

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SEMEN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ, SPERM DNA HASARI VE SPERM
MİTOKONDİYAL DNA MUTASYON ANALİZ YÖNTEMLERİ OPTİMİZASYONU**

ELNAZ MOSHFEGHI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLÖJİ VE GENETİK
MOLEKÜLER BİYOLÖJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ.DR.TÜLİN ARASOĞLU**

**EŞ DANIŞMAN
DR.NECATİ FINDIKLI**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SEMEN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ, SPERM DNA HASARI VE SPERM
MİTOKONDİRİAL DNA MUTASYON ANALİZ YÖNTEMLERİ OPTİMİZASYONU**

Elnaz MOSHFEGHI tarafından hazırlanan tez çalışması 26.04.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç.Dr.Tülin ARASOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Dr. Necati FINDIKLI
Bahçeci sağlık Gurubu

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Tülay İREZ
Biruni Üniversitesi

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün FYL-2018-3260 numaralı projesi ve Bahçeci Sağlık Gurubu tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

“Semen antioksidan kapasitesi, sperm DHA hasari ve sperm mitokonsrial DNA mutasyon analiz yöntemleri optimizasyonu” konu başlıklı yüksek lisans tez yolculuğum süresince engin bilgi ve deneyimi ile bu yolda ilerlememde yardımcı olan danışmanım Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU' na sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Bana bu eşsiz tecrübeyi tanıyan, Bahçeci Fulya Tüp Bebek Merkezindeki her anımın bende güzel anılar bırakmasını sağlayan, engin tecrübelerini cömertçe paylaşan ve bu yolda ufkumu açan ve yoğun çalışma programına rağmen bana zaman ayıran tez eş danışmanım, Dr. Necati FINDIKLI'ya yönetim ve ilgilerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Bahçeci Tüp Bebek Merkezinde bana her zaman yönlendiren ve destekleyen biolog Meral GÜLTOMRUK'a ve ordaki güler yüzli tüm personeline ve YTÜ laboratuvarında çalışmaktan büyük keyif aldığım arkadaşlarıma ve en başta hep bana destek olan Tuğba Atabey'e;

Omur boyu bana destek olan canım annem ve babama; bana yol gösteren ve yol arkadaşım olan sevgili eşim Reza Ghahremani'e ve her zaman arkamda olan kardeşlerim Alborz ve Alvand'den içtenlikle teşekkür ederim.

Nisan, 2018

Elnaz MOSHFEGHI

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	vii
KISALTMA LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ÖZET.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	2
1.3 Hipotez.....	2
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 İnfertilite (Kısırlık) Nedir?.....	4
2.2 Erkeklerde Kısırlık.....	4
2.2.1 Sperm Ve Özellikleri.....	6
2.2.2 Spermatogenez ve Spermiogenez.....	12
2.2.3 Sperm ve Oksidatif Stres.....	14
2.2.4 Sperm ve Genomik Hasarlar.....	19
2.2.5 Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve Etkileri.....	26
2.3 Erkek Kısırlığı Tayininde Kullanılan Güncel İleri Tanı Testleri.....	32
2.4 Mevcut Çalışmada Kullanılan İleri Tanı Testleri.....	34
2.4.1 Semen Analiz (Spermiyogram) Testi.....	34
2.4.2 sORP Testi.....	36
2.4.3 TUNEL Testi.....	36
2.4.4 Anilin Mavi Testi.....	37
2.4.5 PZR Yöntemi İle mtDNA Mutasyon Tespiti.....	38
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT.....	39
3.1 Materyal.....	39
3.1.1 Kullanılan Malzemeler:.....	39
3.1.2 Kullanılan Çözeltiler:.....	40
3.1.3 Kullanılan Cihazlar:.....	41
3.1.4 Örnek Türü:.....	41
3.2 Metodl.....	41
3.2.1 Semen Analizi.....	41

3.2.2	sORP Testi.....	47
3.2.3	TÜNEL Testi	47
3.2.4	Anilin Mavisi Testi	51
3.2.5	PZR Yöntemiyle mtDNA Mutasyon Tespiti.....	51
BÖLÜM 4		
DENEYSEL SONUÇLAR		62
4.1	Semen Analiz Sonuçları	62
4.2	sORP Analiz Sonuçları.....	64
4.3	TUNEL Analiz Sonuçları.....	64
4.4	TUNEL Analiz Sonuçları.....	65
4.5	TUNEL Analiz Sonuçları.....	66
4.5.1	Semen DNA İzolasyon Sonuçları	66
4.5.2	ATPase6 Gen Bölgesinde PZR Ürünü Jel Görüntüsü	67
4.5.3	ND3 Gen Bölgesinde PZR Ürünü Jel Görüntüsü	68
4.5.4	Common Gen Bölgesinde PZR Ürünü Jel Görüntüsü:	68
4.5.5	Primer Şift Gen Bölgesinde PZR Ürünü Jel Görüntüsü:	69
BÖLÜM 5		
SONUÇ VE ÖNERİLER		70
KAYNAKLAR		70
ÖZGEÇMİŞ		83

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
κ	Kappa
bp	Baz çifti
kDa	Kilo Dalton
kb	Kilobaz
μ L	Mikrolitre
mL	Mililitre
mm/gün	Milimetre/gün
mm/s	Milimetre/saniye
nm	Nanometre
ng/mL	Nanogram/Mililitre
RCF	Rölatif santrifügal güç
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
cc	Santimetre Küp
p	Kromozomun kısa kolu
q	Kromozomun uzun kolu

KISALTMA LİSTESİ

DFI	DNA Fragmentasyon Endeksi
SCSA	Sperm Kromatin Yapı Tahlili
RPL	Tekrarlayan Gebelik Kaybı
ART	Yardımcı Üreme Teknikleri
IVF	Tüp Bebek
QOL	Yaşam Kalitesi
PUFAs	Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
RC	Solunum Zinciri
QA	Oligoazyenozoospermik
OAT	Oligoasthenoteratozoospermic
8-OHdG	8-hydroxy-2' -deoxyguanosine
SNPs	Tek Nükleotid Polimorfizmleri
LHON	Leber'in Kalıtsal Optik Nöropati
MMP	Mitokondriyal Membran Potansiyeli
ETZ	Elektron Taşıma Zinciri
OXPHOS	Elektron Taşıma Zinciri
D-loop	Dsplacement Loop
MMP	Mitokondria membran potansiyeli
SCSA	Kromatin Yapı Tayini
AOT Test	Akridin Turuncu Testi
TB	Toludin Mavisi
NT	In Situ Nick Translation
COMET	Tek Hücre Jel Elektroforezi
SCD	Sperm Kromatin Ayrılma
MDA	Malondialdehyde
ROS	Reaktif oksijen türleri
TAC	Toplam Antioksidan Kapasite
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
SSP	Standart Sperm Parametreleri
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılıklı dUTP nick sonu etiketleme tahlili
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi

mtDNA

Mitokondriyal DNA



ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Yumurta hücresine girmek için spermilerin istilası, mikroskopik görüntü 6
Şekil 2. 2	Sperm hücresi 7
Şekil 2. 3	Spermilerin yumurtaya girişi 7
Şekil 2. 4	Testisin iç yapısı 8
Şekil 2.5	Spermelerde gözlenen farklı şekil bozuklukları 10
Şekil 2. 6	Testisin iç yapısı 11
Şekil 2. 7	Erkek üreme sisteminde spermatogenez olayı 13
Şekil 2. 8	Erkek üreme sisteminde spermatogenez olayı 15
Şekil 2. 9	Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü 20
Şekil 2. 10	Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü 21
Şekil 2. 11	Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü 25
Şekil 2. 12	Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü 27
Şekil 2. 13	Sperm Mitokondri DNA yapısı 28
Şekil 2. 14	Erkek infertilitesinde ROS ve mtDNA mutasyonu ilişkisi 30
Şekil 4.1	Erkek infertilitesinde ROS ve mtDNA mutasyonu ilişkisi 42
Şekil 4.2	Kamaradaki hücre sayım alanları görüntüsü 42
Şekil 4.3	Aglütinasyon görüntüsü 43
Şekil 4.4	Sperm yıkamada kullanılan iki ve üç katmanlı gradient hazırlığı 44
Şekil 4.5	Vitalscreen boyaması sonrası sperm görüntüleri 45
Şekil 4.6	Peroksidaz boyama testi (Leucoscreen) görüntüsü 45
Şekil 4.7	Semen örneğinde pH ölçümü 46
Şekil 4.8	Kruger kriterlerine göre anormal sperm morfolojisi görüntüleri 47
Şekil 4.9	Mioxsys analizör ve sensörü 47
Şekil 4.10	Mitokondriyal DNA'nın büyük ölçekli 4977 bp'lik delesyon içinde bulunan farklı bölgeler 53
Şekil 4.11	Mitokondriyal DNA'nın büyük ölçekli 4977 - bp delesyonun tespitinde kullanılan stratejinin gösterimi, A; B 55
Şekil 4.12	MtDNA 4,977-bp delesyonunun saptanması 55
Şekil 4.1	1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil bireylerin genomik DNA jel görüntüsü 67
Şekil 4.2	1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil, 8 no'lu negatif kontrol bireyler için ATPas6 gen bölgesinde PZR jel görüntüsü 67

Şekil 4.3	1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil, 8 no'lu negatif kontrol bireyler için ND3 gen bölgesinde PZR jel görüntüsü.....	68
Şekil 4.4	1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil, 8 no'lu negatif kontrol bireyler için common gen bölgesinde PZR jel görüntüsü	69
Şekil 31:	1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil, 8 no'lu negatif kontrol bireyler için Primer çift gen bölgesinde PZR jel görüntüsü	69
Şekil 5.1	Son 30 yılda Reprodüktif Tıp ve Androloji Merkezine (Cera) katılan 26.091 infertil erkek hastanın semen analizi sonuçlarına göre konulan klinik tanılar	74



ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Sperm parametrelerin alt referans sınırı	12
Çizelge 2. 1 2010 yılı doktora mezun sayıları	33
Çizelge 3. 1 Sentezlenen primerler ve ilgili gen bölgeleri	54
Çizelge 3. 2 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı	56
Çizelge 3. 3 ATPase6 PZR koşulları	56
Çizelge 3. 4 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı	57
Çizelge 3.5 ATPase6 PZR koşulları	58
Çizelge 3.6 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı	59
Çizelge 3.7 ATPase6 PZR koşulları	59
Çizelge 3.6 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı	60
Çizelge 3.7 ATPase6 PZR koşulları	60
Çizelge 4.1 Semen analiz sonuçları:.....	63
Çizelge 4.2 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı	64
Çizelge 4.3 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı	64
Çizelge 4.5 DNA miktarı ve saflık sonuçları	66
Çizelge 5.1 Güncel rutin analizlerle belirlenen genetik sebepler	75

SEMEN ANTİOKSİDAN KAPASİTESİ, SPERM DNA HASARI VE SPERM MİTOKONDİRİAL DNA MUTASYON ANALİZ YÖNTEMLERİ OPTİMİZASYONU

Elnaz MOSHFEGHI

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU

Eş Danışman: Dr. Necati FINDIKLI

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından bir yıllık korunmasız cinsel ilişkiden sonra gebe kalınmaması durumu olarak tanımlanan infertilite, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde çiftlerin% 10-15'ini etkilemektedir. Ancak rutin infertilite tanısında kullanılan semen analizi çok düşük oranda tanı konulmasını sağladığından infertilite olgularının tanılanmasında başka ilave tekniklere, yeni yaklaşımlara ve daha kapsamlı kombine test uygulamalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Sunulan çalışma da varikozel olmayan infertil erkeklerde tanı amaçlı kullanılmak üzere; semen analizi, semen-antioksidan kapasite, nDNA paketleme ve fragmentasyon, mtDNA hasarını içeren sperm biyobelirteçler paneli oluşturulmuştur. Panelde test edilecek parametrelerin analiz metodları optimize edilerek 5 normal ve 2 infertil erkek hastada değerlendirilmiştir. Panelde yer alan parametreler; semen analizi DSÖ kriterleri esas alınarak, semen-antioksidan kapasite sORP analizi ile, nDNA paketleme ve fragmentasyon TUNEL ve Anilin mavi testleri kullanılarak, mtDNA hasarı PZR yöntemiyle “common delesyon” gen bölgesi ve bu bölgenin içerisinde yer alan ATPase6, ND3, primer shift gen bölgelerinin amplifikasyonu ile değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları; sadece 6 nolu infertil hastada sperm sayısının düşük olduğunu ve sORP değerinin yüksek olduğunu göstermiştir.

Sunulan tez çalışmasında erkek infertilitesinin tanılanması amacıyla kombine test yaklaşımıyla dört parametreden oluşan bir panel çalışması için kullanılacak analiz metodlarının optimize edilmesi sağlanmıştır. Uygulanılacak tekniklere yönelik optimizasyon çalışmalarının tamamlanmış olması ileride eldesi planlanan infertil erkek hastaların değerlendirilmesinin önünü açmış ve kolaylaştırmıştır. Ayrıca bu parametrelerin bir bütün olarak değerlendirilmesi, başarısız hamilelik süreci ve yardımcı üreme teknik uygulamalarının yaşanmamasını da sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Erkek infertilite, sperm, mtDNA, delesyon, oksidatif stres, motilite, ROS, sperm DNA



ABSTRACT

OPTIMIZATION OF SEMEN ANTIOXIDANT CAPACITY, SPERM DNA DAMAGE AND SPERM MITOCHONDRIAL MUTATION ANALYSIS METHODS

Elnaz MOSHFEGHI

Department of Molecular Biology and Genetics

MSc. Thesis

Adviser: Doç. Dr. Tülin ARASOĞLU

Co-Adviser: Dr. Necati FINDIKLI

Infertility, defined by the World Health Organization (WHO) as an unprotected sex after one year of unprotected sexual intercourse, affects 10-15% of couples in developed and developing countries. However, since semen analysis used in the diagnosis of routine infertility provides diagnosis at a very low rate, other additional techniques, new approaches and more comprehensive combined testing are needed in diagnosing cases of infertility. The present study also aimed to be used for diagnostic purposes in non-varicocele infertile men; sperm biomarkers panel including semen analysis, semen-antioxidant capacity, nDNA packaging and fragmentation, and mtDNA damage. The analysis methods of the parameters to be tested in the panel were optimized and evaluated in 5 normal and 2 infertile male patients. The parameters in the panel are; semen analysis based on WHO criteria, mRNA damage was assessed using the SORP analysis, nDNA packaging and fragmentation TUNEL and Aniline blue tests using the SORP analysis, mRNA DNA damage was assessed using the PZR "common deletion" gene region and the ATPase6, ND3, amplification. Study results; only 6 infertile patients showed low sperm count and high sORP.

In the presented thesis study, optimization of analysis methods to be used for a panel study consisting of four parameters with the combined test approach has been provided for the diagnosis of male infertility. Completion of the optimization studies for the

techniques to be applied has opened and facilitated the evaluation of future planned infertile male patients. In addition, the evaluation of these parameters as a whole will ensure that the failed pregnancy process and assisted reproductive techniques are not experienced.

Keywords: Male infertility, sperm, mtDNA, deletion, oxidative stress, motility, ROS, sperm DNA



1.1 Literatür Özeti

Son yıllarda aşırı ilaç kullanımı, toksik maddelere maruziyetin artması, ateşli hastalıklar, testislere uygulanmış cerrahi ameliyatlar ve genetik sorunlar gibi faktörlerden dolayı artan erkeklerdeki kısırlık oranı (%30), spermdeki kalitatif ve kantitatif defektlerden kaynaklanmaktadır. Erkek infertilitesindeki artışın önemli sebeplerden biri olan sperm hareketliliği için gerekli olan enerjinin sağlanmasında, sperm mitokondrilerindeki oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) mekanizmasının etkin çalışması çok önemlidir. Ancak oksidatif fosforilasyon mekanizması ile oluşan ROS ve serbest radikaller beraberinde endojen antioksidant eksikliği sperm hücrelerinin oksidatif hasara karşı daha duyarlı hale gelmesine neden olur. ROS' un fizyolojik seviyeleri motilite, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi optimal sperm fonksiyonları için gereklidir, ancak seviyeler çok yüksek olduğunda oksidatif stres oluşmaktadır ve bu durumun mitokondriyal DNA mutasyonu artışında önemli bir rol oynadığı literatürde gösterilmiştir. Sperm mtDNA'sında gerçekleşen yüksek frekanslı mutasyonlar ve nükleotid delesyonlarının; spermin üretimi ve farklılaşmasında anormal değişikliklere sebep olduğu ve hareket yeteneğini azalttığı bilinmektedir.

Erkek infertilitesinin belirlenmesinde ilk aşama semen miktarı, total sperm sayısı, sperm konsantrasyonu, total motilite, canlılık ve sperm morfolojisi parametrelerini içeren semen analizidir. Ancak bu analiz; sperm hücrelerindeki kromozomal anöploidi, DNA ve kromatin anormallikleri gibi moleküler düzeydeki önemli unsurların varlığını göstermemektedir. Bu çalışmada, varikosel olmayan infertil erkeklerden alınan semen numunelerinde genel sperm parametrelerinin (hacim, sayı,

hareket, morfoloji vb.) incelendiği rutin semen analizinin yanısıra sperm DNA hasarı ve anormalliklerinin birlikte tespitine yönelik farklı analiz metotlarının bir arada kullanılarak bir test sistemi oluşturulması ve moleküler düzeydeki anomalilerin infertiliteye olası etkilerinin bu test sistemi ile kapsamlı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu metodlar sırası ile:

- Oksidatif stresin değerlendirilmesi için spermin oksidasyon redüksiyon potansiyelinin sORP testi ile ölçümü,
- Sperm genomunda tek ve çift zincir hasarlarının tesbitinin TUNEL[1, 2] testi ile belirlenmesi,
- Olası DNA paketlenme problemleri nedeni ile oluşabilen DNA hasarı ve fertilizasyon problemlerinin tespitinin Anilin mavisi testi ile belirlenmesi,
- Olası mtDNA mutasyonlarının ve bu mutasyonların kalıtsal yönünün tespiti için PCR [3, 4] yöntemi ile mutasyon analizidir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, infertil ve fertil erkeklerde bazal semen parametreleri ile oksidatif stres, sperm DNA paketlenmesi ve mtDNA yapısı arasındaki olası korelasyonun incelenebilmesi amacı ile bir test sistemi geliştirilecektir. Böylelikle adı geçen faktörlerin erkek infertilitesindeki olası rolleri daha etkin olarak belirlenebilecektir.

Geliştirilecek test sistemi sayesinde incelenen parametrelerdeki olası bozulmaların çalışma popülasyonundaki insidansı belirlenebilecek ve yakın gelecekte planlanacak yardımcı üreme teknikleri tedavisi öncesi antioksidan tedavisinden fayda görebilecek hasta popülasyonu belirlenmeye çalışılacaktır.

1.3 Hipotez

Çalışmanın birincil hipotezi, varikosel olmayan infertil erkek hastalarda, hastaların sperminde fertilizasyon potansiyelinin azalmasını sebep olan çeşitli biyokimyasal, moleküler, genomik ve fonksiyonel anormalliklerin önemli rol oynadığıdır.

Çalışmanın ikincil hipotezi, bazı semen örneklerinde gözlenen hareketlilik kaybının bir kısmının mtDNA mutasyonları nedeni ile ortaya çıktığı ve bu durumlarda oral antioksidan kullanımının semen kalitesine olumlu bir etki yapmayacağı hipotezidir.



BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 İnfertilite (Kısırlık) Nedir?

Reprodüktif (doğurganlık) süreç içerisinde olan bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmadan en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanan infertilite= kısırlık, çiftlerin evlilik yaşamındaki en önemli sağlık problemlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır [5]. İnfertilitenin görülme ve sıklığı; ülkeden ülkeye, bölgeden bölgeye değişmekle birlikte gelişmiş ülkelerde yaklaşık %8-10, gelişmekte olan ülkelerde ise %15-20 civarındadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünyada, üreme yaşında olan çiftlerin %8-12'si infertilite problemi yaşamaktadır [5]. Türkiye’de infertilite sıklığı açısından çok net bilgiler bulunmamakla birlikte bu oranın %10-15 dolayında olduğu düşünülmektedir. İnfertilite; biyolojik, psikolojik, ekonomik, etik, yasal ve sosyal açıdan her iki cinsiyet açısından önemlidir [6]. Özellikle kadınların bu konudaki duyarlılıkları sosyokültürel nedenlere bağlı olarak çok daha fazladır.

2.2 Erkeklerde Kısırlık

Dünya genelinde infertil kadın ve erkek oranı yaklaşık olarak eşittir. Ortalama olarak infertilite; çiftlerde %40 erkeğe , %40 kadına, %10 hem erkek hem de kadına bağlı ve %10 bilinmeyen sebeplerden meydana gelir. Kadın infertilitesine göre daha çok dikkat çeken erkek infertilitesinin belirgin sebepleri olarak sperm üretim bozuklukları, sperm kanallarındaki tıkanıklıklar, sperme karşı antikor varlığı, testis travması, hormonal

bozukluklar, anatomik problemler, geçirilmiş hastalıklar, enfeksiyonlar ve bazı ilaçlar, gen mutasyonları, anöploidler, varikosel, radyasyon, kemoterapi ve erektil disfonksiyon sayılabilir. Bununla birlikte infertil erkeklerin %50'sinde, infertiliteye sebep olan neden belirgin değildir ve bundan dolayı bu tür vakalar idiyopatik infertilite olarak tanımlanırlar.

Genel olarak erkeklerde ergenlik döneminin başlamasıyla sperm üretimi başlar. Beyindeki hipofiz bezinden, luteinizan hormon (LH) ve folikül stimüle edici hormon (FSH) salgılanır. FSH sperm üretiminin aktif olmasını ve LH testosteron hormonunun salgılanmasını sağlar. Bunların salgılanması da spermin olgunlaşmasını sağlar. Spermlerin üretimi testislerde ve gelişimi epididimde tamamlanır ki bu süreç yaklaşık üç ay sürer. Cinsel ilişki esnasında olgun spermler, sperm kanalı yoluyla kadın vajinasına atılır. Bu sırada spermi besleyen ve koruyan sıvılar, prostat ve prostat arkasındaki bezlerden yani veziküler seminalisden meniye karışır ve bu işlem (sperm üretimi) erkeğin yaşamı boyunca devam eder [7, 8].

İnfertilitenin değerlendirmesi için birinci adım olarak hastanın tıbbi özgeçmişi (geçirilmiş bazı ateşli hastalıklar, cerrahi girişimler veya travmalar, cinsel yolla bulaşan enfeksiyonlar) çok önemlidir ve fertilitiyi etkileyebilir. Ayrıca kimyasal maddelere maruz kalma, stres, ilaç ve alkol kullanımı, egzersiz alışkanlıkları, cinsel ilişki zaman ve sıklığı önemli faktörler olabilir. İkinci adım fizik muayene veya üreme organlarının muayenesidir. Bu muayenelerde testislerin yerinde olup olmadığı, testislerin durumu, sperm kanalları, skrotum içinde genişlemiş damarların olup olmadığı (varikosel), prostat bezinin durumu ve vücut yağı incelenir. Son aşamada ise laboratuvar testleri yapılır. Semen (meni) analizinde, 2-7 günlük bir cinsel perhiz sonrası alınan taze semenin makroskopik ve mikroskopik değerlendirmesi yapılır. Sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisi değerlendirilir. Semen analizi tek başına fertilité durumunu göstermez, zira bu analiz ile spermin tüm fonksiyonlarını görmek imkansızdır. Ancak infertilitenin başlangıç değerlendirmesi için kolay ve yararlı bir test olarak tanımlanır. Semen analizinde herhangi bir anormallik görülürse, devamında tanı koyucu testler yapılır ve ona göre tedavi yöntemleri başlanır [9, 10]. Bu aşama da gerçekleştirilen tüp bebek tedavisi, genellikle gebelik şansı olmayan ya da şansı az olan çiftlerde gebelik şansını arttıran bir tedavi yöntemidir [11].

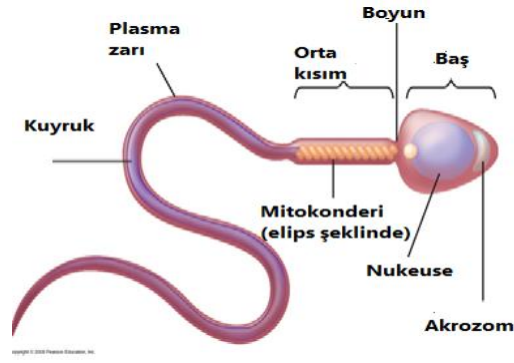
2.2.1 Sperm Ve Özellikleri

Semen, sperm ve çeşitli salgı bezlerinden salınan sıvıları içeren yoğun, yapışkan, beyazımsı bir sıvıdır. Ejakülasyon sonrasında yoğun olan semen, 10-30 dakika içinde sıvılaşarak akışkan hale gelmektedir. Sperm; semen içinde bulunan, başı ve kuyruğu olan ve hareket eden erkek üreme hücresidir. Spermiler, kadın vücuduna girdiklerinde kuyrukları sayesinde hızla hareket edip yumurtaya ilerler ve yumurta ile birleşir ve döllenme gerçekleşir (Şekil 1). Her semen örneği içinde; milyonlarca sperm ve farklı miktarlarda fruktoz, tampon sıvıları, koagülasyon maddeleri, kayganlaştırıcılar ve spermi destekleyen ve döllenmeye yardımcı olan enzimler bulunmaktadır [12].



