

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SEMİNAL PLAZMA REAKTİF OKSİJEN
TÜRLERİNİN (ROS) SPERM DNA
FRAGMENTASYONU VE APOPTOZU
SÜRECİNDE İNFERTİLİTEYE OLAN
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ŞULE DOĞAN

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR - 2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SEMİNAL PLAZMA REAKTİF OKSİJEN
TÜRLERİNİN (ROS) SPERM DNA
FRAGMENTASYONU VE APOPTOZU
SÜRECİNDE İNFERTİLİTEYE OLAN
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞULE DOĞAN

YRD.DOÇ.DR. ÇETİN PEKÇETİN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından proje
2008.KB.SAG.003 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İçindekiler	ii
Şekiller Dizini	v
Tablolar Dizini	vi
Resimler Dizini	vii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
Teşekkür	x
Özet	xi
Summary	xiii

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. SPERMATOGENEZ	2
2.1.1 .SPERMATOGONİAL FAZ.....	2
2.1.2. SPERMATOSİT FAZ (MAYOZ):	3
2.1.3. SPERMATİD FAZ (SPERMİOGENEZ):	3
2.1.3.1. Akrozom Gelişimi	3
2.1.3.2. Flagellumun (kamçı) Gelişimi	4
2.1.3.3. Nükleer yoğunlaşma	5
2.1.3.3.1. Protamin/Histon değişimi.....	5
2.1.4. SPERMATOZOON YAPISI.....	6
2.1.4.1. Baş Bölgesi.....	6
2.1.4.2. Boyun Bölgesi.....	7
2.1.4.3. Kuyruk Bölgesi:	7
2.2. SPERMATOZOON DNA HASARI	8
2.2.1. MİTOKONDRİAL DNA HASARI.....	8
2.2.2. NÜKEER DNA HASARI VE KAYNAĞI	8
2.2.3. SPERMATOZOON DNA’SINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	9
2.2.4. SPERMATOZOON DNA HASARI BELİRLEME YÖNTEMLERİ.....	9
2.2.4.1. Asidik Anilin Mavisı Boyaması	9
2.2.4.2. Toluidine Mavisı Boyaması	10
2.2.4.3. Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi.....	10
2.2.4.4. DBD-FISH (DNA breakage detection-fish) Yöntemi	10
2.2.4.5. İn Situ-Nick Translasyon (NT)Yöntemi	10
2.2.4.6. Akridin Oranj (AO) Boyaması	10
2.2.4.7. Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD) - HALOSPERM®.....	11
2.2.4.8. COMET yöntemi	11
2.2.4.9. TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) Yöntemi.....	11
2.2.4.10. SCSA (Sperm Kromatin Strüktür Analizi)	11
2.2.4.11. Yüksek Performanslı Likit Kromatografi Yöntemi.....	12
2.2.5. SPERMATOZOON DNA HASARI VE KLİNİK ÖNEMİ.....	12
2.2.5.1. Spermatozoon DNA Hasarı ve Erkek İnfertilitesi.....	12

2.2.5.2.	Spermatozoon DNA hasarı ve Yardımlı Üreme Teknikleri.....	12
2.3.	APOPTOZİS	13
2.3.1.	APOPTOZİSİN GÖRÜLDÜĞÜ OLAYLAR	14
2.3.2.	MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER	15
2.3.2.1.	Morfolojik Değişiklikler	15
2.3.2.2.	Biyokimyasal Değişiklikler.....	15
2.3.3.	APOPİTOZİS MEKANİZMALARI	16
2.3.3.1.	Ekstresek / Reseptör Aracılı Yol	16
2.3.3.2.	İntresek / Mitokondrial Yol.....	17
2.3.4.	APOPİTOZİS REGÜLATÖRLERİ	18
2.3.4.1.	P53	18
2.3.4.2.	BCL-2 Ailesi Proteinleri	19
2.3.4.3.	IAF Ailesi Proteinleri.....	19
2.3.4.4.	Kaspazlar.....	19
2.3.5.	SPERMATOGENEZ VE APOPİTOZİS	20
2.4.	REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)	21
2.4.1.	ROS'UN HÜCRESEL SUBSTRATLARI.....	22
2.4.2.	ANTIÖKSİDANLAR	23
2.4.3.	İNSAN SEMENİNDE ROS 'UN KAYNAĞI	24
2.4.3.1.	Lökosit	24
2.4.3.2.	Spermatozoon.....	24
2.4.5.	SPERM ANTIÖKSİDAN SİSTEMİ.....	25
2.4.6.	OKSİDATİF STRES VE ERKEK İNFERTİLİTESİ	25
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1.	SEMEN ANALİZİ.....	30
3.1.1.	MAKROSKOBİK DEĞERLENDİRME.....	30
3.1.2.	MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME.....	30
3.1.2.1.	STAT III™ Boyama Prosedürü	32
3.1.2.2.	Kruger'in Kesin Kriterleri.....	32
3.1.2.3.	Eozin Testi Prosedürü.....	34
3.1.2.4.	Lökosit Boyama Metodu Leucoscreen® Testi.....	34
3.2.	DNA FRAGMENTASYON ANALİZİ.....	35

3.3.	APOPİTOZİS BELİRLENMESİ.....	36
3.3.1.	ANNEXIN V BOYAMA PROSEDÜRÜ	36
3.4.	ROS VE ANTİOKSİDAN TAYİNİ	37
3.4.1.	SPEKTROFOTOMETRİK MDA ÖLÇÜMÜ	37
3.4.2.	SPEKTROFOTOMETRİK GPX ÖLÇÜMÜ	38
3.4.3.	TOTAL PROTEİN ÖLÇÜMÜ	38
3.5.	ULTRASTRÜKTÜREL DEĞERLENDİRME.....	38
3.5.1.	ELEKTRON MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ.....	38
4.	BULGULAR.....	40
4.1.	SEMEN ANALİZİ.....	40
4.1.1.	SPERMATOZOON SAYISI.....	40
4.1.2.	MOTİLİTE.....	40
4.1.3.	MORFOLOJİ.....	43
4.1.4.	VİTALİTE VE LÖKOSİT PEROKSİDASYONU	45
4.2.	DNA FRAGMENTASYONU-TUNEL BULGULARI	46
4.3.	APOPİTOZİS BULGULARI.....	48
4.4.	ROS VE ANTİOKSİDAN DÜZEYLERİ	50
4.5.	ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR.....	54
5.	TARTIŞMA.....	70
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
7.	KAYNAKLAR.....	81

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Spermatogenez.....	4
Şekil 2. Spermatozoon Kromatin Paketlenmesi	5
Şekil 3. Apoptozis Mekanizmaları	17
Şekil 4. Apoptozom Oluşumu	18
Şekil 5. Reaktif Nitrojen /Oksijen Türleri	22
Şekil 6. Oksidatif Stres Ve Erkek İnfertilitesi	26
Şekil 7. Olguların Günlük Sigara Tüketimi	30
Şekil 8. Semen Analizi.....	32
Şekil 9. Spermatozoon Morfoloji Kriterleri	33

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. Gruplar arasında Sperm Sayısı, Motilite Bulguları.....	41
Tablo 2. Sigaranın Gruplar arasında Bazal Değerlere Etkisi	42
Tablo 3. Morfolojik Kriterlerin Değerlendirilmesi.....	43
Tablo 4. Sigaranın gruplar arasında Morfolojiye Etkisi.....	44
Tablo 5. Gruplarda Eosin , Leucoscreen™ Testi.....	45
Tablo 6. Sigaranın Gruplar arasında Vitalite Ve Peroksidasyona Etkisi	46
Tablo 7. Normozoospermia Ve Astenoospermia Tunel- Apoptozis Değerleri	46
Tablo 8. Sigaranın Gruplarda Tunel – Apoptozis Düzeylerine Etkisi	47
Tablo 9. Tunel ile Diğer Parametrelerin Korelasyon Analizi.....	48
Tablo 10. Apoptozis İle Diğer Parametreler Arasındaki İlişki.....	49
Tablo 11. Gruplar arasında Mda, Gpx, Total Protein Düzeyleri	50
Tablo 12. Sigaranın gruplarda Mda, Gpx, Total Protein Düzeylerine Etkisi.....	51
Tablo 13. Mda ve Diğer Parametrelerin Korelasyon Analizi.....	52
Tablo 14. Gpx Düzeyleri Korelasyon Analizi	53
Tablo 15. Sigaranın ROS, TUNEL, Apoptozis ile Doz Bağımlı İlişkisi.....	54
Tablo 16. Elektron Mikroskopik Spermatozoon Histopatolojisi.....	56

RESİM DİZİNİ

	Sayfa
Resim 1 Işık mikroskopik STAT III boyaması	57
Resim 2 Işık mikroskopik Eosin boyaması.....	58
Resim 3 Işık mikroskopik Leucoscreen™ boyaması.....	59
Resim 4 Floresan mikroskopik TUNEL boyaması Astenozoospermia olgusu.....	60
Resim 5 Floresan mikroskopik TUNEL boyaması Normozoospermia olgusu.....	61
Resim 6 Floresan mikroskopik Annexin V boyaması Astenozoospermia olgusu.....	62
Resim 7 Floresan mikroskopik Annexin V boyaması Normozoospermia olgusu.....	63
Resim 8 Elektron mikroskopik Normozoospermia sigara içen olgu.....	64
Resim 9 Elektron mikroskopik Normozoospermia sigara içen olgu.....	65
Resim 10 Elektron mikroskopik Astenozoospermia sigara içmeyen olgu.....	66
Resim 11 Elektron mikroskopik Astenozoospermia sigara içmeyen olgu.....	67
Resim 12 Elektron mikroskopik Astenozoospermia sigara içen olgu	68
Resim 13 Elektron mikroskopik Astenozoospermia sigara içmeyen olgu	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama	
Aif	Apoptosis-Inducing Factor	Apoptozu Uyarıcı Faktör
AO	Acridine orange	Akridin oranj
Apaf	Apoptotic Protease Activating Factor	Apoptotik Proteaz Etkinleştirici Faktör
Bcl-2	B Leukemia Cell 2	B Lösemi Hücre 2
Kaspas	cysteiny aspartate-specific proteases	Sistein Aspartat-Spesifik proteaz
Ced	<i>Caenorhabditis Elegans</i> Cell Death Gene	<i>Caenorhabditis Elegans</i> Hücre Ölüm Geni
Dd	Death Domain	Ölüm Ucu
Ded	Death Effector Domain	Ölüm Oluşturan Bölge
Disc	Death-Inducing Signalling Complex	Ölümü Başlatan Sinyalleme Yapısı
Dann	Deoxyribonucleic Acid	Deoksiribonükleik Asit
Fadd	Fas Associated Death Domain	Fas'a Bağlı Ölüm Bölgesi
Fitc	Fluorescein Isothiocyanate	Floresan Boyası
Gpx	Glutathione peroxidase	Glutasyon Peroksidaz
Hos	Hypo-Osmotic Swelling	Hipoozmotik Şişme Testi
Iap	Inhibitor Of Apoptosis Protein	Apoptozu Baskılayan Protein
Icam	Intercellular Adhesion Molecule	Hücrelerarası Adhezyonmolekülü
Ivf	In Vitro Fertilization	In Vitro Fertilizasyon
Mda	malondi-. aldehyde	Malondialdehit
P53	Tumor protein 53	tümör protein 53 (TP53),
Pas	Periodic-Acid Schiff	Periyodik-Asit Schiff
PI	Propidium iodide	Propidyum iyodür

Ps	Phosphatidylserine	Fosfatidilserin
Rna	Ribonucleic Acid	
Ros	Reactive Oxygen Species	Reaktif Oksijen Türleri
Scd	Sperm Chromatin dispersion	Sperm kromatin dağılımı
Scsa	Sperm Chromatin structure assay	Sperm kromatin strüktür anaizi
Sdi	Sperm Deformity Index	Sperm Deformite İndeksi
Sodd	Silencer Of Death Domain	Ölüm Bölgesi Susturucusu
TNF	Tumor Necrosis Factor	Tümör Nekroz Faktör
TNFR	Tumour Necrosis Factor Receptor	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
Tradd	Tnfr Associated Death Domain	Tnfr'e Bağlı Ölüm Bölgesi
Traf	Tnf Receptor-Associated Factor	Tnf Reseptörü İle İlişkili Faktör
Trail	Tnf-Related Apoptosis-Inducing Ligand	Tnf'yle İlişkili Apoptozu Uyarıcı Bağ
Tunel	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-Dutp Nick End Labeling	

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, Histoloji ve Embriyoloji Bilimi sevgisini aşıl原因an, yetişmemde büyük emekleri olan ve öğrencileri olmaktan şans duyduğum başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Candan Özoğul' a, tez danışmanım Sayın Yrd. Doç Dr. Çetin Pekçetin'e ve anabilim dalındaki tüm hocalarıma bana verdikleri destek ve katkıları için sonsuz şükranlarımı sunarım.

Yine bu süreçte lisansüstü eğitimi alırken DEÜTF Tüp Bebek Merkezinde staj olanağı sağlayan başta Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent Güleklil olmak üzere, anabilim dalı diğler hocalarına ve çalışanlarına destekleri için teşekkür ederim.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışmalarımın her aşamasında laboratuvar bilgilerini esirgemededen bana sunan Dr. Müge Kiray, Bio. Özcan Üstün'e ve Bio. Sedef Menkü' ye, ayrıca ARLAB çalışanlarına teşekkür ederim.

Bilgisini, sabrımı zorladığım ama her zaman bıkmadan bana yardımcı olan, Bio. Fulya Aydın'er'e, moral kaynağım olan ve birlikte olmaktan huzur ve mutluluk duyduğum yüksek lisans arkadaşlarım Bio. Müge Kovalı ve Bio. Ceyda Yıldız'a teşekkür ederim.

Bana verdikleri sevgi ve fırsatlarla bugünlere gelmemde büyük özverileri olan aileme anlayış ve sabırları için teşekkür ederim.

**SEMİNAL PLAZMA REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN (ROS) SPERM DNA
FRAGMENTASYONU VE APOPİTOZU SÜRECİNDE İNFERTİLİTEYE OLAN
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
ÖZET**

ŞULE DOĞAN

Spermatozoon DNA hasarının infertilitedeki önemi şimdiye kadar farklı mekanizmalarla birçok araştırmacı tarafından açıklanmaya çalışıldı. Bu mekanizmalardan protaminasyon, apoptoz ve oksidatif stres üzerinde duruldu. Sigaranın insanda semen kalitesini ve erkek faktörlü fertilitiyi ROS düzeyini artırarak etkilediğine dair yayınlar bulunmakla birlikte sigara ile spermatozoon parametreleri arasında anlamlı ilişkinin saptanmadığı yayınlarda mevcuttur. Biz bu çalışmada sigara içimine bağlı olarak seminal plazma reaktif oksijen türlerinin, sperm DNA fragmentasyonu ve apoptozu sürecinde infertiliteye olan etkisinin değerlendirilmesini amaçladık.

Sigara içen ve içmeyen 27 Astenozoospermia'lı, kontrol grubu olarak da sigara içen ve içmeyen 23 Normozoospermia'lı olmak üzere toplam 50 olgu çalışma kapsamına alındı. Bütün olgulardan toplanan semen örnekleri, makroskopik, mikroskopik, enzim aktivitesi ve morfometrik açıdan değerlendirildi. Reaktif oksijen türlerinin düzeyleri malondialdehit (MDA), antioksidanlardan Glutasyon peroksidaz (GPX) enzimi ve total protein miktarları ölçülerek belirlendi. Mikroskopik değerlendirmede sperm sayısı ve motilitesi WHO (Dünya Sağlık örgütü) kriterlerine göre, morfolojisi de Kruger'in kesin kriterlerine göre değerlendirildi. Eosin testi uygulanarak ışık mikroskopunda spermatozoon vitalitesi değerlendirildi. Her bir olgudan alınan semen örnekleri sırasıyla DNA fragmentasyonunu belirlemek için direkt TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) protokolü, apoptozu belirlemek için TUNEL pozitif oranının %10 ve üzeri olduğu olgularda Annexin V testi uygulandı. Ultrastrüktürel inceleme için transmisyon elektron mikroskobu kullanıldı.

Çalışmamızda ROS düzeyinin yüksek bulunduğu astenozoospermia hasta grubunda spermatozoon DNA fragmentasyonu, kontrol grubundan daha fazlaydı. DNA fragmentasyonu ile semen parametreleri, vitalite arasında negatif korelasyon bulundu. Normozoospermia ve astenozoospermia olguları birbirleriyle karşılaştırıldığında sigaranın semen parametrelerine (konsantrasyon, motilite, morfoloji) etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı. Sigara içen normozoospermia ve astenozoospermia olgularında içmeyenlere göre DNA fragmentasyonu daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Reaktif oksijen türleri (ROS) ile semen parametreleri, vitalite gruplar arasında farklı olmakla birlikte

istatistiksel açıdan ilişki bulunmadı. Ayrıca spermatozoon DNA fragmantasyonu ile apoptoz arasındaki pozitif korelasyon istatistiksel açıdan da anlamlıydı. Apoptoz ile ROS arasında doğrudan bir ilişki gösterilemedi.

Sonuç olarak sigara içiciliği ile artan ROS düzeyinin apoptozu indüklediğini ve dolayısıyla infertilitede doğrudan etkili olduğunu iddia eden çalışmaların aksine bu çalışmada sigara içiciliğinin ROS düzeyine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış apoptoz ve infertiliteye etkisi belirlenmemiştir. İnfertillerde sigara içimiyle ROS'un doz bağımlı olarak arttığı bununda apoptozisten farklı bir mekanizma ile DNA fragmantasyonu oluşturduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelime: Sperm, DNA fragmantasyonu, TUNEL, Apoptoz, Annexin V, ROS

EVALUATION FOR THE EFFECT OF SEMINAL PLASMA REACTIVE OXYGEN SPECIES ON INFERTILITY DURING SPERM DNA FRAGMENTATION AND APOPTOSIS

The source for spermatozoon DNA damage and its significance in infertility have been explained with various mechanisms by researchers so far. The emphasized subjects were protamination, apoptosis and oxidative stress. While there are papers submitting that smoking affects the semen quality in human, there are also papers which establish no significant relation between the parameters of smoking and spermatozoon. On this study, we intend to evaluate the effect of seminal plasma reactive oxygen species on infertility during sperm DNA fragmentation and apoptosis.

Totally 50 cases were evaluated in the scope of the project. Semen samples were analyzed from twenty seven patients with asthenozoospermia and twenty three patients with normozoospermia (Smoking and non-smoking). Sperm concentration and motility rates were evaluated microscopically in accordance with World Health Organization (WHO) criterias while its morphology was assessed according to the Kruger's strict criterias by using STAT III stain. For vitality, Eosin Y assay applied to the semen samples and assessed with light microscopy. Semen samples were separated to three groups after each case. TUNEL assay was used to detect of DNA fragmentation, MDA assessment for ROS, GPX for antioxidant enzyme respectively. Annexin V assay used to determine apoptosis in TUNEL positive cases when apoptosis rate was $>10\%$. Apoptosis was evaluated ultrastructurally by transmission electron microscopy.

We saw that there is no significantly difference between smoking and semen parameters (concentration, motility, morphology) in cases with normozoospermia and asthenozoospermia . There was difference DNA fragmentation between asthenozoospermia and control group (normozoospermia). A negative correlation was found between DNA fragmentation and semen parameters, vitality. A significantly difference was found between the levels of MDA and GPX in two groups. MDA was no significant in spite of difference between smoking and non smoking groups. There was no significant difference between ROS and semen parameters, vitality in two groups. A positive correlation was found between ROS and DNA fragmentation. A negative correlation was found between ROS and GPX. These findings were supported by ultrastructurally.

Consequently, on the contrary with papers claiming that ROS levels increased in smokers induce apoptosis and so directly affect the infertility, in this paper, the effect of smoking on ROS levels is not found statistically significant and so its effect on apoptosis and infertility is not established.

Keyword: Sperm, DNA fragmentation, TUNEL, Apoptosis, Annexin V, ROS

1. GİRİŞ VE AMAC

İnfertilite sorununun yaklaşık %50'si erkek faktörü kaynaklıdır. İlk mikroenjeksiyon uygulaması 1992 yılında gerçekleşmiş, o zamandan günümüze erkek infertilitesine çözüm arayışları için yardımcı üreme teknikleri çalışmaları gelişmiş, hızlanmış ancak hala yanıt bekleyen bir çok soru kalmıştır. Bu sorulardan biri de spermatozoonda oluşan DNA hasarının nedenleridir.

Spermatozoon DNA hasarının infertilitedeki önemi in vivo ve in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. DNA hasarlı spermatozoon oranı arttıkça doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır. Yüksek oranda DNA hasarlı spermatozoon bulunan ejakulattan alınan spermatozoa, IUI (intra uterin inseminasyon), IVF (in vitro fertilizasyon) ve ICSI (intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu)'de sorun yarattığını iddia eden çalışmalar vardır. Bu soruna yanıt arayan araştırmacılar DNA fragmentasyonunun kaynağının açıklanmasına odaklanmıştır. Ortaya çıkan veriler fragmentasyonun maturasyon sürecinde oksidatif stres sonucu yada apoptotik yolla oluşabileceğini düşündürmektedir.

Seminal plazmadaki ROS'a bağlı spermatozoonda ortaya çıkan değişikliklerin immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve morfometrik olarak incelendiği bu çalışmanın amacı sigara içimiyle artan ROS düzeylerinin, DNA hasarı ve apoptozis üzerindeki etki mekanizmasını ortaya koymaktır. Bu da semen parametreleri, spermatozoonda DNA hasarı, apoptozis ve spermatozoon ultrastrüktüründeki değişiklikler belirlenerek açıklanabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SPERMATOGENEZ

Spermatogenez, spermatogoniumların proliferasyonu, mayoz ve spermiyogenez aşamalarından oluşan erkek germ hücre gelişiminde kompleks bir süreçtir. Bu sırada sitoplazmik yapı değişir, somatik hücre histonları protaminlerle yer değiştirir (1). Spermatogenez ergenlikten önce başlar, gonadotropin düzeyinin yükselmesinin etkisiyle yaşam boyunca devam eder (2,3). Spermatogenez; spermatogonial, spermatosit ve spermatid faz olmak üzere 3 ayrı evreden oluşur (4).

2.1.1. SPERMATOGONİAL FAZ

Spermatogoniumlar, bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Spermatogoniumlar pubertede başlayan başarılı mitotik hücre bölünmeleri geçirirler. Sertoli hücreleri ile arasındaki sıkı bağlantıların altında yer alırlar ve bu nedenle kan-testis bariyerinin dışında kalırlar (1,4). Morfolojik olarak 3 tip spermatogonial hücre tanımlanmıştır:

Koyu Tip A (Ak) Spermatogoniumlar: 12 µm çapında, ovoid çekirdekli yuvarlak şekilli heterokromatinden zengin hücrelerdir. Seminifer tübüllerdeki kök hücre rezervini oluştururlar ve mitozla bölünerek diğer Koyu tip A spermatogoniumlar ve Açık tip A spermatogoniumları oluşturma yeteneğindedir. Bu hücreler düzensiz aralıklarla bölünerek kök hücre olarak kalabilecekleri gibi, koyu tip A (Ak) Spermatogoniumları ya da açık tip A (Aa) Spermatogoniumları da oluşturabilirler (1,4). Hangi Ak spermatogoniumun kendini yenileyeceği hangisinin ise Aa ve B spermatogoniumları oluşturacağını belirlenmesinde kesin olmamakla birlikte bir görüşe göre c-kit transmembran tirozin kinaz reseptörü sorumludur. Bu reseptör varlığında hücreler spermatositleri yapacak şekilde çoğalırlarken, olmadığında kendilerini yenilemeye devam ederler (5).

Açık Tip A (Aa) Spermatogoniumlar: Açık renk boyanan çekirdekleri ovaldir ve ince granüler kromatine sahiptir. Granüllü endoplazmik retikulum(GER), mitokondri ve çok az miktarda golgi aygıtı içerir. Aa Spermatogoniumlar, proliferasyon aşamasında testosteronla uyarılır. Mitoz bölünme geçirerek sayılarını arttırarak Tip A ve tip B Spermatogoniumları oluştururlar.

Tip B Spermatogoniumlar: En çok bulunan spermatogonium tipidir. Bazal lamina üzerine oturmalarına rağmen bazal lamina ile bağlantıları daha azdır. Sentrik çekirdekleri

yuvarlaktır. Çekirdekte bir ya da iki koyu boyanan çekirdekçik bulunur. Sitoplazmasında diğer A tiplerine göre daha fazla ribozom bulunur. Oval yerine yuvarlak olan nükleusları dışında açık tip A Spermatogoniumlara benzerler. Mitoz geçirerek primer spermatositleri meydana getirirler. Tip B Spermatogoniumlar, mayoz bölünme geçirecek olan çapları 18 mikrona ulaşan primer spermatositlere dönüşür (1, 4).

2.1.2. SPERMATOSİT FAZ (MAYOZ):

Tip B Spermatogoniumlar mitozdan hemen sonra, DNA sentezindeki S fazını tamamlar ve mayoz bölünmenin profaz aşamasına girer. Birinci mayoz bölünme yaklaşık 22 gün süren uzun bir profaz evresi ile karakterizedir. Uzun olan bu profaz evresinden sonra, kardeş kromatid çiftleri metafaz I, anafaz I ve telofaz I evreleri geçirir ve sekonder spermatositlere dağılır (6). Birinci mayoz bölünmede profaz; leptoten (ipliksi), zigoten (eşleşen), pakiten (kalınlaşan), diploten (çift görünen) ve diyakinez (uzaklaşan) alt evrelerinden oluşur (2,3).

Spermatositler iki mayotik hücre bölünmesi sonrasında sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal bölümünde yer alırlar. Böylece, mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşir (1). Sekonder spermatositler hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve ikinci mayoz bölünmeyi geçirir. Her bir diploid sekonder spermatosit iki adet haploid spermatid meydana getirir. Birinci mayoz bölünme günlerce süren bir süreç olmasına rağmen ikinci mayoz bölünme dakikalar sürdüğünden seminifer tübüllerde primer spermatositler en çok gözlenen hücrelerdir. Meydana gelen spermatidler spermiogenez sürecine girerler (6).

2.1.3. SPERMATİD FAZ (SPERMİOGENEZ):

Spermiogenez olarak adlandırılan süreçte önce yuvarlak olan spermatidler uzamış yapıdaki spermatidleri yaparlar. Üç ana olay spermiyogenez karakterize eder:

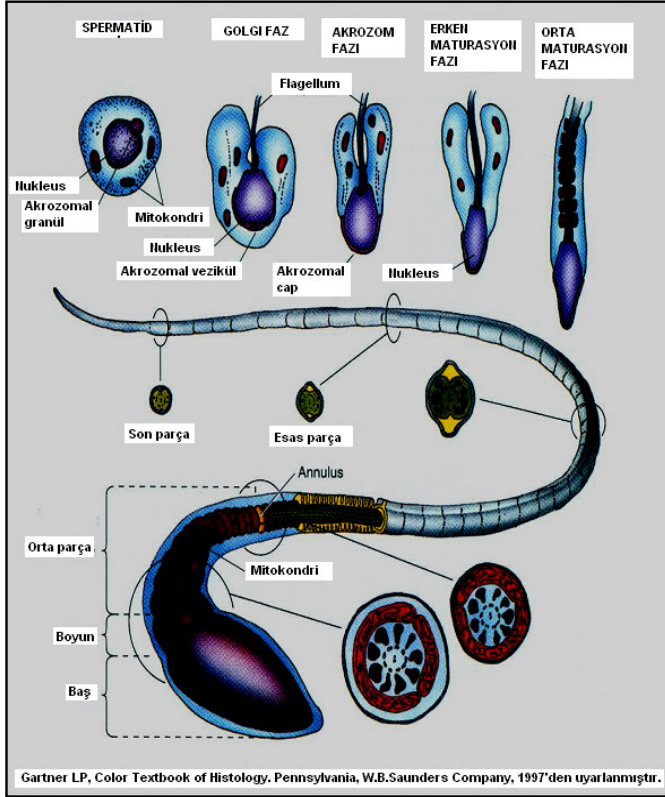
2.1.3.1. Akrozom Gelişimi

Fertilizasyon için şart olan hidrolitik enzimlerin depolanması ve sürekli sentezinin gerçekleştiği akrozomal kesenin oluşumudur. Akrozomun gelişmesinde; golgi evresi, kep evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi olmak üzere 4 olay gerçekleşir (Şekil 1).

Golgi Evresi: Spermatidlerin sitoplazmasında nükleusun yanında belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve endoplazmik retikulum

bulunur. PAS (Periyodik-asit Schiff) ile boyanan glikoproteinden zengin proakzomal granüller golgi aygıtında birikir sonra bu granüller tek bir zarla çevrilir (4).

Kep Evresi: Akrozom vezikülü ve granülünden akrozom başlığı oluşur ve çekirdeğin tüm ön kısmını kaplar. Akrozom başlığı akrozom içeriğini saracak şekilde iç ve dış akrozom zarlarını oluşturur. Çekirdek zarı ve iç akrozom zarı arasında granüler filamentöz bir madde meydana gelir. İç taraftaki kromatin yoğunlaşması nedeniyle daha yoğun görünür (4).



Akrozom Evresi: Spermatisit çekirdeği ön kısmı, seminifer tübüllerin bazaline doğru döner. Spermatisit sitoplazması, seminifer tübül epitelinin luminal bölgesine doğru yer değiştirir. Çekirdeğin akrozom bölgesi plazma zarına yaklaşır, çekirdek progresif olarak yassılaşır ve uzar. Bu sırada kromatin granülleri genişler, boyları eşitlenir bazı boşluklar dışında homojen bir biçimde dağılır. Golgi kompleksi, akrozom büyümesini tamamladığında çekirdeğin ön kutbundan sitoplazmanın bol olduğu bölgeye göç eder (4).

Şekil 1. Spermatogenez

Olgunlaşma Evresi: Bu evrede spermatisit sitoplazması atılır ve sertoli hücrelerince fagosite edilir. Kreatin kinaz konsantrasyonu, spermatogenezin son fazı sırasındaki fazla sitoplazmanın atılma derecesini gösterir (7). Daha sonra sertoli hücreleri geç spermatisitlerin tübül lümenine doğru serbest hale gelmesini sağlar (4).

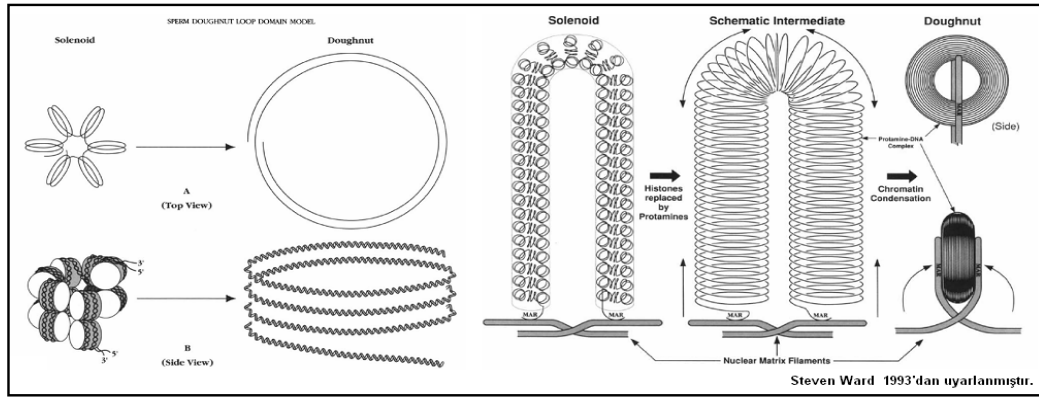
2.1.3.2. Flagellumun (kamçı) Gelişimi

Flagellum, distal sentriyolden gelişir. Keratin içeren dış yoğun lifler ve fibröz kılıf ile çevrili eşmerkez dizilimli 9+2 mikrotübül aksonem yapısındadır. Mitokondriler kuyruğun orta parçasında sarmal benzeri bir kılıf oluşturur, spermatisit olgunlaşma evresi sırasında gelişip, flagellum boyunca dizilimlerini tamamlarlar (4). İmmatür spermatozoon kuyruk

uzunluklarının daha kısa olduğu ve kuyruk uzunluk oranının, geniş baş ekseninin spermatozoon matüritesi için çok hassas bir işaret olduğu düşünülmüştür (8) (Şekil 1).

2.1.3.3. Nükleer yoğunlaşma

Somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nükleer yoğunlaşma (kromatin paketlenmesi) oluşur. Bu da spermatozoon genomik DNA'sını stabilize eder ve korur. Somatik histonların protaminlere dönüşümünden sonra, nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilirler. Çekirdek uzar ve yoğunlaşır, manşet kaudal yönde göç eder. Olgunlaşma, çekirdek yoğunlaşır, manşet dağılmaya başladığında ve dış yoğun lifler tamamen organize olduğunda tamamlanır. Spermiogenezin olgunlaşma aşamasından sonra belirgin bir RNA sentezi yoktur (6).



