini ve testisin kendisini, tunika albuginea’ dan geçen 15 ile 20 elastik kanaldan terk eder. Seminifer boruların içinde altı farklı hücre tipi vardır. Bunlar arasında destekleyici hücreler ve germ hücreleri olarak adlandırılan beş tür sperm hücresi bulunur. Germ hücresi gelişimi, bazal membrandan (tübülün çevresinde) lümene doğru ilerler (Jensen ve ark., 1995).

2.1.3. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri gelişmekte olan sperm hücrelerini destekler. Tipik olarak, epitel dokusunda bulunurlar. Sertoli hücreleri destekleyici hücre türleridir. Sperm üretimini teşvik eden ve germ hücrelerinin yaşayıp yaşamadığını kontrol edebilen sinyal molekülleri salgılar (Eşrefoğlu ve ark., 2016). Bunlar, seminifer tübüllerin periferik bazal zarından lümen içine germ hücrelerinin etrafında fiziksel olarak uzanmaktadır. Bu hücreler arasındaki sıkı kavşaklar, kanla taşınan maddelerin germ hücrelerine ulaşmasını engelleyen ve aynı zamanda, mikrop hücrelerinin kan akışına kaçmasını ve otoimmün bir tepkiye neden olmasını sağlayan yüzey antijenlerini tutar, kan-testis bariyeri oluşturur (Kierszenbaum ve ark., 2006).

2.1.4. Leydig Hücreleri

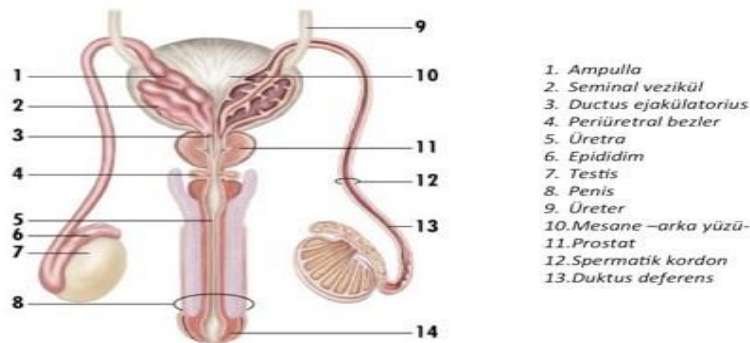
Leydig hücreleri bir androjen olan testosteron üretiminden sorumludur. Leydig hücreleri intertübüler alanda bulunurlar. Leydig hücreleri sentezlenen testosteron hormonunun kan ve lenf kapillerine boşaltılmasını sağlayarak endokrin sekresyon yaparlar (Kierszenbaum ve ark., 2006). Erkek embriyolarında, testosteron Leydig hücreleri tarafından yedinci gelişme haftasında salgılanır ve ikinci trimesterde en yüksek konsantrasyonlara ulaşılır. Testosteronun bu erken salınımı, erkek cinsel organlarının anatomik farklılaşması ile sonuçlanır. Çocuklukta testosteron konsantrasyonları düşüktür. Ergenlik döneminde artar, karakteristik fiziksel değişiklikleri harekete geçirir ve spermatogenezi başlatır (Gartner ve ark., 2016).

2.1.5. Epididim Rolü

Seminifer tübüllerindeki spermier olgunlaşmaya devam ederken testise bağlı sarılmış bir tüp olan epididime taşınır. Her ne kadar epididim sıkıca sarılmış bi halde bulunsa da tamamen düzleştğinde 4-6 m uzunluğunda olur. Spermin epididim bobinleri içinde hareket etmesi ortalama 12 gün sürer ve insanlarda kaydedilen en kısa geçiş süresi bir gündür. Sperm, epididimisin kafasına girer ve esas olarak epididim tüplerini kaplayan düz kasların kasılmasıyla hareket eder. Epididiminin uzunluğu boyunca hareket ettiklerinden, spermier daha da olgunlaşır ve kendi güçleri altında hareket etme yeteneği kazanır. Dişı üreme kanalının içine girdiğinde, bu yeteneği bağımsız olarak döllenmemiş yumurtaya doğru hareket etmek için kullanacaklar. Daha olgun olan sperm daha sonra boşalma gerçekteşene kadar epididim kuyruğunda depolanır (Junquiera ve ark., 1998).

2.1.6. Erkek Genital Kanal Sistemi

Sperm epididimis kuyruğundan ayrılıp duktus deferense geçer. Bu geçiş yumuşak bir kas kasılmasıyla meydana gelir. Duktus deferens, skrotumun içinde bağ dokusu, kan damarları ve sinirleri spermatik kord adı verilen yapıya birleştiren kalın kaslı bir tüptür. Epididim sonunda duktus deferens bulunur ve oradan inguinal kanaldan karın boşluğuna uzanır. Buradan duktus deferens pelvik boşluğa posterior olarak devam eder. Ampulla olarak adlandırılan bölgede açıldığı mesanenin posterioruna son verir. Ampulla sonunda seminal vezikül kanallarıyla beraber prostata girer ve üretraya açılır (Junquiera ve ark., 1998).



Şekil 2.3: Erkek Üreme Sistemi ve Kanal Sistemi

Kaynak: (Ürolinik Ürolojide Robotik Cerrahi Merkezi, 2018)

2.1.7. Seminal Veziküller

Seminal veziküller semen hacminin yaklaşık %60' ına katkıda bulunan bezlerdir. Seminal veziküller mesanenin arkasında yer alır. Seminal vezikül sıvısı, sperm mitokondri tarafından dişi üreme sistemi boyunca harekete izin vermek ve ATP üretmek için kullanılan büyük miktarlarda fruktoz içerir (Kierszenbaum ve ark., 2006).

2.1.8. Prostat Bezi

Merkezi olarak yerleştirilmiş olan prostat bezi, prostat idrar yolunu saran mesanenin tabanındaki rektumun önünde durur. Bir ceviz büyüklüğündeki prostat hem kas hem de glandüler dokulardan oluşur. Semen içeriğinin %20-30' unu oluşturur. Semen geçici olarak kalınlaşmasına ve dişi üreme sistemi içerisinde kalmasına yardımcı olur. Spermin seminal vezikül salgıları tarafından sağlanan fruktozu kullanması için zaman sağlar. Semen sıvı halini yeniden kazandığında sperm dişi üreme sisteminde hızlı ilerlemeye devam eder (Gartner ve ark., 2016)

2.1.9. Bulboüretal Bezler

Üretranın idrar atıklarından temizlenmesine yardımcı olur. Kalın ve tuzlu bir sıvı salgılayan iki adet bulboüretal bez bulunmaktadır. Bu bezler tarafından salgılanan sıvı semen salınımından kısa bir süre önce salgılanır (Kierszenbaum ve ark., 2006).

2.1.10. Penis

İdrarın ve semenin vücut dışına salınmasına ve spermin dişi üreme sistemine bırakılmasını sağlayan organdır (Eşrefoğlu ve ark., 2016). Başlıca üç silindirik erektile doku kitlesi ile üretrayı içerir. Dış kısmı ise deri ile sınırlıdır (Junquiera ve ark., 1998).

2.2. İnfertilite

İnfertilite, reproduktif çağıdaki çiftlerin herhangi bir doğum kontrol yöntemi uygulanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması durumudur. İnfertilite çiftlerin yaklaşık % 15' ini etkilemektedir (Esteves ve ark., 2015).

İnfertil çiftlerin %40-%50' sini kadın faktörü oluştururken, % 30-%40' lık kısmını erkek faktörü oluşturmaktadır. %20-%25' ini hem kadın hem erkek faktörü oluştur (Esteves ve ark., 2013). Çiftlerin % 15' inde ise yapılan birinci basamak testler ile gebeliğe engel olan herhangi bir problem tespit edilememektedir (Esteves ve ark., 2011). Bu grup “İdiopatik (Açıklanamayan) İnfertilite” olarak adlandırılmaktadır. Reprodüktif çağıdaki erkeklerin yaklaşık % 6' sında infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Bunun yaklaşık % 90' ında ise sperm anomalileri söz konusudur (Caprio ve ark., 2015).

Son zamanlarda yeni tanısal testler bulunmuş ve yardımcı üreme teknikleri ileri düzeyde gelişmiştir. Bu durum üreme sağlığı tedavisindeki başarı oranlarını artırmıştır. İnfertil erkeklerin % 60' ında matür germ hücre üretiminde bozukluk ya da düşük sayıda sperm üretimi görülmektedir. Erkek üreme sağlığını etkileyen faktörler arasında kromozomal anomaliler, hormonlar, sperm üretimi, sperm kanalında hormonların taşınması ve cinsel fonksiyonlar gibi etmenler bulunmaktadır. Bunlardan herhangi birinde meydana gelen bir anomali infertiliteye neden olmaktadır. Erkek infertilitesinin en sık nedeni “İdiopatik İnfertilite” dir (Esteves ve ark., 2013).

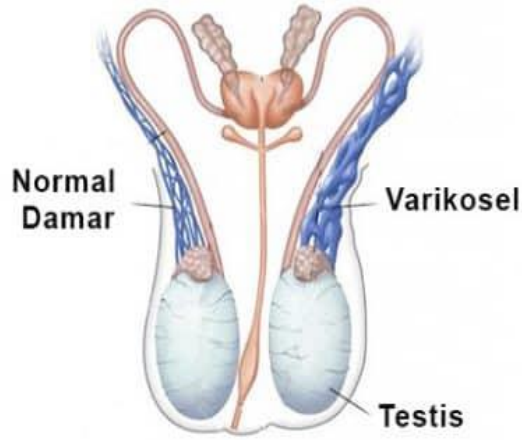
İnfertil bir erkeğin değerlendirilmesinde dikkat edilmesi gereken sıralama şu şekildedir;

Hikaye, fizik muayene ve standart semen analizi infertil erkek değerlendirilirken göz önünde bulundurulmalıdır. Değerlendirme esnasında; evlilik süresi, korunma yöntemleri, infertilite süresi, uygulanan tedaviler, ilişki sıklığı ve zamanı sorgulanmalıdır. Çocukluk ve gelişme dönemine ait kriptorşidizm ve bunun için geçirilen ameliyatlar, testis tümörü ameliyatları, testise yönelik kazalar, travmalar, sistemik hastalıklar (Diabetes Mellitus, Multipl Skleroz) için uygulanan tedaviler, ergenlik döneminde geçirilen ateşli hastalıklar (kabakulak, menenjit), testis torsiyonu, puberte yaşı, aile öyküsü (kistik fibrozis), iş yerinde kullanılan kimyasallar ve zehirli gazlar, hastanın alkol ve sigara kullanımı sorgulanmalıdır (Gomel ve ark., 2005).

2.3. Varikosel

Varikosel erkeğin testislerinde bulunan toplardamarların genişlemesi sonucu meydana gelen bir kısırlık nedenidir. Daha basit bir anlatımla testisin kan dolaşımını

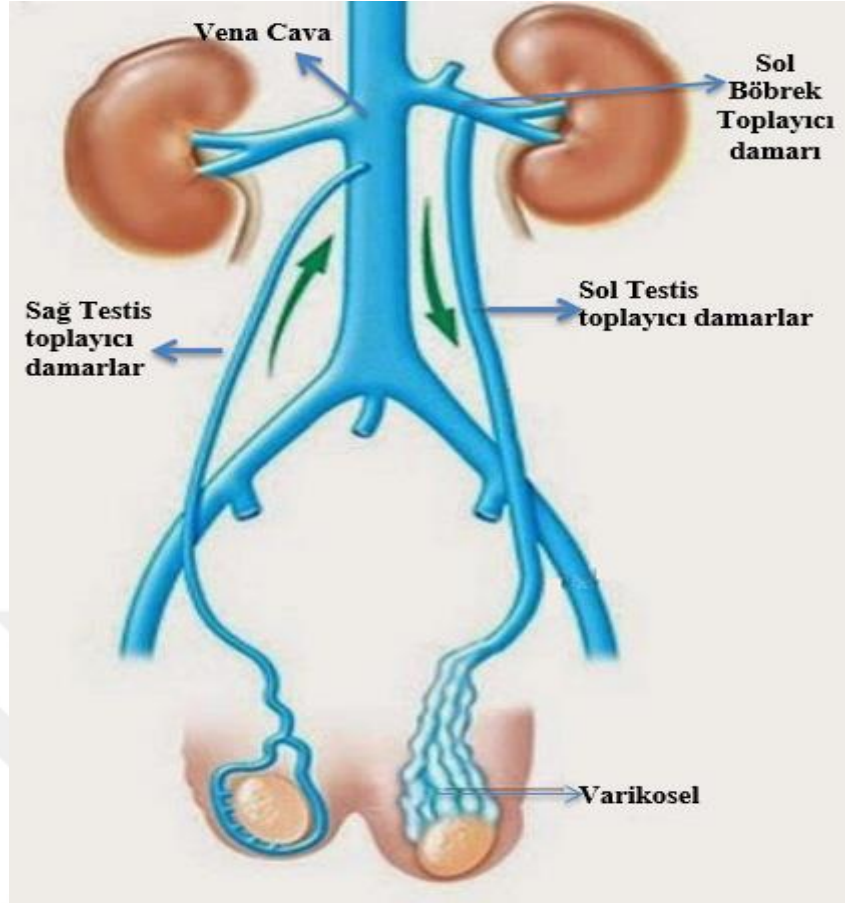
sağlayan toplardamarlarda varislerin oluşmasıyla varikozel meydana gelir (Lundy ve ark., 2017).



