

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FARKLI SEMEN PARAMETRELERİNE GÖRE
İNSAN SPERMLERİNDE APOPTOZİS VE NEKROZİSİN
HİSTOKİMYASAL VE İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

Didem ARSLAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 10600.401.02.00

Tez Danışmanı: Yrd.Doç.Dr. Remziye DEVECİ

Bornova-İZMİR

III

Didem Arslan tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak sunulan “Farklı Semen Parametrelerine Göre İnsan Spermlerinde Apoptozis ve Nekrozisin Histokimyasal ve İstatistiksel Yöntemlerle Belirlenmesi” başlıklı çalışma “E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği” ile “E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi”nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve/....../..... tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği / oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. Remziye DEVECİ

Raportör Üye:

Üye:

ÖZET**FARKLI SEMEN PARAMETRELERİNE GÖRE
İNSAN SPERMLERİNDE APOPTOZİS VE NEKROZİSİN
HİSTOKİMYASAL VE İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ**

ARSLAN, Didem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi; Yrd. Doç. Dr. Remziye DEVECİ

Aralık 2008, 81 sayfa

Erkeklerde, fertilizasyon potansiyellerinin göstergelerinden biri semen analizidir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO, 1999) göre yapılan standart semen analizleri spermlerin sayısı, hareketliliği ve morfolojiyi kapsar. Ancak bir semen analizi sadece geniş teşhis kategorileri sağlamaya yardımcı olur. “Yardımcı Üreme Teknikleri”nden erkek infertilitesinin tedavisinde kullanılan ICSI (intrastoplazmik sperm injeksiyonu) hareketsiz spermlerde de kullanılmaktadır. Bu durum embriyoda hasarlı DNA'nın oluşmasına yol açabilir. Bu nedenle, ICSI'de kullanılan hasar görmemiş spermatozoon için marker bulmak önemlidir ve ejaküle spermatozoonun hücre ölüm mekanizmalarını anlamayı gerektirir.

Bu gerekçelere dayanak bu çalışmada semen parametrelerinden konsantrasyon, hareketlik ve morfolojiye göre apoptotik ve nekrotik spermleri belirlemek ve olası değişimlerini istatistiksel olarak

VI

değerlendirmek amaçlanmıştır. Bunun için, İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen 13 gönüllü hastadan alınan semen örneklerinde Hoechst 33342 ve TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphate nick end labeling) yöntemleriyle apoptotik, propidium iodide ile nekrotik spermeler belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmeler için, semen parametreleriyle apoptozis ve nekrozis arasındaki korelasyon, %95 güven aralığına göre hazırlanan grafiklerde gösterilmiştir. Ayrıca bu parametrelere göre normal ve düşük düzeyli (WHO'ya göre) iki hasta grubu belirlenerek Student t Testi (%95 güven aralığına göre) uygulanmıştır.

Apoptozis belirlemek için kullanılan Hoechst 33342 ve TUNEL yöntemlerinden TUNEL'de sperm hücrelerinin sayısal değerleri daha yüksek bulunmuştur. Semen parametrelerinden; sperm konsantrasyonu ile apoptotik sperm oranları arasında istatistiksel bir ilişki bulunamamıştır. Sperm hareketliliği ve morfolojisi ile apoptozis arasında ise ters bir korelasyon vardır. Sperm hareket yüzdeleri ile sağlıklı morfoloji yüzdeleri azaldıkça, apoptotik sperm sayısı artmaktadır. Propidium iodide ile belirlenen nekrozis ile sperm konsantrasyonu arasında ters bir korelasyon bulunmaktadır. Sperm hareketliliği ve morfolojisi açısından ise farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Apoptozis ve nekrozis oranları karşılaştırıldığında, nekrotik hücreler apoptotik hücelere oranla daha fazladır.

Anahtar Kelimeler: Semen parametreleri, İnsan Spermi, Apoptozis, Nekrozis, Hoechst 3342, TUNEL, Propidium iodide.

VII

ABSTRACT

DETERMINING APOPTOSIS AND NECROSIS IN HUMAN SPERMS WITH HISTOCHEMICAL AND STATISTICAL METHODS ACCORDING TO DIFFERENT SEMEN PARAMETERS

ARSLAN, Didem

MSc. in Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Remziye DEVECİ

DECEMBER 2008, 81 pages

Semen analysis is one of the fertilization potentials indicators in men. According to World Health Organization (WHO: 1999), standard semen analysis contains sperm count, sperm motility and sperm morphology. But a semen analysis helps to provide only large scale diagnosis categories. In ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) application, which is one of the Assisted Reproductive Techniques used to cure men infertility, immotile sperms are also applied. But this case can cause damaged DNA to be produced in embryo. For this reason it is important to find markers non-damaged spermatozoon to use for ICSI and it is needed to understand the possible cell death mechanisms of ejaculated spermatozoon.

Depending on this reasons it is aimed to indicate the apoptotic and necrotic sperms according to semen parameters; concentration, motility and morphology and statistically evaluate possible changes of them. For

VIII

this reason apoptotic sperms are identified with Hoechst 33342 and TUNEL methods and necrotic sperms are identified with PI with the semen samples taken from 13 volunteers which have come to İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratory.

In between Ho342 and TUNEL applications identified apoptosis, it is found that the numeric values of the sperm count higher in TUNEL application. Any statical relationship between the semen parameter sperm concentration and apoptotic sperm ratio was not observed. There is an inverse correlation between apoptosis and sperm motility and morphology. As the sperm motility percentage and healthy morphology percentages decreases, apoptotic sperm count increases. There is an inverse correlation between sperm concentration and necrosis identified with PI. The differences are not statistically meaningful from the point of sperm motility and morphology. When comparing the apoptosis and necrosis, it is observed that necrotic cell counts are more than apoptotic cell counts

Key Words: Sperm parameters, Human sperm, Apoptosis, Necrosis, Hoechst 3342, TUNEL, Propidium iodide.

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasının her safhasında değerli bilgilerini, katkılarını ve sabrını esirgemeyen, değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Remziye DEVECİ'ye ve her zaman bilgileri ve manevi desteği ile yanımda olan sayın hocam Prof. Dr. Sabire KARAÇALI'ya, çalışmamız için gerekli materyali sağlayan Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı Çalışanlarına ve örneklerin toplanması aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyolog Erol TURAN'a, laboratuvar çalışmaları sırasındaki katkı ve yardımlarından dolayı Yüksek Lisans Öğrencisi Atabak NAGHAVİ'ye, tezin istatistik kısmındaki katkıları için Dr. Dilek ÜNAL'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu tezin hazırlanması sırasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmayı, 2007 Fen 029 no'lu proje kapsamında parasal olarak destekleyen Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı'na teşekkürlerimi borç bilirim.

X

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR	IX
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XV
TABLolar DİZİNİ	XVIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Spermatogenez	1
1.2. Spermatozoon Yapısı	2
1.3. Spermatozoon Morfolojik Açıdan Sınıflandırması	3
1.4. Spermatozoon Morfolojik Bozukluklarının Önemi	5
1.5. Semen Analizi	6
1.5.1. Semen analizinde kullanılan terimler	7
<u>1.5.1.1. Azospermi</u>	7
<u>1.5.1.2. İmmotil sperm</u>	8
<u>1.5.1.3. Oligospermi</u>	8
<u>1.5.1.4. Astenospermi</u>	8
<u>1.5.1.5. Teratospermi</u>	8
<u>1.5.1.6. Aglütinasyon: (Kümeleşme)</u>	8
1.6. Apoptozis ve Nekrozis	9
1.6.1. Apoptozisin morfolojisi	12
1.6.2. Apoptozisin mekanizmaları	14

XII

1.6.3. Apoptozisin regülasyonu	16
1.6.4. Apoptozisin indüklenmesi	16
1.7. Sperm DNA Hasarları	17
1.8. Spermatogenez ve Apoptozis	18
2. MATERYAL VE YÖNTEM	21
2.1. Materyal	21
2.2. Yöntemler	21
2.2.1. Semen örneklerinin hazırlanması	21
2.2.2. Sperm yapısının gösterilmesi	22
2.2.3. Spermelerde apoptozisin belirlenmesi	22
<u>2.2.3.1. Hoechst 33342 ile floresan işaretleme</u>	22
<u>2.2.3.2. TUNEL uygulaması</u>	23
2.2.4. Nekrozisin Belirlenmesi	25
2.2.5. Apoptozis ve nekrozisin karşılaştırılması	25
2.2.6. İstatistiksel uygulamalar	26
3. BULGULAR	27
3.1. Semen Analizleri	27
3.2. Sperm Morfolojik Yapısı	27
3.3. Apoptozisin Belirlenmesi	32
3.3.1. Hoechst 33342 ve TUNEL yöntemleriyle belirlenmiş sperm apoptozisinin istatistiksel değerlendirmesi	32
3.3.2. Semen parametreleri-Sperm apoptozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi	32
<u>3.3.2.1. Sperm konsantrasyonu-Sperm apoptozisi</u>	

XIII

<u>ilişkinin istatistiksel değerlendirmesi</u>	36
<u>3.3.2.2. Sperm hareketliliği-Sperm apoptozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi</u>	38
<u>3.3.2.3. Sperm morfolojisi-Sperm apoptozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi</u>	40
3.3.3. Apoptozis belirlemelerine ilişkin genel sonuçlar	42
3.4. Nekrozisin Belirlenmesi	43
3.4.1. Propidium iodide yöntemiyle belirlenmiş sperm nekrozisinin istatistiksel değerlendirmesi	43
3.4.2. Semen parametreleri-Sperm nekrozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi	46
<u>3.4.2.1. Sperm konsantrasyonu-Sperm nekrozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi</u>	46
<u>3.4.2.2. Sperm hareketliliği-Sperm nekrozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi</u>	49
<u>3.4.2.3. Sperm morfolojisi-Sperm nekrozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi</u>	51
3.4.3. Nekrozis belirlemelerine ilişkin genel sonuçlar	53
3.5. Apoptozis-Nekrozis İlişkisi	53
3.5.1. Semen parametreleri-Sperm apoptozis-nekrozis ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi	59
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	63
YARARLANILAN KAYNAKLAR	68
EK (ETİK KURUL RAPORU)	79
ÖZGEÇMİŞ	80

ŞEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1 Spermatozoon yapısı	3
Şekil 1.2 Spermatozoon morfoloji bozuklukları	6
Şekil 1.3 Apoptozis ile Nekrozis arasındaki farklar	12
Şekil 3.1 Sperm konsantrasyonu normal ve düşük düzeydeki örnekler.	29
Şekil 3.2 Sperm hareketliliği normal bireyin spermeleri dalgalı kuyruk, düzgün baş ve boyuna sahiptir. Sperm hareketliliği düşük olan bireylerin spermelerinde çeşitli kuyruk anomalileri görülür.	30
Şekil 3.3 Sperm morfolojisinde küçük, uzamış veya iri baş, deforme olmuş sperm ve çift kuyruk anomalileri	31
Şekil 3.4 Ho342 ve TUNEL yöntemleriyle apoptotik spermelerin belirlenmesi	33
Şekil 3.5 Ho342 ve TUNEL uygulamaları ile belirlenen apoptotik sperm yüzdelerinin hastalara göre karşılaştırılması	35
Şekil 3.6 Sperm konsantrasyon değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik sperm yüzdelerinin karşılaştırması	37
Şekil 3.7 Sperm hareketlilik değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik sperm yüzdelerinin karşılaştırması	39

XVI

Şekil 3.8	Sperm morfoloji değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik sperm yüzdelерinin karşılaştırması	41
Şekil 3.9	Propidium iodide yöntemleriyle nekrotik spermlerin belirlenmesi	43
Şekil 3.10	PI uygulaması ile belirlenen nekrotik sperm yüzdelерinin hastalara göre karşılaştırılması	45
Şekil 3.11	Sperm konsantrasyon değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla nekrotik sperm yüzdelерinin karşılaştırması	48
Şekil 3.12	Sperm hareketlilik değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla nekrotik sperm yüzdelерinin karşılaştırması.	50
Şekil 3.13	Sperm morfoloji değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla nekrotik sperm yüzdelерinin karşılaştırması	52
Şekil 3.14	Sperm yayma preparatta aynı bölgenin aydınlık alan, Ho342 ve PI ile görünümü	54
Şekil 3.15	Ho342 ve PI uygulamaları ile belirlenen apoptotik ve nekrotik sperm yüzdelерinin hastalara göre karşılaştırılması	56
Şekil 3.16	Ho342 ile işaretli apoptotik hücrelerle PI ile işaretli nekrotik hücrelerin verdiği floresan ışıma farkı	57
Şekil 3.17	Sperm konsantrasyon değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik-nekrotik sperm yüzdelерinin karşılaştırması	60

XVII

- Şekil 3.18** Sperm hareketlilik değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik-nekrotik sperm yüzdelerinin karşılaştırması 61
- Şekil 3.19** Sperm morfoloji değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik-nekrotik sperm yüzdelerinin karşılaştırması 62

XVIII

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1 WHO kriterleri referans değerlerine göre Tepecik SSK Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çalışılmış insan semen analiz sonuçları	28
Tablo 3.2 Hoechst 33342 ve TUNEL uygulaması sonucu, apoptotik sperm oranlarının hastalara göre dağılımı	34
Tablo 3.3 Sperm konsantrasyonu normal ve düşük grupların apoptotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri	38
Tablo 3.4 Sperm hareketliliği normal ve düşük grupların apoptotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri	40
Tablo 3.5 Sperm morfolojisi normal ve düşük grupların apoptotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri	42
Tablo 3.6 Propidium iodide uygulaması sonucu, nekrotik sperm oranlarının hastalara göre dağılımı	44
Tablo 3.7 Sperm konsantrasyonu normal ve düşük grupların nekrotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri	47
Tablo 3.8 Sperm hareketliliği normal ve düşük grupların nekrotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri	49

XIX

Tablo 3.9	Sperm morfolojisi normal ve düşük grupların apoptotik sperm yüzdelерinin Student t Testi ile istatistiksel değeri	51
Tablo 3.10	Ho342 (apoptozis için) ve PI (nekrozis için) uygulaması sonucu, apoptotik-nekrotik sperm yüzdelерinin hastalara göre dağılımı	55
Tablo 3.11	Tüm hastalar için apoptotik ve nekrotik sperm yüzdelерinin karşılaştırılmasına ilişkin Student t Testi ile istatistiksel değeri	58

1. GİRİŞ

1.1. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır (Levy ve Seinfer-Aknin, 2001; Print ve Loveland, 2002; Ricci ve ark., 2002; Sakkas ve ark, 2002; Liu ve ark., 2004; Yılmaz, 2005). Bu oluşum sürecinde germ hücreleri mayoz bölünme sonrası 46 kromozomlu diploid halden 23 kromozomlu haploid hale gelirler ve yine 23 kromozom içeren haploid yumurta hücresi ile birleşerek 46 kromozomlu yeni bir bireyin oluşmasına olanak sağlarlar. Her aşamada hücreler spermatogonia, spermatosit, spermatid gibi farklı isimler alırlar.

Spermatogenez yani sperm üretimi testis içinde seminifer tübül adı verilen yapılar içinde gerçekleşir. Seminifer tübül adından da anlaşılacağı gibi içi boş tüp şeklinde çok ince ve uzun bir yapıdır ve seminifer epitel adı verilen bir tabaka ile çevrilidir. Seminifer epitel 2 tür hücre içerir: Germ hücreleri sperm yapımından sorumluyken Sertoli hücresi adı verilen hücre grubu da germ hücrelerinin etrafında destek dokusunu oluşturur. Testislerde bulunan bir diğer hücre türü de erkeklik hormonu olan testosteron yapımını sağlayan Leydig hücrelerdir. Seminifer tübül içinde spermatogenezin tüm aşamalarındaki sperm öncülü hücreler bulunur. Farklılaşma fazını tamamlayan hücreler seminifer tübül içine bırakılır. Bu nedenle testisin farklı kesimlerindeki farklı alanlarda gelişimin değişik evrelerindeki sperm üretimi devam eder (Sharpe, 1994).

Spermatogenezin 3 temel aşaması vardır:

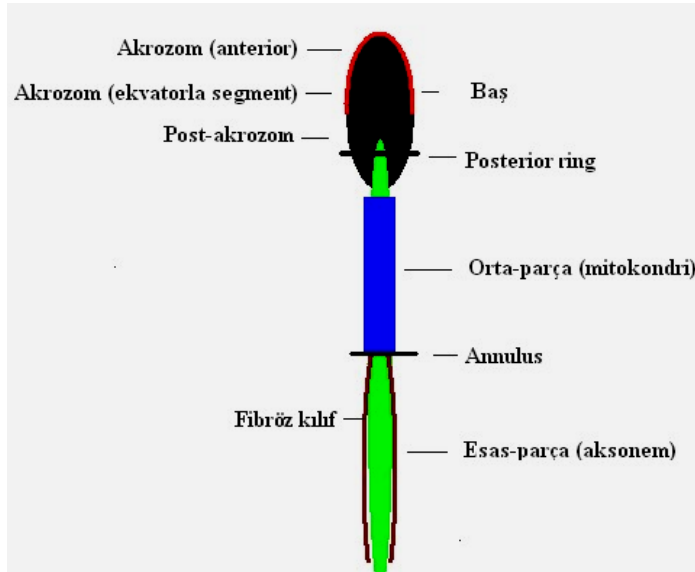
- a. Proliferasyon fazı: İleride spermleri oluşturacak spermatogonia denen hücreler seminifer epitelinin en alt tabakasında bulunur. Bu hücreler mitoz bölünme ile sürekli çoğalırlar ve seminifer epitelin daha üst tabakalarına doğru ilerlerler.
- b. Redüksiyon-Bölünme fazı: Çoğaldıktan sonra primer spermatosit adını alan hücreler DNA içeriklerini yani genetik materyallerini iki katına çıkardıktan sonra iki kez mayoz bölünme geçirirler. Birinci mayoz sonucu sekonder spermatositler, ikinci mayoz sonucu spermatidler meydana gelir. Bu süreç uzun bir zaman alır ve bu nedenle seminifer tübüllerin hemen her alanında mayoz bölünmenin değişik evrelerindeki spermatositler görülebilir.
- c. Farklılaşma fazı: II. Mayoz bölünme sonucu sperm öncülü hücreler (spermatidler) olgun sperm hücrelerine farklılaşırlar. Spermiogenez denen bu süreçte üreme hücreleri hem dölleme yeteneklerini kazanırlar, hem de spermlerin hareket yeteneğini sağlayan kuyruk gelişir.

Tüm bu fazlar sırasında sperm öncülü hücreler seminifer epitelinin derinliklerinden yüzeye yani seminifer tübüllerin iç boşluğuna doğru ilerler (Clermont, 1972).

1.2. Spermatozoon Yapısı

Spermatozoon gerek yapısal gerekse fonksiyonel ve metabolik bakımdan kesin sınırlarla bölmelere ayrılmış bir hücredir. Bu bölmeler baş ile orta-parça, esas-parça ve son-parçadan oluşan bir kuyruk kısmını kapsar (Şekil 1.1). Baş esasen, içindeki genetik materyali dışı gamete

ulaştırma ve bu gamette bazı fonksiyonların başlaması için etkileşimde bulunma görevine sahiptir. Kuyruğun içinde ise aksonem bulunur. Aksonem, orta ve esas-parçalarda dış yoğun fibriller denen hücre iskeleti organelleri ile kuşatılmıştır. Orta-parçada mitokondriler, en aktif kısım olan esas-parçada ise fibröz kılıf bulunur. Fibröz kılıf esas-parçanın başladığı yerde başlar ve son-parçada kesilir. Son-parça ise fibröz kılıfın sonladığı yerde başlar (Aydos, 2005).



Şekil 1.1: Spermatozoon Yapısı (Aydos, 2005).

