



T.C.

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK EMBRİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**VARİKOSEL OLGULARINDA SEMEN OKSİDATİF STRES
ÜRÜNLERİ VE ANTİOKSİDANLARI İLE BİRLİKTE SPERM
MİTOKONDİRİYAL MEMBRAN POTANSİYELİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ayşegül AVCI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

Ekim, 2019



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

VARİKOSEL OLGULARINDA SEMEN OKSİDATİF STRES
ÜRÜNLERİ VE ANTİOKSİDANLARI İLE BİRLİKTE SPERM
MİTOKONDİRİYAL MEMBRAN POTANSİYELİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

Ayşegül AVCI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay İREZ

Ekim, 2019

TEZ ONAY BELGESİ



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.

Ayşegöl AVCI



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, projemin yönlendirilmesi ve başarılı bir şekilde uygulanması ile tez konumun belirlenmesinde ilgi ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. Tülay İREZ'e, desteği için Dr. Öğr. Üyesi Emre SALABAŞ'a, bilgileriyle bizleri daima aydınlatan Biruni Üniversitesi Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı'ndaki tüm hocalarıma, akademik kariyerimde ilerlememde ve başarılarımda desteklerini esirgemeyen, daima yanımda olup varlıklarıyla daima güç bulduğum ailem başta olmak üzere Bahar SARIKAYA ve Ecem ASLAN'a saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayşegül AVCI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No.

TEZ ONAY BELGESİ	
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE/SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TÜRKÇE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELEER	xi
İNGİLİZCE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELEER	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İNFERTİLİTE	4
2.2. Erkek Üreme Sistemi	6
2.2.1. Testis	6
2.2.2. Seminifer tübüller	7
2.3.1. Sertoli hücreleri	8
2.3.4. Leydig hücreleri	8
2.4. Erkek Genital Kanal Sistemi	8
2.4.1. Penis ve üretra	9
2.4.2. Erkek genital sisteminin yardımcı bezleri	10
2.4.2.1. Prostat bezi	10
2.4.2.2. Seminal vezikül	10
2.4.2.3. Bulboüretral bezler (Cowper bezleri)	10
2.5. Spermatogenez	10
2.6. Semen Toplanması	14
2.7. Makroskopik İnceleme	14
2.8. Mikroskopik İnceleme	15
2.9. Sperm DNA Yapısı	17
2.10. Sperm DNA Hasarı	19
2.10.1. Sperm DNA hasarı belirleme yöntemleri	19

2.10.1.1. Anilin blue (mavisi) boyama.....	19
2.10.1.2. Acridine orange (turuncusu) boyama.....	20
2.10.1.3. Chromomycin A3 boyama	21
2.11. Anormal kromatin paketlenmesi	22
2.12. Apoptoz.....	22
2.13. Varikosel	23
2.13.1. Etiyoloji	25
2.13.2. Fizyopatoloji	27
2.13.3. Skrotal Hiptermi	27
2.13.4. Testiküler Hipoksi ve hipoperfüzyon	28
2.13.5. Hormonal düzensizlik ve Leydig hücre disfonksiyonu	30
2.14. Reaktif Oksijen Türevleri.....	30
2.15. Reaktif Oksijen Türevlerinin Hücresel Kaynağı.....	32
2.15.1. Lipid Peroksidasyonu	33
2.15.2. Reaktif Oksijen Türevleri ve Mitokondriyal Membran Potansiyeli	33
2.15.3. Mitokondriyal membran potansiyeli belirleme yöntemi	34
2.15.3.1. Nitroblue tetrazolium boyama.....	34
2.16. Oksidatif Stres.....	35
2.16.1. Varikosel ve Oksidatif Stres İlişkisi	36
2.16.2. Varikosel Kaynaklı Oksidatif Stres ve DNA Hasarı	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Çalışmanın Tasarımı	39
3.2. Hasta Seçimi.....	39
3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	40
3.3.1. Sperm Maturasyonunun Anilin Mavi Boyası ile Gösterilmesi.....	40
3.3.2. Sperm DNA Fragmentasyonunun Akridin Orange ile Floresan Mikroskobunda Gösterilmesi.....	40
3.3.3. Gevşek Paketlenmiş Kromatinde Protamin Eksikliğinin Kromomisin A3 ile gösterilmesi.....	41
3.3.4. Sperm Oksidatif Stresinin Nitroblue Tetrazolium Boyama İle Işık Mikroskobunda Değerlendirilmesi	42
3.3.5. İstatiksel Yöntemler:.....	43
4. BULGULAR	44
4.1. Sperm Konsantrasyon Değerlendirme Sonuçları	45

4.2. Sperm Motilite Değerlendirme Sonuçları	46
4.3. Sperm Morfoloji Değerlendirme Sonuçları	47
4.4. Sperm DNA Maturasyon Defekti Sonuçları (Anilin Blue (Mavisi) %).	49
4.5. Sperm DNA Fragmentasyon İndeksi Sonuçları(Acridine Orange/Akridin Turuncusu %).....	51
4.6. Sperm Kromatin Kondensasyon Defekti Sonuçları (Cma3 (Kromomisin A3) %)	53
4.7. Anormal Mitokondriyal Membran Potansiyeli Sonuçları.....	55
5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER	59
5.1. Tartışma.....	59
5.2. Öneriler	64
6. KAYNAKLAR	65
7. EKLER.....	77
EK 1. Gönüllü Olur Formu	77
EK 2. Etik Kurul Onayı.....	80
Ek 3. Hastane Onay Formu	82
8. ÖZGEÇMİŞ	83
9. İNTİHAL RAPORU	84

SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
NO	Nitrik Oksit
HEL	Heksanoil-lizin
ATP	Adenozin Tri Fosfat
GnRH	Gonodotropin Serbestleyici Hormon
FSH	Folikül Stimülan Hormon
LH	Lüteinleştirici Hormon
AMH	Anti-Müllerian hormon
µm	Mikromolar
ml	Mililitre
°C	Derece
PSA	Prostat Spesifik Antijen
AO	Akridin Oranj
SCSA	Sperm Kromatin Yapı Analizi
DFI	DNA Fragmentasyon İndeksi
AB	Anilin Blue
CMA3	Chromomycin A3
SMA	Üst Mezenterik Arter
HIF-1α	Hipoksiya ile İndüklenen Faktör-1 alfa
O ₂ •-	Süperoksit anyonu
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
•OH	Hidroksil radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NBT	Nitroblue Tetrazolium Testi
8-OHdG	8-hidroksi -2-deoksiguanozin
GSR	Glutasyon Redüktaz
GST	Glutasyon S-transferaz
HO-1	Heme oksijenaz-1
TAC	Total Anitoksidan Kapasitesi
LPO	Lipid Peroksidasyonu

IVF	İn Vitro Fertilizasyon
IUI	InraUterin İnseminasyon
ICSI	Intra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu



TABLO LİSTESİ

Tablo No	Tablo İsmi	Sayfa No
Tablo 2.1.	İnfertilite etiyolojisi	4
Tablo 2.2.	Dünya Sağlık Örgütü (WHO) referanslarına göre semen analizi değerleri	5
Tablo 2.3.	Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre semen analizi değerlendirme kriterleri.....	17
Tablo 2.4.	Reaktif oksijen türevleri	31
Tablo 4.1.	Normal ve varikozel hasta gruplarında konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması	45
Tablo 4.2.	Normal ve varikozel hasta gruplarında motilite değerlerinin karşılaştırılması	46
Tablo 4.4.	Normal ve varikozel hasta gruplarında Anilin blue (mavisi) (+) değerlerinin karşılaştırılması.....	49
Tablo 4.5.	Normal ve varikozel hasta gruplarında Acridine orange (turuncusu) % değerlerinin karşılaştırılması.....	52
Tablo 4.7.	Varikozel ve normal hasta gruplarında Nitroblue tetrazolium ile boyanmış sperm anormal mitokondriyal membran potansiyeli değerlerinin karşılaştırılması...	56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Şekil İsmi	Sayfa No
Şekil 2.1.	Erkek üreme sistemi anatomisi	6
Şekil 2.2.	Testis Yapısı ve Seminifer Tübüller	7
Şekil 2.3.	Testis histolojisi ve epididimis.....	9
Şekil 2.4.	Sperm hücresinin seminifer tübülleri ve Sertoli hücreleri arasındaki ilişki ile seminifer tübül lümenine taşınması	11
Şekil 2.5.	Spermatogenez.....	12
Şekil 2.6.	Sperm hücresi yapısı	13
Şekil 2.7.	Sperm protaminasyon mekanizması	18
Şekil 2.8.	Varikoselde toplardarin anormal genişmesi.....	23
Şekil 2.9.	Varikozel damar fizyolojisi ve anatomisi	26
Şekil 2.10.	Varikoselde toplardamar kapakçıklarına bağlı geri akış mekanizması..	29
Şekil 2.11.	Hücrel reaktif oksijen türevleri kaynakları	32
Şekil 12.	Spermatozoa mitokondriyal membran potansiyeli ve ROS.....	34
Şekil 4.1.	Normal ve varikozel hasta gruplarında konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması	45
Şekil 4.2.	Normal ve varikozel hasta gruplarında motilite değerlerinin karşılaştırılması	46
Şekil 4.3.	Normal ve varikozel hasta gruplarında morfoloji değerlerinin karşılaştırılması	48
Şekil 4.4.	Asidik anilin mavisi boyama	49
Şekil 4.5.	Normal ve varikozel hasta gruplarında Anilin blue (mavisi) (+) değerlerinin karşılaştırılması.....	50
Şekil 4.6.	Acridine orange (turuncusu) boyama.....	51
Şekil 4.7.	Acridine orange(turuncusu) boyama.....	51
Şekil 4.8.	Normal ve varikozel hasta gruplarında acridine orange (turuncusu) % değerlerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.11.	Nitroblue tetrazolium boyama mavi (pozitif) boyama.....	55
Şekil 4.12.	Nitroblue tetrazolium boyama mavi (pozitif) boyama.....	55
Şekil 4.13.	Nitroblue tetrazolium boyama	56
Şekil 4.14.	Varikozel ve normal hasta gruplarında Nitroblue Tetrazolium ile boyanmış sperm anormal mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi	57

TÜRKÇE ÖZET VE ANAHTAR KELİMELELER

Avcı, A. (2019) Varikosel Olgularında Semen Oksidatif Stres Ürünleri ve Antioksidanları İle Birlikte Sperm Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Değerlendirilmesi. Yüksek lisans Tezi, Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul.

Günümüzde infertilite sebebi ile kliniğe başvuran çiftlerde yaygın olarak görülen varikosel, testiküler toplardamarın anormal genişleşmesi sonucu testisten çıkan kirli kanın geri akışına neden olan varisleşmedir. Varikosel etiyolojisi ile aşırı miktarda artan oksidatif stres hücresel homeostazı bozarak sperm DNA'sında fragmentasyon ve maturasyonu, anormal kromatin paketlenme ve mitokondriyal hasara neden olup erkek infertilitesi ile sonuçlanmaktadır. Bu çalışmada amaç varikoselli ve normal olgularda spermatozoada oksidatif stres ilişkili mitokondriyal membran potansiyeli, DNA fragmentasyonu, kromatin kondensasyonu ve sperm maturasyonuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada; Biruni Üniversite Hastanesi Üroloji polikliniğine başvuran hastalardan varikoselli (n:24) ve normal hasta gruplarında (n:24) WHO kriterlerine uygun standart semen analizi uygulanarak ardından Anilin blue (mavisi) boyama yöntemi ile sperm maturasyon defekti, Acridine orange (turuncusu) boyama yöntemi ile sperm DNA fragmentasyon hasarı, Chromomycin A3 boyama yöntemi ile sperm kromatin kondensasyonu ve Nitroblue tetrazolium boyama ile oksidatif stresin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi değerlendirildi. İki grup arasındaki verilerin değerlendirilmesi student-t testi analizi ile yapılarak karşılaştırıldı.

Bu tez çalışmasına göre varikoselli ve normal hasta gruplarında sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi açısından varikosel hasta istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Karşılaştırılan iki grup arasında DNA fragmentasyonu, sperm maturasyonu, kromatin kondensasyonu ve mitokondriyal membran potansiyeli açısından anlamlı farklılık bulunmuş olup, varikosel kaynaklı oksidatif stresin mitokondriyal membran potansiyeline etkisi belirlenmiştir ($p<0,05$).

Sonuç olarak varikozel hasta grupları sperm DNA hasarı ve anormal mitokondriyal membran potansiyeli açısından normal hasta grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiş, varikozel kaynaklı oksidatif stresin negatif etkisi ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: varikozel, oksidatif stres, Nitroblue tetrazolium, sperm mitokondriyal membran potansiyeli



İNGİLİZCE ÖZET VE ANAHTAR KELİMELER

Avcı, A. (2019) Presentation of Sperm Mitochondrial Membrane Potential with Semen Oxidative Stress Products and Antioxidants Together in Varicocele Cases. Master Thesis, Biruni University Institute of Graduate Education, Istanbul.

Varicocele, commonly seen in couples presenting to the clinic because of infertility, is the varicocele that causes the backflow of dirty blood from the testis as a result of abnormal expansion of the testicular vein. Excessive oxidative stress caused by varicocele etiology disrupts cellular homeostasis, causing fragmentation and maturation of sperm DNA, abnormal chromatin packaging and mitochondrial damage, resulting in male infertility. The aim of this study was to investigate the effects of oxidative stress-related mitochondrial membrane potential, DNA fragmentation, chromatin condensation and sperm maturation in spermatozoa in varicocele and normal cases.

In this study; Biruni University Hospital Urology outpatient clinic varicocele patients (n: 24) and normal patient groups (n: 24) according to WHO criteria standard standard semen analysis was applied, followed by aniline blue (blue) staining method with sperm maturation defect, Acridine orange (orange) staining method sperm DNA fragmentation damage, sperm chromatin condensation with Chromomycin A3 staining method and the effect of oxidative stress on mitochondrial membrane potential with Nitroblue tetrazolium staining were evaluated. The evaluation of the data between the two groups was compared with student-t test analysis.

According to this thesis, varicocele patients were found statistically different in terms of sperm concentration, motility and morphology in varicocele and normal patient groups ($p < 0.05$). There was a significant difference between two groups in terms of DNA fragmentation, sperm maturation, chromatin condensation and mitochondrial membrane potential, and the effect of varicocele induced oxidative stress on mitochondrial membrane potential was determined ($p < 0.05$).

Varicocele patient groups were found to be higher in sperm DNA damage and abnormal mitochondrial membrane potential than normal patient group, and negative effects of varicocele induced oxidative stress were revealed.

Key words: varicocele, oxidative stress, Nitroblue tetrazolium, sperm mitochondrial membrane potential



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, çiftlerin korunmasız ve düzenli olarak bir yıllık cinsel birleşme sonrası gebeliğin gerçekleşmemesi durumudur (Agarwal ve ark., 2007). İnfertilite etiyojisi çok faktörlü olup, vakaların %50'si erkek faktörü, erkek-kadın kombinasyonlu infertilite %20'sini oluşturmaktadır(Winters ve ark., 2014). Erkek infertilitesinin temelinde üreme hücresi olan spermin üretimi ve kalitesi etkindir. Fertilite değerlendirme semen analizi ile başlamakta, sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisi analiz edilmektedir(Bonde ve ark., 1998).

Erkek üreme hücresi spermin üretimi steroid hormonların sentezlenmesiyle desteklenerek testiste olup, spermatogenezi tetikleyen Sertoli hücreleri ve testesteron üretimi ile hormonal dengenin sağlanmasında görevli olan Leydig hücreleri ile gerçekleştirilir.

Varikosel, pampiniform pleksus toplardamarının anormel genişmesi sonucu kirli kanın testiste havuzlanmasına neden olan damar varisleşmesidir. İnfertilite nedenli vakaların %15'inde temel faktör olan varikosel, primer erkek infertilitesindeki oranı %40'a kadar artmaktadır(Pasqualotto ve ark., 2005). Varikosel etiyojisi, sağ ve sol testiküler venler arasındaki anatomik farklılıklar, spermatik toplardamar kapakçıklarının fonksiyonel eksikliği ya da kaybı ya da sol renal venin anatomik sıkışması sonucu renal vendeki genişleme kaynaklı olabilmektedir(Sheehan ve ark., 2014).

Artan testiküler sıcaklık, hipoperfüzyon, testiküler hipoksi, renal ve adrenal metabolitlerin ters yönde akışı ve oksidatif stres varikosel patofizyolojileridir. Kirli kanın testise geri dönmesi ile artan skrotal sıcaklık, var olan venöz arter kanının dışarı çıkarak soğuk arter kanı ile vücut sıcaklığından 1-2 derece düşük olması spermatogenez için gerekli optimal sıcaklığın korunmasını sağlar(Dahl ve ark., 1959). Renal ve adrenal metabolitlerin testise geri akışı ise yeteri kadar oksijene sahip olmayan çevresel şart meydana getirerek damar iç basıncını arttırmakta, skrotal oksijen miktarı azalmaktadır. Testis yapısı içerisinde farklılaşan ortam koşullarından etkilenen Leydig hücreleri endokrin görevinde eksikliklerle hormonal dengesizlikler meydana gelir(McClure ve ark., 1991).

Aerobik hücrelerin, hücrel bileşenleri okside ve perokside ederek meydana gelen süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\bullet OH$) gibi metabolizma ürünleri reaktif oksijen türevleridir(Alkan ve ark., 2018). Kararsız serbest radikaller, reaktif substrat ürünleri ile tepkimeye girerek farklı hücrel savunma ve sinyalleşme mekanizmalarında rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin düşük seviyeli oranlarda hücrel mevcudiyeti oosit füzyonu, akrozomal reaksiyon, kapasitasyon gibi fizyolojik olayların sürdürülmesinde etkilidir(Zalata ve ark., 2004).

Antioksidanlar, enzimatik ya da enzimatik olmayan savunma mekanizması ile germ hücrelerini korur. Reaktif oksijen türevlerinin hücrel kontrolü de antioksidan sistemi tarafından gerçekleştirilir. Reaktif oksijen türevlerini işlevsel olarak nötralize edip indükleyerek hücrel serbest radikal homeostazını sağlar.

Aşırı reaktif oksijen üretimi ya da antioksidanların işlevsek eksikliği ya da yokluğu sonucu meydana gelen reaktif oksijen türevleri ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik oksidatif strestir (Aitken, 2011). Hücrel nitrik oksit (NO), 8-hidroksi -2-deoksiguanozin (8-OHdG), heksanoil-lizin (HEL) gibi reaktif oksijen türevleri ile glutamat peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi antioksidan kapasitesi hücrel seviyeleri oksidatif stres belirteçleridir(Sakamoto ve ark., 2008).

Varikosel etiyolojisi sonucu kirli kanın testise dönmesi ile farklılaşan testiküler ortam hücrel homeostazın bozulması ile testiküler oksidatif stres meydana gelir. Oksidatif stres spermatogenezi etkileyerek anormal semen parametreleri ve hasarlı sperm üretimine neden olmaktadır. Bozulan spermatogenez ile birlikte düşük total sperm sayısı, motilitede azalma, morfolojik anomalilerin artan oranları meydana gelir. Azalan testiküler hacim ile semen parametreleri doğru orantılıdır(Agarwal ve ark., 2016)(MacLeod, 1965).

Oksidatif stres sperm DNA nukleer yapıdan hasarlara, DNA kırıkları, kromozomal delesyonlar, kromatin paketlenme anomalileri, maturasyonda duraksamalara neden olmaktadır. DNA bütünlüğü fertilizasyonda rol oynarken, kötü semen parametreleri ile yakından ilişki göstermektedir. Matur olmayan sperm oranları varikoselli ve infertil hasta gruplarında daha yüksek oranda görülür(Agarwal ve ark., 2007). Spermde meydana gelen DNA hasarının temelinde anormal kromatin

paketlenme, mitokondriyal membran potansiyeli farklılığı ve apoptoz mekanizmaları etkilidir(Santana ve ark., 2017; Dieamant ve ark., 2017). Spermatozoanın boyun kısmında yer alan ve ATP üretiminden sorumlu olan mitokondri organeli anormal reaktif oksijen türevlerine maruz kaldığında mitokondriyal fonksiyonel kayıpları meydana gelerek, spermde azalan motilite oranları ile sonuçlanmaktadır(Dieamant ve ark., 2017).

Bu çalışmada varikosel ve normal grupların konsantrasyon, motilite, morfoloji gibi semen parametreleri karşılaştırılarak, uygulanan boyama yöntemleri ile iki grup arasında DNA fragmentasyonu, sperm maturasyonu, kromatin kondensasyonu ve mitokondriyal membran potansiyeli bakımından farklılıklar incelenerek, varikosel kaynaklı oksidatif stresin spermin fonksiyonel ve DNA kalitesine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE

İnfertilite, çiftlerin korunmasız ve düzenli olarak gerçekleştirdiği cinsel birleşme ile bir yılın sonunda gebeliğin gerçekleşmemesi durumudur. Kadın yaşının 35'ten büyük olduğu durumda bu süre altı aya kadar inmektedir. Yapılan araştırmalarda üreme popülasyondaki çiftlerin %15-20'sinin infertiliteden etkilendiği bilinmektedir (Agarwal ve ark., 2007). İnfertilite erkek ve kadın faktörlerine ek olarak ikisinin kombinasyonu şeklinde meydana gelebilmektedir. Erkek faktörlü infertilite genellikle vakaların %50'sinde görülürken, kadın faktörü ile birlikte %20'sinde etkili olmaktadır(Winters ve ark., 2014).

Tablo 2.1. İnfertilite etiyolojisi

Faktörler	Oranları
Kombine faktörler	40
Erkek faktörü	26-30
Ovulasyon fonksiyonu	21-25
Tubal faktörler	14-20
Diğer (servikal faktörler, uterin anomaliler vb.)	10-13
Açıklanamayan	25-28

Erkek infertilitesi çok faktörlü olup, vakaların %30-40'ı ise idiyopatik erkek infertilitesi olarak tanımlanır(Jungwirth ve ark., 2015). Temel infertilite nedenleri anatomik ya da genetik anomaliler, nörolojik hastalıklar, enfeksiyonlar, hormonal düzensizlik ve yaşamsal faktörler en genel görülenler arasındadır.

Genetik nedenler infertilite vakalarının %15'inde etkili olurken, kromozomal anomali, tek gen mutasyonları, poligenik ve multifaktöriyel defekt olan Y kromozom mikroleksyonu gibi faktörleri içermektedir(Peterlin ve ark., 2002; Horst ve ark.,

1997; Renee ve ark., 1995; O'Flynn ve ark., 2010). Yaşam tarzı önemli infertilite nedenleri arasında olup, artan stres ile azalan libido oranları arasında ilişki olduğu belirlenmiştir. Risk faktörleri arasında sigara ve tütün kullanımı, alkol tüketimi, obezite, ileri yaşın etkin olduğu bilinmektedir(Gaur ve ark., 2010; Quinn ve ark., 2009).

İnfertilitede etkin olan faktörlerin temelinde sperm üretimini ve kalitesini etkilemeleri bulunmaktadır. Erkek infertilitesinde değerlendirme anamnez ve fiziksel muayene ile başlamaktadır. Bu değerlendirme aşamasında üreme ve cinsel geçmiş, genel medikal ve cerrahi hikaye, risk faktörleri ve yaşam tarzına ek olarak aile hikayesi de dikkate alınmaktadır. Laboratuvar değerlendirmesi Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO, 2010) belirlediği standartlara göre temel semen analizi ile devam etmektedir.

