



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

VARİKOSEL OLGULARINDA SPERM
PROTAMİNASYONUNUN İNCELENMESİ

BÜŞRA BERKSOY

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL

2019



**T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**VARİKOSEL OLGULARINDA SPERM
PROTAMİNASYONUNUN İNCELENMESİ**

BÜŞRA BERKSOY

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL,2019

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Program Adı: Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Öğrencinin Adı Soyadı: Büşra BERKSOY

Danışman: Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Büşra BERKSOY tarafından hazırlanan "Varikozel Olgularında Sperm Protaminasyonunun İncelenmesi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:23/10/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Emre SALABAŞ

Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Belkıs Melike ERKAN

İstanbul Üniversitesi

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

Prof. Dr. Leman ŞENTURAN
Lisansüstü Eğitim Enstitü Müdürü

I.BEYAN

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

Büşra BERKSOY

II. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından itibaren en büyük katkısı ve desteği gösteren bilimsel yönüyle ışık tutan yol gösteren saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof.Dr. Tülay İREZ başta olmak üzere çalışmamda desteği ve katkılarını esirgemeyen Sayın hocam ve ikinci tez danışmanım Dr.Emre SALABAŞ'a. Her türlü zor koşullarda yardımına koşan ve en büyük destekçim Sayın Ecem ASLAN'a ve Bu zorlu süreçte manevi olarak yanımda olup destek veren Sayın Kübra KOÇ'a. Biruni Üniversite Hastanesi Laboratuvarı çalışanlarına, bu aşamaya gelebilmemde emeği olan tüm hocalarıma ve hayatımın her anında varlığıyla yanımda olan sevgili annem,babam ve ablalarıma..

Büşra BERKSOY

III. İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

I.BEYAN.....	iii
II. TEŞEKKÜR	iv
III. İÇİNDEKİLER	v
IV.SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	vi
V. TABLO LİSTESİ	vii
1.ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER:	5
4.1 Spermatogenez	5
4.2Olgunlaşan Spermilerin Salgılanması	7
4.3. Spermatogenezi Etkileyen Durumlar	9
4.4. Sperm kromatin yapısı:.....	10
4.5. Sperm DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri	13
4.5.Sperm Kromatini Protamin	17
4.6.Spermatogeneizde Histon ve Protamin Değişimleri.....	18
4.7. Varikosel	19
4.8 Etiyolojisi ve Fizyopatolojisi.....	19
5. GEREÇ VE YÖNTEM	21
6. BULGULAR	26
7.TARTIŞMA	32
8.SONUÇ VE ÖNERİLER:	36
9. KAYNAKLAR	37
10.EKLER.....	42
EK1	42
EK 2: Gönüllü Onam Formu	44

EK 3. Kurum İzin Belgesi	46
11. ÖZGEÇMİŞ	47



IV.SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ-WHO:	Dünya Sağlık Örgütü, (World Health Organization)
°C:	Santigrat derece
pH:	Power of Hydrogen
cc:	santimetre küp (cubic centrimetre)
ml:	mililitre
µl:	mikrolitre
FSH:	Folikül Stimülan Hormon
LH:	Lüteinizan Hormon
AO:	Akridin Oranj (acridine orange)
AB:	Anilin mavisi (aniline blue)
CMA₃:	Kromomisin A3
TUNEL :	Terminal Uridine Nick- End Labeling
RNA:	Ribonükleik asit

V. TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1. Sperm Kromatin Hasarı belirleme yöntemleri.....	13
Tablo 4.2. Semen Analizi Normal Referans Değerleri.....	15
Tablo 6.1. Hasta Gruplarının konsantrasyonlarının Hesaplanması.....	26
Tablo 6.2. Hasta Gruplarının motilitesinin hesaplanması.....	26
Tablo 6.3. Hasta gruplarının sperm DNA fragmentasyon indeksi.....	26
Tablo 6.4. Hasta gruplarının sperm protaminasyon defektleri	
Şekil 4.6. Sperm kromatin yapısı için halka-ilmek modeli.	
Kaynak: (Oliva,2006).....	27
Tablo 6.5.Varikosel ve normospermi hasta gruplarının morfolojik hesaplanması..	28
Tablo 6.6. Varikosel ve normospermi hasta gruplarının sperm maturasyon defekti .	28
Tablo 6.7. Varikosel ve normospermi hasta gruplarının 1 cc'deki oranları.....	28
Tablo 6.8. Varikosel ve normospermi hasta gruplarının total konsantrasyonu.....	29
Tablo 6.9. Varikosel ve normospermi hasta gruplarının motilite (%) oranları.....	29
Tablo 6.10. Varikosel ve normospermi hasta gruplarının morfoloji (%) oranları	30
Tablo 6.11. Varikosel ve normospermi hasta gruplarının sperm maturasyon defekti oranları	30
Tablo 6.12. Varikosel ve normospermi hasta gruplarının sperm DNA fragmentasyon indeksi	31

V.ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 4.1. Spermatogenez aşamaları	6
Şekil 4.2. Erkek germ hücrelerinin oluşumu	6
Şekil 4.3. Spermiyogenezin fazları	8
Şekil 4.4. Olgun sperm hücresinin görüntüsü	9
Şekil 4.5. Makler sayım kamerası	17
Şekil 4.6. Sperm kromatin yapısı için halka-ilmek modeli	18
Şekil 5.1. Anilin Blue boyaması ile görülen sperm hücreleri	22
Şekil 5.2. Akridin oranj boyaması ile görülen sağlıklı (yeşil) ve fragmente (kırmızı-sarı) sperm hücreleri	24
Şekil 5.3. CMA3 boyaması ile görülen sağlıklı (yeşil/CMA3-) ve fragmente (sarı/cma3+) sperm hücreleri	25

1.ÖZET VE ANAHTAR KELİMELELER

Erkek faktörlü infertilite tanısında semen analizi parametrelerinin infertilite nedenini tam olarak açıklayamadığı bilinmektedir. Sperm protaminasyonu spermatogenezin geç haploid fazında meydana gelen, DNA'yı paketleyen histonlar ile protaminlerin yer değiştirip, arjininden zengin çekirdek proteini oluşumu ile sperm DNA stabilizasyonu kondansasyonu sağlamasıdır. Ayrıca sperm DNA fragmentasyonları erkekte infertilite nedeni olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda bu amaçla spermde protaminasyon faktörü ve sperm DNA fragmentasyonu, varikozel tanısı konmuş ve normospermi özelliği gösteren olgularda incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda normospermi ve Varikozel olgularında sperm protaminasyonunun incelenmesi için çalışma 'Biruni Üniversitesi' Girişimsel Olmayan Etik Kuruluna sunuldu ve 2019/25-18 sayı ve 24.01.2019 tarihli etik kurul onayı alındı. Çalışma ocak-Haziran 2019 tarihleri arasında Biruni Üniversite Hastanesi'nde spermiyogram analizi için başvuran hastalarda uygulandı. Bu çalışmada; Biruni Üniversitesi Hastanesine başvuran hastalardan normospermi (n:22), ve Varikozel gruplarında (n:22) DSÖ kriterlerine uygun standart semen analizi uygulanarak, asidik anilin mavisi boyama yöntemi ile sperm maturasyonu ve akridin oranj boyama yöntemi ile sperm DNA fragmentasyon hasarı, kromomisin A3 boyası ile protaminlerce pozitif olan sperm örneklerinin zayıf kromatin paketlenmesi incelendi ve varikozel olgularının kontrol olgular ile kıyaslaması yapıldı. Normospermi ve Varikozel grubu karşılaştırıldığında; sperm motilitesi Varikozel olgularında anlamlı olarak düşük bulundu. (p=0.004). Histon pozitif sperm oranının Varikozel olgularında daha yüksek olduğu görüldü. (p=0.000). Sperm DNA fragmentasyonunun Varikozel olgularında daha yüksek olduğu görüldü. (p=0.000) Spermelerde normal morfoloji oranı kontrole kıyasla Varikozel olgularında daha düşük bulundu. (p=0.004) Sonuç olarak varikozel olgularında sperm maturasyonu'nun etkilendiği, DNA fragmentasyonlarının arttığı görülmüştür. Testiküler sıcaklığın yükseldiği bu olgularda sıcaklığın artışının testis üzerindeki negatif etkileri gözlenmiştir. Ayrıca kromatin kondansasyonu'nun yani sperm maturasyonu'nun kullanılan iki ayrı test ile benzer sonuçlar gösterdiği de doğrulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Asidik anilin mavisi, Akridin oranj, Kromomisin A3, DNA fragmentasyonu, Protaminasyon,

2.ABSTRACT

Investigation Of Sperm Protamination In Varicocele Cases

It is known that semen analysis parameters do not fully explain the cause of infertility in the diagnosis of male factor infertility. Sperm protamination occurs in the late haploid phase of spermatogenesis, replacing protamines and protamines that pack the DNA with the formation of arginine-rich nucleus protein and providing sperm DNA stabilization, condensation. sperm DNA fragmentation, varicocele diagnosis and normospermia. In our study, the study was submitted to the 'Biruni University Olmayan Non-Interventional Ethics Committee for the examination of sperm protamination in normospermia and varicocele cases and approval of the ethics committee dated 24.01.2019 and numbered 2019 / 25-18. The study was performed between January-June 2019 in Biruni University Hospital for spermogram analysis. In this study; Normospermia (n: 22) and varicocele (n: 22) patients who applied to Biruni University Hospital, standard semen analysis according to WHO criteria, sperm maturation with acidic aniline blue staining method and sperm DNA fragmentation damage with acridine orange staining method, chromomycin A3 staining. In this study, weak chromatin packaging of sperm samples that were positive by protamines was examined and varicocele cases were compared with control cases. Normospermia and varicocele group were compared; sperm motility was significantly lower in varicocele cases ($p = 0.004$). Histone-positive sperm ratio was higher in varicocele cases. Sperm DNA fragmentation was found to be higher in varicocele cases ($p = 0.000$). Sperm normal morphology rate was lower in varicocele cases compared to control group ($p = 0.004$). In conclusion, sperm maturation was affected and DNA fragmentation was increased in varicocele cases. Negative effects of temperature increase on testis were observed in these cases where testicular temperature increased. It was also confirmed that chromatin condensation, ie sperm maturation, showed similar results with two separate tests.

Keywords: Acidic aniline blue, Acridine orange, Chromomycin A3 DNA fragmentation, Sperm maturation, Protamination

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Testiste panpiniform venöz pleksus'un dilatasyonu ile ortaya çıkan varikozel, erkek popülasyonunda yaklaşık olarak % 15 civarında bulunmaktadır (Enciso ve ark 2013). İnfertil erkeklerde ise bu oranın yüksek seyrettiği çeşitli araştırmalarla kanıtlanmıştır (Marmar 2001).

Varikozel'in sperm kalitesi üzerindeki etkileri konusunda çelişkili yayınlar bulunmaktadır. Sperm kalitesinin bozulmasında en büyük etkenin testis sıcaklığı olduğu konusunda bir fikir birliği bulunmaktadır (Enciso ve ark. 2013).

Sperm DNA hasarı erkek infertilitesi'nin önemli bir sebebidir (Kara ve ark., 2011,Ying ve ark 2012). 2003 ve 2004 yıllarında yapılan çalışmalar varikozelli bireylerin spermalarında Tunel ve Halosperm testleri ile doğrulanan DNA fragmentasyonlarının kontrol olgulara kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Saleh ve ar. 2003, Chen ve ark 2004).

Döllenme sırasında pronukleus gelişimi ve arkasından pronukleusların birleşmesi gerçekleşir. Bu sürecin doğru işlemesi için sperm DNA ve kromatin yapısının sağlıklı olması gereklidir (Sun ve ark.,1997). Kromatin kondansasyonu'nun normal oluşu genetik materyalin geçişi için önemlidir (Aktan., 2011).Spermatogenez çok karmaşık bir süreçtir ve birçok genin potansiyel olarak rol oynayabileceği düşünülmektedir(Yang et all.,2004). Spermiyogenez sırasında, sperm protaminleri, çok adımlı bir işlemde somatik hücre histonlarının yerini alır.Protaminler, spermiyogenezin geç evrelerinde somatik hücre histonlarının yerini almaktadırlar (Vincent et all.,2006) .

