T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İNFERTİL ERKEKLERDEKİ SPERM DNA HASARININ COMET ASSAY İLE TAYİNİ

Ayşen DURMAZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Nurten DİKMEN

ADANA-2010

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İNFERTİL ERKEKLERDEKİ SPERM DNA HASARININ COMET ASSAY İLE TAYİNİ

Ayşen DURMAZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Nurten DİKMEN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TF2007D8 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: …….

ADANA-2010

TEŞEKKÜR

Tezim konusunda bana ışık tutan, ilgi, sevgi ve sabır ile hiçbir yardımı esirgemeyen, her konuda çok büyük desteğini gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Nurten DİKMEN'e sonsuz minettarım.

Tezimin gerçekleştirilmesi aşamasında karşılıksız yardım ve desteğini benden esirgemeyen, laboratuvarını bana açan, her türlü isteğime güler yüzü ile "evet" diyen ve ailesi ile geçireceği istirahat saatlerini çalmama müsaade eden değerli hocam Doç. Dr. Cumhur GÜNDÜZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın yürütülmesinde beni destekleyen, yönlendiren, bilimsel ve sosyal katkılarını esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Levent KAYRIN'a ve Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisans eğitimim sırasında laboratuvar asistanımız olan, eğitimimde emeği geçen ve doktora tez çalışmalarım sırasında da bana laboratuvarını açan güler yüzlü, genç ve sempatik hocam Doç. Dr. Suna TİMUR'a ve asistanı canım arkadaşım Dilek ODACI DEMİRKOL'a teşekkürlerimi sunuyorum

Örnek toplama konusunda yardımlarını gördüğüm, bilgi ve tecrübeleri ile bana destek veren değerli hocalarım Prof. Dr. Erol TAVMERGEN ve Prof. Dr. Ege TAVMERGEN GÖKER'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca Ege Üniversitesi Androloji laboratuvarı çalışanları Günsel UĞRAŞ'a ve Murat ERSÖZ'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamı TF2007D8 numaralı proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Her sıkıntımda olduğu gibi tezimin hazırlanması esnasında da yanımda olan canım arkadaşlarım, dostlarım Özge KIRAN, Nilüfer ÇALIMLIOĞLU, Pelin YAŞAR, Müge BİLGİN ve Tuba SUSAMCI'ya ayrıca teşekkür ederim.

Eğitimim ve öğrenimim süresince, daima yanımda olan ve her türlü fedakarlıkta bulunan sevgili anneme ve babama şükran borçluyum.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	
TEŞEKKÜR	**i**
İÇİNDEKİLER	**ii**
ŞEKİLLER DİZİNİ	**vi**
ÇİZELGELER DİZİNİ	**ix**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	**xi**
ÖZET	**xiii**
ABSTRACT	**xiv**
1.GİRİŞ VE AMAÇ	**1**
2. GENEL BİLGİLER	**4**
2.1. İnfertilitenin Tanımı	**4**
2.2. Erkek İnfertilitesinin Başlıca Nedenleri	**4**
2.2.1. Hormonal Bozukluklar	**4**
2.2.2. Genetik Bozukluklar	**4**
2.2.3. Çeşitli Metabolik Hastalıklar	**5**
2.2.4. Gonadotoksinler	**5**
2.2.5. Anormal Spermatogenez	**5**
2.3. Erkek İnfertilitesinde Kullanılan Testler	**5**
2.3.1. Semen Analizi (Spermiyogram)	**6**
2.3.1.1. Semenin Toplanması	**7**
2.3.1.2. Semenin Makroskobik İncelenmesi	**8**
2.3.1.2.1. Koagülasyon ve Likefaksiyon	**8**
2.3.1.2.2. Görünüm ve Koku	**9**
2.3.1.2.3. Volüm	**9**
2.3.1.2.4. pH	**9**
2.3.1.3. Semenin Mikroskobik İncelemesi	**9**
2.3.1.3.1. Sperm sayımı (Derişim)	**10**
2.3.1.2. Sperm Hareketliliği (Sperm Motilitesi)	**11**
2.3.1.3. Sperm Morfolojisi	**11**

2.3.1.3.1. Normal Sperm Morfolojisi **12**
2.4. GAMETOGENEZ **13**
2.4.1. SPERMATOGENEZ **14**
2.4.2. SPERMİYOGENEZ **15**
2.5. Spermatozoon DNA'sı **17**
2.6. Spermatozoon DNA'sında Hasara Neden Olan Faktörler **20**
2.6.1. İç nedenler (İntrinsik faktörler) **20**
2.6.1.1. Protamin Eksikliği **20**
2.6.1.2. Oksidatif Stres **21**
2.6.1.3. Apoptoz **23**
2.6.1.4. Yaş **25**
2.6.2. Dış nedenler (Ekstrinsik faktörler) **25**
2.6.2.1. Kanser, Kemoterapi ve Radyoterapi **25**
2.6.2.2. Sigara **26**
2.6.2.3. Genotoksik Bileşikler **27**
2.6.2.4. Çevre **28**
2.7. Sperm DNA Hasarı Hangi Durumlarda Tespit Edilmelidir? **29**
2.7.1. Erkek İnfertilitesinin Tanısında **29**
2.7.2. Üremeye Yardımcı Tekniklerde **29**
2.7.3. Embriyonal Kayıplarda **30**
2.7.4. Kanser Hastalarında **30**
2.8. Spermatozoon DNA'sındaki Hasarın Tespit Edilmesinde Kullanılan Yöntemler **30**
2.8.1. Asidik Anilin Mavisi Boyaması (AAB) **31**
2.8.1.1. Prensip **31**
2.8.1.2. Yöntem **31**
2.8.2. Toluidin Mavisi Boyaması (TB) **32**
2.8.2.1. Prensip **32**
2.8.2.2. Yöntem **32**
2.8.3. Kromomisin A_3 (CMA_3) Boyaması **33**
2.8.3.1. Prensip **33**
2.8.3.2. Yöntem **33**

2.8.4. DBD-FISH Yöntemi **33**
2.8.4.1. Prensip **33**
2.8.4.2. Yöntem **34**
2.8.5. In situ Nick Translation (NT) Ölçümü **35**
2.8.5.1. Prensip **35**
2.8.5.2. Yöntem **35**
2.8.6. Akridin Oranj (AO) Boyaması **35**
2.8.6.1. Prensip **35**
2.8.6.2. Yöntem **36**
2.8.7. Sperm Kromatin Dispersiyon (SCD) Testi **36**
2.8.7.1. Prensip **36**
2.8.7.2. Yöntem **37**
2.8.8. COMET ASSAY **37**
2.8.8.1. Prensip **37**
2.8.8.2. Yöntem **39**
2.8.8.3. Lizis Solüsyonu **39**
2.8.8.4. Elektroforez Tamponu **40**
2.8.8.5. Lam Hazırlama **40**
2.8.8.5.1. Tek Tabakalı Lam Modeli **40**
2.8.8.5.2. Üç Tabakalı Lam Modeli (Sandviç Modeli) **41**
2.8.8.6. Nötralizasyon **41**
2.8.8.7. Lamların Saklanması **41**
2.8.8.8. Boyama **41**
2.8.8.9. Veri Analizi **42**
2.8.9. TUNEL Testi **43**
2.8.9.1. Prensip **43**
2.8.9.2. Yöntem **43**
2.8.10. Sperm Kromatin Strüktür Analizi (SCSA) **44**
2.8.10.1. Prensip **44**
2.8.10.2. Yöntem **45**
2.8.11. *8*-Hidroksi *2*-Deoksiguanozin Ölçümü **45**
2.8.11.1. Prensip **45**

2.8.11.2. Yöntem **45**
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER **48**
3.1. Gereçler ve Kimyasal Maddeler **48**
3.1.1. Gereçler **48**
3.1.2. Kimyasal Maddeler **48**
3.2. Örneklerin Temini ve Gruplandırılması **49**
3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ **50**
3.3.1. Spermiyogram **50**
3.3.1.1. Makroskobik İnceleme **50**
3.3.1.2. Mikroskobik İnceleme **50**
3.3.1.2.1. Sperm sayısının belirlenmesi **50**
3.3.1.2.2. Morfolojik sınıflandırma **50**
3.3.1.2.3. Sperm yıkama işlemi ve Swim-up **51**
3.3.2. Sperm DNA Hasarının COMET ASSAY İle Analizi **52**
3.3.2.1. Örnek hazırlama **53**
3.3.2.2. Lam Hazırlama **53**
3.3.2.3. Hücre parçalanması ve DNA dekondenzasyonu **53**
3.3.2.4. Elektroforez **53**
3.3.2.5. Nötralizasyon **54**
3.3.2.6. Fiksasyon **54**
3.3.2.7. Boyama **54**
3.3.2.8. Verilerin Analizi **55**
3.4. İstatistiksel Değerlendirme **62**
4. BULGULAR **64**
4.1. Olguların Belirlenmesi ve Analizleri **64**
4.2. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) ve *in vitro* Fertilizasyon (IVF) Uygulanan Olgunun COMET Analizi **89**
5. TARTIŞMA **100**
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **114**
7. KAYNAKLAR **116**
8. ÖZGEÇMİŞ **130**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Makler sperm sayma kamarası 10
Şekil 2. Normal morfolojiye sahip sperm yapısı 13
Şekil 3. Testis, epididimis, vaza deferens 14
Şekil 4. Spermiyogenez golgi evresinden kep evresi 16
Şekil 5. Paternal kromozomların spermiyogenezis sırasında yeniden düzenlenmesi 18
Şekil 6. Spermde oksidatif strese neden olan faktörler 22
Şekil 7. İmmatür spermatozoada ROT üretimi ve DNA hasarı 23
Şekil 8. a) Toluidine mavisi boyaması **b)** DBD-FISH yöntemi **c)** Akridin oranj boyaması 32
Şekil 9. (a) SCD testi resimleri **a1)** büyük halo **a2)** orta büyüklükteki halo **a3)** küçük halo **a4)** halo yok **(b)** COMET görüntüleri **b1)** hasarlı DNA **b2)** sağlam DNA 37
Şekil10. Normal morfolojiye sahip sperm 51
Şekil 11. Anormal morfolojiye sahip spermler 51
Şekil 12. Elektroforez tankı 54
Şekil 13. Güç kaynağı 54
Şekil 14. DNA hasarı içermeyen normospermik olgu 55
Şekil 15. DNA hasarı ve patolojisi bulunan bir olgu 55
Şekil 16. CometScore 1,5 Tritek bilgisayar programı 56
Şekil 17. Program aracılığı ile hasar hesaplamada ilk adım 56
Şekil 18. Program aracılığı ile hasar hesaplamada ikinci adım 57
Şekil 19. Program aracılığı ile hasar hesaplamada üçüncü adım 57
Şekil 20. Program aracılığı ile hasar hesaplamada dördüncü adım 58
Şekil 21. Program aracılığı ile hasar hesaplamada beşinci adım 58
Şekil 22. Program aracılığı ile hasar hesaplamada altıncı adım 59
Şekil 23. Program aracılığı ile hasar hesaplamada yedinci adım 59
Şekil 24. Hesaplaması yapılmış olan hücrelerin not defteri görüntüsü 60
Şekil 25. Not defterinin excell programına aktarımı 61

Şekil 26. Ondalık ve binlik ayıraçlarının değiştirilmesinde izlenecek ilk adım 61
Şekil 27. Ondalık ve binlik ayıraçlarının değiştirilmesinde izlenecek ikinci adım 62
Şekil 28. Not defterinin excell sayfasına aktarılmış son hali 62
Şekil 29. Gruplara ait ortalama yaş değerlerinin grafiksel gösterimi 69
Şekil 30. Gruplardaki ortalama semen hacmi değerleri 70
Şekil 31. Gruplardaki ortalama sperm sayılarını gösteren grafik 71
Şekil 32. Gruplara özgü ortalama motilite değerlerini gösteren grafik 72
Şekil 33. Gruplara ait ortalama morfoloji değerlerini gösteren grafik 73
Şekil 34. Gruplardaki sigara içenlerin ve içmeyenlerin sayısını gösteren grafik 74
Şekil 35. Sigara içenler ile içmeyenlerin morfolojik açıdan karşılaştırılmasını gösteren grafik 76
Şekil 36. Gruplardaki alkol kullananların ve kullanmayanların sayısını gösteren grafik 77
Şekil 37. Alkol kullananlar ile kullanmayanların morfolojik karşılaştırılmasını gösteren grafik 78
Şekil 38. Spermiyogram parametrelerinin karşılıklı ilişkisini ve %95 güven aralığını gösteren grafik 80
Şekil 39. Normospermik gruba ait jel görüntüsü 81
Şekil 40. Teratospermik gruba ait jel görüntüsü 81
Şekil 41. Oligospermik gruba ait jel görüntüsü 81
Şekil 42. Astenospermik gruba ait jel görüntüsü 81
Şekil 43. Gruplardaki ortalama sağlam DNA oranının (%) grafiksel gösterimi 82
Şekil 44. Sigara kullananların ve kullanmayanların ortalama sağlam DNA yüzdelerinin grafiksel gösterimi 84
Şekil 45. Alkol kullanan ve kullanmayan bireylerdeki ortalama sağlam DNA yüzdelerinin grafiksel gösterimi 85

Şekil 46. Gruplara ait ortalama Kuyruk Momenti değerlerinin grafiksel gösterimi 86
Şekil 47. Spermiyogram parametrelerinin sağlam DNA oranı ve kuyruk momenti ile ilişkisini ve % 95 güven aralığını gösteren grafik 88
Şekil 48. 72 numaralı olguya ait Diff-quick ile boyanmış morfoloji preperatı 89
Şekil 49. %85 kısa kuyruklu, %100 baş anomalisine sahip spermler 89
Şekil 50. 1 numaralı oosit 90
Şekil 51. 2 numaralı oosit 90
Şekil 52. 3 numaralı oosit 91
Şekil 53. 4 numaralı oosit 91
Şekil 54. 5 numaralı oosit 92
Şekil 55. 6 numaralı oosit 92
Şekil 56. 1 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit 93
Şekil 57. 2 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit 93
Şekil 58. 3 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit 94
Şekil 59. 4 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit 94
Şekil 60. 5 numaralı fertilizasyon anomalisi gösteren (3 PN) oosit 95
Şekil 61. 6 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit 95
Şekil 62. 1 numaralı embriyo 96
Şekil 63. 2 numaralı embriyo 96
Şekil 64. 3 numaralı embriyo 97
Şekil 65. 4 numaralı embriyo 97
Şekil 66. 5 numaralı embriyo 98
Şekil 67. 6 numaralı embriyo 98
Şekil 68. 72 numaralı olgunun COMET ASSAY analizine ait jel görüntüsü 99
Şekil 69. İki pronukleus (PN) içeren, fertilize olmuş bir oosit 110
Şekil 70. 1 pronukleuslu (1PN) oosit 111
Şekil 71. 3 pronukleuslu (3PN) oosit 111
Şekil 72. Blastosist, iç hücre kitlesi ve dış hücre kitlesi 112

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Normospermik Grup- Olgu yaşı, spermiyogram değerleri, sağlam DNA yüzdesi ve kuyruk momenti değerleri 65
Çizelge 2. Teratospermik Grup- Olgu yaşı, spermiyogram değerleri, sağlam DNA yüzdesi ve kuyruk momenti değerleri 66
Çizelge 3. Oligospermik Grup - Olgu yaşı, spermiyogram değerleri, sağlam DNA yüzdesi ve kuyruk momenti değerleri 67
Çizelge 4. Astenospermik Grup - Olgu yaşı, spermiyogram değerleri, sağlam DNA yüzdesi ve kuyruk momenti değerleri 68
Çizelge 5. Gruplardaki ortalama yaş değerleri ve %95 güven aralığı 69
Çizelge 6. Gruplara ait ortalama semen hacmi değerleri ve %95 güven aralığı 70
Çizelge 7. Gruplara ait ortalama sperm sayısı değerleri ve %95 güven aralığı 71
Çizelge 8. Gruplara özgü ortalama motilite değerleri ve %95 güven aralığı 72
Çizelge 9. Gruplara ait ortalama morfoloji değerleri ve %95 güven aralığı 73
Çizelge 10. Her bir gruptaki sigara içen ve içmeyenlerin sayısı ve bunların yüzdeleri 74
Çizelge 11. Sigara içenler ile içmeyenlerin morfolojik açıdan karşılaştırılması 75
Çizelge 12. Gruplardaki alkol kullananların ve kullanmayanların sayıları ile yüzdeleri 77
Çizelge 13. Alkol kullananlar ile kullanmayanların morfolojik açıdan karşılaştırılması 78
Çizelge 14. Spermiyogram parametrelerinin karşılıklı ilişkileri 79
Çizelge 15. Gruplardaki yüzde sağlam DNA değerlerinin ortalaması ve %95 güven aralığı 82
Çizelge 16. Sigara içenlerde ve içmeyenlerde ortalama sağlam DNA yüzdeleri 83

Çizelge 17. Alkol kullanan ve kullanmayan bireylerdeki ortalama sağlam DNA yüzdeleri 85
Çizelge 18. Gruplardaki ortalama Kuyruk Momenti değerleri ve %95 güven aralığı 86
Çizelge 19. Spermiyogram parametrelerinin sağlam DNA oranı ve Kuyruk Momenti ile ilişkisi 87
Çizelge 20. 72 numaralı olguya ait spermiyogram sonucu 89
Çizelge 21. Normospermik grup ile 72 numaralı olguya ait sağlam DNA oranları (%) 99

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAB	Asidik Anilin Mavisi Boyaması
AO	Akridin oranj
AP	Alkalen fosfataz
ASA	Antisperm Antikor Testi
ATP	Adenozin Trifosfat
CAT	Kloramfenikol asetiltransferaz
CMA_3	Kromomisin A_3
DAPI	4′,6-diamidino-2-fenilindol
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
DBD-FISH	DNA Breakage Detection- Fluorescent in situ Hybridization Assay
dG	Deoksiguanozin
DFI	DNA Fragmantasyon İndeksi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DTT	Ditiyotreitol
dUTP	Deoksiuridin trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FACS	Floresan İndüklü Hücre Tiplendirme
FADD	Fas ilişkili ölüm domaini
FSH	Folikül uyarıcı hormon
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
8-OHdG	8-hidroksi 2-deoksiguanozin
HOS	Hipo-ozmolar şişme testi
HPLC-EC	Elektrokimyasal belirlemeli yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HZA	Hemizona Bağlanma Testi
ICM	İç Hücre Kitlesi
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IUI	İntrauterin inseminasyon

IVF	*In vitro* fertilizasyon
LH	Lutein yapıcı hormon
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
MII	Metefaz II
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (indirgenmiş)
NT	In situ nick translation
NMA	Normal erime noktasına sahip agaroz
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
P1	Protamin 1
P2	Protamin 2
PN	Pronukleus
PSA	Prostat Spesifik Antijen
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SCSA	Sperm Kromatin Strüktür Analizi
SCD	Sperm Kromatin Dispersiyon
SPA	Sperm Penetrasyon Testi
SSC	Tuzlu Sitrat Solusyonu
TB	Toluidin Mavisi Boyaması
TdT	Terminal deoksinükleotidiltransferaz
TE	Trofoektoderm
TNFR-1	Tümör Nekroz Faktörü
TRADD	TNFR-1 ilişkili ölüm domaini
TUNEL	Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı “Nick-end Labelling” Assay
WHO	Dünya Sağlık Teşkilatı

ÖZET

İnfertil Erkeklerdeki Sperm DNA Hasarının COMET ASSAY İle Tayini

İnfertilite, doğum kontrol yöntemi uygulamayan çiftlerde 1 yıllık sürede gebeliğin gerçekleşmemesidir. Erkek infertilitesi, infertil çiftlerin % 10-30'unda tek neden, % 15-30'unda ise kadındaki probleme ek olarak karşımıza çıkmakta, dolayısı ile vakaların yaklaşık % 50'sinde görülmektedir.

Günümüzde erkek bireyin değerlendirilmesinde rutin olarak, spermiyogram analizi kullanılmaktadır. Bu analiz sayesinde erkek infertilitesinin yaklaşık % 40-60'ında altta yatan etken ortaya konulabilmekteyken yaklaşık % 50'lik bir kısmında sorunun ana kaynağı tam olarak anlaşılamamakta ve idiyopatik infertilite olarak sınıflandırılmaktadır. Bu hasta grubu için de tanıyı koydurtabilecek ve tedaviye yön verecek yeni testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu anlamda son yıllarda en çok "Sperm DNA Hasarı" üzerinde durulmaktadır.

Bu çalışmada, infertil erkeklerdeki DNA hasarının basit, ucuz, duyarlı ve güvenilir bir yöntem olan COMET ASSAY ile tespit edilmesi planlanmıştır. Bu amaçla 20 normospermik, 20 oligospermik, 20 astenospermik ve 20 teratospermik olgunun sperm DNA hasarı hesaplanmış, sperm parametreleri ile DNA hasarı arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Ayrıca %85'i kısa kuyruklu olan ve %100 baş anomalisine sahip bir olgunun da mikroenjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon, klivaj ve gebelik durumu takip edilerek DNA hasarı ile ilişkisi de incelenmiştir.

İncelemeler sonucunda, normospermik grupta ortalama % sağlam DNA değeri 92,49 ± 7,92, teratospermik grupta 64,32 ± 32,08, oligospermik grupta 52,32 ± 26,59, astenospermik grupta ise 47,09 ± 35,48 olarak saptanmış olup normospermik gruptaki sağlam DNA oranının (%) diğer gruplardan anlamlı derecede ($p<0,001$) daha büyük olduğu saptanmıştır. Ayrıca DNA hasarının pronükleus oluşumunu engellemediği ancak, embriyo kalitesini azalttığı ve gebeliği negatif yönde etkilediği dikkat çekmiştir.

Anahtar Sözcükler: COMET ASSAY, İnfertilite, Sperm DNA hasarı, Sperm DNA yapısı.

ABSTRACT

The COMET ASSAY-assisted Determination of Sperm DNA Damage in Infertile Males

Infertility is the condition when pregnancy is not achieved within a one-year period in couples who do not use any contraceptive method. Male infertility is the only reason in 10-30% of the infertile couples, and in 15-30% of the couples it goes together with a problem in the female so it is found in about 50% of cases.

Today, spermiogram analysis is used routinely in the evaluation of the male individual. Thanks to this analysis, the underlying reason in about 40-60% of the male infertility can be found out but the main reason of the problem cannot be fully understood in 50% and it is classified as idiopathic infertility. For those patients, new tests are required to make a diagnosis and to guide the treatment. In this context, most emphasis has been put on "Sperm DNA Damage" in recent years.

In this study, it was planned to determine the DNA damage in the infertile males with COMET ASSAY, a method which is simple, cheap, sensitive and reliable. For this purpose, the sperm DNA damage of 20 normospermic, 20 oligospermic, 20 asthenospermic and 20 teratospermic cases was calculated and the relationship between sperm parameters and DNA damage was assessed. Also, the microinjection of a case with 85% short-tailed and 100% head anomaly was performed. Following the microinjection, fertilization, cleavage and pregnancy were monitored and its relation to DNA damage was also studied.

As a result of the examinations, the mean % value of undamaged DNA was 92.49 ± 7.92 in the normospermic group, 64.32 ± 32.08 in the teratospermic group, 52.32 ± 26.59 in the oligospermic group and 47.09 ± 35.48 in the asthenospermic group and it was observed that % value of undamaged DNA in normospermic group was significantly ($p<0,001$) greater than the others. Also, it was pointed out that DNA damage did not prevent the pronucleus formation but it diminished the embryo quality and affected pregnancy negatively.

Key words: COMET ASSAY, Infertility, Sperm DNA damage, Sperm DNA structure.

GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, doğum kontrol yöntemi uygulamayan çiftlerde 1 yıllık sürede gestasyonun gerçekleşmemesidir. İnfertil vakaların yaklaşık %50'si erkek kökenli bir probleme bağlıdır. Bu hastaların değerlendirilmesinde bakılan standart seminal faktörlerin (sperm sayısı, morfolojisi, motilitesi, pH'sı, antisperm antikoru vb) prediktif etkinliği sınırlıdır. Diğer yandan, erkek genomundaki anormallik fertilizasyon sonrası kötü kalitede embriyo gelişiminin önemli bir nedeni olarak görülmektedir. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işlemi sırasında spermin sadece motilite ve temel morfolojisine bakılıp, doğal seleksiyon sistemleri by-pass edildiğinden, neticede hasarlı genomun nakli yapılmış olabilir [1-5].

Sperm DNA bütünlüğünün korunmuş olması; başarılı bir gebelik ve genetik materyalin sonraki kuşaklara taşınması açısından büyük önem taşır. Birçok çalışma; üremeye yardımcı tekniklerin kullanımının ardından tekrarlayan başarısızlıklarda erkek faktörünün önemini ortaya koymuştur. Sperm kromatin yapısı ve DNA bütünlüğü fertilizasyonda da önemli bir parametredir. Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalarda infertil erkeklerdeki sperm kromatin defektinin ve DNA kırıklarının fertil hastalara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir [6-13].

DNA hasarı ortaya çıkaran nedenler apoptoz ya da spermatozoalardan kaynaklanan reaktif oksijen türleri (ROT) gibi internal faktörler olabileceği gibi, radyasyon, kemoterapi ya da ejakulattaki lökositler gibi dış faktörler de olabilir. Gerçekten de pek çok çalışmada sperm motilitesi ve morfolojisi ile ejakulattaki DNA hasarlı spermatozoa sayısı arasında doğrudan ilişki kurulmuştur. Eldeki kanıtlar DNA hasarlarının onarılmasının ya da en azından önlenmesinin, doğal yolla gebelik şansı kadar ICSI başarısını da anlamlı derecede artıracağı kanısını vermektedir[4,14,15,16].

Fertilizasyon mekanizmasında rol oynayan faktörler hakkında bilgilerimiz artmasına rağmen, hala fertil yaştaki her 6 çiftten biri çocuk sahibi olamamaktan yakınmaktadır. Bunların yarısında erkeği de ilgilendiren bir sorun bulunmakla birlikte, erkeklerin % 50'sinde sorunun nedeni bulunamamakta ve idiyopatik olarak sınıflandırılmaktadır. Oysa bu olguların büyük kısmının ejakulatlarında

lökositospermi görülür. Asemptomatik ürogenital enfeksiyon sıklığındaki düşüklük göz önüne alındığında, lökositlerin ya da ürünlerinin, yani ROT'nin, erkeğin fertilizasyon potansiyeli üzerine etkileri önem kazanmaktadır. Spermde DNA hasarlarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı konusu tam olarak izah edilmiş değildir. Değişik çalışmalarda inflamasyon, apoptoz, sigara ve oksidanların spermde kromatinin kondanse hale geçmesini engelledikleri gösterilmiştir. Kromatinde yeterli kondenzasyon gelişmez ise sperm DNA'sı kırık gelişimine daha hassas hale gelmektedir. DNA hasarı geçiren sperm sonuçta 1) tamir olabilir; 2) tamir kapasitesini aşmış ise hasarlı olarak çoğalmasına devam edebilir; 3) spermatogenez bir seviyede duraklayabilir (maturasyon duraklaması); ya da 4) hücre ölür[4,14,17].

DNA bütünlüğü korunmamış bir sperm ile oositin döllenebileceği, hatta gebelik oluşabileceği; ama gebeliğin devamının gerçekleşme olasılığının çok düşük olduğu unutulmamalıdır. Ayrıca yardımla üreme teknikleri ile doğan çocuklarda, kromozom anomalisi ve malformasyon oranlarının normale göre arttığı da bilinmektedir. Bu artışta önemli ölçüde spermle taşınan genetik anomalilerin etkisi vardır. Yardımla üreme teknikleri ile fertilizasyon ve canlı doğum oranlarının artması ve doğan çocuklarda kromozomal anomali ve malformasyon oranlarının azalması için intrauterin inseminasyon (IUI), *in vitro* fertilizasyon (IVF) veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulanmadan önce DNA hasarının varlığı mutlaka araştırılmalıdır[18,19,20].

Yukarıda bahsedilen nedenlerden dolayı; erkek infertilitesi tanı ve tedavisinde sperm DNA hasarının olup olmadığının değerlendirilmesi ayrı bir önem taşır. Günümüzde sperm DNA'sının bütünlüğünü incelemede yaygın olarak; 1) DNA'nın asit denaturasyonuna duyarlılığını ölçen Sperm Kromatin Strüktür Analizi (SCSA); 2) sperm DNA'sının tek veya iki iplikciğindeki hasarı enzimatik olarak ölçebilen Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı "Nick-end Labelling" (TUNEL) Assay; 3) COMET Analizi kullanılmaktadır[4,5,16,17,18,20].

Bu çalışmada, infertil erkeklerdeki DNA hasarının basit, ucuz, duyarlı ve güvenilir bir yöntem olan COMET ASSAY ile tespit edilmesi planlanmıştır. Bu amaçla 20 normospermik, 20 oligospermik, 20 astenospermik ve 20

teratospermik olgunun sperm DNA hasarı hesaplanmış, sperm parametreleri ile DNA hasarı arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

Ayrıca fertilizasyon, klivaj, blastosist gelişimi ve implantasyon gibi henüz tam olarak anlaşılamamış konulara da ışık tutacağı düşünülerek %85'i kısa kuyruklu olan ve %100 baş anomalisine sahip olan oligoastenoteratospermik bir vakanın mikroenjeksiyonu gerçekleştirilmiş olup aynı zamanda sperm DNA hasarı da COMET ASSAY ile hesaplanmıştır. Mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon, klivaj ve gebelik durumu takip edilerek DNA hasarı ile ilişkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİ

2.1. İnfertilitenin Tanımı

Düzenli bir cinsel yaşama rağmen (haftada iki kez) hiçbir korunma yöntemi uygulanmaksızın bir yıl içinde gebelik oluşmamasına infertilite denir. Erkek infertilitesi, infertil çiftlerin % 10-30'unda tek neden, % 15-30'unda ise kadındaki probleme ek olarak karşımıza çıkmakta, dolayısı ile vakaların yaklaşık %50'sinde görülmektedir[21,22].

Erkek infertilitesinin yaklaşık % 40-60'ında altta yatan neden bilinse de birçoğunda etken ortaya konulamamakta ve idiopatik infertilite olarak kabul edilmektedir[21].

2.2. Erkek İnfertilitesinin Başlıca Nedenleri

2.2.1. Hormonal Bozukluklar

- Primer testiküler yetmezlik (hipergonadotropik hipogonadizm),
- Hipogonadotropik hipogonadizm (Kallman sendromu),
- Hiperprolaktinemi,
- Androjen rezistansı,
- Hipotiroidizm,
- Konjenital adrenal hiperplazi,
- İzole LH eksikliği,
- İzole FSH eksikliği,
- Östrojen fazlalığı [23].

2.2.2. Genetik Bozukluklar

- Y kromozom mikrodelesyonları,
- Testis fonksiyonlarını bozan kromozom anomalileri (Klinefelter sendromu),
- Konjenital vaz deferens agenezisine neden olan Kistik Fibrozis gen mutasyonları,
- Sperm fonksiyonlarını direk olarak etkileyen genetik sendromlar :

Primer silier diskinezi,

Myotonik distrofi ve Noonan sendromu,

Orak hücre anemisi [2].

2.2.3. Çeşitli Metabolik Hastalıklar

- Testislere travma,
- Omurilik zedelenmesi,
- Böbrek yetmezliği,
- Karaciğer hastalığı,
- İmmünolojik hastalıklar,
- Enfeksiyonlar [21].

2.2.4. Gonadotoksinler

- İlaçlar, insektisitler,
- Radyasyon, manyetik alanlar,
- Alkol, sigara ve uyuşturucu maddeler,
- Gıda katkı maddeleri [21].

2.2.5. Anormal Spermatogenez

- Kriptoorşitizm (inmemiş testis),
- Varikosel,
- Sperm kanallarında tıkanıklık,
- Sperm motilite ve fonksiyon bozukluğu,
- Sperm morfoloji defekti,
- Maturasyon defekti [21].

2.3. Erkek İnfertilitesinde Kullanılan Testler

- Semen analizi (Spermiyogram),
- Anti sperm antikor testleri (ASA),
- Sperm Fonksiyon testleri,

  ∗ Sperm otoantikorları,

- ∗ Postkoital test,
- ∗ Hipo-ozmolar şişme testi (HOS),
- ∗ Hemizona bağlanma testi (HZA),
- ∗ Sperm penetrasyon testi (SPA),

- Sperm kromatin testleri,
  - ∗ Anilin mavisi testi,
  - ∗ Sperm kromatin strüktür assay (SCSA),
  - ∗ Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Aracılı “Nick-end Labelling” (TUNEL) Assay
  - ∗ Sperm kromatin dispersiyon (SCD) testi,
  - ∗ Akridin oranj (AO) boyama tekniği,
  - ∗ Tek hücre jel elektroforezi (COMET) [18,21,24].

2.3.1. Semen Analizi (Spermiyogram)

Normal koşullar altında semen (meni) hipotalamo-pitüiter testiküler aks dahilinde testislerin işlevi ve posttestiküler boşaltma kanallarıyla aksesuar bezlerin salgılarından oluşan bir son üründür.

Klinik anlamda semenin doğru değerlendirilmesi tüm androlojik yaklaşımlarla birlikte erkek faktörünün tanımlanmasını sağlayacaktır. İnfertilitede erkek faktörünün kesinlik kazanabilmesi için: öykü, genel fizik muayene, semen analizi ve hormonal tetkikler sırayla yapılmalı ve gereğinde testis biyopsisi, biyokimyasal ve fonksiyonel testlerle desteklenmelidir.

Semen analizi, standardize edilmesi oldukça güç bir tetkiktir. Çünkü kişiden kişiye olduğu kadar, aynı kişide bile cinsel perhiz süresi, ısı farklılığı, günün farklı saatleri, mevsimler, semen örneğinin verildiği yer, çalışma koşulları ve emosyonel duruma göre farklılık gösterebilir. Sayılan nedenlerden dolayı oldukça değişik sonuçlar verebilen semen analizi aynı kişide 3-4 hafta arayla iki kez yapılmalı ve çeşitli parametreler arasındaki farklılık %20 den fazla ise üçüncü kez yinelenmelidir[25].

2.3.1.1. Semenin Toplanması

Semen örneği ağzı geniş, kapağı kilitli, steril ve polistirenden yapılmış bir kaba alınmalıdır. Semen toplama kaplarının plastik yapısı daha önceden kimyasal ve biyolojik testlerle araştırılmış olmalıdır. Bu testler özellikle semen parametreleri üzerinde etkili olabilecek maddelerin araştırılması amacıyla yapılmalıdır. Polistiren kaplar içinde oda sıcaklığında uzun süre bekletilen semenin farklı parametreleri incelenmiş ve plastik maddenin neden olduğu bir değişiklik saptanmamıştır[25].

Semen örneğinin toplanmasında en güvenilir ve kabul edilir yol masturbasyondur. Çünkü ejakulatın tamamı yalnızca masturbasyonla toplanabilmektedir. Eğer psikolojik nedenler veya inançlardan dolayı masturbasyon yapılamıyor ise özel olarak dizayn edilmiş prezervatifler kullanılabilir. Doğum kontrol amacı ile kullanılan prezervatifler antispermatik etkiye sahip olduğundan tercih edilmemelidir. Geri çekme-boşalma (Coitus interrupts) tekniğinin ejekulatın toplanmasındaki güvenirliği azdır. Sperm hücreleri ejekulat içinde uniform dağılmadığı için numune kaybı yanlış sonuç verebilir[26].

Semen örneği mümkün olduğunca merkezde, hastalar için hazırlanan özel odada verilmelidir. Semen örneğini laboratuvarda veremeyen kişi evinden getirebilir. Semenin dışarıdan getirilmesi halinde en fazla 45 dakikada, vücut sıcaklığında muhafaza edilerek laboratuvara iletilmelidir. Zaman spermlerin motilitesinde düşüşe neden olurken, karşılaşılabilecek sıcaklık farklılığı da bu etkiyi arttıracaktır[25,26].

Semen örneği vermek üzere gelen kişinin cinsel perhiz süresi de önemlidir. Cinsel perhiz süresi infertilite problemi olmayan bireylerde sadece sayısal özellikleri etkileyen bir parametredir. Sperm sayısı ile cinsel perhiz süresi arasındaki doğru orantı birçok kez gösterilmiştir. Semen analizi sonuçlarını standardize edebilmek için kişilerden 3-5 günlük cinsel perhizle gelerek örnek vermeleri istenmelidir. 2-7 gün arasındaki cinsel perhiz süresi yeterli görülürse de kısa süreli cinsel perhizde menideki sperm sayısı az, uzun süreli cinsel perhizde de sperm sayısı yeterli olsa bile motilitenin düşük olduğu gözlenmiştir. Yapılan yapısal araştırmalarda, uzun süreli cinsel perhizin

spermlerin akrozin içeriğinde de azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Sperm motilitesi, uzayan cinsel perhiz süresinden en çok etkilenecek parametre gibi görünmesine rağmen; 5 günlük cinsel perhiz süresince önemli bir değişiklik göstermediği saptanmıştır. Sağlıklı bireylerde 2 yıllık süreç içinde farklı cinsel perhizlerden sonra alınan semen örneklerinde sperm sayısı 5-170 milyon/mL arasında değişmektedir. Dolayısıyla önerilen cinsel perhiz süresine uyulduğunda dikkatli bir şekilde yapılan semen analizi testislerin spermatogenetik ve steroidogenetik aktivitesiyle aksesuvar bezlerin çalışması hakkında sağlıklı bilgi sahibi olunmasını sağlayacaktır[25,26].

2.3.1.2. Semenin Makroskobik İncelenmesi

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasında ilk basamağı oluşturan spermiyogram analizinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 1992) tarafından belirlenen kriterler esas alınmaktadır. Semen analizi makroskobik ve mikroskobik incelemelerden oluşur[21].

Makroskobik incelemede semen, likefaksiyon, görünüm, volüm ve pH özellikleri yönünden değerlendirilmektedir[21].

2.3.1.2.1. Koagülasyon ve Likefaksiyon

Ejakülasyondan 5 ila 40 dakika sonra semen önce koagüle daha sonra likefiye olur. Bu olayın fizyolojik fonksiyonu tam olarak anlaşılamamakla birlikte kan koagülasyonundan farklı mekanizma ile gerçekleştiği bilinmektedir. Koagülasyondan veziküla seminalisten salınan enzimler, likefaksiyondan ise prostat ve covper bezinin sekresyonundaki proteolitik enzimler sorumludur. Seminal plazma içinde prostatik kökenli likefaksiyondan sorumlu proteolitik enzimler, plazminojen faktörleri ve prostat spesifik antijen (PSA) dir. Seminal plazma içindeki diğer proteolitik enzimler pepsinojen, lizozim, alfa-amilaz ve hyalürinidaz'dır. Ayrıca bu proteolitik aktiviteyi inhibe edici faktör olarak alfa-antitripsin ve alfa-antikimotripsin bulunmaktadır[26].

2.3.1.2.2. Görünüm ve Koku

Taze ejakulat gri-beyaz opelasan görünümdedir. Cinsel perhiz süresi uzadıkça rengi sarıya döner. Ayrıca, renk değişikliği muhtemel üriner sistem patolojileri ile ilişkili olabilir. Semende eritrositlerin bulunması halinde ise kırmızı-kahverengidir. Uzun süreli antibiyotik kullanımı semenin renksizleşmesine neden olabilir[25,26].

Semen, kendine özgü "Kestane Çiçeği" kokusundadır. Bu koku muhtemelen semen içerisindeki Diamin oksidaz aktivitesi sonucu ortaya çıkan aldehid grubundan kaynaklanmaktadır[26,27].

2.3.1.2.3. Volüm

WHO kriterlerine göre semen hacmi 2 ml veya daha fazla olmalıdır. 1 ml'den az olması durumu, hipospermik olarak isimlendirilip toplama sırasında örneğin dökülmüş olabileceği, kısa cinsel perhiz süresi, retrograd ejakülasyonu veya ejakülatör kanalda darlık gibi nedenler düşünülebilir. Miktarı 6 ml'den fazla olan semen içeriği hiperspermik olarak adlandırılır, bu durumda cinsel perhiz süresi uzun veya seminal sıvı fazladır[25].

2.3.1.2.4. pH

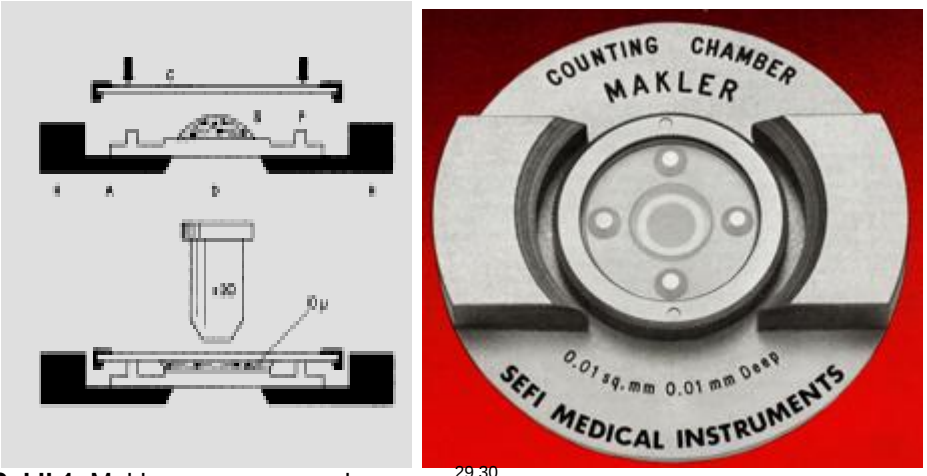
Ejakulatın normal pH'sı hafif baziktir (pH 7,5- 7,8). Prostatik fraksiyonun pH'sı 7'nin üstündedir. Çeşitli patolojik durumlar seminal plazmanın pH değerini etkiler. Atrofik testislerde, ejakulatuvar kanalların oklüzyonunda veya semenin idrarla kontaminasyonunda pH asitleşir (pH 6,3-6,6). Kronik enflamatuvar hastalıklarda da pH 7,2'nin altına düşebilir. Seminal veziküllerin akut hastalığında veya gecikmiş ölçümlerde seminal plazma devamlı CO_2 saldığı için pH yükselir[26].

2.3.1.3. Semenin Mikroskobik İncelemesi

Semen analizinde mikroskobik değerlendirmenin sağlıklı sonuç verebilmesi için faz kontrast ataşmanlı mikroskoplar kullanılmalı ve değerlendirmeler 10x20 büyütmede yapılmalıdır[28].

2.3.1.3.1. Sperm sayımı (Derişim)

Ejakülatta bulunan sperm sayısı likefaksiyonunu tamamlamış örnekte iki yöntemle değerlendirilebilir: 1) spermlerin hepsi immobilize edilerek sayım yapılır ya da 2) hareketli ve hareketsiz spermler birlikte değerlendirilir. Sperm sayımı için hemositometre, microcell, CellUV, Standard Count, Makler gibi çeşitli sayım kamaraları tanımlanmış olmakla birlikte günümüzde yaygın olarak Makler sayım kamarası kullanılmaktadır (Şekil 1)[21,28,29,30].



Şekil 1. Makler sperm sayma kamarası[29,30].

Makler sayım kamarası 1978 yılında Prof. Dr. Amnon Makler tarafından sperm sayımı için özel olarak tasarlanmıştır. Kamaranın derinliği 10 µm'dir. Bu derinlikte ancak bir adet sperm başı sığabilmekte ve böylece spermatozoanın tek bir düzlemde serbest hareketine olanak sağlamaktadır[22].

Makler kamarası ile yapılan değerlendirmelerde iyi sonuç alınabilmesi için kamaraya koyulan ejakülat miktarının 10 µl'yi geçmemesi, kamaranın analiz öncesinde tercihan +37^{o}C'de veya oda sıcaklığında olması gerekir. Kamarada sadece sayımın yapıldığı alan değil, tüm alanda hava kabarcığı olup olmadığı kontrol edilmeli; varsa yeniden örnek koyularak çalışılmalıdır. Sağlıklı bir sonuç alabilmek için 100 karelik alan içerisinden en az 10 karede sayım yapılır ve on karede saptanan sayı 10^6 ile çarpılarak mililitredeki (x 10^6/ml) sperm sayısı belirlenir. Normal sperm derişimi >20x10^6/ml ve totalde >40x10^6'dur[22,28].

2.3.1.2. Sperm Hareketliliği (Sperm Motilitesi)

Fertilizasyonda kritik noktalardan biri de, sperm sayısı kadar hareketliliğinin de yeterli olmasıdır. Bu nedenle, semen analizinde motilite değerlendirmesi titizlikle üzerinde durulması gereken bir konudur. Spermlerin hareketleri orta parça ve kuyruğun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğü ile enerji üreten sistemin yeterliliğine bağlıdır[25].

Isı ve süre spermlerin motilitesi üzerine direk etki eden iki parametre olması nedeniyle sayım kamaralarının +37^{o}C etüvde tutulmasına dikkat edilmelidir[21,25].

Motil spermlerin toplam sperm sayısına oranı yüzde olarak motiliteyi verir. Motilitenin değerlendirilmesinde en az 100 sperm sayılarak sonuç aşağıdaki özelliklere göre değerlendirilir[31].