Tablo 2.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) referanslarına göre semen analizi değerleri

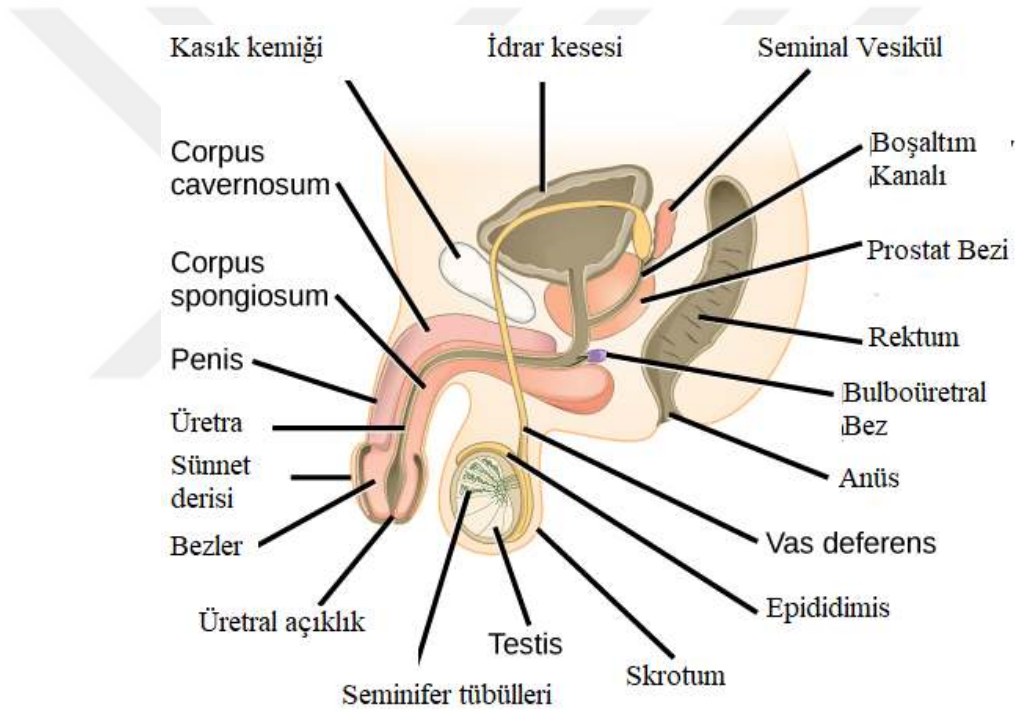
Volüm	≥1.5 mL
Ph	≥7.2
Sperm konsantrasyonu	≥15 milyon/mL
Total sperm sayısı	≥39 milyon
Total motilite	≥ %40
Progresif motilite	≥ %32
Canlılık	≥ %58
Normal morfoloji	≥ %4
Lökositler	<1 milyon/mL

Semen analizinde temel incelenen faktörler sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisi değerlendirilir. Erkek faktörlü infertilite anormal semen parametrelerine bağlı düşük sperm sayısı ve azalan motilite ile ilişkilidir. Ancak yapılan araştırmalar sonucu normal sperm parametrelerine sahip erkeklerin fertilitayla karakterize

olmadıkları, semen analizinin fertil ve infertil bireyler arasında ayırım yapmada tek başına yeterli olmadığı kanıtlanmıştır(Bonde ve ark., 1998).

2.2. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, erkek germ hücresi üretimi ve steroid hormonlarının biyosenteziyle görevli olup, testisler, genital kanal sistemi, yardımcı genital bezler ve penisten meydana gelmektedir. Steroid hormonların sentezi ve spermatozoa üretimi testiste olup, genital kanal sistemi aracılığı ile üretilen gametler ile gerekli salgıların penise taşınması ve yardımcı genital bezler ise bu salgıların üretiminden sorumludur.



Şekil 2.1. Erkek üreme sistemi anatomisi

Kaynak: (Ürolinik Ürolojide Robotik Cerrahi Merkezi, 2018)

2.2.1. Testis

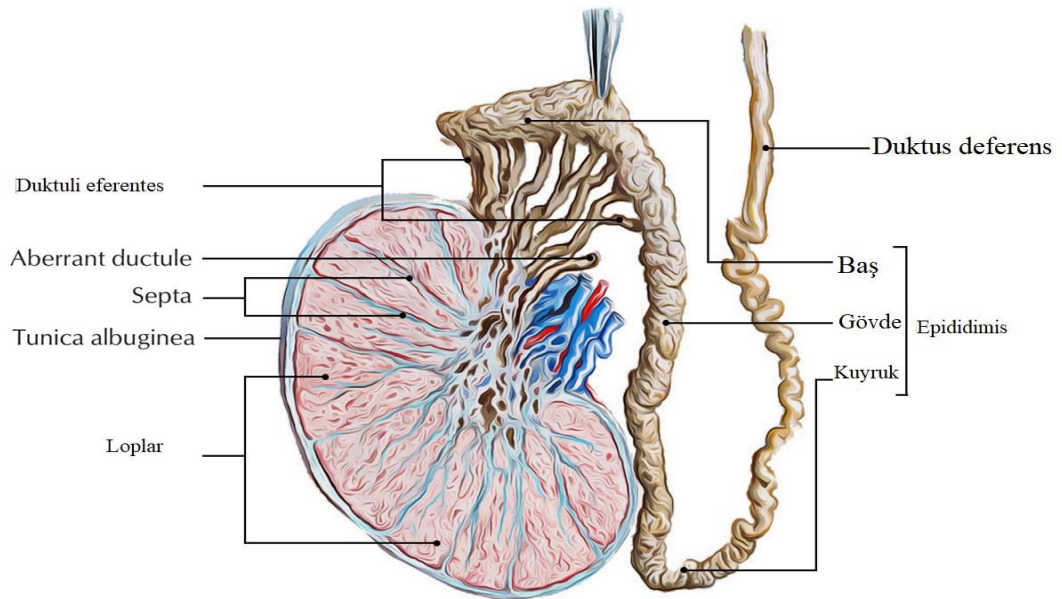
Testisler, skrotal kavite içerisinde sağ ve solda funikulus spermaticus'a yerleşmiş olan oval şekilli, en dış tabakası tunica vaginalis ile çevrili bir çift organdır. Testis, dıştan içe olmak üzere tunica vaginalis, tunica albuginea, tunica vasküloza tabakalarını içermektedir(Junqueira ve ark., 1998). Testis histolojik olarak 4- 5 cm boyutlarında ve 20-30 gram ağırlığındadır. Tunica albugineadan ayrılan ve ince fibröz

doku ile sarılı 250 tane primordial lobül içerirken, her lobül 1-4 seminifer tübül ve Leydig hücrelerinden oluşan bağ doku stroması içermektedir(Gunes ve ark., 2016).

Testiste gerçekleşen sperm üretiminden dolayı vücut dışına uzanan konumu önemli olup, vücut sıcaklığının 2-4 ° C altında sıcaklıkta olması önemlidir. Spermatogenez için gerekli sıcaklık 34-36 ° C'dir. Hipofiz ve ön hipofizde Gonodotropin Serbestleyici Hormon (GnRH), Folikül Stimulan Hormon (FSH), Lüteinleştirici Hormon (LH) yöneten testisin hacmi ile sperm üretimi arasında ilişki olduğu belirlenmiştir(Jensen ve ark., 1995).

2.2.2. Seminifer tübüller

Seminifer tübüller, testiste yaklaşık 250-1000 bulunan, somatik Sertoli hücreleri ve spermatogenetik hücreleri içeren, sperm üretiminden sorumlu kıvrımlı kanallardır(Kierszenbaum, 2006). Kıvrımlı tübüller rete testise bağlanarak epididimisin baş kısmına kadar uzanmaktadır. Seminifer tübülleri spermatogenezin önemli spermatogenetik hücreleri içerirken, somatik sertoli hücreleri ile bağlantılıdır(Junqueira ve ark., 1998). Kan damarları, lenfatik kanallar ile Leydig hücreleri tübüller arasında mevcuttur. Arasında ilişki olduğu belirlenmiştir(Jensen ve ark., 1995).



Şekil 2.2. Testis Yapısı ve Seminifer Tübüller

Kaynak: (Jensen ve ark., 2017)

2.3.1. Sertoli hücreleri

Seminifer tübüllerinin periferik bazal membranı ile başlayıp lümene kadar uzanan, epitelyum dokusunda bulunan destekleyici hücre tipidir(Eşrefoğlu, 2016). Spermatogenezde etkili olan hücre tiplerini destekleyen ve germ hücrelerinin etrafını fiziksel olarak sarıp yaşamsal fonksiyonlarını kontrol amacıyla sinyal molekülleri salgılamakla görevlidir. Seminifer tübüllerinin lümenine protein ve iyon bakımından zengin sıvı salgılar. Aynı zamanda sperm üretimi teşvik etmektedir.

Spermiyogenez sonunda oluşan rezidual sitoplazmik parçalarının yanı sıra anormal sperm fagositozunda etkilidir. Kan-testis bariyerini oluşturarak kan ile taşınan maddelerin germ hücresine ulaşmasını engeller(Eşrefoğlu, 2016; Kierszenbaum, 2006). Anti-Müllerian hormon (AMH) üretir. FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) Sertoli hücrelerini uyarak spermatogenezi tetiklemektedir(Gunes ve ark., 2016).

2.3.4. Leydig hücreleri

Testis dokusundaki intratübüler alanın bağ dokusuna yerleşen Leydig hücreleri embriyonik ve eşeyssel erkek gonadlarının gelişiminden sorumlu testosteron sekrete eden endokrin görevli hücrelerdir. Sekresyonundan itibaren direk kana verilen testosteron hipotalamusta GnRH ile ön hipofizden salgılanan LH (Lüteinleştirici hormon) ve FSH hormonlarının geri bildiriminden sorumludur(Gunesve ark., 2016)(Pierre ve ark., 2016). Pubertede sekonder eşey karakterlerinin gelişmesi ve ergin bireylerde bezlerin salgı aktivitelerinin sürekliliğinde etkilidir(Gartner ve ark., 2016).

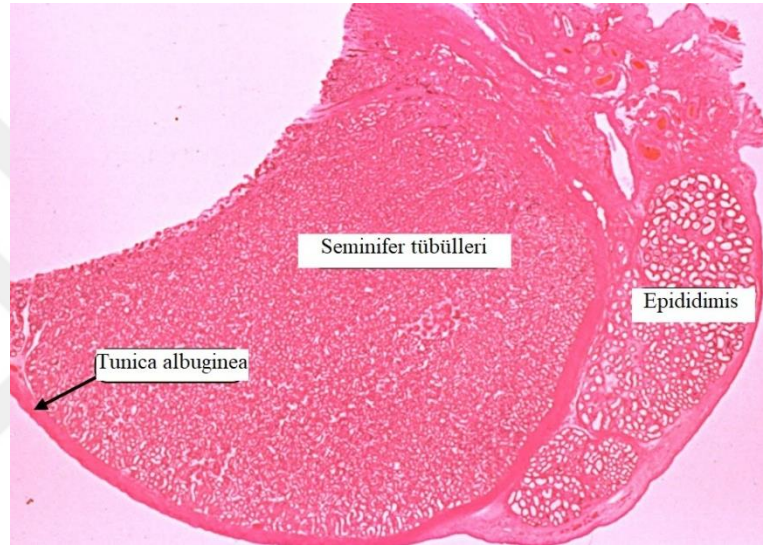
2.4. Erkek Genital Kanal Sistemi

Duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve üretradan meydana gelen erkek genital kanal sistemi testis tübüllerinde üretilen spermatozoonların penise taşınmasını sağlamaktadır.

Epididimal rete testis 20 kıvrımlı kanaldan meydana gelen duktuli efderentes, sahip olduğu bağ doku ile prizmatik epitel ve kubik hücreler ile oluşmaktadır.

Epididimisten çıkan spermler silyum ve kas hareketleri ile bu kanallar boyunca ilerlemektedir(Gartner ve ark., 2016).

4-6 m uzunluğa sahip duktus epididimis Duktus eferentes ile birleşerek epididimisi oluşturur. Kıvrımlı ve tek tüp anatomisine sahip epididimis testis arkası boyunca uzanmaktadır. Epididimis kanalı baş, boyun ve kuyruk kısımlarını içermekte, duktuli eferentesin Bağ dokusunun kan damarları ile birleşmesi ile gövdesi ve kuyruk bölgelerini meydana getirmektedir(Junqueira ve ark., 1998). Spermatozoonlar ileri hareket özelliğini epididimal kanaldan geçtikten sonra kazanmaktadırlar.



Şekil 2.1. Testis histolojisi ve epididimis

Kaynak: (yenibiyoloji.com, Erişim Tarihi: 23 Temmuz 2019)

Epididimal kuyruğun kalınlaşan kısmından meydana gelen duktus deferens, skrotumda bağ dokusu, kan damarları ve spermatik kord ile birleşerek kas yapılı tüp yapısıdır. Epididimal sonlanma ile abdominalden karın boşluğuna uzanarak mesanede ampulla yapısını meydana getirir. 40 cm uzunluğundaki kanal ampulla sonunda seminal vezikül kanalları ile birleşerek prostat yapısından üretraya açılır(Junqueira ve ark., 1998).

2.4.1. Penis ve üretra

Eretil dokudan oluşmuş penis, üretrayı çevreleyen, idrar ve semen için boşaltım organıdır. Korpus spongiosum üretrayı sararken erekte olduğu sırada işlevini sürdürmekte, penisin son kısmında yer alan kısmı ise yüksek oranda sinir uçlarına

sahip olmaktadır. Üretra mesaneden köken alan ve penisle birlikte dış ortama uzanan boşaltım kısmıdır(Eşrefoğlu, 2016).

2.4.2. Erkek genital sisteminin yardımcı bezleri

2.4.2.1. Prostat bezi

Mesannenin alt kısmında konumlanıp, rektum önünde olan prostat bezi kas ve bağ dokuları ile çevrili meydana gelen en büyük erkek genital yardımcı bezidir(Pierre ve ark., 2016). Semen salgılanmasına yardımcı olan prostat bezi fruktozca zengin seminal vesikül sıvısının sperm ile etkileşimini sağlar.

Salgılarını parasempatik indüklenme ile üretraya salgımlarken, ejakuların %20-30'luk kısmını meydana getirmektedir. Bazik salgıların yanı sıra asit fosfataz, prostatik antibakteriyel faktör, sitrik asit, proteolitik enzimler sekrete ederken, asidik vajinal ortamı nötrleyerek sperm hücrelerinin yaşamsal devamını sağlamaktadır.

2.4.2.2. Seminal vezikül

Kıvrımlı yapıda mesannenin arka kısmına doğru uzanan çift tübüler seminal vezikül bezi, semen hacmine yüksek oranda katkıda bulunan sekresyon ile görevlidir. Sperm mitokondrisinin ATP enerjisinin kaynağı seminal vezikül salgısında yüksek oranda fruktoz ve prostaglandin kaynaklıdır(Kierszenbaum ve ark., 2006). Seminal vezikül kanalları ampulladan geçerek sekresyon ürününü prostat bezinin son kısmına iletmektedir.

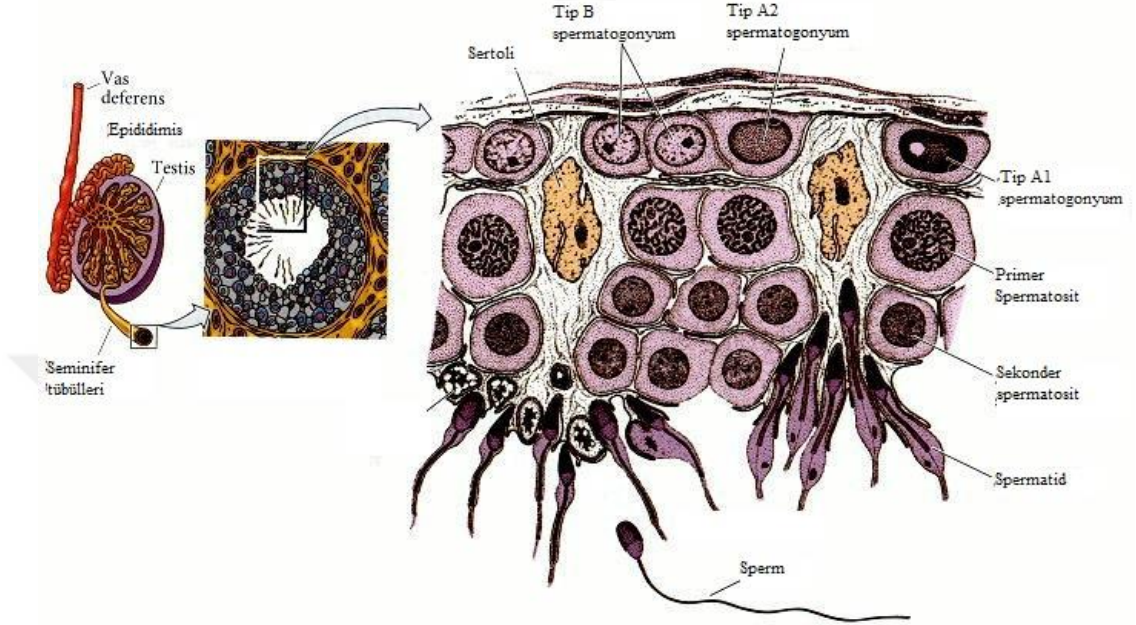
2.4.2.3. Bulboüretal bezler (Cowper bezleri)

Üretranın son kısmında yer alan iki adet bulboüretal bezden meydana gelen erkek genital salgı bezi, üretranın temizlenmesi için asit yapısını nötralize eden sıvı salgılamaktadır. Üretranın temizlenmesi ile görevli olan bez, galaktoz, galaktozamin ve siyalik asitten zengindir salgı sekrete etmektedir(Kierszenbaum ve ark., 2006).

2.5. Spermatogenez

Erkek gamet hücresi spermin, spermatogonyal kök hücrelerin hücresel mayotik ve mitotik bölünmeler ile pitüitar bez salgısı gonodotropinlerin etkisinde seminifer

tübüllerinde meydana gelmesi olayıdır(Mariotti ve ark., 2013; Ross ve ark., 2003). Germ hücrelerinin olgun sperm hücresi haline gelmesi aşaması dört farklı süreçten meydana gelir. Spermatogenez spermatogoninin olgun sperm hücresine dönüşmesini kapsar.



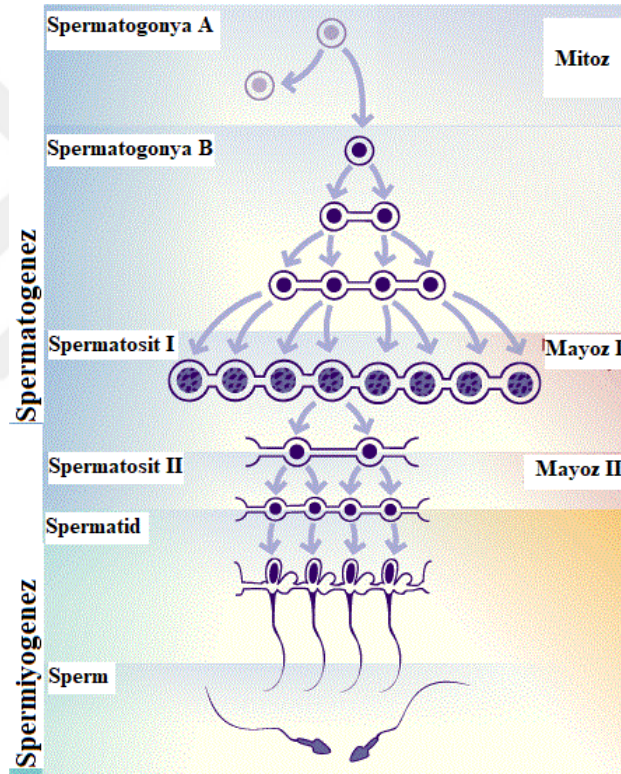
Şekil 2.2.Sperm hücresinin seminifer tübülleri ve Sertoli hücreleri arasındaki ilişki ile seminifer tübül lümenine taşınması

Kaynak: (Benoff ve ark., 2004)

Puberte ile başlayan spermatogenez hormonal etkenlerle birlikte yaşam boyu devam etmektedir. Spermatogonialar ergenlik aşamasına kadar testisteki seminifer tübüllerinde inaktif durumdadır. Spermatogenezin ilk aşaması diploid kromozomlu A tipi spermatogoninin mitoz bölünmeler geçirerek B tipi spermatogonileri oluşturur. B tipi spermatogoniler birincil spermatozitlerin öncü hücreleridir. Bu evre ergenlik aşamasına kadar hacimsel testis gelişimini meydana getirmektedir(Donnell, 2014).

Primer spermatozitler üretimi olan seminifer tübülleri içerisinde bulunan en büyük germ hücreleridir. Olgunlaşan öncü hücrelerin mayoz geçirmesi ile iki haploid sekonder spermatozit hücreleri oluşur. İkincil spermatozitler geçirdikleri ikinci mayotik bölünme sonucu ikincil spermatozitin yarısı büyüklüğünde ancak eşit büyüklükteki küresel dört tane spermatozidi meydana getirir.

Spermatositlerin I. Ve II. Mayoz evreleri arasında S fazı DNA sentezi görülmediği için haploit gametler meydana gelir. Spermatidler Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında bulunurlar(Boekelheid, 2005). Spermatidlerin hücresel ve genomik yapısının farklılaşması aşaması olan spermiyogenez spermatozoonlara dönüşümdür. Sitoplazmik azalma ile hücresel olarak farklılaşırken, genomik yapıda histon-protamin değişimi meydana gelir. Sertoli hücrelerinde meydana gelen bu evre golgi, akrozomal ve maturasyon evrelerinden oluşmaktadır. Hücre bölünmesinin gerçekleşmediği bu evrede genom karakterize hale dönüşürken, sitoplazma kaybolarak akrozom ve kuyruk gelişimi gerçekleşir(Gunes ve ark., 2016).



Şekil 2.3. Spermatogenez

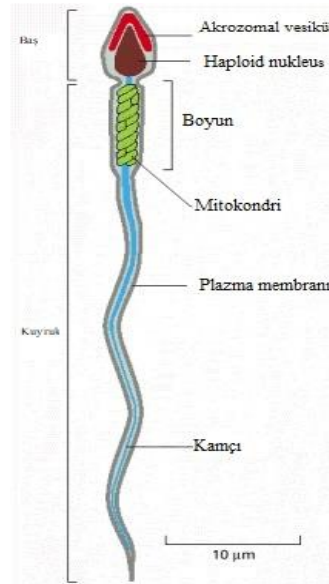
Kaynak: (Benoff ve ark., 2004)

Golgi evresi; sitoplazmik yapıda Golgi kompleksi, mitokondri, çift sentriyol, serbest ribozom ve endoplazmik retikulum mevcuttur. Akrozom bölgesi spermin ön kısmını belirlerken mitokondriler sitoplazma kenarına göç gerçekleştirir(Donnell, 2014). Plazma zarına yakın yerleşen mitokondriler ile birlikte akrozom zıt yönde hareket göstererek çekirdek arkasında konumlanır

Akrozomal evre; akrozomal vesikül ve granül çekirdeğin arkasında yer aldıktan sonra yayılarak akrozom adını alır. Hidrolitik enzimler içeren bu yapı zona pellisudayı sindirimle görevli lizozomal işleve sahiptir. Kamçı yapısının öncüsü sentriyolden kökenlenmektedir. Kamçı yapısının kalınlaşmış proksimal kısmı mitokondri bakımından zengindir. Hareket için etken alan orta parçadır(Gartner ve ark., 2016; Junqueira ve ark., 1998). Maturasyon evresi; somatik histonların (H1,H2A, H2B, H4) protaminlerle yer değiştirmesi evresidir. Arjinin ve lizince zengin protaminlerin oluşumu sonrası nükleozomlar kaybolarak düz kromatin lifler dizilmesi sırasında RNA sentezi durdurulur. Spermatidin olgunlaşma evresi sonucunda çekirdek uzamış ve yoğunlaşmış olup, lifler tamamen organize olmuş şekli ile tamamlanır.