Şekil 2.4: Varikozel Damar Yapısı

Kaynak: (medicalacademi.com.tr, Erişim Tarihi: 19 Temmuz 2019)

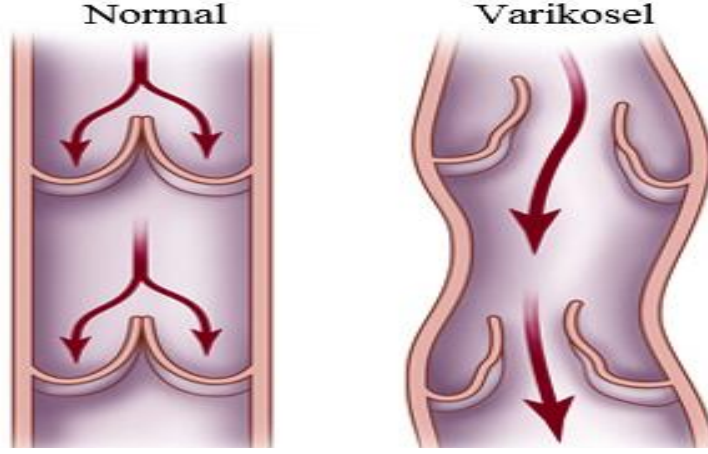
Erkeklerin yaklaşık %15 i skrotal varikozel hastasıdır. Varikozele infertil erkeklerin %40' nda rastlanır (Sönmez ve ark., 2018). Primer infertilite ile başvuran erkekler %19-41 aralığında varikozelden etkilenirken sekonder infertilite ile başvuran erkeklerin %45-81' i etkilenir (Lomboy ve ark., 2016). Varikozel genellikle asemptomatiktir ve sol taraflıdır. Varikozele sağ testise oranla sol testiste daha fazla rastlandığı yapılan değerlendirmeler sonucunda belirtilmiştir (Afshar ve ark., 2018). Yalnızca sol testiste varikozelin görülme sıklığı %90 oranındadır. Sağ testiste görülme sıklığı ise %2 civarındadır (Lundy ve ark., 2017). Sağ ve sol testislerdeki toplayıcı damarlar arasındaki anatomik farklılıklar varikozel gelişimi açısından önemli olan 3 teoriden ilkidir. Sağ testis toplayıcı damar ana damara doğrudan bağlanır. Sol testis toplayıcı damar ise dik açı ile sol böbrek toplayıcı damarına bağlanır. Sol böbrek toplayıcı damar ise sağ böbrek toplayıcı damarın 8-10 cm daha yukarisından ana damara dik açı ile bağlanmıştır (Lundy ve ark., 2017). Bu anatomik farklılıktan dolayı sol testis sağ testise oranla daha fazla basınca sahiptir.



Şekil 2.5: Sağ ve Sol Testis Arasındaki Anatomik Farklılık

Kaynak: (Dubin ve ark., 1970)

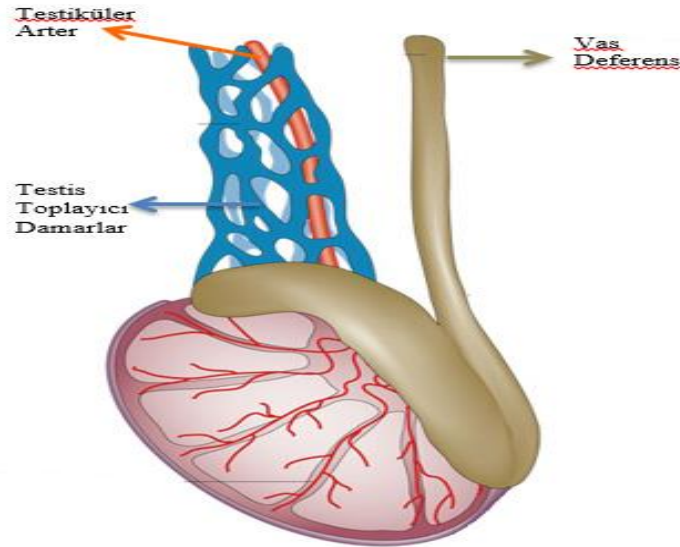
İkinci teori ise toplayıcı damardaki kanın geri akımıdır. Testislerde kirli kanı alıp temiz kanı testislere taşıyan ve kan transferini sağlayan kapakçıklar vardır. Varikozel varlığında bu kapakçıklarda işlevsel eksikliğe ya da kapakçıkların tamamen yokluğuna rastlanır. Sonuç olarak damar genişliği gözlemlenir. Sol testiste anatomik farklılıktan dolayı daha yavaş bir kan akımı söz konusudur. Kan akımının yavaşlamasıyla kirli kan testis damarından boşaltılamaz ve burada birikir. Sonuç olarak varikozel sorunu ortaya çıkar (Sheehan ve ark., 2014).



Şekil 2.6: Testis kapakçıklarında işlevsel eksiklik

Kaynak: (Benoff ve ark., 1997)

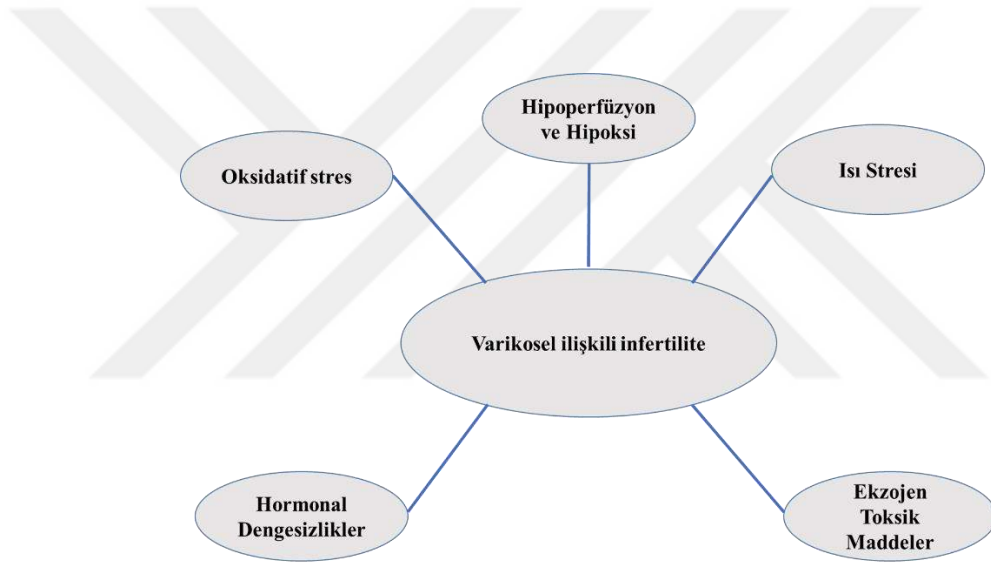
Varikozel gelişiminde öne sürülen sonuncu teori ise sol testis toplayıcı damarın baskıya uğraması sonucu testis drenajının bozulmasıdır. Sol testis toplayıcı damar ana atardamar ve bağırsakları besleyen atardamar arasında baskıya uğrar (Sheehan ve ark., 2014). Bununla birlikte, intratestiküler sıcaklık artışı, testis hipoksisi, menide antioksidan birikimi, böbrek ve adrenal metabolit geri akımı ve anti-sperm antikorlar varikozele bağlı testiküler fonksiyon bozukluğuna neden olabilir (Sönmez ve ark., 2018).



Şekil 2.7: Testiküler Yapı

Kaynak: (Jensen ve ark., 2017)

Varikosel, testiküler hücre apoptozunu indükleyen ve reaktif oksijen türlerini (ROS) arttıran, testiküler DNA polimeraz aktivitesini azaltan, sertoli hücresel fonksiyonunu değiştiren ve leydig hücrelerinin testosteron üretimini azaltan hücresel düzeyde değişikliklere neden olabilir. Bunlara ek olarak kısırlığa neden olabilir (Sönmez ve ark., 2018). Varikosele bağlı kısırlığa yol açan fizyopatolojik nedenler henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Hipoksiye yol açan hipoperfüzyon, ısı stresi, oksidatif stres, hormonal dengesizlikler ve eksojen toksik maddelerin varikoselin patogenezeine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yine de bu beş mekanizma tek başına varikoselin spermatogenez üzerine etkisinin tam olarak anlaşılmasını sağlamamaktadır (Naughton ve ark., 2001).



Şekil 2.8: Varikosele Bağlı Kısırlığa Yol Açan Patofizyolojik Nedenler

Kaynak: (Naughton ve ark., 2001)

İnfertilite ile ortaya çıkan varikoselli erkeklerin hepsinde, moleküler ve genetik faktörlerin aslında varikosele bağlı kısırlığın patogenezi anlamada rol oynadığı düşünülmektedir. Klinikte yapılan çalışma raporlarında varikosel hastalarının sperm sayısı, motilite ve morfolojisinde kalıcı anormallikler bildirilmiştir (Marmar ve ark., 2001). Varikoselin germ hücre apoptozunu arttırdığı bulunmuş ve oligospermiye neden olabileceği gösterilmiştir (Bargawi ve ark., 2004). Klinik varikoseli olan bazı erkeklerin normal semen morfolojisine rağmen infertil olduğu gösterilmiştir.

Birçok çalışma zona pellusida bağlanması arasındaki akrozom reaksiyonuna odaklanmıştır ve çalışmalar sonucu anormal akrozom reaksiyonuna rastlanmıştır (Camlı ve ark., 2000). Varikoselin en çok görülen klinik belirtileri kronik skrotal ağrı ve kısırlıktır. Varikozel ile ilişkili ağrının etiyolojisi tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak varikozelle ilişkili testis ağrıları testis, skrotum veya kasıkta donuk, ağırlı veya zonklayan bir ağrı olarak tarif edilir (Paick ve ark., 2019).

2.3.1. Varikoselin hasar oluşturma mekanizmaları

Hipoperfüzyon ve Hipoksi: Testislerde, damarlardaki kan basıncı, vücuttaki diğer birçok dokuya kıyasla çok düşüktür. Sonuç olarak, testis mikro ortamı kan basıncındaki minimum değişikliklere karşı bile oldukça hassastır (Sweeney ve ark., 1991). Varikoselli erkeklerde testislerde damar genişlemesi sonucu kirli kan birikir buda geri akıma sebep olur. Testislerde geri akım ısı değişimini bozmakta ve skrotumda yüksek sıcaklıklara neden olmaktadır. Ayrıca damarlardaki artan basınç sonucu damar büzüşmesi meydana gelir. Buda testislerin hipoperfüzyonuna yol açar (Gat ve ark., 2005). Sonuç olarak testiküler mikro ortamdaki hücrelere oksijen ve besin salınımı azalır.

Isı ve Stres: Varikoselli erkeklerde damar genişlemesi sonucu testislerde oluşan geri akımın testislerde ısı değişimine sebep olduğu bilinmektedir. Testislerde DNA sentezinde görevli enzimlerin çoğu sıcaklığa bağlı bir şekilde işlev görür ve normal testis ortamının düşük sıcaklıklarında optimum aktivite sergiler (Fujisawa ve ark., 1988). Varikozel ile ilişkili yüksek sıcaklıklar, bu enzimlerin işlevini bozabilecek ısı stresi empoze eder (Fujisawa ve ark., 1988). Aslında, Fujisawa ve ark. infertilite ile başvuran varikoselli erkeklerin, DNA sentezinde rol oynayan iki temel enzim olan topoizomera I ve DNA polimeraz aktivitesinde azalma olduğunu göstermiştir (Fujisawa ve ark., 1988). Spermdede protein sentezinin de sıcaklık bağımlılığı gösterdiği gösterilmiştir (Fujisawa ve ark., 1988).

Çalışmalar sonucunda, protein ürünleri hücreyi yüksek sıcaklıklara karşı koruyan ve spermin normal fizyolojik fonksiyonlarının çoğundan sorumlu olanlar da dahil olmak üzere birçok genin ekspresyonundaki farklılıkların sperm hücrelerinin duyarlılığına katkıda bulunabileceğini gösterilmiştir. Varikozele bağlı ısı stresi, bu nedenle varikozele bağlı kısırlığa katkıda bulunur.

Oksidatif Stres: Reaktif oksijen türleri (ROS), hayati hücresele olaylarda kilit düzenleyiciler olarak görev yapan hücrede bulunan çeşitli metabolik yolakların yan ürünleridir (Griveau ve ark., 1997;Rakesh ve ark., 1996). Erkek üreme sisteminde, ROS sperm fonksiyonunda önemli roller oynar. ROS aracılı sinyal iletim yolları, spermin fonksiyonel olgunluğuna ulaştığı tüm süreçler, kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozomal reaksiyon için gereklidir (Lamirande ve ark., 1995). Ayrıca, membran lipidlerinin ROS aracılı lipid peroksidasyonu, döllenme sürecinde oosite sperm yapışmasını kolaylaştırır (Kodama ve ark., 1996). Varikoseli olan infertil erkeklerden alınan semen örneklerinde yüksek ROS seviyeleri görölmüştür (Weese ve ark., 1993). Varikoselin kısırlığa katkıda bulunduğ u potansiyel mekanizmalardan biri, sperm kafasında artan ROS üretimidir ve bu durum DNA' ya zarar veren yüksek oksidatif stres seviyelerine yol açar (Sharma ve ark., 1999).

Hormonal Dengesizlikler: Leydig hücreleri, luteinize edici hormon (LH) tarafından uyarılmaya cevap olarak, testislerde lokal olarak sinyal veren testosteronu sentezler ve salgırlar. Testosteron, uygun spermatogenez için gerekli olduğ undan, leydig hücre fonksiyonundaki ve dolayısıyla testosteron seviyelerindeki bozuklukların, varikosele bağı l infertilitenin fiyopatolojisine katkıda bulunabileceğ i düşünölmektedir. Testosteron, DNA' yı bağı layan ve birçok androjen aktivitesini kontrol eden bir kompleks oluşturmak için androjen reseptörüne (AR) bağı lanır. AR ekspresyonu, varikoseli olan infertil erkeklerde düşük oranda rastlanmıştır. Zalata ve ark. AR ifadesinin sperm sayısı, sperm motilitesi ve sperm morfolojisi ile yüksek derecede korele olduğ unu gösterir (Zalata ve ark., 2013).