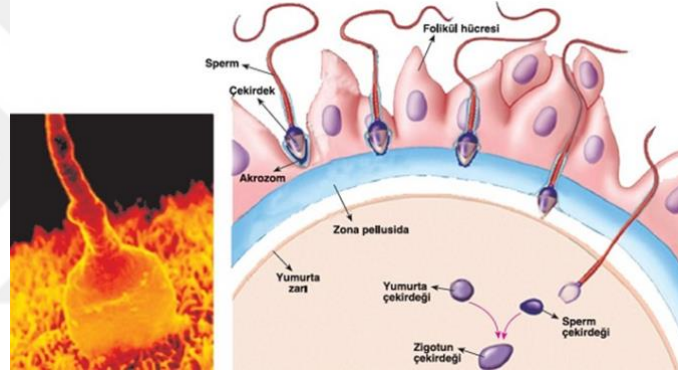
Şekil 2. 1 Yumurta hücresine girmek için spermilerin istilası, mikroskopik görüntü

Sperm hücreleri, çıplak göz ile görülemeyecek kadar küçük hücrelerdir. Baş, boyun, orta kısım ve kuyruk adı verilen bölümlerden oluşmaktadır (Şekil 2). Sperm hücrelerinin baş kısımlarında, plazma membranı ile çevrili nükleus ve akrozom yer almaktadır. Akrozom bölgesinin içerdiği enzimler, spermatozoanın oositi çevreleyen korona radyata ve zona pellusida'dan geçişini kolaylaştırmaktadır. Nitekim, yumurta hücresinin dış tabakasını eritebilecek kadar güçlü maddeler içerdiğinden döllenme sürecinde son derece önemli bir fonksiyona sahiptir (Şekil 3). Nükleus (çekirdek) kısmı ise genomik materyalinin bulunduğu kısımdır (23 kromozom) [13].



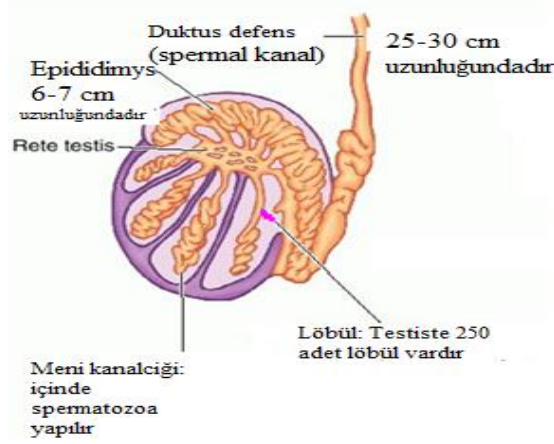
Şekil 2. 2 Sperm hücresi

Spermin orta bölgesinde bulunan yaklaşık 70-100 mitokondri, canlılık ve hareketin sağlanması için enerji üretimini sağlamaktadır. Spermin kuyruk kısmı ise genellikle sperm hücresinin hareketli kalmasını sağlamaktadır[14] .



Şekil 2. 3 Spermlerin yumurtaya girişi

Genel olarak spermlerin oluşumu ve olgunlaşmaları testis ve epididimiste gerçekleşmektedir. Testis, spermatogenez ve spermiogenez süreçlerinde; epididim ise sperm DNA maturasyonu, kromatin kondansasyonu için son işlem olan protaminler arasındaki bağların güçlenmesi, yüzey proteinlerinin eklenmesi ve fizyolojisinin tamamlanmasında, membran maturasyonu ve hareket kazanmasında önemli rol oynamaktadır [15, 16]. İlaveten, epididim sperm hücrelerinin olgunlaşmalarında ve depolanmasında görev yapmaktadır. Epididimin devamında sperm iletim kanalı bulunur. Sperm kanalının içinde prostat salgı bezi mevcuttur(Şekil 4). Bu salgı bezleri kendi salgılarını boşaltarak meninin en son şeklini almalarını sağlar. Ayrıca bu salgılar sperm hücreleri için hem hareket artırıcı hem de besleyici özellikleri barındırmaktadır [17].



Şekil 2. 4 Testisin iç yapısı

Sperm hücrelerinin üretimi ve olgunlaşmaları yaklaşık 74 günlük bir süreçtir. Bu süreçte başlangıçta 46 kromozom taşıyan gonadal kök hücreler farklı aşamalardan geçerek spermatogonyumlara, spermatogonyum hücreleri de sonrasında mayoz bölünmenin tamamlanması ile yuvarlak spermatidlere dönüşürler. Yuvarlak spermatidler daha sonrasında spermiyogenez adı verilen son derece kompleks morfolojik değişim aşamalarından geçerek olgun sperm halini alır [18].

Sağlıklı sperm üretimi, biyolojik üretim süreci yanında doğrudan veya dolaylı olarak etkileyebilen birçok çevresel faktöre bağlıdır. Günümüzde zorlaşan hayat şartları, hava kirliliği ve modern yaşamın getirdiği pek çok olumsuz etki nedeni ile sperm kalitesinde yaşanan azalma nedeni ile üreme sorunlarının da arttığı gözlenmektedir. Şartların iyileştirilmesi orta ve uzun vadede pek çok olguda daha sağlıklı ve kaliteli sperm üretimini sağlayabilmektedir ancak bu iyileşme kısa süreli (günlük) önlemlerle gerçekleştirilebilecek bir durum olmayıp daha uzun süreli (aylar) önlem ve tedaviler ile sağlanabilir [8].

Mevcut hayat standardı ve tarzının da sağlıklı sperm üretimi ile doğrudan ilgili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmektedir. Üreme hücrelerinin sağlığı için sigara, alkol gibi bağımlılık yapan maddelerin kullanımından uzak durulması gerekmektedir. Bu maddelerin kullanımı organlara ve sağlıklı sperm üretime ve hatta sperm sayısında azalmaya neden olmaktadır. Kilo fazlalıkları yumurta ve sperm sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle vücut kitle endeksi normal sınırlarda (18.5-24.9 kg/m² arasında) olmalıdır. Birçok hastalığın nedeni olarak karşımıza çıkan stres,

ortamın aşırı sıcak veya soğuk oluşu gibi faktörler de sağlıklı sperm üretimi için oldukça önemlidir [5].

DSÖ kriterlerine göre erkekten alınan semen örneğinin “normal” olarak değerlendirilmesi için ejakülasyon sonrası volümün en az 1,5 ml olması ve ml'de 15 milyon'dan fazla sperm içermesi gerekir (Şekil 6). Teorik olarak gebeliğin oluşması için tek bir sperm yeterli olmasına karşın, çok sayıda sperm varlığının sebebi yumurtaya ulaşabilmek için girdikleri mücadelenin zorluğundan kaynaklanır. Sperm sayısı, sperm konsantrasyonu olarak tanımlamaktadır. Sperm sayısı; erkeklerin üreme potansiyelini gösterir ve yukarıda bahsedildiği üzere birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Sperm sayısının azlığı veya kalitesiz spermilerin daha fazla olması nedeniyle dölleme gerçekleşmeyebilir. Sperm sayısının azalmasının en büyük nedeni kalıtsal faktörlerdir. Aile geçmişinde sperm sayısında azalmaya dair bulgular bulunduğu diğer bireyler de risk grubu içerisinde kabul edilebilir. Sperm sayısı ile beslenme arasında doğru orantı bulunmaktadır. Bol miktarda vitamin, mineral ve protein içeren sağlıklı ve dengeli beslenme, sperm sayısı ve kalitesinde artışı beraberinde getirir. Ancak yardımcı üreme teknikleri tedavilerinde spermilerin kalitesi, sayısından daha önemlidir [19].

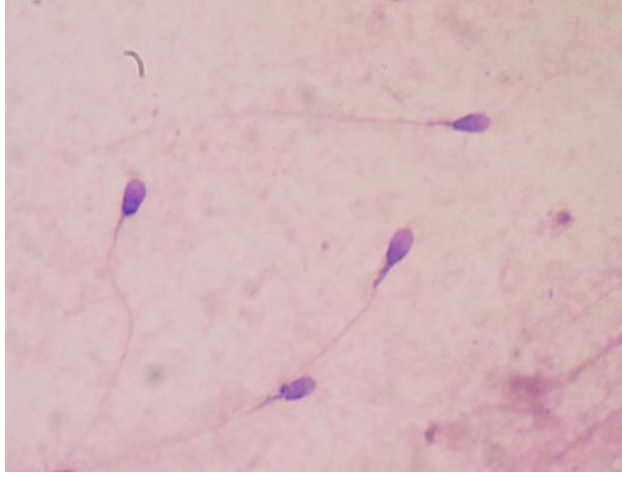
Sıklıkla karşılaşılan sperm anomalisi, spermilerin baş kısmında veya kuyruklarında oluşur (Şekil 5) ve spermin yumurtaya ulaşma, dölleme ihtimalini oldukça düşürür. Kuyruk anomalisi olan bir spermin hareket edemeyeceğini düşünürsek, yumurtaya ulaşması imkansız olacaktır. Bir ejakülasyonda sperm sayısı yaklaşık 100 milyon ve anomali değeri %50 olan bir erkekte, bu değerler spermilerin yarısının hareketli olduğunu gösterir ve dölleme için de yeterlidir. Ancak bir ejakülasyonda 40 milyon sperm varsa ve anomali değeri yüksek ise bu birey fertilité açısından sınır değerinin altındadır ve uygun sperm sayısına ulaşabilmek için tedavi almak zorunda olabilir. Sperm kalitesinde düşüklük gözlenen olguların bir kısmı beslenme ve yaşam tarzındaki değişiklikler ile düzeltilebilir [20].



Şekil 2.5 Spermelerde gözlenen farklı şekil bozuklukları

Meni sıvısındaki spermın özellikleri semen analizi ile belirlenmektedir. Standart bir semen analizinde ölçülen parametreler:

- Semen hacmi
- Sperm konsantrasyonu
- Toplam sperm sayısı
- Sperm hareketi ve hareket şekli
- Normal ve normal olmayan sperm sayısı
- Agülasyon (sperm topaklanması) olup olmaması
- Fruktoz içeriği ve pH (asidite)
- Çözünürlük=Sıvılaşma (Likefaksiyon) zamanı
- Lökosit (beyaz kan hücresi) hücre sayısı
- Morfoloji parametreleridir.



Şekil 2. 6 Testisin iç yapısı

Semen analizi (Spermiogram) testinin sağlıklı ve doğru sonuç verebilmesi için test öncesinde bireyin uygun şartlarda hazırlığı ve örneğin kurallara uygun veriliyor olması son derece önemlidir. Aksi durumlarda elde edilecek sonuçlar sadece yanlış olmakla kalmayıp yanlış ve gereksiz tedavi planlamaları yapılmasına sebep olabileceğinden semen analizi öncesi bu kurallar detaylı ve anlaşılır şekilde bireye anlatılmalıdır.

- 3-7 günlük cinsel perhiz yapılmış olmalıdır.
- Eğer semen örneği test yapılacak kurumda verilmiyor ise örnek en geç bir saat içerisinde vücut sıcaklığına yakın bir ortamda muhafaza edilmeli, laboratuvara teslim edilmeli ve analizler başlanmalıdır.
- Semen örneği mastürbasyon yöntemi ile elde edilir. Bu amaçla örnek verme öncesinde eller mutlaka temizlenmeli, meninin mümkün olduğu kadar kabın içine toplandığından emin olunmalı (aksi durumda görevli mutlaka haberdar edilmeli) ve kabın sterilliğinin bozulmamasına (kabın iç kısmına dokunulmaması) dikkat edilmelidir.

Semen analizi testinde elde edilen değerler için referans sınırlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

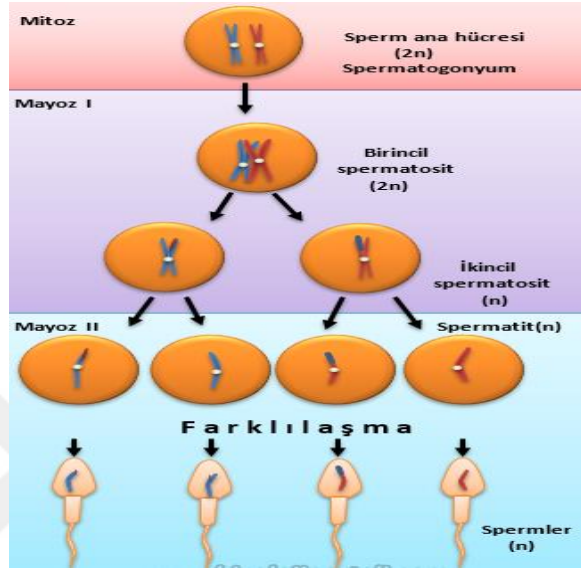
Çizelge 2. 1 Sperm parametrelerin alt referans sınırı

Parametre	Referans sınırı
Semen hacmi (ml)	1.5 (1.4 – 1.7)
Sperm sayısı (ml /10 6) %	39 (33- 46)
Sperm Konsantrasyonu %	15 (12- 16)
Sperm Hareketlilik %	40 (38- 42)
Sperm Canlılığı %	58 (55- 63)
Sperm morfolojisi %	4 (3.0- 4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lokosit (ml /10 6)	<1.0
Diğer fikir birliği eşik değerleri	
SPERM MAR TESTİ (Sperm otoantikör testi) %	<50
Anti-Sperm Antikör (İmmunobead) Testi	<50
Seminal Çinko (μ mol/ ejakulat)	>2.4
Seminal Froktoz (μ mol/ ejakulat)	>13
Seminal Glukozid (mU/ ejakulat)	>20

2.2.2 Sp Spermatogenez ve Spermiogenez

Sekiz Spermilerin, erkek üreme organı olan testislerin yapısındaki seminifer tüpçüklerinde mayoz bölünme ile oluşmasına spermatogenez denir. Spermier erkek üreme sistemindeki özel yapılar da bulunan 2n kromozomlu sperm ana hücrelerinden oluşur. Bu hücrelere **spermatogonyum** denir. Spermatogonyumlar, erkeklerde ergenlik öncesi dönemde mitoz bölünmeyle çoğalır. Mitozla yeni spermatogonyumların oluşması ergenlik sonrasında da devam eder. Spermatogonyumlar büyüyünce mayoza hazırlanır ve bu aşamada olan hücrelere birinci spermatosit denir. Mayoz I sonunda, 2n kromozomlu (diploid hücre) spermatositlerden n kromozomlu (haploid hücre) ikinci spermatositler meydana gelir. İkinci spermatosit mayoz II sonunda n kromozomlu spermatit adlı hücreleri oluşturur.

Spermatogenez sırasında oluşan hücreler, eşit miktarda sitoplazma ve kromozom sayısına sahiptir. Spermatogenezde dölleme yeteneğine sahip 4 sperm oluşurken, oogenezde dölleme yeteneğine sahip 1 yumurta oluşturmaktadır. Sağlıklı erkek bireylerde spermatogenez ergenlik dönemi ile başlar ve yaşamın sonuna kadar devam eder (Şekil 7).



Şekil 2. 7 Erkek üreme sisteminde spermatogenez olayı

Spermiogenez: Mayoz sonrası oluşan spermatitlerin olgun erkek germ hücresi olan spermatozoonlara dönüşmesi işlemi olarak tanımlamaktadır. Spermiogenez süresince üreme hücreleri hem dölleme kabiliyetini kazanırlar hem de spermilerin hareket yeteneğini sağlayan kuyruk gelişir. Tüm bu fazlar sırasında sperm öncülü hücreler seminifer epitelinin derinliklerinden yüzeye yani seminifer tübüllerin iç boşluğuna doğru ilerler. Testis dokusu içindeki spermatozoa hücreleri hareketli değildir ve dölleme yetenekleri yoktur. Bu yeteneği epididim içerisinde ilerlerken bir olgunlaşma süreci (20 günlük bir süreç) sonunda kazanırlar. Epididim yaklaşık 3-4 metre uzunluğunda kıvrımlı bir dokudur. Spermilerin hareket yeteneğini kazanmalarının yanı sıra epididim bir çeşit rezervuar görevi görür. Epididimde bekleyen spermier yaklaşık 35 santimetre uzunluğundaki vas deferens adı verilen yine boru şeklinde bir yapı ile pelvise ulaşırlar. Olgunlaşan spermier epididimisten vas deferens denilen sperm kanalına geçer. Vas deferens kanalı idrar kesesi üzerinden dolanarak spermier üretraya taşır. Buradan ejakulatuar kanala açılarak erkek orgazmı sırasında prostat sıvısı ile karışarak penis ucundan dışarıya atılır.

Genel olarak spermlerin oluşumundan dış ortama atılincaya kadar izlediği yol:

Seminifer tüpçükleri →Epididimis→ Vasdeferens → Üretra→ Penis→ Dış orta

Spermatogonyumdan hareketli sperm oluşuncaya kadar geçen zaman 65-75 gündür. Yetişkin erkeklerde her gün yaklaşık 3 milyon spermatogonyum bu sürece başlamaktadır.

2.2.3 Sperm ve Oksidatif Stres

Sperm hücreleri üzerinde olumsuz etkilere sahip olan oksidatif stres (OS), reaktif oksijen türleri (ROS) ve diğer serbest radikal seviyelerinin artışından veya antioksidan düzeyindeki azalmadan kaynaklanır. Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki hassas denge bozulmaya başladığında OS oluşur. ROS çoğunlukla, yarılanma süresi kısa ve oldukça reaktif maddelerdir. Yapısında oksijen, nitrojen ve diğer organik bileşikleri içeren moleküller ile demir ve bakır gibi geçiş metal iyonları içeren moleküllerden köken alan serbest radikal olarakta tanımlanan ROS'un; süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), lipit peroksil ($LOO^{\cdot}$), ve alkoksil ($RO^{\cdot}$) sıklıkla karşılaşılan örnekleridir. Serbest radikaller en az eşleşmeyen bir valans elektronuna sahipler. Onların eşlenmemiş elektronları, diğer bileşiklerden aldıkları bir elektronla eşleşir ve oksidasyona neden olurlar. Serbest radikaller, aslında radikal olmayan ve yüksek oksidatif yeteneği olan moleküllerden radikal zincir reaksiyonları sonucunda oluşurlar [21].

Hücreler ve organizmalarda ROS ve antioksidanlar, oksidasyon redüksiyon süreçleri ile ilişkilidir ve hücrenin redoks (veya oksidatif) durumunun değişmesine sebep olur. Bu değişim çeşitli protein sinyallerinin aktif veya inhibe olmasına ve sinyalizasyon yönünün değişmesine sebep olur. Bir oksidatif ortam, apoptoz veya nekroz ile hücre tahribine yol açabilir ve bir redoks, hücrenin hayatta kalmasını sağlar [22, 23].

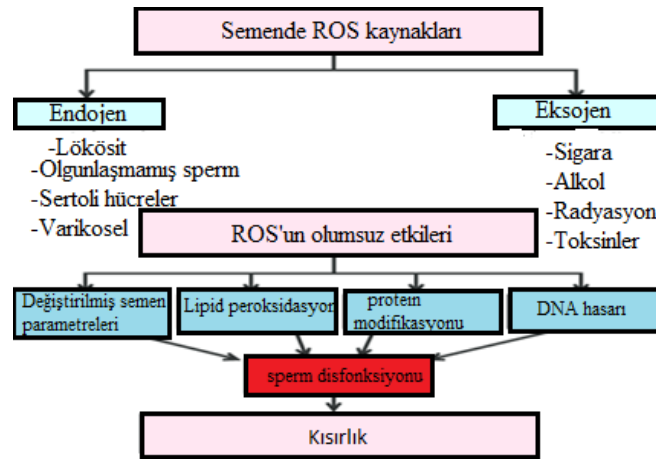
Semendeki ROS, hem içsel (endojen) hem dışsal (eksojen) faktörlerden kaynaklanır. Enflamasyon ve enfeksiyon sonucu ortaya çıkan aktif lökositler (polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar), en önemli iç kaynakları oluşturur. ROS'un başka önemli kaynaklarından biri, anormal baş morfolojisine ve sitoplazmik korumaya (retention)

sahip immatür (olgunlaşmamış) spermatozoidlerdir. Spermatogenez sonucu olarak hasar görmüş, yetersiz veya anormal sperm, aşırı ROS'a yol açabilirler.

Seminifer tubüllerin duvarında bulunan sertoli hücrelerinin, ROS üretme kabiliyetine sahip olduğu literatürde yer almaktadır. Varikozel hastalığı, kriptorşidizm, testis torsiyonu ve yaşlanma ROS'un diğer intrinsik kaynaklı etyolojisi arasındadır [24, 25]. Sigara içmek, alkol tüketimi, radyasyona maruz kalmak ve diğer çevresel toksinler testiküler ve seminal ROS seviyesinde artışa sebep olan dış kaynaklar arasında yer almaktadır(Şekil 7).

Redüksiyon ve oksidasyon arasındaki hassas dengenin sperm üzerindeki etkileri;

- Olgunlaşan sperm hücrelerinde epididimal transit sırasında kromatin sıkışması,
- Kapasitasyon,
- Aşırı aktivasyon,
- Akrozom reaksiyonu,
- Sperm-oosit füzyonu,
- Başarılı gübreleme.



Şekil 2. 8 Erkek üreme sisteminde spermatogenez olayı

ROS seviyesindeki artış, sperm yapısını ve işlevselliğini (Motilite, morfoloji, sayım ve canlılığı) etkilediğinden erkek faktörlü infertilite etiyolojisinde önemli rol oynar [26-28]. İnfertil erkeklerdeki yüksek ROS, DNA hasarı ve zayıf kromatin paketlenmesini beraberinde getirir. Sperm DNA hasarı döllenme ve implantasyon oranlarının azalmasına, hasarlı embriyonik gelişime, düşük/gebelik kaybının artmasına ve doğum kusurlarının ortaya çıkmasına sebep olur. ROS, baz modifikasyonu ile (özellikle guanin) sperm mitokondri veya çekirdek DNA'sını etkiler. Özellikle fosfodiester bağlarında kırılmalar, abazik bölgeler, nokta mutasyonlar, polimorfizmler, delesyonlar, translokasyonlar ve kromatin çapraz bağlantıları (cross-links) ve rekombinasyonlara sebep olabilir [1, 6].

Spermin sıkışık ve organize kromatin yapısı onu oksidatif hasardan koruyan önemli mekanizmalardandır, ancak sıkıştırma ve kromatin paketlenmesi yetersiz olunca sperm DNA'sı ROS'a karşı savunmasız kalır. Apoptoza sebep olan önemli faktörlerden biri olan DNA hasarı, daha fazla sperm hasarına ve erkek faktörlü idiyopatik infertiliteye yol açar [5, 28]. Ayrıca sperm plazma membranı, doymamış yağ asitleri içerdiğinden bunlar ROS saldırısına karşı son derece duyarlıdır. Oksidatif strese maruz kalmış hücrelerdeki DNA hasarı, nitelikli ve muhtemelen hasar görmüş bir plazma membranının oluşumuna neden olurken bu durum döllenme yeteneğini azaltır[29].

Özet olarak ROS'un aşırı üretilmesi OS'e sebep olmakta ve OS spermin morfolojik bozulması, sayısı ve hareketliliğinde azalma ile ilişkilidir. Böylece OS sperm kalite değerlemesinde bir biyolojik belirteç (Biomarker) olarak kullanılmaktadır. Erkek infertilitesindeki patogenezinde, OS'in rolu heterojen yöntemler ile kısmen açıklanabilir. Bu testler genel olarak yeteneklerine göre ROS'un doğrudan veya dolaylı ölçümüne göre iki kategoriye ayrılmıştır.

Doğrudan ROS analizi:

- En çok kullanılan yöntemlerdir.
- Kemilüminesan ROS analizi, luminol ve oksitleyici bileşikler arasındaki reaksiyon olarak tanımlanır ve bir renk değişimine dayanmaktadır. Zayıf ROS aktivitesine sahip semen örneklerini saptamak için kullanılır [30, 31].

