



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

NORMOSPERMİK VAKALARDA SİPROFLOKSASİN *İN VİTRO*
SPERM DNA FRAGMENTASYONU VE SPERM
MİTOKONDRIYAL AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Esra SOLAK

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Göksun Demirel

Ocak, 2020



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
YÜKSEKLİSANS TEZ ONAY SAYFASI

Tarih: 21 / 01 / 2020

Anabilim Dalı : HISTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ

Program : KLİNİK EMBRİYOLOJİ

Öğrencinin;

Adı ve Soyadı : ESRA SOLAK

Öğrenci No : 170805017

Danışman : DR. ÖĞR. ÜYESİ GÖKSUN DEMİREL

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Esra SOLAK tarafından hazırlanan Normospermik Vakaslarda Siprofloksasin' in *In Vitro* Sperm DNA Fragmentasyonu ve Sperm Mitokondriyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21 / 01 / 2020

İmri Çyesinin Unvanı, Adı, Soyadı

DR. ÖĞR. ÜYESİ GÖKSUN DEMİREL

PROF. DR. TÜLAY İREZ.

DR. ÖĞR. ÜYESİ DERYA DOĞANAY

Çalıştığı Kurum

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL YENİ YÜZYIL
ÜNİVERSİTESİ

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

İmza

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri raporından emsal olmuş ve Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Leman ŞENTÜRK
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tezin bana ait olduğunu, tüm aşamalarında etik dışı davranışımın olmadığını, içinde yer alan bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, kullanmış olduğum bütün bilgilere kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin yürütülmesi ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Esra SOLAK



Değerli Anneciğime; Rahmet, Sevgi Ve Özlemle...

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sürecinde, beni her daim motive edip gece gündüz demeksizin ilgilenerek bana sonsuz olanak sunan, akademisyenliği aşılıp sevdiren çok kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Göksun DEMİREL'e, Akademik kariyer yolumda her daim sabırla, şevkatle yanımda olan hiçbir desteği üzerimden esirgemeyen Saygıdeğer hocam Prof. Dr. Tülay İREZ 'e TC Biruni Üniversitesi Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı'ndaki tüm hocalarıma, asistan arkadaşlarıma ve bu aşamaya birlikte geldiğim başta canım babam Sayın Mehmet SOLAK olmak üzere değerli ağabeylerim, Yunus Emre ve Hüseyin SOLAK'a, kız kardeşim Duygu SOLAK'a, sonsuz saygılarımı sevgilerimi ve en içten teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

İÇ KAPAK	
ONAY BELGESİ	
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	x
RESİMLER LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
TÜRKÇE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELEr.....	xiv
İNGİLİZCE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELEr.....	xvi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. İNFERTİLİTE NEDİR?.....	2
2.1.1. ERKEK İNFERTİLİTESİ	2
2.1.2. ERKEK ÜREME SİSTEMİ	5
2.2. ERKEK GENİTAL ÜREME KANAL SİSTEMİ	6
2.3. ERKEK GENİTAL SİSTEMİNİN YARDIMCI BEZLERİ.....	7
2.3.1. TESTİSİN GELİŞİMİ	8
2.4. TESTİSİN ANATOMİSİ.....	11
2.5. TESTİSLERİN KANLANMASI	12
2.5.1. KAN TESTİS BARİYERİ	13
2.6. TESTİS HİSTOLOJİSİ	13
2.7. SPERMATOGENEZ, SPERM VE YAPISI.....	15
2.7.1. SPERMATOGENEZ	15
2.7.2. SPERMATOGENEZ BASAMAKLARI	16
2.7.2.1. Sperm	17
2.8. SPERM KROMATİN YAPISI	18
2.8.1. SPERM DNA HASARI	19
2.8.2. SPERMATOZON DNA FRAGMENTASYON TESTLERİ	21

2.8.2.1. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling)	21
2.8.2.2. In situ çentik okuma tayini (In Situ Nick Translation Assay) (NT)	22
2.8.2.3. DNA breakage detection- FISH (DBD-FISH)Yöntemi	22
2.8.2.4. Sperm Kromatin Dispersiyon (SCD) Testi	22
2.8.2.5. Basit hücre jel elektroforezi (COMET):	23
2.8.2.6. Sperm kromatin strüktür analizi (SCSA):	23
2.8.2.7. Akridin oranj testi (Acridine Orange Test) (AOT):	23
2.9. MİTOKONDRIYAL DNA(MTDNA) VE ETKİLERİ	24
2.10. ANAMNEZ VE FİZİK MUAYENE	28
2.11. GENETİK NEDENLER	29
2.12. SEMEN VE MEVCUT ÇALIŞMADA KULLANILAN İLERİ TANI TESTLERİ.....	31
2.12.1. SEMEN	31
2.12.2. SEMEN ANALİZ (SPERMİYOGRAF) TESTİ	32
2.12.4. SEMENİN FİZİKSEL İNCELEMESİ LİKEFAKSİYON	32
2.13. MORFOLOJİ ANALİZİ	35
2.13.1. KRUGER KRİTERLERİ	36
2.13.2. WHO KRİTERLERİ	36
2.14. SPERMATOZOA VİABİLİTE (CANLILIK) TESTLERİ	37
2.15. SİPROFLOKSİSİN	38
2.15.1. KİMYASAL YAPISI	38
2.16.2. ETKİ MEKANİZMALARI	39
2.16.3. FARMOKİNETİK ÖZELLİKLERİ	39
2.16.4. DİRENÇ MEKANİZMALARI	39
3.GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. KULLANILAN YÖNTEMLER	41
3.1.1. HASTA SEÇİMİ	41
3.1.2. DIŞLANMA KRİTERLERİ	41
3.1.3. MORFOLOJİ DEĞERLENDİRİLMESİ	42
3.2. SPERM DNA FRAGMENTASYONU DEĞERLENDİRİLMESİNDE ACRİDİN ORANGE BOYAMA PROSEDÜRÜ	43
3.3. MTT TESTİ	44
3.3.1. SPERMLER İÇİN MTT CANLILIK TESTİ	45
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	46

4.BULGULAR	48
5.SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	58
5.1. SONUÇ.....	58
5.2. TARTIŞMA	58
5.3. ÖNERİLER.....	61
6. KAYNAKLAR	62
7. EKLER.....	71
8. ÖZGEÇMİŞ	72
9. İNTİHAL RAPORU	73



SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

°C	Santigrat Derece
µl	Mikrolitre
AMH	Anti-müllerian Hormon
AO	Akridin Orange
DFI	DNA fragmentation index
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ-WHO	Dünya Sağlık Örgütü, World Health Organization
FSH	Folikül Stimülan Hormon
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
LH	Lüteinizan Hormon
ml	mililitre
TUNEL	Terminal Uridine Nick- End Labeling
YÜT	Yardımla Üreme Teknikleri
CP	Ciprol
CPFX	Siprofloksasin
MTT	Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT)

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 2.1:	Erkek infertilitesinde ROS ve mtDNA mutasyonu ilişkisi.....	28
Tablo 3.1:	Çalışma grupları.....	42
Tablo 3.2:	Çalışma prosedürü.....	46
Tablo 4.1:	Olguların yaş ortalaması.....	47
Tablo 4.2:	Total konsantrasyonun ortalama değeri.....	47
Tablo 4.3:	Canlılık oranlarına dair değerler.....	50
Tablo 4.4 :	Canlılık oranlarına ilişkin test sonuçları.....	49
Tablo 4.5 :	Numune DNA'larına ilişkin sağlamlık oranları.....	51
Tablo 4.6:	DNA sağlamlığına ilişkin test sonuçları.....	52
Tablo 4.7 :	Deneklerin morfolojik özelliklerine ilişkin bulgular.....	53

RESİMLER LİSTESİ

Resim No	Resim Adı	Sayfa No
Resim 2.1:	Y Kromozomunun fonksiyonel haritalanması	4
Resim 2.3:	Sertoli hücreleri ile gelişmekte olan sperm arasındaki ilişkiyi gösteren seminifer tübül kesitinin şematik gösterimi	10
Resim 2.4:	İnsan testiküler parankimi 100 gr doku için 9ml/dk kan ile beslenir.....	12
Resim 2.5:	Sertoli hücrelerinin oluşturduğu kan testis bariyerinin şematik diyagramı.....	13
Resim 2.6:	İnsan testisinin sagital kesitinin şematik diyagramı	14
Resim 2.7:	Testisin histolojik yapısı	15
Resim 2.8:	Spermatogenez.....	16
Resim 2.9:	Spermatogenik hücre serilerini gösteren şematik diyagramı	17
Resim 2.10:	Sperm Mikroskopik Anatomisi.....	18
Resim 2.11:	Normal spermin 100x büyütme objektifindeki morfolojik görüntüsü izlenmektedir.....	18
Resim 2.12:	Sperm Kromatin Yapısı	19
Resim 2.13:	Erkek üreme sisteminde spermatogenez olayı.....	20
Resim 2.14:	SCD testi ile DNA bütünlüğü analizi	22
Resim 2.15:	Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü.....	24
Resim 2.16:	Oksidatif fosforilasyon mekanizma yapısı ile kristaller üzerindeki enzimler aracılığıyla mitokondride enerji üretilmesi	25
Resim 2.17:	Sperm Mitokondri DNA yapısı	26
Resim 2.18:	a- Makler sayım kamerası.....	34
Resim 2.19:	Kruger kriterlerine göre anormal sperm morfolojisi görüntüleri.....	35
Resim 2.20:	Siprofloksasin kimyasal yapısı	38
Resim 3.1:	Acridin orange boyama yeşil (normal), kavuniçi ve turuncu (defektli) DNA fragmentasyonunu göstermektedir(100x immersiyon objektifi floresan mikroskobu görüntüsü).	44
Resim 3.2:	MTT boyaması ile Pozitif ve negatif reaksiyon gösteren sperm resimde görülmektedir.....	46
Resim 4.1:	Sperm morfoloji değerlendirme, anormal morfolojik yapıdaki spermilerin gösterimi (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü).....	55

Resim 4.2: MTT testi, sperm canlılık analizi(100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü).	55
Resim 4.3: MTT testi, sperm canlılık analizi(100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü).	56
Resim 4.4: Acridin Orange boyaması Siprofloksasin antibiyotik uygulama öncesi Sperm DNA hasar tayini değerlendirilmesi.	56
Resim 4.5: Acridin Orange boyaması Siprofloksasin antibiyotik uygulama sonrası Sperm DNA hasar tayini değerlendirilmesi	57



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 4.1:	Semen örneklerine ait motilite dağılımı.....	49
Şekil 4.2:	7,4 ul ilaç uygulama sonrası motilite dağılımı.....	49
Şekil 4.3:	14,8 ul ilaç için motilite dağılımı.....	50
Şekil 4.4:	Kontrol için motilite dağılımı	50
Şekil 4.5:	Gözlemlerin her 3 grup için canlılık oranları.....	51
Şekil 4.6:	Gruplara göre ortalama canlılık oranları.....	52
Şekil 4.7:	Gözlemlere ilişkin DNA sağlamlık oranlarının histogramı.	53
Şekil 4.8:	Normal numune morfolojisinde kritik değer etrafındaki frekans.	54



TÜRKÇE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELELER

Solak, E. (2020). Normospermik Vakalarda Siprofloksasin İn Vitro Sperm DNA Fragmentasyonu ve Sperm Mitokondriyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması Yüksek Lisans Tezi, Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.

12 ay veya daha uzun süreli korunmasız ilişkiye rağmen gebelik oluşmaması durumu infertilite olarak tanımlanır. Erkek infertilitesi üreme çağına ulaşmış çiftlerin %15' ini etkilemekte iken tüm infertil olguların yarısını oluşturur. İnfertilite, çiftlerin hem ruh sağlığını hemde sosyal yaşamlarını etkileyen önemli bir sebeptir. İnfertilite %50 kadın, %40 erkek faktörüne bağlı olarak gelişmektedir. Toplam infertil vakaların %10 luk kısmı açıklanamayan infertilite olarak belirtilmektedir. Anormal veya düzensiz kromatin paketlenmesi sperm DNA hasar mekanizmasının en önemli belirteçidir. Spermdeki gelişimsel anormaller kromatin kondensasyon sürecine bağlıdır. Sperm DNA fragmentasyon indeksi ve maturasyon defekti oranları fertilizasyon öncesi sperm seçiminde çok önemlidir. Sperm DNA fragmentasyonu ile birlikte spermin hareket ederek oosite ulaşması için gerekli olan enerji deposu mitokondrinin aktivitesi günümüzdeki araştırma konularında önem taşımaktadır. Bu çalışmada siprofloksasin antibiyotığının sperm DNA fragmentasyonu ve sperm mitokondriyal aktivitesi üzerindeki etkileri belirlenmek üzere Biruni Üniversitesi Hastanesine rutin kontrol amacıyla başvuran 30 erkek hastadan elde edilen örnekler kullanılmıştır. Öncelikle semen analizi gerçekleştirilen sperm hücreleri, siprofloksasin antibiyotığının farklı dozları uygulanmak üzere ve kontrol grubu oluşturmak üzere 3'er eşit porsiyona bölündü. Siprofloksasin, gruplara ayrılan sperm hücrelerine 7,4 ve 14,8 mikrolitrelik dozlar halinde uygulanarak iki saat boyunca 36,5 C⁰ inkübe edildi. İlaç dozları uygulandıktan sonra her grupta semen analizleri tekrarlanarak fark gözlemlendi. Semen numunesi yayma preparat halinde hazırlanarak acridin orange boyama tekniği ile floresan mikroskopu kullanılarak DNA hasarı belirlendi. Yüksek doz siprofloksasin antibiyotik ile inkübe edilen numunede DNA hasar oranlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artış tespit edildi. MTT canlılık testi ile farklı antibiyotik dozlarında inkübe edilen sperm numunelerinin mitokondriyal aktivitesi tespit edildi. Yüksek doz antibiyotiğe maruz bırakılan semen numunesinde düşük doz ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı derece canlılık kaybının olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilitesi, Sperm mitokondriyal aktivite, Siprofloksasin, Sperm DNA hasarı.



İNGİLİZCE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELER

Solak, E. (2020). Investigation of the Effect of Ciprofloxacin on In Vitro Sperm DNA Fragmentation and Sperm Mitochondrial Activity in Normospermic Cases. Master Thesis, Biruni University Graduate Education Institute, Istanbul.

Infertility is defined as occurrence of no pregnancy despite having unprotected sexual intercourse over a time period of 12 months or more. Male infertility affects the 25% of the young couples and it forms the half of the all infertility cases. Infertility is a very important issue affecting both mental state and the social life of couples. Infertility develops by 50% of female factors and %40 of male factors. 10% of all the infertility cases are defined as unexplainable infertility. Abnormal or irregular chromatin packaging is the main determinant of sperm DNA damage mechanism. The developmental abnormalities of sperms are related to chromatin condensation time. The sperm DNA fragmentation index and the maturation defect ratios very important in sperm selection before the time of fertilization. The activity of mitochondria, the energy store which is needed for sperm to move and reach the oocyte, along with the sperm DNA fragmentation are carrying utmost importance at the current research topics. In this study, to determine the effects of an antibiotic known as ciprofloxacin on the sperm mitochondrial activity and sperm DNA fragmentation, the samples obtained by the 30 male patients that visited the Biruni University Hospital for routine control procedures are used. First, the semen analyzed sperm cells are divided into three equal portions to apply ciprofloxacin in different doses and to form the control group. Ciprofloxacin applied to the divided sperm groups at 7.4 and 14.8 microliters doses then incubated with the temperature of 36.5 celcius for two hours. After the application of doses, the semen analyzes are repeated and the differences are monitored. The DNA damage is determined by using the fluorescent microscope with acridine painting technique and by preparing as semen sample spreading preparation. It is detected that the group which incubated with high dose of ciprofloxacin had more DNA damage compared to the control group. The mitochondrial activity of the sperm samples that are incubated with the different doses of antibiotic are detected with MTT test it is determined that the semen sample exposed to the high dose of antibiotic lost its vitality more compared to the semen sample of low dose and the control group.

Key words: Ciprofloxacin, Male Infertility, Sperm DNA Damage, Sperm Mitochondrial Activity.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Erkek infertilitesi, fertil olduğu bilinen kadın eş varlığında ve düzenli cinsel birlikteliğe karşın 35 yaş altı kadınlarda bir yıl, 35 yaş üzeri kadınlarda ise 6 ay sürede gebelik görülmemesi olarak tanımlanır (Looijenga and Dohle, 2009). Erkek infertilite belirteçlerinin en başında anamnez, fizik muayene ve takiben semen analizi yapıldığı bilinmektedir. Semen analizi, sperm hareketliliği ve sperm morfolojisi hakkında bilgi vererek gerekli tedavi planlanmasında başrol oynar. Semen analizi sperm DNA hasarı ve sperm maturasyonu hakkında bilgi vermemekte olup ileri tetkit gerektirir. Sperm DNA hasarı testi rutin laboratuvar uygulamalarında kromatin kondasyonu ve sperm maturasyonu hakkında bilgi verir (Aitken et al., 1995). Son yıllarda yapılan DNA bütünlüğünün belirlenmesine yönelik çalışmalar erkek infertilitesindeki önemini ortaya koymuştur (Koyuncu, 2011). Sperm DNA fragmantasyon oranı (DFI); İnfertil bireylerde fertil bireylere göre daha yüksektir (Sun et al., 1997). Fertil bireylerin infertil bireylere göre DNA hasar onarım mekanizması anlamlı derecede yüksek olarak bildirilmiştir(Sun et al., 1997). Literatürde yapılmış olan birkaç çalışma bulunmaktadır. İlk olarak Buffalo üzerine yapılan bir hayvan çalışmasında bakteriyel kontrol için ciprol(CP) kullanılmıştır. Dondurulmuş buffalo semen numunesinin çözülme sonrası kalite ve doğurganlığına hasar vermeden bakteriyel kontaminasyonu kontrol ettiğini göstermiştir(Akhter, 2007). Zobeiri ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı hayvan çalışmasında NMRI farelerde siproflaksisinin DNA hasarı ve fertilite potansiyeli kapsamında embriyonik gelişim üzerine etkisine bakılmıştır. DNA hasarı ve kondrotoksisitenin, CPFEX tarafından indüklendiği bildirilmiştir. Testis fonksiyonları ve yapısındaki bozulmaya CPFEX' in neden olduğu belirtilmiştir(Zobeiri et al.,2012). Ramesh ve arkadaşları 2016 yılında yaptıkları çalışmalarında Levofloksasinin sıçanlarda testis dokusu ve spermatogenez üzerine etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak Levofloxacin, spermatosit hücreleri üzerinde, özellikle de yüksek dozda histopatolojik etkilere görülmüştür (Ramesh et al.,2016).

Bu tez çalışmasında kinolon grubuna ait olan siprofloksasin antibiyotığının 'Normospermik Vakalarda in vitro Sperm DNA Fragmantasyonu ve Sperm Mitokondriyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması'amaçlanmıştır. Siprofloksasin antibiyotığının, insan spermi üzerine literatürdeki ilk çalışmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite Nedir?

1 yıllık korunmasız düzenli ilişkiye rağmen 35 yaş altındaki ve 6 aylık korunmasız düzenli ilişkiye rağmen 35 yaş üzerindeki kadınlarda gebe kalınmaması infertilite olarak tanımlanmaktadır. Bu durumdaki çiftlerde infertilitenin nedeni endokrinolojik, jinekolojik, anatomik, genetik, ürolojik ve psikolojik olarak açıklanır. İnfertilite %50 kadın, %40 erkek faktörüne bağlı olarak gelişmektedir. Toplam infertil vakaların %10 luk kısmı açıklanamayan infertilite olarak belirtilmektedir. İnfertilite tanısı koyulan çift, kadının yaşı, aile öyküsü, erkek bireyin küçüklükte geçirdiği ateşli hastalıklar, infertilite süresi gibi birçok faktör değerlendirilerek yardımcı üreme teknikleri ile uygun tedavi yöntemine karar verilir. (Jungwirth et al., 2012).

2.1.1. Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesi kadın infertilitesine göre daha çok dikkat çeken belirgin sebeplerden meydana gelmektedir. Bu sebepler sperm DNA hasarı, sperm motilitesi, testis travması, üreme kanalı tıkanıklıkları, gen mutasyonları, hormonal bozukluk, varikosel, kriptorşidizm, kemoterapik ajanlar ve erektil disfonksiyon sayılabilir. Sperm üretimi genel olarak erkeklerde ergenlik döneminin başlamasıyla başlamaktadır. Luteinizan hormon (LH) ve Folikül stimüle edici hormon (FSH) beyindeki hipofiz bezinde salgılanır. Sperm olgunlaşması için bu hormonların salınımı gerekmektedir. Testisler sperm üretirken gelişimi epididimde tamamlanır. Sperm kanalı aracılığıyla olgun spermier cinsel ilişki esnasında kadın vajinasına atılır. Bu esnada veziküler seminalisten spermi besleyen ve koruyan sıvılar meniye karışır. Bu işlem sperm üretimi olarak adlandırılırken, erkeğin yaşamı boyunca sürekli olarak devam eder (Payan-Carreira, 2013). Erkek infertilitesine neden olan birçok genetik etiyoloji tanımlanmıştır.

Bunlar:

- 1.Kromozomal bozukluklar,
- 2.Y kromozom mikrolelesyonları,
- 3.Hipotalamik-hipofizer-gonadal aks bozuklukları,
- 4.Steroid ve reseptör defektleri,

- 5.Ekstratestiküler duktal ve ejakulatör sistem anomalileri,
6.Sperm üretim ve fonksiyon bozuklukları olarak sıralanabilir.

➤ **Kromozomal düzensizlikler**

Kromozomal bozukluklar subfertil ve infertil erkeklerde sıklıkla görülmektedir.. Kromozom anomalisi infertil erkeklerde %5 civarındadır(Vegetti et al., 2000). Yapısal ve sayısal olarak kromozom anomalisi değerlendirilir. Hücre başına düşen kromozom sayısındaki değişiklikler, sayısal anomali bir veya daha fazla kromozom delesyonu/duplikasyonu yapısal kromozom anomalisi olarak adlandırılmaktadır. İnfertiliteye neden olan sayısal ve yapısal kromozom bozuklukları aşağıdaki gibi sınıflandırılır(May et al.,2003).

➤ **Sayısal kromozom bozuklukları:**

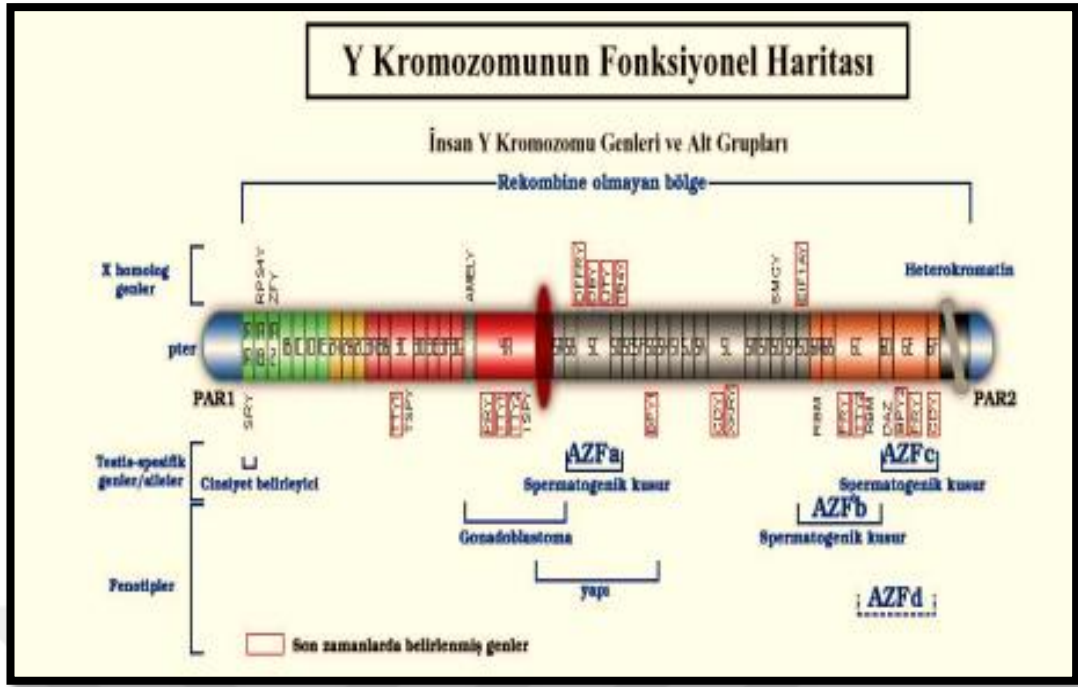
- a. Klinefelter sendromu
- b. XYY erkek
- c. Miks gonadal disgenezi
- d. Otozomal anöplodiler

➤ **Yapısal kromozom bozuklukları:**

- a. Robertsonian translokasyon
- b. Resiprokal translokasyon
- c. Otozomal İnversiyon
- d. XX erkek sendromu

Y mikro delesyonları

Parça kaybına uğrayan kromozomlar delesyon adını alır. İki kromozomun sinapsis evresinde kesişme noktalarında kırılmalar olması ve böylelikle ortaya çıkan parçaların farklı kromozomlara yapışmasıyla oluşabilir (Temizkan, 1994). Genetik materyalin spontan kaybı y mikro delesyonu ile ilişkilendirilmektedir. Y kromozomun fonksiyonel haritası gösterilmiştir(Resim 2.1).