Spermelerde protaminasyon işlemindeki ilk adım yuvarlak spermatitlerde gerçekleşir ve histonların geçiş nükleer proteinleri (TP1 ve TP2) ile değiştirilmesini içerir.(Yalçın ve ark.,2018). Daha sonra, uzayan spermatidlerde, protaminler TP1 ve TP2'nin yerini alır. Bu histon-protamin değişimi, oldukça yoğun, transkripsiyonel olarak sessiz bir kromatin ile sonuçlanır. Spermiyogenez süresince, protamin proteinleri spermatid kromatin kondansasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Spermiyogenez boyunca, spermatid kromatini kompaksiyon sürecine girerler. Histonlar ile protaminlerin yer değiştirmesi sayesinde kromatin kondansasyonu gerçekleşir (Erimşah ve ark.,2015). Protaminler, ana nükleer sperm proteinleri olup,

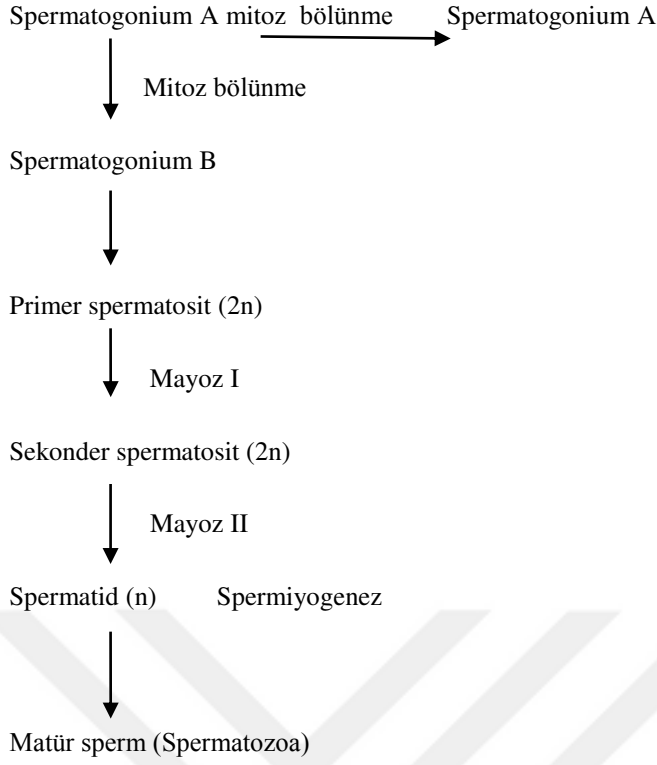
insan sperm nukleusu P1 ve P2 diye adlandırılan 2 tip protamin içermektedir(Olivia.,2006). Protaminlerdeki çapraz bağların sağlam bir yapı olarak kromatinin dirençli (kuvvetli) ve stabilizasyonunu sağlamaya yardımcı olurlar(Avcı.,2006).

İrez ve arkadaşları sperm protamin kusurlarının intrauterin inseminasyon ve ICSI olgularında IUI ve IVF sonuçlarını belirleyebileceğini gösterdiler (İrez ve ark.2015,2018). Bu çalışmada Varikozel olgularında artan oksidatif stres ürünlerinin DNA bütünlüğü ile birlikte nükleus protein organizasyonunu da etkileyebileceği düşünülmüştür (Kai ve ark., 2014). Bu nedenle bu çalışmada varikozel olgularında sperm DNA fragmantasyonu ve sperm maturasyonunu farklı iki teknik ile araştırmayı amaçladık.

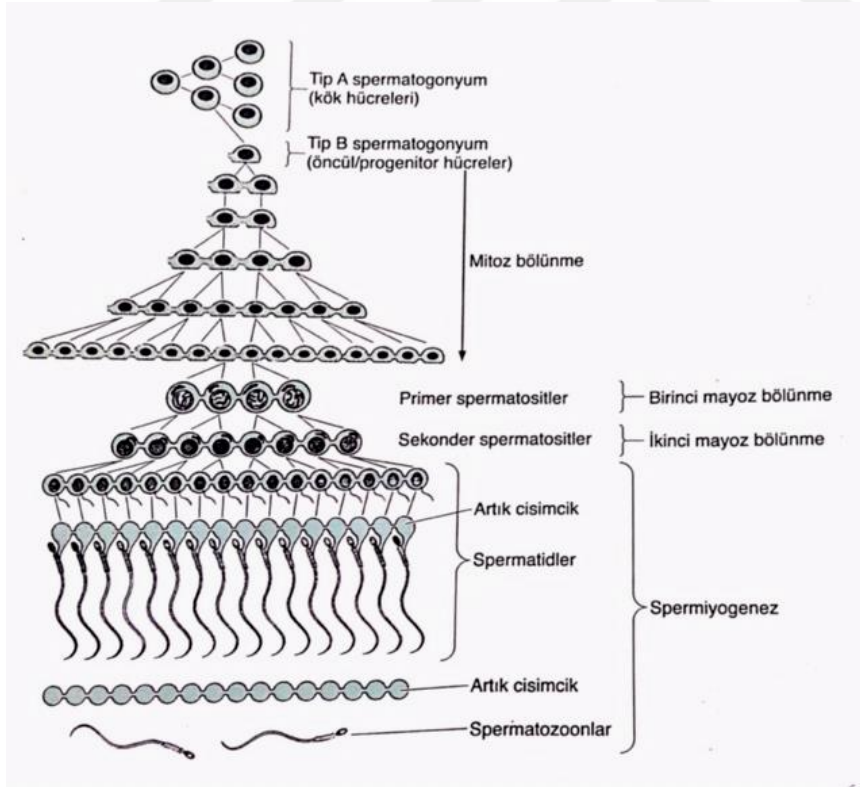
4.GENEL BİLGİLER:

4.1 Spermatogenez

Spermatogenez puberte sonrası, hipofiz ön lobu gonadotropik hormonlarının uyarısı sonucunda testislerdeki seminifer tubüllerinde gerçekleşen olgun sperm oluşması işlemine spermatogenez denir. Spermatogenez adölesan dönem ile başlamakta olup, (13–16 yaş) yaşlanmanın etkisi ile hızı yavaşlar ancak yaşlılığın son dönemlerine kadar sürer. Matür spermier spermatogonium germ hücrelerinden oluşmaktadır. Bu süreç spermatogoniumların mitoz ile çoğalma aşaması olan spermatositogenez, oluşan spermatogoniumun mayoz bölünme geçirerek DNA yapısının yarıya düştüğü aşama ve spermin olgun hale ulaştığı spermiyogenez aşamalarını içermektedir. (Şekil 1). (Doğantekin ve ark. ,2016). Mitozla bölünen bu hücreler A tipi hücreler (kök Hücreler) olarak adlandırılır. A tipi hücrelerineşeyssel olgunlukta farklılaşma geçirerek, B tipi hücreler'i meydana getirirler. Bu hücreler primer spermatositler'e farklılaşan hücreler olmaktadır. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) içerir. Primer spermatositler oluştuktan sonra akabinde birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Bu safha 22 gün sürdüğü için çoğunlukla primer spermatositler görülmektedir. Bu hücreler bölünmeler dizisindeki (I. ve II.Mayoz) hücrelerin en büyüğüdür.(Eşrefoğlu.,2016). Testisin esas salgısı iç salgı bezi olan endokrin salgısı testosteron hormonudur. Testosteron interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) tarafından sentez edilmektedir. Testosteronun, spermatogenez üzerine etkilerine ilave olarak sekonder seks karakterlerinin oluşumu, cinsel olgunlaşma, genital kanallar ve yardımcı bezlerinin fonksiyonlarının devamlılığında da rolü vardır.Spermatogeneziste testis hormonu olan testesteron ve hipofiz hormonları olan FSH, LH ve androjen taşıyıcı proteinlerin rolü bulunmakta olup, ergenliğe erişildiği zamanda hipofizin ön lobundan salgılanan LH hormonunun testisin interstisyel dokusunda bulunan Leydig hücrelerini etkilemesiyle Testesteron hormonunun salgılanmasına neden olmaktadır.FSH spermatogenezisin başlatılmasını sağlarken, LH ve Testesteron hormonu ise sürekliliği için gerekli olmaktadır.(Doğantekin ve ark. ,2006)



Şekil 4.1. Spermatogenez aşamaları



Şekil 4.2. Erkek germ hücrelerinin oluşumu

Kaynak:(Junqueira L.C. et al., 1998)

4.2Olgunlaşan Spermilerin Salgılanması

Seminifer tüpçüklerinden epididimis'e ulaşır, vasdeferans (sperm kanalına) açılmaktadır. Vasdeferens'de üretra(idrar kanalı) birleşip dışarı açılır. Spermatogenez; testislerin seminifer tüpçüklerinde gerçekleşmektedir. Spermilerin üretradan atılması seminal sıvı ile sağlanır. Bu sırada idrar yolu kasılıp tıkanmış olur. Seminal sıvı prostat-cowper bezi ve seminal keseciklerin salgılarından oluşur.Hormon kontrolü hipofiz bezinden salgılanan FSH ve LH hormonlarında yapılmaktadır. FSH spermatogenez LH ise testislerden testosteron hormonu salgılanmasını kontrol eder. Testosteron hormonu ise sperm olgunlaşmasını, ses kalınlığını ve kıllanmayı sağlar (Eşrefoğlu.,2016).

Spermiyogenez: Sperm hücresi üretiminin son aşaması olan ve spermatitlerin, spermilere dönüştüğü durumlara spermiyogenez denir. Spermatidler, 7-8 µm çaptaki boyutları ve yoğunlaşmış kromatin materyaline sahip çekirdekleri ile tanınırlar.Spermiyogenez; akrozomun oluşmasını, nukleusun yoğunlaşmasını, uzamasını, flagellumun gelişmesini ve sitoplazmanın çoğunun kaybolmasını içeren olaylar zincirinden oluşmaktadır.(Eşrefoğlu.,2016)

Spermiyogenezin 4önemli faz'ı vardır:

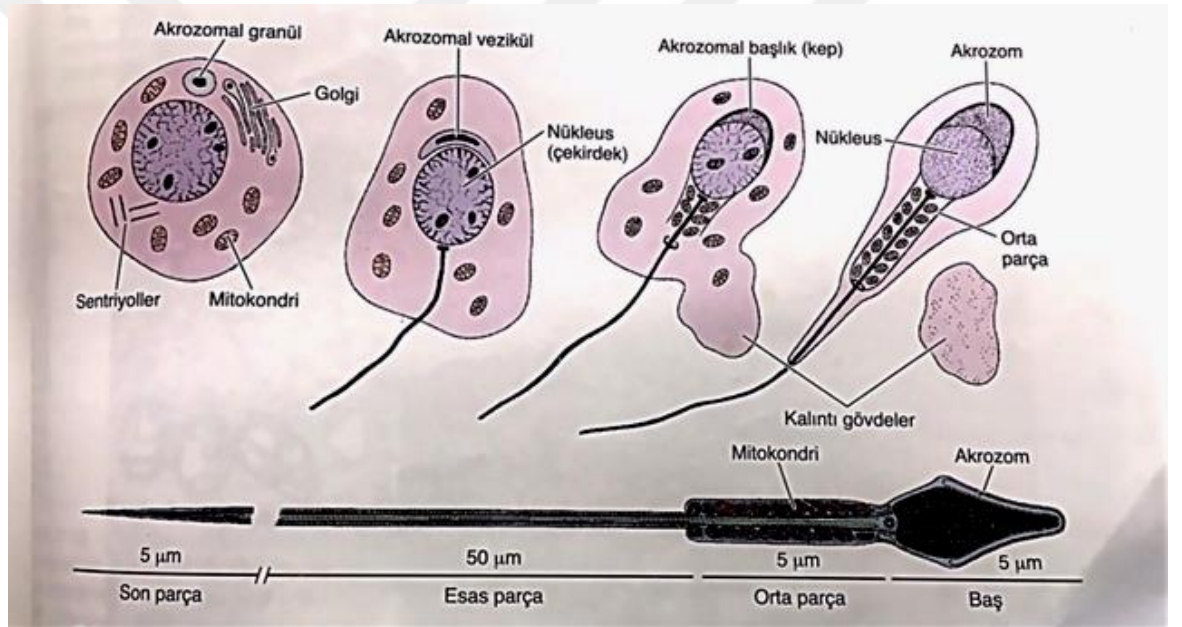
1.Golgi Fazı: Spermatidlerin sitoplazmasında yer alan Golgi kompleksinde proakrozomal granüller birikir ve bunlar birleşerek Golgi'den ayrılır. Ayrılan bu granüller Akrozomal vezikülün içinde akrozomal granülü oluştururlar. Bununla birlikte sentriyoller göç ederek oluşan akrozomun karşı tarafında hücrenin yüzeyine yakın bir konuma ulaşırlar ve çekirdeğin alt tarafında kamçı oluşur. Sentriyoller tekrar nukleusa göç ederken aksonemal bileşenleri etrafına sarar. (Eşrefoğlu.,2016)

2.Cep evresi: Akrozomal veziküller nuklear membranın yüzeyi üzerinde gelişmeye başlar ve nuklear yüzeyin yarısını örter hale gelir. Golgi apparatus bundan sonra yerini terk eder. Çekirdeğin diğer kutbuna doğru uzaklaşmaya başlar.(Kierszenbaum.,2006)

3. Akrozomal Faz: Akrozomal vezikül ve granül çekirdeğin üst kısmında yayılır ve akrozom adını alır. Akrozom içerisinde hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin etkisi gösteren proteaz enzimleri bulunur. Bu enzimler, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırır ve zona pellusidayı sindirir. Sperm

oositle karşılaştığı zaman, akrozomun zarı hücre zarıyla kaynaşır ve enzimler dışarı bırakılır. Buna akrozomal reaksiyon denir. Akrozomal fazda spermatid hücresi bir hareketle ters döner ve alt kısmındaki aksonem tübülün lümenine doğru uzanır ve sentriyollerden biri uzayıp kamçı'yı oluşturur. Mitokondriler kamçının proksimal ucunda birikerek, spermin kamçıdan kalın bir yer tutan boyun kısmını meydana getirirler. Bu bölge spermin hareketi sırasında enerji sağlar. (Eşrefoğlu.,2016)