Şekil 2. Spermatozoon Kromatin Paketlenmesi

Ward ve Coffey (1991) DNA paketlenme aşamalarında bir model geliştirmişlerdir. Öncelikle DNA yeniden yapılırken demirli ilmik haline gelir, yoğunlaşır (histon protamin yerdeğişimi yoluyla) DNA kangallaşmış, ortası delikli çörek benzeri olan kompakt kromatin ayçöreği şeklindedir (2,8). Protaminler üzerinde bulunan sülfidril gruplarının oksidasyonu ile disülfid bağları şekillenir. Böylece DNA kangallaşmış, ortası delikli çörek benzeri olan kromatin, spiral bir şekil alır. Bu spiraller somatik hücrenin Solenoid tip DNA'sından çok daha dar bir yapıya sahiptir (2,10) (Şekil 2).

2.1.3.3.1. Protamin/Histon değişimi

Spermatogenez ve spermiyogenez sırasında kromozomal proteinler üzerinde yapılan çalışmalar, spermatozoid ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde somatik histonların ve testise spesifik TH1 ve TH2B histonların bulunduğunu, oysa ileri evre spermatidlerde TP1

geçiş (tranzisyon) proteinlerinin ve TP2 daha ileride ise artık protamin P1 ve P2 proteinlerinin yer aldığını göstermiştir (11) (Şekil 3). Topoizomeraz-II, DNA iplikçiklerinden birini keserek aradan bir parçayı çıkarır. TP1 bu araya girer. DNA ligaz enzimi de TP1'in iki ucunun orjinal DNA iplikçğine bağlanmasını sağlar. Daha sonra ortama gelen protaminlerde TP1 üzerine tutunurlar ve aralarında disülfid bağları oluşarak, kromatin iplikçiklerinin birbirlerine yaklaşmasını ve neticede kondensasyonu gerçekleştirirler. TP1 eksikliğinde kromatin kondensasyonu bozulur. Diğer yandan, TP1'in de DNA kırıklarında tamir edici rolü bulunduğu gösterilmiştir (12, 13) (Şekil 3).

2.1.4. SPERMATOZOON YAPISI

Bir spermatozoon baş, boyun ve kuyruk bölgesinden oluşur. Toplam uzunluğu yaklaşık 60 µm kadar olan spermatozoon baş kısmının boyu 3-5 µm, eni 2-3 µm dir. Başın esas görevi; DNA materyalini taşımak ve korumaktır. Baş bölgesi, lizozomal organelin bulunduğu akrozom, fertilizasyon için oosite tutunma bölgesi olan ekvator bölgesi ve akrozom sonrası bölgeyi içerir (14).

2.1.4.1. Baş Bölgesi

Akrozom: Plazma zarının hemen altında bulunan akrozom zarı arkaya doğru ilerler, orada bir katlantı yapıp tekrar ön tarafa gelir. Bu paralel gibi duran iki zar arasında birçok hidrolitik enzimin paketlenmiş olarak beklediği yer olan akrozomal matriks bulunur. Çekirdeğin üçte ikisini kaplar. Buradaki esas iki enzim hyaluronidaz ve akrozindir bunun dışında nöraminidaz, aril sülfataz, asit ve alkalın fosfotaz, glikosidaz, β-N-asetilgalaktosaminidaz, β-N-asetilglukosaminidaz(NAG) , β-galaktosidaz, β-glukosidaz, β-glukuronidaz enzimleri bulunur. Akrozinin, proakrozinin adı verilen inaktif zimojenlerde tutulan tripsin benzeri bir proteindir. Akrozinin; spermatozoonun zonayı geçmesini sağlar. Spermatozoonun içerdiği diğer zimojen enzim sperminojendir. Bu enzimler akrozom reaksiyonunda salgılanırlar (1,15).

Peri-nükleer madde: Akrozomun altında onu çekirdekten ayıran ince tabakaya perinükleer madde denir. Disülfid köprüleriyle sağlamlaştırılmış bu madde, akrozomla nükleus arasında sert bir yapı olup kesintisiz bir tabaka yaparak çekirdeğin üzerini kaplar. Akrozomun arkasındaki bu madde, post akrozom kılıfını oluşturur (1,6).

Çekirdek: Spermatozoon DNA'sı arginin ve sisteinden zengin oldukça bazik proteinler olan protaminlerle bir kompleks halinde bulunur. Sistein miktarı nedeniyle disülfid çarpaz

bağları fazladır. Bu, çekirdeğe sağlamlık ve dayanıklılık kazandırır. Çekirdek haploid sayıda kromozom içerir ve oosite girmeden ve protaminler ayrılmadan DNA aktive olamaz (1,4).

Son halka ve bazal plaka: Kuyruğu baş bölgesinden ayıran yapıdır. Burada çekirdek zarı porlara sahiptir. Bu bölge de elektronca yoğun bir maddenin oluşturduğu bazal plaka yer alır.

2.1.4.2. *Boyun Bölgesi*

Uzunluğu yaklaşık 0,3 μm olup, yapısında segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriol bulunur. Proksimalde iki çift bölünmüş sütun, 2 major ve 2 minör sütun oluşturup başın alt kısmında birleşirler. Distal sentriyol ise spermiogenezin ileri evrelerinde ortadan kalkmaktadır. Bunlar aksonemin oluşumu sırasında önemli bir rol oynar. Proksimal sentriyol 9 adet üçlü dış mikrotübül içerir. Ortada ise mikrotübül çifti yoktur (1,4).

2.1.4.3. *Kuyruk Bölgesi:*

Enerji üretimi ve hareketlilikten sorumlu oldukça gelişmiş bir bölgedir. Aksonem, 9 dış çift mikrotübül yapısı ve ortada bir çift mikrotübülden oluşan kuyruğun önemli bir bileşenidir. Bu mikrotübüllerin ana yapısında tübülün proteini bulunur ve kendi içinde α ve β olmak üzere 2 formdadır. A mikrotübülünde ve ortadaki merkezi tübüllerde 13 adet protofilaman varken, B tübülü 10 adet protofilamandan oluşur. Her A tübülünden B tübülüne doğru Ca-Mg bağımlı ATPaz izomeri protein olan dynein kolları kuyruğun hareket etmesini sağlar. Her 9 dış çift, komşu çiftlerle neksin adlı bir protein aracılığıyla bağlanır ve elastik yapılarıyla aksonemin simetrisini korur (1,4). Bir diğer önemli yapı spermatozoon aksonem etrafında kuyruğun sertliğinde rolü olabileceği düşünülen dış yoğun liflerdir. Esas parçanın %60'ına kadar uzanır ve 3 kısma ayrılır: 2 kısa lif: 3 ve 8 numaralılar (6-8 μm), 3 orta boylu lif: 2,4 ve 7 numaralılar (17-21 μm), 4 uzun lif: 1,5,6,9 numaralar (31-35 μm). Lifler sisteinden zengin keratin benzeri protein ve yaygın disülfid çapraz bağları içerir. Bu liflerin ileri derece kaybında esas parçanın eğriliği meydana gelmektedir (6) (Şekil 1).

Spermatozoon kuyruğu orta parça, esas parça, son parça olarak üçe ayrılır.

Orta parça: 3,5 μm uzunluğundadır. Orta parçanın en önemli sarmal biçiminde aksonemin çevresini saran, türe özgün sayıda mitokondriyonun arka arkaya dizildiği mitokondri kılıfının varlığıdır. Bu sarmalın 11-15 döngüsü vardır ve her dönemece ortalama 2 mitokondri denk gelir.

Esas parça: Esas parça yapısında aksonem, çevresinde kalın dış fibriller, fibröz kılıf ve plazma membranı bulunur. En uzun parça çapı yaklaşık 0,5 μm ve uzunluğu 40 μm ' dir.

Kılıf iki periferik yarım daire sütun şeklindeki fibröz kılıfla sarılır. Fibröz kılıf sıkı şekilde bir araya gelmiş filamanlardan oluşur. Uzunlamasına sütunlar 2 küçük dış yoğun lifleri (3 ve 8'i) kaplar ve birleşir. Fibröz kılıf, disülfit bağlarından zengin yapısıyla sıkı ve oldukça dayanıklı bir bölgedir. Fibröz kılıf kuyuk hareketlerini kısıtlar ve kontrol eder.

Son parça: Fibröz kılıfın distal ucundan sonra son parça başlar. 3 µm uzunluğundadır. Kuyruğun son kısmında kalın fibriller ve fibröz tabaka kaybolur. Bu bölgede önce dynein kolları yok olur, daha sonra merkezdeki mikrotübül çiftleri kaybolur ve dıştaki çiftlerin ikisi ortaya hareket ederken kalan 7'si onların etrafını sarar. Bu sırada B tübüleri de açılarak kaybolur. Kuyruğun ucuna gelindikçe aksonemin mikrotübüler yapısı sona erer (1,4).

2.2. SPERMATOZOON DNA HASARI

Spermatozoondaki DNA hasarlarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı konusu tam olarak izah edilmiş değildir. DNA hasarı geçiren spermatozoon tamir olabilir, tamir kapasitesini aşmış ise hasarlı olarak çoğalmasına devam edebilir, spermatogenez bir seviyede duraklayabilir (maturasyon duraklaması) ya da hücre ölür (16). Erkek infertilitesinde spermatozoon DNA hasarı ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (17, 18)

2.2.1. MİTOKONDRIAL DNA HASARI

Spermatozoon gelişiminin farklı formlarında bilinen muhtemel delesyonlar; nokta mutasyonlar ve polimorfizm gibi mitokondrial DNA anomalilerini kapsar. Bu anomaliler semen kalitesi, motilite ve erkek infertilitesiyle ilişkidir. Mitokondrial DNA (mt DNA) yardımcı histonlardan yoksun olduğundan sadece esas tamir mekanizmalarına sahip olduğuna inanılır (19).

2.2.2. NÜKLEER DNA HASARI VE KAYNAĞI

Önceleri erkek germ hücre hattındaki DNA hasarının iki tipi tanımlanmıştır. İlki replikasyon hataları diğeri ise DNA tek ve çift zincir kırıklarını içeren DNA fragmentasyonudur (20). İnsan ejakulatındaki bu anomalilerin kaynağını açıklamada günümüzde farklı mekanizmalar tanımlanmıştır (19). İlk teori DNA hasarının, spermatozoon maturasyonu sırasında yanlış paketlenmesi ve ligasyonu nedeniyle olduğudur (17). İkinci teori apoptozisin yol açtığı DNA fragmentasyonu nedeniyle olduğudur (17,21). Üçüncü teori ise oksidatif stresin DNA hasarına neden olduğudur (22, 23).

Spermatozoon Kromatin Paketlenmesi; İmmatür spermatozoonda muhtemelen protaminasyon ve kromatin paketlenmesi sırasında DNA hasar ve ROS (reaktif oksijen türleri) üretim seviyeleri yüksektir. DNA zincir kırıkları doğal olarak erkek germ hattında kondenzasyon sırasında oluşabilir (17,19). Subfertil erkeklerin ejakulatlarında genelde tespit edilen DNA fragmantasyonu tek ve çift zincir kırıkları ile karakterizedir (24).

Apoptozis; Apoptozis, sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek kapasitede erkek gametlerinin üretimini ve normal proliferasyon seviyelerini kontrol eder (17). Ejakulattaki spermatozoon endojen çentiklerinin varlığı somatik hücre apoptozisindeki gibi karakteristik programlı hücre ölümünün bir göstergesidir (19).

Oksidatif Stres; Oksidatif stresin nedeni ROS üretimi ve antioksidan kapasite arasındaki dengesizliktir (19). ROS, kromatin çapraz bağlanmaları, DNA zincir kırıkları, DNA baz oksidasyonu (21), kromozom delesyonları, disentrik ve kardeş kromatid değişimine (20) neden olabilir. Oksidatif stres, apoptozisle, DNA tek ve çift zincir kırıklarının sıklığıyla korelasyon gösterir (16, 20, 19).

2.2.3. SPERMATOZOON DNA'SINI ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Spermatozoon DNA'sında oluşan hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi, kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlamaları, DNA da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır (25). Spermatozoon DNA'sında hasara neden olan faktörler:

İn Vivo Faktörler; Sigara (26,27,28), varikosel (6,25), yaş (29,30), radyasyon (6), kemoterapi (6), alkol (19), kafein (31).

İn Vitro Faktörler; Spermatozoonun saklanması (32), santrifüj (33), spermatozoonu semenden ayırma yöntemleri (34), ROS'a maruz kalması (23), kryoprotektanlardır (25).

2.2.4. SPERMATOZOON DNA HASARI BELİRLEME YÖNTEMLERİ

2.2.4.1. Asidik Anilin Mavisini Boyaması

Lizinden zengin histonlarla, arjinin/sistein zengini protaminlerin ayrımında kullanılan bir boyadır. İmmatür spermatozoonun lizinden zengin histon taşıyan nükleusu sonuç olarak mavi rengi alacaktır. Matür spermatozoonun arjinin-sistein zengini protaminli nükleusu çok düşük lizin içerdiğinden anilin mavisini boyanmayacaktır (10) .

2.2.4.2. *Toluidine Mavisi Boyaması*

Kromatinin metakromatik boyanmasında kullanılır. Hasarlı yoğun kromatinde ağır bir şekilde birleşmiş hale gelir. Bu boya DNA paketlenmesine hassastır. Zayıf spermatozoon bütünlüğünü ve şiddetli DNA hasarını gösterir (10). Erenpreiss 2004'te yaptığı çalışmada bu boyanın spermatozoon DNA fragmantasyonu ya da anormal kromatin yapısını göstermede diğer metotlarla korelasyon gösterdiğini saptamıştır (35).

2.2.4.3. *Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi*

Spermatozoonda zayıf paketlenen kromatinde, indirekt yolla protaminden eksik DNA'nın görüntülenmesinde kullanılan guanin-sitozin spesifik bir boyadır. CMA3 ve protaminler DNA'da aynı yere bağlanır. Bu yüzden yüksek CMA3 floresanı, spermatozoonun düşük protaminasyonunun işaretidir. CMA3 yöntemi, spermatozoon kromatin değerlendirilmesinde diğer yöntemlerle güçlü korelasyon gösterir (36).

2.2.4.4. *DBD-FISH (DNA breakage detection-fish) Yöntemi*

Floresan in situ hibridizasyon çoklu mikrolezyon gibi kromozom anomalilerini saptamak için kullanılan bir metottur. Hücreler bir agaroz matriksle bir slayta gömüldüğünde bir alkali çözücü (denatüre) solusyonla parçalanır. ssDNA motifleri DNA zincir kırıklarına dönüşür. Nötralize edilir ve protein uzaklaştırılır, ssDNA, bütün genom yada spesifik DNA problemleriyle hibritlenerek floresan yoğunluğunda incelenir. Spermatozoon kromatin yapısal özelliklerini açığa kavuşturmasına rağmen pahalı, zaman alıcı ve klinik değeri azdır (10, 37).

2.2.4.5. *İn Situ-Nick Translasyon (NT)Yöntemi*

NT yöntem biyotinlenen deoksiuridin trifosfatın (dUTP) ssDNA kırıklarında kalıp bağımlı DNA polimeraz I enzimi tarafından katalizlendiği reaksiyonda kaynaşması esasına dayanır. Spesifik olarak endojen DNA hasarını tespit eder ve değişken seviyelerini içeren spermatozoonu boyar. NT yöntemi spermatozoonda, nükleer DNA'nın yeniden modellenmesi sırasında meydana gelen anomalileri gösterir (10) .

2.2.4.6. *Akridin Oranj (AO) Boyaması*

Spermatozoon nükleer DNA'sının asit ilavesiyle denatürasyon hassasiyetinin in situ (yerinde) ölçülmesine dayanır. Metakromatik AO boyası çift zincir (ds) DNA'da (doğal DNA, yeşil) monomer olarak araya sokulurken, tek zincir (ss) DNA'da (denatüre DNA, kırmızı) agregat olarak bağlanır. ssDNA değerlendirmesinde kullanılan diğer yöntemlerle güçlü

korelasyon göstermektedir. Ancak floresan mikroskobu kullanılıyorsa gözlemci öznelliği sonuçları etkileyebilir (38,39,40).

2.2.4.7. *Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD) - HALOSPERM®*

SCD test prensip olarak; spermatozoonun, liziz solusyonundan önce asit solusyonuyla muamele edildiğinde fragmante olmayan DNA'lı spermatozoonda nükleer protein uzaklaştırmasından sonra DNA dağılım haloları (fragmante DNA'lı spermatozoonda bu halolar ya hiç yoktur ya da minimaldir) meydana gelir. DNA kırıklarının varlığı nükleoidin halo genişlemesiyle ilerler. Floresan şiddetine ihtiyaç duyulmadan kullanımı en büyük avantajdır. Basit, kısa sürelidir ve SCSA (sperm kromatin strüktür analizi) ile karşılaştırılabilir (37, 40, 41, 42, 43, 44, 45).

2.2.4.8. *COMET (Cluster Of Motifs E-value Tool) yöntemi*

Bu yöntem DNA hasarı analizinde tek hücre jel elektroforezidir. Hasarlı hücreden dsDNA zincir migrasyonu şeklinde görünür. DNA kırıkları COMET'in baş kısmında yoğunlaşırken, çift ve tek DNA zincirindeki kırıklar COMET'in kuğuğuna doğru uzama yapar. Spermatozoon DNA fragmentasyonunun tespiti alkali koşullarda, nötral koşullardan hem tek hem de çift zincir kırıklarını tespit edebildiğinden daha üstündür. Floresan mikroskobu kullanılır. Sonuçların yorumlanması ve görüntü analizi için tecrübeye ihtiyaç duyulur (10,46).

2.2.4.9. *TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) Yöntemi*

Kalıp bağımsız TdT (Terminal Deoksinukleotidil Transferaz) enziminin katalizlediği reaksiyonda tek ve çift zincirli DNA'da dUTP'nin (deoksiuridin trifosfatın) katılımı esasına dayanır. Bu enzim biyotinlenen dUTP'nin DNA kırığının olduğu kısımlarda DNA 3'-OH'da sinyal verir. Normal DNA'lı spermatozoonda sadece arka kısım floresan boyanır, fragmante DNA (çoklu kromatin 3'-OH uçları) açık floresan renk oluşturur. Genel olarak flow sitometrik metot daha hassas ve güvenilir olmasına rağmen, karmaşık ve pahalıdır. Floresan TUNEL da kontrol parametreleriyle çok iyi korelasyon göstermektedir (40, 47, 48, 49, 50).

2.2.4.10. *SCSA (Sperm Kromatin Strüktür Analizi)*

Anormal kromatinli spermatozoon in situ kısmi DNA denatürasyonuna çok hassastır. Isı ya da asitle muamele ile DNA denatürasyonu metakromatik olarak değişen akrinin oranj boyaması ile flow sitometrik incelenmesi esasına dayanır. SCSA asit metot kullanımı daha kolaydır. SCSA'da tespit edilen DNA hasarı DFI (DNA fragmentasyon indeksi) tarafından

izah edilir. DFI sınırı fertil ve infertillerde genelde %30'dur. Flow sitometrik olduğundan hem pahalı hem de teknisyen tecrübesi gerektirir (41, 40, 51, 52, 53).

2.2.4.11. *Yüksek Performanslı Likit Kromatografi Yöntemi*

Spermatozoonda oksidatif DNA hasarı yan ürünü olan 8-OHdG (8-hidroksideoksi guanozin) seviyesi ölçümünü esas alan bir yöntemdir. Bu en yaygın çalışılmış oksidatif DNA hasarı biyo işaretleyicisidir. Çeşitli oksidatif DNA eklentileri arasından 8-OHdG, oksidatif DNA hasarını göstermede yüksek spesifitesi, mutajenik potansiyeli ve DNA'da göreceli çokluğuyla tercih edilir (10) .

2.2.5. SPERMATOZOON DNA HASARI VE KLİNİK ÖNEMİ

Semen analizi rutin olarak fertilitenin göstergesi olarak kullanılmasına rağmen standart spermatozoon konsantrasyonu, motilite ve morfoloji yüzdeleri spermatozoon defektlerini açığa çıkarmayabilir (20,47). Ayrıca zayıf DNA kalitesi, DNA fragmentasyonlu spermatozoon oranının artışıyla ilgilidir ve fertilitede önem taşır (16, 24, 47).

2.2.5.1. *Spermatozoon DNA Hasarı ve Erkek İnfertilitesi*

Normal testislerdeki germ hücreleri %5'ten daha az DNA zincir kırığına sahiptir. Yükselen DNA zincir kırıklı spermatozoon sayısı artışıyla erkek fertilitate parametreleri arasında ilişki vardır (12). DNA hasarlı spermatozoon oranı arttıkça doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır. Spermatozoon DNA hasarı, fertilitate potansiyeliyle negatif korelasyon gösterir. DNA kırıklarının seviyeleri infertillerde fertillere göre daha yüksektir (19).

Yapılan çalışmalarda testiküler spermatozoonlarda, epididimis proksimalinden elde edilenlere göre DNA hasarlı spermatozoon oranı anlamlı olarak daha düşük bulundu. Bu farkın nedeninin genital yolda spermatozoonlara etki eden reaktif oksijen türleri (ROS) olabileceği belirtilmiştir (12).

2.2.5.2. *Spermatozoon DNA hasarı ve Yardımlı Üreme Teknikleri*

Spermatozoon DNA hasarlarının infertilitedeki önemi çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir (19,46). Bazı araştırmacılar spermatozoon DNA hasarının fertilizasyon oranını düşürdüğü (47, 49), bazıları da etkisiz olduğu görüşündedir (19, 46, 51, 54).

Spermatozoondaki DNA hasarı; apopitozis erken embriyo fragmentasyonu ya da daha sonra düşüklüklerle (abort) sonuçlanabilir (16). Fakat sonuçlar hasta seçimi ve yöntem farklılıklarından dolayı değişebilir (55). Dört blastomer döneminde paternal genler açıldığında

spermatozoon DNA'sının fragmantasyonu ve oksidasyonu nedeniyle embriyo gelişimi duracak ve erken embriyo ölümü gerçekleşecektir (17, 54, 46).

Özellikle ICSI (intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) gibi yardımcı üreme tekniklerinde DNA fragmantasyonlu spermatozoon ile oositin fertilize olma riski yüksektir (46). IVF (in vitro fertilizasyon) ile karşılaştırıldığında ICSI'de daha düşük blastokist oluşum oranları (54) ve DNA hasarlı embriyo ve beklenmeyen düşüklerin daha fazla olduğu gösterilmiştir(19). Çünkü ICSI için spermatozoon seçimi, motilite ve iyi morfolojiye dayanmaktadır. Doğal seleksiyon ortadan kaldırıldığı için defektif paternal genom da bilinmeden oosit içine enjekte edilmiş olabilmektedir (19).

Aksine bulgular da mevcut olup, ICSI olgularında eğer morfolojisi normal spermatozoon enjekte edilmişse, fertilizasyon ve gebelik oranlarının DNA hasarlı spermatozoon oranları ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (56). Ayrıca oosit, spermatozoon DNA'sında önceden var olan belli orandaki çentikleri tamir edebilme yeteneğindedir (9).

2.3. APOPTOZİS

Morfolojik olarak ayrı, doğal ve biyolojik öneme sahip iki farklı hücre ölümü; nekroz ve apoptozistir (57). 1967-1970 yılları arasında büzüşme nekrozu Kerr tarafından elektron mikroskopik olarak gösterildi. Kerr, Wyllie ve Currie 1972 yılında Apoptozisi, hücre morfolojik ve biyokimyasal serileri içeren bir genetik mekanizmaya dayanan hücre ölüm modeli olarak tanımladılar (Yunanca: Sonbaharda dökülen yapraklar). 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptozis endonükleazların aktive olarak merdiven basamağı denin karakteristik DNA kırıklarına neden olduğunu gösterdi. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve apoptozisin genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkarılmıştır (58).

Organizmada hücre bölünmesi kadar önemli olan hücre göçü, hücre ölümünün regülasyonu (ya da programlanması) sıkı bir şekilde hücre sayısının kontrolü, doku büyüklüğü ve homeostozis ile korunur. Çok hücreli organizmalarda da gelişimsel olarak istenmeyen hücrelerin eliminasyonu programlanmış hücre ölümü ile gerçekleşir (58, 59). Apoptozis ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir. Belirli bir dokuda hücre proliferasyonu mitozla, o dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (59).

Apoptozis, hücrede yarattığı değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılansa da nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma zarı yırtılır. Sitoplazma

materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında gösterir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. Apoptoziste mitokondri tarafından sitoplazmaya sitokrom-c gibi birçok madde salınır (57, 58, 60, 61).

2.3.1. APOPTOZİSİN GÖRÜLDÜĞÜ OLAYLAR

Apoptozis organizmanın bazı doku ve hücrelerinde sürekli olmakta ve ömür boyu devam etmektedir. Günde yaklaşık bir milyon hücre apoptozisi uğrayarak ölür ve yerine yeni hücreler yapılır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı bir insanın vücut ağırlığının her 24 ayda bir yenilenmesi anlamına gelir. Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır. Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (59, 60).

2.3.1.1. FİZYOLOJİK OLAYLAR

- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde (Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı iç organların lümenlerinin oluşması).
- Menstrual siklusta endometriyum hücrelerinde, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu gibi olaylarda.
- Vertebraların nöron gelişimi sırasında. Barsak kripta epiteli gibi sürekli proliferasyon gösteren hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesinde.
- T lenfositlerinin kontrolünde, matür T lenfositlerinin antijene bağımlı düzenlenmesinde, immatür B lenfositlerinin gelişimi gibi immun sistemin düzenlenmesinde.
- Derideki keratinositlerin epidermisin en üst tabakası olan stratum korneumunu oluşturmasında görülür (57, 62).

2.3.1.2. PATOLOJİK OLAYLAR

- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofide, otoimmün hastalıklar sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümünde.

- Her türlü neoplastik oluşumda; hem büyüme hem gerileme döneminde, hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gibi hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda.
- Pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi parankimden zengin dokularda duktus tıkanması sonrası patolojik atrofide apoptozis görülür (57, 62).

2.3.2. MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

Apoptotik hücrelerde küçük parçalara ayrılan hücre kısımlarında bozulmamış organeller, yoğunlaşmış sitoplazma, kompakt kromatin, nükleer sarılma dikkati çeker. Son olarak da kromatin kondenzasyonu, nükleozomal DNA fragmantasyonu, nükleer membran yıkımı, fosfolipidlerinin membran dışına yerleşimi ve apoptotik cisimciklerin görünümü apoptoziste gerçekleşen değişikliklerdir (59).

2.3.2.1. Morfolojik Değişiklikler

Hücre Büzülmesi: Sitoplazması daha yoğundur ve bu yüzden organeller kalabalık görünür. Komşu hücreye göre daha küçüktür. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur. Hücre zarı sağlamdır, nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (59,62).

Kromatin Yoğunlaşması: Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır ve genellikle büzülür (59). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür (63).

Apoptotik Cisimlerin Oluşması: Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (58).

2.3.2.2. Biyokimyasal Değişiklikler

DNA Fragmantasyonu : Hedef proteinlerden biri olan DNA, endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca^{+2} Mg^{+2} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur ve merdiven basamağı adıyla karakterizedir (57).

Hücre İskeletinin Yıkılması: Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteindir. Aktin filamanlarının yıkımı ile hücre normal şeklini kaybeder (64).

Hücre Membranı Değişiklikleri: Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle ilişkisi kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillusler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır. Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozulur. Plazma zarının iç yüzündeki fosfatidilserin yer değiştirilerek zarın dış yüzüne yerleşir (65, 66).

Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre zarlarında thrombospondin adlı adheziv bir glikoprotein içerirler. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlarlar (58,60). Bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositozlarını sağlar. Apoptotik cisimler çevredeki parenkim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokulardan temizlenirler (60).

2.3.3. APOPTOZİS MEKANİZMALARI

Apoptozis, ekstresek ve intrinsek olmak üzere iki mekanizma ile gerçekleşir (57).

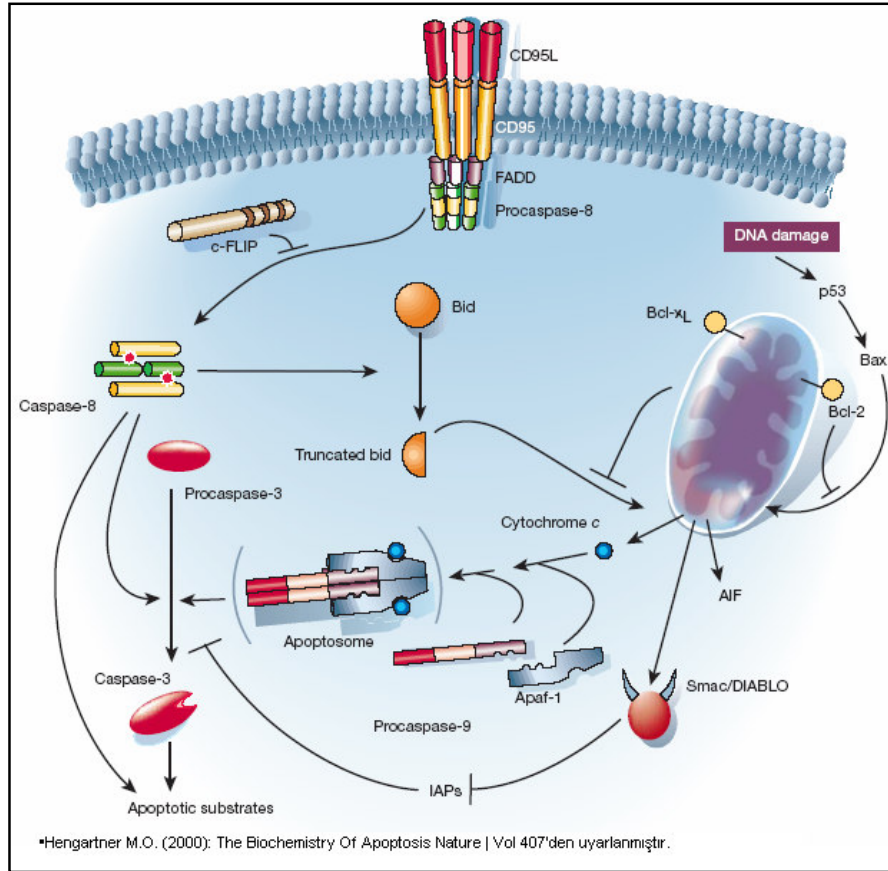
2.3.3.1. Ekstresek / Reseptör Aracılı Yol

Apoptozisin dış yolu Tümör Nekroz Faktör (TNF) ailesi hücre yüzey reseptörlerinin ligantlar yolu ile aktive edilmesi ile uyarılır (Şekil 3). Hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların belki de en iyi anlaşılmuş örneği sitokine bağlı dış apoptozis yoludur. TNF- α , TNF ile ilişkili apoptozis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar. TNF ailesi reseptörler (TNF-R1/CD120a, TNF-R2, DR3/Ws11/Tramp, DR4/Trail-R1, DR5/Trail-R2, CAR-1) ve Fas (CD95/APO1) reseptörü, belli bir aminoasit diziliminde ve homologtur (62).

Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesi (DD) bulunur. Bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlanarak apoptozisin başladığı yerlerdir. Ligandlar bağlandığında 3 Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü kompleks oluşturur. TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TNFR'e bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD/Mort-1) denen adaptör proteinlere bağlanır. Bu proteinlerin hem DD hem de proteazların ölüm oluşturan kısımlarına (DED) bağlanan bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar ölümü başlatan sinyalleme kompleksini (DISC) oluştururlar (57) (Şekil 3). Normalde ölüm bölgesi

susturucusu (SODD) olarak bilinen proteiniyle uyarılmamış reseptörlerin sitoplazmik DD uçları maskelenerek reseptörlerin kendi kendilerine sinyal üretmeleri önlenir. Reseptörün uyarılmasıyla SODD ölüm ucundan ayrılarak DED içeren adaptörün bağlanmasına izin verir (59, 63).