Ekzojen Toksik Maddeler: Son zamanlarda, araştırmacılar mesleki ve çevresel risklerin varikosele bağı l kısırlığ a katkısını araştırmıştır. Sigara içimi ve düşük sperm kalitesi arasında sağı lam bir ilişki olduğ u, kadmiyum (Cd²⁺ + dahil) dahil olmak üzere sigara dumanındaki toksik maddelere maruz kalmanın sigara içenlerde varikosele ve kısırlığ a yol açabileceğ ini göstermiştir (Vine ve ark., 1996). Aslında, araştırmacılar sadece testislerde, testis damarlarında ve varikoselli erkeklerin seminal sıvısında yüksek Cd²⁺ + seviyeleri bildirmemiş , aynı zamanda varikoseli olan erkeklerde Cd²⁺ + seviyelerinin bozulmuş testiküler fonksiyonu öngördüğ ünü bulmuşlardır (Benoff ve ark., 2004;Jeng SY, 2009). Cd²⁺ + homeostazını kontrol eden genetik ve moleküler mekanizmalardaki lezyonların, varikoseli olan erkeklerde

yüksek Cd²⁺ + seviyelerini açıklayabilmesi ve varikosele bağlı kısırlığa katkıda bulunabilmesi mümkündür (Benoff S ve ark., 1997).

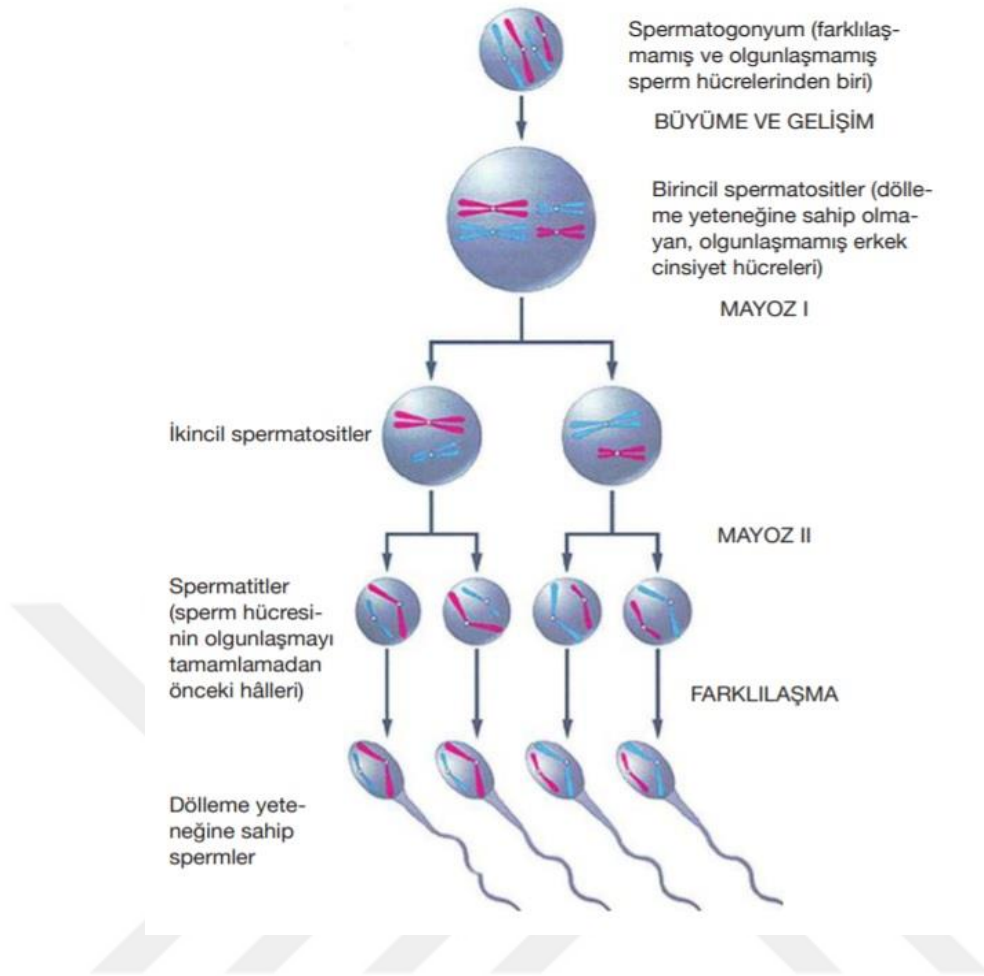
Varikozel hastalarında cerrahi onarım spermatik kordun genişlemiş damarlarını temizlemede başarılı olabilir. Varikoselektomi sonrası sperm parametrelerindeki gelişmeler kolayca değerlendirilebilir. Varikozelin cerrahi onarımının sperm parametrelerini iyileştirdiğini, sperm DNA hasarını azalttığını gösteren birçok çalışma vardır (Barekat ve ark., 2016).

2.4. Spermatogenez

Testisin kök hücreleri olan spermatogoniumların farklılaşarak olgun spermatozoonlara dönüşmesi sürecine spermatogenez denir (Mazumdar ve ark., 1998). Spermatogenez her bir testisin kütlesini oluşturan seminifer tübüllerinde meydana gelir. Spermatogenez puberte ile birlikte başlar ve gonodotropin hormonunun artmasıyla beraber yaşam boyu devam eder (Levy ve ark., 2001).

Primordial germ hücreleri fetal dönemin 6. haftasında vitellüs kesesinin duvarından testislere ulaşır. Testislerde inaktif olarak seminifer tübüllerinde bulunurlar. Puberteye kadar sessiz kalır ve sürekli olarak mitozla çoğalırlar. İnsanda spermatogenetik 3 tip hücre vardır. Koyu Tip A, açık tip A ve tip B. Koyu tip A spermatogoniumlar kök hücrelerdir. Bölünerek açık tip A spermatogoniumlara farklılaşırlar. Açık tip A spermatogoniumlar mitoz bölünme ile tip B spermatogoniumları oluştururlar. Tip B spermatogoniumlar primer spermatositleri oluşturan progenitor hücrelerdir (Sigman ve ark., 1998). Primer spermatositler oluşur oluşmaz mayoz bölünmenin profazına girer ve profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürer. Bu süreçte germ hücreleri 46 kromozoma sahiptir. Daha sonra mayoz bölünme geçirerek diploit (2n) yapıdan 23 kromozomlu haploit yapıya dönüşürler (Gedikli ve ark., 2013).

Primer spermatositler mayozun 1. evresine girdiğinde DNA' larını eşlerler. Sekonder spermatositler 1. Mayoz tamamlandığında oluşmaya başlar. Sekonder spermatositler 23 haploit kromozom ve DNA' nın yarısını yani 2n DNA taşırlar. Daha sonra sekonder spermatositler 2. mayoz girer ve 23 haploid (n DNA) kromozom içeren spermatidleri oluştururlar.



Şekil 2.9: Spermatogenez

Kaynak: (yenibiyoloji.com, 2017)

Daha sonra spermiyogenez yani farklılaşma evresi başlar;

Spermiyogenez evresinde hücre bölünmesi olmaz. Bu süreçte spermatidler gelişir ve farklılaşır. Spermatidler süreç sonunda olgun spermiumlara farklılaşırlar. Spermatidlerin olgun spermiumlara dönüşmesi olayına spermiyogenez denir. Daha sonra seminifer tübül lümenine atılırlar (Gartner ve ark., 2016). Spermatidler seminifer tübül lümeninde sertoli hücreleri tarafından beslenir, yeniden şekillenir. Spermatozoon yapısına dönüşür. Spermatozoon dönüşümünde stoplazmanın yarısı kaybolur çekirdek yeniden oluşur, kompakt baş ve kuyruk meydana gelir (Gilbert ve ark., 2000).

Spermiyogenez golgi fazı, akrozomal faz ve maturasyon fazı olmak üzere üç evreden oluşur;

Golgi Fazı; Spermatidlerde belirgin bir golgi kompleksi, bir çift sentriyol, mitokondri, endoplazmik retikulum vardır. Akrozom spermin ön kutbundadır. Bu aşamada mitokondriler stoplazma kenarına göç eder ve plazma zarına yakınlaşır. Akrozom granülü ve vezikülü oluşur. Sentriyoller iki adet birbirine dik şekilde konumlanır ve çekirdeğin arkasına ilerler (Junqiera ve ark., 1998).

Akrozomal Faz; Akrozom vezikülü ile granülü ayrılır ve akrozom meydana gelir. Akrozomal enzimler lizozom gibi işlev görerek korono radyata hücrelerini birbirinden ayırır ve zona pellusidayı sindirirler. Çift sentriyolden bir tanesi flagellumu yani kamçıyı oluşturur. Mitokondriler kamçı çevresinde toplanırlar ve orta parçayı oluşturur (Junqiera ve ark., 1998).

Maturasyon Fazı; Spermatid stoplazması bu fazda atılır. Sertoli hücreleri tarafından stoplazma fagosit edilir. Spermatidler tübül lümenine doğru serbest hale gelir (Junqiera ve ark., 1998).

2.5. Sperm Dna Yapısı

Sperm DNA' sı nukleus içerisinde sıkıca paketlenmiş bir yapıdadır. Somatik hücre DNA' sı histonlarla paketlenmiş halde bulunurken sperm DNA' sında bu histonların %90-95' i protaminlerle yer değiştirir. Bu değişimde TP1 ve TP2 proteinleri etkilidir. Bu nükleer proteinler çoğunlukla P1 ve P2 protaminleridir. DNA ve protaminler sperm nukleusu içinde sıkıca sarmalanmış bir şekilde konumlanmaktadır. Protaminler arasında çapraz disülfid bağları vardır. Bu bağlar sperm nukleusunun yoğunlaşmasında önemlidir. Histonlarla paketlenmiş kromatin gevşek yapılıdır. Ancak protaminlerle sarılmış kromatin yapıları daha sıkı yapılıdır. Histon paketlenmesinin artması sperm DNA' sında hasar oluşumunu artırır (Güneş ve ark., 2013).

2.6. Sperm DNA Hasarı

Sperm DNA hasarı, spermatogenez sırasında yanlış kromatin paketlenmesi, apoptozis yeteneğinin kaybolması, reaktif oksijen türevlerinin artması, oksidatif stres oluşumu ya da çevresel toksinlere maruz kalma sonucunda meydana gelir (Aoki ve ark., 2003). Sperm DNA' sında onarım mekanizması yoktur. Spermdede meydana gelebilecek DNA hasarı embriyoyu olumsuz etkileyebilmektedir (Foresta ve ark.,

1992). Sperm DNA' sında %15' lik kısım histonlarla paketlenmiştir. Protamin paketlenmesi daha fazladır. İnfertil erkeklerde yapılan çalışmalar sonucunda fertil erkeklere oranla histon paketlenmesinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Tesarik ve ark., 2002). Çünkü histon paketlenmesi protamin paketlenmesine göre daha gevşektir. Bu da DNA hasarı oluşumunu arttırmaktadır. Sperm DNA hasarı aşağıdaki yöntemlerle tespit edilebilir.

2.6.1. Asidik Anilin Blue (Mavisi) Boyama

Asidik bir boya olan anilin mavisi, sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla kullanılır. Rezidüel histonlar, hasarlı DNA bulunduran spermde açığa çıkar. Bu gevşek bağlı histonlar zayıf kromatin paketlenmesine sebep olur (Dadoune ve ark., 1998). Bu zayıf paketlenme sonucu nükleoproteinlere kolay ulaşılır ve anilin mavisi gibi asidik boyalara bağlanma yatkınlığı artar. İmmatür DNA' ya sahip spermde zayıf kromatin paketlenmesinden dolayı koyu mavi boyanır (Auger ve ark., 1999).

2.6.2. Acridine Orange (Akridin Turuncusu) Boyama

Akridin turuncusu asidik koşullarda denatüre olmuş DNA' nın boyanmasını sağlayan bir boyadır. Akridin turuncusu asidik koşullarda yeşilden turuncuya dönüşür. Bu esasa dayanarak DNA denatürasyonunun floresan mikroskopta değerlendirilmesini sağlar. Boya normal DNA' ya bağlandığında yeşil floresan, denatüre olmuş DNA' ya bağlandığında kırmızı floresan verir (Evenson ve ark., 1999).

2.6.3. CMA3 (Kromomisin A3) Boyama

Sperm DNA' sı somatik hücrelerin aksine protaminlerle paketlenmiştir. Yalnızca %15' lik kısmı histonlarla paketlenmiştir. Histon paketlenmesinin arttığı spermier hasarlı spermier olarak gözlenmiştir (Güneş ve ark., 2013). CMA3 gevşek bağlı paketlenmiş kromatinde protamin eksikliğini gösteren bir florokromdur.

2.7. Apoptoz

Apoptoz programlı hücre ölümü olarak bilinir. Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin

kendisi tarafından programlanan bir mekanizma ile hücre ölümünü kontrol edebilen aktif bir işlemdir ve hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Spermatogenezde 2 tane apoptotik görev vardır (Singh ve ark., 1998). Birinci apoptotik görev anormal spermatozoonları yok etmektir. İkincisi ise sertoli hücreleri tarafından desteklenen germ hücrelerinin sayısını sınırlamaktır (Singh ve ark., 1998). Spermatogenez sırasında hücrelerin apoptotik yeteneklerini kaybetmesi DNA hasarına yol açar. Böylece hasarlı spermatozoonlar ejakülate dahil olur (Agarwal ve ark., 2005).

2.7.1. Propidyum İyodür

Propidyum iyodür (PI), canlı hücrelerin membranından geçiş yapamayarak yalnızca apoptotik hücrelerin DNA' sının boyanmasını sağlayan bir boyadır. Apoptotik hücrelerin membran bütünlüğünün bozulması sonucu hücre içine girerek apoptotik hücrelerin gösterilmesini sağlamaktadır. Propidyum iyodür ile boyanan sperm hücreleri kırmızı renkli floresan gösterir.

2.8. Sperm Mitokondri Membran Potansiyeli

Sperm mitokondrileri spermiyogenezin golgi fazında çekirdeğin yanında lokalize olurlar. Mitokondriler akrozomal evrede aksonem boyunca göç etmektedirler. Maturasyon evresinde ise orta parçada dış yoğun liflerin etrafında yer almaktadır (Kierszenbaum ve ark., 2006).