4. Maturasyon (olgunlaşma) Fazı: Spermin fazla kalan sitoplazma kısmı sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir ve spermier seminifer tübülün lümenine bırakılır.(Eşrefoğlu.,2016)



Şekil 4.3. Spermiyogenez'in fazları

Kaynak:(Junqueira L.C. et al., 1998)

Spermiyogenez sonunda oluşan olgun sperm hücresi üç bölgeden oluşur:

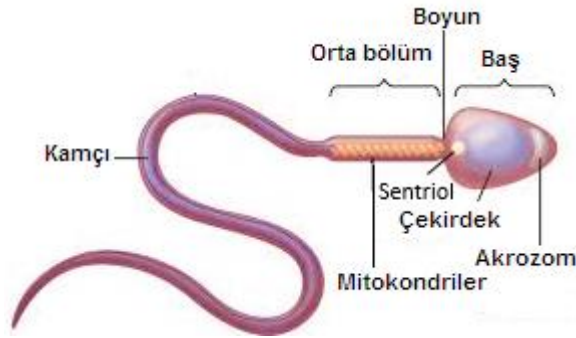
1:Baş Bölgesi:Sperm başında az miktarda sitoplazma, çekirdek ve akrozom bulunur. Bu bölgenin şekli canlı türlerine göre farklılık gösterir.İnsanda ve sığırlarda oval, kuşlarda burgulu, kemirgenlerde ise balta şeklindedir. (Eşrefoğlu.,2016)

2:Boyun Bölgesi: Baş bölgesiyle kamçı arasında kalan kısımdır. Burada sentriyol bulunur. Sentriyolun distal ucu sperm kamçısının aksiyal filamentlerini yapar. Bu

filamentlerin etrafını spermin hareketinde enerji sağlayan çok sayıda mitokondri sarmıştır. (Eşrefoğlu.,2016, İrez T.2007)

3: Kamçı (Kuyruk) Bölgesi: Yapısal olarak sil ve kamçıya benzer. Bu kısımda daha az miktarda sitoplazma ve plazma zarı bulunur.(Eşrefoğlu.,2016)

Olgun Sperm hücresi 60 µm uzunluğunda kuyruk, baş kısmı 4.5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde, 1 µm kalınlığında baş, orta parça ve kuyruktan oluşmaktadır. Baş kısmı yoğunlaşmış bir çekirdek ve anterior kısmında yoğun akrozom içeren baş şapkasından meydana gelmiştir. Spermin başı içerisinde DNA ve kromatin materyali bulunmaktadır. Akrozom; hyaluronidaz, akrozin enzimi gibi pek çok proteolitik enzime sahiptir. Spermin oosit ile teması sonucu akrozom reaksiyonuyla akrozom enzimleri salınmakta olup, hyaluronidaz enzimi ile birlikte fertilizasyona yardımcı olurlar. Orta kısımda bulunan mitokondriler spermin kuyruk hareketinin kontrolünden ATP üretiminden sorumludur.(Kierszenbaum.,2006)



Şekil 4.4. Olgun sperm hücresinin görüntüsü

4.3. Spermatogenezi Etkileyen Durumlar

Spermatogenez için, 35 C sıcaklık çok önemli olmakla birlikte bu sıcaklık, spermatik arteri saran venlerin oluşturduğu pampiniform pleksus tarafından skrotumda sağlanır. Sıcaklığı dağıtması için, ters yönlü akımla ısı değişimi görevi görür. Sıcaklık 35 C'nin altına düşünce, spermatik kordondaki kremaster kasının ve skrotum kesesinin dartos kasının kasılması, sıcaklığı artırmak için testisleri karın boşluğuna yaklaştırır.

Ters Akım Isı Değişim Sistemi (CHES) :

Testisin arter ve venlerinin bu şekilde bir arada ilerlemesi Ters Akım Isı Değişim Sistemi (CHES) olarak adlandırılır. Bu sistem ile testislere giren kan testisten dönen daha soğuk kan ile soğutulmuş ve testisin sıcaklığının düşük tutulmasına yardımcı olmaktadır.

Kriptorşidizm(İnmemiş testis)

Gelişimi esnasında, testis skrotuma ulaşamaz olup karın boşluğunda kalması durumudur. Bu durumda, normal vücut sıcaklığı 37 – 38 C olduğu için spermatogenez önlenir. Eğer durum çift taraflı ise, kısırlık oluşur. (Kierszenbaum., 2006)

4.4. Sperm kromatin yapısı:

Sperm hücresinin döllenmeyi gerçekleştirebilmesi için dişi üreme sistemi boyunca hareket etmesi, zona pellusidaya bağlanması ve yumurta içerisine penetrasyon gibi birçok işlemi başarması gerekmektedir. Bu işlemlerin gerçekleştirilebilmesi sperm DNA'sı nukleus içerisinde sıkı ve yoğun bir şekilde paketlenmiştir. Mitotik kromozomlarla karşılaştırıldığında sperm kromozomları altı kat daha sıkı paketlenmiştir. Ayrıca, somatik hücrelerin DNA'sı yalnızca nukleusun bir bölümünü doldururken, sperm DNA'sı nukleusun neredeyse tamamını kaplar. Sperm DNA'sının bu şekilde düzenlenmesi, yumurtaya aktarılabilecek olan genetik bilginin sıkıca paketlenmesine ve embriyonun gelişmesine olanak sağlar. Sperm kromatininin spermatozoa içerisinde paketlenmesi dört aşamada gerçekleşir. Bu aşamalar, DNA'nın çekirdek zarına bağlanması, DNA'nın çekirdeğe bağlandıktan sonra DNA halkalarının oluşumu, histonların protaminlerle yer değiştirmesi ve kromozomal pozisyonudur. Sperm hücresinde somatik hücrelerde bulunan ve DNA'nın paketlenmesinde görev yapan histon proteinlerin %90-95'i protamin adı verilen ve sperm hücresine özgü olan proteinlerle yer değiştirmektedir. Protaminlerin arjininden zengince ve spermin nukleusları içerisinde yer alan, histonların yarısı büyüklüğünde ve spermatogenezin ileri gelen evrelerinde sentezlenen küçük proteinlerdir. Sperm kromatininin protaminasyonu, sperm motilitesi için gereken nukleusun sıkıştırılmasını kolaylaştırırken, sperm genomunu oksitlenmekten, sıcaklık yükselmeleri gibi çevresel stresten, dişi üreme sistemi içerisinde bulunan zararlı

moleküllerden de korur. Arjininden zengin olan protaminler arasındaki intermoleküler ve intramoleküler çapraz bağlantıların sperm nükleusunun yoğunlaşmasında önemli yer tutmaktadır. Histon proteinlerinin artışı sperm kromatininin sıkı paketlenmesini engelleyerek DNA hasarına yatkınlığı artırabilir. (Güneş ve ark. ,2013)

Sperm DNA Hasarı:

İnsanlarda sperm DNA'sının büyük bir bölümü protaminlerle sıkı paketlenmiş haldedir. Bu yapı içerisindeki DNA spermin testis dokusunun taşınması sırasında potansiyel zararlı etkenlerden korunmaktadır. Spermin DNA hasarını daha fazla aktif hale getiren mekanizmalar arasında protaminin eksikliği, oksidatif stres ve DNA tamir mekanizmasındaki yetersizlikler yer almakta olup, yapılan çalışmalarda ise insan spermatozoasındaki DNA hasarını açıklamak için 3 teori ortaya atılmaktadır.

1. Anormal ya da düzensiz kromatin paketlenmesi

Sperm kromatin yapısı DNA ve sperm nükleer proteinleri arasındaki eşsiz ilişkiyi sağlamak için sıkı bir şekilde paketlenmiştir. Bu nükleer proteinler ağırlıklı olarak yüksek bazik özellik gösteren protaminlerden oluşmaktadır. Sperm DNA iplikleri sıkı ve düzenli ilmekleri oluşturmak üzere protaminler etrafında sıkıca sarmalanmıştır. Sıkıştırma ve stabilizasyon işlemleri sisteinden zengin inter ve intramoleküler disülfid çapraz bağları ile sağlanmaktadır. Spermatozoa kromatin yapısının büyük kısmı protaminlerle sıkıca paketlenmişken, yalnızca %15' lik bir kısmı histonlarla daha gevşek olarak paketlenmiştir. İnfertil erkeklerin fertil erkeklere oranla artmış histon/protamin oranına sahip oldukları gösterilmiştir. Bu durum anormal kromatin paketlenmesi olarak adlandırılır ve spermin dış strese karşı duyarlılığının artmasına neden olduğu düşünülmektedir. İnfertil erkeklerin %5-15'inde protamin eksikliği olduğu gösterilmiştir. Yeni çalışmalarda da protamin eksikliğine bağlı sperm DNA hasarı ve düşük fertilizasyon kapasitesi arasındaki ilişki gösterilmiştir. (Erdem. ,2013)

2.Oksidatif stres

Sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonunu aktif olarak uyarabilen temel mekanizmalardan birisidir. Somatik hücreler ile karşılaştırıldığında sperm hücresinin membranının özelliğinden dolayı oksidatif stres hasarına karşı açık olduğu belirtilmektedir . (Özsait.,2013)

3.Apoptozis

Spermatogenez sürecinde germ hücre popülasyonunu sertoli hücreleri tarafından destekleyebilecek sayıya indirmek ve anormal spermatozoaları seçerek yok etmekle görevlidir. (Dunkel et all. ,1997)

Yaşam boyunca hasarlı ya da mutasyona uğramış hücreler apoptozisle seçilerek yok edilirler. Apoptoziste hücre boyutları küçülür, hücre zarı parçalanır, hücre iskeleti yeniden düzenlenir, nükleer yoğunlaşma ve intranukleosomal DNA fragmentasyonu oluşur (Nagata. ,2000).Apoptozis normal kabul edilen fizyolojik bir süreç olup aşırıya kaçması sperm sayısında azalma ve dolayısıyla infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir. Caspas (cysteinyl aspartate-specific proteinases) olarak bilinen spesifik proteinazlar apoptozis regülasyonunda önemlidir. İnsan seminifer tübül epitelinde inaktif proenzimler olarak eksprese edilen proapoptotik sinyallerle aktive olan birçok proteinazın varlığın bilinmekle beraber en önemlisi caspas-3'tür (Peasch et all. ,2004).Caspas'lar tarafından aktive edilen DNaz'lar DNA fragmentasyonundan sorumludur.

4.5. Sperm DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri

Tablo 4.1. Sperm Kromatin Hasarını Belirleme Yöntemleri

YÖNTEM	ANALİZ METODU	PARAMETRE
Sperm kromatin yapı analizi (SCSA)	Akış sitometrisi	DNA sarmalının ayrılması(asit/ısı)
Comet analizi	Floresan mikroskobu	DNA parçalanması(dsDNA)
Terminal transferaz analizi(TUNEL)	Işık mikroskobu, Floresan mikroskobu, Akış sitometrisi	DNA parçalanması
Sperm kromatin dağılımı analizi(SCD)	Floresan mikroskobu	DNA parçalanması(tek sarmal)
Asidik anilin mavisi boyama	Işık mikroskobu	DNA yapısı/Nükleer maturasyon
Akridin oranj boyama	Floresan mikroskobu, Akış sitometrisi	DNA çift iplik sarmalının birbirinden ayrılması
Kromomisin A3 boyama	Floresan mikroskobu	DNA yapısı/Nükleer maturasyon
Toluidin mavisi boyama	Işık mikroskobu	DNA yapısı/Nükleer maturasyon

Asidik Anilin Mavisi Boyama

Anilin mavisi, asidik bir boyadır. Hasarlı DNA'ya sahip spermdeki rezidüel histonların açığa çıkması sonucu nükleoproteinlere daha kolay ulaşılır ve bu durum asidik anilin mavisinin DNA'yı boyanmasını sağlamaktadır. (Ovari ve ark 2009) İmmatur DNA'ya sahip spermlerde zayıf kromatin paketlenmesinden dolayı koyu mavi renkte boyanma gözlenir. Asidik anilin mavisi boyama tekniği, ejakülattaki spermatozoaların nükleer protein bileşiminin farklılıklarını belirleyerek lizinden zengin histonlara bağlanarak histon fazlalığını gösterme prensibine dayanmaktadır. Anilin boyama ile kondensasyon anomalisinin yanı sıra morfolojisini de değerlendirmek mümkündür(Avcı B.,2006).

Akridin Oranj Boyama

Akridin oranj , nükleik asite spesifik, katyonik floresan boyadır. Çift sarmal yada tek sarmal DNA'ya bağlandığında eksitasyon ve emisyonu farklıdır. (Evenson et all. 1999)

Denature olmayan sperm yeşil renkte, denarute DNA'ya sahip olan sperm turuncu renkte gözlenir. Bu yöntem floresan ışık ya da flow sitometre için kullanılabilir.