1.3. Spermatozoonların Morfolojik Açıdan Sınıflandırması:

Diğer memelilere kıyasla insan spermleri yapı ve büyüklük açısından büyük değişiklik gösterirler. Normal fertil ejakulatta dahi spermatozoonlar arası şekil, büyüklük, baş ve akrozoim şekli yönünden

farklılıklar bulunur. Fertil erkeklerin ejakulatında da nuklear vakualizasyon, sitoplazmik damlacıkların varlığı, kuyruk anomaliliği görülebilir (Ombelet ve ark., 1995). Normal ve anormal spermatozoonların morfolojik farklılıkları uzun zamandır bilinmektedir. Anormal sperm morfolojisi ile infertilite arasındaki ilişkinin varlığı kabul görmüş ancak anormal spermatozoonun nasıl olması konusunda bir görüş birliğine ulaşılamamıştır.

Bir spermatozoonun anormal veya normal olduğunu belirleyen kriterleri ortaya koymak çok zordur. Bu kriterleri standardize etmek için pek çok girişim yapılmıştır (Guzick ve ark., 2005). İlk Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organisation, 1980) sınıflaması, sperm morfolojisinin değerlendirilmesi yönünde büyük bir adım olmuştur. Arkasından Hofmann ve Haider, Dusseldorf sınıflaması adı altında yeni bir morfoloji sınıflaması ortaya koymuştur (1985). Bu sınıflamada spermatozoonun uzaması ve akrozom hasarları üzerine daha fazla önem verilmiştir. 1987'deki ikinci WHO kılavuzu ile semen analiz kriterleri yeniden düzenlenmiştir. 1992'deki üçüncü WHO sınıflamasında ise sperm morfolojisinin değerlendirilmesi daha ayrıntılı olarak ele alınmıştır. Morfolojik olarak normal grubun yanı sıra 4 sınıf halinde anomaliler sınıflandırılmış ve teratozoospermi indeksi hazırlanmıştır. Spesifik infertilite nedenleri örneğin, globozoosperminin (akrozom yokluğu) ayrıca belirtilmesi gerekmektedir. Bu son sınıflamada normal morfolojiye sahip olma sınırı %50'den %30'a çekilmiştir.

Kruger ve Menkveld, sperm morfolojisine yönelik kesin Tygerberg kriterlerini tanımlamıştır (Aydos, 2005). Bu sınıflandırmada, spermatozoon bir bütün olarak incelenir. Düzensiz sınır hatları ve hafifçe

anormal sperm başlarının hepsi anormal olarak değerlendirilir. Tygerberg kriterlerine göre, morfolojik değerlendirmenin sonuçları üç kategoride ele alınabilir: 1. Normal morfolojiye sahip grup (%14'den fazla normal form mevcut), 2. İyi prognozlu grup (%4-14 arası normal form mevcut), 3. Kötü prognozlu grup (%4'den az normal form mevcut) (Aydos, 2005).

1.4. Spermatozoon Morfolojik Bozukluklarının Önemi

Kruger sınıflamasına göre spermilerin baş, orta bölüm ve kuyruk yapısındaki bozuklukları esas alan bir değerlendirme yapılmaktadır. Özellikle baş yapısındaki bazı formların baskın oluşu (makrosefal, çift baş, globozoospermia), bu erkeklerin spermlerinin mikro enjeksiyon uygulamalarında başarısızlık olasılığının yüksek olabileceğinin bir göstergesidir. Çünkü bu anormal baş yapısında spermilerin içerisindeki DNA yapısında da anormallikler tespit edilmiştir. Dolayısı ile semeninde yüksek oranda bu spermilerin bulunduğu kişilerde dölleme ve embriyo kalitesinde düşüklük olasılığı açısından risk yüksektir. Sperm kuyruk yapısındaki bir takım bozukluklar da (kısa kuyruk gibi) spermin hareket kabiliyetini bozarak infertiliteye neden olur. Morfolojide kısa kuyruk anomalisi (tail stump) yoğun olarak görülen erkeklerde, mikroenjeksiyon sonrası başarı şansı düşük olmaktadır (Aydos, 2005).

Sperm morfolojik bozuklukları; büyük başlı, küçük başlı, çift başlı, çift kuyruklu, amorf ve uzamış başlı, birlikte görülen baş ve gövde anomalisi ve akrozom hasarları olarak sınıflandırılabilir (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: Spermatozoon morfoloji bozuklukları (<http://www.emrebakircioglu.com>)

1.5. Semen Analizi

Gerek tedavi amaçlı gerekse bilimsel araştırmalarda insanda veya deney hayvanlarında infertiliteyi belirlemek için semen analizi uygulanır. Bunun için en az 48 saatlik (insan için) cinsel perhizden sonra alınan taze semen makroskopik ve mikroskopik değerlendirmeye tabi tutulur. Burada spermin sayısı (yoğunluğu), hareketliliği ve morfolojisi değerlendirilir. Semen analizi, infertil erkek bireyin değerlendirilmesinde fertilite potansiyelini belirlemede önemli bir yere sahiptir. Ayrıca klinikte tedavinin planlanmasında ve alınan cevabın değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Bilimsel araştırmalarda, spermin hareketliliği, sayısı veya şekli ile ilgili detaylı çalışmalar da amaca yönelik kullanılabilmektedir (Carrell, 2000; Irvine, 2000).

Geleneksel semen analizinde, ejakulat alındıktan sonra en fazla 60 dakikaya kadar (ideali 30 dakika) sıvılaşması (likefikasyon) için beklenir

ve daha sonra incelemeye geçilir.

WHO (World Health Organization, 1999) 'un manüel olarak değerlendirdiği semen analizi için referans aralıkları aşağıdaki gibidir.

Hacim: $\geq 2,0$ ml

Likefikasyon süresi: 60 dk içinde

Ph: $\geq 7,2$

Sperm konsantrasyonu: ml'de ≥ 20 milyon

Total sperm sayısı: ejakülatta ≥ 40 milyon

Hareketlilik: 30 ve 60 dk sonra hareketlilik oranı sırasıyla, $\geq \%50$, $\geq \%25$

Canlılık: $\geq \%75$ veya daha fazla canlı

Lökosit: ml'de 1 milyondan daha az

Normal morfoloji: en az $\geq \%30$

1.5.1. Semen analizinde kullanılan terimler

1.5.1.1. Azospermi

Erkeğin menisinde canlı veya cansız hemen hiç sperm hücresi olmamasıdır. Bu durum 2 şekilde ortaya çıkar: a. Tıkayıcı tip: Burada erkeğin yumurtalıklarında (testis) sperm hücre yapımı olmasına rağmen hücreleri ileten kanallarda tıkanıklık olması nedeniyle (daha önce geçirilmiş iltihabi bir hastalık gibi) sperm hücreleri dışarı çıkamaz.

b. Hücre yapımının olmaması: Burada ise sperm hücresinin yapımı ya hiç olmamakta, ya da hücre olgunlaşması tamamlanamadığı için olgun sperm hücresi bulunmamaktadır. Bu tip azospermi pek çok nedenden olabilir. Örn; inmemiş testis, genetik kaynaklı hatalar gibi.

1.5.1.2. İmmotil sperm

Erkeğin menisinde hareketli sperm hücrelerinin olmayışıdır. Burada hücrelerin kuyruk yapısında bir anormallik söz konusudur. Hücre sayısı değişik olabilir. Burada, iki durum söz konusudur:

1. Hücrelerin hepsi ölüdür
2. Hücrelerin bir kısmı canlıdır fakat hareket yeteneğini kaybetmiştir.

1.5.1.3. Oligospermi

Sperm hücrelerinin sayı olarak azlığını ifade eder. Eğer, sperm hücre sayısı 20 milyon/ml den az ise oligospermi tanısı konur.

1.5.1.4. Astenospermi

Sperm hücrelerinin hareket azlığını ifade eder. Burada:

1. Hızlı ileri hareketli (hiperaktif)
2. Yavaş hareketli
3. Yerinde hareketli
4. Hareketsiz şeklinde bir sınıflandırma vardır.

1.5.1.5. Teratospermi

Bazen sperm başı değişik şekillerde olur. Eğer anormal şekilli sperm hücrelerinin oranı hemen hemen % 100 ise teratospermiden bahsedilir.

1.5.1.6. Aglutinasyon: (Kümeleşme)

Sperm hücrelerinin baş, kuyruk gibi bölgelerinden irili ufaklı kümeler oluşturmasıdır. Bu durumda sperm hareket etse bile yerinden ayırlamadığı için yumurta dölleme kabiliyetini kaybetmiştir.

1.6. Apoptozis ve Nekrozis

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Erdoğan, 2003; Akşit, 2008). Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (Akşit, 2008).

Apoptozis, hücrenin yaşam devri boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden sürekli olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir (Cooper, 1994). Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozis yoluyla gerçekleşir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (Erdoğan, 2003; Nishihara, 2003; Akşit, 2008).

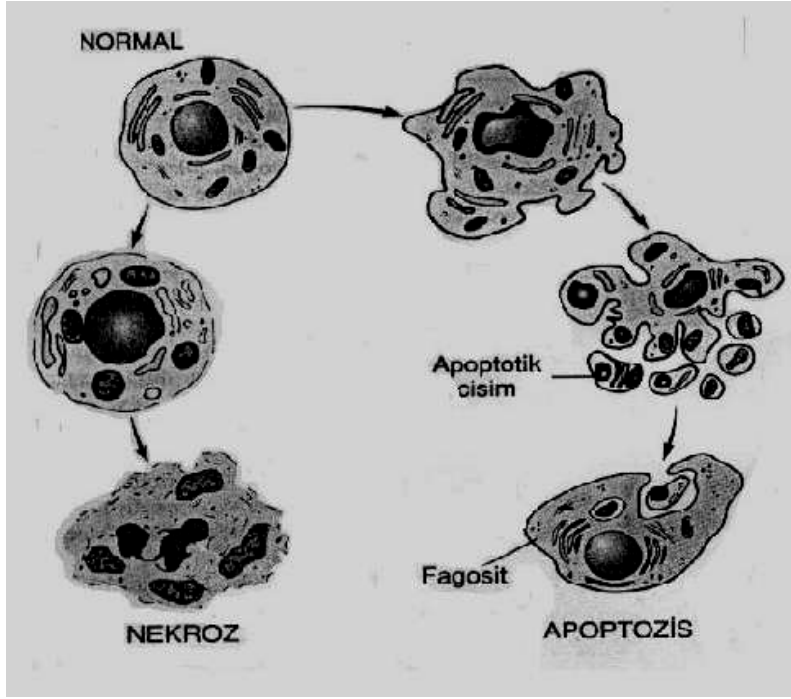
Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmış, programlanmış hücre ölümü terimi ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ise ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Kerr ve ark.,

1972). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Köken olarak "apo-TOE-sis" 'den gelmektedir ve eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamını taşır (Yılmaz, 2005). Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (Cummings ve ark., 1997). Apoptozis ve mitozis dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (Cohen ve ark., 1993; Cummings ve ark., 1997). Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozisi, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir . Daha sonra, yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkileri incelenmiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediği, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiği bulunmuştur. Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (Cohen ve ark., 1993).

Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla düzenlenir (Cohen ve ark., 1993). Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi

için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (Yılmaz, 2005). Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir (Gavrieli ve ark., 1992).

Apoptozis, klasik hücre ölüm şekli olan nekrozisden birçok özelliği açısından oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekrozis, fizyolojik bir ölüm şekli değildir. Apoptozis ise hem fizyolojik hem patolojik şartlarda meydana gelmektedir. Apoptozis morfolojik olarak kendine özgü bir yapı içerir (Cooper, 1994). Nekroziste, hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptoziste tam tersine hücre küçülür. Nekroziste, kromatin paterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ancak apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır (Erdoğan, 2003). Nekrotik hücrenin plazma membranı, bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına doğru hücre içi materyalinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intakttır ve üzerinde küçük cepçikler oluşur. Nekrotik hücre lizise uğrarken apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Bunlar zar ile kaplıdır, değişken miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerir (Cooper, 1994). Nekroziste hücre içeriği dış ortama salındığından enflamasyon reaksiyonu uyarılır. Apoptoziste ise apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden enflamasyon oluşmaz (Erdoğan, 2003) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3: Apoptozis ile Nekrozis arasındaki farklar (Erdoğan, 2003)

1.6.1. Apoptozisin morfolojisi

Apoptoziste ana morfolojik olay, nukleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır (Akşit, 2008). İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (Walker ve ark., 1999). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (Öktem ve ark., 2001).

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, bir

kaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır (Wijsman, 1993). Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskobunda incelendiğinde, hücreler etrafında açık bir parlama şeklinde görülmektedir (Öktem ve ark., 2001).

Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Akşit, 2008). Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Öktem ve ark., 2001).

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskobunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklandmalar oluşur ki bu yapı 'zeiozis' olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (Tomatır, 2003).

Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve

fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptozis sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosit edilirler. Apoptozis 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptozisde önemli bir role sahiptir (Saraste ve ark., 2000). Elektron mikroskopunda apoptozis esnasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan “Apoptozis İndükleyici Faktör” salınımı, gerçekleştiği bildirilen morfolojik değişikliklerdendir (Akşit ve ark., 2008).

1.6.2. Apoptozisin mekanizmaları

Hücresinin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır (Erdoğan, 2003).

Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer olarak başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık

gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüslerde (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir (Erdoğan, 2003; Akşit ve ark., 2008). Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Öktem ve ark., 2001)

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekroz faktör, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (cmec gibi) yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler hafif dozlarda apoptoz meydana getirirler. Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir (Öktem ve ark., 2001; Akşit ve ark., 2008).

Apoptozis süreci; DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişı (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir. Apoptoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteinidir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozisde gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (Akşit ve ark., 2008).

1.6.3. Apoptozisin regülasyonu

Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptozis inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozisi uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır (Nagata, 1997). Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptozis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler (Akşit ve ark., 2008). AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom c apoptozisin en son basamağında görev alır. Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks "apoptosom" olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (Nagata, 1997; Tomatır, 2003).

1.6.4. Apoptozisin indüklenmesi

Apoptozis hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (APO-1 ve CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri, hücre membranında bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas; lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokardda bulunur. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile interaksyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar (Akşit ve ark., 2008).

1.7. Sperm DNA Hasarları

Çeşitli iç ve dış nedenlerden dolayı DNA’da farklı düzeyde hasarlar meydana gelmektedir. Spermatozoon DNA’sı hasarına insan ve fare, at, domuz, balık gibi pek çok hayvan türünde rastlanmaktadır. DNA’da oluşan bu hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonunun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi, kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları, DNA’da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır.(Türk ve ark., 2005).

Sperm kromatin yoğunlaşması, spermatogoniadan olgun sperm oluşmasına kadar geçen sürede (spermatogenez), proliferasyon ve hücre farklılaşmalarının olduğu kompleks ve dinamik bir süreçte meydana gelmektedir (Sakkas ve ark., 2002). Spermatogenezis, mayoz, mitoz, sitoplazmik yapıdaki değişiklikler, yuvarlak spermatidlerde haploid geçiş proteinleri ile somatik histonların yer değişimi ve takiben geçiş proteinleri ile protaminlerin uzamış spermatidde yer değişimi olaylarını da içermektedir. Pozitif yüklü protamin ve negatif yüklü DNA iskeleti arasında, moleküller arası kuvvetli etkileşim DNA’nın bazik karakterli protamine bağlanmasını kolaylaştırarak kromatin yoğunlaşmasına sebep olur (Sakkas ve ark., 1999).

Anormal kromatin organizasyonu infertil erkeklerde, fertil erkeklere göre daha sık görülmektedir (Hammadeh ve ark., 1999). Sperm kromatin hasarının oluşmasını sağlayan üç mekanizma olduğu düşünülmektedir.

1. Spermatogenesis süresince oluşan hasarlı kromatin yoğunlaşması, yani

protamin gen kompleksindeki değişiklikler.

2. Artan apoptozis

3. Reaktif oksijen türleri

Sperm kromatin hasarının belirlenmesinde DNA kromatin olgunlaşması/DNA bütünlüğüne bakılmaktadır (Sakkas ve ark., 1999). Bu işlem için geliştirilmiş olan testlerin temelini kromatin yapısındaki hasarların DNA yapısındaki kararlılığı artarak bozmasına ve denature eden strese olan duyarlılığın artması sebep olmaktadır. İnfertil erkeklerde sperm anomalileri, kötü paketlenen DNA, artan DNA zincir kırıkları ve asitle indüklenen DNA denatürasyonuna olan duyarlılık fertil erkeklerin spermatozoonlarında daha fazladır.

1.8. Spermatogenez ve Apoptozis

Normal spermatogenez sırasında, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar. Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada hücre ölümüne yol açar. Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir. Testiste devamlı olarak kendiliğinden apoptozis gerçekleştiğı belirlenmiştir (Yılmaz, 2005). Testiste, hasarlı germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin %75'i apoptozise maruz kalır. Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre elenmesi, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (Yılmaz, 2005).

Testiste, germ hücresi apoptozisinin hormonlar gibi çeşitli dış faktörler ile kontrol edildiğinin bilinmesine (Dunkel ve ark., 1997) karşın fizyolojik önemi konusunda tam bir bilgi yoktur. Fizyolojik olarak germ hücresi ölümü yaşam boyu sürer (Bartke, 1995; Billig ve ark., 1995; Dunkel ve ark., 1997). Radyasyon (Henriksen ve ark., 1995, 1996) veya toksinlere maruz kalma (Allard ve ark., 1996; Schlegel ve ark., 1996; Lee ve ark., 1997) gibi dış etkiler de germ hücresi apoptozisine neden olur. Bunun yanında Fas-FasL etkileşiminin de germ hücresi apoptozisine neden olduğu belirlenmiştir (Lee ve ark., 1997). Bu sistem, bir çok hücre tipinde apoptozisin fizyolojik düzenleyicisidir (Henriksen ve ark., 1995, 1996).

Apoptozisin, normal bir spermatogenez sırasında varsayılan iki rolü vardır; germ hücre sayısını Sertoli hücrelerinin destekleyebileceği bir sayıda tutmak ve olası anormal spermatozoonları seçici olarak azaltmaktır (Sakkas ve ark., 2003, 2004). Ancak hasarlı apoptotik germ hücrelerinin uzaklaştırılması başarısız olursa semen içinde anormal sperm sayısı yükselir ve düşük fertilitateye neden olur (Anzar ve ark., 2002).

Spermatogenez esnasında germ hücrelerinin apoptozisinin kontrolü özellikle önemli bir noktadır. Bu kontrol germ hücreleriyle yakından ilişkili Sertoli hücrelerinden türevlenen sinyaller ile gerçekleştirilir. Bu sinyallerin anlaşılması genetiği değiştirilmiş hayvanların spermatogenik bozukluklarının çalışılmasıyla ortaya çıkar. Diğer hücre tipleri gibi, erkek germ hücreleri dış sinyallere hücreler arası sinyalleme yollarını kendi iç çevrelerinde aktive ederek eninde sonunda kendi kaderlerini belirleyen yanıtı verirler. Bcl-2 ailesi proteinleri germ hücrelerinin kaderlerini

belirleyen bir sinyalleme yoludur. Bu ailenin bazı üyeleri hücrelerin hayatta kalmasını düzenler (örneğin; Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1 ve A1) diğerleri de antogonistik çalışır (Bax, Bak, Bim) (Print ve ark, 2000).

Son yıllarda seminifer epitelyum döngüsünde kendiliğinden programlı hücre ölümü meydana geldiği açık bir hale gelmiştir. İndüklenmiş germ hücre apoptozisi spermatogenik döngünün spesifik aşamalarında açığa çıkarılmıştır ve spermatogenesis sırasında germ hücre ölümünün hücre dışı kontrolü henüz belgelere dayandırılmıştır (Levy ve Seinfer-Aknin, 2001).

Ancak, ejakule spermlerdeki apoptozisin biyolojik önemi bilinmemektedir (Ricci ve ark., 2002). Ejakule spermelerde görülen apoptozisin önceden başlamış apoptozisin kalıntısı mı yoksa ejakulasyon sonrasındaki süreçte başlamış bir apoptozis mi olduğu konusu da açık değildir (Lachaud ve ark., 2004).