Resim 2.1: Y Kromozomunun fonksiyonel haritalanması (Lahn and Page, 1997)'den değiştirilerek alınmıştır.

Kromozom içi rekombinasyon olayları Yg11'de bulunan büyük homolog tekrarlayan diziler arasında gerçekleşerek AZFa, AZFb ve AZFc delesyonlarına neden olmaktadır(Hendry et al., 1999). Dölllenmiş yumurtalarda veya embriyolarda delesyonlar çoğunlukla de novo(yeni) olarak meydana gelmektedir. Olası nedenler genelde mayotik ya da spermatit kaynaklıdır(McElreavey K. 1999).

Hipotalamik-hipofizer-gonadal aks bozuklukları

Hipotalamo-hipofizer gonadal aksta bulunan genetik düzenleyici faktörler erkek fertilitasını etkilemekte ve bunların anormallikleri infertiliteye neden olmaktadır (Lahn and Page 1997). Yetersiz androjen salınımı ve spermatogenezdeki bozukluk; Gonadal yetmezlik veya düşük seviyede gonadotropinler ile karakterize olan hipogonadotropik hipogonadizmde, gonadotropin salgılatıcı hormon, folikül stimulan (uyarıcı) hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) düzeylerinde düşüklük ile ilişkilendirilmektedir (Maurer and Simoni 2000).

Hormon ve reseptör bozuklukları

Steroid hormon ve reseptör bozuklukları sebebiyle gelişen infertilite steroid biyosentez ve metabolizmasındaki düzensizliklere bağlıdır (Griffin and Wilson, 1992).

X kromozomu üzerinde tek gen kopya halinde androjen reseptörü bulunur. Bu genin bozukluğu halinde ağır infertilite ve/veya ağır dış genital anomaliler görülmektedir (Playán et al.,2006).

➤ **Ekstratestiküler duktal ve ejakulatör sistem bozuklukları**

Bu bozukluklar içinde, konjenital bilateral vaz deferens agenezisi, persistan Müllerian kanal sendromu, Young sendromu, myelodisplazi ve Prune-Belly sendromu bulunmaktadır (Kadıoğlu ve ark.,2004).

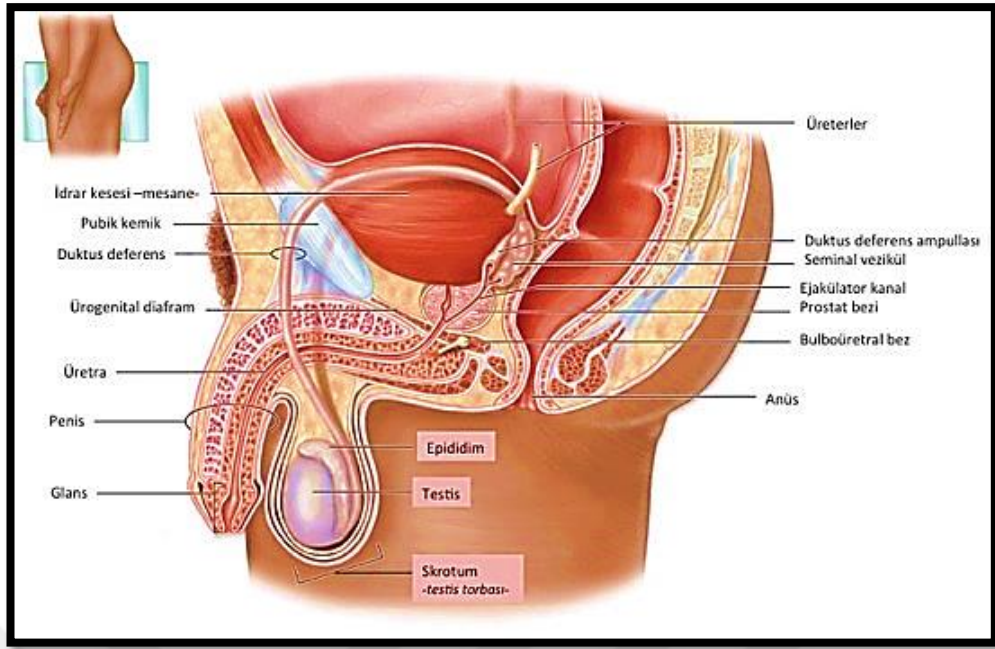
➤ **Sperm üretim ve fonksiyon bozuklukları**

Myotonik distrofi, Noonan sendromu, primer silier diskinezi, orak hücre anemisi ve β -talasemi, sperm üretim ve fonksiyonlarını bozarak infertiliteye neden olabilmektedir(Fourie et al., 1991).

2.1.2. Erkek Üreme Sistemi

Testis

Erkek üreme sistemi androjen biyosentezi ve sekresyonundan sorumlu olan testisler, spermatogenezis ve spermiyogenezis evreleri sonunda sperm üretiminin gerçekleştiği ve spermin taşınmasından sorumlu olan genital boşaltım kanallarından oluşmaktadır(Kalfa, 2020).



Resim 2.2: Erkek üreme sistemi anatomisi (Mescher,2016).

2.2. Erkek Genital Üreme Kanal Sistemi

Erkek üreme sistemi genital boşaltım kanalları, duktus eferentes, duktus epididimis, duktus deferentes, duktus ejakulatoryus erkek üretrasının bir parçasıdır. Semen sperm dışındaki kısmını oluşturmakta görev alan ve spermin beslenmesi için besin kaynağı, veziküla seminalis, aksesuar cinsiyet bezleri, prostat, bulboüretal bezler ve penisten oluşmaktadır(Ross and Pawlina., 2014).

Duktili Eferentes

Mediastenden, epididim başının başına 15-20 adet küçük, sıkıca kıvrılmış kanallar duktuli efferentes olarak adlandırılır. Bu kanal 4-5 m uzunluğundadır. Duktus epididimidis, epididiminin hem gövde hem de kuyruk bölgesi boyunca uzanır. Kuyruk bölgesinde kalın, az kıvrılmış ve çapı büyük olur. Epididimin sonunda duktus deferens'i oluşturmak için düz yapı halini alır. Boşalma sırasında spermiler duktuli efferentes ve duktus epididimidis boyunca iki şekilde itilir. İlk olarak kas dokusu, kasılma yoluyla kanalları daraltarak spermi ilerletir. İkincisi, duktuli efferentes'de bulunan silialar sürekli sallanma hareketleriyle spermileri ilerletebilir. Sperm çeşitli kanallardan geçerken, onları canlı tutmaya yardımcı olan az miktarda sıvı alırlar.

Bu sekresyonlar yüksek konsantrasyonlarda potasyum, sodyum ve sperm için bir enerji kaynağı olan gliserilfosforilkolin olarak bilinen bir maddeyi içerir (Gartner and Hiatt, 2016).

Epididimis

Testisin postero-laterinde yer alan epididim, tek bir kanal olup yaklaşık olarak 5 m uzunluğundadır (Junqueira et al., 1992). Kıvrılarak 4-5 cm boyunda bir bez halini alır. Testise efferent kanallarla tutunarak kauda kısmında vaz deferens ile devam eder. Epididim lümenini yalancı çok katlı kolumnar epitel hücreleri döşer. En dış kısımda serozası yer almaktadır (Kierszenbaum, 2006).

Duktus Deferens

Erkek üreme sisteminde, vaz deferans olarak adlandırılan duktus deferens, epididimisin kuyruğunda, musküler bir boru şeklindedir. Her duktus deferens, rezervuar görevi mesane seviyesinde genişleyerek ampulla ile biter. İki epididimiden ortaya çıkan yapı ve fonksiyon bakımından özdeş olan iki ductus deferentes vardır (Junqueira et al., 1992).

Penis ve Üretra

Penis, hem idrar hem de meninin vücut dışına atılmasını sağlayan üç silindirik yapı ve bunları saran zarlardan oluşmaktadır. Güçlü zarla sarılmış olan silindirik yapılar penisin üst kısmında birbirine paralel şekilde uzanır. Bu silindirik yapıların iç kısımları süngerimsi yapıdadır ve ereksiyon sırasında kanla dolar. Bu yapıların alt kısmından üretra (idrar yolu) geçmektedir (Junqueira et al., 1992).

2.3. Erkek Genital Sisteminin Yardımcı Bezleri

Prostat

Prostat, yuvarlak halde mesane tabanında yer alır. Başlıca önemli görevlere sahip olan prostat meni sıvısının kokusu, spermilerin besleneceği maddelerin salgısı ve meni sıvısının spermier dışındaki kısmından sorumlu olup idrar yolunun başlangıç kısmında yer almaktadır (Gartner and Hiatt, 2016). Ejekülatın %20-30'unu oluşturan

prostat bezi günlük 0,5-2 ml kadar sıvı salgılar. Vajina içerisinde spermilerin yaşaması için bazik olan prostat salgısı, vajinanın asidik ortamını nötralize eder.

Seminal Vezikül

Seminal vezikül, yaklaşık 6 cm boyunda prostatın üst hizasında yerleşmiş mesanenin arka-alt kısmında yer alan bir çift bezdir. Vaz deferans ile her bir bez birleşerek ejakülatör kanalı oluşturur. İç yüz tarafında üreterler uzanırken arka tarafta rektum ile komşudur. Yalancı çok katlı epitel ile döşeli olan yapısı yoğun bağ dokusu içermektedir. Prostat bezi kan dolaşım sistemi ve lenfatikleri ile aynıdır. Sempatik sinirler aracılığıyla innerve olur(Kierszenbaum, 2006).

Bulboüretal Bezler(Cowper Bezleri)

Cowperbezleri olarak adlandırılan bulboüretal bezler membranöz üretranın iki yanında, prostatın altında konumlanmış ürogenital diafragma içinde bulunur. 0.7-1 cm çapında olan bezler; albüminden zengin, alkali mukoid yapıdaki salgılarını üretraya boşaltma kanalları aracılığıyla aktarırlar. Testesteron yokluğunda bulboüretal bezler atrofiye olur. Ejekülasyon öncesi üretrada kalmış olan idrar kalıntısını nötralize ederek kaygan, akıcı ve kendine özel kokusu olan üretranın kayganlaşmasını sağlayan sıvı salgılar (Kierszenbaum, 2006).

2.3.1. Testisin Gelişimi

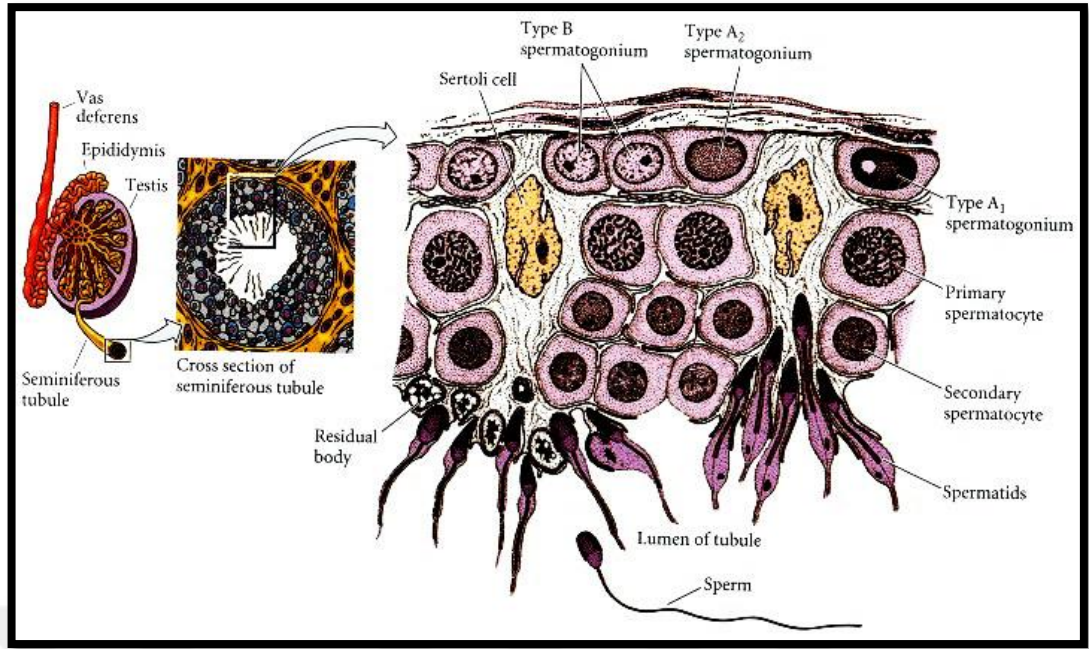
Fertilizasyon ile genetik cinsiyet oluşur. Oosit X kromozomuna sahiptir. X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllenmesi sonucu cinsiyet XX dişi veya XY erkek olarak adlandırılır. Farklanmamış gonadlar yedinci haftaya kadar aynı görünümündedirler. Y kromozomunun kısa kolu cinsiyet belirlenmesi için kritik öneme sahiptir. SRY geni testis belirleyici faktör (TBF) için gereklidir (Berta et al., 1990). TBF primer seks kordonlarını uyarır. Bu kordon yapıları farklanmamış gonad medullalarında anastomoz yaparlar ve ‘rete testis’i oluştururlar. Seminifer kordonlar(seks kordonları) tunika albuginea gelişiminden sonra yüzey epiteliyle olan bağlantıları kaybolur. Testiküler gelişim fetüs için çok önemli olup tunika albugineanın gelişimine önemli derecede bağlıdır. Testis geliştikçe mezonefroz bağlarından ayrılarak kendi mezenteri olan ‘mezorchium’ ile asılı hale gelir. Seminifer tübüller seminifer kordonlardan farklanarak tubuli rekti ve rete testis tübül

ağı ile bağlantı kurar. Mezenşimde interstisyel(ara) dokuda bulunan leydig hücreleri ve destek elemanları seminifer tübüllerden ayrılırlar. Androjenik hormonlar (testesteron ve androstenedione) leydig hücreleri tarafından sekizinci haftadan itibaren salgılanmaya başlar.

Erkeklik yönünden mezonefrik kanallar ve dış genital yollar bu hormonlar ile tetiklenerek farklılaşır. İnsan karyonik gonadotropin (hCG) hormonu testesteron üretimini stimüle eder. En yüksek değerine 8-12 haftalık dönemde ulaşır.“Antimüllerian hormon” (AMH) veya “müllerian inhibitör madde” (MIS) fetal testis glikoprotein hormondur, testesterona ek olarak salgılanır (Berta et al., 1990). Sertoli hücreleri(Destek hücreleri) tarafından AMH salgılanır, puberte sonuna doğru bu hormonun salgısı azalır. Puberteye kadar seminifer tübüller solid halde kalırken, puberteden sonra lümenleri oluşur. Testis yüzey epitelinden gelişen ve destek hücreleri olan sertoli hücreleri ile primordiyal germ hücrelerinden farklı olan primordiyal sperm hücreleri olan spermatogonya seminifer tübül duvarında bulunur. Seminifer tübüllerde sertoli hücreleri fetal testiste çoğunluğu oluşturur. Daha sonra testis dış yüzeyindeki mezotel testisin yüzey epitelinin düzleşmesiyle oluşur. Mezonefrik kanalcıklardan oluşan efferent kanalcıklarla (5-20 adet) rete testis devam eder. Epididimisle bağlantılı olan kanalcıklar deferens kanalı oluşturmak üzere epididimis distalinde düz kas tabakası kazanır. Mezonefrik kanallardan seminal veziküller kaudal uçların lateralinden dışa doğru gelişir. Mezonefrik kanal seminal vezikül kanalı ile üretra arasında yer alarak ‘‘ejekülatör’’ kanal olarak bilinir.

Leydig Hücreleri(İnterstisyel Hücreler)

Leydig hücreleri testis dokusu içerisinde bulunur. Loblar arasında bağ doku bölmeleri erkeklik hormonu olan testesteronu üretirler. Hipofiz ön lobundan salgılanan testesteron, LH’nın (Lüteinleştirici hormon) stimülasyon veya inhibisyonu için çok önemlidir (Grudzinskas and Yovich, 1995). Testesteron hormonu embriyonik ve fetal yaşam evrelerinde cinsiyet farklılaşmasını sağlar. Sperm üretimi ve aksesuar bezlerin sekresyonunun başlaması ile sekonder seks karakterlerinin gelişimi puberte döneminde başlar. Sekonder seks karakterlerinin devamlılığı ve erişkinlerde spermatogenez için testesteron hormonu gereklidir (Gartner and Hiatt, 2016).



Resim 2.3: Sertoli hücreleri ile gelişmekte olan sperm arasındaki ilişkiyi gösteren seminifer tübül kesitinin şematik gösterimi (Junqueira et al., 1992).

Testis Embriyolojisi

Cinsiyet seçilimi fertilizasyon sırasında sperm oositi döledikten sonra sperm yapısına göre embriyonun cinsiyeti belirlenmektedir. Y kromozomu taşıyan embriyoda genellikle testisler gelişmektedir (Moore KM ve Persaud TVN). Sekonder oosit X kromozomu taşır. X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile oositin döllenmesi sonucu embriyo XX veya XY kromozom kompleksine sahip olur. Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti fertilizasyon sırasında belli olsada embriyonun görünümü 7.haftaya kadar her iki cins içinde yakın benzer görünüme sahiptir. Bu benzerlik evresi 'seksüel gelişiminin farksız safhası' olarak adlandırılır. Testislerin gelişimleri bir seri genin indüksiyonu ile sağlanmaktadır. SRY geni Y kromozomunun kısa kolunda cinsiyet belirleyici olarak yer alır. SRY genin varlığı ile gonadal cinsiyet belirlenmektedir (Moore et al., 2002). Sry geninin kodladığı genetik bilgi erkek bireyin gelişme evresi için yeterli değildir. SRY geni tarafından testis belirleyici faktör (TNF) kodlanır. Transkripsiyon faktörü olarak bilinen TNF, DNA'nın moleküler yapısını ve DNA'ya bağlanan molekülleri değiştirebilme yeteneğine sahiptir. Bu transkripsiyon faktörleri erkek cinsiyet organlarının ve testislerin oluşumunu başlatan diğer genlerin ekspresyonlarına neden olarak birtakım görevleri bulunmaktadır.

Bu genler:

DAX-1 geni:DAX-1'i kodlayan nüklear reseptör

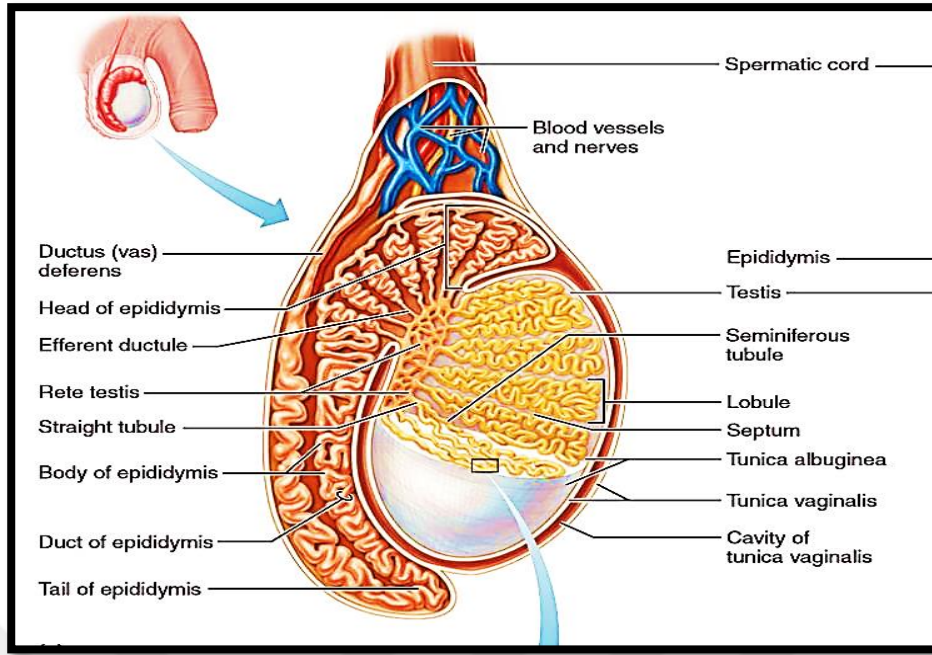
SOX-9 geni:Müllerian inhibe edici faktörün sentezlenmesinden sorumlu olan AMH genini aktive eder.

SF-1 geni:Birkaç steroidogenik genin ekspresyonunun düzenlenmesinden sorumludur.

WT-1 geni:SRY genini ürogenital sistem gelişimi için düzenler.

2.4. Testisin Anatomisi

Testisler bir çift organ halinde skrotum içerisinde septum skroti ile birbirinden ayrı vaziyette funikulus spermatikusa asılı halde bulunurlar. (Hutson, 2006). Testisin arka kenar medial yüzü peritonsuzken, lateral yüzü epiorşium (lamina visceralis) ile örtülü olup düz , ön kenar medial ve lateral yüzüalt üst uçları ile serbast ve parlaktır. Epididimis testise peritonsuz yüzeyden tutunur (Tortora et al., 2006). Testis erişkin insanda 20-30 gr ağırlığındadır. 4-5 cm uzunluğunda, 2-2,5 cm kalınlığındadır. Testisler elastikiyeti az çok sayıda kollajen lif bulunduran sağlam bağ dokusundan yapılmış kapsülle çevrilidir. Tunika vajinalis ve Tunika vasküloza processus vajinalisin uzantısı olarak kapsülün üzerinde bulunur. Testis parankimi 200-300 lobül haline tunika albugineadan uzanan bağ dokusundan yapılmış septula testis ile ayrılır. Bu bölmeler birleşerek mediastinum testis adı verilen cisim oluşur(korpus higmon). Bu bölge sinir ve damar ağlarının çıkış kısmıdır. Testiküler kanallar, düz bir kanal olan mesiastinuma tubuli seminiferine uzanarak rete testis ağını meydana getirirler. Bu ağ Heller ağı adını alır. Duktus efferentes testis üreme hücrelerini epididimise getirerek rete testisi yapan kanallarla devam eder(Tortora et al., 2006).



Resim 2.4: İnsan testiküler parankimi 100 gr doku için 9ml/dk kan ile beslenir (Schlegel ve Chang 1998).

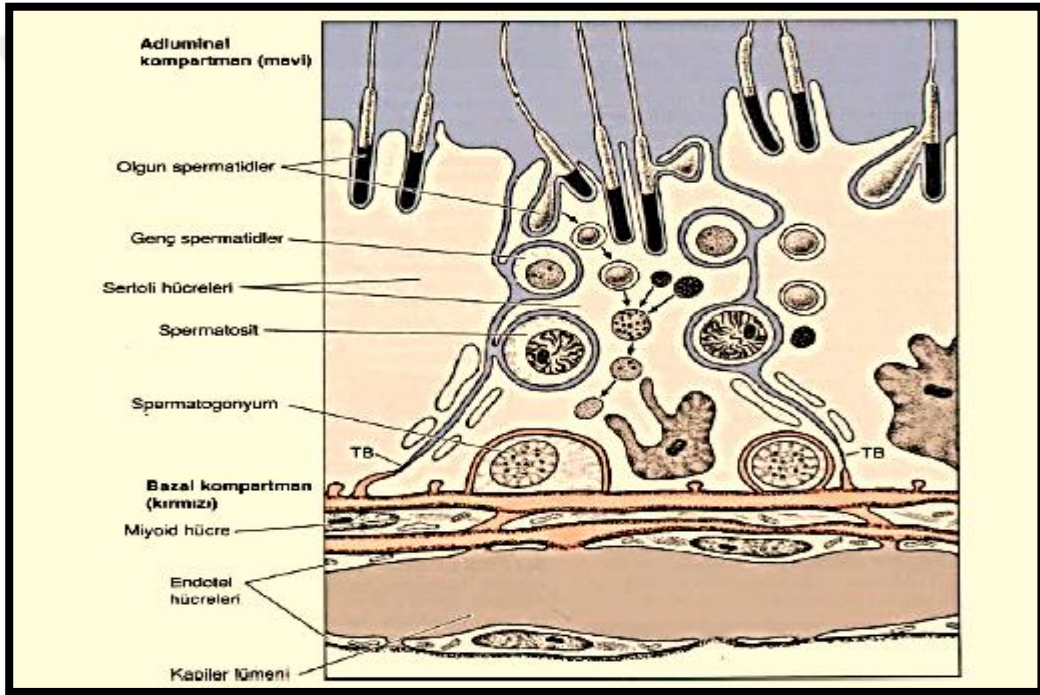
Testis arterleri aortadan, spermatik kordun içinden geçerek testise ulaşırlar. Renal arterlerin çıkış yerinin hemen altında konumlanmışlardır. İnternal spermatik arter, spermatik kord içerisinde internal iliak arterden gelen diferensiyel arterle anastomoz yapar. Testisin venleri mediastinum testisten çıktıktan sonra spermatik kordun içindeki plexus pampiniformise boşalırlar. Pampiniform plexus internal spermatik ven olarak devam eder. İnternal spermatik ven, orta diferensiyel venler, eksternal spermatik venler testisin ven sistemini oluşturur (Tortora et al., 2006). Testisin arterleri ile venleri arasında intimal bağlantılar vardır. Bu bağlantılar ile arterlerden venlere doğru ters akımlı değişme sistemi ile ısı alış verişi yapılarak spermatogenez için testisin maksimum düzeyde soğutulması(yaklaşık 20°C) sağlanmış olur(Guyton and Hall, 2007).

2.5. Testislerin Kanlanması

Testisler abdominal aortanın dalı olan testiküler arter yolu yardımıyla kanlanır. Testiküler arterler testislere yakın konumda kıvrımlı halde bulunurlar. Venöz pluksus yapısı testisten absominak venlere kanı taşır(Mortimer et al., 2013).