Şekil 3. Apoptozis Mekanizmaları

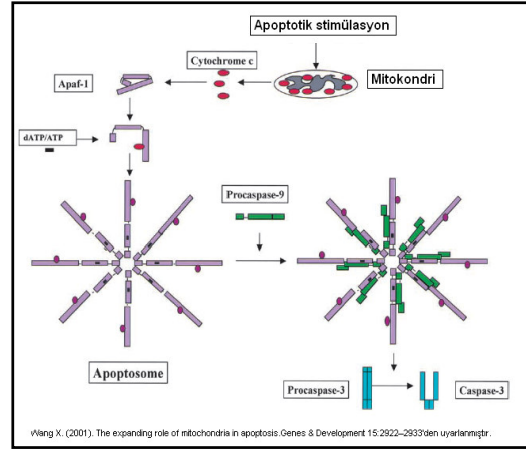


2.3.3.2. İntrensek / Mitokondrial Yol

Mitokondri apoptoziste ölüm programını aktive eden birkaç faktör salar. İntraselüler stimüle DNA hasarı gibi genel olarak sadece BH3- Bcl-2 ailesi proteinlerin aktivitesiyle sitoplazmada mitokondri iç membranından proapoptotik faktörlerin salınımı ile sonuçlanır (64, 63). Bu salınım Bax ve Bak apoptotik proteinleri tarafından indüklenir ve antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL proteinleri tarafından inhibe edilir (Şekil 3). Salınan protein faktörlerden biri sitokrom c, direkt olarak Apaf-1'i aktive eder ve ATP varlığında multimerik kompleks olan apoptozomu oluşturur (63) (Şekil 4).

Apoptozisin yaygın yolu olan iç yol hücrenin kendi içinden, sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlar ve iç yoldaki apoptotik sinyal iletiminde mitokondri tarafından

gerçekleşir. AIF (Apoptozis indükleyici faktör) canlı hücrede iç ve dış mitokondriyal membran arasında bulunur ve çekirdek tarafından kodlanan, proteaz özelliğinde olan 57 kDa'lık bir flavoproteindir. AIF sitoplazmik faktörler yokluğunda apoptotik çekirdek değişikliklerini başlatır ve kaspazı aktive eder (63). Sitokrom c (Cyt-c) mitokondriyal elektron iletim sisteminin önemli bir parçasıdır. Normalde mitokondrinin iç ve dış membranı arasında bulunur. Salınımı Bcl-2 proteinler tarafından düzenlenen ve kaspazların aktivasyonunda gerekli bir kofaktördür. dATP (ya da ATP) ve sitoplazmik faktör Apaf-1 ile birlikte sitoplazmaya salınımı önce Kaspaz-9'u sonra da Kaspaz-3'ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar. Apaf-1 proteinin kaspazla etkileşme aktivasyonu için gereken bilinen tek mekanizma sitokrom-c'dir (62,72) (Şekil 3).



Şekil 4. Apoptozom oluşumu

2.3.4. APOPTOZİS REGÜLATÖRLERİ

Apoptozisi düzenleyen genler *myc*, *p53* ve *bcl-2* olarak bilinir ve ürettikleri proteinler aynı adı alır. Apoptozisi baskılayan (anti-apoptotik) ya da indükleyen (pro-apoptotik) proteinler vardır. P53, Bcl-2 ailesi, apoptozis baskılayıcı faktör (IAP), Kaspazlar gibi protein aileleri apoptozis regülatörleridir (64).

2.3.4.1. P53

Anti-apoptotik özellikte, 393 aminoasitli bir proteindir ve çevresel şartlara, hücre duruma göre hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, hücre farklılaşması, genomik şekillenme ve programlı hücre ölümünde görev alır (62). N-ucunda asidik transaktivasyon bölgesi, merkezinde DNA'ya bağlanan bölge ve C-ucunda tetramerizasyon bölgesi olmak üzere 3 fonksiyonel bölgesi vardır. DNA hasarlanması olan normal hücrelerde p53 protein düzeyinde belirgin bir artışla hücre döngüsü G1'de bloke olur. Büyümenin durmasından sonra DNA onarımı, hücre DNA' sının çoğaldığı S fazına geçmeden önce tamamlanır. Genom hasarı büyük boyutlarda ise hücre programlı hücre ölümüne girer (57,59).

2.3.4.2. BCL-2 Ailesi Proteinleri

Bcl-2 ailesi apopitotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur (72). Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve Bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür (58). Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membranı dışında, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda bulunur. Bcl-2 ayrıca Raf 1 ve kalsinörine bağlanır (62). İnsanda en az 17 Bcl-2 ailesi üyesi protein bulunur. Bcl-2 ailesi proteinler birkaç α -heliks yumağını içeren benzer protein yapısındadır. Bunlar 4'e kadar numaralanan Bcl-2'ye benzer (BH) bölgesidir. Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve fonksiyonlarına göre 3 grupta toplanır (60) :

- *Bax alt grubu*; Hepsi proapopitotiktir. Bax ve Bak'dan oluşur. BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde Bcl-2'ye benzerlik gösterirler. Yapı olarak bazı bakteriyel toksinlerin por oluşturan proteinlerine benzerlik gösterirler ve kısmen hücre içi zarlarda bulunan mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarlarında kanallar oluşturma yetenekleri vardır.
- *Bik alt grubu*; Proapopitotik Bik, Bid ve Bim'den oluşur. Bunlara yalnız BH3 bölgeleri Bcl-2'ye benzerlik gösterdiği için BH3 proteinler de denir. Heterodimerler yaparlar ve böylece eşlerinin aktivitelerini düzenlerler (59).
- *Bcl-2 alt grubu*; Hepsinin antiapopitotik aktivitesi vardır Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'den oluşur, dört bölgeleri (BH1, BH2, BH3, BH4) kuvvetli benzerlik gösterir. Proteinin C ucunda zara tutunma bölgesi vardır ve mitokondri membranında bulunur (57).

2.3.4.3. IAF Ailesi Proteinleri

Anti-apopitotik protein ailesindedir ve bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP, Bruce, Survivin, plAP olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre ölümünü Kaspaz-3, Kaspaz-7 ve Kaspaz-9'a direkt olarak bağlanıp onları inhibe ederek gerçekleştirirler. Apoptozis protein inhibitörleri kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (60, 62).

2.3.4.4. Kaspazlar

Kaspaz; Sistein aspartatik asit proteazlar olarak bilinir ve birbirleriyle homolog büyük protein ailesidir (67, 59). Kaspazlar, proteolitik yarıklanmasıyla aktifleşen, inaktif granüller olarak üretilir (67). Şimdiye kadar yaklaşık 100 Kaspaz substratı rapor edilmiştir (59). Kaspaz kaskadını başlatan kaspaz -3,-6 ve -7'dir. Kaspaz ailesi üyelerinden bazıları küçük N-terminal peptidler (Ör: Kaspaz-3,-6,-7) ve geniş N-terminal domainler içeren (Kaspaz-2, -8, -9, -10 ve sitokin aşamasında Kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13). ProKaspaz-7 zimojen tek polipeptid

zinciri bulundurur. Matür Kaspaz'ın küçük ve geniş altbirimleri arasında bir halka bulunur. Bu alt üniteler arasında ProKaspaz-7 aktivasyonu için bölünme alanları bulunur (Ile195–Gln196–Ala197–Asp198). Aktivatör kaspazın aktif bölgesine bağlanması için gerekli aktif bölgedeki esneklikten dolayı bu halka yapısal olarak görünmez (59). İnsanda yapı ve fonksiyonlarına göre 11 değişik Kaspaz tarif edilmiştir:

- Başlıca lenfokin yapımında bulunan kaspazlar: Kaspaz-1 (ICE) , -4, -5, -11, -12 , -13, - 14
- Sonuçlandırıcı(effektör) kaspazlar: Kaspaz-3 (CPP32/Yama) ,- 6 , -7
- Başlatıcı (initiatör) kaspazlar: Kaspaz-2, Kaspaz-8 (FLICE/MACH), -9, -10

2.3.5. SPERMATOGENEZ VE APOPİTOZ

Normal spermatogenez sırasında hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu spermatozoon oluşumunda kritik rol oynar. Sonuçta spermatozoon potansiyel sayısı tahminen %75'i kadar azalır. Testiküler germ hücre apoptozisi fizyolojik ve devamlı olarak hayat boyu meydana gelir (12). Apoptozisin normal spermatogenez sürecinde iki önemli rolü vardır. Bunlardan ilki Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıda germ hücre popülasyonunu sınırlandırmak, ikincisi de anormal spermatozoonun azaltılmasında seçici olmaktadır (12, 21,56).

İnsan spermatozoonda apoptozisin varlığı yapılan çalışmalarda ortaya konduktan (16,47, 17,24) sonra ejakulatta matür spermatozoonda apoptozisin varlığı birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (16, 47, 17, 21, 61, 68). Bu araştırmacılar somatik hücredeki kapsamlı DNA hasarına neden olan endojen endonükleazların aktivasyonu, üreme havuzundan defektli germ hücrelerinin eliminasyonu gerçekleştireceği görüşündedirler. Sakkas 1999'da apoptotik eliminasyon hatası sonucu ejakulattaki spermatozoonda görünen apoptozisi 'abortif apoptozis' olarak tanımlamıştır ve bu hücrelerin bir şekilde apoptozisten kaçtığını öne sürmüştür (17,21,69).

Apoptozis çeşitli patolojilerin ve spermatogenez kontrol sistemlerinin kaldırılmasının sonucu olabilir (70). Yapılan bir çalışmada DNA hasarı ve muhtemel DNA tamirinin azalan seviyeleri karşısında apoptozisin, hatalı genetik bilginin embriyoya geçmesini engelleyen son basamak olduğu düşünülmüştür (29).

Erkek üreme sistemine lökositlerin büyük etkisi gösterilmiştir fakat seminal lökositlerin işlevi hala netlik kazanmamıştır. Spermatozoon apoptozisi semen kalitesiyle korelasyon göstermeyebilir. Ürogenital kanallardaki enfeksiyon yokluğunda; Seminal

lökositlerin asıl fonksiyonlarından biri, apoptotik spermatozoonları ortadan kaldırmak olabilir (71).

Spermatozoon apoptozisi ve spermatozoon DNA'sında hasar erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilir. Apoptozis ile ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında oluşur. p53, p21, CD 95 (17) , Kaspaz-3 (72,74), Kaspaz 1-8 (74), Bcl-2 , Bcl xl (12,73) ve Fas düzeyleriyle, değişik yollarla saptanabilmektedir. Kaspaz 1-3-8 postakrozomal bölgede, Kaspaz 9 ise orta parça (midpiece) bölgesinde gösterilmiştir (74).

Son çalışmalar antiapoptotik fonksiyon sergileyen ve spermatozoon matürite işareti olarak kabul edilen HspA2 adlı protein ve erkek fertilitesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Isı şoku proteini A2 (Heat-shock protein, HspA2) bir spermatozoon matürite işareti Hsp70 şaperon protein ailesinin üyesi olan testis spesifik proteinidir. Hsp70-2 bloke edilen farelerde mayoz duraksamasına ek olarak karakteristik apoptotik DNA patern bozulmasıyla germ hücre apoptozisi artışı görülür. Yapılan çalışmalarda HspA2 gen ekspresyonu oligozoospermik grupta normozoospermik gruba göre daha düşük bulunmuştur (75). HspA2 ilk olarak primer ve sekonder spermatositte, daha sonra plazma membran yeniden şekillenmesi ve sitoplazmik artıklı uzamış spermatidde görüldü. İnsan ejakulatında düşük seviyede HspA2 tespit edilmiştir. Hsp70'in apoptoziste çalışma mekanizması, apoptotik enzimler olan Kaspaz-3 ve -9'un salınmasıyla gerçekleşir. Böylece HspA2, apoptotik sürecin olası inhibitörüdür (76).

2.4. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)

Serbest radikal bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektronu bulunan atom yada molekül olarak tanımlanmıştır. ROS yüksek derecede reaktif oksijenlenmiş ajanlara sahip serbest radikaller sınıfıdır (77). Organizmada geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^{+} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi ile oksidasyon reaksiyonları meydana gelmektedir (78). Sonuç olarak, NADH ve NADPH oksijenden reaktif oksijen ara ürünlerinin meydana gelmesine yol açmaktadır. Bu bileşikler aerobik metabolizmanın, ilaçlar ve çevresel toksinlerle oluşan reaksiyonların yan ürünleri olarak sürekli meydana gelmektedir. İleri derecede reaktiftirler ve DNA, proteinler ve doymamış yağlarda ciddi kimyasal değişikliklere neden olurlar. ROS'lar reperfüzyon hasarı, kanser, inflamatuvar hastalıklar ve yaşlanma gibi çok sayıda patolojiden sorumlu tutulmuşlardır (79). Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen

türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri (ROS), normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\bullet})'dir. Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R^{\bullet}), peroksit radikalleri (ROO^{\bullet}), alkoksi radikalleri (RO^{\bullet}), tiyil radikalleri (RS^{\bullet}), sülfenil radikalleri (RSO^{\bullet}), tiyil peroksit radikalleri (RSO_2^{\bullet}) gibi çeşitli serbest radikaller oluştururlar (80) (Şekil 5).

RNS	Reaksiyon	ROS	Reaksiyon
Nitrik Oksit (NO^{\bullet})	<u>NOS</u> $L\text{-arginine} + O_2 + 2 NADPH \rightarrow Citrulline + NO^{\bullet} + 2 NADP^{\bullet} + H_2O$	Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet-}$) $t_{1/2} = 1 \times 10^{-6} s$	$O_2 + 1e^{-} \rightarrow O_2^{\bullet-}$ <u>NADPH oksidase</u> $NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^{\bullet} + H^{\bullet} + 2O_2^{\bullet-}$
Nitrogen Dioksit (NO_2^{\bullet})	$NO^{\bullet} + O_2 \rightarrow NO_2^{\bullet}$ $2 NO_2^{\bullet} + H_2O \rightarrow HNO_3 + HNO_2$ (nitrik ve nitrus asit üretimi) $RH + NO_2^{\bullet} \rightarrow R^{\bullet} + HNO_2$ (lipit peroksidasyon başlatma)	Hidroperoksil radikali (HO_2^{\bullet})	$O_2 + H_2O \rightarrow HO_2^{\bullet} + OH^{\bullet}$
Reaktif olmayan oksijen türevleri	Reaksiyon	Hidroksil radikali (OH^{\bullet}) $t_{1/2} = 1 \times 10^{-9} s$	Fenton reaction: $H_2O_2 + 1e^{-}(Fe^{2+}/Cu^{\bullet}) \rightarrow Fe^{3+}/Cu^{2+} + OH^{\bullet} + OH^{\bullet}$ Haber-Weiss: $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O + OH^{\bullet}$
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	<u>SOD</u> $2 O_2^{\bullet-} + 2 H^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 + O_2$ $HO_2^{\bullet} + e^{-} + H^{\bullet} \rightarrow H_2O_2$	Sülfür radikali (RS^{\bullet})	$RSH + \cdot C^{\bullet} \rightarrow \cdot CH + RS^{\bullet}$ $RSH + OH^{\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + H_2O$ $RSH + ROO^{\bullet} \rightarrow RS^{\bullet} + ROOH$ $RSH + Fe^{3+} \rightarrow RS^{\bullet} + Fe^{2+} + H^{\bullet}$ or $RSH + Cu^{2+} \rightarrow RS^{\bullet} + Cu^{\bullet} + H^{\bullet}$
Hipoklorik asit (HOCl)	<u>MPO</u> $H_2O_2 + Cl^{-} \rightarrow HOCl + OH^{\bullet}$ (hypochlorous acid formation) $HOCl + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + Cl^{-} + OH^{\bullet}$ or $HOCl + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + Cl^{-} + OH^{\bullet}$ (hydroxyl formation) $HOCl \rightleftharpoons H^{\bullet} + OCl^{\bullet}$ (hypochlorite formation) $HOCl + H^{\bullet} + Cl^{-} \rightleftharpoons Cl_2 + H_2O$ (chlorine gas formation) $R-NH_2 + HOCl \rightarrow RNHCl + H_2O$ (taurine chloramines)	Singlet oksijen (1O_2) $t_{1/2} = 1 \times 10^{-6} s$	
Peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$) $t_{1/2} = 3-5 \times 10^{-3} s$	$O_2^{\bullet-} + NO^{\bullet} \rightarrow ONOO^{\bullet}$ $ONOO^{\bullet} + H^{\bullet} \rightarrow ONOOH$	Alkoksil (RO^{\bullet}) Peroksil (ROO^{\bullet}) $t_{1/2} = 1 \times 10^{-6} s$ and $t_{1/2} = 1 \times 10^{-2} s$.	
Ozon (O_3)	$Cl^{\bullet} + O_3 \rightarrow O_2 + ClO$ <i>Silva 2006'dan uyarlanmıştır</i>		<i>Silva 2006'dan uyarlanmıştır</i>

Şekil 5. Reaktif Nitrojen /Oksijen Türleri

2.4.1. ROS'UN HÜCRESEL SUBSTRATLARI

Lipitler;

Lipitler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve poliansatüre (doymamış) yağ asitleri (PUFA) serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer, lipit peroksidasyonu oluşturur (81). Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri (L^{\bullet}) ve lipit peroksit radikallerinin (LOO^{\bullet}) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" denir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna neden olur. Böylece plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesi sonucu serbest radikal üretimine "enzimatik lipit peroksidasyonu" denir (78). Malondialdehit

(MDA) lipid peroksidasyon son ürünüdür ve MDA ölçülmesi lipid peroksid seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (80).

Protein ;

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler.

Karbonhidratlar;

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.

Nükleik Asitler Ve DNA;

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH[•]) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksid (H₂O₂) membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşır. Sonunda DNA kalıcı "oksidatif hasara" uğrar. Eğer hidroksil radikalleri DNA'ya yakın oluşursa, purin ve pirimidin bazlarına saldırarak mutasyonlara ve hatta hücre ölümüne sebep olabilirler (80).

2.4.2. ANTİOKSİDANLAR

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidan savunma mekanizmaları hem intraselüler (superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, peroksidaz, ferritin) hem de ekstraselülerdir (transferrin, laktoferrin, seroloptazmin, haemopexin, haptogloblin ve albumin). Bazı serbest radikaller bu antioksidanlardan kurtulup, hasara yol açma yeteneğindedir (78, 82).

Antioksidan sistemde enzimatik (süperoksitdismutaz: SOD, Glutatyon peroksidaz / Glutatyon reduktaz: GPX / GRD, Katalaz: CAT) ve enzimatik olmayan (Askorbat, Ürat, Vitamin E, pirüvat, taurin, hipotaurin) antioksidanlar mevcuttur. Bu antioksidanlar üç savunma mekanizması içerir. Bunlar: önleme, durdurma ve tamir etmedir (81,83).

Endojen Antioksidanlar:

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-GPx), glutatyon S-transferazlar (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz (80).

Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: Melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyogloblin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, urat, laktoferrin, albümin.

Eksojen Antioksidanlar:

Dışarıdan alınan antioksidanlar şunlardır: α -tokoferol (vitamin E), β -karoten, askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat), ksantin oksidaz, mannitol, albümin, barbitüratlar, demir şelatörleri (78).

2.4.3. İNSAN SEMENİNDE ROS'UN KAYNAĞI

Semende ROS kaynağı lökositler ve spermatozoondur (84).

2.4.3.1. Lökosit

Erkek genital sisteminde sürmekte olan enfeksiyon için bir gösterge olarak kabul edilir. Bütün infertil erkeklerin %10-20'sinde bulunur. Semendeki lökositlerin kaynağı epididim ve prostattır (14). Lökositler hem normal hem de infertil erkeklerin semenlerinde bulunabilir. %60-70'ini polimorf nükleuslu nötrofiller oluşturur. Mikroorganizmalara karşı mücadele verirken ortama süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) salarlar ki bu da diğer ROS ve iyonlarla reaksiyona girerek ya da dismutasyon ile hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^{\bullet}) veya hipoklorid gibi diğer toksik maddelerin oluşmasına neden olur (78). Lökosit, spermatozoona göre 100 kat daha fazla ROS üretebilir (83).

Serbest oksijen radikallerinin üretimi lökositospermik (semen lökosit kontaminasyonu) örneklerde anlamlı olarak daha fazladır. Lökositospermik bireylerde, sağlıklı donörler ve lökosit olmayan hastalarla karşılaştırıldığında DNA hasarı anlamlı derecede artış gösterir (85). Eğer semende lökosit konsantrasyonu 3 milyon/ml'yi geçerse fertilizasyonda anlamlı bozulma gözlenir (14). Olumsuz etkilerin ROS, proteazlar ve sitokinler gibi lökositlerden başka faktörlerin aracılığına bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (81,85).

2.4.3.2. Spermatozoon

ROS'un ikinci kaynağı spermatozoonun kendisidir. İnsan spermatozoonu endojen ROS'un az bir kısmını kontrollü bir şekilde oluşturma yeteneğine sahiptir (81, 86). Aslında

spermatozoon kapasitasyonu için sinyal iletim mekanizması sırasında faydalanılmak üzere az miktarda süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit üretmektedir (86). Spermatozoonun H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonuyla inkübe edildiğinde kapasitasyonu (87), hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyon yeteneği kazanması ile fertilizasyon yeteneğinin stimüle edilebildiği gösterilmiştir (81). Erken evre spermatositler, yuvarlak ve uzamış spermatidler hepsi aynı düzeyde ROS yaparlar. Epididimisteki henüz maturasyonunu tamamlamamış spermatozoon bunlardan daha fazla ROS üretmektedirler (87,83). Matürasyonu bozulan spermatozoon spermiyogenezin son evresinde fazla sitoplazma artığını atamaz. Sonuçta spermatozoon normalden daha fazla ROS yapar ve oksidatif stres belirtileri verir. Zaten ROS düzeyi yüksek olan semenlerde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi de artmıştır. Bu enzim sitoplazmik artığın fazla olduğu semen örneklerinde yükselmektedir (87, 81).

2.4.5. SPERMATOZOON ANTIOKSİDAN SİSTEMİ

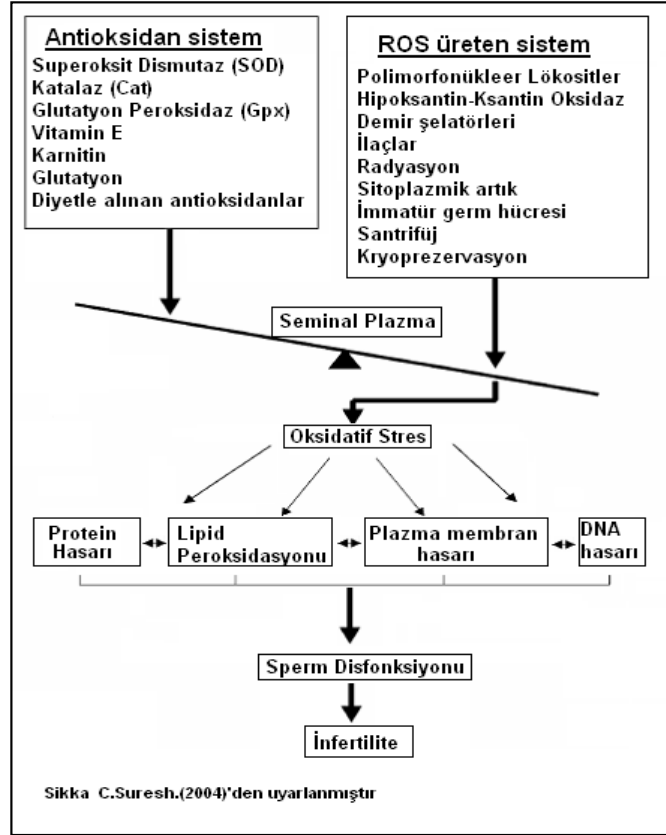
Seminal plazma antioksidan enzimler olan SOD, GPX/ GRD, Katalaz, ve enzimatik olmayan askorbat, ürat, E vitamini, piruvat, glutatyon, taurin, hipotaurin gibi antioksidanlar içerir (78). Seminal plazmadaki düşük antioksidan kapasite özellikle katalaz aktivitesi ve TAK (total antioksidan kapasitesi) anormal spermatozoon etiolojisinde önemli olabileceği belirtilmiştir (65).

İn-vitro, oksidatif stresin aktive lökositlerle gerçekleştirildiği çalışmalar dahil olmak üzere, hipotaurin, indirgenmiş glutatyon ve N-asetil sisteinin de dahil olduğu çok geniş bir aralıkta antioksidanların insan spermatozoonu ekzojen kaynaklı toksik oksijen metabolitlerinden korumada potansiyel klinik değerleri olduğu gösterilmiştir (81). Spermatozoonları ekzojen kaynaklı ROS'dan koruyan SOD, katalaz, hipotaurin, pentoksifilin veya vitamin E gibi ajanların hiçbirinin NADPH'nın indüklediği oksidatif strese karşı etkin olmadığı gösterilmiş olup bunun nedeni ROS'in intraselüler kaynaklı olması olarak düşünülmüştür. Ne yazık ki bugüne kadar antioksidanların insan spermatozoonunu endojen kaynaklı ROS'dan koruma kabiliyetlerini gösterecek bir model geliştirilmemiştir (88).

2.4.6. OKSİDATİF STRES VE ERKEK İNFERTİLİTESİ

Spermatozoon ROS'a normal hücrelerden daha hassastır. Çünkü plazma membranları büyük oranda poliunsatüre (doymamış) yağ asitleri ve sitoplazmaları da düşük konsantrasyonlarda antioksidan sistem enzimleri içerir (80, 81, 82). Normalde serbest oksijen radikallerinin üretiminde ve antioksidan sistem arasında bir denge vardır (82). Spermatozoon,

oksidatif ajanlardan DNA'sını iki savunma mekanizması ile korur. Bunlardan ilki, DNA'nın paketlenerek düzenlenmesi (2), diğeri ise seminal plazmadır (19).



Şekil 6. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi

Oksidatif stresin erkek infertilitesindeki önemi, 1943'te İskoç androlog John MacLeod'un aerobik şartlarda enkübe edilen insan spermazoonların hareketliliğinin katalaz eklenmesi ile arttığını göstermesinden beri bilinmektedir (87). Erkek faktörlü infertilitede, oksidatif stres süresince temel değişiklikler sonucunda spermatozoon DNA'sında bütünlük hasarı, DNA fragmentasyonu ve kromatin çapraz bağlanmaları olduğu bunun da germ hücre apoptozisini hızlandırabileceği ileri sürülmüştür (23,83). Yapılan araştırmalarda infertil erkeklerin %25- %40'ının semeninde ROS seviyelerinin yüksek olduğu (22,65), bunun da spermatozoon morfoloji ve motilitesini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (28). İmmatür spermatozoonlar tarafından üretilen ROS'un matür spermatozoonlar üzerinde oksidatif hasar yapabileceği (12) ve bunun infertilite nedeni olabileceği düşünülmüştür (83,85).

Spermatozoonda ROS toksisite mekanizması lipit peroksidasyonu ile başlar, motilitenin bozulmasıyla devam eder ve nükleer DNA hasarı oluşturur (82,83). Spermatozoonda ROS'un etkisinin ilk göstergesi flagellar salınım sıklığında progressif bir azalma olmasıdır. Bu etki hücre içi ATP (Adenozin trifosfat) konsantrasyonunun düşmesine bağlıdır ve aksonem proteinlerinin cAMP-protein kinaz A-bağımlı yolla fosforilasyonunda bozulmaya yol açan bir takım olaylar zinciri tarafından tetiklenir. ROS spermatozoon DNA'sını baz modifikasyonu, DNA zincir kırığı, kromatin karşılıklı bağlanması şeklinde etkiler (83).

5.7. YARDIMLI ÜREME TEKNİKLERİ (ÜYTE) VE ROS

Yardımlı üreme tekniklerinde immatür ve anormal spermatozoon, lökosit kontaminasyonu, in vitro spermatozoon hazırlama işlemleri (yüksek santrifüj, kriyoprezervasyon vb.) yüksek ROS üretimine neden olmaktadır. Bununla birlikte, serum , seminal plazma, spermatozoon hazırlama solüsyonlarındaki antioksidan sistemlerin düşük olması oksidatif strese sebep olur (82). İlk kez Aitken tarafından in vitro ortamda spermatozoon hazırlanması (ÜYTE'de) sırasında ROS üretiminin arttığı bildirildi (34).

Seminal plazma spermatozoonu oksidatif stresten koruyacak önemli miktarda antioksidan güce sahiptir. Bu nedenle, spermatozoon seminal plazma içerisinde kaldığı sürece, lökositosperminin yaratacağı oksidatif stresten bir dereceye kadar korunabilecektir. Seminal plazmanın uzaklaştırılması için yapılan ejakulat yıkanması durumunda oksidatif stres etkin hale geçer ve spermatozoon fonksiyonları da bozulmaya başlar (77, 81).

Yardımlı Üreme Teknikleri (ÜYTE:ART) laboratuvarında spermatozoon hazırlığı için çeşitli medyumlar (tampon solüsyonları) ve santrifüj kullanılmaktadır. Woren ve arkadaşları 1987'de yaptıkları çalışmalarında tekrarlanan santrifüj nedeniyle spermatozoon yıkanması sırasında ROS seviyesinin 20-50 kat artabildiğini ve spermatozoon fonksiyonları üzerine zararlı etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Spermatozoonun hazırlanması sırasında seminal plazmanın atılımı burada bulunan antioksidanları da uzaklaştırdığından ROS'un zarar vermeye devam etmesine neden olabilmektedir (89). Ayrıca başka bir çalışmada ise santrifüj süresinin, santrifüj hızına göre spermatozoon DNA fragmentasyon artışında daha önemli olduğu sonucuna varılmıştır (90). Spermatozoonda ROS'un neden olduğu DNA hasarının, fertilizasyon ve embriyo gelişim sürecini nasıl etkilediği hala netlik kazanmamıştır (82).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezine Şubat 2008 ile Nisan 2008 tarihleri arasında başvuran toplam spermatozoon motilite bozukluğu olan 27 Astenozoospermia'lı (bu gruptan 15'i sigara içiyor, 12'si ise sigara içmiyordu) kontrol grubu da 23 Normozoospermia'lı (bu gruptan 10'u sigara içiyor, 13'ü ise sigara içmiyordu) toplam 50 olgu çalışma kapsamına alındı. Yaş aralığı 25-45 olan bu olgulardan kontrol grubunun yaş ortalaması 36(\pm 5,3) ve motilite bozukluğu olan grubun ise yaş ortalaması 32 (\pm 3,2) olarak hesaplandı (65,91).

Normozoospermia ve Asthenozoospermia kriterlerindeki hastalardan alınan örnekler 2 grupta incelendi. Gruplar kendi içinde sigara içen ve sigara içmeyenler olarak alt gruplara ayrılarak normozoospermia sigara içen, normozoospermia sigara içmeyen ve astenozoospermia sigara içen, astenozoospermia sigara içmeyen olmak üzere ayrıca incelendi.

GRUPLAR :

GRUP 1: Normozoospermia (n:23)

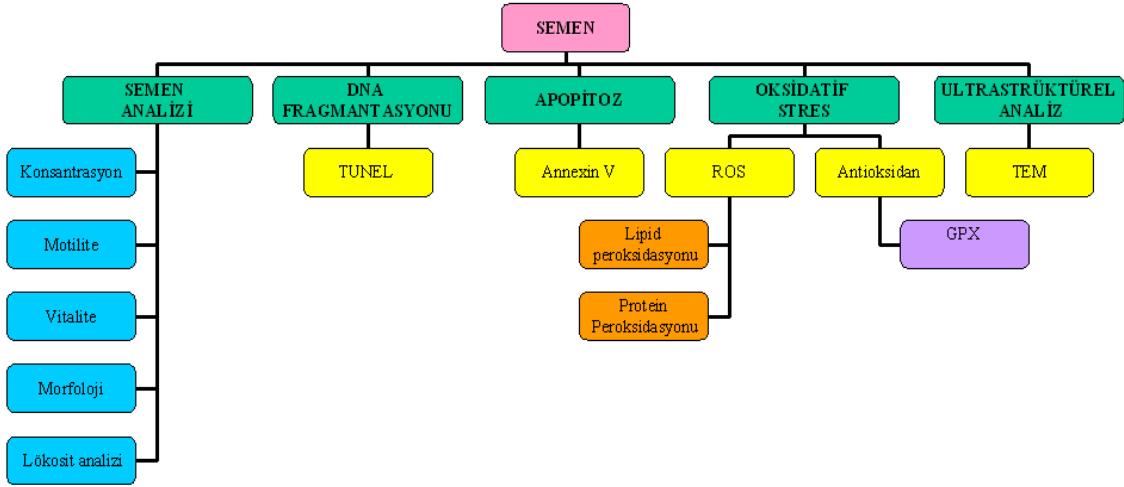
- a. Sigara içen (n:10)
- b. Sigara içmeyen (n:13)

GRUP 2: Astenozoospermia (n: 27)

- a. Sigara içen (n: 15)
- b. Sigara içmeyen (n: 12)

Bu gruplar arasındaki farklar yaş, hacim, spermatozoon sayısı, total motil sayı, motilite (progressif ileri hareketli, ileri hareketli ve hareketsiz), morfoloji, eosin pozitif oranları (vitalite = canlılık düzeyleri), MDA düzeyleri (lipit peroksidasyonu), GPX enzim düzeyleri (antioksidan), TUNEL oranları (DNA fragmantasyonu), Annexin V oranları (apoptozis düzeyleri), ve ultrastrüktürel özelliklerine göre karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamız kapsamına aldığımız 58 hastanın semen örneklerinden 5'i GPX ölçümü yapılamadığı için, 3'ü de MDA/GPX oranı tutarsızlığından dolayı çalışma dışı bırakıldı. Bütün parametreler 50 olgu üzerinden incelenirken sadece Annexin V ölçümlerinde TUNEL pozitif oranı %10 ve üzeri olan 14 olgu incelendi.