Olgun sperm hücreleri son evre sonrası Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübül içerisine bırakılır. Morfolojik olarak olgun spermler fonksiyonel olarak dölleme kapasitesine sahip değilken, epididimde hareket yeteneğini kazanmaktadırlar. Spermatogenez 64 gün sürerken, ejakulatta olgun spermatozoa görülmesi 74 günü almaktadır.

Olgun bir spermatozoa baş, boyun ve kuyruk bölümlerinden oluşan yaklaşık 60 µm uzunluğunda aktif hareketli hücrelerdir(Alberts ve ark., 2002).



Şekil 2.4. Sperm hücresi yapısı

Kaynak: (Alberts ve ark., 2002)

Sperm başı, yapıdaki en büyük kısmı meydana getirirken, haploit nükleusu içermektedir. Ayrıca nükleer membran ve akrozomal kısmı da içeren baş kısmının %40-70'i akrozom adını almaktadır(Alberts ve ark., 2002). Akrozom lizozomal enzimler bakımından zengin, hyaluronidaz, aril sülfataz, akrosin, asit fosfataz, nöroaminidaz gibi hidrolitik enzimler içerir.

Akrosin en önemli enzim olup, fertilizasyon aşamasında korona radiata ve zona pellisudayı geçmeyi sağlamaktadır. Baş ve kuyruk kısmının birleştiği yere boyun denir. Orta, esas ve son parça kısımlarından oluşan spermin kuyruk kısmı hareketi sağlarken fertilizasyon için oosite ulaşmayı kolaylaştırır. Kuyruk 45 µm uzunluğunda ve 0.4-0,5 çapına sahiptir(Alberts ve ark., 2002). Kuyruğun orta kısmında yer alan mitokondrice zengin alan hareket için gerekli enerjinin ATP kaynağını oluşturmaktadır.

2.6. Semen Toplanması

Erkek fertilitésinin ilk değeriendirme aşaması semen analizi olup, en az 72 saatlik cinsel perhiz sonrası masturbasyonla elde edilen semenin incelenmesidir. Seminal analiz, spermatozoa, seminal sıvı ve sperm dışı hücreler ile diğer faktörlerin analiz edildiği testtir. Cinsel perhiz süresi 7 günü geçmemeli, semen steril kaba alınır.

Semen örneği için uygun kriterleri içeren özel hazırlanmış odalar mevcut olmalıdır. Steril, geniş ağızlı, poliprolen, polietilen ve vücut ısısında kaplar kullanılır. Normal erkek bireylerde cinsel perhiz günü başına 0.4 ml volüm ve konsantrasyon 10-15 milyon/ml artmaktadır. Laboratuvar ortamında alınan semen örneği en geç 30 dakika içinde incelenir ve ilk makroskobik değeriendirilmeler yapılır.

2.7. Makroskobik İnceleme

Likefaksiyon süresi: Semen analizinin makroskobik incelemesi likefaksiyon süresinin ardından başlamaktadır. Likefaksiyon süresi oda sıcaklığında 15-60 dakika arasında olabilmektedir. Normal semen örneğinin likefaksiyonu 37°C'de 10-20 dakikada gerçekleşir. Likefaksiyonun temelinde prostat spesifik antijen (PSA) ve

normal prostat fonksyonu yer almaktadır(Alberts ve ark., 2002). En geç 60 dakika içinde gözlenmeli olan numune dehidratasyon ve farklılaşan ısı ortamlarından dolayı olumsuz etkilenmesi en aza indirilmelidir(WHO, 1992). Likefaksiyon süresi spermatozoon hareketinin gözlenmesi için önemli faktördür.

Görünüm: Normal likefiye olmuş semen örneği homojen ve gri-opak olarak gözlenir. Sarımsı ya da krem renkte olan semen numunesi perhiz süresi ve enfeksiyonel durumlara bağlı olarak değişmektedir.

Koagülasyon: Ejakule olan spermin sıvı halden koagüle hale hızlı geçiştir. Koagülasyon nedeni semende mevcut veziküler ve epididimal proteinlerdir.

Hacim: Cinsel perhiz süresinin uygun olması durumunda normal semen numune hacmi 1,5-6 ml'dir.

Viskozite: Semen akışkan duruma gelmesine karşı direnç olarak bilinmektedir. Numunenin akışkan duruma gelmesinde temel proteolitik enzimler prostattan sekrete edilir. Sekrete edilen enzimler semenin koagülasyonunu oluşturmaktadır. Yüksek vizkoziteli semen örneği sperm yapısını ve hareketini olumsuz etkileyerek sperm üzerinde negatif etki yaratmaktadır.

pH: Normal semen pH'ı seminal vezikül sekresyonu kaynaklı alkali olmalı, uygun pH aralığı 7,2 ve 8.0 arasındadır.

2.8. Mikroskopik İnceleme

Mikroskopik inceleme sonucu WHO paramterlerinin içerdiği kriterler açısından değerlendirilerek yapılır. Semen analizinin en önemli kısmı olan mikroskopik incelemede sperm sayısı, hareketlilik, morfoloji ve yuvarlak hücre sayısı oranları belirlenir. Makroskopik inceleme sonrası semen numunesinden 10 µl Makler sayım kamerasına alınarak faz-kontrast mikroskobu ile incelenir.

Konsantrasyon: Sperm konsantrasyonu toplam ejakulatın 1 mL'indeki sperm sayıdır. Semen numunesindeki total spermatozoa sayısının Makler sayım kamerası ile belirlenmesidir. Ejakulattaki sperm sayısı ile erkek infertilitesi arasında yüksek korelasyon bulunmaktadır. WHO parametrelerine göre fertil bireyler için konsantrasyon alt limiti 15 milyon/mL'dir. Konsantrasyonun <15 milyon/mL olduğu

durumlarda örnek oligozoospermik, <5 milyon/mL ise şiddetli oligospermi ile tanımlanmaktadır. Semende hiç sperme rastlanmadığı mikroskopik incelemede numuneye 3000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi uygulanarak pellette sperm incelemesi yapılmalıdır. İşlem sonucu sperme rastlanmayan vakalarda azospermi tanısı konulabilir(Olshan ve ark., 1995).

Konsantrasyonun belirlenmesi Neubauer (hemositometre), microcell, Makler veya Horwell sayım kameraları kullanılır. Sayım kameraları aynı zamanda sperm morfolojisi ve hareket değerlendirmesi için de kullanılmaktadır(WHO, 2010). Ejakulattaki total sperm sayısı sperm hacmi ve sperm konsantrasyonunun çarpımı ile hesaplanmakta, örnekler x400 büyütme ile incelenmektedir.

Motilite: Sperm konsantrasyonu belirlenirken sperm hareketliliği de incelenebilmektedir. Semendeki total sperm konsantrasyonundaki hareketli spermlerin yüzdeleri motiliteyi ifade etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün hareketlilik sınıflandırmasına göre;

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

Hızlı hareketli sperm sayısı (a+b) tanımlı olup %40'tan az olması sperm motilite sorunu olduğunu belirlemektedir. Motilitenin %0 olduğu durumlarda vitalite (canlılık testi) uygulanmalıdır. Vitalite testinde sperm canlılık yüzdesi %70'ten büyük olmalıdır.

Morfoloji: Semen analizinde önemli kriter olan sperm morfolojisi spermin normal baş ve kuyruk yapısında sahip olup olmadığının belirlenmesidir. Baş kısmı akrozom, post akrozomal parça ve nukleustan oluşur. Yapısal olarak düz oval şekilde olmalı, akrozomal kısım tüm baş kısmının yalnızca ön kısımda %40-%70'inde bulunmalıdır(B.Peterlin ve ark., 2002).

Boyun sperm hareketi için gerekli mitokodriyal kısmı oluştururken morfolojik olarak silindir şekilli, Eni yaklaşık 1 µm, boyu ise başın uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır. Kuyruk, orta, ana ve son parçadan oluşurken düz yapısı ve son kısmının daha ince olması morfolojisine sahiptir. Uzunluğu 45 µm olan kuyruk kısmı sperm motilitesinde önemli rol oynamaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre normal morfolojik sperm oranı %30 olması gerekirken, Kruger kriterlerine göre normal morfoloji oranı %4'ten büyük olması gerekir(Kruger ve ark., 1988). Normal morfolojili sperm oranı %5-14 arasında iyi prognoz (G pattern) olarak belirlenirken, kötü prognoz (P pattern) oranı %4'ten az durumlarda tanımlanmaktadır.

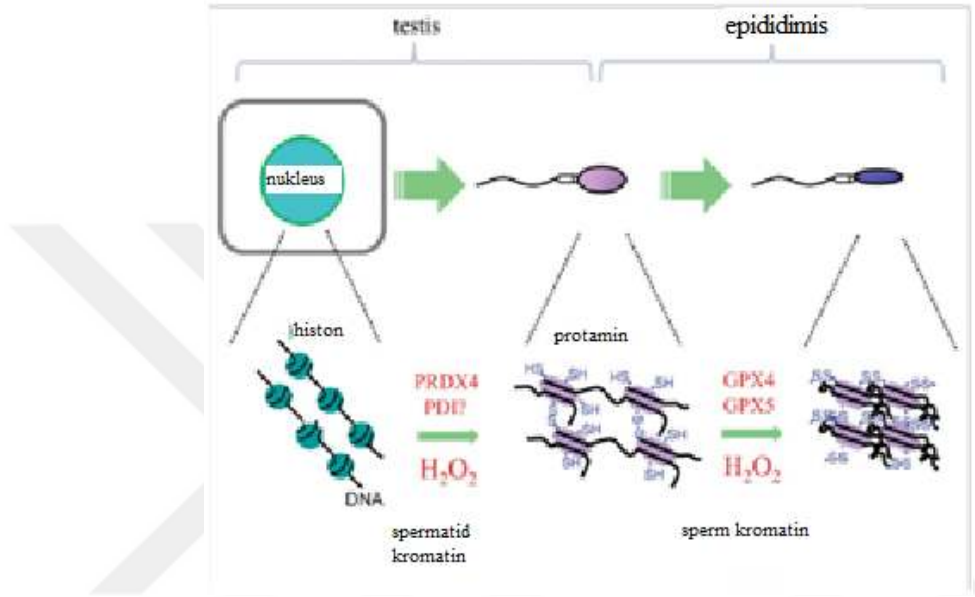
Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre semen analizi değerlendirme kriterleri

Parametreler	Alt Limit Değerleri
Semen Volümü (mL)	≥1.5 mL (1.4-1.7)
Konsantrasyon (10⁶ / ml)	≥15 milyon/mL (12-16)
Motilite	%40 (a+b+c) (38-42)
Progresif Motilite	%32 (a+b) (31-34)
Vitalite (canlı sperm,%)	≥58 (55-63)
Morfoloji	≥%4 (3-4)
pH	≥7.2
Lökosit	≤1 milyon

2.9. Sperm DNA Yapısı

Spermiyogenez, sperm hücreleri nükleer yapısının somatik hücre DNA'larından farklılaşarak kromatinin sıkı paketlenmesi ile oluşur. Somatik hücre DNA'sı histon bakımından zengin ve gevşek kromozomal yapı mevcuttur(Balhorn, 2007). Bu somatik tip histonların bazik nükleer proteinler olan protaminler ile yer değiştirmesi olayıdır.

Protaminler arjinin bakımından zengin, ileri spermatogenez evresinde sentezlenen ve histonların yarısı büyüklüğündeki proteinlerdir(Bedford ve ark., 1974). Spermatogenezin son aşamasında sperm nükleusunda DNA'nın nukleus membranına bağlanarak DNA halka bölgesinin oluşturması paketlenmenin başladığını göstermektedir(Dieamant ve ark., 2017).



Şekil 2.5. Sperm protaminasyon mekanizması

Kaynak: (Fujii ve ark., 2014)

DNA kümelenmesini oluşması sonrasında etkili proteinler ve enzimler ile somatik histonların protaminlerle yer değiştirmesi gerçekleşir. Kromozomal yerleşimlerin belirlenmesi ile sperm DNA mitotik kromozomlardan altı kat daha yoğun olarak nükleer yapının tamamını içermektedir(Champroux ve ark., 2016).

Epididimde olgunlaşan spermin son aşaması olarak kromatin organizasyonu meydana gelir. Paketlenme geçiş nükleer proteinleri (transition nuclear protein- TP) mekanizmada görev almaktadır(Hamilton ve ark., 2018).

TP1 ve TP2 geçiş proteinleri DNA bütünlüğünü koruyarak, önce yerleşimleri protaminlerin daha doğru yerleşimini sağlar(Bianchi ve ark., 1996). Histonların uzaklaştırılması endonukleaz topoizomerez-II ile olur. P1 protamin ve P2 protamin olmak üzere iki farklı protein grubu mevcuttur. DNA ipliklerinden birini keserek

çıkarılan kısma TP1 girerek DNA'nın fosfat gruplarıyla etkileşimi sağlanır. DNA ligaz TP1'in bağlanmasını sağlayarak protaminlerin üzerlerine tutunması ve aralarında dilsülfid bağlarının oluşması sağlanır(Santana ve ark., 2017).

Protaminler DNA'ya bağlanmadan önce fosforile olurlar. Nükleoprotamin yapısının oluşması ile defosforile olarak, sisteince zengin kısımlar içerdiğinden meydana gelen iç ve ara protamin disülfid çapraz bağları sayesinde kromatinler kendi içerisinde kondanse olurlar(Champroux ve ark., 2016).

Dilsülfid bağları nükleoprotamin yapısının daha kararlı hale gelmesini sağlar. Sperm nukleusunda P1 ve P2 protamin miktarları birbirine yakındır. P1/P2 oranının yaklaşık 1 olması beklenirken, oranın 1'den farklılaşması sperm anomalileri ile ilişkilidir(Boekelheide, 2005).

Sperm kromozomal paketlenmenin amacı, somatik hücre kromatin yapısından farklı olarak genomun daha sıkı paketlenerek genetik bütünlüğün korunması, sperm kromatin yapısının dışı ve erkek üreme kanallarından hasarsız geçerek genomun döllere sağlıklı aktarımını sağlamaktır(Balhorn, 1982).

2.10. Sperm DNA Hasarı

Sperm DNA hasarı, fragmentasyon, hatalı kromatin paketlenmesi, apoptoz kaynaklı anomaliler ile spermatogenezde DNA tamir mekanizmalarının eksikliği sonucu meydana gelmektedir(Nagata, 2000). Sperm DNA hasar mekanizmasının temelindeki neden ve mekanizmalarının tam olarak belirlenememesi ile birlikte radyasyon, genital enfeksiyonlar, varikosel gibi çevresel faktörlerin yanı sıra anormal kromatin paketlenmesi, anormal mitokondriyal membran potansiyeli, apoptoz ve reaktif oksijen türevleri biyolojik etkenleri meydana getirmektedir(Erimşah ve ark., 2008; Agarwal ve ark., 2009).

2.10.1. Sperm DNA hasarı belirleme yöntemleri

2.10.1.1. Anilin blue (mavisi) boyama

Anilin blue(mavisi), immatur sperm ile karakterize olan histonlar ile sperm maturasyonu belirteci olan histon-protamin değişimi defektlerini belirleyen asidik boyama metodudur(Hammadeh ve ark., 2001; Auger ve ark., 1990; Dadoune ve ark.,

1988; Terquem ve ark., 1983). Sperm hücreleri kromozomları, DNA'nın ve somatik histonların yerini alan protaminlerin sıkı paketlenmesi ile bir kompleks yapısı spermiyogenez sırasında meydana gelir (Braun, 2001)(Hofmann ve ark., 1991).

Nükleer histon proteinleri bölgelerinde yüksek oranda lizin bulunmakta olan immatur spermlere göre matur sperm nükleer yapısında protaminli bölgeler sistein ve arjinince zengindir (Hammadeh ve ark., 1996). Anilin mavisi boyama yöntemi de histonlarca zengin nükleer sperm yapılarında lizin bölgelerine bağlanarak kromatin kondensasyonunun belirlenmesinde kullanılır(Dadoune ve ark., 1988).

Kromatin kondensasyonuna bağlı sperm maturasyonu tüm fertilité olgularında önemli olduğu gibi yapılan çalışmalarda sperm kromozomal anoploidi, sperm DNA ve kromatin bütünlüğü gibi parametrelerde anomali oranlarının yüksek olduğu semen örneklerinde fertil grup ile karşılaştırıldığında tekrarlayan spontan düşüklerin görüldüğü infertil çiftlere ait olduğu belirlenmiştir (Talebi ve ark., 2012; Virro ve ark., 2004; Carrell ve ark., 2003; Evenson ve ark., 1999).

2.10.1.2. *Acridine orange (turuncusu) boyama*

Acridine orange(turuncusu) testi, asit koşullarına dayanan ve amacı DNA normalitesinin değerlendirilmesi olan basit florasan mikroskopik prosedürdür. Memeli nükleoproteinlerinin histondan protamine yer değişimi seminifer tübüllerindeki spermiyogenezde sperm hücrelerinde sistein ve temel aminoasitlerden olan lizin, arjinin bakımından zengin olup somatik hücrelerden farklılık göstermektedir(Poccia D, 1986).

Epididimal taşıma sırasında protaminlerin sistein tiyolleri (-SH) oksitlenerek disülfit yapılarına (S-S) dönüşerek sperm nükleer kromatinin protamin formunun histon yapısından daha kararlı hale geldiği bilinmektedir(Bedford ve ark., 1974). Matür sperm DNA'sı S-S bağları bakımından zengin olup çift zincirli formu bakımından kararlıdır. Akridin oranj boyama sperm maturasyonunu gösterirken, boyama ile matür sperm çift zincirli doğal DNA'nın aralarına eklenen akridin oranj monomerleri ile yeşil florasan ışıma vermektedir(Acheson, 1973).

İmmatur sperm histonlu ya da düşük S-S bağları içeren denatüre DNA'ya sahip olduğunda Akridin Oranj monomerleri nuklusta bir araya gelerek kırmızı floresan ışığa göstermektedir(Hoshi ve ark., 1996).

Yapılan çalışmalarda, Birçok yazar, örnekte $\geq$ % 50 yeşil floresanın, infertil vericilerden alınan örnekte AOT için normal bir cut-off değeri olduğunu gözlemlemiştir. Sitometri ve SCSA Yazılım kullanılarak sperm kromatin yapı analizi (SCSA), Acridine orange(turuncusu)(AO) floresan boyama sonrası yoğunluğu ölçmede kullanılır. Kırmızı / kırmızı + yeşil oranı, DNA fragmentasyon indeksi (DFI%) olarak adlandırılan DNA fragmentasyonunun yüzdesini vermektedir(Evenson ve ark., 1999). SCSA değeri% 15 veya daha düşük DFI değerli semen örnekleri düşük seviyeli, % 15'ten büyük veya eşit % 30 DFI değerleri orta,% 30'dan fazla veya eşit DFI değerleri ise yüksek seviyede DNA fragmentasyonu olduğunu ifade etmektedir (Claassens ve ark., 1992).

2.10.1.3. Chromomycin A3 boyama

CMA3, sperm DNA'sının küçük oluşuna bağlanmak amacı ile protaminlerle rekabet içinde olup, gevşek paketlenmiş kromatinde protamin eksikliğini gösteren guanin-sitozin spesifik florokromdur (Bianchi ve ark., 1996). Chromomycin A3 boyama testinin uygulanma amacı sperm kromatin paketlenmesinde meydana gelen anormalileri ve protamini eksik DNA'yı göstermektir(Esterhuizen ve ark., 2000). DNA kalitesi, protaminizasyon, kondenzasyon ve sperm maturasyonu CMA3 tekniği ile gösterilmektedir(Iranpour ve ark., 2000). Spermiyogenez aşamasında sperm DNA histonları protaminlerle yer değiştirerek süpersarmal DNA ipliklerinin yoğunlaşması ve sperm kromatin yapısının yüksek oranda paketlenmesi ile sonuçlanmaktadır (Manicardi ve ark., 1995). Normal sürecinde devam etmeyen protaminizasyonda nükleer histonların varlığı devam ederken dekontenzasyon gerçekleşir (Lolis ve ark., 1996; Bianchi ve ark., 1993).

Kromatin paketlenmesinde anomali ile sonuçlanan sperm dekontenzasyonu azalan fertilizasyon oranlarına öncülük ederken IVF ve ICSI uygulamalarında başarısızlıkların olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır(Nasr-Esfahani ve ark., 2008; Sakkas ve ark., 1996; Lolis ve ark., 1996; Bianchi ve ark., 1996). Boyama sonrası sarı renkli ışığa veren sperm başları anormal kromatin paketlenmeye sahip

olup CMA3 testi bakımından pozitif (CMA3 +) kabul edilirken, sarımsak yeşil ışığa veren spermiler normal kromatin paketlenmeye sahip spermileri ifade ederken test bakımından negatif (CMA3 -) kabul edilir.

2.11. Anormal kromatin paketlenmesi

Sperm nükleusunun %15'lik kısmı DNA histon proteinleri tarafından paketlenmiş olup, tüm kromatin yapısı protaminler ile sıkı paketlenmiş durumdadır (Carrell ve ark., 2003; Aoki ve ark., 2003).

Kromatin yapısındaki bu histon ve protamin oranlarının farklılaşması infertil erkeklerde histonca zengin paketlenmenin arttığına göstergesidir(Tesarik ve ark., 2002; Aoki ve ark., 2003; Carrell ve ark., 2003). Disülfid çapraz bağları ile stabilitesi sağlanan kromatin histon paketlenmesinin artması genomun hasara uğrama oranını arttırdığı bilinmektedir. Histonca paketlenmiş kısımların daha gevşek yapıda paketlenmesi fertilizasyon ve embriyonik gelişim ile ilgili DNA dizileri alanları olduğu belirlenmiştir(Tesarik ve ark., 2002).

P1 ve P2 protaminleri yardımı ile sıkı paketlenen DNA iplikleri sıkı ve düzenli ilmekler oluşturarak sarılmıştır(Bianchi ve ark., 1996). P1/P2 oranının farklılaşması DNA hasarı oranları ile ilişkili olduğu, protamin genlerindeki mutasyonların infertil gruplarda daha yüksek olduğu belirlenmiştir(Tesarik ve ark., 2002).