Bu bilinenlere dayanarak **tezin amacı**; semen analizleri sonucu normal ve düşük düzeyli olarak belirlenmiş insan spermelerinde; üç farklı semen parametresini (konsantrasyon, hareketlilik, morfoloji) esas alarak; apoptotik spermelerin iki farklı yöntemle (Hoechst 33342 ve TUNEL) belirlenmesi ve karşılaştırılması, propidium iodide ile nekrotik spermelerin belirlenmesi, semen parametreleriyle apoptozis ve nekrozis arasındaki korelasyonların istatistik yöntemlerle belirlenmesi ve apoptozis-nekrozis ilişkisinin değerlendirilmesidir.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Çalışma materyali insan semen örnekleri, İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen gönüllü hastalardan alınmıştır. Bu hastaların mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından semen analizi için alınan örneklerden arta kalan semenler çalışmada kullanılmıştır. Bunun için İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurul’undan onay alınmıştır (Ek 1). Örnek alınan her hastaya örneklerin kendi rızasıyla alındığına dair daha önceden hazırlanan “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” okutulup imzalatılmıştır. Alınan semen örnekleri yaşları 20 ile 35 arasında 13 erkekten en az 3 günlük cinsel perhiz sonrası alınmıştır. Temel semen parametreleri, sperm konsatrasyonu, hareketlilik, canlılık ve morfoloji dahil WHO (1999) kriterlerine göre İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında değerlendirilmiştir.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Semen örneklerinin hazırlanması

İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarından alınan örnekler 37°C’de 30 dakika içerisinde çalışmanın yapıldığı Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboturatuvarına ulaştırılmıştır. Laboratuara getirilen semen örneklerinde spermleri prostat sıvısından ayırmak için yıkama işlemleri

gerçekleştirilmiştir. Bunun için; 7 ml salin imidizol'e (SAIM) 1 ml semen örneği eklenerek soğutmalı santrifüjde (Sigma, 3K30) +4°C'de 1200 rpm'de 20 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatantın atılmasından sonra pellet SAIM ile 1:2 oranında seyreltilmiştir (Ozenci ve ark., 2003; Cayli ve ark., 2004). Resüspanse edilmiş bu örnekler morfolojiyi, apoptozisi ve nekrozisi belirlemek üzere, amaca uygun şekillerde hazırlanmıştır.

2.2.2. Sperm yapısının gösterilmesi

Spermilerin morfolojisini incelemek için, SAIM ile resüspanse edilmiş sperm örneklerinden alınan eşit miktarlardaki damlalar lam üzerine yayılarak havada kurutuldu ve hemen ardından %4'lük formalin ile tespit edildi. Boyama işlemlerine kadar +4°C'de saklanan örnekler PBS ile yıkandıktan sonra Hematoksilen-Eozin ile boyandı ve balzam ile kapatıldıktan sonra Leica DM4000 B araştırma mikroskopunda incelenerek Olympus DP71 video kamera ile fotoğrafları çekildi.

2.2.3. Spermelerde apoptozisin belirlenmesi

Spermlerdeki apoptozisin belirlenmesi için iki farklı yöntem kullanıldı; 1. **Hoechst 33342** (Ho 342) ile floresan işaretleme, 2. **TUNEL** (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphate nick end labeling) uygulaması.

2.2.3.1. Hoechst 33342 ile floresan işaretleme

SAIM ile resüspanse edilmiş sperm örneklerinden alınan eşit miktarlardaki damlalar lam üzerine yayılarak havada çabucak kurutuldu ve Pap-pen ile çalışılacak olan alanlar işaretlendi. Tespit edilmemiş bu

örneklerin hemen boyama işlemleri başlatıldı. Hoechst 33342 (Bisbenzimide) (Applichem) 1 mg/10 ml PBS (pH 7.4) içinde stok hazırlandı ve 1:1000 PBS (pH 7.4) ile tekrar seyreltilerek kullanım solusyonu hazırlandı. Örnekler PBS (pH 7,4) ile üç kez 5dk yıkandı. Ho342 kullanım solusyonunda 5 dk. bekletildikten sonra PBS ile üç kez 5 dk. yıkanarak hemen incelemeye geçildi. Leica DM4000 B floresan ataçmanlı mikroskopta uygun filtre ile incelenerek Olympus DP71 video kamerada eşit aralıklarla seri olarak fotoğraflandı. Her fotoğraf alanında, tüm hücreler ve floresan ışımaya gösteren hücreler ayrı ayrı sayılarak ortalama yüzde değerleri hesaplandı ve istatistik analizler uygulandı (Watkins ve ark., 1996; Zhang ve Kiechle, 1997; Sara ve ark., 2003).

2.2.3.2. TUNEL uygulaması

SAIM ile resüspanse edilmiş sperm örneklerinden alınan eşit miktarlardaki damlalar (10 µl) pap-pen ile işaretli lisinli lamlara konuldu. Örneklerin üzerine 2-3 damla PBS (pH 7.4) damlatıldı. Örnekler nemli odada +4°C de bir gece bekletildi. Ertesi gün örneklerdeki PBS uzaklaştırılarak %4'lük formalin ile 20 dk oda sıcaklığında tespit edildi. Üç kez PBS ile yıkandıktan sonra kurutuldu ve TUNEL uygulaması yapıncaya kadar hava almayacak şekilde +4°C'de saklandı. TUNEL yöntemi, DNA kırıklarının (nick) terminal deoksinukleotidil transferaz enzimi (TdT) ile belirlenmesi mantığına dayanır. TdT enzimi, işaretli nukleotidlerin DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanmasını katalizler. TUNEL kiti (ApopTag® Plus Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon Cat # S7101) uygulanmadan önce +4°C'deki örnekler oda sıcaklığına getirildi ve iki kez 5 dk. PBS ile yıkandı. Ardından, DNA'ya

bağlı protein moleküllerini ortadan kaldırmak için spermier oda sıcaklığında proteinaz K (Chemicon, 21627) ile 15 dakika inkübe edildi. Ardından endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için örnekler %0,3'lük H₂O₂ ile 5 dakika muamele edildi. Dengeleme tamponu (Chemicon, 90416) uygulaması ve PBS ile yıkamanın ardından örnekler TdT enzim (Chemicon, 90418) ile nemli odada ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi ve 10 dk durdurma/yıkama tamponu (Chemicon, 90419) ile 30 dakika yıkandı. PBS ile kısaca yıkanan örnekler nemli odada ve oda sıcaklığında 30 dakika Anti-digoksigenin konjugat (Chemicon, 90420) ile 30 dakika inkübe edilerek dört kez 2'şer dakika PBS ile yıkandı ve DAB (diaminobenzidin) substrat (Chemicon, 90423) ile reaksiyon görülünceye kadar oda sıcaklığında muamele edildikten sonra tekrar PBS ile 2 kez yıkandı. Karşıt boya olarak metil yeşili (Sigma M8884) kullanıldı. Örnekler %0.5'lik metil yeşili ile 10 dakika boyandıktan sonra distile su ile yıkandı ve ardından n-bütanol (Riedel 24124) ile 30 saniye inkübe edilerek ksilolden geçirildi ve lamel kapatılarak Leica DM4000 B araştırma mikroskobunda incelenerek Olympus DP71 video kamerada fotoğraflandı. Her fotoğraf alanında, tüm hücreler ve TUNEL + hücreler ayrı ayrı sayılarak ortalama yüzde değerleri hesaplandı ve istatistik analizler uygulandı ((Bacetti ve ark., 1996; Anzar ve ark., 2002; Sakkas ve ark., 2002; Lachaud ve ark., 2004; Liu ve ark., 2004; Oosterhuis ve ark., 2004; Sakkas ve ark., 2004; Brugnon ve ark., 2006; Balcan ve ark., 2007).

2.2.4. Nekrozisin Belirlenmesi

Spermlerdeki nekrozisin belirlenmesi için **Propidium iodide** (PI) ile floresan işaretleme yapıldı (Sara ve ark, 2003; Siddighi ve ark., 2004). Bunun için, SAIM ile resüspanse edilmiş sperm örneklerinden alınan eşit miktarlardaki damlalar lam üzerine yayılarak havada çabucak kurutuldu ve pap-pen ile çalışılacak olan alanlar işaretlendi. Tespit edilmemiş bu örneklerin hemen boyama işlemleri başlatıldı. Propidium iodide (Applichem) 1 mg/10 ml PBS (pH 7.4) içinde stok hazırlandı ve 1:1000 PBS (pH 7.4) ile tekrar seyreltilerek kullanım solusyonu hazırlandı. Örnekler PBS (pH 7,4) ile üç kez 5dk yıkandı. PI kullanım solusyonunda 5 dk. bekletildikten sonra PBS ile üç kez 5 dk. yıkanarak hemen incelemeye geçildi. Leica DM4000 B floresan ataçmanlı mikroskopta uygun filtre ile incelenerek Olympus DP71 video kamerada eşit aralıklarla seri olarak fotoğraflandı. Her fotoğraf alanında, tüm hücreler ve floresan ışımaya gösteren hücreler ayrı ayrı sayılarak ortalama yüzde değerleri hesaplandı ve istatistik analizler uygulandı.

2.2.5. Apoptozis ve nekrozisin karşılaştırılması

Apoptozis ve nekrozisin aynı anda gösterilmesi ve istatistik olarak karşılaştırılabilmesi için hücreler önceki şekilde hazırlanıp ardışık olarak Ho342 ve PI ile muamele edildi. Fotoğraf çekimlerinde aynı bölgeler Ho342 ve PI için uygun filtreler seçilerek ard arda fotoğraflandı. Ayrıca, aynı bölgelerin aydınlık alan fotoğrafları da alındı. Seri olarak alınan fotoğraflardan sayımlar yapılarak ortalama yüzde değerleri hesaplandı ve istatistik analizler uygulandı.