- Post hoc hasar analizi; Malondialdehyde (MDA) varlığını tespit eden en sıklıkla kullanılan dolaylı yöntemdir. Analiz sonucu elde edilen değer lipid peroksidasyonunun aşırı OS'den oluştuğunun bir göstergesidir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından en yakın lipidler üzerine yapılan hasarın ölçümüdür. Lipit peroksidasyonun bir yan ürününün (yani MDA) varlığıyla temsil edilmektedir. Ayrıca MDA mutajenik bir bileşendir ve MDA dayalı analizlerde semen örneklerindeki DNA hasarının göstergesi olarak da kabul edilir.
- ROS-TAC analiz değeri; İnfertil ve fertil erkeklerin, sadece ROS veya sadece TAC analizlerine göre daha iyi ayırt edilmesini sağlayan istatistiki değerlendirmesinde yer aldığı bir analizdir. Gebelik oluşturma potansiyeline sahip spermi olan infertil erkekler bu kabiliyete sahip olmayanlara göre daha yüksek ROS-TAC değerine sahiptir. Semende aşırı ROS konsantrasyonu enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar (total antioksidan kapasite =TAC) ile nötrlenmeye çalışılır. Aşırı ROS üretiminde, ROS üretimi ve TAC dengesi bozulabilir ve sonuçta oksidatif stres oluşur. ROS-TAC değeri, seminal OS'nin bir göstergesi olarak; seminal ROS ve seminal plazma TAC değerlerinin hesaplandığı bir analizdir [27]. Bu nedenle verimli ve kısır erkeklerin fertilité değerlendirmesinde ROS-TAC analizi, sadece ROS ve ya sadece TAC değeriye göre daha çok tercih edilmektedir [30, 31]

Dolaylı ROS analizi :

Antioksidan düzeylerinin değerlendirmesiyle dolaylı olarak ROS hakkında bilgi veren yöntemlerdir.

- TAC (total antioksidan kapasite) testi, semen içinde bulunan antioksidanların kümülatif etkisini değerilemek amacıyla kullanılan analizdir. Spesifik veya spesifik olmayan mekanizmalarla, serbest radikallerin temizlenmesiyle gerçekleştirilmektedir. TAC seviyeleri, zayıf ve kaliteli semen örneğini ayırt etmek için kullanılır.

Bu geleneksel OS ölçme yöntemi, yararlı olmasına rağmen zamana duyarlı ve uygulaması zaman alan bir yöntem olduğundan rutin teşhislerde kullanımı zordur.

Ayrıca uygulama sırasında yüksek miktarda örnek hacmi gerekir ve gerçekleştirilmesi için yaklaşık 45 dakika gerekir. Bu nedenle OS ölçmesi için semen yaşından bağımsız ve gerçek zamanda sonuçlanan bir metot gerekmektedir [27, 30, 31]. Bu nedenle son yıllarda OS ölçümü için, semen yaşından bağımsız ve gerçek zamanda sonuç veren elektron galvanostatik ölçüme dayalı MiOXSYS Sistemi geliştirilmiştir. MiOXSYS Sisteminden elde edilen veriler, statik olarak oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki pasif veya aktif olguya göre, statik ORP ölçü (sORP) ile sunulmaktadır. MiOXSYS analizöründe elektron aktivitesi milivolts (MV) olarak ölçülür. Tüm süreç 2 dakika sürer ve ihtiyaç duyulan tek hazırlık, semen örneğin sıvılaşmasıdır. Yüksek sORP değerleri, yüksek oksidatif stres durumudur [32] Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 1930 yılından günümüze redoks dengesinin bir göstergesi ve ölçüm aracı olarak ORP= oksidatif redüksiyon potansiyeli kullanılmaktadır. ORP, biyolojik örneklerde OS veya redoks dengesizliğinin doğrudan bir ölçümüdür. ORP ile oksidanlar-antioksidanlar arasındaki ilişkinin ölçümünden OS değerlendirilmesi sağlanır. Yüksek ORP değerleri, oksidan aktiviteleri antioksidanlara göre dengesizliğin varlığını gösterir. Dolayısıyla indüklenen OS derecesi erkek faktörlü infertilitenin ayırt edilmesinde yararlıdır. Uzmanlar tarafından gerçekleştirilecek ORP ölçümü ile oksidatif stresi azaltacak tedavinin fayda sağlayabileceği adaylar belirlenebilir. Literatürdeki çelişkili verilere rağmen birçok ürolog, varikoseli olan veya olmayan subfertil erkeklerde oral antioksidan tedavisini uygulamaktadır. Oral antioksidan tedavinin temel stratejisi, oksidatif stresi azaltarak fertilitede neden olduğu olumsuzlukları azaltmaktır. Bu tedavinin amacı seminal antioksidan eksikliğinin giderilmesi ve antioksidanla ilgili ciddi yan etkilerin azaltılmasıdır. İdeal olarak, bir oral antioksidan tedavisinde üreme sisteminde antioksidan seviyesinin yükselmesi sağlanarak spermatogenezdeki hareketlik ve morfoloji gibi önemli özelliklerin iyileşmesi amaçlanır. Tedavi ayrıca seminal plazmanın temizleme kabiliyetini artırır ve seminal ROS seviyesini azaltır. E, C, A, B kompleks vitaminler, koenzim Q10 (CoQ10), ubikinol, glutatyon, l-karnitin, laktoferrin, β -karoten, likopen, pantotenik asit, α -lipoik asit, N-asetil-sistein, selenyum, çinko, bakır içeren supplementler v.b ağız yoluyla antioksidan tedavi için kullanılan önemli ürünlerdir. Bunların kullanımı ile ROS'un azaltılabildiği literatürde gösterilmiştir [29, 33, 34].

2.2.4 Sperm ve Genomik Hasarlar

Genomda meydana gelebilen kalıtsal değişiklikler bireyin sağlıklı sperm üretme ve üreme potansiyelini ciddi olarak etkiler. Bu değişiklikler kromozomal düzeydeki bozukluklar ve gen mutasyonları olmak üzere ikiye ayrılır.

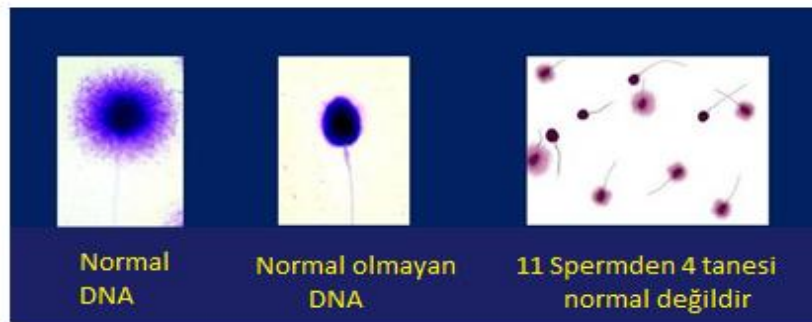
i) Kromozomal bozukluklar, kromozomların yapısında ve sayısında meydana gelen değişimleri ifade eder. Kromozomlardaki sayısal bozukluklar (Öploid- Anöploidi), kromozom sayısının normalden fazla ya da az sayıda olmasından kaynaklanır. Kromozomlardaki yapı bozuklukları ise, DNA parçalarının genom içinde bir yerden başka bir yere taşınması şeklinde tanımlanabilir. En çok görülenleri; delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyondur.

ii) Gen mutasyonları, kromozomların yapısında ya da sayısında herhangi bir değişiklik olmadan, gen bölgesinde değişiklik meydana gelmesi durumudur. DNA zincirindeki bir bazın (A, T, G, C) başka bir bazla yer değiştirmesi sonucunda ortaya çıkabileceği gibi, zincire bir ya da daha çok bazın eklenmesi veya zincirdeki bazların eksilmesi sonucunda da ortaya çıkabilir.

Mutasyonlar kalıtım şekline göre de, germ hattı mutasyonları ve somatik mutasyonlar olarak ikiye ayrılır. Germ hattı mutasyonları gelecek nesillere aktarıldıklarından evrim için önemlidir. Ancak somatik mutasyonlar ortaya çıktığı organizmalar üzerinde etkilere sahiptirler ve gelecek nesillere aktarılmazlar [35].

Memeli hayvanlardaki sperm DNA'sı, yapısal olarak somatik hücrelerin DNA'sından farklıdır. Oldukça organize bir ünite olan spermin yapısal ve işlevsel bütünlüğü çok benzersiz bir paketleme sistemi yardımıyla oluşmaktadır. İnsan sperm DNA'sının kıvrılması spesifik proteinler (protaminler) aracılığı ile yüksek derecede yoğunlaştırılmıştır. Dolayısıyla sperm genomunda histonlar yerine fonksiyon gören protaminler, yoğunlaşma ve gevşeme üzerine kontrol sağlamaktadır. Embriyonun belirli gelişme evrelerinde, DNA dekompresif (gevşeme) olur ve protein sentezi gerçekleşir. Ancak DNA, olumsuz koşullardan etkilenmemek için yani hasardan korunmak için sıkıştırılmalı/paketlenmelidir. Bu denge DNA'nın yapısal düzenlenmesi ile senkronize edilmektedir.

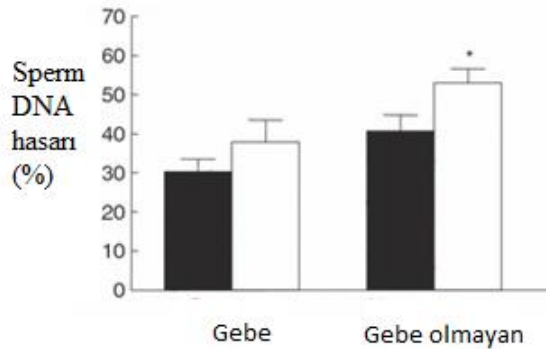
Embriyogeneziste sperm genomu, genetik bilginin doğru bir şekilde iletilmesinden ve sperm kalitesinden sorumludur. İnsan sperm DNA hasarları, üremeyi olumsuz olarak etkileyerek erkeklerde infertiliteye sebep olabilmektedir. Birçok çalışmada, yüksek sperm DNA hasarına sahip olgularda, doğurganlığın önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. İnsan somatik hücrelerindeki genom, anne-babadan kalıtılır ve sperm/yumurta aracılığıyla mayoz bölünme ile haploid sayıda yavru hücrelere aktarılır. Diğer bir ifadeyle, insandaki toplam 46 kromozomlu germ hücresi mayoz bölünme ile yarıya indirilerek 23 kromozomlu sperm veya yumurta hücresini oluşturur ve döllenme ile oluşan zigotta yeniden 46 kromozoma ulaşarak yeni yavru birey meydana getirilir. Ancak bazen kök hücrelerdeki kromozomlarda yapısal veya sayısal bir hasar olmamasına rağmen üretilen spermde mayoz bölünmeden kaynaklı bir hata nedeniyle anormal kromozom sayısına sahip bir sperm oluşabilir. Bu spermle döllenmiş yumurtadan oluşan zigot genetik olarak anormal bir embriyo oluşturur. Bu tür olgularda gebelik genellikle gebeliğin ilk 3 ayında düşükle/kayıpla sonlanmaktadır [36].



Şekil 2. 9 Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü

Embriyogenezis bakış açısıyla spermin asıl fonksiyonu erkeğe ait genetik materyalin oosite aktarılmasıdır. Bu nedenle Tüp bebek merkezleri/Üroloji kliniklerinde gerçekleştirilen rutin semen analizinde; konsantrasyon, motilite ve morfoloji gibi testler, temel test parametreleri olarak kullanılırken, sperm kalitesinin belirlenmesinde DNA hasarının analizi infertilite olgusunun daha ayrıntılı değerlendirilmesini sağlar (Şekil 8). Sperm DNA hasarının niteliğinin belirlenmesi, gelecek nesillerin daha sağlıklı ve fertil bireylerden oluşması açısından önem arz

etmektedir. Ayrıca sperm DNA hasarının tespit edilmesi, ilgili merkezlerde kullanılan yardımcı gebelik yöntemlerinin de doğru seçilmesini sağlayacaktır (Şekil 9) [8, 36].



Şekil 2. 10 Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü

*Siyah kolonlar, IVF(in vitro fertilizasyon); dölleme ve beyaz sütunlar ICSI (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu) dölleme göstergesidir)

Anormal sperm genomunun oosite aktarılması, erken doğum veya majör-minör konjenital malformasyonu olan bireylerin doğmasına ve hatta kansere neden olabilmektedir. Hasarlı sperm DNA'sına sahip ancak semen analiz parametreleri açısından normal idiopatik infertil erkekler ile anormal idiopatik infertil erkek yüzdeleri karşılaştırıldığında; her iki grupta da sperm DNA hasar oranı fertil erkeklere göre çok daha yüksektir. Bu nedenle standart semen analiz parametreleri (SSP) fonksiyonel sperm yeterliliği için düşük belirteçler olarak düşünülmektedir. Bazı in vitro ve in vivo çalışmalara göre sperm DNA bütünlüğü ve fertilité arasında negatif korelasyon bulunmaktadır. DNA hasarı, embriyo gelişim ve implantasyonda yetersizliğe sebep olur [37, 38]. 2010 yılında Shamsi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmaya göre gebelik kaybı görülen çiftlerde %47,7 sperm DNA hasarının var olduğu, semen analizinde yüksek oranda anormalliklerin gözlemlendiği infertil erkeklerde % 40,06 sperm DNA hasarıyla karşılaşıldığı tespit edilmiştir [39].

Ayrıca bu bireylerdeki kemilüminesans ROS analizi ile yüksek seviyede serbest radikallerin mevcudiyeti bildirilmiştir. DNA hasarı oluşmasında önemli bir faktör olan serbest radikallerin yüksek miktarlarda üretildiği erkeklerde; erken teşhis ve hızlı antioksidan tedavisinin, yardımcı üreme tekniklerinin uygulanmasından önce son derece faydalı olacağı düşünülmektedir. Spermiyogenez esnasında kromatinin

yeniden yapılandırılması, sperm DNA onarım kapasitesi sınırlı olduğundan ve spermdeki kromatin transkripsiyon ve translasyonu inaktif olduğundan mümkün değildir. DNA'daki delesyonlar ve kırılmalar oosite doğrudan aktarılır [11].

Sperm DNA hasarının etiyojisi çok faktörlüdür ve çoğunlukla aşağıda kısaca listelenmiş iç ve dış faktörlerden kaynaklanabilmektedir [12]:

- Anormal kromatin paketlenmesi veya defektif apoptoz
- Aşırı ROS üretimi
- Azalmış seminal antioksidanlar
- Uyuşturucu, kirlilik, sigara gibi olumsuz çevresel faktörler
- Yüksek ateş ve yüksek testiküler sıcaklık,
- Ksenobiyotikler,
- Varikosel ve ileri yaş

Kısırlık sorunu yaşayan erkeklerden, ileri yaşta olanlar ve özgeçmişinde benzer olgu taşıyan bireylerin sperm kalitesi ve DNA'sında hasar varlığı tespit edilmiştir [40, 41].

Sperm hücrelerinde görülen DNA hasarının oluşum mekanizmaları tam olarak bilinmese de üzerinde durulan üç temel mekanizma; sperm kromatin paketlenmesinde ortaya çıkan hasar, başarısız apoptozis ve oksidatif stresdir [22, 42, 43].

Sperm kromatin paketlenmesi; Kromatin paketlenme kalitesindeki anormallikler spermiogenez sırasında meydana gelen nükleoprotein bileşenleri modifikasyonlarından kaynaklanır. Temel olarak protaminler histonlarla yer değiştirir sonrasında sistein ve protamin molekülünün arasında kurulan intra ve intermoleküler disülfid bağları ile yapı stabilize olmaktadır. Literatürde sperm kromatin paketlenmesinin sağlıklı bir döllenme için sperm seçiminde önemli bir etken olduğu bildirilmiştir [44, 45]. Memeli sperm hücrelerinin kromatin yapı değerlendirmesinde anilin mavisi, metil yeşil, etidyum bromür, akridin turuncusu gibi boya ve florokromlar kullanılmaktadır [46]. Bu boyaların bağlanma kapasitesinin kromatin paketleme kalitesindeki anormallikleri yansıtmaktadır.

Apoptoz: infertil erkeklerin spermalarında görülen DNA fragmentasyonu nedeniyle oluşan programlanmış hücre ölümüdür [47]. Apoptoz, biyokimyasal ve morfolojik modifikasyonlar sonucu gerçekleşen hücre programlanmış bir süreçtir. Bu süreçte inflamasyona neden olmadan hücre makrofajlar tarafından yok edilir. Hücre içeriği sızmadan ve çevreleyen hücrelere zarar vermeden yani nekroz oluşmadan doğrudan ölmekte olan hücrenin bileşenleri immun sistem elemanları tarafından fagosit edilir. Dolayısıyla, apoptozis yoğunluğunun sperm kalitesinde azalma ile ilişkili olduğu bilinmektedir [48]. Ayrıca hücre reseptörleri aracılığıyla iç (mitokondriyal) ve dış nedenler sonucu iki farklı mekanizma ile oluşan apoptozis ile erkek infertilitesi arasında anlamlı bir ilişki vardır. Olgun olmayan testislerde, daha fazla apoptoz gerçekleşir. Semen analiz sonuçları infertilitenin net bir göstergesini oluşturmadığından ve infertil çiftlerin %30-40'ında kaynağın erkek olmasından dolayı, sperm yapısı-işlevi konusunda daha doğru bir tahmin verebilecek yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır [49]. Bu amaçla; sperm konsantrasyonu ve doğurganlığı etkileyen apoptoz, erkek fertilitesi için güçlü ve yararlı bir endekstir [48, 49].

- i) **Oksidatif stresin DNA hasarına etkisi:** İç faktörlere bağlı nedenlerden kaynaklanan ROS'un sperm DNA'sı üzerinde olumsuz etkilerinin dış nedenlerden kaynaklanana göre daha fazla olduğu literatürde gösterilmiştir. Bu durum antioksidan kapasiteye sahip spermaların dış kaynaklı ROS'u bertaraf etmesine bağlı olarak oluşmuş olabilir. Ancak yetersiz antioksidan kapasiteye sahip olunması durumunda oksidatif stres, DNA hasarına neden olabilmektedir. Dolayısıyla dış faktörlerden kaynaklanan ROS tarafından indüklenen DNA hasarı, diyet ve in vitro antioksidan takviyesi ile azaltılabilmektedir. Normal metabolizmanın ürünü olarak ortaya çıkan ROS'un bütünüyle hücreden bertarafı istenilen bir durum değildir, çünkü sperm işlevini olumsuz etkileyebilmektedir. İç faktörlerden kaynaklanan ROS, hücrede belirli bir seviyeye kadar fizyolojik olgunlaşmada, kapasiteyi ve sperm hiperaktivasyonunda önemlidir. Apoptoz sürecinden kaynaklanan bir ürün olması oksidatif stres ile apoptoz arasındaki ilişkinin temelidir.

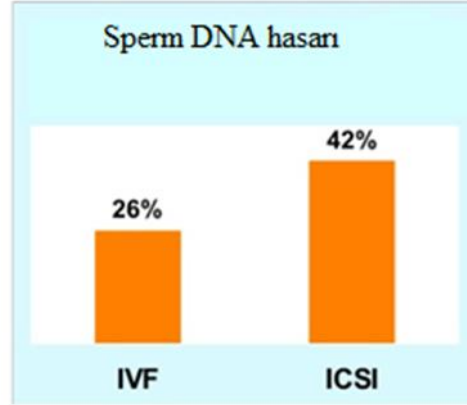
Yüksek sperm DNA hasar sonuçları;

- Embriyo tutunma başarısında azalma ve düşük yapma olasılığında artış,
- Blastokist gelişim yetersizliği,
- Semen analiz parametrelerinde anormal sapmalar,

şeklinde sayılabilir.

Sperm DNA bütünlük kaybı, spermatogonyal germ hücrelerinin transformasyonundan sperm ejakulat seviyesine kadar herhangi bir aşamada ortaya çıkabilmektedir. Dolayısıyla DNA hasarı; testis sperminde, epididimal spermden veya ejakulat sperminde ortaya çıkabilmektedir[50]. Sperm DNA bütünlüğü, infertilite prognozunda (Şekil 10) ve yardımcı üreme prosedürleri açısından sperm kalitesinin önemli bir parametresi olarak bilinmektedir (Şekil 11). Temel androloji laboratuvarında sperm kalite değerlendirilmesi DSÖ yönergelerine dayanmaktadır. DSÖ kılavuzlarına göre fertil ve infertil erkeklerin semen analizleri karşılaştırıldığında, infertil erkeklerin yaklaşık % 15'i normal bir spermograma sahiptir ve bu sebeple üreme sonuçlarının zayıf belirleyicisi olarak tanımlanmaktadır. Dolayısıyla rutin semen analizi, bazı sperm ve testis fonksiyonlarını açıklayabilirken sperm DNA bütünlüğü hakkında yeterli bilgi sunmamaktadır [37, 38]. Literatürde yer alan ilgili çalışmalarda DNA bütünlüğünün, spermin fonksiyonel yeterliliğini açısından önemli bir faktör olduğu belirtilmektedir. Bu sebeple araştırma ve geliştirme (Ar-Ge) laboratuvarlarında sperm DNA hasarı değerlendirilmesi için birçok test geliştirilmiş ve uygulanmaktadır. Ancak günümüzde çok az androloji laboratuvarında DNA bütünlüğü, rutin semen analizin bir parçası olarak yer almaktadır. Ek olarak sperm DNA hasarının tespitine yönelik araştırmalar, doğum öncesi ve sonrası aşamalarda süreci etkilediğinden yardımcı üreme teknolojisi kullanan hastalarda son derece önemlidir (Şekil 10) [36]. Özellikle tüp bebek tedavisi uygulanan bireylerde, seçilmiş spermle yumurta döllenip elde edilen embriyolar gelişim kalitesine göre değerlendirildikten sonra anne adayının rahmine yerleştirilir. Ancak spermden yüksek oranda DNA hasarı varlığında dengesiz genetik yapıya sahip bir embriyo oluşma ihtimali arttığından tedavide beklenen başarı sağlanamayabilmekte, veya gebeliğin erken dönemde düşük ile sonuçlanmasına sebep olabilmektedir. İşte bu sebeple tüp bebek tedavi teknolojisinde sperm DNA

Hasar Testleri uygulamaya konulmuştur [9]. Literatür çalışmalarına göre anormal sperm parametrelerine sahip subfertil erkeklerde sperm DNA hasarı daha yüksektir [37, 50]



Şekil 2. 11 Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü

Sperm DNA hasarının tespitine yönelik geliştirilen çeşitli testler genel olarak iki gruba ayrılır;

➤ Özellikle DNA zincir kırıkları olmak üzere DNA üzerinde meydana gelen hasarların doğrudan tespitini sağlayan ve spesifik prob dizaynı temeline bağlı teknikler: İlgili problardan elde edilen sinyaller, spermdeki DNA hasarının kantitatif tespitini sağlamaktadır. Terminal deoksinnükleotidil transferaz aracılı dUTP kırık sonu etiketleme analizi (TUNEL) ve In Situ Nick Translated (ISNT) bu kategoride değerlendirilen iki metottur [13].

➤ Belirli koşullar altında denatürasyonu kolaylaştırmak için hasarlı DNA'nın özelliklerinin kullanıldığı teknikler. Metot olarak yapısında kırık ihtiva eden DNA, çift zincirli DNA'dan daha kolay denatüre olduğundan bu yaklaşım temel alınarak çift zincirli DNA'nın tek zincirli DNA formuna dönüştürülmesi yani denatürasyona duyarlılığının ölçümü amaçlı kullanılır. Sperm kromatin dispersiyon testi (SCD), Tek hücre jel elektroforezi (SCGE) veya Sperm kromatin yapı analizi (SCSA), akridin turuncu boyama yöntemleri bu temela dayalı ve DNA hasarının kantitatif ölçüldüğü yöntemlerdir [14].

Sperm DNA hasarı testlerini;

- ✓ Tekrarlayan gebelik kaybı,

- ✓ Açıklanamayan kısırlık olguları,
- ✓ Embriyo gelişimi yavaş olan çiftler,
- ✓ Anormal embriyo gelişimi olan hastalar,
- ✓ Tekrarlayan Tüp bebek (IVF/ICSI) başarısızlığı olan bireyler,
- ✓ Oligoastenoteratozoospermi ve ciddi teratozoospermia tespit edilen hastalara

uygulanabilir.