0 : Hareketsiz

1 : Yerinde hareketli sperm

2 : Yavaş hareketli sperm

3: Hızlı hareketli sperm

4: İleri hızlı hareketli sperm

Normal sperm derişiminin > %50'si motil ve bu değerin %25'i progresif olmalıdır[31].

2.3.1.3. Sperm Morfolojisi

Semen analizinde değerlendirilen en önemli kriter, spermin yapısal özelliklerinin incelenmesine dayanan morfolojik sınıflandırmadır[28].

Sperm morfolojisi ilk kez mikroskobun Antoni van Leuwenhook tarafından keşfedilmesi ile tanımlanmıştır. 1934 yılında Williams ilk morfolojik sınıflandırmayı önermiş ve çok daha sonra, Dünya Sağlık Örgütü 1980 yılında spermlerin morfolojik sınıflandırmasını yapmıştır. Günümüzde halen birçok merkez tarafından WHO sınıflandırmasına göre morfolojik değerlendirme yapılmakla birlikte; 1987 yılında Kruger ile kesin kriteler (strict criteria) kavramı kullanılmaya başlanmış ve morfoloji ile gerek fertilizasyon gerekse gebelik oranları arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün önceleri %50, daha sonra %30 olarak verdiği normal sperm morfolojisine ait alt sınıra

karşılık; Kruger kriteleri ile değerlendirmede bu alt sınırın aslında %5 olduğu ortaya koyulmuştur. Sperm morfolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar özellikle zona pellusidaya bağlanan spermlerin morfolojik değerlendirilmesi sonrasında tanımlanmış ve bu çalışmalar Kruger kriterlerinin belirlenmesinde öncü olmuştur. Konu ile ilgili yapılan çalışmalarda, WHO kriterleri ile değerlendirilen sonuçların Kruger kriterlerinden daha zayıf tanısal değeri olduğu gözlenmiştir. Sperm tarafından fertilizasyonun gerçekleşmesini sağlayarak embriyogenezis, haploid genom, sentrozom ve oosit aktivasyonunu sağlayacak sinyalizasyon gibi kompleks gelişmelerin sadece sperm morfolojisi ile açıklanmasının mümkün olmadığı bilinmesine rağmen; spermin yapısal bozukluklarında gerek fertilizasyon gerekse embriyo gelişimi ile ilgili aksaklıklara rastlanması, spermlerin morfolojik değerlendirmesinin önemini vurgulamıştır[22,28].

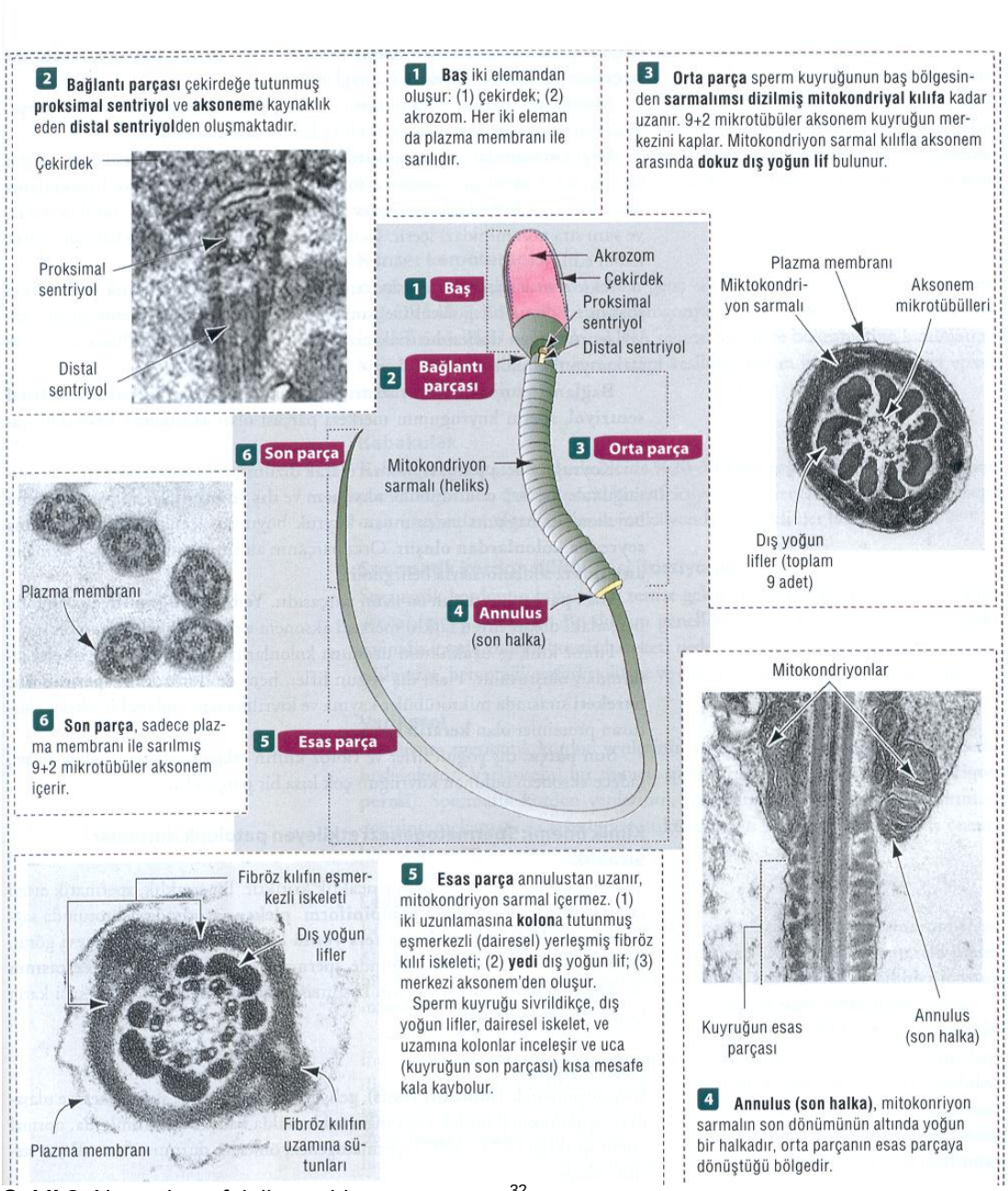
Morfolojik değerlendirme yaparken kullanılan boyama yöntemine göre spermler farklı boyutlarda görülebilir, çünkü boyama öncesi yapılan fiksasyon sırasında spermler bir miktar büzülür. Diff-Quick yönteminde fiksasyon ve boyama işlemi kısa sürdüğünden spermler gerçek boyutlarına yakın görünümdeyken Papanicolau ya da Spermac ile yapılan boyamalarda daha küçük görünecektir[28].

2.3.1.3.1. Normal Sperm Morfolojisi

Baş: 2-3 µm genişlikte ve 4-5 µm uzunlukta, konturları düzgün, oval, akrozom başın %40-70'ini kaplayacak şekilde olmalı ve vakuol içermemelidir (Şekil 2).

Boyun: 4-5 µm uzunluğunda ve düzgün olmalı ve başın alt kısmına, aksiller konumda bağlanmalıdır. Boyun bölgesinde bulunabilen sitoplazmik droplet başın yarısından daha büyük olmamalıdır.

Kuyruk: 50-55 µm uzunlukta, düzgün kıvrımlı, boyun kısmından daha ince olmalı ve son kısma doğru giderek incelmelidir[21,22,28].

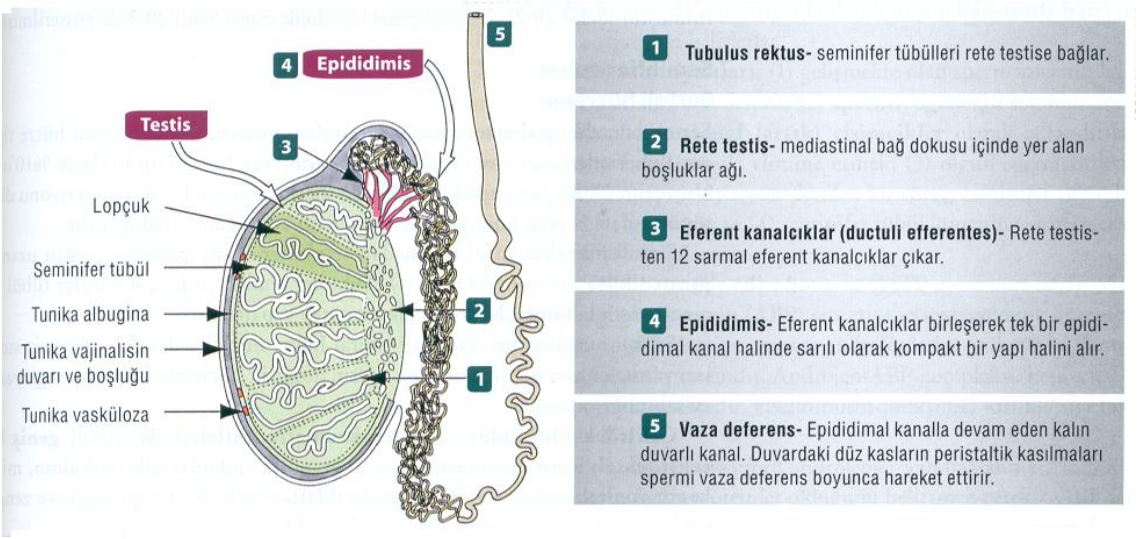


Şekil 2. Normal morfolojiye sahip sperm yapısı[32].

2.4. GAMETOGENEZ

Gametogenez veya gamet formasyonu kadın üreme hücresi ile erkek üreme hücresi spermatozoon'un oluşum (sırasıyla **oogenez** ve **spermatogenez**) ve maturasyon süreçlerini içerir. Erkek ve kadın germ hücreleri embriyonik gelişimin 3. haftasında yolk sac duvarından ameboid

hareketlerle 4. haftanın sonunda veya 5. haftanın başında gelişmekte olan gonadlara (primitif seks glandlarına) ulaşırlar. Genetik olarak dişi gonadlarda (over) oogonialara, erkek gonadlarda (şekil 3) ise spermatogonialara dönüşürler [31,32].



Şekil 3. Testis, epididimis, vaza deferens [32].

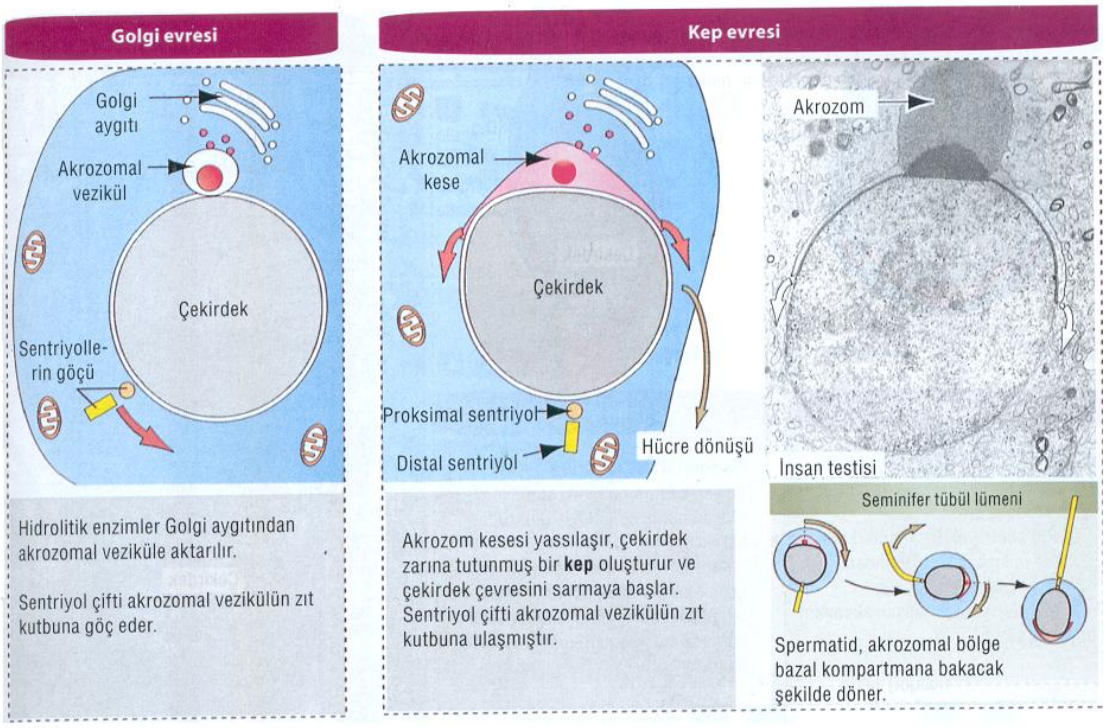
2.4.1. SPERMATOGENEZ

Primitif germ hücrelerinin önce spermatogonialara ve daha sonra olgun spermatozooalara dönüşüm sürecini tanımlar. Dişilerden farklı olarak erkeklerde primordial germ hücrelerinin farklılaşması pubertede başlar. Doğumda erkeklerdeki germ hücreleri testisin seks kordları içerisinde destek hücreleri ile çevrelenmiş büyük, soluk hücreler olarak tanınırlar. Destek hücreleri olasılıkla folliküler hücrelerde olduğu gibi glandın yüzey epitelinden köken alırlar ve sertoli hücrelerine dönüşürler. Puberteden hemen önce seks kordlarda bir lümen oluşarak bunlar seminifer tübüllere dönüşür. Hemen hemen aynı zamanda primordial germ hücreleri iki tip olan spermatogonialara farklılaşır. Tip A spermatogonialar mitozla bölünerek kök hücreler için devamlı bir kaynak sağlarken bunlardan gelişen Tip B spermatogonialar primer spermatositleri oluşturur [31].

Normal gelişim aşamasındaki olayların oluşumu ile tip A spermatogonialar bir yandan kök hücreler için yeterli populasyonu geride bırakırken bir yandanda tip B spermatogonialara dönüşür. Oluşan bu tip B spermatogonialar daha sonra mitoz ile çoğalarak primer spermatositleri meydana getirirler. Primer spermatositler yaklaşık 22 gün süren uzun bir profaz aşamasından sonra hızla 1. mayoz bölünmelerini tamamlayarak sekonder spermatositleri oluştururlar. Bu hücreler derhal ikinci mayotik bölünmelerini tamamlayarak spermatidlere dönüşürler ve spermatidlerin her biri haploid sayıda kromozom içerir. Böylece tip A spermatogoniumdan spermatid aşamasına kadar olan farklılaşmada birbirleriyle hücre düzeyinde temaslarını sürdüren bir seri germ hücresi oluşur. Oluşan bu germ hücrelerinin desteklenmesi, korunması, beslenmesi ve olgunlaştıklarında lümene salınmaları başlıca sertoli hücreleri tarafından sağlanır. Oluşan spermatidlerin fertilizasyon yeteneğine sahip olgun sperm hücrelerine dönüşmesi spermiyogenez denilen bir süreçte meydana gelir [31].

2.4.2. SPERMİYOGENEZ

Spermiyogenez, spermatidlerin spermatozoalara olgunlaşma sürecidir (Şekil 4). Memelilerde spermiyogenez 3 önemli olay ile karakterizedir: 1) akrozom gelişimi; 2) keratin kılıf içine yerleşmiş, dinamik bir aksonemden oluşan kuyruğun organizasyonu; 3) nukleusun kondenzasyonu ve uzaması ile birlikte, etrafının mikrotubuler/keratin yapısında bir kılıf ile çevrelenmesi. En önemli evresi akrozomun gelişmesidir. Bu sürecin ilk fazında golgi aygıtı akrozom için materyal üretir. Bu yapı sıkı, oturan bir şapka şeklinde nukleusun başını yanlardan öne doğru kısmen kaplar. Akrozom glikoproteinlerden zengin birçok enzime sahip, modifiye olmuş bir lizozom olarak kabul edilebilir. Bu enzimler, fertilizasyon sırasında oositi çevreleyen zona pellusidayı eritmek için gereklidir [32-34].



Şekil 4. Spermiyogenez golgi evresinden kep evresi [32].

Spermiyogenezin ilk döneminde akrozom büyürken, spermatid nükleusu metabolik olarak aktif, küresel bir yapı olarak kalır ve zamanla nukleus hücrenin periferine göç eder. Bu sırada şapka şeklindeki akrozom oluşumu tamamlanmıştır ve çekirdek etrafındaki plazma membranına sıkıca gömülür. Bu göçün tamamlanması; nuklear metabolik aktivitenin dereceli olarak durması, kromatin kondenzasyonu ve nuklear uzamanın başlaması için bir sinyaldir. Spermiyogenez tamamlanırken; nukleus, oldukça kondanse olmuş kromatine sahip yoğun, sıkıştırılmış oval bir şekil alır. Akrozom büyümesi bir nükleer kutupta devam ederken, sentriyoller de karşı kutba hareket ederek kuyruk oluşumunu başlatırlar. Başlangıçta yaygın olarak bulunan mitokondriyumlar oluşan kuyruk bölgesine göç ederek, enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere boyun kısmı etrafında uç uca spiral şekilde sıralanırlar [33].

Spermatidler uzamaya başladıkça, akrozomal kep bölgesinde spermatidlerle sertoli hücreleri arasında geniş kapsamlı ektoplazmik olaylar gelişir. Bu olayların, germ hücrelerinin lümene doğru düzgün göç etmeleri ve

germ hücreleri ile sertoli hücreleri arasında yakın fiziksel kontağın korunması için gerekli olduğu düşünülmektedir. Bu değişimler sperm salınımının gerçek zamanının belirlenmesinde temeldir [33].

Spermiyogenez esnasında sitoplazmanın çoğu, hücreler arası köprüler ve kalan organellerle beraber, sertoli hücreleri tarafından hemen fagosite edilen rezidüel cisimcik olarak lümene dökülürler. Özellikle spermiyogenezin son safhasında, hormon desteğinin gerekliliğini düşündüren oldukça fazla veri vardır. Ancak spermatidlerde aktif hormon reseptörleri bulunmadığından, hormonal işlevler FSH ve testosteron için hedef olarak bilinen sertoli hücreleri tarafından yerine getirilir[33].

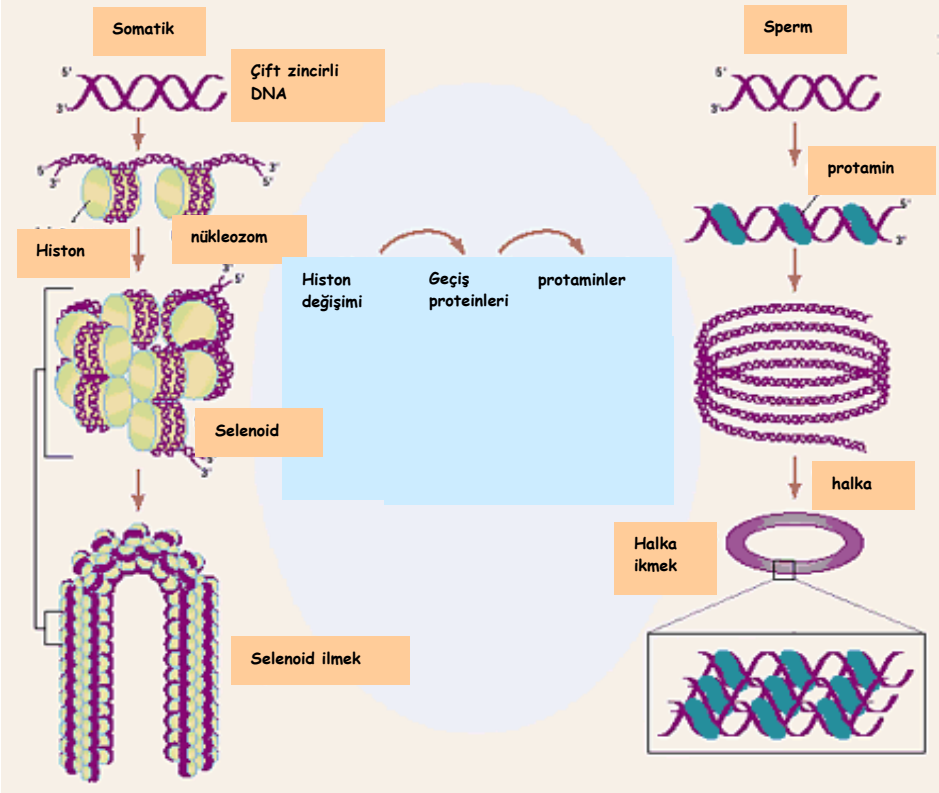
Spermatogoniumdan olgun bir spermatozoonun oluşmasına kadar geçen süre yaklaşık 70 gündür. Tam olarak olgunlaşan spermatozoolar serbestleşerek seminiferöz tübüllere geçer ve tübüllerin duvarındaki kontraktil elementlerin etkisi ile epididimise doğru ilerler ve olgunlaşırlar. Ejakulasyon sırasında epididimin kuyruk kısmı, vaz deferens ve vazal ampullada depolanan sperm ejekülatuvar kanal aracılığı ile prostatik üretraya geçerek seminal vezikül sekresyonu ile karışır ve mesane boynunun kapanmasını izleyerek ritmik kasılmalarla penil üretra aracılığı ile dışarı atılır [31].

2.5. Spermatozoon DNA'sı

Erkek gametinde nukleusun kondenzasyonu özellikle son 40 yıl içerisinde dikkat çekmiştir. Burada etken olan faktör, spermatogenik seri hücrelerinin kromatin yapısında diğer somatik hücrelerden farklı bazı olayların geliştiğinin ultrastrüktürel düzeyde ortaya çıkmış olmasıdır[34].

Somatik hücrelerdeki gevşek kromatin yapısının aksine sperm hücresi kromatini oldukça kompakt bir yapıya sahiptir. Spermiyogenez sırasında spermatid nükleusu yeniden düzenlenir ve nükleer yoğunlaşma meydana gelir. Bu süreçte somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) ilk önce geçiş proteinleri ile daha sonrada arjinin, lizin ve sisteince zengin protaminlerle (protamin 1 ve protamin 2) yer değiştirir (Şekil 5). DNA iplikçikleri protamin molekülleri ile sıkıca sarılmış bir durumdadır. Sisteince zengin olan bu protamin molekülleri

arasındaki intermoleküler ve intramoleküler disülfid köprüleri sperm nükleusunun kompaktlaşmasından ve stabilizasyonundan sorumludur[32,36-39].



Şekil 5. Paternal kromozomların spermiyogenezis sırasında yeniden düzenlenmesi[39].

Boğa, kedi, yaban domuzu ve koç spermatozoasında yalnızca protamin 1 (P1) bulunurken insan ve fare spermatozoası ikinci bir form olan protamin 2 (P2)'yide içermektedir. P2'deki sistein içeriği daha az olduğundan disülfit köprüsü oluşturma potansiyeli ve dolayısıyla kompaktlaşmadaki etkisi daha azdır. P1 içeriği fazla olan türlerin sperm DNA'sı daha stabilken, değişmiş P1/P2 oranı ya da P2 yokluğu erkek infertilitesi ile ilişkilidir. Nükleer yoğunlaşmanın, sperm genomunu oksidasyon ve ısı artışı gibi dış etkenlere karşı korumada gerekli olduğu düşünülmektedir [40-46].

Spermiyogenezin başlangıcında haploid spermatidler tipik bir nukleozomal kromatin yapısı gösterirler. Bu evredeyken bol miktarda nonribozomal RNA transkripsiyon aktiviteleri vardır. Ancak, spermiyogenez ilerledikçe boncuk dizilimi şeklinde görünüm veren kromatin yapısı yerini düz

kromatin liflerine bırakır. Bunlar artık transkripsiyon yapamazlar ve yan yana iplikçikler tarzında toplanırlar. Spermatogenez ve spermiyogenez sırasında kromozomal proteinler üzerinde yapılan çalışmalar, spermatosit ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde somatik histonların ve testise spesifik H1t ve TH2B histonlarının bulunduğunu, ileri evre spermatidlerde TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin, daha ileri evrelerde ise artık protamin P1 ve P2 proteinlerinin yer aldığını göstermektedir. Gerçektende, sıçanlarda spermatogenezin 12. ve 16. basamakları arasında nukleusta TP1 ve TP2 proteinleri bulunurken, 16. basamaktan sonra P1 ve P2 proteinleri ortaya çıkmaktadır[34].

Spermde, somatik hücrelerde bulunan histonların daha dayanıklı protaminlerle yer değiştirmeden önce, testise spesifik histonlar ve geçiş proteinleri TP1 ve TP2'ye neden ihtiyaç duyduğu henüz tam olarak izah edilmiş değildir. Yapılan deneysel çalışmalarda H1t gen ekspresyonu önlendiğinde fertilitenin devam ettiği gösterilmiştir. Oysa, her ne kadar TP1 gen delesyonu varlığında komplet spermatogenez tamamlanabilmekteyse de TP2 ve P2 prekürsörlerinin ortamdaki miktarları artmakta, matür P2 gelişmemekte ve kromatin kondanse olamamaktadır. TP1 eksikliğinde sperm motilitesi bozulur ve fertilizasyon kapasitesi azalır. Bu sonuçlar da ortaya koymaktadır ki; H1t ve TP1 proteinlerinin kromatin kondenzasyonunda ve genin inaktivasyonunda rolleri kısıtlıdır. Aslında geçiş proteinlerinin spermiyogenezde rolleri büyüktür. Yapılan çalışmalar TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin DNA'nın bütünlüğünü koruyarak, protaminlerin kromatin üzerinde daha sağlam yerleşmelerini sağladığını ortaya çıkarmıştır. TP2 geninin regülatör bölümü spermatidlerde kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) düzenleyici genini etkileyerek mRNA translasyonunu geçici olarak 6 gün geciktirir [47-49].

Diğer yandan, TP1'in de DNA kırıklarında tamir edici rolü bulunduğu gösterilmiştir. Normal spermiyogenezde spermatidlerde histonların uzaklaştırılması sırasında, bir endonükleaz olan topoizomeraz-II, DNA iplikçiklerinden birini keserek aradan bir parçayı çıkarır. TP1 (6,2 kDa) bu araya girer ve DNA'nın fosfat gruplarıyla etkileşerek açıklığı doldurur. Bu sırada bir DNA ligaz enzimi de TP1'in iki ucunun orjinal DNA iplikçiğine bağlanmasını sağlar. Daha sonra ortama gelen protaminlerde TP1 üzerine tutunurlar. Yan

yana gelen kromatinler üzerindeki protaminler arasında disülfid bağları oluşarak, kromatin iplikçiklerinin birbirlerine yaklaşmasını neticede kondenzasyonu gerçekleştirirler. İşte bu mekanizma TP1 eksikliğinde neden kromatin kondenzasyonunun bozulduğunu izah etmektedir. Bütün bu bulgular, TP1'in DNA tamirinde temel rol oynadığına işaret etmektedir[50].

İnsanlarda sperm kromatini protaminler tarafından sıkıca paketlenmiştir fakat spesifik DNA dizilerinde, yaklaşık sperm DNA'sının % 15'lik bir kısmında, DNA histon proteinleri tarafından paketlenmiş olarak bulunmaktadır. Histon bağlı DNA dizileri daha gevşek bir yapıya sahiptir ve bu DNA dizilerinin ve/veya genlerinin fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminde yer aldığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda infertil erkeklerdeki sperm histon/protamin oranının fertil bireylerdekinden daha yüksek olduğu gösterilmiş olup spermdeki artmış histon oranının kromatin yoğunlaşmasını engellediği ve DNA'yı hasara açık hale getirdiği düşünülmektedir[4,36,37,51,52,53].

2.6. Spermatozoon DNA'sında Hasara Neden Olan Faktörler

Spermde DNA hasarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı konusu tam olarak izah edilebilmiş değilse de çeşitli iç (protamin eksikliği, artmış ROT düzeyi, apoptoz) ve dış nedenlerden (testiküler hipertermi, çevresel toksinler) dolayı spermatozoon DNA'sında farklı düzeyde hasarlar meydana gelmektedir. Sperm DNA hasarının erkek infertilitesi ve bozulmuş spermatogenez ile ilişkili olduğu çok açık olarak bilinmesine rağmen fertil bireylerde de az da olsa tespit edilebilecek düzeyde DNA hasarının olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır[4,17].

2.6.1. İç nedenler (İntrinsik faktörler)

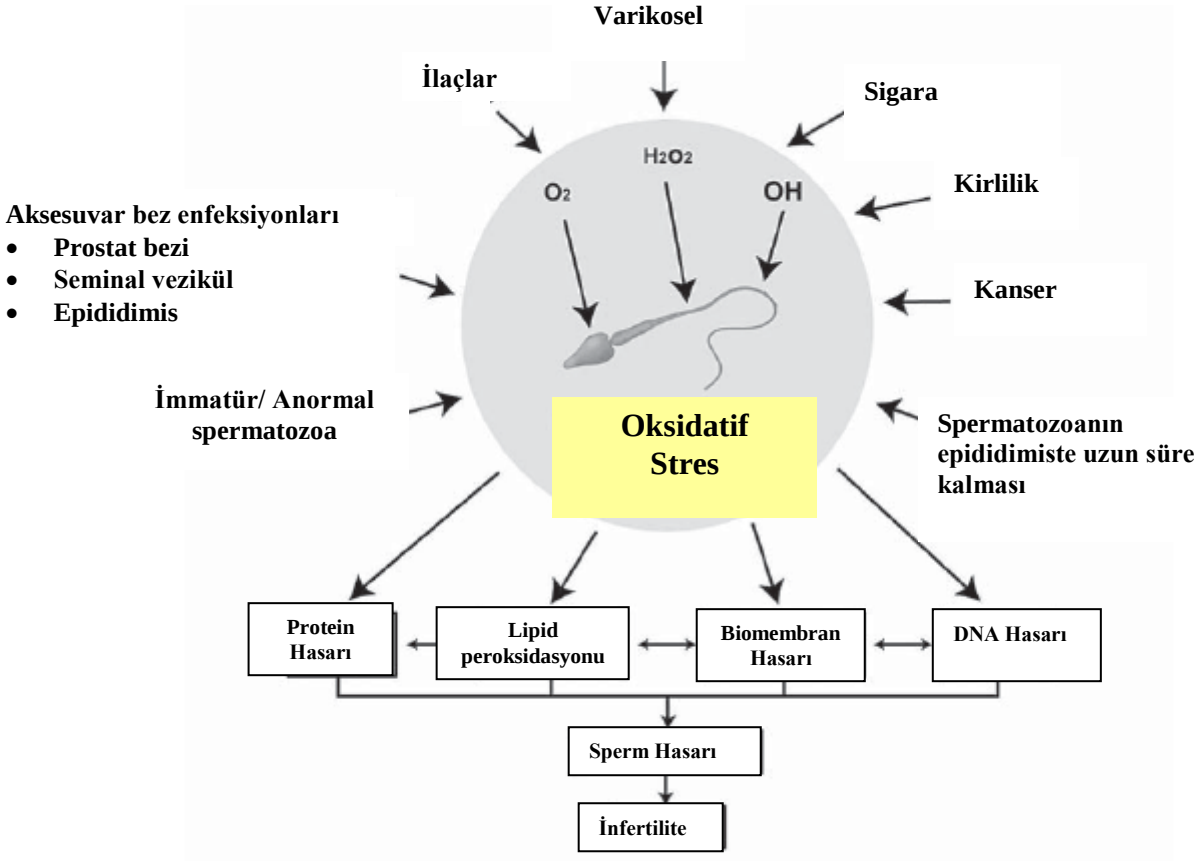
2.6.1.1. Protamin Eksikliği

Sperm DNA hasarı ile protamin eksikliği arasında bir bağlantı bulunmaktadır. İnfertil erkeklerde sperm histon/protamin oranı artmış olmakla birlikte infertil erkeklerin yaklaşık %5- 15'lik bir bölümünde total protamin eksikliği bulunmaktadır. Protamin eksikliği kromatin yoğunlaşmasını

engellemekte DNA'yı hasara açık hale getirmektedir. Sperm DNA hasarı ile protamin eksikliği arasındaki bu ilişki hasarın spermiyogenez sırasındaki bir aksaklık sonucunda oluştuğu fikrini düşündürmektedir[4].

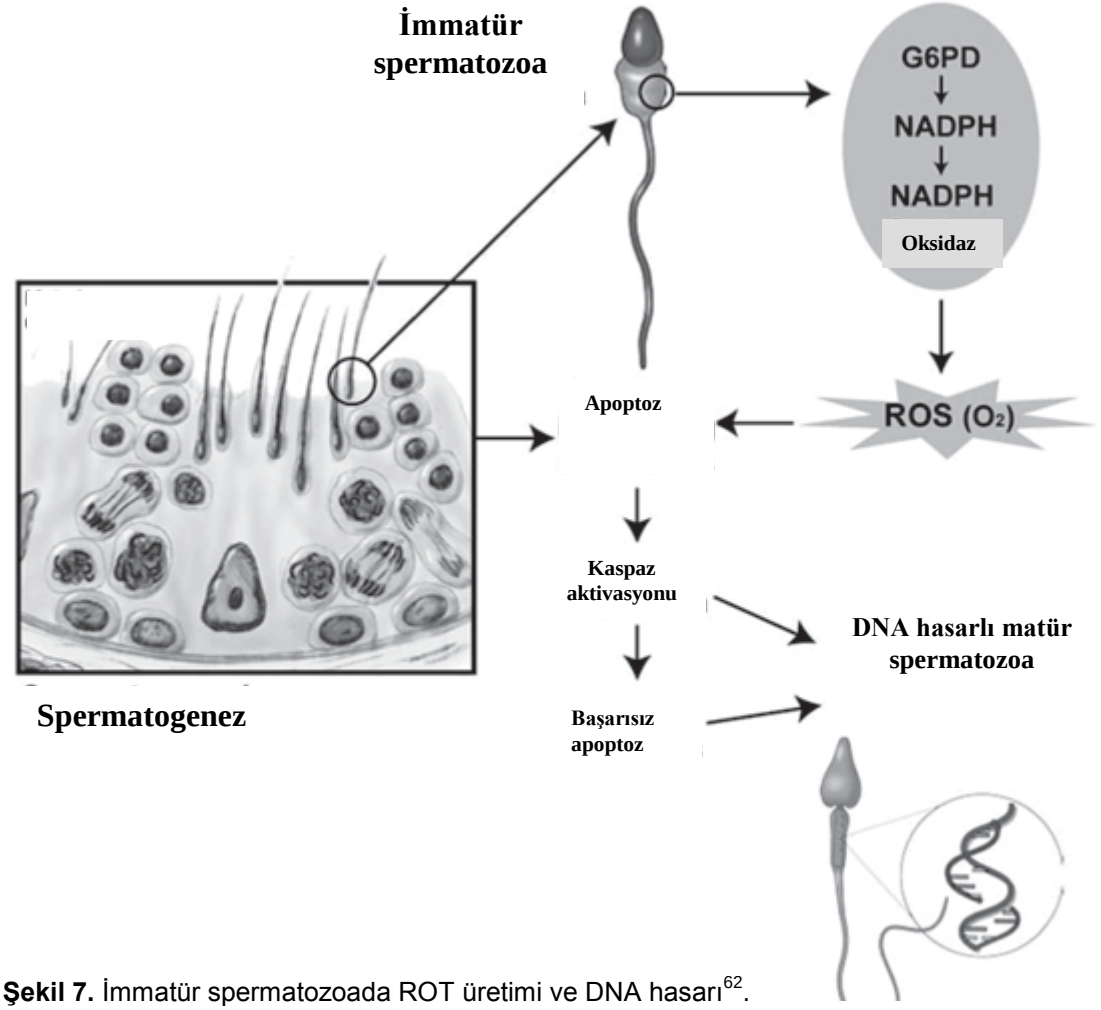
2.6.1.2. Oksidatif Stres

Sperm DNA hasarının artmış ROT düzeyleri ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır. İnfertil bireylerin yaklaşık %25'inin semeninde yüksek ROT düzeyleri tespit edilmiştir. Testiküler doku, sperm hücreleri ve lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin, seminal plazmada oksidatif stresi artırabileceği bildirilmiştir. ROT'nin sperm hücrelerinin hiperaktivasyonunda, kapasitasyonunda ve akrozom reaksiyonlarında fizyolojik rolü olduğu bilinse de, seminal plazmadaki miktarlarının artışı oksidatif hasara neden olmaktadır. Fertil bireylerin semenindeki ROT düzeyi seminal antioksidanlar tarafından kontrol edilir. Eğer ROT üretimi antioksidan kapasiteyi aşacak düzeylerdeyse ROT'nin patolojik etkileri ortaya çıkar. Sperm hücrelerinin plazma membranlarının yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşması nedeniyle ROT'lerin indüklediği hasarlara çok duyarlıdırlar. Sperm hücresi plazma membranındaki bu peroksidatif hasar, insan erkek infertilitesinin patofizyolojik mekanizmasında önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif hasar sperm membranında fonksiyon bozukluğuna ve anormal morfolojili sperm oluşumlarına (özellikle de sitoplazmik dropletli sperm oluşumuna) neden olabilmektedir. Klinik çalışmalarda artmış ROT üretimi ile fertilizasyon arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır (Şekil 6) [54-58].



Şekil 6. Spermde oksidatif strese neden olan faktörler[58].

ROT mitokondrilerde ATP üretimi sırasında metabolik yan ürün olarak oluşur. Spermiyogenezde sitozolün büyük bir bölümü ve spermin genetik bilgisini oosite aktarmada işlev görmeyen tüm organeller sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermiyogenezdeki bir defekt sonucunda sitozolün hepsi uzaklaştırılamaz ve bir kısmı spermin orta parçasında kalırsa, bu yapı sitoplazmik droplet olarak adlandırılır. Sitoplazmik droplet içermiş olduğu sitozolik glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi nedeniyle ROT üretiminin ana kaynağıdır. Yapılan çalışmalarda sitoplazmik droplet anomalisi ile semendeki ROT üretimi arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Plazma membranı poliansatüre yağ asidi ve membrana bağlı NADPH oksidaz enzimi açısından zengin olması nedeniyle sperm hücresi oksidatif hasara oldukça duyarlıdır (Şekil 7)[59-62].



Şekil 7. İmmatür spermatozoada ROT üretimi ve DNA hasarı[62].

2.6.1.3. Apoptoz

Apoptoz ve nekroz, hücre ölümünün iki formudur. Nekroz, fizyolojik olmayan etkiler sonucu gelişen ve yangıya neden olan hücre ölümüdür. Apoptoz ise çevre dokularda yangı olmaksızın tek hücreyi etkileyen fizyolojik olarak programlanmış hücre ölümüdür. Apoptotik hücrelerde plazma membranları sağlamken, nekrotik hücrelerde plazma membranları bütünlüğünü kaybeder. Apoptoz ultrastrüktürel olarak bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterizedir. Apoptotik hücrelerde kromatin yoğunlaşması ile çekirdek ve sitoplazma membranlarının kaynaşması söz konusudur. Bu sürecin

sonunda çekirdek fragmantasyona uğrar ve tüm hücre fragmanları apoptotik cisimlere dönüşür[63-67].

Apoptozun da DNA hasarlanması ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Aslında apoptoz, vücutta bulunan bütün dokuların normal fonksiyon görebilmesinde önemli bir rol oynar. Spermatozoa için de aynı şey söz konusudur. Apoptoz ile ortaya çıkan, germ hücre kaybı spermatogenez sırasında oluşan dominant bir süreçtir ve p53, p21, kaspaz, bc1-2 ve Fas düzeylerince değişik yollarla ayarlanır. İnfertilite nedeni olarak bilinen çoğu faktör, spesifik mekanizmalarla apoptoza yol açar. Apoptoz ise DNA'nın parçalanması ile gerçekleşir. Apoptoz organların sağlıklı fonksiyon görebilmeleri için doğal olarak meydana gelebildiği gibi, hormonal faktörler, ROT, çevresel toksinler gibi faktörler tarafından da uyarılabilmektedir[68-73].

Apoptoz, iki yolla gerçekleşebilir. Birinci yolda (ekstrensek yol) tümör nekrozis faktör reseptör ailesinin üyeleri olan reseptörler görev alır. Apoptoz, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ve tümör nekroz faktörün (TNFR-1) ilgili ligandları (FasL ve TRAIL) ile etkileşime girmesi sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı alınmış olduğundan bir seri protein: protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD (TNFR-1 ilişkili ölüm domaini) ve FADD (Fas ilişkili ölüm domaini) ile ilişkiye girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatır. Diğer yolda (intrensek yol) ise mitokondri görev alır. DNA hasarı, radyasyon gibi stres koşullarında mitokondriden sitokrom c salınır. Sitokrom c, kaspazlar için muhtemel bir aktivatördür. Daha sonra devreye efektör kaspazların da girmesiyle apoptoz başlar[74-76].

Testislerde spermatozoa yapımı ve maturasyonu sertoli hücrelerinin desteği altında gerçekleşir. Ancak bu olayın sağlıklı sürebilmesi, sertoli hücrelerinin sayısı ile spermatogonia sayısı arasındaki belirli orana bağlıdır. Çünkü zaten çoğalma kapasitesi olmayan sertoli hücreleri sadece belirli sayıdaki spermatogoniumları destekleyebilir. Yani mayoz bölünmeye girecek spermatogonium sayısı sınırlıdır. Eğer spermatogonia sayısı, sertoli hücrelerinin

destek kapasitesini aşarsa, fazla hücreler apoptoz ile parçalanır. Yapılan deneysel çalışmalarda germ hücrelerinin apoptozunda testosteronun da etkili olduğu bildirilmiştir. Spermatogenez sırasında apoptozun başlatılmasında etken bir başka faktör ise germ hücreleri ve lökositlerden kaynaklanan ROT yapımı ve miktarı ile ilişkilidir. İnsan spermi ile yapılan çok sayıdaki çalışmada hücre ölümü ile ROT üretimi arasında sıkı ilişki bulunduğu vurgulanmıştır. İnflamasyon hücreleri salgıladıkları sitokinler ile apoptozu başlatabilir[68,77-82].

2.6.1.4. Yaş

Yaşlanma ile doğru orantılı olarak spermatozoon DNA'sında hasar meydana gelmektedir. DNA çift sarmalındaki hasar ile spermatozoondaki apoptozun yaşlanmaya paralel olarak arttığı ve bu artışın muhtemelen spermatogenez esnasında ve sonrasında hücre seçim sistemindeki yetersizliğin bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Araştırıcılar fertil ve infertil erkeklerde sperm motilitesi ile yaş arasında negatif bir ilişkinin bulunduğunu, yaşa bağlı azalan spermatozoa motilitesi ve artan DNA hasarının muhtemelen sperm süspansiyonu içerisindeki lökositler tarafından üretilen ROT'lerinden kaynaklandığını ileri sürmektedir. Narendra ve ark. ise yaş ile spermdeki lökosit sayısı ve ROT arasında bir ilişkinin olmadığını, yaşın ilerlemesiyle spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasarların arttığını ve bu hasarlı hücrelerin eliminasyonunun da güçleştiğini bildirmektedirler[54,79,83].

2.6.2. Dış nedenler (Ekstrinsik faktörler)

İlaçlar, sigara kullanımı ve çevresel toksinler, genital kanal inflamasyonu, testiküler hipertermi, hormonal faktörler ve varikoseller gibi dış nedenlere bağlı olarak da sperm DNA'sında hasar oluşabilmektedir[4,17].

2.6.2.1. Kanser, Kemoterapi ve Radyoterapi

Hodgkin lenfoma ve testiküler kanser gibi kanser hastası erkeklerde tedavi öncesinde bile semen kalitesi kötü ve DNA hasarı yüksektir. Alınan ilacın dozu ile bağlantılı olarak DNA'daki hasar daha da artar hatta kişiyi tamamen steril hale de getirebilir. Testisin hızlı bölünen germinal epiteli sitotoksik tedavi

ajanlarının doğal bir hedefidir. Işın tedavisi ve kemoterapinin verdiği hasar benzer olup, hasar ilacın dozu ve kullanım süresiyle ilişkilidir. Tedavi sonrasında spermatogenezin düzgün bir şekilde işleyebilmesi aylar ya da yıllar alabilir. Spermatogenez tekrar gerçekleşse bile bugün itibariyle elimizde bulunan veriler bu süreçte de DNA hasarının devam ettiğini işaret etmektedir. Bu nedenden dolayı birçok klinisyen kanser tedavisi görecek çiftlerin ebeveyn olma isteğini tedaviden 12-24 ay sonraya ertelemelerini önermektedir. Ayrıca tedbir amacıyla kanser tedavisi görecek kişilere ileride kullanabilmek amacıyla sperm kriyoprezervasyonu önerilmektedir[84-88].

2.6.2.2. Sigara

Sigara DNA hasarını artıran mutajen veya karsinojen maddeler olarak bilinen veya varsayılan maddeleri (nitrozaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar-PAH) içermektedir. Sigara dumanındaki mutajenik etkiye bağlı olarak sperma kalitesinde özellikle spermatozoon sayısı, motilite oranı ve anormal spermatozoon oranında önemli düşüşler meydana gelmektedir. Sigara içmeye bağlı olarak insan spermasında anöploidi oranı da artmaktadır. Ayrıca sigara içilmesine bağlı olarak seminal plazmadaki antioksidan kapasitenin düşmesi sonucunda da DNA hasarının arttığı bildirilmektedir. Yapılan çalışmalar sigara içme oranı ile spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasar arasında önemli derecede pozitif bir ilişkinin olduğunu ortaya koymaktadır[89-97].