2.12. Apoptoz

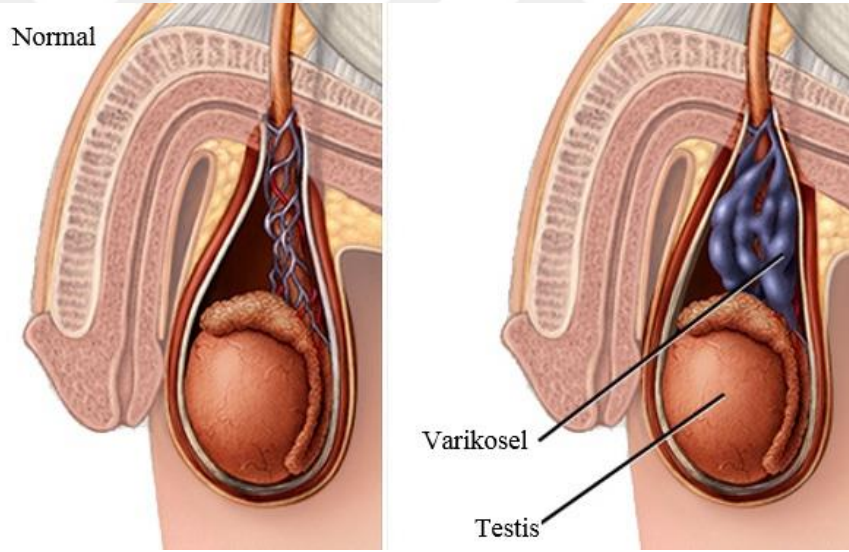
Apoptoz, fonksiyonel ve biyolojik işlevlerini yitirmiş veya hasarlı ve mutasyonlu hücrelerin genomik olarak kontrol edilerek kontrollü ölümleridir(Grunewald ve ark., 2017). Apoptoz mekanizması farklı gelişimsel aşamalarda hücresel kontrollerin sağlanması için rol alırken spermatogenezde de etkilidir (Aitken ve ark., 2011).

Spermatogenez aşamasında iki temel amaç için apoptoz mekanizması normal olmayan spermatozoonların belirlenerek yok edilmesi ve temel görevi germ hücrelerini desteklemek olan Sertoli hücreleri için uygun sayıya indirerek sınırlandırmaktır(Tamburrino ve ark., 2012; Dunkel ve ark., 1997). Apoptoz mekanizması hasarlı hücrelerin yok edilmesi ile genomik hasarın döllere aktarımını

engelleyen son aşama olarak belirlenirken, sperm hücrelerinde yüksek oranda meydana gelmesi semendeki konsantrasyonun azalmasına neden olabilmektedir(Zorn ve ark., 2012; Nagata, 2000; Singh ve ark., 1998).

2.13. Varikosel

Varikosel, spermatik kordun patolojik skrotal pampiniform pleksus toplardamarın anormal genişmesi sonucu kanın havuzlanması, testiküler toplardamar sistem aracılığı ile kan akışının kesikli ya da devamlı geri akışına sebep olan toplardamar varisleşmesidir(Santana ve ark., 2017; Peluso, 2013). Varikosel kelimesinin temeli variko- (varico) Latince’de varis anlamını taşıyan ve sel (cele) Yunanca’da tümörü ifade eden iki farklı kelimenin birleşmesi ile meydana gelmiş, ilk olarak Fransız cerrah Ambroïse Paré tarafından 16. yüzyılda tanımlanmıştır (White, 2017; Tsili ve ark., 2017).



Şekil 2.6. Varikoselde toplardamarın anormal genişmesi

Kaynak: (Jensen ve ark., 1995)

Klinik araştırmalar sonucu infertilite nedenli vakalarda erkeklerde görülen varikosel, genel popülasyonun %15’inde, primer infertil erkeklerin %40’ında ve sekonder infertilitenin en sık görülme sebebi olarak %80’inde gözlemlendiği bilinmektedir(Pasqualotto ve ark., 2005; Peluso ve ark., 2001; Jo ve ark., 2015). Levinger ve arkadaşlarının çalışmaları sonucu varikoselin insidansı her 10 yılda bir %10 olarak arttığı belirlenmiştir(Levinger ve ark., 2007).

Varikosel sol spermatik venin drenajı daha yüksek bir dirence sahip olduğundan çoğunlukla sol taraflı olarak görülse de vakaların %50'sinin bilateral olduğu bilinmektedir(Alsaikhan ve ark., 2016). Varikoselin infertilite üzerindeki patofizyolojik mekanizması net olarak belirlenemese de anatomik, genetik ve moleküler faktörlerin erkek üreme sistemi üzerindeki negatif etkisi olduğu belirlenmiştir.

Erkek infertilitesinde en sık geri dönüştürülebilir infertilite risk faktörleri arasında olan varikosel, etkilenmiş spermatogenez mekanizmasıyla yakından ilişkilidir. Varikosel ve infertilite arasındaki bağlantı ilk olarak MS 1. Yüzyılda Celcius'un çalışmaları ile ortaya konmuş, 19. Yüzyılda MacLeod tarafından yapılan varikoselli hastaların semen örneklerinin analizi ile düşük total sperm sayısı, motilitede azalma ve artan morfolojik anomaliler varikoselin etkilenmiş testiküler fonksiyonundaki etkisi ile seminal anomali belirlenirken semen volümüne etkisi olmadığı ortaya çıkmıştır(MacLeod, 1965; Agarwal ve ark., 2016).

Varikosel hastalarında testiküler hacmin azalmasının azalan sperm sayısı ile orantılı olduğu bilinmektedir (Shridharani ve ark., 2016). WHO gözlemsel çalışmaları sonucunda 9.034 erkeğin %26,6'sında anormal semen analizli varikosel vakası olduğu, yapılan farklı çalışmalarda ise varikoselin her vakada spermatogenezini etkilediği belirlenmemiş, varikoselli erkeklerin yalnızca %20'sinin fertilitide anomali ile klinik yardıma başvurduğu bulgulanmıştır(WHO, 1992).

Varikoselli erkek hastaların testis biyopsisi sonuçlarında spermatogenezde maturasyon duraklaması, spermatogenetik epitelde anomali ve Leydig hücrelerinin fonksiyonel baskılanması belirlenmiştir(Shiraishi ve ark., 2012).

Varikoselli erkeklerde spermatogenetik epitelde degradasyon, seminifer tübüllerinde atrofi, mezenkimal hücrelerde hidronkus ve spermatogonyum hücrelerinde anomali gibi histolojik hasar sonuçları ortaya çıkmıştır.

Varikosel üzerinde yapılan klinik ve hayvan çalışmaları sonucu testiküler fonksiyonun olumsuz etkilemesi, sperm taşınması mekanizmasında tıkanıklık ve cinsel fonksiyonlarda bozukluk etiyolojik faktörlerden etkilenen parametreler arasındadır(Owen ve ark., 2017).

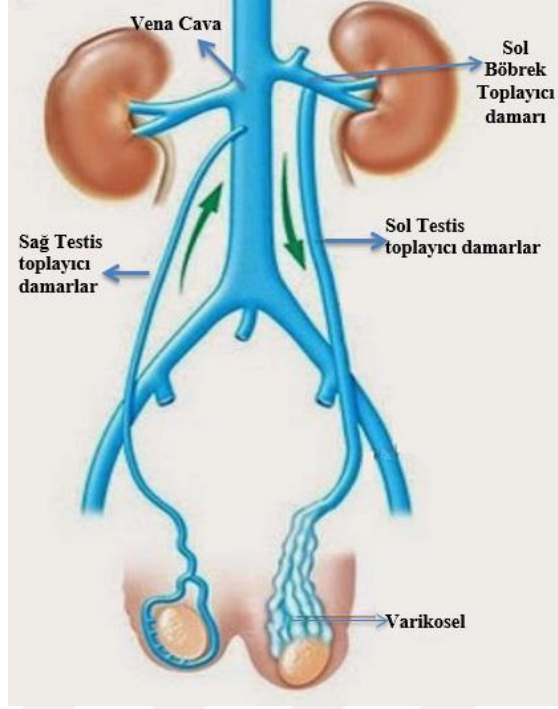
Köksal ve arkadaşlarının çalışmalarına göre varikoselli hastaların testis biyopsilerinde E-kaderin ve α -katenin gibi Sertoli hücre bağlantılarında etkili olan proteinlerde azalma ve kan-testis bariyerinde bozulma gözlenmektedir. İpsilateral testiküler atrofiye sebep olabilen varikosel, azalan serum testesteron seviyelerini doğrudan etkilemektedir.

İnfertilitedeki etkin rolü skrotal hipertermi, testiküler hipoksi, oksidatif stres, apoptoz, testiküler toplardamar hipertansiyonu, hormonal düzensizlik, renal ya da adrenal orjinli toksik metabolitlerin geri akışı sonucu spermatik vende artan katekolamin seviyesi, otoimmünite gibi çok faktörlü etiyolojik araçlar tarafından belirlenirken çevresel ve genetik faktörler de rol oynamaktadır(Sofikitis ve ark., 2014; Esteves ve ark., 2016; Shridharani, 2016).

Aile öyküsünde varikosel bulunan erkeklerde birinci derece yakınların hastalık risklerini daha yüksek oranda taşıdığı yapılan çalışmalarla kanıtlanırken, genetik faktörünün etkisi de anlaşılmıştır(Santana ve ark., 2017).

2.13.1. Etiyoloji

Varikoselin erkek skrotum anatomik yapısına göre testiküler toplardamar akış sisteminde sol iç spermatik toplardamar sağ spermatik vene göre uzundur ve sol renal vene dik açı ile giriş yapmaktadır. Sağ testiküler ven, vücudun en büyük toplardamarı olan ve kalbin sağ kulakçığına açılan alt ana toplardamar inferior vena kava ile direkt olarak bağlanmaktadır.



Şekil 2.7. Varikozel damar fizyolojisi ve anatomisi

Kaynak: (yenibiyoloji.com, Erişim Tarihi: 23 Temmuz 2019)

Varikozel etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan araştırmalarda 3 farklı etiyolojik teori olduğu ileri sürülmüştür.

Sağ ve sol testiküler venler arasındaki anatomik farklılıklar ile birlikte sol testiküler venin sol renal vene olan dik açısı kandaki hidrostatik basıncı artırarak pampiniform pleksus venlerinin ve iç spermatik venin anormal genişlemesi ilk etiyolojik teoridir (Sheehan ve ark., 2014). Varikozelin bu teori ile vakaların yüksek oranda palpable sol taraflı olduğu bilinse de erkeklerin %50 oranında bilateral varikozele sahip olduğu belirlenmiştir.

İkinci teori spermatik damarların toplardamar kapakçıklarının fonksiyonel eksikliği ya da tamamen yokluğuna bağlı olarak testiküler toplardamar sisteminin ters yönde akışa ve kanın geri çekilmesi sonucu artan hidrostatik basınç ile ilişkili olduğu etiyolojik nedendir (Kantartzi ve ark., 2007).

“Nutcracker etkisi (Fındıkkıran etkisi)” olarak bilinen sol renal venin aort ve üst mezenterik arter (SMA) arasında sıkışması ile sol böbrek venözde daralma sonucu kısmi tıkanıklık, ön segmentindeki renal vende genişlemeye meydana geldiği üçüncü

teoridir(Sheehan ve ark., 2014). Toplardamar sisteminde artan hidrostatik basınç spermatik kordun venöz pleksusunun genişmesi ile sonuçlanmaktadır(Sofikitis ve ark., 1993).

2.13.2. Fizyopatoloji

Varikoselin infertilite ilişkili spermatogenez mekanizmasındaki fonksiyonel farklılıklar birden fazla patofizyoloji faktörü ile kontrol edilmektedir. Artan testiküler ve skrotal sıcaklık, testiküler hipoksiya, hipoperfüzyon, renal ve adrenal metabolitlerin ters yönde akışı, oksidatif stres, hipotalamo-hipofiz-gonadal aksın eksikliğine bağlı gonodotropin ve androjen sekresyonunda bozulma, semende oksidan birikimi, kan-testis bariyerinde farklılıklar, artan intratestiküler kadmiyum konsantrasyonu, Notch sinyali, anti-sperm antikorları varikosele bağlı testiküler fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır(Chiles ve ark., 2016).

Farklı faktörlerin kombinasyonu ile spermatogenez ve sperm fonksiyonlarının etkilenmesi varikoselin spermatogenez üzerindeki etkisini açıklamaktadır. Fizyopatoloji mekanizmaları ile birlikte hücresel seviyede testiküler reaktif oksijen türevi miktarını artırırken germ hücre apoptozunu indüklemekte, testiküler DNA polimeraz aktivitesinde ve Sertoli hücre fonksiyonunda farklılıklarla birlikte etkilediği Leydig hücrelerinin testesteron üretiminde azalmada etkilidir(Pathak ve ark., 2016).

2.13.3. Skrotal Hipertermi

Varikosel, testiküler hasara bağlı bozulan spermatogenez mekanizmasının temelinde skrotal sıcaklığın yükselmesine neden olan fizyopatoloji yer almaktadır(Jo ve ark., 2015). Spermatik damarlar ağ örgüsü şeklinde pampiniform pleksus testiküler arterler ile çevrilidir. 1959'da Dahl ve Herrick'in yaptığı incelemeler ile pampiniform pleksus içerisindeki venöz kan dışarı çıkarak testis arterindeki soğuk arter kanı ile soğutulur(Dahl ve ark., 1959). Birbirine karşı akış mekanizmasının iç spermatik atardamarın testiste normal vücut sıcaklığından 1-2 derece düşürerek ters akım sıcaklık değişim mekanizması olarak bilinmektedir ve skrotal sıcaklığın korunmasından sorumludur (Dahl ve ark., 1959).

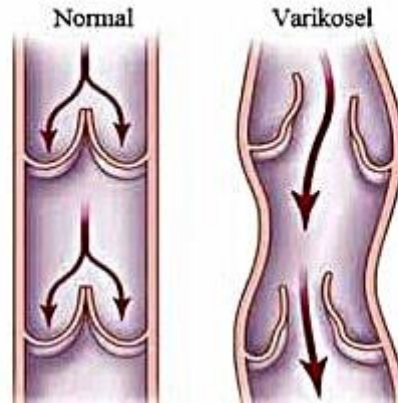
Genişleyen pleksus damar nedenli sıcak abdominal kanın geriye doğru akışı sıcaklık koruma mekanizmasının işlevini kaybetmesi ile testis sıcaklık stresinin ortaya

çıkmasına neden olmaktadır(Jarow, 2001). Genellikle yüksek mitoz aktivitesi gösteren germ ve kanser gibi hücre tipleri sıcaklık stresine daha yatkın olmakla birlikte somatik hücreler tam tersi aktivite göstermektedir(Goldstein ve ark., 1989). Testiste gerçekleşen spermatogenez ise sıcaklığa duyarlılık gösteren mekanizmalar arasındadır. Spermatogenez için gerekli olan optimal sıcaklık 33-34 derece olduğu bilinirken, skrotal hiperterminin etkisi endokrin fonksiyon bozukluklarına da öncülük etmektedir(Yamaguchi ve ark., 1989). Artan skrotal sıcaklık ile birlikte germinel epitelyum ve spermatogenetik hücrelerin programlı germ hücre yaralanmaları ya da kayıpları ve sperm fonksiyon kayıpları yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır(Zorgniotti ve ark., 1998).

Testis yer aldığı optimal çevre sıcaklığı dışındaki bu hipertermi durumundan etkilenen aynı zamanda spermatik enzim aktivitesidir. DNA sentezinin ve polimeraz mekanizmasında önemli rol oynayan topoizomerez I ve DNA polimeraz aktivitesi fonksiyonel olarak 33-34 derecede gerçekleştirmektedir(Fujisawa ve ark., 1988; Zorgniotti ve ark., 1973). Varikozel kaynaklı artan sıcaklık enzimlerin bu aktivitelerini inhibe ederek yapılan çalışmalarda özellikle infertil erkeklerde azalan polimeraz aktivitesinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca DNA ve spermatit nükleusundaki proteinler ile birlikte Leydig hücrelerinde sıcaklığa bağlı hasarın meydana gelmesi gerçekleşmektedir.

2.13.4. Testiküler Hipoksi ve hipoperfüzyon

Testisteki pre-kapiler ve post-kapiler damarlar ile atardamarlardaki kan basıncı vücuttaki diğer dokulara göre düşük kan basıncı göstermektedirler(Sweene ve ark., 1991). Testisteki bu mikroçevre düşük kan basıncına sahip damarlardaki minimum değişikliklere yüksek oranda duyarlılığa sahiptir. Varikozel nedenli toplardamarlardaki farklılık ve kanın geriye akışı ile testiste meydana gelen sıcaklık değişim mekanizmasındaki anormallik skrotal sıcaklığın artmasına neden olur(Goldstein ve ark., 1989).



Şekil2 2.8. Varikozelde toplardamar kapakçıklarına bağlı geri akış mekanizması

Kaynak: (yenibiyoloji.com, Erişim Tarihi: 23 Temmuz 2019)

Testisten çıkan kirli kanın varikozel etiyolojisi ile testise geri dönmesi sonucu hücrelerin yeteri kadar oksijene sahip olmayan bir mikroçevrede bulunmasını gerektirir. Adrenal ve renal metabolitlerin geri akışı iç spermatik vende hidrostatik basıncın artması ile renal vende ters yönde akış kaynaklı gerçekleşmektedir(Turner ve ark., 1989).

HIF-1 α (Hipoksiya ile indüklenen faktör-1 alfa) hipoksik koşullarda hücreler hayatta kalım mekanizmasında önemli rol oynamaktadır. Testiküler oksijen seviyesinin düşmesi ile HIF-1 α yeni damarların biyosentezini yöneterek oksijensiz kalan dokulara yüksek miktarda oksijen iletimini sağlamaktadır. Testiküler hipoksi yanıt mekanizması ile oksijen tedarikini arttırarak oksidatif stresi azaltmaya öncülük etmektedir(Chakraborty ve ark., 1995).

Yönettiği çeşitli metabolik yollarla hipoksik hücrelerin oksijen ihtiyacını karşılanmasında etkindir. Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda varikoz vaskular duvarlarının apoptozunu yöneterek damarlarının genişlemesini sağlayan HIF-1 α , varikozel ve kontrol gruplarında karşılaştırıldığında hasta gruplarında yüksek oranda eksprese edildiği ortaya çıkmıştır(Lee ve ark., 2006). Yapılan bir başka çalışmada varikoselli erkeklerde skrotal oksijenin azalmasıyla testiküler damarlarda artan HIF-1 α olduğu belirlenmiştir(Kupis ve ark., 2015). Düşük oksijene sahip mikroçevre koşullarında HIF-1 α apoptozu ve programlı hücre ölümünü tetiklemektedir(Lee ve ark., 2012).

Varikosel kaynaklı skrotal hipokside HIF-1 α ekspresyonunun artması ile artan germ hücre apoptozunun ilişkili olduğu belirlenmiştir. Testiküler hasara neden olan hipoksi durumu toplardamar ve küçük damarlarda yavaşlayan sıvı dolaşımı bu mekanizmayı indüklemekte, Leydig ve germ hücrelerinin fonksiyon anomalilerine neden olmaktadır.

2.13.5. Hormonal düzensizlik ve Leydig hücre disfonksiyonu

Varikoselin spermatogenez üzerindeki olumsuz etkisine hormonal düzensizlik sebep faktörlerinden biridir. Varikoselin etiyolojisinde toplardamar geri akışı ile birlikte böbrekteki adrenal ve renal bezlerden katekolaminler gibi metabolik ürünlerin testise dönmesi azalan spermatogenez mekanizması ile ilişkili olduğu belirlenmiştir(Sofikitis ve ark., 1993). Hipotalamik-gonadal aksın bozulması infertilite üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Spermatogenez için etkin hormon olan testesteron LH gibi parakrin ve endokrin sinyaller ile stimulesi gerçekleştirilen Leydig hücreleri tarafından sentez ve sekrete edilmektedir. Patolojik incelemeler ile androjen eksiliğinin infertilitede önemli bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir.

Bilateral ve tek taraflı varikoselli vakalarda histolojik farklılıklar incelendiğinde Sertoli ve Leydig hücrelerinde atrofi olguları bozulan spermatogenez ve intratestiküler testesteron seviyesinde azalamaların olduğu ortaya çıkmıştır(McClure ve ark., 1991). Azalan intratestiküler testesteron seviyesinde 17,20-desmolase ve 17- α -hydroxylase gibi testesteron biyosentezinde önemli rol alan enzimlerin etkilenen aktiviteleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir(Rajfer ve ark., 1987).

2.14. Reaktif Oksijen Türevleri

Reaktif oksijen türevleri, aerobik hücrelerin lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitlerin peroksidasyonu ve oksidasyonu ile kontrollü olarak üretilen hücresel mekanizmalardandır. Süperoksit anyonu (O₂•-), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikali (•OH) hücresel metabolizma ürünü olan reaktif oksijen türevleridir(Alkan İ., 2018). Reaktif oksijen türevleri temel olarak radikal ve radikal olmayan gruplar altında incelenirken, reaktif nitrojen türevleri nitroz oksit, peroksinitrit, nitroksil iyonu gibi serbest nitrojen türevleri olarak bilinir(Darley-USmar, 1995).

Tablo 2.2. Reaktif oksijen türevleri

Reaktif Oksijen Türevleri	
Radikal	Radikal Olmayan
Hidroksil iyonu	Ozon
Süperoksit	Tekli oksijen
NO	Lipit peroksit
Peroksil	Hidrojen peroksit

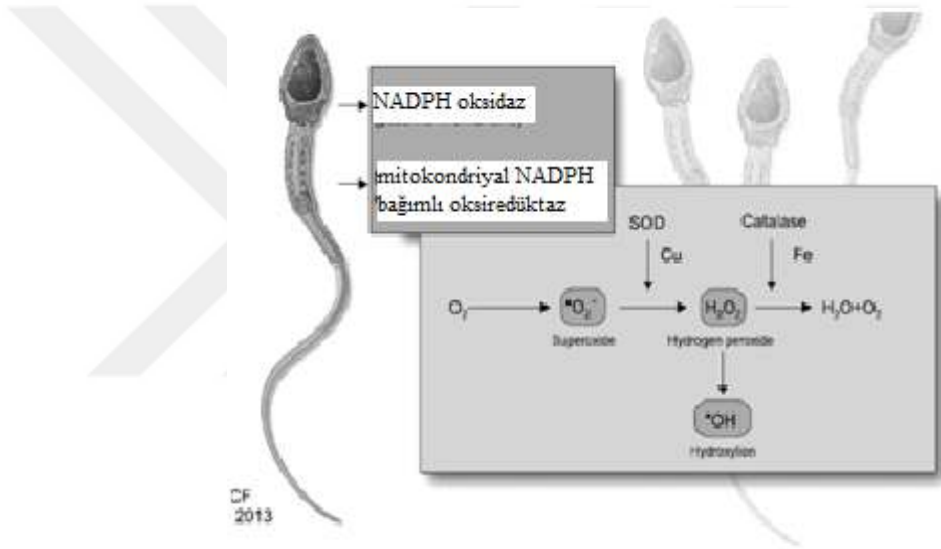
Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif metabolitler farklı moleküllerle etkileşime girerek hücrel oksidatif stresin başlamasına neden olmaktadır(Coyle ve ark., 2007). Hücrel bileşenler olan lipidler, proteinler, nükleik asitler ve şekerler serbest radikallerin temel hedefleridir(Oldereid ve ark., 1998).

En dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunan karasız radikallerin düşük seviyeli mevcudiyetinde fizyolojik görevleri spermin fertilizasyon yeteneğinde önemli rol oynarken, belirli orandaki hücrel düzeyleri oosit füzyonu, akrozomal reaksiyon, akrozomal reaksiyon, kapasitasyon ve hiperaktivasyon ile sperm hareketi için etkilidir(Zalatave ark., 2004; Aitken, 1999). Serbest radikallerin hücrel bir görevi de hücrelerin sinyalleşme ve savunma mekanizmalarında etkili olmalarıdır.