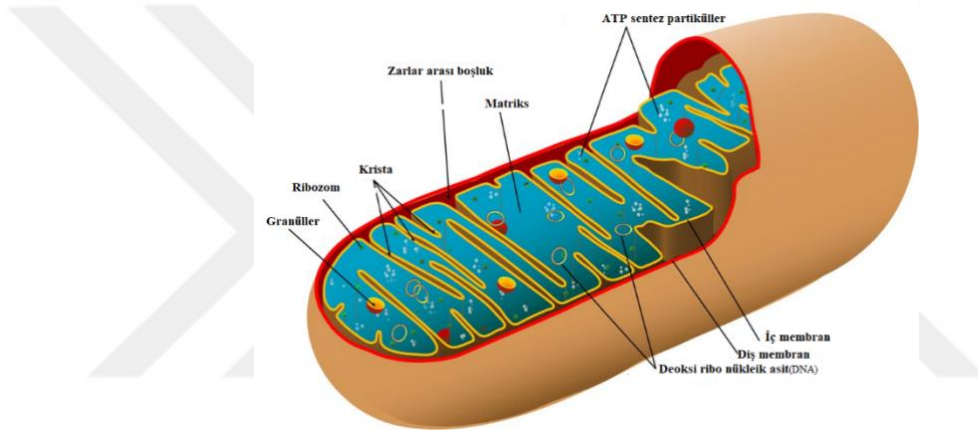
2.2.5 Mitokondriyal DNA (mtDNA) ve Etkileri

Hücre organellerinden biri olan mitokondri, ATP üretiminden sorumlu olan enerji üretim merkezidir. Hücrede bulunan mitokondri sayısı 8'den 2500'e kadar değişebilir. Mitokondri organeli kendine ait DNA, RNA ve ribozomları içerdiğinden bölünme ve çoğalma yeteneğine sahiptir. Çift katlı bir zar ile çevrilmiş organel, iç membranın mitokondri içine doğru kıvrımlar yaparak oluşturduğu "Krista" yapısına sahiptir. Kristalar vasıtasıyla mitokondri, iç yüzey alanını artırır (Şekil 11).

Mitokondride enerji üretimi oksidatif fosforilasyon (solunum) mekanizması ile kristalar üzerinde yerleşmiş enzimler tarafından sağlanır. İç kısmı dolduran matriks ise sitrik asit döngüsü ve organik madde oksidasyonunda görevli olan enzimlerin bulunduğu ve fonksiyon gösterdiği bölümdür [51].

Döllenme sırasında sperm hücreleri, flagella hareketleri için büyük miktarda enerji tüketir. Bu enerjiyi sağlamak için hızlı ve etkili bir enerji deposu gerektirmektedir [52]. Olgun bir spermin boynunda, enerjiyi üreten yaklaşık 100 mitokondri bulunmaktadır. Sperm hareketliliği için gereken enerjinin kaynağını mitokondrideki oksidatif fosforilasyon mekanizması ve beraberinde ATP oluşturur. ATP, insan hücrelerinin büyüme, farklılaşma, çeşitli fizyolojik fonksiyonlarında ve hücresel homeostazda en önemli kaynaktır. Glikoliz, sitrik asit döngüsü, β oksidasyon biyokimyasal yolları; solunum zincirine aktarılmak üzere indirgeyici özellikte NADH'dan üretilmektedir. ETS'de (Elektron Taşıma Sistemi), NADH'den oksijen molekülüne elektron taşınımı, serbest enerji oluşumuyla sonuçlanır ve oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretilir.

Kimyasal ETS inhibitörlerinin mitokondride yüksek ROS' a sebep oldukları, aynı zamanda piruvat ve süksinat gibi kompleks II substratların eklenmesiyle sperm hareketliliğinde de artışa neden oldukları gösterilmiştir [53]. Aynı zamanda bu çalışmalarda sperm hareketliği ve oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi arasında korelasyon olduğu bildirilmiştir. Oksidatif fosforilasyon kompleksleri hem mitokondriyal hem de nükleer genom tarafından kodlanmış olduğu için, onların herhangi birinde veya her ikisinde meydana gelen patojen mutasyonlar, solunum zincirinin fonksiyonunun bozulmasına ve sonucunda eksik ATP üretimine sebep olmaktadır. ATP üretiminin azalması, anormal spermatogeneze, bozulmuş farklılaşmaya, hipospermatogeneze, motilitenin azalmasına yol açabilmektedir[54].

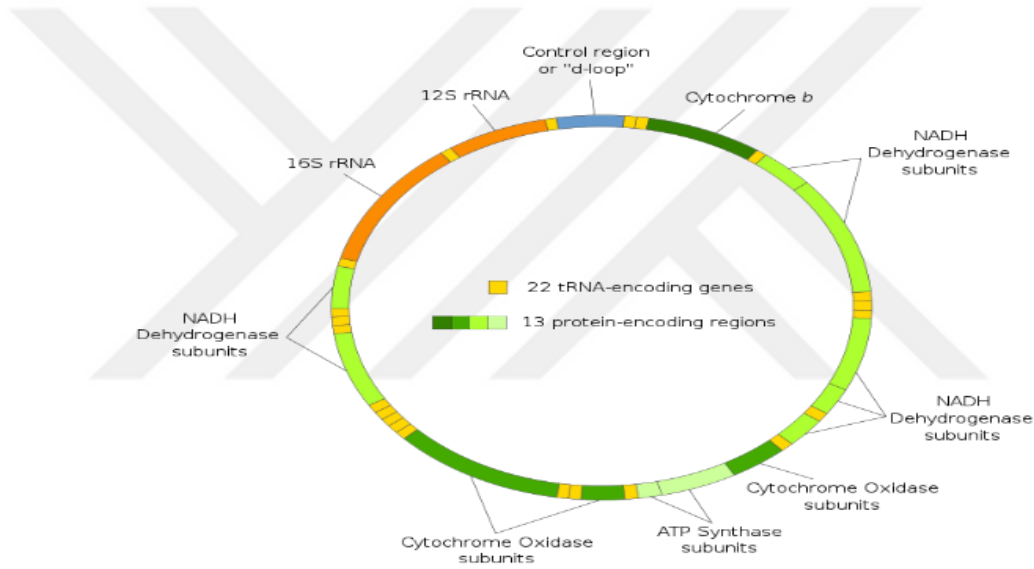


Şekil 2. 12 Spermin normal ve anormal DNA mikroskopik görüntüsü

İnsan mtDNA'sı, 16.569 çift baz içeren kapalı dairesel ve nükleus dışı bir genomdur. Mitokondri genomu ağır (H-heavy) ve hafif (L-light) iki zincirden oluşmaktadır. Guanin açısından zengin olan zincir, ağır (H) ve sitosin açısından zengin olan ise, hafif (L) olarak tanımlanır. mtDNA içinde 36 gen bulunmaktadır. Bunların, 13'ü mitokondriyal solunum ve oksidatif fosforilasyonda görevli polipeptitlerdir. 22 tanesi tRNA ve 2'si rRNA (12S ve 16S) kodlar [4, 14]. Nükleer genlerden farklı olarak, mtDNA'ında intronlar yoktur. Tüm kodlama dizileri bitişiktir (contiguous) ve çakışma (overlapping) görülmektedir. mtDNA'nın kodlama yapmayan tek kısmı D ilmeği (D-loop); H ipliği replikasyon orijini ve L-H ipliklerinin promotörlerinden oluşan 1121 bp'lik bölgedir. Diğer mitokondriyal oksidatif fosforilasyon proteinleri, metabolik enzimler, DNA ve RNA polimerazlar, ribozomal proteinler ve mtDNA'daki düzenleyici faktörlerin tamamı nükleer genler tarafından kodlanmaktadır. ATP ve ROS' un ana

kaynağı olan oksidatif fosforilasyon ünitesi mitokondrinin önemli bir parçasıdır. Enerji üretimi ile ilişkili olan oksidatif fosforilasyon ünitesi veya elektron taşıma zinciri (ETZ), 13 alt birimden oluşmaktadır. Bu 13 altbirim:

- Kompleks I (NADH-Q oksidoredüktaz),
- Kompleks II (7 alt-birimden oluşur: ND1- ND2- ND3- ND4-ND5-ND6 ve ND4L),
- Kompleks III (sitokrom b),
- Sitokrom oksidaz (3 alt birimi; COX I, COX II ve COX III),
- Kompleks IV
- Kompleks V alt birimleridir (ATPaz 6 ve ATPaz 8) (Şekil 12)[54].



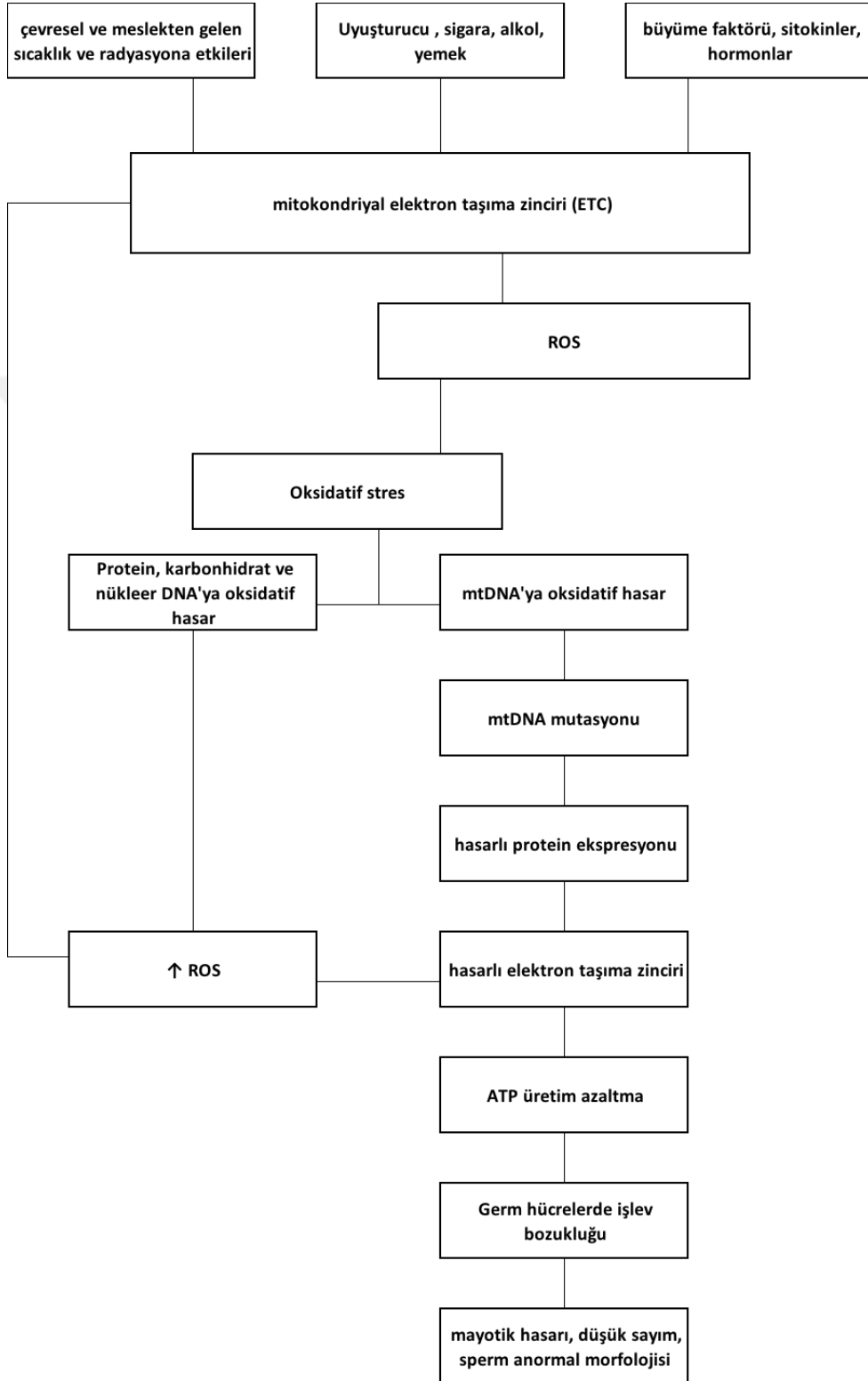
Şekil 2. 13 Sperm Mitokondri DNA yapısı

Bu protein altbirimlerinin çoğu mtDNA'sı tarafından kodlanırken, sadece kompleks II nükleer DNA tarafından kodlanır. Bu da nükleer DNA 'nın mitokondriyal işlevlerde dolaylı bir rolü olduğunu göstermektedir. Mitokondriyal DNA, ROS 'un ilk saldırı alanı olduğu için mitokondri genlerinin çoğunluğunun evrim sırasında nükleer genomu göç ettiği ve sadece babaya ait nükleer DNA'nın çocuklara aktarıldığı düşünülmektedir [54]. Nükleer DNA'nın tersine, mitokondriyal DNA histonlar tarafından korunmamaktadır. mtDNA, ROS'a karşı nükleer genomuna göre daha duyarlı olduğu için [55, 56] nükleer DNA'ya göre de yaklaşık 10-17 kat daha hızlı polimorfizm ve mutasyon birikmesi gerçekleşir [57] [14, 55, 58]. Ayrıca etkili bir tamir sisteminin olmaması ve anormal mitokondri metabolizması da süreci daha da

hızlandırabilmektedir [59]. Literatürde infertil bir erkek hastanın mitokondri DNA'sında nükleer DNA'ya göre çok daha yüksek 8-OHdG miktarı [60, 61] ve tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) rapor edilmiştir [62]. Astenozoospermi hastalarında ROS ile ilişkili birçok mtDNA mutasyonu olduğu bilinmekte ve mtDNA'sında biriken mutasyonlar heteroplazmiye sebep olmaktadır [52, 63-65]. Ayrıca idiyopatik astenozoospermik ve oligoastenozoospermik (OA) hastalıklarının önemli bir kısmında altında yatan sebebin mitokondri kaynaklı sperm hareketliliğinin eksikliği olduğu düşünülmektedir [66, 67]. Ek olarak mitokondride oluşan fonksiyon kaybı ve aşırı ROS üretiminin beraberinde getirdiği mitokondri genomundaki hasar, farklılaşan spermatogenez nedeniyle erkek infertilitesine yol açmaktadır [55]. Mitokondri disfonksiyonu, mitokondri zar potansiyeli (MMP) olarak ölçülebilir. Yüksek ROS seviyelere sahip olan infertil erkeklerde MMP miktarında azalma bildirilmiştir [67]. Bazı çalışmalarda mutant mtDNA taşıyan insan hücrelerinde; düşük solunum fonksiyonu, artan süperoksit anyonlar, hidroksil radikaller ve H₂O₂ üretimi rapor edilmiştir (Şekil 13)[53, 54]. mtDNA hasarının kalıcılığı, lipid peroksidasyonu aracılığıyla da ROS üretimini artırır. İç ve dış mitokondri membranında da yapısal bozulmalara sebebiyet veren yüksek ROS, sitokrom C'nin serbest bırakılmasına, kaspazların aktivasyonuna ve apoptoza sebep olabilmektedir [68]. mtDNA mutasyonlarının sayısındaki artış, spermin anormal morfolojiye ve yapısal bozukluklarına yol açmaktadır [5, 26].

Memelilerde spermatogenez testislerde sürekli olarak gerçekleşmektedir. Mitokondriyal solunum fonksiyonunun, sperm oluşumu sırasında gerçekleşen mayoz bölünme için gerekli olup olmadığı konusunda kesin bir literatür bilgisi olmamasına rağmen mayotik süreçte mitokondri morfolojilerinin yuvarlak hale dönüştüğü ve göreceli olarak küçüldüğü, bazı mitokondrilerin flagellanın gelişme yönüne doğru hareket ederken bazılarının grup halinde kaldıkları görülmüştür [69, 70]. Spermatogenezden sonra mitokondriler eski morfolojilerine dönerek füzyon halinde spermin orta bölümündeki (mid-piece) flagella etrafında, bükülmüş bir yapı oluşturur. Son aşamada mitokondri doğal uzun formuna döner. Sonuç olarak, spermatogenez sırasında germ hücreleri farklılaşırken mitokondrinin morfolojik olarak değişikliğe uğraması, bu sürecin ATP'den etkilendiğini göstermektedir. Buradan da

mitokondriyal genom mutasyonları ve bağlantılı hücresel solunum fonksiyon bozukluklarının, mitokondri farklılaşması ve dolayısıyla spermatogenez üzerinde negatif bir etkisinin olabileceği sonucuna varılmaktadır [71, 72].



Şekil 2. 14 Erkek infertilitesinde ROS ve mtDNA mutasyonu ilişkisi

Literatürde, germ hücrelerindeki spermatogenez sırasında, mitokondrilerin morfolojik modifikasyonların dışında sayı ve lokasyon özelliklerinin de değişikliğe uğradığı bildirilmiştir. Fertil erkeklerin gelişmiş ve gelişmememiş spermlerinde, ortalama 1000 mtDNA kopyası bulunmaktadır. Oysa sperm olgunlaşması sırasında, hücrede her kübik mikrometre başına, mtDNA sayısında 7 kat artış gerçekleştiği ve bu durumun da yüksek miktarda ATP'ye ihtiyaç duyulduğunu ve sperm fonksiyonu için mitokondrinin ne kadar önemli olduğunu göstermektedir [73]. Ensefalomiyopati hastalarının testislerinde germ hücrelerin farklılaşması sırasında spermlerde oluşan anormal mitokondri ve sertoli hücrelerinin, enerji üretiminin yetersizliğine ve buna bağlı anormal sperm oluşumuna neden olduğu raporlandırılmıştır. Son çalışmalarda solunum zincirinde görev alan genlerde meydana gelen hasarların spermatogenez sırasında mayoz bölünmeye engel olduğunu ve spermatositlerin apoptoza sürüklendiklerini göstermektedir [74].

Nükleer ve mitokondriyal genler, hücresel birçok işlevin yerine getirilmesinde birlikte çalıştıklarından dolayı, sperm kalite ve işlevindeki kayıpların sebebi araştırılırken nükleer genomdaki DNA hasarlarının yanısıra mitokondri mutasyonları da analiz edilmelidir [75]. Ancak literatürde, spermin mitokondriyal ve nükleer DNA hasar değerlendirilmesi ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır [14, 55, 58]. Erkek infertilitesinde en sık görülen mtDNA hasarları nokta mutasyonu ve delesyonlardır [52]. Düşük semen kalitesi ve miktarı, anormal sperm morfolojisi (teratozoospermi), yetersiz hareketlilik (astenozoospermi) gibi özellikler çoklu mitokondriyal DNA mutasyonları ile bağlantılıdır [75]. Annelerinden A3243G mtDNA mutasyonu miras alan erkeklerde, yüksek seviyelerde mutant mtDNA ve düşük sperm hareketi arasında korelasyon tespit edilmiştir [76]. Varikosel olmayan infertil erkekler üzerinde Hindistan'da yapılan çalışmada, sperm mtDNA'sında 9 anlamlı ve 27 sessiz mutasyon olduğu raporlandırılmıştır [77]. Ancak bu çalışmada spermlerin azalmış hareketinin mitokondrinin COXII genlerindeki 2-nükleotid delesyonu ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Hindistandaki diğer araştırmaya göre, oligo asteno teratozoospermi (OAT) hastalarında mitokondrinin ND4 geninde mutasyon varlığı tespit edilmiş ve bu mutasyonun birkaç nesil sonra mutant DNA homoplazisine sebep olduğu gösterilmiştir [78]. Kumar ve ark. tarafından 2009 yılında infertil erkek semen

örneklerinin mtDNA'sında; ATPaz 6, ATPaz 8, ND2, ND3, ND4 ve ND5 gen bölgelerinde nükleotid değişiklikleri saptanmıştır [79].

mtDNA'da artan polimorfizm, mitokondri genomunda işlev bozukluğu meydana getirmekte ve bu durum yüksek miktarda serbest radikal ve düşük seviyelerde de ATP üretimine neden olabilmektedir. İdiopatik infertilite tedavisi çoğunlukla deneysel olduğu için sperm DNA hasar analizleri, klinik doğrulama ve rutin uygulamalarda uygun tedavi seçiminde yardımcıdır. İlaveten manipülasyon riskini azaltır ve anormalliklerin doğacak çocuklara aktarılmasını engeller [80].

2.3 Erkek Kısırlığı Tayininde Kullanılan Güncel İleri Tanı Testleri

Günümüzde erkek infertilite değerlendirilmesinde ilk adım olarak rutin semen analizi kullanılıyor olsa da bireylerin yaklaşık %15'inde semen analiz sonuçları normal olduğundan infertilitenin kesin nedeni tam olarak belirlenemektedir. Düşük motilite ve anormal morfoloji bozuklarına sahip olgularda, sperm DNA hasar oranının yüksek olduğu da literatürde yer almaktadır. Ek olarak normal semen parametrelerine sahip hastaların sadece %8'inde sperm DNA hasarı gözlenmektedir.

In Vitro Fertilizasyon (IVF) veya İntrasitoplazmik Sperm İnjektasyon (ICSI) uygulamalarındaki fertilizasyon başarısının, sperm DNA hasarı tespitiyle artırılabilceği bilinmektedir. Günümüzde, DNA hasarını tespit etmek için en sık kullanılan yöntemler; Sperm Kromatin Yapı Tayini (SCSA), Akridin Turuncu Testi (AOT), Toludin Mavisi (TB), Anilin Mavisi, TUNEL, Asıl kırık Okuma Tayini (NT), Tek Hücre Jel Elektforezi (COMET), Sperm Kromatin Ayrılma Testi (SCD) ve Mitokondrial DNA Mutasyon Testi'dir. Tüm bu testler değerlendirilirken, her metodun tespit ettiği hasar tipinin aynı olup olmadığı ve her testin standart olup olmadığı göz önünde bulundurulmalıdır (Tablo 2). Dünya Sağlık Örgütünün önerisine göre bir erkeğin semen profiline karar vermek için her biri arasında 7 günden az ve 3 haftadan uzun olmamak üzere en az 2 örnek incelenmelidir ve sonuçlar arasında çok büyük farklılık olduğunda testler tekrar edilmelidir.

Çizelge 2. 2010 yılı doktora mezun sayıları

	Prensip	Yöntem	Avantaj	Dezavantaj
SCSA (Sperm Kromatin Yapı Tayini)	DNA denatürasyon una duyarlık	Akım sitometrisi	Standardize olması, duyarlığın yüksek olması	Özel ekipman gerektirir
AOT (Akridin Turuncu Testi)	DNA denatürasyon una duyarlık	Floresan Mikroskopisi	Basit ve ucuz	Kişiler arası değerlendirm e farkı ve diğer testlerle kolerasyon olmaması
TUNEL	Tek ve çift zincir kırıkları	Tek hücre elektroforezi Floresan mikroskopisi	Duyarlılığı yüksek kantitatif bir test	Zaman alıcı ve standardize olmamış
COMET	Tek ve çift zincir kırıkları	Tek hücre elektroforezi Floresan mikroskopisi	Duyarlılığı yüksek kantitatif bir test	Zaman alıcı ve standardize olmamış
Anilin Mavi Boyaması	Lizin rezidülerini ve artık histonları boyar	Parlak alan mikroskopisi	Basit ve ucuz	Labarotuvanlar arası değerlendirm e farklılıkları ve heterojen boyanma
Toluidin Mavi Boyaması	Fosfat rezidülerini boyar	Parlak alan mikroskopisi	Basit ve ucuz	Labarotuvanlar arası değerlendirm e farklılıkları ve heterojen boyanma

2.4 Mevcut Çalışmada Kullanılan İleri Tanı Testleri

2.4.1 Semen Analiz (Spermiyogram) Testi

Semen analizi (Spermiogram testi): Erkeğin üreme potansiyelini belirlemek amacıyla kullanılan başlıca testlerden biridir. Eğer erkeğin üreme potansiyeli ile ilgili herhangi bir sorunu varsa, semen analizi sayesinde nasıl bir tedavi yöntemi izleneceği ile ilgili bilgi sahibi olunabilmektedir. Sperm sayısı ve semen yoğunluğu günlük değişebildiğinden semen analizi 2-3 hafta arayla en az iki örnekte değerlendirilmelidir [19, 81].

Semen analizinde incelenen parametreler, makroskopik ve mikroskopik olarak iki gruba ayrılmaktadır:

- Makroskopik incelemede; hacim (miktar), renk, reaksiyon (pH), vizkozite, likefaksiyon değerlendirmesi yapılır.
- Mikroskopik incelemede; spermatozoa sayısı (ml başına ve total), motilite, yerinde hareketli (NP), ileri hareketli (PR) veya hareketsiz (IM), lökosit, eritrosit, canlılık, yuvarlak hücre sayısı, morfolojik değerlendirme (baş-boyun-kuyruk açısından normal % - anormal %) gerçekleştirilir.

Semen hacmi (Volüm), DSÖ kriterlerine göre 1,5-6 ml arasında olmalıdır. 6ml'den fazla olması durumu hiperspermik, 1 ml veya daha az olması ise hipospermik olarak isimlendirilir.

Semen rengi, normalde opak ve grimsidir. Ancak uzun süreli cinsel perhizlerde sarı, semende eritrositlerin bulunması halinde kırmızı-kahverengi, uzun süreli antibiyotik kullanımdan sonra renksiz görülebilmektedir.