Bir babanın sigara içmesi, kendi androjen seviyesindeki değişimlerle birlikte bu babadan doğan çocuklarda da doğumsal anomaliler ve hatta çocukluk çağında bile çeşitli kanserlere neden olabilmektedir. Genotoksik maddeler spermatozoon hücresinde mutasyonu indükleyebilir ve yavruya geçip onların gelişimini etkileyerek, kanser meydana getirebilir. Kimyasal karsinojenlerin DNA'yı etkileyen metabolitleri kan yoluyla diğer doku ve organlara taşınabilmektedir. Ancak sertoli hücrelerindeki kan-testis bariyerinden dolayı gelişen cinsiyet hücreleri ile kan dolaşımı doğrudan temas içerisinde değildir. Bununla birlikte nikotin ve nikotin metabolitlerine sigara içen kişilerin spermasında rastlanması DNA'yı etkileyen metabolitlerin bu engeli aşıp cinsiyet hücrelerini etkilediğini göstermektedir. Gaspari ve ark. yaptıkları araştırma

sonucunda tespit ettikleri PAH-DNA kompleksinin spermatozoa DNA'sındaki hasarın bir kanıtı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar sigara içmeksizin PAH bileşiklerine maruz kalan insanlarda da PAH-DNA kompleksinin yüksek bulunduğunu iddia etmektedirler. Erkek cinsiyet hücresinin DNA'sındaki hasar spermatogenez esnasında tamir edilmezse, bu hasar birikerek artış gösterir. Olgun spermatozoon hücresinin bu hasara karşı küçük çaplı bir tamir mekanizmasına sahip olup olmadığı halen bir tartışma konusudur. Fraga ve ark. spermatozoon DNA'sının hasara uğraması için oksidatif hasarın gerekli olmadığını ve DNA'sı hasarlı bir spermatozoonun da fertilizasyonu başarabildiğini, askorbik asitin de insan spermatozoasında oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ileri sürmektedir[89,90,96-101].

2.6.2.3. Genotoksik Bileşikler

Genotoksikler yani hücre DNA'sında hasara yol açan maddeler DNA'da mutasyona ve kötü huylu kansere yol açmaktadır. Genotoksik maddelerin spermatozoa DNA'sına verdiği hasarlarla ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Bu maddelerden biri olan vanadyum, özellikle volkanik bölgelerdeki yer altı sularında bulunmakta olup spermatozoon DNA'sında hasara neden olduğu tespit edilmiştir. Prooksidan özelliğe sahip olan demir elementi ile oluşturulan oksidatif strese bağlı DNA hasarı ve spermatogenetik fonksiyon bozukluğu meydana gelmektedir. Daha da önemlisi uzun süreli demir verilmesini takiben canlı vücudunda oksidatif strese bağlı olarak mayoz sonrası testis hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının yanı sıra spermatozoonun fizyolojisi ve fonksiyonunda bozukluklar oluşmaktadır[102-104].

Kemoterapotik ajan olan cisplatin de spermatozoonun baş kısmında anomalilere ve spermatozoon DNA'sında hasara sebep olan genotoksik bir maddedir. Genotoksik maddelerin spermatozoon DNA'sına verdiği zararlarla ilgili yapılan diğer çalışmalar, akrilonitril, tamoksifen, siklofosfamid ve akrilamid gibi pek çok maddenin genotoksik etkiye ve spermatozoon DNA'sında hasara neden olduğunu ortaya çıkarmıştır[105-111].

2.6.2.4. Çevre

Çevresel şartlar spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasarın artmasında rol oynamaktadır. Bu şartlar DNA'nın bozulmasına sebep olabilir, spermatogenez boyunca DNA tamirini engelleyebilir veya azaltabilir ya da hücrede apoptoz oluşturabilir. Bu yüzden ideal çevrede genç bir bireyin spermatozoasında minimal DNA hasarı ve daha az apoptoz görülür. Seminal plazmada antioksidan seviyenin yüksek olması spermatozoonu çevresel DNA hasarına karşı korur. Bu nedenle antioksidanca zengin bir çevre hem testisteki hem de fertilizasyon için ampullaya doğru giden spermatozoon DNA'sının bütünlüğünün sağlanması için taşınma süresince en uygun şartları sağlamaya yardımcı olabilir. Bunun tersine genç bir bireyde spermatozoanın antioksidanca yetersiz bir çevrede bulunması DNA hasarı ve apoptoz miktarında artmaya yol açar. Alkol tüketimi ve kafein alınması da sperma kalitesini etkilemekle birlikte yavrularda doğumsal bozukluklara, kanser ve mental hastalıklar gibi üreme ile ilgili önemli problemlere yol açabilmektedir. Diğer taraftan Horak ve ark. ise kahve ve alkol tüketimi ile DNA hasarı arasında bir ilişkinin olmadığını ileri sürmektedir. Sperma kalitesi üzerine zararlı etkisi olan diğer çevresel faktörlerden fitalik asit esterleri gibi endüstriyel kimyasallar, pestisitler (organofosfat bileşikleri) gibi tarım ilaçları, organoklorürlü maddeler, hava kirliliği ve tanı amacıyla yapılan radyasyonların da spermatozoon DNA'sı üzerine zararlı etkileri bulunmaktadır. Varikosellerin de seminal oksidatif stres ve DNA hasarı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Varikosel tedavisi sonrasında sperm DNA bütünlüğünün iyi yönde ilerleme kaydettiği gösterilmiştir[83,89,112-123].

Post-testiküler kanal infeksiyon ve inflamasyonu lökositospermiye neden olur. Lökositopermi ise ROT düzeyinin dolayısıyla da DNA hasarının artmasına neden olur[124].

FSH gibi gonadotropik hormonların eksikliği de kromatin hasarına neden olmaktadır. FSH reseptörü bulunmayan farelerle yapılan bir çalışmada bu farelerin spermlerindeki DNA hasarının daha yüksek olduğu bulunmuştur[125].

Son olarak sperm hazırlamada ve spermi seminal plazmadan ayırmada kullanılan yüksek santrifüj hızları ROT üretimine ve DNA hasarına neden olmaktadır[126,127].

2.7. Sperm DNA Hasarı Hangi Durumlarda Tespit Edilmelidir?

2.7.1. Erkek İnfertilitesinin Tanısında

Sperm DNA hasarı, *in vivo* fertilizasyon üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yapılan çok sayıdaki çalışmada fertil ve infertil erkeklerin sperm DNA hasar düzeylerinin anlamlı derecede farklı olduğu gösterilmiş hatta infertil bireylerin spermlerinin H_2O_2 ve radyasyon gibi DNA'da hasara neden olan ajanlara karşı daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Sperm hücresindeki DNA hasarı SCSA tekniği kullanıldığında %30, TUNEL testi kullanıldığında ise %20'den fazla ise *in vivo* daki fertilizasyon oranı neredeyse sıfıra yaklaşmaktadır. Tüm bu nedenlerden ötürü sperm DNA'sındaki hasarın tespiti erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde yeni bir belirteç olarak düşünülebilir. SCSA tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada sperm parametreleri normal olan infertil erkeklerin DNA hasarının fertil bireylerdekinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiş olup bu sonuç sperm DNA hasarı analizinin, semen parametresi normal olan ve idiyopatik infertilite tanısı ile merkeze başvuran çiftlerdeki gizli sperm anomalisinin tanımlanmasında kullanılabilecek ayırıcı bir test olabileceğini düşündürmektedir[7,10,128-133].

2.7.2. Üremeye Yardımcı Tekniklerde

DNA hasarı SCSA testi kullanıldığında %30, TUNEL testi kullanıldığında ise %12'den fazlaysa IUI ile fertilizasyon oranı neredeyse sıfırdır. Sperm DNA hasarının IVF ve ICSI sonuçlarını negatif yönde etkilemesi ise tartışmalıdır. Her ne kadar bazı çalışmalar sperm DNA hasarı ile IVF/ICSI sonuçları arasında bir ilişki bulunmadığını söylese de yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda IVF sikluslarında embriyo kalitesi ve blastosist gelişimi ile sperm DNA hasarı arasında anlamlı bir negatif ilişkinin olduğunu göstermektedir[134-140].

Sperm DNA hasarının ICSI sikluslarında fertilizasyon ve pronükleus formasyonunu engellemediği yönünde görüşler olsa da hem IVF hem de ICSI sikluslarında sperm DNA hasarı ile fertilizasyon oranı arasında negatif bir ilişkinin olduğunu bildiren görüşler de bulunmaktadır[141-143].

Sperm kromatin yapısının değerlendirilmesi IUI ve IVF'deki başarının önceden tahmin edilebilmesine ve hangi yöntemin kullanılacağına yardımcı olabilir. Eğer hastanın sperm parametreleri normal fakat hasarlı DNA oranı yüksekse IUI yerine ICSI önerilebilir[134].

2.7.3. Embriyonal Kayıplarda

Hasarlı DNA oranı yüksek olan erkeklerin spermleri kullanılarak yapılan IVF/ ICSI uygulamalarında spontan abortus eğiliminin arttığı bildirilmiştir. Tekrarlayan gebelik kaybı yaşayan çiftlerde, erkek partnerdeki sperm DNA hasarının normal populasyondakinden daha yüksek olduğu gösterilmiş olup sperm DNA hasarı hesaplanarak ve/veya anormal kromatin paketlenmesi değerlendirilerek gebelik kayıplarının %39'unun önceden tahmin edilebileceği öngörülmüştür. Ancak bu hipotezle ilgili çalışma sayısı oldukça az olduğundan daha fazla sayıda çalışma ile desteklenmesi gerekmektedir[6,144-146].

2.7.4. Kanser Hastalarında

Kanser hastaları kemoterapi, radyoterapi ya da operasyon öncesi sperm bankalarına kriyoprezervasyon için yönlendirilirler. Bu hastalarda tedavi öncesi sperm dondurma işlemi yapılmadan, DNA hasarının tespit edilmesi spermin nasıl dondurulacağı yönünde bilgi verir. Eğer örneğin derişimi ve motilitesi yüksek, DNA hasarı az ise örnek büyük hacimlerde IUI'a uygun şekilde birkaç seansta dondurulabilir. Eğer iyi kalitede ise ve tek bir seansta dondurulacaksa küçük hacimlerde ve çok sayıda IVF ya da ICSI'ye uygun şekilde dondurulmalıdır[147].

2.8. Spermatozoon DNA'sındaki Hasarın Tespit Edilmesinde Kullanılan Yöntemler

Yardımla üreme teknikleri ile doğan çocuklarda, kromozom anomalisi ve malformasyon oranlarının normale göre arttığı bilinmektedir. Bu artışta önemli ölçüde spermle taşınan genetik anomalilerin etkisi vardır. Yardımla üreme teknikleri ile fertilizasyon ve canlı doğum oranlarının artması ve doğan çocuklarda kromozomal anomali ve malformasyon oranlarının azalması için IUI,

IVF veya ICSI uygulanmadan önce DNA hasarının varlığı mutlaka araştırılmalıdır[20].

DNA yapısının araştırılabilmesi için farklı teknikler geliştirilmiştir ve her geçen gün bu tekniklere yenisi eklenmektedir. Bu testler TUNEL testi, SCD testi, SCSA testi, CMA_3 (Kromomisin A_3), Akridin oranj, AAB (Asidik Anilin Mavisi Boyaması), TB (Toluidin mavisi boyaması), DBD-FISH (DNA breakage detection-fluorescent in situ hybridization assay), NT (in situ nick translation), ELISA, ve son yıllarda yaygınlaşmaya başlayan COMET analiz tekniğidir. Bu yöntemlerle çok sayıda çalışma yapılmış, yöntemlerin güvenirliği karşılaştırmalı çalışmalarla araştırılmıştır.

2.8.1. Asidik Anilin Mavisi Boyaması (AAB)

2.8.1.1. Prensip:

AAB boyası histon proteinleri ile protaminleri birbirinden ayırır. Bu boya histon oranı yüksek, immatür spermlerdeki lizin grupları ile reaksiyona girerek mavi renk oluşturur. Bol miktarda protamin içeren matür spermatozoalarda ise lizin miktarı az olduğundan boya almazlar. Protaminlerde lizin yerine yüksek oranda arginin ve sistein kalıtları bulunur[149].

2.8.1.2. Yöntem:

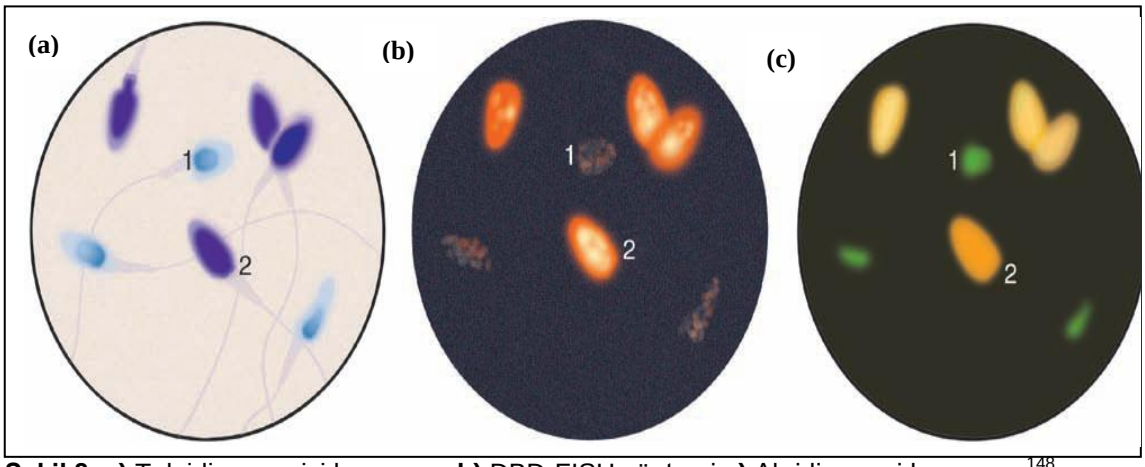
5 µl semen örneği direk olarak ya da yıkandıktan sonra lam üzerine yayılıp kurutulur. 30 dk. PBS ile hazırlanmış %3'lük gluteraldehid solüsyonu içerisinde fikse edildikten sonra 5 dk. %5'lik AAB boyası (pH 3,5) ile boyanır. İmmatür nükleer kromatin içeren sperm başları maviye boyanırken matür nükleus içeren sperm başları boyanmaz. Mikroskop altında 200 hücre sayılarak boya alan hücrelerin yüzdesi hesaplanır[150].

2.8.2. Toluidin Mavisi Boyaması (TB)

2.8.2.1. Prensip:

Toluidin mavisi bazik nükleer bir boyadır. Kromatinin metakromatik ve ortokromatik boyaması için kullanılır. TB çekirdek içerisinde bulunan kromatin yapısındaki ve/veya DNA yapısındaki fosfat kalıtlarına bağlanarak açık maviden mora uzanan bir renk skalası oluşturur (Şekil 8a). Kromatin yapısı sağlam sperm başları açık maviye boyanırken bütünlüğü bozulmuş kromatinler ise mora boyanır[151].

TB yöntemi ile AO, SCSA ve TUNEL testleri arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir[152].



Şekil 8. a) Toluidine mavisi boyaması **b)** DBD-FISH yöntemi **c)** Akridin oranj boyaması[148].

2.8.2.2. Yöntem:

TB boyama protokolü; fiksasyon, hidroliz, yıkama ve boyama olmak üzere 4 adımdan oluşur. Lam üzerine yayılıp kurutulmuş preperatlar taze hazırlanmış %96'lık etanol-aseton (1:1) karışımında +4^{o}C'de en az 30 dk. fikse edilir. Daha sonra 0,1 N HCl içerisinde +4^{o}C'de 5 dk. hidrolizlenir ve ikişer dakikadan olmak üzere 3 defa distile su ile yıkanır. Son olarak da %0,05'lik TB boyası (boyama tamponu pH 3,5 %50'lik sitrat fosfat tamponudur) ile 5 dk. boyanır[152].

Hazırlanan preperatı kalıcı hale getirmek ve sürekli olarak kullanabilmek için tersiyer bütanol içerisinde, +37^{o}C'de üçer dakikadan 2 defa, ksilen

içerisinde ise üçer dakikadan 2 defa dehidrate edilmesi gerekir. Daha sonra ise preperatlar DPX içerisine gömülmelidir[152].

AAB ve TB yöntemleri basit ve ucuzdur. Sıradan bir mikroskop kullanılarak analiz yapılabilir ve kalıcı preperatlar hazırlanabilir. TB ile boyanmış preperatlar morfolojik inceleme yapmak içinde kullanılabildiğinden daha avantajlıdır[148].

2.8.3. Kromomisin A_3 (CMA_3) Boyaması

2.8.3.1. Prensip:

Kromomisin A_3 guanin-sitozin spesifik bir florokromdur ve protaminler ile DNA'da aynı bölgelere bağlanırlar. Güçlü CMA_3 floresansı az protaminasyon düzeyini dolayısı ile de gevşek paketlenmiş kromatin yapısını ifade eder[153].

2.8.3.2. Yöntem:

CMA_3 boyaması için yaymalar 3:1 oranındaki metanol-glasiyel asetik asit solüsyonunda +4^{o}C de 20 dk. fikse edilir ve oda ısısında 20 dk. kurumaya bırakılır. Daha sonra slaytlar 100 µl CMA_3 solüsyonu ile 20 dk. boyanır. CMA_3 solüsyonu 10 mmol/L $MgCl_2$ ilave edilmiş McIlvaine tamponu (pH 7,0) içerisinde 0,25 mg/ml CMA_3'den oluşur. Boyama sonrasında slaytlar tampon ile yıkanıp üzerine 1:1 oranında PBS-gliserol eklenip +4^{o}C'de 1 gece bekletilir. Floresan mikroskop kullanılarak her bir slaytta 200 spermatazoa sayılarak değerlendirme yapılır. CMA_3 pozitif hücreler parlak sarı renge boyanırken CMA_3 negatif hücreler sönük sarı renge boyanır[153].

2.8.4. DBD-FISH Yöntemi:

2.8.4.1. Prensip:

Hücreler agaroz matriks içerisine gömülüp, alkali solüsyona maruz bırakılarak DNA iplikçiğinin açılmasına izin verilir. Böylece tek zincirli DNA motifleri elde edilir. Nötralizasyon ve proteinlerin uzaklaştırılmasından sonra tüm genoma ait ya da yalnızca analizlenmek istenen kromatin bölgesine spesifik

DNA probları kullanılarak hibridizasyon gerçekleştirilir. Eğer DNA'daki kırık miktarı fazla ise fazla miktarda tek zincirli DNA oluşur ve daha fazla prob ile hibridleşerek floresans yoğunluğunu ve FISH sinyal alanını arttırır (Şekil 8b). Sperm hücrelerindeki anormal kromatin paketlenmesi DNA'yı alkali denatürasyonuna karşı daha duyarlı hale getirip floresans yoğunluğunu arttırır. Bu nedenle DBD-FISH, DNA kırıklarının in situ olarak tespit edilmesine ve miktarının ölçülmesine imkan verirken sperm kromatininin yapısal özelliklerini ortaya çıkarır[154,155].

Kromatinin yapısal özelliklerini açıklamasına karşın pahalı, zaman alıcı ve sofistike bir prosedür içerdiği için ve sonuçları da diğer yöntemlerden farklı olmadığı için klinik önemi azdır[148].

2.8.4.2. Yöntem:

Sperm hücreleri ilk olarak +37^{o}C'de, %0,7'lik düşük erime noktalı agaroz (LMA) ile karıştırılır. 300 µL'lik karışım polistiren slayt üzerine aktarılıp +4^{o}C'de katılaşması için beklenir. Katılaştıktan sonra slayt 22^{o}C'de, karanlıkta, 5 dk. alkali denatürasyon solüsyonuna (0,03M NaOH, 1M NaCl) maruz bırakılır. Daha sonra slayt nötralizasyon-lizis solüsyonu 1 (0,4 M Tris, 0,8M DTT, % 1 SDS, 50mM EDTA, pH 7,5) içerisinde oda ısısında 10 dk. nötralizasyon-lizis solüsyonu 2 (0,4 M Tris, 2M NaCl, %1 SDS, pH 7,5) içerisinde oda ısısında 20 dk. inkübe edilerek protein artıkları uzaklaştırılmış olur. Sonrasında ise slaytlar TBE tamponu (0,09 M Tris-borat ve 0,002 M EDTA, pH 7,5) ile 15 dk. yıkanıp, ardışık %70'lik, %90'lık ve %100'lük etanol solüsyonlarında ikişer dakika bekletilerek dehidrate edilir. Slaytlar kuruduktan sonra insan tüm genom probu ile hibridize edilir. Daha sonra ise iki kez beşer dakika, %50 formamid/2 X Tuzlu Sitrat Solusyonu (SSC) (pH 7,0) ile iki kez de üçer dakika 2 X SSC (pH 7,0) ile oda ısısında yıkanır. Hibridleşmiş problar streptavidin-indokarbosiyamin (1:200) ile işaretlenir, 4$'$,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; 1 µg/ml) ile zıt boyaması yapılır ve fuloresans mikroskopta görüntülenir[154].

2.8.5. In situ Nick Translation (NT) Ölçümü

2.8.5.1. Prensip:

DNA polimeraz I enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonda deoksiuridin trifosfat (dUTP) spesifik olarak tek zincirli DNA kırıkları ile birleşir. NT yöntemi ile yapılan nükleer bütünlük değerlendirmesindeki sonuçlar ile sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi arasında net bir ilişki olduğu görülmüştür. Ayrıca NT sonuçları ile CMA_3 ve TUNEL sonuçları arasında güçlü bir pozitif ilişki olduğu da gösterilmiştir[54,153,156].

2.8.5.2. Yöntem:

İlk olarak bir miktar semen örneği lam üzerine aktarılıp kuruması için bir süre beklenir. Bu bekleme sırasında 10 µl streptavidin-floresin-izotiyosiyanat, 90 µl Tris tamponu, 900 µl bidistile su karıştırılarak floresan boya hazırlanır. Bu karışımın 100 µl'si kurumuş preperat üzerine aktarılarak nemli bir ortamda 37^oC'de 30 dk. inkübe edilir. Boyama işlemi sonrasında lamlar ilk önce PBS ile daha sonrada distile su ile yıkanır. Değerlendirme yapmak için lam üzerine 1:1 oranında karıştırılmış PBS- gliserol karışımından damlatılıp üzeri lamel ile kapatılır ve floresan mikroskop altında 100-200 spermatazoa incelerek sonuç verilir. Boya almış hücreler, DNA'sında kırık bulunan hasarlı hücrelerdir[157].

2.8.6. Akridin Oranj (AO) Boyaması

2.8.6.1. Prensip:

Bu yöntem asit-indüklü denatürasyona karşı sperm DNA'sının hassasiyetini ölçer. Akridin oranj çift zincirli DNA'da iki zincir arasına girerek monomer oluştururken, tek zincirli DNA'da bir araya toplanarak agregat oluşturur. Akridin oranjın sağlam DNA'ya monomerik bağlanması sonucunda yeşil, hasarlı DNA'ya agregasyonu sonucunda ise kırmızı renkte floresan oluşur (Şekil 8c)[158].

2.8.6.2. Yöntem:

AO yöntemi hem mikroskobik hem de flow-sitometrik olarak gerçekleştirilebilir. Mikroskobik değerlendirmede yayma sperm preperatları hazırlanarak Carnoy (metanol:asetik asit, 1:3) fiksatifinde en az 2 saat bekletilir. Fiksasyon sonrasında 5 dk. boyanıp deiyonize su ile yıkanır. Doğru bir değerlendirme yapabilmek için en az 200 hücre sayılmalıdır[159].

Flow-sitometrik analiz için, sayısı $1x10^6$/mL olan 25-100 µl semen örneği 1 ml soğuk PBS (pH 7,4) ile karıştırılıp 600g'de 5 dk. santrifüjlenir. Süpernatan atılıp pellet soğuk TNE (0,01M Tris-HCl, 0,15M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) solüsyonu ile süspanse edilip tekrar 600g'de 5 dk. santrifüjlenir. Dipte kalan pellet, içerisinde %10 oranında gliserol içeren 200 µL soğuk TNE ile karıştırıldıktan hemen sonra %70'lik etanolde 30 dk. fikse edilir. Fiksasyon sonrasında ise içerisinde %0,1 Triton X-100, 0,15 M NaCl, 0,08 N HCl bulunduran ve pH 1,2 olan solüsyondan 400 µL alınıp örnek üzerine aktarılarak 30 saniye muamele edilir. Son olarak test tüpüne 1,2 ml boyama tamponundan (6µg/ml AO, 37 mM sitrik asit, 126 mM Na_2HPO_4, 1mM Na_2EDTA, 0,15 M NaCl, pH 6,0) eklenerek boyanır. Hücreler 488 nm lazer uyarımı ile flow-sitometri kullanılarak analiz edilir[159].

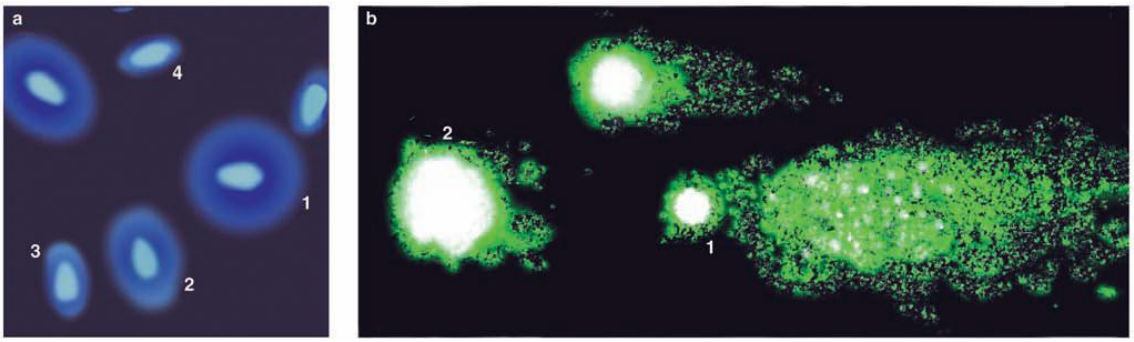
2.8.7. Sperm Kromatin Dispersiyon (SCD) Testi

2.8.7.1. Prensip:

SCD testinin prensibi spermlerin lizis solüsyonundan önce asit solüsyonu ile muamele edilmesine ve düşük erime noktalı agaroz (LMA) içerisinde karakteristik bir halo oluşturmasına dayanır. Halonun oluşması veya büyüklüğü DNA fragmantasyonunun olmadığını gösterirken halonun bulunmaması ya da çapının çok küçük olması fragmantasyonun varlığını ifade eder (Şekil 9a). Fernandez ve arkadaşlarının 20 infertil ve 10 fertil erkeğin spermleri ile yaptıkları çalışmada, DNA fragmantasyonunun değerlendirilmesinde SCD yönteminin sonuçları DBD-FISH yöntemi ile doğrulanmıştır. SCD değerleri, infertil grupta fertil donör gruba göre daha yüksek bulunmuştur[160-166].

2.8.7.2. Yöntem:

Yıkanmış ya da yıkanmamış semen örneği son derişim 5-10 X10^6/ml olacak şekilde ayarlanır. Süspansiyon +37^{o}C'deki %1'lik LMA ile karıştırılır. Bu karışımın 50 µl'si daha önce üzeri %0,65'lik normal agaroz ile kaplanmış lam üzerine aktarılıp üzeri lamel ile kapatılarak +4^{o}C'de 4 dk. katılaşması için bekletilir. Katılaştıktan sonra lamel dikkatli bir şekilde çıkarılarak 22^{o}C'de, 7 dk. taze hazırlanmış 0,08N HCl solüsyonu ile karanlıkta denatüre edilir. Denatürasyon sonrası lamlar nötralizasyon-lizis solüsyonu 1 (0,4M Tris, 0,8M DTT, %1 SDS, 50mM EDTA, pH 7,5) içerisinde oda ısısında, 10 dk. bekletilerek proteinler uzaklaştırılmış olur. Daha sonra ise lamlar nötralizasyon-lizis tamponu 2 (0,4M Tris, 2M NaCl, %1 SDS, pH 7,5) içerisinde oda ısısında 5 dk. bekletilir. Bu süre sonunda 2 dk. TBE tamponu (0,09M Tris-borat ve 0,002M EDTA, pH 7,5) içerisinde bekletilip ikişer dakika %70, %90 ve %100'lük etanol solüsyonlarında bekletilerek dehidrate edilir. Son işlem olarak da 2 µg/ml'lik DAPI ile boyanır[161].



Şekil 9. (a) SCD testi resimleri **a1)** büyük halo **a2)** orta büyüklükteki halo **a3)** küçük halo **a4)** halo yok **(b)** COMET görüntüleri **b1)** hasarlı DNA **b2)** sağlam DNA[148].

2.8.8. COMET ASSAY

2.8.8.1. Prensip:

Tek hücre jel elektroforezi ya da diğer bir adıyla COMET Assay ökaryotik hücrelerdeki DNA hasarını hücre bazında saptayabilen duyarlı, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir. Hücre bazındaki DNA hasarını saptayan ilk araştırmacılar Rydberg ve Johanson'dır. Bu araştırmacılar, hücreleri parçalayıp agaroz

içerisine gömdükten sonra agarozu lam üzerine aktararak alkali koşullarda DNA'nın açılmasını sağlamışlardır. Nötralizasyon işlemi sonrasında ise hücreleri akridin oranj ile boyayarak DNA hasarını fotometre aracılığı ile yeşil renkli floresansın (çift zincirli DNA'yı ifade eder) kırmızı renkli floresansa (tek zincirli DNA'yı ifade eder) oranı şeklinde ölçmüşlerdir. 1984 yılında Ostling ve Johanson yöntemin duyarlılığını arttırmak için mikrojel elektroforez tekniğini geliştirmişlerdir. Araştırmacılar agaroz jel içerisine yerleştirdikleri hücreleri lam üzerine aktardıktan sonra deterjanlar ve yüksek tuz derişimleri kullanarak parçalamışlar. Bu şekilde açığa çıkan DNA'ya hafif bazik şartlarda (pH 9,5) elektroforez uygulamışlar ve elektroforez sonunda DNA'yı floresans bir boya (etidyum bromür) ile boyadıklarında jelde baş ve kuyruktan oluşan ve kuyruklu yıldıza benzeyen görüntülerin oluştuğunu görmüşler; bu nedenden ötürü de tekniğe " COMET ASSAY" adını vermişlerdir (Şekil 9b). Nötral şartlarda DNA çift iplikli olduğundan bu teknik yalnızca çift-zincirli DNA'daki kırıkların tespitine olanak sağlarken, RNA artifakta neden olmaktadır[167,168].

Bugün için COMET Assay'in iki farklı şekli kullanılmaktadır. Bunlardan bir tanesi Singh ve ark.'nın 1988 yılında geliştirdiği alkali elektroforez (pH>13) tekniğidir. Alkali koşullarda DNA tek iplikli olduğundan bu teknik ile tek zincir DNA kırıkları ve alkali labil bölgeler tespit edilebilmektedir. Bu yöntem Tek Hücre Jel Elektroforezi (SCGE) olarak bilinmektedir, fakat kronolojik sıralamadan dolayı birçok araştırmacı bu yöntemi "COMET Assay" olarak adlandırmaktadır. 1990 yılında ise Olive ve ark.'ları Ostling ve Johanson'ın nötral tekniğini geliştirerek alkali muamelesi ile hücreleri parçaladıktan sonra nötral ya da orta alkali koşullarda elektroforez uygulayarak tek zincir kırıklarını tespit edebildiklerini bildirmişlerdir[169-171].

Singh ve Olive'in geliştirmiş olduğu metodlar prensipte aynı pratikte ise benzerdir. Fakat Singh'in yöntemi daha duyarlı gibi görünmektedir[167].

Singh'in yönteminde düşük erime noktalı agaroz (LMA) içerisinde hazırlanan hücre süspansiyonu, lam üzerine agar jel ile sandeviç modeli oluşturacak şekilde aktarılıp pH 10'da deterjanlar ve yüksek tuz derişimleri kullanılarak parçalama işlemi gerçekleştirilmektedir. Daha sonra ise alkali koşullar altında kısa bir süre elektroforez uygulanmaktadır. Parçalama işlemi ile

nükleer materyal dışındaki hücre bileşenleri uzaklaştırılmış olur. Çok küçük miktardaki non-histon protein varlığında bile DNA süpersarmal halinde iken, alkali koşularda kırıkların bulunduğu bölgelerden açılmaya başlar. DNA hasarı yüksek olan hücrelerdeki DNA göçü daha fazladır ve bu göç kuyruklu yıldıza benzer[167].

Parçalama işleminde ve elektroforezde kullanılan pH değeri tekniğin duyarlılığını değiştirir. Her iki değişken için de nötral pH kullanıldığında çift zincirli DNA'daki kırıklar tespit edilirken pH 12,3'de tek zincir kırıkları ve delay tamir bölgeleri, pH 13'de ise alkali labil bölgeler, tek zincir kırıkları ve delay tamir bölgeleri tespit edilebilmektedir[167].

2.8.8.2. Yöntem:

COMET Assay birçok yayında detaylı bir şekilde anlatılmıştır. Kısaca özetlemek gerekirse ilk olarak hücreler +37^{o}C'de %0,5'lik LMA ile süspanse edilip daha önceden üzeri %0,5'lik normal erime noktasına sahip agaroz (NMA) ile kaplanmış lam üzerine aktarılır. Katılaştıktan sonra 3. tabaka olarak üzerine yine %0,5'lik LMA ilave edilir. Bu üç tabakalı jel hazırlandıktan sonra hücreler deterjanlı solüsyon içerisinde en az 1 saat bekletilerek parçalanır. Daha sonra lam alkali ya da nötral bir tampon içeren elektroforez tankına yerleştirilip, DNA'nın açılması için bir süre beklendikten sonra elektroforez gerçekleştirilir. Elektroforez sonrasında lam nötralizasyon tamponu ya da PBS ile yıkanıp florokrom bir boya ile boyanır[169,172,173].

Son birkaç yıldır yayınlarda COMET Assay'in çeşitli modifikasyonları kullanılmıştır. Lizis solüsyonunun içeriği ve pH'sı, elektroforez tamponunun içeriği ve pH'sı, elektroforez koşulları (voltaj, amper, elektroforez süresi) değiştirilerek yöntemin duyarlılığı değiştirilebilmektedir[167].

2.8.8.3. Lizis Solüsyonu

Çalışmanın amacına uygun olan lizis solüsyonu seçilmelidir. Nötral lizis solüsyonları çift zincir kırıklarının tespitinde, alkali lizis solüsyonları ise tek zincir kırıklarının tespitinde kullanılmaktadır. Literatürlerde en çok kullanılan alkali lizis solüsyonudur. pH 10-12'de yüksek tuz derişimi ve deterjan içeren lizis

solüsyonunda hücreler en az 1 saat bekletilir. McKelvey- Martin ve ark. lizis solüsyonunun içeriğinde bazı modifikasyonlar yapmışlardır. Bu araştırmacılar deterjan karışımına N-laurilsarkozin eklemişler ve sonuçta bir değişiklik olmadığını rapor etmişlerdir. Rojas ve ark. ise artık protein kalıntılarının uzaklaştırılması için lizis solüsyonuna proteinaz K eklediklerini bildirmişlerdir [167,172,174].

2.8.8.4. Elektroforez Tamponu

Elektroforezden önce lamlar alkali elektroforez solüsyonunda bir süre dengelenir. Bu solüsyon deterjan içermez, tuz derişimi düşük, pH (< 12,3) değeri ise yüksektir. Dengeleme ve elektroforez süresi çalışılan hücre tipine ve DNA hasarına göre değişir. Bu adımlarda yapılan değişiklikler önemli olup yüksek voltaj kullanılarak ya da elektroforez süresi uzatılarak daha büyük sürüklenmeler/kuyruklar (kometler) elde edilebilir. Dengeleme süresi uzadıkça yöntemin duyarlılığı artar. Green ve ark. dengeleme süresinin 40 dk. dan uzun olması durumunda kuyruk oluşumun arttığını bildirmişlerdir. Dengeleme ve elektroforez sıcaklığının arttırılması da duyarlılığı artırırken aynı zamanda kontrol grubunda da kuyruk oluşumuna neden olmaktadır. 15^{o}C'de maksimum ayırımın sağlanabileceği, bu sıcaklıkta ve 40 dk. dengeleme süresi ile de maksimum duyarlılığın elde edilebileceği bildirilmektedir[167].

2.8.8.5. Lam Hazırlama

Lam hazırlamada iki temel prosedür kullanılmaktadır, bunlardan ilki tek tabakalı lam diğeri ise daha yaygın olarak kullanılan üç tabakalı (sandviç modeli) lam modelidir[167].

2.8.8.5.1. Tek Tabakalı Lam Modeli

LMA içerisinde süspanse edilmiş hücreler daha önceden tamamen soğutulmuş lam üzerine akatarılarak tek tabakalı lam hazırlanmış olur[167].

2.8.8.5.2. Üç Tabakalı Lam Modeli (Sandviç Modeli)

Bu teknikte lamın daha önceden soğutulmasına gerek yoktur, oda ısısındaki lamlar kullanılmaktadır. İlk olarak lam yüzeyi NMA ile kaplanır, bu ilk tabakayı oluşturur. İkinci tabaka olarak LMA ile süspanse edilmiş hücreler lam üzerine aktarılır. Üçüncü tabaka olarak da yine LMA eklenerek üç tabakalı lam hazırlanmış olur[167].

İlk tabakadaki agaroz düz bir zemin oluştururken ikinci ve üçüncü tabakaların daha sıkı bir şekilde tutunmasını sağlar. Etkin bir analiz için ikinci tabakada bulunan hücre miktarı ve agaroz derişimi önemlidir. Genellikle ~1,000-50,000 hücre 10µL PBS veya kültür medyumu ile süspanse edilip son derişim %0,5-1 olacak şekilde, 35-45^{o}C'de, 75 µL LMA ile karışıtırılır. Eğer ikinci tabakadaki hücre sayısı fazla olursa görüntüleme işlemi zorlaşır. Üçüncü tabaka ise yalnızca hücreleri korumak için eklenir[167].

2.8.8.6. Nötralizasyon

Elektroforez sonrası lamlar pH 7,5 Tris tamponunda 5'er dakika 3 defa yıkanarak nötralize edilir. Nötralizasyon süresi uzadıkça artifakt yoğunluğu azalmaktadır[167].

2.8.8.7. Lamların Saklanması

Lam üzerine ilk tabakadaki agaroz ilave edildikten sonra 40-50^{o}C'deki fırında birkaç dakika bekletilerek agaroz dehidrate edilir ve sonraki adımlar aynen yukarıda anlatıldığı şekilde uygulanır. Nötralizasyon işlemi sonrasında da yine diğer agaroz tabakalarının dehidrate edilmesi için iki kez 5'er dakika saf etanolde bekletilir[175,176].

2.8.8.8. Boyama

Bu teknikteki son adım DNA spesifik bir boya ile DNA'nın boyanarak görüntülenmesidir. En çok kullanılan boyalar etidyum bromür, propidyum iyodür ve DAPI'dir. Singh ve ark. YOYO-1 ve gümüş yeşili boyalarının duyarlılığı arttırdığını bildirmişlerdir[167,177].

2.8.8.9. Veri Analizi

Araştırmacılar verileri değerlendirmede farklı yöntemler kullanmışlardır. Calderon ve ark. DNA hasarını migrasyon gösteren hasarlı hücreleri sağlam hücrelere oranlayarak ölçmüşlerdir. Bu yöntem ile elde edilen sonuç bize genel DNA hasarı hakkında bilgi verir, hücre düzeyindeki DNA hasarı hakkında fikir vermez. Anderson ve ark. ise migrasyon oranına göre hücreleri skorlayarak hücre bazındaki DNA hasarını ölçtüklerini belirtmişlerdir. DNA migrasyonu genellikle µm cinsinden ifade edilmektedir. Göç uzunluğu fragmantasyon oranıyla ve dolayısıyla DNA hasarı ile ilişkilidir. Migrasyon uzunluğu çeşitli şekillerde ölçülebilir; okülerdeki mikrometre aracılığı ile hücrelerin fotografik görüntülerinin üzerindeki cetvellerle ya da görüntüleme sistemlerindeki monitorler aracılığı ile ölçülebilmektedir[167,178].

Yalnızca kuyruk uzunluğu DNA hasarını doğru bir şekilde yansıtmaz ayrıca bu kuyruk bölgesinde sürüklenen DNA'nın yüzdesi de önemlidir. Olive ve ark. yaptıkları çalışmalar sonucunda nötral pH'da ve pH 12,3'de (alkali) DNA migrasyonunun belirli bir yere kadar devam ettiğini ve bu noktadan ileriye gidemediğini bildirmişler. Buna karşılık migrasyon uzunluğunun artmamasına rağmen göç eden DNA yüzdesinin ise arttığını ifade etmişlerdir. pH >13 olduğu alkali koşullarda ise böyle bir durumun söz konusu olmadığını bu pH'da migrasyon uzunluğunun DNA hasarını doğru bir şekilde yansıttığını rapor etmişlerdir. Tüm bu karışıklığı ortadan kaldırmak için Olive ve ark. "Kuyruk Momenti" terimini tanımlamışlardır[167,171].

Kuyruk Momenti = Kuyruk uzunluğu **X** Kuyruktaki floresan yoğunluğu
veya
Göç bölgesindeki DNA yüzdesi

2.8.9. TUNEL Testi

2.8.9.1. Prensip:

TUNEL yöntemi asıl olarak apoptoz sırasında meydana gelen DNA parçalanmasını ölçmek için tasarlanmıştır. Normal spermatogenezin gelişimi ve kontrolü için programlanmış hücre ölümü gereklidir. Ancak ağır testiküler germ hücre apoptozu, yardımla üreme tekniklerinden elde edilecek başarıyı düşürür. TUNEL tekniği apoptotik olduğuna inanılan semendeki sperm populasyonunun tanımlanması için ilk defa Gorczya ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. Bu yöntemde DNA kırıklarının 3'OH ucuna, terminal deoksinükleotidiltransferaz (TdT) enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, biyotinlenmiş uridintrifosfat (dUTP) bağlanır. Biyotinlenmiş DNA streptavidin ile birleşerek suda çözünmeyen renkli bir ürün ortaya çıkarır[9,157].

TUNEL yöntemi ile sperm sayısı, motilitesi ve normal morfoloji yüzdesi arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu konudaki verilere göre, TUNEL sonuçlarının prediktif etkinliğinin yüksek olabileceği, IUI'daki gebelik oranı, IVF'deki embriyo kalitesi, ICSI'deki fertilizasyon oranı hakkında fikir verebileceği ve tekrarlayan gebelik kayıplarına bir açıklama getirebileceği düşünülmektedir[144,179-182].

2.8.9.2. Yöntem:

Sperm örnekleri PBS (pH 7,4) ile iki kez yıkanıp son derişim 1-2 $X10^6$/ml olacak şekilde süspanse edilir. Sperm süspansiyonu %1'lik formaldehid ile 10 dk. oda ısısında fikse edilir. Süre sonunda örnek 10,000g'de 4 dk. santrifüjlendikten sonra PBS ile yıkanır ve tekrar 100 µl yıkama tamponu (100mM Tris-asetat, 100mM magnezyum asetat, 500mM potasyum asetat, %0,1 Triton X-100) ile süspanse edilip oda ısısında 10 dk. inkübe edilir. Fikse edilmiş spermler 50 µl TdT tamponu (3µM biotin-16-dUTP, 12 µM deoksiadenozin trifosfat (dATP), %0,1 Triton X-100, 10 IU TdT enzimi) ile 37^oC'de 60 dk. inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında hücreler PBS ile iki kez yıkanarak 100 µl boyama tamponu ile (%0,1 Triton X-100, %1 streptavidin/Texas kırmızı antibiotin) +4^oC'de 30 dk. boyanır. Boyanmış hücreler

PBS-% 0,1 Triton X-100 ile yıkanır. 100-500 sperm hücresi floresan mikroskop kullanarak ya da Floresan İndüklü Hücre Tiplendirme (FACS) flow sitometresi kullanılarak analizlenir[183].

TUNEL yöntemi hem pahalı hem de zaman alıcı bir yöntemdir. Flowsitometrik değerlendirme daha doğru ve daha güvenilir olmasının yanında daha karmaşık ve daha pahalıdır[184].