Normal metabolizmal aşamada üretilen ROS yıpranmış hücrelerin yıkılmasında da rol oynamaktadır(Durackova, 2010). Sağlıklı erkek bireylerde reaktif oksijen türevlerinin kontrolü anti-oksidan savunma sistemi ile sağlanmaktadır. Testisteki antioksidanların anahtar rolü germ hücrelerinin enzimatik ya da enzimatik olmayan savunma mekanizması ile korunmasıdır. Süperoksit, hidroksil, peroksil, hidroperoksil, nitrik oksit, nitrojen dioksit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türevlerinin etkileri antioksidanlar tarafından indüklenerek hücrel homeostazı sağlanmaktadır.

2.15. Reaktif Oksijen Türevlerinin Hücresel Kaynağı

Reaktif oksijen türevlerinin spermatozoadaki kaynakları sperm mitokondrisi ve sperm plazma membranı olarak iki alandan köken almaktadır. Spermatozoanın reaktif oksijen türevi kaynağı sperm plazma zarında bulunan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz ve mitokondride bulunan NADPH bağımlı oksidoredüktaz sistemi adı verilen 2 farklı mekanizma ile oluşmaktadır (Aitken, 1992). Hücresel reaktif oksijen türevlerinin kaynağı %90 hücre mitokondrisidir (Balaban ve ark., 2005). İki enzim sistemi de değişen koşullarla birlikte H₂O₂ üretimini sağlamaktadır.



Şekil 2.9. Hücresel reaktif oksijen türevleri kaynakları

Kaynak: (Agarwal, 2004)

Mitokondri sperm hücresi solunum olayının gerçekleştiği organel olup, NAD bağımlı oksidoredüktaz aracılı ROS üretimi meydana gelmektedir. Sperm plazma membranı ise NADP bağımlı oksidaz mekanizması aracılığı ile ROS üretilir (Karadağ ve ark., 2013).

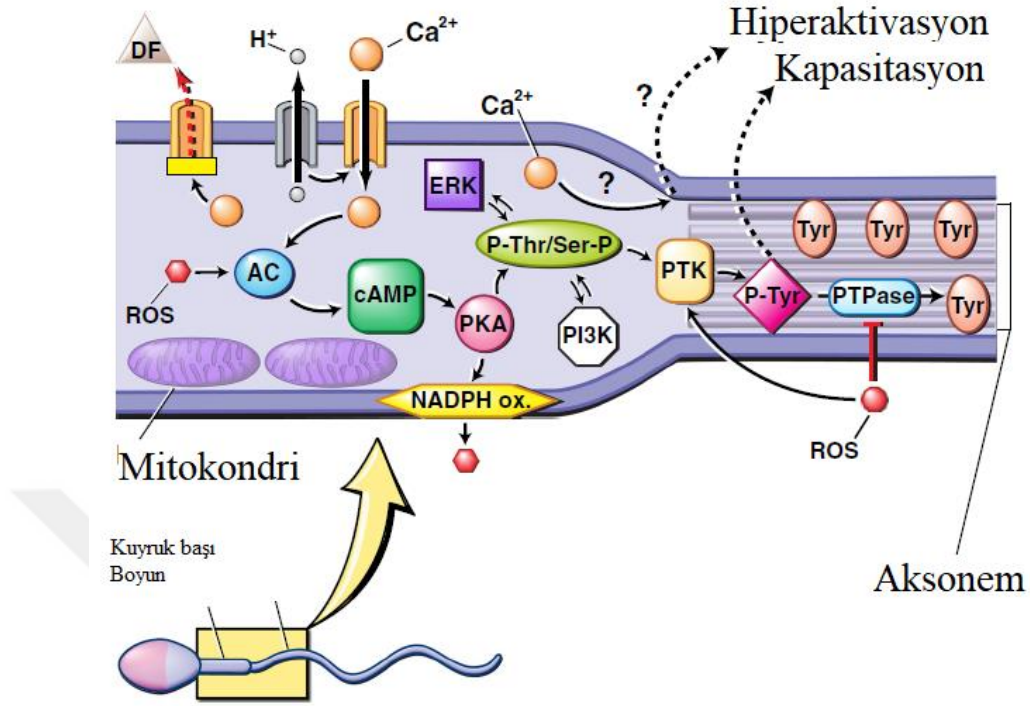
2.15.1. Lipid Peroksidasyonu

Reaktif oksijen türevlerinin aşırı ve kontrolsüz üretimi sonucu oksidatif stres meydana gelerek hücresel fonksiyonlarının bozulmasına neden olmaktadır. Testiküler hücreler ile birlikte sperm hücre membranının sahip olduğu çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin olduğundan oksidatif stresin etkilerine daha duyarlıdır (Koksal, 2003; Koksal ve ark., 2000). Yağ molekülleri oksidasyona en açık moleküllerdir (Aitken, 1994). Sperm plazmalemması doymamış yağ asitleri bakımından zengin olması nedeni ile membran akışkanlığı sağlanmaktadır. Bu akışkanlık spermin motilitesi ve membran füzyonu açısından önemlidir. Reaktif oksijen türevlerinin lipid peroksidasyonunu meydana getirmesi ile sperm motilite anomalileri ve bozulan akrozomal reaksiyon ile oosit füzyonunun etkilenmesi ortaya çıkmaktadır (Lobascio ve ark., 2015).

Oksidatif strese neden olan ROS üretimi lipid peroksidasyonuna öncülük ederek hücre içi pH'ın düşmesiyle sperm baş, boyun defektlerine ve membran hasarları sperm kapasitasyonu ve akrozomal reaksiyonu etkilemekte, canlı sperm oranları ve sperm motilitesindeki azalmayla birlikte infertilite ile sonuçlandığı bilinmektedir (Sikka, 1996). Spermatozoa motilitesinin azalması ise lipid peroksidasyonu ile yakından ilişkilidir (Gomez, 1998).

2.15.2. Reaktif Oksijen Türevleri ve Mitokondriyal Membran Potansiyeli

Biyolojik mekanizmalar için gerekli organellerden biri olan mitokondri reaktif oksijen türevleri için kaynak olarak görev yapmakta ve uygun reaktif oksijen türevleri seviyesi ile birlikte başta spermatogenez olmak üzere sperm fonksiyonları, kapasitasyon, akrozomal reaksiyon ve fertilizasyon gibi mekanizmaları yönetmektedir.



Şekil 10. Spermatozoa mitokondriyal membran potansiyeli ve ROS

Kaynak: (Stefan ve ark., 2015)

Spermatozoanın boyun kısmında yer alan ve ATP üretiminden sorumlu mitokondri normal sperm motilitesinin gerçekleşmemesi durumu mitokondrinin fonksiyonel anomalisi kaynaklı başta DNA hasarı olmak üzere erkek infertilitesine öncülük etmektedir(Dieamant, 2017).

2.15.3. Mitokondriyal membran potansiyeli belirleme yöntemi

2.15.3.1. Nitroblue tetrazolium boyama

Nitroblue Tetrazolium Testi (NBT), sarı renkli suda çözünebilen aromatik bileşen olup, hücresel süperoksit anyonları ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türevleri aktivitesini ve hücresel kaynağını somatik ve germ hücrelerinde belirlemek için kullanılan tekniktir(Esfandiari, 2003). Glikozun hücresel oksidasyonu sonucu üretilen ve elektron donörü olarak bilinen sitoplazmik NADPH, NBT'ye elektron transferine öncülük ederek NBT'deki formazan moleküllerini redükleyerek sarı

renkten mavi formazan çökeltisine dönüştüğü reaksiyon ile reaktif oksijen türevlerinin miktarının belirlenmesi ve bunun sperm fonksiyonu, motilite ve DNA bütünlüğü ile karşılaştırılmasına yardımcı olmaktadır(Tunç ve ark., 2010; Gosálvez ve ark., 2017).

Anormal mitokondriyal aktivite durumunun en önemli sebeplerinden biri artan ROS seviyesidir. Varikosel kaynaklı oksidatif stres koşullarında yüksek oranda mitokondriyal disfonksiyon ilişkili anormal mitokondriyal membran potansiyeli oranları tespit edilmiştir.

2.16. Oksidatif Stres

Oksidatif stres üretilen reaktif oksijen türevleri ve hücrel antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizliği ifade etmektedir. Reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretimi ya da antioksidan üretimi ve aktivitesinin azalması seminal oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır (Aitken, 2011). İmmatur spermatozoa, lökositler, varikosel gibi iç kaynaklı olabildiği gibi, testiküler hipertermi, çevresel kimyasallara maruz kalma, sigara dış kaynaklı oksidatif stres tetikleme kaynaklarıdır(Kumar ve ark., 2009; Aitken ve ark., 1989).

Hücrel redoks elektron transferleri ile sağlanırken, redoks durumundan etkilenen proteinler aktivitelerinin artışı ya da duraksaması meydana gelmektedir. Etkin proteinlerin hücrel sinyal yollarında görev almaları nedeni ile hücrel apoptoz ya da anormal proliferasyon durumları ortaya çıkmaktadır(Durackova, 2010). Sakamoto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar sonucu oksidatif stresin etkisini belirlemede nitrik oksit (NO), 8-hidroksi -2-deoksiguanozin (8-OHdG), heksanoil-lizin (HEL) gibi reaktif oksijen türevleri ile glutamat peroksidaz, katalaz, süperoksit dismutaz gibi antioksidan kapasitesi seviyeleri ile belirlendiği ortaya çıkmıştır(Sakamoto ve ark., 2008).

Memeli testiküler antioksidan enzimlerine glutatyon redüktaz (GSR), glutatyon S-transferaz (GST), heme oksijenaz-1 (HO-1) da dahildir(Bauche ve ark., 1994). İleri derece varikoselli oligospermi ve azospermi vakalarının seminal plazmalarında yüksek seviyeli NO ile birlikte HEL ve SOD aktivitelerinin arttığı ortaya çıkmıştır(Mruk ve ark., 2002). Reaktif oksijen türevleri ile total antioksidan kapasitesi (TAC) arasındaki oranın artışı düşük semen kalitesine ve sperm konsantrasyonuna neden olmaktadır (Aitken, 2006; Ghabili ve ark., 2009).

Seminal oksidatif stresin sonucunda lipid peroksidasyonu (LPO), DNA fragmentasyonu ile hücresel sinyal yolları ve enzimatik süreçlerde farklılıkla oluşmaktadır(Aitken ve ark., 2011; Clarkson ve ark., 1989). Reaktif oksijen türevleri kaynaklı oksidatif stres erkek infertilitesinin %30-80'ini oluşturmaktadır(Swan, 2006). Erkek infertilitesinde önemli rol oynayan oksidatif stres infertil erkeklerde yükselen oranları ile seminal reaktif oksijen türevlerinin fertilité ile ilişkisini açıklamaktadır(Agarwal ve ark., 2004).

2.16.1. Varikosel ve Oksidatif Stres İlişkisi

Testise dönen kirli kanın testiküler hücreleri etkilediği varikosel mekanizmasında oksidatif strese yüksek oranda öncülük ettiği bilinmektedir. Varikoselli infertil hastaların infertil ve kontrol grubu ile karşılaştırılmalarında seminal ROS miktarının artan varikosel oranları ile ilişkili olduğu belirlenmiştir(Abd-Elmoaty ve ark., 2010).

Varikoselli erkeklerde yapılan çalışmalarda testisteki oksidatif stresin artması ile testiküler ve sperm disfonksiyonlarının meydana gelmesi erkek infertilitesinde oksidatif stresin rolünü ifade etmektedir(Agarwal ve ark., 2009; Haans ve ark., 1991). Süperoksit anyonları ve total reaktif oksijen üretiminin başta erkek spermatogenezi ve semen parametrelerini etkilediği ortaya çıkmıştır.

2.16.2. Varikosel Kaynaklı Oksidatif Stres ve DNA Hasarı

DNA hasarı, sperm DNA'sında meydana gelen baz modifikasyonları, DNA kırıkları, kromatin paketlenme anomalileridir(Spiropoulos ve ark., 2002). Sperm DNA hasarı etiyolojik olarak iç ve dış faktörlere bağlı olup, erkek infertilitesinde önemli rol oynayan etken faktördür. Sperm DNA fragmentasyonu multifaktöriyel etiyolojiye sahip olup temel olarak spontan abortus, anormal gen aktarımı ve başarısız yardımcı üreme döngüsünü etkilerken, infertil erkeklerde sperm DNA hasarının meydana gelmesinde anormal kromatin paketlenme, anormal mitokondriyal membran potansiyeli ve apoptoz ile ilişkilidir(Dieamant ve ark., 2017; Santana ve ark., 2017).

Varikoselin fizyopatolojisinde etken olan oksidatif stres, sperm genomunu ve mitokondriyal DNA'yı etkileyerek DNA yapısında fragmantasyon ile birlikte baz degridasyonlarına ve spermatogenezin moleküler mekanizmasında farklılıklara neden olmaktadır. Sperm DNA'sının korunması protaminlerle yoğunlaştırılmış kromatin yapısı uygun nukleer yapı ve nuklear korunma için erkek fertilitesinde önemli mekanizmadır. Sperm DNA'sının kompaksiyonu ile stabil hale gelmesi sperm genomunu toksik metabolit, yüksek sıcaklık, oksidatif stres gibi faktörlerden koruyarak DNA hasarını önlemektedir(Dieamant ve ark., 2017).

Varikosel kaynaklı oksidatif streste anormal genişleyen testis damarlarının endotel hücrelerinden nitrik oksit ve peroksinitrit salınımının ile süperoksit serbest radikallerin artışına neden olduğu bildirilmektedir(Romeo ve ark., 2009). Oksidatif stresin DNA hasarı üzerindeki temel etkisi DNA baz eşleşmesi, tek ya da çift zincir kırıkları, kromozomal düzenlenme ile delesyon, nokta mutasyonu gibi gen mutasyonlarıdır (Sharma ve ark., 2004; Aitken ve ark., 2001).

DNA hasarının düşük olduğu durumlarda spermatozoa tamir edebilirken, oosit de hasarlı olan spermatozoayı tamir edebilmektedir(Agarwal ve ark., 2007). Yüksek oranda OS'ye maruz kalan varikoselli erkek gruplarında semen parametreleri ve DNA bütünlüğünün negatif etkilendiği bilinmektedir (Cocuzza ve ark., 2008).

Yüksek ROS sahip erkek bireylerde infertilite gözlenirken, fertil bireylere oranla kromozomal kırıkların daha yüksek olduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir(Agarwal ve ark., 2007). ROS sperm fiyolojisi ve fonksiyonunu etkileyerek olgun spermatozoada apoptozu indüklemektedir(Alkan ve ark., 2018). ROS seviyesindeki farklılıklar sperm plazma membranında lipid peroksidasyonuna neden olurken, protaminasyon eksikliği ile nuklear ve mitokondriyal hasara yol açar.

Varikosel kaynaklı testis sıcaklığında meydana gelen sıcaklık artışı spermatogenez mekanizmasında duraksamalarla birlikte otofajik hücre ölümleri artmaktadır. Sperm DNA hasarının ile DNA fragmantasyonunun yüksek olduğu durumlarda düşük fertilizasyon oranları, zayıf embriyonel bölünmeler, azalan implantasyon ile gebelik ve canlı doğum oranlarının negatif etkilendiği belirlenmiştir (Ghabili ve ark., 2009; Santana ve ark., 2017; Park ve ark., 2018).

Varikoselli hastalarda yüksek oranlı ROS'a maruz kalan spermatozoonlarda sitoplazmik droplar artmaktadır. Sitoplazmik dropların varlığı immatur ve defektli spermilerin reaktif oksijen türevlerinin etkisi meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalar gösterir ki spermatozoanın immatur olması artan ROS seviyesi ve DNA hasarı ile ilişkili olup, ejakulatta yüksek sayıda olduğu belirlenmiştir(Santana ve ark., 2017).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Tasarımı

Bu çalışmada DNA fragmentasyonu belirleme yöntemi olarak “Acridine Orange” boyama, sperm maturasyon belirleme yöntemi olarak “Anilin mavisi” ve “Chromomycin A3” boyama, oksidatif stres belirleme yöntemi olarak “Nitroblue Tetrazolium Testi” teknikleri kullanılarak normal ve Varikosel hasta grupları kriterlerine uyan 48 hastada sperm DNA fragmentasyonu, sperm maturasyon defektleri, sperm oksidatif stres oranları belirlenerek karşılaştırıldı.

Çalışma Ağustos 2019-Eylül 2019 tarihleri arasında Biruni Üniversitesi Hastanesi’ne spermiyogram analizi için başvuran varikoselli ve infertil normal hastalarda uygulandı.

Çalışmada önce ‘Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul’una sunuldu ve 2018-12-9 sayı ve 29.01.2018 tarihli etik kurul onayı alındı. 2019/31-03 sayı ve 24.07.2019 tarihli etik kurul onayı alındı.

3.2. Hasta Seçimi

Çalışmaya dahil olma kriterleri:

Varikosel hasta grubu;

Varikosel Hasta Grubu için; Üroloji polikliniğine başvurmuş ve varikosel tanısı konulmuş erkek hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Normal hasta grubu;

Normal Hasta Grubu için; Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre yıkama işlemi öncesi sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml fazla olması, normal morfolojinin %4 den fazla olması ve ileri hareketli sperm yüzdesinin %32 den fazla olması

Her iki grup için;

-Erkeğin yaşının en az 20 en fazla 45 olması

- Endokrinolojik ve/veya metabolik bozukluklar göstermemesi
- En az 3 en fazla 7 gün cinsel perhiz süresi uygulanması

3.3. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3.3.1. Sperm Maturasyonunun Anilin Mavi Boyası ile Gösterilmesi

Ejakulasyonu sonrası semen örnekleri 1:1 oranında PBS ile yıkanarak santrifüjlenir. Yıkama sonrası örnekten yayma preparat hazırlanarak sperm maturasyon defektinin belirlenmesi amacı ile Anilin blue(mavisi) boyama tekniği uygulanarak mikroskopik değerlendirilmesi yapılmıştır.

İnfertil ve varikoselli hasta grupları örneklerinden hazırlanan yayma preparatlara boyama tekniği uygulanarak değerlendirilme ve karşılaştırılmaları amaçlanmıştır.

20 µl semen örneği temiz lam üzerine yayılarak kurutulur. Oda sıcaklığında %2 gluteraldehit içinde 3 saat fiksasyona bırakılır. Fiksatif uygulaması sonrası %5'lik anilin mavisi ve %2 asetik asit içeriği ile hazırlanmış boya solüsyonunda 5 dakika inkübe edilir ve distile su ile yıkanır. Mikroskopik değerlendirmesinde nukleusları mavi boyanan spermiler sperm maturasyon defekti açısından pozitif kabul edilirken, boyanmamış spermiler defekt bakımından negatif olan matür spermileri göstermektedir. Değerlendirmeleri 100 sperm sayımı yapılarak negatif sperm yüzdesinin çıkarılması ile sperm maturasyon defekti oranının hesaplanması ile tamamlanır.

3.3.2. Sperm DNA Fragmentasyonunun Akridin Orange ile Floresan Mikroskopunda Gösterilmesi

Ejakulasyonu sonrası semen örnekleri 1:1 oranında PBS ile yıkanarak santrifüjlenir. Yıkama sonrası örnekten yayma preparat hazırlanarak sperm DNA fragmentasyonunun değerlendirilebilmesi amacı ile Carnoy fiksatifinde fiksasyonu sağlanarak Acridine orange(turuncusu) boyası uygulanır. Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar infertil ve varikoselli hasta gruplarından yapılarak DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi için boyama tekniği uygulanır.

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 molar $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (47,991gr/ litre distile suda)

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

BOYA çözeltisi

%1 Acridine orange(turuncusu) 2,5 ml

0,1 Mol/L sitrik asit 10 ml

0,3 M Na_2HPO_4 400 μl

Günlük hazırlanır.

Boyanın uygulanması:

Mikroskopik-akridin oranj boyama (M-AOT) ;

20 μl semen örneği temiz lam üzerine yayma tekniği uygulanarak kurutulur. Kurutulan yayma preparatlar Carnoy fiksatifinde (3:1 oranında, metanol: glasiyal asetik asit) 1 saat fikse edilir. Fiksatif uygulaması sonrası Acridine orange(turuncusu) boyasına alınan yayma preparatlar 5 dakika boya ile inkübe edilerek distile su ile yıkanır, kurutulur ve floresan mikroskopunda incelenir. Mikroskopik değerlendirmede yeşil ışık veren sperm hücreleri normal DNA yapısına sahipken, sarı-kavuniçi boyalı hücreler fragmente DNA taşıyan spermleri ifade etmektedir. Değerlendirmeler 100 sperm sayımı yapılarak fragmentasyon yüzdesi çıkarılması ile tamamlanır.

3.3.3. Gevşek Paketlenmiş Kromatinde Protamin Eksikliğinin Kromomisin A3 ile gösterilmesi

Ejakulasyon sonrası semen örnekleri 1:1 oranında PBS ile yıkanarak santrifüjlenir. Yıkama sonrası örnekten yayma preparat hazırlanarak sperm gevşek paketlenmiş kromatinde protamin eksikliğinin değerlendirilmesi için Carnoy fiksatifinde yayma preparatların fiksasyonu yapılarak CMA3 boyası uygulanır. Örneklerden hazırlanan yayma preparatlar infertil ve varikoselli hasta gruplarından

yapılarak kromatinde protamin eksikliğinin değerlendirilmesi amacı ile boyama tekniği uygulanır.

Stok Chromomycin çözeltisi ve diğer solüsyonlar

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

Boya Çözeltisi

CMA3 0,25 mg/ml

MCIIIvane Buffer 1 ml (pH:7)

Disodium Hydrogen Phosphate 200 mM

Sitrik asit 100 mM

Boyanın Uygulanması

20 µl semen örneği temiz lam üzerine yayma tekniği uygulanarak kurutulur. Kurutulan yayma preparatlar Carnoy fiksatifinde (3:1 oranında, metanol: glasiyal asetik asit) 5-8 dakika fikse edilir. Fiksasyon sonrası MCIII Buffer ile çalkalanan preparatlar üzerine 100 µl CMA3 boyası konularak kapalı bir ortamda 20 dakika boya ile inkübasyonu sağlanır. İnkübasyon süresi sonrası Mcillvane Buffer ile çalkalanan preparatlar üzerine gliserol damlatılarak floresan mikroskobunda dichroic: BP400-440:DM455:BA475 bariyer filteleri kullanılarak APlanx60 objektif lens ile değerlendirilir. Değerlendirmeler 100 sperm sayımı yapılarak iki farklı tip boyanan spermeler incelenir. Parlak sarı boyananlar anormal kromatin paketlenme, mat sarı-yeşil boyananlar ise normal paketlenmeyi ifade etmektedir.

3.3.4. Sperm Oksidatif Stresinin Nitroblue Tetrazolium Boyama İle Işık Mikroskobunda Değerlendirilmesi

Stok Boya (%1'lik NBT boya)

10 mg NBT

1 mL H₂O (bidistile)

Stok Buffer (Michaelis Buffer, Veronal Asetat) (0.28 M)

1.90 gr Sodyum Asetat

100 mL H₂O

Çalışma Buffer

Buffer..... 5 mL

H₂O..... 15 mL

(pH : 7.8 olacak şekilde 0.1 HCl ile ayarlanır.)