Normal semenin PH değeri 7,2-8,0 arasında olmalıdır. Ph değeri 7'nin altında olduğu azoospermi olgularında; boşaltma kanallarının tıkanıklığı, veziküla seminalde kronik enfeksiyonlar ve idrarın semene karıştığı gibi olasılıklar düşünülmelidir. Ejakülasyon sırasında akıcı olan ve veziküla seminalis tarafından salgılanan "protein kinaz" enziminin etkisiyle, koagüle olan semen 10-30 dakika içerisinde kendiliğinden likefiye olmalıdır. Likefaksiyon süresinin uzaması gibi bir aksaklık semen viskozitesini arttırdığını

gösterir, bu da istenmeyen bir durumdur. Semen normalde hafif visközdür, ancak prostat enfeksiyonu olgusunda ve vezikülit gibi kronik enfeksiyonlarda viskozite artmış olabilir. Semende yuvarlak hücre miktarının değerlendirilmesi mikroskopik gözlem ve sayımın yanı sıra Leucoscreen testi ile gerçekleştirilmektedir. Yuvarlak hücre konsantrasyonunun 1 ml semende 1×10^6 'dan fazla olması durumunda örnek lökosperti olarak değerlendirir. Semende yuvarlak hücrelerin yüksek miktarı enfeksiyon göstergesidir. Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre lökositlerinin saptanması için peroksidaz boyama tercih edilmelidir. İnfertil erkeklerde lökositospermi insidansı %10-20 arasındadır. Semende anormal sperm morfolojisi ve lökositlerin aynı anda bulunmaları, reaktif oksijen türleri (ROS) üretiminde artış ve oksidatif stres göstergesidir [82].

Dünya Sağlık örgüt (WHO) kriterlerine göre sperm analizindeki normal değerler;

- ✓ Volüm (hacim): 1.5-6.5 ml
- ✓ Sperm konsantrasyonu: 15 milyon/ml ve üzeri
- ✓ Sperm hareketliliği: %40 ve daha fazla
- ✓ Sperm morfolojisi: %4 ve üzeri normal yapıda olmalıdır.

Sperm hareketliliği de belli bir zaman aralığında incelenir ve hareket tiplerine göre

- +4 – ileri, doğrusal ve hızlı hareketli sperm,
- +3 – ileri ve hızlı hareketli sperm,
- +2 – kendi etrafında dönen sperm,
- +1 – hareketsiz sperm,

olarak adlandırılır.

Spermiyogram testine göre semende hiç sperm olmaması “azospermi” ve sperm sayısının azlığı “oligospermi” ve hareketlilik oranında azalma “astenospermi”, yapı veya morfoloji bozukluğu için “teratospermi” sözcükleri kullanılmaktadır. Spermle ilgili tanımlamalar problemin doğasına göre “Astenoteratospermi” veya “Oligoastenoteratospermi” gibi kombine şekilde de yapılabilir.

2.4.2 sORP Testi

Oksidatif stres, erkek için önemli bir infertilite faktörüdür. Daha önceki bölümlerde de kısaca bahsedildiği üzere ROS'un fizyolojik seviyeleri spermin optimal işlevleri (Motilite, hiperaktivasyon, kapasitasyon ve akrozom reaksiyon) için gerekli olmakla birlikte ROS seviyesinde yüksek artış oksidatif stresi meydana getirir. Olgunlaşmamış spermatozoa ve seminal lökositler, aşırı ROS üretiminin önemli kaynaklarından olabilir ve anormal sperm parametrelerine yol açmaktadırlar. İnfertil erkeklerde %25-%40 oranında yüksek ROS değerleri tespit edilmektedir. Ayrıca infertil hastaların seminal plazmasında düşük antioksidan seviyesi de tespit edilmiştir.

Oksidatif stres ölçümünde, bağımsız tahlil kombinasyonu (Doğrudan ve Dolaylı) kullanılmaktadır. Rutin tanı laboratuvarlarında semen içindeki ROS miktarı kemilüminesans testler ile, seminal plazmadaki antioksidan kapasite kolorimetrik yöntemle değerlendirildikten sonra bunlardan yola çıkılarak istatistiksel olarak ROS-TAC puanı hesaplanmaktadır. Bu geleneksel seminal oksidatif stres ölçme yöntemleri yararlı olmasına rağmen, sonuçların geçen süreden etkilenmesi ve ciddi olarak zaman alması nedeniyle rutin tanı süreçlerinde kullanımı zordur. Bu yüzden, sperm yaşından bağımsız bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır.

Oksidasyon redüksiyon potansiyeli (ORP) testi, biyolojik örneklerde oksidatif stres veya redoks dengesizliğin doğrudan bir ölçümü olarak tanımlanmaktadır [30, 83]. ORP, bir antioksidan tarafından oksidana doğru elektronların transferini ölçer. ORP milivolts (MV) cinsinden ölçülür. Bu çalışmada ORP'ı ölçümü için, yeni bir galvanostat tabanlı teknoloji-MiOXSYS Sistemi kullanılmıştır. MiOXSYS Sistemi, sORP ve cORP şeklinde iki farklı türde oksidatif stres ölçümünü sağlar. Static ORP (sORP), milivolts olarak ölçülür ve biyolojik sistemdeki tüm oksidan ve antioksidanlar arasındaki mevcut dengenin entegre ölçümüdür. Kapasite rezervi ORP (Capacity reserve ORP; cORP), antioksidan kapasite miktarını micro-coulombs (μC) olarak ölçmektedir.

2.4.3 TUNEL Testi

TUNEL [Terminal Deoksinükleotidil Transferaz (TdT) aracılı Deoksiüridin Trifosfat (dUTP) nick-end etiketleme] testi ile hem tek hem de çift zincir DNA hasarları tespit edilebilmektedir. Bu yöntemde terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzimi

yardımıyla DNA zincirindeki tek veya çift kırıklar, deoksiuridine trifosphate (dUTP) ile birleşir ve bu noktalar işaretlenir. İşaretlenen noktalar; ışık mikroskopisi, floresan mikroskopisi ya da akım sitometrisi ile değerlendirilir. Serbest 3'OH uçlarının modifiye nukleotidlerle işaretlenme prensibine dayanan ve enzimatik bir tespit yöntemi olan TUNEL testi, nötr pH koşullarında ek bir denatürasyon gerektirmeden tek ve çift zincir hasarlarının tespitinde kullanılmaktadır. TUNEL testi SCSA' dan sonra sperm DNA hasar tespiti için en sık kullanılan yöntemdir. Aslında TUNEL yöntemi kullanılarak DNA hasarından ziyade DNA kırıklarının tespiti sağlanmaktadır. SCSA gibi standardizasyonun tam sağlanmamış olması testin en önemli dezavantajıdır [1].

Hasarlı spermin apoptoz göstergesi olması nedeniyle TUNEL tekniği apoptotik olduğu düşünülen spermdeki spermatozoa popülasyonunun tanımlanması için ilk defa Gorczyca ve ark. (1993) tarafından uygulanmıştır. Bu yöntemde, DNA kırıklarının 3'-OH ucu reaksiyonunu katalizleyen eksojen terminal deoksinukleo-tidiltransferaz (TdT) enzimi kullanılarak işaretlenir ve bu kısma (tek ve çift DNA zincir kırıkları) uridin trifosfat (dUTP) bağlanarak biotinlenir. Biotinlenmiş DNA streptavidin ile birleşerek suda çözünmeyen renkli bir ürün ortaya çıkarır [2, 84].

2.4.4 Anilin Mavi Testi

Asidik bir boya olan anilin mavisi, hasarlı DNA'ya sahip spermlerde rezidüel histonların açığa çıkması sonucunda nükleoproteinlere son derece kolay ulaşır ve bu DNA'nın boyanmasını sağlar. Basit ve ucuz bir tekniktir, analiz için ışık mikroskobu yeterlidir. Ancak heterojen boyama ile değerlendirmedeki güçlükler, bazı renklerin tam ayrımının yapılamaması ve renklerin hızlı kaybolması tekniğin önemli dezavantajlarıdır.

Sperm kromatini, maternal kromatinden farklı olarak geniş çapta tekrar modelleme ve protamin-histon değişimine ihtiyaç duymaktadır. Döllenmenin akabinde pronükleus oluşumu sırasında, sperm DNA'sındaki protaminler oositten sağlanan histonlar ile yer değiştirmektedir. Sperm kromatinindeki protamin-histon değişimi oranı asidik anilin mavisi boyaması ile tanımlanabilmektedir. Hazırlanan sperm slaytları anilin mavi ile boyanarak açık (olgun sperm), ara faz (kısmen immatür) ve koyu (ağır matürasyon arresti) olarak değerlendirmektedir [16, 85, 86].

2.4.5 PZR Yöntemi İle mtDNA Mutasyon Tespiti

Spermiler de yüksek frekanslı mtDNA delesyon ve nokta mutasyonları; spermin farklılaşma, büyüme ve gelişmesinde anormalliklere yol açmaktadır. Ayrıca spermin en önemli özeliği olan kuyruk hareketlerinde de azalmaya neden olmaktadır. mtDNA'nın 100'den fazla ve büyük ölçekli delesyonları ile hastalık paternleri arasında korelasyon bulunmaktadır. Bu tür delesyonlar, yaşlanma ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bunlardan biri olan 4977-bp'lik "Common delesyon" insanda çeşitli patolojik fenotiplere sebep olmakta ve mtDNA hasarının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Literatürde ilk kez 1995 yılında Kao ve arkadaşları tarafından 8470-8482 ve 13447-13459 bp pozisyonlarında iki 13 bp "direkt tekrarın" mevcut olduğunun tespit edilmesiyle anlaşılmıştır. Sonrasında mtDNA'daki bu direkt tekrarların 4977 bp'lik delesyonun göstergesi olduğu rapor edilmiştir. mtDNA mutasyonunun saptanmasında ilk adım semenden total DNA ekstraksiyonudur. Sonrasında laboratuvar ortamında ilgili gen bölgesi, primer denilen sentetik oligonükleotid diziler yardımıyla PZR yöntemiyle thermal cycler cihazında çoğaltılır. Çoğaltılan gen ürünleri jel-elektroforez tekniğiyle görüntülenir. Eğer çalışmada kantitatif analiz yapılması isteniyorsa amplifikasyon işlemi için Gerçek-Zamanlı PZR kullanılmalıdır. Gerçek-Zamanlı PZR 'da oluşan ürün miktarı, reaksiyon boyunca eş zamanlı olarak oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresans boya ve probların verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır. Gerçek-Zamanlı PZR eşzamanlı ve kantitatif sonuç alınması, hızlı bir teknik olması, kontaminasyon riskinin çok az olması, non-spesifik bir bağlanma olmaması ve sonucu görüntülemek/elde etmek için ikinci bir tekniğe ihtiyaç duyulmamasından dolayı tercih edilen bir tekniktir [4, 14, 68, 71, 72, 87, 88].

MATERYAL VE METHOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Malzemeler:

- Tüp (Falcon 2003)
- Mavi kapaklı tüp (15 ml, konik, Falcon 2095)
- Steril pipet (10 ml)
- Steril pastör pipeti
- Petri dish
- Steril 10- 100-1000 µl pipet uçları
- pH indikatörü
- Lam ve lamel
- Polizinli slayt (Superfrost)
- Steril idrar kabı
- Toplama tüpü
- Spin kolumn
- Mikro santrifüj tüpü (1.5ml-2 ml)
- PZR kapaklı tüp (0.2 ml)

- Sperm boyama kiti (Spermac stain, ferti pro)
- Sperm canlılık testi kiti (Vital screen)
- Lökosit boyama kiti (Leuco screen)
- Mioxsys sensorü
- TUNEL kit (Roche, in situ cell death detection kit, Fluorescein)
- DNA izolasyon quick DNA miniprep plus kit (Zymo research)
- Primerler (Sentegen)
- Ranger DNA polimeraz kit (Biolin)
- Phusion high-fidelity DNA polimeraz kit

3.1.2 Kullanılan Çözeltiler:

(IASP)'nin

- Pure sperm Wash (100 ml, Nidacon)
- Pure sperm-100 (250 ml, Nidacon)
- Triton-X (Sigma, T8787) %37' lik formaldehit
- 50x TAE buffer (Tris-asetat-EDTA)
- Sodyum sitrat (Sigma, S1804)
- DAPI
- PBS
- Saf su(distile su)
- Anilin mavisi (Metyl blue, Sigma M6900)
- Merkaptoetanol
- Agaroz

3.1.3 Kullanılan Cihazlar:

- Faz kontrast mikroskobu
- Mikromanipülatör
- Makler hücre sayım kamerası
- Mioxsys Analizör
- Pipetör
- Santrifüj
- Etüv
- PCR cihazı
- Vorteks
- Nanodrop spektrofotometre
- Mikrodalga

3.1.4 Örnek Türü:

- Semen örneği

3.2 Metod

3.2.1 Semen Analizi

Sperm örneği alınacak olan erkek hastalara işlemden önce 3 - 7 gün arasında bir cinsel perhiz uygulandı. Cinsel perhiz sonrası semen örneği steril numune kabına alındı ve hasta bilgi formuyla birlikte laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvara ulaşan semen örneği, en az 20 dakika (ortalama 30 dakika) süre ile oda ısısında likefiye olması için bekletildi ve sonrasında 1 saat içerisinde semen analizine alındı.

Sperm sayımı için likefiye olan semen örneği 10 ml'lik steril pastör pipeti kullanılarak homojenize edildi. Bu işlem sırasında aynı zamanda örneğin hacmi ml cinsinden ölçüldü. Homojenize edilmiş semen örneğinden 10 μ L alınarak oda sıcaklığında tutulan Makler hücre sayım kamerasının ortasındaki yuvarlak ve saydam kısma

konuldu ve hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek kapağı kapatıldı. Kamaradaki semen örneği faz kontrast mikroskop altında 20X objektif kullanılarak 200X büyütme altında incelendi (Şekil 14). Şekildeki mikroskop görüntüsünde 100 eşit kareye bölünmüş büyük kareye odaklandıktan sonra 10 karedeki tüm sperm hücreleri sayıldı. Elde edilen sayı aşağıdaki formül kullanılarak 1 ml semendeki toplam sperm sayısını bulmak için kullanıldı:

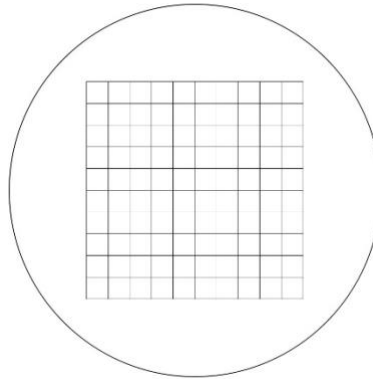
Formül: 10 karedeki toplam hücre sayısı $\times 10^6$

Eğer sperm sayısı çok düşükse tüm saha sayıldı.



Şekil 4.1 Erkek infertilitesinde ROS ve mtDNA mutasyonu ilişkisi

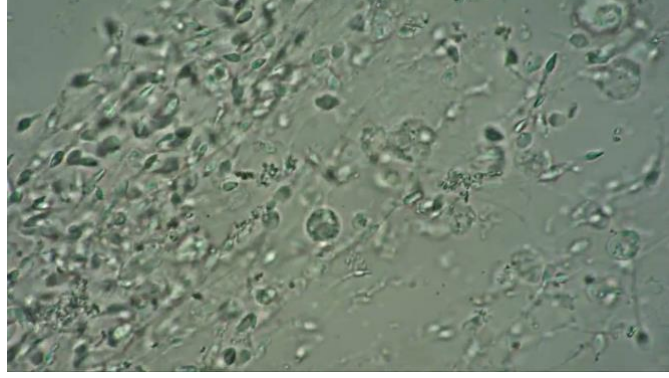
Motilite hesaplaması için daha önce sperm sayısının hesaplanmasında kullanılan 10 veya 100 karelik alandaki hareketsiz sperm sayıldı ve elde edilen sayı aynı alanda sayılan toplam sperm sayısından çıkarıldı (Şekil 15). Elde edilen sayı sayım yapılan alandaki toplam sperm sayısına bölünerek % olarak hareketlilik belirlendi.



Şekil 4.2 Kamaradaki hücre sayım alanları görüntüsü

Toplam % hareketlilik içindeki, +4, +3, +2, +1 hareketli ve hareketsiz spermelerin oranları hesaplandı.

Enfeksiyon veya sperm antikorlarının varlığının tespit edilmesi amacıyla örnekte "sperm aglütinasyonu" (topaklanma) incelendi (Şekil 16).



Şekil 4.3 Aglütinasyon görüntüsü

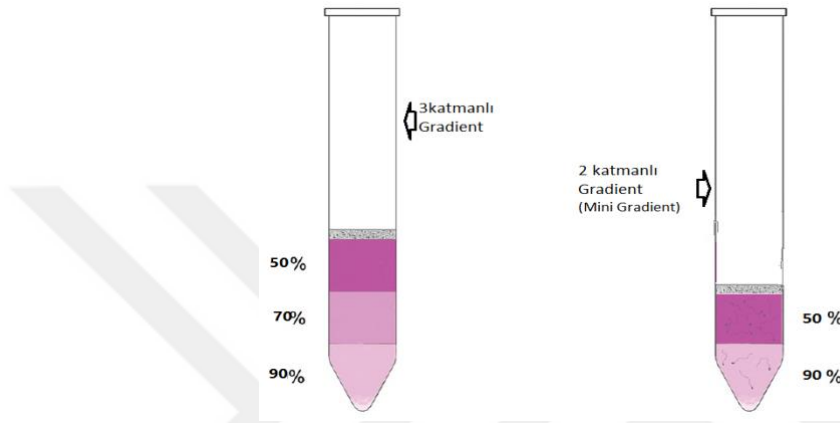
Semen örneğinin yıkaması iki veya üç katmanlı gradient yöntemleri ile yapıldı (Şekil 17). İşlem öncesinde %100 konsantre Puresperm-100, uygun miktarda Puresperm Wash solüsyonu kullanılarak seyreltildi ve %50, %70 ve %90'lık gradient solüsyonları hazırlandı.

İki katmanlı gradient için 15 ml'lik tüpün içerisine her bir katman için 0,5 ml ve yoğun olan katman altta kalacak şekilde %50 ve %90'lık solüsyonlar ile iki katman olarak ve solüsyonların birbirilerine karışmaması sağlanarak nazikçe yerleştirildi. Bu gradient semen örneğinde 5×10^6 'dan az sperm ve en az % 5 hareket görüldüğü durumda uygulandı.

Üç katmanlı gradient için 15 ml'lik tüpün içerisine her bir katman 1 ml ve yoğun olan katman altta kalacak şekilde %50, %70 ve %90'lık solüsyonlar ile üç katman olarak ve solüsyonların birbirilerine karışmaması sağlanarak nazikçe yerleştirildi. Bu gradient semen örneğinde 5×10^6 'dan fazla sperm ve en az %5 hareket görüldüğü durumda uygulandı.

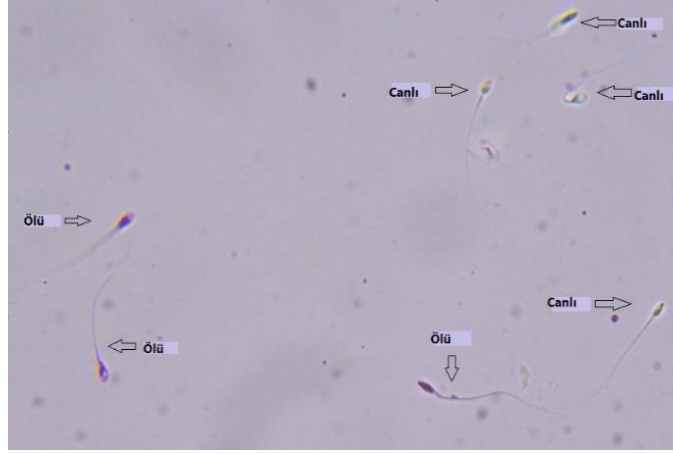
Hazırlanan gradientin üzerine likefiye olmuş semen örneği konuldu. Semen örneği 2 ml' den fazla ise ek olarak yeterli sayıda gradient tüpü hazırlandı ve kullanıldı. Her bir tüp üzerine konulacak olan semen miktarı 2 ml den fazla değildi. Semen örneği konularak hazırlanmış gradient tüpleri 300 rpg ile 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası cam pastör pipeti kullanılarak en alt katman yeni bir tüpe aktarıldı. Bu işlem esnasında gradientin bozulmamasına ve pipet içerisine solüsyon alınmamaya dikkat

edildi. Yeni bir tüpe aktarılan örneğin üzerine 3 ml sperm yıkama medyumunu eklendi ve 500 rpg'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan yaklaşık 0,5 ml'lik solüsyon ile pellet yeniden süspanse edildi. Yeniden süspanse edilen semen örneğinden pipet yardımı ile 10 µl alınarak oda sıcaklığında tutulan makler kamera ortasındaki yuvarlak ve saydam kısma konuldu. Kamaranın kapağı hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek kapatıldı ve mikroskop altında incelendi. Yıkama sonrası elde edilen sayı ve hareketlilik verileri kaydedildi.



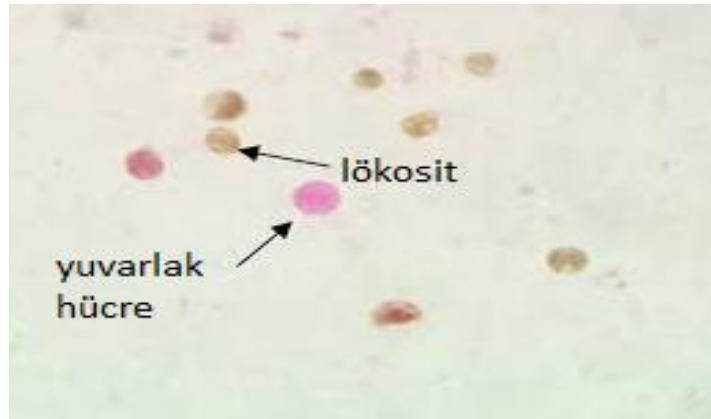
Şekil 4.4 Sperm yıkamada kullanılan iki ve üç katmanlı gradient hazırlığı

Semen örneğinde %5'den az hareketlilik görülmesi halinde sperm canlılık testi uygulandı. Canlılık testi için bir tüp içerisine 50 µl likefiye olmuş semen örneği ve sperm canlılık test kiti içerisinde bulunan 2 damla solüsyon 1 eklenerek karıştırıldı. 30 saniye sonra üzerine 3 damla solüsyon 2 eklendi ve iyice karıştırıldı. Yaklaşık 30 saniye sonra hazırlanan karışımdan 1 damla temiz bir lama damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı. 400X büyütme ile mikroskop altında incelendi. Beyaz renkli spermiler canlı kabul edilirken pembe renkli boyanmış spermiler ölü olarak kabul edildi (Şekil 18). Yüz adet sperm aldıkları renge göre sayıldı ve canlı sperm miktarı yüzde cinsinden ifade edildi.



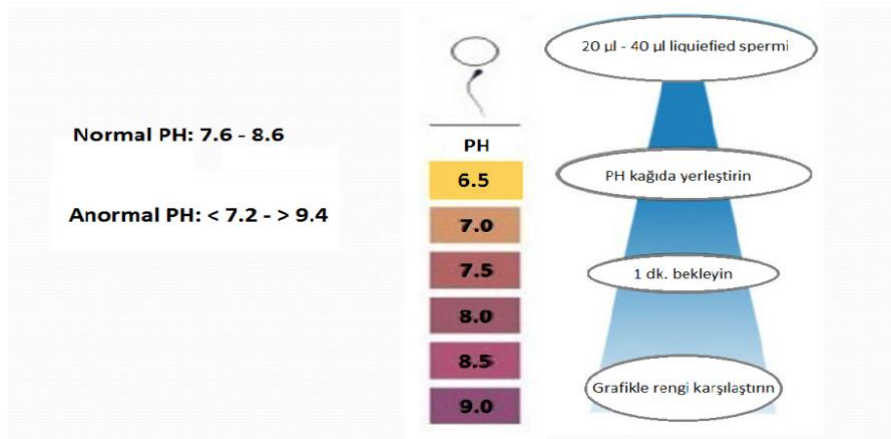
Şekil 4.5 Vitalscreen boyaması sonrası sperm görüntüleri

Peroksidaz Boyama Testi (Leucoscreen): Semen örneğinde 5×10^6 'dan fazla yuvarlak hücre görülmesi halinde lökosit varlığını test etmek amacı ile lökosit boyama metodu ile (LeucoScreen) boyama yapıldı. Bir tüp içerisine lökosit boyama kiti içerisinde bulunan 1 ml solüsyon 1 ve 30 μ l solüsyon 2 eklendi. Hazırlanan çalışma solüsyonu 1 gün süre ile bekletildi. 10 μ l likefiye olmuş semen örneği ve 10 μ l çalışma solüsyonu temiz bir lam üzerinde 1 dakika süre ile karıştırıldı. Süre sonunda üzerine lamel ile kapatıldı ve 400X büyütme ile mikroskop altında incelendi. Kahverengi boyanmış yuvarlak hücreler lökosit olarak değerlendirilirken, pembe renkli yuvarlak hücreler tüm yuvarlak hücre formları olarak kabul edildi (Şekil 19). Yüz adet yuvarlak hücre aldıkları renge göre sayıldı ve lökosit miktarı yüzdesel olarak belirlenmiş oldu. Yüzde miktarı belirlenen lökositin toplam yuvarlak hücre sayısındaki değeri sayısal olarak hesaplandı. Hesaplanan değerler kaydedildi.