Semen örnekleri 3-5 günlük ideal cinsel perhiz sonrası elde edildi. Semen örneği steril ve geniş ağızlı bir kapta toplandı. Oda sıcaklığında 15-60 dakika likefiye olması için beklendi. Bundan sonraki aşamada her bir olgudan alınan semen örnekleri üç gruba ayrıldı.

- 1) DNA fragmentasyonunu belirlemek için direkt TUNEL protokolü uygulandı
- 2) Reaktif oksijen türleri etkisi için, lipid peroksidasyonu son ürünü olan MDA (malondialdehit), enzimatik antioksidanlardan olan GPX enzimi ve total protein miktarı ölçümleri yapıldı.
- 3) Apoptozis testi olan Annexin V protokolü uygulandı.

Aynı zamanda her iki gruptan (Astenozoospermia ve Normozoospermia) ve onların alt gruplarından elde edilen örnekler (sigara içen ve sigara içmeyen) transmisyon elektron mikroskopunda (Transmission Elektron Microscope ZEISS 1200) incelendi.

Çalışmaya dahil etme kriterlerinde sigara içmeyen olgular için ‘1 yıldan bu yana sigara içmiyor olmak’ koşulu uygulanmıştır. Sigarayı yeni bırakanlar (son 1 yıldan önce) karışıklık yaratacağı için çalışmaya dahil edilmedi. Semen örnekleri ve semen volümleri göz önüne alınarak yuvarlak hücre sayısı gibi parametreler çalışmaya dahil etme kriterlerimiz oldu.

Günlük sigara tüketimine göre olgular şu şekilde sınıflandırıldı:

1. Grup günde 5’den az sigara içen (ılımlı içiciler)
2. Grup günde 6-15 sigara içen (orta düzeyde içiciler)
3. Grup günde 20’den fazla sigara içen (Ağır içiciler)

Şekil 7. Olguların Günlük Sigara Tüketimi

	Sigara içmeyen	<5 /gün	1-15 /gün	>20 /gün	Toplam
Normozoospermia	13	3	4	3	23
Astenozoospermia	12	1	6	8	27

3.1. SEMEN ANALİZİ

3.1.1. MAKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

Semen; koagülasyon, likefaksiyon, görünüm, hacim, viskozite ve pH açısından değerlendirildi (14) (Şekil 8).

- A) **LİKEFAKSİYON:** Elde edilen örneklerin oda ısısında 15-60 dakika likefiye olması beklendi (14, 92).
- B) **GÖRÜNÜM:** Likefaksiyondan sonra 1 saat içerisinde yapıldı. Normalde homojen, gri-opelasan görünümde olan semen örnekleri Normal (N) olarak değerlendirildi.
- C) **VOLÜM:** Steril enjektör veya dereceli pipete çekilerek değerlendirildi.
- D) **VİSKOZİTE:** Likefiye olduktan sonra semen 5 ml'lik bir pipete çekildi ve kendi ağırlığı ile pipetin ucundan damlaması sağlandı. Bu sırada akarak uzayan damlanın boyu ölçüldü. Viskozite, sübjektif olarak 4 dereceli bir skalada değerlendirildi: (14)
Ø : Viskozite normal
+ : Biraz artmış viskozite
++ : Orta derecede artmış viskozite
+++ : Çok artmış viskozite
- E) **PH:** Bunun için 6.1- 10.0 arasında indikatör kağıtlar kullanıldı. Bir damla semen örneği bu indikatör üzerine damlatıldı. Oluşan renk değişimi, skala ile karşılaştırılarak pH tayin edildi. Normal değeri 7.2- 8.0 arasındadır. 7.0'ın altındaki değerler vaz agenezini veya seminal vesikül agenezini, ejakuluar kanal obstrüksiyonlarını, vb. düşündürür (14).

3.1.2. MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

Spermatozoon konsantrasyonu ve motil spermatozoon yüzdesi (motilite) WHO kriterlerine göre belirlenerek faz kontrast mikroskobu ile değerlendirme yapıldı (14, 92).

Spermatozoon konsantrasyonu ve motil spermatozoon yüzdesinin belirlenmesi için Makler® Sayım Kamerası kullanıldı (Şekil 8).

A) KONSANTRASYON: Makler® Sayım Kamerasının ortasına 10 µm semen örneği konup üst kapak kapatılarak x 20 büyütme altında yan yana 10 kare sayılarak mililitredeki spermatozoon sayısı tespit edildi (14).

B) MOTİLİTE: Lineer motilitesi olan spermatozoonların (+4, +3) toplam yüzdesi ise toplam hareketlilik olarak belirlendi (14, 92).

Şu şekilde sınıflandırıldı:

- +4 Hızlı ileri (progresif) hareketli
- +3 Yavaş ileri (progresif) hareketli
- +2 Yerde hareketli
- +1 Hareketsiz (immotil)

C) TOTAL MOTİL SAYI: mL'deki ileri ve hızlı ileri hareketli spermatozoon sayılarının oranıdır. Total Motil sayı = (mL'deki spermatozoon sayısı x hacim) / Motilite (%) şeklinde hesaplandı. (14, 92).

D) AGLÜTİNASYON: Motil spermatozoonlara antisperm antikorlarının bağlanmaları nedeni ile baş-baş, orta parça-orta parça, kuyruk-kuyruk ya da benzer şekillerde birbirlerine yapışmalarıdır. İmmünolojik infertilite için düşündürücü bir parametredir (14, 92).

Değerlendirme kriterleri:

- Ø : Aglütinasyon yok
+ : Artmış Aglütinasyon
++ : Çok artmış Aglütinasyon

E) MORFOLOJİ: Morfolojik değerlendirme için STAT III™ (Doğan medikal midatlantis) boyaması (Wright'ın Giemsa boyaması) yapıldı ve Kruger'in kesin kriterlerine göre ışık mikroskopik olarak değerlendirildi. Ayrıca bu boya ile immatür germ hücreleri ve beyaz kan hücreleri ayırt edilebilir (14, 92).

3.1.2.1. STAT III™ BOYAMA PROSEDÜRÜ

- Semenden alınan bir damla örnek lam üzerine yayma preparat hazırlandı. Bu lam 5-15 dakika arası havada kurutulduktan sonra boyama işlemine geçildi.
- Lam 1-2 dk. fiksatif solüsyonunda bekletildi.
- Distile su ile yıkanıp fazla suyun akması beklendi sonra diğer aşamaya geçildi.
- Lam 1-2 dk. solüsyon I'e (Eosin solüsyonu) batırıldı.
- Distile su ile yıkanıp fazla suyun akması beklendi sonra diğer aşamaya geçildi.
- Lam daha sonra 1-2 dk. solüsyon II'ye (azur solüsyonu) batırıldı. Fazla solüsyonun akması için bekletildi.
- Distile su ile yıkanıp oda ısısında kurumaya bırakıldı ve daha sonra immersiyon yağı altında x100 'lük ışık mikroskopuyla incelendi.

Spermatozoon morfolojisinin değerlendirilmesinde, Kruger kriterleri kullanıldı (14).

Şekil 8. Semen Analizi

SEMEN ANALİZİ NORMAL DEĞERLERİ (WHO 1999)
Volüm: 2.0 ml veya daha fazla
pH: 7.2 - 8.0
Spermatozoon konsantrasyonu: 20 milyon spermatozoa/ml veya daha fazla
Total sperm sayısı: 40 milyon spermatozoa/ejakulat veya daha fazla
Motilite: Ejakulasyonu takiben 60 dakika içerisinde, %50 veya daha fazlasının ileri progresyon göstermesi (a + b kategorisinde); veya %25 yada daha fazlasının hızlı (a kategorisinde) progresyon göstermesi.
Morfoloji: %30 veya üzerinde normal form.
Vitalite: %75 veya üzerinde canlı (boya almayan) spermatozoa.
Lökosit: 1 milyon/ml'den az.
İmmunobead test: Partikül yapışmış spermatozoa oranının %20'den az olması.
MAR testi: Partikül yapışmış spermatozoa oranının %10'dan az olması.

3.1.2.2. KRUGER'İN KESİN KRİTERLERİ:

- Spermatozoon başı ovoid ve düzgün konturlu olmalı, iyi sınırlanmış bir akrozomal kılıf içermelidir.
- Baş boyutları, 4–6 mikron x2–3 mikron x1,5 mikron olmalıdır.
- Akrozom, baş alanının %40–70' ini kaplamalıdır.
- Akrozom altında kalan bölümlerin konturları düzgün olmalıdır.
- Boyun, orta parça ve kuyruk anomalisi olmamalıdır.
- Orta parça silindirik ve baş ile aksiyel olmalıdır.
- Orta parça eni 1 mikron, uzunluğu baş uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır.
- Orta parça sitoplazmik artık içermemelidir.
- Kuyruk uniform, orta parçadan daha ince ve 45–55 mikron uzunluğunda olmalıdır.
- Kesin kriterlere göre morfolojik değerlendirmede dikkat edilecek noktalar:
- Spermatozoonun tümünün morfolojik yapısı değerlendirilmelidir.
- Değerlendirme x100 büyütme alanında yapılmalıdır.
- Değerlendirme esnasında hücre kümelerinin bulunduğu bölgelerdeki spermatozoonlar dikkate alınmamalıdır (14, 92).

Mikroskopik değerlendirmede spermatozoon sayısı, motilitesi yine WHO kriterlerine göre ve morfolojisi de Kruger'in kesin kriterlerine göre değerlendirildi (Şekil 9).

Morfolojik olarak normal sperm		
	Kruger strict kriterleri	WHO
Baş	Düz oval	Oval, düzenli dış hatlar
	Akrozom başın %40-70'ini oluşturur.	Akrozom başın 1/3'ünden fazlasını oluşturur
	Normal ölçüler; Uzunluk 5-6 µm Genişlik 2.5-3.5 µm	Uzunluk 3-5 µm Genişlik 2-3 µm
	Genişlik /Uzunluk; 3/5 veya 2/3 arasında olmalı	Genişlik /Uzunluk; 1/2 veya 2/3 arasında olmalı
	Borderline baş formları anormal olarak sınıflandır	Borderline anomaliler normal olarak sınıflandır
Boyun	Abaksiyel implantasyon olmamalı ve intakt olmalı	
Orta kısım	Silindirik şeklinde 1 µm genişlikte ve baş uzunluğunun 1.5 katı uzunlukta olmalı Baş büyüklüğünün 1/2'den büyük sitoplazmik droplet olmamalı	Silindirik şeklinde baş genişliğinin 1/3'ünden az genişlikte, düzgün kenarlı, yaklaşık 7-8 µm uzunlukta Baş büyüklüğünün 1/2'den büyük sitoplazmik droplet olmamalı
Kuyruk	Orta kısımdan hafifçe ince, kıvrım içermeyen 45 µm uzunlukta	Silindirik gibi, dış kısmı düzenli en az 45 µm uzunlukta

Şekil 9. Spermatozoon Morfoloji Kriterleri

F) VİTALİTE (CANLILIK) : WHO kriterlerine göre normal semende spermatozoonların %75'inin canlı olması gerekir. Semende canlılığın belirlenmesinde genel olarak iki test kullanılır. Bunlardan biri HOS (hipo osmotik şişme) testi, diğeri de eosin testidir. Çalışmamızda eosin testi kullanılarak canlılık değerlendirildi (14,92).

3.1.2.3. EOZİN TESTİ PROSEDÜRÜ

- 50 µl semen, 2 damla A boyası (20 ml Eosin solusyonu) steril test tüpünde karıştırıldı.
- 30 sn sonra 3 damla B (30 ml Nigrosin solusyonu) boyası eklenerek dikkatlice karıştırıldı.
- Eosin boyası hücreleri boyamada, nigrosin boyası ise zemin boyası olarak kontrast yaratmada kullanıldı.
- B boyasının eklenmesini izleyen 30 sn. içinde semen boya karışımından 1 damla bir lama kondu ve yayma preparat hazırlandı.
- Mikroskopta x100 büyütmede incelenerek 100 spermatozoon sayıldı. Pembe veya total olarak beyaz görünmeyen hücreler ölü olarak kabul edildi
- Sonuçlar permeabilitesi bozulan spermatozoonun boya alarak pozitif renk vermesine göre yüzde olarak değerlendirildi (14).

G) DİĞER HÜCRELER: Bunlar; spermatogenik hücreler, epitel hücreleri, genital kanal ve aksesuar bezlerden gelen hücreler, eritrositler ya da lökositler olabilirler. Semendeki diğer hücrelerden en önemlisi ve dikkat edilmesi gerekeni lökositlerdir. Direkt ve indirekt olarak spermatozoonu etkilediğinden semende bulunma miktarı önem taşır. Semende yuvarlak hücre miktarı $>1-2 \times 10^6$ ise lökosit varlığına bakılmalıdır. Yuvarlak hücre sayısı $>1 \times 10^6$ /mL ise lökosit testi uygulanarak lökosit miktarı belirlendi. Lökosit sayısı $>1 \times 10^6$ /mL pozitif olanlar çalışmaya alınmadı.

3.1.2.4. LÖKOSİT BOYAMA METODU LEUCOSCREEN® TESTİ

- Çalışma solüsyonu Metot ENDTZ, 1972'a göre belirtildiği şekilde hazırlandı (14).
- 1 mL reaktif 1 içine 30 µl reaktif 2 ilave edilerek dikkatlice karıştırıldı (24 saat bekletilebilir).
- Semen örneğinden 10 µl, karışımdan (çalışma solüsyonu) 10 µl lama konuldu.

- Pipetle köpük çıkartmadan 1 dakika karıştırıldı.
- Dikkatlice lamel ile kapatıldı.
- Bir süre sonra kabarcıklar oluştu ve bu da peroksidaz aktivitesini gösterdi,
- Yaklaşık 2 dakika beklendikten sonra preparat x40'lık objektifle değerlendirildi.
- Kahverengi ve sarı hücreler peroksidaz pozitif olan lökositler, pembe boyanmış olanlar ise spermatogenik vb diğer hücrelerdi.
- Aşağıdaki hesaplama yöntemi kullanılarak yaklaşık 10 farklı alan sayılarak mL deki lökosit sayısı belirlendi.

$$\frac{(\text{mL'deki spermatozoon sayısı} \times \text{Alandaki kahverengi hücre sayısı})}{\text{o alandaki spermatozoon sayısı}} = \times 10^6 / \text{mL}$$

3.2. DNA FRAGMENTASYON ANALİZİ- TUNEL PROTOKOLÜ

DNA kırığının antikor ile terminal uçtan işaretlenmesi esasına dayanır (53,93).

- Ejakulat örneği 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmek suretiyle konsantre edildi.
- Oluşan pellet her defasında üzerine 1 ml distile su ekleyip homojenize edildikten sonra 3 kez 1200 rpm'de 10'ar dakika santrifüj edildi.
- 2ml hipotonik solüsyon (KCl; 0,075 M) eklendi. Hafifçe vortekslendikten sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Pellet üzerine 2 ml fiksatif metanol: asetik asit (Sigma®) (2:1 oranı ile) eklendi. 15 dakika -20°C'de bekletildi.
- İki lam üzerine yayma yapıldı. 5 dakika fosfat tampon solüsyonunda (phosphat buffer solution, PBS, Biochrom ag®) (1x), bekletildi. Daha sonra sırayla %70, %85 ve %100'lük etil alkol konsantrasyonlarından geçirilerek yıkandı.
- Bu aşamada hazır kit solüsyonlarının uygulanmasına geçildi. Önce birinci solüsyondan 5 µl, sonra ikinci solüsyondan 45 µl alınarak hazırlanan stok solüsyondan hazırlanmış iki slaytın herbirinin üzerine 25 µl eklendi ve üzerlerine geniş birer lamel kapatıldı. Slaytlar kağıt ıslak havlu konmuş olan mapeye yerleştirildi ve üzerleri aliminyum folyo ile kapatıldı. 45 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

- İnkübasyon sonrası PBS ile 1 dakika boyunca yıkandı. İşlem 3 kez tekrar edilip örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- Kurumuş slaytlar DAPI (Appllichem®) boya ile boyanıp ve floresan mikroskopta FITC filtresi ile değerlendirildi.

DAPI boyası hazırlanışı ve uygulanışı: Toz boya 200 mL distile suda iyice çözülerek stok boya hazırlandı ve -20 °C'de aliminyum folyaya sarılarak saklandı. Daha sonra 80 mL distile suya 64 µL DAPI konularak şalede preparatlar 2-3 dakika boyandı. Preparatlar floresan mikroskobunda (Olympus BX51) fotoğraflanarak her preparat başına ortalama 500 hücre sayılarak TUNEL, % olarak hesaplandı (53).

3.3. APOPTOZİS BELİRLENMESİ

Apopitozis için Annexin V (Annexin V Flous Roche®) (AN) yöntemi kullanıldı. Annexin V kalsiyum bağımlı fosfolipit bağlayıcı proteindir ve PS'e (fosfotidil serin) yüksek afinitesi vardır. PS'in eksternal yerleşimi apoptozun erken aşamalarından biridir (68).

3.3.1. ANNEXIN V BOYAMA PROSEDÜRÜ

Apopitozis membran fosfolipitlerinin asimetrisiyle ilgilidir. Canlı hücrelerde fosfolipitler membranın iç tarafındadır, apoptozisin erken aşamalarında ise bu fosfolipitler içten dışa yer değiştirir ve membranın dış tarafında yer alır. Annexin V transloke olmuş bu plazma membranındaki fosfolipitleri ölçer. Ancak Annexin V tek başına apoptozis belirtgeci değildir Propidyum iyodürle (PI) (Annexin V Flous Roche®) kullanıldığında apoptozis için yeterli bir göstergedir. Çünkü Annexin V nekrotik hücreleride boyar, PI sadece nekrotik hücreleri tespit eder. Annexin V ve PI birlikte kullanılarak apoptozis saptanır (32).

- 1×10^6 spermatozoa olacak şekilde örnekler PBS ile yıkandı.
- 200g de 5 dakika santrifüj edildi.
- 1 mL tampon solusyon (Annexin V Flous Roche®) içine 20 µL Propidyum iyodür (PI) (Annexin V Flous Roche®), 20 µL Annexin V (Annexin V Flous Roche®) reaktifi koyularak Annexin V çalışma solusyonu hazırlandı.
- Hücreler (pellet) falcon® marka tüplerde üzerlerine 100 µL Annexin V çalışma solusyonu ile resuspanse edildi.
- 15-20 °C'de 10-15 dakika inkübe edildi.
- Lamlara yayılarak alimünyum folyo ile kapatıldı.

- Hemen floresan mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

Preparat başına yaklaşık 500 spermatozoon sayılarak Annexin V (AN) (-) / PI (+) Normal , Annexin V (AN) (+) / PI (-) Apoptotik , Annexin V (AN) (+) / PI (+) Nekrotik şeklindeki sonuçlar % cinsinden değerlendirildi (32,65).

3.4. ROS VE ANTIOKSİDAN TAYİNİ

Oksidatif stresin belirlenmesi için, seminal plazmada ya da pellette ROS ve antioksidan enzimlere ayrı ayrı bakılır. ROS için, lipid peroksidasyon oluşumu spektrofotometrik yolla ölçülür. Erkek infertilitesinde kullanılan tanısal testler arasında oldukça etkin olduğu bildirilmektedir (91).

- Semen örneği 800g (=yaklaşık 2000rpm) de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı. Eppendorf tüplerine ayrılarak çalışılacağı güne kadar -80 °C 'de bekletildi.
- Pellet PBS ile yıkandı, 800g de 10 dk santrifüj edildi.
- Bu işlem x3 kez yapıldı en son santrifüj sonrası 2ml Ca Mg Free PBS (Immco®) ile konsantre edilen pellet (spermatozoa) eppendorflara ayrılarak çalışılacağı güne kadar -80 °C 'de bekletildi (94).

3.4.1. SPEKTROFOTOMETRİK MDA (MALONDİALDEHİT) ÖLÇÜMÜ

- Daha önceden -80 °C'deki seminal plazma 10 dakika oda ısısında çözüldü.
- 200 µL tüplere konuldu
- Her tüpe 10'ar µL probukol eklendi. (Bioxytech, oxis research, MDA 586®)
- Her tüpe 640 µL R1 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice karıştırıldı.
- Her tüpe 150 µL R2 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice karıştırıldı.
- 45°C de 60 dakika inkübe edildi.
- Temiz bir süpernatant için örnekler santrifüj edildi (ör. 10,000 X g 10 dakika).
- Temiz süpernatant kısmı ölçüm kuvetine konularak spektrofotometre ile 586 nm absorbansla ölçüldü (HACH-LANGE DR 5000®).

3.4.2. SPEKTROFOTOMETRİK GLUTATYON PEROKSİDAZ ÖLÇÜMÜ

- Daha önceden –80 °C’deki seminal plazma oda ısısında çözüldü.
- Spektrofotometre absorbanı 340 nm ye ayarlandı (sıcaklık 23-25°C).
- Deiyonize su ile sıfırlanarak ölçüm yapıldı.
- Çabucak örnek tampon solüsyonla 1/10 oranında dilüe edildi (Ör 30 µL + 270 µL tampon) (Bioxytech Oxis research GPx 340®).
- Pipetle ölçüm küvetine, 350 µL Tampon solüsyonu, 350 µL NADPH reaktifi, 70 µL örnek konuldu.
- Küvet spektrofotometreye yerleştirildi.
- Küvete 350 µL dilüe tert-Butyl Hydroperoxide reaktifi eklenerek köpürtmeden pipetle karıştırıldı.
- 3 dakika boyunca A340 nm’de değişim kaydedildi.

Çalışma solüsyonu dilüe edildi. 1/100 dilution of tert-Butyl Hidroksit: 0.05 mL tert-Butyl Hydroperoxide stoktan + 4.95 mL distile su, 1/100 ara solüsyon dilüesi, 0.2 mL ara solüsyon + 19.8 mL distile su) (HACH-LANGE DR 5000®).

3.4.3. TOTAL PROTEİN ÖLÇÜMÜ

- Daha önceden –80 °C’deki seminal plazma oda ısısında çözüldü.
- Tüpe 1000µL reaktif 1 konuldu.
- 20 örnek ilave edildi ve 5 dakika 37 °C ‘de bekletildi.
- Spektrofotometre ile ölçülerek değerler yazıldı.
-

3.5. ULTRASTRÜKTÜREL İNCELEME

3.5.1. ELEKTRON MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ

- 1400 rpm’de 10 dakika santrifüj edilen semenden süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 2 mL , %2,5’ luk glutaraldehit (Merck®) damla damla konuldu ve 1- 48 saat + 4°C’ de bekletildi .
- Lam üzerie agar damlatılarak (%5) kuruduktan sonra küçük parçalara bölünerek doku takibine devam edildi.
- Sorensen fosfat buffer ile 3–4 kez değiştirilerek 15–20 dakika yıkandı (glutaraldehit şişelerinden boşaltılıp üzerine tampon solüsyonu kondu).

- 1 kısım PBS+1 kısım osmium tetroksit solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi. (ependorf tüplerin içine 500 µl OsO₄ + 500 µl tampon kondu. Bu işlem her şişe için yapıldı.(otomatik pipetle) tüpler aliminyum folyo ile kapatıldı. Oda ısısında 1 saat karanlık ortamda (çekmece içine) bekletildi.
- PBS ile 15–20 dakika yıkandı (Üç küçük beher içine PBS kondu. OsO₄' ten çıkan parçalar çalkalandı. Çıkan parçalar kurutma kâğıdında süzdürülüp en son içinde tampon olan eppendorf tüpe kondu.)

Dehidratasyon İşlemi

- % 70 Alkol10 dakika
- %100 (Absolu) Alkol.....10 dakika
- %100 (Absolu) Alkol.....10 dakika
- Propilen oksit15 dakika
- Propilen oksit15 dakika

İnfiltrasyon işlemi

- Dokudaki propilen oksiti (Merk®), agara gömülen pellet parçalarını kurutmayacak şekilde 1:1 oranındaki propilen oksit+araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
- Arada hafif hareketlerle karıştırıldı.
- Agara gömülen pellet parçaları (1:1) araldite cy212 resin (TAAB®) ve DDSA (dodecenyl suuccinic anhdride TAAB®) karıştırılarak 2 mL şişelere konuldu. Yeni araldit karışımında yaklaşık 2 saat bekletildi.
- Araldite cy212 resin (TAAB®) ve DDSA (dodecenyl suuccinic anhdride (TAAB®) (1:1) karıştırılarak içine gömülecek materyale göre hesaplanarak BDMA (Benzyl Dimethylamine TAAB®) konuldu ve karıştırılarak gömme aralditi hazırlandı. Bu pellet parçaları daha sonra önceden hazırlanan gömme araldite alındı.
- Bu karışım içine gömüldü ve 60°C 'lik etüvde 48 saat polimerize edildi.
- Daha sonra yarı ince kesitleri alınarak toluidin mavisiyle boyanarak alan belirlendi.
- Belirlenen alanlardan ince kesitleri gridler üzerine alınarak Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlaması yapılarak trasmisyon elektron mikroskobunda (Carl Zeiss Libra 1200) değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. SEMEN ANALİZİ

Çalışmamızdaki 50 olgunun yaş ortalaması 34,0 ($\pm 4,6$) iken normozoospermia grubunun yaş ortalaması 36 ($\pm 5,3$), astenozoospermia grubunun ise 32 ($\pm 3,2$) olarak bulundu. Kontrol grubu olarak kullanılan normozoospermia grubunun yaş ortalaması hasta grubu olarak kullanılan astenozoospermia grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha büyüktü ($p < 0,05$) (Tablo 1).

Bu olgulardan alınan semen volümleri ortalaması 3,6 ($\pm 1,9$) mL iken normozoospermia grubunda 3,5 ($\pm 1,2$) mL, astenozoospermia grubunda 3,8 ($\pm 2,5$) mL idi ve aralarında istatistiki açıdan bir fark yoktu (Tablo1).

4.1.1. SPERMATOZOON SAYISI

Tüm olguların spermatozoon sayısı ortalaması 55,8 ($\pm 26,9$) $\times 10^6$ /mL, normozoospermia spermatozoon sayısı ortalaması 74,0 ($\pm 29,5$) $\times 10^6$ /mL iken astenozoospermia olgularında bu ortalama 43,6 ($\pm 17,0$) $\times 10^6$ /mL bulundu. İki grupta spermatozoon sayıları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 1).

4.1.2. MOTİLİTE

Semendeki total motil sayılarına bakıldığında, tüm olguların total motil sayı ortalaması 98,4 ($\pm 86,0$) $\times 10^6$ /mL, normozoospermia olgularında 161,0 ($\pm 100,4$) $\times 10^6$ /mL iken astenozoospermia olgularında 51,7 ($\pm 29,0$) $\times 10^6$ /mL bulundu. İki grup arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 1).

Hareketlilik bakımından iki grup incelendiğinde, toplamda progressif ileri hareketli spermatozoon (+4) ortalaması %5,3 ($\pm 6,4$) idi. Normozoospermia olgularında progressif ileri hareketli spermatozoon (+4) ortalaması %10,3 ($\pm 6,49$) iken astenozoospermia olgularında bu ortalama %1,5 ($\pm 3,3$) idi. İki grup arasındaki bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 1).

Tüm olguların ileri motil spermatozoon (+3) ortalaması %41,1 ($\pm 13,5$) idi. Normozoospermia olgularında ileri motil spermatozoon (+3) ortalaması %51,1($\pm 6,8$) iken

astenozoospermia olgularında bu ortalama %32,8(±10,8) idi. Gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak da anlamlıydı (p<0,05) (Tablo 1).

Tablo 1. Normozoospermia ve Astenozoospermia grupları spermatozoon sayısı, motilite bulguları

	Normozoo	Asteno zoo	Toplam	p
N	23	27	50	-
Yaş	36 ±5,3	32 ±3,2	34,0 ±4,6	0,01**
Volüm	3,5 ±1,2	3,8 ±2,5	3,6 ±1,9	0,78**
Spermatozoon Sayısı (x10 ⁶ /mL)	74,0 ±29,5	43,6 ±17,0	55,8 ±26,9	0,000*
Total Motil Sayı (x10 ⁶)	161,0 ±100,4	51,7 ±29,0	98,4 ±86,0	0,000*
+4 ileri hareketli (%)	10,3 ±6,4	1,5 ±3,3	5,3 ±6,4	0,000**
İleri hareketli (%)	51,1 ±6,8	32,8 ±10,8	41,1 ±13,5	0,000*
Yerinde hareketli (%)	13,0 ±6,3	18,0 ±8,8	15,3 ±8,1	0,03*
Hareketsiz (%)	25,7 ±6,6	47,3 ±16,0	38,0 ±18,0	0,000*

*Normal dağılım gösteren parametrelerde Student t testi kullanıldı. **Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Yerinde hareketli spermatozoon (+2) bütün olgularda ortalama %15,3 (±8,1) iken gruplara göre bakıldığında normozoospermia grubunda %13,0 (±6,3), astenozoospermia grubunda %18,0 (±8,8) idi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p<0,05)(Tablo 1).

Bütün gruplardaki **hareketsiz (immotil) spermatozoon yüzdesi ortalama %38,0 (±18,0)**'dı. Normozoospermia olgularında hareketsiz spermatozoon yüzdesi ortalama %25,7 (±6,6), astenozoospermia olgularında ise %47,3 (±16,0) bulundu. Astenozoospermia grubunda hareketsiz spermatozoon yüzdesinin fazla olması istatistiksel açıdan da anlamlı bulundu (p<0,05) (Tablo 1).

Normozoospermia grubunda sigara içen alt grupta (N1) **yaş ortalaması 38(±5,8)**, içmeyenlerde (N2) ise 34 (±4,3) bulundu. Astenozoospermia grubunda yaş ortalamaları sigara içenlerde (A1) 33 (±2,6), sigara içmeyenlerde (A2) 32 (±4,0) olarak hesaplandı. **Spermatozoon sayısı** N1 de ortalama 68,7 (±22,6) x10⁶/mL iken N2 de 78,0 (±34,2) x10⁶/mL ve gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. N1 grubunda **total motil sayı**

ortalama 143,9 ($\pm 83,2$) $\times 10^6$ /mL iken N2 grubunda 174,2 ($\pm 113,4$) $\times 10^6$ /mL 'ye yükselirken bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (Tablo 2).

Tablo 2. Sigaranın Normozoospermia ve Astenozoospermia gruplarında bazal değerlere etkisi

	Normozoospermia			Astenozoospermia		
	Sigara içen (N1)	Sigara içmeyen (N2)	p	Sigara içen (A1)	Sigara içmeyen (A2)	p
n	10	13	-	15	12	-
Yaş	38 \pm 5,8	34 \pm 4,3	0,14**	33 \pm 2,6	32 \pm 4,0	0,77**
Sperm Sayısı ($\times 10^6$ /mL)	68,7 $\pm 22,6$	78,0 $\pm 34,2$	0,79*	44,3 $\pm 16,2$	42,7 $\pm 18,7$	1,00*
Total Motil Sayı ($\times 10^6$)	143,9 $\pm 83,2$	174,2 $\pm 113,4$	0,75*	52,7 $\pm 29,7$	50,3 $\pm 29,3$	1,00*
Progressif ileri hareketli(%)	11,3 $\pm 6,4$	9,5 $\pm 6,5$	0,45**	1,0 $\pm 2,1$	2,1 $\pm 4,5$	0,69**
İleri hareketli (%)	53,8 $\pm 7,3$	49,1 $\pm 5,8$	0,60*	34,7 $\pm 7,6$	30,4 $\pm 13,8$	0,62*
Yerinde hareketli (%)	8,3 $\pm 4,5$	16,5 $\pm 5,0$	0,047*	19,5 $\pm 9,3$	16,0 $\pm 8,3$	0,60*
Hareketsiz (%)	26,6 $\pm 7,7$	24,9 $\pm 5,8$	0,99*	44,0 $\pm 10,0$	51,5 $\pm 21,0$	0,42*

*Normal dağılım gösteren parametrelerde One way ANOVA testi kullanıldı. **Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Kruskal Wallis testi kullanıldı.

N1 **progressif ileri hareketli spermatozoon sayısı ortalama** %11,3 ($\pm 6,4$) iken N2 de %9,5 ($\pm 6,5$) idi ve aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. N1 grubunda **ileri hareketli spermatozoon ortalama** %53,8 ($\pm 7,3$) iken, N2 grubunda %49,1 ($\pm 5,8$) idi ve bu fark da istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. N1 grubunda yerinde **hareketli spermatozoon ortalama** %8,3 ($\pm 4,5$) iken N2 grubunda %16,5 ($\pm 5,0$) idi ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlıydı ($p < 0,05$). N1 grubunda **hareketsiz spermatozoon ortalaması** %26,6 ($\pm 7,7$) iken, N2 grubunda %24,9 ($\pm 5,8$) idi ve istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (Tablo 2).