Boyanın Uygulanması

Ejakulasyon sonrası semen örneklerine uygulanarak taze örnek ile çalışılır. Ependorflara 80 µl çalışma buffer, 20 µl hazırlanan NBT stok boya eklenir. Hücre süspansiyonu olarak hazırlanmış hasta örneklerinden 100 µl eklenir. Örnekler 37 °C’de 30 dakika inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonrası hazırlanan örneklerden 20 µl alınarak temizlenmiş lam üzerine yayılıp kurutulur. Kuruduktan sonra yayma preparatlar ışık mikroskopunda x100 büyültmede gözlemlenir. Mikroskopik alanda boyanan (NBT pozitif) ve boyayı almayan (NBT negatif) 200 hücre sayılarak yüzde oksidatif stresten etkilenen sperm oranları hesaplanır.

3.3.5. İstatiksel Yöntemler:

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

4. BULGULAR

Bu prospektif kontrollü çalışmada, Ağustos 2019 ve Eylül 2019 tarihleri arasında ‘Biruni Üniversite Hastanesi’ Üroloji kliniğine başvuran hastalardan çalışma kriterlerine uyan kontrol grubu infertil normozoospermik (n:24), deney grubu varikoselli hasta (n:24) tanısı olan toplam 48 hastanın semen örneğinde varikoselin spermatozoa üzerindeki etkisinin incelenmesi amacı ile Acridine orange(turuncusu) , Anilin blue(mavisi), Chromomycin A3 ve Nitroblue tetrazolium boyama yöntemleri uygulanarak, varikoselin DNA fragmentasyon, sperm maturasyonu ve oksidatif stres kaynaklı sperm mitokodriyal membran potansiyeli üzerine etkileri araştırıldı.

48 hastanın semen parametreleri incelenerek, DNA maturasyon defekti ve sperm DNA fragmentasyon analizi boyamaları için semen örneklerinden yayma preparat hazırlanarak fikse edilip boyama testleri uygulandı. Semen pelleti oksidatif stres belirleme yöntemi Nitroblue tetrazolium boyama ile inkübe edildi. Boyanan pellete yayma preparat hazırlandı. Sperm maturasyon defekti, sperm DNA fragmentasyonu, oksidatif stres kaynaklı sperm mitokodriyal membran potansiyelinin yüzdeleri hesaplanarak, kontrol ve deney grubu arasındaki varikoselin spermatozoa üzerindeki etkisi incelenerek gruplar kendi içerisinde karşılaştırıldı.

P değeri Yorumu

$p < 0.05$ İstatistiksel anlamlılık *

$p < 0.01$ Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık **

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

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

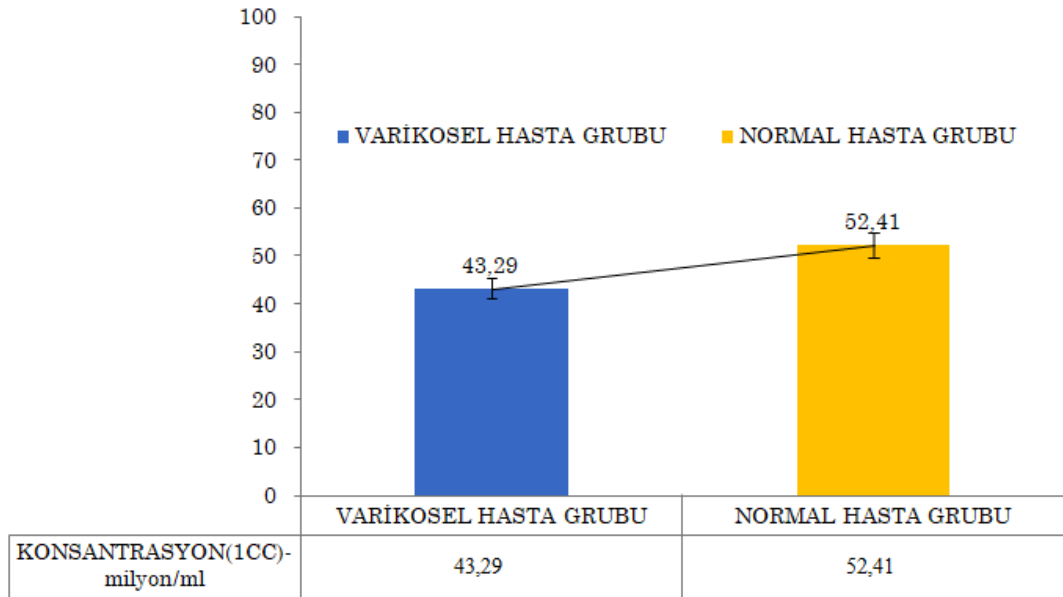
$p > 0.10$ Fark tesadüften ileri gelmiştir(istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır)

4.1. Sperm Konsantrasyon Değerlendirme Sonuçları

Tablo 4.1. Normal ve varikozel hasta gruplarında konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması

	Normal Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	Varikozel Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	t	p
Konsantrasyon (1cc) milyon/mL	52,41 $\pm$ 38,28	43,29 $\pm$ 24,11	-,988	,328

KONSANTRASYON(1CC)-milyon/ml



Şekil 4.1. Normal ve varikozel hasta gruplarında konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması

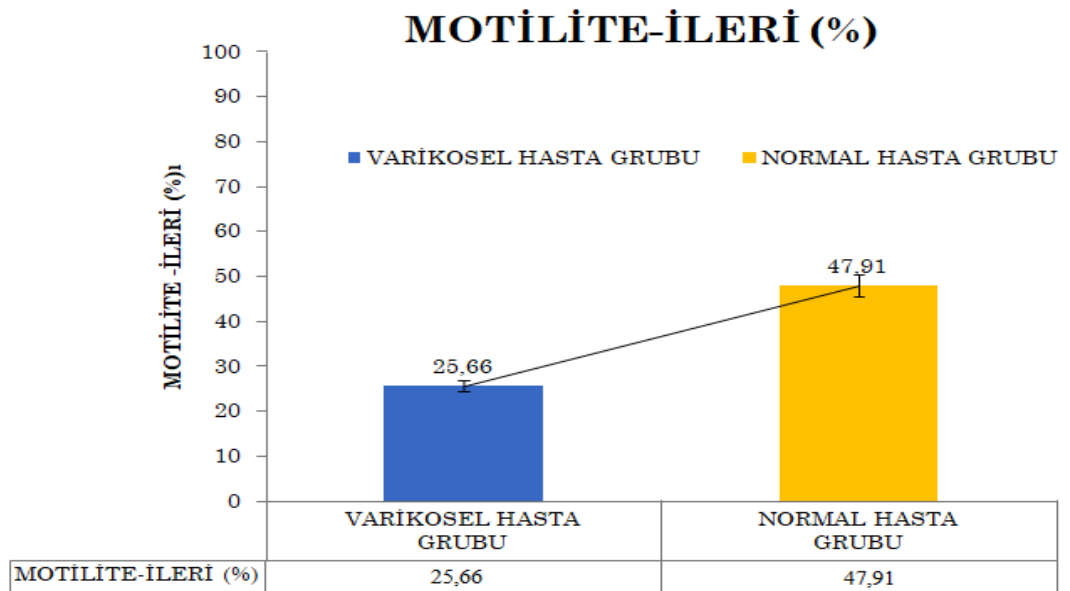
Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de normal ve varikoselli hasta grupları arasında konsantrasyon değişkeni açısından istatistiksel olarak sınırda anlamlılık değeri saptanmıştır ($0.05 \leq p < 0.10$). WHO 2010 kriterlerine göre normal hasta grubunun

konsantrasyon değerinin 15 milyon/ml'nin üzerinde olması beklenir. Varikoselli hasta grupları için semen kriterleri mevcut değildir.

4.2. Sperm Motilite Değerlendirme Sonuçları

Tablo 4.2. Normal ve varikosel hasta gruplarında motilite değerlerinin karşılaştırılması

MOTİLİTE %	Normal Hasta Grubu (x±SD)	Varikosel Hasta Grubu (x±SD)	t	p
İleri hareketli	47,91±11,19	25,66±7,04	_8,240	,000
Yerinde Hareketli	18,08±6,02	27,20±11,80	3,374	,002
Hareketsiz	34±9,74	47,12±11,31	4,307	,000



Şekil 4.2. Normal ve varikosel hasta gruplarında motilite değerlerinin karşılaştırılması

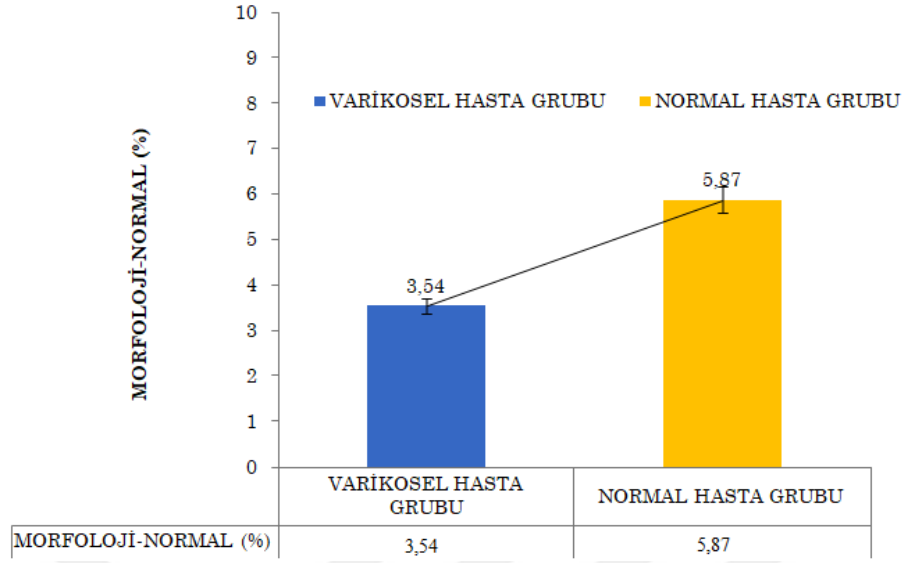
Tablo 4.2 ve Şekil 4.2’de prograssif hareket (ileri hareketli motilite yüzdesi), yerinde hareketli motilite yüzdesi ve non-prograssif hareket (hareketsiz sperm yüzdesi) değişkenleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). WHO kriterlerine göre normal semen parametrelerine sahip gruplarda beklenildiği gibi %32’nin üzerinde ileri hareket görülürken, varikozel hasta grubunda ileri hareket değeri %15’in altında görülmektedir.

4.3. Sperm Morfoloji Değerlendirme Sonuçları

Tablo 4.3. Normal ve varikozel hasta gruplarında morfoloji değerlerinin karşılaştırılması

MORFOLOJİ	Normal Hasta Grubu ($\bar{x}\pm SD$)	Varikozel Hasta Grubu ($\bar{x}\pm SD$)	t	p
NORMAL	5,87 $\pm$ 1,65	3,54 $\pm$ 1,61	-4,951	,000
BAŞ	56,87 $\pm$ 9,95	51,45 $\pm$ 9,1	-1,970	,050
BOYUN	20,33 $\pm$ 7,99	27,70 $\pm$ 6,38	3,532	,001
KUYRUK	16,62 $\pm$ 6,47	17,29 $\pm$ 7,94	,319	,751

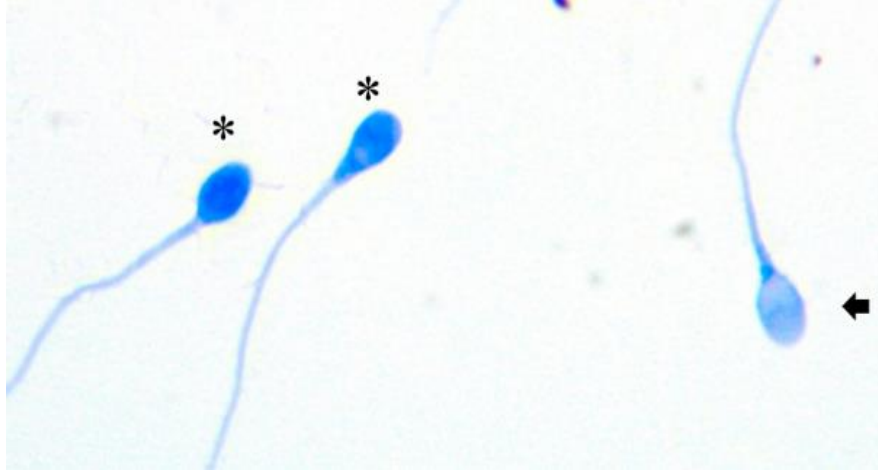
MORFOLOJİ-NORMAL (%)



Şekil 4.3. Normal ve varikozel hasta gruplarında morfoloji değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.3 ve Şekil 4.3’de normal ve varikoselli hasta gruplarında baş ve kuyruk değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Normal ve boyun morfoloji değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). WHO kriterlerine göre beklenildiği gibi normal hasta grubu örneklerinde %4’ün üzerinde normal morfolojiye sahip sperm değeri görülürken, varikozel hasta örneklerinde %4’ün altında görülmektedir.

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



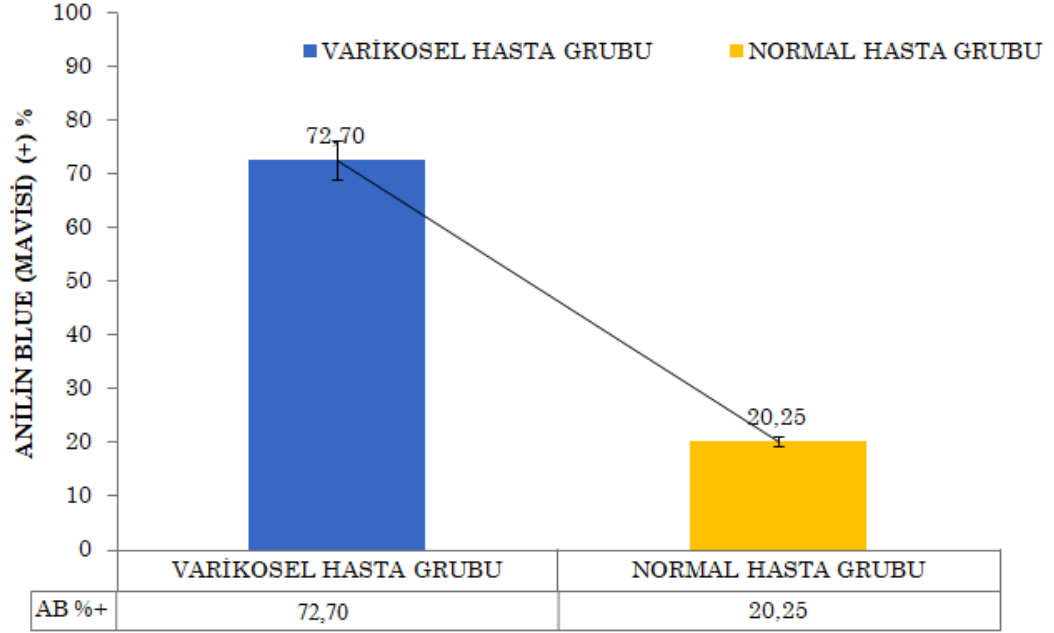
Şekil 4.4. Asidik anilin mavisi boyama

Koyu boyanan pozitif (+) spermler sperm DNA maturasyon defektini ifade ederken, açık renkteki nukleusu boyanmayan sperm (-) maturasyon açısından normal olarak gösterilmiştir (100X immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü).

Tablo 4.4. Normal ve varikozel hasta gruplarında Anilin blue (mavisi) (+) değerlerinin karşılaştırılması

Sperm Maturasyon Defekti (%)	Normal Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	Varikozel Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	t	p
Anilin Blue (mavisi)	20,25 $\pm$ 5,21	72,70 $\pm$ 7,58	27,929	,000

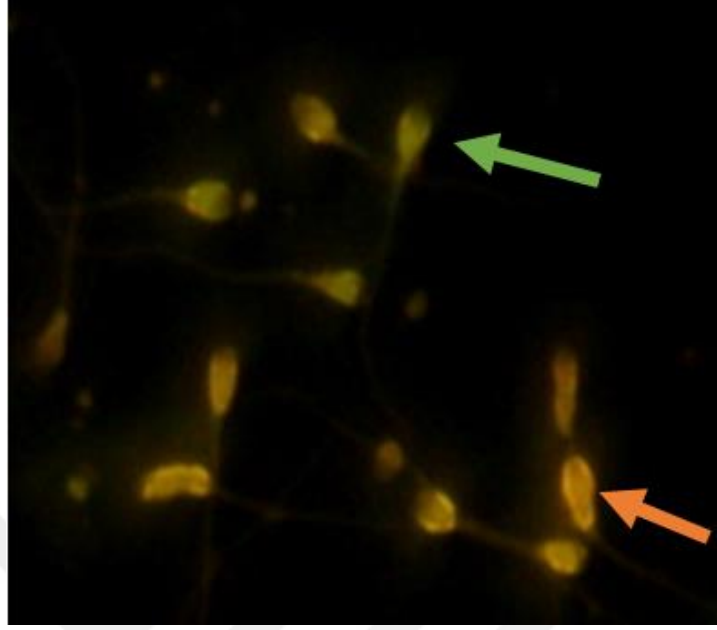
ANİLİN BLUE (MAVİSİ) (+) %



Şekil 4.5. Normal ve varikosel hasta gruplarında Anilin blue (mavisi) (+) değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.4 ve Şekil 4.5’de normal ve varikosel hasta grupları arasında sperm maturasyon defekti açısından (%) değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Sperm maturasyon defekti normal hasta grubunda varikosel hasta grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir.

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



Şekil 4.6. Acridine orange (turuncusu) boyama

DNA fragmentasyonu olmayan sperm hücreleri yeşil (normal) boyanırken, kavun içi ve turuncu(defekli) boyanan sperm hücreleri DNA fragmentasyonunu göstermektedir. (100X immersiyon objektifi floresan mikroskop görüntüsü)



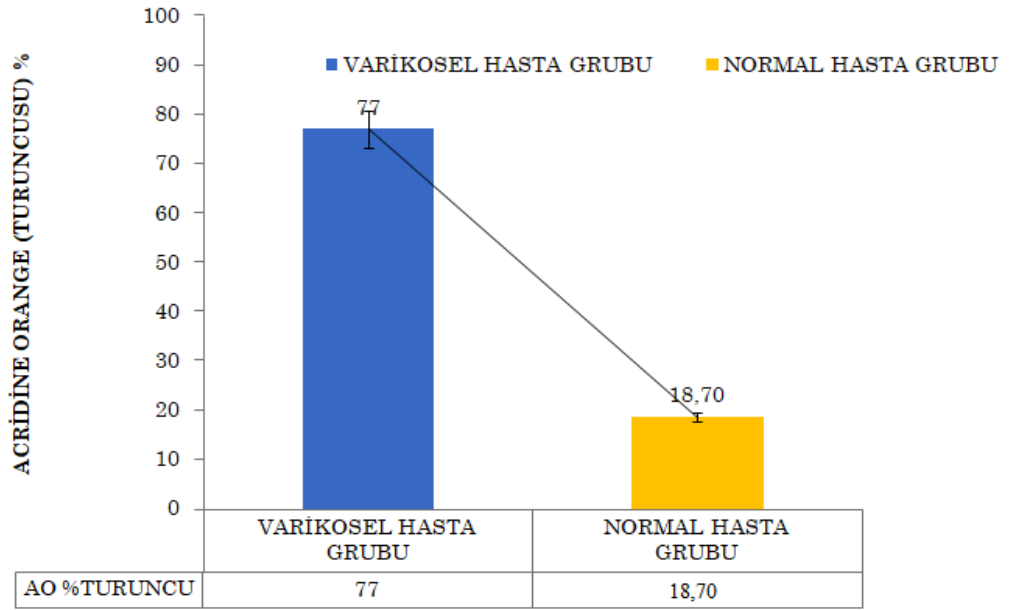
Şekil 4.7. Acridine orange(turuncusu) boyama

DNA fragmentasyonuna sahip spermatozoa (turuncu) ve kontrol (yeşil) DNA'ya sahip spermleri göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskopi görüntüsü)

Tablo 4.5. Normal ve varikozel hasta gruplarında Acridine orange (turuncusu) % değerlerinin karşılaştırılması

DNA Fragmantasyon İndeksi (%) (DFI)	Normal Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	Varikozel Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	t	p
Acridine Orange (Turuncusu)	18,70 $\pm$ 5,00	77 $\pm$ 7,87	30,356	,000

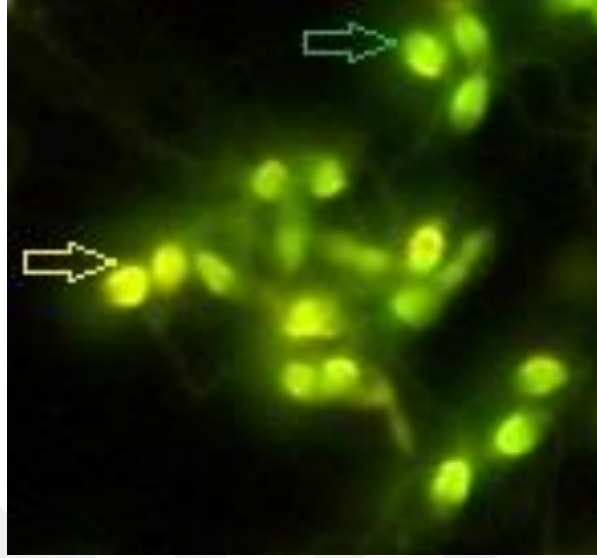
ACRIDİNE ORANGE (TURUNCUSU) %



Şekil 4.8. Normal ve varikozel hasta gruplarında acridine orange (turuncusu) % değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 9 ve Şekil 20’de normal ve varikozel hasta grupları arasında sperm DNA fragmentasyonu (%) değişkeni açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). DNA fragmentasyon indeksi normal hasta grubunda varikozel grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir.

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



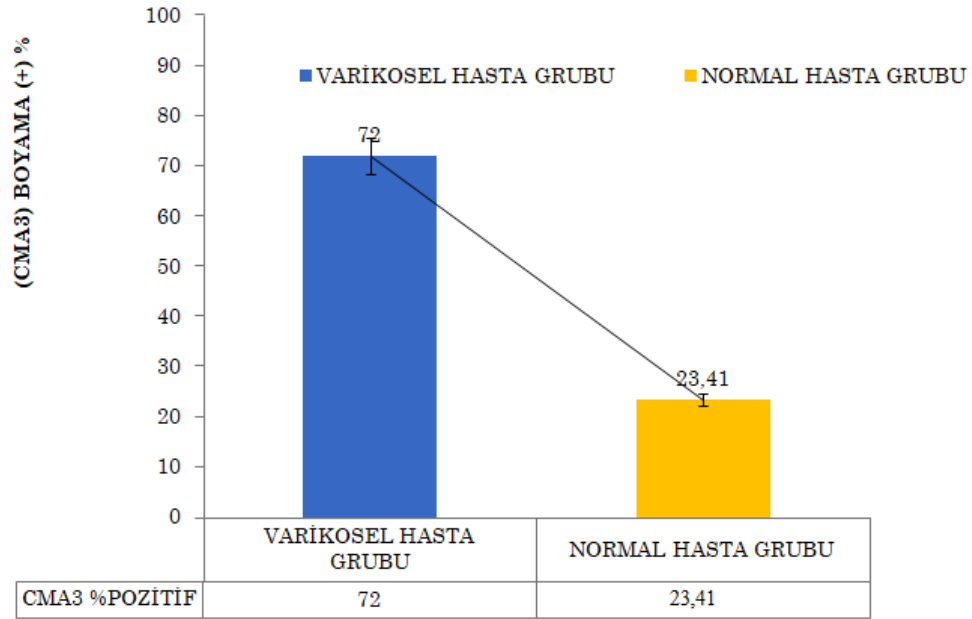
Şekil 4.9. Chromomycin A3 boyama

Parlak sarı boyanan sperm DNA'sı decondanase, soluk mat sarı ve yeşil boyanan spermatozoalar ise kondanase sperm DNA'sına sahip olarak değerlendirildi (100X immersiyon objektifi floresan mikroskop görüntüsü).