2.8.10. Sperm Kromatin Strüktür Analizi (SCSA)

2.8.10.1. Prensip:

SCSA, in situ olarak DNA'nın ısı ya da asit indüklü denaturasyona olan hassasiyetini ölçen flowsitometrik bir yöntemdir. Her iki yöntem ile de aynı sonuçlar elde edilmesine rağmen protokol $SCSA_{asit}$ ve $SCSA_{ısı}$ olmak üzere ikiye ayrılır. Isı veya asit muamelesi sonucunda denatüre olan DNA metakromatik bir boya olan akridin oranj ile boyanır. Hasarlı DNA (tek zincirli DNA) kırmızı renkte floresan verirken hasarlanmamış DNA (çift zincirli DNA) yeşil renkte floresan verir. $SCSA_{asit}$ protokolü daha kolay ve kullanışlıdır. DNA hasarı, DNA fragmantasyon indeksi (DFI) ile ifade edilir. SCSA, sperm DNA hasarını doğru bir şekilde ölçen, fertil ve infertil bireyleri birbirinden ayıran sınır değeri hesaplanmış, pahalı bir yöntemdir. Fertilizasyon ve implantasyon oranı gibi üremeye yardımcı tekniklerin sonuçlarını yorumlamada bugüne kadar bildiğimiz yöntemler içerisinde en başarılısı SCSA'dır. İnfertil erkeklerde semen analizini desteklemek amaçlı SCSA testinin de rutin olarak yapılması önerilmektedir. Elde edilen en son verilere göre DFI %30'dan büyük ise aşılama ile gebe kalma olasılığı neredeyse sıfıra yaklaştığından çözüm olarak ICSI yöntemi seçilmelidir[6,134,185-187].

Virro ve arkadaşları 249 infertil çifte IVF-ICSI uygulamışlar ve DFI ile fertilizasyon ve gebelik oranları arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Bu çalışmanın verilerine göre, DFI < %30 olan 178 çiftin gebelik oranı %43, DFI ≥30 olan grupta ise %28 olarak bulunmuştur. Fertilizasyon oranları arasında ise anlamlı bir fark görülmemiştir[11].

2.8.10.2. Yöntem:

Yaklaşık 13-70 µl yıkanmamış semen örneği son derişim 1-2 $X10^6$ sperm/ml olacak şekilde TNE tamponu (0,01 M Tris-HCl, 0,15M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4) ile dilüe edilir. Hücre süspansiyonu asit-deterjan solüsyonu (%0,1 Triton X-100, 0,15M NaCl, 0,08N HCl, pH 1,2) ile 30 saniye muamele edilir. Daha sonra ise pH 6 fosfat-sitrat tamponu içerisinde çözünmüş 6 mg/l AO boyası ile boyanır. Boyanmış örnek flowsitometrideki örnek haznesine yerleştirilir[6].

2.8.11. *8*-Hidroksi *2*-Deoksiguanozin Ölçümü

2.8.11.1. Prensip:

8-hidroksi 2-deoksiguanozin (8-OHdG) en yaygın oksidatif DNA hasarı biyoişaretleyicisidir. Genomik DNA'da 8-OHdG tayini için kullanılan en yaygın metod elektrokimyasal belirlemeli yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC-EC)'dir[188].

2.8.11.2. Yöntem:

a) DNA Ekstraksiyonu

Sperm örneği ilk önce sperm yıkama solüsyonu (10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 1M NaCl, pH 7,4) ile yıkanır. Daha sonra ditiyotreitol (DTT), proteinaz K ve SDS ile 55^oC'de 1 saat inkübe edilir. Akabinde spermatozoa DNA'sı kloroform/izoamil alkol ile ekstrakte edilir ve ribonükleaz A ile hidrolizlenir. Daha sonra DNA 10mM Tris-HCl içinde bir sonraki enzimatik DNA hidrolizi için çözdürülür. DNA ürünü spermatozoa sayısına bağlı olarak 40 ile 300 µg arasında (1 milyon hücrede ortalama 1,63 µg olmak üzere) değişim gösterir[188].

b) Enzimatik DNA Hidrolizi

Bu aşama 8-OHdG için kritik bir basamaktır. Bazı araştırıcılar nükleaz P1 ve alkalen fosfataz gibi enzimlerle kombine olarak kullanmalarına rağmen Shen

ve Ong DNA hidrolizinin bakteriyel kaynaklı alkalen fosfataz (AP) kullanıldığında daha iyi sonuç verdiğini ve diğer kaynaklardan elde edilen AP ile daha az hidroliz sağladığını bildirmektedirler. Her bir örnekte %90'ın üzerinde olan DNA hidrolizi dönüşüm faktörü ile deoksiguanozin (dG) yoğunluğu hesaplanabilir (1µg DNA =0,62 nmol dG)[188].

c) HPLC-EC Analizi

Bu analiz sistemi bir Gilson pompası, bir Whatman partisphere 5 C18 kolon, bir elektrokimyasal dedektör (Ag/AgCl elektrot, camsı karbon elektrot, 0,7 V, 50nA), ultraviole dedektör (254 nm) bir otoörnekleyici ve bir toplayıcıdan meydana gelmektedir. 8-OHdG ve dG düzeylerinin belirlenmesi için sırasıyla 13 ve 9 dakikalık bir zaman gereklidir. Sonuçlar 8-OHdG/10^5 hücre olarak verilir. Spermatozoon DNA'sındaki hasarın tespiti için spermada 8-OHdG'nin düzeyinin belirlenmesi duyarlı ve nitelikli bir yöntem olarak gözükmesine rağmen bu yöntemle ilgili problemler şöyle sıralanabilir[188,189].

- DNA ekstraksiyonu ve sindirimini kapsayan analitik işlemler beklenmeyen DNA oksidasyonu ile ortaya çıkabilir.
- Standart işlemlerin eksikliği farklı laboratuvarlar arasında önemli varyasyonlara sebep olabilir.
- Nispeten büyük miktarda (50µg) DNA gerektirmesi klinik örneklerde yaygın olarak kullanımını engeller.

Yukarıda belirtilen durumlar dikkate alındığında spermada 8-OHdG düzeyinin güvenilir bir şekilde tespit edilebilmesi için şu önlemleri almak gereklidir.

- DTT ve proteinaz K ile inkübasyon sperm DNA'sını dekondanse ve ekstrakte etmek için esastır.
- İnsan eliyle yapılan hataları en aza indirgemek için DNA ekstraksiyonunda fenol kullanımından sakınılmalıdır.
- Sistemin belirleme sınırına bağlı olarak 30 µg'dan daha az DNA ekstraktları kabul edilmemelidir.
- Bütün çalışma boyunca 8-OHdG standartlarında aynı kimyasalları ve ajanları kullanmak gerekir.

- Her grubun analizinde kalite kontrol için az miktarda karıştırılmış örnek kullanılmalıdır.
- Hidroliz işleminden sonra mümkün olan (genellikle birkaç gün içinde) en kısa süre içerisinde analiz yapılmalıdır[17].

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Gereçler

- Dijital pH metre (Orion 3 Star)
- Santrifüj (Hettich Universal II)
- Hassas Terazi (Sartorius)
- Otomatik Pipet (Gilson P-20, Socorex 200,Biohit 1000)
- Mikrodalga fırın (Beko)
- Elektroforez cihazı (CleverScientific)
- Mikromanipülatör (Narishige)
- Floresan mikroskop (Olympus DP72)
- Buzdolabı (Arçelik)
- İnkübatör (Forma Scientific)
- Faz-kontrast mikroskobu (Zeiss)
- İnvert mikroskop (Olympus)
- Makler kamarası
- Rodajlı lam (Isotherm 76X26 mm)
- Lamel (Cıtoglas 24X60 mm)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Agaroz (Sigma A9539)
- Düşük erime noktalı agaroz (LMA) (Sigma A9414)
- Triton X-100 (Fluka 93420)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma D5879)
- Proteinaz K (Sigma-Aldrich P6556)
- Etidyum bromür (Sigma E8751)
- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma ED2SS)
- PBS tablet (Amresco E404)

Kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıkta olup Amresco, Sigma ve Fluka firmaları tarafından sağlanmıştır.

3.2. Örneklerin Temini ve Gruplandırılması

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'na ve Ege Üniversitesi Aile Planlaması İnfertilite (Kısırlık) Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne 2008-2010 yılları arasında infertilite şikayeti ile başvuran erkek olgular, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 12.06.2007 tarihli 5 no'lu kararı doğrultusunda çalışmaya alınmıştır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen kriterler esas alınarak yapılan spermiyogram analizleri sonrasında uygun vakalar, onam formu alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Olası bir girişimi engellemek amacı ile oligospermik, teratospermik, astenospermik ve normospermik bireylerden yalnızca semen örneğinde lökosit bulunmayan olgular çalışmaya alınmıştır. Çalışmada, 20 normospermik, 20 oligospermik, 20 astenospermik ve 20 teratospermik olgunun sperm DNA hasarı COMET ASSAY ile çalışılmış sonuçlar CometScore1.5 Tritek bilgisayar programı kullanılarak hesaplanmıştır. Sperm parametreleri ile DNA hasarı arasındaki ilişki değerlendirilmiş olup ayrıca, yukarıda sayılan tüm sperm anomalilerini içeren %85'i kısa kuyruklu olan ve %100 baş anomalisine sahip olan oligoastenoteratospermik bir olgunun mikroenjeksiyonu da gerçekleştirilmiştir. Mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon, klivaj ve gebelik durumu takip edilerek DNA hasarı ile ilişkisi incelenmiştir.

Genel olarak çalışma dört kısımdan oluşmaktadır;

1) Makroskobik ve mikroskobik semen analizini gerçekleştirmek,
2) Sperm hücrelerini agaroz jel içerisinde immobilize etmek, parçalamak, elektroforez uygulamak, nötralizasyon ve boyama adımlarını gerçekleştirmek,
3) Floresan mikroskop ve bilgisayar yardımı ile boyanmış olan hücrelerden en az 100 tanesini görüntülemek ve resimlerini çekmek,
4) Bilgisayar ortamına aktarılmış olan bu resimleri CometScore1.5 Tritek programı için uygun olan formata dönüştürmek ve en az 100 hücreyi baz alarak DNA hasarını hesaplamaktır.

Makler kamarası ile yapılan sperm sayımı sonrası, semeninde lökosit bulunmayan oligospermik, teratospermik ve astenospermik toplam 60 infertil olgu çalışmaya alınmıştır. Azospermik olgularda sperm hücresi olmadığı için bu vakalar çalışmaya dahil edilmemiştir. Kontrol grubu 20 normospermik, evli ve çocuklu, fertil olduğu bilinen olgulardan oluşturulmuştur.

3.3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

3.3.1. Spermiyogram

3.3.1.1. Makroskobik İnceleme:

Çalışmaya alınan 80 bireye ait semen örneği likefaksiyon, görünüm, volüm ve pH özellikleri yönünden değerlendirilmiştir.

3.3.1.2. Mikroskobik İnceleme:

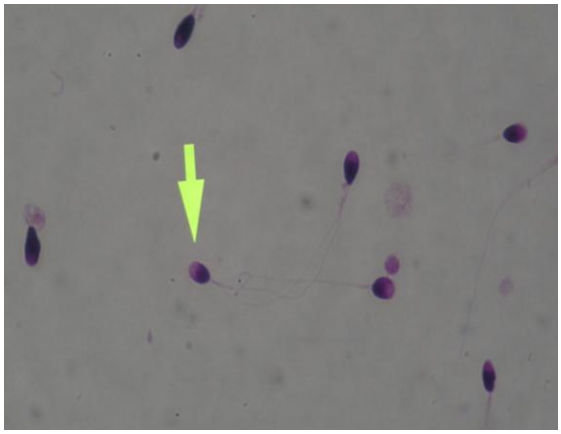
3.3.1.2.1. Sperm sayısının belirlenmesi

Likefaksiyonunu tamamlamış semen örneğinden 10 µl alınıp +37^{o}C'de bulunan Makler sayım kamarasına aktarılarak, faz kontrast ataşmanlı mikroskopta 10x20 büyütmede sayım yapılmıştır. En az 10 karede sayım yapılmış ve on karede saptanan sayı 10^6 ile çarpılarak mililitredeki (x 10^6/ml) sperm sayısı belirlenmiştir. Sperm sayısı belirlenirken aynı zamanda hızlı bir şekilde immotil sperm sayısı ve sperm hareketliliği de değerlendirilerek sperm motilitesi saptanmıştır.

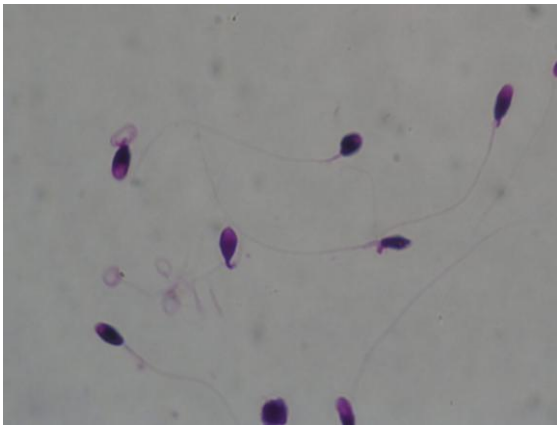
3.3.1.2.2. Morfolojik sınıflandırma

Morfolojik sınıflandırma Kruger'in kesin kriterlerine göre yapılmıştır. Bu amaçla sayımı yapılmış semen örneği üzerine kendi hacminin iki katı olacak şekilde HEPES tamponlu besi yeri ilave edilerek 150-200 g'de santrifüjlenmiş ve böylece sperm hücresi dışındaki diğer hücrelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Santrifüj sonrası üst faz atılmış, sperm sayısı ve hacmi göz önünde bulundurularak seyreltilmesi yapılmış ve lam üzerine yayılmıştır. Hazırlanan preperat kuruduktan sonra Diff-Quick boyası ile boyanmıştır. Boyama sonrası

mikroskop altında en az yüz hücre değerlendirilerek normal ve anormal morfolojili sperm yüzdesi belirlenmiştir (Şekil 10, Şekil 11).



Şekil10. Normal morfolojiye sahip sperm.



Şekil 11. Anormal morfolojiye sahip spermler**.**

3.3.1.2.3. Sperm yıkama işlemi ve Swim-up

Likefiye olmuş, makroskobik ve mikroskobik incelemesi yapılmış semen örneği hacminin iki katı miktarındaki HEPES tamponlu bir besi yeri ile 150-200 g'de santrifüjlenmiştir. Üst faz atılarak üzerine tekrar 2 ml HEPES tamponlu besi yeri ilave edilmiş ve santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst faz atılmış, sayısı ve motilitesi göz önünde bulundurularak 0,3-0,5 ml arasında, uygun miktarda bikarbonat tamponlu besi yeri pelleti kaldırmayacak şekilde ilave edilmiş +37^{o}C'de, %5 oranında CO_2 içeren inkübatörde 1 saat bekletilerek spermlerin yukarı doğru yüzmeleri sağlanmıştır.

Süre sonunda yukarı doğru yüzmüş olan spermlerden, yani tüpün en üst kısmındaki besi yerinden 10 µl alınmış ve +37^{o}C'de bulunan Makler sayım kamarasına damlatıldıktan sonra yukarıda belirtilen esaslara uygun olarak sperm sayımı yapılmıştır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 1992 verilerine göre sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi için normal olarak kabul edilen değerler aşağıda verilmiştir.

Hacim ≥ 2 ml

Sperm sayısı ≥ 20 X10^{6}/ml

Motilite > %50

Morfoloji ≥ 14 (Kruger)

3.3.2. Sperm DNA Hasarının COMET ASSAY İle Analizi

Ayıraçlar

1) Fosfat Tamponu (10mM, pH 7,4, 100 ml)

Amresco E404 markalı PBS tabletinin bir tanesi 100 ml distile su içerisinde çözülür.

2) Lizis Çözeltisi (pH 10, 100 ml)

Bir behere ayrı ayrı tartılarak, 2,5 M (14,61 g) NaCl, 100 mM (3,72 g) EDTA, 10 mM (0,12 g) Tris baz konulur. Üzerine 50 ml distile su eklenerek karıştırıcı yardımı ile çözünmeleri sağlanır. Çözelti pH'sı 10'a ayarlandıktan sonra karışım balon jojeye aktarılarak son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Kullanılıncaya dek 2-8^{o}C'de saklanır.

Kullanmadan önce çözeltiye son derişimi %1 olacak şekilde, Triton X-100 ve %10 DMSO eklenir.

3) Elektroforez tamponu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13, 500 ml)

300 mM (6 g) NaOH tartılarak behere aktarılır üzerine 400 ml distile su ve 1 ml 500 mM EDTA eklenerek, karıştırılır. Kalibrasyonu ayarlanmış pH metre ile pH'sı 13'e ayarlanır. Çözelti balon jojeye aktarılarak son hacim 500 ml'ye tamamlanır.

Elektroforez tamponu günlük olarak taze hazırlanmalıdır.

4) Nötralizasyon Tamponu (0,4 M, pH 7,4, 100 ml)

0,4 M (4,85 g) Tris baz tartılarak bir behere aktarılır ve üzerine 50 ml distile su eklenir. pH metre ile pH 7,4'e ayarlandıktan sonra balon jojeye aktarılıp son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

5) Normal Erime Noktalı Agaroz (NMA)

Normal erime noktasına sahip agarozdan 0,375 g tartılıp üzerine 50 ml PBS (10 mM, pH 7,4) eklenir. Mikrodalga fırında 400 watt'da bir taşım kaynatılır.

6) Düşük Erime Noktalı Agaroz (LMA)

Normal erime noktalı agarozdan 0,015 g, düşük erime noktalı agarozdan ise 0,06 g tartılarak bir behere aktarılır. Üzerine 10 mM, pH 7,4, 10 ml PBS aktarılarak mikrodalga fırında 400 watt'da bir taşım kaynatılır.

3.3.2.1. Örnek hazırlama

Yıkanmış ve swim-up'ı yapılmış örnek bikarbonat tamponlu besi yeri ile son derişim $2x10^6$ hücre/mL olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.3.2.2. Lam Hazırlama

i) 100 µL, %0,75'lik normal erime noktasına sahip agaroz lam üzerine aktarılmış en az 5 dk. oda ısısında katılaşması için beklenmiştir.

ii) 8 µL yıkanmış sperm örneği, 72 µL %0,75'lik düşük erime noktasına sahip agaroz ile karıştırılarak ilk agaroz tabakasının üzerine aktarılmış +4^oC'de 8 dk. katılaşması için beklenmiştir.

iii) 2. tabakanın üzeri de yine 100 µL, %0,75'lik düşük erime noktasına sahip agaroz ile kaplanmış +4^oC de 8 dk. bekletilmiştir.

3.3.2.3. Hücre parçalanması ve DNA dekondenzasyonu

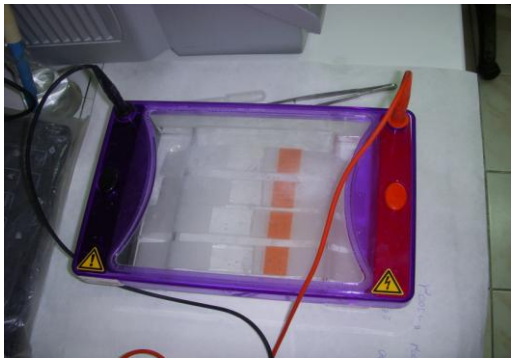
Lamlar 100 µg/mL proteinaz K solüsyonu içeren lizis solüsyonu (2,5 M NaCl, 10mM Tris, %1 Triton X-100, %10 DMSO, pH 10) ile 1 gece +37^oC'de inkübe edilmiştir.

Lamlar lizis solusyonu içerisine direk olarak atılmamalı, pastör pipeti yardımı ile lamın üzerini kapatabilecek kadar ~1 ml ilave edilmelidir. Lam üzerini kaplayan lizis solusyonunun hacmi az olduğundan buharlaşmayı engellemek amacıyla inkübasyon nemli bir ortamda yapılmalıdır.

3.3.2.4. Elektroforez

Lamlar oda ısısında 300 mM NaOH, 1 mM EDTA solüsyonu içeren elektroforez tankında 20 dk. bekletildikten sonra 50 V'da (300 mA) 10 dk. elektroforez uygulanmıştır.

Yöntemin kurulum aşamasında yapılan ön denemelerde elektroforez tankının tampon ile tamamen doldurulması durumunda lam üzerindeki jel tabakasının lam yüzeyinden ayrıldığı gözlenmiştir. Bu durumu önleyebilmek için, tankın iki ucunda bulunan tampon haznesini dolduracak fakat lam yüzeyini kapatmayacak kadar tampon ilave edilerek elektroforez yapılmıştır. İletkenlik lamların üzerine damlatılan elektroforez tamponu ve lamların uçlarına yerleştirilen, tampon ile ıslatılmış kurutma kağıtları ile sağlanmıştır. (Şekil 12, Şekil13)



Şekil 12. Elektroforez tankı.



Şekil 13. Güç kaynağı.

3.3.2.5. Nötralizasyon

Lamlar 0,4 M, pH 7,4 Tris-HCl tamponunda en az 15 dk. nötralize edilmiştir. Nötralizasyon işleminde de yine jelin kalkmasını engellemek için lam solusyon içerisine daldırılmamalı, pastör pipeti yardımı ile solusyonun ~1 ml'si lam üzerine aktarılmalıdır.

3.3.2.6. Fiksasyon

Nötralizasyon sonrasında lamlar %70'lik etanolde 5 dk. bekletilmiştir.

3.3.2.7. Boyama

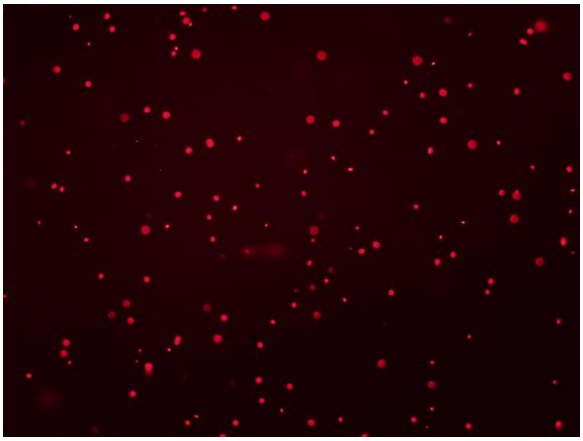
Her bir lam üzerine 45 µL (15 µg/mL) etidyum bromür eklenerek 5 dk. süreyle boyanması sağlanmıştır.

Boyama işlemi sonrasında lamlar iki defa beşer dakika bidistile su ile yıkanmış ve böylece boya artıkları uzaklaştırılmıştır. Bir süre kuruması için

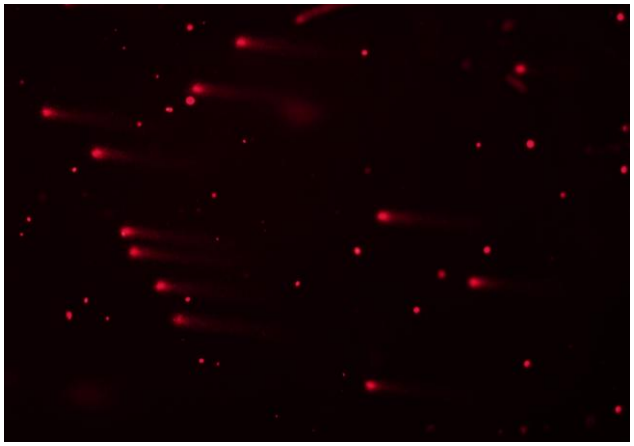
bekledikten sonra üzerine 50 µl, su: gliserol (1:1) karışımından damlatılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Son işlem olarak da floresan mikroskop ve bilgisayar yardımı ile hücrelerin resimleri çekilmiştir.

3.3.2.8. Verilerin Analizi

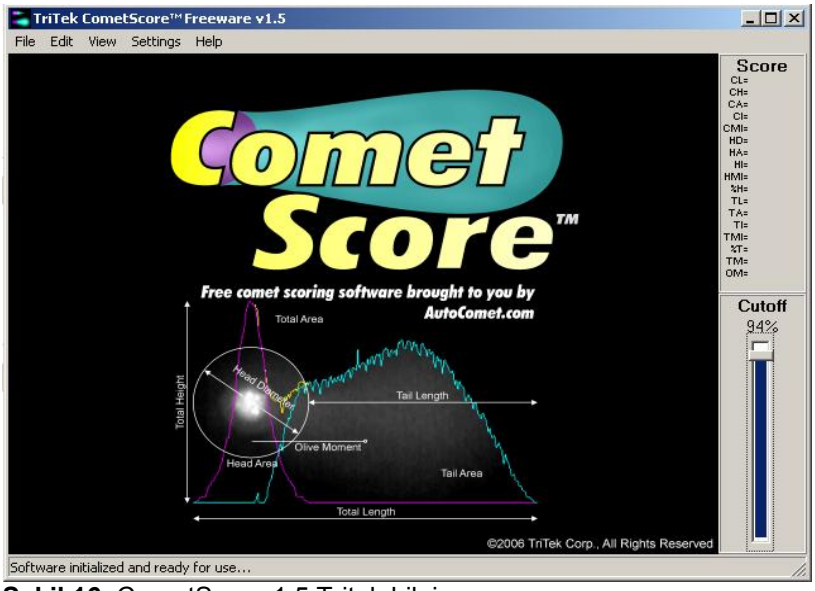
Boyama işlemi sonrasında lamlar floresan mikroskop altında incelenerek bilgisayar aracılığı ile resimleri çekilmiş ve çekilen resimler "bmp" formatında kaydedilmiştir. Eğer hücrede hasar yoksa boyama sonrası, DNA nokta şeklinde görülür ve fragmantasyonu yoktur (Şekil 14), eğer DNA'da hasar mevcutsa fragmantasyon görülür ve boyama sonrası jelde kuyruklu yıldıza benzer yapılar ortaya çıkar (Şekil 15). Resimleri çekilmiş ve "bmp" formatında kaydedilmiş hücrelerin DNA hasarı CometScore1.5 Tritek programıyla hesaplanmıştır (Şekil 16).



Şekil 14. DNA hasarı içermeyen normospermik olgu

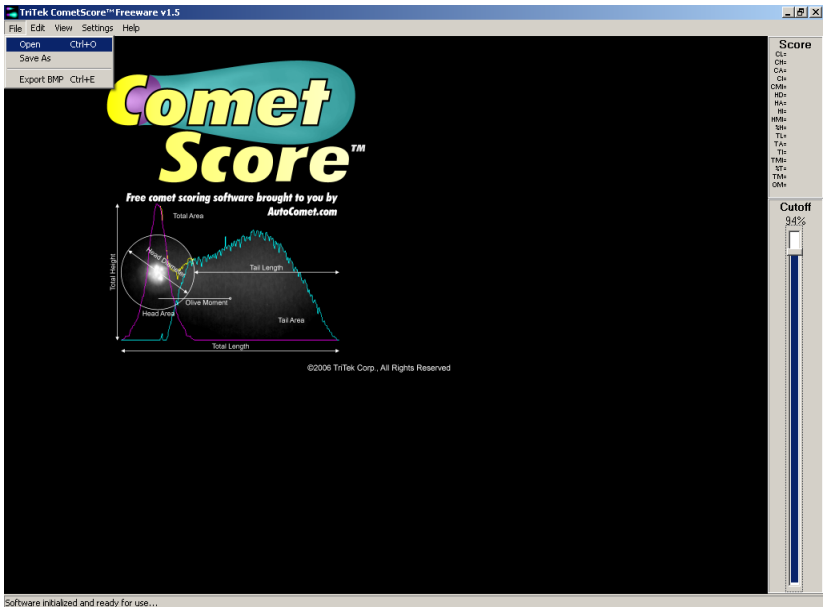


Şekil 15. DNA hasarı ve patolojisi bulunan bir olgu

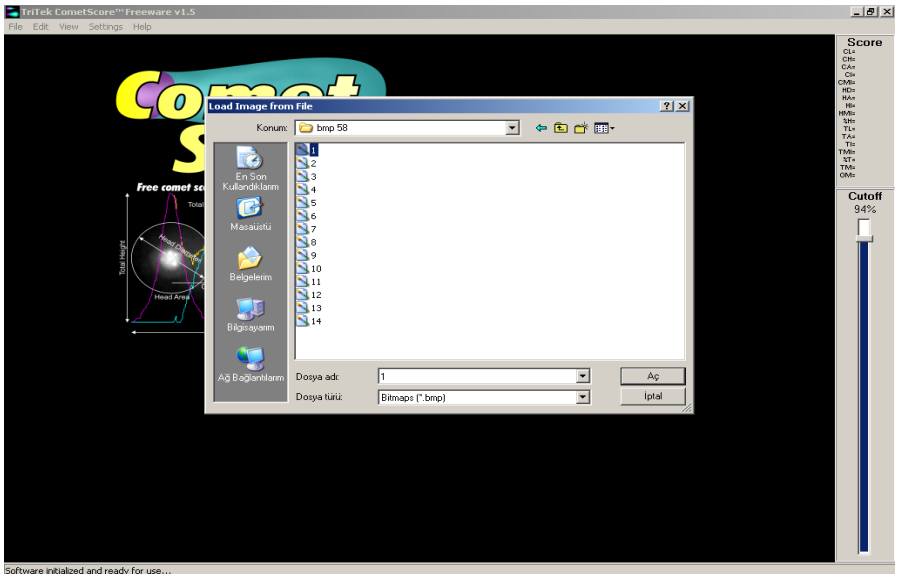


Şekil 16. CometScore 1,5 Tritek bilgisayar programı.

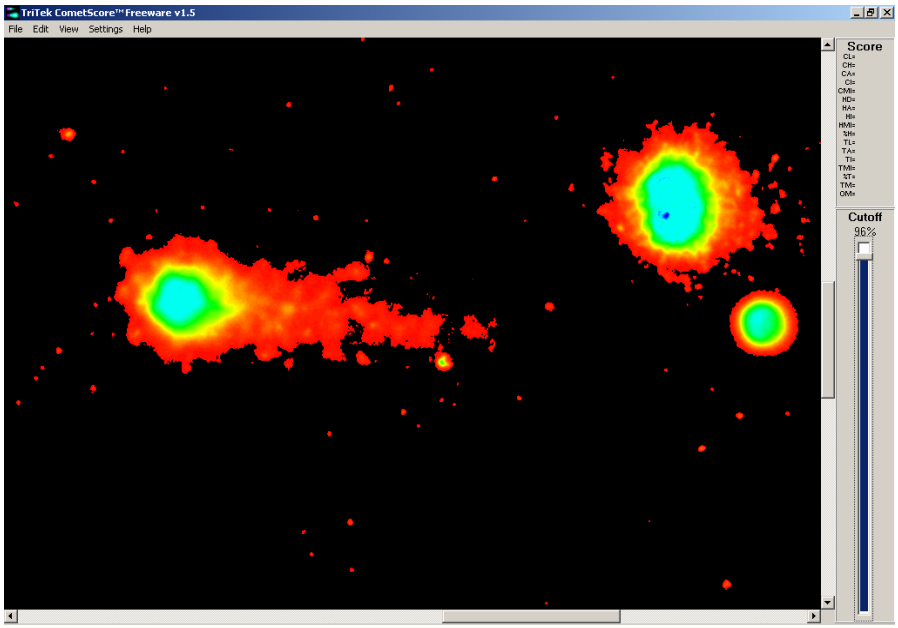
Program açıldıktan sonra "file" menüsünden "open" düğmesi işaretlenerek (Şekil 17) hesaplanması istenen hücreye ait "bmp" formatındaki resim açılır (Şekil 18), sağ tarafta bulunan "cutoff" çubuğu ile zemin rengi ayarlandıktan sonra ekrana gelen hücrelerin tek tek baş ve kuyruk kısımları mouse yardımı ile işaretlenerek hücre bazındaki DNA hasarı hesaplanmış olur (Şekil 19, Şekil 20, Şekil 21).



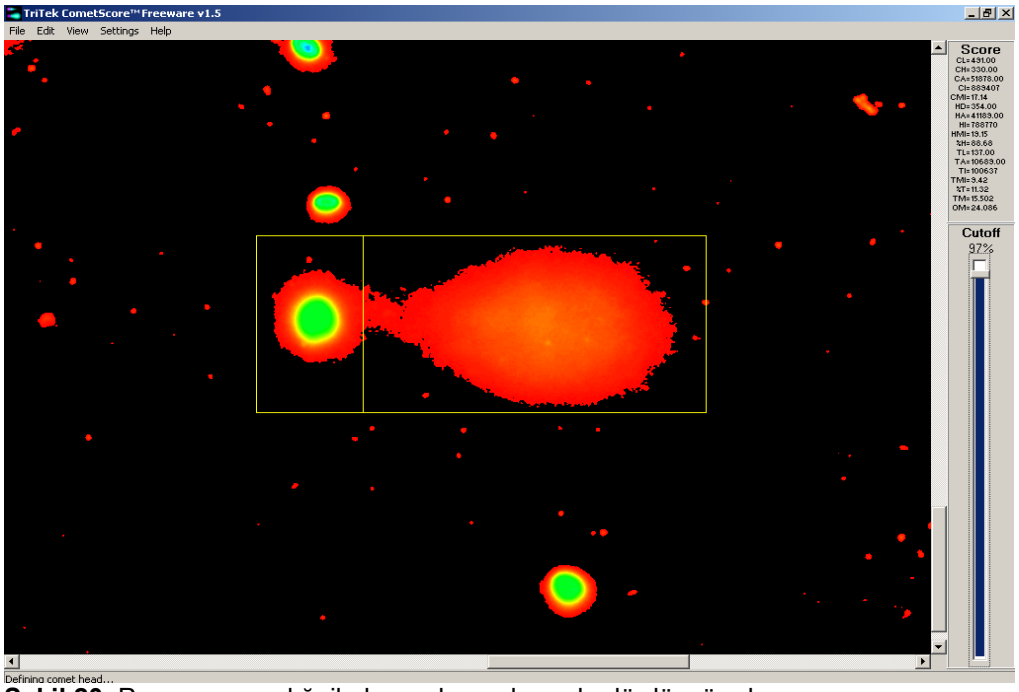
Şekil 17. Program aracılığı ile hasar hesaplamada ilk adım.



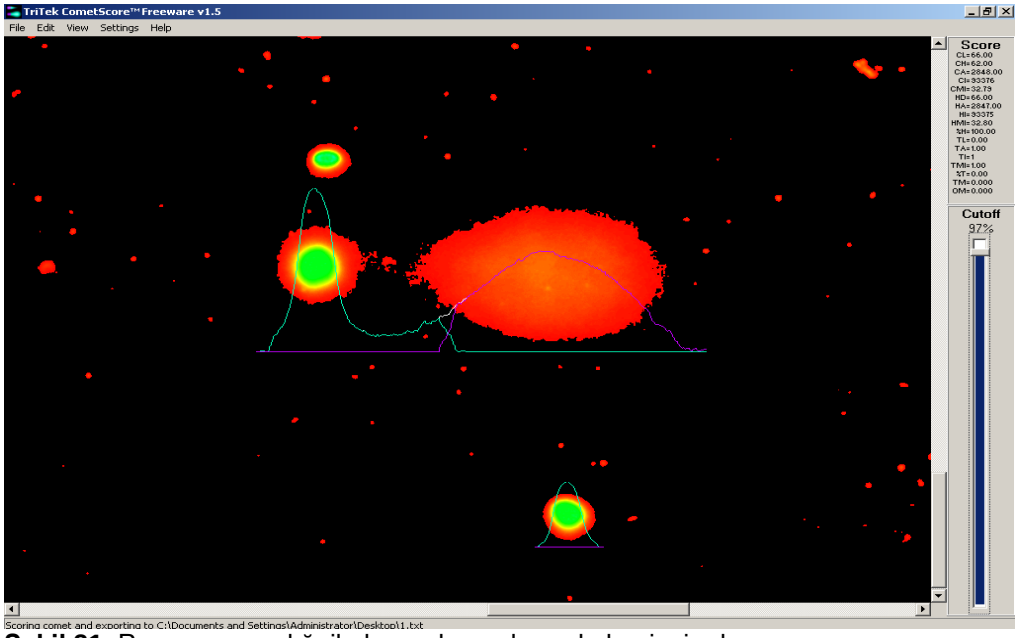
Şekil 18. Program aracılığı ile hasar hesaplamada ikinci adım.



Şekil 19. Program aracılığı ile hasar hesaplamada üçüncü adım.

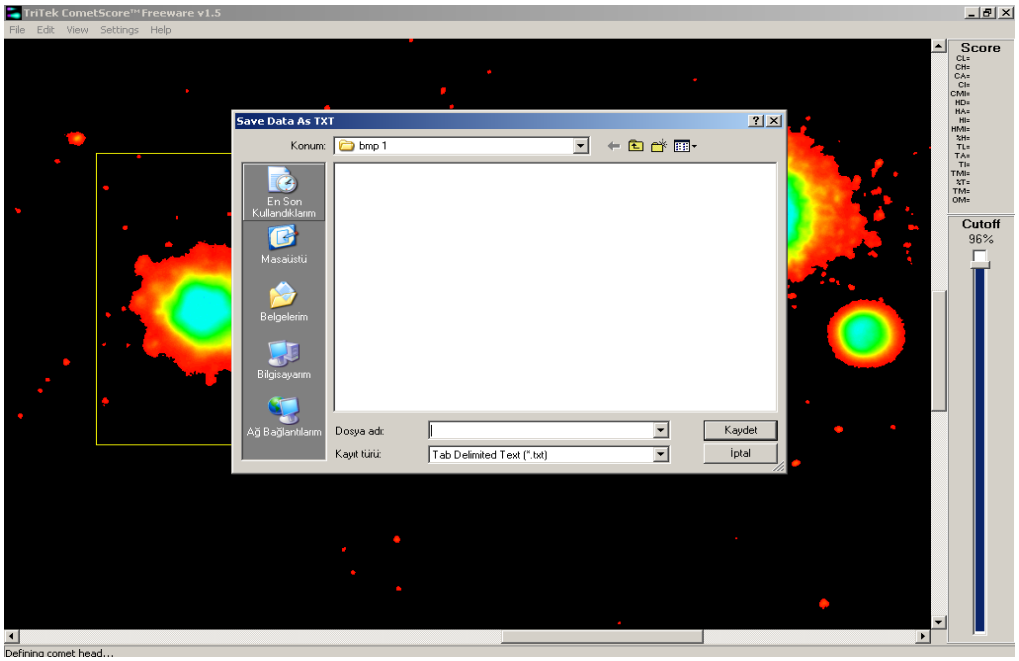


Şekil 20. Program aracılığı ile hasar hesaplamada dördüncü adım.

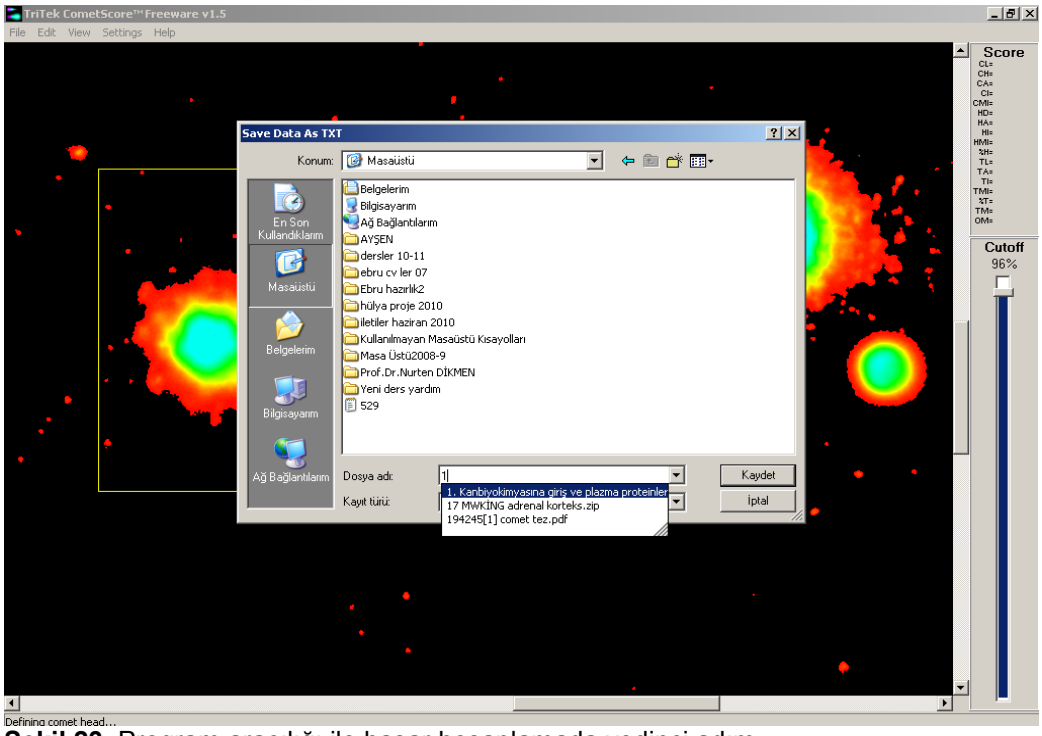


Şekil 21. Program aracılığı ile hasar hesaplamada beşinci adım.

İlk hücrenin seçilmesi ile birlikte program, "verilerinizi TXT olarak kaydedin" uyarısını verir, verilerin kaydedileceği konum seçilerek bu şekilde en az 100 hücrenin değerlendirilmesi gerekir (Şekil 22, Şekil 23).



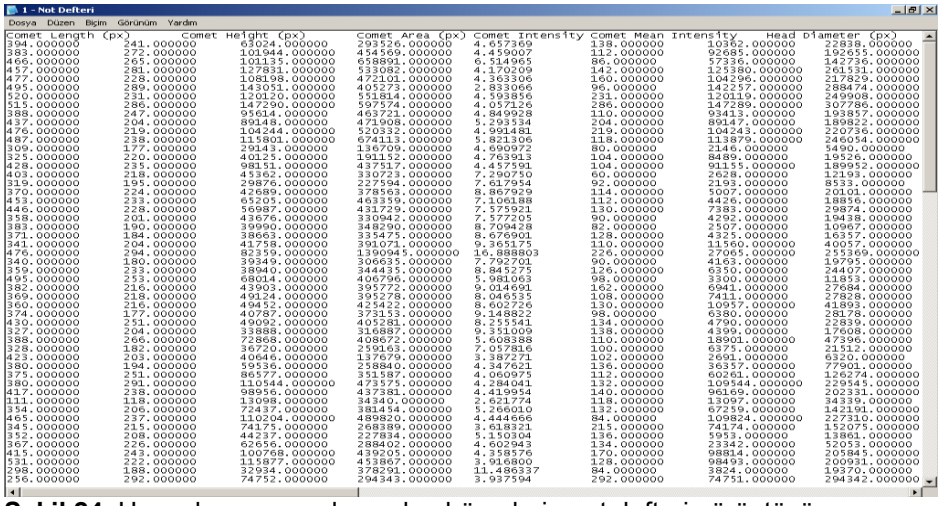
Şekil 22. Program aracılığı ile hasar hesaplamada altıncı adım.



Şekil 23. Program aracılığı ile hasar hesaplamada yedinci adım.

Değerlendirmeye alınan her hücre seçilen konumda, “not defteri” şeklinde kaydedilmiş olur (Şekil 24). Daha sonra boş bir excell sayfası açılarak “file” menüsünden “open” düğmesi işaretlenir ve daha önce kaydedilmiş olan

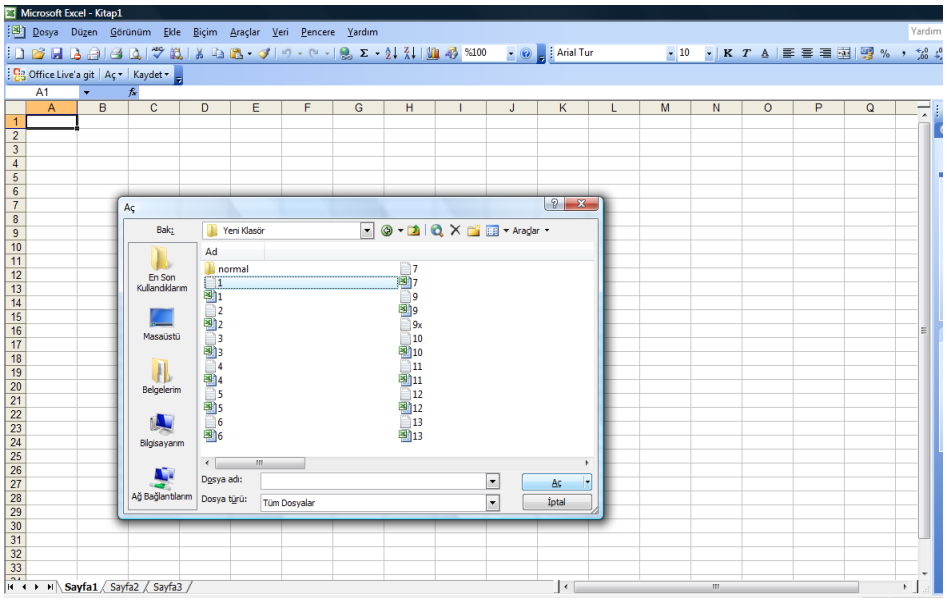
not defteri açılır (Şekil 25). Bir bilgisayar programından diğerine geçiş yapıldığında rakamlarda kaymalar meydana geldiği için “ondalık ayıracı” ile “binlik ayıracı” nın değiştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle karşımıza çıkan sayfada “gelişmiş” düğmesi işaretlenerek ondalık ayıracı nokta ile, binlik ayıracı ise virgül ile değiştirilir (Şekil 26, Şekil 27). Bu işlemden sonra tamam düğmesi işaretlenerek işlem sonlandırırlır. Excel sayfasındaki “ % DNA in Head”, “ % DNA in Tail” ve “Tail Moment” sütunundaki tüm rakamların ortalaması alınarak her bir bireye ait sağlam ve hasarlı DNA oranı hesaplanmış olur (Şekil 28). “% DNA in Head” ortalama sağlam DNA oranını gösterirken “% DNA in Tail” ve “Tail Moment” ortalama hasarlı DNA oranını verir.