2.5.1. Kan testis bariyeri

Kan testis bariyerinin bulunduğu alanlar sertoli-sertoli sıkı bağlantı alanlarıdır. Seminefer tübül epitelinde iyon, karbonhidrat, protein ve aminoasit bileşenleri için fizyolojik bir tabakalanmanın oluşabilmesi için gereklidir. Seminifer tübül lümeninden dolaşımdaki antikorlar ve plazma proteinleri kan testis bariyeri sayesinde uzak tutulur. Kan testis bariyeri gelişmiş spermatogenik hücre serileri ile immun sistem arasında olabilecek herhangi bir girişimi engelleyerek seminifer tübüllere immunoglobulinlerin geçmesini engeller. Bu mekanizma sayesinde seminifer epitelyum otoümmün reaksiyona karşı korunmuş olur (Ross and Pawlina,2014).



Resim 2.5: Sertoli hücrelerinin oluşturduğu kan testis bariyerinin şematik diyagramı (*Jangueria et al., 1992*).

2.6. Testis Histolojisi

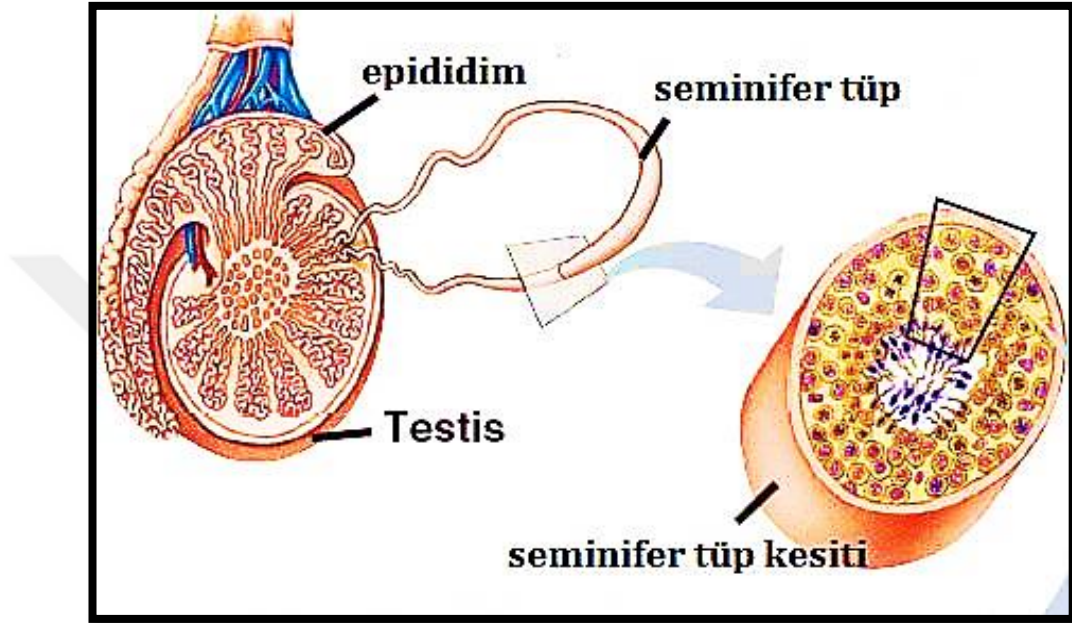
Gametlerin meydana geldiği ve olgunlaştığı steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılandığı hem ekzokrin hem de endokrin işlevi olan organ testis olarak adlandırılır (Erbengi, 1990).

Testiküler kapsül ile çevrili olan testisler üç tabakadan meydana gelir (Artan 1991).

1. Tunika vaginalis

2. Tunika albuginea
3. Tunika vasküloza

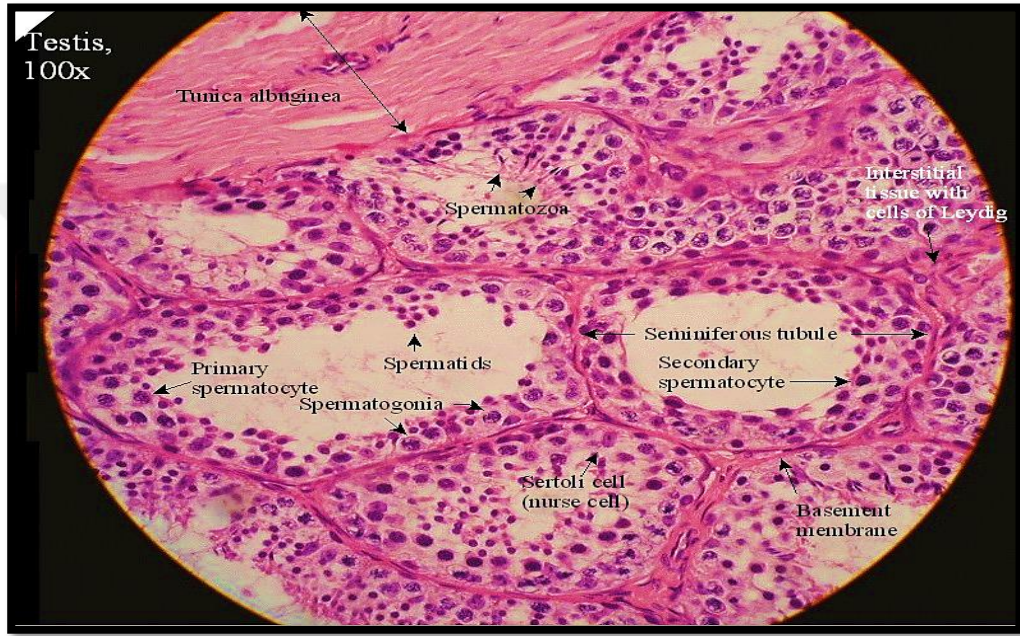
Fibroz septumlar mediastinumdan testiküler kitleye doğru uzanarak dokuyu 250-300 lopcuğa böler. Seminifer tübülde spermatogenesis gerçekleşir (Junqueira et al., 1992).



Resim 2.6: İnsan testisinin sagittal kesitinin şematik diyagramı (Ross and Pawlina, 2006).

Yaklaşık 150 μ m çapta olan seminifer tübül 80 cm uzunluğunda kıvrıntılı yapı halindedir (Kierszenbaum, 2006). Toplam uzunluğu 300-900 m aralığında olan seminifer tubul özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli lümene sahiptir. Hücre popülasyonunu için sertoli ve spermatogenetik hücreler seminifer tübülde özelleşmiştir. Tubuli rekti denen düz tübülle birleşen seminifer tübüller testisteki bağ dokusu içerisinde bulunan mediastinum ile rete testisi oluşturur (Blomberg, 2014). Tubulus seminiferus bazal membran yüzeyi ile kaplıdır Leydig hücreleri interstisiyel alanda bulunmaktadır. Bu alanda bağdokusu elemanları, lenfatik damarlar ve sinirler de yer almaktadır. (Dellmann and Brown, 1987). Seminifer tübül içerisinde germ hücreleri kalın epitelyum halinde 4-7 hücre katmanı oluşturur (Leeson et al., 1985). Hücreler, lümene proliferasyonla itilir. Sertoli hücreleri bazal membran üzerinde yer alarak tubulus lümenine bazal laminadan uzanır (Johnson, 1991).

En iri germ hücreleri olarak bilinen primer spermatositler, spermatogonyumların büyümesiyle oluşur. Spermatogonyumlar luminal yüze doğru bazal membrandan ayrılarak ilerlerken luminal yüzeye sekonder spermatositler uzanır. (Leeson et al., 1985). Sertoli hücrelerinin sitoplazma oyuntularında başkalaşım geçirmek üzere olan tubulus lümenine ulaşmış küçük yuvarlak spermatidler bulunur (Tanyolaç, 1999). Farklılaşan hücreler spermatozoon olarak epitel katmanından lümeneye doğru geçerler (Tanyolaç, 1999).



Resim 2.7: Testisin histolojik yapısı (Fankhauser, 1989).

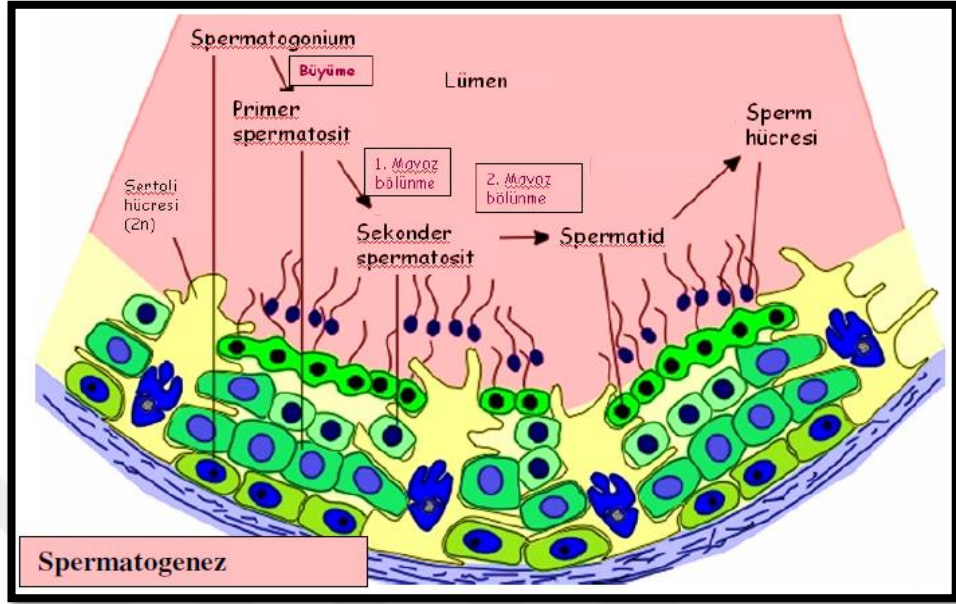
2.7. Spermatogenez, Sperm ve Yapısı

2.7.1. Spermatogenez

Seminifer tübüllerde sperm(erkek üreme hücresi) üretilmektedir. Seminifer epitel ve peritübüler doku seminifer tübülü oluşturur. Spermatogenik ve sertoli hücreler seminifer epitel hücreleri oluşturur.

Gelişmekte olan spermleri spermatogenik hücreler sertoli hücreleri aracılığıyla destekler. Seminifer tübülün çevresinden lümeneye kadar olan bölgeyi spermatogenik hücreler doldururlar. Tübül çevresinde erken gelişme evresinde olan hücreler bulunurken iç kısımda ileri evredeki hücreler yer alırlar. Sperm ana hücreleri en dış kısımda yer alır. Spermatogonyum, farklılaşma, kromozom sayısı yarıya indirme gibi

seri basamaklar sonucunda olgun spermier meydana gelir. Bu olay akışına spermatogenez denir (Leblond and Clermont, 1992).

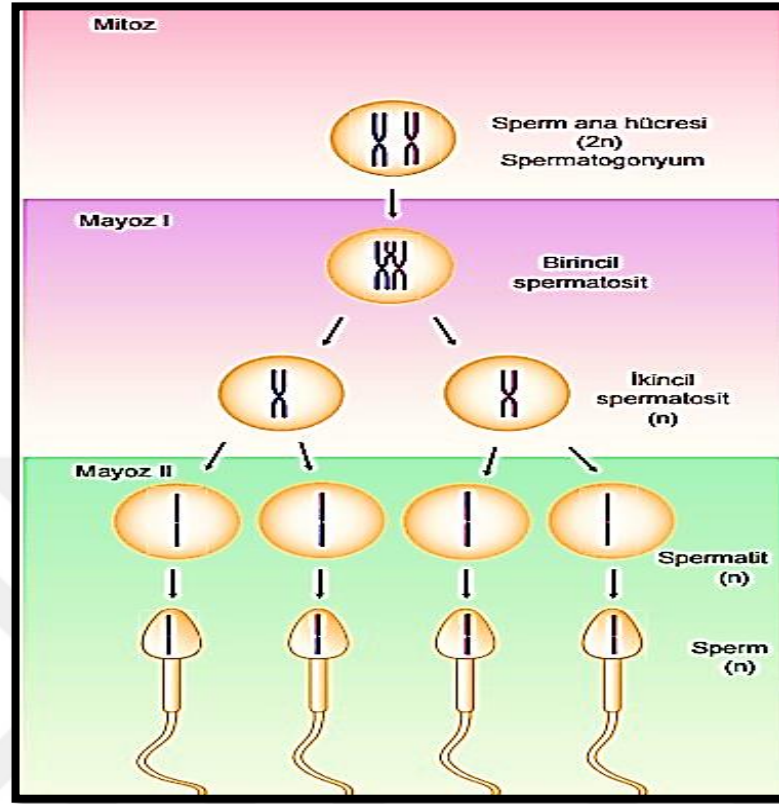


Resim 2.8: Spermatogenez. (Leblond and Clermont, 1992).

2.7.2. Spermatogenez Basamakları

Spermatogenezin ana basamak elemanları; spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatisitler, spermatidler ve olgun spermatozoadır. Diploid spermatogonyumlar tekrarlanan hücre bölünmeleri ile öncelikli olarak oluşur. Primer spermatisitlere ergenlikle birlikte bazı hücreler farklılaşır. Mayoz I bu hücrelerden meydana gelerek bir birincil spermatisitten her biri haploid sayıda iki tane ikincil spermatisit oluşur. İkişer spermatid oluşturmak üzere sekonder spermatisitler mayoz II evresinde bölünürler. Haploid kromozom sayısına sahip olan 4 spermatid bir spermatisitten oluşur. Spermatidler olgun spermatozoaya dönüşür. Tübülün lümeninde farklılaşma ve gelişimlerini tamamlayan spermier sertoli hücreleri ile ilişkilerini kaybederler. Bu hücreler morfolojik olarak gelişmiş olsalar bile fonksiyonel olarak gelişmemişlerdir.

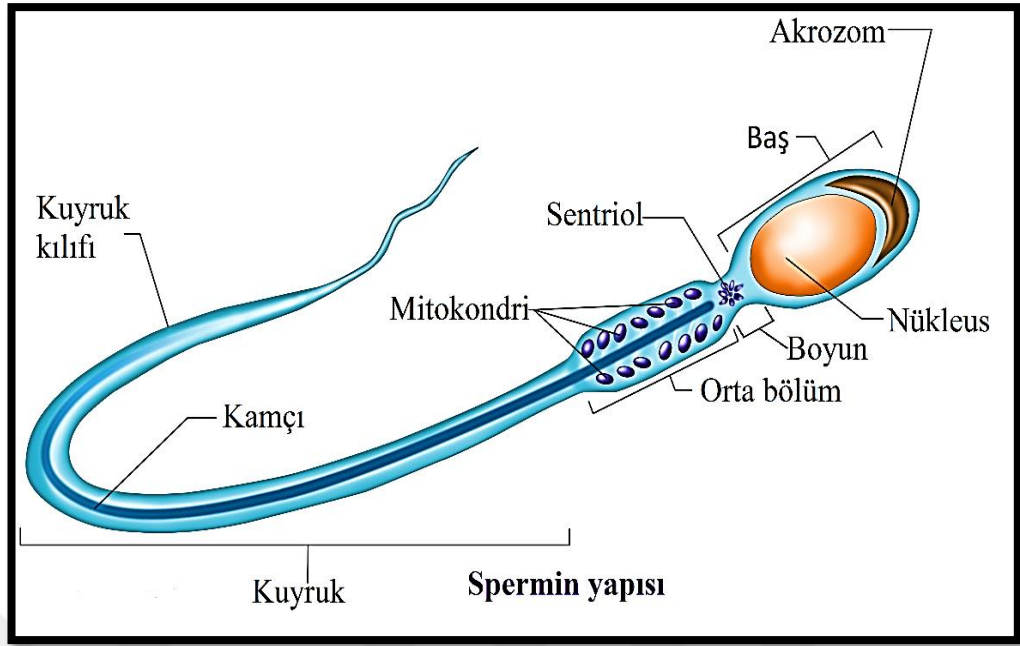
Ejekülasyon sonrası ve erkek taşıyıcı kanallarda olgunlaşma süreci dişi birey vajinasında tamamlanır. (Jensen et al.,2013)



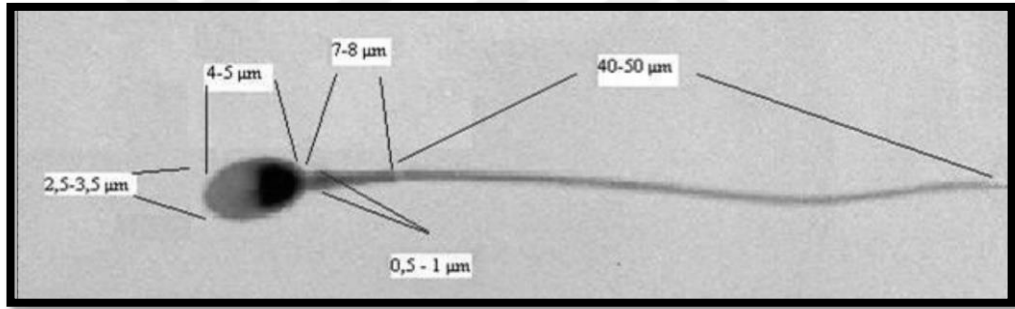
Resim 2.9: Spermatogenik hücre serilerini gösteren şematik diyagramı (Ross and Pawlina, 2014).

2.7.2.1. Sperm

Erkeğe ait üreme hücresine sperm adı verilir. Ergenlikte üretimi başlayan bu hücreler testislerde oluşur. Yaklaşık olarak 72 gün kadar bir süreçte olgulaşma ve sperm hücreleri üretimi tamamlanır. Sperm hücresinin baş kısmında kalıtsal bilgi (DNA) yer alır, döllenme sırasında yumurtaya aktarılır. Yalnızca tek bir adet sperm yumurtayı döller ve bir coitus sırasında yaklaşık olarak 150-200 milyon sperm salınır. Spermin baş kısmında şapka şeklinde içerisinde bol miktarda hücre organeli barındıran akrozom kısım bulunur. Spermin akrozom kısmında yumurtaya giriş için birtakım enzimler salgılanır. Bu enzimler oositin(dişi yumurta hücresi) çevresindeki zar ve granüloza hücre yapısının eritilmesinde görev alır(Meyts et al., 2016).



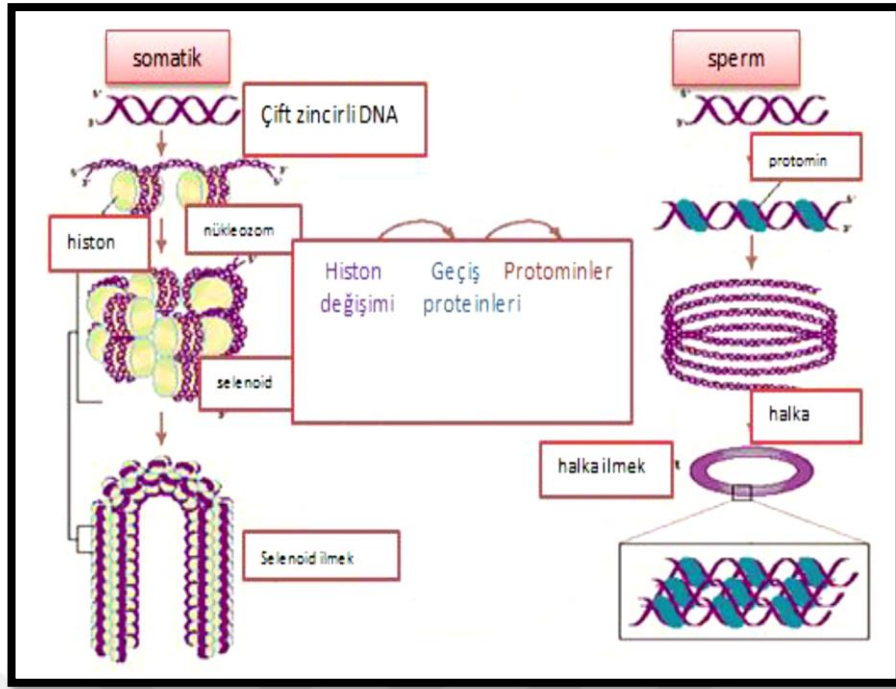
Resim 2.10: Sperm Mikroskopik Anatomisi.



Resim 2.11: Normal spermin 100x büyütmeli objektifteki morfolojik görüntüsü izlenmektedir (Janqueria and Carneiro, 2003).

2.8. Sperm Kromatin Yapısı

Sperm hücrelerinin kromatin yapısı somatik hücrelerin kromatin yapısının aksine oldukça kompaktır. Nükleer yoğunlaşma spermiyogenez sırasında spermatid nükleusunun yeniden düzenlenmesi ile meydana gelir. İlk olarak H1, H2A, H2B ve H4 somatik histonlar geçiş proteinleri ile daha sonra protamin 1 ve protamin 2 ile yer değiştirirler (Balhorn, 2007).



Resim 2.12: Sperm Kromotin Yapısı (Ordueri & Çelik-Özenci).

DNA'yı paketleyen histonlar ile spermatogenezin geç haploid fazında yer değiştiren protaminler arjininden zengin küçük proteinlerdir. Embriyonun erken gelişimi için büyük önem taşıyan histonların %10-15'i sperm genomunda paketli olarak kalır. Histonlar öncelikli olarak tekrar yapılandırılmakta ve protaminler ile spermlerin kromatin kondensasyonu son olarak düzenlenmektedir (Basu, 2018). Kromozomların sentromerik ve telomerik bölgelerinde, nükleozom temelli histonlarla paketli halde sperm genomunun % 15 lik kısmının olduğu saptanmıştır. Stabil haldeki bu paketlenme genomda rastgele bir dağılım göstermez. Yapılan son çalışmalarda embriyonel gelişimde önemli görevler üstlenen genlerin promotör bölgelerinde bu stabil yapının kaldığını ifade eden verilere de ulaşılmıştır.

2.8.1. Sperm DNA hasarı

6 ana mekanizma ile sperm DNA hasarı indüklenir;

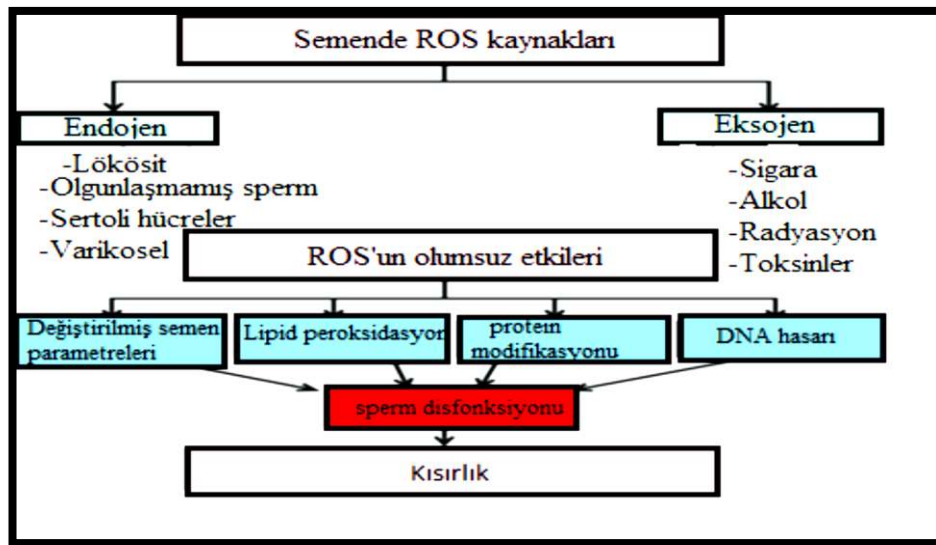
- 1) Spermatogenez sırasında apoptoz
- 2) Spermiyogenezde kromatinremodellingi sırasında kol kırıkları
- 3) Erkek reproduktif kanalında ilerlerkanserbest oksijen radikalleri ile indüklenen post-testiküler DNA fragmentasyonu
- 4) Endojen endonükleazların indüklemesi

- 5) Radyoterapi yada kemoterapi ile indüklenme
- 6) Sigara kullanımı yada hava kirliliği çevresel faktörler yolu ileoluşan DNA hasarı (Robinson et al., 2012).

DNA bütünlüğünü bozan en önemli etiyolojik faktör anormal kromatin paketlenmesi, reaktif oksijen ürünleri ve apoptozisdir. Aşırı gamet oluşumu testisteki apoptozis ile önlenir. Testis apoptozisi hasarlı DNA ya sahip germ hücre proliferasyonunu engeller.

Sperm ve Oksidatif Stres

Oksidatif stress (OS) sperm hücreleri üzerinde oldukça olumsuz etkilere sahiptir. Oksidan ve antioksidanlar dengesi bozulunca oksidatif stress oluşurmaktadır. Reaktif oksijen radikalleri (ROS) ileri derecede reaktif oksijenlenmiş ajanlara sahip serbest radikaller sınıfıdır (Aitken et al., 1995). DNA daki iplik hasarına, fertilizasyondaki bazı protein aktivitelerinin değişmesine neden olan ROS sperm plasma mebrnında lipid peroksidasyonuna sebep olur. Mutajenik olan süperoksit(O_2^-) ve hidroksil radikalleri kardeş kromatin ve kromozom delesyonlarına sebep olmaktadır (Shamsi et al.,2008). Sperm ROS hasarından fertil erkeklerde semendeki antioksidanlar korur. Semendeki lökosit konsantrasyonunun 3 milyon/ml'yi geçmesi ROS kaynağıdır. Böyle durumlarda anlamlı derecede fertilizasyon bozukluğu gözlenmiştir (Zhou et al.,2007).