Kromomisin A3 Boyama

CMA₃ gevşek bağlı paketlenmiş kromatinde protamin eksikliğini gösteren bir florokromdur. Parlak sarı fluoresan veren spermiler negatif, soluk-mat sarı boyananlar pozitif sperm hücreleri olarak görülür. (Avcı B.,2006). Kromomisin A3 yöntemi, protaminlerden az olan DNA' nın dolaylı olarak gözlenilmesi yoluyla zayıf paketlenmiş kromatin yapısını ortaya çıkarmaktadır. Yüksek kromomisin A3 floresansı gösteren bölgelerin düşük protaminasyona sahip olduğu kabul edilmekte olup, ICSI olgularında, kromomisin A3 pozitifliğinin tümüyle fertilizasyon başarısızlığını göstermediğini, zayıf kromatin paketlenmesine işaret ederek decondansasyonu ve olası düşük fertilizasyon kapasitesini gösterdiğini bildirmişlerdir. Erkek infertilitesinde kromomisin A3 pozitifliği sperm konsantrasyonu, motilitesi ve özellikle normal morfoloji ile negatif korelasyon göstermektedir .(Erdem ,2013)

Spermiogram

Sperm kalite testi, sperm konsantrasyonu, sperm hareketliliği ve sperm morfolojisinin (normal şekilli spermilerin % cinsinden tespiti) belirlenmesini kapsamaktadır.

Tablo4.2. Semen Analizi Normal Referans Değerleri

Kaynak: (WHO 5.Baskı,2010)

PARAMETRE	REFERANS DEĞER
VOLÜM	>1,5 ml
PH	7.2-8.0
VİSKOZİTE	<3
KONSANTRASYON	>15x10 ⁶ /ml
TOTAL KONSANTRASYON	>39x10 ⁶ /ml
TOTAL MOTİLİTE (Progresif+Nonprogresif)	>%40
PROGRESİF HAREKETLİLİK	%32
MORFOLOJİ	%4 Normal
VİTALİTE	%58
LÖKOSİT	<1

WHO parametrelerine göre sperm analizi terminolojilerinin tanımları ve nedenleri :

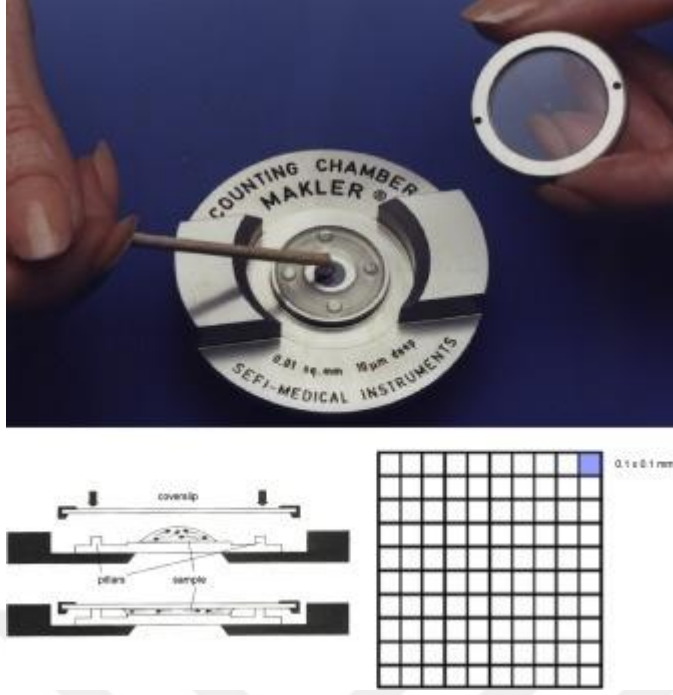
1. **Aspermi:** Hiç ejakülat olmaması durumudur. Aspermi nedenleri arasında retrograd ejakülasyon, vasküler nedenler, hormonal nedenler bulunmaktadır.
2. **Azospermi:** Ejakulatta sperm yokluğu anlamına gelmektedir. Azospermi yapan nedenler arasında genetik bozukluklar, hormonal değişiklikler, germinal aplazi, bilateral vas deferens yokluğu ve ejakülatör kanallarda tıkanıklıklar sayılabilir.
3. **Hipospermi:** Ejakulatın hacminin 1,5 ml'den az olması durumudur. Hipospermi nedenleri arasında prostat, seminal vezikül ve vas deferensin

enfeksiyonu, travma ve tümörlerinin yanı sıra; androjen eksikliği, ejakülatör kanalların tıkanıklıkları ve retrograd ejakülasyon da bulunmaktadır.

4. **Oligozoospermi:** Sperm sayısının 15 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.
 - a. Hafif Oligozoospermi: Sperm sayısının 5- 15 milyon/ ml' nin arasında olması durumudur.
 - b. Şiddetli Oligozoospermi: Sperm sayısının 5 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

Oligozoospermi idiyopatik olabildiği gibi; sistemik enfeksiyonlar, kromozomal bozukluklar, inmemiş testis, ilaçlar, kronik sistemik hastalıklara bağlı olarak da gelişebilmektedir.

5. **Astenozoospermi:** İleri hareketli spermatozoa' nın < % 40 olması ya da ileri hızlı hareketli olanların < % 32 olması anlamına gelir. Pek çok konjenital nedenle veya enfeksiyon, ilaç, ısı sebebiyle oluşabilir.
6. **Teratozoospermi:** Normal spermatozoa morfolojisinin < %4 olması durumudur. Teratozoospermi yapan nedenler arasında kromozomal bozukluklar, toksik maddeler, seminal kanallarda deformasyon ve epididim enfeksiyonu bulunmaktadır.
7. **Astenoteratozoospermi:** Spermilerin motilite ve morfolojik incelemesiyle her ikisinde normal sınırların altında olması durumuna denir.
8. **Oligoastenoteratozoospermi:** Spermilerin sayı, motilite ve morfolojik incelemesinde üçünün birden normal sınırların altında olmasıdır.
9. **Nekrozoospermi:** Ejekulatta % 25' ten fazla ölü sperm hücresi bulunması anlamına gelir. İdiyopatik olabildiği gibi; toksik maddelerle temas, Kartagener Sendromu ve cinsel ilişki sıklığında azalma nedeniyle de oluşabilir.

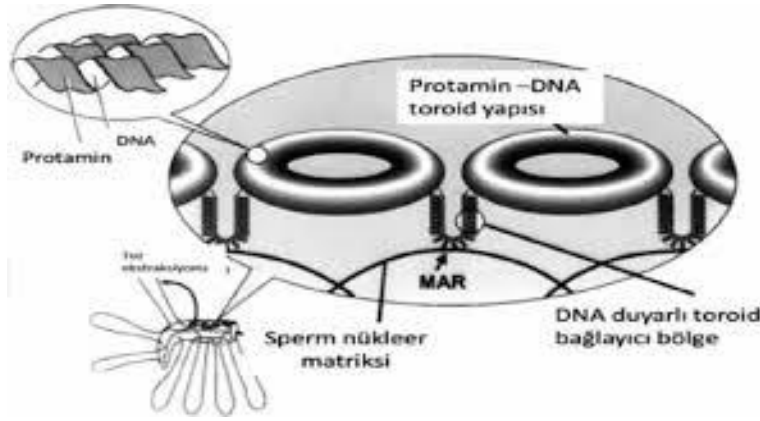


Şekil 4.5. Makler sayım kamerası

Kaynak:(Brito et al.,2016).

4.5.Sperm Kromatini Protamin

Protaminler, spermatogenezin geç haploid fazında DNA'yı paketleyen histonlar ile yer değiştirerekarjının amino asidi bakımından zengin nuklear proteinlerdir. Protamin/histon oranının sperm kromatinin kondenzasyonu ve DNA stabilizasyonu için oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. DNA'ya bağlanırlar ve spermatid genomunu inaktif hale getirip yoğunlaştırırlar. İnsanlarda ve bazı primatlarda, sperm genomunun %10-15'i histonlar tarafından paketli olarak kalır, bu durum embriyonun erken gelişimi açısından önem teşkil etmektedir. (Oliva ,2006)



Şekil 4.6. Sperm kromatin yapısı için halka-ilmek modeli.

Kaynak: (Oliva,2006)

4.6.Spermatogenezde Histon ve Protamin Değişimleri

Spermiyogenez, histon proteinlerinin büyük bölümünü düzenli bir şekilde protamin proteinleri ile yer değiştirmesiyle gösterilmektedir. Spermatogonyumların farklılaşması ile birlikte, testis özellikli histon çeşitlerini kromatinlerine dahil etmeye başlarlar. Spermin gelişmesi esnasında , epididimiste protaminlerdeki disülfid(çapraz) bağların düzenlenmesiyle nükleoprotamin kompleksini daha da sağlamlaştırmış olup, protein sentezi, depolanması mayoz bölünme esnasında giderek artış göstermiştir.

Spermiyogenez sürecindeki spermin 3 fonksiyonu için önemli olduğu bilinmektedir :

1. Spermin nükleusunun ve küçülen şeklinin fertilite için hidrodinamik bir yapı oluşturmasını sağlar .
2. Protaminasyon, sperm genomunu olası nükleaz enzimlerinin saldırısına karşı korur, radyasyona karşı dayanıklı hale getirmektedir.
3. Histonlarla paketlenmişDNA 'nın seçilmiş lokasyonları zigotun erken gelişimde kullanılmak üzere tercih edilen gen bölgelerini sunan kromatin paketini oluşturmaktadır. (Oliva ,2006)

4.7. Varikosel

Varikosel, erişkin erkeklerin %15-25'sinde görülmesinin yanısıra, varikosele bağlı infertilite nedeniyle başvuranların hastaların ortalama %30-40'-ında en sık rastlanan hastalıktır. (Witt&Lipshultz,1993).

Testiküler venöz drenajını sağlayan fleksus pampiniformisin dilatasyonu olan Varikosel yaşla birlikte ilerleyici testis hasarı ile devam eden ve cerrahi olarak düzeltilebilen bir hastalık olmaktadır. Varikosel, testis gelişiminde gerilemeye, testis atrofisine, testis ağrısına ve sperm parametrelerinde bozukluklara neden olarak infertiliteye yol açmaktadır. Dolayısıyla varikoselin fertilité üzerine etkileri sperm anomalileri, testis hacminde azalmaya ve Leydig hücre dış fonksiyonu ile ilişkili olmaktadır. (Çayan. ,2017). Varikosel olgularında anormal spermatogenez, testiste hormonal fonksiyon bozuklukları göstermektedir. (Naughton ve ar. 2001, Bacetti ve ark 2006)

4.8 Etiyolojisi ve Fizyopatolojisi

Varikosel günümüzde en yaygın karşılaşılan anatomik faktörlerin yol açtığı hastalıklardan biri olup, anatomik olarak sol spermatic venin sağa göre yaklaşık 8-10 cm daha uzun olması ve daha dik açıyla açılması yada sol spermatic vendeki valvlerin disfonksiyonu ve "nutcracker"(fındıkkıran) fenomeni yapıları şeklinde görülür. (Güzel ve ark. ,2017) Testiküler ısı artışı, venöz basınç artışı, hormonal işlev bozukluğu, epididimal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyon bozuklukları, DNA hasarı ve oksidatif stres gibi mekanizmalar varikoselin semen parametreleri ve dolayısıyla fertilitéyi olumsuz yönde etkilemektedir. Testiküler ısı artmasının tek taraflı olmadığı her iki skrotumda görülmesi nedeniyle en çok üzerinde durulan mekanizma ısı artışıdır. Varikoselli veya infertil hastaların tamamında testiküler ısının yüksek olduğu görülmüştür. Varikoselinden kaynaklı testiküler ısı artışı ile DNA polimeraz aktivitesinde azalma meydana gelerek spermatogenezin etkilendiği gösterilmiştir. (Güzel ve ark. ,2017). Varikosel, sperm ve oositin zona pellucida'sı arasında gelişen akrozom reaksiyonunda da bozulmalara neden olmaktadır. Son yıllarda spermatogenez ile varikosel ilişkisi ile ilgili araştırmaların yoğunlaştığı diğer bir mekanizma sperm DNA hasarıdır. Varikosel, mitokondriyal inaktivasyona sebep olarak sperm DNA fragmentasyonunda artışa neden olmakta ve apoptozisi

düzenleyen soluble Fas gen düzeyinde azalma meydana gelmesi nedeniyle sperm hücresinin apoptozisinde artış görülmektedir. Üzerinde en çok araştırmalar yapılan bir diğer mekanizma oksidatif strestir. Sigara,alkol, varikosel, ilaç kullanımı, çevre kirliliği vb. oksidatif stres yaratan etkenler nedeni ile protein hasarı, lipidperoksidasyonu, biyomembran hasarı ve DNA hasarı gelişmesi, sonuçta sperm DNA hasarı ve infertiliteye yol açtığı görülmüştür.Sperm DNA hasarlarının onarılmasında görev yapan DNA polimeraz enzim aktivitesinde azalma görülmüştür.Serbest oksijen radikallerinin yüksek olması kromozom kırıklarınınartışına ve DNA fragmantasyonunda artışa ve bununla birlikte akrozomun bütünlüğünde bozulmalara neden olmakla birlikte infertiliteye yolaçtığı görülmüştür.(Güzel ve ark. ,2017)



5. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın Tasarımı:

Bu çalışmada sperm protaminasyonu (kromatin kondansasyonu) ve DNA hasarı (fragmentasyon)analizi için normospermik hasta grubu ve klinik varikosel hasta grubuna ait bireylerin sperm örnekleri alınarak,temel semen analizi ,spermiyogram, ve özel histolojik boyama teknikleri kullanılarak karşılaştırma yapıldı.