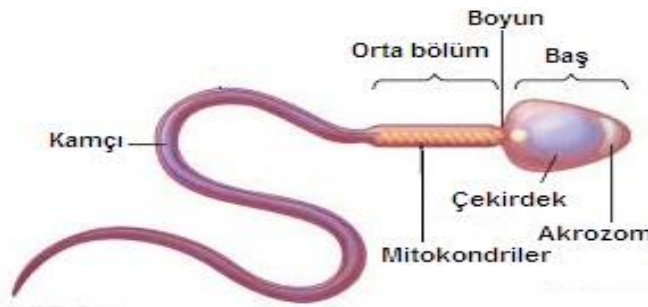
Olgun spermelerde mitokondriler orta parçada yer alır hiç hareket etmezler. Olgun spermde 70-100 arası mitokondri vardır (Miki ve ark., 2007). Totalde sperm hacminin %15-22' sini mitokondriler kaplar. Olgun spermde ATP üretiminin en fazla olduğu yer mitokondri, ATP harcanmasının en fazla olduğu yer ise kuyruk bölgesidir (Aydos, 2005). Sperm mitokondrisinde meydana gelen hasar sperm parametrelerini olumsuz olarak etkilemektedir. Spermatozoanın maruz kaldığı oksidatif stres sonucu sperm mitokondrileri mutasyona uğrar ve bu durum sperm aktivasyonu için kritiktir. Sperm mitokondrilerinde meydana gelen hasarın sperm motilitesini yavaşlattığı bilinmektedir (Ünal ve ark., 2017).

2.8.1. Rhodamine 123 Boyama

Rhodamine 123, hücrelerde mitokondriyal membran potansiyelini tespit etmek için kullanılır. Sperm mitokondrisi tarafında kolayca ayrıştırılabilen katyonik yeşil floresan bir boyadır. Ölü spermilerin mitokondrisi rhodamini kolayca tutamazlar. Canlı sperm mitokondrisi daha kolay ayrıştırır (Zou ve ark., 2010).

2.9. Normal Sperm Yapısı

Spermatozoa; baş, boyun ve kuyruk bölgesinden oluşur.



Şekil 2.10: Sperm Yapısı

Kaynak: (Aydos, 2005)

Baş; Spermatozoanın uzunluğu 60 μm ' dir. Baş kısmının boyu 3-5 μm , eni 2-3 μm ' dir. Sperm başının görevi, DNA materyalini taşımak, korumaktır. Sperm başı, akrozom, ekvator bölgesi ve akrozom sonrası bölgeyi içerir. Akrozom lizozomal organelin bulunduğu kısımdır. Ekvator bölgesi, fertilizasyon için oosite tutunma bölgesidir. Sperm başı akrozom ve çekirdek olmak üzere iki bölgede incelenir (Kruger ve ark., 1998).

Boyun; Kuyruk ile sperm başı arasında bulunur. Uzunluğu 0.5 μm ' dir. Kuyruk bölgesinde mitokondriler bulunur. Spermin enerji ihtiyacı mitokondriler tarafından sağlanır. Boyun kısmı aynı zamanda kuyruğun başlangıç bölümü olan sentrozomuda içerir.

Kuyruk; 45-50 μm uzunluğundadır. Sperm kuyruğu 3 bölümden oluşur. Orta parça, esas parça ve son parça. Merkezinde 9 dış çift mikrotübül yapısı ve ortada bir çift mikrotübül yapısı bulunmaktadır. Mikrotübüller kuyruğa diklik sağlar. Aksonem ise hareketi sağlar. Spermatozoa hareketi flagellum ile sağlanır.

2.10. Semen Toplanması (WHO 5. Baskı, 2010)

Semen örneği, 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında toplanmalıdır. Normal erkeklerde 1 günlük cinsel perhiz sonrasında semen volümü 0.4 mL, semen konsantrasyonu ise 10-15 milyon/mL artar. 5 gün boyunca bu artış devam eder. 1 haftadan fazla süren cinsel perhiz sonunda sperm morfolojisinde yavaşlama olur.

En uygun bulunan semen örneği laboratuvar ortamında mastürbasyon yoluyla elde edilendir. Semen genel muayenesi, koagülasyon ve likefaksiyon olaylarının gözlenmesi ve motilitenin doğru bir şekilde değerlendirilmesi bu şekilde mümkün olur.

Semen örneği laboratuvar ortamında özel olarak hazırlanmış odalarda alınmalıdır. Burada gerekli tüm temizlik imkanları, uygun ısı ve ses ortamı sağlanmalıdır. Örnek almak için geniş ağızlı ve poliprolen, polietilen kaplar kullanılabilir. Bu kaplar kesinlikle deterjan ve diğer zararlı maddeler içermemeli, vücut ısısında olmalıdır (WHO Laboratuvar El kitabı, 2010).

2.11. Makroskopik İnceleme

Renk: Semen mat beyaz renklidir. Enfeksiyon ve cinsel perhiz süresine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Buna bağlı olarak sarımsı veya gri-krem renkte olabilir.

Koagülasyon: Ejakülasyondan hemen sonra semen sıvı renktedir. Hızlıca değişim göstererek koagüle hale gelmektedir. Bu çok kısa bir sürede gerçekleşir.

Likefaksiyon: Normal koşullarda semen örneğinin 10-20 dakika süre içinde likefaksiyonu gerçekleşir. Bu durum prostat bezinden salgılanan enzimlere bağlıdır. Likefaksiyon hiç olmamışsa ya da 30 dakikadan uzun sürmüşse bu prostatın normal işlev görmediğinin belirtisi olabilir. Likefaksiyon süresi spermin hareketliliği için önemlidir.

Hacim: Semen hacmi 1,5 mL ve bu değer üzerinde olmalıdır.

Vizkozite: Vizkozite semen akışkanlığının çok yoğun olması durumudur. Yetersiz likefaksiyon sonucunda semen hipervizküz duruma gelir. Yüksek vizkozite sperm açısından olumsuzdur. Bu durum motilite ve konsantrasyonu olumsuz etkiler.

pH: Normal semende pH değeri 7.2 ve 8.0 değerlerindedir. Prostat sorunu yada enfeksiyon gibi problemler varsa pH değeri 8.0' ın üzerinde saptanabilir. Kronik enfeksiyonlar sonucunda ise pH değeri 7.2 altında saptanır.

2.12. Mikroskopik İnceleme

Semen analizinde mikroskopik değerlendirme ışık mikroskopuyla yapılır. Matür bir sperm baş, boyun ve kuyruk olmak üzere 3 bölümden oluşur. Sperm başı uzunluğu ortalama 5-6 µm, genişliği ise 2,5-3,5 µm' dir. Başın büyük bir bölümünü kromatin oluşturur. Kromatin yoğunlaşarak hacim olarak küçülür. Çekirdeğin 2/3' lük ön kısmında akrozom yer alır. Akrozom, başlık şeklinde ve bir zar ile çevrili bir organeldir (Aziz ve ark., 2013). Spermin boyun kısmı kısa bir parçadır ve bağlantıyı sağlamaya yönelik segmentli kolonlardan ve proksimal sentriyolden meydana gelir. Orta parça ise, sperm hareketini gerçekleştirmeye yönelik olan, gerekli enerjiyi sağlayan mitokondrileri içerir. Kuyruk kısmı, sperme diklik veren fibröz tabakadan ve spermin hareketini sağlayan aksonem tabakasından meydana gelir (Esteves ve ark., 2015).

Tablo 2.1: Semen analizi normal referans değerleri

PARAMETRE	REFERANS DEĞER
VOLÜM	< 1,5 mL
pH	7.2 – 8.0
VİZKOZİTE	< 3
KONSANTRASYON	> 15x10⁶ / mil/mL
TOTAL KONSANTRASYON	> 39x10⁶ / mil/mL
TOTAL MOTİLİTE	> %40
PROGRASİF HAREKETLİLİK	%32
MORFOLOJİ	%4 Normal
VİTALİTE	%58
LÖKOSİT	< 1

Kaynak: (WHO Laboratuvar El kitabı, 2010)

2.12.1. Konsantrasyon

Sperm sayımı için hemositometre, microcell, standart count gibi çeşitli sayım kamaraları olmakla birlikte, günümüzde yaygın olarak Makler sayım kamarası kullanılmaktadır. Semen örneğinin koyulacağı alanın 10 mm derinliğinde olması spermatozoanın tek bir düzlemde serbest hareketini sağlamaktadır. Bu kuyucuk sperm yoğunluğunun homojen dağılımını ve iki tabaka arasında kalan spermin konsantrasyon farkı yaratmamasını sağlamaktadır (Esteves ve ark., 2013). Makler sayım kamarası ile spermlerin sayıları ve hareket yüzdeleri daha kesin olarak belirlenebilmektedir. Yüz karelik bir alan içinde 10 karelik alandaki sayılan sperm sayısı milyon/ml’ deki sayıyı verir. Sonucun sağlıklı olması için en az dört tane 10’ lu kare sayılarak ortalamalarının alınması gerekir. Bu şekilde yapılan sayımla 100 karelik alan içinde hiç sperm bulunamamışsa alan dışındaki bölgeler de değerlendirilmelidir. Eğer ejakulatta sperm bulunmazsa, 2000 rpm’ de 10 dakika santrifüj edilerek pellete bakılması zorunludur. Santrifüj edildikten sonra da sperm bulunmazsa buna “azoospermik örnek” adı verilmektedir. Tedaviye gelen hastanın sağlıklı bir tanısının konması için, 15 gün arayla en az 2 kere spermiyogram değerlendirilmesi yapılması gerekmektedir (Aziz ve ark., 2013). Bu değerlendirme sonucunda sperm konsantrasyonuna göre sınıflama yapılabilir. Hiç sperm bulunamayan örnekler “Azospermi”, sperm sayısı < 1 milyondan’ dan az örnekler “Şiddetli oligospermi”, sperm sayısı 1-5 milyon arasında olan örnekler “Orta oligospermi”, sperm sayısı 5-20 milyon arasında olan örnekler “Hafif oligospermi” ve sperm sayısı > 20 milyon’ dan fazla örnekler “normospermi” olarak adlandırılır.

2.12.2. Motilite

Sperm motilitesi total sperm popülasyonunda hareketli olan spermlerin yüzdesidir.

Dünya Sağlık Örgütü hareketliliği 3 sınıfta değerlendirmektedir:

- a) İlerleyici (progresif) hareket
- b) İlerleyici (Non-progresif) olmayan hareket
- c) Hareketsiz (WHO Laboratuvar El kitabı, 2010).

2.12.3. Morfoloji

Sperm morfolojisi spermatogenezin kalitesini yansıtır, morfoloji anormallikleri baş, boyun ve kuyruğa göre sınıflandırılır. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %30' un üzerinde olmalıdır. Dünya Sağlık Örgütü' nün önerdiği morfolojik değerlendirme özelliklerini aynı alan ancak sınırda kabul edilen spermatozoayı da anormal gruba sokan daha kesin ölçütlerin kullanıldığı değerlendirme sistemi Kruger' in kesin ölçütleri olarak bilinir (Kruger ve ark., 1998).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Tasarımı

Bu çalışmada, normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm DNA hasarı belirleme yöntemleri ile sperm DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve sperm DNA maturasyonu incelenecektir. Ayrıca rhodamine123/propidyum iyodür boyama yöntemleri kullanılarak sperm mitokondri membran potansiyeli ve sperm apoptozunun araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada;

Biruni Üniversite Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan normal (n:22) grup ve varikosel (n:22) hasta gruplarında WHO kriterlerine uygun standart semen analizi uygulandı. Ardından anilin blue (mavisi) boyama yöntemi ile sperm DNA maturasyonu, acridine orange (akridin turuncusu) boyama yöntemi ile sperm DNA fragmentasyonu, CMA3 boyama yöntemi ile sperm kromatin kondensasyonu, rhodamine123/propidyum iyodür boyama yöntem ile sperm mitokondri membran potansiyeli ve apoptotik spermier değerlendirilmiştir.

Çalışma ‘Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul’ una sunuldu ve 2019/31-04 karar no’ lu ve 24.07.2019 tarihli etik kurul onayı alındı.

Çalışma Ağustos 2019 – Eylül 2019 tarihleri arasında Biruni Üniversite Hastanesi’ ne spermiyogram analizi için başvuran hastalara uygulandı.

3.2. Hasta Seçimi

Çalışmaya dâhil olma kriterleri:

Normal Erkek Grubu;

Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml fazla olması, normal morfolojinin %4 den fazla olması ve ileri hareketli sperm yüzdesinin %32 den fazla olması gerekmektedir.

Varikozel hasta grubu;

Üroloji polikliniğine başvurmuş ve varikozel tanısı konulmuş erkek hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Her iki grup için;

- Erkeğin yaşının en az 20 en fazla 45 olması
- Endokrinolojik ve/veya metabolik bozukluklar göstermemesi
- En az 3 en fazla 7 gün cinsel perhiz süresi uygulanması

3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Sperm DNA Maturasyonunun Anilin Blue Boyama İle Gösterilmesi

%5 Anilin Blue (Mavi) Boyasının Hazırlanması:

5 gram toz asidik anilin blue (mavi) boyası, kaynamış 100 mL distile su içerisinde çözündürülür, kağıt filtreden geçirilir. Soğuduktan sonra %2 asetik asit eklenir. pH, 3,5 olarak ayarlanır.

%2 Gluteraldehit Hazırlanması:

%25 gluteraldehit fiksativ distile su ile %2 olacak şekilde seyreltilir. Yani 8 mL gluteraldehit 92 mL distile su içerisine eklenir.

Boyanın Yapılışı:

20 mikrolitre semen örneği temiz lam üzerine yayılıp kurutulur. Oda sıcaklığında %2 gluteraldehit içinde 3 saat fikse edilir. Fiksasyon sonrası %5 anilin mavisi ve %2 asetik asit içeren boya solüsyonunda 30 dakika boyanır ve distile su ile yıkanır. Nukleusları boyanmış sperm pozitif ve boyanmamış sperm negatif, yani matur sperm olarak değerlendirilir. 100 sperm sayılarak boyanmamış sperm yüzdesi çıkarılarak sperm maturasyon defekti oranı hesaplanır.