Resim 2.13: Erkek üreme sisteminde spermatogenez olayı (Aitken et al., 2011).

Yüksek sperm DNA hasar sonuçları;
Embriyo tutunma başarısında azalma ve düşük yapma olasılığında artış,
Blastokist gelişim yetersizliği,
Semen analiz parametrelerinde anormal sapmalar, şeklinde sayılabilir.

2.8.2. Spermatozon DNA fragmentasyon testleri

Sperm DNA bütünlüğü değerlendirme testleri iki grupta incelenir;

1. DNA fragmentasyonunun, harap olan bölgeye problemlerin inkorporasyonunu sağlayarak doğrudan ölçülmesine dayanan tekniklerdir.
2. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling), ISNT (in situ nick translation).
3. Belirli koşullar altında fragmente olmuş DNA' nın kolaylıkla denatüre olma özelliğine göre ölçümlerin yapıldığı tekniklerdir.
4. DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescent In Situ Hybridization),
5. SCD (Sperm chromatin dispersion test),
6. SCGE (Single cell gel electrophoresis) veya basit hücre jel elektroforezi olan COMET analizi,
7. SCSA (Sperm chromatin structure assay),
8. Akridin oranj boyama teknikleri sayılabilir(Shamsi et al., 2008).

2.8.2.1. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling)

Programlanmış hücre ölümü sırasında meydana gelen DNA hasarını ölçmek için kullanılır. Bu yöntemde DNA kırıklarının 3'OH ucuna, biyotinlenmiş uridin trifosfat (dUTP) terminal deoksinnükleotidiltransferaz (TdT) enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla bağlanır. Biyotinlenmiş DNA streptavidin ile birleşerek suda çözünmeyen renkli bir ürün ortaya çıkarır. Işımanın yoğunluğu eşleşmemiş dUTP'leri yani DNA'daki çentik sayısını göstermektedir. FITC, DAPI, PI gibi floresan boyalar kullanılır ve pozitif hücrelerde yüksek yoğunlukta sinyaller alınabilir (Ombelet et al., 1995).

2.8.2.2. *In situ* çentik okuma tayini (*In Situ Nick Translation Assay*) (NT)

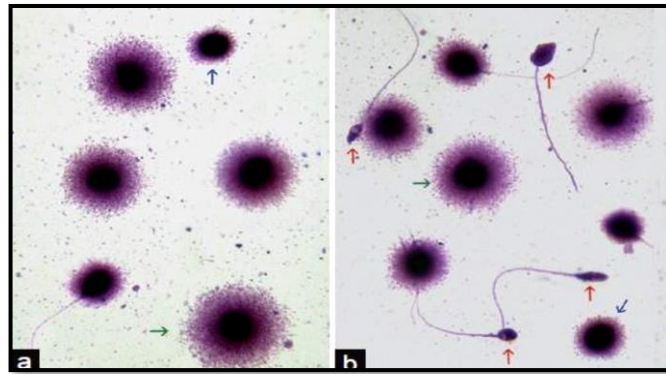
TUNEL testi ile benzer mekanizmaya sahiptir. Sperm DNA hasarını dUTP‘ın DNA kırıkları ile birleşmesi sonucu tespit eder. TUNEL testi ile olan tek farkı tespit ettikleri zincir sarmal sayısıdır. TUNEL testi hem tek hem de çift zincir DNA kırıklarını tespit ederken, NT sadece tek zincir DNA kırıklarını tespit etmektedir. DNA polimeraz I‘in enzimatik reaksiyon ile katalize ettiği NT testinde DNA hasarı tespit edilir (Ward et al., 1991).

2.8.2.3. *DNA breakage detection- FISH (DBD-FISH)Yöntemi*

DNA iplikçığının açılması için hücreler alkali solüsyona maruz bırakılarak agaroz matriks içerisine gömülür. Spesifik kromatin problemleri kullanılarak hibridizasyon gerçekleştirir. Sonuç olarak tek zincirli DNA oluşum miktarı bize DNA kırık miktarını gösterir(Gosálvez et al., 2011).

2.8.2.4. *Sperm Kromatin Dispersiyon (SCD) Testi*

İntakt DNA'nın kromatin proteinlerinden yoksun sperm nükleus çevresindeilmek oluşturabilme becerisine dayanmaktadır. Tek iplik DNA eldesi için denatüre edici alkali solüsyon ile spermler muamele edilerek nükleer proteinlerden temizlenerek agoroza gömülürler. Normal DNA'ya sahip spermlerin çevresinde büyükçe bir halo gözlenirken, halonun bulunmaması veya çapının çok küçük olması fragmente olmuş DNA'yı göstermektedir. Spermde tek dal kırıkları olan DNA'nın, asit ile denaturasyon sonrası yayılma becerisi bulunmadığı için sperm çevresinde halo oluşumu gözlenmemektedir(Resim 2.9.2.).



Resim 2.14: SCD testi ile DNA bütünlüğü analizi (Gosálvez et al., 2011).

2.8.2.5. Basit hücre jel elektroforezi (COMET):

Hücre bazında DNA hasarını belirleyebilen hızlı ve güvenilir yöntemdir. Bu teknik prensip olarak; spermasüspansiyonunun hazırlanması, jel yerleştirilmesi, hücre lizisi, DNA sarmalının çözülmesi, elektroforez, nötralizasyon, DNA boyama ve Comet şekil analizi şeklinde tanımlanabilir (Ribas-Maynou et al., 2013).

2.8.2.6. Sperm kromatin strüktür analizi (SCSA):

Bu test ilk olarak 27 yıl önce tarif edilmiştir. Protokol SCSA asit ve SCSA ısı olmak üzere ikiye ayrılır;

Isı veya asit muamelesi sonucunda denatüre olan DNA metakromatik bir boya olan akridin oranj ile boyanır. Hasarlı DNA (tek zincirli DNA) kırmızı renkte floresan verirken hasarlanmamış DNA (çift zincirli DNA) yeşil renkte floresan verir. SCSA asit protokolü daha kolay ve kullanışlıdır. DNA hasarı, DNA fragmentasyon indeksi (DFI) ile ifade edilir (Evenson et al., 1999).

2.8.2.7. Akridin oranj testi (Acridine Orange Test) (AOT):

Akridin turuncusu asitli ortamda yeşil renkten kırmızı/turuncu arası renk alarak DNA hasarını göstermektedir. (Koyuncu, 2011). Akridin oranj testi (AOT), asit koşullarına dayanan ve denatürant DNA'ya dayanan basit bir mikroskopik prosedürdür ve denature DNA akridin turuncu ile boyanır. AOT, AO floresanının yeşilden (doğal DNA) kırmızıya (denatüre edilmiş DNA) metakromatik kaymasını ölçer. Acridine Orange, parçalanmış DNA'ya bağlandığında kırmızı doğal DNA'ya bağlandığı zaman yeşil ışık saçar. Birçok yazar, örnekte $\geq 50\%$ yeşil flüoresansın, infertil vericilerden alınan örnekte AOT için normal bir cut-off değeri olduğunu gözlemlemiştir. Floresan mikroskobu kullanarak AOT, DNA denatürasyonunun durumunun genel bir resmini sağlar. Benzer şekilde, sitometri ve SCSA Yazılım kullanılarak sperm kromatin yapı analizi (SCSA), Akridin oranj (AO) floresan yoğunluğunu ölçer. Kırmızı / kırmızı + yeşil oranı, DNA fragmentasyon indeksi (DFI%) olarak adlandırılan DNA fragmentasyonunun yüzdesini verir. SCSA değeri ≥ 15 veya daha düşük DFI değerine sahip olan semen numuneleri düşük seviyeli, ≥ 15 'ten büyük veya eşit ≥ 30 DFI değerleri orta, ≥ 30 'dan fazla veya eşit DFI değerleri ise yüksek seviyede DNA fragmentasyonunu temsil eder (Liu et al., 2015).

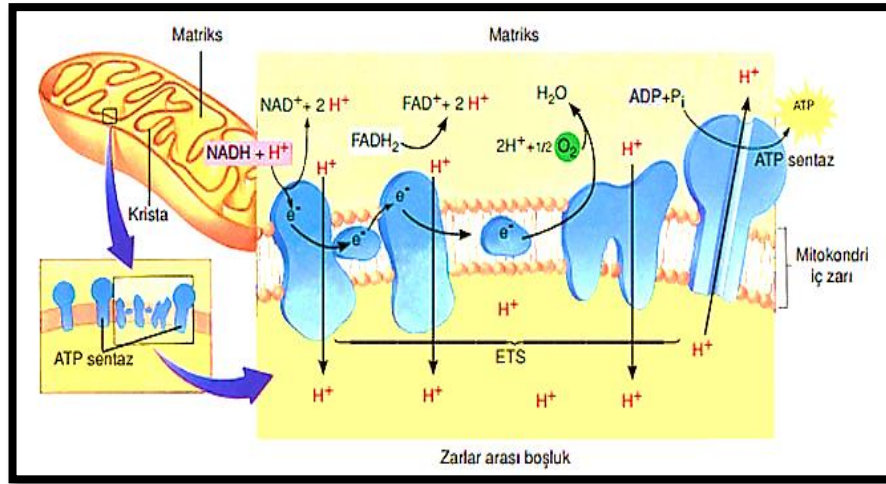
2.9. Mitokondriyal DNA(mtDNA) ve Etkileri

ATP üretimi esas görevi olan mitokondri hücrenin enerji üretim merkezidir. Bir hücre içerisinde bulunan mitokondri sayısı 8-2500 arası değişkenlik gösterir. Kendine özgü DNA, RNA ve ribozomları olan mitokondri bölünme ve çoğalma özelliği taşır. Organel yapısı çift kat zarla çevrilmiş olup ‘krista’ aracılığıyla geniş iç yüzey alanına sahiptir. (Resim 2.10).



Resim 2.15: Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü (Venkatesh, 2009).

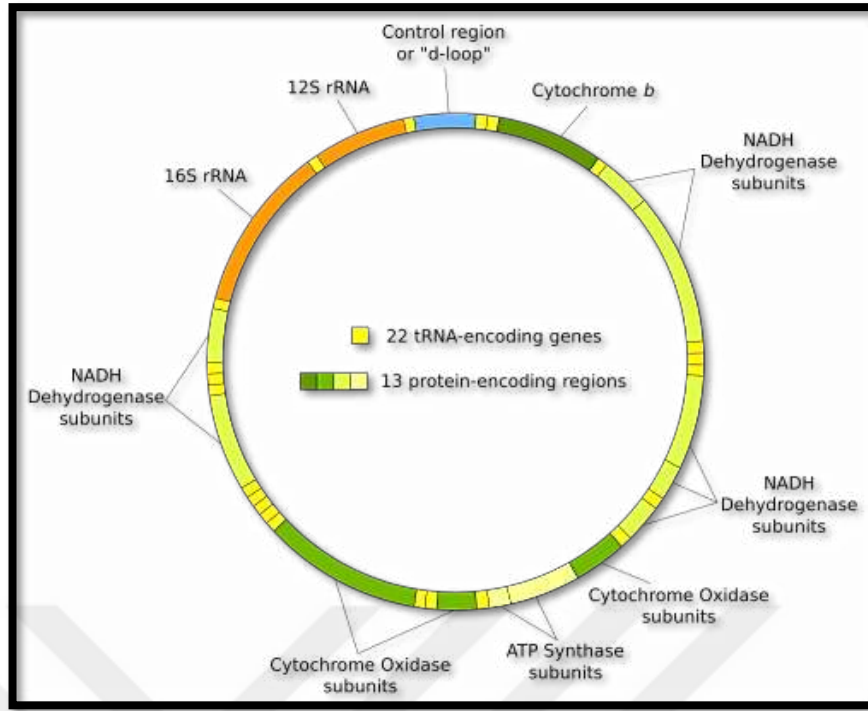
Oksidatif fosforilasyon mekanizma yapısı ile kristalar üzerindeki enzimler aracılığıyla mitokondride enerji üretilir (Sherratt, H., 1991). Sperm hücreleri döllenme sırasında flagella hareketi için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bu enerji gereksinimi oldukça büyük oranda kullanılır ve olgun bir spermin boyun kısmında yaklaşık olarak 100 mitokondri bulunur (Bowles and Amaral, 2007). Sperm flagella hareketi için gerekli olan enerjiyi mitokondrideki solunum mekanizması ile beraber ATP oluşturur. ATP hücresel homeostaz başta olmak üzere çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda önemli kaynaktır. Solunum mekanizmasına aktarılmak üzere NADH den glikoz, sitrik asit döngüsü, β oksidasyon yolları indirgenir. Elektron taşıma sisteminde (ETS) NADH den oksijen molekülüne elektronların taşınması serbest enerjinin açığa çıkmasıyla sonuçlanarak solunum yoluyla ATP üretilir. Mitokondride kimyasal ETS inhibitörleri yüksek düzeyde ROS'a sebep olduklarından piruvat ve süksinat gibi kompleks II substratların eklenmesi ile sperm motilitesinde artış gösterilmiştir (Piomboni, 2012).



Resim 2.16: Oksidatif fosforilasyon mekanizma yapısı ile kristalar üzerindeki enzimler aracılığıyla mitokondride enerji üretilmesi (Sherratt, 1991).

16.569 baz çiftinden oluşan insan mtDNA'sı, nükleus dışı ve kapalı dairesel halde bir genomdur. Mitokondri genomu iki zincirden oluşmaktadır. Guanin bakımından zengin olan zincir ağır (H-heavy), sitozin bakımından zengin olan zincir ise hafif (L-light) olarak adlandırılır. 36 gen bulunan mtDNA'nın 13 geni oksidatif fosforilasyonda ve mitokondriyel solunumdan görevli polipeptitlerdir. Geriye kalan 2 tanesi rRNA(16S ve 12S)'yi 22 tanesi ise tRNA'yı kodlar (Ambulkar, 2016). mtDNA'nın nükleer genlerden farkı intron bölgelerinin olmamasıdır. Kodlama yapan dizilerin tümü bitişik(contiguous) haldedir ve çakışmalar (overlapping) görülmektedir. 1121 bp'lik bölgesi bulunan mtDNA'nın kodlama yapmayan D-loop(D ilmeği) kısmı H ipliği replikasyon orjini ve L-H ipliklerinin promotörlerinden oluşur. Nükleer genler tarafından mtDNA 'da bulunan düzenleyici faktörler, mitokondriyal oksidatif fosforilasyon proteinleri, metabolik enzimler, DNA ve RNA polimerazlar, ribozomal proteinler kodlanırlar. Oksidatif fosforilasyon ünitesi mitokondrinin önemli bölümüdür. Oksidatif fosforilasyon 13 alt birimden oluşmaktadır;

- Kompleks I (NADH-Q oksidoredüktaz),
- Kompleks II (7 alt-birimden oluşur: ND1- ND2- ND3- ND4-ND5-ND6 ve ND4L),
- Kompleks III (sitokrom b),
- Sitokrom oksidaz (3 alt birimi; COX I, COX II ve COX III),
- Kompleks IV,
- Kompleks V alt birimleridir(ATPaz 6 ve ATPaz 8) (Resim2.10.2) (Venkatesh, 2009).

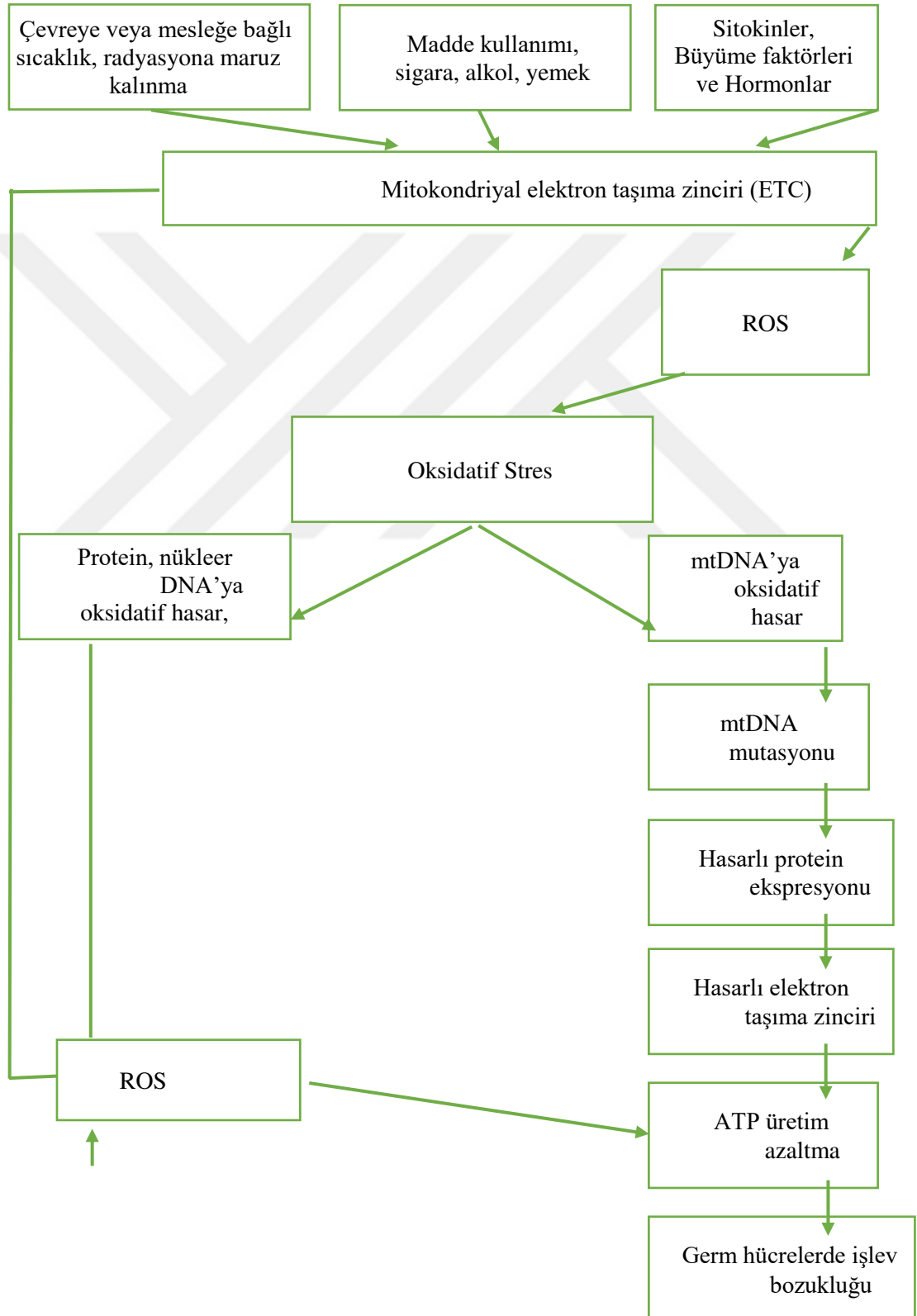


Resim 2.17: Sperm Mitokondri DNA yapısı (Cui et al., 2012).

mtDNA tarafından proteinlerin altbirimleri kodlanır. Nükleer DNA sadece kompleks II tarafından kodlanır. Bu da mitokondriyal işlevlerde nükleer DNA'nın işlevi olduğunun göstergesidir. Nükleer DNA histonlar tarafından korunurken mitokondriyal DNA histonlar tarafından korunamamaktadır (Cui et al., 2012). İnfertil bir erkek hastanın mitokondriyal DNA'sı nükleer DNA'ya kıyasla 8-OHdG miktarınca oldukça yüksektir. Astenozoospermi hastalarında mtDNA mutasyonu ROS ile ilişkilendirilmektedir. mtDNA'da biriken mutasyonlar heteroplazmiye sebep olmaktadır (Bonanno, 2016). Sperm hareketliliğindeki azalmanın altında yatan sebepler içerisinde önemli yer tutan mitokondriyal hasarı idiyopatik astenozoospermik ve oligoastenozoospermik (OA) vakaların belirgin kısmında gösterilmiştir (Sun, 2007). Mitokondrinin fonksiyon kaybı ile ROS üretiminde aşırı artış olarak mitokondriyal hasarı gelişir. Bu nedenle farklılaşan spermatogenez sonucu erkek infertilitesi gelişir (Cui et al., 2012). Mitokondriyal zar potansiyeli (MMP) mitokondriyal disfonksiyonu ölçülebilir. MMP miktarındaki azalma yüksek ROS seviyesine sahip infertil erkeklerle ilişkilendirilmiştir (Bonanno, 2016). İnsanda mutant mtDNA taşıyan hücreler; H₂O üretimi, artan süperoksit anyonlar ve düşük solunum fonksiyonu bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Chen 2013). ROS üretimi mtDNA hasarı kalıcılığı durumunda lipid peroksidasyon aracılığıyla artar.

ROS un yüksek olması mitokondri membranının iç ve dış membranında yapısal bozulma yaratır. mtDNA daki mutasyon artışı spermelerde anormal morfoloji ve yapısal anomaliye yol açmaktadır(Bisht, 2017).

Tablo 2.1: Erkek infertilitesinde ROS ve mtDNA mutasyonu ilişkisi (Díez-Sánchez, 2003).



2.10. Anamnez ve Fizik Muayene

Genellikle infertilite sorunu yaşayan çiftlerden üreme öyküsü alınır. İnfertiliteye sebep olabilecek önemli risk faktörleri saptanmaya çalışılır.

Hasta öyküsü;

- Çocuklukta geçirmiş olduğu önemli, ateşli hastalıklar,
- İnmemiş testis öyküsü , buna bağlı olarak yapılmış cerrahi tedavi,
- Ejekülat miktarı ve zamana göre miktar değişimi,
- Cinsel ilişki sıklığı,
- Testiste oluşan tümörler ve bunlara bağlı yapılmış olan tedaviler, kullanılan ilaçlar,
- Puberte başlangıç yaşı,
- Vücuttaki kıllanma bölgeleri ve yoğunluğu,
- Herhangi bir sebeble geçirilmiş testis travması.
- Hastanın medikal öyküsü de dikkatli bir şekilde alınmalıdır (Anabolizan steroidler, kemoterapötik ilaç, alfa- adrenerjik reseptör blokerleri ve antibiyotik kullanımı)
- Erkek infertilitesi, nedenleri ile incelendiğinde üç ana grup oluşturulur;
- Non-Obstrüktif İnfertilite
- İdiopatik erkek infertilitesi
- Obstrüktif İnfertilite (Doğan, 2011).

Non-obstrüktif infertilite

Testisler tarafından yeterli hareket ve sayıda sperm üretilmeme durumudur. Klinikte %60 olarak rastlanır.

Hormonal Bozukluklar

Gonadotropin salgılatıcı hormonda eksikliğe neden olan sebeplerin en başında yer alır. Ani baş travmaları, beyin tümörleri, ısın tedavileri hormon dengesini etkileyerek infertiliteye sebep olmaktadır. Obezite, serum SHBG (Sex hormone-binding globulin) düzeyindeki değişimler ile ilişkili olarak serum total testosteron konsantrasyonunda azalmaya neden olur(Hammoud et al., 2006).

2.11. Genetik Nedenler

Genetik temelli nedenler infertil erkeklerde %5 oranında yapısal ve sayısal olarak saptanmıştır. Genetik nedenler sıklıkla azospermi vakalarında rastlanmaktadır. Genetik anormaliler; Y kromozom mikrodelsiyonları, kromozomal translokasyonları ve anöploidi içerir. Yüksek oranda azosperminin ve ciddi oligosperminin temelinde genetik nedenler yer alır (Ferlin et al., 2007). Y kromozomu Yq11 bölgesinde bulunan mikrodelsiyon, azospermik faktör(AZF) olarak adlandırılır. İnfertilite tanısı almış bireyler genellikle sperm yapı ya da motilitede olabilecek anormaliler yapılan incelemeler sonucu genetik olarak tespit edilmiştir (Griffin, 1992).

Varikosel

Varikosel infertil erkeklerin % 12'sinde görülür. Yapılan araştırmalar sonucunda infertil erkeklerde genellikle sol testiste olmak %21-41 oranında varikosel görülmektedir. Varikosel damar rahatsızlığı olmakla birlikte testise giden kan akımını arttırarak bulunduğu testis ısıya maruz kaldığından semen parametrelerinde, sayıda, ve harekette azalmaya, morfolojik bozulmalara neden olabilmektedir (Çiçek, 2008).

Varikosel gradlendirilmesi

Subklinik varikosel

Göz ile görülemeyen veya palpe edilemeyen ancak görüntüleme yöntemleri ile saptanan varikoseldir.

Grade 1: Palpe edilebilecek bir distansiyonu olmayan varikosel

Grade 2: Palpe edilebilen fakat göz ile görülemeyen

Grade 3: Direkt gözle görülebilen varikoseldir(Çiçek, 2008).

İnmemiş Testisler

İnmemiş testisler abdominal bölgede kalarak yüksek sıcaklığa maruz kalmaktadır. Kriptorşidizm olarak da adlandırılmaktadır. Testisin fetal gelişim sürecinde abdominal bölgeden skrotuma inmemesi durumudur. Genelde sol tarafta gözlenirken bazı durumlarda her iki tarafta gözlenebilmektedir. Böyle vakalar

doğumdan sonra iki yaşına kadar orşidopeksi (testislerin skrotum içine yerleştirilmesi) yapılması gerekir. Yapılan çalışmalar inmemiş testis öyküsü olan erkek bireylerin spermatogenezisinde bozulma ve testiküler tümör riskinde anlamlı bir artış gösterilmiştir (Rajfer et al., 1986).