Tablo 4.6. Normal ve varikozel hasta gruplarında Chromomycin (CMA3) (+) % değerlerinin karşılaştırılması

Sperm Kondansasyon Defekti (%)	Normal Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	Varikozel Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	t	p
Chromomycin(%)	23,41 $\pm$ 7,70	72 $\pm$ 14	14,893	,000

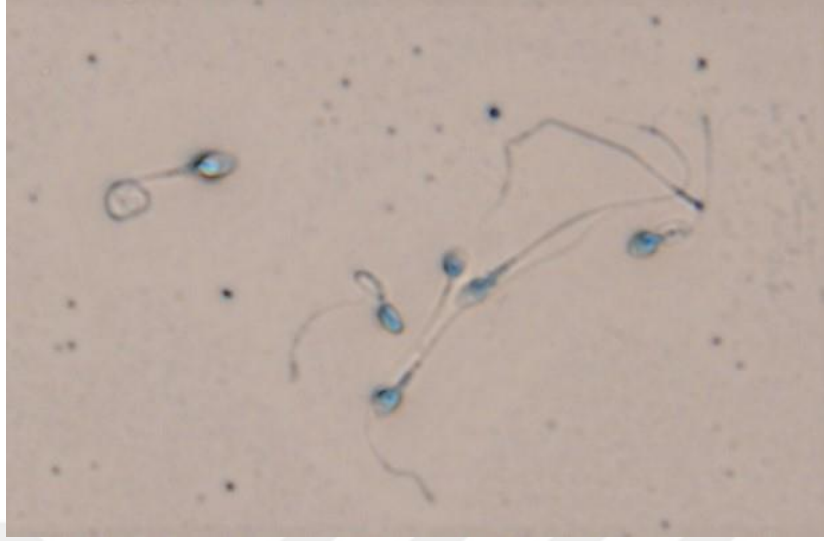
CHROMOMYCİN (CMA3) BOYAMA (+) %



Şekil 4.10. Normal ve varikozel hasta gruplarında Chromomycin (CMA3) (+) % değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 4.6 ve Şekil 4.10’da sperm kondansasyon defekti değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$). Sperm kondansasyon defekti normal hasta grubunda varikozel hasta grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir.

4.7. Anormal Mitokondriyal Membran Potansiyeli Sonuçları



Şekil 4.11. Nitroblue tetrazolium boyama mavi (pozitif) boyama

Mavi boyanan oksidatif strese etkilenen spermatozoalar olarak gösterilmektedir (100X immersiyon objektifi ışık mikroskop görüntüsü).



Şekil 4.12. Nitroblue tetrazolium boyama mavi (pozitif) boyama

Mavi boyanan spermatozoa (100X immersiyon objektifi ışık mikroskop görüntüsü)



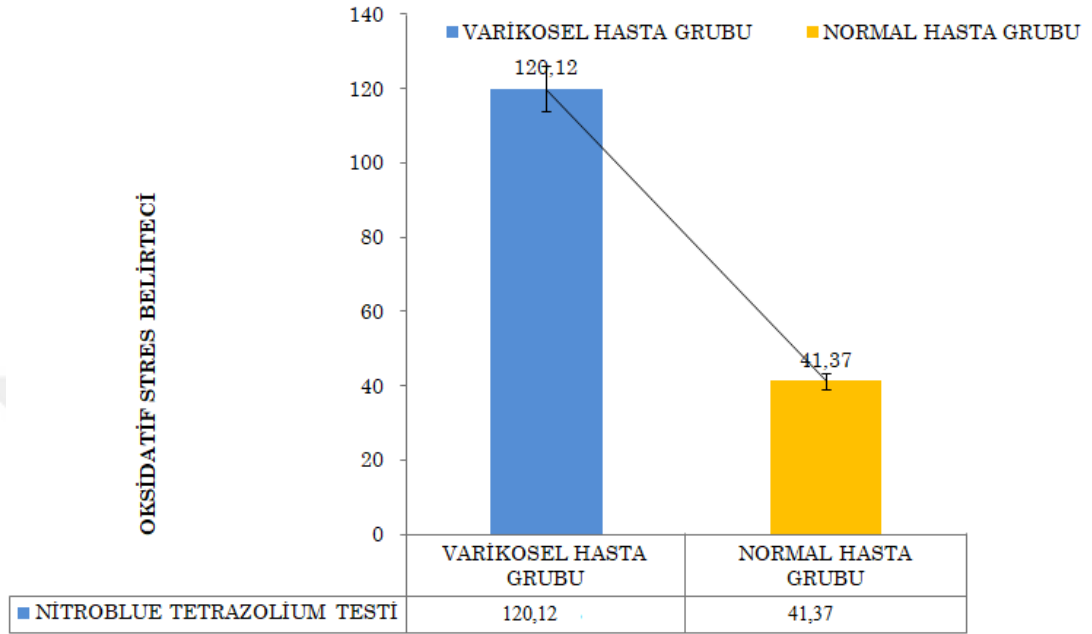
Şekil 4.13. Nitroblue tetrazolium boyama

Boyayı almayan spermiler oksidatif stres açısından etkilenmemiş spermiler olarak belirlenip, boyanmayan (negatif) spermiler kontrol olarak gösterilmiştir (100X immersiyon objektifi ışık mikroskop görüntüsü).

Tablo 4.7. Varikozel ve normal hasta gruplarında Nitroblue tetrazolium ile boyanmış sperm anormal mitokondriyal membran potansiyeli değerlerinin karşılaştırılması

Oksidatif stres belirteci	Normal Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	Varikozel Hasta Grubu ($\bar{x} \pm SD$)	t	p
Nitroblue Tetrazolium Testi	41,37 $\pm$ 12,55	120,12 $\pm$ 13,59	20,848	,000

NİTROBLUE TETRAZOLİUM TESTİ



Şekil 4.14. Varikösel ve normal hasta gruplarında Nitroblue Tetrazolium ile boyanmış sperm anormal mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi

Tablo 4.7 ve Şekil 4.14 'te mitokondriyal membran potansiyeli (%) değerleri değişkenleri açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Oksidatif stres kaynaklı anormal sperm mitokondriyal membran potansiyeli normal hasta grubunda varikösel hasta grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir.

* $p<0,05$, ** $p<0,005$

Normal ve varikösel hasta gruplarında prograssif hareket (ileri hareketli motilite yüzdesi), yerinde hareketli motilite yüzdesi ve non-prograssif hareket (hareketsiz sperm yüzdesi) oranlarına bakıldığında, varikösel grubunda normal hasta grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür.

Normal ve varikösel hasta gruplarında normal ve boyun morfolojisi oranlarına bakıldığında, varikösel grubunda normal hasta grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür.

Normal ve varikosel hasta gruplarında Anilin blue (mavisi)(+) ile sperm maturasyon defekti oranına bakıldığında, varikosel hasta grubunda normal hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek maturasyon defekti görülmüştür.

Normal ve varikosel hasta gruplarında Acridine orange (turuncusu) boyama ile sperm DNA fragmentasyon indeksi oranına bakıldığında, varikosel hasta grubunda normal hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek DNA fragmentasyonu görülmektedir.

Normal ve varikosel hasta gruplarında Chromomycin A3 boyama ile sperm kondensasyon defekti oranına bakıldığında, varikosel hasta grubunda normal hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek sperm kondansasyon defekti görülmektedir.

Normal ve varikosel hasta gruplarında Nitroblue tetrazolium boyama ile anormal sperm mitokondriyal membran potansiyelin oranına bakıldığında, varikosel hasta grubunda normal hasta grubuna göre anlamlı derecede yüksek anormal mitokondriyal membran potansiyeline sahip sperm görülmüştür.

5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Tartışma

Günümüzde infertilite sorunu yaşayan çiftlerin en sık erkek faktörlü etiyolojisi varikozel kaynaklıdır. Kliniklere başvuran çiftlerin yardımcı üreme teknikleri IVF, IUI ve ICSI uygulamalarında başarısız üreme siklusları ile sonuçlanmaktadır. Varikozel, erkek infertilitesinde geri dönüştürülebilir infertilite risk faktörüdür (Levinger, 2007). İnfertilite değerlendirilmesi rutin olarak semen analizi ile başlamaktadır. Varikozel vakalarının semen analizleri ile ilgili yapılan çalışmada anormal semen parametreleri %26 oranında belirlenirken, farklı varikozel semen analizi çalışması sonucunda her vakada varikozelin spermatogenezi etkilemediği, varikozelli erkeklerin yalnızca %20'sinin infertilite ile klinik yardıma başvurduğu bulgulanmıştır (MacLeod, 1965; Agarwal ve ark., 2016).

İnfertilite analizi için yapılan spermiyogram yalnızca semendeki sperm konsantrasyonu, hareketliliği ve morfolojik olarak değerlendirilmektedir. Ancak semen analizinde sperm nukleer yapısı ve DNA kalitesi belirlenmemekte, yardımcı üreme teknikleri uygulansa da yüksek başarı oranlarının yükselmemesine neden olmakta ve sperm DNA hasarı tespiti ile ilgili farklı tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir (Auger ve ark., 1990).

Varikozelin temel mekanizması olan testise oksijen bakımından düşük, metabolit ürün bakımından yüksek oranlı kanın geri akışı normal hücresel koşulları değiştirir (Turner ve ark., 1989). Metabolizma ürün olan reaktif oksijen türevleri ile savunma sistemi antioksidanları arasındaki dengesizlik oksidatif stresi oluşturarak erkek üreme hücresi olan spermleri olumsuz etkileyerek infertiliteye neden olur (Aitken, 2006). İnfertil ve fertil erkek grupları ile yapılan çalışmada ROS kaynaklı DNA hasarı ile infertil erkek gruplarındaki seminal düşük antioksidan seviyesi ilişkilidir (Smith ve ark., 1996).

Sperm kalitesinde önemli belirteç olan DNA bütünlüğü ile ilgili yapılan çalışmalarda sperm DNA hasarının yüksek olarak görüldüğü erkek gruplarında fertilitede problemlerin olduğu belirlenmiştir (Park ve ark., 2018). Varikosel kaynaklı oksidatif stres DNA hasarını tetikleyerek fertilizasyon başarısızlıkları, başarısız yardımcı üreme döngüsü ve spontan düşüklere neden olmaktadır. Cocuzza ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada varikoselli erkek gruplarında yüksek oksidatif stres miktarı ve negatif semen parametreleri gözlenmiştir (Cocuzza ve ark., 2008).

Oksidatif stresin DNA hasarı üzerindeki temel etkisi DNA baz eşleşmesi, tek ya da çift zincir kırıkları, kromozomal düzenlenme ile delesyon, nokta mutasyonu gibi gen mutasyonlarıdır (Sharma ve ark., 2004; Aitken ve ark., 2001).

Agarwal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yüksek reaktif oksijen türevine maruz kalan erkek bireylerde infertilite gözlenirken, fertil bireyler ile karşılaştırıldığında kromozom kırıklarının yüksek oranda olduğu belirlenmiştir (Agarwal ve ark., 2007).

Sperm DNA'sının korunması protaminlerle yoğunlaştırılmış kromatin yapısı uygun nuklear yapı ve nukleer korunma için erkek fertilitesinde önemli mekanizmadır (Santana ve ark., 2017). Sperm DNA'sının kompaksiyonu ile stabil hale gelmesi sperm genomunu toksik metabolit, yüksek sıcaklık, oksidatif stres gibi faktörlerden koruyarak DNA hasarını önlemektedir (Dieamant ve ark., 2017).

Yapılan çalışmalarda CMA3 boyama ile anormal kromatin paketlenmesinin incelenmesi sonucu varikoselli hastalarda daha yüksek oranda meydana geldiği bulgulanmıştır (Dieamant ve ark., 2017). İnfertil ve fertil erkek semen örnekleri ile yapılan çalışmalarda varikoselli hasta örneklerine göre fertil grupta anormal ve immatur kromatin içeren spermatozoa oranlarının daha az görüldüğü belirlenmiştir (Romeo ve ark., 2009).

Bu çalışmada CMA3 boyama ile incelenen normal hasta grubu sperm örneklerinde anormal kromatin paketlenmeye sahip sperm oranlarının daha düşük olduğu görülmüştür. Varikosel ve oksidatif stresin kromatin paketlenme mekanizmasında negatif etkiye sahip olduğu ve sonucunda reaktif oksijen türevlerinin anormal kromatin paketlenme gösteren spermlerdeki negatif etkisi gösterilmiştir.

Sperm DNA'sı histonlar ile karakterize olup maturasyon sırasında histon-protamin değişimi meydana gelir (Bianchi ve ark., 1996). Nükleer histon preoteinleri yüksek oranda lizin bulundururken protaminler sistein ve arjinine zengindir (Manicardi ve ark., 1995). Sperm kalitesinde önemli belirteç olan DNA bütünlüğü ile ilgili yapılan çalışmalarda sperm DNA hasarının yüksek olarak görüldüğü erkek gruplarında fertilitede problemlerin olduğu belirlenmiştir (Hammadeh ve ark., 1996).

Yapılan  alışmalar gösterir ki spermatozoonun immatur olması artan ROS seviyesi ve DNA hasarı ile ilişkili olup, ejakulatta yüksek sayıda olduğu belirlenmiştir(Santana ve ark., 2017).

Anilin blue (mavisi) boyası lizin bölgelerine bağlanarak histonca zengin maturasyon anomalili spermleri ifade eder (Auger ve ark., 1990; Hammadeh ve ark., 1996). Kromatin kondensasyonuna bağlı sperm maturasyonu tüm fertilit  olgularında önemli olduğu gibi yapılan çalışmalarda sperm kromozomal anoploidi, sperm DNA ve kromatin bütünlüğü gibi parametrelerde anomali oranlarının yüksek olduğu semen örneklerinde fertil grup ile karşılaştırıldığında tekrarlayan spontan düşüklerin görüldüğü infertil çiftlere ait olduğu belirlenmiştir (Talebi ve ark., 2012; Virro ve ark., 2004; Carrell ve ark., 2003; Evenson ve ark., 1999).

Hafif erkek faktörlü ve açıklanamayan infertil olgularda sperm kromatin kondensasyon değerlerinin anilin mavisi negatif sperm oranları belirlenerek histon protaminasyonunun fertilizasyon sonrası embriyo gelimindeki önemi gösterilmiştir. IUI ve ICSI olgularında da pozitif gebeliği öngörmek amacı ile kullanılacağı gösterilmiştir (Irez ve ark., 2015).

Bu çalışmada yapılan Anilin blue(mavisi) boya ile normal hasta grubunda sperm DNA fragmentasyonu varikosel grubuna göre daha düşük olduğu ve anormal kromatin protaminasyonu oranlarının varikoselli grupta daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Sperm DNA fragmentasyonunun varikosel kaynaklı olduğu, reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretimi ile DNA yapısındaki bazları hedef alması fragmentasyona neden olarak varikosel grubunda yüksek oranda olduğu g r lm ştir.

Reaktif oksijen türevlerinin hücresel kaynağı sperm mitokondrisi ve plazma membranıdır (Aitken, 2011). Hücresel reaktif oksijen türevlerinin kaynağı %90 hücre mitokondrisidir (Balaban ve ark., 2005). Spermatozoanın reaktif oksijen türevi kaynağı sperm plazma zarında bulunan nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz ve mitokondride bulunan NADPH bağımlı oksidoredüktaz sistemi adı verilen iki farklı mekanizma ile oluşmaktadır (Aitken, 1992). İki enzim sistemi de değişen koşullarla birlikte H₂O₂ üretimini sağlamaktadır.

Sperm boyun kısmında bulunan NADP, elektron donörü olarak bilinen NADPH, süperoksit anyonlarının NADPH redüktaz ile üretimini sağlayarak NBT'ye elektron transferine öncülük eder (Lee ve ark., 2005). Formazan molekülleri redüklenerek sarı renkten mavi formazan çökeltisine dönüşür (Marchetti ve ark., 2002).

Tunç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Nitroblue tetrazolium ile reaktif oksijen türevleri miktarının belirlenmesinde kullanılıp, artan formazan molekülleri ile artan reaktif oksijen türevi miktarının ilişkili olduğu belirlenmiştir (Tunç ve ark., 2010).

Bu çalışmada NBT boyama tekniği ile varikozel hasta grubunda normal gruba göre yüksek oranda NBT pozitif sperm hücresi miktarı belirlenmiştir. Boyanan sperm hücrelerinin varikozel kaynaklı oksidatif strese etkilenerek normal gruba göre 3 kat daha fazla sitoplazmik formazan molekülü içeren sperm miktarı görülmüştür.

Araştırmalar sonucu formazan üretim miktarı ile sperm DNA hasarı arasında yüksek ilişki bulunmuştur (Fernández ve ark., 2015). Reaktif oksijen türevleri DNA yapısının pürin ve pirimidin bazlarına direk saldırarak DNA yapısında hasara neden olmaktadır (Ozmen ve ark., 2007). Hücresel bileşenler olan lipidler, proteinler, nükleik asitler ve şekerler serbest radikallerin temel hedefleridir (Koksal, 2003). Oksidatif stres etkisinde çoklu doymamış yağ asidi bakımından zengin sperm membranı oksidasyona en açık moleküllerdir (Aitken, 1994). Membran akışkanlığını sağlayan bu yapı sperm motilitesi ve oosit füzyonu için etkilidir.

ROS etkisinde lipid peroksidasyonunun meydana gelmesi ile hücre içi pH'ın düşmesiyle sperm baş, boyun defektlerine ve membran hasarları sperm kapasitasyonu ve akrozomal reaksiyonu etkilemekte, canlı sperm oranları ve sperm motilitesindeki azalmayla birlikte infertilite ile sonuçlandığı bilinmektedir(Sikka, 1996).

ATP üretiminden sorumlu mitokondrinin fonksiyonel anomalisi anormal mitokondriyal membran potansiyelini ifade etmektedir. Anormal mitokondriyal aktivite durumunun en önemli sebeplerinden biri artan ROS seviyesidir. Varikosel kaynaklı oksidatif stres koşullarında yüksek oranda mitokondriyal disfonksiyon ilişkili anormal mitokondriyal membran potansiyeli oranları tespit edilmiştir (Dieamant ve ark., 2017).

Anormal mitokondriyal membran potansiyeli oranlarının artan ROS seviyeleri ile ilişkili olduğu ve azalan sperm hareketliliği ile artan DNA hasarına öncülük ettiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Meseguer ve ark., 2008).

Sakkas ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada spermatozoayı etkileyen yüksek oranlı reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretiminin DNA fragmantasyonunu arttırarak, sperm mitokondriyal aktivitesini azalttığı bulgulanmıştır(Sakkas ve ark., 2010).

Varikoselli erkeklerde yapılan çalışmalarda anormal mitokondriyal membran potansiyeli ve inaktif mitokondri seviyelerinin yüksek oranda olduğu, sonuç olarak varikosel kaynaklı oksidatif stresin inaktif sperm mitokondrileri ile ilişkili olduğu bulgulanmıştır (Koppers ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalarda formazan üretiminin artması ile sperm motilitesinin azalması ROS ile meydana geldiği belirlenmiştir (Mercado-Pichardo ve ark., 1981). ROS, sperm motilitesini membran lipid peroksidasyonu ve sperm mitokondrisinde hasar meydana getirerek etkilemektedir. Oksidatif stres nedeni ile mitokondri fonksiyonel bozukluklarının ortaya çıkması enerji kullanılabilirliği azaltarak sperm hareketini kısıtlamaktadır.

Bu çalışmada yapılan varikoselli hasta gruplarında mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi Nitroblue tetrazolium ile gerçekleştirilerek, normal gruba göre 3 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Varikosel kaynaklı oksidatif stresin sperm mitokondrisi üzerindeki etkisi ile maruz kaldığı görülmüştür. Sperm

motilitesinde önemli rol oynayan enerji organeli mitokondrinin fonksiyonel bozukluğu ve ROS kaynaklı lipid peroksidasyonun artması varikoselli hastaların sperm motilitesinde normal gruba göre yüksek oranda azalma görülmüş, oksidatif stres kaynaklı sperm hareketliliğinde azalma kanıtlanmıştır. Varikoselin oksidatif stresi meydana getirerek azalan sperm motilitesi ile ilişkili olduğu görülmüştür.

5.2. Öneriler

Yaptığımız çalışmalar sonucu varikoselin etiyolojisi sonucu reaktif oksijen türevleri artışı ile meydana gelen oksidatif stres, spermde DNA hasarına neden olarak sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonunu arttırdığı sonucuna varıldı. Sperm kromatin kondensasyonunda etkili olan varikosel kaynaklı oksidatif stres ile yüksek oranda DNA maturasyon defekti görüldüğü sonucuna varıldı.

Sperm boyun kısmında yer alan mitokondrilerin etkilenmesi anormal mitokondriyal membran potansiyeline sahip sperm oranları varikosel ile arttığı sonucuna varıldı. Negatif etkilenen boyun lokalize mitokondrilerin artması ile sperm boyun defekti oranları artarken, enerji mekanizmasının etkilenmesi ile sperm hareketliliği azaldığı sonucuna varıldı.

Varikosel, sperm morfoloji, hareketlilik, DNA fragmentasyonu, sperm kromatin kondensasyonu, DNA maturasyonu ve mitokondriyal membran potansiyeli üzerinde negatif etki gösterdiği sonucuna varıldı.

6. KAYNAKLAR

- Abd-Elmoaty M.A., S. R. (2010). Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. *Fertil Steril* , 94:1531–4.
- Acheson R.M. (1973). Acridines. *New York: Interscience Publishers* .
- Agarwal A, N. K. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* , 8:616-27.
- AGARWAL A., S. T. (2004). Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *Center for Advanced Research in Human Reproduction, Infertility, and Sexual Function, Glickman Urological Institute and Department of Obstetrics and Gynecology* .
- Agarwal A., P. S. (2007). Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *AUA Update Series* , 26:1-12.
- Agarwal A., S. R. (2009). Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology* , 73:461–9.
- Agarwal A., S. R. (2016). Effect of varicocele on semen characteristics according to the new 2010 World Health Organization criteria: a systematic review and meta-analysis. *Asian Journal of Andrology* , 18, 163–170.
- Aitken R.J., C. J. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function . *Biol Reprod.* , 41(1):183–197.
- Aitken RJ, C. J. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* , 41(1):183–197.).
- Aitken RJ, B. D. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol* , 151:466-77.
- Aitken J., K. C. (1994). Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev* , 39:268-79.
- Aitken RJ. (1999). The Amoroso Lecture. The human spermatozoon-a cell in crisis? *J Reprod Fertil* , 115:1-7.
- Aitken R.J., K. C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* , 122(4):497–506.