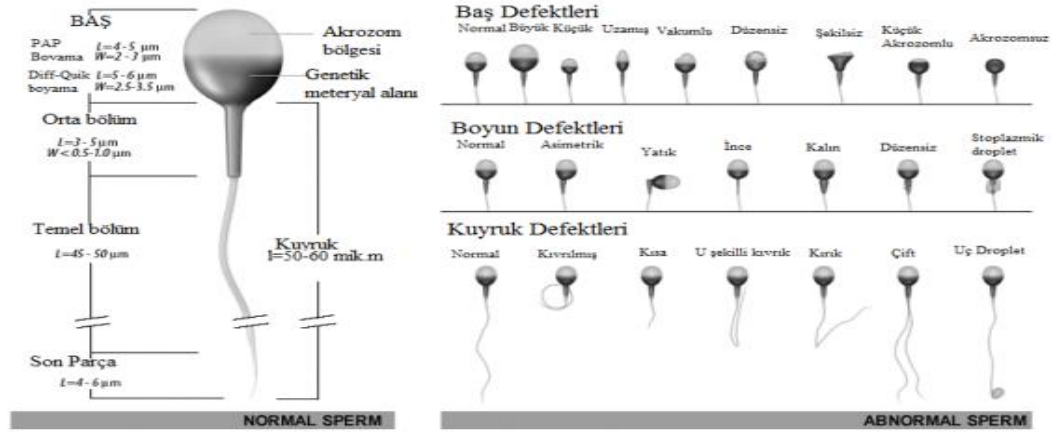
Şekil 4.6 Peroksidaz boyama testi (Leucoscreen) görüntüsü)

Semen Asit-Baz Dengesinin Ölçülmesi: Likefiye olan semen örneğinden 10 ul alınarak pH indikatörü üzerine kondu. PH indikatörünün aldığı renk indikatörün kutusundaki skalada değerlendirilerek semenin pH'sı ölçüldü (Şekil 20).



Şekil 4.7 Semen örneğinde pH ölçümü

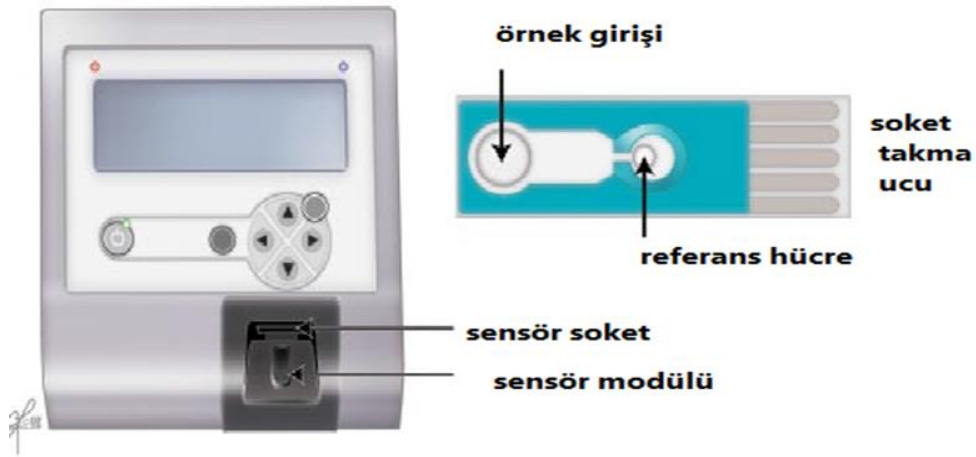
Spermin Morfolojik Değerlendirilmesi: Laboratuvarıda spermin morfolojik değerlendirilmesinde Kruger'in kesin kriterleri (Kruger's strict criteria) kullanıldı. Bu kriterlere göre normal morfolojiye sahip sperm oranı $>4\%$ ise normal morfoloji olarak ve normal morfolojiye sahip sperm oranı $<4\%$ ise teratozoospermi olarak değerlendirildi (Şekil 21). Sperm morfolojik değerlendirme için öncelikle semen örneği 1:1 oranında sperm yıkama solüsyonu ile karıştırıldı ve 15 ml tüp içerisine alınarak 300 g de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz (süpernatant) uzaklaştırıldı, tüpün dibindeki pellet nazikçe sarsılarak kalan solüsyon ile karışması ve homojenize olması sağlandı. Bu solüsyondan 10 µl alındı ve lam üzerine lamel yardımıyla yayılarak oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldı. Lam, sperm boyama kiti ile boyandı. Bu amaçla ilk aşamada önce lam 15 dakika fiksatif solüsyonunda bekletildi, daha sonra kuruması için 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra lam sırasıyla kit içerisindeki A solüsyonunda 3 dakika, B solüsyonunda 2 dakika ve C solüsyonunda 30 saniye bekletildi. Solüsyonlar arası geçişlerde lam, distile su ile nazikçe durulandı ve kalan su süzüldü. Son aşama sonrası lam oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurumuş lam immersiyon yağı kullanarak 100X objektifte incelendi. Toplam 100 sperm hücresi içindeki normal ve anormal morfolojideki (Baş, boyun ve kuyruk anomalileri ile ilgili alt gruplar) spermatozoa sayısı belirlendi.



Şekil 4.8 Kruger kriterlerine göre anormal sperm morfolojisi görüntüleri

3.2.2 sORP Testi

Semen örneği alınıp 30 dk. likefiye edildikten sonra 30µL semen örneği Mioxsys analizör cihaz üzerindeki Mioxsys sensörünü yerleştirildi. Analizi başlatma tuşuna basıldıktan iki dakika sonra sonuç cihaz ekranından okundu (Şekil 22). sORP, milivolts (mV) cinsinden, antioksidan kapasite potansiyeli (cORP) mikrokoulomb (µC) cinsinden ölçüldü.



Şekil 4.9 Mioxsys analizör ve sensörü

3.2.3 TÜNEL Testi

TUNEL testi uygulanacak örnek öncelikle sayı, hareketlilik ve viskozite açısından değerlendirildi. İşleme alınacak örnek eğer visküz ise 30 dk. bekletildi. Viskozitesi

devam eden test örneği iğneden geçirildi ve hala viskoz ise az miktarda PBS ile sulandırıldı.

Çalışma için kullanılan örnek miktarı şu şekilde belirlendi:

Sperm sayısı 20 milyon ve üzeri ise; 0,5 ml

Sperm sayısı 5-20 milyon arasında ise; 1 ml

Sperm sayısı 5 milyondan az ise eldeki tüm örnek kullanıldı.

Sperm sayısı 1 milyondan az olan örneklerde incelemeye alınan sperm sayısı yetersizliği nedeni ile sonuç verememe riski bulunduğundan örnek çalışma dışı bırakıldı.

Tünel testi için slayt hazırlama protokolü:

- Sperm sayısına göre tüp içine konan örnek üzerine 2 ml PBS ilave edilerek pipetaj yapıldı.
- 1200 rpm (280-300 g)' de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine 2 ml PBS eklendi ve pipetaj yapıldı.
- 1200 rpm de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine 0,5 ml PBS eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Polizinli slayt üzerine yayma yapıldı. Slayt yatay tutularak, isim yazılan şerite yakın yere 3-4 damla damlatıldı. 22×22 ölçülerindeki lamel dik tutularak damlaların üzerinden diğer uca çekilerek tüm yüzeye yayılması sağlandı. Daha sonra slayt dik tutularak kuruması beklendi.
- Slayt tamamen kuruduktan sonra %4' lük formaldehit içerisinde, oda ısısında 1 saat bekletildi. %4' lük formaldehit 4 ml %37' lik formaldehit ile 96 ml PBS karıştırılarak elde edildi. İşlem öncesi taze olarak hazırlanıp kullanıldı.
- Süre sonunda slaytın yüzeyi PBS ile birkaç kez yıkandı ve dik tutularak kuruması beklendi.
- Slayt buz üzerine konarak 2 dakika %0,1 Triton-X / %0.1 sodyum sitrat karışımında bekletildi. Karışım 0,1 gr Sodyum sitrat, 100 ml dH₂O ve 100 µl

Triton-X karıştırılarak elde edildi. Uygulama öncesi taze olarak hazırlanıp kullanıldı.

- Çalışılacak alan marker kalem ile işaretlendi ve işaretli alana 10 µl Tu 2 defa PBS ile yıkandı, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- nel mix eklenerek 22x22 lamel ile kapatıldı. (Tünel mix: 1µl enzim solüsyonu + 9µl label solüsyonu / taze olarak hazırlanıp kullanıldı)
- 37°C' de 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.
- Süre sonunda karanlıkta 3 defa PBS ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı (15-20 dk).
- DAPI konularak mikroskop yardımıyla analiz edildi (en az 300 sperm sayıldı).

Değerlendirme kriterleri: Yeşil renkli spermlerin toplam incelenen sperm sayısına oranı hesaplanarak aşağıdaki şekilde değerlendirme yapıldı:

- > %40 Fragmentasyon (+)
- <%30 Fragmentasyon (-)
- %30-40 ara bölge olarak değerlendirildi.

3.2.4 Anilin Mavisi Testi

Anilin mavisi testi uygulanacak örnek öncelikle sayı, hareketlilik ve viskozite açısından değerlendirildi. İşleme alınacak örnek eğer visküz ise 30 dk. bekletildi. Viskozitesi devam eden test örneği iğneden geçirildi ve hala viskoz ise az miktarda PBS ile sulandırıldı.

Çalışma için kullanılacak örnek miktarı şu şekilde belirlenir:

- Sperm sayısı 20 milyon ve üzeri ise; 0,5 ml
- Sperm sayısı 5-20 milyon arasında ise; 1 ml
- Sperm sayısı 5 milyondan az ise eldeki tüm örnek kullanıldı.

- Sperm sayısı 1 milyondan az olan örneklerde incelemeye alınan sperm sayısı yetersizliği nedeni ile sonuç verememe riski bulunduğundan örnek çalışma dışı bırakıldı.

Anilin mavi testi için slayt hazırlama protokolü:

- Sperm sayısına göre tüp içine konan örnek üzerine 2 ml PBS ilave edilerek, pipetaj yapıldı.
- 1200 rpm (280-300 g)' de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine 0,5 ml %4' lük formaldehit eklendi ve pipetaj yapıldı. (%4' lük formaldehit hazırlanışı: 4 ml %37' lik formaldehit + 96 ml PBS / taze olarak hazırlanıp kullanıldı)
- Polizinli veya normal slayt üzerine yayma yapıldı. Slayt yatay tutularak, isim yazılan şerite yakın yere 3-4 damla damlatıldı. 22×22 ölçülerindeki lamel dik tutularak damlaların üzerinden diğer uca çekilerek tüm yüzeye yayılması sağlandı. Daha sonra slayt dik tutularak kuruması beklendi.
- Süre sonunda slaytın yüzeyi PBS ile birkaç kez yıkandı ve dik tutularak kuruması beklendi.
- Slayt oda ısısında yatay tutularak 3 dakika "%0,1 Triton-X / %0,1 sodyum sitrat" karışımında bekletildi (0,1 gr Sodyum sitrat + 100 ml dH₂O + 100 µl Triton-X / taze olarak hazırlanıp kullanıldı).
- 2defa PBS ile yıkandı, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- Slayt tamamen kuruduktan sonra lam yatay konarak üzerini kaplayacak kadar stok anilin mavisi solüsyonundan üzerine kondu ve 7 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Slayt tamamen kuruduktan sonra lam yatay konarak üzerini kaplayacak kadar stok anilin mavisi solüsyonundan üzerine konur ve 7 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Stok anilin mavisi hazırlanışı: 200 ml PBS + 10 g anilin blue. PBS kaynatılır ve içine toz anilin mavisi eklenerek karıştırılır. Asetik asit ile pH 3.5 ayarlanır. Karanlıkta saklanır)

- Stok anilin mavisi hazırlanışı: 200 ml PBS kaynatıldı ve içine 10 g toz anilin mavisi eklenerek karıştırıldı. Asetik asit ile pH 3.5 ayarlandı. Karanlıkta saklandı. Işık mikroskopunda analiz edilir.
- Süre sonunda slayt musluk suyunda nazikçe yıkandı.
- Işık mikroskopunda analiz edildi.

Değerlendirme kriterleri:

- Tamamen koyu renkte bulunanlar yüksek seviye,
- Yarı koyu renkte bulunanlar orta seviye
- Tamamen açık renkte bulunanlar normal seviye olarak değerlendirildi.
- Koyu renkli spermlerin toplam incelenen sperm sayısına oranı hesaplanarak **aşağıdaki şekilde değerlendirme yapıldı:**
- > %30 Denatürasyon (+)
- < %20 Denaturasyon (-)
- %20-%30 ara bölge olarak değerlendirildi.

Değerlendirme sırasında orta seviye sperm yüzdesi de yüksek bir oranda görülmüşse raporda belirtildi.

3.2.5 PZR Yöntemiyle mtDNA Mutasyon Tespiti

3.2.5.1 Sperm örneklerinde kirliliğin giderilmesi

Semen iki kez iki hacim PBS ile yıkanarak ortamda var olan diğer kontaminantlar uzaklaştırıldı. Yıkama işleminde;

- Sperm sayısına göre tüp içine konan örnek üzerine 2 ml PBS ilave edilerek pipetaj yapıldı ve 1200 rpm' de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldıktan sonra pelletin üzerine 2 ml PBS ilave edilerek pipetaj yapıldı ve 1200 rpm' de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.

Bu işlemin tamamlanmasından sonra DNA izolasyonu aşamasına geçildi.

3.2.5.2 Sperm DNA İzolasyonu

- Sperm DNA izolasyonu için Quick DNA Mini Prep Plus Kit kullanıldı ve ilgili protokole uygun olarak gerçekleştirildi.
- 200 µl semen örneği mikrosantrifüj tüpüne kondu ve üzerine 200µl Bio-Fluid & Cell Buffer ve 20 µl merkaptotanol ilave edilerek 55°C'de 10 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda örneğin üzerine 420 µl Genomic Binding Buffer eklendi.
- Karışım, toplama tüpündeki zymo-spin IIC-XL kolonu içine aktarılarak 1 dakika santrifüj ($\geq 1200 \times g$) edildi ve sıvı kısım atıldı.
- Yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilen kolon üzerine 400 µl DNA-Pre-Wash Buffer eklenerek 1 dakika santrifüj ($\geq 1200 \times g$) edildi ve sıvı kısmı atıldı.
- Aynı kolon yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilerek 700 µl g-DNA Wash Buffer ilave edildi. Bir dakika santrifüj ($\geq 1200 \times g$) sonrası sıvı kısım atıldı.
- Aynı kolon yeni bir santrifüj tüpüne yerleştirilerek üzerine 200µl g-DNA Wash Buffer eklendi. Bir dakika santrifüj ($\geq 1200 \times g$) sonrası sıvı kısım atıldı.
- Son aşamada kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra ≥ 50 µl DNA Elüsyon Buffer eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bir dakika santrifüj ($\geq 1200 \times g$) edilerek sıvı kısmı PZR aşamasına kadar -20°C 'de muhafaza edildi.

3.2.5.3 DNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

Elli beş µl elüsyon buffer içerisinde çözünen genomik DNA miktarı nanodrop yardımıyla ölçüldü. Daha sonra DNA'nın bütünlüğü ve kalitesi jel elektroforez ile analiz edildi. Genomik DNA'lar %1'lik agaroz içeren jel içerisinde yürütüldü. Bu işlemde, 1x TAE içerisinde gerekli miktarda agaroz (40 ml için 0,4 gr) mikrodalga yardımıyla çözülüp soğuduktan sonra 20.000x Sybr Safe DNA boyası 1:20.000 seyreltilerek çözelti içerisinde eklendi (40 ml için 1 ul boya). Jel donduktan sonra 1 µl 6x yükleme boyası ve 5 µl DNA karıştırılarak kuyulara yüklendi. Elektroforez tankı içerisinde yerleştirilen jel, 100 V 50 dk yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülendi.

3.2.5.4 PZR İçin Primer Tasarımı

Çalışmada hedeflenen mitokondrial DNA'daki 4977 bazlık "yaygın delesyon" bölgesinin amplifikasyonu için tasarlanan oligonükleotid primerler Çizelge 3'de verilmiştir. Bu delesyon bölgesinde yer alan gen bölgeleri Şekil 24'te gösterilmiştir.



Şekil 4.10 Mitokondriyal DNA'nın büyük ölçekli 4977 bp'lik delesyon içinde bulunan farklı bölgeler

Primer tasarlanması için Mitomap ve Primer Blast programları kullanılmıştır.

<https://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/MITOMAP/MitoSeqs>

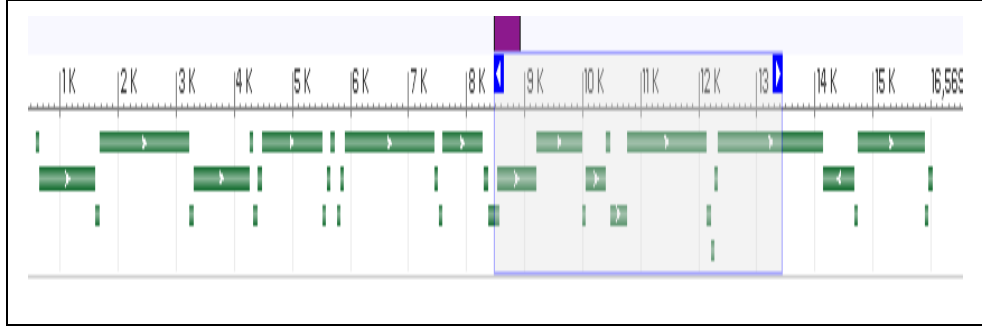
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?ORGANISM=9606&INPUT_SEQUENCE=NM_001618.3

Çizelge 3. 3 Sentezlenen primerler ve ilgili gen bölgeleri

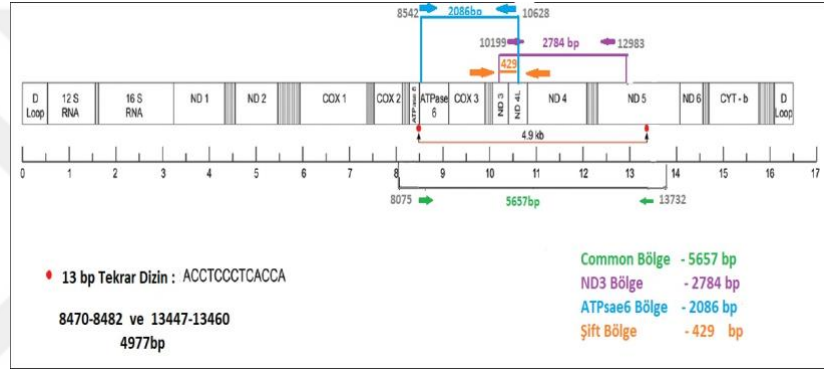
Primer numarası	Forward ve Reverse	Hedeflenen Amplifikasyon Bölgesi	Primer Uzunluğu	Primer Dizisi	Gen Bölgesi	Beklenen Amplikon Büyüklüğü
1	F	10199	20	CCGCGTCCCTTTCTCC ATAA	ND3	2784
1	R	12983	20	AGGCCTAGTAGTGGG TGAG	ND3	
2	F	8542	20	TTCGCTTCATTATTG CCCC	ATPase6	2086
2	R	10628	20	GGAGTGGGTGTTGAG GGTTA	ATPase6	
3	F	8075	20	GCTGTCCCCACATTAG GCTT	common	5657
3	R	13732	20	ATCCTGCGAATAGGCT TCCG	common	
4	F	10199	20	CCGCGTCCCTTTCTCC ATAA	Primer çift	429
4	R	10628	20	GGAGTGGGTGTTGAG GGTTA	Primer çift	

Kanunu Normal ve infertil bireylerden elde edilen sperm DNA örneklerinde 4977 bp'lık "common delesyon" gen bölgesi mitokondrial DNA genom haritasında 8470-8482 ve 13447-13460 bp pozisyonları aralığında yer almaktadır (Şekil 24). Amplifikasyon gerçekleştirilirken seçilen bölgenin uzunluğu sebebiyle oluşabilecek optimizasyon problemleri sebebiyle, sentezlenen primerlerin ikisi ilgili delesyon gen bölgesinin içinden diğeri ise dış kısmında olacak şekilde tasarlanmıştır (Şekil 25). Buna göre ATPase6, ND3 ve primer çift gen bölgeleri "common delesyon" bölgesinin iç kısmından; Common gen bölgesinin up-down stream bölgelerinden seçilerek amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

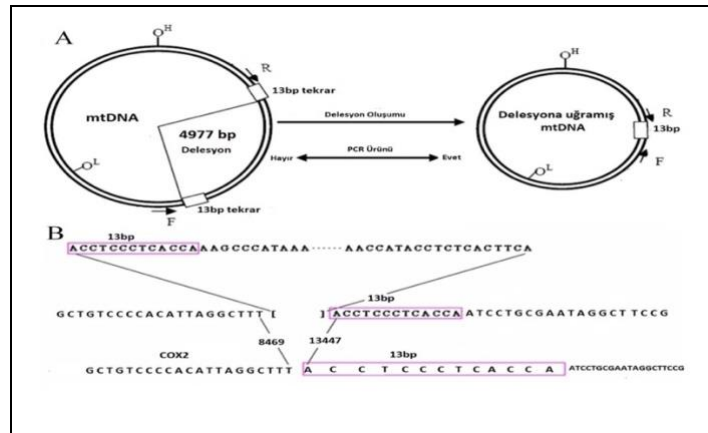
A)



B)



Şekil 4.11 Mitokondriyal DNA'nın büyük ölçekli 4977 - bp delesyonun tespitinde kullanılan stratejinin gösterimi, A; B



Şekil 4.12 MtDNA 4,977-bp delesyonunun saptanması.(A) 4,977-bp delesyonu olan veya olmayan insan mitokondriyal genomu.(B) 4.977 bp'lik delesyon onayı

3.2.5.5 PZR Reaksiyonu

mtDNA mutasyon taramasında 3 farklı gen bölgesi değerlendirilmiştir.

ATPase 6 gen bölge amplifikasyonu: Bu gen 8542-10628 baz dizileri arasında bulunan 2068 nükleotidli ürününün oluşmasını sağlayan gen bölgesidir. ATPase6 proteini, ATP sentaz adı verilen büyük enzimin bir parçasını oluşturur. Ayrıca kompleks V olarak tanımlanan bu enzim, oksidatif fosforilasyonun son aşamasından sorumludur.

Bu gen bölge amplifikasyonu için;

Forward primer; TTCGCTTCATTCATTGCCCC

Reverse primer; GGAGTGGGTGTTGAGGGTTA kullanıldı.

ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyon reaksiyonlarındaki PZR reaksiyon karışımı Çizelge 4'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 2 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
Nükleazsız su	(50 - tüm bileşenler)µL
5X HF buffer	10 µL
25 mM dNTP	0,4 µL
10 µM ileri primer	2,5 µL
10 µM geri primer	2,5 µL
Kalıp DNA (100 ng)	100/x µL x=DNA miktarı (ng)
Phusion polimeraz	0,5 µL
Toplam	50 µL

Çizelge 3. 3 ATPase6 PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon Primer eşleşmesi	98°C	30 sn	35 döngü
	98°C	10 sn	
	65°C	30 sn	
Primer uzaması	72°C	30 sn	
Son uzama	72°C	10 dk	
	4°C	∞	

Elde edilen PZR ürününün baz uzunluğu delesyon olmaması durumunda 2086 bp' dir. Delesyon varlığında ise bantın gözlenmemesi veya boyutunun küçülmesi beklenmektedir [25]. Daha sonra PCR ürünleri % 1 etidyum bromür içeren agaroz jeli üzerinde 1.5 saat süreyle elektroforezde yürüdükten sonra jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi [26].

ND3 gen bölge amplifikasyonu: Bu gen 10199-12983 baz dizileri arasında bulunan 2784 nükleotidli ürünün oluşmasını sağlayan gen bölgesidir. ND3 proteini, NADH dehidrojenazın bir alt birimi olarak mitokondrinin iç membranında yer alan ve elektron taşıma zincirinin beş kompleksinin en büyüğüdür.

Bu gen bölge amplifikasyonu için;

Forward; CCGCGTCCCTTTCTCCATAA

Reverse; AGGCCTAGTAGTGGGTGAG primerleri kullanıldı.