2.2.6. İstatistiksel uygulamalar

İstatistiksel analizler için; Ho 342 ile floresan ışıma yapan ve TUNEL + reaksiyon gösteren apoptotik spermlerin sayımı ve PI ile floresan ışıma yapan nekrotik hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Bu amaçla, her bir örnek için 9-14 alan ve ortalama 200 hücre taranarak alandaki hem tüm spermler ve hem de apoptotik ve/veya nekrotik spermler sayıldı. Her hasta için apoptotik/nekrotik spermlerin tüm hücrelere oranı hesaplanarak yüzde değerleri bulundu. Yapılan işlemler:

1. Apoptozis belirlemede kullanılan iki tekniğin (Ho342 ve TUNEL) karşılaştırılarak korelasyon olup olmadığının %95 güven aralığına göre excelde hazırlanmış grafiklerle kontrolü.
2. Semen parametreleri (sperm konsantrasyonu, sperm hareketliliği, sperm morfolojisi) ile sperm apoptozisi ilişkisinin **normal** ve **düşük düzeyli** olarak sınıflandırılan iki hasta grubunda “Student t Testi” ile %95 güven aralığına göre karşılaştırılması.
3. PI yöntemiyle belirlenmiş sperm nekrozisinin %95 güven aralığına göre excelde hazırlanmış grafiklerle istatistiksel değerlendirmesi.
4. Semen parametreleri (sperm konsantrasyonu, sperm hareketliliği, sperm morfolojisi) ile sperm nekrozis ilişkisinin **normal** ve **düşük düzeyli** olarak sınıflandırılan iki hasta grubunda “Student t Testi” ile %95 güven aralığına göre karşılaştırılması.
5. Apoptozis-Nekrozis İlişkisinin istatistiksel karşılaştırmaları.

3. BULGULAR

3.1. Semen Analizleri

Hastaların Tepecik SSK Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında yapılan semen analizleri, konsantrasyon (M/ml), hareketlik (%) ve morfoloji (%) parametreleri açısından WHO (1999) kriterleri referans değerlerine göre gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.1). Semen analiz sonuçlarına göre her parametre için ayrı ayrı, **normal** ve **düşük düzeyli** olmak üzere iki grup oluşturulmuştur.

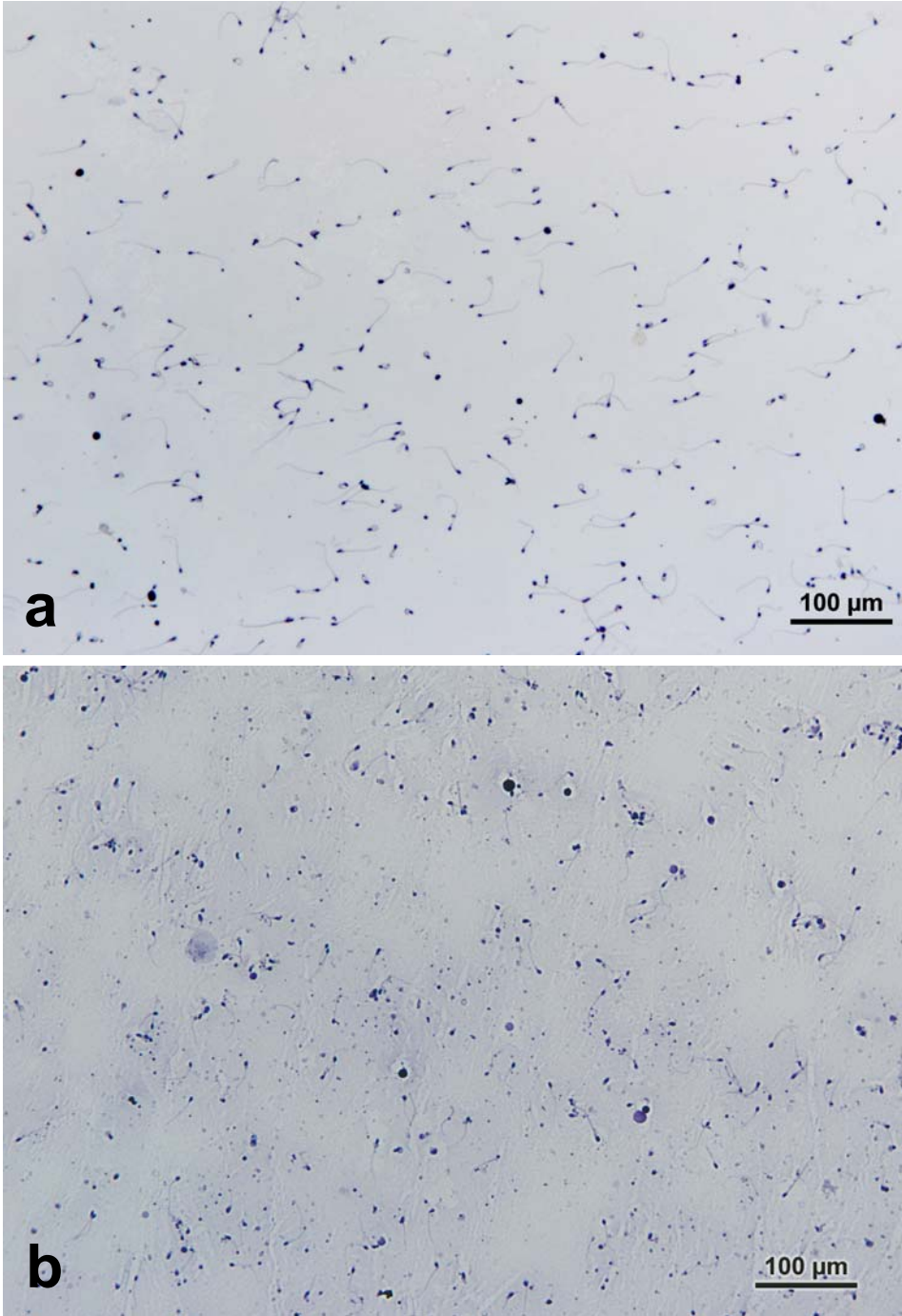
3.2. Sperm Morfolojik Yapısı

Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanmış sperm yayma preparatları konsantrasyon, hareketlilik ve morfoloji parametrelerine göre karşılaştırılmıştır. **Konsantrasyon** bakımından karşılaştırıldığında; normal gruba dahil örnekler düzgün dağılmış bol sperme sahipken (Şekil 3.1a), düşük grubun örnekleri az sayıdadır (Şekil 3.1b). **Hareketlilik** bakımından incelendiklerinde; hareketli sperm sayısı normal değerlerde olan örneklerde, spermelerin büyük çoğunluğu uzun dalgalı bir kuyruk ile düzgün yapılı orta-parça (boyun) içermektedir (Şekil 3.2a). Hareketli sperm sayısı normal değerlerden düşük örneklerin spermelerinde çeşitli kuyruk anomalileri gözlenmiştir. Örneğin, tamamen düz veya halka şeklinde kıvrılmış bir kuyruk (Şekil 3.2b), mitokondrilerin yer aldığı orta parçada (boyunda) incelmeye vb. hasarlar (Şekil 3.2c,d). **Morfolojik** açıdan incelendiklerinde, boyun anomalileri dışında, küçük, uzamış veya iri baş, deforme olmuş sperm (Şekil 3.3a,b,c), çift kuyruk (Şekil 3.3d) gibi anomaliler görülür.

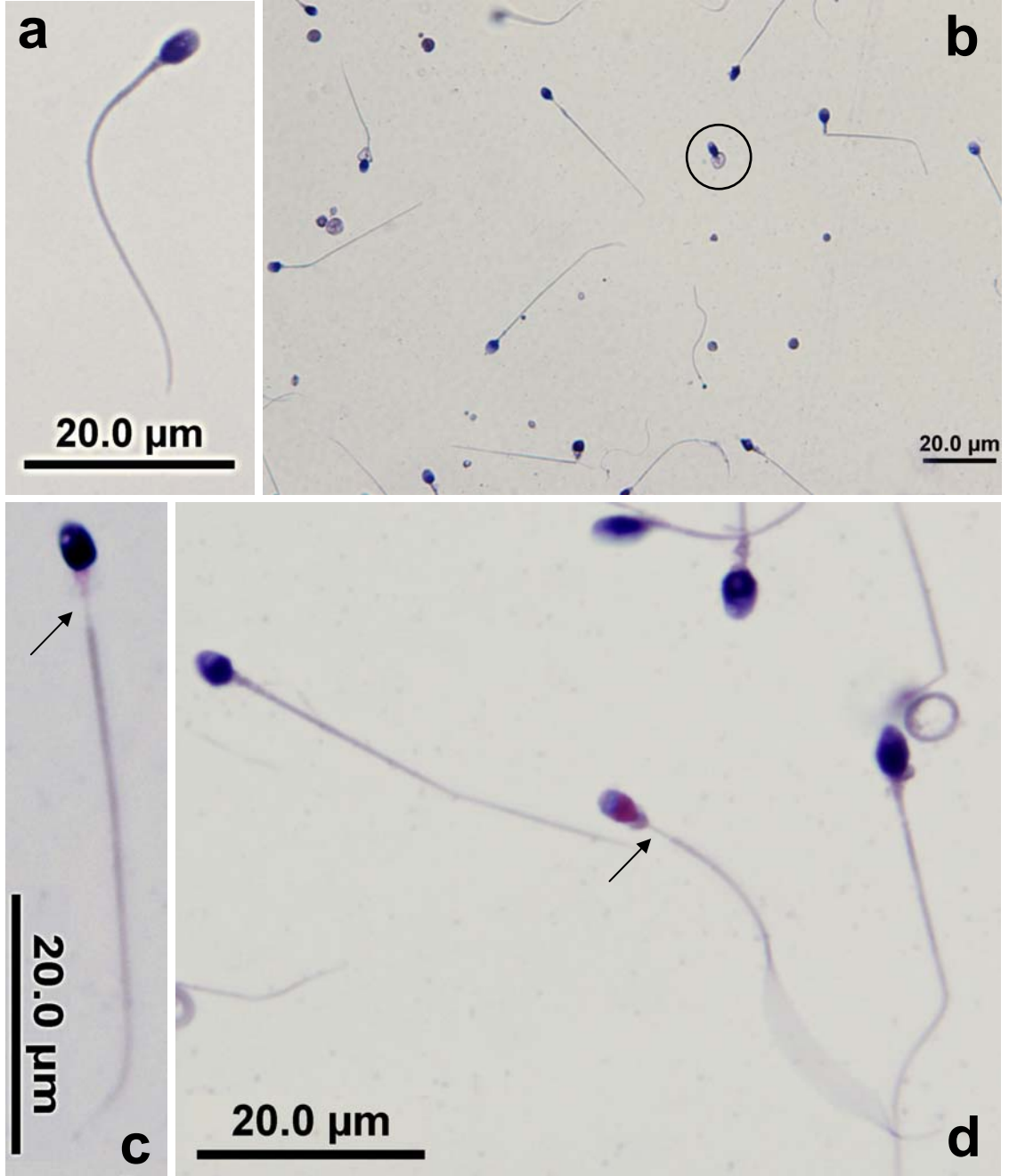
Tablo 3.1: WHO kriterleri referans değerlerine göre Tepecik SSK Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çalışılmış insan semen analiz sonuçları.