1 - Not Defteri

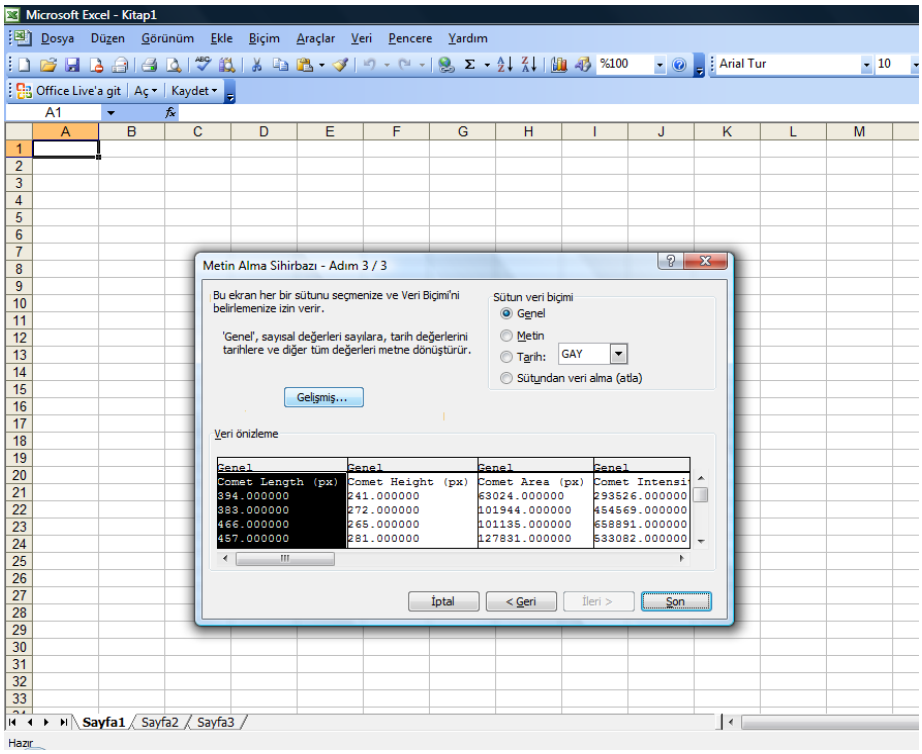
Dosya Düzen Biçim Görünüm Yardım

Comet Length (px)	Comet Height (px)	Comet Area (px)	Comet Intensity	Comet Mean Intensity	Head Diameter (px)	
394.000000	241.000000	63024.000000	293526.000000	4.657369	138.000000	10362.000000	22838.000000
383.000000	272.000000	101944.000000	454569.000000	4.459007	112.000000	92685.000000	192655.000000
466.000000	265.000000	101135.000000	658891.000000	6.514965	86.000000	57336.000000	142736.000000
457.000000	281.000000	127831.000000	533082.000000	4.170209	142.000000	125380.000000	261531.000000
477.000000	228.000000	108198.000000	472101.000000	4.363306	160.000000	104296.000000	217829.000000
495.000000	289.000000	143051.000000	405273.000000	2.833066	96.000000	142257.000000	288474.000000
520.000000	231.000000	120120.000000	551814.000000	4.593856	231.000000	120119.000000	249908.000000
515.000000	286.000000	147290.000000	597574.000000	4.057126	286.000000	147289.000000	307786.000000
388.000000	247.000000	95614.000000	463721.000000	4.849928	110.000000	93413.000000	193857.000000
437.000000	204.000000	89148.000000	471908.000000	5.293534	204.000000	89147.000000	189822.000000
476.000000	219.000000	104244.000000	520332.000000	4.991481	219.000000	104243.000000	220736.000000
487.000000	238.000000	115801.000000	674113.000000	5.821306	118.000000	1138879.000000	246054.000000
309.000000	177.000000	29143.000000	136709.000000	4.690972	80.000000	2146.000000	5490.000000
325.000000	220.000000	40125.000000	191152.000000	4.763913	104.000000	8489.000000	19526.000000
428.000000	235.000000	98151.000000	437517.000000	4.457591	104.000000	91155.000000	189952.000000
403.000000	218.000000	45362.000000	330723.000000	7.290750	60.000000	2628.000000	12193.000000
319.000000	195.000000	29876.000000	227594.000000	7.617954	92.000000	2193.000000	8533.000000
370.000000	234.000000	42689.000000	378563.000000	8.867929	114.000000	5007.000000	20101.000000
453.000000	233.000000	65205.000000	463359.000000	7.106188	112.000000	4426.000000	18856.000000
446.000000	228.000000	56987.000000	431729.000000	7.575921	130.000000	7383.000000	29874.000000
358.000000	201.000000	43676.000000	330942.000000	7.577205	90.000000	4292.000000	19438.000000
383.000000	190.000000	39990.000000	348290.000000	8.709428	82.000000	2507.000000	10967.000000
371.000000	184.000000	38663.000000	335475.000000	8.676901	128.000000	4325.000000	16357.000000
341.000000	204.000000	41758.000000	391071.000000	9.365175	110.000000	11560.000000	40057.000000
476.000000	294.000000	82359.000000	1390945.000000	16.888803	226.000000	27065.000000	255369.000000
340.000000	180.000000	39349.000000	306635.000000	7.792701	90.000000	4163.000000	19795.000000
359.000000	233.000000	38940.000000	344435.000000	8.845275	126.000000	6350.000000	24407.000000
495.000000	253.000000	68014.000000	406796.000000	5.981063	98.000000	3300.000000	11853.000000
382.000000	216.000000	43903.000000	395772.000000	9.014691	162.000000	6941.000000	27684.000000
369.000000	218.000000	49124.000000	395278.000000	8.046535	108.000000	7411.000000	27828.000000
360.000000	216.000000	49452.000000	425422.000000	8.602736	130.000000	10957.000000	41893.000000
374.000000	177.000000	40787.000000	373153.000000	9.148822	98.000000	6380.000000	28178.000000
430.000000	251.000000	49092.000000	405281.000000	8.255541	134.000000	4790.000000	22839.000000
327.000000	204.000000	33888.000000	316887.000000	9.351009	138.000000	4399.000000	17608.000000
388.000000	266.000000	72868.000000	408672.000000	5.608388	110.000000	18901.000000	47396.000000
328.000000	182.000000	36720.000000	259163.000000	7.057816	100.000000	6375.000000	21512.000000
423.000000	203.000000	40646.000000	137679.000000	3.387271	102.000000	2691.000000	6320.000000
380.000000	194.000000	59536.000000	258840.000000	4.347621	136.000000	36357.000000	77901.000000
375.000000	251.000000	86577.000000	351587.000000	4.060975	112.000000	60261.000000	126274.000000
380.000000	291.000000	110544.000000	473575.000000	4.284041	132.000000	109544.000000	229545.000000
417.000000	238.000000	98956.000000	437381.000000	4.419954	140.000000	96169.000000	202331.000000
111.000000	118.000000	13098.000000	34340.000000	2.621774	118.000000	13097.000000	34339.000000
354.000000	206.000000	72437.000000	381454.000000	5.266010	132.000000	67259.000000	142191.000000
465.000000	237.000000	110204.000000	489820.000000	4.444666	84.000000	109824.000000	227310.000000
345.000000	215.000000	74175.000000	268389.000000	3.618321	215.000000	74174.000000	152075.000000
352.000000	208.000000	44237.000000	227834.000000	5.150304	136.000000	5953.000000	13861.000000
367.000000	226.000000	62656.000000	288402.000000	4.602943	134.000000	23342.000000	52053.000000
415.000000	243.000000	100768.000000	439205.000000	4.358576	170.000000	98814.000000	205845.000000
531.000000	222.000000	115877.000000	453867.000000	3.916800	128.000000	98493.000000	200931.000000
298.000000	188.000000	32934.000000	378291.000000	11.486337	84.000000	3824.000000	19370.000000
256.000000	292.000000	74752.000000	294343.000000	3.937594	292.000000	74751.000000	294342.000000

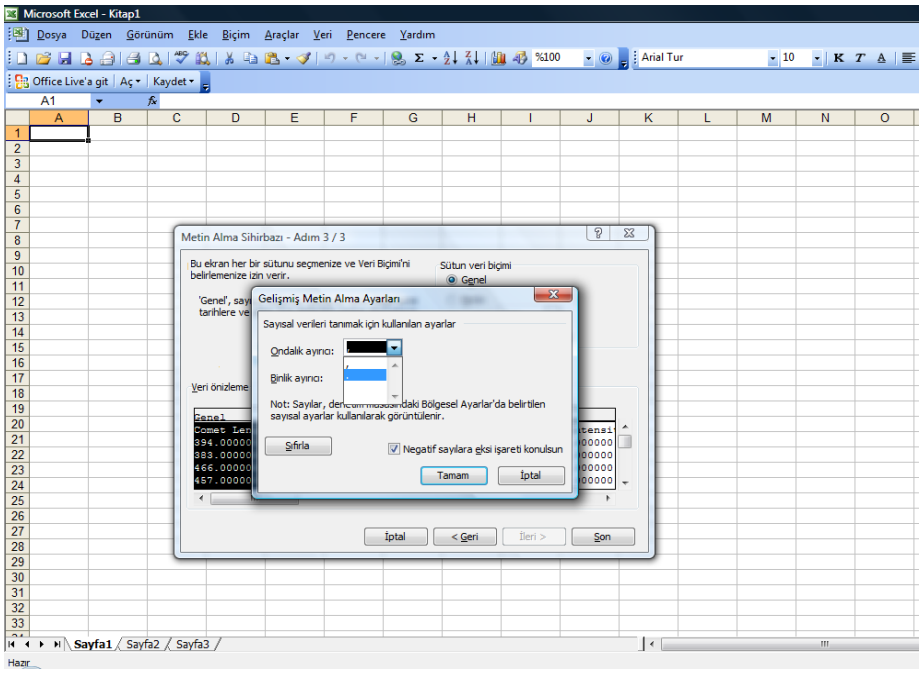
Şekil 24. Hesaplaması yapılmış olan hücrelerin not defteri görüntüsü.



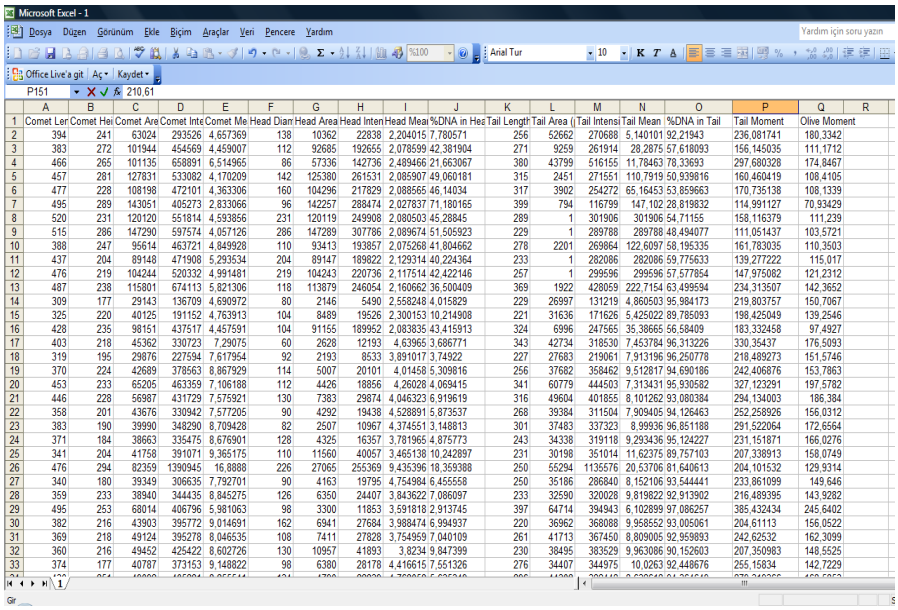
Şekil 25. Not defterinin excell programına aktarımı.



Şekil 26. Ondalık ve binlik ayıraçlarının değiştirilmesinde izlenecek ilk adım.



Şekil 27. Ondalık ve binlik ayıraçlarının değiştirilmesinde izlenecek ikinci adım.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	Comet Ler	Comet Hei	Comet Are	Comet Inte	Comet Me	Head Diam	Head Area	Head Inten	Head Mea	%DNA in Hea	Tail Lengt	Tail Area	Tail Intensi	Tail Mean	%DNA in Tail	Tail Moment	Olive Moment	
2	394	241	63024	293526	4,657369	138	10362	22838	2,204015	7,780571	256	52662	270688	5,140101	92,21943	236,081741	180,3342	
3	383	272	101944	454569	4,459007	112	92685	192655	2,078599	42,381904	271	9259	261914	28,2875	57,618093	156,145035	111,1712	
4	466	265	101135	658891	6,514965	86	57336	142736	2,489466	21,663067	380	43799	516155	11,78463	78,33693	297,680328	174,8467	
5	457	281	127831	533082	4,170209	142	125380	261531	2,085907	49,060181	315	2451	271551	110,7919	50,939816	160,460419	108,4105	
6	477	228	108198	472101	4,363306	160	104296	217829	2,088565	46,14034	317	3902	254272	65,16453	53,859663	170,735138	108,1339	
7	495	289	143051	405273	2,833066	96	142257	288474	2,027837	71,180165	399	794	116799	147,102	28,819832	114,991127	70,93429	
8	520	231	120120	551814	4,593856	231	120119	249908	2,080503	45,28845	289	1	301906	301906	54,71155	158,116379	111,239	
9	515	286	147290	597574	4,057126	286	147289	307786	2,089674	51,505923	229	1	289788	289788	48,494077	111,051437	103,5721	
10	388	247	95614	463721	4,849928	110	93413	193857	2,075268	41,804662	278	2201	269864	122,6097	58,195335	161,783035	110,3503	
11	437	204	89148	471908	5,293534	204	89147	189822	2,129314	40,224364	233	1	282086	282086	59,775633	139,277222	115,017	
12	476	219	104244	520332	4,991481	219	104243	220736	2,117514	42,422146	257	1	299596	299596	57,577854	147,975082	121,2312	
13	487	238	115801	674113	5,821306	118	113879	246054	2,160662	36,500409	369	1922	428059	222,7154	63,499594	234,313507	142,3652	
14	309	177	29143	136709	4,690972	80	2146	5490	2,558248	4,015829	229	26997	131219	4,860503	95,984173	219,803757	150,7067	
15	325	220	40125	191152	4,763913	104	8489	19526	2,300153	10,214908	221	31636	171626	5,425022	89,785093	198,425049	139,2546	
16	428	235	98151	437517	4,457591	104	91155	189952	2,083835	43,415913	324	6996	247565	35,38665	56,58409	183,332458	97,4927	
17	403	218	45362	330723	7,29075	60	2628	12193	4,63965	3,686771	343	42734	318530	7,453784	96,313226	330,35437	176,5093	
18	319	195	29876	227594	7,617954	92	2193	8533	3,891017	3,74922	227	27683	219061	7,913196	96,250778	218,489273	151,5746	
19	370	224	42689	378563	8,867929	114	5007	20101	4,01458	5,309816	256	37682	358462	9,512817	94,690186	242,406876	153,7863	
20	453	233	65205	463359	7,106188	112	4426	18856	4,26028	4,069415	341	60779	444503	7,313431	95,930582	327,123291	197,5782	
21	446	228	56987	431729	7,575921	130	7383	29874	4,046323	6,919619	316	49604	401855	8,101262	93,080384	294,134003	186,384	
22	358	201	43676	330942	7,577205	90	4292	19438	4,528891	5,873537	268	39384	311504	7,909405	94,126463	252,258926	156,0312	
23	383	190	39990	348290	8,709428	82	2507	10967	4,374551	3,148813	301	37483	337323	8,99936	96,851188	291,522064	172,6564	
24	371	184	38663	335475	8,676901	128	4325	16357	3,781965	4,875773	243	34338	319118	9,293436	95,124227	231,151871	166,0276	
25	341	204	41758	391071	9,365175	110	11560	40057	3,465138	10,242897	231	30198	351014	11,62375	89,757103	207,338913	158,0749	
26	476	294	82359	1390945	16,8888	226	27065	255369	9,435396	18,359388	250	55294	1135676	20,53706	81,640613	204,101532	129,9314	
27	340	180	39349	306635	7,792701	90	4163	19795	4,754984	6,455558	250	35186	286840	8,152106	93,544441	233,861099	149,646	
28	359	233	38940	344435	8,845275	126	6350	24407	3,843622	7,086097	233	32590	320028	9,819822	92,913902	216,489395	143,9282	
29	495	253	68014	406796	5,981063	98	3300	11853	3,591818	2,913745	397	64714	394943	6,102899	97,086257	385,432434	245,6402	
30	382	216	43903	395772	9,014691	162	6941	27684	3,988474	6,994937	220	36962	368088	9,958552	93,005061	204,61113	156,0522	
31	369	218	49124	395278	8,046535	108	7411	27828	3,754959	7,040109	261	41713	367450	8,809005	92,959893	242,62532	162,3099	
32	360	216	49452	425422	8,602726	130	10957	41893	3,8234	9,847399	230	38495	383529	9,963086	90,152603	207,350983	148,5525	
33	374	177	40787	373153	9,148822	98	6380	28178	4,416615	7,551326	276	34407	344975	10,0263	92,448676	255,15834	142,7229	

Şekil 28. Not defterinin excell sayfasına aktarılmış son hali.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizinde ve grafiklendirilmesinde SPSS v 15,0 paket programından yararlanılmıştır. Semen hacmi, sperm sayısı, motilite, morfoloji, sağlam DNA oranı (%) ve kuyruk momentine ait ortalama, standart sapma, minmum maksimum değerler ve %95

güven aralığı tanımlayıcı istatistik ile, spermiyogram parametrelerinin karşılıklı ilişkileri ve bu parametrelerin sağlam DNA oranı ve kuyruk momenti ile ilişkisi non-parametrik Spearman korelasyon analizi ile, ikili karşılaştırmalar Mann Whitney testi ile, çoklu karşılaştırmalar ise Kruskal Wallis testi ile analizlenmiştir. Anlamlılık derecesi $p<0,05$ olarak alınmıştır. 0,10 - 0,29 arasındaki "r" değerlerinde anlamlılık derecesi düşük, 0,30 – 0,49 arasındaki "r" değerlerinde anlamlılık derecesi orta, 0,50 – 1,00 arasındaki "r" değerlerinde anlamlılık derecesi yüksek olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Olguların Belirlenmesi ve Analizleri

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı'na ve Ege Üniversitesi Aile Planlaması İnfertilite (Kısırlık) Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne 2008-2010 yılları arasında infertilite şikayeti ile başvuran erkek olgular, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 12.06.2007 tarihli 5 no'lu kararı doğrultusunda çalışmaya alınmıştır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen kriterler esas alınarak yapılan spermiyogram analizleri sonrasında uygun vakalar, onam formu alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Olası bir girişimi engellemek amacı ile oligospermik, teratospermik, astenospermik ve normospermik bireylerden yalnızca semen örneğinde lökosit bulunmayan olgular çalışmaya alınmıştır. Çalışmada, 20 normospermik, 20 oligospermik (18 oligoteratospermik, 2 oligospermik), 20 astenospermik (12 oligoastenoteratospermik, 8 astenoteratospermik) ve 20 teratospermik olgunun sperm DNA hasarı çalışılarak, hesaplanmıştır. Sperm parametreleri ile DNA hasarı arasındaki ilişki değerlendirilmiş olup ayrıca, yukarıda sayılan tüm sperm anomalilerini içeren %85'i kısa kuyruklu olan ve %100 baş anomalisine sahip olan oligoastenoteratospermik bir olgunun mikroenjeksiyonu da gerçekleştirilmiştir. Mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon, klivaj ve gebelik durumu takip edilerek DNA hasarı ile ilişkisi de incelenmiştir.

Makroskobik ve mikroskobik spermiyogram analizi sonucu sayı, motilite, morfoloji açısından uygun olan ve semeninde lökosit bulunmayan olgular çalışmaya alınmıştır. Örnekler spermiyogram özelliklerine göre aşağıdaki şekilde gruplandırılmıştır.

Grup 1 (n=20) : Normospermik grup; sayı, motilite ve morfoloji normal

Grup 2 (n=20) : Teratospermik grup; sayı ve motilite normal, morfoloji bozuk

Grup 3 (n=20): Oligospermik grup; motilite normal, sayı az ve morfoloji bozuk

Grup 4 (n=20): Astenospermik grup; sayı ve motilite az, morfoloji bozuk

Çizelge 1, 2, 3 ve 4'te sırasıyla bütün gruplardaki olgu yaşı, sigara ve alkol kullanıp kullanmadığı, spermiyogram değerleri, sağlam DNA yüzdesi ve kuyruk momenti değerleri verilmiştir.

Çizelge 1. Normospermik Grup- Olgu yaşı, spermiyogram değerleri, sağlam DNA yüzdesi ve kuyruk momenti değerleri.

Olgu No	Yaş	Sigara	Alkol	Semen hacmi (ml)	Sperm Sayısı ($X10^6$)	Motilite (% motil)	Morfoloji (%normal)	Sağlam DNA (%)	Kuyruk Momenti
1	34	+	-	2,0	96	80	12	74,57	**73,85**
2	33	+	-	4,4	98	80	6	77,46	**49,05**
3	28	+	-	2,8	20	60	12	81,50	**79,54**
4	33	-	+	3,0	45	90	8	83,98	**32,00**
5	27	-	-	5,3	72	85	7	85,35	**44,63**
6	31	-	+	2,8	112	70	5	89,10	**27,35**
7	41	-	-	2,5	178	85	6	89,98	**18,46**
8	31	+	+	2,0	75	65	5	93,17	**4,69**
9	35	-	+	3,0	125	90	8	93,80	**8,38**
10	26	-	+	2,6	150	80	10	96,10	**4,49**
11	33	-	+	2,0	90	60	6	96,24	**3,60**
12	32	-	+	2,0	43	60	6	97,84	**4,43**
13	32	-	+	3,0	145	80	5	98,17	**0,62**
14	35	+	-	2,0	177	60	6	98,20	**0,71**
15	35	+	+	1,5	28	80	5	98,23	**2,74**
16	32	-	-	3,8	197	85	6	99,09	**0,00**
17	26	+	+	4,0	31	90	5	99,13	**0,21**
18	35	+	+	10,0	42	90	5	99,27	**0,10**
19	25	-	-	4,9	98	75	8	99,28	**0,00**
20	33	+	+	3,0	93	65	13	99,37	**0,00**

Çizelge 2. Teratospermik Grup- Olgu yaşı, spermiyogram değerleri, sağlam DNA yüzdesi ve kuyruk momenti değerleri.

Olgu No	Yaş	Sigara	Alkol	Semen hacmi (ml)	Sperm Sayısı ($X10^6$)	Motilite (% motil)	Morfoloji (%normal)	Sağlam DNA (%)	Kuyruk Momenti
21	37	+	+	4,9	92	75	3	12,63	**257,39**
22	36	+	+	3,6	34	90	1	14,41	**324,53**
23	40	+	+	1,0	78	55	3	16,49	**187,83**
24	26	-	-	5,5	65	80	2	21,17	**193,38**
25	41	+	-	0,8	110	80	2	37,25	**157,60**
26	37	-	+	2,5	52	60	1	45,99	**27,23**
27	38	+	+	2,5	24	70	3	47,44	**60,00**
28	27	+	+	3,4	32	65	2	51,24	**49,66**
29	31	+	+	1,0	28	60	3	52,40	**44,38**
30	36	+	-	3,0	92	65	2	60,55	**115,90**
31	39	+	+	2,8	20	85	1	76,40	**19,55**
32	39	-	-	4,3	83	80	3	85,85	**56,17**
33	43	-	-	2,0	154	90	2	86,13	**41,50**
34	33	+	-	3,0	43	90	2	91,97	**2,94**
35	35	+	-	2,8	30	60	1	94,71	**14,97**
36	39	+	-	1,4	65	90	4	97,36	**2,40**
37	39	-	-	4,0	22	85	1	98,02	**2,37**
38	28	-	-	2,2	65	90	2	98,09	**0,04**
39	38	-	-	6,0	50	70	3	98,88	**1,71**
40	32	-	-	1,8	89	80	1	99,33	**1,46**

Çizelge 3. Oligospermik Grup - Olgu yaşı, spermiyogram değerleri, sağlam DNA yüzdesi ve kuyruk momenti değerleri.

Olgu No	Yaş	Sigara	Alkol	Semen hacmi (ml)	Sperm Sayısı ($X10^6$)	Motilite (% motil)	Morfoloji (%normal)	Sağlam DNA (%)	Kuyruk Momenti
41	41	+	+	5,0	1,0	60	0	4,09	**297,50**
42	26	+	-	2,5	0,9	70	0	11,08	**159,62**
43	31	+	+	3,2	16,0	60	3	12,20	**201,26**
44	29	-	-	4,8	15,0	75	2	33,20	**76,80**
45	32	+	-	2,2	12,0	55	2	36,42	**183,18**
46	33	+	-	2,2	7,0	60	2	39,28	**160,89**
47	27	-	-	1,8	8,0	55	2	39,66	**67,10**
48	40	+	+	2,0	6,0	67	1	42,15	**115,26**
49	35	-	-	2,2	7,0	55	3	45,96	**10,54**
50	32	-	-	5,8	8,0	80	0	50,97	**84,48**
51	32	+	-	2,0	9,0	60	1	51,72	**57,20**
52	43	-	-	3,0	5,0	80	1	59,93	**29,81**
53	38	-	-	3,8	15,0	70	1	60,71	**51,42**
54	38	+	-	1,1	13,0	90	5	61,86	**56,54**
55	34	-	+	4,0	12,0	80	5	62,51	**32,14**
56	29	+	+	4,0	1,0	80	0	76,71	**45,18**
57	36	-	-	6,5	4,0	90	0	80,14	**97,85**
58	29	-	-	3,0	5,0	90	3	82,76	**22,92**
59	32	-	-	2,8	7,0	70	4	96,57	**10,92**
60	30	-	-	2,5	5,0	90	2	98,38	**1,73**

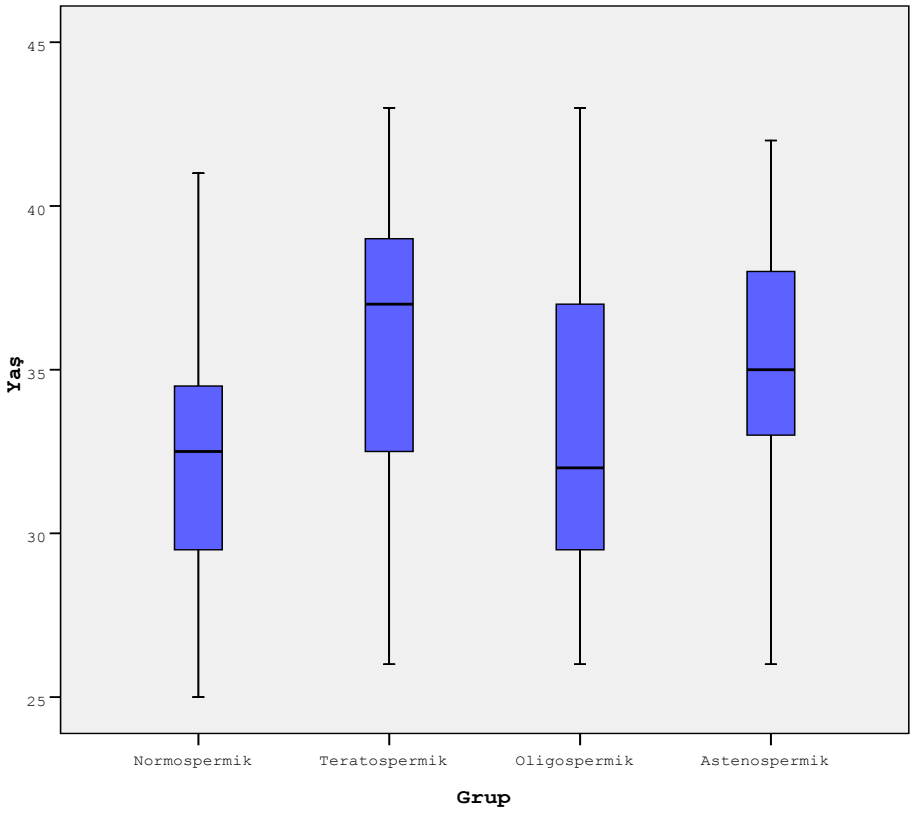
Çizelge 4. Astenospermik Grup - Olgu yaşı, spermiyogram değerleri, sağlam DNA yüzdesi ve kuyruk momenti değerleri.

Olgu No	Yaş	Sigara	Alkol	Semen hacmi (ml)	Sperm Sayısı ($X10^6$)	Motilite (% motil)	Morfoloji (%normal)	Sağlam DNA (%)	Kuyruk Momenti
61	38	-	-	3,0	0,6	10	0	8,70	**78,49**
62	42	+	+	3,0	6,0	50	0	13,95	**38,00**
63	33	+	-	2,8	27,0	12	0	15,11	**127,13**
64	42	+	-	2,1	4,0	40	0	15,20	**32,63**
65	26	-	-	2,0	34,0	35	2	15,35	**88,34**
66	41	-	-	4,6	6,0	50	2	15,40	**128,90**
67	34	+	+	4,0	6,0	50	1	17,54	**210,61**
68	34	+	-	2,4	76,0	40	1	24,55	**127,45**
69	38	+	-	2,8	5,0	50	1	29,29	**81,18**
70	33	+	-	2,6	42,0	10	2	30,00	**84,67**
71	36	+	-	2,8	47,0	2	3	33,28	**93,27**
72	39	+	-	2,0	15,0	10	0	40,85	**63,31**
73	34	+	-	5,5	4,0	50	1	41,65	**80,90**
74	37	-	-	5,8	11,0	10	0	59,74	**124,56**
75	38	+	-	3,5	6,0	50	1	93,32	**11,69**
76	26	-	-	2,4	11,0	50	0	96,26	**2,12**
77	31	+	-	1,2	74,0	40	2	97,18	**15,45**
78	27	-	-	3,5	10,0	40	0	97,73	**3,42**
79	35	+	+	2,0	45,0	20	2	98,34	**3,13**
80	47	-	-	2,0	50,0	50	2	98,37	**0,28**

Çalışmaya alınan 80 olguya ait toplam ortalama yaş değeri 34,11 ± 4,93 olarak saptanmıştır. Normospermik grupta ortalama yaş değeri 31,85 ± 3,90, teratospermik grupta 35,70 ± 4,76, oligospermik grupta 33,35 ± 4,73, astenospermik grupta ise 35,55 ± 5,49 olarak saptanmıştır. Bu analizlere ait veriler çizelge 5'te ve şekil 29'da verilmiştir. Gruplar arasındaki yaş farkı anlamlı olup ($p<0,05$), bu fark normospermik grup ile astenospermik ($p<0,05$) grup ve teratospermik grup ($p<0,05$) arasındaki yaş farkından kaynaklanmaktadır. Diğer gruplar arasında anlamlı bir yaş farkı bulunmamaktadır.

Çizelge 5. Gruplardaki ortalama yaş değerleri ve %95 güven aralığı.

				Ortalama için % 95 güven aralığı			
	N	Ortalama	Standart sapma	Alt sınır	Üst sınır	Minimum	Maksimum
Normospermik	20	31,85	3,90	30,03	33,67	25	41
Teratospermik	20	35,70	4,76	33,47	37,93	26	43
Oligospermik	20	33,35	4,73	31,14	35,56	26	43
Astenospermik	20	35,55	5,49	32,98	38,12	26	47
Toplam	**80**	**34,11**	**4,93**	**33,01**	**35,21**	**25**	**47**

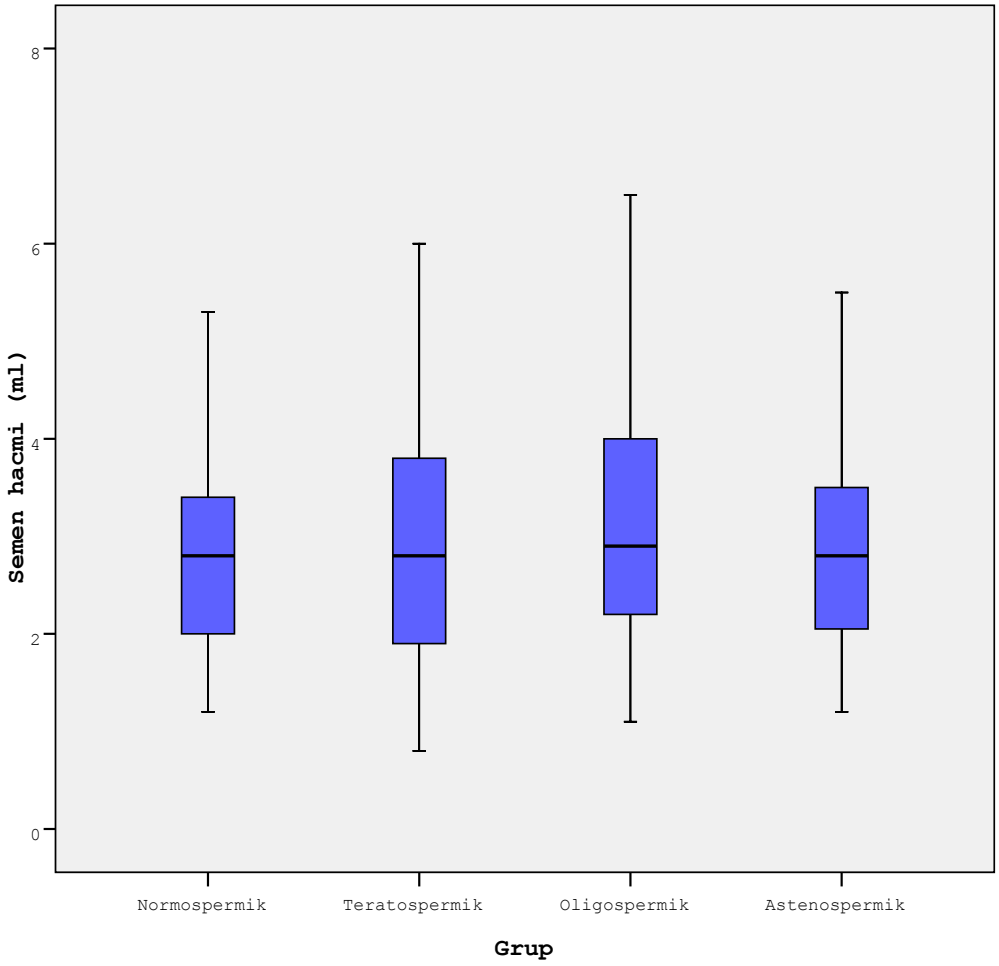


Şekil 29. Gruplara ait ortalama yaş değerlerinin grafiksel gösterimi.

Ortalama semen hacmi (ml) normospermik grupta 3,26 ± 1,95, teratospermik grupta 2,93 ± 1,47, oligospermik grupta 3,23 ± 1,42, astenospermik grupta ise 3,00 ± 1,20 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 6, Şekil 30). Gruplar arasında semen hacmi açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Çizelge 6. Gruplara ait ortalama semen hacmi değerleri ve %95 güven aralığı.

				Ortalama için % 95 güven aralığı			
	N	Ortalama	Standart sapma	Alt sınır	Üst sınır	Minimum	Maksimum
Normospermik	20	3,26	1,95	2,34	4,17	1,20	10,00
Teratospermik	20	2,93	1,47	2,24	3,61	0,80	6,00
Oligospermik	20	3,23	1,42	2,56	3,89	1,10	6,50
Astenospermik	20	3,00	1,20	2,44	3,56	1,20	5,80
Toplam	**80**	**3,10**	**1,51**	**2,77**	**3,44**	**0,80**	**10,00**

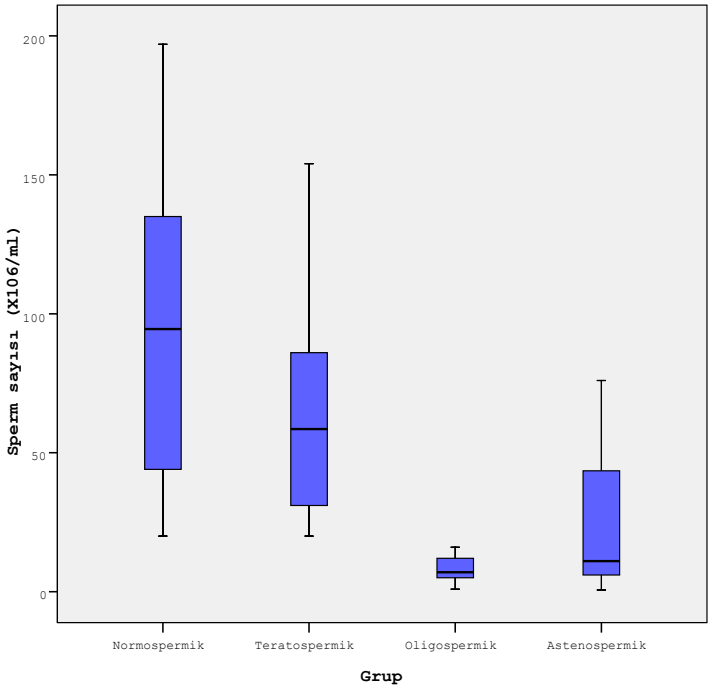


Şekil 30. Gruplardaki ortalama semen hacmi değerleri.

Ortalama sperm sayısı ($X10^6$/ml) ise normospermik grupta 95,75 ± 53,27, teratospermik grupta 61,40 ± 35,01, oligospermik grupta 7,85 ± 4,69, astenospermik grupta ise 23,98 ± 23,95 olarak bulunmuştur (Çizelge 7, Şekil 31). Gruplar arasındaki sperm sayıları karşılaştırıldığında normospermik grup ile teratospermik grup arasında anlamlı ($p<0,05$), normospermik grup ile oligospermik grup arasında anlamlı ($p<0,001$), normospermik grup ile astenospermik grup arasında anlamlı ($p<0,001$), teratospermik grup ile oligospermik grup arasında anlamlı ($p<0,001$) ve teratospermik grup ile astenospermik grup arasında anlamlı ($p<0,001$) fark saptanmıştır. Oligospermik grup ile astenospermik grup arasında ise anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Çizelge 7. Gruplara ait ortalama sperm sayısı değerleri ve %95 güven aralığı.

				Ortalama için %95 güven aralığı			
	N	Ortalama	Standart sapma	Alt sınır	Üst sınır	Minimum	Maksimum
Normospermik	20	95,75	53,27	70,82	120,68	20,00	197,00
Teratospermik	20	61,40	35,01	45,01	77,79	20,00	154,00
Oligospermik	20	7,85	4,69	5,65	10,04	0,90	16,00
Astenospermik	20	23,98	23,95	12,77	35,19	0,60	76,00
Toplam	**80**	**47,24**	**47,93**	**36,58**	**57,91**	**0,60**	**197,00**

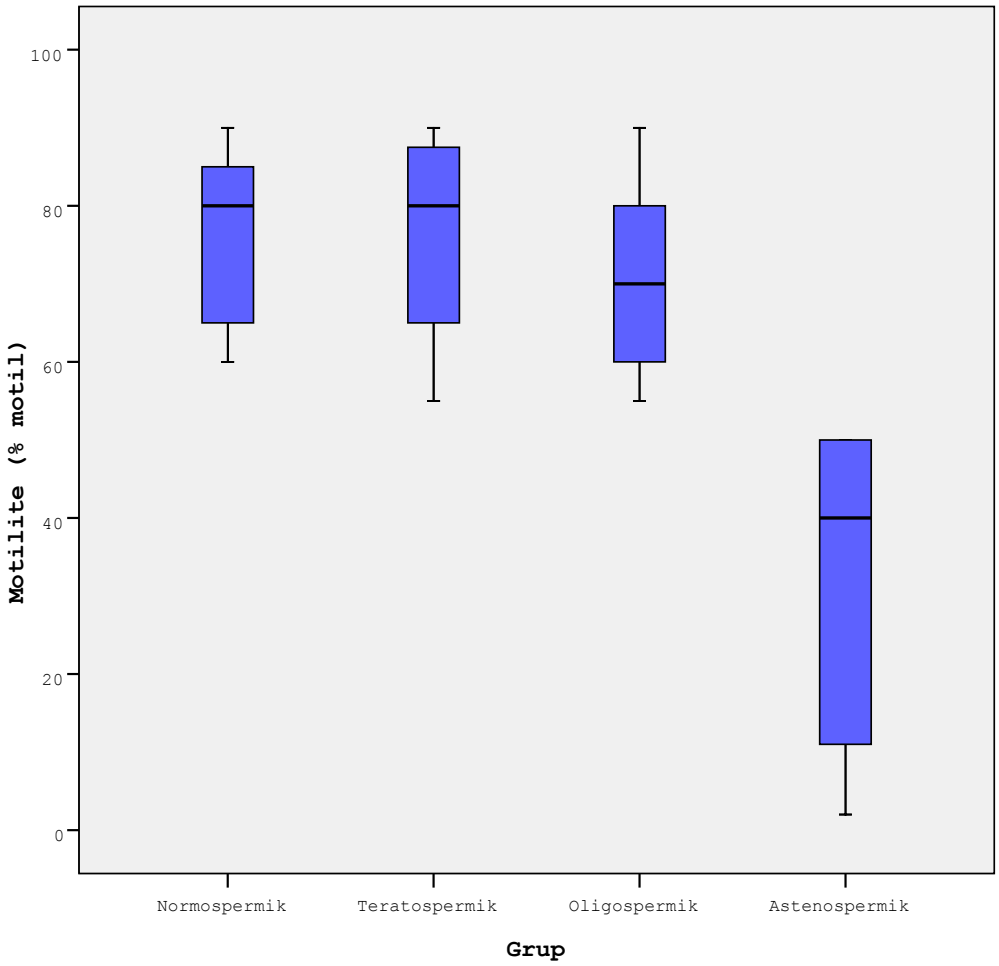


Şekil 31. Gruplardaki ortalama sperm sayılarını gösteren grafik.

Gruplara özgü ortalama motilite değerleri (% motil) ve %95 güven aralığı Çizelge 8 ve Şekil 32'de verilmiştir. Astenospermik gruptaki motilite değerleri diğer gruplardan anlamlı ($p<0,05$) derecede daha düşüktür.

Çizelge 8. Gruplara özgü ortalama motilite değerleri ve %95 güven aralığı.

	N	Ortalama	Standart sapma	Ortalama için %95 güven aralığı		Minimum	Maksimum
				Alt sınır	Üst sınır		
Normospermik	20	76,50	11,25	71,23	81,77	60	90
Teratospermik	20	76,00	11,99	70,39	81,61	55	90
Oligospermik	20	71,85	12,65	65,93	77,77	55	90
Astenospermik	20	33,45	18,06	25,00	41,90	2	50
Toplam	**80**	**64,45**	**22,57**	**59,43**	**69,47**	**2**	**90**

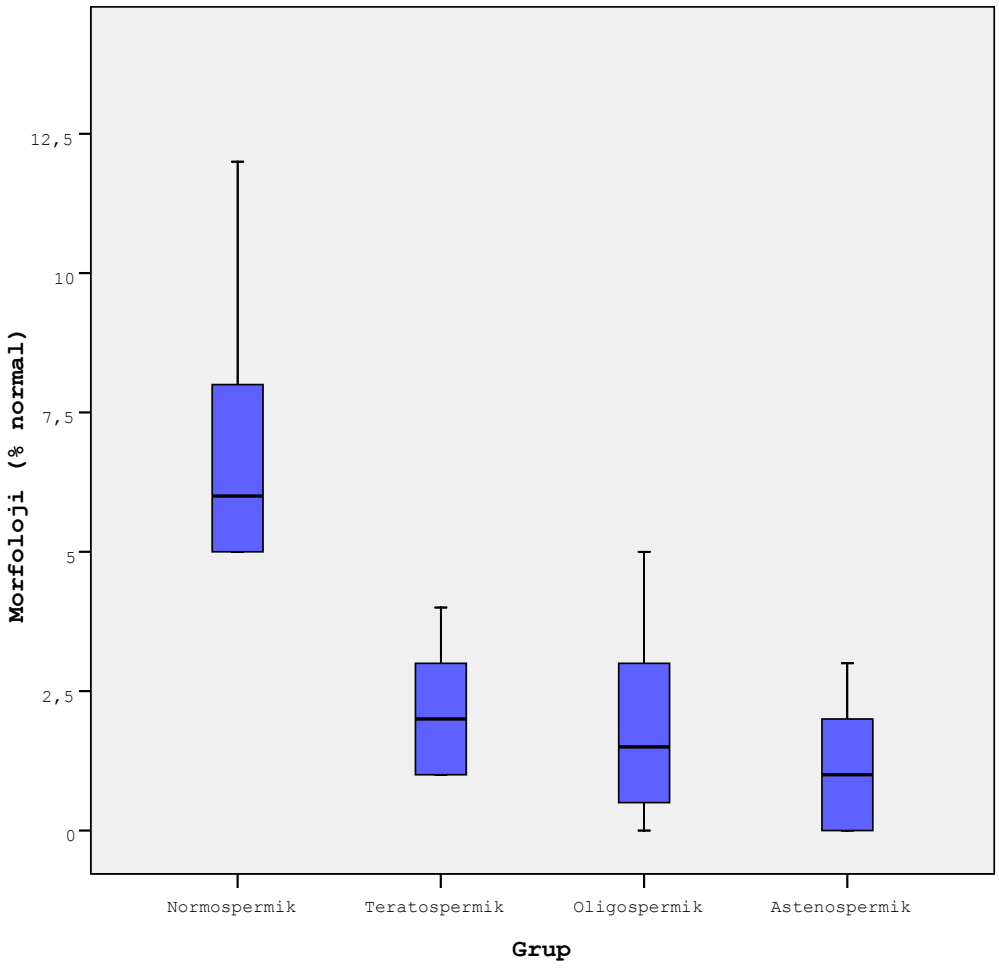


Şekil 32. Gruplara özgü ortalama motilite değerlerini gösteren grafik.