ND3 gen bölgesi amplifikasyon reaksiyonlarındaki PCR reaksiyon karışımı Çizelge 6'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 4 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
Nükleazsız su	(50 - tüm bileşenler)µL
5X HF buffer	10 µL
25 mM dNTP	0,4 µL
10 µM ileri primer	2,5 µL
10 µM geri primer	2,5 µL
Kalıp DNA (100 ng)	100/x µL x=DNA miktarı (ng)
Phusion polimeraz	0,5 µL
Toplam	50 µL

ND3 gen bölgesi amplifikasyonu PCR reaksiyonu şartları; 35 döngü olacak şekilde, Çizelge 7'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5 ATPase6 PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon Primer eşleşmesi	98°C	30 sn	35 döngü
	98°C	10 sn	
	65°C	30 sn	
Primer uzaması	72°C	30 sn	
Son uzama	72°C	10 dk	
	4°C	∞	

Elde edilen PCR ürününün baz uzunluğu delesyon olmaması durumunda 2784 bp' dir. Delesyon varlığında ise bantın gözlenmemesi veya boyutunun küçülmesi beklenmektedir [25]. Daha sonra PCR ürünleri % 1 etidyum bromür içeren agaroz jel üzerinde 1.5 saat süreyle elektroforezde yürüdükten sonra jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi [26].

Primer çift gen bölge amplifikasyonu: Bu gen 10199-10628 baz dizileri arasında bulunan 429 nükleotidlik bir bölgesidir. Bu bölge için seçilen primerler ile amplifiye DNA fragmanlar, kalıp DNA için mis-anneling ürünü olmadığının tespitinde önemlidir. İlaveten mtDNA'daki delesyonun saptanmasında istenmeyen amplifikasyonların tespiti sağlanmasında da önemlidir.

Bu bölgenin amplifikasyonu için,

Forward; CCGCGTCCCTTTCTCCATAA

Reverse; GGAGTGGGTGTTGAGGGTTA primerleri kullanıldı.

Primer çift gen bölgesi amplifikasyon reaksiyonlarındaki PCR reaksiyon karışımı Çizelge 8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
Nükleazsız su	(50 - tüm bileşenler)µL
5X HF buffer	10 µL
25 mM dNTP	0,4 µL
10 µM ileri primer	2,5 µL
10 µM geri primer	2,5 µL
Kalıp DNA (100 ng)	100/x µL x=DNA miktarı (ng)
Phusion polimeraz	0,5 µL
Toplam	50 µL

Çizelge 3.7 ATPase6 PZR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon Primer eşleşmesi	98°C	30 sn	35 döngü
	98°C	10 sn	
	65°C	30 sn	
Primer uzaması	72°C	30 sn	
Son uzama	72°C	10 dk	
	4°C	∞	

Primer çift gen bölge amplifikasyonu PCR reaksiyonu şartları; 35 döngü olacak şekilde Çizelge 9'de gösterilmiştir. Elde edilecek PCR ürününün baz uzunluğu delesyon olmaması durumunda 429' bp dir. Delesyon varlığında ise bantın gözlenmemesi veya boyutunun küçülmesi beklenmektedir [25]. Daha sonra PCR ürünleri % 1 etidyum bromür içeren agaroz jeli üzerinde 1.5 saat süreyle elektroforeze yürüdüktan sonra jel görüntüleme sistem ile görüntülenecektir [26].

3.2.5.6 Long Range PZR Reaksiyon

Common gen bölgesi amplifikasyonu: Bu gen 8075-13732 baz dizileri arasında bulunan 5657 nükleotidlik ürününün oluşmasını sağlayan gen bölgesidir. Elektronlar alt birim 2 (COX2) vasıtasıyla sitokrom c' den katalitik birinci alt üniteye aktarılır.

COX2, substrat bağlayıcı bölgeyi sağlar ve Cu (A) adı verilen bir bakır merkez içerir. Cu, muhtemelen sitokrom c oksidazda birincil alıcıdır.

Bu gen bölgesi amplifikasyonu için,

Forward GCTGTCCCCACATTAGGCTT ve

Reverse ATCCTGCGAATAGGCTTCCG primerleri kullanıldı.

Common gen bölgesi amplifikasyon reaksiyonlarındaki PCR reaksiyon karışımı Çizelge 10'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PCR reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
5X RANGER Reaction Buffer	10µL
Template (200 ng)	1µ
Forward Primer (10 µM)	1µL
Reverse Primer (10µ M)	1µL
RANGER DNA Polymerase	1µL
H2O	50L kadar

Common gen bölgesi amplifikasyonu PCR reaksiyonu şartları; 30 döngü olacak şekilde Çizelge 11'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7 ATPase6 PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon Primer eşleşmesi	98°C	1 min	35 döngü
	98°C	10 sn	
	65°C	1 min	
Primer uzaması	72°C	6 min	
Son uzama	72°C	10 dk	
	4°C	∞	

Elde edilen PCR ürününün baz uzunluğu delesyon olmaması durumunda 5657 bp' dir. Delesyon varlığında ise bantın gözlenmemesi veya boyutunun küçülmesi

beklenmektedir [3, 4, 72]. Daha sonra PCR ürünleri % 1 etidyum bromür içeren agaroz jeli üzerinde 1.5 saat süreyle elektroforezde yürüdükten sonra jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi [26].



BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR

Üsküdar Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Kurulun'dan etik kurul izni alındıktan sonra Bahçeci Sağlık Grubu Kliniği Androloji Bölümünden 5 adet normal fertil (infertil olmayan) ve 2 adet varikozel olmayan infertil hastaların semen örnekleri steril ortamda alındı. Semen örneklerin semen analizi, TUNEL testi ve anilin blue testi Bahçeci Sağlık Grubu Laboratuvarlarında, PZR ile mutasyon çalışması ise YTU/Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarında gerçekleştirildi. Semen analizi, sORP, TUNEL ve anilin blue testleri numuneler alındıktan yaklaşık bir saat sonra gerçekleştirildi. Sonrasında semen örneklerinin DNA izolasyon çalışmaları tamamlanıp +4 °C'de muhafaza edildi. PZR ile mutasyon tarama testi gerekli optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra gerçekleştirildi.

4.1 Semen Analiz Sonuçları

Yapılan çalışmadaki 5 fertil normal erkekler ve 2 varikozel olmayan infertil hastanın semen analiz sonuçları Çizelge 12'de gösterilmiştir.

DSÖ verileriyle karşılaştırıldığında tüm veriler uygun olarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlardan sadece 6 nolu infertil hastada sperm sayısının istenilenden az olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1 Semen analiz sonuçları:

FERTİL HASTA SONUÇLARI													
Örnek No	LikefiyeZamanı min	Volume (ml)	Aglütinasyon	PH	Leuco Screen	Sperm Sayısı	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Morfoloji (x/100)
1	30	3	-	8	-	58x10 ⁶	35	0	20	15	50x10 ⁶	85	3
2	30	3	-	8	-	42x10 ⁶	40	0	25	15	38x10 ⁶	85	3
3	30	2.5	-	7.5	-	72x10 ⁶	30	0	20	10	65x10 ⁶	70	3
4	30	3	-	8.5	-	80x10 ⁶	30	0	20	10	65x10 ⁶	80	3
5	30	3	-	8	-	52x10 ⁶	30	0	20	10	45x10 ⁶	70	2

İNFERTİL HASTA SONUÇLARI													
Örnek No	LikefiyeZamanı min	Volume (ml)	Aglütinasyon	PH	Leuco Screen	Sperm Sayısı	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Sperm Hareketliliği (%)	Morfoloji (x/100)
6	30	3.5	-	8	-	9x10 ⁶	40	0	25	15	6x10 ⁶	70	3
7	30	2.2	-	7.5	-	90x10 ⁶	45	5	25	15	65x10 ⁶	65	2

4.2 sORP Analiz Sonuçları

Yapılan çalışmadaki 5 fertil normal erkek ve 2 varikosel olmayan infertil hastanın milivolt (MV) cinsinden ölçülen sORP sonuçları Çizelge 16'de gösterilmiştir. Yapılan bu analizde statistik ORP değeri 1.36 mv/milyon değeri normal olarak kabul edilmektedir. Bunun üstünde olan değerler infertil olarak kabul edilir ve antioksidan tedavisi alınmasının hastaya yapılacak yardımcı üreme tedavi teknikler uygulaması açısından anlamlı olacağının göstermektedir. Çizelge 13'da görüldüğü gibi elde edilen sonuçlardan sadece 6 nolu infertil hastada sORP değeri istenilen değerin üzerinde olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı

NO	sORP (MV)
1	0.71
2	0.28
3	0.48
4	0.45
5	0.68
İnfertil hasta sonuçları	
6	3.7
7	0.14

4.3 TUNEL Analiz Sonuçları

Yapılan çalışmadaki 5 fertil normal erkek ve 2 varikosel olmayan infertil hastanın TUNEL analizinden elde edilen sonuçlar Çizelge 14'de gösterilmiştir. Bu testte <%30 fragmentasyon normal olarak tanımlandığından tüm sonuçlar uygundur. Bu sonuçlar, analiz edilen numunelerde tek ve çift zincir DNA kırıklarının olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.3 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı

NO	DNA fragmentasyon (%)
1	4.3
2	8
3	4.3
4	2.3
5	5
İnfertil hasta sonuçları	
6	0.77
7	6

4.4 TUNEL Analiz Sonuçları

Yapılan çalışmadaki 5 fertil normal erkek ve 2 varikosel olmayan infertil hastasının anilin mavi analizinden elde edilen sonuçlar Çizelge 15'de gösterilmiştir. Bu testte <%20 denatürasyon normal olarak tanımlandığından tüm sonuçlar uygundur. Bu sonuçlar, analiz edilen numunelerde kromatin paletleme bozukluklarının olmadığını göstermektedir.

Çizelge 4.4 ATPase 6 gen bölgesi amplifikasyonu PZR reaksiyon karışımı

NO	DNA denatürasyon (%)
1	4
2	7.3
3	7
4	4
5	2.6
İnfertil hasta sonuçları	
6	5
7	6

4.5 TUNEL Analiz Sonuçları

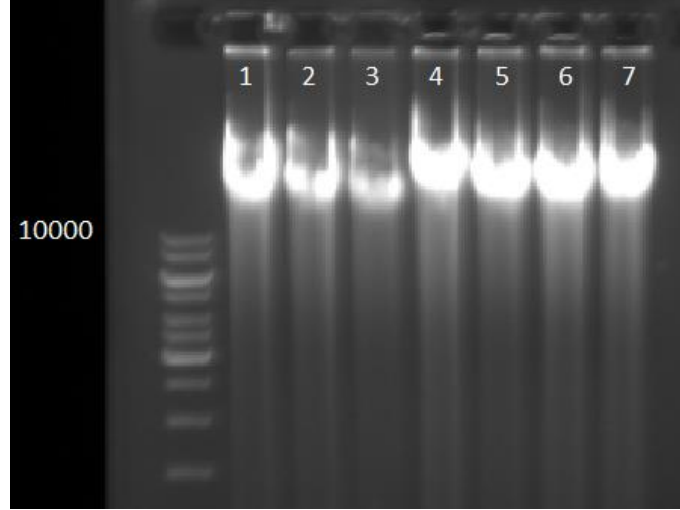
4.5.1 Semen DNA İzolasyon Sonuçları

Yapılan çalışmadaki 5 fertil normal erkek ve 2 varikozel olmayan infertil hastanın yıkanmış semen örneğinde yapılan DNA izolasyon çalışmalarının;

- Nanodrop cihazı ile ölçülen DNA'nın miktar ve saflık sonuçları Çizelge 16'de gösterilmiş ve sonraki aşama olan PZR reaksiyonu için uygun olarak değerlendirilmiştir.
- Elektroforez ile bütünlük ve kalite uygunluğu sonuçları şekil 27 gösterilmiş ve sonraki aşama olan PZR reaksiyonu için uygun olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.5 DNA miktarı ve saflık sonuçları

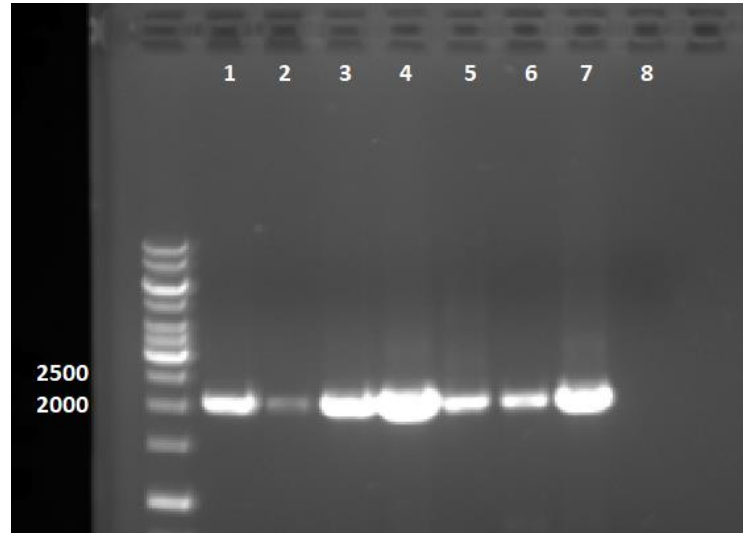
NO	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260 /280	OD260 /230	OD 260	OD 280	OD 230	OD 320	Pathlength (mm)	Dilution
1	268,47	1,90	2,36	5,269	2,731	2,177	-0,100	0,192	1,00
2	34,77	2,50	0,50	1,355	0,938	2,047	0,659	0,192	1,00
3	318,38	1,89	2,16	6,253	3,248	2,828	-0,114	0,192	1,00
4	394,45	1,90	1,68	7,655	3,911	4,463	-0,234	0,192	1,00
5	309,31	1,93	2,19	5,988	3,010	2,631	-0,198	0,192	1,00
İnfertil hasta sonuçları									
6	76,06	2,39	1,00	1,230	0,346	1,235	-0,291	0,192	1,000
7	107,50	2,23	0,60	1,944	0,760	3,386	-0,206	0,192	1,000



Şekil 4.1 1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil bireylerin genomik DNA jel görüntüsü

4.5.2 ATPase6 Gen Bölgesinde PZR Ürünü Jel Görüntüsü

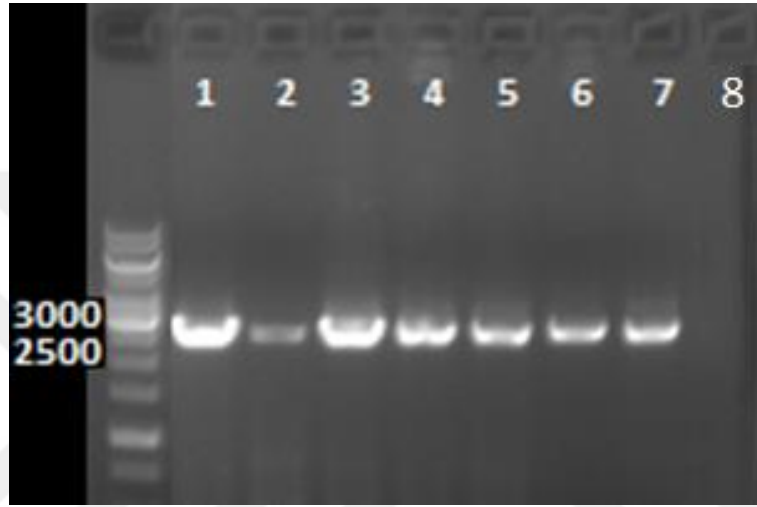
5 normal fertil ve 2 varikosel olmayan infertil hasta örnekten elde edilen ATPase6 gen bölgesi PZR amplifikasyon ürünü bant büyüklüğünün DNA marker ile karşılaştırıldığında beklenen 2086 bp'ye uygun olduğu Şekil 28'de gösterilen jel görüntüsünde gözlenmektedir. Dolayısıyla çalışmada yer alan normal fertil ve infertil örneklerin sperm mtDNA'sının ATPase6 gen bölgesinde delesyon veya insersiyon tarzı mutasyon tespit edilmemiştir.



Şekil 4.2 1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil, 8 no'lu negatif kontrol bireyler için ATPas6 gen bölgesinde PZR jel görüntüsü

4.5.3 ND3 Gen Bölgesinde PZR Ürünü Jel Görüntüsü

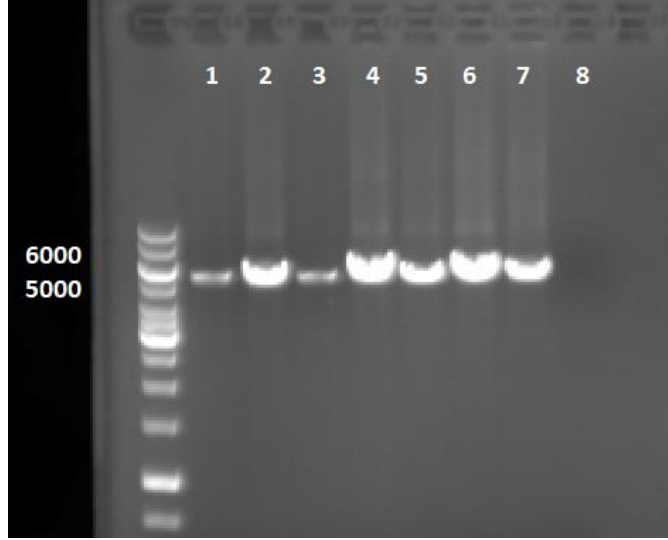
5 normal fertil ve 2 varikosel olmayan infertil hasta örnekten elde edilen ND3 gen bölgesi PZR amplifikasyon ürünü bant büyüklüğünün DNA marker ile karşılaştırıldığında beklenen 2784 bp'ye uygun olduğu Şekil 29'de gösterilen jel görüntüsünde gözlenmektedir. Dolayısıyla çalışmada yer alan normal fertil ve infertil örneklerin sperm mtDNA'sının ND3 gen bölgesinde delesyon veya insersiyon tarzı mutasyon tespit edilmemiştir.



Şekil 4.3 1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil, 8 no'lu negatif kontrol bireyler için ND3 gen bölgesinde PZR jel görüntüsü

4.5.4 Common Gen Bölgesinde PZR Ürünü Jel Görüntüsü:

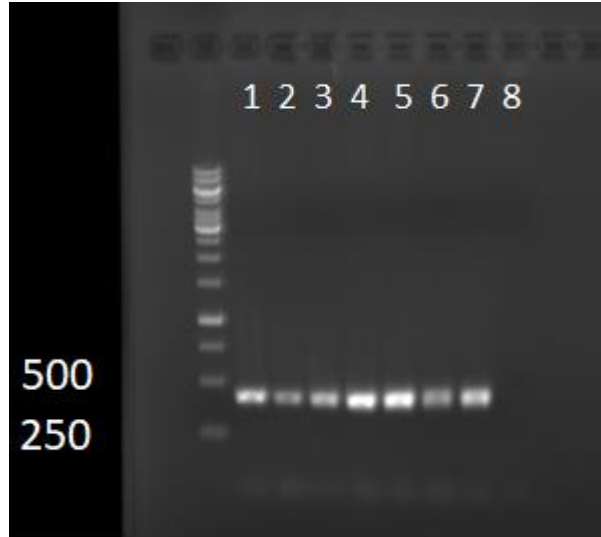
Common gen bölgesi 5657pb büyüklüğünde bir bölge olduğu için PZR karışımı diğer bölgelerden farklı olarak hazırlandı. Long-PZR koşullarında farklı yapıldı. 5 normal fertil ve 2 varikosel olmayan infertil hasta örnekten common gen bölgesi için elde edilmiş ürün büyüklüğü Şekil 30'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi normal ve hasta örneklerinden elde edilen amplifikasyon ürünü DNA marker ile karşılaştırıldığında sonuçlar uygundur.



Şekil 4.4 1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil, 8 no'lu negatif kontrol bireyler için common gen bölgesinde PZR jel görüntüsü

4.5.5 Primer Şift Gen Bölgesinde PZR Ürünü Jel Görüntüsü:

5 normal fertil ve 2 varikosel olmayan infertil hasta örnekten elde edilen primer Şift gen bölgesi PZR amplifikasyon ürünü bant büyüklüğünün DNA marker ile karşılaştırıldığında beklenen 429 bp'ye uygun olduğu Şekil 30'da gösterilen jel görüntüsünde gözlenmektedir. Dolayısıyla çalışmada yer alan normal fertil ve infertil örneklerin sperm mtDNA'nın bu gen bölgesinde delesyon veya insersiyon tarzı mutasyon tespit edilmemiştir.



Şekil 31: 1-5 no'lu normal fertil bireyler, 6-7 no'lu infertil, 8 no'lu negatif kontrol bireyler için Primer şift gen bölgesinde PZR jel görüntüsü

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çiftlerin evlilik yaşamındaki en önemli sağlık problemlerinden biri olan infertilitenin görülme sıklığı Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre çiftlerin yaklaşık %8-12'sinde görülmektedir [5]. Dünya genelinde eşit olarak saptanan infertil kadın ve erkek oranının infertiliteye olan yansıması; çiftlerde %40 erkeğe , %40 kadına, %10 hem erkek hem de kadına bağlı ve %10 bilinmeyen şeklindedir [72]. Çok faktörlü patolojik koşullardan biri olan şiddetli sperm motilite düşüklüğü, sık görülen kısırlık nedenlerdendir [67]. Elektron taşıma zincir yoluyla büyük bir ATP üreticisi olan mitokondri, oksidatif fosforilasyon yardımıyla sperm hareketliği için gereken enerjiyi üretmektedir. Bu karmaşık biyokimyasal ve moleküler mekanizma, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve nükleer DNA (nDNA) ile kontrol edilmektedir. Erkek infertilitesinde bazal semenin sayısal ve yapısal özellikleri yanında sperm genomunun moleküler düzeyde taşıdığı yapısal ve/veya kalıtsal hasarların önemi de oldukça büyüktür. Karmaşık bir süreç olan spermatogenez, çeşitli aşamaları ve farklı hücre tiplerini içerdiğinden dolayı nükleer ve mitokondriyal genom mutasyonları, sperm morfolojisi ve işlevselleğini etkilediğinden infertiliteye sebep olmaktadır [71]. mtDNA ile nDNA'nın genomik bütünlüğü, sperm motilitesinin sağlanmasında önemli bir rol faktördür [36, 67]. Literatürde sperm üreme potansiyeli (sperm fonksiyonel yetkinliği) ve DNA hasarları arasında korelasyon bulunduğu bildirilmektedir [36]. Zayıf kaliteye sahip spermelerde çeşitli büyük delesyonlar ve mtDNA fragmentasyonu gözlemlendiği çalışmalar oldukça fazladır [1-3, 67]. Bu nedenle DNA hasarının tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışmaların, geleneksel semen analizinden

daha iyi bir tahmin puanına sahip olduğu düşünölmektedir [37]. Nökleer ve mitokondriyal gen ürünleri birbirine bağımlı olduğundan, nDNA fragmantasyonunun spermin bozuk motilitesinde daha güvenilir bir göstergesi olabileceğı bildirilmiştir [67]. İlaveten DNA fragmantasyonu ile sperm konsantrasyonunu arasında negatif ilişkinin var olduğunu gösteren çalışmalarda literatürde yer almaktadır [1, 75]. Çoklu regresyon analizlerinde semen kalitesi (özellikle, hareketlilik) ve ROS üretimi gibi sperm özelliklerinin DNA hasarıyla bağlantılı olduğı da tespit edilmiştir [22].

Mitokondrilerde üretilen enerjideki düşüş sperm motilitesini azaltabilir ve bu durum genellikle yüksek ROS seviyesi ile ilişkilidir. Endojen ROS üretimi veya semende bulunan lökositlerden oluşan ROS spermi etkilemektedir [89]. Son zamanlarda geliştirilen prob temelli teknolojiler ile mitokondrilerin spermde ana ROS kaynağı olduğı gösterilmiştir [90, 91]. ROS üretimi bir kez başlatıldığında, peroksidasyon mekanizmasıyla devam eder. Peroksidasyon mekanizması, lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu devam ettiren peroksil ve lipid radikalleri üreterek ROS üretimini arttırdığından biyokimyasal ve moleküler düzeyde spermler için son derece zararlı bir işlemdir. Bununla birlikte, birçok çalışma, hücre içi veya hücre dışı reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve bunun sonucunda oluşan oksidatif stresin, nDNA ve mtDNA hasarını indüklemeye önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. Sperm, doymamış yağ asitleri, DNA ve proteinler gibi birçok ROS substratlerini içerir ve sınırlı endojen antioksidan kapasiteye sahiptir. Bu nedenle sperm, mtDNA ve nDNA'yı etkileyen oksidatif hasara karşı oldukça hassastır. Bu nedenle erkek infertilite etyolojisinde ve patogeneğinde, mtDNA mutasyonlarına sebep olan ROS'un patolojik seviyeleri son derece önemlidir [55]. Sperm hareketliliğinde azalma ve genom ile mtDNA'da hasara sebep olan yüksek OS'nin erken tespiti ve beraberinde hızlı antioksidan tedavisi OS kaynaklı oluşabilecek genom ve mtDNA hasarlarını önleyebilir [14]. Ayrıca yüksek ROS seviyesine sahip infertil erkeklerin antioksidan tedavi alması, sonrasında uygulanması planlanan yardımcı üreme tekniklerinin başarısını olumlu yönde etkileyecektir [92]. Bütün bu bilgiler ışığında, infertil erkeklerin yüksek DNA hasarına sahip spermlere sahip olduğı ve bununda yardımcı üreme teknikleri uygulanabilecek erkekler için önemli sonuçları beraberinde getireceğı görölmektedir.