- Aitken R.J., G. Z. (2006). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* , 28:1-10.
- Aitken R.J, C. B. (2011). Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxid Redox Signal* , 1(14):367–81.
- Aitken R.J., K. A. (2011). Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology* , 36–42.
- Alberts B, J. A. (2002). Molecular Biology of the Cell. 4th edition. *New York: Garland Science* , Sperm.
- Alkan İ., Y. M. (2018). Superoxide Anion Production by the Spermatozoa of Men with Varicocele: Relationship with Varicocele Grade and Semen Parameters. *World J Mens Health* 2018 , 36(3): 255-262.
- Alsaikhan B., A. K. (2016). Epidemiology of varicocele. *Asian Journal of Andrology* , 18, 179–181.
- Aoki VW, C. D. (2003). Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J. Androl* , Dec.5(4): 315-24.
- Auger J., M. M. (1990). Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* , 13:452–62. 4.
- B.Peterlin, T. J. (2002). Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Human Reproduction* , 17-24.
- Balaban, R. S. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* , 120, 483–495.
- Balhorn R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *Journal of Cell Biology* , 93(2):298–305.
- Balhorn R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology* , 8(9):p. 227.
- Bauche F., F. M. (1994). Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett.* , 349: 392–6.
- Bedford JM, C. H. (1974). The occurrence and possible functional significance of S-S crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J Exp Zool* , 188:137–56.
- Belardin L.B., G. P. (2016). Alterations in the proliferative/apoptotic equilibrium in semen of adolescents with varicocele. *J Assist Reprod Genet* , 33:1657–1664.

- Bianchi P, M. G. (1993). Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biology of Reproduction* 49 , 1083–1088.
- Bianchi P, M. G. (1996). Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 2 , 139–144.
- Boekelheide K. (2005). Mechanisms of Toxic Damage to Spermatogenesis. *Journal of the National Cancer Institute Monographs* , No. 34.
- Bonde JP, E. E. (1998). elation between semen quality and fertility: a population based study of 430 first pregnancy planners. *R Lancet* , 1172–7.
- Carrell DT, L. L. (2003). . Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* , 49:49-55.
- Chakraborty J., H. A. (1995). Stagnation of blood in the microcirculatory vessels in the testes of men with varicocele. *Journal of Andrology*, vol. 6, no. 2, pp , 117–124.
- Champroux A., T.-C. J. (2016). Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin Androl.* , 26: 17. Published online.
- Chiles K.A., S. P. (2016). Cost-effectiveness of varicocele surgery in the era of assisted reproductive technology. *Asian J Androl* , 18:259–61.
- Cocuzza M., A. K. (2008). Impact of clinical varicocele and testis size on seminal reactive oxygen species levels in a fertile population: a prospective controlled study. *Fertil Steril* , 90:1103–8.
- Coyle CH, K. K. (2007). Mechanisms of H₂O₂-induced oxidative stress in endothelial cells exposed to physiologic shear stress. *ASAIO J* , 53:17-22.
- Dadoune J.P., M. M.-M. (1988). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* , 20:211-7.
- Dadoune JP, M. M.-M. (1988). Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* , 20:211-7.
- Dahl E.V., H. J. (1959). A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg Gynecol Obstet* , 108: 697–705.
- Darley-Usmar V, W. H. (1995). Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett* , 369:131-135.

- De la Casa, M. F.-F. (2015). Semi-quantitative assessment of superoxide in the human neat ejaculate using a Nitro BlueTetrazoilum based assay: a comparison of visual, spectrophotometric and image analysis approaches. *FIV Reprod.Med. Genet* , 3, 2–5.
- Dieamant F., P. C. (2017). Semen parameters in men with varicocele: DNA fragmentation, chromatin packaging, mitochondrial membrane potential, and apoptosis. *JBRA Assisted Reproduction* , 21(4):295-301 .
- Donnell L.O. (2014). Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed. *Spermatogenesis* , 4:2, e979623.
- Dunkel L., H. V. (1997). Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death Differ* , Apr;4(3):171-9.
- Durackova Z. (2010). Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* , 59, 459-469.
- Erimşah S., S. İ. (2008). Sperm Morfolojisi ve Kromatin Kondensasyon Defektleri Arasındaki Korelasyon. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* , 39(4):128-135.
- ESFANDIARI N., S. R. (2003). Utility of the Nitroblue Tetrazolium Reduction Test for Assessment of Reactive Oxygen Species Production by Seminal Leukocytes and Spermatozoa. *Journal of Andrology* , Vol. 24, No. 6.
- Esterhuizen A, F. D. (2000). Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates. . *Human Reproduction* 15 , 657–661.
- Esteves S.C., A. A. (2016). Afterword to varicocele and male infertility: current concepts and future perspectives. *Asian J Androl* , 18: 319-322.
- Eşrefoğlu M., E. (2016). *Özel Histoloji 2. Baskı* (s. Bölüm 9 Erkek Genital Sistemi). içinde İstanbul Tıp Kitabevi.
- Evenson DP, J. L. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* , 14:1039-49.
- Fujii J., I. H. (2014). Redox reactions in mammalian spermatogenesis and the potential targets of reactive oxygen species under oxidative stress. *Spermatogenesis* , 4:2, e979108.
- Fujisawa M., Y. S. (1988). Decrease of topoisomerase I activity in the testes of infertile men with varicocele. *Arch Androl* , 21(1):45–50.
- Gartner P.L., H. L. (2016). *Hücre Biyolojisi ve Histolojisi. 7. Baskı*, İstanbul Tıp Kitabevi.

- Gaur DS, T. M. (2010). Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. . *Ind J Pathol Microbiol* , 53: 35–40.
- Ghabili K., S. M. (2009). Hypothesis: intracellular acidification contributes to infertility. *Fertility and Sterility* , vol. 92, no. 1, pp. 399–401.
- Goldstein M., E. J. (1989). Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele,. *The Journal of Urology* , vol. 142, no. 3, pp. 743–745.
- Gomez E., B. D. (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual. *J Androl*, 17, 276-87.
- Gomez E, I. D. (1998). Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl* , 21:81-94.
- Gosálvez J., C. L.-F. (2017). Multi-centre assessment of nitroblue tetrazolium reactivity in human semen as a potential marker of oxidative stress. *Reproductive Biomedicine Online* , 513-521.
- Grunewald S., F. G. (2017). Induction of ultra-morphological features of apoptosis in mature and immature sperm. *Asian Journal of Andrology* , 533–537.
- Haans L.C., L. J. (1991). Testis volumes, semen quality, and hormonal patterns in adolescents with and without a varicocele. *Fertil Steril* , 56: 731–736.
- Hamilton TR, S. A. (2018). Effect of Heat Stress on Sperm DNA: Protamine Assessment in Ram Spermatozoa and Testicle. *Oxid Med Cell Longev.* , 25;2018:5413056.
- Hammadeh ME, a.-H. S. (1996). The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod* , 11:2468–71.
- Hammadeh ME, Z. T. (2001). Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl* , 46: 99–104.
- Henkel R.R., M. R.-B. (2001). Seasonal Changes in Human Sperm Chromatin Condensation,. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* , 371-377.
- Hofmann N, H. B. (1991). Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* , 6:979–82.

- Hoshi K., K. H. (1996). The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertility and Sterility*, vol. 66, no. 4 , 634–639.
- Iranpour F, N.-E. M. (2000). Chromomycin A3 staining as a useful tool for evaluation of male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* , 17, 60–66.
- Irez T, S. S. (2015). Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques. *Andrologia* .
- Irez T, D. N. (2018). The use of aniline blue chromatin condensation test on prediction of pregnancy in mild male factor and unexplained male infertility. *Andrologia* . , Dec;50(10):e13111. doi: 10.1111/and.13111. Epub 2018 Jul 19.
- J.Horst, D. a. (1997). The molecular genetics of male infertility. *Molecular Human Reproduction* , 419–430.
- Jarow JP. (2001). Effects of varicocele on male fertility. *Hum Reprod Update* , 7:59–64.
- Jensen CE, W. K. (1995). Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. *Fertil Steril* , 64(6):1189-96.
- Jo J., K. H. (2015). Improvements in Scrotal Thermoregulation in Patients with Varicoceles Treated by Using Traditional Korean Medicine: Two Case Reports. *Medical Association of Pharmacopuncture Institute* , pISSN 2005-2901 eISSN 2093-8152.
- Jungwirth A, D. T. (2015). *European Association of Urology (EAU) guidelines on male infertility*.
- Junqueira L.C. , Carneiro J, Kelley R O. (1998). ‘22. Bölüm Erkek Üreme Sistemi’, ‘Basic Histology 8th edition’. AYTEKİN Y., Barış Kitabevi.
- Kantartzi P.D., G. C. (2007). Male infertility and varicocele: myths and reality. *HIPPOKRATIA* , 3: 99-104.
- Karadağ, T. K. (2013). Erkek infertilitesinde antioksidan tedavinin yeri. *Erkek Üreme Sağlığı* , 55, 263-264.
- Kass E.J., R. C. (1995). Adolescent varicocele. *Urologic Clinics of North America*, vol. 22, no. 1 , 151–159.
- Kierszenbaum A. L., (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş* (s. ‘Bölüm 20:Spermatogenez). içinde Ankara: Çev.Ed. Demir R., Palme Yayıncılık.

- Koksal I.T., T. A. (2000). The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. *BJU Int* , 86: 549–52.
- Koksal I.T., U. M. (2003). Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J. Androl.* , 5: 95–9.
- Koksal I.T., I. Y. (2007). Varicocele-induced testicular dysfunction may be associated with disruption of blood-testis barrier. *Archives of Andrology*, vol. 53, no. 1 , 43–48.
- Koppers AJ, D. I. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* , 93:3199-207.
- Kruger TF, A. A. (1988). Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* , 49:112-7.
- Kumar S, K. A. (2009). Lifestyle factors in deteriorating male reproductive health. *Indian J Exp Biol* , 47:615-24.
- Kupis K., D. P. (2015). Varicocele as a source of male infertility – current treatment techniques. *Cent European J Urol* , 68: 365-370.
- Lee, C. L. (2005). Oxidative stress-induced depolymerization of microtubules and alteration of mitochondrial mass in human cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci* , 1042, 246–254.
- Lee J.D., L. C. (2012). Increased expression of hypoxia-inducible factor 1-aand metallothionein in varicocele and varicose veins. *Phlebology* , 27: 409–15.
- Levinger U., G. M. (2007). Is varicocele prevalence increasing with age. . *Andrologia* , 39: 70–80.
- Lobascio M., D. F. (2015). Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *American Society of Andrology and European Academy of Andrology Andrology* , 265–270.
- Lolis D, G. I. (1996). Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and. *International Journal of Andrology* 19 , 23–27.
- MacLeod J. (1965). Seminal cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril* , 16: 735–757.
- Manicardi G, B. P. (1995). Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biology of Reproduction* 52 , 864–867 .

- Marchetti, C. O. (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum. Reprod* , 1257-1265.
- Mariotti A, M. M. (2013). Endocrinology of sex steroid hormones and cell dynamic in the peridontium. *Periodontol 2000* . , Feb;61(1):69-88.
- McClure R.D., K. D. (1991). Subclinical varicocele: the effectiveness of varicocelelectomy. *J Urol* , 145: 789–791.
- Mercado-Pichardo, E. V.-R.-F.-T. (1981). Reduction capacity on nitroblue tetrazolium (NBT) of the normal human spermatozoa. *Archivos de Investigacion medica* , 12, 107–114.
- Meseguer, M. M.-C. (2008). The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertility and Sterility* , 89, 1191–1199.
- Mruk D.D., S. B. (2002). Antioxidant superoxide dismutase-a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* , 65: 305–11.
- Nagata S. (2000). Apoptotic DNA Fragmentation, *Experimental Cell Research*. Volume 256, Issue 1 , Pages 12-18.
- Nasr-Esfahani M.H., A. H. (2007). Varicocelelectomy: semen parameters and protaminedeficiency. *international journal of andrology* , ISSN 0105-6263.
- Nasr-Esfahani M, R. S. (2008). Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. *Fertility and Sterility* 89 , 892–898.
- National Institute for Health and Care Excellence. *Fertility problems: Assessment and Treatment*. (2013). 07 12, 2017 tarihinde www.nice.org.uk/guidance/cg adresinden alındı
- O’Flynn O’Brien KL, V. A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil Steril* , 93:1-2.
- Oldereid NB, T. Y. (1998). Selenium in human male reproductive organs. *Human Reproduction* , 13: 2172–2176.
- Olshan AF, A. C. (1995). Intrauterine growth retardation as an endpoint in mutation epidemiology: an evaluation based on paternal age. *Mutation Research/Genetic Toxicology Volume 344, Issues 1–2* , 89-94.
- Organization, W. H. (1992). The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* , 57:1289–93.

- Organization, W. H. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen*.
- Owen R.C., M. B. (2017). A review of varicocele repair for pain. 10.21037/tau.2017.03.36.
- Ozmen, B. K.-H. (2007). DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reproductive BioMedicine* , 14, 384–395.
- Park Y.S, L. S. (2018). Abnormal Human Sperm Parameters Contribute to Sperm DNA Fragmentation in Men with Varicocele. *World J Mens Health* , 36(3): 239-247.
- Pasqualotto F., L. A. (2005). Relationship between the number of veins ligated in a varicocelectomy with testicular volume, hormonal levels and semen parameters outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, Vol. 22, No. 6 , 10.1007/s10815-005-5147-4.
- Pathak P., C. A. (2016). Varicocele management in the era of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Asian J Androl* , 18:343–8.
- Peluso G., P. A. (2013). The study of spermatid DNA fragmentation and sperm motility in infertile subjects. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia* , 85, 1.
- Pierre Clement, F. G. (2016). Physiology and Pharmacology of Ejaculation. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* , 119, 18–25.
- Poccia D. (1986). Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis fertilization and early development. *Int Rev Cytol* , 105:1–65.
- Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine*. (2008). Fertil steril.
- Quinn GP, V. S. (2009). Physician referral for fertility preservation in oncology patients: a national study of practice behaviors. . *J Clin Oncol* , 27: 5952–7.
- Rajfer J., T. T. (1987). Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. *Biol Reprod.* , 36(4):933–7.
- Rawin E., 2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet* , 28:10-2.
- Renee Reijo, T.-Y. L. (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics* , 383-393.

- RJ, A. (1999). The Amoroso Lecture. The human spermatozoon-a cell in crisis? *J Reprod Fertil* , 115:1-7.
- Romeo C., S. G. (2009). Varicocele and infertility: why a prevention? *Journal of Endocrinological Investigation* , vol. 32,no. 6, pp. 559–561.
- Ross H.M., K. G. (2003). Histology, a text and atlas 4th edition. *Lippincott Williams&Wilkins PhiledelphiaLippincott Williams&Wilkins Philedelphia* , 689-696.
- Sakamoto Y., I. T. (2008). The assessment of oxidative stress in infertile patients with varicocele. *BJU Int* , 101: 1547–1552.
- Sakkas D, U. F. (1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 11 , 837–843.
- Sakkas D., A. J. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* , 1(93):1027–36.
- Santana V.P., M. C. (2017). Genetics and epigenetics of varicocele pathophysiology: an overview. *J Assist Reprod Genet* , 34:839–847.
- Sezgin Gunes, G. N. (2016). Effects of aging on the male reproductive system. *J Assist Reprod Genet* , 33:441–454.
- Sharma R.K., S. T. (2004). Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl.* , 6(2):139–48.
- Sheehan M.M., R. R. (2014). Molecular mechanisms involved in varicocele-associated infertility. *J Assist Reprod Genet* , 31:521–526.
- Shiraishi K., M. H. (2012). Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Int J Urol* , 19: 538-550.
- Shridharani A., O. R. (2016). The significance of clinical practice guidelines on adult varicocele detection and management. *Asian J Androl* , 18: 269-275.
- Sikka S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosci* , 1:e78–e86.
- Singh N.P., S. R. (1998). X-Ray induced DNA double-strand breaks in human sperm. *Mutagenesis* , Jan;13(1):75-9.
- Smith R., V. D. (1996). Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod* , 11: 1655–1660.
- Sofikitis N., D. K. (1993). Anatomical characteristics of the left testicular venous system in man. *Arch Androl* , 30: 79-85.

- Sofikitis N., M. I. (1993). Left adrenalectomy in varicocelized rats does not inhibit the development of varicocele-related physiologic alterations. *Int J Fertil Menopausal Stud.* , 38:250–5.
- Sofikitis N., S. S. (2014). Mysteries facts and fiction in varicocele pathophysiology and treatment. *European Urology Supplements* , 13: 89-99.
- Spiropoulos J., T. D. (2002). Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? . *Mol Hum Reprod.* , 8:719–21.
- Stefan S., P. D. (2015). Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. *J Assist Reprod Genet* , 32:509–520.
- Swan SH. (2006). Semen quality in fertile US men in relation to geographical area and pesticide exposure. *Int J Androl* , 29:62-8.
- Sweeney T.E., R. J. (1991). Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *Am J Physiol* , 260(5 Pt 2):H1581–9.).
- Talebi AR, V. S. (2012). Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* , 1:462-70.
- Tamburrino L., M. S. (2012). Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian Journal of Andrology* , 24–31.
- Terquem A, Dadoune JP. . (1983). Aniline blue staining of human spermatozoa chromatin: evaluation of nuclear maturation. In: *Andre J, ed. The sperm cell. London: Martinus Nijhoff Publishers* , 249–52. 2.
- Tesarik J., M. C. (2002). Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after icsi. *Human Reproduction, Voleme 17* , 184,189.
- Tsili A.C., X. O. (2017). Potential role of imaging in assessing harmful effects on spermatogenesis in adult testes with varicocele. *World J Radiol* , 9(2): 34-45.
- Tunc Ö., T. J. (2010). Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stres. *International Journal of Andrology* , 13–21.
- Turner T.T., L. T. (1989). Effects of experimental varicocele require neither adrenal contribution nor venous reflux. *J Urol.* , 142:1372–5.
- Valentino M., B. M. (2014). Children and adults varicocele: diagnostic issues and therapeutical strategies. *J Ultrasound* , 17: 185-193.
- Virro MR, L.-C. K. (2004). Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in

- vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* , 81:1289-95.
- Winters BR, Walsh TJ. . (2014). The epidemiology of male infertility. *Urol Clin North Am* , 41(1):195-204.
- Yamaguchi M., S. J. (1989). The application of intrascrotal deep body temperature measurement for the noninvasive diagnosis of varicoceles. *Fertil. Steril* .
- Zalata A.A., A. A. (2004). Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl.* , 6:313–8.
- Zorgniotti A.W., M. J. (1973). Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril* , 24: 854–863.
- Zorgniotti A.W., S. A. (1998). Measurement of intrascrotal temperature in normal and subfertile men. *J. Reprod.Fertil* , 82: 563–6.
- Zorn B., G. B. (2012). Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. *J Assist Reprod Genet* , 29:357–364.
- Yeni Biyoloji (12 Aralık 2017), www.yenibiyoloji.com
nbbi.nlm.nih.gov.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10095/figure/A4691/?report=objectonly> adresinden alınmıştır.

7. EKLER

EK 1. Gönüllü Olur Formu

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR”

İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: ‘Varikozel olgularında semen oksidatif stres ürünleri ve antioksidanları ile birlikte sperm mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi’

Sizi, ‘Varikozel olgularında semen oksidatif stres ürünleri ve antioksidanları ile birlikte sperm mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi’ 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: Prof. Dr. Tülay İREZ

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

Sizi davet ettiğimiz çalışmanın amacı testisteki damarlarda normal olmayan genişleme sonucu ortaya çıkan varikozel hastalığına sahip erkeklerde semen analizi yapmak, hasta ve normal erkek spermelerinde çevresel faktörlerle oluşan stres etkisinin incelenmesidir. Çalışmanın ortalama bir ay sürmesi ve yaklaşık 47 kişinin katılması planlanmaktadır.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım?

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

Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?

Bu çalışmaya katılmanız halinde herhangi bir maddi sorumluluk altına girmeyeceksiniz.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

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

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

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

ADI : Ayşegül AVCI

GÖREVİ : Diğer Araştırmacı

TELEFON : 0506 790 80 33

Biruni Üniversitesi'nde Ayşegül AVCI 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. Ayşegül Avcı'yı 05067908033 nolu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

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

Katılımcı

Adı, soyadı:

Tel:

İmza:

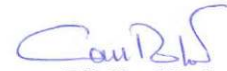
EK 2. Etik Kurul Onayı

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

24.07.2019

Sayın Prof.Dr.Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda planladığı “Varikozel Olgularında Semen Oksidatif Stres Ürünleri ve Antioksidanları İle Birlikte Sperm Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Değerlendirilmesi” isimli araştırmanızın kurulumuzun 24.07.2019 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

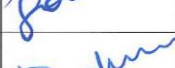
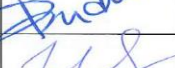


Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN

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

Tarih: 24.07.2019 Toplantı Sayısı:31	Karar No: 2019/31-03 Prof.Dr.Tülay İREZ'in planladığı "Varikozel Olgularında Semen Oksidatif Stres Ürünleri ve Antioksidanları İle Birlikte Sperm Mitokondriyal Membran Potansiyelinin Değerlendirilmesi" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.
---	--

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 Zeynep HOŞBAY	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü	Üye	
Dr.Öğr.Üyesi.Ayşe Dilşad YAKUT	Eğitim Fakültesi	Özel Eğitim	Üye	

Ek 3. Hastane Onay Formu

BİRÜNİ
ÜNİVERSİTE HASTANESİ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığına;

Biruni Üniversitesi Prof. Dr. Tülay İREZ'in yürütücüsü olduğu, Biruni Üniversitesi Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ayşegül AVCI'nın araştırmacısı olduğu "Varikozel olgularında semen oksidatif stres ürünleri ve antioksidanları ile birlikte sperm mitokondriyal membran potansiyelinin değerlendirilmesi" isimli tez çalışmasında, hastanemiz üroloji polikliniğine gelen hastaların semen örneklerinin, çalışma sonrası atık materyallerinin tez çalışmasında kullanılması tarafımdan uygun görülmüştür.

Uygun

BİRÜNİ ÜNİVERSİTE HASTANESİ
SAĞLIK EĞİTİMİ UYG. VE ARAŞ. MERKEZİ
Dr. Öğr. Üyesi **MURAT BAHADIR**
Başhekim
Dip.Tes.No: 94321 Kurum Kodu: 1134997

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ayşegül AVCI

Doğum Tarihi ve Yeri: 18.02.1994

Mail Adresi: aysegul-avci@windowslive.com

Unvanı: Biyolog

Öğrenim Durumu: Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2016
Y. Lisans	Klinik Embriyoloji	Biruni Üniversitesi	2017- Devam Ediyor

9. İNTİHAL RAPORU

VARİKOSEL OLGULARINDA SEMEN OKSİDATİF STRES ÜRÜNLERİ VE ANTİOKSİDANLARI İLE BİRLİKTE SPERM MİTOKONDİRİYAL MEMBRAN POTANSİYELİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJİNALLIK RAPORU

% 4	% 3	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.toraks.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
2	mersin.mitosweb.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	jeb.biologists.org İnternet Kaynağı	<% 1
4	ir.lib.uth.gr İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.uroturk.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	metekilciler.net İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.sporbilimleri.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	nuevo.sefertilidad.com	