Çalışma girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulu tarafından karar no:2019/25-18 numarası ile Biruni Üniversite Hastanesi'ne spermiyogram analizi için başvuran hastalarda uygulanmıştır.

Hasta seçimi:

Çalışmaya dahil olma kriterleri:

Normal Grup için;

Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml 'den fazla olması, normal morfoloji oranının % 4 ve üzerinde bulunması,motilitenin %40 üzerinde bulunması,ileri hareketli sperm oranının %32 üzerinde bulunması kriterleri gözönüne alındı.

Varikosel hasta Grubu için;

Doktor muayenesi ile birlikte klinikvarikosel tanısı bulunması.

Her iki grup için yaş aralığı ve abstinens;

Erkeğin yaşının en az 18 en fazla 45 olması

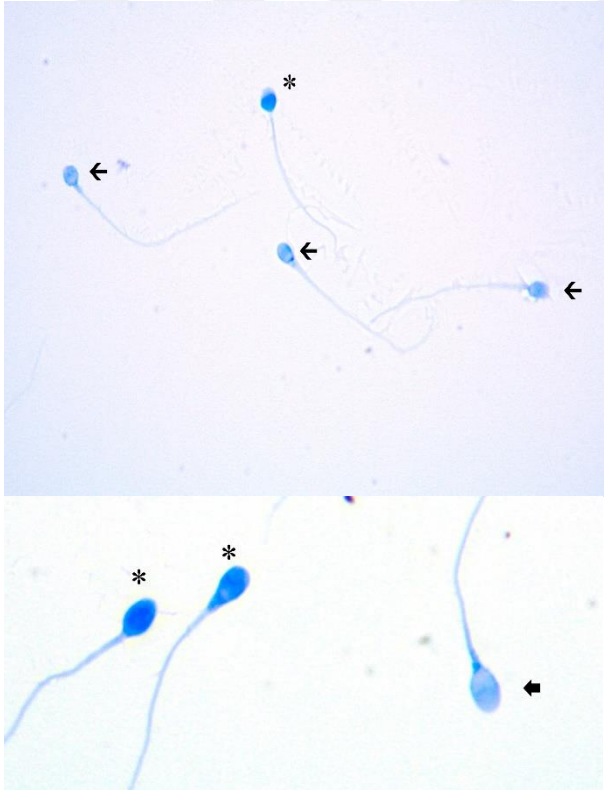
En az 3 en fazla 7 gün cinsel perhiz süresi uygulanması

Sperm maturasyonunun anilin mavisi boyası ile gösterilmesi:

Semen örneklerine hiçbir işlem uygulanmadan öncesinde yayma preparatı yapılarak sperm kromatin kondensasyonunu değerlendirmek amacıyla anilin mavisi boyaması yapılarak değerlendirilmeye alınmıştır.

Asidik Anilin mavisi boyama:

Yirmi mikrolitrelik semen örneği temizlenmiş lam üzerine yayılıp kurutulur. Oda sıcaklığında %2 glutaraldehitte 30 dk fikse edilip fiksasyon sonrası %5 anilin mavisi ve %2 asetik asit içeren boya solüsyonunda 5 dk boyanır ve distile su ile yıkama işlemi yapılır. (Henkel R. ve ark.,2001). Kurutma işlemi yapıldıktan sonra ışık mikroskobu ile nükleusları boyanmış hücreler pozitif ve boyanmamış spermiler negatif yani matür olarak değerlendirilmiş olup işleme alınmıştır. 200 sperm sayılarak boyanmamış sperm oranı kromatin kondansasyonu değerleri olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.1. Anilin mavisi boyaması ile görülen sperm hücreleri **ok**; negatif, **yıldız**; pozitif boyama gösteren spermiler.

Akridin oranj boyaması:

Semen örnekleri hiçbir işlem yapmadan önce DNA fragmentasyonu değerlendirilmesi için carnoy fiksatif ile fiske edildi. Daha sonrasında akridin oranj boyaması yapıldı.

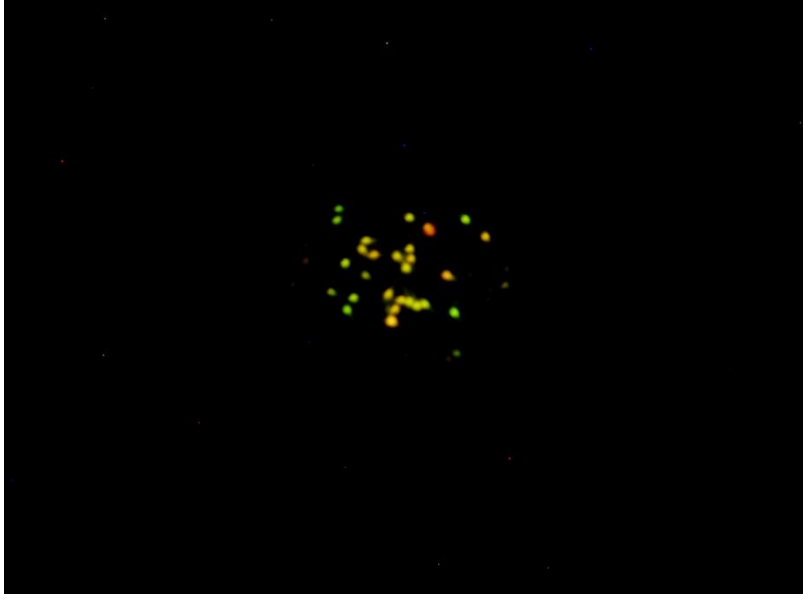
Boyama işlemi:

Gerekli malzemeler: Akridin oranj, Glasial Asetik asit, Distile su

Boyanın hazırlanması: 50 mg akridin oranj 10 ml distile suda çözülür, bu solüsyon stok olarak kullanılır, buzdolabında(+4) saklanır. Çalışma solüsyonu için 1 ml Akridin Oranj boyası stok solüsyonu ,0,5 ml glasial asetik asit solüsyonu distile su ile 50 ml ye tamamlanır, PH 2,5 e ayarlanır (Royare D. ve ark., 1988).

Boyanın uygulanması:

20 µl sperm süspansiyonu önceden temizlenmiş lam üzerine yayılır, kurutulur. Kurumuş örnek Carnoy fiksatif ile 2 saat fikse edilir (1 kısım asetik asit 3 kısım metanol). Fiksasyon sonrası akridin oranj boyası ile 5 dakika karanlıkta boyanır ,distile su ile yıkanır, kurutulur ve floresan mikroskobunda incelenir. Yeşil boyalı hücreler normal DNA , sarı-kavuniçi boyalı hücreler fragmente DNA taşımaktadır. Ortalama 200 hücre sayılarak yüzde fragmentasyon değeri bulunur.



Şekil 5.2. Akridin oranj boyaması ile görülen sağlıklı (yeşil) ve fragmente (kırmızı-sarı) sperm hücreleri ,floresan mikroskobu X40

Sperm protaminasyonunun CMA₃ boyası ile floresan mikroskobunda değerlendirilmesi:

Semen örnekleri hiçbir işlem yapılmadan önce sperm protaminasyonunun değerlendirilmesi için Methanol/Acetic acid (3/1) 4 C’de 5 dk fiksasyon işlemi uygulanır.

CMA3 solüsyonunun hazırlanışı:

CMA3 0.25 mg/ml Mcillvane Buffer içinde hazırlanır. Ph 7.0 gelicek şekilde hazırlanır.

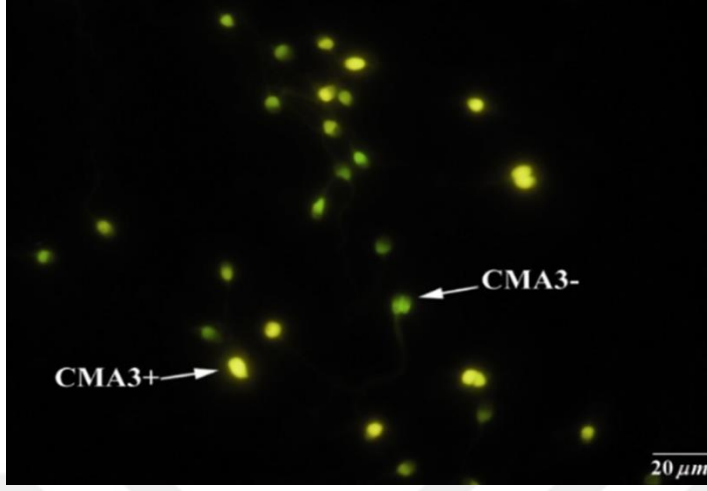
Mcillvane Buffer:

200 mM Disodium Hydrogen phosphate ve 100 N sitrik asit içerir.

Boyanın yapılışı:

Fiksasyon sonrası preparatlar Mcillvane Buffer ile çalkalandıktan sonra üzerine 100 mikrolitre CMA3 boyası konur ve kapalı bir ortamda 20 dk tutulur. Süre sonunda Mcillvane Buffer ile çalkalanır ve üzerine gliserol damlatılarak floresan mikroskobunda 100 sperm hücresi sayılarak 2 farklı renk elde etmiş oluruz. Parlak

sarı boyananlar anormal kromatin paketlenmesini gösterir. Mat sarı veya yeşil renk boyananlar ise normal paketlenmeyi göstermektedir.



Şekil 5.3. CMA3 boyaması ile görülen sağlıklı (yeşil/CMA3-) ve fragmente (sarı/cma3+) sperm hücreleri ,floresan mikroskobu

6. BULGULAR

Çalışma Ocak – Haziran 2019 tarihleri arasında %50 ‘si (n=22) normospermik bireyler ,%50’si (n=22) Varikozel olan toplam 44 olguyla yapılmıştır. Çalışmaya katılan bireylerin yaşları 18 ile 40 arasında değişmektedir.

Varikozel ve kontrol grup kıyaslandığında sperm konsantrasyonu, hasta yaşı, total sperm sayısı bakımından gruplar arasında bir fark görülmedi. Sperm motilitesi Varikozel olgularında anlamlı olarak düşük bulundu. (p=0,004). Sperm normal morfoloji oranı kontrole kıyasla Varikozel olgularında daha düşük bulundu. (p=0,000). Sperm orta kısım anomalilerinin Varikozel olgularında daha yüksek olduğu görüldü. (p=0,022). Histon pozitif sperm oranının Varikozel olgularında daha yüksek olduğu iki ayrı test ile kanıtlandı (p=0,000). Sperm DNA fragmentasyonunun Varikozel olgularında daha yüksek olduğu görüldü (p=0,000).