Gonadotoksinlere Maruz Kalmak

Uyuşturucu maddeler, tütün, alkol ve ağır metaller gonadotoksin olarak adlandırılır. Bu kimyasal ve ilaçlar; seri hücreler halindeki spermatogenik hücrelerde spermatogenesis sürecindeki aksaklıklara ek olarak intersitisyel dokuda bulunan leydig hücrelerinin fonksiyonel işlevini yerine getirmesini engelleyerek infertiliteye neden olabilir (Raheem and Ralph, 2011).

Testis Torsiyonu

Spermatik kordun etrafında dönmesi sonucu oluşan testis torsiyonu testisin kanlanma mekanizmasının bozulmasına neden olur. Yeterli kanlanmanın olmaması durumunda testiste iskemi meydana gelir. İskemi hasarı 6 saat içerisinde testislerde detorsiyonla düzeltilmezse nekroz meydana gelir. Testis torsiyonu tek taraflı gerçekleşse bile diğer testisi etkileyerek antisperm antikoru üretime neden olmaktadır (Raheem and Ralph, 2011).

Testis Tümörleri

Testis kanserinde genetik faktörler önemli yer tutmaktadır. Testis kanseri tedavisinde kullanılan kimyasal veya ışın tedavisi fertilitateye sebep olabilir (Raheem and Ralph, 2011).

Üriner sistem enfeksiyonu

Üriner sistem enfeksiyonu üroloji polikliniğinde en çok karşılaşılan üriner sistem patolojisidir. WHO; orşit, epididimit, prostatit üreme sistemi olarak tanımlanmaktadır (Gözükara ve Görür, 2015).

Epididimit

Epididimite oluşan enfeksiyondur. Epididimit sonrası meydana gelen hasara bağlı spermelerde meydana gelebilecek olumsuz etkiler üzerine çok az çalışma bulunmaktadır(Grabe et al., 2015).

Orşit

Testiste meydana gelen enfeksiyondur. Nadir görülen enfeksiyon türüdür. Viral enfeksiyonlar orşitlerin önemli kısmını oluştururlar.En sık olarak karşılaşılan etkenler; stafilokok, E. coli, P. Aeruginosa, K. pneumoniae ve streptokoklardır(Doshi et al., 2012; Dousset et al.,1997).

Prostatit

Prostat bezinin enfeksiyonudur. Prostatit tanısı koymada birtakım sorunlar yaşansa da prostatitin sperm kalitesi üzerine olumsuz etkileri henüz yapılan çalışmalar sonucunda net olarak anlaşılamamıştır(Ludwig et al., 2003).

2.12. Semen ve Mevcut Çalışmada Kullanılan İleri Tanı Testleri

2.12.1. Semen

Erkek genital salgı bezlerinden oluşan ve ejakülasyon ile dışarı atılan grimsi opak bir sıvıdır. (vesikula seminalis %60, prostat %30, bulboüretal bez %10). Semen %1 lik kısmını spermatozoa oluşturur. Geriye kalan kısmı(vesikula seminalis %60, prostat %30, bulboüretal bez %10) erkek genital salgı bezleri oluşturur. Erkek genital bez sıvılarının esas görevleri;

- Spermatozanın beslenmesi amacıyla fruktoz üretmek,
- Vajina ve üretranın asidik ortamını nötröle etmek için alkalın salgı üreterek hareketsiz kalan spermatozoanın hareketliliğini sağlamak.

Semen içeriği %90 sudur. Bunun yanı sıra önemli ölçüde enerji kaynağı olarak fruktoz bulunur. Ca, Zn, Mg, Cu gibi iz elementlerde semen içeriğinde bulunmaktadır.

Üretra bulboürtlal bezlerin salgısı ile ereksiyon sırasında kayganlaşır. Spermium salınımı duktus deferens ve duktus epididimisin distal kısmındaki kasların kontraksiyon gücü sayesinde asit fosfataz ve sitrik asitten zengin prostat sıvısı ile ejakülasyon başlangıcında salınır. Ejekülatta fruktoz ve koyu kıvamlı seminal vezükül sıvısı kalmaktadır(Barroso et al., 2000).

2.12.2. Semen Analiz (Spermiyogram) Testi

Erkek üreme potansiyelini belirlemek için yapılan testlerin başında spermiyogram testi gelmektedir. Semen analizi, infertil erkek birey için gerekli tedavi planının yapılmasına önemli ölçüde öncülük etmektedir. Semen analizi 2-3 hafta aralığında minimum iki örnek çalışma tekrarı ile değerlendirilmelidir. Sperm sayısı ve yoğunluğu günlük değişebildiğinden dolayı tedavi için test tekrarının yapılması kesinlik sunmaktadır. Analiz sonuçları birbirine %20 yakınlıkta ise ilave örneklerle gerek yoktur. %20'nin üzerinde ise tekrarlamak daha doğrudur (Kayıkçı ve ark., 2002).

Normal spermatozoa analizi değerleri

- Volüm: 1,5 - 5 ml
- pH: >7,2
- Viskozite: < +2
- Spermatozoa konsantrasyonu: ≥ 20 milyon/ml
- Total spermatozoa sayısı: > 40 milyon
- Motilite yüzdesi: $a+b \geq \%50$ ya da $\geq \%25$ ileri hızlı hareket
- Morfoloji: > %30 WHO, > %14 Kruger Strict
- Lökosit: < 1 milyon/ml (WHO 2010).

2.12.4. Semen Fiziksel İncelemesi Likefaksiyon

Semenin uygun sıcaklıkta prostatik proteolitik enzimler sayesinde sıvı hale geçme durumudur (Sakkas and Alvarez, 2010). Yaklaşık 10-20 dakika içerisinde 37°C'de likefaksiyon gerçekleşme durumu prostat fonksiyonunun işlevsel olduğunun

göstergesidir. Spermatozoonun hareketlilik kazanması açısından likefaksiyon süresi önemlidir(WHO, 2010).

Renk: Opak, beyazımsı bir sıvı olan semen genital duktus ve yardımcı bezlerin salgısından oluşur. Enfeksiyon veya cinsel perhiz süresine bağlı olarak sarımsı veya grimsi renk alır. (Simon et al., 2011).

Koku:Prostat salgısı sırasındaki sperm oksidasyonu sonucu koku özelliği kazandığı düşünülen semen, cinsel perhiz süresi ve enfeksiyon varlığına bağlı olarak özgün kokusunda değişkenlik göstermektedir(Kayıkçı ve ark., 2002).

Volüm:1,5-5 ml arası semen hacmi normal olarak kabul edilmektedir(WHO, 2010). Semen volümü 5ml üzeri hiperspermik, 1ml veya daha az volüm miktarı hipospermik olarak adlandırılır (Sakkas and Alvarez, 2010).

Viskozite:Likefaksiyon süresinden sonra yaklaşık 1.5 mm ağız genişliği olan plastik pipete örnek çekilerek yerçekimi etkisi sayesinde pipetten damlaması beklenir. Örneğin damla ile pipet arasında oluşturduğu uzunluk numunenin viskozitesi hakkında bilgi verir. Küçük ve birbirinden ayrı damla halinde olması örneğin normal olduğunun göstergesidir(Zini et al., 2001).

ph:Erkek aksesuar bezleri arasındaki dengeyi pH gösterir (Zini et al., 2001). 7,2-8 arası normal semen pH aralığıdır(WHO, 2010)

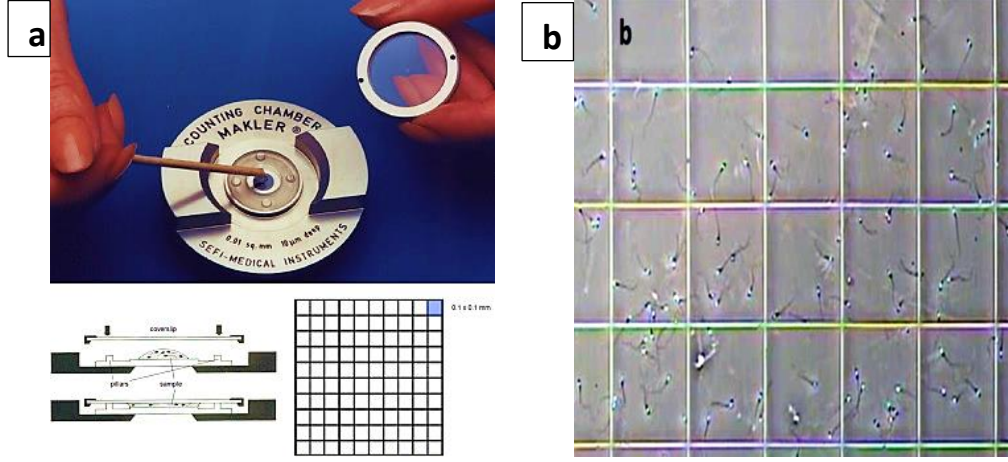
Mikroskobik Muayene

Bu inceleme spermleri sayı, hareket yeteneği ve morfolojik yapısı açısından incelemek için yapılmaktadır(Kayıkçı ve ark., 2002).

Konsantrasyon Ölçümü

Erkek fertilitasını belirlemek için sperm hücrelerinin ejakülattaki konsantrasyonuna bakılmaktadır. Konsantrasyonu belirlemek için Neubauer hemositometre, Makler kamarası ve tek kullanımlık sayım cihazlarından biri (Mikro-Cell) kullanılmaktadır(Kayıkçı ve ark., 2002). Spermatozoa sayımı için günümüzde en çok Makler sayım kamerası kullanılmaktadır. Makler sayım kamerasının orta kısmı 10 µm derinliğe sahiptir. Sayım kamerasının orta kısmına bir damla numune damlatılarak

0,1 x 0,1 mm boyutlarında 100 kareden oluşan 1mm² boyutlarında kendine ait olan yuvarlak grid camı ile kapatılır(WHO,2010).



Resim 2.18: a- Makler sayım kamerası (Brito et al., 2016). b- Mikroskop görüntüsü (Brito et al., 2016).

Makler sayım kamerası sabit hacim miktarı ile semen analizini mümkün kılar. Grid camı üzerinden ışık mikrosku yardımı ile 100x objektifte 3x10 küçük karedeki sperm sayılır, ortalaması alınır ve çıkan sonuç milyon cinsinden 1 ml'deki spermatozoa sayısını verir. Sperm sayısı tüm ejakülat için 39 milyon/mL dir. Fertilite için büyük öneme sahiptir ve alt limit 15 milyon/mL'dir. Bu değerin altındaki sperm, oligozoospermik olarak adlandırılır. Oligozoosperm değeri 5 milyon/mL' nin altında ise şiddetli oligospermi olarak değerlendirilir. (Erimşah ve ark.,2006).

Motilite Tayini

Spermatozoalar fallop tüpünde yumurtayı dölleyebilmeleri için servikal mukusu geçerek aktif hareketli halde olmaları gerekmektedir. Farklı laboratuvarlar arasındaki motilite farkı değerlendirmenin subjektif olarak yapılmasından kaynaklanmaktadır(Kayıkçı ve ark., 2002). Gebelik şansının artması semendeki motil sperm sayısı ile doğru orantılıdır. Spermatozoanın hareketli olması tek başına dölleme için yeterli olmamakla birlikte spermatozoayı ileri iten bir hareket yeteneğine sahip olması gerekmektedir. Spermatozoanın, dişi genital sistemde ilerlemesi ve oositi kaplayan kılıfların delinerek döllemenin gerçekleşmesi için progresif aktivite adı verilen ileri hızlı hareket yeteneğine sahip olması gerekmektedir(Niu et al.,2011). Motilite ejakülasyondan sonra ilk bir saat içerisinde, likefaksiyondan sonraki 30 dakika içerisinde değerlendirilmelidir(Payne et al.,2005).

Spermatozoaların motilite değeriendirilmesi:

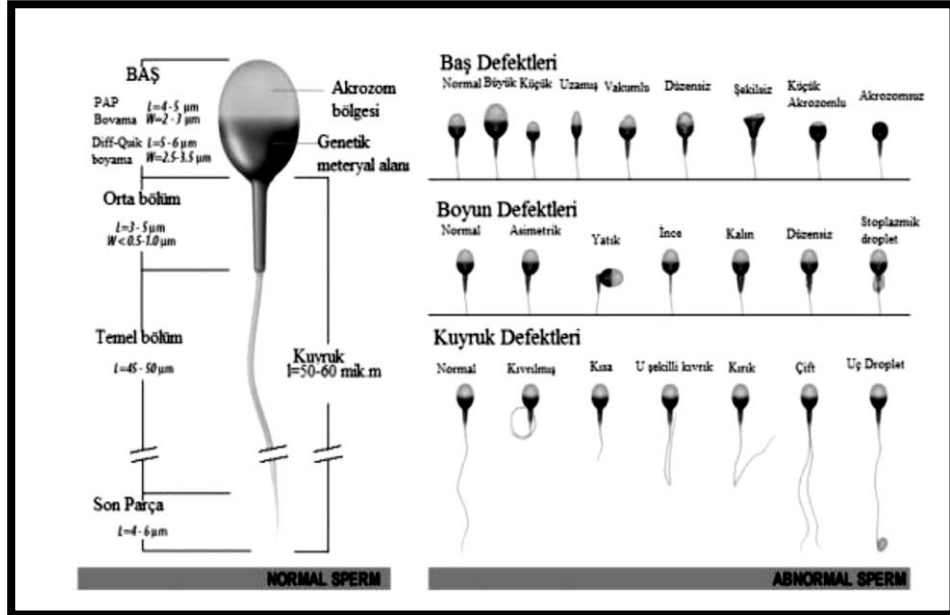
Dünya Sağlık Örgütü hareketliliği 3 sınıfta değeriendirmektedir:

- a) İlerleyici (progresif) hareket
- b) İlerleyici (progresif) olmayan hareket
- c) Hareketsiz

DSÖ kriterlerine göre motilitenin (a+b) <%40 ve/veya ileri doğru hareketin (a) <32% olduğu erkekler astenozoospermik olarak sınıflandırılırlar(WHO,2010). Motil sperm sayısının toplam sperm sayısına oranı yüzde olarak motilite oranını verir(Irvine et al.,2000).

2.13. Morfoloji Analizi

Spermatogenezin kalitesi sperm morfolojisi ile belirlenir. Dünya sağlık örgütü(DSÖ) kriterlerine göre sperm morfoloji anormallikleri baş, boyun ve kuyruk olarak üç kısımda incelenerek değeriendirilir. DSÖ kriterlerine göre %30 üzeri morfolojiye sahip sperm yüzdesi normal olarak kabul edilir. Morfolojik özelliklerine göre spermin normal olarak değeriendirme ölçütleri Kruger kriterleri ve WHO kriterleri ile belirlenmiştir(Kruger et al., 1986).



Resim 2.19: Kruger kriterlerine göre anormal sperm morfolojisi görüntüleri (Kruger et al., 1986).

2.13.1. Kruger Kriterleri

Baş: Oval yapıda ve düzgün olmalı, baş kısmın %40-70 ini akrozom kısım oluşturmaktadır. Normal sperm baş ölçüsü 3-5µm iken baş genişlik çapı 2-3µm'dir. Baş kısmındaki şekil bu ölçütlere yakın veya sınırda ise belirgin oval yapı dışındaki şekiller anormal kabul edilir.

Boyun: İntakt olmalıdır.

Orta kısım: Baş kısma eksen doğrultusunda bağlanmış ve silindirik şekle sahip olmalıdır. Yaklaşık olarak 1µm en, uzunluğun ise 1,5 misli boy ölçüsüne sahip olmalıdır. Baş büyüklüğünün 1/2' sini geçen sitoplazmik atıklar anormal olarak kabul edilir.

Kuyruk: Orta kısma nazaran daha ince ve düz yapıda olmalıdır. Normal uzunluk 35-45µm olmalıdır(Kruger et al., 1986).

2.13.2. WHO Kriterleri

Baş: Düzgün kenarlı ve oval yapıda olmalıdır. Baş kısmı, akrozomal kısım 1/3 oranında örtmelidir. Normal sperm baş ölçüsü 4,1 µm iken baş genişlik çapı 2-8 µm'dir.

Boyun ve Orta kısım: 0,6 µm genişliğinde, 4 µm uzunluğunda silindirik şekile sahip olmalıdır.

Kuyruk: Düz kıvrımsız ve silindir şeklinde olmalıdır. 35-45µm uzunluğunda olmalıdır(WHO, 2010). Morfolojik sperm incelemesi için en az 100, tercihen 200 adet sperm incelenmesi gerekmektedir. Baş, boyun ve kuyruk incelemeleri immersiyon merceği altında morfolojik olarak değerlendirilir(Kayıkçı ve ark., 2002).

2.14. Spermatozoa Viabilite (Canlılık) Testleri

Sperm canlılığı, progresif hareketli sperm oranının %40' dan az olduğu durumlarda hücre membran bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanan önemli bir testtir. Hareketlilik değerlendirilmesinin doğruluğu bu test ile kontrol edilir. Eosin Y, Tripan blue gibi boyalar ile canlı sperm oranı hipoozmotik şişme yöntemleri ile hücre zarı sağlam olanların değerlendirilmesi ile hesaplanabilir (Payne et al.,2005). Doğal halde üretilen veya herhangi atık olarak ortaya çıkan ya da kazara ortaya element, karışım veya bileşiklere kimyasal madde'denir. Kalıtsal olmayan, erkek ve dişi üreme fonksiyonlarını ve kapasitelerini azaltarak doğacak çocuğu etkileyen kimyasal maddelere ise üreme için toksik madde denir. Literatürdeki çalışmalar Erkek üreme sağlığını etkileyen faktörler olarak kemoteröpatik ajanlar, alkol ve madde bağımlılığı, bazı ilaç kullanımı, hava kirliliği, sıcaklık, radyasyon, kimyasal etmenler, tarım ilaçları/pestisitler, ağır metaller, ergonomik ve psikolojik etmenlerin yer aldığı çalışmalar bulunmaktadır.

Literatürde Akhter ve arkadaşları tarafından buffalo spermatozoasında yapılan çalışmada ;

Tüm bakteriler siprofloksisin(CP) antibiyotigine karşı dirençlidirler. Bufola sperminin motilitesi ve canlılığı açısından 1000 µg / mL'ye kadar olan CP'nin toksik olmadığı bulunmuştur. Sonuç olarak, bakteriyel kontrol için CP kullanımı, su aygırının dondurulmuş semen numunesinin çözülme sonrası kalite ve doğurganlığına hasar vermeden bakteriyel kontaminasyonu kontrol etmede etkili olmuştur(Akhter et al., 2007). Zobeiri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise NMRI farelerde siproflaksisinin DNA hasarı, fertilite potansiyelive embriyonik gelişim üzerine etkisine bakılmıştır(Zobeiri et al., 2012). Florokinolonlar (FQ) 1980'den beri rutin olarak kullanılan bir antibakteriyel ajan grubudur. FQ'ların uygulanması idrar, cilt, gastrointestinal, solunum, kemik ve eklem enfeksiyonlarının yanı sıra cinsel yolla bulaşan hastalıkların tedavisindedir. Siprofloksasin (CPFX), birçok mikrobiyal enfeksiyonun tedavisinde yaygın olarak kullanılan 4-floro-kinolon bir antibiyotiktir. DNA hasarı ve kondrotoksisitenin CPFX tarafından indüklediği bildirilmiştir. Testis fonksiyonları ve yapısındaki bozulma CPFX in neden olduğu belirtilmiştir. Janny ve Menezo, blastosist bölünme yüzdesindeki azalmanın sperm anomalisi ile korele

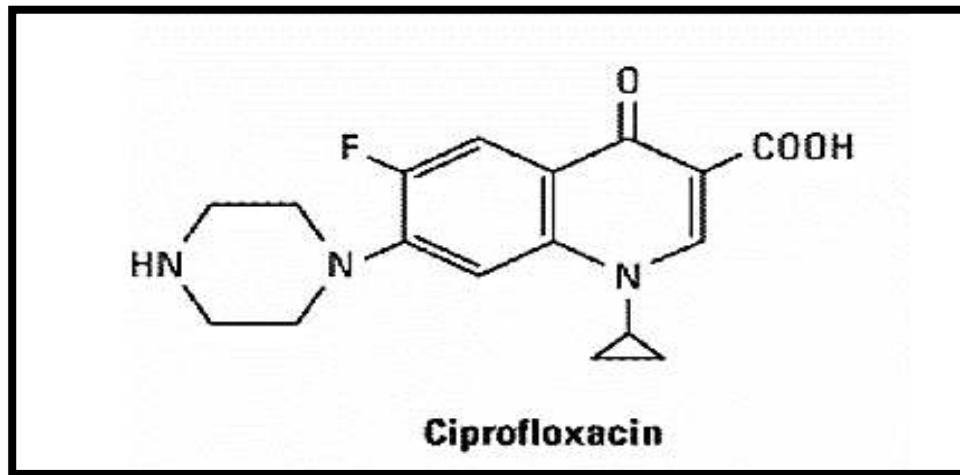
olduğunu göstermiştir. Yapılmış olan bu çalışmada DNA hasarı ve kromatin bütünlüğü ve hayvan modelinde kısırlığa etkileri incelenmiştir. (Janny and Menezo, 1994). Ramash ve arkadaşları Levofloksasinin Sıçanlarda Testis Doku ve Spermatogenez Üzerine Etkileri incelenmiştir(Ramash et al., 2016). Levofloksasin, özellikle üreme organlarında enfeksiyonları kontrol etmeyi etkileyen Flurokinolin antibiyotik gruplarından biridir. Çok sayıda ülkede terapötik kullanıma sahiptir, ancak bulaşıcı tedavi için kullanıldığında Levofloksasinin spermatogenez üzerindeki etkileri hakkında çok az bilgi vardır.

2.15. Siprofloksisin

Siprofloksisin, kinolon grubu antibiyotikler arasında olup yetişkin üriner sistem enfeksiyonları tedavisinde sıklıkla kullanılan bir antibiyotiktir(Bökesoy ve ark.,2000).

2.15.1. Kimyasal Yapısı

Temel yapısı, 1. pozisyondaki nitrojen(N), 3. pozisyondaki karboksil(COOH) grubu ve 4. pozisyondaki karbona çift bağlı olan oksijen(O)'in bulunduğu ikili halkadan oluşmuştur(Nazik ve Öngen, 2010). Tamamen saf kimyasal madde olan siprofloksasin sentetik olarak üretilir. Kinolanlar antibiyotik değildir. Diğer kinolon grubuna kıyasla in vitro bakteriyel etkisi güçlüdür(Leblebicioglu ve ark., 2003).



Resim 2.20: Siprofloksasin kimyasal yapısı

Erişim: 13 Mayıs 2019 http://www.biofarma.com.tr/pdf/upload/P25_tr.pdf

2.15.2. Etki Mekanizmaları

DNA giraz enziminin görevi; DNA replikasyonu , rekombinasyonu evrelerinde onarımdır. Siprofloksasin bakterilerin DNA giraz(Topoizomeraz II)enzimini inhibe ederek DNA çift sarmal yapısına zarar verir. Böylece bakteriler bölünemezler ve ölürlür. Siprofloksasin bakteri sitoplazma membranını da zedelenerek diğer kinolon gruba kıyasla daha güçlü antibakteriyel etki yapar(Nazik ve H., Öngen, 2010).

2.15.3. Farmokinetik Özellikleri

Yüksek lipofilik özellikteki ilaçtır. Sindirim kanalından çok iyi emilir. Karaciğerde metabolize edilirler(Herold et al.,2002).

2.15.4. Direnç Mekanizmaları

Gram negatif(-) bakteriler:

Bakteri membranında ilaç geçirgenliği azalır.

Gram pozitif(+) bakteriler:

DNA-giraz enziminde mutasyon.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan Gereçler

Cihazlar

- Mini Spin(Rotalab)
- Işık Mikroskop(Zoomex XSP-42)
- Floresan Mikroskop(Zeiss)
- Etüv(Eurolab)
- Makler Sayım Kamarası(Sefi-Medical Instrument)
- -80 C⁰ dondurucu(Thermo Fischer)

Ekipman

- Pasteur pipet(0,5 ml)(Isolab)
- Mikropipet(50ul, 400ul) (Isolab)
- Mikropipet uç seti(50ul, 100ul) (Isolab)
- Falkon tüp(100 ml, 50ml) (Isolab)
- Steril kap
- Lam, lamel
- Şale

Solüsyon

%96 Alkol

Carnoy Solüsyonu

MTT (3 [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolyum bromür)

BSA

Kültür mediumu

Acridin Orange boya

Freezing solüsyonu

Hemotoksilen boya

0,1 Molar sitrik asit

0,3 molarNa₂HPO₄.H₂O (Sodyum fosfat)

Metanol

Asetik asit

İlaç çözeltisi(Ciprofol 2mg/ml(200 mg siprofloksasin içerir).

Tampon özeltisi (Sipfofloksasin laktat:2.54 mg, sodyum klorür:9 mg, %90 laktik asit: 0,123 mg, enjeksiyonluk su:1 mg, hidroklorik asit pH:3.5-4.6)

Bu tez alışması, İstanbul Biruni Üniversitesi Hastanesi üroloji polikliğine başvuran hastalardan spermiyogram testi çalışılan hasta numunelerinden etik kurul ve hasta onamı ile test çalışması sonunda kalan atık numuneden, Mart 2019-Ocak 2020 tarihleri arasında gerçekleştirildi. WHO 2010 kriterlerine göre normospermik olan 30 hasta 2019/27-51 nolu etik kurul kararınca seçildi(Etik kurul kararı ektedir).