Astenozoospermia grubunda sigara içen alt grupta (A1) **sperm sayısı ortalama** 44,3 ($\pm 16,2$) $\times 10^6$ /mL iken sigara içmeyen alt grupta (A2) 42,7 ($\pm 18,7$) $\times 10^6$ /mL idi , A1 grubunda **total motil sayı ortalaması** 52,7 ($\pm 29,7$) $\times 10^6$ /mL iken, A2 grubunda 50,3 ($\pm 29,3$) $\times 10^6$ /mL idi A1 grubunda **progressif ileri hareketli spermatozoon ortalaması** %1,0 ($\pm 2,1$) iken, A2

grubunda %2,1 ($\pm 4,5$) idi, A1 grubunda **ileri hareketli spermatozoon ortalaması** %34,7 ($\pm 7,6$) iken, A2 grubunda %30,4 ($\pm 13,8$) idi, A1 grubunda **yerinde hareketli spermatozoon ortalaması** %19,5 ($\pm 9,3$) iken, A2 grubunda %16,0 ($\pm 8,3$) idi A1 grubunda **hareketsiz spermatozoon ortalaması** %44,0 ($\pm 10,0$) iken, A2 grubunda %51,5 ($\pm 21,0$) bulundu ve gruplar arasındaki tüm bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (Tablo 2).

4.1.3. MORFOLOJİ

Semen analizi, ışık mikroskopunda Kruger'in kesin morfoloji kriterlerine göre yapılan incelemede spermatozoon morfolojisi; normal, baş, boyun, kuyruk ve mixed olarak beş ana grup ve akrozomal defekt, sitoplazmik artık olarak alt gruplarda değerlendirilmiştir.

Tablo 3. Morfolojik Kriterlerin Değerlendirilmesi

	Normozoo	Asteno-zoo	Toplam	P
Normal(%)	5,6 \pm 1,6	2,5 \pm 1,5	3,8 \pm 2,1	0,000*
Baş anomalisi(%)	47,0 \pm 7,1	58,3 \pm 15,4	52,8 \pm 13,6	0,002**
Akrozomal defekt (%)	9,26 \pm 7,6	13,8 \pm 10,2	11,6 \pm 9,2	0,08**
Boyun Anomalisi(%)	5,2 \pm 5,2	6,8 \pm 6,5	5,7 \pm 5,9	0,41**
Sitoplazmik artık (%)	2,1 \pm 4,1	2,7 \pm 5,0	2,2 \pm 4,4	0,87**
Kuyruk anomalisi(%)	1,7 \pm 4,0	3,6 \pm 10,2	2,6 \pm 4,6	0,07**
Mixed anomali (%)	40,57 \pm 10,3	28,3 \pm 15,2	34,3 \pm 14,5	0,001*

*Normal dağılım gösteren parametrelerde Student t testi kullanıldı. **Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Normozoospermia kriterlerine sahip olgularda **normal morfolojik yapı gösteren sperm oranı** %5,6 ($\pm 1,6$), astenozoospermia kriterlerine sahip olgularda ise %2,5 ($\pm 1,5$) bulundu ve iki grup arasındaki bu fark istatistiksel açıdan da anlamlıydı ($p < 0,05$). Normozoospermialarda **baş anomalisi** %47,0 ($\pm 7,1$) iken, astenozoospermialarda bu oran %58,3 ($\pm 15,4$) saptandı. Gruplar arasındaki bu fark istatistiksel açıdan da anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 2).

Akrozomal defekt oranı normozoospermia olgularında %9,26 ($\pm 7,6$) iken, astenozoospermialarda %13,8 ($\pm 10,2$), **Boyun anomalisi oranı** normozoospermia olgularında %5,2 ($\pm 5,2$) iken astenozoospermialarda %6,8 ($\pm 6,5$), **kuyruk defekti**

normozoospermialarda %1,7 ($\pm 4,0$) iken, astenozoospermialarda ise %3,6 ($\pm 10,2$) bulundu fakat iki grup arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı (Tablo 3).

Sitoplazmik artık oranı normozoospermia olgularında %2,1 ($\pm 4,1$) iken, astenozoospermialarda %2,7 ($\pm 5,0$) ile kontrol grubuna çok yakındı ve bu açıdan istatistiksel olarak anlamlı değildi. Normozoospermia grubunun **mixed anomalisi oranı** ortalama %40,57 ($\pm 10,3$) iken, astenozoospermialarda bu oran yarı yarıya azaldı ve %28,3 ($\pm 15,2$) ile istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 3).

Tablo 4. Sigaranın Normozoospermia ve Astenozoospermia gruplarında morfolojiye etkisi

	Normozoospermia			Astenozoospermia		
	Sigara içen (N1)	Sigara içmeyen (N2)	p	Sigara içen (A2)	Sigara içmeyen (A2)	p
N	10	13	-	15	12	-
Morfoloji (%)	5,4 \pm 1,3	5,7 \pm 1,8	0,97*	2,4 \pm 1,5	2,7 \pm 1,6	0,97*
Baş anomalisi (%)	46,9 \pm 8,7	47,1 \pm 5,7	0,55**	60,1 \pm 19,1	55,9 \pm 9,3	0,70**
Boyun anomalisi (%)	6,8 \pm 6,2	3,9 \pm 4,1	0,33**	5,8 \pm 6,9	8,1 \pm 6,1	0,39**
Kuyruk anomalisi (%)	2,2 \pm 5,0	1,3 \pm 3,3	0,74**	2,4 \pm 4,2	5,2 \pm 6,3	0,28**
Mixed anomalisi (%)	38,7 \pm 12,0	42,0 \pm 9,1	0,94*	28,3 \pm 17,3	28,3 \pm 12,9	1,00*

*Normal dağılım gösteren parametrelerde One way ANOVA testi kullanıldı. **Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Kruskal Wallis testi kullanıldı.

Spermatozoon morfolojisinde sigaranın etkisi gruplara göre incelendiğinde normozoospermia sigara içen alt grubunda normal morfolojideki spermatozoon oranı %5,4 ($\pm 1,3$) iken, sigara içmeyenlerde %5,7 ($\pm 1,8$) bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı değildi. Astenozoospermia grubunun alt gruplarında normal morfolojideki spermatozoon oranı sigara içenlerde %2,4 ($\pm 1,5$) iken sigara içmeyenlerde %2,7 ($\pm 1,6$) olarak tespit edildi. Bu farklılık da istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Ayrıca **morfolojik olarak baş, boyun, kuyruk ve mixed anomalileri** de istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi (Tablo 4).

4.1.4. VİTALİTE ve LÖKOSİT PEROKSİDASYONU

Bütün olgularda **canlılık değerlendirilmesi** Eosin testi kullanılarak yapıldı ve Eosin pozitif (boya alan=cansız) spermatozoon oranı ortalama %34,7 ($\pm 18,1$) bulundu. Gruplara bakıldığında normozoospermia olgularında %24,0 ($\pm 6,3$) iken, astenozoospermialarda yaklaşık iki katı bir oran %41,6 ($\pm 19,2$) bulundu ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlıydı ($p < 0,05$) (Tablo 5).

Semendeki yuvarlak hücre düzeyine (WBC) baktığımızda tüm olgularda ortalama $1,0 (\pm 8,1) \times 10^6/\text{mL}$ olarak belirlendi. Normozoospermia olgularında %0,8 ($\pm 0,9$) iken, astenozoospermialarda %0,6 ($\pm 0,9$) ile $< 1 \times 10^6/\text{mL}$ olma koşulunu sağladı ve iki grup arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 5).

Tablo 5. Normozoospermia ve Astenozoospermia gruplarında Eosin , Leucoscreen™ testi

	Normozoo	Asteno-zoo	Toplam	p
Eosin + (%)	24,0 \pm 6,3	41,6 \pm 19,2	34,7 \pm 18,1	0,000*
WBC (Yuvarlak hücre $\times 10^6/\text{mL}$)	0,8 \pm 0,9	0,6 \pm 0,9	1,0 \pm 8,1	0,33**
Peroksidaz+ ($\times 10^6/\text{mL}$)	0,2 \pm 0,3	0,1 \pm 0,2	0,3 \pm 0,7	0,18**

*Normal dağılım gösteren parametrelerde Student t testi kullanıldı**Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Sigaranın etkisi yuvarlak hücre ve vitaliteye göre incelendiğinde Normozoospermia alt grubu N1(sigara içen)'de canlılık belirlemek için kullanılan Eosin pozitif spermatozoon oranı %24,4 ($\pm 7,6$) iken, N2 (sigara içmeyen)'de %23,7 ($\pm 5,5$) bulundu fakat istatistiksel açıdan bu fark anlamlı değildi. Astenozoospermialarda ise A1 (sigara içen) için Eosin pozitif spermatozoon oranı %39,9 ($\pm 13,3$) iken, A2(sigara içmeyen)'de %43,7 ($\pm 25,3$) olarak bulundu ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 6).

Normozoospermia alt grubu N1'de yuvarlak hücre oranı $0,5 (\pm 0,5) \times 10^6/\text{mL}$, N2'de $1,1 (\pm 1,1) \times 10^6/\text{mL}$ idi ve istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. Yine peroksidaz pozitif oranı N1 grubu için $0,1 (\pm 0,2) \times 10^6/\text{mL}$, N2 grubu için $0,2 (\pm 0,3) \times 10^6/\text{mL}$ olarak hesaplandı fakat istatistiksel anlamlılık gözlenmedi. Astenozoospermia alt grubu A1'de yuvarlak hücre $0,8 (\pm 1,2) \times 10^6/\text{mL}$, A2'den $0,4 (\pm 0,5) \times 10^6/\text{mL}$ daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Peroksidaz pozitif oranına baktığımızda A1 grubu için $0,1 (\pm 0,2) \times 10^6/\text{mL}$,

A2 grubu için $0,0 (\pm 0,1) \times 10^6/\text{mL}$ olarak hesaplandı fakat istatistiksel anlamlılık bulunamadı (Tablo 6).

Tablo 6 . Sigaranın Normozoospermia ve Astenoospermia gruplarında vitalite ve peroksidasyona etkisi

	Normozoospermia			Astenoospermia		
	Sigara içen (N1)	Sigara içmeyen (N2)	p	Sigara içen (A2)	Sigara içmeyen (A2)	p
Eosin + (%)	24,4 $\pm 7,6$	23,7 $\pm 5,5$	1,00*	39,9 $\pm 13,3$	43,7 $\pm 25,3$	0,92*
WBC (Yuvarlak hücre $\times 10^6/\text{mL}$)	0,5 $\pm 0,5$	1,1 $\pm 1,1$	0,10**	0,8 $\pm 1,2$	0,4 $\pm 0,5$	0,40**
Peroksidaz+ ($\times 10^6/\text{mL}$)	0,1 $\pm 0,2$	0,2 $\pm 0,3$	0,30**	0,1 $\pm 0,2$	0,0 $\pm 0,1$	0,41**

*Normal dağılım gösteren parametrelerde One way ANOVA testi kullanıldı. **Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Kruskal Wallis testi kullanıldı.

4.2. DNA FRAGMENTASYONU –TUNEL BULGULARI

DNA fragmentasyonu için uygulanan TUNEL testinde sonuçlar % cinsinden değerlendirilerek incelendi. Bütün olgularda TUNEL pozitif ortalaması yüzde 8,9 ($\pm 7,7$)'dı. Gruplar içinde normozoospermia grubunda bu değer %5,2 ($\pm 5,0$) iken, astenoospermia olgularında %12,1 ($\pm 8,3$) idi ve istatistiksel açıdan da anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 7).

Tablo 7. Normozoospermia ve Astenoospermia TUNEL- APOPTOZİS değerleri

	Normozoo	Astenoospermia	Toplam	p
TUNEL+ (%)	5,2 $\pm 5,0$	12,1 $\pm 8,3$	8,9 $\pm 7,7$	0,000**
Nekrotik AN+/PI+ (%)	31,5 $\pm 14,8$	26,6 $\pm 10,9$	26,1 $\pm 11,5$	0,65**
Apopitotik AN+/PI- (%)	11,5 $\pm 14,8$	4,8 $\pm 3,7$	4,5 $\pm 5,4$	0,93**

**Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Sigaranın etkisi normozoospermia grubunda incelendiğinde, sigara içenlerde % 5,4 ($\pm 2,0$) , içmeyenlerde ise %5,0 ($\pm 6,5$) idi ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p > 0,05$). Astenoospermia grubunda sigara içenlerde TUNEL pozitif ortalaması %13,6 ($\pm 10,4$) iken, sigara içmeyenlerde %10,1 ($\pm 4,3$) bulundu, istatistiksel olarak bir anlamlılık gözlenemedi (Tablo 8).

DNA fragmentasyonu ile diğer parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde DNA fragmentasyonu (TUNEL + oranı) ile spermatozoon sayısı arasında negatif yönde korelasyon

bulundu (rho: -0,414, p: 0,00) (Tablo 9). DNA fragmantasyonu ile total motil sayı arasında negatif yönde korelasyon bulundu (rho: -0,410, p: 0,00) (Tablo 9).

Tablo 8. Sigaranın Normozoospermia ve Astenoospermia gruplarında TUNEL – Apoptozis düzeylerine etkisi

	Normozoospermia			Astenoospermia		
	Sigara içen	Sigara içmeyen	p	Sigara içen	Sigara içmeyen	P
TUNEL+ (%)	5,4 ±2,0	5,0 ±6,5	0,99*	13,6 ±10,4	10,1 ±4,3	0,56*
Nekrotik AN+/PI+ (%)	21 (n:1)	42 (n:1)	0,32**	29,5 ±12,0 (n:8)	20,8 ±5,3 (n:4)	0,35**
Apoptotik AN+/PI- (%)	1 (n:1)	22 (n:1)	0,32**	5,6 ±4,3 (n:8)	3,3 ±1,5 (n:4)	0,44**

*Normal dağılım gösteren parametrelerde One way ANOVA testi kullanıldı. **Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Kruskal Wallis testi kullanıldı.

DNA fragmantasyonu ile motilite arasındaki ilişki incelendiğinde DNA fragmantasyonu spermatozoon yüzdesiyle hızlı ileri progressif (+4) hareketli spermatozoon oranı arasında negatif yönde korelasyon bulundu (rho: -0,523, p: 0,00). DNA fragmantasyonu ile ileri hareketli (+3) spermatozoon yüzdesi arasında negatif yönde korelasyon bulundu (rho: -0,486, p: 0,00) (Tablo 9). DNA fragmantasyonu ile hareketsiz spermatozoon oranı arasında ise pozitif yönde korelasyon saptandı. Böylece TUNEL pozitif oranı arttıkça hareketsiz spermatozoon oranının da arttığı gözlemlendi (rho: 0,604 p: 0,00) (Tablo 9).

DNA fragmantasyon oranı arttıkça normal morfolojideki spermatozoon oranının azaldığı gözlemlendi, aralarında negatif korelasyon saptandı (rho: -0,466 p: 0,00) (Tablo 9). DNA fragmantasyon oranı arttıkça spermatozoonda baş anomalisinin de arttığı, aralarında pozitif yönde korelasyon olduğu belirlendi (rho: 0,330 p: 0,02) (Tablo 9). DNA fragmantasyon oranı arttıkça Eosin testi pozitif olan cansız spermatozoon oranının pozitif yönde korelasyonla arttığı gözlemlendi (rho: 0,426 p: 0,00) (Tablo 9).

DNA fragmantasyonu arttıkça ROS parametresi olan lipit peroksidasyon (MDA) oranının da pozitif korelasyon göstererek arttığını saptadık (rho: 0,809 p: 0,00) (Tablo 9). Oksidatif stres belirlenmesindeki diğer parametre olan antioksidan GPX oranı ile DNA fragmantasyonu arasındaki ilişkiye baktığımızda GPX oranı arttıkça DNA fragmantasyonunun azaldığını, negatif yönde korelasyonla belirledik (rho: -0,652 p: 0,00) (Tablo 9). DNA fragmantasyonu ile apoptozis arasındaki ilişkiyi incelediğimizde ise DNA

fragmantasyonu arttıkça apoptozisin da arttığını pozitif yönde korelasyon varlığıyla gösterdik (rho: 0,911 p: 0,00). Nekrotik (geç apoptotik) spermatozoon oranı ile DNA fragmantasyonunun bir ilişkisini bulamadık (rho: 0,191 p: 0,51) (Tablo 9).

Tablo 9. TUNEL ile diğer parametrelerin Korelasyon analizi

TUNEL + (%)	Korelasyon Katsayısı	p	N
Spermatozoon sayısı ($\times 10^6$ /mL)	-,414**	0,00	50
Total motil sayı ($\times 10^6$)	-,410**	0,00	50
+4 ileri hareketli (%)	-,523**	0,00	50
+3 İleri Hareketli (%)	-,486**	0,00	50
Hareketsiz (%)	,604**	0,00	50
Normal (%)	-,466**	0,00	50
Baş (%)	,330*	0,02	50
Eosin (%)	,426**	0,00	50
GPX (mU/mL)	-,652**	0,00	50
MDA (μ M)	,809**	0,00	50
Apoptotik (AN+/PI- %)	,911**	0,00	14
Nekrotik (AN+/PI+ %)	0,191	0,51	14

** $P < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Spearman's rho analizi kullanıldı.

4.3. APOPTOZİS BULGULARI

TUNEL pozitif oranı %10 ve üzerinde olan toplam 14 olguya Annexin V testi uygulanarak apoptozis belirlendi. AnnexinV, apoptotik spermatozoonları belirlerken propidyum iyodür (PI) ise, nekrotik (geç apoptotik) spermatozoonları tespit etti. Sonuçlar nekrotik AN+/PI+ (%) ve apoptotik AN+/PI- (%) olarak belirlendi. Bu 14 olgunun ikisi normozoospermia, 12'si astenozoospermia olgusuydu. Toplam apoptotik hücre ortalaması %4,5 ($\pm 5,4$), nekrotik hücre ortalaması %26,1 ($\pm 11,5$) olarak hesaplandı. Normozoospermia grubunda apoptotik hücre oranı (AN+/PI-) %11,5 ($\pm 14,8$) iken, astenozoospermialarda %4,8 ($\pm 3,7$) bulundu fakat bu sonuçlar grup sayıları eşit olmadığından istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Normozoospermia grubunda nekrotik hücre oranı (AN+/PI+) %31,5 ($\pm 14,8$) iken, astenozoospermialarda %26,6 ($\pm 10,9$) olarak bulundu ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi (Tablo 7).

Apopitotik spermatozoon yüzdesi normozoospermia grubunda sigara içen bir olguda %1 iken sigara içmeyen diğer olgu da % 22' idi. Astenozoospermia grubu incelendiğinde sigara içen 8 olguda %5,6 ($\pm 4,3$) iken, içmeyen 4 olguda ortalama %3,3 ($\pm 1,5$) olarak hesaplandı. Grup sayıları eşit olmadığından ya da örnek sayısı yetersiz olduğundan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 8).

Nekrotik spermatozoon yüzdesi AN+/PI+ (%), normozoospermia grubunda sigara içen bir olguda %21 iken sigara içmeyen diğer olgu da % 42 bulundu. Astenozoospermia grubunda incelendiğinde, sigara içen 8 olguda %29,5 ($\pm 12,0$) iken, sigara içmeyen 4 olguda ortalama %20,8 ($\pm 5,3$) olarak hesaplandı ve grup sayıları eşit olmadığından sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 8).

TUNEL pozitif oranı %10 ve üzerinde olan ve annexin V uygulanan toplam 14 olgunun apopitozis bulguları ile diğer parametreler arasındaki ilişki incelendi. Apopitozis (AN+/PI %) ile spermatozoon sayısı, total motil sayı, ileri hareketli (+3) spermatozoon yüzdesi, hareketsiz spermatozoon yüzdesi, normal morfolojideki spermatozoon oranı, eosin testi pozitif olan cansız spermatozoon oranı arasında, istatistiksel açıdan herhangi bir ilişki görülmedi (Tablo 10). Bu çalışmada apopitozis arttıkça lipit peroksidasyon (MDA) oranı ve nekrotik hücre oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (rho: 0,399 p: 0,16) (rho: 0,329 p: 0,25) (Tablo 10).

Tablo 10. Apopitozis ile diğer parametreler arasındaki ilişki

Apopitotik (AN+/PI- %)	Korelasyon Katsayısı	p	N
Spermatozoon sayısı ($\times 10^6$ /mL)	-0,135	0,65	14
Total motil sayı ($\times 10^6$)	-0,075	0,80	14
+4 ileri hareketli (%)	-0,353	0,22	14
+3 İleri Hareketli (%)	0,24	0,41	14
Hareketsiz (%)	-0,09	0,76	14
Normal (%)	-0,027	0,93	14
Eosin (%)	0,013	0,96	14
GPX (mU/mL)	-0,381	0,18	14
MDA (μ M)	0,399	0,16	14
TUNEL (%)	,911**	0,00	14
Nekrotik (AN+/PI+ %)	0,329	0,25	14

** $P < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Spearman's rho analizi kullanıldı.

4.4. ROS (MDA) ve ANTİOKSİDAN (GPX) DÜZEYLERİ

Çalışmamızda **reaktif oksijen türlerinin düzeyini** belirlemede kullanılan lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA (malondialdehit) oranları tüm olgularda $10,2 (\pm 3,8)\mu\text{M}$ olarak saptandı. Normozoospermia grubumuzda MDA düzeyini $8,9 (\pm 3,8)\mu\text{M}$, astenozoospermia $11,5 (\pm 3,8)\mu\text{M}$ olan hasta grubumuza göre anlamlı ölçüde düşük bulduk ($p < 0,05$). Her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi (Tablo 11).

Antioksidan kapasitesi GPX düzeyleriyle saptandı ve tüm çalışma grubunda ortalama $4,2 (\pm 3,9)$ mU/mL'di. Gruplara baktığımızda, normozoospermia olgularında ortalama $5,9 (\pm 4,6)$ mU/mL iken, astenozoospermia olgularında ortalama $2,7 (\pm 2,4)$ mU/mL idi. Bu artış istatistiksel açıdan anlamlıydı ($p < 0,05$) (Tablo 11). **Total protein oranları (g/L)**, tüm olgularda ortalama $2,0 (\pm 0,4)$ g/L, normozoospermia grubunda ortalama $2,2 (\pm 0,3)$ g/L ve astenozoospermia grubunda ortalama $1,9 (\pm 0,3)$ g/L idi. Gruplar arasındaki bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 11).

Tablo 11. Normozoospermia ve Astenozoospermia gruplarında MDA, GPX, Total Protein düzeyleri

	Normozoo	Astenozoo	Toplam	p
MDA (μM)	$8,9 \pm 3,8$	$11,5 \pm 3,8$	$10,2 \pm 3,8$	0,02*
GPX (mU/mL)	$5,9 \pm 4,6$	$2,7 \pm 2,4$	$4,2 \pm 3,9$	0,01*
Total Protein (g/L)	$2,2 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,4$	0,01*

*Normal dağılım gösteren parametrelerde Student t testi kullanıldı.

Normozoospermia grubunda sigara içenlerde MDA düzeyi ortalama $9,6 (\pm 3,3)$ μM idi sigara içmeyenlerde $8,4 (\pm 4,2)$ μM idi, bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunamadı (Tablo 12). **Astenozoospermia olgularında sigara içenlerde MDA düzeyi** $12,2 (\pm 3,7)$ μM bulunurken içmeyenlerde daha düşüktü $10,6 (\pm 3,7)$ μM , fakat bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi (Tablo 12).

GPX enzim aktivitesi sigara içen normozoospermi grubunda ortalama $4,7 (\pm 4,2)$ mU/mL, sigara içmeyenlere $6,8 (\pm 4,9)$ mU/mL göre daha düşüktü fakat bu istatistiksel açıdan anlamlı değildi (Tablo 12). Astenozoospermia olgularında sigara içenlerde GPX düzeyi $1,6 (\pm 1,1)$ mU/mL bulunurken içmeyenlerde $4,1 (\pm 2,8)$ mU/mL'di. Bu fark istatistiksel açıdan

anlamli değildi (Tablo 12). **Total protein düzeyleri** (g/L), normozoospermia grubu sigara içenlerde ortalama 1,9 ($\pm 0,1$) iken, içmeyenlerde 2,3 ($\pm 0,3$) bulundu ve istatistiksel açıdan anlamlıydı ($p < 0,05$) (Tablo 12). Astenozoospermia olgularında sigara içenlerle (1,9 $\pm 0,2$) , içmeyenlerin (1,9 $\pm 0,4$) total protein düzeyi (g/L) ortalamaları ise aynıydı (Tablo 12).

Tablo 12. Sigaranın Normozoospermia ve Astenozoospermia gruplarında MDA, GPX, Total Protein düzeylerine etkisi

	Normozoospermia			Astenozoospermia		
	Sigara içen	Sigara içmeyen	P	Sigara içen	Sigara içmeyen	p
N	10	13	-	15	12	-
MDA (μM)	9,6 $\pm 3,3$	8,4 $\pm 4,2$	0,87*	12,2 $\pm 3,7$	10,6 $\pm 3,7$	0,68*
GPX (mU/mL)	4,7 $\pm 4,2$	6,8 $\pm 4,9$	0,47*	1,6 $\pm 1,1$	4,1 $\pm 2,8$	0,26*
Total protein (g/L)	1,9 $\pm 0,1$	2,3 $\pm 0,3$	0,00*	1,9 $\pm 0,2$	1,9 $\pm 0,4$	0,99*

*Normal dağılım gösteren parametrelerde One way ANOVA testi kullanıldı. **Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Kruskal Wallis testi kullanıldı.

Lipit peroksidasyonu ile diğer parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde lipit peroksidasyonu (MDA düzeyi) ile spermatozoon sayısı arasında negatif yönde korelasyon bulundu fakat istatistiksel olarak anlamli değildi ($r: -0,248$ $p: 0,08$) (Tablo 13). Lipit peroksidasyonu ile total motil sayı arasında bir ilişki bulunamadı (Tablo 13). Lipit peroksidasyonu ile motilite arasındaki ilişki incelendiğinde, hızlı ileri progressif (+4) hareketli spermatozoon yüzdesi, ileri hareketli (+3) spermatozoon yüzdesi, hareketsiz spermatozoon yüzdesi ile lipit peroksidasyonu arasında bir ilişki bulunmadı (Tablo 13).

MDA ile normal morfolojideki spermatozoon oranı, eosin testi pozitif olan cansız spermatozoon oranı, mL'deki peroksidaz pozitif spermatozoon oranı arasında bir korelasyon saptanmadı (Tablo 13). Lipit peroksidasyonu arttıkça DNA fragmantasyon oranının da pozitif korelasyon göstererek arttığını saptadık ($r: 0,635$ $p: 0,00$) (Tablo 13). Oksidatif stres belirlenmesindeki diğer parametre olan antioksidan GPX oranı ile arasındaki ilişki incelendiğinde lipit peroksidasyonu arttıkça GPX düzeyinin azaldığını negatif yönde korelasyonla belirledik ($r: -0,652$ $p: 0,00$) (Tablo 13).

Lipit peroksidasyonu belirleyici olan MDA düzeyi ile apoptozis arasındaki ilişkiyi incelediğimizde ise TUNEL testinde pozitif oranının %10 ve üzeri olan 14 olguya uyguladığımız AnnexinV testinde bu olgularda lipit peroksidasyonu arttıkça apoptozisinde

arttığı fakat bunun istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını belirledik (Tablo13). MDA düzeyinin nekrotik spermatozoon oranı ile bir ilişkisi bulunamadı (Tablo 13).

Tablo 13. MDA ve diğer parametrelerin korelasyon analizi

MDA	Korelasyon Katsayısı	p	N
Spermatozoon Sayısı ($\times 10^6/\text{mL}$)	-0,248	0,08	50
Total motil sayı ($\times 10^6/\text{mL}$)	-0,167	0,25	50
+4 ileri hareketli (%)	-0,201	0,162	50
+3 İleri Hareketli (%)	-0,143	0,32	50
Hareketsiz (%)	0,199	0,17	50
Morfoloji normal (%)	-0,046	0,75	50
Eosin+ (%)	0,148	0,31	50
Peroksidaz+ ($\times 10^6/\text{mL}$)	-0,204	0,16	50
TUNEL+ (%)	,635**	0,00	50
GPX (mU/mL)	-,608**	0,00	50
Apopitotik+ (AN+/PI- %)	0,353	0,22	14
Nekrotik+ (AN+/PI+ %)	0,026	0,93	14

** $P < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Pearson Korelasyon analizi kullanıldı

Antioksidan enzim kapasitesi (GPX) ile diğer parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde antioksidan enzim (GPX düzeyi) ile spermatozoon sayısı arasında pozitif korelasyon bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($r: -0,256$ $p: 0,07$) (Tablo 13). GPX düzeyi ile total motil sayı, hızlı ileri progressif (+4) hareketli spermatozoon yüzdesi, ileri hareketli (+3) spermatozoon yüzdesi arasında bir ilişki bulunamadı (Tablo 14). GPX düzeyi ile hareketsiz spermatozoon yüzdesi arasında negatif korelasyon istatistiksel açıdan anlamlı değildi (Tablo 14).

GPX düzeyi ile normal morfolojideki spermatozoon oranı, eosin testi pozitif olan cansız spermatozoon oranı mL'deki peroksidaz pozitif spermatozoon oranı arasında bir korelasyon saptanamadı. Antioksidan düzeyleri düştükçe baş anomalisi artışını negatif yönlü korelasyonla gösterdik ($r: -0,288$ $p: 0,04$) (Tablo 14). Antioksidan düzeyi arttıkça DNA fragmentasyon oranında azalma olduğunu negatif yönlü korelasyonla tespit ettik. ($r: -0,436$ $p:$

0,00) (Tablo 14). Oksidatif stres belirlenmesindeki diğer parametre olan antioksidan MDA oranı ile arasındaki ilişki incelendiğinde GPX enzim aktivitesi arttıkça MDA düzeyinin azaldığını negatif yönde korelasyonla belirledik (r: -0,608 p: 0,00)(Tablo 14).

Oksidatif stres için belirleyici olan antioksidan enzim GPX düzeyi ile apoptozis arasındaki ilişkiyi incelediğimizde ise TUNEL testinde pozitif oranının %10 ve üzeri olan 14 olguya uyguladığımız AnnexinV testi uygulanan olgularda GPX düzeyi arttıkça apoptozisinde düştüğünü fakat bunun istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını belirledik (r: -0,381 p: 0,18) (Tablo 14). GPX düzeyinin artışıyla nekrotik spermatozoon oranının azaldığını istatistiksel olarak negatif korelasyonla saptadık. (r: -0,538 p: 0,05) (Tablo 14).

Tablo 14. GPX Düzeyleri Korelasyon Analizi

GPX (mU/mL)	Korelasyon Katsayısı	P	N
Spermatozoon sayısı (x10 ⁶ /mL)	0,256	0,07	50
Total motil sayı (x10 ⁶ /mL)	0,192	0,18	50
+4 ileri hareketli (%)	0,227	0,11	50
+3 İleri Hareketli (%)	0,236	0,10	50
Hareketsiz (%)	-0,263	0,07	50
Normal (%)	0,176	0,22	50
Baş (%)	-,288*	0,04	50
Eosin (%)	-0,24	0,09	50
Peroksidaz+ (x10 ⁶ /mL)	0,02	0,89	50
TUNEL + (%)	-,436**	0,00	50
MDA (µM)	-,608**	0,00	50
Apoptotik (AN+/PI- %)	-0,381	0,18	14
Nekrotik (AN+/PI+ %)	-,538*	0,05	14

** P<0,05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Pearson Korelasyon analizi kullanıldı

Astenozoospermia grubunda doz bağımlı olarak günde 20 ve üzeri sigara içenlerde içmeyenlere göre MDA (13,9 ± 3,1 - 10,6± 3,7), TUNEL (%) (14,3 ± 10,8 - 10,1± 4,3) ve apoptozis (%) düzeylerini (6,8 ± 5,9 - 4,1 ± 3,8) daha yüksek, GPX düzeylerini ise (1,4 ± 1,0 - 4,1 ± 3,8) daha düşük bulduk. Bu MDA ve GPX düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlıydı.

Normozoospermia grubunda ise doz bağımlı olarak günde 20 ve üzeri sigara içenlerde içmeyenlere göre MDA ($9,8 \pm 2,6 - 8,4 \pm 4,2$), TUNEL (%) ($5,2 \pm 1,2 - 4,9 \pm 6,4$) ve GPX düzeylerini ise ($3,3 \pm 2,9 - 6,8 \pm 4,9$) daha düşük bulduk. Fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 15).