Hasta No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13
Semen Parametreleri													
Sperm Konsantrasyonu (M/ml) ≥ 20	80.00	36.20	26.50	29.80	59.60	90.30	27.10	113.10	<0.10	0.00	23.60	19.40	59.00
Sperm Hareketliliği (%) ≥ 25	45.00	20.00	35.00	40.00	0.70	34.90	7.40	30.10	0.00	0.00	5.50	5.20	33.10
Sperm Morfolojisi (%) ≥ 30 (WHO)	-	-	-	-	14.90	40.50	27.40	44.00	0.00	0.00	29.80	18.10	40.00

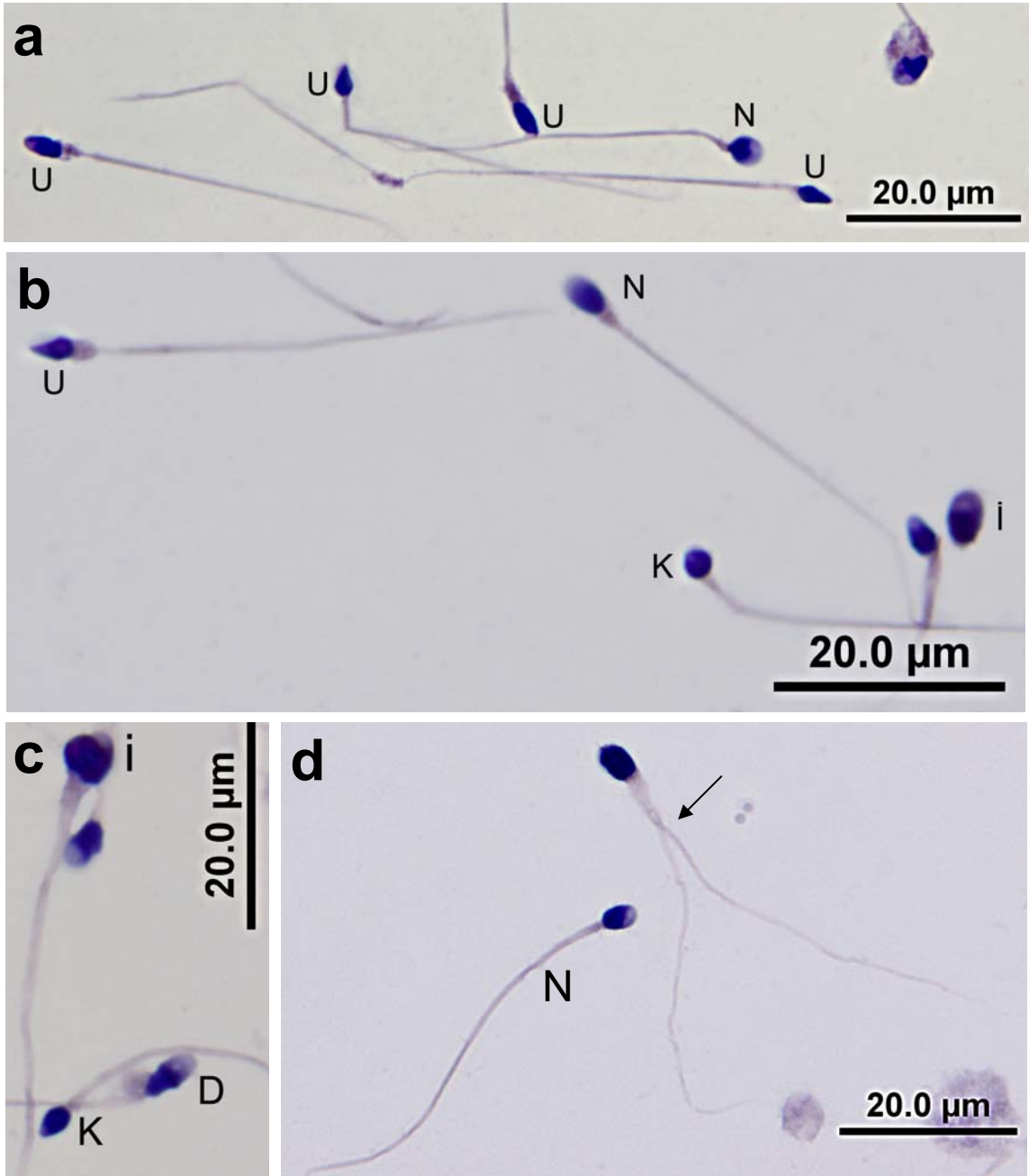
* Vasektomi ameliyatlı hastadır.



Şekil 3.1: Sperm konsantrasyonu normal (a) ve düşük (b) düzeydeki örnekler (Total, H-E).



Şekil 3.2: Sperm hareketliliği normal bireyin spermeleri dalgalı kuyruk, düzgün baş ve boyuna sahiptir (a). Sperm hareketliliği düşük olan bireylerin spermelerinde çeşitli kuyruk anomalileri görülür. b. tamamen düz veya aşırı kıvrılmış (O) kuyruk; c.,d. mitokondrilerin yer aldığı boyun bölgesinde incelmeler (→). (Total, H-E).



Şekil 3.3: Sperm morfolojisinde küçük (K), uzamış (U) veya iri baş (İ) (**a,b,c**), deforme olmuş sperm (D) (**c**) ve çift kuyruk (→) (**d**) anomalileri, N: normal sperm. (Total, H-E).

3.3. Apoptozisin Belirlenmesi

Apoptotik sperm hücrelerinin belirlenmesi için Hoechst 33342 (Ho342) ile floresan işaretleme (Şekil 3.4a) ve TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated biotinylated deoxyuridine triphosphate nick end labeling) uygulaması (Şekil 3.4b) yapılmıştır. Her iki uygulama sonucu elde edilen + reaksiyonlar sayılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

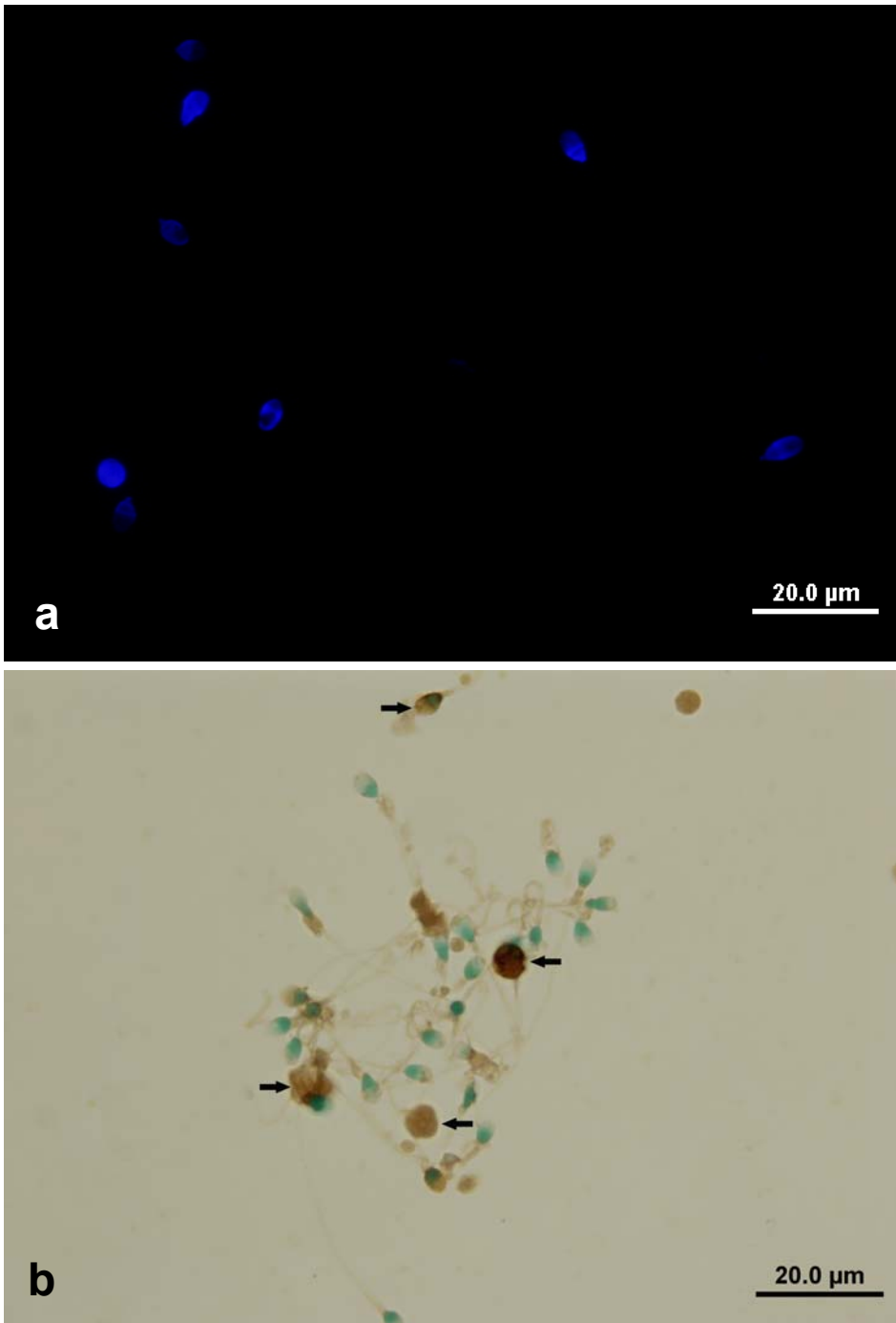
3.3.1. Hoechst 33342 ve TUNEL yöntemleriyle belirlenmiş sperm apoptozisinin istatistiksel değerlendirmesi

Ho342 ve TUNEL uygulaması ile apoptotik spermelerin normal spermilere olan oranları ve bunların hastalara göre dağılım yüzdeleri hesaplanmıştır (Tablo 3.2). Her hastaya ait bu oranlar %95 güven aralığına göre sütun grafiklerle karşılaştırılmıştır (Şekil 3.5).