3.1. Kullanılan Yöntemler

3.1.1. Hasta seçimi

Çalışmada kullanılacak semen örnekleri Biruni Üniversite Hastanesi'ne infertilite şikayetiyle başvurmuş, infertilite açısından erkek faktörü tanımlanmayan, sadece kadın faktörü tanımlanan çiftlerden muayene sonucu spermiyogram testine tabi tutulan atık semenlerin kullanılması yoluyla temin edilecektir. Semen örnekleri herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan, herhangi bir ilaç, bağımlılık yapıcı madde, alkol yada sigara kullanmayan normospermik bireylerin semenleri tercih sebebi olacaktır.

3.1.2. Dışlanma kriterleri

Karyotip anomalisi,Y kromozom mikroleksyonu ve vas deferens ve/veya seminal vezikül yokluğu olan hastalar çalışma dışı bırakılacaktır. Seçilen hastalardan 3 günlük cinsel perhiz sonunda alınan numuneler steril, toksik madde içermeyen polypropilen bir kaba toplandı ve ortalama numune durumuna göre 15-25 dakika likefaksiyon işlemi uygulanmasının ardından semen analizi yapıldı. Koku, viskozite, renk, volüm, pH, aglünitasyon yönünden semen numunesi fiziksel muayene edildi. 5ml'lik pipet kullanılarak semen numunesi miktarı ölçülerek kaydedildi.

Mikroskopik inceleme

Semen numunesinden 10 µl alınarak, 0,01 mm derinliği olan Makler sayım kamerasının(Sefi - Medical Instruments) orta kısmına damlatılarak kamaranın grid camı ile kapatıldı. Işık mikroskobu ile 200x objektif büyütme altında değerlendirildi. Gridin üzerinden spermatozoalar 3 satır veya 3 sütun şeklinde 10'arlı kare şeklinde sayılarak konsantrasyonu milyon/ml olarak tespit edildi. Eş zamanda Motilite değerlendirilmesi için 100 hücre sayılarak, en az 3 kareyi kat edenler ileri hareketli olarak adlandırıldı ve motilitesi +4 , karenin dışına çıkan fakat 1-2 kare sonra geri dönme yeteneği gösteren spermatozoalar +3, bir kare içerisinde olup olduğu yerde baş veya kuyruk flegalle hareketi gösterenler +2, hiç hareket göstermeyen spermatozoaların motilitesi +1 olarak değerlendirilerek skorlandı(Makler 1980, WHO 2010).

3.1.3. Morfoloji değerlendirilmesi

WHO 2010 kriterleri gözönüne alınarak morfolojik değerlendirme yapıldı. Morfolojisi sağlam ve normosperm olanlar 400X objektif büyütme altında incelenerek çalışmaya dâhil edildi. Bu evreden sonra numune çalışma gruplarına ayrılarak siprofloksasinin antibiyotiği verilmek üzere hazır edildi. Çalışmada her grup için 1 numune, hiçbir işlem uygulanmadan direkt olarak kullanıldı. Antibiyotik verilen numuneler 2 saat boyunca 36,5 C⁰ inkube edildi ve inkübaasyon sonunda numune WHO 2010 kriterlerine göre mikroskopik olarak değerlendirildi. Normospermik örnek çalışma sonrasında akridin orange boyaması tekniği kullanılarak sperm **DNA hasarı** incelendi.

Tablo 3.1: Çalışma grupları.

1. grup	1.grup pozitif kontrol	2.grup	2.grup pozitif kontrol
7,4 ul siprofloksasin antibiyotik	7,4 ul plasebo çözeltisi	4,8 ul siprofloksisin antibiyotik	14,8 ul plasebo çözeltisi

3.2. Sperm DNA Fragmentasyonu Değerlendirilmesinde Acridin Orange Boyama Prosedürü

Mikroskopik-akridin oranj testi(M-AOT) Liu ve arkadaşları (2015 tarafından geliştirilen test DNA normalliğinin değerlendirilmesi için yapılır . Smearlar Carnoy fiksatifinde(3: 1 oranında, metanol: glasiyal asetik asit en az 3 saat süreyle) tutulur ve hava ile kurutulur. Slaytlar daha sonra AO boyasına alınır (Liu et al., 2015).

Boya Çözeltisi

STOK AO çözeltisi ve diğer solüsyonlar

%1 AO distile suda hazırlanır (1gr AO/100 ml distile suda çözülür)

0,1 Molar sitrik asit (19,212gr/ 1 litre distile suda)

0,3 molarNa₂HPO₄.H₂O (47,991gr/ litre distile suda)

Carnoy fiksatif (metanol 75 ml, asetik asit 25 ml)

Boya Çözeltisi

%1 Akridin Oranj..... 2,5 ml

0,1 Mol/L sitrik asit..... 10 ml

0,3 M Na₂HPO₄.....400 µl

Günlük hazırlanır.

Boyanın yapılışı

Boya çözeltisinde lamlar 5 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta tutulur. Distile su ile yıkanır ve 100'lük immersiyon objektifinde floresan mikroskopta 450-490 nm dalga boyunda incelenir. Yeşil ve kırmızı floresan veren hücreler sayılır, 200 hücre sayılarak sağlıklı DNA taşıyan hücre yüzdesi çıkarılır(yeşil floresan boyalı). Lam üzerine 20 µl semenden konularak yayma preparat hazırlanır. Havada kurutulur. Carnoy fiksatif ile (1/3 asetik asit,metanol) 3 saat fikse edilir. Stok solüsyon; %1 acridin orange (1 gr.acridin orange/100 ml distile suda çözülür).

0.1M sitrik asit

0.3M Na₂HPO₄.H₂O

Boya çözeltisi

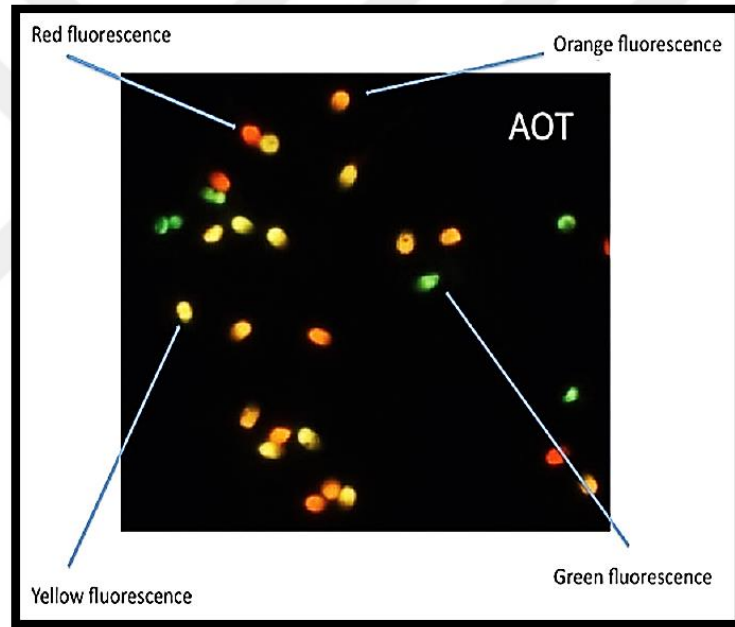
%1 acridin orange 2,5 ml

0.1Mol/L sitrik asit 10 ml

0.3M Na₂HPO₄.H₂O 400 µl günlük olarak hazırlanır.

Boya çözeltisinde lamalar 5 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta tutulur. Distile su ile yıkanır. 100x immersiyon objektifinde floresan mikroskobunda 450-490 nm dalga boyunda incelenir.

Yeşil ve kırmızı floresan veren hücreler sayılır, 200 hücre sayılarak sağlıklı DNA taşıyan hücre yüzdesi çıkarılır. Acridin orange boyası parçalanmış DNA ya bağlandığında kırmızı, doğal DNA ya bağlandığında yeşil ışık saçar.



Resim 3.1: Acridin orange boyama yeşil (normal), kavuniçi ve turuncu (defekli) DNA fragmentasyonunu göstermektedir(100x immersiyon objektifi floresan mikroskobi görüntüsü). (Franken DR et al. 1992).

3.3. MTT testi

MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) sarı renkte suda çözünür tetrazolium tuzudur. Boya, hücre viabilitesini ve metabolik aktivitesini ölçmede kullanılmakta, metabolik aktivitesi yüksek hücrelerin tetrazolium tuzunu

formazana indirgemesi ile aktiviteyi göstermektedir. Böylece oluşan formazanın miktarı spektrofotometrik olarak, flow sitometrik olarak belirlenebilir ve mitokondri sayısının tahmini olarak görev yapar ve bu nedenle örnekteki canlı hücrelerin sayısı (Denizot ve Lang, 1986). MTT testi ile tahmin edilebilir. Canlı spermilerin orta kısımlarındaki renk reaksiyonu ile mitokondriyal aktivite belirlenebilir. Manuel yöntemlerle 200 sperm sayılarak % canlılık verilebilir.

Gerekli malzeme

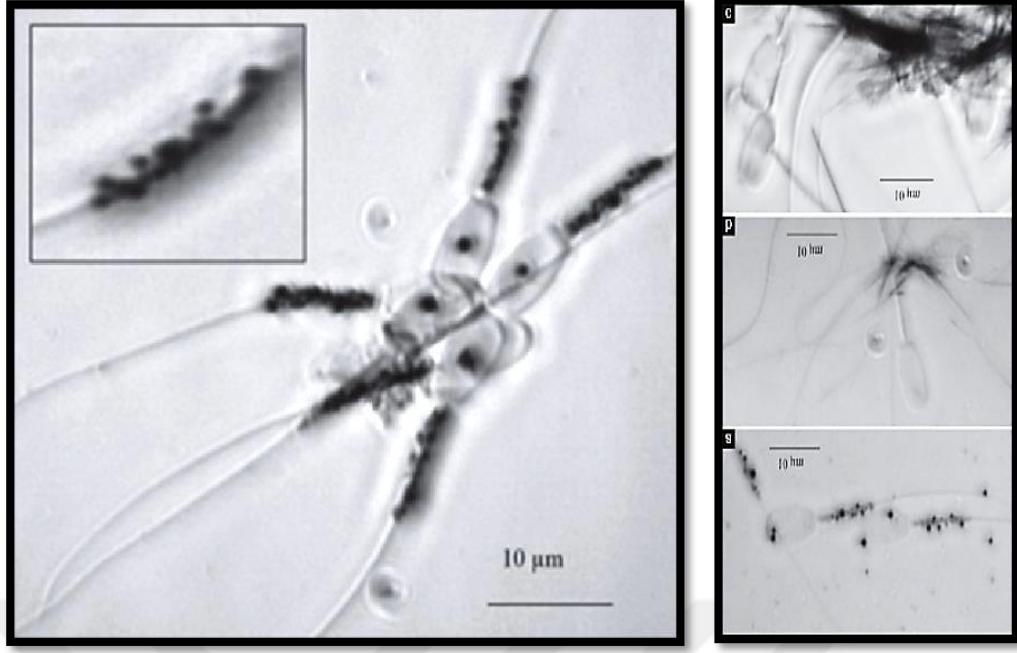
MTT (3 [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolyum bromür)

BSA

Kültür mediumu

3.3.1. Spermiler için MTT Canlılık Testi

Somatik hücreler için rutin MTT analizinde, MTT, 5 mg / mL'de PBS'de (fosfat tamponlu salin) çözündürülür. Ve daha sonra sterilize etme amacı ile membran filtresinden geçirilir. Daha sonra, her bir ortam ortamı (PH 6,7-7,0) için 0.5mg MTT nihai bir konsantrasyon elde etmek üzere, somatik hücrelerin ve kültür ortamlarının karışımına MTT eklenir. HAMSF10 veya farklı kültür sıvıları kullanılabilir . Stok çözelti 10 misli sulandırılır, % 10 BSA eklenir.inkübasyon süresi optimal 30 dak-2 saattir ve 37 °C ortamda tutulmalıdır.pozitif reaksiyon canlılık ve metabolik aktiviteyi gösterir.



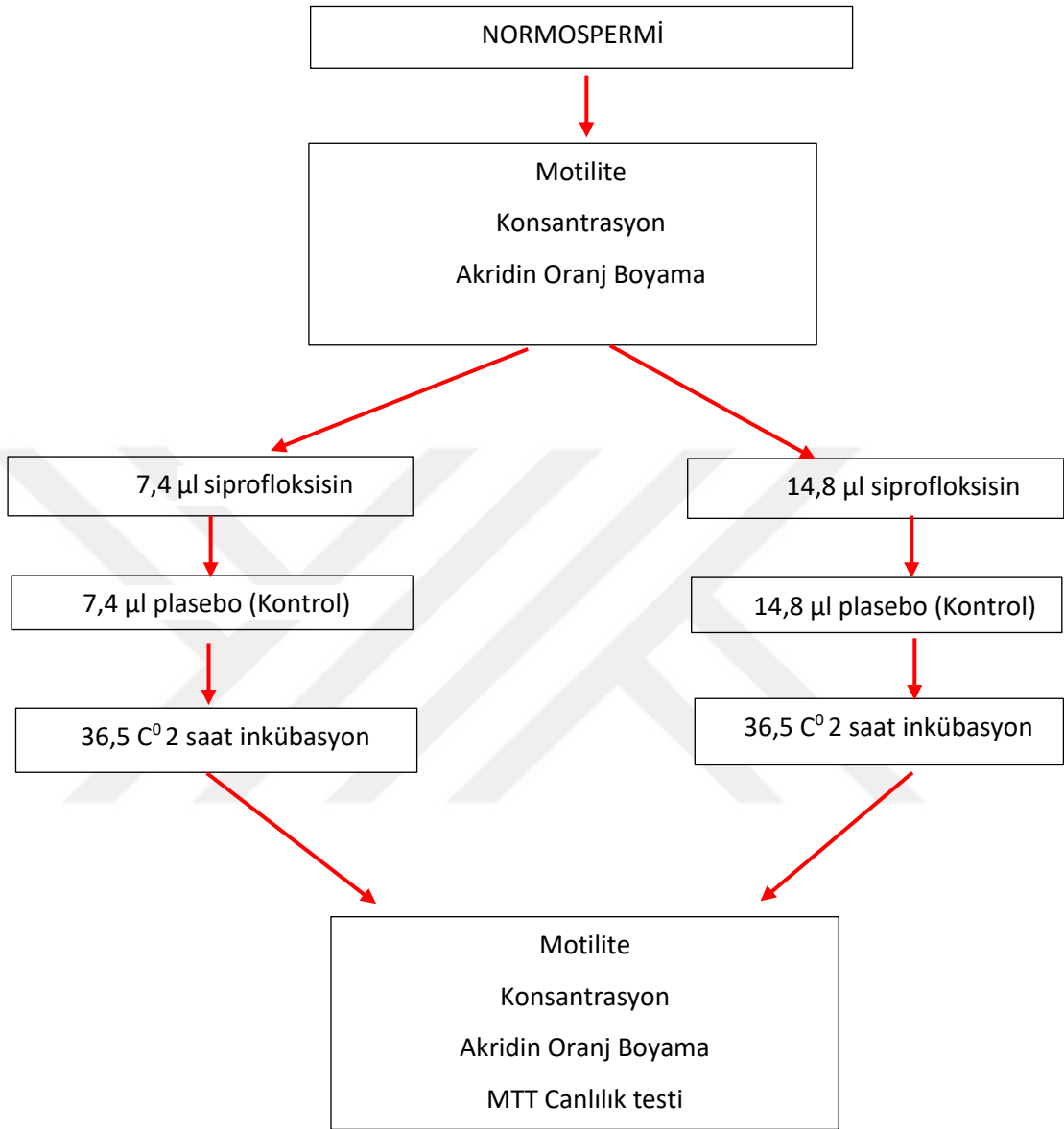
Resim 3.2: *MTT boyaması ile Pozitif ve negatif reaksiyon gösteren spermler resimde görülmektedir.*

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için Statistical Package for Social Sciences 15.0(SPSS 15.0) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (Ortalama, Standart sapma) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında (R 3.5.4) testi, normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Bonforenni testi kullanılmıştır. Sonuçlar % 95’lik güven aralığında, anlamlılık $p \leq 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

Çalışma Tablosu

Tablo 3.2: Çalışma prosedürü.



4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, Mart 2019 ve Ocak 2020 tarihleri arasında ‘Biruni Üniversitesi Hastanesi’ Üroloji kliniğine başvuran olgulardan çalışma kriterlerine uygun alkol, sigara, uyuşturucu madde kullanmayan, y mikroyejyon ve kromozom anomali tanısı almamış 27 denek rastgele örnekleme yöntemiyle seçilmiş ve yaş ortalamaları 31.111 ± 6.577 olarak saptanmıştır. Olguların yaş aralığı 23 ila 43 arasındadır(Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Olguların yaş ortalaması.

N	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Y27	31,111	6,577	23	43

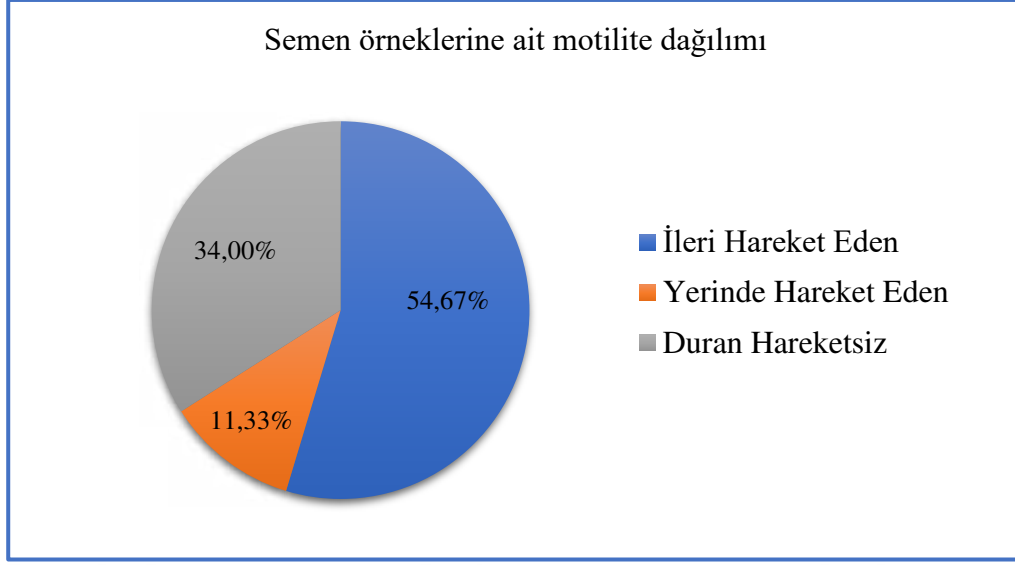
Olgulardan elde edilen semen konsantrasyon değerlerinin ortalama $4,389 \pm 1,294$ volüm değerine sahip olduğu görülmüştür. Alınan değerlere ait minimum değer 2,5 cc ve maksimum değer 6 cc’dir. Konsantrasyona ait değerlerde ise ortalama $81,444 \pm 58,157$ ’dir. Olgulardan alınan konsantrasyon değerlerinin 31 ile 215 arasında değiştiği görülmektedir. Total konsantrasyonun ortalama değeri $330,778 \pm 224,748$ iken bu değerler 110 ile 860 milyon/1cc arasındadır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Total konsantrasyonun ortalama değeri

	N	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Volüm/cc	27	4,389	1,294	2,5	6
Milyon konsantrasyon/ 1 cc	27	81,444	58,157	31	215
İilyon total konsantrasyon/cc	27	30,778	224,748	110	860

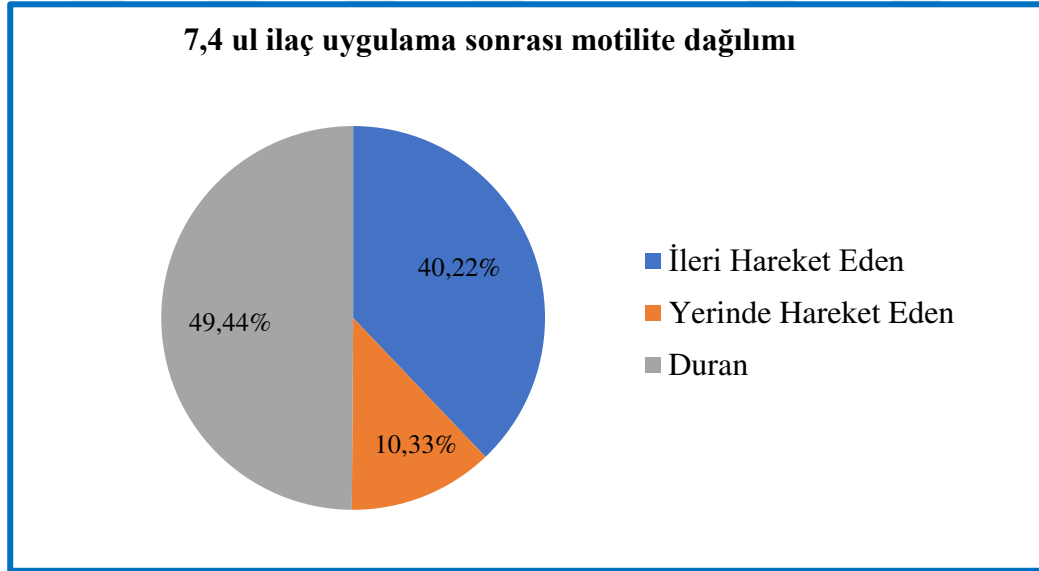
Olguların semen örneklerinin ilaç uygulamasından önceki motilite değerleri, 7,4 ul ve 14,8 ul ilaç uygulamasından sonraki motilite değerleri ve plasebo değerleri not edilmiştir. İlk motilite değerlerine ait veriler Şekil 4.1’de gösterilmektedir.

İleri hareket eden motilite dağılımının %54,67, yerinde hareket eden motilitenin %11,33 olduğu görülürken, %34’ün hareketsiz duran olduğu kaydedilmiştir.



Şekil 4.1: Semen örneklerine ait motilite dağılımı.

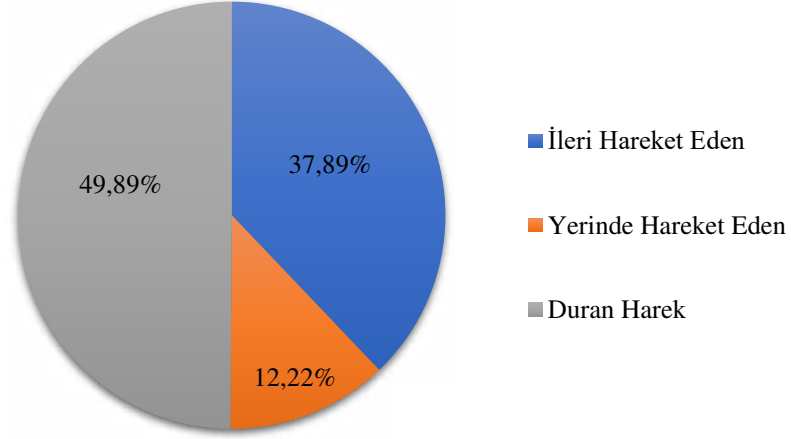
Semen örneklerine 7,4 ul ilaç aldıktan sonra örneklere ait motilite değerleri değişmektedir. İleri hareket eden motilite dağılımının %40,22'ye ve yerinde hareket eden motilitenin %10,33'e azaldığı görülmüştür. Bunun beraberinde hareketsiz duranların oranı %49,44'e yükselmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: 7,4 ul ilaç uygulama sonrası motilite dağılımı.

27 olgunun semen örneği 14,8 ul ilaç uygulamasından sonra ileri hareket eden motilite oranı %37,89 ve yerinde hareket eden motilite oranı %12,22 olmuştur. Duran oranı ise %49,89'a yükselmiştir. 14,8 ul ilaç aldıktan sonraki motilite dağılımı Şekil 4.3'te gösterilmiştir.

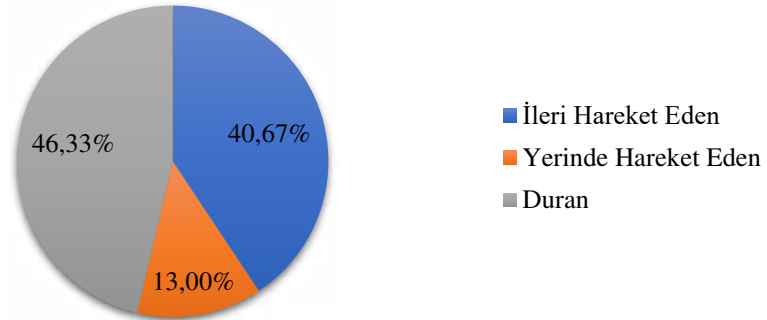
14,8 ul ilaç için motilite dağılımı



Şekil 4.3: 14,8 ul ilaç için motilite dağılımı.

Plasebo grubu için sonuçlar Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Buna göre ileri hareket eden için motilite oranı %40,67, yerinde hareket eden için motilite oranı %13,00 ve hareketsiz olanlar için oran %46,33'tür.