Tablo 15. Sigaranın ROS , TUNEL, Apoptozis ile doz bağımlı ilişkisi

	Astenozoospermia			Normozoospermia		
	Ağır içiciler	Sigara içmeyen	p	Ağır içiciler	Sigara içmeyen	p
n	8	12		3	13	p
MDA	$13,9 \pm 3,1$	$10,6 \pm 3,7$	0,05*	$9,8 \pm 2,6$	$8,4 \pm 4,2$	0,60*
GPX	$1,4 \pm 1,0$	$4,1 \pm 3,8$	0,02*	$3,3 \pm 2,9$	$6,8 \pm 4,9$	0,27*
Apoptozis (%)	$6,8 \pm 5,9$ (n=4)	$3,3 \pm 1,5$ (n=4)	0,30**	0	22	
TUNEL (%)	$14,3 \pm 10,8$	$10,1 \pm 4,3$	0,23*	$5,2 \pm 1,2$	$4,9 \pm 6,4$	0,94*

*Normal dağılım gösteren parametrelerde One way ANOVA testi kullanıldı. **Normal dağılım göstermeyen parametrelerde Kruskal Wallis testi kullanıldı.

4.5. ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR

N1 grubunda normal morfolojide spermatozoonların boyun ve kuyruk ultrastrüktürleri normal yapıdayken baş görünüşleri çoğu hücrede oval, çekirdek kromatini yoğun ve homojen, akrozom yapısı normal gözlemlendi. Ancak bir grup hücrede nükleer vakuolizasyon, amorf baş ve akrozomal membran invaginasyonu izlendi (Resim 8a,b) (Tablo 16).

N2 grubundaki olgular ise ultrastrüktürel olarak normal morfolojideydi. Spermatozoonların baş görünüşleri oval, çekirdek kromatini yoğun ve homojen, akrozom yapısı normal olarak gözlemlendi. Akrozom içeriği homojen bir dağılım gösterirken, elektron yoğun bölgeler seçildi. Membran yapısının düzgün, baş, boyun ve kuyruk kısımlarının normal olduğu görüldü. Orta parçada mitokondrilerin sıralanışı heliks yapısında izlendi. Normal morfolojide fakat nükleer vakuolizasyon gösteren spermatozoonlara da az sayıda rastlandı. Ancak az sayıda genişlemiş, fragmente nükleuslu spermatozoonlara da rastlandı (Resim 9a,b,c) (Tablo 16).

A1 grubunda, nükleer vakuollü ve amorf başlı spermatozoonlara sık rastlandı. Hemen hemen bütün spermatozoon başlarında nükleer vakuolizasyon görülürken, akrozomal

membran ayrılması ve invaginasyonu gösteren spermatozoonlar saptandı. Düzensize, genişlemiş ya da fragmante şekilli nükleuslu apoptotik hücelere, nükleer vakuollere, kromatin ağ kaybı gibi defektlere rastlandı (Resim 10a, 10b, 11b). Ayrıca çok sayıda makrofaj hücresi ve immatür germ hücresi (spermatozoid, spermatid) gözlemlendi (Resim 10b, 11a) (Tablo 16).

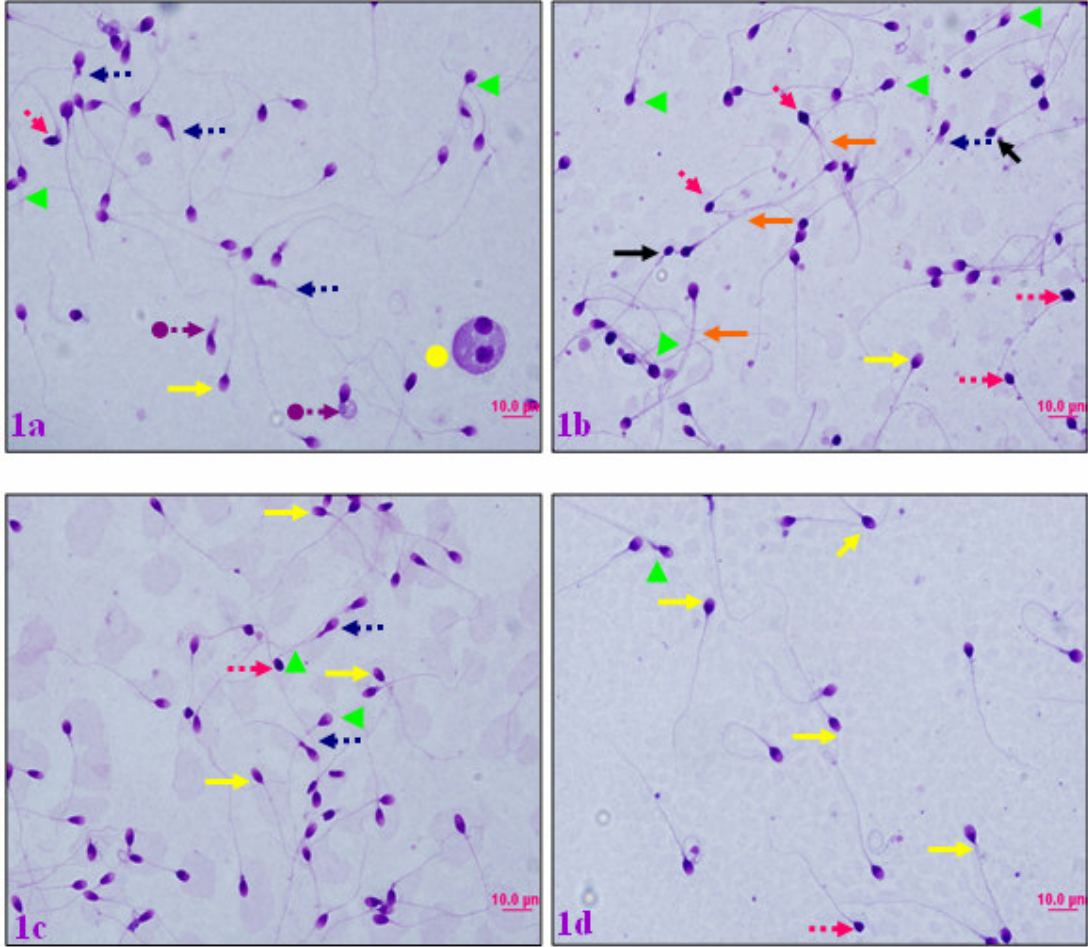
A2 grubunda sigara içenlere göre ultrastrüktürel olarak benzer görüntüler saptandı. Spermatozonda; amorf baş, nükleer vakuoller, sitoplazmik artıklar, akrozomal içerik kaybı, akrozomal membran hasarı gözlemlendi (Resim 12a,b). Apoptotik hücelerde, irregüler, genişlemiş ya da fragmante şekilli nükleus, nükleer vakuoller, kromatin ağ kaybı ve akrozomal hasar tespit edildi (Resim 12a, 13a, 13b). Ayrıca bu grupta oldukça fazla Bizzare spermatozoon ve az sayıda makrofaj ile immatür germ hüceleri (spermatozoid) de gözlemlendi (Resim 12a, 12b) (Tablo 16).

Apoptozisin ilk morfolojik bulgularından olan kromatin agregasyonu ve büyük kompakt granüllerin yığılması ile nükleer kromatin kondenzasyonu bütün gruplar ve alt gruplarda gözlemlendi. Normozoospermia grubunda hasta grubuna göre apoptotik ve nekrotik hücre morfolojilerine daha az rastlandı. Ancak genel morfolojisi normal olan spermatozoonların bazılarında nükleer vakuolizasyon dikkati çekti. Hem normozoospermia hem de astenoospermianın alt gruplarında ultrastrüktürel farkı yansıtacak belirgin bir karakter gözlenmemiştir. (Tablo 16).

Tablo 16. Elektron mikroskopik spermatozoon histopatolojisi

	Asteno		Normo	
	Sigara +	Sigara -	Sigara +	Sigara -
Akrozomal membran kaybı	+	+	-	-
Akrozomal invaginasyon	+	+	+	+
Akrozomal membranda vezikülasyon ve akrozomal içerik kaybı	+	+	+	+
Granüler kromatin içeren nükleus	+	+	+	+
Akrozomal kist	+	+	+	+
Akrozom yokluğu (globozoospermia)	+	-	+	-
Sitoplazmik artık	+	+	+	+
Çok miktarda yoğun sitoplazmik materyalle çevrili hiperkondense nükleus,	+	+	+	+
Düzensiz mitokondri heliks yapısı	+	+	-	-
İmmatür germ hücresi (spermatid, spermatosit)	+	+	-	-
Amorf baş	+	+	+	+
Makrofaj	+	-	-	-
Düzgün aksonem yapısı (9+2)	+	+	+	+
Düzensiz aksonem kalın dış fibril	-	-	-	-
Ortak akrozomlu Bizarre sperm	+	-	-	-

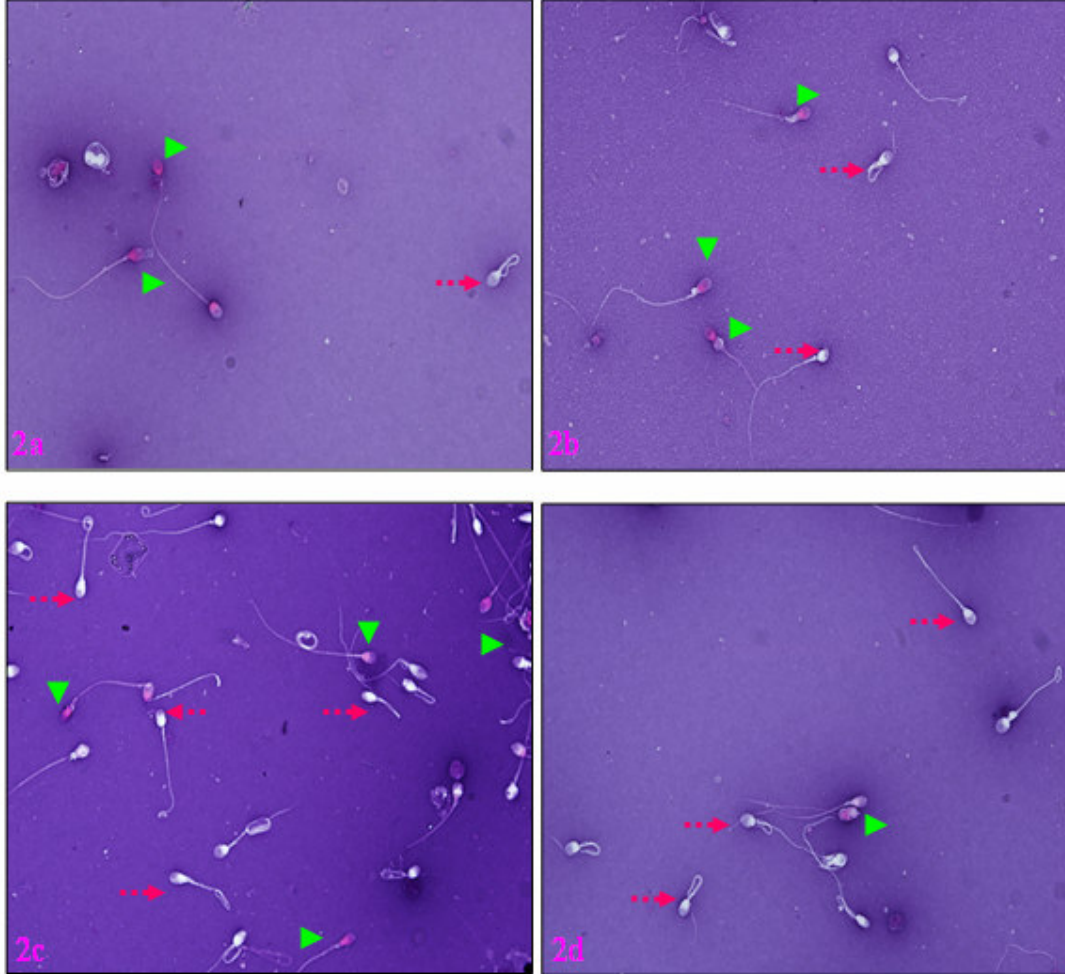
IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR
STAT III BOYAMASI



Resim 2 Işık mikroskopik STAT III boyaması

1. (a) Asteozoospermia sigara içmeyen olgu. (b) Asteozoospermia sigara içen olgu. (c) Normozoospermia sigara içmeyen olgu. (d) Normozoospermia sigara içen olgu. Normal morfololideki sperm (→), akrozomal kist (▲), Akrozom yokluğu (●→), boyun bölgesinde sitoplazmik artık (●●●), yuvarlak başlı globozoospermi (→), çift kuyruk anomalisi (←), kıvrık kuyruk defekti (●→), (f) Lökosit (●).

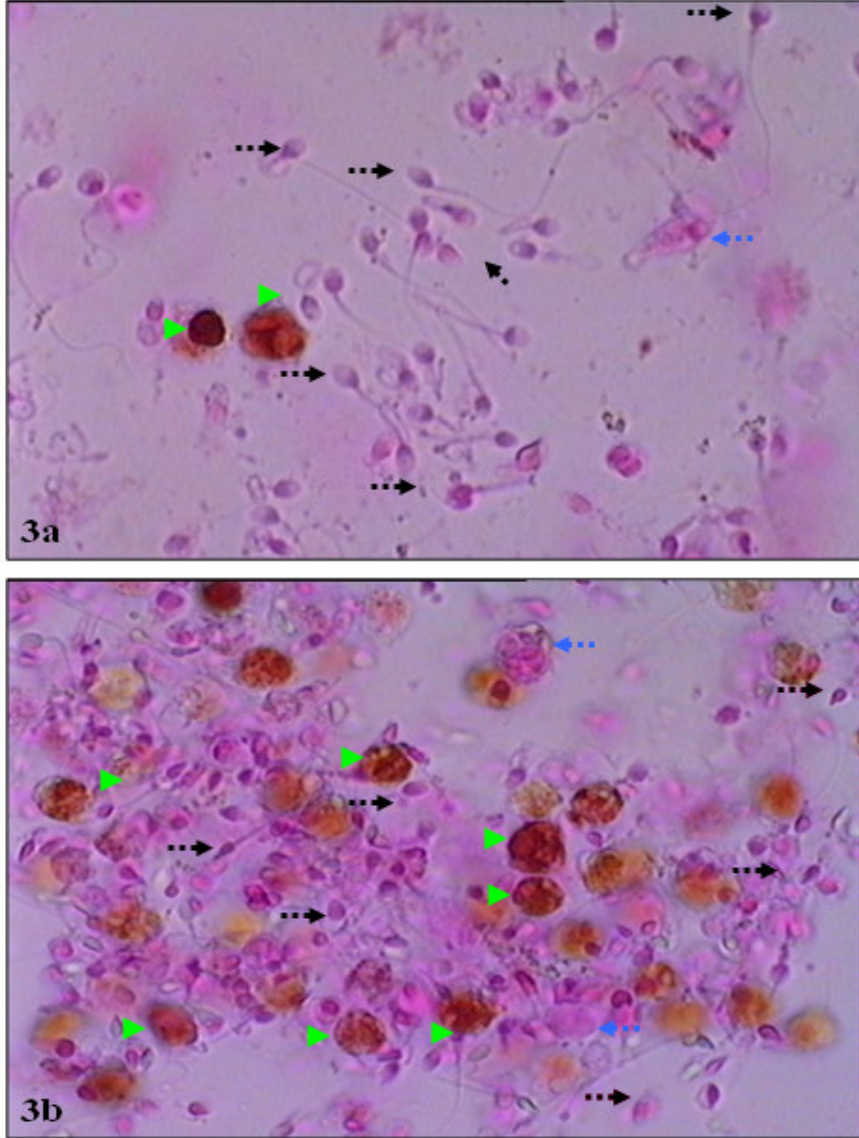
EOSİN BOYAMASI






Resim 2 Işık mikroskobik Eosin boyaması

2. (a) Asteozoospermia sigara içmeyen olgu. (b) Asteozoospermia sigara içen olgu. (c) Normozoospermia sigara içmeyen olgu. (d) Normozoospermia sigara içen olgu. Eosin pozitif (cansız,ölü spermatozoon) (▲), Eosin negatif (canlı, vital spermatozoon) (--->).

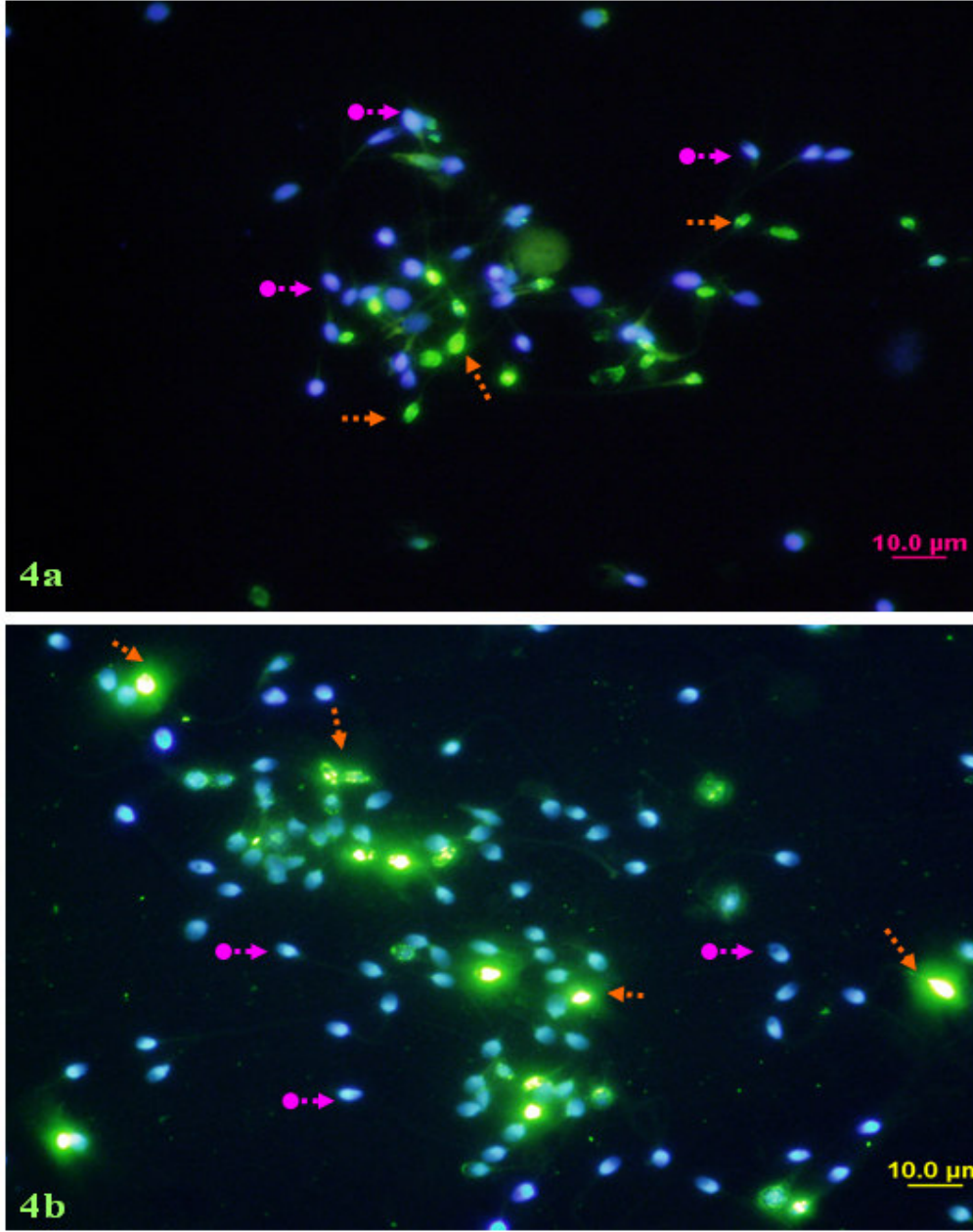
LEUCOSCREEN™ BOYAMASI





Resim 3 Işık mikroskobik Leucoscreen™ boyaması

3. (a) Yuvarlak hücresi $>1 \times 10^6$ olan olgulardan Leucoscreen™ uygulanıp peroksidaz negatif (lökosit varlığı) $<1 \times 10^6$ olan olgu. (b) Yuvarlak hücresi $>1 \times 10^6$ olan olgulardan Leucoscreen™ uygulanıp peroksidaz pozitif (lökosit miktarı $>1 \times 10^6$ olan olgu. Peroksidaz pozitif lökosit () , Spermatozoon () , Spermatogenik hücre ()).

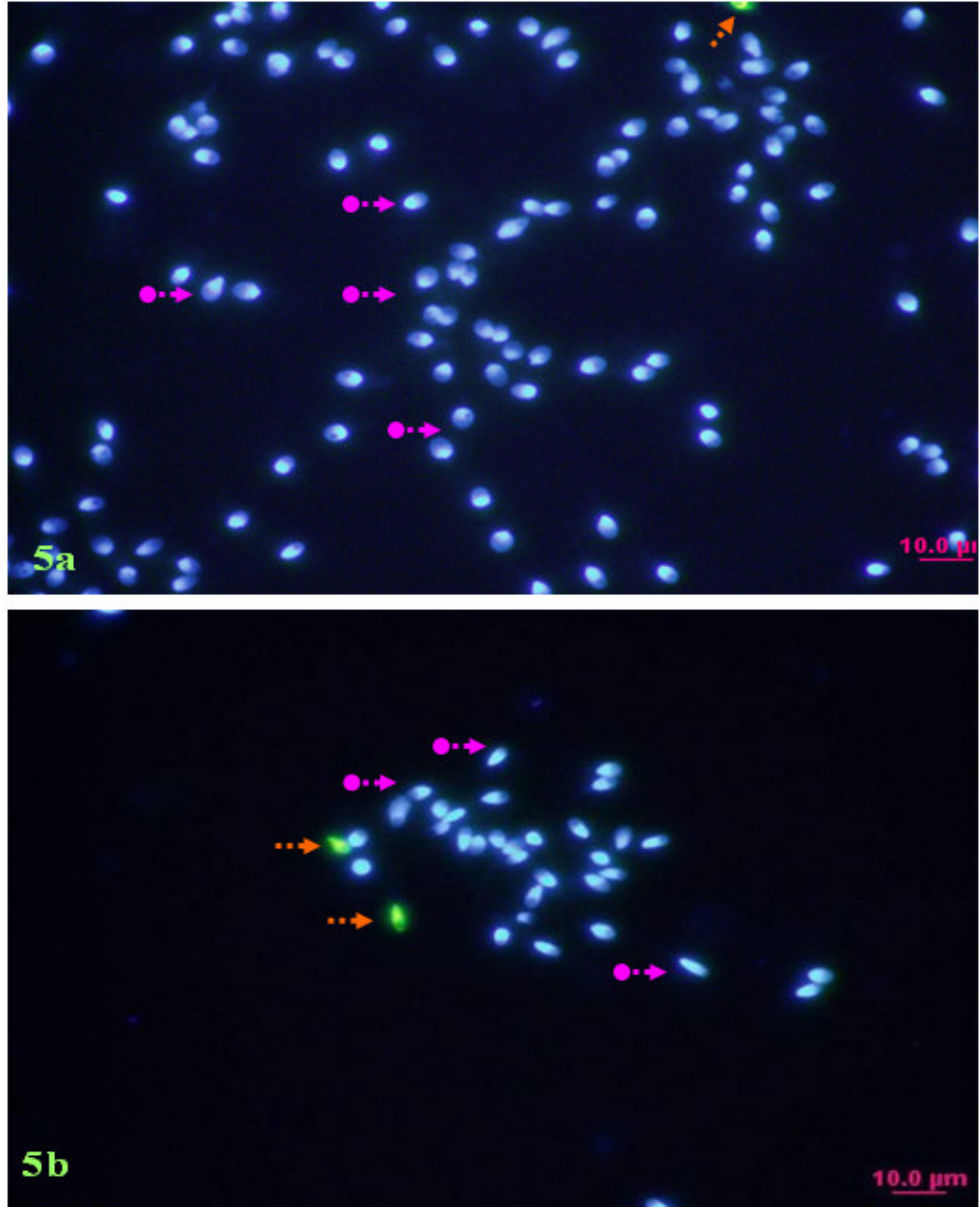
FLORESAN MİKROSKOBİK BULGULAR





Resim 4 Floresan mikroskopik TUNEL boyaması

4. (a) Asteozoospermia sigara içmeyen olgu. (TUNEL pozitif %21,0) (b) Asteozoospermia sigara içen olgu (TUNEL pozitif %40,9) TUNEL+ DNA fragmentasyonlu spermatozoon (), TUNEL-DNA fragmentasyonsuz spermatozoon ().

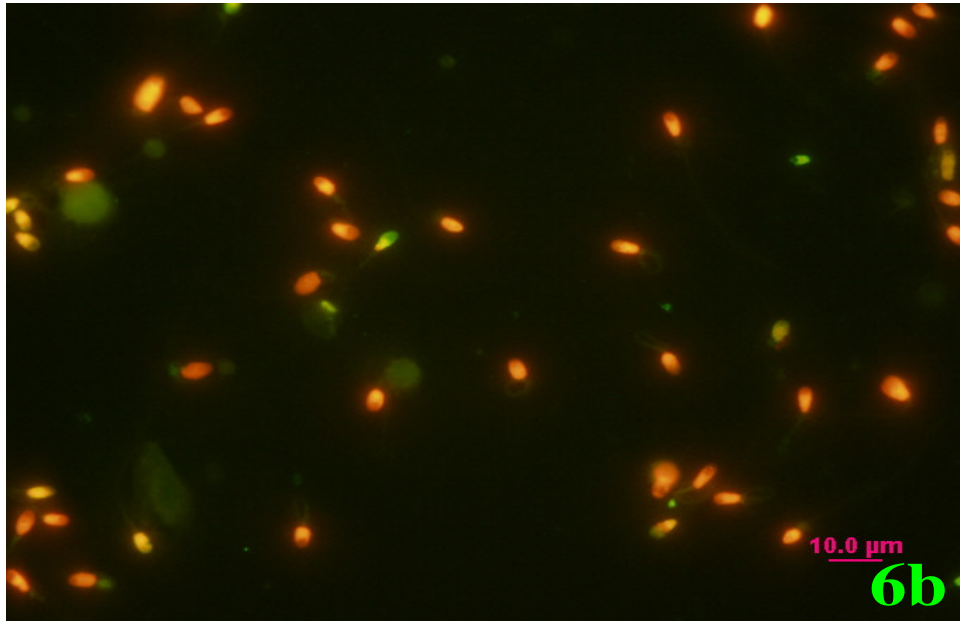
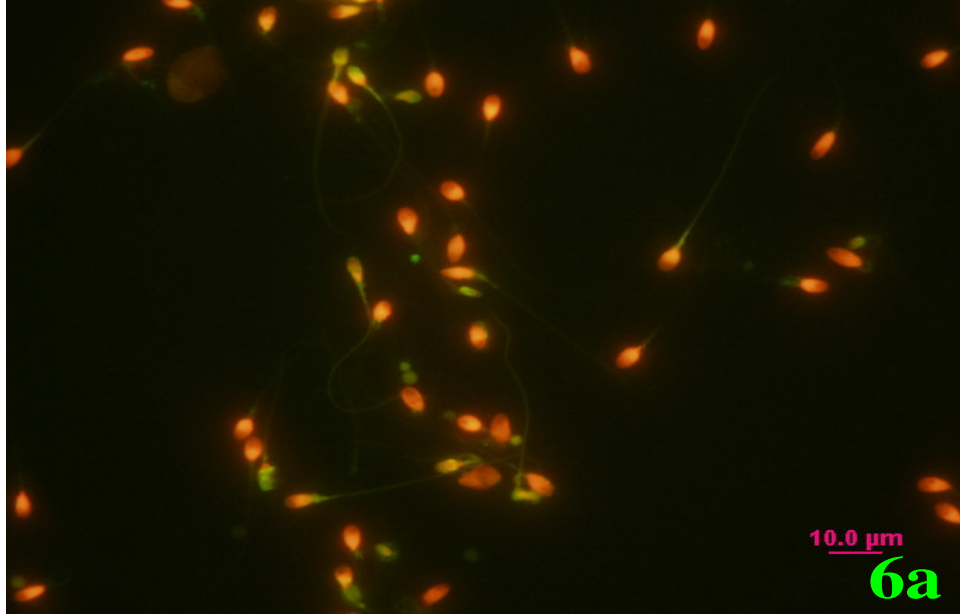
FLORESAN MİKROSKOBİK BULGULAR





Resim 5 Floresan mikroskopik TUNEL boyaması

5. (a) Normozoospermia sigara içmeyen olgu. (TUNEL pozitif %1,5) (b) Normozoospermia sigara içen olgu (TUNEL pozitif %6,1) TUNEL+ DNA fragmentasyonlu spermatozoon (), TUNEL-DNA fragmentasyonsuz spermatozoon ().

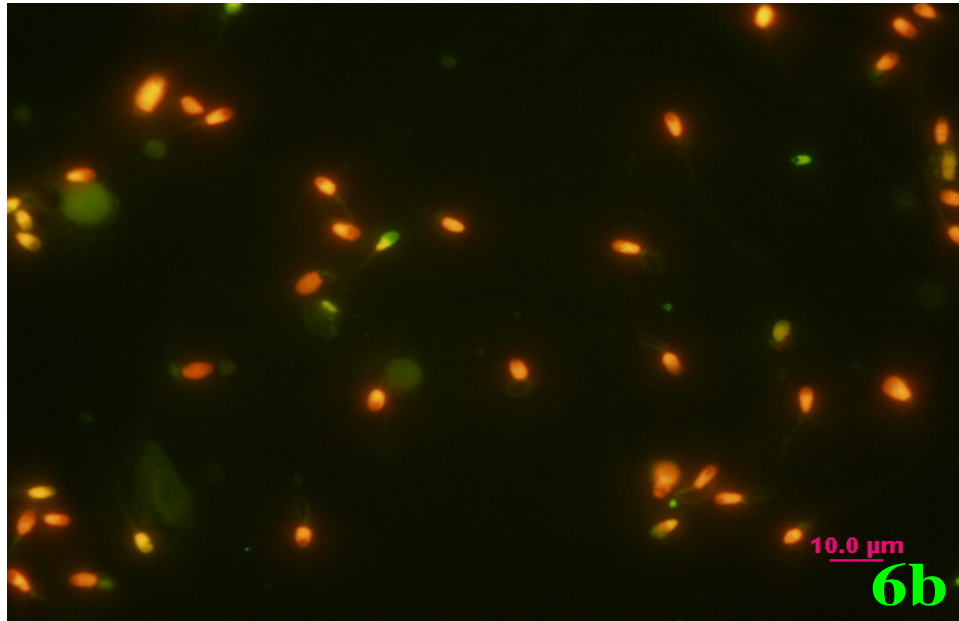
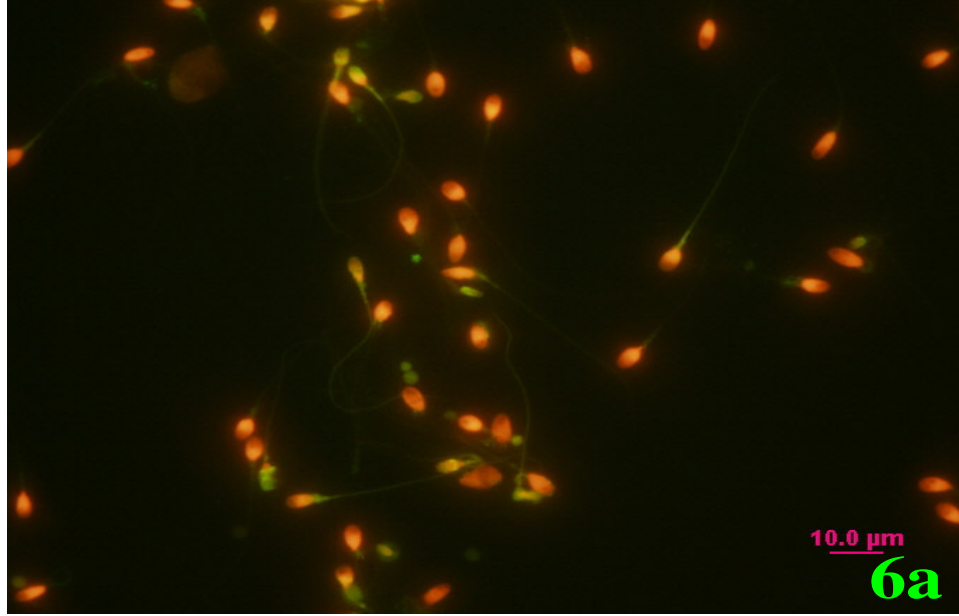
FLORESAN MİKROSKOBİK BULGULAR





Resim 6 Floresan mikroskopik Annexin V boyaması

6. (a) Asteozoospermia sigara içen olgu. (Annexin V pozitif %14,1) (b) Asteozoospermia sigara içmeyen olgu (Annexin V pozitif %5,4) Apoptotik spermatozoon AN(+)/PI(-) (), Nekrotik spermatozoon AN(+)/PI(+). ().