Özetle: Varikozel olgularında sperm motilite,morfoloji bozuklukları, orta kısım anomalileri, DNA fragmentasyonları ve immatür sperm oranının yüksek olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 6.1. Hasta gruplarının konsantrasyonlarının hesaplanması

Değişken	NORMOSPERMİ ($\bar{x} \pm SD$)	VARİKOSEL ($\bar{x} \pm SD$)	p
Konsantrasyon (1 cc/mil)	104,04 $\pm$ 74,30	66,21 $\pm$ 58,56	0,066
Konsantrasyon (total/milyon)	320,80 $\pm$ 395,85	277,94 $\pm$ 167,31	0,648

Tablo 6.2. Hasta gruplarının motilitesinin hesaplanması

Değişken	NORMOSPERMİ ($\bar{x} \pm SD$)	VARİKOSEL ($\bar{x} \pm SD$)	p
Motilite % (ileri hareketli)	44,85 $\pm$ 9,97	35,47 $\pm$ 10,29	0,004
Motilite% (yerde hareketli)	24,85 $\pm$ 9,53	20,08 $\pm$ 7,52	0,071
Motilite % (hareketsiz)	30,28 $\pm$ 10,32	44,43 $\pm$ 12,94	0,000

Tablo 6.3. Hasta gruplarının Sperm DNA Fragmentasyon indeksi

Değişken	NORMOSPERMİ ($\bar{x} \pm SD$)	VARİKOSEL ($\bar{x} \pm SD$)	p
Sperm DNA fragmentasyon indeksi oranı(DFI)% (akridin turuncusu)	26,57 $\pm$ 7,67	70,73 $\pm$ 10,94	0,000

Tablo 6.4. Hasta gruplarının sperm protaminasyon defektleri

Değişken	NORMOSPERMİ ($\bar{x} \pm SD$)	VARİKOSEL ($\bar{x} \pm SD$)	p
Sperm protaminasyon defekti oranı%(CMA3boyama)	28,14 $\pm$ 6,93	69,04 $\pm$ 12,72	0,000

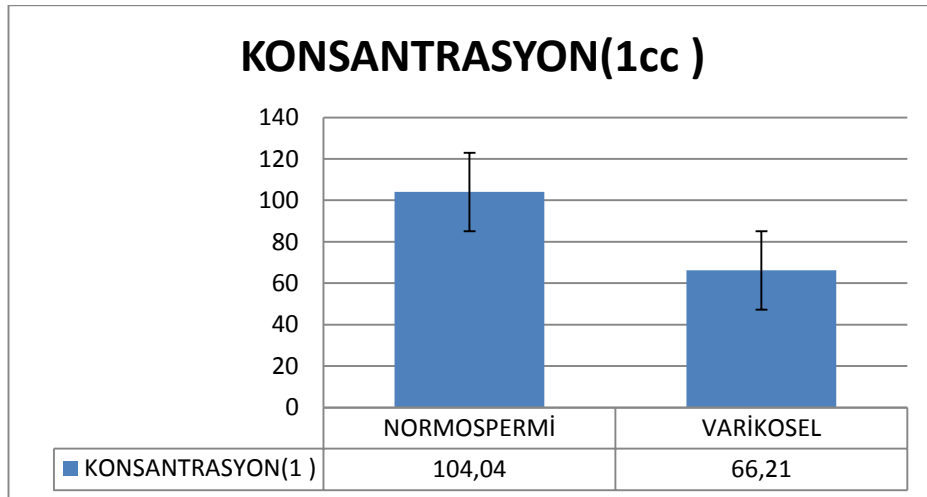
Tablo 6.5. Varikozel ve normospermi hasta gruplarının morfoloji hesaplanması

Değişken	NORMOSPERMİ ($\bar{x} \pm SD$)	VARİKOSEL ($\bar{x} \pm SD$)	p
Morfoloji% (normal)	5,28 $\pm$ 1,84	3,21 $\pm$ 1,08	0,000
Morfoloji%(baş)	49,19 $\pm$ 5,77	48,30 $\pm$ 6,66	0,641
Morfoloji% (gövde)	25,09 $\pm$ 4,98	28,69 $\pm$ 5,06	0,022
Morfoloji% (kuyruk)	20,66 $\pm$ 4,69	19,39 $\pm$ 5,61	0,421

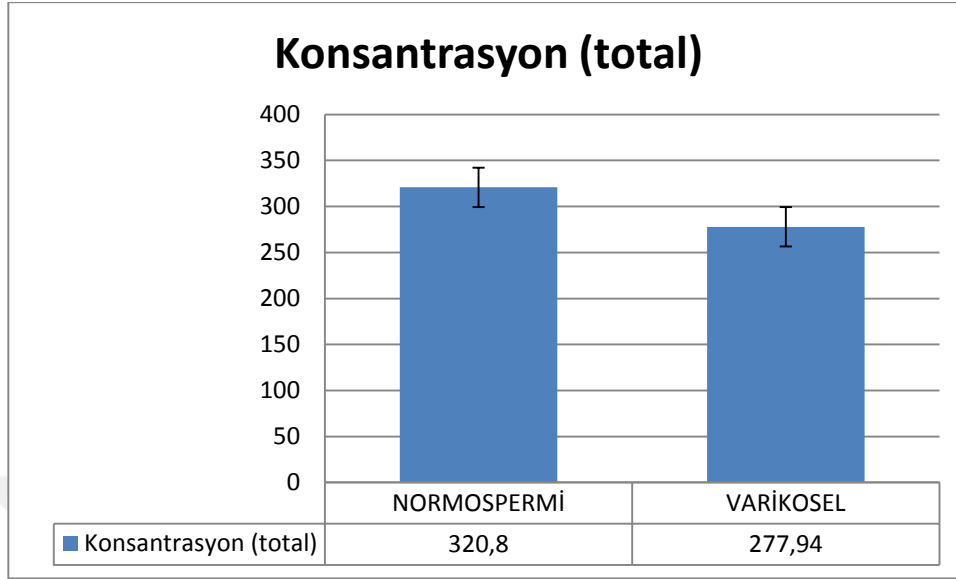
Tablo 6.6. Varikozel ve normospermi hasta gruplarının sperm maturasyon defekti

Değişken	NORMOSPERMİ ($\bar{x} \pm SD$)	VARİKOSEL ($\bar{x} \pm SD$)	p
Sperm maturasyondefekti oranı% (anilin mavisi pozitif)	27,71 $\pm$ 8,44	68,78 $\pm$ 12,29	0,000

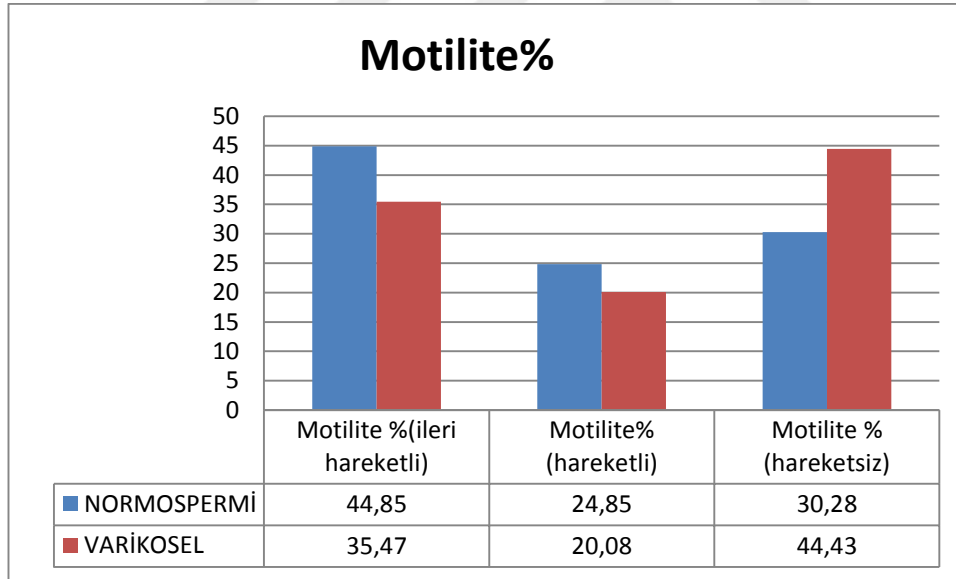
Tablo 6.7. Varikozel ve normospermi hasta gruplarının 1 cc'deki oranları(p=0.066)



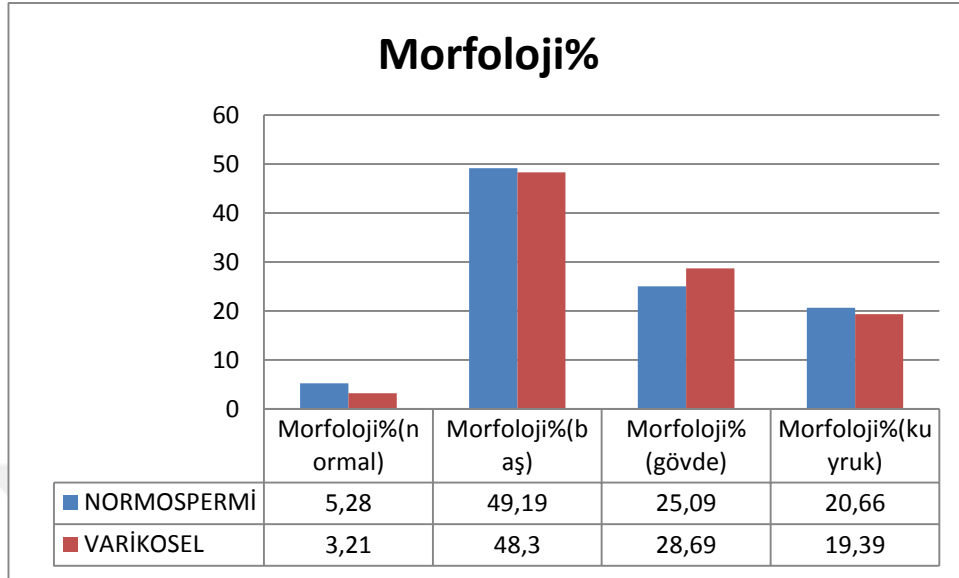
Tablo 6.8. Varikozel ve normospermi hasta gruplarının total konsantrasyonu(p=0.648)



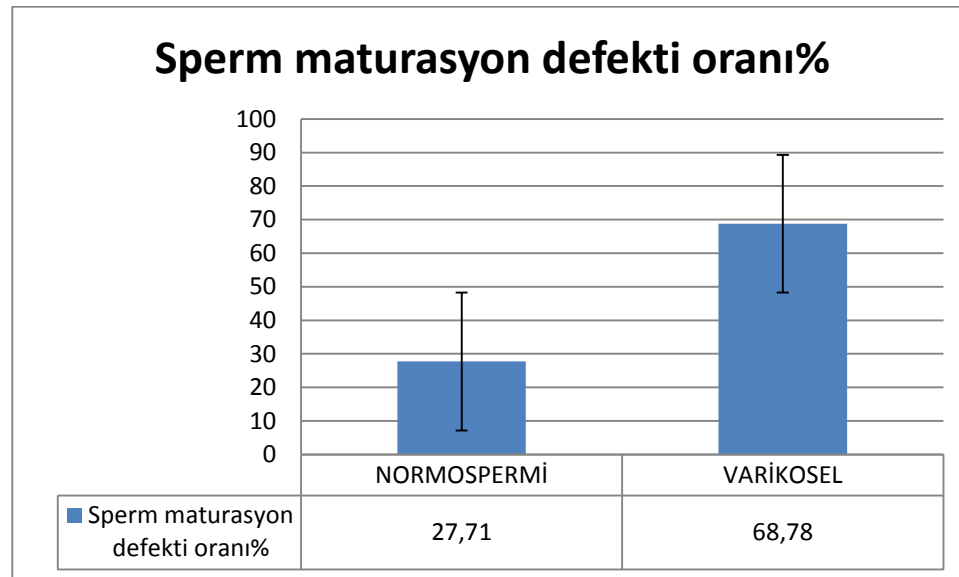
Tablo 6.9. Varikozel ve normospermi hasta gruplarının % motilite oranı



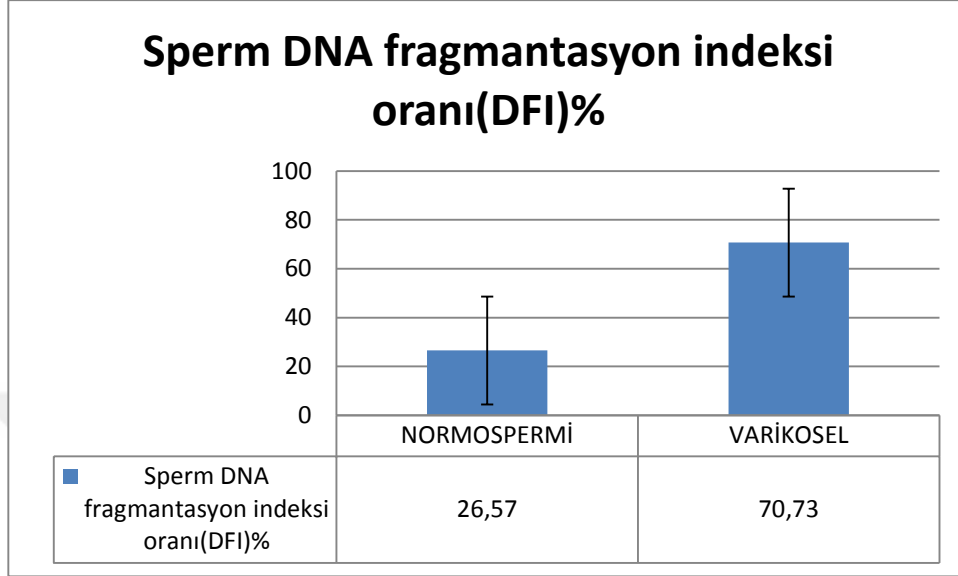
Tablo 6.10. Varikösel ve normospermi hasta gruplarının % morfoloji oranı



Tablo 6.11. Varikösel ve normospermi hasta gruplarının sperm maturasyon defekti oranı (Anilin mavisi pozitif)



Tablo 6.12.Varikozel ve normospermi hasta gruplarının sperm DNA fragmentasyon indeksi (Akridin oranj kırmızı hücre oranı)



7.TARTIŞMA

Varikosel, primer ve sekonder infertilitedeki en sık gözlenen anormalliktir ve testiküler temperaturun artışı ile karakterize bir durumdur. Fertilite üzerinde varikoselin gerçek mekanizması oldukça tartışmalı olmasına rağmen genelde eldeki bilgiler varikoselin spermatogenez üzerine zararlı etkilere yol açtığını göstermektedir. Erkek infertilitesi üzerine varikosel onarımının etkisi tartışmalıdır. Erkeklerin çoğunda varikosel onarımı semen parametrelerinde iyileşme ile sonuçlanmasına rağmen yayınların hepsi bu sonucu desteklememektedir. Son bilgiler, varikosel onarımı ile rutin semen analizinde görülen olumlu etkilerinin de ötesinde sperm DNA fragmentasyonunu ve daha sonraki spontan gebelik oranları ve yardımcı üreme sonrasındaki gebeliği olumlu etkilediğini düşündürecek tarzdadır (Samplaski et all. ,2014) .