Bu nedenle, bu çalışma varikosel olmayan infertil erkeklerde, infertiliteye sebep olan sperm biyobelirteçler paneli değerlendirildi. Bu panel; semen analizi, semen-antioksidan kapasite, nDNA paketlenme ve fragmentasyon, mtDNA hasarını içermektedir. Bu amaçla semen analizi; DSÖ kriterleri esas alınarak semendeki volüm, PH, viskozite, aglütinasyon, likefiye olma zamanı, sperm konsantrasyon, sperm hareketliliği, sperm morfoloji parametreleri açısından değerlendirilmiştir. Semen-antioksidan kapasite; yeni bir galvanostat tabanlı teknoloji olan MiOXSYS Sistemi kullanılarak millivolt cinsinden sORP analizi ile gerçekleştirilmiştir. sORP; biyolojik sistemdeki tüm oksidan ve antioksidanlar arasındaki mevcut dengenin entegre ölçümüdür. Pakette yer alan nDNA paketlenme ve fragmentasyon, TUNEL ve Anilin mavi testleri kullanılarak sperm DNA'sında var olabilecek tek-çift zincir kırıklar ile genom paketlenmesinde oluşabilecek hasarların tespiti amacıyla gerçekleştirilmiştir. mtDNA hasarı ise; PZR yöntemiyle "common delesyon" olarak tanımlanan 5657bp büyüklüğündeki gen bölgesi ve bu bölgenin içerisinde yer alan ATPase6, ND3, primer shift gen bölgeleri üç farklı gen bölgesinin amplifikasyonu ile değerlendirilmiştir. Çalışma da bu panel için 5 normal fertil birey ve 2 varikosel olmayan infertil erkek birey değerlendirilmeye alınmıştır.

Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde;

DSÖ kriterlerine göre değerlendirilen semen analizi sonuçları, sadece 6 nolu infertil hastada sperm sayısının düşük olduğu,

Statistik ORP değeri 1.36 mv/milyon değeri normal olarak değerlendirilen sORP analizi sonuçları, tüm bireylerde oksidan ve antioksidan arasında dengenin mevcut olduğu, sadece 6 nolu infertil hastada sperm sORP değeri yüksek olduğu,

<%30 fragmentasyonun normal olarak kabul edildiği TUNEL analizi sonuçlarına göre tüm bireylerde fertilite problemi oluşturacak şekilde bir nDNA fragmentasyonun (tek/çift zincir kırıklarının) mevcut olmadığı,

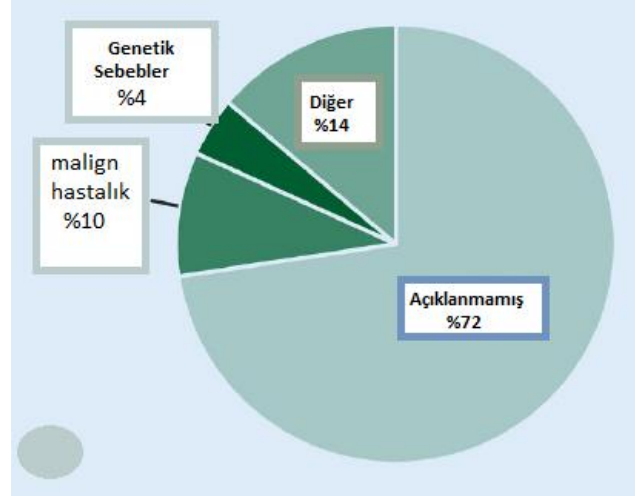
<%20 denaturasyon normal olarak kabul edildiği Anilin mavisi test sonuçlarına göre, tüm bireylerde nDNA paketlenmesinde histon/protamin yer değişiminin normal sınırlar içerisinde olduğu,

mtDNA delesyonlarının tespiti amacıyla gerçekleştirilen çalışmada amplifiye edilen gen bölgelerinde tüm bireylerdeki amplifikasyon ürününün istenilen büyüklüğe sahip olduğu ve herhangi bir delesyon mutasyonun olmadığı, gözlenmiştir.

Ancak sunulan çalışmaya uygun kriterlere sahip infertil erkek hasta sayısı sadece 2 ile sınırlı kaldığından; yürütülen test teknikleri arasında istatistiksel olarak bir korelasyon çalışması gerçekleştirilememiştir. Dolayısıyla çalışmada değerlendirilen OS-genom tek/çift zincir kırıkları-genom paketleme-mtDNA delesyon parametreleri arasında bir ilişkinin varlığı net olarak ortaya konulamamıştır. Bu yüzden hasta sayısı artırılarak ülkemizdeki varikosel olmayan infertil erkek bireylerde bu parametreler arasında ilişkinin tam olarak tespit edilmesi için yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte PZR yöntemiyle amplifiye edilen gen bölgelerindeki nokta mutasyon varlığı/yokluğu tespiti, sekans analizi ile ileriki çalışmalarda tanımlanmalıdır.

Çalışmanın hipotezleri arasında yer alan; varikosel olmayan infertil erkek hastalarda, hastaların sperminde fertilizasyon potansiyelinin azalmasına sebep olan çeşitli biyokimyasal, moleküler, genomik ve fonksiyonel anormalliklerin önemli olduğu düşüncesi elde edilen genel bulgular ile net bir şekilde ortaya konulamamış olsa da ileriki çalışmalarda artan hasta sayısı ile bu korelasyonun sağlanabileceği öngörülmektedir.

Bütün bunların yanısıra, 2018 yılında Tüttelmann ve arkadaşları tarafından yayınlanan çalışmada; semen analizine göre incelenmiş yaklaşık 26 bin infertil erkeğin infertilite sebepleri; %10 malign hastalıklar, %4 genetik sebepler, %14 diğer sebepler ve %72 ise nedeni açıklanamayan kaynaklar olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 32). Dolayısıyla yayınlanan çalışma, infertil erkeklerin tanısında kullanılan semen analizinin sadece %28 oranında bir tanıya gidilebilmesine olanak sağlamaktadır. Geriye kalan %72'lik kaynağı bilinmeyen infertilite olgularının tanılanmasında başka ilave tekniklere, yeni yaklaşımlara ve daha kapsamlı kombine test uygulamalarına ihtiyaç duyulduğu açıktır [93].



Şekil 5.1 Son 30 yılda Reprodüktif Tıp ve Androloji Merkezine (Cera) katılan 26.091 infertil erkek hastanın semen analizi sonuçlarına göre konulan klinik tanılar

Ayrıca aynı çalışmada, bilinen mevcut genetik hastalıklar açısından incelenen yaklaşık 26 bin infertil erkek hastanın sadece %4 'ünde genetik bir tanının konulması infertilite olgularında spermin moleküler açıdan daha kapsamlı değerlendirilmesinin önemi ortaya koymaktadır. Güncel rutin genetik tanılarının özellikle kromozomal düzeydeki anomalilerin saptanmasına yönelik olduğu yapılan çalışmada vurgulanmış ve geriye kalan %96 oranındaki infertilitenin genetik kökeninin tespiti amacıyla sadece kromozomal düzeyde değil gen-nokta mutasyonları yönünden incelenmesinin daha anlamlı olacağı görülmektedir (Çizelge 17) [93].

Bu bilgilerden yola çıkılarak, sunulan tez çalışmasında erkek infertilitesinin tanılanması amacıyla kombine test yaklaşımıyla dört parametreden oluşan bir panel çalışması için kullanılacak analiz metodlarının optimize edilmesi sağlanmıştır. Uygulanılacak tekniklere yönelik optimizasyon çalışmalarının tamamlanmış olması ileride eldesi planlanan infertil erkek hastaların değerlendirilmesinin önünü açmış ve kolaylaştırmıştır. İleriki çalışmalarda ülkemizin infertil erkek popülasyonundaki infertilite sebeplerinin tespitine yönelik olarak bu panelin uygulanması ile istatistiksel anlamda önemli bir çalışmanın gerçekleştirilmesi ve çalışma sonuçlarının tedaviye önemli katkılar sağlaması amaçlanmaktadır. Tekrarlayan-başarısız yardımcı üreme teknikleri veya erken doğum olgusuyla sıklıkla karşılaşan çiftlerde;

Çizelge 5.1 Güncel rutin analizlerle belirlenen genetik sebepler

Genetik tanı	Seçilmemiş hastalar (N = 26,091) (%)	Azoospermik hastalar (N = 3252) (%)
Kromozom anomalileri	2.8	15.0
Klinefelter sendromu (47, XXY)	2.6	13.7
XX-Erkek (46, XX)	0.1	0.6
translokasyonlar	0.1	0.3
Diğerleri	<0.1	0.4
Vas deferens ve kistik fibrozisin izole konjenital bilateral yokluğu	0.5	3.1
Kallmann sendromu dahil olmak üzere konjenital hipogonadotropik hipogonadizm	0.7	0.9
Y kromozomal azospermi faktörlü delesyonlar	0.3	1.6
Toplam	4.3	20.6

sperm DNA bütünlüğü, mtDNA hasar ve ROS seviyelerin değerlendirmesi infertiliteye sebep olan faktörlerin doğru tespiti açısından oldukça önemli olduğundan, ülkemiz infertik erkek popülasyonunda bu korelasyonun tanımlanması tedavi açısından büyük katkılar sağlayacaktır. Çünkü genom ve/veya mtDNA’da var olan “common delesyon” gibi büyük delesyonların tedavisi mümkün olmadığından bu hasara sahip bireylerin teşhisi fertilitate açısından uygulanabilecek yöntemlerin yeniden değerlendirilmesini de beraberinde getirecektir. Ayrıca bu parametrelerin bir bütün olarak değerlendirilmesi, başarısız hamilelik süreci ve yardımcı üreme teknik uygulamalarının yaşanmamasını da sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Sharma, R., J. Masaki, and A. Agarwal, (2013) "Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay." *Spermatogenesis: Methods and Protocols*: 121-136.
- [2] Takeda, K., et al., (2015) "Evaluation of sperm DNA damage in bulls by TUNEL assay as a parameter of semen quality." *Journal of Reproduction and Development*: 185-190.
- [3] Ambulkar, P.S., A.R. Chuadhari, and A.K. Pal, (2015) "Association of large scale 4977-bp "common" deletions in sperm mitochondrial DNA with asthenozoospermia and oligoasthenoteratozoospermia." *Journal of human reproductive sciences*: 35.
- [4] Ambulkar, P.S., et al., Large Scale (2016) "Deletions in Human Sperm Mitochondrial DNA with Spermatozoa Dysfunction and Male Infertility." *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR.GC09*.
- [5] Bisht, S., et al., (2017) "Oxidative stress and male infertility." *Nature Reviews Urology*: 470-485.
- [6] Kırca, N. and T. Pasinlioğlu, (2015) "Psychosocial problems in infertility treatment." *Psikiyatride Guncel Yaklasimler-Current Approaches in Psychiatry*: 62-178.
- [7] PLATFORMU, T.K. and S. İÇERİKLERİ, Tüp bebek: Yardımla üreme teknikleri.
- [8] Payan-Carreira, R., et al., (2013) "Molecular Markers in Sperm Analysis, in Success in Artificial Insemination-Quality of Semen and Diagnostics Employed, InTech."
- [9] Eser, A. and M. SELÇUK, (2013) "Spermatozoon DNA'sının Hasarına Neden Olan Faktörler, Tamir ve Hasar Tespit Mekanizmaları." *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*: 284-293.
- [10] Dubin, L. and R.D. Amelar, (1971) "Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility." *Fertility and sterility*: 469-474.

- [11] Poongothai, J., T. Gopenath, and S. Manonayaki, (2009) "Genetics of human male infertility." *Singapore Med J.*: 336-347.
- [12] Pizzari, T. and G.A. Parker, (2009) "Sperm competition and sperm phenotype" in *Sperm biology*. 207-245.
- [13] Simmons, L.W. and A.J. Moore, *Evolutionary quantitative genetics of sperm*, in *Sperm Biology*. 2009, Elsevier. 405-434.
- [14] Chari, M.G., A.H. Colagar, and A. Bidmeshkipour, (2015) "A novel large-scale deletion of the mitochondrial DNA of spermatozoa of men in north Iran." *International journal of fertility & sterility*: 453.
- [15] Amann, R., R. Hammerstedt, and D. Veeramachaneni, (1993) "The epididymis and sperm maturation: a perspective." *Reproduction, fertility, and development*: 361.
- [16] Kim, H.-S., et al., (2013) "The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis." *Clinical and experimental reproductive medicine*: 23-28.
- [17] Fawcett, D.W. and M.H. (1960) "Burgos, Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue." *Developmental Dynamics*: 245-269.
- [18] Bridges, C.B., (1925) "Sex in relation to chromosomes and genes." *The American Naturalist*: 127-137.
- [19] Gottardo, F. and S. (2010) "Kliesch, Semen analysis: spermiogram according to WHO 2010 criteria." *Der Urologe*: 101-108.
- [20] Erdemir, F., F. Firat, and Y. (2011) "Gençten, Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi." *Türk Urol Sem*: 11-7.
- [21] Agarwal, A., et al., (2016) "Oxidation-reduction potential of semen: what is its role in the treatment of male infertility?" *Therapeutic Advances in Urology*: 302-318.
- [22] Lopes, S., et al., (1998) "Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa." *Human Reproduction*: 896-900.
- [23] Agarwal, A., et al., (2006) "Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility." *Fertility and sterility*: 878-885.
- [24] Aitken, R.J. and C. Krausz, (2001) "Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome." *Reproduction*: 497-506.
- [25] Agarwal, A., et al., (2014) "Mechanisms of oligozoospermia: an oxidative stress perspective." *Systems biology in reproductive medicine*: 206-216.
- [26] Chen, S.-j., et al., (2013) "Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches." *Archives of gynecology and obstetrics*: 191-199.

- [27] John Aitken, R., J.S. Clarkson, and S. Fishel, (1983) "Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function." *Biology of reproduction*: 183-197.
- [28] Guthrie, H. and G. Welch, (2012) "Effects of reactive oxygen species on sperm function." *Theriogenology*: 1700-1708.
- [29] Venkatesh, S., et al. (2012) "Clinical implications of oxidative stress & sperm DNA damage in normozoospermic infertile men." *Indian Journal of Medical Research*: 396.
- [30] Agarwal, A., et al., (2016) "MiOXSYS: a novel method of measuring oxidation reduction potential in semen and seminal plasma." *Fertility and sterility*: 566-573. e10.
- [31] Agarwal, A. and A. Majzoub, (2017) "Role of Antioxidants in Assisted Reproductive Techniques." *The World Journal of Men's Health*: 35.
- [32] Arafa, M., et al., (2017) "Semen quality and infertility status can be identified through measures of oxidation-reduction potential."
- [33] Ahmad, G., et al., (2017) "Ascorbic acid reduces redox potential in human spermatozoa subjected to heat-induced oxidative stress."
- [34] Ko, E.Y., E.S. Sabanegh, and A. Agarwal, (2014) "Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity." *Fertility and sterility*: 1518-1527.
- [35] Meuth, M., (1990) "The structure of mutation in mammalian cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*: 1-17.
- [36] Zini, A., et al., (2008) "Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis." *Human Reproduction*: 2663-2668.
- [37] Singh, A. and A. Agarwal, (2011) "The role of sperm chromatin integrity and DNA damage on male infertility." *Open Reprod Sci J*: 65-71.
- [38] IRVINE, D.S., et al., (2000) "DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality." *Journal of andrology*: 33-44.
- [39] Shamsi, M., et al., (2010) "Comet assay: A prognostic tool for DNA integrity assessment in infertile men opting for assisted reproduction."
- [40] Bay, F., (2015) "Sigara kullanan ve sigara kullanmayan infertil erkeklerde sperm DNA hasarı ve apoptozis."
- [41] Aghamohammadi, A. and M. Zafari, (2011) "The impact of cigarette smoking on sperm parameters" cross-sectional study: 35.23-6.81.
- [42] Shamsi, M.B., S.N. Imam, and R. Dada, (2011) "Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility." *Journal of assisted reproduction and genetics*: 1073-1085.
- [43] Parmegiani, L., G.E. Cognigni, and M. Filicori, (2014) "Sperm selection: effect on sperm DNA quality, in Genetic Damage in Human Spermatozoa."

- [44] Evenson, D.P., K.L. LARSON, and L.K. Jost, (2002) "Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques." *Journal of andrology*: 25-43.
- [45] Esterhuizen, A., et al., (2000) "Sperm chromatin packaging as an indicator of in-vitro fertilization rates." *Human Reproduction*: 657-661.
- [46] Agarwal, A., (2012) "Sperm chromatin assessment."
- [47] Moustafa, M.H., et al., (2004) "Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility." *Human Reproduction*: 129-138.
- [48] Shukla, K., A. Mahdi, and S. Rajender, (2012) "Apoptosis, spermatogenesis and male infertility." *Frontiers in bioscience (Elite edition)*: 746-754.
- [49] Najafi, T.F., et al., (2012) "Assessment of sperm apoptosis and semen quality in infertile men-meta analysis." *Iranian Red Crescent Medical Journal*: 182.
- [50] Simon, L., et al., (2010) "Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome." *Human Reproduction*: 1594-1608.
- [51] Sherratt, H., (1991) "Mitochondria: structure and function." *Revue neurologique*: 417-430.
- [52] St John, J., E.J. Bowles, and A. Amaral, (2007) "Sperm mitochondria and fertilisation." *Society of Reproduction and Fertility supplement*: 399-416.
- [53] Piomboni, P., et al., (2012) "The role of mitochondria in energy production for human sperm motility." *International journal of andrology*: 109-124.
- [54] Venkatesh, S., et al., (2009) "Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility." *Indian J Med Res*: 127-137.
- [55] Cui, H., Y. Kong, and H. Zhang, (2012) "Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging." *Journal of signal transduction*.
- [56] Beckman, K.B. and B.N. Ames, (1998) "The free radical theory of aging matures." *Physiological reviews*: 547-581.
- [57] Wallace, D.C., (1999) "Mitochondrial diseases in man and mouse." *Science*: 1482-1488.
- [58] Agarwal, A., R.A. Saleh, and M.A. Bedaiwy, (2003) "Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction." *Fertility and sterility*: 829-843.
- [59] Bogenhagen, D.F., (1999) "Repair of mtDNA in vertebrates." *The American Journal of Human Genetics*: 1276-1281.
- [60] Lightowlers, R.N., et al., (1997) "Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease." *Trends in Genetics*: 450-455.
- [61] Bennetts, L.E. and R.J. Aitken, (2005) "A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa." *Molecular reproduction and development*: 77-87.

- [62] Holyoake, A., et al., (2001) "High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men." *International journal of andrology*: 175-182.
- [63] Wei, Y.-H. and S.-H. Kao, (2000) "Mitochondrial DNA mutation and depletion are associated with decline of fertility and motility of human sperm." *ZOOLOGICAL STUDIES-TAIPEI* :1-12.
- [64] Spiropoulos, J., D.M. (2002) "Turnbull, and P.F. Chinnery, Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction?" *Molecular human reproduction*: 719-721.
- [65] MUGHAL, I.A., et al., (2017) "Male infertility is significantly associated with multiple deletions in an 8.7-kb segment of sperm mtDNA in Pakistan." *TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES*: 928-933.
- [66] Sun, Z., et al., (2007) "Ultrastructure and function of mitochondria in idiopathic asthenospermia: study of 151 cases." *Zhonghua yi xue za zhi*: 1263-1265.
- [67] Bonanno, O., et al., (2016) "Sperm of patients with severe asthenozoospermia show biochemical, molecular and genomic alterations." *Reproduction*: 695-704.
- [68] Ieremiadou, F. and G.C. Rodakis, (2009) "Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm dysfunction." *BMC research notes*: 18.
- [69] C, D., et al. (1974) "MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL MODIFICATIONS OF MITOCHONDRIA IN RAT GERM-CELLS. in *JOURNAL OF SUBMICROSCOPIC CYTOLOGY AND PATHOLOGY*." EDITRICE COMPOSITORI BOLOGNA VIA STALINGRADO 97/2, I-40128 BOLOGNA, ITALY.
- [70] De Martino, C., et al., (1979) "Morphological, histochemical and biochemical studies on germ cell mitochondria of normal rats." *Cell and tissue research*: 1-22.
- [71] Kao, S.-H., H.T. Chao, and Y.H. Wei, (1998) "Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa." *Molecular Human Reproduction*: 657-666.
- [72] Talebi, E., M. Karimian, and H. Nikzad, (2017) "Association of sperm mitochondrial DNA deletions with male infertility in an Iranian population." *Mitochondrial DNA Part A*: 1-9.
- [73] Díez-Sánchez, C., et al., (2003) "Mitochondrial DNA content of human spermatozoa." *Biology of reproduction*: 180-185.
- [74] Siwar, B.-G., et al., (2014) "Two novel mutations in COII and tRNA^{His} mitochondrial genes in asthenozoospermic infertile men." *Biochemical and biophysical research communications*: 610-615.
- [75] MURATORI, M., et al., (2000) "Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm." *Journal of andrology*: 903-912.

- [76] Spiropoulos, J., D.M. Turnbull, and P.F. Chinnery, (2002) "Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction?" MHR: Basic science of reproductive medicine: 719-721.
- [77] Thangaraj, K., et al., (2003) "Sperm mitochondrial mutations as a cause of low sperm motility." Journal of andrology: 388-392.
- [78] Rani, D.S., et al., (2006) "A novel missense mutation C11994T in the mitochondrial ND4 gene as a cause of low sperm motility in the Indian subcontinent." Fertility and sterility: 1783-1785.
- [79] Kumar, R., et al., (2009) "Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men."
- [80] Jensen, M., et al., (2004) "Frequent polymorphism of the mitochondrial DNA polymerase gamma gene (POLG) in patients with normal spermiograms and unexplained subfertility." Human Reproduction: 65-70.
- [81] Huang, Y. and J. Lu, (2007) "Advances in standardization and quality control for the analysis of sperm quality parameters." Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology: 963-968.
- [82] Alshahrani, S., et al., (2014) "The effect of low level leukocytospermia on oxidative stress markers in infertile men." BMC genomics: P56.
- [83] Said, T.M., et al., (2003) "Enhanced chemiluminescence assay vs colorimetric assay for measurement of the total antioxidant capacity of human seminal plasma." Journal of Andrology: 676-680.
- [84] Ribas-Maynou, J., et al., (2013) "Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay." Andrology: 715-722.
- [85] Hammadeh, M., et al., (1996) "Andrology: The effect of chromatin condensation (Aniline Blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme." Human Reproduction: 2468-2471.
- [86] Auger, J., et al., (1990) "Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men." International journal of andrology: 452-462.
- [87] Heidari, M.M., et al., (2016) "Mitochondrial genetic variation in Iranian infertile men with varicocele." International Journal of Fertility & Sterility: 303.
- [88] Kao, S., H.-T. Chao, and Y.-H. Wei, (1995) "Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm." Biology of Reproduction: 729-736.
- [89] Whittington, K., (1999) "Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions." International journal of andrology: 229-235.

- [90] Koppers, A.J., et al., (2008) "Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*: 3199-3207.
- [91] Aitken, R.J., K.T. Jones, and S.A. (2012) "Robertson, Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health." *Journal of andrology*: 1096-1106.
- [92] Kefer, J.C., A. Agarwal, and E. Sabanegh, (2009) "Role of antioxidants in the treatment of male infertility." *International journal of Urology*: 449-457.
- [93] Tüttelmann, F., C. Ruckert, and A. Röpke, (2018) "Disorders of spermatogenesis. *medizinische genetik*: 12-20.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Elnaz MOSHFEGHI
Doğum Tarihi ve Yeri : 20.09.1978-İRAN
Yabancı Dili : İngilizce-Farsça
E-posta : elimoshfeghi123@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Ziraat Mühendisliği	Urmia Üniversitesi	2001
Lise	Düz	Metin Lisesi	1996

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2002-2013	Carton Plast Gharb Co.	CEO
2002	Caerton Tala Co.	Aeaştırmacı



info@uskudar.edu.tr

Altunizade Mah. Haluk Türksoy Sk. No:14, 34662 Üsküdar / İstanbul / Türkiye
Tel: +90 216 400 22 22 Faks: +90 216 474 12 56

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU BAŞKANLIĞI

SAYI: B.08.6.YÖK.2.ÜS.0.05.0.06/2017/156

20.06.2017

Sayın Dr. Necati Fındıklı

Üsküdar Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 19 Haziran 2017 tarihinde, 06 No.lu toplantısında değerlendirmeye almış olduğu "Varikosel-Olmayan Erkek Kısırlığı Tanısı Konmuş Olgularda, Semen Antioksidan Kapasitesi, Sperm DNA Hasarı ve Sperm Mitokondrial DNA Mutasyon İnsidansının İncelenmesi" adlı araştırma projenizin etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.


Doç. Dr. Cümlül TAŞ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik
Kurulu Başkanı