Gruplara özgü ortalama morfoloji değerleri (%normal) ve %95 güven aralığı Çizelge 9 ve Şekil 33'te verilmiştir. Normospermik gruba ait morfolojik değerler diğer gruplardan anlamlı derecede ($p<0,05$) farklıdır. Bu gruptaki bireylerde bulunan normal morfolojili sperm sayısı diğer gruplardakine göre daha fazladır.

Çizelge 9. Gruplara ait ortalama morfoloji değerleri ve %95 güven aralığı.

	N	Ortalama	Standart sapma	Ortalama için %95 güven aralığı		Minimum	Maksimum
				Alt sınır	Üst sınır		
Normospermik	20	7,20	2,59	5,99	8,41	5	13
Teratospermik	20	2,10	0,91	1,67	2,53	1	4
Oligospermik	20	1,80	1,61	1,05	2,55	0	5
Astenospermik	20	1,00	0,97	0,54	1,46	0	3
Toplam	**80**	**3,03**	**2,95**	**2,37**	**3,68**	**0**	**13**

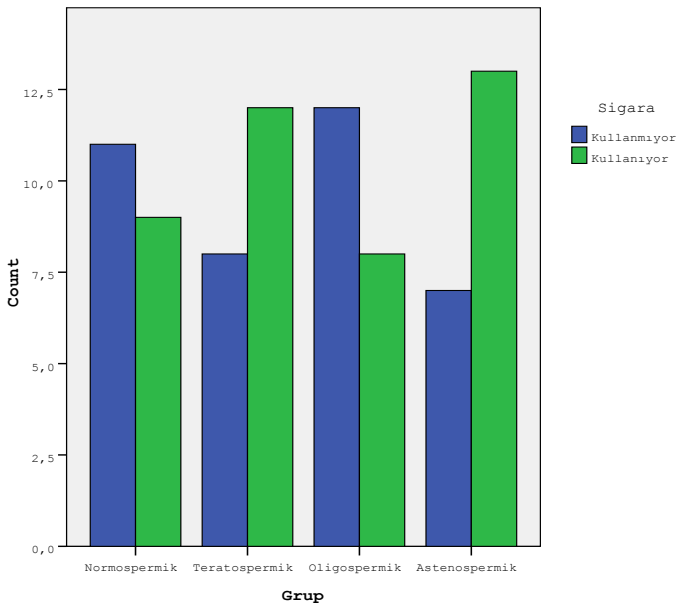


Şekil 33. Gruplara ait ortalama morfoloji değerlerini gösteren grafik.

Gruplara özgü ortalama yaş, semen hacmi, sperm sayısı, motilite ve morfoloji değerleri hesaplandıktan sonra, her bir grup kendi içerisinde incelenerek sigara kullananlarla kullanmayanların spermiyogram değerlerinde anlamlı bir farkın bulunup bulunmadığına bakılmıştır. Çizelge 10 ve Şekil 34'te her grupta sigara kullananlar ve kullanmayanların sayıları ve yüzdeleri gösterilmiştir. Analiz sonucunda sigara içenler ile içmeyenlerin spermiyogram parametreleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çizelge 10. Her bir gruptaki sigara içen ve içmeyenlerin sayısı ve bunların yüzdeleri.

		Sigara		
		Kullanmıyor	Kullanıyor	Toplam
Normospermik	N	11	9	20
	%	28,95	21,43	25,00
Teratospermik	N	8	12	20
	%	21,05	28,57	25,00
Oligospermik	N	12	8	20
	%	31,58	19,05	25,00
Astenospermik	N	7	13	20
	%	18,42	30,95	25,00
Toplam	N	38	42	80
	%	100,00	100,00	100,00

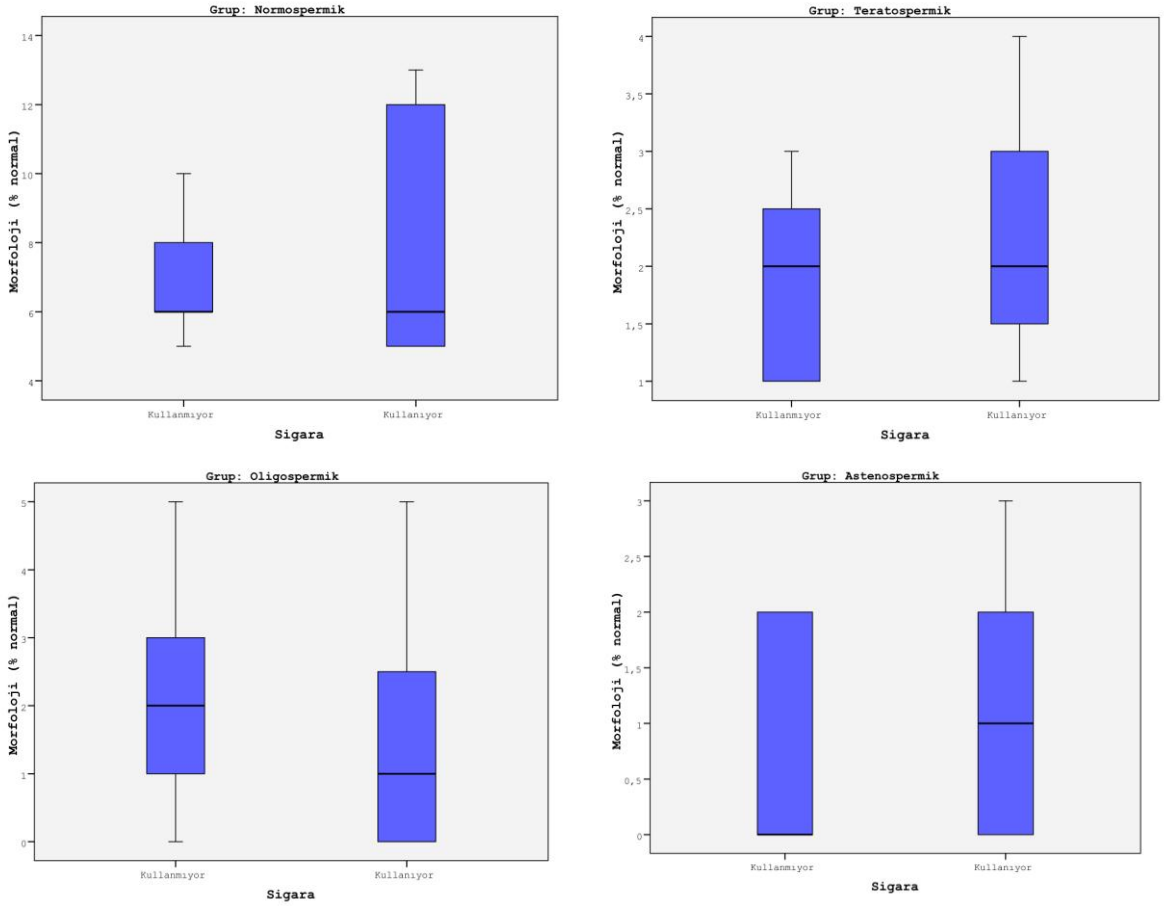


Şekil 34. Gruplardaki sigara içenlerin ve içmeyenlerin sayısını gösteren grafik.

Gruplar arasında sigara kullananlar ile kullanmayanların morfolojileri karşılaştırıldığında ise, anlamlı fark (p< 0,001) saptanmış olup, analize ait veriler Çizelge 11ve Şekil 35'te gösterilmiştir.

Çizelge 11. Sigara içenler ile içmeyenlerin morfolojik açıdan karşılaştırılması.

Grup	Sigara	N	Ortalama	Standart sapma
Normospermik	Kullanmıyor	11	6,82	1,54
	Kullanıyor	9	7,67	3,54
	Toplam	20	7,20	2,59
Teratospermik	Kullanmıyor	8	1,88	0,83
	Kullanıyor	12	2,25	0,97
	Toplam	20	2,10	0,91
Oligospermik	Kullanmıyor	12	2,00	1,54
	Kullanıyor	8	1,50	1,77
	Toplam	20	1,80	1,61
Astenospermik	Kullanmıyor	7	0,86	1,07
	Kullanıyor	13	1,08	0,95
	Toplam	20	1,00	0,97
Toplam	Kullanmıyor	38	3,16	2,73
	Kullanıyor	42	2,90	3,17
	Toplam	80	3,03	2,95



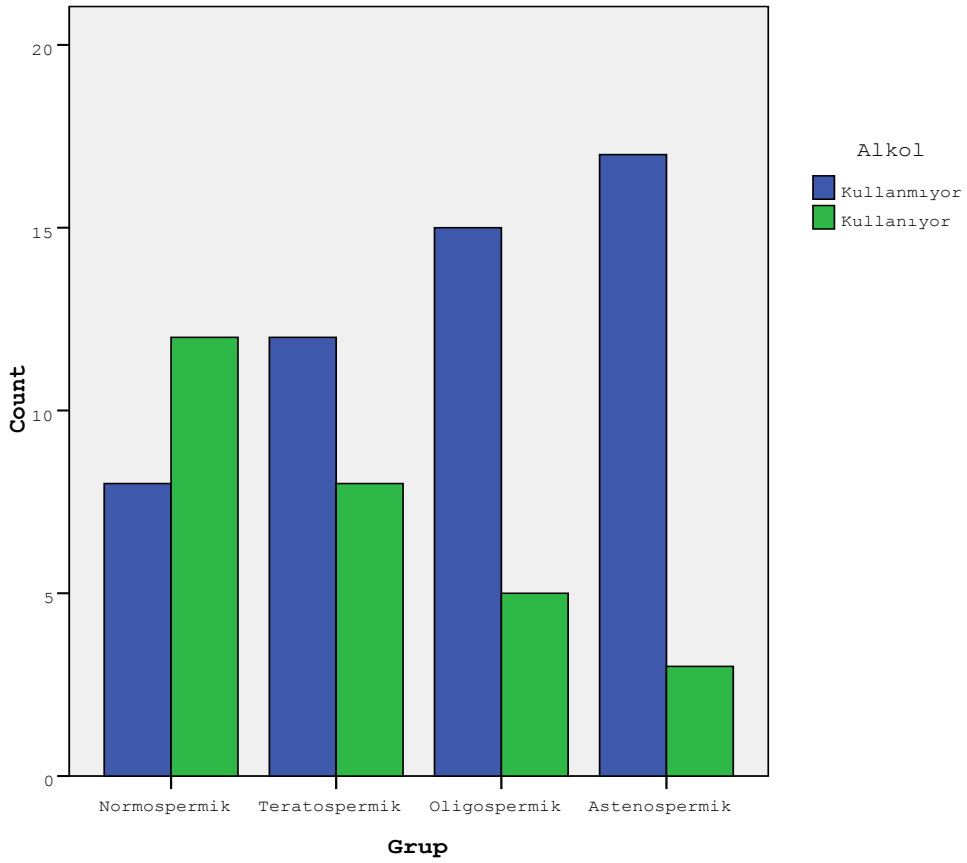
Şekil 35. Sigara içenler ile içmeyenlerin morfolojik açıdan karşılaştırılmasını gösteren grafik.

Her bir grup kendi içerisinde incelendiğinde alkol kullananlar ile kullanmayanların spermiyogram parametreleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Gruplar arasında alkol kullananlar ile kullanmayanların morfolojileri karşılaştırıldığında ise $p< 0,001$ düzeyinde anlamlı fark saptanmıştır. Bu gruba ait veriler Çizelge 12, Çizelge 13, Şekil 36 ve Şekil 37'de verilmiştir.

Çizelge 12. Gruplardaki alkol kullananların ve kullanmayanların sayıları ile yüzdeleri.

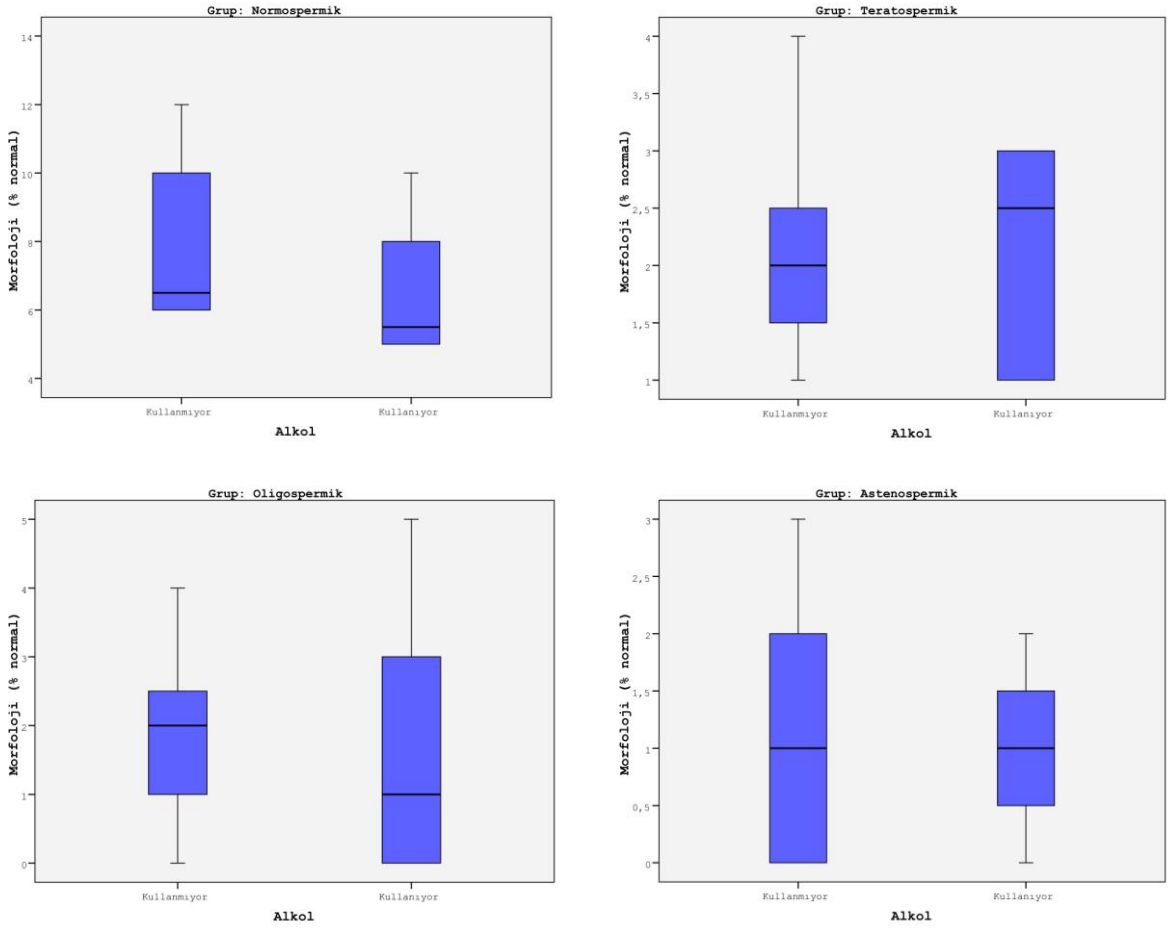
		Alkol		
		Kullanmıyor	Kullanıyor	Toplam
Normospermik	n	8	12	20
	%	15,38	42,86	25,00
Teratospermik	n	12	8	20
	%	23,08	28,57	25,00
Oligospermik	n	15	5	20
	%	28,85	17,86	25,00
Astenospermik	n	17	3	20
	%	32,69	10,71	25,00
Toplam	n	52	28	80
	%	100,00	100,00	100,00



Şekil 36. Gruplardaki alkol kullananların ve kullanmayanların sayısını gösteren grafik.

Çizelge 13. Alkol kullananlar ile kullanmayanların morfolojik açıdan karşılaştırılması.

Grup	Alkol	N	Ortalama	Standart sapma
Normospermik	Kullanmıyor	8	7,88	2,64
	Kullanıyor	12	6,75	2,56
	Toplam	20	7,20	2,59
Teratospermik	Kullanmıyor	12	2,08	0,90
	Kullanıyor	8	2,13	0,99
	Toplam	20	2,10	0,91
Oligospermik	Kullanmıyor	15	1,80	1,47
	Kullanıyor	5	1,80	2,17
	Toplam	20	1,80	1,61
Astenospermik	Kullanmıyor	17	1,00	1,00
	Kullanıyor	3	1,00	1,00
	Toplam	20	1,00	0,97
Toplam	Kullanmıyor	52	2,54	2,74
	Kullanıyor	28	3,93	3,16
	Toplam	80	3,03	2,95



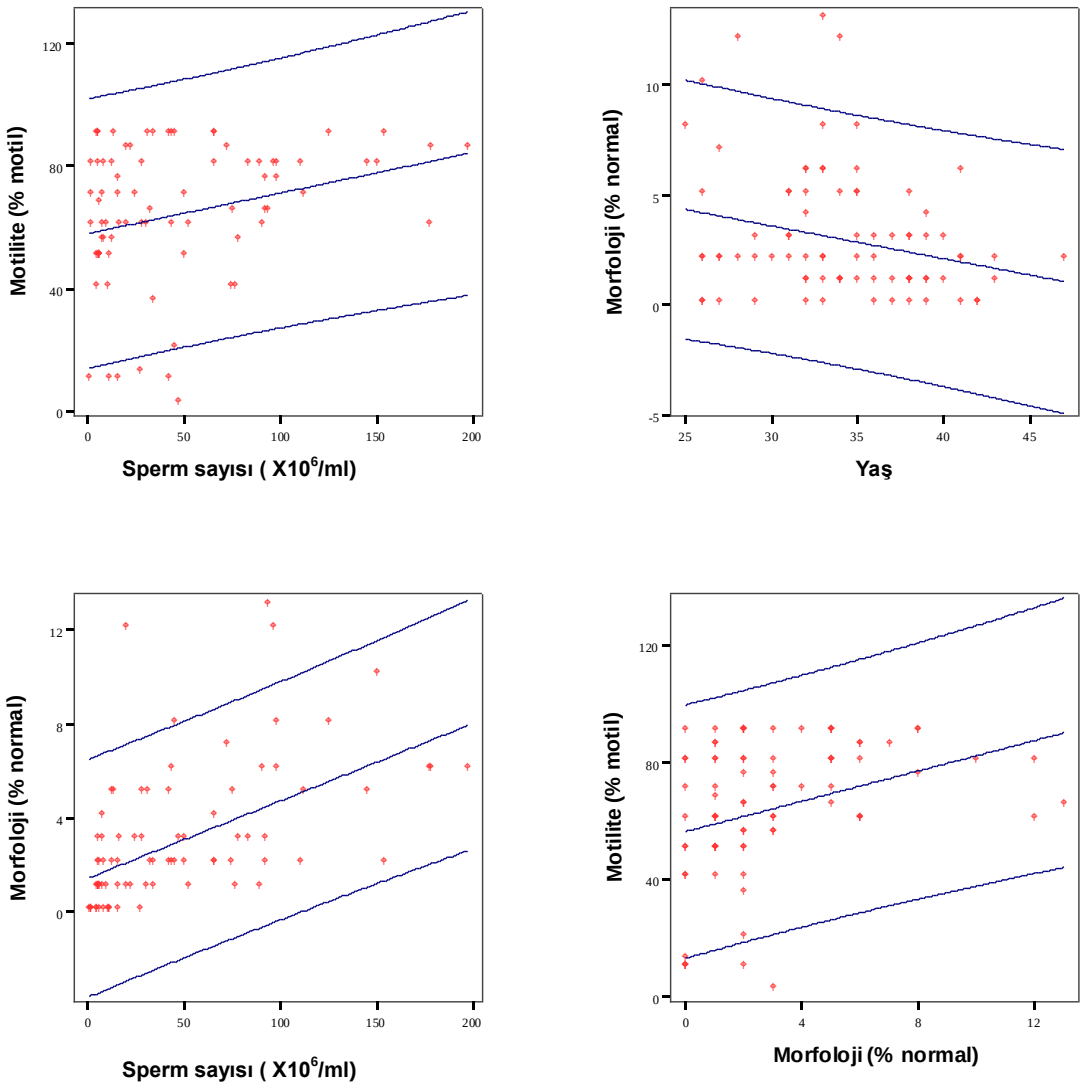
Şekil 37. Alkol kullananlar ile kullanmayanların morfolojik karşılaştırılmasını gösteren grafik

Spermiyogram parametrelerinin birbirleri ile karşılıklı etkileşimleri incelendiğinde; motilitenin sperm sayısı ile düşük düzeyde pozitif anlamlı ilişki ($p<0,05$) gösterdiği, morfolojinin ise yaş ile düşük düzeyde negatif anlamlı ilişki ($p<0,05$), sperm sayısı ile yüksek düzeyde pozitif anlamlı ilişki ($p<0,001$) ve motilite ile de orta düzeyde ($p<0,001$) pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 14, Şekil 38).

Çizelge 14. Spermiyogram parametrelerinin karşılıklı ilişkileri.

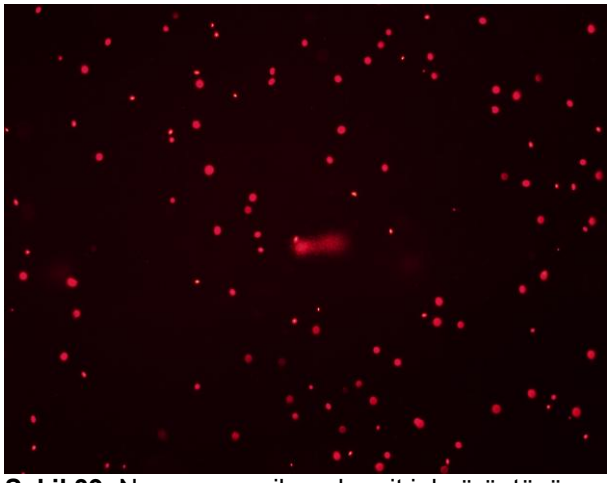
		Yaş	Semen hacmi (ml)	Sperm sayısı ($X10^6$/ml)	Motilite (%motil)	Morfoloji (%normal)
Yaş	R	1				
	P (çift taraflı)					
	N	80,00				
Semen hacmi (ml)	R	-0,06	1,00			
	P (çift taraflı)	0,59				
	N	80,00	80,00			
Sperm sayısı ($X10^6$/ml)	R	-0,07	-0,19	1,00		
	P (çift taraflı)	0,56	0,09			
	N	80,00	80,00	80,00		
Motilite (% motil)	R	-0,07	0,20	0,27*	1	
	P (çift taraflı)	0,52	0,08	0,02		
	N	80,00	80,00	80	80	
Morfoloji (%normal)	R	-0,23*	-0,12	0,648**	0,39**	1
	P (çift taraflı)	0,04	0,31	0,000001	0,00041	
	N	80,00	80,00	80	80	80

**Korelasyon 0.05 düzeyinde (çift taraflı) anlamlı.*
***Korelasyon 0.01 düzeyinde (çift taraflı) anlamlı.*

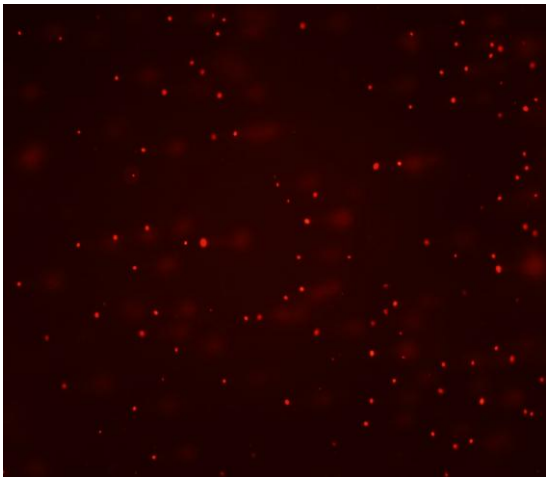


Şekil 38. Spermiyogram parametrelerinin karşılıklı ilişkisini ve %95 güven aralığını gösteren grafik.

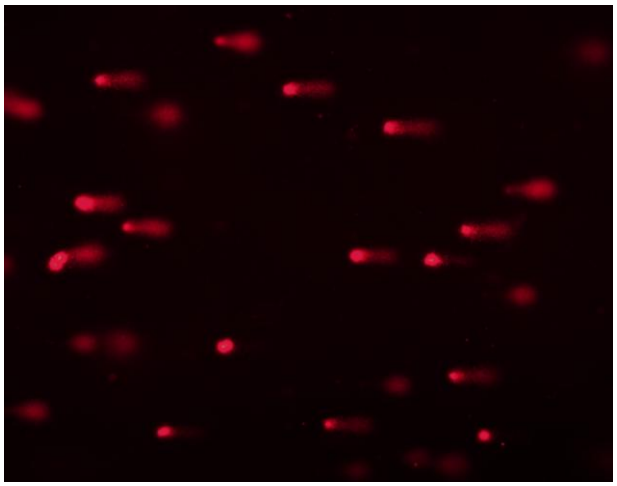
80 olguya ait DNA hasarı COMET ASSAY ile çalışılmıştır. Her gruba ait bir adet jel görüntüsü aşağıda verilmiştir (Şekil 39 - 42).



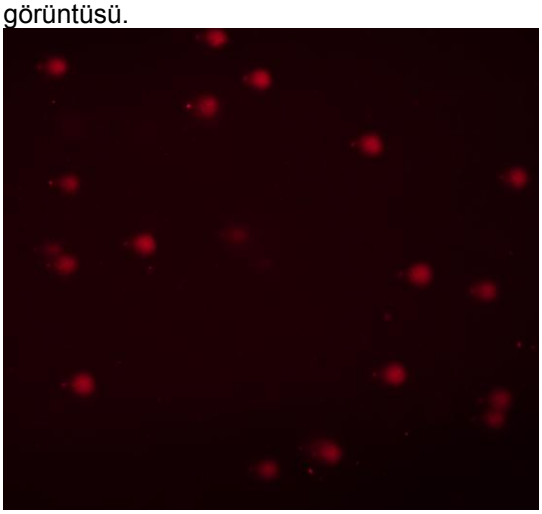
Şekil 39. Normospermik gruba ait jel görüntüsü.



Şekil 40. Teratospermik gruba ait jel görüntüsü.



Şekil 41. Oligospermik gruba ait jel görüntüsü.

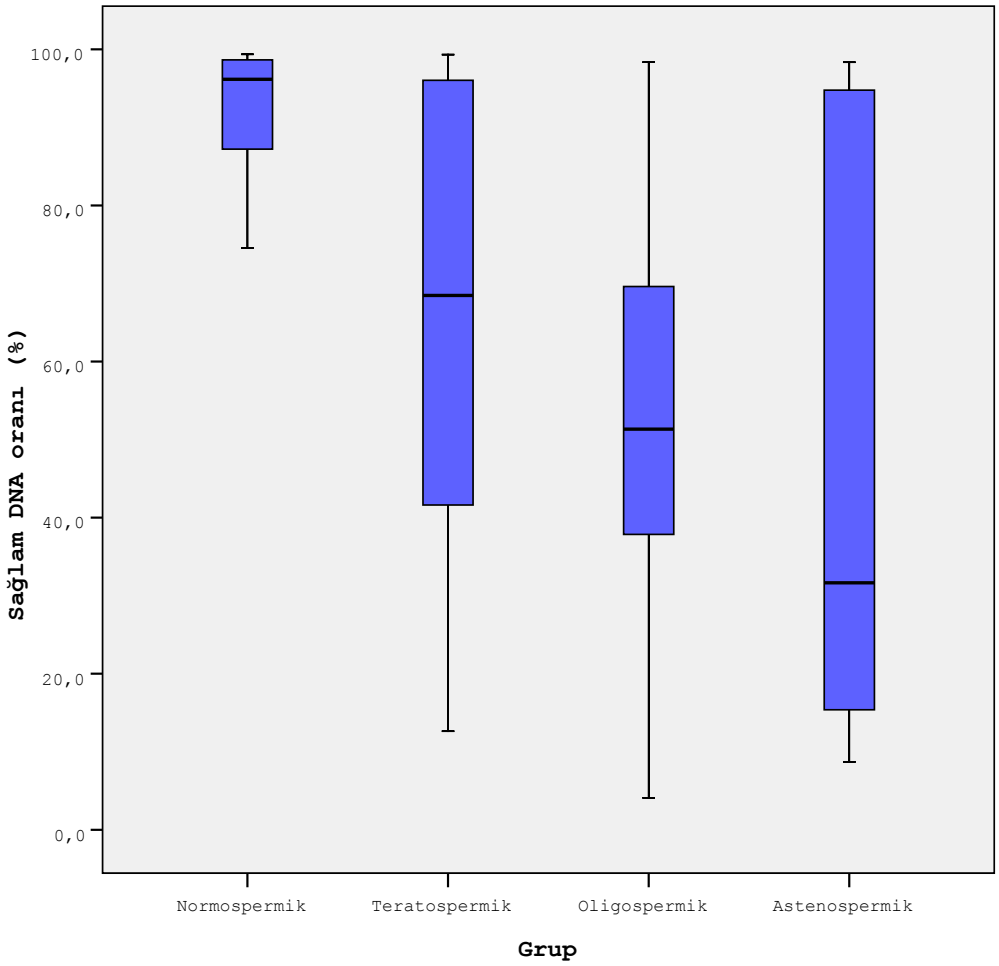


Şekil 42. Astenospermik gruba ait jel görüntüsü.

Sağlam DNA oranları hesaplanırken "Baş bölgesindeki % DNA" parametresi, DNA hasarları hesaplanırken ise "Kuyruk Momenti" parametresi dikkate alınarak istatistiksel incelemeler yapılmıştır. Toplam ortalama sağlam DNA yüzdesi 64,05 ± 32,37 olup bu değer normospermik grupta 92,49 ± 7,92, teratospermik grupta 64,32 ± 32,08, oligospermik grupta 52,32 ± 26,59, astenospermik grupta ise 47,09 ± 34,48 olarak hesaplanmıştır. Bu analizlere ait veriler çizelge 15'te ve şekil 43'de sunulmuştur. Sağlam DNA oranları (%) ($p<0,005$) ve Kuyruk Momenti ($p<0,05$) açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmaktadır. Normospermik gruptaki sağlam DNA oranı (%) diğer grupların hepsinden anlamlı olarak ($p<0,005$) daha büyük olup bu gruba ait Kuyruk Momentleri de diğer gruplardan anlamlı derecede ($p<0,05$) daha küçüktür.

Çizelge 15. Gruplardaki yüzde sağlam DNA değerlerinin ortalaması ve %95 güven aralığı.

	N	Ortalama	Standart sapma	Ortalama için %95 güven aralığı		Minimum	Maksimum
				Alt sınır	Üst sınır		
Normospermik	20	92,49	7,92	88,78	96,20	74,57	99,37
Teratospermik	20	64,32	32,08	49,30	79,33	12,63	99,33
Oligospermik	20	52,32	26,59	39,87	64,76	4,09	98,38
Astenospermik	20	47,09	35,48	30,49	63,70	8,70	98,37
Toplam	80	64,05	32,37	56,85	71,26	4,09	99,37



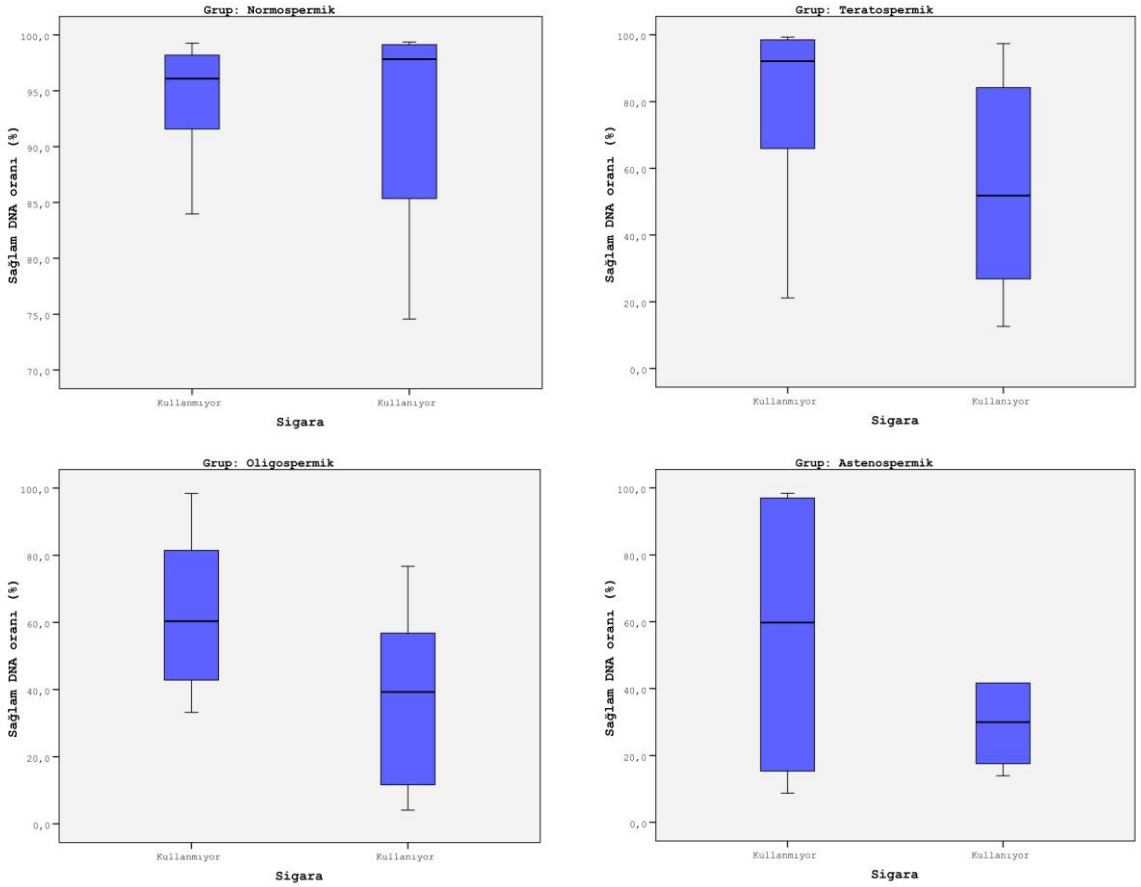
Şekil 43. Gruplardaki ortalama sağlam DNA oranının (%) grafiksel gösterimi.

Sigara kullanımının gruplardaki ortalama sağlam DNA yüzdelerini nasıl etkilediği incelenmiş ve bu analizlere ait tablolar ve şekiller aşağıda

gösterilmiştir (Çizelge 16, Şekil 44). Normospermik grupta, teratospermik grupta ve astenospermik grupta sigara içenler ile içmeyenlerin sağlam DNA oranları (%) arasında anlamlı bir fark yoktur. Oligospermik grupta ise sigara içmeyenlerin sağlam DNA oranları (%) anlamlı derecede ($p<0,05$) daha büyük, Kuyruk Momentleri ise anlamlı derecede ($p<0,05$) daha küçüktür.

Çizelge 16. Sigara içenlerde ve içmeyenlerde ortalama sağlam DNA yüzdeleri.

Grup	Sigara	N	Ortalama	Standart sapma
Normospermik	Kullanmıyor	11	93,59	6,08
	Kullanıyor	9	91,14	9,95
	Toplam	20	92,49	7,92
Teratospermik	Kullanmıyor	8	79,18	29,44
	Kullanıyor	12	54,40	30,96
	Toplam	20	64,32	32,08
Oligospermik	Kullanmıyor	12	62,51	22,37
	Kullanıyor	8	37,03	26,21
	Toplam	20	52,32	26,59
Astenospermik	Kullanmıyor	7	55,94	42,25
	Kullanıyor	13	42,33	32,10
	Toplam	20	47,09	35,48
Toplam	Kullanmıyor	38	73,81	28,93
	Kullanıyor	42	55,23	33,11
	Toplam	80	64,05	32,37

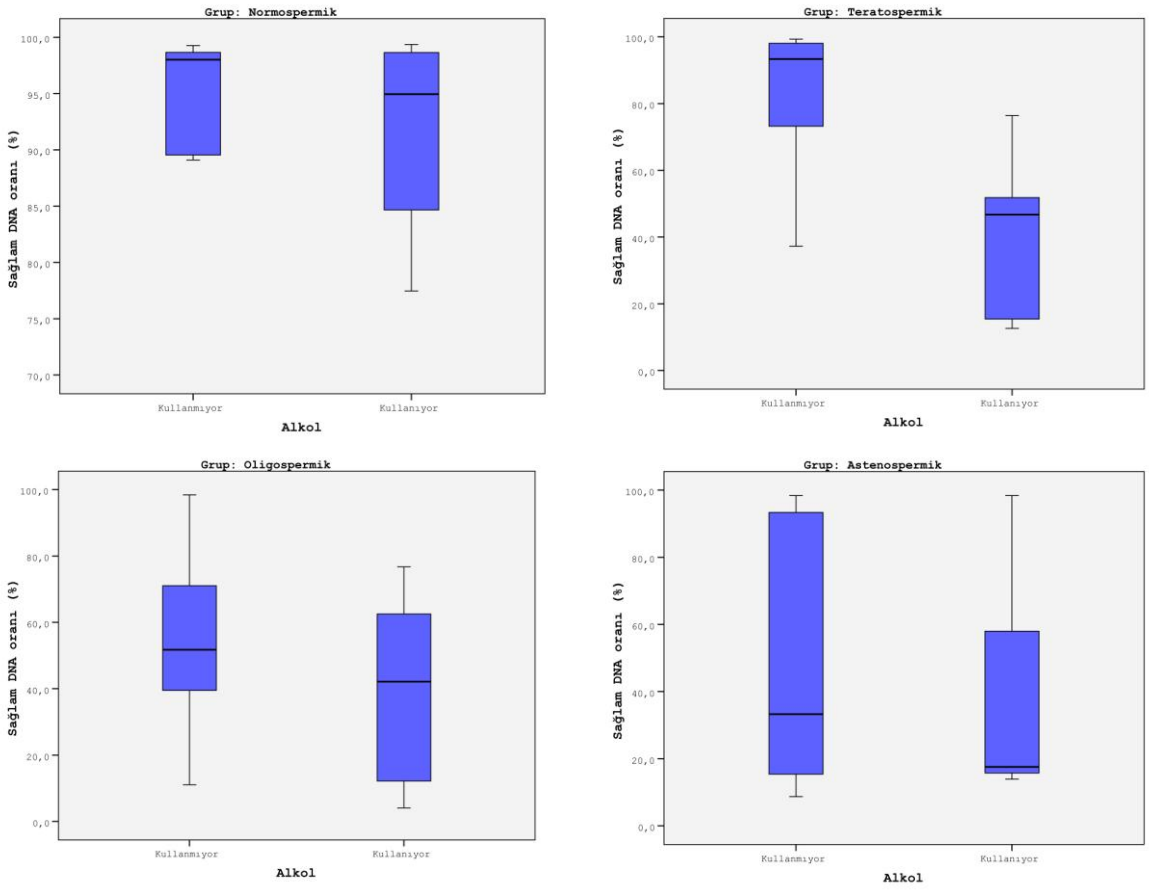


Şekil 44. Sigara kullananların ve kullanmayanların ortalama sağlam DNA yüzdelerinin grafiksel gösterimi.

Alkol kullananlardaki ortalama sağlam DNA yüzdeleri ile kullanmayanların ortalama sağlam DNA yüzdeleri aşağıdaki Çizelge 17'de ve Şekil 45'te verilmiştir. Her grup kendi içerisinde incelendiğinde normospermik grupta, oligospermik grupta ve astenospermik grupta alkol kullananlar ile kullanmayanların sağlam DNA oranları (%) arasında anlamlı bir farkın olmadığı yalnızca teratospermik grupta alkol kullananların sağlam DNA oranlarının (%) anlamlı derecede ($p<0,05$) daha yüksek Kuyruk Momentlerinin ise anlamlı derecede ($p<0,05$) daha küçük olduğu saptanmıştır.

Çizelge 17. Alkol kullanan ve kullanmayan bireylerdeki ortalama sağlam DNA yüzdeleri.

Grup	Alkol	N	Ortalama	Standart sapma
Normospermik	Kullanmıyor	8	93,29	8,60
	Kullanıyor	12	91,96	7,78
	Toplam	20	92,49	7,92
Teratospermik	Kullanmıyor	12	80,78	26,59
	Kullanıyor	8	39,63	22,84
	Toplam	20	64,32	32,08
Oligospermik	Kullanmıyor	15	56,58	24,52
	Kullanıyor	5	39,53	31,31
	Toplam	20	52,32	26,59
Astenospermik	Kullanmıyor	17	47,76	34,74
	Kullanıyor	3	43,28	47,72
	Toplam	20	47,09	35,48
Toplam	Kullanmıyor	52	64,93	31,79
	Kullanıyor	28	62,43	33,96
	Toplam	80	64,05	32,37

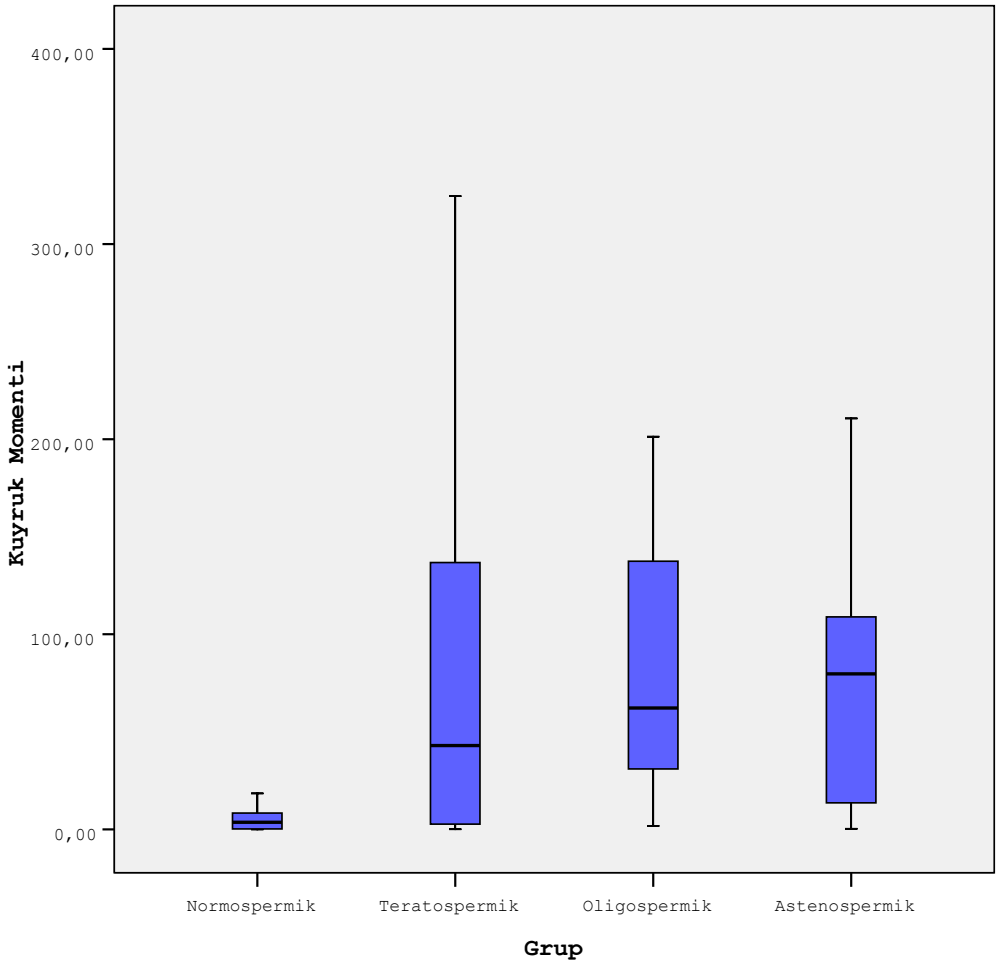


Şekil 45. Alkol kullanan ve kullanmayan bireylerdeki ortalama sağlam DNA yüzdelerinin grafiksel gösterimi.