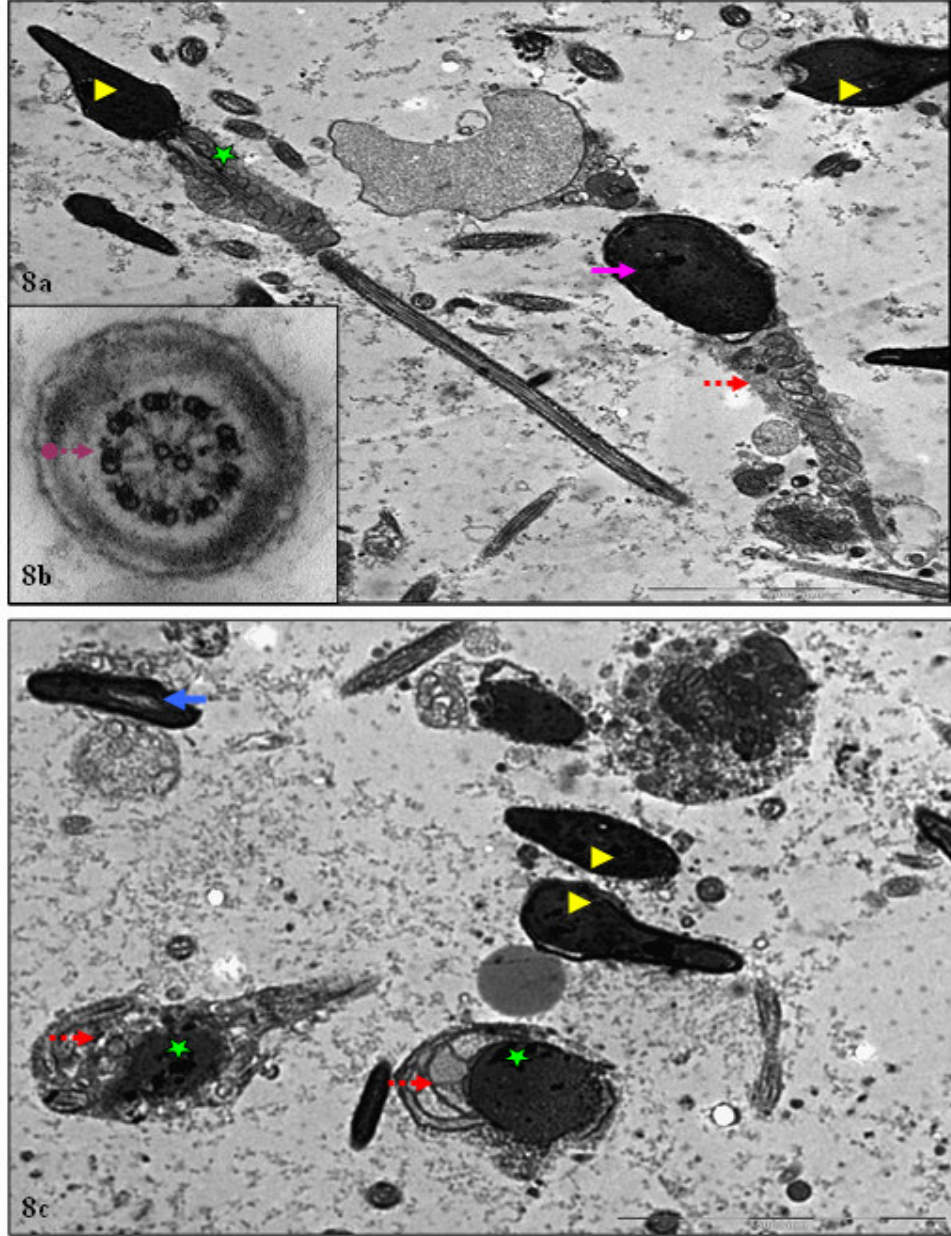
FLORESAN MİKROSKOBİK BULGULAR












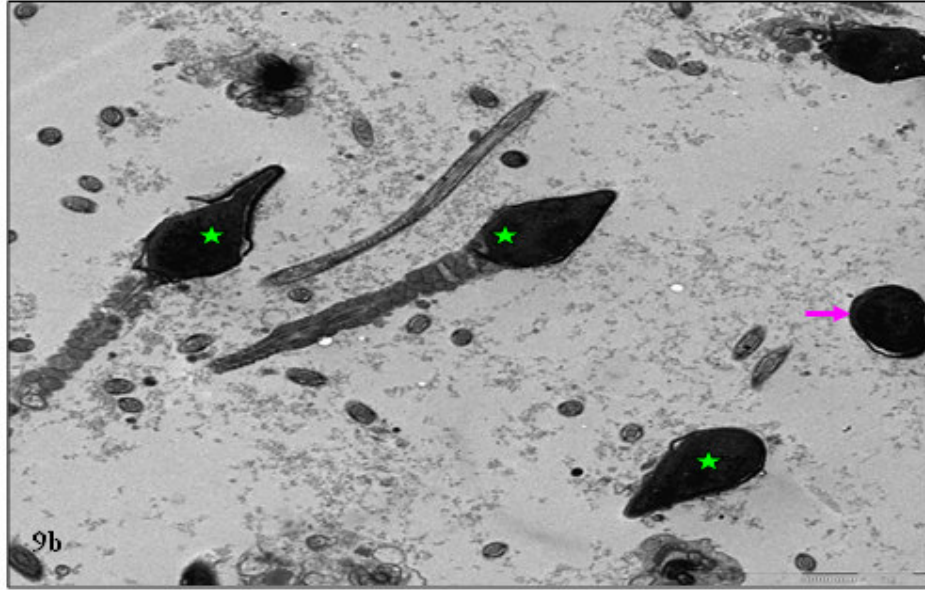
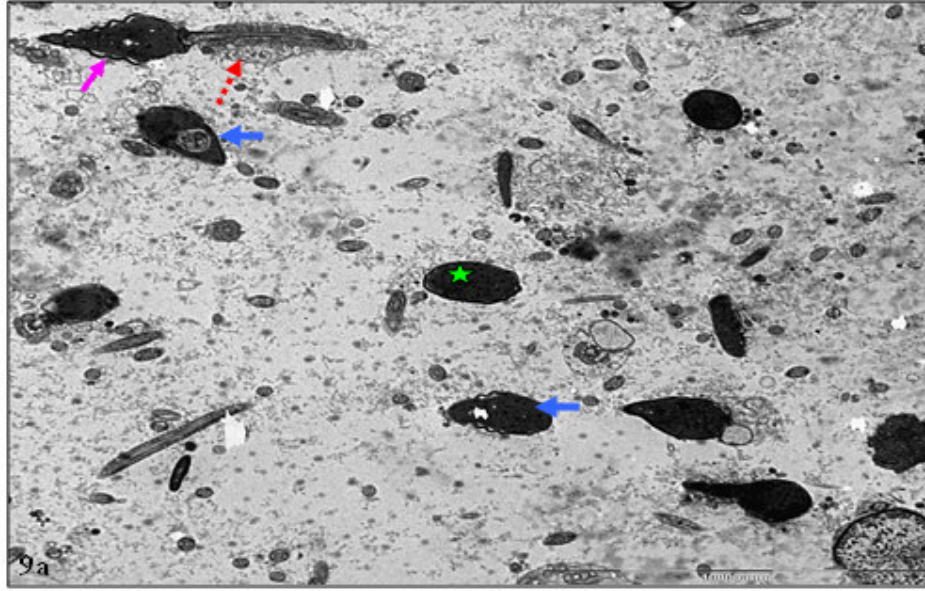
Resim 7 Floresan mikroskopik Annexin V boyaması

7. (a) Normozoospermia sigara içen olgu. (Annexin V pozitif %1,6) (b) Normozoospermia sigara içmeyen olgu (Annexin V pozitif %22,1) Apoptotik spermatozoon AN(+)/PI(-) (), Nekrotik spermatozoon AN(+)/PI(+) ().

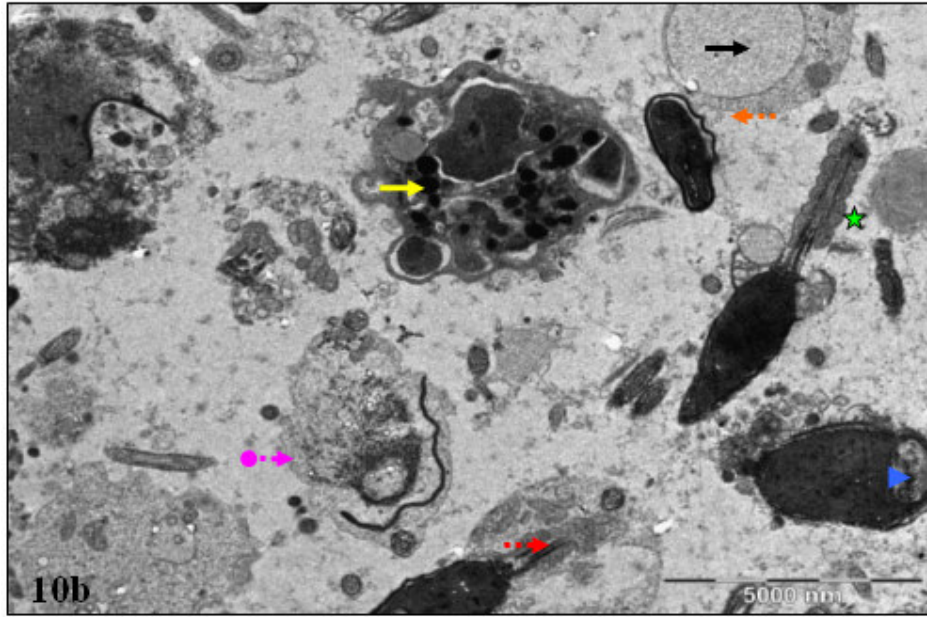
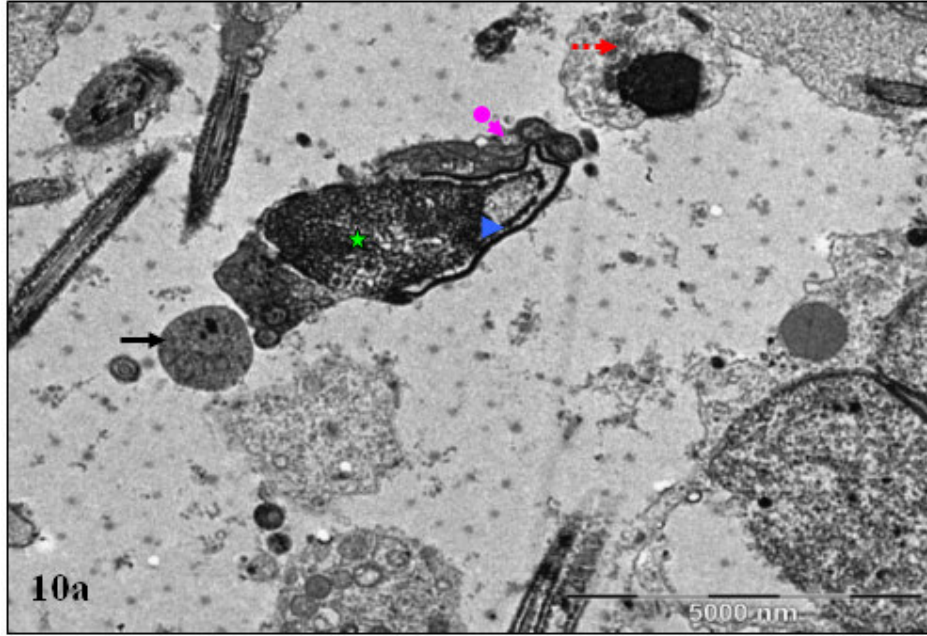
ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR















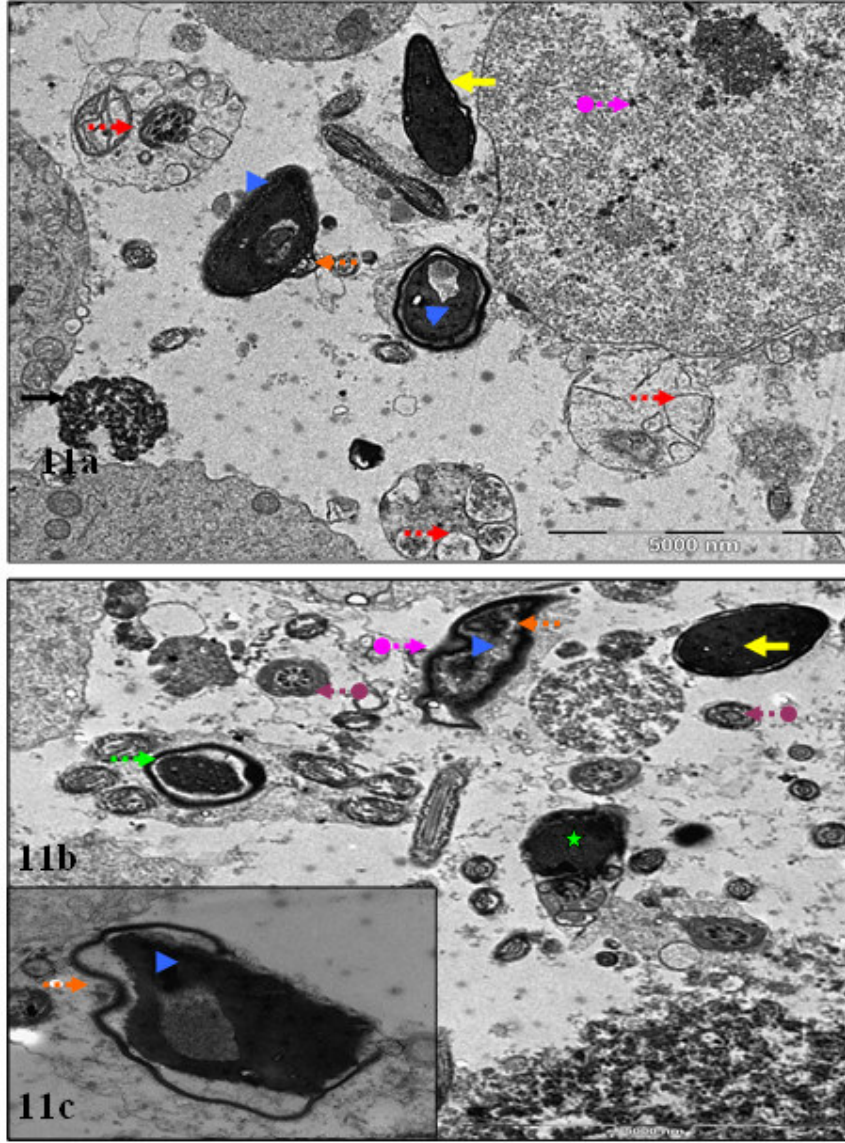
Resim 8. Normozoospermia sigara içen olgu. (a) Normal morfolojideki spermatozoon başı () ,boyun bölümü () , globozoospermia (akrozom yokluğu) () , sitoplazmik artık () , (b) Düzgün aksonem yapısı (9+2 mikrotübül)() . (c) Normal morfolojideki spermatozoon () , Nükleer vakuol () , hiperkondanse ve düzensiz nükleüs () , sitoplazmik artık () .


















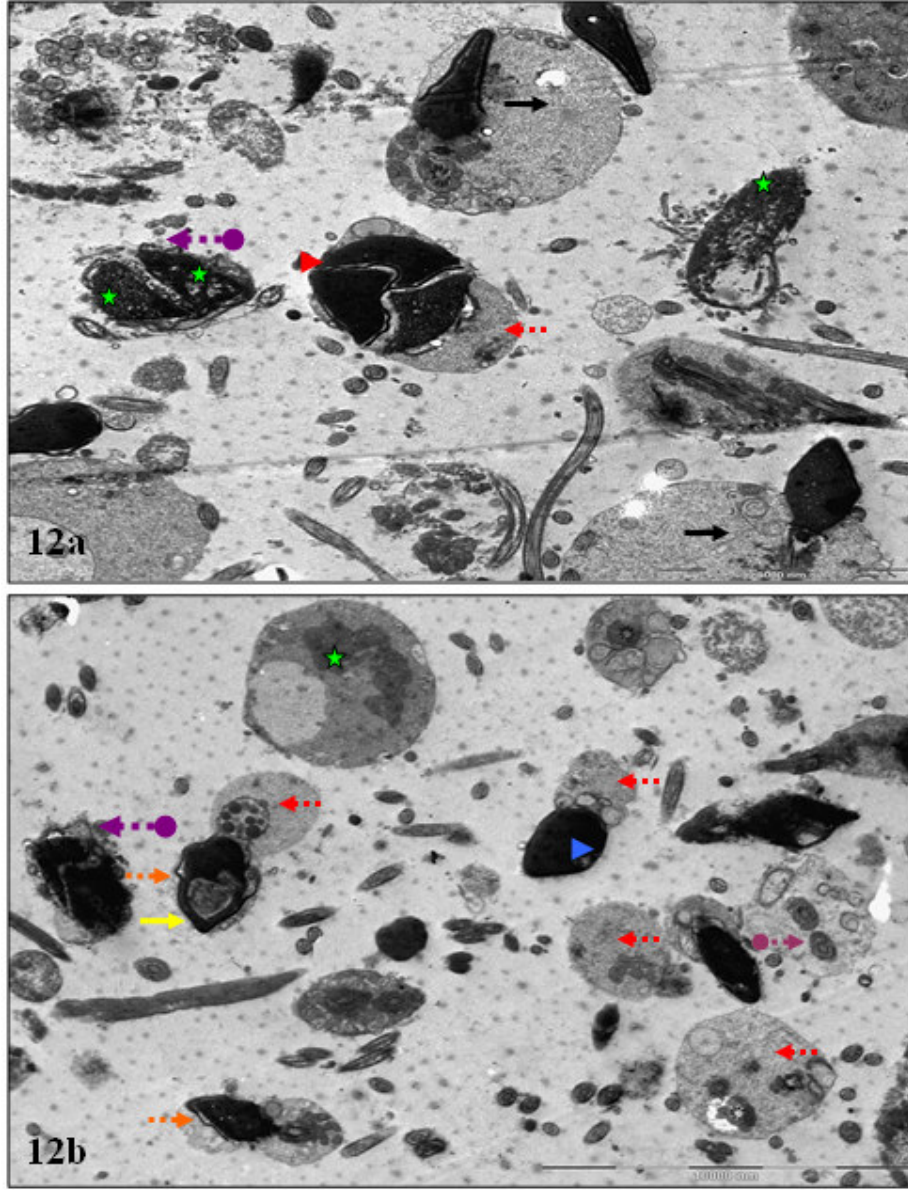
Resim 9. Normozoospermia sigara içmeyen olgu. (a) Nükleer vakuol (←), akrozom membran düzensizliği (→), normal morfolojili spermatozoon (★), sitoplazmik artık (---). (b) normal morfolojili spermatozoon (★), amorf başlı spermatozoon (→).



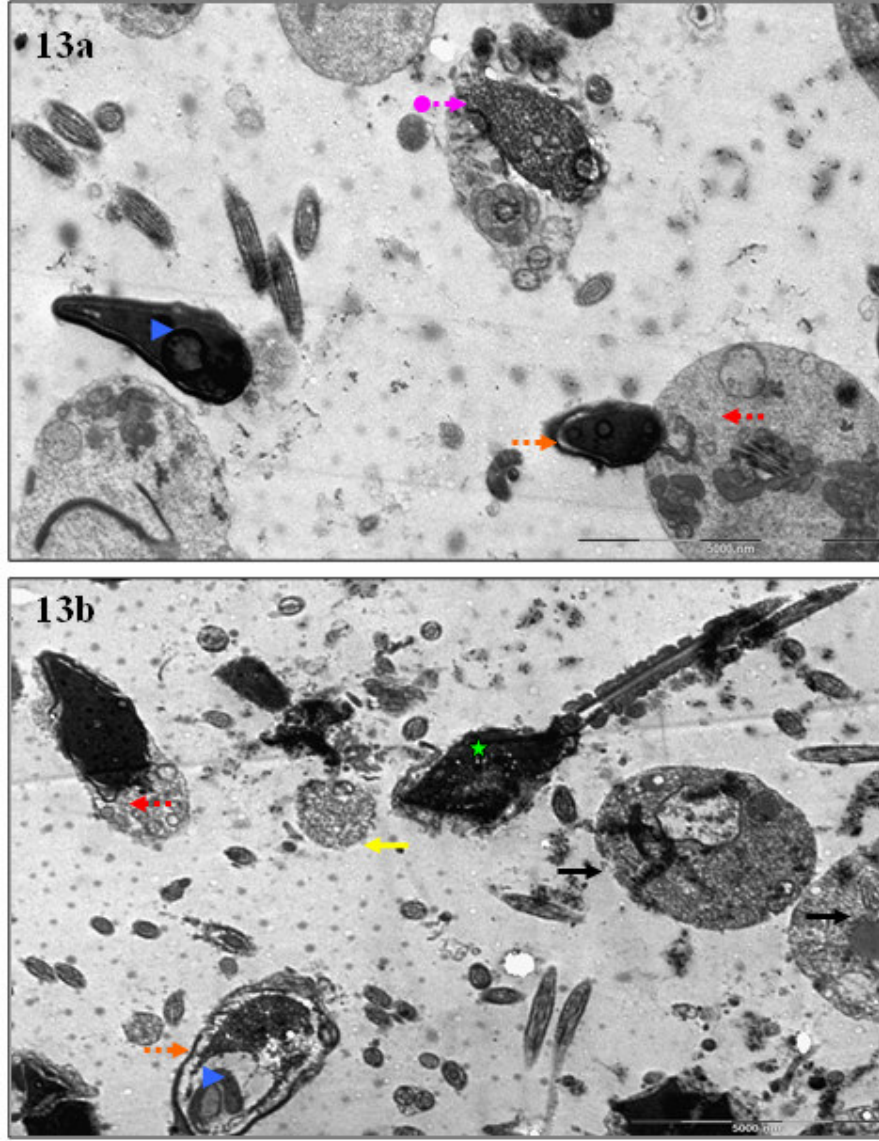
Resim 10. Asteonozoospermia sigara içen olgu (a). Nükleer vakuol (), granüler kromatin içeren apoptotik nukleus (), Periakrozomal membran dejenerasyonu olan vakuolizasyon- vezikülasyon (), apoptotik cisim (), geç spermatid (), (b) Nükleer vakuol (), mitokondri düzenli heliks yapısı (), akrozomal düzensizlik (), geç spermatid (), lökosit (), dev apoptotik cisim-fragmente spermatozoon (), Parçalanmış plazma ve akrozomal membran ile nekrotik spermatozoon ().













Resim 11. Asteonozoospermia sigara içen olgu (a). Nükleer vakuol (), apoptotik spermatozoon (), sitoplazmik artık (), normal morfolojide spermatozoon (), apoptotik cisim (), akrozomal düzensizlik (). (b). Nükleer vakuol (), genişlemiş nükleus (), apoptotik spermatozoon (), akrozomal düzensizlik (), düzgün aksonem (9+2) yapısı (), normal morfolojide spermatozoon (), akrozomal membran çekilmesi (). (c) Nükleer vakuol (), akrozomal düzensizlik (),



Resim 12. Asteonozoospermia sigara içmeyen olgu. (a) granüler kromatin içeren apoptotik nükleus (★), sitoplazmik artık (←...), düzgün aksonem (9+2) yapısı (●-→), geç spermatid (→), bizzare spermatozoon çift başlı ortak akrozomlu spermatozoon (←-●-●), üç başlı ortak akrozomlu spermatozoon (→). (b). Nükleer vakuol (▲), myelinize nükleer vakuol (→), akrozomal düzensizlik (→), sitoplazmik artık (←...), düzgün aksonem (9+2) yapısı (●-→), bizzare spermatozoon çift başlı spermatozoon (←-●-●), Lökosit (★).



Resim 13. (a) Asteonozoospermia sigara içmeyen olgu. Nükleer vakuol (), granüler kromatin içeren apoptotik nükleus (), akrozomal düzensizlik (), sitoplazmik artık (). (b) fragmente ,vakuollü apoptotik spermatozoon (), immatür germ hücresi (), sitoplazmik artık (), granüler kromatin içeren apoptotik nükleus (), akrozomal düzensizlik (), apoptotik cisim ().

5. TARTIŞMA

Erkek infertilitesinde, spermatozoon DNA hasarının kaynağı şimdiye kadar farklı mekanizmalarla açıklanmaya çalışıldı. Bunlardan birincisi spermiyogenez sırasında spermatozoon kromatin paketlenmesinde, protaminasyon hatasının DNA'da hasar oluşturduğu görüşüdür (17, 21, 35). İkincisi ise oksidatif stresin ROS üretiminin spermatozoon fonksiyon bozukluğu, DNA hasarına dolayısıyla erkek infertilitesine neden olduğu görüşüdür (22, 23, 24, 47, 54, 68). Üçüncüsü de defektli germ hücre eliminasyonunun sağlandığı apoptozis yoluyla endonukleaz kırık oranının artmasıyla DNA hasarına neden olduğu görüşüdür (17, 21, 68, 69, 95). Abortif apoptozis tanımıyla Sakkas 1999'da germ hücrelerinde apoptotik süreçten kaçan spermatozoonların apoptotik eliminasyon hatası sonucunda ejakulatta görülebildiğini saptamıştır (17).

Nikotin, insanda birçok dokuda sigaranın etkilerinden sorumlu en büyük etkidir. Literatürde sigara kullanımının insanda seminal kaliteyi ve erkek faktörlü fertilitiyi etkilediğine dair yayınlar mevcuttur. (96). Bazı araştırmacılar spermatozoon parametrelerinin sigara kullanımından etkilendiğini savunurken, bazı araştırmacılar da sigara ile spermatozoon parametreleri arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını savunmaktadır (97).

Biz yaptığımız bu çalışma ile erkek infertilitesindeki spermatozoon DNA fragmentasyonunun kaynağını araştırdık. Sigara içimiyle arttığı varsayılan ROS düzeylerinin, DNA hasarı ve apoptozis üzerindeki etki mekanizmasını ortaya koymayı ve infertiliteye olan etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Yapılan bir çalışmada, normozoospermia ve astenoospermia gruplarında semen parametreleri ve DNA fragmentasyonu incelendiğinde spermatozoon konsantrasyonu, motilite, morfoloji, viabilite ve lökosit yönünden iki grup arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (24). Irvine ve ark.nın yaptığı çalışmada normozoospermia ve hasta gruplarında semen parametrelerinden konsantrasyon ve motilite farklılığı bakımından istatistiksel olarak anlamlılık gözlenirken, normal morfoloji yönünden gruplar arasında fark görülmemiştir (26).

Biz, yaptığımız çalışmada astenoospermia hasta grubunu, normozoospermia kontrol grubuna göre konsantrasyon, motilite ve morfoloji yönünden karşılaştırdığımızda, normozoospermia grubunun değerlerini anlamlı derecede daha yüksek bulduk.

Trummer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonucunda sigara içenlerde içmeyenlere göre semen parametrelerinde fark saptanamamıştır. Ancak yuvarlak hücre ve lökosit oranının sigara içen grupta anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (98). Sepaniak ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sigaranın semen parametrelerini etkilemediği sonucuna ulaşmışlardır (26). Fertil erkeklerde sigara içimi, hormon düzeyleri ve semen kalitesinin incelendiği bir diğer araştırmada sigara içiminin spermatozoon konsantrasyonu, motilitesi ve üreme hormon seviyeleri üzerine belirgin bir etkisi yoktur sonucuna varılmıştır (84). Ramlau-Hansen (2007) sigara içiminin semen kalitesi üzerine tek başına olumsuz etkisini gösterememiştir. Ancak Stillman 1986'da ve Attia 1989'da yaptıkları çalışmalarla sigara içiminin spermatozoon morfolojisi, motilitesi, konsantrasyonu ve fertilizasyona zararlı etkilerini göstermiştir (100, 101). İnfertil Türk erkeklerinde yapılan bir çalışmada günde yirmi adet ve daha fazla sigara içenlerde spermatozoon kuyruk defektlerinin daha fazla olduğu saptanmıştır (103). Başka bir çalışmada spermatozoon konsantrasyonu ve ortalama spermatozoon sayısı sigara içmeyenlerde ağır içicilere göre daha fazla gözlenmiştir ancak sigara içimi ile azalan semen kalitesi arasında net ilişki gözlenememiştir (99).

Çalışmamızda, sigaranın normozoospermia ve astenozoospermia olgularında semen parametrelerine (konsantrasyon, motilite, morfoloji) etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığını gördük.

Moustafa ve arkadaşları 2004'te infertil erkeklerde DNA fragmantasyonu indeksinin (DFI) fertillerden daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (55, 68). Spermatozoon DNA fragmantasyonu, anormal spermatozoon parametrelili olgularda, normal spermatozoon parametrelili olgulara göre anlamlı ölçüde daha yüksektir (50). Normozoospermia grubunda hasta grubuna göre DNA fragmantasyonu daha düşük bulunmuştur. İnfertilin ejakulatlarındaki spermatozoon DNA hasarının yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır (24). Ancak Weng 2002'deki çalışmasında DNA fragmantasyonunun iki grup arasındaki farkını istatistiksel olarak anlamlı bulamamıştır (72). Başka bir çalışmada ise fertil ve infertil erkeklerde spermatozoon DNA bütünlüğünde herhangi bir farklılık bulunmamıştır (39).

Çalışmamızda astenozoospermia hasta grubunda normozoospermia kontrol grubuna göre DNA fragmantasyonunu istatistiksel olarak daha yüksek tespit ettik.

Yapılan çalışmalarda DNA fragmentasyonunun spermatozoon konsantrasyon (68), motilite (24, 31, 47, 48, 49, 104) ve morfolojisi ile arasında negatif korelasyon saptanmıştır (21, 24, 31, 48, 49, 57, 68, 103). Ayrıca yapılan çalışmalarda TUNEL, SCSA (51, 94) ve Toluidine mavisi yöntemlerinin üçünde de negatif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir (24, 35, 49, 55, 104). Spermatozoon morfolojisi kötü olan örneklerde TUNEL pozitif oranının (DNA fragmentasyonu) daha yüksek olduğu bildirilmiştir (21, 57, 68). Lopes'in 1998'deki çalışmasında ise DNA fragmentasyonu ile spermatozoon konsantrasyonu arasında ilişki bulunamamıştır (47).

IVF sikluslarında spermatozoon DNA fragmentasyonu TUNEL yöntemiyle flow sitometrik olarak incelendiğinde DNA fragmentasyon oranının sınırı %4 olarak saptanmıştır (16). Floresan mikroskopik incelendiğinde %10 (48, 49, 50) - %15 (104) ve üzerinde olduğu durumda fertilizasyonu negatif etkileyeceği fakat gebeliğe etkisinin olmayacağı saptanmıştır (44, 45). Yine başka bir çalışmada spermatozoon DNA fragmentasyonunun %20'nin üzerinde olduğu durumda ise hiç gebeliğe rastlanmamıştır (49). Virro ise bu oranı SCSA testiyle %30 olarak belirlemiştir. Spermatozoon DNA fragmentasyonunun blastokist – gebelik oranını negatif etkilediğini, abortusla pozitif ilişkisini saptamıştır (51).

Spermatozoon morfolojisi ile DNA hasarı arasında ilişki varlığını akridin oranj boyası kullanarak gösteren bir çalışmada kötü morfolojinin DNA hasarı ile anlamlı ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bunun ICSI ile fertilizasyon oranını etkilediği fakat embriyo gelişimine bir etkisinin olmadığı saptanmıştır (38, 47). Ancak semen parametreleriyle DNA bütünlüğü arasında bir korelasyonun saptanamadığı yayınlarda mevcuttur (39). Ayrıca Domínguez-Fandos 2007'de DNA fragmentasyonunu sadece motiliteyle ilişkilendirebilmiştir (105). Brooks 2006'daki çalışmasında TUNEL yöntemiyle incelediği spermatozoon DNA hasarı ile semen parametreleri arasında negatif ya da pozitif ilişki bulamamıştır (57).

Bizde çalışmamızda DNA fragmentasyonu ile konsantrasyon ve spermatozoon sayısının negatif korelasyon gösterdiğini belirledik. Buna ek olarak çalışmamızda DNA fragmentasyonu ile motilite ve morfoloji arasında da negatif korelasyon saptadık.

Sigaranın seminal plazmadaki ROS'u önemli ölçüde artırdığı ve bu nedenle spermatozoon DNA hasarına yol açtığı düşünülmektedir (25). TUNEL yöntemiyle DNA fragmentasyonu sigara içenlerde içmeyenlere göre farklı bulunmuştur (26). DNA hasarlı spermatozoon yüzdesi sigara içen erkeklerde içmeyenlere göre anlamlı artış gösterir (16)

Sigara içmeyen erkeklerde yaş artışına bağlı olarak DNA fragmentasyon artışı gösterilmiştir. Bunun artan oksidatif strese bağlı olabileceği varsayılmıştır (31). Ancak Vilorio 2007'deki çalışmasında spermatozoon DNA fragmentasyon oranının infertil sigara içen ve sigara içmeyen erkekler arasında fark olmadığını bulmuştur (96).