3.3.2. Sperm DNA Fragmentasyonu'nun Acridine Orange (Akridin Turuncusu) İle Floresan Mikroskobunda Değerlendirilmesi

% Acridine Orange (Akridin Turuncusu) Boyasının Hazırlanması;

Stok çözelti

% 1 acridine Orange distile su içinde hazırlanır

Boya

%1 Acridine orange (akridin turuncusu)	25 mL
0,1 M Sitrik Asit	10 mL
0,3 M Na ₂ HPO ₄	300 µL

Carnoy (Karnoy) Fiksatif;

Metanol 75 mL

Asetik asit 25 mL

Carnoy buzdolabında bekletilmelidir .Taze fiksatif kullanılmalıdır.Fiksasyon süresi buzdolabında 5-10 dakika , oda sıcaklığında 30 dakika civarındadır.

Boyamanın Yapılışı;

20 mikrolitre semen örneği temiz lam üzerine yayılıp kurutulur. Oda sıcaklığında carnoy (karnoy) solüsyonu içinde 1 saat fikse edilir. Fiksasyon sonrası acridine orange boyası ile 5 dakika karanlıkta boyanır, distile su ile yıkanır, kurutulur ve floresan mikroskobunda incelenir. Yeşil boyalı spermiler normal DNA, turuncu-kavuniçi boyalı spermiler fragmente DNA taşımaktadır. Ortalama 200 sperm sayılarak yüzde fragmentasyon hesaplanır.

3.3.3. Sperm Kromatin Kondensasyonunun CMA3 (Kromomisin A3) İle Floresan Mikroskopta Değerlendirilmesi

Boyanın Hazırlanması;

CMA3	0,25 mg
MCI IIvane Buffer	1 mL

MCI IIvane Buffer Hazırlanması;

200 mM Disodyum Hidrojen Fosfat

100 mM Sitrik Asit

Carnoy (Karnoy) Fiksatif;

Metanol 75 mL

Asetik asit 25 mL

Boyamanın Yapılışı;

20 mikrolitre semen örneği temiz lam üzerine yayılıp kurutulur. + 4°C’ de carnoy (karnoy) solüsyonu içinde 5 dakika fikse edilir. Fiksasyon sonrası yayma preparatlar MCI IIvane solüsyonu ile çalkalanır. CMA3 boyası ile karanlıkta 20 dakika boyanır. Süre sonunda preparatlar tekrar MCI IIvane solüsyonunda yıkanır, kurutulur ve floresan mikroskopunda görüntülenir. Yeşil boyalı spermier kondanse DNA içeren sperm, sarı boyanan spermier dekonpanse sperm olarak değerlendirilir. Ortalama 100 sperm sayılarak yüzde değer hesaplanır.

3.3.4. Rhodamine 123/Propidyum İyodür İle Sperm Mitokondri Membran Potansiyelinin ve Apoptotik Spermierin Belirlenmesi

Rhodamine 123 Boyasının Hazırlanması;

Rhodamine 123 5 mg

PBS 5 mL

Propidyum İyodür Boyasının Hazırlanması;

Propidyum iyodür 2 µL

DMEM medium (-) 1 mL

Boyamanın Yapılışı;

Semen örnekleri 5×10^6 konsantrasyon olacak şekilde 1 mL DMEM medium içine koyulur. Süspanse hale getirilir. Sperm süspanسیونuna 5 µL hazırlanan rhodamin 123 boyası eklenir ve 15 dakika karanlıkta bekletilir. Süre sonunda aynı çözeltiye 1 µL propidyum iyodür boyası eklenir ve 5 dakika karanlıkta bekletilir. Süre sonunda boyalı süspanسیونdan 20 µL temizlenmiş lam üzerine yayılır ve kurutulur. Daha sonra floresan mikroskopta incelenir. Yeşil boyanan spermier mitokondri membran potansiyeli yüksek sperm, kırmızı boyanan spermier apoptotik sperm olarak değerlendirilir. Ortalama 200 sperm sayılarak yüzde değeri belirlenir.

3.3.5. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada iki grup karşılaştırılması için student' s t testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu prospektif kontrollü çalışmada; Ağustos 2019 – Eylül 2019 tarihleri arasında Biruni Üniversite Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan çalışma kriterlerine uyan normal semen analizine sahip (n:22) grup ve varikosel (n:22) hasta gruplarında, toplam 44 hastada WHO kriterlerine uygun standart semen analizi uygulandı.

Yayma preparatları yapılan 44 hastadan alınan semen örneklerinde anilin blue (mavisi) boyama yöntemi ile sperm DNA maturasyonu, acridine orange (akridin turuncusu) boyama yöntemi ile sperm DNA fragmentasyonu, CMA3 boyama yöntemi ile sperm kromatin kondensasyonu, rhodamine123/propidyum iyodür boyama yöntem ile sperm mitokondri mebran potansiyeli ve apoptotik spermier değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonuçları gruplar arasında karşılaştırılmıştır.

P değeri Yorumu

$p < 0.05$ İstatistiksel anlamlılık *

$p < 0.01$ Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık **

$p < 0.001$ Çok yüksek istatistiksel anlamlılık ***

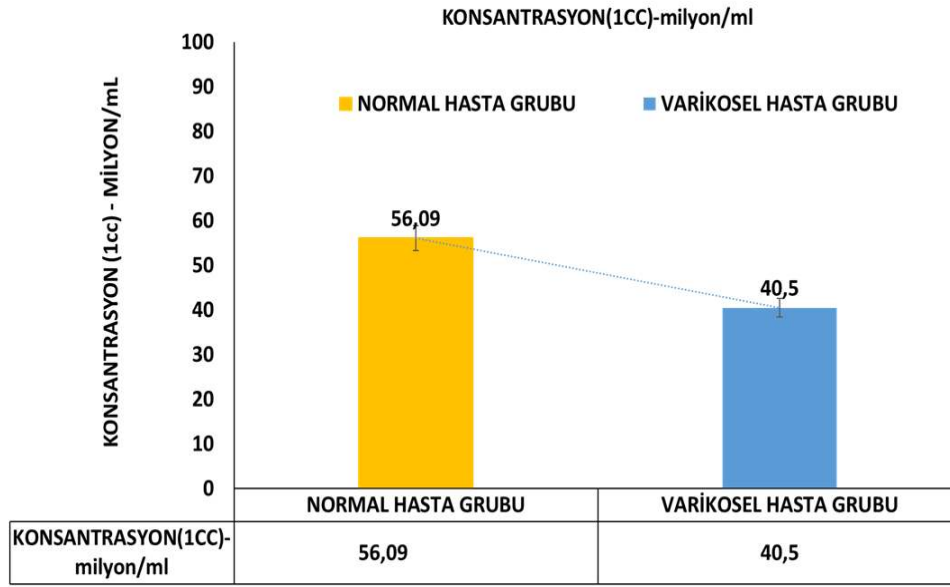
$0.05 \leq p < 0.10$ Anlamlılık eğilimi (sınırdan anlamlılık)

$p > 0.10$ Fark tesadüften ileri gelmiştir (istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır)

4.1. Sperm Konsantrasyon Değerlendirme Sonuçları

Tablo 4.1: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm konsantrasyonu değerlerinin karşılaştırılması

	Normal hasta grubu(ort±SD)	Varikozel hasta grubu (ort±SD)	p
Konsantrasyon (mil/ml)	56,09±37,88	40,50±20,71	0,098



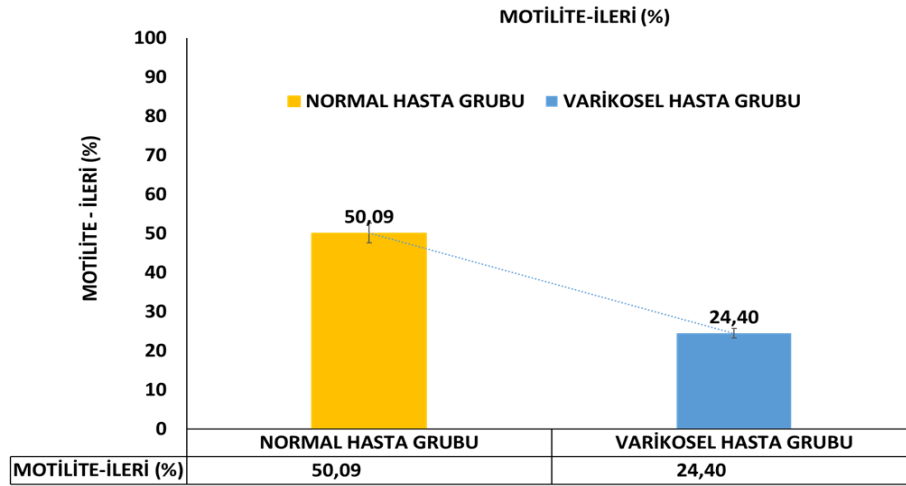
Şekil 4.1: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm konsantrasyonu değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.1’ te ve Şekil 4.1’ de görüldüğü gibi konsantrasyon değişkeni açısından normal erkek ve varikozel hasta grupları karşılaştırılmıştır. Konsantrasyon değişkeni açısından istatistiksel olarak sınırda anlamlılık değeri saptanmıştır ($0.05 \leq p < 0.10$).

4.2. Sperm Motilite Değerlendirme Sonuçları

Tablo 4.2: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm motilitesi değerlerinin karşılaştırılması

	Normal hasta grubu (ort±SD)	Varikozel hasta grubu (ort±SD)	p
Sperm motilitesi (a)	50,09±8,73	24,40±5,7	0,000
Sperm motilitesi (b)	17,95±6,28	28,27±11,38	0,001
Sperm motilitesi (c)	31,9545±6,9247	47,3182±10,7466	0,000



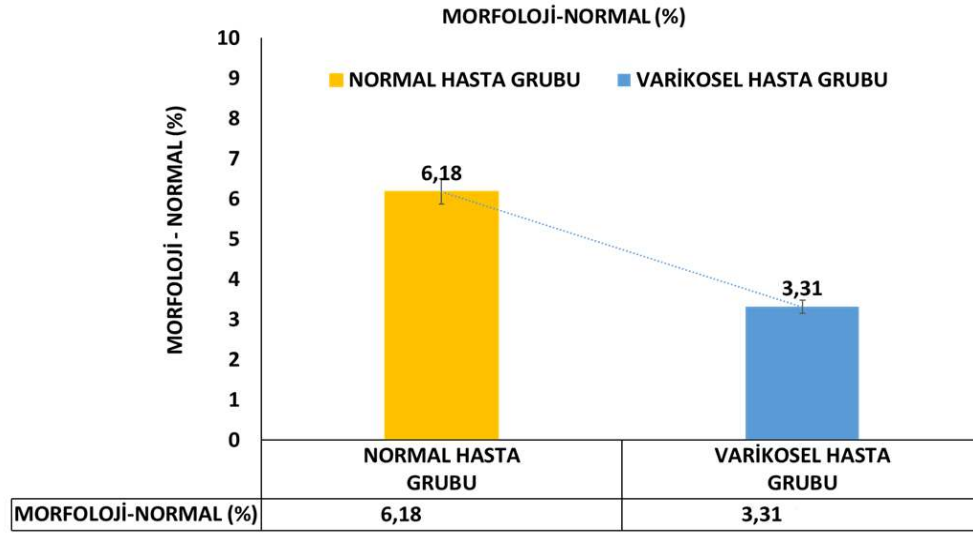
Şekil 4.2: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm motilitesi değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.1’ te ve Şekil 4.2’ de görüldüğü gibi, normal erkek olguları varikozel hasta olguları ile kıyaslandığında, varikozel hasta olgularında; progresif hareket (ileri hareketli motilite yüzdesi) varikozel hasta olgularında normal erkek olgularına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği görülmüştür ($p<0,01$). Tablo 3’ te olduğu gibi non-progressif hareket (hareketsiz sperm yüzdesi) ve yerinde hareketli sperm yüzdesi değişkenlerinin varikozel olgularında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği görülmüştür ($p>0,01$).

4.3. Sperm Morfoloji Değerlendirme Sonuçları

Tablo 2.3: Normal erkek ve varikozel hastalarda morfoloji değerlerinin karşılaştırılması

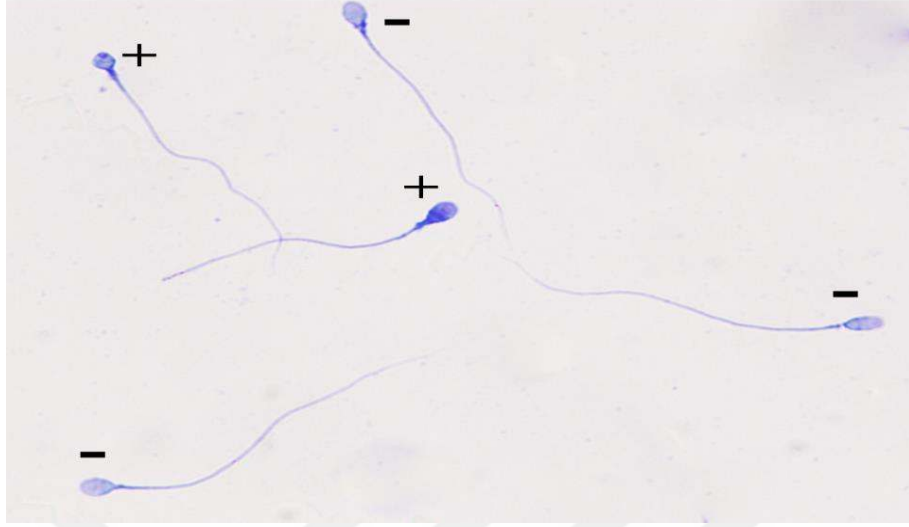
Morfoloji %	Normal hasta grubu (ort±SD)	Varikozel hasta grubu (ort±SD)	p
Normal	6,18±1,25	3,31±1,46	0,000
Baş anomali	57,59±9,79	50,86±9,31	0,024
Orta kısım (Boyun anom.)	20,68±6,95	28,27±6,35	0,000
Kuyruk anom.	16,04±6,33	17,54±8,26	0,503



Şekil 3: Normal erkek ve varikozel hastalarda morfoloji değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.3’ te ve Şekil 4.3’ te olduğu gibi, normal erkek ve varikozel hasta grupları karşılaştırıldığında, normal sperm morfolojisi varikozel hasta olgularında normal erkek olgularına kıyasla anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,05$). Tablo 4’ te bulunan verilere göre sperm boyun anomalilerinin varikozel hasta olgularında daha yüksek olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$).