Kuyruk momentinin ortalama değeri normospermik grupta 17,74 ± 25,29, teratospermik grupta 78,05 ± 95,96, oligospermik grupta 88,12 ± 77,07, astenospermik grupta ise 69,78 ± 56,85 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 18, Şekil 46).

Çizelge 18. Gruplardaki ortalama Kuyruk Momenti değerleri ve %95 güven aralığı.

				Ortalama için %95 güven aralığı			
	N	Ortalama	Standart sapma	Alt sınır	Üst sınır	Minimum	Maksimum
Normospermik	20	17,74	25,29	5,91	29,58	0,00	79,54
Teratospermik	20	78,05	95,96	33,14	122,96	0,04	324,53
Oligospermik	20	88,12	77,07	52,04	124,19	1,73	297,50
Astenospermik	20	69,78	56,85	43,17	96,38	0,28	210,61
Toplam	80	63,42	72,95	47,19	79,66	0,00	324,53



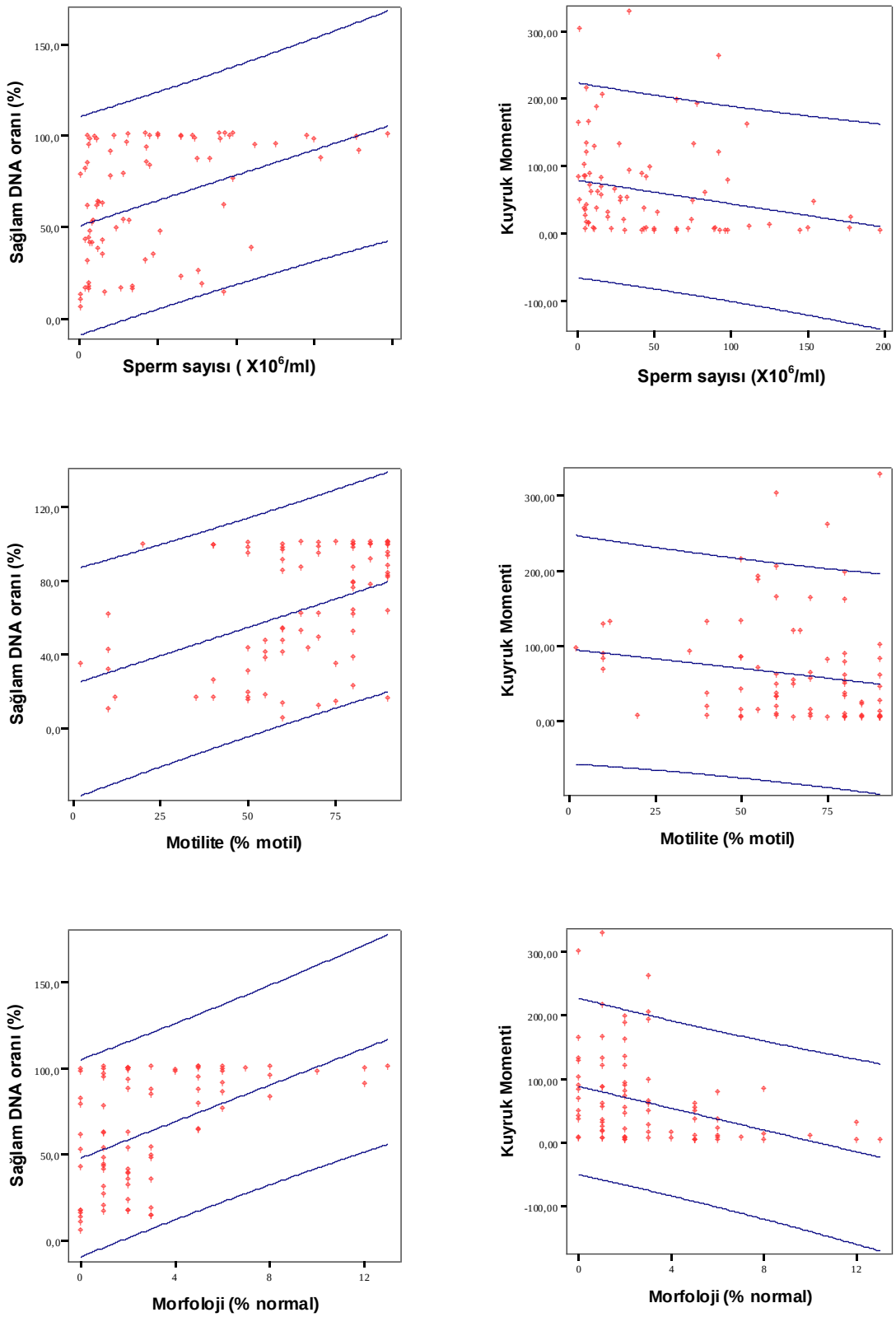
Şekil 46. Gruplara ait ortalama Kuyruk Momenti değerlerinin grafiksel gösterimi.

Yaş, spermiyogram parametreleri, sağlam DNA oranı ve Kuyruk Momenti arasındaki ilişki incelendiğinde; sperm sayısı ile sağlam DNA oranı arasında orta düzeyde pozitif anlamlı ilişki ($p<0,001$), Kuyruk Momenti ile de arasında ise orta düzeyde negatif anlamlı ($p<0,001$) ilişkinin olduğu görülmüştür. Motilite ile sağlam DNA oranı karşılaştırıldığında ise orta düzeyde pozitif anlamlı ($p<0,001$), Kuyruk Momenti ile de orta düzeyde negatif anlamlı ($p<0,01$) ilişkisinin olduğu saptanmıştır. Morfolojinin ise sağlam DNA oranı ile orta düzeyde pozitif anlamlı ($p<0,001$), Kuyruk Momenti ile de orta düzeyde negatif ($p<0,001$) anlamlı ilişkisi vardır. Ayrıca sağlam DNA oranı ile de Kuyruk Momenti arasında da beklenilen şekilde yüksek düzeyde negatif anlamlı ($p<0,001$) ilişkinin olduğu görülmüştür (Çizelge 19, Şekil 47).

Çizelge 19. Spermiyogram parametrelerinin sağlam DNA oranı ve Kuyruk Momenti ile ilişkisi.

		Sağlam DNA oranı (%)	**Kuyruk Momenti**
Yaş	R	-0,2188	0,183599
	P (çift taraflı)	0,051192	0,103058
	N	80	80
Semen hacmi (ml)	R	-0,02143	0,082307
	P (çift taraflı)	0,850375	0,467949
	N	80	80
Sperm sayısı (X10^6/ml)	R	0,444047**	-0,33925**
	P (çift taraflı)	3,69E-05	0,002081
	N	80	80
Motilite (% motil)	R	0,42066**	-0,31082**
	P (çift taraflı)	0,000102	0,005014
	N	80	80
Morfoloji (% normal)	R	0,477658**	-0,40166**
	P (çift taraflı)	7,45E-06	0,000222
	N	80	80
Sağlam DNA oranı (%)	R	1	-0,89482
	P (çift taraflı)	.	0,000001
	N	80	80
Kuyruk Momenti	R	-0,89482**	1
	P (çift taraflı)	0,000001	
	N	80	80

**Korelasyon 0.05 düzeyinde (çift taraflı) anlamlı.*
***Korelasyon 0.01 düzeyinde (çift taraflı) anlamlı.*



Şekil 47. Spermiyogram parametrelerinin sağlam DNA oranı ve kuyruk momenti ile ilişkisini ve % 95 güven aralığını gösteren grafik.

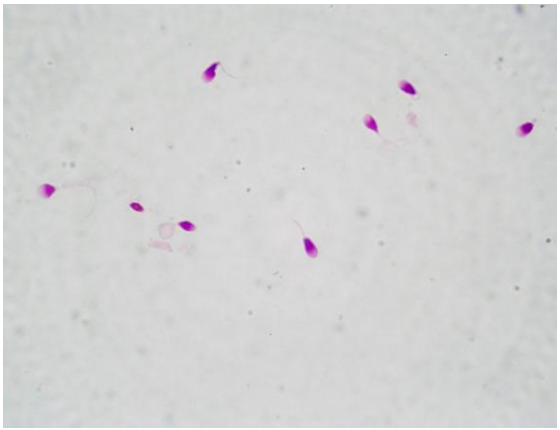
4.2. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) ve *in vitro* Fertilizasyon (IVF) Uygulanan Olgunun COMET Analizi

Hasta öyküsü alınırken 39 yaşında olduğunu, 10 yıldır günde yarım paket sigara içtiğini, alkol kullanmadığını, 17 yıldır evli olduğunu ve eşinin 40 yaşında olduğunu, erkek kardeşinin olmadığını, iki kız kardeşinin olduğunu onların da çocuklarının olduğunu, amcasının oğullarının çocuğu olmadığını yurt dışında oldukları içinde tüp bebek tedavisi görüp görmediklerini bilmediğini ifade etmiştir. Hastaya ait spermiyogram analizi Çizelge 19'de verilmiştir.

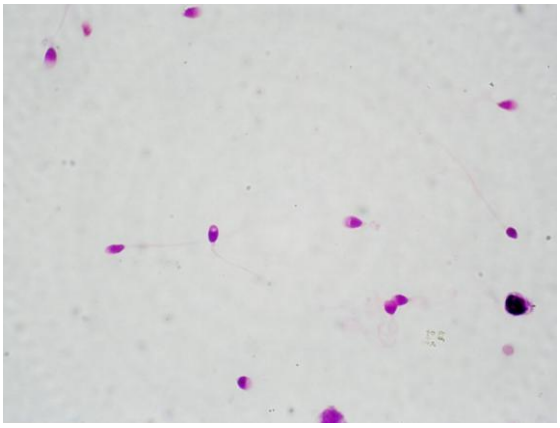
Çizelge 20. 72 numaralı olguya ait spermiyogram sonucu.

Hacim	2 ml
Sperm sayısı	15 X 10^6
Motilite	% 90 hareketsiz % 10 1^o hareketli
Morfoloji	% 100 baş % 85 kısa kuyruk

Morfolojik inceleme sırasında spermlerin hepsinde baş anomalisinin bulunduğu %85'inin ise kısa kuyruklu olduğu gözlenmiştir (Şekil 48, Şekil 49).

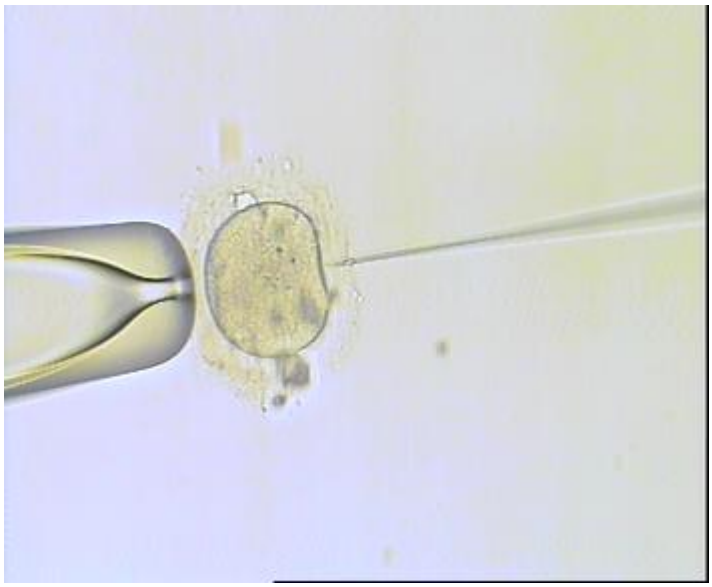


Şekil 48. 72 numaralı olguya ait Diff-quick ile boyanmış morfoloji preperatı.

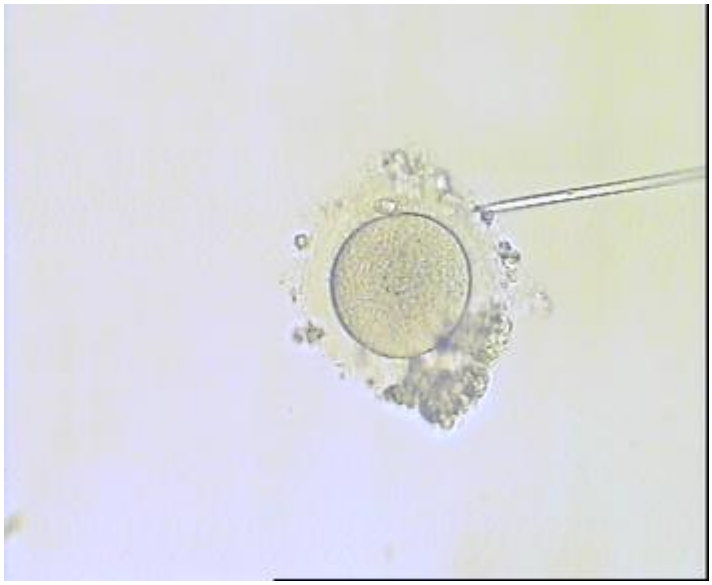


Şekil 49. %85 kısa kuyruklu, %100 baş anomalisine sahip spermler.

Oosit toplama günü eşinden toplam 6 oosit toplanmıştır. Oositlerin hepsi de olgun, metafaz II (MII) oositler olduğu için altısına da mikroenjeksiyon işlemi uygulanmıştır (Şekil 50-55).



Şekil 50. 1 numaralı oosit.



Şekil 51. 2 numaralı oosit.



Şekil 52. 3 numaralı oosit.



Şekil 53. 4 numaralı oosit.



Şekil 54. 5 numaralı oosit.

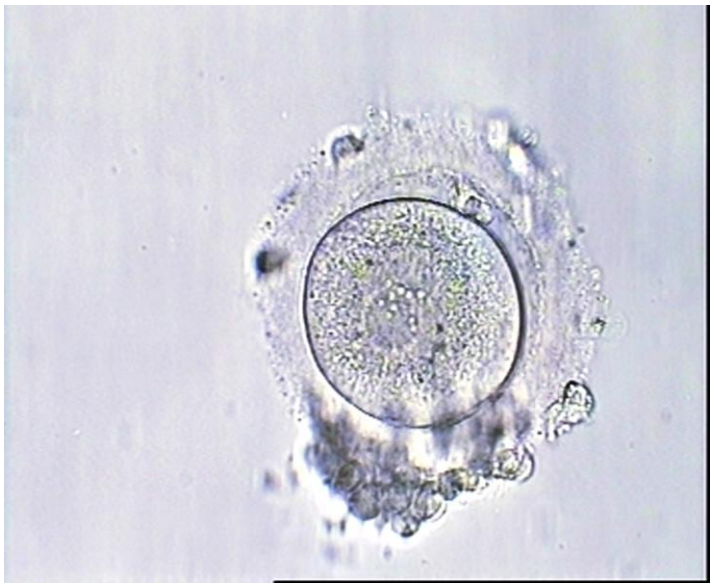


Şekil 55. 6 numaralı oosit.

Mikroenjeksiyondan ~16-18 saat sonra fertilizasyon kontrolü yapıldığında 5 tanesinde iki pronukleusun (2 PN) oluştuğu yani oositlerin döllendiği görülmüştür (Şekil 56-59, 61). Bir tanesinde ise sınırları çok belli olmamakla birlikte 3 pronukleusun oluştuğu görülmüş olup 3 PN olarak değerlendirilmiştir (Şekil 60).



Şekil 56. 1 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit.



Şekil 57. 2 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit.



Şekil 58. 3 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit.



Şekil 59. 4 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit.



Şekil 60. 5 numaralı fertilizasyon anomalisi gösteren (3 PN) oosit.



Şekil 61. 6 numaralı fertilize olmuş (2 PN) oosit.

İkinci gün embriyoların kontrolleri yapıldığında ise kaliteleri çok iyi olmasa dahi hepsinde klivajın gerçekleştiği saptanmıştır (Şekil 62 -67).



Şekil 62. 1 numaralı embriyo.



Şekil 63. 2 numaralı embriyo.



Şekil 64. 3 numaralı embriyo.



Şekil 65. 4 numaralı embriyo.



Şekil 66. 5 numaralı embriyo.

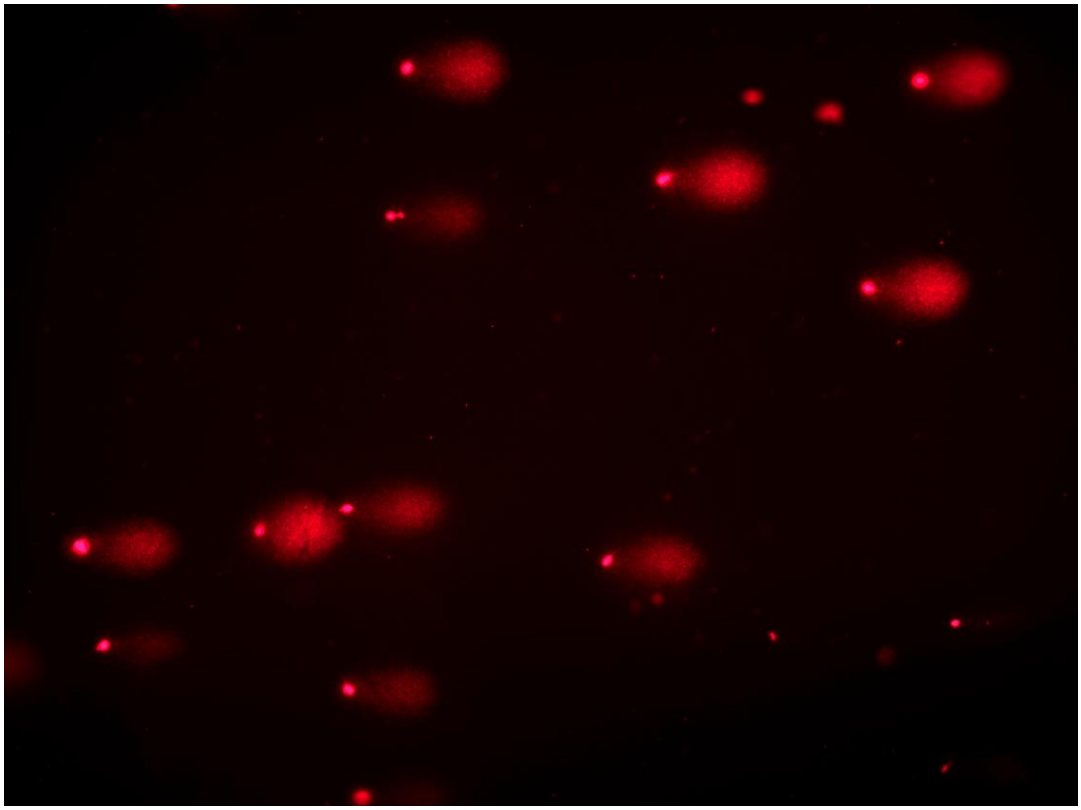


Şekil 67. 6 numaralı embriyo.

COMET ASSAY ile DNA hasarı çalışıldığında sağlam DNA oranı % 40,85, Kuyruk Momenti 63,31 olarak saptanmıştır. Normospermik grupta ise bu değerler ortalama sağlam DNA oranı için (%) 92,49 ± 7,92, Ortalama Kuyruk Momenti değeri için de 17,74 ± 25,29 olarak hesaplanmıştı (Çizelge 20, Şekil 68).

Çizelge 21. Normospermik grup ile 72 numaralı olguya ait sağlam DNA oranları (%).

	Sağlam DNA oranı (%)	Kuyruk Momenti
Normospermik grup	92,49 ± 7,92	17,74 ± 25,29
72 numaralı olgu	40,85	63,31



Şekil 68. 72 numaralı olgunun COMET ASSAY analizine ait jel görüntüsü.

15 gün sonra eşinin βhCG sonucu alındığında ise sonucun negatif olduğu görülmüştür.

TARTIŞMA

İnfertilite, doğum kontrol yöntemi uygulamayan çiftlerde 1 yıllık sürede gebeliğin gerçekleşmemesidir. İnfertil vakaların yaklaşık %50'si erkek kökenli bir probleme bağlıdır. Günümüzde erkek bireyin değerlendirilmesinde kullanılan rutin analizlerde ejakulatın hacmine, sperm sayısına, hareketliliğine, morfolojisine, pH'sına ve antisperm antikoru (ASA)'nun bulunup bulunmadığına bakılmaktadır. Eğer bayana ait anormal bir bulgu da yok ise, bu testlerin sonuçları değerlendirilerek androlojik patolojilerin ~%50'si tanımlanabilmektedir. Ancak %50'lik bir kısmında sorunun ana kaynağı tam olarak anlaşılamamakta ve idiyopatik infertilite olarak sınıflandırılmaktadır. Bu hasta grubunda tedaviye nasıl yön verileceği konusunda da sıkıntılar yaşanmaktadır. Bahsi edilen sorunlar nedeniyle bu grupta tanıyı koydurtabilecek ve tedaviye yön verecek yeni testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu anlamda son yıllarda en çok sperm DNA hasarı üzerinde durulmaktadır.

Sperm hücresinin kromatin yapısı, içermiş olduğu protamin molekülleri sayesinde somatik hücreye göre 6 kat daha kompakttır. Bu kompakt yapı sayesinde sperm hücresinin çekirdeği, somatik hücreye kıyasla, hacimsel olarak 40 kat daha küçüktür. Sperm hücresinin bu kompakt yapısı protamin molekülleri ile DNA arasındaki disülfit bağlarıyla sağlanır. DNA-protamin disülfit bağları, belirli bölgelerde ve belirli aralıklarda DNA'nın katlanmış bir merdiven gibi bükülmesini sağlar. Bu yapı "lineer yan yana diziler modeli" olarak adlandırılır. Bu paketleme sistemi sayesinde sperm hücresinin hacmi azaltılarak genital kanal boyunca geçişi kolaylaştırılmış ve döllenme öncesinde hücre, dış etkenlere karşı korunmuş olur. Ayrıca bu paketleme sistemi hücre genomunu genital kanallardan geçiş sırasında inaktif hale getirerek tamir yeteneğini de ortadan kaldırır[190].

Sperm hücresindeki kompakt paketleme sistemi DNA'nın proteinlerden ayrılmasını zorlaştırarak COMET ASSAY protokolunu güçleştirir. Bu nedenle, bu çalışmada ilk olarak laboratuvarımıza uygun COMET ASSAY protokolunun kurulması hedeflenmiştir. COMET ASSAY, özgün hücredeki DNA hasarını ölçebilen floresan bir tekniktir. Yöntem 1980'li yıllarda somatik hücrelerde

yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen insan sperm hücresi üzerindeki çalışmalar yeni yeni uygulanmaya başlamıştır.

Somatik hücreler için uygulanan COMET ASSAY protokolu ile sperm hücresi için uygulanan COMET ASSAY protokolu arasındaki en önemli fark "hücrenin parçalanması ve DNA'nın açılması" aşamasında görülür. Sperm kromatininin özel yapısı ve dirençli sperm başı hücrenin parçalanmasını ve DNA'nın açılmasını güçleştirmektedir. Bu amaçla lizis solusyonuna proteinaz K eklenerek, somatik hücreler için uygulanan 1 saatlik inkübasyon süresinin 1 geceye, yani yaklaşık olarak 16-18 saate kadar, uzatılması gerekmektedir. Lizis solüsyonunun proteinaz K içermesinden dolayı da parçalama işlemi +37^{o}C'de yapılmaktadır. Somatik hücreler ise +4^{o}C'de bile parçalanabilmektedir. Özetlemek gerekirse optimum lizis +37^{o}C'de ve yaklaşık olarak 16-18 saatte gerçekleşmektedir.

Ardışık olarak yapılan, değişik voltajlardaki ve değişik sürelerdeki elektroforez çalışmaları sonucunda ise sperm hücresi için optimum elektroforez 50 V'da gerçekleştirilmiş olup optimum elektroforez süresi 10 dk. olarak saptanmıştır.

Elektroforez sırasında ısı yükseldiği ve orta tabakada bulunan hücreleri immobilize ettiğimiz düşük erime noktalı agarozu (LMA) erittiği için, LMA 1/5 oranında normal erime noktasına sahip agaroz (NMA) ile karıştırılmış ve optimum agaroz derişimi %0,75 (0,15 NMA + 0,06 LMA) olarak saptanmıştır. Elektroforez sırasında dikkat edilmesi gereken diğer bir nokta ise elektroforez tankının tampon ile tamamen doldurulmamasıdır. Tank tampon ile tamamen doldurulduğunda jel lam yüzeyinden ayrılmaktadır. Bu nedenle tanka tampon haznesinin alacağı kadar tampon eklenmeli ve iletkenlik ıslatılmış kurutma kağıtları ile ve jel üzerine damlatılan birkaç damla tampon ile sağlanmalıdır.

Trevigen marka lamlarda elektroforez sırasında elektriksel iletkenlik sağlanamadığı ve doğru bir değerlendirme yapabilmek için lama yeterli sayıda hücre düşmemesinden dolayı tek tabakalı jel tekniğinden vazgeçilip sandviç modeli uygulanmış ve bu amaçla farklı markalardaki rodajlı lamlar kullanılmıştır. Menzel markalı lamlarda orta tabakada bulunan hücrelerin döküldüğü ve ayrıca lamın kendisinin de boyandığı tespit edilmiştir. Isotherm marka lamlarda ise

hücreler başarıyla immobilize edilmiş ve elektroforez başarıyla gerçekleştirilmiştir.

Dondurulup saklanan örneklerde ise hücrelerin parçalandığı ve DNA'nın besiyeri ile karıştığı gözlenmiştir. DNA miktarı hücresel bazda hesaplanarak deneyler gerçekleştirildiğinden hücre yapısı bozulmuş örneklerin COMET ASSAY için uygun olmadığı tespit edilmiştir. Bu yöntem için taze, hücresel bütünlüğü bozulmamış örneklerin kullanılması gerekmektedir.

Yöntemin kurulmasının ardından, ikinci adım olarak örnek çalışmalarına başlanmıştır. Bu amaçla fertil olduğu bilinen 20 normospermik olgu ile 20 oligospermik (18 oligoteratospermik, 2 oligospermik), 20 astenospermik (12 oligoastenoteratospermik, 8 astenoteratospermik) ve 20 teratospermik toplam 80 olgunun spermiyogram analizi yapıldıktan sonra sperm DNA hasarı COMET ASSAY ile çalışılmıştır. Hasar hesaplamaları CometScore 1,5 Tritek bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır. Gruplardaki spermiyogram parametreleri karşılaştırıldıktan sonra sperm parametreleri ile DNA hasarı arasındaki ilişki değerlendirilmiş olup sigara ve alkol kullanımının DNA hasarını ve spermiyogram parametrelerini nasıl etkilediği incelenmiştir.

Gruplar arasındaki sperm sayıları karşılaştırıldığında normospermik gruptaki ortalama sperm sayısının ($x10^6$/ml) diğer gruplardan anlamlı ($p<0,05$) derecede daha fazla olduğu saptanmıştır. Oligospermik gruptaki ortalama sperm sayısı ($x10^6$/ml) ise normospermik gruptan ve teratospermik gruptan anlamlı ($p<0,001$) derecede daha azdır. Oligospermik grup ile astenospermik grup arasında ise anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çünkü astenospermik gruba ait 12 infertil erkek oligoastenoteratospermiktir.

Gruplar ortalama semen hacmi açısından karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Gruplar arasındaki motilite değerleri (%) karşılaştırıldığında ise astenospermik gruptaki ortalama motilite değerlerinin beklenen şekilde (%) diğer gruplardan anlamlı ($p<0,05$) derecede daha düşük olduğu görülmüştür. Ortalama morfoloji değerleri (%) karşılaştırıldığında da normospermik gruptaki normal morfolojili sperm sayısının diğer gruplardan anlamlı ($p<0,05$) derecede daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu bulgular bize grupları hangi oranda doğru bir şekilde oluşturduğumuzu göstermektedir.

Günümüzde sigara kullanımının erkek üreme fonksiyonları üzerine olan etkisi hala tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda sigaranın sperm sayısını, motilitesini ve normal morfolojili sperm sayısını azalttığı ifade edilse de, bu çalışmaların bir kısmında sigara tüketimi ile semen kalitesi, sperm fonksiyonları ve sperm nükleer DNA hasarı arasında bir korelasyonun olmadığı belirtilmiştir[191-194].

Toplam 27 çalışmanın değerlendirildiği bir meta-analizde sigara içenlerin sperm sayısının %13, sperm motilitesinin %10 ve normal morfolojiye sahip sperm sayısının ise %3 oranında azaldığı bildirilmiştir. Ne yazık ki bu 27 çalışmanın 25'inde sigara içenlerin sayısı 200'ün altındadır[195].

Pasqualotto ve ark. nın yapmış olduğu çalışmada ise toplam 889 fertil erkek incelenmiştir. Araştırmacılar çalışmanın sonunda sigaranın spermiyogram parametereleri (sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi) ile serum folikül uyarıcı hormon (FSH), lutein yapıcı hormon (LH) ve testosteron düzeyleri üzerine her hangi bir etkisinin bulunmadığını açıklamışlardır. Örneklem sayısı fazla olan (1104 infertil erkek) başka bir çalışmada da Trummer ve ark. yine sigaranın semen parametrelerini etkilemediğini ifade etmişlerdir[196,197].

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da her bir grup kendi içerisinde incelendiğinde sigara içenler ile içmeyenlerin spermiyogram parametreleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Aynı şekilde yine her bir grup kendi içerisinde incelendiğinde alkol kullananlar ve kullanmayanların spermiyogram parametreleri arasında da anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Gruplar arasında sigara ve alkol kullananlar ile kullanmayanların morfolojileri karşılaştırıldığında ise sigara ve alkol kullananların morfolojilerinin anlamlı derecede ($p<0,001$) daha iyi olduğu görülmüştür. Bu durum örneklem sayısının az olmasından ($n_{sigara}=42$, $n_{alkol}= 28$) kaynaklanmış olabilir. Bu nedenle örneklem sayısı fazla, sigara ve alkol ile doz ilişkili daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Aynı zamanda sigara ve alkolun kullanım süresi, diğer ilaçlarla etkileşimi, antioksidan kapasite ve tamir mekanizmaları da incelenmesi gereken diğer önemli parametreler arasındadır.

Spermiyogram analizi aynı kişide bile cinsel perhiz süresi, sıcaklık farklılığı, günün farklı saatleri, mevsimler, semen örneğinin verildiği yer, çalışma koşulları ve emosyonel duruma göre farklılık gösterebilir. Örneğin perhiz

süresine bağlı olarak gün başına semen hacminde 0,62 ml, sperm sayısında 17,6 $X10^6$/ml ve motilitede %1,2'lik artış olabileceği açıklanmıştır. Çalışılan örneklerde sperm sayısındaki düşmenin % motilitede azalmaya ve morfolojik olarak % anormal olarak ifade edilen sperm sayısında da artışa neden olabileceği bildirilmiştir[22,25].

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da spermiyogram parametrelerinin birbirleri ile karşılıklı etkileşimleri incelendiğinde yukarıdaki sonuçlara paralel olarak; motilitenin sperm sayısı ile düşük düzeyde pozitif anlamlı ilişki ($p<0,05$) gösterdiği, morfolojinin ise yaş ile düşük düzeyde negatif anlamlı ilişki ($p<0,05$), sperm sayısı ($p<0,001$) ile yüksek düzeyde pozitif anlamlı ilişki ve motilite ($p<0,001$) ile de orta derecede pozitif ve istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterdiği saptanmıştır.

Spermde DNA hasarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı konusu tam olarak izah edilebilmiş değilse de çeşitli iç (protamin eksikliği, artmış ROT düzeyi, apoptoz) ve dış nedenlerden (testiküler hipertermi, çevresel toksinler) dolayı sperm DNA'sında farklı düzeyde hasarlar meydana gelmektedir. Sperm DNA hasarının erkek infertilitesi ve bozulmuş spermatogenez ile ilişkili olduğu çok açık olarak bilinmesine rağmen fertil bireylerde de az da olsa tespit edilebilecek düzeyde DNA hasarının olduğunu bildiren çalışmalar da bulunmaktadır[4,17].

Sperm DNA hasarı, *in vivo* fertilizasyon üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yapılan çok sayıdaki çalışmada fertil ve infertil erkeklerin sperm DNA hasar düzeylerinin anlamlı derecede farklı olduğu gösterilmiş hatta infertil bireylerin spermlerinin H_2O_2 ve radyasyon gibi DNA'da hasara neden olan ajanlara karşı daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Sperm hücresindeki DNA hasarı SCSA tekniği kullanıldığında %30, TUNEL testi kullanıldığında ise %20'den fazla ise *in vivo* daki fertilizasyon oranı neredeyse sıfıra yaklaşmaktadır. Tüm bu nedenlerden ötürü sperm DNA'sındaki hasarın tespiti erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde yeni bir belirteç olarak düşünülebilir. SCSA tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada sperm parametreleri normal olan infertil erkeklerin DNA hasarının fertil bireylerdekinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiş olup bu sonuç sperm DNA hasarı analizinin, semen

parametresi normal olan ve idiyopatik infertilite tanısı ile merkeze başvuran çiftlerdeki gizli sperm anomalisinin tanımlanmasında kullanılabilecek ayırıcı bir test olabileceğini düşündürmektedir[7,10,128-133].

Çalışmamızda sağlam DNA oranları hesaplanırken "Baş bölgesindeki % DNA" parametresi, DNA hasarları hesaplanırken ise "Kuyruk Momenti" parametresi dikkate alınarak istatistiksel incelemeler yapılmıştır. Toplam ortalama sağlam DNA yüzdesi 64,05 ± 32,37 olup bu değer normospermik grupta 92,49 ± 7,92, teratospermik grupta 64,32 ± 32,08, oligospermik grupta 52,32 ± 26,59, astenospermik grupta ise 47,09 ± 34,48 olarak hesaplanmıştır. Daha önce yapılmış olan çalışmaları da destekleyici şekilde bizim çalışmamızda da sağlam DNA oranları (%) ($p<0,005$) ve Kuyruk Momenti ($p<0,05$) açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmaktadır. Normospermik gruptaki sağlam DNA oranı (%) diğer grupların hepsinden anlamlı olarak ($p<0,005$) daha büyük olup bu gruba ait Kuyruk Momentleri de diğer gruplardan anlamlı derecede ($p<0,05$) daha küçüktür.

Bir sonraki adımda sigara kullanımının gruplardaki ortalama sağlam DNA yüzdelerini nasıl etkilediği incelenmiştir. Analiz sonucunda normospermik grupta, teratospermik grupta ve astenospermik grupta sigara içenler ile içmeyenlerin sağlam DNA oranları (%) arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Oligospermik grupta ise sigara içmeyenlerin sağlam DNA oranlarının (%) anlamlı derecede ($p<0,05$) daha büyük, Kuyruk Momentlerinin ise anlamlı derecede ($p<0,05$) daha küçük olduğu saptanmıştır.

Sigara, alkol ve kafein tüketiminin kan hücrelerindeki genetik hasarı arttırdığı bilinmesine rağmen bu maddelerin spermdeki genetik materyal üzerine olan etkileri hakkında ise çok az şey bilinmektedir. Sigara ve alkol tüketiminin sperm anöploidisi ile ilişkisi ise hala tartışma konusudur[198].

Bizim çalışmamızda ise normospermik grupta, oligospermik grupta ve astenospermik grupta alkol kullananlar ile kullanmayanların sağlam DNA oranları (%) arasında anlamlı bir farkın olmadığı yalnızca teratospermik grupta alkol kullananların sağlam DNA oranlarının (%) anlamlı derecede ($p<0,05$) daha yüksek, Kuyruk Momentlerinin ise anlamlı derecede ($p<0,05$) daha küçük olduğu saptanmıştır. Bu durumun da yine daha önce belirtildiği gibi

çalışmamızdaki alkol kullanan sayısının az olmasından (n_{alkol}=28) kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Kuyruk momentinin ortalama değeri normospermik grupta 17,74 ± 25,29, teratospermik grupta 78,05 ± 95,96, oligospermik grupta 88,12 ± 77,07, astenospermik grupta ise 69,78 ± 56,85 olarak hesaplanmıştır. Schmid ve ark. nın yaptıkları çalışmada ise 12 infertil oligospermik birey ile 12 fertil olduğu bilinen normospermik birey incelenmiştir. Normospermik bireylerde kuyruk momenti 4,8 ± 1,2, oligospermik bireylerde ise 6,4 ± 0,4 olarak hesaplanmıştır. Baş bölgesindeki % sağlam DNA oranı ise normospermik grupta 74,6 ± 5,3, oligospermik grupta ise 67,9 ± 3,5 olarak bildirilmiştir[199].

Sperm DNA hasarını ölçen testleri rutin analizler arasına girdirmeden önce semen parametreleri ile sperm DNA bütünlüğü arasındaki ilişki araştırılmalı ve eğer sperm DNA bütünlüğü fertilite için tanı koydurucu bir niteliğe sahip ise rutinde kullanılmalıdır.

Bugüne kadar birçok çalışmada insan sperm DNA'sı ile semen parametreleri arasındaki ilişki incelenmiştir. Farklı ölçüm yöntemleri kullanılarak yapılan bu çalışmaların bir kısmında bazı semen parametreleri ile sperm DNA bütünlüğü arasında ilişkinin bulunduğu ifade edilse de bir kısmında bu parametreler arasında ilişkinin saptanamadığı bildirilmiştir[5,10,54,135,182,200,201,202].

Kodama ve ark. yaptıkları bir çalışmada 8-OHdG miktarının sperm sayısı ile negatif ilişkisinin olduğunu Shen ve ark. ise 8-OHdG miktarının hem sperm sayısı, hem motilite hem de morfoloji ile negatif ilişkisinin olduğunu açıklamışlardır[13].

Oosterhuis ve ark. ise fosfatidilserin ekspresyonu ile sperm sayısı ve motilitesinin ters ilişkili olduğunu belirtmişlerdir[203].

Çalışmamızda yaş, spermiyogram parametreleri, sağlam DNA oranı ve Kuyruk Momenti arasındaki ilişki incelendiğinde; sağlam DNA oranı ile sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi arasında pozitif ($p<0,001$) istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin bulunduğu, Kuyruk Momenti ile semen parametreleri arasında ise negatif ($p<0,01$) istatistiksel olarak anlamlı ilişkinin bulunduğu saptanmıştır. Yaş ile sağlam DNA oranı arasında ise anlamlı ($p= 0,051192$) olmasa da negatif bir ilişkinin olduğu açık olarak görülmektedir. Ayrıca beklenilen şekilde sağlam

DNA oranı ile Kuyruk Momenti arasında da güçlü negatif ($p<0,001$) bir ilişkinin olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar bize benzer mekanizmaların sperm DNA hasarından ve semen kalitesinden sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

Farklı yöntemlerin kullanıldığı diğer insan çalışmalarında da sperm DNA hasarı ile semen parametreleri arasında ilişki saptandığı açıklanmıştır. Benchaib ve ark. IVF (n=50) ve ICSI (n=54) tedavisi için başvuran 105 çift ile yaptıkları çalışmada TUNEL yöntemini kullanmışlar ve sonuçta DNA hasarı ile sperm sayısı ve motilitesi arasında negatif ilişki saptadıklarını bildirmişlerdir. Irvine ve arkadaşları ise alkali COMET ASSAY, NT-kondanse ve NT-dekondanse tekniklerini kullanarak gerçekleştirdikleri, 12 gönüllü donorün ve 29 infertil hastanın kullanıldığı çalışmanın sonucunda sperm DNA hasarı ile semen kalitesi arasında, özellikle de sperm sayısında, anlamlı negatif ilşkinin bulunduğunu rapor etmişlerdir. DNA hasarını ölçen bu üç farklı tekniği karşılaştırdıklarında ise COMET ASSAY'in fertil grup ile infertil grup arasındaki ayırımı daha iyi yaptığını bildirmişlerdir[54,182].

Morris ve ark. ise IVF tedavisi için başvuran 60 erkekte, alkali COMET ASSAY kullanarak yaptıkları çalışmada artan yaş ile birlikte DNA hasarının da arttığını saptamışlardır. Bu araştırmacılar aynı zamanda DNA hasarının anormal morfolojili sperm yüzdesi ile pozitif, sperm sayısı ile de negatif korelasyon gösterdiğini açıklamışlardır. Beklenilenin aksine bu çalışmada DNA hasarı ile motilite arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır[5].

Sun ve ark. ise flovsitometrik olarak gerçekleştirdikleri TUNEL yöntemini kullanarak, infertilite kliniğine başvuran 298 erkeği incelemişler ve sonuçta DNA hasarının sperm motilitesi, morfolojisi ve sayısı ile negatif ilişkisinin olduğunu fakat yaş ile DNA hasarı arasında ise anlamlı bir ilişki saptayamadıklarını açıklamışlardır. Ayrıca DNA hasarı ile sigara arasında da istatistiksel olarak anlamlı negatif bir ilşki saptadıklarını da bildirmişlerdir[135].

Bizim çalışmamıza benzer şekilde Trisini ve ark. nötral COMET ASSAY kullanarak yaptıkları çalışmada sperm DNA hasarı ile sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi arasında negatif ilişkinin olduğunu, sigara ve sperm DNA hasarı arasında ise bir ilişkinin bulunmadığını ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da

muhtemelen sigara içen birey sayısı (n_{sigara}=22) az olduğu için sigara ile bir ilişki kurulamamıştır[204].

Tüm bu çalışmaların aksine bir grup çalışmada ise DNA hasarı ile semen parametreleri arasında ilişki saptanamamıştır. Bu çalışmaların sonuçları sperm DNA hasarının semen parametrelerinden bağımsız olduğunu göstermektedir. Chan ve Donnelley'in alkali COMET ASSAY protokolunu kullanarak yaptıkları çalışmanın sonucunda her ikisi de sperm DNA hasarı ile sperm morfolojisi arasında bir korelasyon saptayamadıklarını açıklamışlardır. Evenson ve ark. da SCSA tekniğini kullanarak yaptıkları çalışmada yine DNA hasarı ile semen parametreleri arasında ilişki bulamamıştır[200,201,202,205].

Saleh ve ark. ise yine SCSA tekniğini kullanarak, infertilite tedavisine başlayan 92 infertil erkeği incelemişlerdir. Bunlardan 21'i normal sperm parametrelerine sahipken 71'inde spermiyogram sonuçları normal sınırlar içerisinde değildir. Kontrol grubu ise fertil olduğu bilinen toplam 16 gönüllüden oluşturulmuştur. Araştırmacılar DNA hasarını DNA fragmantasyon indeksi (DFI) şeklinde ölçmüş ve sonuçta %DFI'nin normal sperm parametresine sahip infertil erkeklerde fertil erkeklere kıyasla anlamlı derecede daha büyük olduğunu saptamışlardır. Normospermik infertil bireyler ile sperm parametreleri normal sınırlar içerisinde olmayan infertil erkekler arasında ise anlamlı bir fark saptayamamışlardır. Bu sonuçların ışığında araştırmacılar sperm DNA kalitesinin, semen parametreleri normal olan, idiyopatik infertilite tanısı konmuş infertil bireyler için güzel bir açıklama sağlayacağını bildirmişlerdir[10].

Üremeye yardımcı tedavi yöntemleri günümüzde doğal yolla bebek sahibi olamayan çiftlere uygulanan en ileri tedavi yöntemidir. Günümüzde erkek kaynaklı hücresel problemler, infertilitenin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Bu problemler, ana hatlarıyla, sperm sayısının azalması, hareketliliğin düşmesi ve morfolojik özelliklerin bozulmasıdır. Bilindiği üzere sperm değerleri (sayı, hareketlilik, morfoloji) anne adayının vücudunda sperm hücrelerinin yumurtaya ulaşması, döllenmesi için son derece önemlidir. Bu değerlerdeki bozulmalar, sadece doğal gebeliğin oluşumunu olumsuz yönde etkilemekle kalmamakta, aynı zamanda seçilecek tedavi yönteminde de belirleyici rol almaktadır. Doğal yolla yumurtaya ulaşma ve döllenme yeteneği azalmış bir sperm popülasyonu

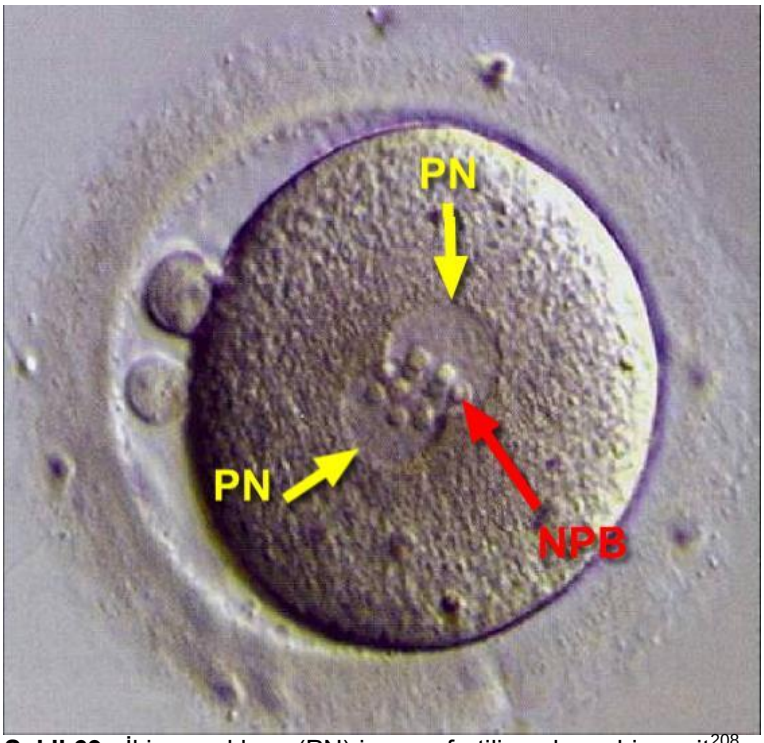
bulunması halinde, klasik tüp bebek ve intra uterin inseminasyon (IUI- aşılama) tedavilerinde de başarı şansı azalmaktadır. 1992 yılından itibaren uygulanmakta olan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI- mikroenjesiyon) yönteminin yararı işte burada görülmektedir. Gerek doğal üreme sisteminde, gerekse spermin yumurtayı kendi yeteneği, kapasitesi ile bulup döllemesinin zorlaştığı, ileri derecede sperm değerlerinin bozulduğu olgularda ICSI ile oldukça başarılı sonuçlar alınmış ve günümüzde erkek kaynaklı infertilitenin temel tedavi yöntemi ICSI olmuştur. ICSI, temel olarak yumurtaya ulaşma ve dölleme kapasitesi azalmış spermlerin bir mikroskobik enjektör aracılığıyla anne adayından alınan yumurtalara enjekte edilmesi olarak tanımlanabilir.