Kontrol için motilite dağılımı



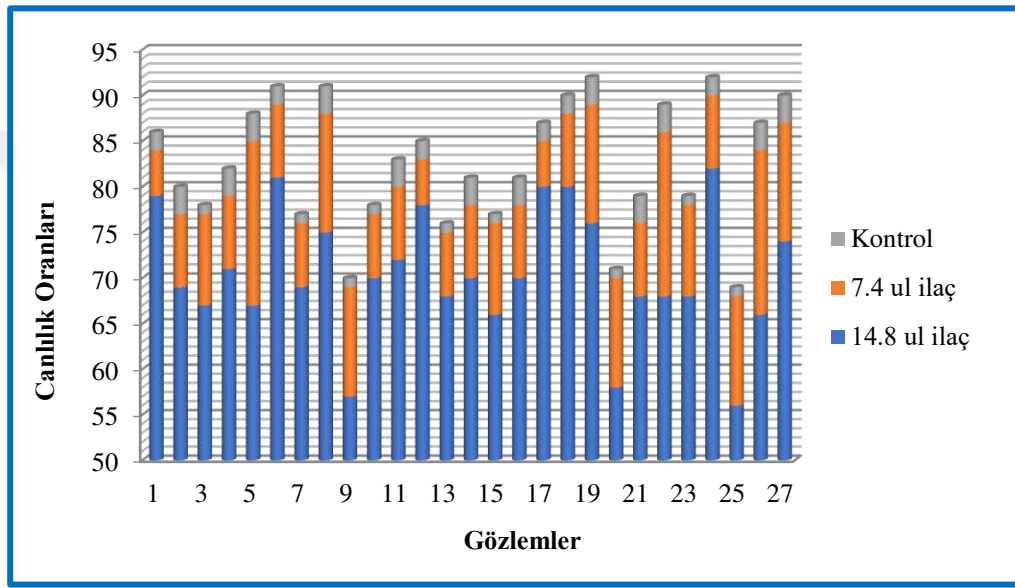
Şekil 4.4: Kontrol için motilite dağılımı

Canlı hücrelerin oranı (yüzdesel olarak) Tablo 4.3'de ifade edildiği gibidir. Buna göre canlı hücrelerin oranı plasebo uygulamasıyla $82.55 \pm 6,84$ ortalamayla en yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. Benzer şekilde örneklerle uygulanan ilaç etken madde dozu artırıldığında canlılık oranında bir **düşüş yaşandığı görülmektedir.**

Tablo 4.3: Canlılık oranlarına dair değerler.

	N	Ortalama	Standart Sapma
Kontrol(plasebo)	27	82,55	6,84
7,4 ul ilaç	27	80,44	6,32
14,8 ul ilaç	27	70,55	6,69

Şekil 4.5’de görüldüğü üzere plasebo grubu her gözlem için en yüksek canlılık oranların sahip gruptur. Bunu 7,4 ul ilaç ve 14,8 ul ilaç grupları sırasıyla takip etmiştir.



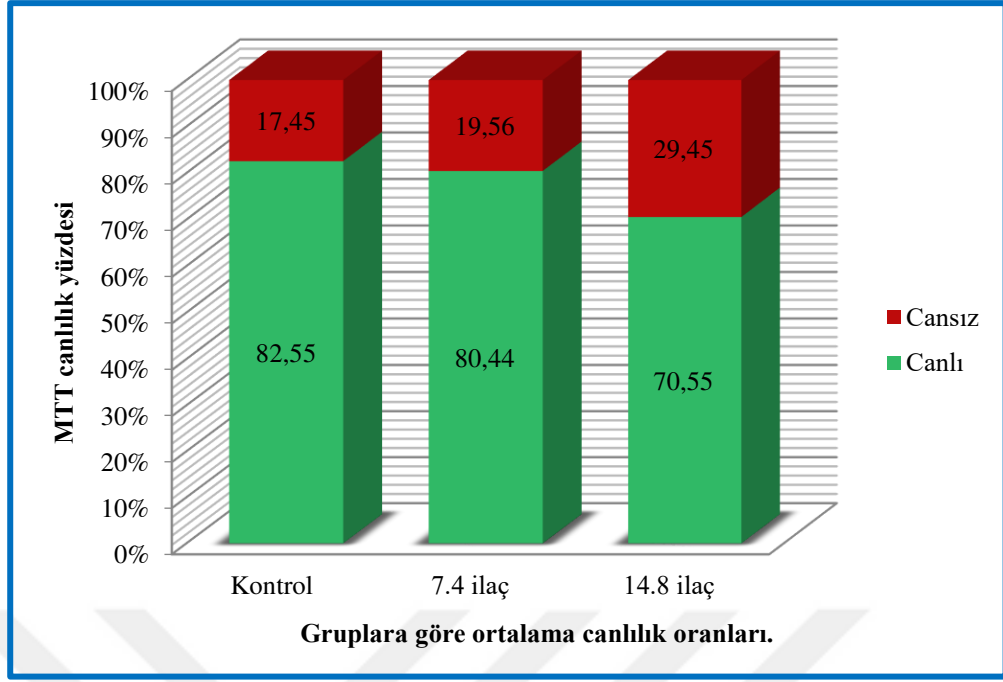
Şekil 4.5: Gözlemlerin her 3 grup için canlılık oranları.

Canlılık- cansız yüzdesel oranları Şekil 4.5’de görülmektedir. İstatistiksel analizler sonucu her 3 grup arasında canlılık oranları açısından anlamlı bir istatistiksel fark olduğu saptanmıştır. ($p=0,000$) Yapılan çoklu karşılaştırma testleri bu farklılığın her 3 ölçüm düzeyi arasında da **anlamlı olduğunu göstermektedir** (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: Canlılık oranlarına ilişkin test sonuçları.

Pillai iz $p = 0,000^*$

Çoklu Karşılaştırma (Bonferroni)		
Kontrol – 7.4 ul	:	0,000*
Kontrol – 14.8 ul	:	0,000*
7.4 ul – 14.8 ul	:	0,000*



Şekil 4.6: Gruplara göre ortalama canlılık oranları.

Kontrol ile 7,4 ul ilaç grubu arasında ($p=0,000$), kontrol ile 14,8 ul arasında ($p=0,000$), ve 7,4 ul ilaç ve 14,8 ul ilaç grupları arasındaki **fark** 0.05 önem düzeyinde istatistiksel olarak **anamlı bulunmuştur**. **Canlılık oranı üzerinde ilaç dozajının önemli ve olumsuz bir etkisi vardır.**

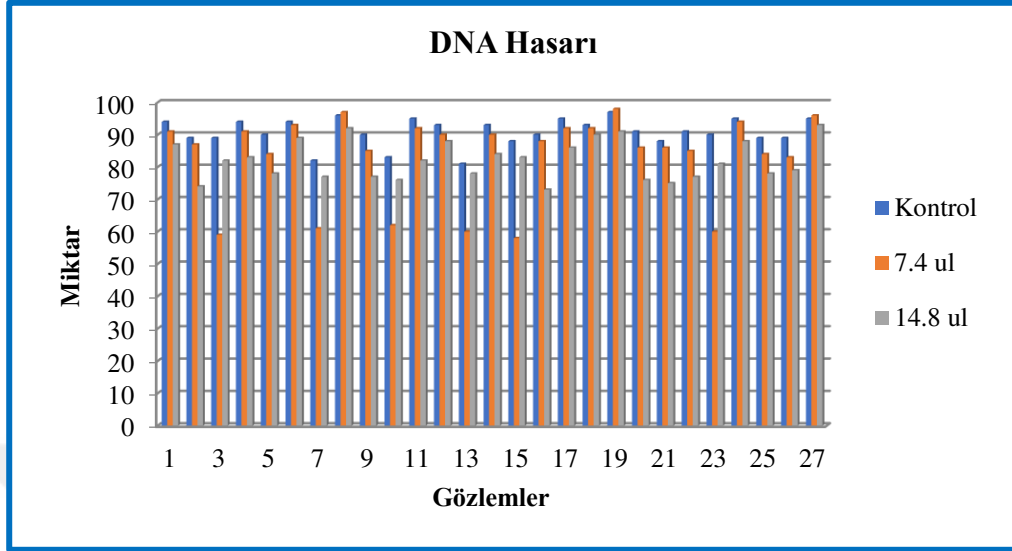
Sperm DNA'larına ilişkin ortalama yüzdesel sağlamlık oranları Tablo 4.5'de verilmiştir.

İlk ölçümlerde ortalama $90,88 \pm 4,144$ ile en yüksek sağlamlık oranına sahipken bu değer kontrol için $83,11 \pm 13,203$, 7,4 ul ilaç için $82,11 \pm 5,989$ ve 14,8 ul ilaç için $88,33 \pm 5,602$ olarak ölçülmüştür. 7,4 ul ilaç uygulamasına ilişkin ölçümler bu değerlere göre en düşük **sağlamlık oranına sahiptir.**

Tablo 4.5: Numune DNA'larına ilişkin sağlamlık oranları.

	N	Ortalama	Standart Sapma
Numune	27	90,88	4,144
7,4 ul ilaç	27	82,11	5,989
14,8 ul ilaç	27	88,33	5,602

27 gözlemin her birisine ilişkin DNA sağlamlık oranları Şekil 4.7’de verilmiştir. Burada 14.8 ul’lık ölçümlerin 7.4 ul ilaç ölçümlerine göre sıklıkla daha düşük sağlamlık oranına sahip olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.7: Gözlemlere ilişkin DNA sağlamlık oranlarının histogramı.

Farklılıkların anlamlılığına ilişkin analizler yapıldığında ($p=0.000$) 0.05 önem düzeyi için üç grup arasında en az bir tanesinin farklı olduğu görülmektedir(Tablo 4.6).

Tablo 4.6: DNA sağlamlığına ilişkin test sonuçları.

Pillai iz $p = 0,000^*$

Çoklu Karşılaştırma (Bonferroni)		
Kontrol – 7.4ul	:	0,003*
Kontrol – 14.8ul	:	0,000*
7.4 ul – 14.8 ul	:	1.000

Çoklu karşılaştırma testleri göstermektedir ki:

* İlk ölçümler diğer tüm gruplara oranla DNA sağlamlığı açısından istatistiksel olarak **anlamlı bir farklılık göstermektedir.**($p_1=0,003$, $p_2=0.000$)

*Kontrol ile 7.4 ul ilaç grupları arasındaki fark 0.05 önem düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 7.4 ul düzeyindeki ilacın DNA sağlamlığı üzerindeki etkisinin tampon malzemenin etkisinden yüksek olduğuna dair istatistiksel bir bulgu yoktur.

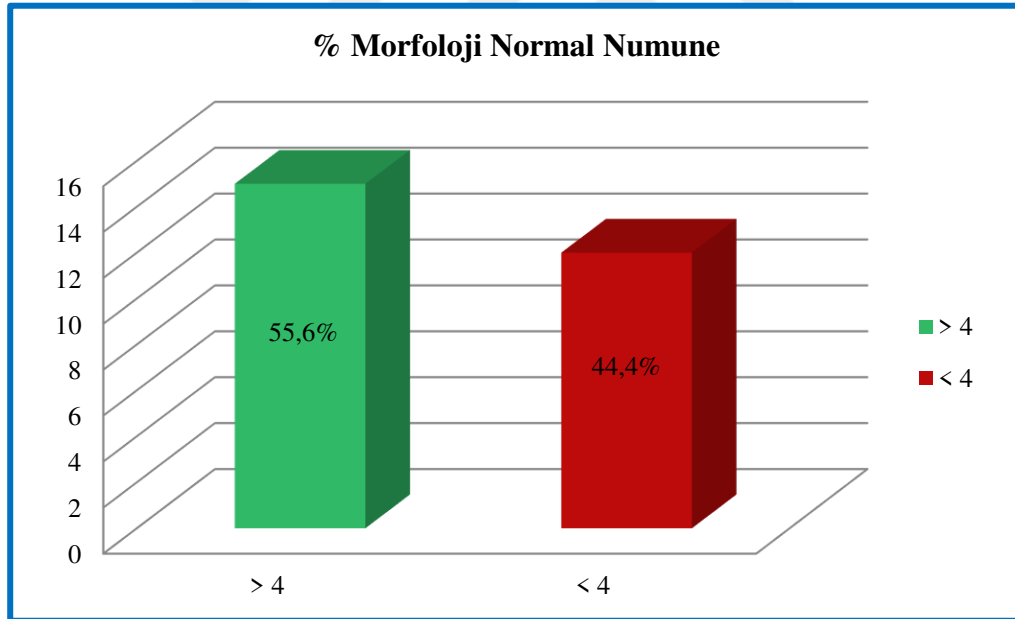
Buna karşın kontrol ile 14.8 ul ilaç düzeyleri arasında DNA sağlamlığı açısından **anlamlı bir farklılık saptanmıştır.** ($p=0,000$). Yüksek dozajda etken madde içeren ilaç DNA sağlamlığını **anlamlı derecede düşürmüştür.**

27 denekten alınan örneklerin morfolojik özelliklerine ilişkin bulgular Tablo 4.7’de gösterilmektedir

Tablo 4.7: Deneklerin morfolojik özelliklerine ilişkin bulgular.

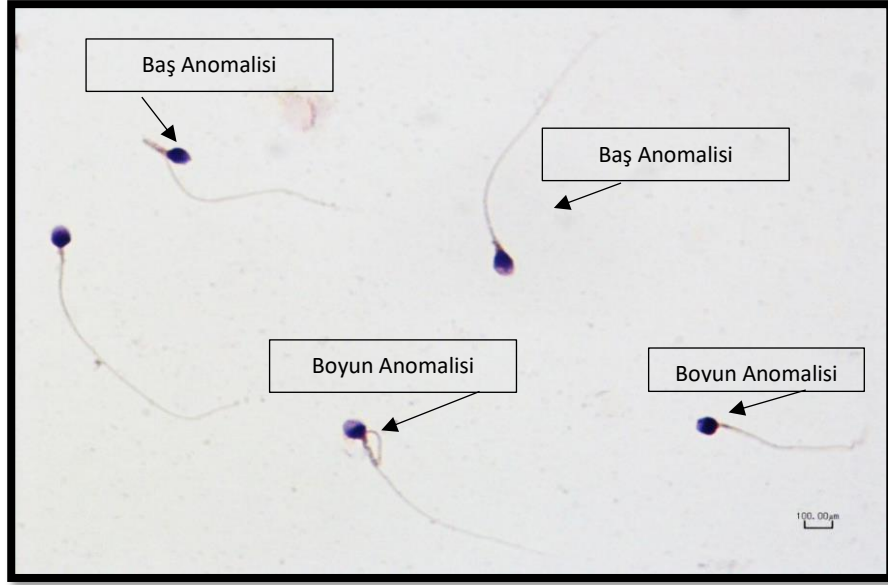
	N	Ortalama	Standart Sapma
Baş	27	62,56	22,959
Gövde	27	12,04	5,965
Kuyruk	27	16,04	5,467
Normal	27	3,56	0,974

İlaç kullanımına bağlı olarak 27 gözlemin hiçbirisinde **morfolojik bir değişim gözlemlenmemiştir.**(Şekil 4.8)

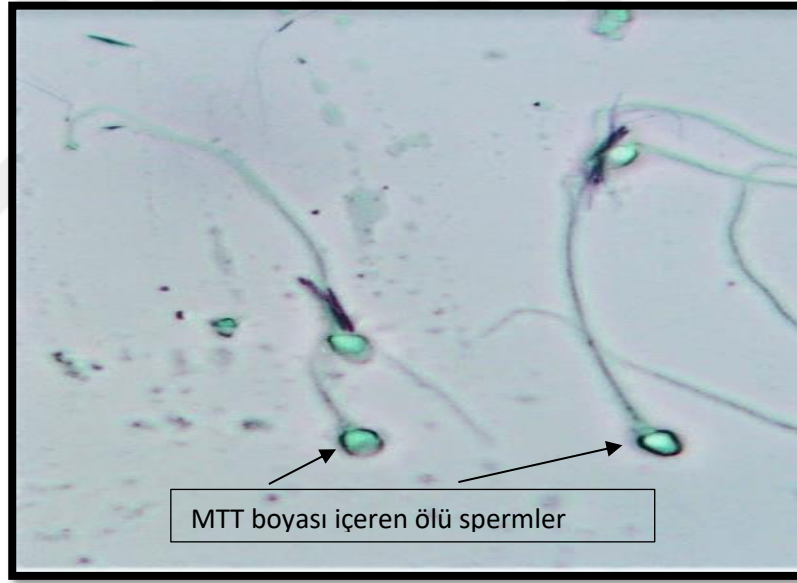


Şekil 4.8: Normal numune morfolojisinde kritik değer etrafındaki frekans.

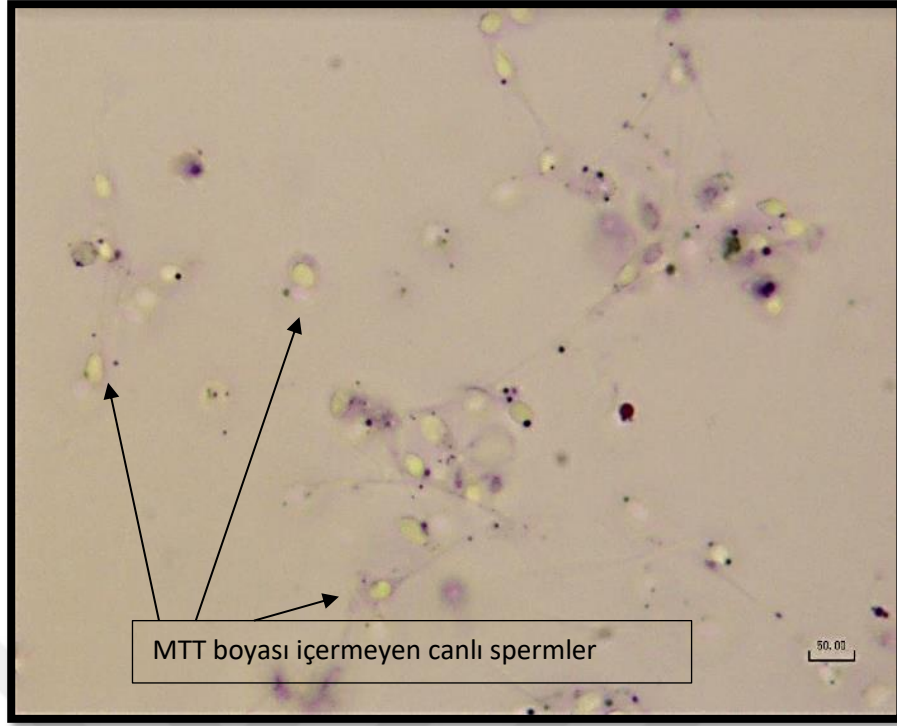
27 denekten 15 tanesinin normal morfolojik değeri 4 ve üzeri olarak görülmekteyken 12 tanesi için bu değer 4’ün altındadır.



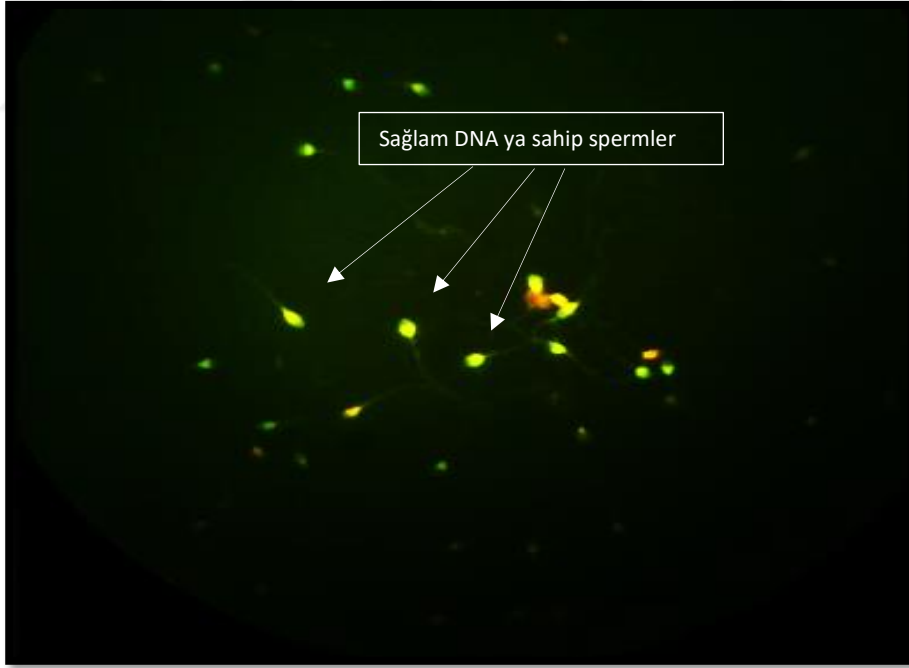
Resim 4.1: Sperm morfoloji değerdendirmesi, anormal morfolojik yapıdaki spermilerin gösterimi (100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü). (Kendi çekimimizdir).



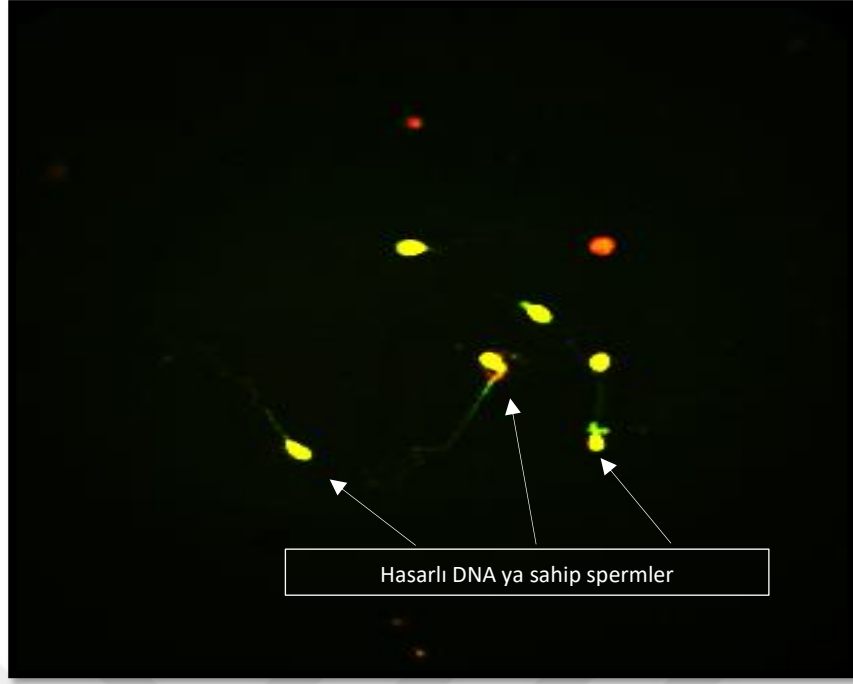
Resim 4.2: MTT testi, sperm canlılık analizi(100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü). (Kendi çekimimizdir).



Resim 4.3: MTT testi, sperm canlılık analizi(100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü). (Kendi çekimimizdir).



Resim 4.4: Acridin Orange boyaması Siprofloksasin antibiyotik uygulama öncesi Sperm DNA hasar tayini değerlendirilmesi. (Kendi çekimimizdir).



Resim 4.5: Acridin Orange boyaması Siprofloksasin antibiyotik uygulama sonrası
Sperm DNA hasar tayini değerlendirilmesi

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Bulgularımız CPFX uygulamasından sonra sperm DNA hasarı ve mitokondriyel aktivitesinde anlamlı derecede kontrol grubuna kıyasla fark göstermiştir. Önceki araştırmalara göre buffalo üzerine yapılan bir çalışmada bakteriyel kontrol için CP kullanımı, su aygırının dondurulmuş semen numunesi' nin çözülme sonrası kalite ve doğurganlığına hasar vermeden 1000 ul ye kadar toksik etki göstermeden bakteriyel kontaminasyonu kontrol ettiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise 7,4ul doz CPFX kullanımında az derecede anlamlı fark 14,8ul de yüksek anlamlı fark yaratarak DNA hasarı ve mitokondriyel aktivitelerinde bozulmalarına neden olduğunu göstermiştir(Arda ve ark., 2008). Fatemeh Zobeiri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise NMRI farelerde siproflaksisinin DNA hasarı, fertilite potansiyelive embriyonik gelişim üzerine etkisine bakılmıştır.

Ciprofloksasinin antibakteriyel mekanizması bakteriyel tip 2 topoizomerez/DNA giraz enziminin inhibasyonuna dayanır. DNA hasarı sırasıyla anilie blue ve akridine orange tteknigi kullanılarak sperm kromatin bütünlüğü ve sperm DNA hasarına bakılmıştır. Erkek farelerde doğurganlık potansiyeli değerlendirilmiştir. Sperm hücreleri kromatin bütünlüğünü ve DNA hasarı açısından değerlendirilerek DNA hasarında ve sperm hücrelerinde protamin eksikliğinde artış olduğu bildirilmiştir. Hasarı ve kondrotoksisitenin CPFX tarafından indüklediği bildirilmiştir. Testis fonksiyonları ve yapısındaki bozulma CPFX in neden olduğu belirtilmiştir(Zobeiri ve ark., 2012). Gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda ise DNA hasarı tayini için akridin orange boyası kullanılmıştır. Sperm 14,8ul doz siprofloksasin uygulaması sonucu anlamlı derecede DNA hasarı oluşturmuştur.