Testiküler termoregülasyon normal spermatogenez için gereklidir ve yükselen sıcaklık germ hücreleri üzerinde stres oluşturmakta ve spermatogenezde duraklama ile birlikte anormal formların ortaya çıkışı görülmektedir (Hjollond ve ark 2002).

Çalışmamızda varikosel olgularında yüksek baş ve orta kısım anomalileri bulduk.Bu bulgular daha önce yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir.Zümrütbaş ve arkadaşlarının 2013 de yaptıkları çalışmada varikosel olgularında sperm baş anomalilerinin artışı ile birlikte uzamış ve amorf baş yapılarının stres faktörü ile geliştiği açıklanmaktadır (Zümrütbaş ve ark 2013).

Varikosel ve Sperm DNA Fragmentasyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen literatürde birkaç çalışma vardır. Varikoseleli olan doğurgan ve infertil erkekler kontrollerden daha yüksek Sperm DNA Fragmentasyonuna sahip olma eğiliminde olduğu gösterilmiştir (Zini ve ark 2011). Varikoselektomi sonrası sperm DNA'sında %3 civarında iyileşme saptanmıştır (Wang ve ark 2012) . Wang ve arkadaşlarının 2012 de yaptıkları çalışmaya göre varikoselektomi sonuçlarını doğrulamak için çok fazla uygun kontrollerle çalışma yürütmenin gerekliliği vurgulanmıştır (Wang ve ark 2012).Çeşitli araştırmalar varikosel ile infertilite arasındaki ilişkiyi göstermiştir bu ilişkinin ortaya çıkardığı laboratuvar analizi genellikle sperm DNA hasarı olmuştur (Wang ve ark.2012). Spermatogenezin son aşamaları spermiohistogenez, sperm canlılığı ve doğurganlıkta önemli bir role sahiptir (Barrat ve ark 2010, Fuse ve ark

2006). Varikosel gibi bu aşamaları etkileyen anormal fizyolojik ortam abortif apoptoza veya değişmiş fertilite potansiyeline neden olabileceği düşünülmektedir (Zümrütbaş ve ark 2013). Sperm analizi bulguları çoğu zaman infertilite nedenini tam olarak açıklayamamaktadır. Sperm hareketi ve rutin semen analizi ile belirlenemeyen DNA fragmentasyonları infertiliteye yol açabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle rutin semen analizi, infertilite / subfertilite durumunu saptamak için yeterli olmayabilir. Sperm DNA hasarını belirlemek için ek testler gerekir. DNA hasarının derecesini belirlemek için TdT (terminal deoksiribonükleotidil transferaz) aracılı dUTP nick-end etiketleme (TUNEL) tahlili, Akridin oranj boyası gibi testler geliştirilmiştir. Akridin oranj testinin flow sitometrik analizi sperm kromatin strüktür testi (SCSA) diye isimlendirilir ve çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Laboratuvar pratiğinde halen kolay yapılabilen ve sperm kalitesini doğru analiz eden yeni testlere ihtiyaç bulunmaktadır

Sperm protaminasyonu, spermiogenez'in son aşamalarını içeren bir süreçtir ve protamin gelişiminin sperm DNA bütünlüğü ve mutasyonlara direnç oluşturduğu bilinmektedir (Alkhayal ve ark 2013)

Varikosel olgularında sperm maturasyon analizleri ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda özellikle sperm DNA fragmentasyon analizleri ile birlikte iki farklı maturasyon analizi yaptık. İrez ve arkadaşlarının 2015 ve 2018 de yaptıkları çalışmalara göre hafif erkek faktörlü ve açıklanamayan infertil olgularda sperm kromatin kondansasyonu değerlerinin (anilin mavisi negatif sperm oranı) yani protaminasyonun klinik gebeliği öngörebileceği gösterilmiştir. (İrez ve ark. ,2015; 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. ,2015 ; 2018). Biz bu çalışmamızda varikoselli hastalarda kromatin kondensasyonunun normospermiye göre karşılaştırarak istatistiksel olarak anlamlı farklı olduğunu gösterdik. Bu durumun akridin oranj ve kromomisin A3 boyası ile elde ettiğimiz sonuçlar ile de benzer olduğunu tespit ettik. Çalışmamızda varikoselli olgularda kontrollere kıyasla yüksek maturasyon defektini her iki maturasyon testi ile doğruladık.

Protaminlerle ilgili ilk araştırmalar protamin genlerinde mutasyonlar bulunan bazı infertil hastaların bulunması ile ilgi çekti (Belokopytova ve ark 1993). Araştırıcılar bazik kromozomal proteinleri, normal kontrollü ve infertil erkeklerde alınan spermilerden izole ettiler. Protamin 1, 2 ve 3'ün nispi oranları, poliakrilamid jellerinde toplam protamin elektroforezini takiben mikrorodensitometri taranarak belirlendi. Elde ettikleri bulgulara infertil erkeklerden elde edilen spermdeki protamin P (2 + 3) oranı fertil erkeklerden daha düşük olduğu gözlemlendi. Bazı insan erkek kısırlığı vakalarının, protamin P2 genindeki mutasyon nedeniyle olabileceği olasılığını ileri sürdüler.

Yine hayvan çalışmalarında, protaminlerin ekspresyonunda kusurlu olan transgenik fareler ayrıca sperm çekirdeğinde çeşitli yapısal kusurlar gösterir ve farklı derecelerde infertiliteye sahiptir (Balhorn R. ,2007). Değişen protamin seviyelerinin, spermatozoan DNA'da hasarlanmaya karşı duyarlılığın artmasına neden olabileceğine dair kanıtlar vardır, ayrıca yardımcı üremede infertiliteye veya kötü YÜT sonuçlarına neden olduğu gösterilmiştir (Angelopoulos R. et al. ,2007).

Protaminler en bol bulunan sperm nükleer proteinleridir ve memeli sperm DNA'sının yaklaşık% 92-98'ini oluşturmaktadır. Memelilerde, Protamin 1 (P1) ve Protamin 2 (P2) olmak üzere iki tip protamin tanımlanmıştır (Solar-Ventura ve ark 2018). Nispi P1 / P2 oranının deregölasyonu, DNA hasarı, seminal parametrelerdeki değişiklikler ve yardımcı üreme tekniklerinin düşük başarı oranı ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, protaminler, arginin ve sistein kalıntıları bakımından oldukça zengin olan özel amino asit dizisi nedeniyle belirli bir kimyasal yapı gösterir. Protaminin bu tuhaf özelliklerinden dolayı, bunların ekstraksiyonu ve analizleri, birçok detaylı protokolün mevcut olduğu diğer kromatinle ilişkili proteinlerin analizi kadar kolay değildir. Sperm nükleusu önce yoğun olarak histon taşımaktadır, spermiogenez sonrası protaminasyon gerçekteşmektedir. Bu nedenle araştırıcılar histon varlığına yönelmişlerdir ve çeşitli histon boyaları geliştirerek pratik olarak protaminasyon kusurlarını ortaya çıkarmak mümkün olmuştur. Anilin mavisi boyası gibi kromomisin A3 boyası da protaminasyonu indirekt olarak belirlemektedir (Lolis ve ark, 1996)

Haploid erkek üreme hücreleri, DNA'larını, tipik olarak somatik bir hücre çekirdeğinininkinin% 10'u veya altında olan bir hacme paketlerler. Bu olağanüstü

sıkıştırma seviyesine ulaşmak için, spermatozoa, histonlarının çoğunu daha küçük, oldukça bazik arginin ve sistein bakımından zengin protaminler ile değiştirir. Bu kadar yüksek bir sıkıştırma seviyesinin sebeplerinden biri, nükleer şeklin optimize edilmesine yardımcı olabileceği ve bu nedenle gametlerin dışı üreme sistemindeki oositlere uzun yolculuk için yüzme yeteneğini destekleyebilmesidir. (Miller ve ark 2010) Genomun süper sıkışması, genotoksik faktörlerin etkilerinden ilave koruma sağlayabilir. Bununla birlikte, insan dahil olmak üzere birçok tür, kromatinin bir kısmını, daha rahat bir nükleozomal konfigürasyonda tutarken, sperm DNA'sının ergonomik, toroidal ve yeniden ambalajlanmasına benzeyen görünebilir. Son araştırmalar, bu "artık" nükleozomal kompartımanın, genellikle erkek gametinin gözden kaçan bir özelliği olan kompozisyonunun, önceden düşünülen çok daha önemli ve önemli olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, spermatozoon tarafından modifiye edilmiş paternal histonların zigota taşınması ve dahil edilmesi gösterilmiş ve baskı durumundan bağımsız döllenmeyi takiben zigotun epigenetik yeniden programlanmasında bir başka potansiyel baba etkisi olduğunu göstermektedir (Miller ve ark 2010). Sperm histonlarının maturasyon sonrası sadece % 15 civarında nukleusta yer aldığı bilinmektedir (Iranpur ve ark 2014).

Çalışmamızda sperm histon varlığının artışı ile DNA fragmentasyonlarının da benzer oranda artış gösterdiği anlaşılmıştır. Bu da sperm DNA fragmentasyonlarına yol açan etkenlerden biri olan paketlenme kusurlarının doğruluğunu göstermektedir. Sperm kromatin paketlemesini değerlendirmek için kullanılan testler arasında, Chromomycin A3 (CMA3) ve Aniline Blue (AB) boyamaları iki basit, düşük maliyetli ve gerçekleştirmesi kolay yöntemlerdir. Ayrıca yaptığımız çalışmada iki ayrı histon boyasının da benzer sonuçları göstermesi anilin mavisi testinin sperm DNA bütünlüğü araştırmalarında önemini ortaya çıkarmıştır.

8.SONUÇ VE ÖNERİLER:

Varikozel ve kontrol grup kıyaslandığında sperm konsantrasyonu, hasta yaşı, total sperm sayısı bakımından gruplar arasında bir fark görülmedi. Sperm motilitesi Varikozel olgularında anlamlı olarak düşük bulundu. Sperm normal morfoloji oranı kontrole kıyasla Varikozel olgularında daha düşük bulundu. Sperm orta kısım anomalilerinin Varikozel olgularında daha yüksek olduğu görüldü. Histon pozitif sperm oranının Varikozel olgularında daha yüksek olduğu iki ayrı test ile kanıtlandı. Akridin oranj boyama ile yapılan sperm DNA fragmentasyonunun Varikozel olgularında daha yüksek olduğu görüldü.

Sonuç olarak, bu çalışma varikozel varlığı ile semen kalitesinde azalma arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Ek olarak, bu patolojinin varlığı DNA fragmentasyonunu, anormal kromatin paketlemesini artırmaktadır. Bununla birlikte, varikozelin fertilizasyon ve embriyo gelişimini nasıl etkilediğini ayrıntılı olarak göstermek için iyi tasarlanmış çalışmalara ihtiyaç vardır.

9. KAYNAKLAR

Alkhayal A, San Gabriel M, Zeidan K, Alrabeeh K, Noel D, McGraw R, Bissonnette F, Kadoch IJ, Zini A., 2013, Sperm DNA and chromatin integrity in semen samples used for intrauterine insemination. J Assist Reprod Genet. Nov;30(11):1519-24. doi: 10.1007/s10815-013-0101-3. Epub 2013 Sep

Aktan T.M., Cücel G., 2011, Effect of Sperm Preparation Techniques on Fertilization, Selçuk Üniv Tıp Derg 2011;27(4):205-207

Angelopoulou R., Konstantina Plastira, Pavlos Msaouel, 2007, Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA, Reprod Biol Endocrinol. ; 5: 36. Published online 2007 Aug 30. doi: 10.1186/1477-7827-5-36

Avcı B., 2006, Farklı fiksasyon protokolleri ile sperm kromatin kondensasyon anomalisinin değerlendirilmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Dergisi, 32(2) 55-59,

Balhorn R. ,2007, The protamine family of sperm nuclear proteins ,Genome Biology volume 8, Article number: 227

Barratt CL, Aitken RJ, Bjorndahl L, Carrell DT, de Boer P, Kvist U, et al. ,2010 Sperm DNA: organization, protection and vulnerability: from basic science to clinical applications--a position report. Hum Reprod. 2010;25:824–38.