Fertilizasyon, gametlerin (sperm ve oosit) yeni bir bireyi meydana getirmek üzere nukleus ve tüm sitoplazmik komponentlerin katılımıyla gerçekleşen bir olaylar zinciridir. İnsanda *in vivo* fertilizasyon tuba uterinaların ovaryumla komşu olan ampulla bölgesinde gerçekleşir. *İn vivo* ve klasik IVF'de fertilizasyonun gerçekleşebilmesi spermlerle oositlerin karşılaşması, iki hücrenin teması ve spermin oosit sitoplazması içerisine girmesi sonrasında oositin aktive olmasıyla devam eden bir süreçtir ve aktive olan oositin iki hücreli embriyoyu meydana getirmesiyle sonlanır[206].

ICSI'de fertilizasyonun nasıl gerçekleştiğine ilişkin somut veriler ilk kez Payne ve arkadaşları tarafından time-lapse-video sinematografi tekniği kullanılarak gösterilmiştir. Araştırmacılar, mikroenjeksiyon uygulamasından sonra, oosit sitoplazmasında 20-53 dakikalık periyotlarla, granüler bir özellik kazanan sitoplazmanın merkezden perifere doğru yayılan bir dalgalanma sergilediklerini gözlemlemişlerdir. Sitoplazmanın bu hareketleri sırasında sperm başının dekondanse olduğu ve ardından metafaz plağının geliştiği ve 2. kutup cisimciğinin sitoplazmik dalgalanmalardan sonra atıldığı vurgulanmıştır. İkinci kutup cisimciğinin atılmasıyla birlikte oosit sitoplazmasının merkezinde organellerin kümelendiği ve erkek pronukleusunun şekillendiği; eş zamanlı olarak veya hemen sonra ikinci kutup cisimciğinin yanında şekillenen dişi pronukleusunun erkek pronukleusuna doğru hareket ettiği belirlenmiştir[207].

Fertilizasyon kontrolu klasik IVF'de inseminasyondan 18-20 saat sonra, ICSI uygulamarında ise 16-18 saat sonra yapılır. Oositlerin sitoplazmalarında iki

pronukleus (2PN) ve perivitellin aralıkta iki kutup cisimciğinin görülmesi fertilizasyonun gerçekleştiği anlamına gelir (Şekil 69). İncelenen hücrenin üç boyutlu olması nedeniyle kutup cisimcikleri her zaman görüş alanında olmayabilir. Bu nedenle oositin iki pronukleus içermesi halinde fertilizasyonun gerçekleştiği kabul edilmelidir[206].



Şekil 69. İki pronukleus (PN) içeren, fertilize olmuş bir oosit[208].

ICSI sonrası fertilizasyon oranları genellikle enjeksiyon yapılan oosit sayısına ve sperm kaynağına bağlı olarak değişmekle beraber, genellikle % 57 ila % 67 arasındadır. Fertilizasyon kontrolu yapılırken enjeksiyon yapılan oositlerin yaklaşık %3'lük bir kısmında 1 pronukleus (1 PN) gözlenebilir. Bu oositler mekanik veya kimyasal etmenler sonrasında partenogenetik olarak aktive olabilmektedir. Enjeksiyon yapılan oositlerin yaklaşık %4'lük bir kısmında ise 3 pronukleus (3 PN) görülür. Bu durum ise muhtemelen fertilizasyon sırasında ikinci polar cisimciğin atılımındaki bozukluktan kaynaklanmaktadır. 1 PN veya 3 PN içeren oositlerden gelişen embriyolar hastalara transfer edilmemelidir. Şekil 70 ve şekil 71'de anormal fertilize olmuş oositler görülmektedir[209].



Şekil 70. 1 pronukleuslu (1PN) oosit[210].



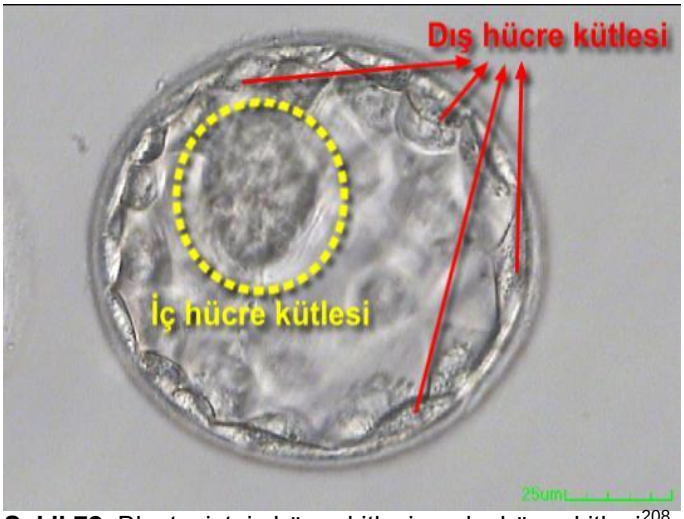
Şekil 71. 3 pronukleuslu (3PN) oosit[210].

Klivaj, döllenmiş olan embriyonun bölünmeye başlamasıdır. Sperm yumurtayı döllediğinde, sperm tarafından ooplazmaya taşınan sentriyol ve mikrotübüller, erkek ve dişi pronukleuslarını bir araya getirir ve inseminasyondan 16-18 saat sonra pronukleuslar oosit sitoplazmasının ortasında gözlenir. İki pronukleusun birleşmesinden sonra (singami) yaklaşık olarak inseminasyondan sonraki 25. saatte sitoplazmanın ikiye bölünmesiyle birlikte iki diploid blastomer meydana gelir. Bu embriyonun ilk klivajı yani ilk bölünmesidir. Preimplantasyon evredeki mitoz bölünmeler blastomer sayısında hızlı bir artışa yol açar ve böylece oluşan yeni blastomerler, bir önceki blastomerlere oranla daha küçüktür ve bu özellik, her bölünmede blastomer hacimlerinin daha da küçülmesiyle devam eder[211].

Embriyonun ikinci ve üçüncü bölünmeleri arasında (dört blastomerli evreden sekiz blastomerli evreye geçiş) maternal genden embriyonik gen dağılımı aşamasına geçiş gerçekleşmektedir. Bu nedenle, spermle birleşmeden itibaren ilk 48 saatte embriyo öncelikle maternal mRNA etkisiyle protein sentezi gerçekleştirirken, bundan sonraki aşamalarda embriyonik genom aktivasyonu ile gelişmeye devam eder[211].

Fertilizasyondan sonraki dördüncü günde embriyo kompaktlaşmaya başladığı zaman morula olarak adlandırılır. Bu evrede blastomerler arasında, iletişimi ve hücreler arası bariyer oluşumunu sağlayan sıkı ve gevşek bağlar oluşmuştur. Morula evresinde hücreler arasında kavite oluştuğu zaman embriyo blastosist adını alır. Kavitasyonun oluşması ve kaviteden salgılanan sıvı, blastosöl oluşumunu tetikler. Kavitasyon ilerledikçe kompaktlaşma sırasında blastomerlerin kutuplaşmasıyla meydana gelen iki farklı hücre grubu **a)** Ekstraembriyonik dokuyu oluşturacak **trofoektoderm (TE)** ve **b)** Embriyo ve

daha sonra fetusun gelişimini devam ettirecek **iç hücre kitlesini (ICM)** oluşturur[211] (Şekil 72).



Şekil 72. Blastosist, iç hücre kitlesi ve dış hücre kitlesi[208].

Son olarak fertilizasyon, klivaj, blastosist gelişimi ve implantasyon gibi henüz tam olarak anlaşılamamış konulara da ışık tutacağı düşünülerek %85'i kısa kuyruklu olan ve %100 baş anomalisine sahip olan oligoastenoteratospermik bir vakanın mikroenjeksiyonu gerçekleştirilmiş olup aynı zamanda sperm DNA hasarı da COMET ASSAY ile çalışılmıştır. Mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon, klivaj ve gebelik durumu takip edilerek DNA hasarı ile ilişkisi incelenmiştir.

Hasta öyküsü alınırken 39 yaşında olduğunu, 10 yıldır günde yarım paket sigara içtiğini, alkol kullanmadığını, 17 yıldır evli olduğunu ve eşinin 40 yaşında olduğunu, erkek kardeşinin olmadığını, iki kız kardeşinin olduğunu onların da çocuklarının olduğunu, amca oğullarının çocuğu olmadığını yurt dışında oldukları içinde tüp bebek tedavisi görüp görmediklerini bilmediğini ifade etmiştir. Spermiyogram analizi sonucunda semen hacminin 2 ml olduğu, sperm sayısının 15 $X10^6$/ml olduğu ve bunların %90'ının hareketsiz %10'unun ise yerinde hareketli spermler olduğu, progresif hareketin olmadığı tespit edilmiştir. Morfolojik değerlendirme sonrasında ise spermlerin hepsinde baş anomalisinin bulunduğu %85'inin ise kısa kuyruklu olduğu gözlenmiştir.

Oosit toplama günü eşinden toplam 6 oosit toplanmıştır. Oositlerin hepside olgun, MII oositler olduğu için altısına da mikroenjeksiyon işlemi

uygulanmıştır. Mikroenjeksiyondan ~16-18 saat sonra fertilizasyon kontrolü yapıldığında 5 tanesinde iki pronukleusun (2 PN) oluştuğu yani oositlerin döllendiği görülmüştür. Bir tanesinde ise sınırları çok belli olmamakla birlikte 3 pronukleusun oluştuğu görülmüş olup 3 PN olarak değerlendirilmiştir. İkinci gün embriyoların kontrolleri yapıldığında ise kaliteleri çok iyi olmasa dahi hepsinde klivajın gerçekleştiği saptanmıştır. COMET ASSAY ile DNA hasarı çalışıldığında sağlam DNA oranı % 40,85, kuyruk momenti 63,31 olarak saptanmıştır. 15 gün sonra βhCG sonucu alındığında ise gebeliğin oluşmadığı görülmüştür.

Çalışmanın sonuçları incelendiğinde spermdeki DNA hasarının pronükleus oluşumunu engellemediği, bununla birlikte oligoastenoteratozoosperminin artmış DNA hasarı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Bunun sonucunda da embriyo kalitesinin azaldığı ve gebeliğin negatif yönde etkilendiği dikkat çekmiştir.

Gebelik sonucunun negatif olması tabi ki yalnızca paternal kaynağa bağlı değildir. Madalyonun diğer yüzünü de düşünecek olursak oositin de irdelenmesi gerekmektedir. İnsan oositi paternal DNA anomalilerini tamir edebilecek kapasiteye sahiptir. Oositin bu tamir yeteneği büyük oranda oositin sitoplazmik ve genomik kalitesine bağlıdır. Tamir yeteneği yaşa, ovaryan çevreye ve fertilite düzeyine bağlı olup artan yaş ile birlikte dramatik olarak azalmaktadır.

Tamir mekanizmasının yetersiz kaldığı durumlarda embriyonik genom aktivasyonu gerçekleşmeyebilir. Bu noktada embriyonik gelişim duraksayabilir ve embriyo blastosist aşamasına kadar gidemez.

Yukarıda bahsi geçen olgunun hem sperm DNA hasarının yüksek olması hem de eşinin yaşının 35'in üzerinde olması ve dolayısı ile de tamir yeteneğinin azalması durumu daha da kötüleştirmiş ve gebelik oluşumunu negatif yönde etkilemiştir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1) Sperm hücresi için optimum lizis, proteinaz K içeren lizis solusyonunda gerçekleştirilmiş olup optimum lizis süresi 1 gece ~16-18 saat olarak belirlenmiştir.
2) Optimum elektroforez koşulunun ise 50 V'da 10 dk.'da gerçekleştiği saptanmıştır.
3) COMET çalışmaları için taze, hücresel bütünlüğü bozulmamış spermler kullanılmalıdır.
4) Normospermik grupta ortalama sağlam DNA değeri 92,49 ± 7,92, teratospermik grupta 64,32 ± 32,08, oligospermik grupta 52,32 ± 26,59, astenospermik grupta ise 47,09 ± 35,48 olarak hesaplanmıştır.
5) Sağlam DNA oranları (%) ($p<0,001$) ve Kuyruk Momenti ($p<0,005$) açısından gruplar arasında anlamlı fark bulunmaktadır. Normospermik gruptaki sağlam DNA oranı (%) diğer grupların hepsinden anlamlı olarak ($p<0,005$) daha büyük olup bu gruba ait Kuyruk Momentleri de diğer gruplardan anlamlı derecede ($p<0,05$) daha küçüktür.
6) Spermiyogram parametrelerinin birbirleri ile karşılıklı etkileşimleri incelendiğinde; motilitenin sperm sayısı ile düşük düzeyde pozitif anlamlı ilişki ($p<0,05$) gösterdiği, morfolojinin ise yaş ile düşük düzeyde negatif anlamlı ilişki ($p<0,05$), sperm sayısı ($p<0,001$) ile yüksek düzeyde pozitif anlamlı ilişki ve motilite ($p<0,001$) ile de orta derecede pozitif, istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterdiği saptanmıştır.
7) Spermdeki DNA hasarı pronukleus oluşumunu, yani fertilizasyonu engellememektedir.
8) Spermdeki DNA hasarının ise embriyo kalitesini azaltabileceği ve gebeliği negatif yönde etkileyebileceği düşünülmektedir.
9) Günümüzde rutinde kullanılan spermiyogram analizinin tanı koydurucu etkinliği sınırlıdır. Bu nedenle tanı koyduracak ve tedaviye yön verecek yeni testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu anlamda rutinde kolaylıkla uygulanabilecek ve DNA hasarını belirleyebilecek bir yöntem klinik değerlendirmede çok önemli bir destek sağlayacaktır. Sperm DNA

hasarını doğru bir şekilde ölçebilecek, pratik yeni yöntemlerin geliştirilebilmesi için çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

10) DNA hasarını ölçebilecek bir tekniğin geliştirilmesi ve sonuçlarının klinikte kullanılmaya başlanmasıyla birlikte; üremeye yardımcı tedavilerin uygulandığı merkezlerde gerek hasta gerekse hekim açısından birçok sorunun cevabı bulunabilecek ve tedavide bir adım daha ileriye gitmemizi sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Yağcı C, Küpeli S, Fitoz S, Atasoy Ç, Aydos K, Göğüş O.** Erkek İnfertilitesinde Transrektal Ultrasonografi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası,* **2002**; 55: 129- 36.

2. **Koşar P, Özçelik N.** Erkek İnfertilitesinde Genetik Değerlendirme. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi,* **2007**; 14: 48- 51.

3. **Oehninger S.** Clinical and Laboratory Management of Male Infertility: An Opinion on its Current Status. *J Androl,* **2000**; 21: 814- 21.

4. **Zini A, Libman J.** Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ,* **2006**; 175: 495- 9.

5. **Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR.** The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod,* **2002**; 17: 990- 8.

6. **Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP.** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod,* **1999**; 14: 1039- 49.

7. **Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G.** Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril,* **2000**; 73: 43- 50.

8. **Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Micheal L, Aitken RJ.** Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod,* **1998**; 4: 439- 45.

9. **Agarwal A, Said TM.** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update,* **2003**; 9: 331- 45.

10. **Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Sharma RK.** Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril,* **2002**; 78: 313- 8.

11. **Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP.** 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,* **2004**; 81: 1289- 95.

12. **Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT.** Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril,* **2001**; 75: 674- 7.

13. **Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T.** Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril,* **1997**; 68: 519- 24.

14. **Başar M, Çakan M, Emir L, Aydos K.** DNA hasarlarının erkek infertilitesindeki önemi
    Erişim: http://www.androloji.org.tr
    Erişim tarihi: 28.07.2009

15. **Lewis SEM, Connel MO, Stevenson M, Thompson – Cree L, McClure N.** An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum Reprod,* **2004**; 19: 1385-94.

16. **Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT.** Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl,* **2006**; 27: 53- 9.

17. **Türk G, Aksu EH, Bozkurt T.** Spermatozoon DNA'sı Hasarı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi,* **2006**; 20: 85- 95.

18. **Aktaş RG, Özdemir A.** Sperm DNA yapısı: Önemi ve değerlendirilme teknikleri. *Androloji Bülteni,* **2009**; 36: 39- 41.

19. **Avendano C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S.** Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril,* **2009**; 91: 1077- 84.

20. **Aktan G, Şanlı Ö, Kadıoğlu A.** Sperm kromatin hasarının tespit edilmesinde kullanılan yöntemler. *Androloji Bülteni,* **2007**; 19: 305- 8.

21. **Tağa S.** Çukurova Bölgesindeki İnfertil Erkeklerde Y Kromozomu (AZF genleri) Mikrodelesyonlarının Saptanması. *Doktora Tezi,* Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2008**.

22. **Leventerler H.** Fertil ve İnfertil Semen Örneklerinde Enerji Üretiminde Görev Alan Bazı Sitozolik ve Mitokondriyal Enzim Aktivitelerinin Karşılaştırılması. *Doktora Tezi,* Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, **2005**.

23. **Karabulut A.** Erkek infertilitesinde endokrin nedenler ve değerlendirme.
Erişim: http://www.androloji.org.tr
Erişim tarihi: 01.08.2009

24. Erkek İnfertilitesinde Kullanılan Testler
Erişim: http://www.biruni.com.tr
Erişim tarihi: 02.08.2009

25. **Delilbaşı L.** *Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuar Yöntemleri*. 1. Baskı, Ankara: Fırat ofset, **1997**.

26. **Özdener H.** Semen Analizi: Morfolojik Yaklaşım. *T Klin Tıp Bilimleri,* **1993**; 13: 408- 17.

27. **Özdener H.** Semen Analizi: Biyokimyasal Yaklaşım. *T Klin Tıp Bilimleri,***1994**; 14: 41- 6.

28. **Enginsu E, Pilavcı NK.** Spermatogenezis, erkek infertilitesinde tanıya yönelik testler ve sperm hazırlama protokolleri. In: Delilbaşı L. Ed. *İn vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri,* Ankara: Öncü Basımevi; **2008**: 61-83.

29. Makler Counting Chamber
Erişim: www.emsdiasum.com/.../magnifier/stage.aspx
Erişim Tarihi: 11.08.09.

30. Semen Evaluation
Erişim : http://www.zdlinc.com/makler_chamber.jpg
Erişim Tarihi: 11.08.2009.

31. **Vicdan K, Işık AZ.** *İn vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuar*. 1.Baskı, Ankara: Çağdaş Medikal Kitabevi, **1999**: 3- 7.

32. **Kierszenbaum AL.** *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş (Çeviri Editörü: Ramazan Demir).* 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık Tic. Ltd. Şti. **2006**: 531- 64.

33. **Enginsu E, Pilavcı NK.** Spermatogenezis, Erkek İnfertilitesinde Tanıya Yönelik Testler ve Sperm Hazırlama Protokolleri. In: Delilbaşı L. Ed. *İn vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri,* Ankara: Öncü Basımevi; **2008:** 61- 6.

34. **Kierszenbaum AL.** Transition nuclear proteins during spermiogenesis: Unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol Reprod Dev,* **2001**; 58: 357- 8.

35. Erişim: http://www.nature.com/ng/journal/v28/n1/images/ng0501_10_I1.gif
Erişim tarihi: 08.04.2010

36. **Zini A, Philips S, Courchesne A, Boman JM, Baazeem A, Bissonette F, Kadoch IJ, Gabriel M.** Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril,* **2009**; 91: 2495- 500.

37. **Ward WS, Coffey DS.** DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells. *Biol Reprod,* **1991**; 44: 569- 74.

38. **Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M.** Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod,* **2000**; 6: 219- 25.

39. Erişim: http://www.nature.com/ng/journal/v28/n1/images/ng0501_10_I1.gif
Erişim tarihi: 16.04.2010

40. **Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R.** Protamine1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev,* **2002**; 61: 519-27.

41. **Jager S.** Sperm nuclear stability and male infertility. *Arch Androl,* **1990**; 25: 253- 9.

42. **Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N.** Aberrant protamine 1/protamine 2 ratio in sperm of infertile human males. *Experientia,* **1988**; 44: 52- 5.

43. **Bench G, Corzett MH, de Yebra L, Oliva R, Balhorn R.** Protein and DNA contents in sperm from an infertile human male possessing protamine defects that vary over time. *Mol Reprod Dev*, **1998**; 50: 345-53.

44. **de Yebra L, Ballesca JL, Vanrell JA, Corzett M, Balhorn R, Oliva R.** Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil Steril,* **1998**; 69: 755-9.

45. **Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Mardani M, Bahramian H, Steger K, Oreizi F.** Effect of protamine-2 deficiency on ICSI outcome. *Reprod Biomed Online,* **2004**; 9: 652-8.

46. **Aoki VW, Liu L, Carrell DT.** Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod,* **2005**; 20: 1298-306.

47. **Fantz DA, Hatfield WR, Horvath G, Kistler MK, Kistler WS.** Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biol Reprod,* **2001**; 64: 425- 31.

48. **Yu YE, Zhang Y, Unni E, Shirley CR, Deng JM, Russell LD, Weill MM, Behringer RR, Meristrich ML.** Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1 deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA,* **2000**; 37: 4683- 8.

49. **Nayernia K, Bohm D, Topaloglu O, Schluter G, Engel W.** Rat transition nuclear protein 2 regulatory region directs haploid expression of reporter gene in male germ cells of transgenic mice. *Mlol Reprod Dev,* **2001**;58: 368-75.

50. **Caron N, Veilleux S, Boissonneault G.** Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mlol Reprod Dev***, 2001**;58: 437- 43.

51. **Zini A, Sıgman M.** Are Tests of Sperm DNA Damage Clinically Useful? Pros and Cons. *J Androl,* **2009**; 30: 219- 29.

52. **Oliva R.** Protamines and Male İnfertility. *Human Reproduction Update,* **2006**; 12: 417 – 35.

53. **Zhang X, San Gabriel M, Zini A.** Sperm nuclear histone to protamine ratio in fertile and infertile men: evidence of heterogeneous sub-populations of spermatozoa in the ejaculate. *J Androl,* **2006**; 27: 414- 20.

54. **Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ.** DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl,* **2000**; 21: 33-44.

55. **Aydemir B, Onaran İ, Kızıler AR, Alıcı B, Aksu A, Toplan S.** İdiyopatik infertil erkeklerde antioksidan sistem ile semen parametreleri arasındaki ililşkiler. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi,* **2008**; 39: 63-9.

56. **Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW.** Differantial contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *J Reprod Fertil,* **1992**; 94: 451-62.

57. **Christova Y, James PS, Jones R.** Lipid diffusion in sperm plasma membranes exposed to peroxidative injury from oxygen free radicals. *Mol Reprod Dev,* **2004**; 68: 365-72.

58. Erişim: http://www.scielo.br/img/revistas/ibju/v33n5/a02f01.gif
Erişim tarihi: 16.04.2010

59. **Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar M, Talwar P, Sharma RK, Dhawan A, Kumar R, Gupta NP, Malhotra N, Singh N, Mittal S, Dada R.** DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant levels. *Mutat Res,* **2009**; 665: 29- 36.

60. **Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T.** Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril,* **1997**; 68: 519-24.

61. **Zini A, Defreitas G, Freeman M, Hechter S, Jarvi K.** Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertil Steril,* **2000**; 74: 461- 4.

62. Erişim: http://www.scielo.br/img/revistas/ibju/v33n5/a02f02.gif
Erişim tarihi: 16.04.2010

63. **Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, Singh NP.** The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl,* **2006**; 27: 112- 20.

64. **Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR.** Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol,* **1980**; 68: 251- 306.

65. **Vermes I, Hanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C.** A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods,* **1995**; 184: 39- 51.

66. **Williams GT, Smith CA.** Molecular regulation of apoptosis: genetic control on cell death. *Cell,* **1993**; 74: 777- 9.

67. **Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP.** Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod,* **2002**; 66: 354- 60.

68. **Vinatier D, Dufour P, Subtil D.** Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,* **1996**; 67: 85- 102.

69. **Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K.** The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology,* **1997**; 138: 2081- 8.

70. **Sinha Hikim AP, Swerdloff RS.** Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod,* **1999**; 4: 38- 47.

71. **Print CG, Loveland KL.** Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays,* **2000**; 22: 423- 30.

72. **Martincic DS, Klun IV, Zorn B, Vrtovec HM.** Germ cell apoptosis in the human testis. *Pflugers Arch,* **2001**; 442: 159- 60.

73. **Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A.** Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod,* **2004**; 10: 39- 51.

74. **Kabsch K, Alonso A.** Human Papillomavrius Type 16 E5 protein impairs TRAIL and FasL- mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol,* **2002**; 76: 12162- 72.

75. **Safi Z.** İnsan Papilloma virüsün apoptozisle ilişkisi. *Zonguldak Karaelmas Ünv. Tıp Fak. Dergisi Mediforum*, **2005**; 3: 1- 6.

76. **Shehata M.** Rel/Nuclear factor-kappa B apoptosis pathways in human cervical cancer cells. *Cancer Cell Intl,* **2005**; 5: 1- 13.

77. **Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S.** The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand,* **2000**; 79: 559- 63.

78. **Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ.** Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update,* **1996**; 2: 103- 17.

79. **Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS.** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod,* **1998**; 59: 1037- 46.

80. **de Lamirande E, Gangnon C.** Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod,* **1995**; 1: 15- 21.

81. **Shen HM, Chia SE, Ong CN.** Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl,* **1999**; 20: 718- 23.

82. **Higuchi M, Singh S, Chan H, Aggarwal BB.** Protease inhibitors differentially regulate tumor necrosis factor-induced apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, cytotoxicity, and differentiation. *Blood,* **1995**; 86: 2248- 56.

83. **Narendra PS, Charles HM, Richard EB.** Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril,* **2003**; 80: 1420- 30.

84. **Morris ID.** Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl,* **2002**; 25: 255- 61.

85. **Sailer BL, Jost LK, Erickson KR, Tajiran MA, Evenson DP.** Effects of X-irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environ Mol Mutagen,* **1995**; 25: 23- 30.

86. **Fossa SD, De Angelis P, Kraggerud SM, Evenson D, Theodorsen L, Clausen OPF.** Prediction of post-treatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Cytometry,* **1997**; 30: 192- 6.

87. **Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, Patrizio P, Wallace WH, Hagerty K, Beck LN, Brennan LV, Oktay K.** American society of clinical oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol,* **2006**; 24: 2917- 31.

88. **Stähl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M, Cwikiel M, Cavallin-Stähl E, Giwercman A.** Sperm DNA integrity in testicular cancer patients. *Hum Reprod,* **2006**; 21: 3199- 205.

89. **Horak S, Polanska J, Widlak P.** Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. *Mutat Res Gen Tox En,* **2003**; 537: 53- 65.

90. **Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM.** Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res,* **1999**; 423: 103- 11.

91. **Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, Dondero F.** Nicotine, continine and trans-3-hydrocotinine levels in seminal plasma of smokers-effects on semen parameters. *Ther Drug Monit,* **1993**; 15: 358- 63.

92. **Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sika S, Hellstrom W.** Effects of smoking on testicular function semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol,* **1995**; 154: 1030- 4.

93. **Vine MF, Tse CKJ, Hu PC, Truong KY.** Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril,* **1996**; 65: 835- 42.

94. **Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN.** Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res-Fund Mol M,* **1999**; 351: 199- 203.

95. **Shen HM, Chia SE, Ni ZY, New AL, Lee BL, Ong CN.** Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol,* **1997**; 11: 675- 80.

96. **Zenses MT, Bielecki R, Reed TE.** Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril,* **1999**; 72: 330-5.

97. **Gaspari L, Chang SS, Santelle RM, Garte S, Pedotti P, Taioli E.** Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutat Res-Gen Tox Env,* **2003**; 535: 155- 60.

98. **Vine MF.** Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl,* **1996**; 19: 323-37.

99. **Ginsberg GL, Atherholt B.** Transport of DNA-adducting metabolites in mouse serum following benzo(a)pyrene administration. *Carciogenesis,* **1989**; 10: 673-9.

100. **Fraser L, Strzezek J.** The use of comet assay to asses DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochem Cytobiol,* **2004**; 42: 49- 55.

101. **Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN.** Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA,* **1991**; 88: 11003- 6.

102. **Farias SS, Casa VA, Vazquez C, Ferpozzi L, Pucci GN, Cohen IM.** Natural contamination with arsenic and other trace elements in ground waters of Argentine Pampean plain. *Sci Total Environ,* **2003**; 309: 187- 99.

103. **Leopardi P, Villani P, Cordelli E, Siniscalchi E, Veschetti E, Crebelli R.** Assessment of the *in vivo* genotoxicity of vanadate: Analysis of micronuclei on DNA damage induced in mice by oral exposure. *Toxicol Lett,* **2005**; 158: 39- 49.

104. **Muralidhara KD.** Genotoxic consequences associated with oxidative damage in testis of mice subjected to iron intoxication. *Toxicology,* **2005**; 206: 169- 78.

105. **Ateşşahin A, Karahan I, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Ceribaşı AO.** Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol,* **2006**; 21: 42- 7.

106. **Khynriam D, Prasad SB.** Cisplatin-induced genotoxic effects and endogenous glutathione levels in mice bearing ascites Dalton's lymphoma. *Mutat Res-Fund Mol M,* **2003**; 526: 9- 18.

107. **Xu DX, Zhu QX, Zheng LK, Wang QN, Shen HM, Deng LX, Ong CM.** Exposure to acrylonitrile induced DNA strand breakage and sex chromosome aneuploidy in human spermatozoa. *Mutat Res-Genc Tox Env,* **2003**; 537: 93-100.

108. **Pagano G, de Biase A, Deeva IB, Degan P, Doronin YK, Laccarino M, Oral R, Trieff NM, Warnau M, Korkina LG.** The role of oxidative stress in developmental and reproductive toxicity of tamoxifen. *Life Sci,* **2001**; 68: 1735- 49.

109. **Anderson D, Bishop JB, Garner RC, Ostrosky-Wegman P, Selby PB.** Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat Res-Fund Mol M,* **1995**; 330: 115- 81.

110. **Simula AP, Priestly BG.** Species differences in the genotoxicity of cyclophosphamide and styrene in three *in vivo* assays. *Mutat Res-En Mut R S,* **1992**; 271: 49- 58.

111. **Dearfield KL, Abernathy CO, Ottley MS, Brantner JH, Hayes PF.** Acrylamide: its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutat Res-Rev Gen Tox,* **1988**; 195: 45- 77.

112.**Hu J, Many Y, Ugnat AM.** Paternal cigarette smoking, hard liquor consumption and the risk of childhood brain tumors: A case-control study in northeast China. *Acta Oncol,* **2000**; 39: 979- 84.

113.**Klonoff-Cohen H, Bleha J, Lam-Kruglick P.** A prospective study of the effects of female and male caffeine consumption on the reproductive endpoints of IVF and gamete intra-fallopian transfer. *Hum Reprod,* **2002**; 17: 1746- 54.

114.**Pollard I.** Substance abuse and parenthood: biological mechanisms-bioethical challenges. *Women Health,* **2000**; 30: 1- 24.

115.**Shu XO, Reaman GH, Lampkin B, Sather HN, Pendergrass TW, Robison LL.** Association of paternal diagnostic X-ray exposure with risk of infant leukemia. Investigators of the childrens cancer group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,* **1994**; 3: 645- 53.

116.**Ji BT, Shu XO, Linet MS, Zheng W, Wacholder S, Gao YT, Ying DM, Jin F.** Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl Cancer Inst,* **1997**; 89: 238- 44.

117.**Malaspina D, Corcoran C, Fahim C, Berman A, Harkavy-Friedman J, Yale S, Goetz D, Goetz R, Harlap S, Gorman J.** Paternal age and sporadic schizophrenia: evidence for de novo mutations. *Am J Med Genet,* **2002**; 114: 299- 303.

118.**Duty SM, Singh NP, Ryan L, Chen Z, Lewis C, Huang T, Hauser R.** Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Human Reprod,* **2002**; 17: 1274- 80.

119.**Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ.** Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril,* **2003**; 80: 1431-6.

120.**Fischer MA, Willis J, Zini A.** Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology,* **2003**; 61: 207- 11.

121.**Zini A, Defreitas G, Freeman M, Hechter S, Jarvi K.** Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertil Steril,* **2000**; 74: 461- 4.

122.**Zini A, Blumenfeld A, Libman J, Willis J.** Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod,* **2005**; 20: 1018- 21.

123.**Werthman P, Wixon R, Kasperson K, Evenson DP.** Significant decrease in sperm deoxyribonucleic acid fragmentation after varicocelectomy. *Fertil Steril,* **2008**; 5: 1800-4.

124.**Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J.** Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: A negative effect in abnormal semen samples. *J Androl,* **2002**; 23: 717- 23.

125.**Xing W, Krishnamurthy H, Sairam MR.** Role of follitropin receptor signaling in nuclear protein transitions and chromatin condensation during spermatogenesis. *Biochim Biophys Res Commun,* **2003**; 312: 697- 701.

126.**Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A.** Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online,* **2007**; 14: 746- 57.

127. **Zalata A, Hafez T, Comhaire F.** Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum Reprod,* **1995**; 10: 1444- 51.

128. **Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP.** Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril,* **2003**; 80: 895- 902.

129. **Host E, Lindenberg S, Kahn JA, Christensen F.** DNA strand breaks in human sperm cells, A comparison between men with normal and oligozoospermic sperm samples. *Acta Obstet Gynecol Scand,* **1999**; 78: 336- 9.

130. **Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A.** Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod,* **2000**; 830- 9.

131. **Shamsi MB, Kumar R, Dada R.** Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res,* **2008**; 127: 115- 23.

132. **McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SEM, Thompson W.** Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: 1) human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and 2) human sperm and male infertility. *Mutat Res-Fund Mol M,* **1997**; 375: 93- 104.

133. **Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G.** Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod,* **2005**; 20: 3446- 51.

134. **Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A.** Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod,* **2007**; 22: 174- 9.

135. **Sun JG, Jurisicova A, Casper RF.** Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod,* **1997**; 56: 602- 7.

136. **Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ.** Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril,* **2003**; 79: 1597- 605.

137. **Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A.** The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod,* **2004**; 19: 1401- 8.

138. **Payne JF, Raburn DJ, Couchman GM, Price TM, Jamison MG, Walmer DK.** Redefining the relationship between sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay and outcomes of assisted reproductive techniques. *Fertil Steril,* **2005**; 84: 356- 64.

139. **Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D.** Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Human Reprod,* **2001**; 16: 2160- 5.

140. **Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D.** Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril,* **2004**; 82: 378- 83.

141. **Hammadeh ME, Stieber M, Haidl G, Schmidt W.** Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. *Andrologia,* **1998**; 30: 29- 35.

142. **Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF.** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril,* **1998**; 69: 528- 32.

143. **Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ.** Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod,* **1998**; 13: 1864- 71.

144. **Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, Campbell B.** Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl,* **2003**; 49: 49- 55.

145. **Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP.** Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilizaiton, blastocyst development, and ongoing pregnancy in *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril,* **2004**; 81: 1289- 95.

146. **Check JH, Graziano V, Cohen R, Krotec J, Check ML.** Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures. *Arch Androl,* **2005**; 51: 121- 4.

147. **Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, Nelson DR, Evenson DP, Toma H, Thomas AJ, Agarwal A.** DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril,* **2001**; 75: 469- 75.

148. **Agarwal A, Erenpreiss J, Sharma R.** Sperm chromatin assessment. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Eds. Textbook of Assisted Reproductive Technologies. 3rd edition, India: Replika Pres Pvt. Ltd, **2009**: 67- 84.

149. **Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E.** Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl,* **2001**; 46: 99- 104.

150. **Baker H, Liu D.** Assessment of nuclear maturity. In: Acosta A, Kruger T. Eds. *Human spermatozoa in Assisted Reproductio,* London: CRC Press, **1996**: 193- 203.

151. **Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa E, Zalkalns J.** Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl,* **2001**; 22: 45- 53.

152. **Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M.** Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod,* **2004**; 19: 2277- 82.

153. **Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D.** Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod,* **1995**; 52: 864- 7.

154. **Fernandez JL, Vazquez-Gundin F, Delgado A, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz J, de la Torre J, Gosalvez J.** DNA breakage detection- FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat Res-Fund Mol M,* **2000**; 453: 77- 82.

155. **Fernandez JL, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz J, Gosalvez J.** Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet,* **1998**; 82: 251- 6.

156. **Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi T, Bizzaro D.** Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod,* **2002**; 66: 1061- 7.

157. **Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z.** Detection of DNA strand breaks in indivual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res,* **1993**; 53: 1945- 51.

158. **Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A.** The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril,* **1996**; 66: 634- 9.

159. **Zini A, Fischer MA, Sharir S, Shayegan B, Phang D, Jarvi K.** Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men. *Urology,* **2002**; 60: 1069- 72.

160. **Ankem MK, Mayer E, Ward WS, Cummings KB, Barone JG.** Novel assay for determining DNA organization in human spermatozoa: implications for male factor infertility. *Urology,* **2002**; 59: 575- 8.

161. **Fernandez JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG.** The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl,* **2003**; 24: 59- 66.

162. **Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL, Alvarez J, Remohi J, Pellicer A, Garrido N.** Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod,* **2006**; 21: 738- 44.

163. **Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ, Meseguer M.** Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril,* **2006**; 85: 371- 83.

164. **Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Alvarez JG, Fernandez JL.** Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test and FISH analysis. *J Androl,* **2007**; 28: 38- 49.

165. **Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C.** Halosperm is an easy, available, and cost-effective alternative for determining sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril,* **2005**; 84: 860.

166. **Fernandez JL, Gozalvez J.** Application of FISH to detect DNA damage: DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH). *Methods Mol Biol,* **2002**; 203: 203- 16.

167. **Rojas E, Lopez MC, Valverde M.** Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J. Chromatogr,* **1999;** 722: 225- 54.

168. **Ostling O, Johanson KJ.** Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophy Res Commun,* **1984;** 123: 291-8.

169. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider LE.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res,* **1988;** 184 -91.

170. **Olive PL, Banath JP, Durand RE.** Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *J. Natl. Cancer Inst,* **1990;** 82: 779-83.

171. **Olive PL, Banath JP, Durand RE.** Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res,* **1990;** 122: 86- 94.

172. **McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, DeMeo MP, Collins A.** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res,* **1993;** 288: 47- 63.

173. **Olive PL, Durand RE, Banath JP, Evans HH.** Etoposide sensitivity and topoisomerase II activity in Chinese hamster V79 monolayers and small spheroids. *Int J Radiat Biol,* **1991;** 60: 453- 66.

174. **Rojas E, Valverde M, Sordo M, Ostrosky-Wegman P.** DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res,***1996;** 370: 115- 20.

175. **Singh NP, Khan H.** Acetaldehyde genotoxicity in human lymphocytes. *Mutat Res,* **1995;** 337: 9-17.

176. **Singh NP, Lai H, Khan A.** Ethanol-induced single strand DNA breaks in rat brain cells. *Mutat Res,* **1995; 345:** 191- 96.

177. **Singh NP, Stephens RE, Schneider EL.** Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol,* **1994;** 66: 23- 8.

178. **Anderson D, Yu TW, Philips BJ, Schmezer P.** The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. *Mutat Res,* **1994**; 307: 261- 71.

179. **Aitken RJ.** The Amoroso Lecture The human spermatozoon- a cell in crisis?. *J Reprod Fertil,* **1999**; 115: 1- 7.

180. **Sun JG, Jurisicova A, Casper RF.** Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod,* **1997**; 56: 602- 7.

181. **Muratori M, Maggi M, Spinelli S, Filimberti E, Forti G, Baldi E.** Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *J Androl,* **2003**; 24: 253- 62.

182. **Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj Samia, Salle B, Lejeune H, Guerin JF.** Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod,* **2003**; 18: 1023- 8.

183. **Barroso G, Morshedi M, Oehninger S.** Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod,* **2000**; 15: 1338- 44.

184. **Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A.** Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl,* **2006**; 8 :11-29.

185. **Evenson DP, Larson KL, Jost LK.** Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl,* **2002**; 23: 25- 43.

186. **Evenson D, Wixon R.** Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online,* **2006**; 12: 466-72.

187. **Li Z, Wang L, Cai J, Huang H.** Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Asist Reprod Genet,* **2006** ; 23: 367- 76.

188. **Shen HM, Ong CN.** Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Rad Biol Med,* **2000**;28: 529-36.

189. **Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T.** Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril,* **1997**; 68: 519- 24.

190. **Singh NP, Stephens RE.** X-ray-induced DNA double-strand breaks in human sperm. *Mutagenesis,* **1998**; 13: 75- 9.

191. **Sofikitis N, Miyagawa I, Dimitriadis D, Zavos P, Sikka S, Hellstrom W.** Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J Urol,* **1995**; 154: 1030- 4.

192. **Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED.** Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl,* **2000**; 21: 145- 53.

193. **Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G.** Lack of association between smoking and DNA fragmentation in spermatozoa of normal men. *Hum Reprod,* **2000**; 15: 1314-21.

194. **Vogt HJ, Heller WD, Borelli S.** Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never smokers. *Fertil Steril,* **1986**; 45: 106- 10.

195. **Vine MF.** Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl,* **1996**; 19: 323- 37.

196. **Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM.** Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU International,* **2004**; 97: 324- 6.

197. **Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K.** The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod,* **2002**; 17: 1554- 9.

198. **Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ.** The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod,* **2007**; 22: 180- 7.

199. **Schmid TE, Kamischke A, Bollwein H, Nieschlag E, Brinkworth MH.** Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and the Comet assay. *Hum Reprod,* **2003**; 7: 1474- 80.

200. **Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chan SR, King A.** Asimple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril,* **2001**; 75: 186- 92.

201. **Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE.** Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod,* **2001**; 16: 1191- 9.

202. **Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP.** Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod,* **2000**; 15: 1717- 22.

203. **Oosterhuis GJE, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, Schoemaker J, Vermes I.** Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality?. *Fertil Steril,* **2000**; 74: 245- 50.

204. **Trisini AT, Singh NP, Duty SM, Hauser R.** Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertil Steril,* **2004**; 82: 1623- 32.

205. **Evenson DP, Jost LK, Baer RK, Turner TW, Schrader SM.** Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod Toxicol,* **1991**; 5: 115- 25.

206. **Sökmensüer L, Delilbaşı L.** Fertilizasyon. In: Delilbaşı L. Ed. *İn vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri,* Ankara: Öncü Basımevi; **2008**: 105- 16.

207. **Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD.** Preliminary observation on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time lapse video cinematography. *Hum Reprod,* **1995**; 12: 532- 41.

208. Erişim: www.tupbebek-genetik.com/.../embriyoloji/
Erişim tarihi: 24.09.2010

209. **Çetin MT, Tokat ZG.** Yardımla Döllenme. In: Serdaroğlu H. Ed. *In Vitro Fertilization Pratik Yaklaşım,* İstanbul: Hayat Tıp Kitapçılık; **2008**: 161- 82.

209. Erişim: www.danfert.dk/Fertilisation_Failure.aspx
Erişim tarihi: 24.09.2010

211. **Özcan C.** Embriyoner gelişim. In: Delilbaşı L. Ed. *İn vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri,* Ankara: Öncü Basımevi; **2008**: 117- 26.

ÖZGEÇMİŞ

1979 Adana doğumlu olan Ayşen Durmaz, Adana Özel Akdeniz Lisesi'ni bitirdikten sonra 1997 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya bölümünü kazanmıştır. 2002 yılında bu bölümden mezun olarak aynı yıl Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başlamıştır. 2005 yılında Yüksek Lisans programını tamamlayarak aynı anabilim dalında Doktora eğitimine başladı. 2006 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından yürütülmekte olan Embriyoloji eğitimini Ege Üniversitesi Aile Planlaması İnfertilite (Kısırlık) Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde tamamlamış ve 2007 yılında bu merkezde çalışmaya başlamıştır. Halen Ege Üniversitesi Aile Planlaması İnfertilite (Kısırlık) Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çalışmaya devam etmektedir.