5.2. Tartışma

Spermatogenez normal olarak üç farklı aşamada ilerler. İlk faz olan mitotik faz, farklılaşmış spermatogoniumların hızlı proliferasyona uğradığı fazdır. İkinci faz olan mayotik faz, haploid spermatidlerin spermatositlerden oluştuğu evredir. Son faz ise

spermiogenez fazı, spermatitlerin karmaşık farklılaşma süreci sonunda spermatozoanın oluştuğu fazdır(Griswold, 2016). Çok sayıda gametin üretimini sağlayan komplike bir mekanizma olan spermatogenez sürekli halde üretimi devam eder. Spermatogenezin düzgün olarak gerçekleşebilmesi kan-testis bariyerinin(KTB) yapısal bütünlüğüne bağlıdır(Cheng et al., 2010). KTB seminifer tübülleri bazal ve luminal olmak üzere iki kompartmana ayırmaktadır (Griswold, 2016). İnsan erkek sperm kalitesi değerlendirilmesinde referans değer aralıkları ve laboratuvar tekniklerindeki değişiklikler sebebi ile antibiyotik kullanımı ile semen kalitesi arasındaki ilişkinin açığa kavuşturulması gerekmektedir(John et al., 2007). İrez ve arkadaşların 2018 de yaptıkları çalışmada hafif erkekfaktörlü ve açıklanamayan infertil erkeklerde sperm kromatin kondansasyonu değerlerinin(anilin mavisi negatif sperm oranı) yani protaminasyonun klinik gebeliği öngörebileceği gösterilmiştir(İrez ve ark., 2018). Araştırmacılar sperm nükleer proteinlerinin ,yani histonların protaminasyonunun fertilizasyon sonrası embriyo gelişiminde çok önemli rol üstlendiğini ve gebelikle sonuçlanan intrauterin inseminasyon ve ICSI olgularında pozitif gebeliği öngörebilecek değerleri göstermişlerdir (İrez ve ark., 2018). Bu tez çalışmasında siprofloksasin antibiyotiğinin sperm motilitesi üzerine etkisini ve canlılığı üzerine in vitro ortamda değerlendirdik. Kinolon grubu antibiyotikler amerika, avrupa ve kanada rehberlerinde de ilk tercih ajanlar olarak önerilmektedir. Kinolon grubu antibiyotikler geniş spektrumlu aktiviteleri nedeniyle, üriner sistem enfeksiyonlarının yanı sıra kemik-eklem enfeksiyonları, deri, yumuşak doku tedavisinde oldukça kullanımı yaygındır. Kinolon grubunun sıklıkla kullanılması artan direnç sorununu geliştirmektedir. Bazal kompartman içerisinde, spermatogoniumlar, genç spermatositler olan leptoten ve zigoteni barındırırken , luminal kompartman ise olgun spermatosit, spermatid ve spermatozooları barındırır (Simon et al., 2010). Sperm DNA hasarı rutin olarak semen analizlerinde kullanılmamaktadır. Sperm DNA hasarı çok önemli test olmakla birlikte infertil erkeklerin yaklaşık %15'inde normal sınırlarda semen analizi sonuçlarına rastlanmaktadır (Koyuncu,2011). Negatif olarak sonuçlanan gebelik sonuçlarında infertilite nedenini öngörmede yeni belirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Sperm DNA hasarı bu belirteçler içerisinde ön sırada yer alarak infertilite çalışmalarında popüler araştırma konusudur (Evenson et al., 1999). Yüksek sperm DNA hasarı bulunan semende düşük konsatrasyon, düşük motilite ve anormal

morfolojik bulgular saptanmıştır. Semen analizi sonucuna göre normal olarak kabul edilen semende %8'inde sperm DNA hasarı saptanmıştır (Zini et al., 2001). Sperm DNA sını yatkın hale gelmesinde protamin eksiklikler, oksidatif stress ve DNA tamir mekanizmasındaki yetersizlikler etkin rol alır. İyi kalitedeki oositler, spermin kendine ait sayılı tamir mekanizması olmasına rağmen spermi tamir eder. DNA fragmentasyon oranı çok yüksek olduğu durumlarda oosit tamir mekanizması yetersiz kalmaktadır (Simon et al., (2010). Yardımcı üreme tekniklerinin başarısını olumsuz yönde etkileyen DNA hasarı tipi henüz bilinmemektedir. Normal bireylere kıyasla infertil erkeklerde sperm DNA fragmentasyon hasar oranı daha yüksektir. Açıklanamayan infertilite endikasyonunu temel alan bir çalışmada DNA fragmentasyonunun %80 olarak neden olduğu bildirilmiştir. Sperm DNA hasarını belirlemek için çalışmamızda akridin orange boyası kullanılmıştır. Akridin orange testi (AOT), AO nun yeşilden kırmızıya metachromatik kaymasının kullanıldığı SCSA ile benzer olan prensibine dayanmaktadır. Asit uygulaması sonucunda DNA denatürasyonunu ölçmede kullanılır. Akridin orange boyaması sonucu ile yeşil renkte floresan ışımaya veren DNA normal, Kırmızı, turuncu veya kavuniçi floresans veren DNA hasarlı olarak tanımlanır(Gyllensten et al., 1991).

Ramesh ve arkadaşları levofloksasinin sıçanlarda testis doku ve spermatogenez üzerine etkileri incelenmiştir. Levofloksasin üreme organlarında enfeksiyonların kontrolünü sağlayan kinolon grubu antibiyotik gruplarından biridir. Levofloksasinin spermatogenez üzerindeki etkileri hakkında çok az bilgi vardır. 100 den fazla ülkede terapatik kullanımı vardır. Kronik bulaşıcı hastalıkların tedavisinde çok etkilidir. Mevcut çalışma, levofloksasinin sıçanlarda testis dokusunu etkileyip etkilemediğini belirlemek için tasarlanmıştır. Çalışmada 3 farklı doz kullanılmıştır. Sonuç olarak levofloxacin, spermatosit hücreleri üzerinde, özellikle de yüksek dozda histopatolojik etkilere sahiptir. Bu nedenle, daha ileri çalışmalar gerektiren erkeklerde doğurganlığı azaltabilir sonucuna ulaşılmıştır. Bizim çalışmamızdaki antibiyotik ise aynı gruba ait olup yüksek doz kullanımında sperm DNA hasarı ve Mitokondriyel aktivitesinde azalma göstermiştir (Ramesh ve ark.,2016). Sperm DNA fragmentasyonuna abortif apoptoz, protamin yetersizlikler veya oksidatif stres gibi yapısal faktörler neden olabilir (Chohan et al., 2016). DNA hasarına, bazı ilaçları testis sonrası oksidatif stres, boşalma sonrasındaki süre gibi dış etkenler nedeniyle de oluşabilir (Gandidi et al.,2000). Spermi somatik hücrelerden iki özellik ayırır. Bu özellikler protaminasyon

ve DNA onarımının olmamasıdır. Transkripsiyon ve spermiyogenez DNA onarımını sona erdirir, bu evreden sonra epididim ve ejakülasyon sonrası geçişler sırasında hasar meydana gelirse bu hasar için onarım mekanizması yoktur Erken embriyo ve oositlerin DNA hasarını onardığı gösterilmiştir(Sharma et al., 2010). Bulgularımız CPFEX uygulamasından sonra sperm DNA hasarı ve mitokondriyel aktivitesinde anlamlı derecede kontrol grubuna kıyasla fark göstermiştir. Önceki araştırmalara göre buffalo üzerine yapılan bir çalışmada bakteriyel kontrol için CP kullanımı, su aygırının dondurulmuş semen numunesinin çözülme sonrası kalite ve doğurganlığına hasar vermeden 1000ul ye kadar toksik etki göstermeden bakteriyel kontaminasyonu kontrol ettiğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise 7,4ul doz CPFEX kullanımında az derecede anlamlı fark, 14,8ul de yüksek anlamlı fark yaratarak DNA hasarı ve mitokondriyel aktivitelerinde bozulmalarına neden olduğunu göstermiştir.

5.3. Öneriler

Bu çalışma insan semen numunesi üzerinde yapılan ilk çalışma olmakla birlikte antibiyotik etki mekanizmasının elde ettiğimiz sonuçlara göre sperm DNA hasarı, sperm canlılığı ve sperm motilitesi üzerine etki ettiği gözlenerek ileri çalışmalara ışık tutacaktır.

6. KAYNAKLAR

Aitken, R.J., Backer, HWG., Irvine, DS. (1995). On the nature of semen quality and infertility. *Hum Reprod.* 10:248–249.

Aitken, R. J., Henkel, R. (2011). Sperm cell biology: current perspectives and future prospects. *Asian journal of andrology*, 13(1), 3.

Akhter, S., Ansari, M., Andrabi, S., Ullah, N. (2007). Effect of Antibiotics in Extender on Bacterial and Spermatozoal Quality of Cooled Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Semen. *Reproduction in Domestic Animals*. 43(3), 272–278.

Ambulkar, P., Large, S.,(2016). "Deletions in Human Sperm Mitochondrial DNA with Spermatozoa Dysfunction and Male Infertility." *Journal of Clinical and Diagnostic Research JCDR*.GC09

Arda, B., Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S.(2008), *Kinolonlar*. Bilimsel Tıp Yayınevi, 497-512.

Artan, E., (1991), *Histoloji*. İstanbul Üniversitesi Basımevi. 1(100), 357- 375.
Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biology*, 8(9), 227.

Barroso, G., Morshedi, M., Oehninger, S. (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 1338–1344.

Basu, E. (2018). Defective Wnt3 expression by testicular Sertoli cells compromise male fertility. *Cell and Tissue Research*. 351-363.

Berta, P., Hawkins, JR., Sinclair, AH., Taylor, A., Griffiths, BL., Goodfellow, PN. (1990), Genetic evidence equating SRY and the testis- determining facto. *Nature*, 348-448.

Bisht, S. (2017). Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology*, 470-485.

Blomberg, J. (2014). Vitamin D and male reproduction. *Nature Reviews Endocrinology*, 86-175.

Bonanno, O. (2016). Sperm of patients with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and genomic alterations. *Reproduction*, 695-704.

Bowles and Amaral, A. (2007), Sperm mitochondria and fertilisation." Society of Reproduction and Fertility, (Suppl 1), 399-416.

Bökesoy, A., Çakıcı, İ., Melli, M. (2000). Farmakoloji Ders Kitabı. Ankara: Gazi Kitabevi, s:26.

Brito, F., Althouse, G., Aurich, C. (2016). Evaluation of sperm concentration. Andrology laboratory review, 1507-1527.

Chen, S. (2013). Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. Archives of gynecology and obstetrics, 191-199.

Cheng, C., Wong, E., Yan, H. (2010). Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. Molecular cell endocrinol, 315 (1–2): 49–56.

Chohan, KR., Griffin, JT., Lafromboise, M., De Jonge, CJ., Carrell DT. (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. J Androl 27, 53– 59.

Cui, H., Kong and Zhang, H. (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. Journal of signal transduction, 1–13.

Çiçek, M. (2008). Temel Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite, Ankara: Palme yayıncılık, s: 339-344.

Dellmann, HD., Brown, EM.(1987). Textbook of Veterinary Histology. 3th Edition. Philadelphia. Lea &Febiger. 286-312.

Diez-Sanchez, C., Ruiz-Pesini, E., Montoya, J. (2003). Mitochondria from ejaculated human spermatozoa do not synthesize proteins. The FEBS Journal 553(1-2), 205–208.

Doğan, E. (2011). İnfertil çiftin araştırılmasında tanısal yöntemler: Üreme Endokrinolojisi Teknikleri ve Cerrahisi. Üreme Tıbbı Derneği Kitabı, Nobel Tıp Kitapevleri, s:362-363.

Doshi, S., Khullar, K., Sharma, R., Agarwal, A. (2012). Role of reactive nitrogen species in male infertility. Reprod Biol Endocrinol, 10-109.

Dousset, D., Hussenet, F., Daudin, M. (1997). Seminal cytokine concentrations (IL-1beta, IL-2, IL-6, sRIL-2, sR IL-6), semen parameters and blood hormonal status in male infertility. Human Reproduction Journal, 12(7):1476-9.

Erbengi, T. (1990), Temel Histoloji. 2. Baskı 2. Cilt. Ankara. Güneş Kitabevi. s: 210-230.

Erimşah, S., Seçkin, İ., İrez, T. (2008). Sperm Morfolojisi ve Kromatin Kondensasyon Defektleri Arasındaki Korelasyon. Cerrahpaşa Tıp Dergisi, 2008,39(4):128-135.

Evenson, D., Jost, L. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Human Reproduction Journal, 1039-1049.

Ferlin, A., Arredi, B., Speltra, A. (2007). Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 92(3): 762-70.

Fourie, M., Du, T., Bornman, M. (1991). Alpha-Glucosidase, sperm ATP concentrations, and epididymal function. Archives of Andrology, 139-41.

Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C et al. (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. Hum Reprod 15, 830– 839.

Gartner, DK., (2006), “In Vitro Fertilization, A Practical Approach”, 3 rd edition, CRC Press.

Gartner P.L., Hiatt L.J., Çeviri Ed.Canan Hürdağ, Hücre Biyolojisi ve Histolojisi, 7.Baskı, İstanbul Tıp Kitabevi,2016.

Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A., Wilson, AC. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. Nature s:255-7.

Gosalvez, j., Lopez-Fernandez., Gouraud, A. (2011). Relationships between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from eleven species. Molecular Reproduction and Development, 78(12):951-61.

Gottardo, F. and S. (2010) "Kliesch, Semen analysis: spermiogram according to WHO 2010 criteria." Der Urologe, 101-108.

Gözükara, K., Görür, S. (2015). Ürogenital enfeksiyonlar ve erkek infertilitesi. Androloji Bülten, 17(60): 43-48

Grabe, M., Bartoletti, R., Bjerklund, J. (2015). Guidelines on urological infections, European Association of Urology.

Griffin, J., Wilson, J. (1992). Disorders of sexual differentiation. Campbell’s Urology, 6th ed. Philadelphia, 1509-1542.

Griffin, J. (1992). Androgen resistance-the clinical and molecular spectrum. *New England Journal of Medicine*, 326(9): 611-8.

Griswold, M. (2016). Spermatogenesis: the commitment to meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1):1–17.

Grudzinskaskb, J., Yovich, J. (1995). Gametes- The Spermatizoon [GametlerSperm]. 1st edition Cambridge University Press.

Guyton, A., Hall, J.(2007). Erkeklerde Üreme İşlevleri ve Hormonal İşlevler. In: Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ. editörler. Tıbbi Fizyoloji. 11.basım. İstanbul: Nobel Matbaacılık; s: 996-1006.

Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A., Wilson, AC. (1991). Alpha-Glucosidase, sperm ATP concentrations, and epididymal function. *Arch Androl*, 26:139-41.

Hammoud, A., Gibson, M., Peterson, C., Hamilton, B., Carrell, D. (2006). Obesity and male reproductive potential. *Journal of andrology*, 27(5): 619-26.

Hendry, VF., Sommerville, IF., Retal, HR. (1999). Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol*; 45: 684-692.

Herold, C., Ocker, M., Ganslmayer, M. (2002). Ciproflo-xacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 86, 443–448.

Hutson, J.(2006). Undescended testis, Torsion, and Varicocele. In: Grosfeld L. editor. *Pediatric Surgery*. 6th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier, s: 1193-2000.

Irez, T. ,Dayioglu, N., Alagöz, M., Karatas, S.,Güralp, O.(2018). The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. *Andrologia*. 2018 Dec;50(10):e13111. doi: 10.1111/and.13111.

Irvine, D., Twigg, J., Gordon, E., Fulton, N. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology* 21, 33-44.

Janny, L., Menezo, Y. (1994). Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Molecular Reproduction and Development*, 36-42.

Jensen, M., Lieben, L., Nielsen. J., Willems, A. (2013). Characterization of the testicular, epididymal and endocrine phenotypes in the Leuven Vdr-deficient mouse

model. Targeting estrogen signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 377(1–2):93–102.

John, St. J., Bowles, E.J., and Amaral A., (2007).Sperm mitochondria and fertilisation. *Society of Reproduction and Fertility supplement*: 399-416.

Johnson, K. (1991). *Histology and Cell Biology*, 2nd Edition., Harwal Publishing Company, 295-304

Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., & Krausz, C. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*, 62(2), s: 324-332.

Kadıoğlu, A., Çayan, S., Semerci, B. (2004). Erkek reproduktif sistem hastalıkları ve tedavisi, 264-78.

Kalfa, N. (2020). Will he be Able to Give me Grandchildren? Uncertainties about the Role of Hormones in Undescended Testis. *Journal of Urology*, 16:10.

Kierszenbaum, A. (2006) Spermatogenez. In: Demir R. editor. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Ankara: Palme Yayıncılık, s:531-550.

Koyuncu, H.(2011), Methods for the determination of sperm DNA damage. *Turk Urol Sem.*; s:18-23.

Köse, S. (2009), *Temel ve İleri Yaşam Desteği. İçinde: Klinik Beceriler, Sağlığın Değerlendirilmesi Hasta Bakımı ve Takibi*. Sabuncu N, Akça Ay F, (eds.), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, s: 565-579.

Kruger, T., Menkveld, R., Stander, F., Lombard, CJ., . Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization, *Fertil Steril*, (1986). 46:1118-1123

Lahn, B., Page, D.(1997). Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*, s:278:675.

Leblebicioglu, H., Usluer, G., Ulusoy, S. (2003). *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*, Ankara; Bilimsel Tıp Yayınevi. s: 407- 416.

Leblond, CP., Clermont, Y. (1992), Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat, *Annals of The New York Academy of Sciences*, 548-573.

Leeson, R., Leeson, S., Paparo, A. (1985), *Textbook of Histology*. 5th edition. London. WB Saunders Company. s:486-489.

Liu, L., Wang, J., Wei, J., Xu, LL., Yu, M., Liu, XM.(2015), Tri-ortho-cresyl phosphate induces autophagy of rat spermatogonial stem cells, 149(2):163–170.

Looijenga, L., Dohle, G. (2009), Testicular microlithiasis and carcinoma in situ overview and proposed clinical guideline. [özet], 32(4):279-87.

Ludwig, M., Vidal, A., Huwe, P., Diemer, T., Pabst, W. (2003), Significance of inflammation on standard semen analysis in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome, 35(3):152–6.

Maurer, B., Simoni, M. (2000). Genetics og hypogonadotropic hypogonadism. J Endocrinol Invest, s:560-65.

May-Paloup, M., Chretien, F., Savagner, C., Vasseur, M. (2003). İncresed sperm mitochondrial DNA content in male infertility. Human reproduction Vol. 18 No.3 s: 550-556.

McElreavey, K. (1999). Y chromosome and male infertility. Frontiers in Bioscience, s: 1-8.

McElreavey, K., Krausz C.(1999). Sex Chromosome Genetics, 99. Male infertility and the Y chromosome. The American Journal of Human Genetics, 64(4):928-33.

Moore, K., Agus, A. Pelvis ve Perineum,(2006) In: Elhan A. editor. Temel Klinik Anatomi. İkinci baskı. Ankara. Güneş Kitabevi, s: 210-276.

Mortimer, D., Barratt, CL., Bjorndahl, L., Jequier, AM., Muller, CH. (2002), What should it take to describe a substance or product as 'sperm-safe'. Hum Reprod Update. 2013;19(Suppl 1), 1–45.

Nazik, H., Öngen, B. (2010), Türkiye’de Plazmit Aracılı Kinolon Direnci. Ankem Dergisi, 46–54.

Niu, ZH., Shi, HJ., Zhang, HQ., Zhang, AJ., Sun YJ & Feng Y. (2011), Sperm chromatin structure assay results after swim-up are related only to embryo quality but not to fertilization and pregnancy rates following IVF. Asian Journal of Andrology 13, 862– 866.

Ombelet, W., Menkveld, R., Kruger, T.F., and Steeno, O. (1995), Sperm morphology assessment (historical review in relation to fertility) . Hum Reprod Update, 543–557

Ordueri, N., Çelik-Özenci, Ç, (2013). Sperm nükleusu ve nüklear matriks, JournalAgent.

Rajpert-De Meyts, E., McGlynn, K. A., Okamoto, K., Jewett, M. A. & Bokemeyer, C. (2016), Testicular germ cell tumours. *Lancet* 387, 1762–1774.

Payan-Carreira, R., (2013) "Molecular Markers in Sperm Analysis, in Success in Artificial Insemination-Quality of Semen and Diagnostics Employed, InTech."

Payne, JF., Raburn, DJ., Couchman, GM., Price, TM. (2005), Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 84, 356– 364.

Piomboni, P., (2012), The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International journal of andrology*, 109-124.

Playán, A., Solano, A., Manuel, J., López-Pérez (2006), Mitochondrial DNA transcription and diseases, Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1179–1189.

Raheem, AA., Ralph D (2011), Male infertility: causes and investigations. *Trends in Urology & Men's Health*, 2(5): 8-11.

Rajfer, J., Handelsman, DJ., Swerdloff, RS., Hurwitz, R. Kaplan H. (1986), Hormonal therapy of cryptorchidism: A randomized, double-blind study comparing human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 314(8): 466-70.

Ramesh, A., Mehdi, A., Elham, S., Nazila, V. (2016), The Effects of Levofloxacin on Testis Tissue and Spermatogenesis in Rat . *Cell Journal*,18(1), 112-116.

Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M. J.,

Prada, E, (2013), Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, 1(5), 715–722.

Robinson, L., Gallos, I. D., Conner, S. J., Rajkhowa, M., Miller, D., Lewis, S., Coomarasamy, A. (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 27(10), s: 2908-2917.

Ross, HM., Kaye, G., Pawlina, W. (2003) ‘Histology, a text and atlas ’, With Correlated Cell and Molecular Biology 7th Edition Williams&Wilkins Philadelphia, 689-696.

Sakkas, D., Alvarez. JG. (2010), Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93, 1027– 1036.

Shamsi, M.B., Kumar, R., Bhatt, A., Bamezai, R.N., Kumar, R., Gupta, N.P., Das, T.K., Dada, R., (2008). Mitochondrial DNA Mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian Journal of Urology*, 24, 150–154.

Sharma, RK., Sabanegh, E., Mahfouz, R., Gupta, S., Thiagarajan, A., Agarwal, A. (2010) TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *Urology* 76, 1380– 1386.

Sherratt, H., (1991), "Mitochondria: structure and function." *Revue neurologique*, 417-430.

Simon, L., Brunborg, G., Stevenson, M., Lutton, D., McManus, J., Lewis, SE. (2010). Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod*, 25(7) s: 1594-1608.

Simon, L., Lutton, D., McManus J & Lewis SE. (2011), Sperm DNA damage measured by the alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 95, 652– 657.

Sun, Z., (2007), "Ultrastructure and function of mitochondria in idiopathic asthenospermia: study of 151 cases" s: 1263-1265.

Tanyolaç, A.(1999) Özel Histoloji, 3. Baskı. Ankara. Yorum basın yayın. s: 132-143.

Temizkan, G. (1994). Temel Genetik 1. İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, Türkiye, 209-211.

Tortora, G, Derrickson, B. (2006). Principles of Anatomy and Physiology. 11th ed. Philadelphia. Wiley.;879-891.

Vegetti, W., Van Assche, E., Frias, A., Verheyen, G., Bianchi, M., Bonduelle, M., Liebaers, I., Van Steirteghem, A. (2000). Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod*. Feb;15(2):351-65.

Venkatesh, S., (2009) "Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility." *Indian J Med Res* s:127-137.

Ward, WS and Coffey, DS(1991), DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa (comparison with somatic cells) . *Biol Reprod*. 44: 569–574.

World Health Organization , (2010) , ‘WHO Laboratory Manual fort the Examination of Human Semen and Sperm-Carvical Mucus Interaction 5th Edition’ Cambridge, Cambridge University Press.

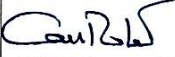
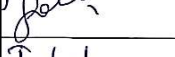
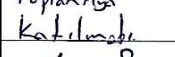
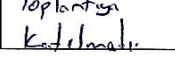
Zhou, X., Liu, F., Zhai, S., (2007). Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 16, 383–390.

Zini, A., Bielecki, R., Phang D & Zenzes MT. (2001), Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 75, 674– 677.

Zobeiri, F., Sadrkhanlou, RA., Salami, S., Karim Mardani K., Abbas Ahmadi A.(2012), The effect of ciprofloxacin on sperm DNA damage, fertility potential and early embryonic development in NMRI mice *Veterinary Research Forum.*, 3 (2) 131 – 135.

7. EKLER

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

Tarih: 29.03.2019 Toplantı Sayısı:27	Karar No: 2019/27-51			
	Dr.Öğr.Üyesi.Göksun DEMİREL'in planladığı "Normospermik Vakalarda Siprofloksasinin İn Vitro Sperm DNA Fragmentasyonu ve Sperm Mitokondriyal Aktivitesi Üzerine Etkisinin Araştırılması" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.			
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	

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Esra SOLAK

Doğum Tarihi ve Yeri: 26/02/1990

Mail Adresi: solakesra2602@gmail.com

Unvanı: Moleküler Biyolog

Öğrenim Durumu: Lisans

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
Lisans	İstanbul Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2016

9. İNTİHAL RAPORU

NORMOSPERMİK VAKALARDA SİPROFLOKSASİN İN VİTRO SPERM DNA FRAGMENTASYONU VE SPERM MITOKONDRIYAL AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%5 BENZERLİK ENDEKSİ	%3 İNTERNET KAYNAKLARI	%2 YAYINLAR	%3 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	-------------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.tipdergi.duzce.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
2	Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University Öğrenci Ödevi	<%1
3	Seda ÇETİNKAYA, Burcu GÜLTEKİN, Aydan ÖZGÖRGÜLÜ. "Relationship Between Motility of Cells with Phosphatidylserine Membrane Translocation in Normospermia Applied Swim-up Technique", Türkiye Klinikleri Journal of Health Sciences, 2018 Yayın	<%1
4	www.uroturk.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	vetjournal.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1