4.4. Sperm DNA Maturasyon Defekti Sonuçları (Anilin Blue (Mavisi) %)

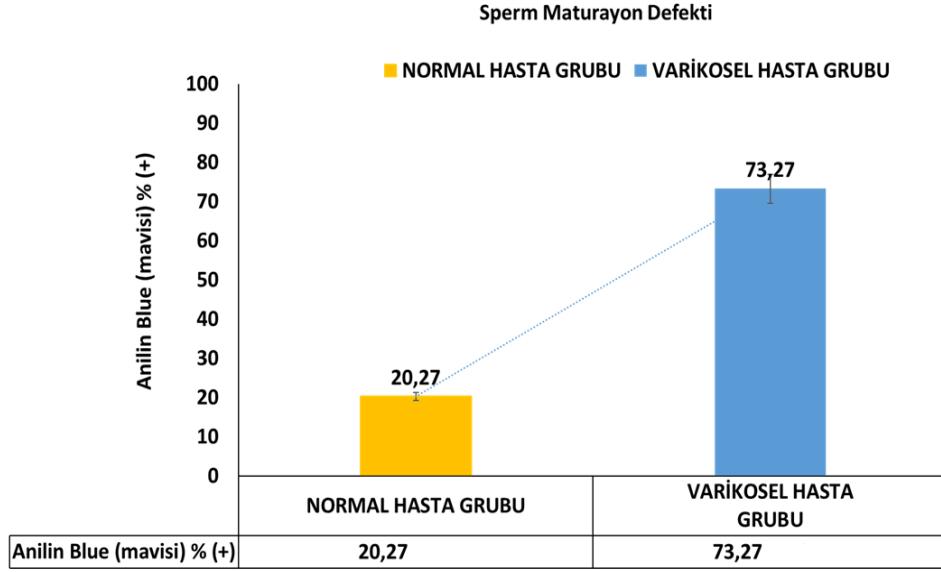


Şekil 4.4: Asidik Anilin Blue (Mavisi) Boyama

Koyu mavi boyanan pozitif (+) spermeler ,sperm maturasyon defektini yansıtmakta olup, boyanmayan spermeler,kromatin kondansasyonunu tamamlamış,negatif (-) olarak gösterilmektedir. (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü)

Tablo 4.4: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm DNA maturasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması

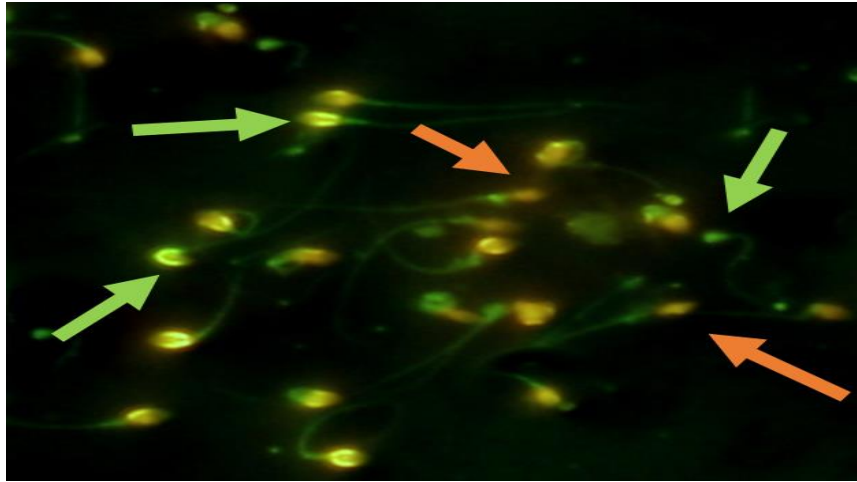
	Normal hasta grubu(ort±SD)	Varikozel hasta grubu (ort±SD)	p
Anilin Blue (Mavisi) (+)(%)	20,27±5,31	73,27±7,66	0,000



Şekil 4: Normal erkek ve varikösel hasta gruplarında sperm kromatin maturasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.4 ve Şekil 4.5’de görüldüğü gibi, normal erkek ve varikösel hasta olguları karşılaştırıldığında sperm kromatinmaturasyon defekti varikösel hasta olgularında istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$). Sperm immaturasyonunun varikösel hasta olgularında daha yüksek olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$).

4.5. Sperm DNA Fragmentasyon İndeksi Sonuçları(Acridine Orange/Akridin Turuncusu %)

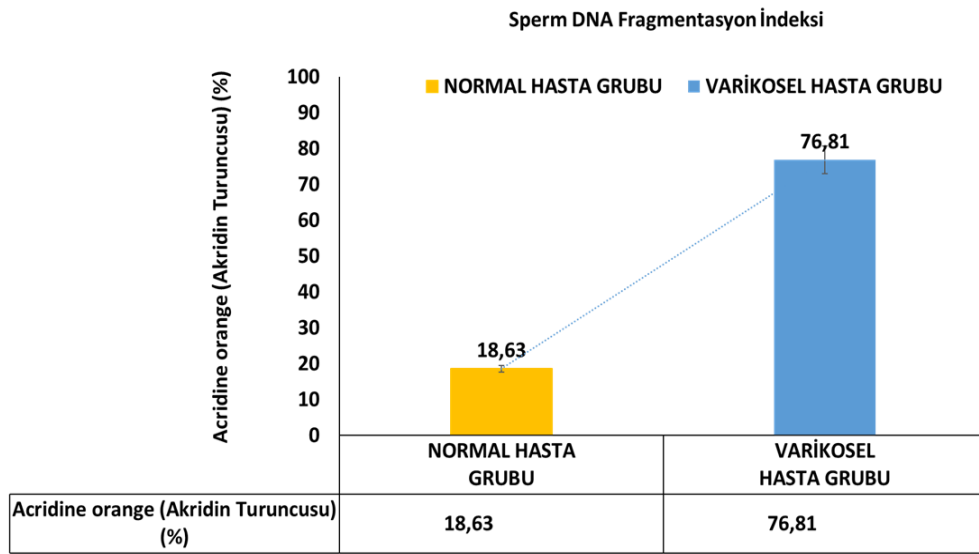


Şekil 4.6: Acridin Orange (Turuncusu) Boyama

Yeşil (normal), kavuniçi ve turuncu (defektli) sperm DNA fragmentasyonunu göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskopi görüntüsü)

Tablo 4.5: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm DNA Fragmentasyon indeksi değerlerinin karşılaştırılması

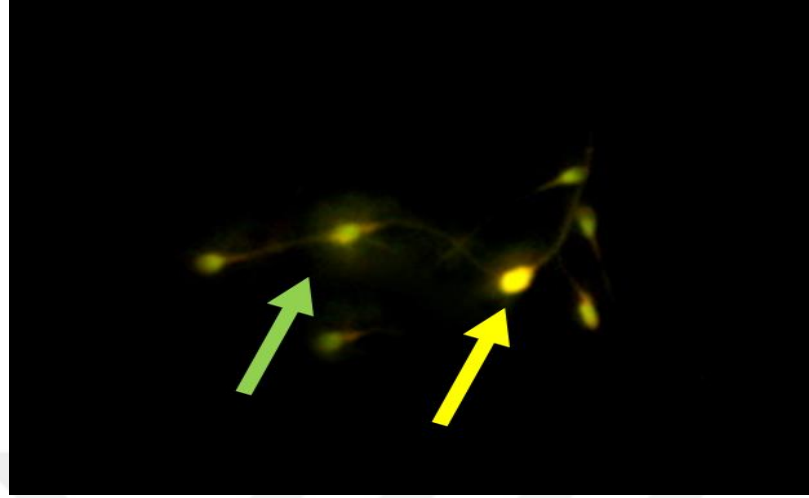
DNA Fragmentasyon İndeksi (%)	Normal hasta grubu(ort±SD)	Varikozel hastagrubu(ort±SD)	p
Acridine Orange (AkridinTuruncusu)(+)(%)	18,63±5,21	76,81±8,21	0,000



Şekil 4.7: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm DNA Fragmentasyon indeksi değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.5 ve Şekil 4.7’ de görüldüğü gibi, normal erkek ve varikozel hasta olguları karşılaştırıldığında sperm DNA Fragmentasyonu varikozel hasta olgularında istatistiksel olarak daha yüksek değer göstermiştir ($p<0,01$). İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,01$).

4.6. Sperm Kromatin Kondensasyon Defekti Sonuçları (Cma3 (Kromomisin A3) %)

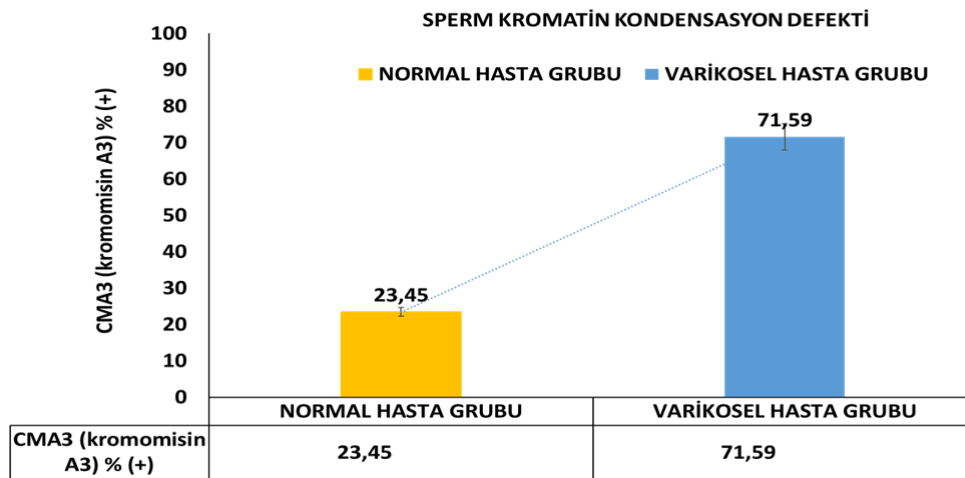


Şekil 5: CMA3 Boyama

Yeşil (normal), sarı (dekondanse). Sperm kromatin kondensasyonu gösterilmiştir (100X immersiyon objektifi floresan mikroskopi görüntüsü)

Tablo 4.6: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm kromatin kondensasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması

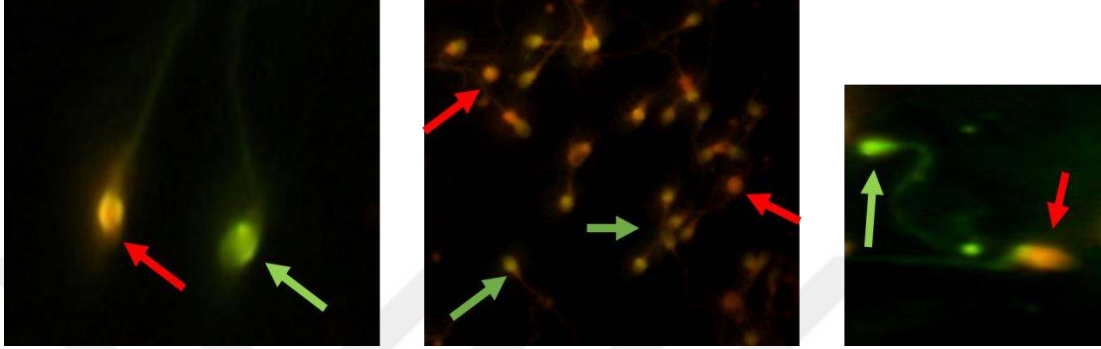
Sperm kromatin kondensasyonu (%)	Normal hasta grubu(ort±SD)	Varikozel hastagrubu(ort±SD)	p
CMA3 (kromomisinA3)(%)	23,45±8,03	71,59±14,55	0,000



Şekil 6: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm kromatin kondensasyon defekti değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.6 ve Şekil 4.9’ da olduğu gibi, normal erkek ve varikosel hasta olguları karşılaştırıldığında sperm kromatin kondensasyon defekti oranı varikosel hasta olgularında istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($p<0,05$). Dekondanse sperm oranının varikosel hasta olgularında daha yüksek olduğu gösterilmiştir ($p<0,05$).