Çalışmamızda normozoospermia ve astenozoospermia olgularında, sigara içenlerde içmeyenlere göre DNA fragmentasyonu daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Yapılan bir çalışmada TUNEL pozitif spermatozoon oranıyla vitalite arasındaki negatif ilişki istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (103). Ancak Hammadeh ve ark.nın yaptığı çalışmada TUNEL ile vitalite ve membran bütünlüğü arasında negatif korelasyon gözlemlenmiştir (106).

Biz de çalışmamızda spermatozoon DNA fragmentasyonu ile vitalite arasında negatif korelasyon bulunduğunu tespit ettik.

Moustafa ve arkadaşları 2004'te infertil erkeklerde spermatozoon ROS ürünleri, apoptozis ve DNA denatürasyonu arasındaki ilişkiyi incelemişler. İnfertil grupta DNA fragmentasyonu ve apoptozis arasındaki ilişkinin varlığını göstermiştir. Annexin V bağlanması yöntemi ve TUNEL arasında pozitif ilişki saptanmış. (68). Ejakulat spermatozoonunda apoptozis tespitinde Flow sitometrik ölçümlere dayanarak yapılan bir çalışmada spermatozoon sayısı, TUNEL pozitif ve Annexin V pozitif (AN+/PI- Apoptotik) oranıyla korelasyon göstermemiştir (103, 61). Bir diğer çalışmada flow sitometrik DNA fragmentasyon oranının floresan mikroskobik TUNEL pozitif oranını karşıladığı bildirilmiştir (93).

Biz de çalışmamızda DNA fragmentasyonu ile apoptozis arasında anlamlı pozitif korelasyon belirledik (TUNEL pozitif %10 ve üzeri olan 14 olguda).

Yapılan çalışmalarda apoptotik spermatozoon oranı (%) infertillerde, fertillere göre anlamlı olarak daha düşük saptanmış (66). Apoptotik oranın normozoospermialarda, astenozoospermia, astenoteratozoospermia ve oligoastenoteratozoospermia gruplarına göre daha düşük olması istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuş (70).

Ancak biz çalışmamızda apoptozis değerlerinde gruplar arasında farklılık bulamadık. Bunun nedeninin TUNEL pozitif oranının %10 ve üzeri olduğu olgularda apoptozise baktığımız için, olgu sayılarının gruplarda eşit olarak dağılmadığından kaynaklandığını düşündük. (normozoospermia:2, astenoospermia:12)

Host ve ark. 2000 yılındaki çalışmalarında normal morfolojideki spermatozoonların Annexin V ile işaretlenebileceğini belirlemişlerdir (95). Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan Caspase 3 ve Caspase 9 ile semen parametreleri olan motilite, konsantrasyon ve morfoloji arasında negatif korelasyon gözlemlenmiş. ROS ile Caspase 3, Caspase 9 ve sitokrom c arasında pozitif korelasyon saptanmış (95). Yapılan bir diğer çalışmada DNA fragmentasyonu (TUNEL) ve Fosfotidil serin translokasyonu (Annexin V) düşük ve yüksek motilitede olan bütün hastalarda saptanmış. İnfertillerde Annexin V bağlanmasının düşük ve yüksek motiliteli fraksiyonlarda mümkün olduğu gözlemlenmiş (107). Singh'in 2000'de geliştirdiği DNA difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenen apoptozis ile semen parametreleri arasında ilişki bulunmuş. Kuyruk defektleriyle apoptozis arasında pozitif korelasyon, motilite ve morfoloji ile apoptozis arasında negatif korelasyon bulunmuştur (30, 72). Aziz ve arkadaşlarının 2007 yılındaki yaptıkları çalışmada apoptotik spermatozoon sayısı, spermatozoon normal morfolojisi ve spermatozoon deformite indeksi (SDI), apoptotik olmayan popülasyona göre anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır. Akrozomal defekt, orta parça defekti, sitoplazmik ve kuyruk defekli spermatozoon yüzdesiyle, SDI'nın ilişkili olduğu gözlemlenmiş (69).

Çalışmamızda normozoospermia grubundaki normal morfolojideki spermatozoonlarda da TUNEL pozitif, Annexin V pozitif boyanma gözlemlendi. Apoptozis ile semen parametreleri arasında bir ilişki bulunamadı. Ayrıca TUNEL pozitif oranının %10 ve üzeri olduğu olgularda apoptozise baktığımız için olgu sayıları gruplarda eşit dağılmadığından ilişki bulunmamış olabileceğini düşündük. (normozoospermia:2, astenoospermia:12)

Peirouvi 2007'de yaptığı çalışmasında, Annexin V yöntemi ile apoptotik ve nekrotik hücreleri belirlenmiş. Gruplar arasında farklılık olmadığı gösterilmiştir (66).

Biz çalışmamızda kontrol ve hasta grubunda nekrotik (AN+/PI+) spermatozoon oranlarının aynı olduğunu saptadık.

Chen'in (2006) yaptığı çalışmada apoptozis ile volüm, vizkozite, konsantrasyon, peroksidaz testi (Endzt) ve yaş arasında herhangi bir ilişkiye rastlanmamıştır. Başka bir çalışmada apoptotik hücre oranıyla canlılık testi arasında herhangi bir ilişki görülmemiştir (103). Lachaud (2004) ise cansız spermatozoon oranı tespitinde Eosin testi ile PI testi arasında ilişki görmüştür (61).

Biz yaptığımız çalışmada, apoptozis ile vitalite belirlenmesinde kullandığımız Eosin testi arasında bir ilişki olmadığını saptadık.

Yardımlı üreme teknikleriyle ilgili olarak yapılan çalışmalarda, semedeki ROS ile IVF fertilizasyon oranları arasında negatif korelasyon gösterilmiştir. ROS'un IVF'te fertilizasyona olan negatif etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır. IVF için fertilizasyon oranı tahmininde semen ROS düzeyinin ölçülmesinin kullanılabilirliği bildirilmiştir (110). ROS seviyelerinin infertillerde, donörlere kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (68, 95 28). MDA konsantrasyonunun normozoospermia, oligozoospermia ya da astenozoospermia olgularında gözlenen farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (91). Ancak Irvine ve ark.nın yaptığı çalışmada semen parametreleri ile ROS düzeyleri gruplar arasında farklılık göstermemiştir (24).

Çalışmamızda MDA düzeyiyle ilgili elde ettiğimiz bulgular, fertil ve infertil gruplarda seminal ROS'un farklı olduğu görüşünü destekler nitelikteydi. Normozoospermia ve astenozoospermia gruplarında ROS için bakılan MDA lipid peroksidasyonu farkını istatistiksel olarak anlamlı bulduk.

Moein 2007'de yaptığı çalışmada sigara içenlerde içmeyen kontrollerine göre ROS seviyesinde farklılık saptamıştır, fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Ancak Magdy'nin (2004) yaptığı çalışmada fertil olan grupta sigara içenlerde, içmeyenlere göre spermatozoal MDA düzeyleri anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur. GPx enzim aktiviteleri anlamlı ölçüde daha düşük gözlenmiştir. İnfertillerde ise sigara içenlerde, içmeyenlere göre spermatozoal MDA düzeyleri anlamlı ölçüde daha yüksek bulunurken GPx enzim aktiviteleri anlamlı ölçüde daha düşük saptanmıştır. İnfertil olgularda sigara içenlerde, içmeyenlere göre motilite ve morfoloji parametreleri anlamlı olarak daha düşük belirlenmiştir. Sigaranın spermatozoal kaynaklı oksidatif stresle ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır (108).

Çalışmamızda ROS için ölçülen lipit peroksidasyon son ürünü olan MDA düzeyleri, hem normozoospermia hem de astenozoospermia sigara içen ve içmeyen gruplarında farklı bulundu, ancak istatistiksel olarak anlamlılık gösterilemedi.

İnfertil ve fertillerde ROS ile ilgili yapılan bir çalışmada iki grup arasında spermatozoon sayısı, arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (108). Başka bir çalışmada lipit peroksidasyonu ile motilite morfoloji arasında bir ilişki bulunamamıştır (109). Diğer taraftan yapılan araştırmalarda aksi bulgularda gösterilmiştir. Fertil ve infertil grupları arasında seminal plazma ROS konsantrasyonu ile ejakulat volümü, spermatozoon vitalitesi, membran bütünlüğü, morfoloji, motilite, antioksidan kapasitesi ve fertilizasyon oranları arasında negatif korelasyon bulunmuştur. IVF/ICSI gruplarında seminal plazma ROS konsantrasyonu ile fertilizasyon oranları arasında negatif korelasyon, tespit edilmiştir. Seminal ROS ile gebelikler arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (106). Yapılan başka bir çalışmada semen volümü ve spermatozoon sayısı lipid peroksidasyonu arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Ultrastrüktürel incelemede aksonem ve akrozom bütünlüğü ile lipit peroksidasyonu arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Ayrıca başka bir çalışmada lipit peroksidasyon oranıyla IVF tedavisiyle fertilizasyon oranı arasında negatif korelasyon bulunmuştur (109). Semen parametreleriyle lipid peroksidasyonu negatif korelasyon göstermiştir (91, 94).

Biz de çalışmamızda astenozoospermia ve normozoospermia gruplarında ROS ile spermatozoon sayısı, motilite, morfoloji ve vitalite parametrelerini inceledik. Gruplar arasında fark olmakla birlikte istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını belirledik.

Saleh ve ark. 2003'te ROS'un sebep olduğu DNA hasarının hücrelerin apoptozisini hızlandırarak spermatozoon sayısının azalması ile fertiliteye olumsuz etkisini göstermişler (52). Yapılan çalışmalarda DNA fragmantasyonu ile ROS üretimi arasında anlamlı pozitif korelasyon saptanmış. Böylece DNA fragmantasyonu ile oksidatif stres arasındaki ilişki gösterilmiştir (54, 107).

Bizde çalışmamızda ROS ile DNA fragmantasyonu arasında pozitif korelasyon tespit ettik.

Antioksidan düzeylerine baktığımızda Irvine 2000'de yaptığı çalışmasında fertil ve infertillerde antioksidan düzeylerinin gruplar arasında farklılık göstermediğini belirlemiştir (24). Yapılan çalışmalarda ROS konsantrasyonu ile antioksidan kapasitesi ve fertilizasyon oranları arasında negatif korelasyon bulunmuştur (106) . Hsieh (2006) çalışmasında Gpx aktiviteleri yönünden fertil ve infertil gruplar arasındaki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını saptamıştır (91).

Biz çalışmamızda bu görüşlerin aksi bulgular elde ettik. Çalışmamızda antioksidan enzim GPX düzeyleri, gruplar arasında farklı bulundu. Bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı idi.

Ayrıca yapılan başka bir çalışmada Gpx aktivitesi ile spermatozoon konsantrasyonu ve motilitesi arasında pozitif fakat anlamlı olmayan korelasyon gösterdiği saptanmıştır (91).

Bizim çalışmamızda GPX ile konsantrasyon, motilite arasındaki pozitif korelasyon istatistiksel açıdan anlamlı bulundu.

Spermatozoonun ultrastrüktürel incelemesinde daha önce yapılan çalışmalarda, elektron mikroskopik apoptozis bulguları irregüler, genişlemiş ya da fragmante şekilli nükleus, nükleer vakuoller, fibriller mikrogranüler ağ kaybı, nükleer zarf yapısı, akrozom kısmi ya da tamamının yokluğu, mitokondri azlığı gibi defektler tespit edilmiştir. Gözlenen küresel cisimcikler (spheroidal element) de apoptotik cisimler (apoptotic body) olduğu düşünülmüştür (57, 70).

Yaptığımız bu çalışmada astenozoospermia grubunda apoptotik hücre, amorf baş, sitoplazmik artık, nükleer fragmantasyon, nükleer vakuolizasyon, akrozom membran invaginasyonu bulgularını kontrol grubuna göre daha yüksek oranda saptadık.

Ultrastrüktürel inceleme yapılan bir başka çalışmada Swim-up ile seçilen ve seçilmeyen spermatozoonlarda DNA fragmantasyonu incelenmiş. Progressif ileri hareketli spermatozoon oranıyla DNA fragmantasyonu arasında negatif korelasyon, immotil spermatozoon ile DNA fragmantasyonu arasında pozitif korelasyon ve DNA fragmantasyonu ile morfoloji arasında ilişki saptanmıştır. Spermatozoon konsantrasyonu ve spermatozoon sayısı ile DNA fragmantasyonu arasında bir korelasyon saptanamamıştır. Ultrastrüktürel olarak spermatozoonlarda nükleer kromatin parçalanması, düzensiz nükleer kromatin biçimi, anormal şekilli mitokondri, nükleer kromatin içinde vakuoller ve bu vakuol içinde sitoplazmik

artıklar, anormal aksonem pozisyonu tanımlanmıştır. DNA fragmentasyonu ile mitokondrial şişme ve sitoplazmik vakuolizasyon arasında pozitif korelasyon, normal biçimli aksonem ile negatif korelasyon tespit edilmiştir (93).

Çalışmamızda normozoospermia ve astenozoospermia gruplarında sigara içenlerde içmeyenlere göre MDA düzeylerinin yüksek olması ile DNA fragmentasyonu ya da nükleer hasar arasındaki ilişkiyi inceledik. Astenozoospermia ve normozoospermia gruplarında sigara içenlerde içmeyenlere göre DNA fragmentasyonunu yüksek saptamamıza karşın istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ultrastrüktürel bulgular da sigara içenlerde, içmeyenlere göre morfolojik hasarın daha fazla olduğunu destekledi. Ultrastrüktürel inceleme de TUNEL bulgularını destekler nitelikteydi.

Yapılan çalışmalarda ultrastrüktürel olarak nekrotik spermatozoonların, reaksiyona girmiş akrozom yokluğu, parçalanmış plazma membranı, bölünmüş kromatini, şişmiş mitokondri varlığı gösterilmiştir. Ayrıca apoptotik spermatozoonların da kenara itilmiş kromatinli biçimsiz nükleus, değiştirilmiş akrozom, sitoplazmik artıklar içeren karışık organize olmamış mitokondri, yarı saydam vakuoller olduğu görülmüştür. İmmatür spermatozoonlar da biçimsiz akrozom, yuvarlak çift nükleus, yoğunlaşmamış kromatin ve sitoplazmik artıklar gözlemlenmiştir (111). Ayrıca başka bir çalışmada ultrastrüktürel incelemede aksonem ve akrozom bütünlüğü ile lipid peroksidasyonu arasında negatif korelasyon saptanmıştır (109).

Çalışmamızda lipid peroksidasyonu yüksek olan hasta grubunda kontrol grubuna göre DNA hasarının daha fazla olduğu, ultrastrüktürel olarak da desteklendi. Normozoospermia grubunda hasta grubuna göre normal morfolojideki spermatozoon varlığı gösterilirken, nükleer vakuolizasyon her grupta dikkati çekti. Ayrıca apoptotik cisimler ve makrofaj varlığı ultrastrüktürel olarak gösterildi.

1998'de Zavos ve arkadaşlarının yaptığı ultrastrüktürel bir çalışmada sigara içen ve içmeyen erkeklerde, sigara içen grupta aksonemal defektlerin içmeyenlere göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu, bunun da motiliteyle ilişkisi gösterilmiştir. Kalın dış fibrilin tekli ya da çiftli olarak yokluğu, aksonemde gözlenen en sık anomali olarak saptanmıştır. Ayrıca merkezi çift tübül yokluğu ya da dinein kolları eksikliği gözlenmiştir (112).

Yaptığımız çalışmada, kuyruk defektleri, aksonem (9+2 mikrotübül) yapısı ve dış kalın fibril yapısına bakıldığında gruplar arasında farklılık gözlemedik. Yine sigaranın aksonemal hasar oluşturarak motiliteye herhangi bir etkisini belirlemedik. Aksonemal tübül defektlerine rastlamadık. Sigara içen ve içmeyenlerde aksonemal yapı normal, dış kalın fibrillerin dizilimi ve yerleşimi düzenli izlendi. Kuyruk defektlerinin sigara içimi ile ilişkisi gözlenmedi .

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Spermatozoonda DNA fragmentasyonu ve normalde var olan spermatogenetik apoptozisin artışı erkek infertilitesinde önem taşımaktadır. Spermatozoon DNA hasarı farklı zamanda farklı mekanizmalarla ya da aynı anda farklı mekanizmalarla oluşabilir. Örneğin, matürasyon sırasında oluşabileceği gibi ejakulasyon sırasında da oluşabilir. Apoptozis ile oksidatif stres arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamış olsa da ROS' un, spermatozoon DNA'sında hasar oluşturduğu düşünülmektedir.

Astenozoospermia ve normozoospermia olguları karşılaştırıldığında, astenozoospermia olgularında MDA düzeyleri ve DNA fragmentasyonu daha yüksek, GPX düzeyleri ise istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur. Aynı gruplarda sigara içen ve içmeyen olgular karşılaştırıldığında ise bu parametreler farklı olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak TUNEL %10 pozitif olgu sayısı bu gruplarda eşit dağılmadığı için apoptozis bulguları tartışılmamıştır. Tüm olgular ele alındığında ise artan ROS düzeyi ile DNA fragmentasyonu arasında ve %10 pozitif DNA fragmentasyonu belirlenen olgulardaki apoptozis oranı arasında pozitif korelasyon bulunurken, artan ROS değerleri ile apoptozis arasında direkt bir ilişki bulunmamıştır.

Sonuç olarak sigara içiciliği ile artan ROS düzeyinin apoptozisi indüklediğini ve dolayısıyla infertilitede doğrudan etkili olduğunu iddia eden çalışmaların aksine bu çalışmada sigara içiciliğinin ROS düzeyine etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış apoptozis ve infertiliteye doğrudan etkisi belirlenememiştir. İnfertillerde sigara içimiyle ROS'un doz bağımlı olarak arttığı bununda apoptozisten farklı bir mekanizma ile DNA fragmentasyonu oluşturduğu gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

- 1- Ross H.M, Kaye G, Pawlina W. Histology, a text and atlas, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 2003, 690-96.
- 2- Ward W.S. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa: minireview. Biol reprod.1993;48:1193-1201.
- 3- De Kretser DM, Loveland KL, Meihardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. Hum Reprod.1998;13:1-8.
- 4- Gartner LP, Hiatt JL: Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W.B.Saunders Company, 1997; 493-98.
- 5- Aydos K. <http://www.androloji.info/>
- 6- Abraham L, Kierszenbaum Histology and Cell Biology, 2th edition. Mosby. 2002; 529-550.
- 7- Huszar G and Vigue L. Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. Mol Reprod Dev.1990;25:258-62.
- 8- Celik-Ozenci C, Catalanotti J, Jakab A, Aksu C, ve ark. Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fish: shape analysis and objective morphometry. Biol reprod. 2003;69:1347-55.
- 9- De Jonge C.The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. Fertil Steril. 2002;5: 51-53.
- 10- Agarwal A., Said T.M., Gardner D.K Textbook of assisted reproductive techniques: 2004. <http://www.clevelandclinic.org/reproductiveresearchcenter/docs/agrach016.pdf>
- 11- D'Occhio MJ, Hengstberger KJ, Johnston SD.Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. Anim Reprod Sci. 2007;101(1-2):1-17.
- 12- Seli E, Sakkas D.Spermatozoal Nuclear Determinants of Reproductive Outcome: İmplications For ART.Hum Reprod Update, 2005;11(4):337–349.
- 13- Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. Mol Reprod Develop.2001;58:357-58.

- 14- WHO : World Health Organization Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th Ed. New York: Cambridge University Press: Cambridge.1999.
- 15- Mack S, Bhattacharyya AK, Joyce C, van der Ven H, ve ark. Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. Biol Reprod. 1983;28(5):1032-42.
- 16- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biol reprod.1997.56, 602-07.
- 17- Sakkas D, Mariethoz E., Manicardi G, Bizzaro D, ve ark. Origin of dna damage in ejaculated human spermatozoa.Rev Reprod.1999; 4:31-37.
- 18- Sikka C.S. Role of Oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. Journal Androl. 2004;25.1.
- 19- Sharma R.K., Said T., Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome Asian J Androl. 2004;6:139-48.
- 20- Aitken R.J.,Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Biol reprod 2001;122:497–506.
- 21- Sakkas D. Moffat O. Nature of dna damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. Biol reprod. 2002;66:1061-67.
- 22- Saleh R A., Agarwal A. Oxidative Stress And Male Infertility :From Research Bench To Clinical Practice- Review. J Androl, 2002. 23,No.6.
- 23- Agarwal A, Said TM.. Role of sperm chromatin abnormalities and dna damage in male infertility. Hum Reprod Upd. 2003;9:331-34.
- 24- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton, P. A ve ark., DNA integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. J Androl 2000; 21:33-44.
- 25- Türk G, Aksu E.H. Spermatozoon Dna'sı Hasarı. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi. 2006;20(1):85-95.
- 26- Sepaniak S, Forges T. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. Toxicol. 2006; 223:54–60.

- 27- Potts R.J., Newbury C.J., Smith G., Notarianni L.J. ve ark. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation Research*. 1999; 423: 103–111.
- 28- Moein M.R , Dehghani V.O, Reactive Oxygen Species(ROS) Level in Seminal Plasma of Infertile Men And Healthy Donors.*Iranian J Reprod Med*. 2007;5(2):51-55.
- 29- Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*. 2003;[80\(6\)](#):1420-30.
- 30- Chen Z., Hauser R., Trbovich A.M., Shifren J.L. ve ark. The Relationship Between Human Semen Characteristics and Sperm Apoptosis: A Pilot Study .*J Androl*. 2006; 27(1):112-20.
- 31- Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, ve ark. The effects of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod* . 2007;22(1): 180–87.
- 32- Peirouvi T., Farjah G., Rad J., Novin M.G. Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. *Iranian J Reprod Med*.2007;5(3):17-20.
- 33- Shekarriz M, DeWire, M.D, A Method of Human Semen Centrifugation to Minimize The Iatrogenic Sperm Injuries Caused by Reactive Oxygen Species. *Eur Urol*.1995;28:31-35.
- 34- Mortimer D. Sperm preparation methods. *J Androl*. 2000;21(3):357-65.
- 35- Erenpreiss J.,Jepson K, Giwercman A., Tsarev I. ve ark. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod*. 2004;19(10):2277–82.
- 36- Sakkas D, Manicardi GC. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear dna anomalies. *Hum Reprod*. 2000;15:1112–16.
- 37- Fernández J.L.,Muriel L,Rivero M.T.Goyanes C.V. ve ark. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm dna fragmentation. *J Androl*. 2003;24:1.
- 38- Cebesoy F.B., Ünlü C., Aydos K., Baltacı V. The Relationship Between Sperm Morphology-Acridine Orange Staining Andfertilization Rate-Embryo Quality in Icsi. *J Turkish-German Gynecol Assoc*. 2006; 7(2):110-14.

- 39- Khalili M.A., Maybodi F.A., Anvari, M., Taleb A.R. Sperm nuclear dna in ejaculates of fertile and infertile men correlation with semen parameters. *J Urol.* 2006; 3(3):154-59.
- 40- Kazım R. Chohan, Jeanine T. Griffin, Marie Lafromboise. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006;(1):27.
- 41- Fernández J.L., Muriel L, Goyanes V., Segrelles E., ve ark. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005;(84):4
- 42- Evenson DP, Wixon R. Comparison of the Halosperm test kit with the sperm chromatin structure assay(SCSA) infertility tes in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril.* 2005;84(4):846-9.
- 43- Enciso M., Muriel L, Fernández J.L., Goyanes V. ve ark. Infertile Men With Varicocele Show A High Relative Proportion Of Sperm Cells With Intense Nuclear Damage Level, Evidenced By The Sperm Chromatin Dispersion Test . *J Androl.* 2006;(27):1
- 44- Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, ve ark. Value of the sperm DNA fragmentation level, measured by the sperm chromatin dispersion (SCD) test, in the IVF and ICSI outcome. *Fertil Steril.* 2006;85:371– 83.
- 45- Muriel L, Meseguer M, Fernández JL, Alvarez J, ve ark. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination (IUI): a double-blind prospective study. *Hum Reprod.* 2006; 21:738–44.
- 46- Morris I.D., Ilott S., Dixon L., Brison D.R. 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)4:990-98.
- 47- 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(3):528-32.
- 48- Younglai EV, Holt D, et Al. (2001): Sperm Swim-Up Techniques and DNA Fragmentation. *Hum Reprod.* 2001;16(9):1950–53.
- 49- Benchaib M., Braun V., Lornage J., Hadj S. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003;(18)5:1023-28.

- 50- [Huang C.C](#), [Lin D.P.C](#), [Tsao H.M](#), [Cheng T.C](#) ve ark. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. [Fertil Steril](#). 2005; 84,1:130-40.
- 51- Virro M.R., Larson -Cook K.L., Evenson D.P.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), 5:1289-95.
- 52- Saleh RA, Agarwal A, Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. [Fertil Steril](#). 2003;79:3
- 53- Gandini L , Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. [Hum Reprod](#). 2004;(19)6:1409-17.
- 54- Henkel R, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. [Fertil Steril](#). 2004;81(4):965-72.
- 55- Zini A., Libman J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. [CMAJ](#) , 2006;175(5):495-500.
- 56- 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](#); 2001 ;79(7):559-63.
- 57- Brooks N.L. (2006): Apoptotic Markers in Ejaculated Human Spermatozoa. http://etd.uwc.ac.za/usrfiles/modules/etd/docs/etd_init_5617_1174551574.pdf
- 58- Kerr J.F.R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. [Toxicology](#). 2002;181-182: 471-74.
- 59- Hengartner M.O.The Biochemistry Of Apoptosis. [Nature](#) . 2000; 407.
- 60- Ulukaya E., Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf
- 61- Lachaud C,Tesarik J., Cañadas, M.L. and Mendoza, C.Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. [Hum Reprod](#). 2004; 19(3):607-10.

- 62- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4): 495–516.
- 63- Yan N, Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 2005;21: 35-56
- 64- Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 2001; 15: 2922–33.
- 65- Khosrowbeygi A, Zarghami N., Deldar Y. Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. *Iranian J Reprod Med.* 2004; 2(2):58-64.
- 66- [Fauser](#) B.C.J.M , [Rutherford](#) A. J. , [Strauss](#) J. F., [Van Steirteghem](#) A. *Molecular biology in Reproductive Medicine* 1th edition. Parthenon publishing group. 1999; 271-295
- 67- Donepudi M., Grutter M.G. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry* 2002;101 –102:145–53
- 68- Moustafa M.H ,Sharma R.K., Thornton J., Mascha E. Relationship Between ROS Production , Apoptosis and DNA Denaturation in Spermatozoa from Patients Examined for Infertility. *Hum Reprod* 2004;19(1):129-38.
- 69- Aziz N., Said T., Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod.* 2007;22(5):1413-19.
- 70- Gandini L ,Lombardo F., Paoli D.,Caponecchia L. ve ark. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000: 15(4):830-39.
- 71- Ricci G.,Peticarari S., Fragonas E.,Giolo E., ve ark. Apoptosis in human sperm : Its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod,* 2002;17(10):2665 -72.
- 72- Weng S.H., Taylor S.L., Morshedi M., Schuffner A. ve ark. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod.* 2002.8(10):984–91.
- 73- Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, ve ark. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004.10(5):365-72.
- 74- Paasch U, Grunewald S., Agarwal A., Glandera H.J. Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2003;81:802-9.

- 75- Cedenho A.P.,Lima S.B.,Cenedeze M.A.,Spaine D.M., ve ark. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. Hum Reprod.2006(21)7:1791–94.
- 76- Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L .Putative creatine kinase Misoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. Biol Reprod .2000;63:925-32.
- 77- Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl. 1988;9(6):367-76.
- 78- Halliwell B.& Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Third Edition. Oxford University Press. ISBN 1999;1-29.
- 79- Lenzi A, Gandini L, Picardo M. A rationale for glutathione therapy. Hum Reprod. 1998 Jun;13(6):1419-22.
- 80- Silva PFN. Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm. <http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2006-0710-200029/full.pdf>. 2006. Utrecht University.
- 81- Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. Reprod Biol Endocrinol. 2005;3:67.
- 82- Sikka CS. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. J Androl, 2004;25:1.
- 83- Agarwal A:Significance of oxidative stres and sperm chromatin damage in male infertility: Chapter13:157-77.
<http://www.Clevelandclinic.Org/Reproductiveresearchcenter/Docs/Agrach014.Pdf>
- 84- Pasqualotto F.F., Sobreiro B.P., Hallak J., Pasqualotto E.B ve ark. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. Bju International. 2005; 97:324 –26.
- 85- Alvarez J.G., Sharma R.K.,Ollero M.,Saleh R.A., Lopez ve ark. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. Fertil Steril 2002;78(2):319-29.
- 86- De Lamirande E, Gagnon C. A Positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human Spermatozoa. Inter J Androl. 1993;16(1):21-5.

- 87- Aitken R.J., Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 2001;122:497–506.
- 88- Twigg J., Fulton N., Gomez E., Irvine D.S., ve ark. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998;13(6):1429–36.
- 89- Tarin JJ, Brincs J, Cano A. Is antioxidant therapy a promising strategy to improve hum reprod? debate antioxidants may protect against infertility. *Hum Reprod*. 1998; 13(6): 1415–24.
- 90- Shekarriz M, DeWire, M.D, A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol*.1995;28:31-35
- 91- Hsieh Y.Y, Chang C.C, Lin C.S. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int. J. Biol. Sci.* 2006; 2(1):23-29
- 92- Delilbaşı L, İn Vitro Fertilizasyon Laboratuar Yöntemleri. Birinci Basım Güneş Tıp Kitabevleri Ankara .2008;61-83
- 93- Muratori M., Piomboni P., Baldi E., Filimberti E. ve ark. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl*. 2000; 21:903-912.
- 94- Kasimanickam R., Pelzer K.D., Kasimanickam V., Swecker W.S ve ark. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs .*Theriogenology* .2006;65:1407–21.
- 95- Wang X., Sharma R.K., Sikka S.C., Thomas A. J. ve ark. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003;80 (3); 531-535
- 96- Vilorio T, Garrido N., Fernández J., Remohí J. Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril*. 2007; 88(2):523-525

- 97- Zenzes M.T., Puy L.A., Bielecki R., Reed T.E. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa. *Molecular Hum Reprod* vol.5 no.2 pp. 125–131, 1999
- 98- Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod.*, 2002; 17(6): 1554-1559
- 99- Ramlau-Hansen C.H., Thulstrup A.M., Aggerholm A.S., Jensen M.S. ve ark. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod.* 2007;22(1):188–96.
- 100- Stillman RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *Fertil Steril* 1986; 46:545.
- 101- Attia AM, el-Dakhly MR, Halawa FA, Ragab NF ve ark. Cigarette smoking and male reproduction. [Arch Androl.](#) 1989;23(1):45-9.
- 102- Özgür K, Işıkoğlu M, Seleker M, Dönmez L. Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Turkish population. *Arch Gynecol Obstet.* 2005;271(2):109-12.
- 103- Oosterhuis G.J.E., Vermes I. Apoptosis in human ejaculated spermatozoa. *J Biol Regul Homeost Agents* .2004;18:115-9.
- 104- Benchaib M., Lornage J., Mazoyer C., Lejeune H ve ark. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertil Steril.* 2007;87(1):93-100.
- 105- Domínguez-Fandos D, Camejo MI, Ballescà JL, Oliva R. Human sperm DNA fragmentation: correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. *Cytometry A.* 2007;71(12):1011-8.
- 106- Hammadeh ME, Radwan M, Al-Hasani S, Micu R. Comparison of reactive oxygen species concentration in seminal plasma and semen parameters in partners of pregnant and nonpregnant patients after IVF/ICSI. *RBMOnline.* 2006; 13(5):696–706.
- 107- 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(6):1338-1344.

- 108- Magdy ES, Adel Z. Impact of Cigarette Smoking and Varicocele on Spermatozoal Oxidative Stress, Seminal Parameters and Acrosome Reaction. 2004;15(1) http://www.geocities.com/arab_derma/pald_vol15_1_feb2004_p187_196.pdf
- 109- Zabludovsky N., Eltes F., Geva E., Berkovitz E ve ark. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. *Andrologia*. 1999; 31(2), 91-98
- 110- [Agarwal A](#), [Allamaneni SS](#), [Nallella KP](#), [George AT](#). ve ark. Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis. *Fertil Steril*. 2005 ;84(1):228-31.
- 111- Piomboni P., Bruni E., Capitani S., Gambera L. ve ark. Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. *Arch Androl*. 2006;52(1):51-9.
- 112- Zavos P.M., Correa J.R., Karagounis C.S., Ahparaki A., ve ark. An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril*. 1998;69(3):430-34.