Belokopytova I.A., Kostyleva E.I., Tomilin A.N., Vorob'ev V.I., 1993, Human male infertility may be due to a decrease of the protamine P2 content in sperm chromatin, Molecular reproduction Development, Volume 34, Issue 1 , Pages 53-57

Boynukalın K.F., Güven S., Günalp S., 2014, Sperm DNA hasarı ve Üremeye Yardımcı Teknikler, Cilt:11, Sayı:1 Sayfa:52-8, DOI ID:10.5505/tjod.2014.82584

Brito F.C.L., Althouse G.C., Aurich C., Chenoweth P.J., Eilts B.E, Love C.C., Luvoni G.C., Mitchell J.R., Peter A.T., Pugh D.G., Waberski D., 2016, Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration, Theriogenology, Volume 85, Issue 9 , Pages 1507-1527.

Çayan S., Kadioğlu A., 2005, Varikoselin tanı ve tedavisinde güncel yaklaşımlar, türk üroloji dergisi:31 (1): 57-63

Çayan S.,2017, Varikoselin güncel tedavisi ,üroloji , mersin üniversitesi tıp fakültesi,Türkiye klinikleri J urology-special topics ;10(1)22.

Chen C., Lee S., Chen D., Chien H., Chen I., Chu Y., Liu J., Chen W., Wu G.,2004., Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. J Androl. 2004; 25: 348– 353.

Doğantekin E. , Özcan S.,2016, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji AD Artvin Devlet Hastanesi, Üroloji Kliniği Androloji Bülteni ; 18(66): 183–187

Dunkel L., Hirvonen V., Erkkilä K.,1997, ‘Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis’, Cell Death Differ 1997 Apr;4(3):171-9.

Erimşah S. , Seçkin İ., Uludağ S., İrez T.,2008, Sperm Morfolojisi ve Kromatin Kondensasyon Defektleri arasındaki korelasyonCTF Dergisi Yıl 2008, Cilt 39 , Sayı 4, Sayfalar 128 - 135

Enciso M., Muriel L., Fernández J.L., Goyanes V., Segrelles E., Marcos M., Montejo J.M., Ardoy M., Pacheco A., Gosálvez J.,2013,Infertile Men With Varicocele Show a High Relative Proportion of Sperm Cells With Intense Nuclear Damage Level, Evidenced by the Sperm Chromatin Dispersion Test J.Andrology, Volume27, Issue1 Pages 106-111 <https://doi.org/10.2164/jandrol.05115>

Erdem A.,2013, Sperm hazırlama yöntemi olarak ‘swim-up ve gradient’ tekniklerinin DNA fragmentasyonuna etkilerinin karşılaştırılması , Ankara

Eşrefoğlu M., 2016 , ‘Bölüm 9 Erkek Genital Sistemi’, ‘Özel Histoloji 2. Baskı’, İstanbul Tıp Kitabevi.

Evenson D.P. ,Jost L.K. ,Marshall D. ,Zinaman M.J. ,Clegg E. ,Purvis K. ,1999 ,Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999;14:1039-49

Fuse H, Akashi T, Mizuno I, Nozaki T, Watanabe A.,2006, Postoperative changes of sperm chromatin heterogeneity, using acridine orange staining, in varicocele patients. Arch Androl. 2006;52:223–6.

Güneş S., Sevgili E., Aşçı R.,2013, ‘Sperm DNA Hasarı Mekanizmaları ve Değerlendirme Yöntemleri(Sperm DNA Damage Mechanisms and Evaluation Assays:Review)’, (2013), Türkiye Klinikleri J. Urology ,4(3):107-14

Güzel Ö.,Tuncel A.,Aslan Y., Atan A., 2014,Varikoselde güncel görüşler., Ankara numune eğitim araştırma hastanesi,üroloji kliniği

Iranpour F.G.,2014,Impact of sperm chromatin evaluation on fertilization rate in intracytoplasmic sperm injection,Adv Biomed Res , 3:229

İrez T.,Kucur M.,İsman F. 2007, Androloji Laboratuvarı el kitabı, Nobel Tıp Kitapevi, 1. Bölüm

Irez T, Sahmay S, Ocal P, Goymen A, Senol H, Erol N, Kaleli S, Guralp O.,2015,Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques.Andrologia. 2015 May;47(4):438-47. doi: 10.1111/and.12286. Epub 2014 Apr 27.

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. Epub 2018 Jul 19

Junqueira L.C. , Carneiro J. , Kelley R .O. ,1998, ‘22. Bölüm Erkek Üreme Sistemi’, ‘Basic Histology 8th edition’, Aytekin Y., Barış Kitabevi.

Kai Ni.,Klaus Steger.,Hao Yang. ,Hongxiang Wang, Kai Hu,Bin C.,2014,Sperm Protamine Mrna Ratio and DNA Fragmentation Index Represent Reliable Clinical Biomarkers For Men With Varicocele After Microsurgical Varicocele Ligation; • doi:10.1016/j.juro.2014.02.046

Kara M., Türktekin N., T.Aydın,2011, The Effect of DNA Fragmentation Rate Measured by Using Halosperm Technique on IVF-ICSI Outcomes, Kafkas J Med Sci 2011; 1(3):92–96 • doi: 10.5505/kjms.2011.39974

Kierszenbaum A. L,2006, ‘Bölüm 20:Spermatogenez’, ‘Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş’, Çev.Ed. Demir R., Palme Yayıncılık, Ankara

Koyuncu H. ,2011, Methods for the determination of sperm DNA damage. *Turk Urol Sem.* ;2:18-23

Kruger TF., Acosta AA, Simmons KF, et al.,1988, Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* ;49:112-7.

Lolis D., Georgiou I., Syroru M., Zikopoulos M.,Konstantelli M. and Messinis I. 1996, Chromomycin A,-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *international journal of andrology*, 1923-27

Marmar JL.,2001,The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update*. 2001; 7: 461– 472.

Nagata S.,2000,‘Apoptotic DNA Fragmentation, *Experimental Cell Research*’, Volume 256, Issue 1, 10 April 2000, Pages 12-18.

Oliva R.,2006, Protamines and Male Infertility. *Human Reproduction Update*, Vol.12, No.4 pp. 417–435, 2006 •doi: 10.1093/humupd/dml009

Olshan AF, Ananth CV, Savitz DA, 1995, Intrauterine growth retardation as an endpoint in mutation epidemiology: an evaluation based on paternal age, *Mutat Res* 344:89

Ovari L. , Sati L., Stronk J., Borsos A., Ward D.C., and Huszar G.,2009, Double probing individual human spermatozoa: aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies.*Fertil Steril* 2009; 0015-0282/09 doi:10.1016/j.fertnstert.2009.05.033

Özsait B.,2010,Yardımla Üreme Tekniklerinde Sperm Kriyoprezervasyonu in:Delilbaşı L.(Ed.),*Klinik Embriyoloji Uygulamaları Atlası*, Büyükharf Tıp Yayınları,(ISBN No:978-9944-5125-7-2)

Peasch U., Granewald S, Agarwall A, Glandera HJ,2004,‘Activation pattern of caspases in human spermatozoa’, *Fertil Steril* 2004, Mar;81 Suppl 1:802-9.

Saleh RA, Agarwal A., Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr.,2003, Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 2003; 80: 1431– 1436.

Samplaski MK., Yu C., Kattan MW.,2014, İnfertil erkeklerde varikoselektomi sonrası semen parametrelerindeki değişiklikleri öngörmede nomogramlar.

Soler-Ventura A. , Castillo J. , Iglesia A. , Jodar M. , Barrachina F. , Ballesca J.L. , Oliva R.,2018, Mammalian Sperm Protamine Extraction and Analysis: A Step-By-Step Detailed Protocol and Brief Review of Protamine Alterations. Protein & Peptide Letters,2018, Volume 25 , Issue 5 DOI : 10.2174/0929866525666180412155205

Sun J.G., Jurisicova A., and Casper R.F.,1997, Detection of Deoxyribonucleic Acid Fragmentation in Human Sperm:Correlation with Fertilization In Vitro',Biology of Reproduction 56, 602-607

Vincent W..Aoki Lihua Liu Douglas T.Carrell., 2005, HumanReproduction, Vol.20,Issue 5, May 2005, Pages 1298–1306, •doi:10.1093/humrep/deh798

Vincent W..Aoki., B.S., Lihua Liu., M.D.,Kirtly P., Jones., M.D.,Harry H., Hatasaka., M.D.,Mark Gibson., M.D., C. Matthew Peterson., M.D.,and Douglas T., Carrell, 2006, Fertility and Sterility,Vol. 86, No. 5, doi: •10.1016/j.fertnstert.2006.04.024

WHO,2002, Laboratuvar El Kitabı insan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi, çev. ed. Günalp S. Dördüncü baskı. Ankara:Tıp Teknik Kitabevi; 2002: 4–33, 76.

Yalçın B.,Çevik Y.,2018,Erkek İnfertilitesinde Spermatozoon DNA Hasarının Rolü Ve Önemi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Dölerme Ve Suni Tohumlama Alanı MAE Vet Fak Derg, 3 (2): 135-140 2018; •doi: 10.24880/maeuafd.463669

Ying-Jun Wang,. Rong-Qiu Zhang,. Yan-Jun Lin,.Rong-Gui Zhang, Wei-Li Zhang., 2012,Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a meta-analysis 2012 ; •doi: 10.1016/j.rbmo.2012.05.002

Zümrütbaş A.E., Gülpınar O., Mermerkaya M., Süer E., and Yaman O.,2013,The effect of varicocele on sperm morphology and DNA maturity: does acridine orange staining facilitate diagnosisTurk J Urol. 2013 Sep; 39(3): 165–169. doi: 10.5152/tud.2013.034 PMCID: PMC4548628 PMID: 26328102

10.EKLER

EK1

ETİK KURUL ONAYI

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

24.01.2019

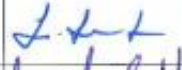
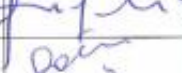
Sayın Prof.Dr.Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda planladığı “Varikosel Olgularında Sperm Protaminasyonunun İncelenmesi” isimli araştırmanızın kurulumuzun 24.01.2019 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.



Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN

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

	Karar No: 2019/25-18			
Tarih: 24.01.2019	Prof.Dr.Tülay İREZ'in planladığı "Varikozel Olgularında Sperm Protaminasyonunun İncelenmesi" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.			
Toplantı Sayısı:25				
ÜYELER				
Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Can Polat EYİGÜN	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.Ayşe Tuba CEYHUN	Eğitim Fakültesi	Zihin Engelliler Bölümü	Üye	
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep HOŞBAY	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü	Üye	

EK 2: Gönüllü Onam Formu

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

"GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR" İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı:Varikosel olgularında sperm protaminasyonunun incelenmesi

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

Sorumlu Araştırmacı: BÜŞRA BERKSOY

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

Bu çalışmaya katılmalı mıyım?

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

Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir?

Bu çalışmaya katılmanız halinde herhangi bir maddi sorumluluk altına girmeyeceksiniz.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Araştırma sorumlusu, kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde yalnızca bu araştırmada olmak üzere tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

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

ADI : Büşra BERKSOY

GÖREVİ : Biyolog

TELEFON : 0546 400 34 17

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

Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

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

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

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sorun ile karşılaştığımda; Bio. Büşra BERKSOY 'u 0546 400 34 17nolu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

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

Katılımcı

Adı, soyadı:

Tel:

İmza:

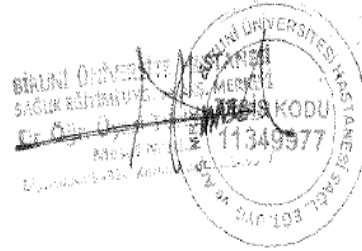
EK 3. Kurum İzin Belgesi

BİRÜNİ
ÜNİVERSİTE
HASTANESİ
SAĞLIK BİLİMİ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığına;

Biruni Üniversitesi Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Tülay İREZ'in yürütücüsü olduğu 'Varikozel olgularında sperm protaminasyonunun incelenmesi' isimli araştırma projesinde, hastanemiz laboratuvarına başvuran hastaların semen örneklerinin araştırma amaçlı kullanılması tarafından uygun görülmüştür.

KUKK uygulaması kapsamında
hastanın onayı alınarak ve yörenle sorulduğu
tarafınızda olara kabul ile uygundur.



11. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Büşra Berksoy

Doğum Tarihi ve Yeri: 20.04.1993/ İST

Mail Adresi: berksoybusra@gmail.com

Ünvanı: Biyolog

Öğrenim Durumu: Lisans

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
Lisans	Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2016

VARİKOSEL OLGULARINDA SPERM PROTAMİNASYONUNUN İNCELENMESİ

ÖZGÜNALLİK RAPORU

%22

BENZERLİK ENDEKSİ

%17

İNTERNET
KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%5

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİ KAYNAKLAR

1

issuu.com
İnternet Kaynağı

%6

2

www.dicle.edu.tr
İnternet Kaynağı

%4

3

Submitted to Inonu University
Öğrenci Ödevi

%2

4

www.journalagent.com
İnternet Kaynağı

%2

5

www.selcuktipdergisi.org
İnternet Kaynağı

%1

6

www.biyologlar.com
İnternet Kaynağı

%1

7

Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam
University
Öğrenci Ödevi

%1

8

slideplayer.biz.tr
İnternet Kaynağı

%1