4.7. Sperm Mitokondriyel Membran Potansiyeli Sonuçları

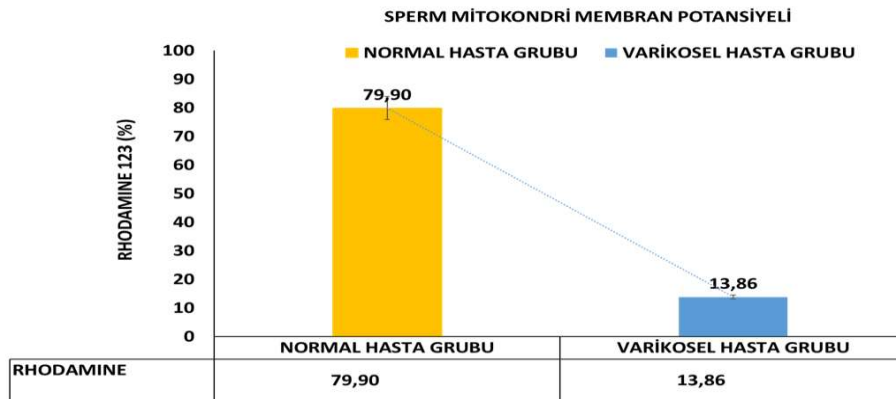


Şekil 4.10: Rhodamine 123/ Propidyum İyodür Boyama

Yeşil (canlı), kırmızı (apoptotik) spermilerin gösterilmesi (100X immersiyon objektifi floresan mikroskopi görüntüsü)

Tablo 4.7: Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm mitokondri membran potansiyelinin karşılaştırılması

Sperm membran (%)	mitokondri potansiyeli (%)	Normal hasta grubu(ort±SD)	Varikosel hasta grubu(ort±SD)	p
Rhodamine 123 (%)		79,90±7,25	13,86±16,93	0,000



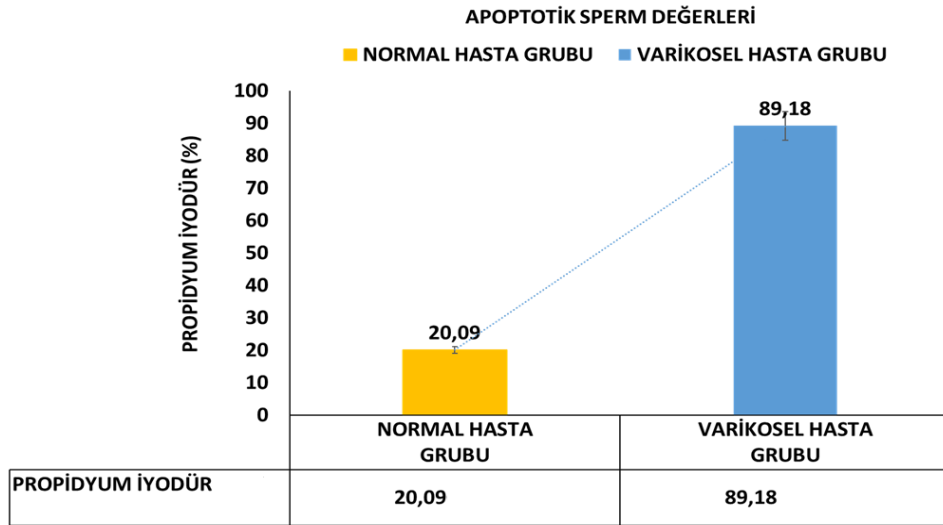
Şekil 4.11: Normal erkek ve varikosel hasta gruplarında sperm mitokondri membran potansiyelinin karşılaştırılması

Tablo 4.7 ve Şekil 4.11’ de olduğu gibi, normal erkek ve varikozel hasta grupları kıyaslandığında sperm mitokondri membran potansiyeli varikozel hasta olgularında istatistiksel olarak azalma göstermiştir ($p<0,05$). Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

4.8. Apoptotik Sperm Değerlendirmesi Sonuçları Propidyum İyodür (%)

Tablo 4.8: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında apoptotik sperm değerlerinin karşılaştırılması

Apoptotik Sperm Değerlendirmesi (%)	Normal hasta grubu(ort±SD)	Varikozel hastagrubu(ort±SD)	p
Propidyum İyodür (%)	20,09±7,25	89,18±4,08	0,000



Şekil 4.12: Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında apoptotik sperm değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.8 ve Şekil 4.12’ de olduğu gibi, normal erkek ve varikozel hasta grupları kıyaslandığında apoptotik sperm sayısı varikozel hasta olgularında istatistiksel olarak artış göstermiştir ($p<0,05$). Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda infertilite üzerinde sperm DNA hasarının çok büyük bir katkısı olduğunu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu fertil erkeklerle kıyaslama yapıldığında infertil erkeklerde yüksek oranda sperm DNA hasarı olduğu belirtilmiştir (Spano ve ark., 2000). Sperm kromatin anomalilerinin IVF denemelerinde başarıyı negatif olarak etkilediğini gösteren birçok çalışma vardır (Sakkas ve ark., 1996). Fertilizasyon başarısızlığının nedenleri arasında zayıf kromatin paketlenmesi düşünülebilir (Hammadeh ve ark., 2001).

Sperm DNA' sında meydana gelen hasarın erkek spermatozoon'unda morfolojik anomalilere neden olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Dozortsev ve ark., 1995). DNA kırıkları, tek iplikli DNA, apoptotik değişiklikler, anormal histon protamin geçişleri veya başarısız kondensasyon, immatürasyon gibi defektlerin infertil erkek spermalarında görüldüğü bildirilmiştir (Chemes ve ark., 1979). Ayrıca sperm DNA' sında meydana gelen hasarın sperm parametrelerinde normalden düşük değerler gösterdiği bildirilmiştir (Auger ve ark., 1999). Yapılan çalışmalarda klinik varikoseli olan erkeklerde infertilite sorunu olduğu gösterilmiştir (Dubin ve ark., 1970).

Sperm kromatin kondensasyon oranındaki azalma CMA3 boyaması ile sperm DNA maturasyon defektleri anilin boyama ile sperm DNA fragmentasyonu ise acridine orange floresan boya ile değerlendirilebilir (Razani ve ark., 2001;Guzman ve ark., 2005).

Bu çalışmada normal erkek ve varikosel hasta olgularında sperm DNA' sında meydana gelen hasarlar araştırılmış ve bu hasarları belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Sperm DNA maturasyon defekti anilin blue boyama yöntemi ile incelenmiştir. Varikosel olgularında sperm DNA maturasyon defektinin normal erkeklere oranla yaklaşık iki kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Sperm kromatin kondensasyonu CMA3 floresan boyama ile incelenmiştir. Sonuç olarak varikosel olgularında normal erkeklere kıyasla yüksek oranda kromatin kondensasyonu anomalisine rastlanmıştır. Sperm DNA fragmentasyonu acridine orange floresan boyama ile incelenmiş ve varikosel olgularında yüksek oranda fragmente DNA bulgusuna rastlanmıştır. Tüm sonuçlar birbirini destekler nitelikte olup sperm DNA

hasarlarına varikozel olgularında normal erkeklere kıyasla istatistiksel olarak yüksek oranda rastlanmıştır.

Klinikte yapılan çalışma raporlarında varikozel hastalarının sperm sayısı, motilite ve morfolojisinde kalıcı anormallikler bildirilmiştir (Marmar ve ark., 2001). Sperm mitokondrilerinde meydana gelen hasarın sperm motilitesini yavaşlattığı bilinmektedir (Ünal ve ark., 2017).

Bu çalışmada varikozel hasta semen örnekleri ve normal erkek semen örnekleri motilite ve morfoloji parametreleri açısından incelenmiş ve varikozel olgularında normal erkeklere kıyasla düşük oranda ileri hareketli sperm motilitesi gözlemlenmiştir. Yerinde hareketli ve hareketsiz sperm oranı varikozel olgularında daha yüksektir. Ayrıca varikozel olgularında yüksek oranda morfoloji anomalilerine rastlanmıştır. Varikozel olgularında yüksek oranda boyun anomalisi görülmüştür . Varikozel hasta olgularında motilite ve boyun morfoloji anomalilerinin gözlemlenmesi sperm mitokondrisinde hasar meydana gelebileceğini düşündürmüştür.

Sperm mitokondri anomalileri, sperm fonksiyonunda bozukluğa yol açan önemli sebeplerdendir. Sperm mitokondrisinde sayısal bozukluk, mitokondri dizilimindeki düzensizlikler, mitokondri yapısında kısa veya uzun kılıf anomalileri, mitokondri matriks yoğunluğunun artması veya lipit içerikleri mitokondriyal anomalilerden bazılarıdır (Rawe ve ark., 2007). Bu sorunlar semen analizi sonrasında boyun anomalisi olarak gözlemlenebilir (Folgero ve ark., 1993).

Daha önceki çalışma raporlarında katyonik floresan bir boya olan rhodamine 123' ün canlı hücrelerin mitokondrisinden seçici olarak geçebildiği gösterilmiştir (Johnson ve ark., 1980).

Sperm mitokondri membran potansiyelindeki değişikliklerin, bu tür floresan problemleri tarafından yansıtılabileceği önceden tespit edilmiştir (Folgero ve ark., 1993).

Bu çalışmada sperm mitokondri membran potansiyeli, rhodamine 123 floresan boyama yapılarak incelenmiştir. Normal erkek ve varikozel hasta olguları kıyaslandığında sperm mitokondri membran potansiyelinin varikozel olgularında yüksek oranda azaldığı gösterilmiştir. Sonuçlar daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

Varikoselin germ hücre apoptozunu arttırdığı bulunmuştur (Bargawi ve ark., 2004). İnsan sperminde yapılan çalışmalar sonucu apoptoz varlığı gösterilmiştir. Ancak çalışmalar ilerledikçe ejakülattaki sperm olgularındada apoptoz varlığı bildirilmiştir (Sun ve ark., 1997). Apoptoz spermatogenez kontrol sistemlerinin kaldırılması ve çeşitli patolojilerin kaldırılmasının bir sonucu olabilir (Gandini ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar sonucunda Sperm DNA hasarı ve sperm DNA tamir mekanizmalarının çalışmaması durumunda apoptoz mekanizmasının devreye girdiği bildirilmiştir. Apoptozun hatalı genetik bilgiyi bir sonraki embriyoya aktarılmasını engelleyen son basamak olduğu düşünülmektedir (Singh ve ark., 2003). Sperm apoptozu ve sperm DNA' sında meydana gelen hasar erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak bildirilmiştir (Ricci ve ark., 2002). Apoptoz sonrasında meydana gelen germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında görülmektedir (Lopes ve ark., 1998).

Bu çalışmada apoptotik spermleri belirlemek için propidyum iyodür floresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Normal erkek ve varikozel hasta olgularında apoptotik sperm değerleri karşılaştırılmış ve varikozel olgularında apoptotik sperm değerleri istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir. Her iki çalışma grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

5.1. Öneriler

Varikozel olguları kontrol ile kıyaslandığında sperm motilitesi ve sperm morfolojisinin istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdiği ($p<0,05$) görülmüştür. Sperm boyun anomalilerinin varikozel olgularında daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Sperm immatürasyonunun, sperm DNA fragmentasyonunun ve sperm kromatin kondensasyon defektinin varikozel olgularında daha yüksek olduğu görülmüştür. Rhodamine 123 ile ölçülen sperm mitokondriyel membran potansiyelinin varikozel olgularında düşük olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca apoptotik sperm oranının (propidium iyodür ile ölçülen) varikozel olgularında arttığı gösterilmiştir. Varikoselin sperm kromatin maturasyonu ve mitokondri fizyolojisi üzerine negatif etkileri görülmüştür. Varikozel olgularında yüksek oranda apoptotik sperm bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

- Afshar, Kouroush, Turistin Domes. (2018). Varicocele. *Can Urol Assoc J*, 12(4-1):35-36.
- Agarwal A, Allameneni SS. (2005). Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *FertilSteril*, 84:850-3.
- Aoki VW, Carrell DT. (2003). Human protamines and the developing spermatid: their structure function expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl*, Dec 5(4):315-24.
- Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. (1999). Aniline Blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl*, 13:452-62.
- Aziz, Nabil. (2013). The importance of semen analysis in the context of azoospermia. *Clinics Sao Palu*, 1:35-8.
- Barekat F, Tavalae M, Deemeh MR, Bahreinian M, Azadi L, Abbasi H, et al. (2016). A preliminary study: N-acetyl-L-cysteine improves semen quality following varicocelectomy. *Int J Fertil Steril*, 10:120-6.
- Bargawi A, Caruso A, Meacham RB. (2004). Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *J Urol*, 171:501-03 [PubMed: 14665963].
- Benoff S, Hurley IR, Barcia M, Mandel FS, Cooper GW, Hershlag A. (1997). A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Fertil Steril*, 67(2):336-47. doi:10.1016/S0015-0282(97)81921-8.
- Benoff SH, Millan C, Hurley IR, Napolitano B, Marmar JL. (2004). Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium in infertile men with left varicocele. *Hum Reprod*, 19(3):616-27. doi:10.1093/humrep/deh139.
- Camlı DB, Marmar JL, Diamond SM, Gibbs M, Corson SL. (2000). Modifiye edilmiş bir akrozom indüksiyon testi. *Arc androl*, 44:59-64 [PubMed: 10690766].
- Caprio F, De Franciscis P, Trotta C, Ianniello R, Mele D, Colacurci N. (2015, Jul 29). Seminal anti-müllerian hormone levels during recombinant human follicle-stimulating hormone treatment in men with idiopathic infertility undergoing assisted reproduction cycles. *Andrology*, s. doi:10.1111/andr.12065.
- Chemes, H., Fawcett, D.W. and Dym, M. (1979). Unusual features of the nuclear envelope in human spermatogenic cells. *Anat Rec*, 192:493-523.

- Christian Fuglesang S. Jensen, P. Q. (2017). Varicocele and Male Infertility. *Nature Reviews Urology*, 14:523-533.
- Clermont Y. (1972). Genetics of spermatogenesis in mammals. Seminiferous Epithelium Cycle and spermatogonium renewal [memelilerdeki genetik spermatogenezis, seminifer epitelyum siklusu ve spermatogonyum yenilenmesi]. *physiol Rev*, 52:198.
- Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. (1998). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*, 20:211-7.
- de Lamirande E, Gagnon C. (1995). Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med*, 18(3):487.
- Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M. (1995). Human oocyte activation following intra-cytoplasmic injection: the role of sperm cell. *Hum Reprod*, 10:403-407.
- Dubin L, Amelar RD. (1970). Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril*, 21:606-9.
- Esteves SC, Miyoaka R, Agarwal A. (2011). Sperm retrieval techniques for assisted reproduction. *Int Branz J Urol*, 37:570-83.
- Esteves, Sandro C. (2013). The azoospermic male: current knowledge and future perspectives. *Clinics (Sao Paulo)*, 68 Suppl 1: 1-4.
- Esteves, Sandro C. (2015, May-Jun 17). Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl*, s. 459-70 doi:10.4103/1008-682X.148719.
- Eşrefoğlu M. (2016). Bölüm 9 Erkek Genital Sistemi. *istanbul: Tıp Kitabevi*.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Pursis K. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*, 14:1039-49.
- Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergsen T, Oian P. (1993). Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod*, 8:1863-8.
- Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varato A. (1992). Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl*, 15:330-337.
- Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, Kojima K, Kamidono S. (1988). Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertil Steril*, 50(5):795-800.

- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L ve ark. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*, 15(4):830-39.
- Gartner PL. (2016). *Hücre Biyolojisi ve Histolojisi*. İstanbul Tıp Kitabevi: Çeviri ed. Canan Hürdağ.
- Gat Y, Zukerman Z, Chakraborty J, Gornish M. (2005). Varicocele, hypoxia and male infertility. Fluid Mechanics analysis of the impaired testicular venous drainage system. *Hum Reprod*, 20(9):2614-9.
- Gedikli S, Özbek E, Demirci T. (2013). Fertilizasyonun Moleküler Temeli. *Van Tıp Dergisi*, 20(4):294-301.
- Gilbert F.S. (2000). *Development Biology*,. 6th edition: Swarthmore Collage.
- Gomel V, Urman B, Yarali H. (2005). Investigation of the infertile couple. I. A. S içinde, *Reproductive Endocrinology and Infertility Medical Network* (s. 143-55). Ankara: Beksac S editors.
- Griveau JF, Le Lannou D. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl*, 20(2):61-9.
- Güneş S, Sevgili E, Aşçı R. (2013). Sperm DNA Hasarı Mekanizmaları ve Değerlendirme Yöntemleri (Sperm DNA Damage Mechanisms and Evaluation Assays : Review). *Türkiye Klinikleri J Urology*, 4(3):107-14.
- Hammadeh ME, Zeginiadiy T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. (2001). Predictive value of sperm chromatin condensation (anilin blue staining) in the assessment of male infertility. *Arch Androl*, 46(2):99-104.
- Jeng SY, Wu SM, Lee JD. (2009). Cadmium accumulation and metallothionein overexpression in internal spermatic vein of patients with varicocele. *Urology*, 73(6):1231-5. doi:10.1016/j.urology.2009.01.
- Jensen CE, Wiswedel K, McLoughlin J, van der Spuy Z. (1995, Dec 6). Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. *Fertil Steril*, s. 1189-96.
- Johnson, L. V. , M. L. , Walsh, and L. B., Chen. (1980). Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77:990-994.
- Junquiera LC, Carneiro J, Kelley RO. (1998). "22. Bölüm Erkek Üreme Sistemi", "Basic Histology". 8th edition: Aytekin Y, Barış Kitabevi.
- Aydos Kaan. (2005). Spermatozoa metabolizmasına değişik bir bakış: kompartmantalizasyon. *J Turkish German Gynecol Assoc*, 6:204-9.

- Kierszenbaum, Abraham L. (2006). Bölüm 20: Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş. Ankara: Çev Ed. Demir R, Palme Yayıncılık.
- Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. (1996). Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl*, 17(2):151-7.
- Kroese AC, d. L. (2012). Surgery or embolization for varicoceles in subfertile men. *Cochrane Database Syst Rev*, 10:CD000479.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, et al. (1998). Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro fertilization. *Fertil Steril*, 49:112-7.
- Levy R, Seifer-Aknin I. (2001). Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin*, 59(5):531-45.
- Lomboy, Jason R, Robert M Coward. (2016). The Varicocele: Clinical Presentation, Evaluation, and Surgical Menagement. *Semin Intervent Radiol*, 33(3):163-169.
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 69(3):528-32.
- Lundy SD, Sabanegh ES Jr. . (2017, Dec 14). Varicocele management for infertility and pain: A systematic review. *Arab J Urol*, Published, s. 16(1):157-170 doi:10.1016/j.aju.2017.11.003.
- Marmar, Joel L. (2001). The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update*, 7:461-72 [PubMed: 11556493].
- Marmar JL, Agarwal A, Prabaskan S, Agarwal R, Short RA, Benoff S, et al. (2007). Reassessing the value of varicolectomy as a treatment for male subfertility with a new meta-analysis. *Ferti Steril*, 88:639-48.
- Mazumdar S, Levine AS. (1998). Antisperm antibodies: etiogy, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Fertil Steril*, 70:799-810.
- Miki K. (2007). Energy metabolism and sperm function. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 65:309-25.
- Nasr-Esfahani MH, Razani S, Mardani M. (2001). Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(4):219-25.
- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. (2001). Pathophysiogology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*, 7:473-81 [Pubmed: 11556494].

- Paick S, Choi WS. (2019). Varicocele and Testicular Pain: A Review. *World J Mens Health*, 37(1):4-11. doi:10.5534/wjmh.170010.
- Pina-Guzman B, Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. (2005). Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202:189-98.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Society for Male Reproduction and Urology. (2014). Report on varicocele and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*, 102:1556-60.
- Rakesh K. Sharma, Ashok Agarwal. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48(6):835-50.
- Rawe Vy, Hermes R, Nodar FN, Fiszbajn G, Chemes HE. (2007). Results of intracytoplasmic sperm injection in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondrial sheaths and severe asthenoteratozoospermia. *Fertil Steril*, 88:649.
- Reece JB, NA. (2015). Ünite 7 "Hayvan Yapı ve İşlevi". T. İ. Çev Ed. Gündüz E içinde, *Campbell Biyoloji* (s. 5:36 published online doi: 10.1186/1477-7827-5-36). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giagolo E ve ark. (2002). Apoptosis in human sperm :Its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod*, 17(10):1665-72.
- Ronald W. Dudek, P. (2016). *BRS: Embriyoloji*. İstanbul: çeviri ed. Tülay İREZ, Melike ERKAN, İstanbul medikal sağlık ve yayıncılık.
- Sakkas D, Urner F, Bianch PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquened N, Manicardi G, Campana A. (1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction*, 11:837-43.
- Schlegel PN. (2012). Contemporary issues in varicocele management. *Curr Opin Urol*, 22:487-8.
- Sharma RK Pasqualotto FF, N. D. (1999). The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility . *Hum Reprod*, 14:2801-7.
- Sheehan MM, Ramasamy R, Lamb DJ. (2014). Molecular mechanisms involved in varicocele-associated infertility. *J Assist Reprod Genet*, 31(5):521-526.
- Sigman M, Howards SS. (1998). Male infertility. In *Campbell's Urology*, 7th edition (Eds PC Walsh, AB Retik, ED Vaughan). Philadelphia W. B. Saunders, 1287-9.

- Singh NP, Stephan RE. (1998, Jan 13). X-Ray induced DNA double-strand breaks in human sperm. *mutagenesis*, s. 75-9.
- Singh N.P, Muller C.H, Berger R.E. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, 80(6):1420-30.
- Sönmez, Mehmet G, Haliloğlu A.H. (2018, Feb 1). Role of varicocele treatment in assisted reproductive. *Arab J Urol*, Published, s. 16(1):188-196.
- Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril*, 73:43-50.
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol reprod*, 56, 602-07.
- Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C, Gore RW. (1991). Microvascular pressura distribution in the hamster testis. *Am J Physiol*, 260(5-2): H1581-9.
- Syed MMA, Amatya B, Sitaula S. (2019, Jul 14). Median raphe cyst of the penis: a case report and review of the literature. *J Med Case Published*, s. 13(1):214.
- Tesarik J, Mendoza C, Greco E. (2002, January 1). Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after icsi. *Human Reproduction*, Volume 17, Issue 1, s. 184-189.
- Tiejun Zou, Xiang Liu, Shangshu Ding, Junping Xing. (2010). Evolation of sperm mitochondrial function using rh123/pi dual florescent staining in asthenospermia and oligoasthenozoospermia. *Journal of biomedical Resarch*, 24(5)404-410.
- Trum JW, G. F. (1996). The volue of palpation, varicoscreen contact thermography and colour Doppler ultrasound in the diagnosis of varicocele. *Hum Reprod*, 11(6):1232-1235.
- Ünal MS, Özer MC, Sönmez FH, Bayrak G, Demirbağ HO. (2017). Seminal sıvının fertilizasyondaki rolü. *Androl Bul*, 19:138-43.
- Vine MF, Tse CK, Hu P, Truong KY. (1996). Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril*, 65(4):835-42.
- Weese DL, Peaster ML, Himsl KK, Leach GE, Lad PM, Ziemmem PE. (1993). Stimulated reactive oxygen species generation in the spermatozoa of infertile men. *J Urol*, 149(1):64-7.
- WHO Laboratuvar El kitabı. (2010). İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi. world health organization: Dünya Sağlık örgütü.

Zalata AA, Mokhtar N, Badawy Ael N, Othman G, Alghbary M, Moatafa T. (2013). Androgen receptor axpression relationship with semen variables in infertile men with varicocele. J Urol, 189(6):2243-7. doi:10.1016/j.juro.2012.11.112.

Zini A, A. R. (2011). Effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm chromatin and DNA integrity: a prospective trial. Int J Androl, 34:14-9.

Medical Academi, (Erişim Tarihi: 19 Temmuz 2019), www.medicalacademi.com.tr

Üroklirik Ürolojide Robotik Cerrahi Merkezi (2018), www.uroklirik.com.tr

Yeni Biyoloji (12 Aralık 2017), www.yenibiyoloji.com



7. EKLER

EK 1. Gönüllü Olur Formu

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: “Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm DNA fragmentasyonu, sperm kromatin kondensasyonu ve sperm mitokondriyal enerji metabolizmasının incelenmesi”

Sizi, “Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm DNA fragmentasyonu, sperm kromatin kondensasyonu ve sperm mitokondriyal enerji metabolizmasının incelenmesi” başlıklı bir araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Bu anket çalışmasına katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama hakkına sahipsiniz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır.

Sorumlu Araştırmacı: Tülay İREZ

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Sizi davet ettiğimiz çalışmanın amacı, testislerdeki damar bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak meydana gelen varikosel hastalığına sahip erkeklerde, standart semen analizi yapmak ve sonuçlara dayalı olarak sperm DNA' sında meydana gelen hasarı araştırmaktır. Çalışmanın ortalama bir ay sürmesi ve yaklaşık 44 kişinin katılması planlanmaktadır.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, vermiş olduğunuz kümülüs örneğinin analiziyle ilgili süreç rutin olarak devam edecek ve işlem sonucunuzu yine planlanan tarihte almış olabileceksiniz. Kısacası bu çalışmaya katılıp katılmamanız analiz sürecini pozitif ya da negatif herhangi bir şekilde etkilemeyecektir.

Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?

Bu çalışmaya katılmanız halinde herhangi bir maddi sorumluluk altına girmeyeceksiniz.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Araştırma sorumlusu, kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışma

sonuçları çalışma bitiminde yalnızca bu araştırmada olmak üzere tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Bahar SARIKAYA

GÖREVİ : Diğer Araştırmacı

TELEFON : 05347227342

Biruni Üniversitesi'nde Bahar SARIKAYA tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı

konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sorun ile karşılaştığımda; Bahar SARIKAYA'yı 05347227342 nolu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Tel:

İmza:

EK 2. Etik Kurul Onayı

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

24.07.2019

Sayın Prof.Dr.Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda planladığı “Normal Erkek ve Varikozel Hasta Gruplarında Sperm DNA Fragmentasyonu, Sperm Kromatin Kondensasyonu ve Sperm Mitokondriyal Enerji Metabolizmasının İncelenmesi” isimli araştırmanızın kurulumuzun 24.07.2019 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

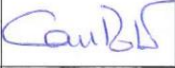


Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN

T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

	Karar No: 2019/31-04
Tarih: 24.07.2019 Toplantı Sayısı:31	Prof.Dr.Tülay İREZ'in planladığı "Normal Erkek ve Varikosel Hasta Gruplarında Sperm DNA Fragmentasyonu, Sperm Kromatin Kondensasyonu ve Sperm Mitokondriyal Enerji Metabolizmasının İncelenmesi" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.

ÜYELER

Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN	Tıp Fakültesi	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D	Etik Kurul Başkanı	
Prof.Dr.Leman ŞENTURAN	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Hemşirelik Bölümü	Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof.Dr.Fatma ÇELİK	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Beslenme ve Diyetetik Bölümü	Üye	
Doç.Dr.Şölen HİMMETOĞLU	Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya A.D.	Raportör	
Doç.Dr.Burcu KARADUMAN	Diş Hekimliği Fakültesi	Periodontoloji A.D.	Üye	
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep HOŞBAY	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü	Üye	
Dr.Öğr.Üyesi Ayşe Dilşad YAKUT	Eğitim Fakültesi	Özel Eğitim	Üye	

Ek 4. Hastane Onay Formu

BİRÜNİ ÜNİVERSİTE HASTANESİ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığına;

Biruni Üniversitesi Prof. Dr. Tülay İREZ'in yürütücüsü olduğu, Biruni Üniversitesi Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Bahar SARIKAYA'nın araştırmacısı olduğu "Normal erkek ve varikozel hasta gruplarında sperm DNA fragmentasyonu, sperm kromatin kondensasyonu ve sperm mitokondriyal enerji metabolizmasının incelenmesi" isimli tez çalışmasında, hastanemiz üroloji polikliniğine gelen hastaların semen örneklerinin, çalışma sonrası atık materyallerinin tez çalışmasında kullanılması tarafımdan uygun görülmüştür.

Uygun

BİRÜNİ ÜNİVERSİTE HASTANESİ
SAĞLIK EĞİTİMİ UYG. VE ARAŞT. MERKEZİ
Dr. Öğr. Üyesi Tülay İREZ
Başhekim
Dip.Tes.No:94324 Kurum Kodu 11349977

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Bahar SARIKAYA

Doğum Tarihi: 02.05.1995

Mail Adresi: baharsrky@gmail.com

Unvanı: Biyolog

Öğrenim Durumu:Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2013-2017
Y. Lisans	Klinik Embriyoloji	Biruni Üniversitesi	2017-Devam Ediyor

9. İNTİHAL RAPORU

NORMAL ERKEK VE VARİKOSEL HASTA GRUPLARINDA
SPERM DNA FRAGMENTASYONU, SPERM KROMATİN
KONDENSASYONU VE SPERM MİTOKONDRIYAL MEMBRAN
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 6	% 2	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	maksfarma.com İnternet Kaynağı	% 2
2	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	Submitted to Mersin Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
4	www.toraks.org.tr İnternet Kaynağı	% 1
5	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<% 1
7	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to Cumhuriyet University	