Bu karşılaştırmaya göre Ho342 ve TUNEL yöntemleriyle belirlenmiş apoptotik sperm hücrelerinin sayısal değerleri TUNEL uygulamasında daha yüksek bulunmuştur. Bu değerler, hastaların yaklaşık 1/3'ünde %95 güven aralığına göre istatistiksel açıdan da önem taşımaktadır (Şekil 3.5).

3.3.2. Semen parametreleri-Sperm apoptozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Semen parametrelerinden olan sperm konsantrasyonu (M/ml), sperm hareketliliği (%) ve sperm morfolojisi (%) ile sperm apoptozisi arasında olası bir korelasyonun belirlenmesi amacıyla istatistiksel karşılaştırmalar yapılmıştır.

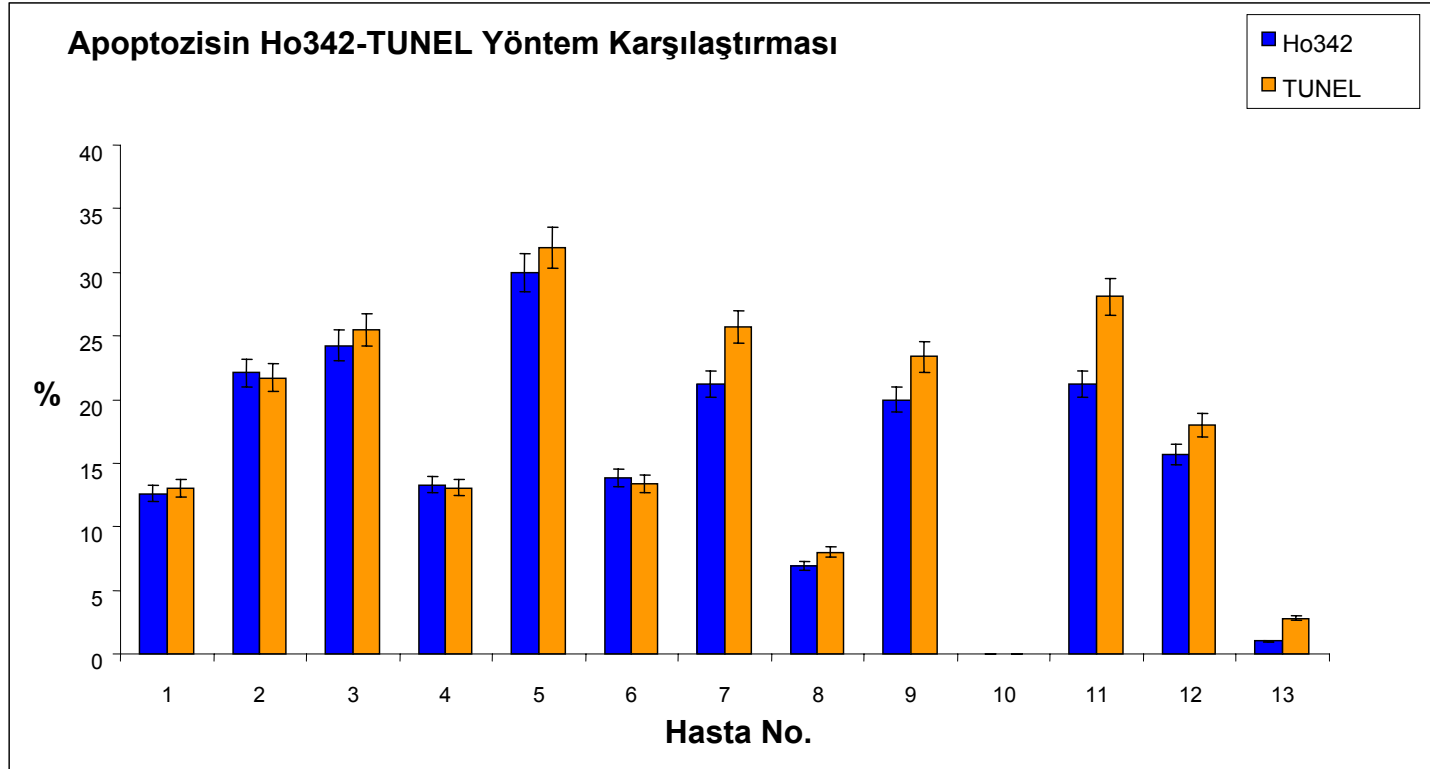


Şekil 3.4: Ho342 (a) ve TUNEL (b) yöntemleriyle apoptotik spermelerin (→) belirlenmesi

Tablo 3.2: Hoechst 33342 ve TUNEL uygulaması sonucu, apoptotik sperm oranlarının hastalara göre dağılımı (%).

Hasta No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13
Apoptotik Sperm (%)													
Hoechst 3342 ile	12.60	22.11	24.21	13.31	30.00	13.78	21.21	6.92	20.00	0.00	21.20	15.71	1.00
TUNEL ile	13.04	21.70	25.46	13.06	31.93	13.40	25.68	7.97	23.35	0.00	28.07	17.99	2.80

* Vasektomi ameliyatlı hastadır.

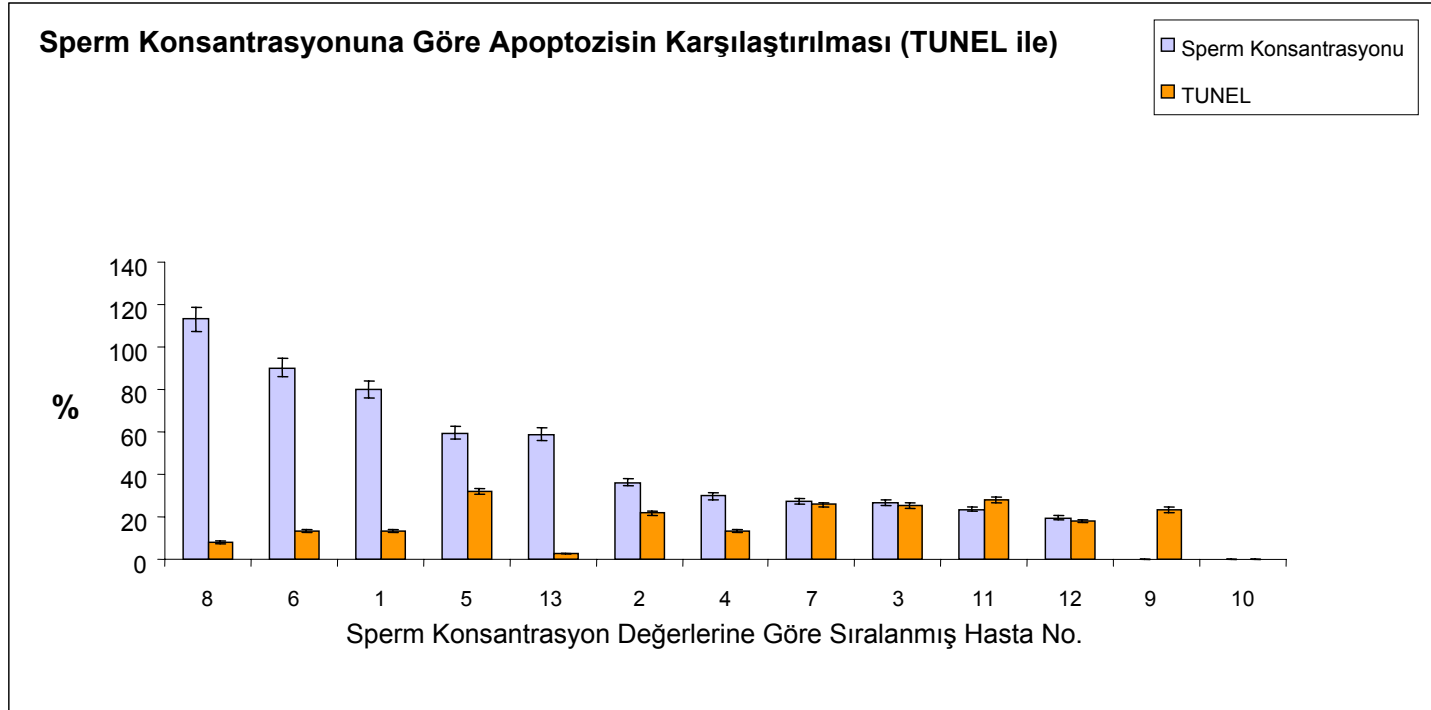


Şekil 3.5: Ho342 ve TUNEL uygulamaları ile belirlenen apoptotik sperm yüzdelерinin hastalara göre karşılaştırılması (%95 güven aralığına göre)

İlk olarak; seçilen semen parametresi ile apoptotik hücre yüzdeleri arasındaki korelasyonu belirlemek için her hastaya ait semen parametre değerleri ile apoptozis yüzdeleri aynı sütun grafiklerde gösterilmiştir. Korelasyon olup olmadığını grafiklerde daha kolay izleyebilmek için sperm konsantrasyonu en yüksek hastadan en düşüğe doğru bir sıralama yapılmıştır. **İkinci olarak**; WHO (1999) kriterleri referans değerlerine göre gerçekleştirilen semen analiz sonuçlarına dayanarak, her parametre için ayrı ayrı, **normal** ve **düşük düzeyli** olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Bu gruplara dahil edilen hastalarda TUNEL yöntemine göre belirlenen apoptotik sperm hücre yüzdeleri iki grup arasında (normal düzey-düşük düzey) Student t Testi kullanılarak %95 güven aralığına göre ($p < 0.05$) istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. 10 numaralı hasta, vaskotomi ameliyatlı olması nedeniyle (tüm semen parametreleri sıfır) hesaplamalara dahil edilmemiştir.

3.3.2.1. Sperm konsantrasyonu-Sperm apoptozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Büyükten küçüğe doğru sıralanmış sperm konsantrasyon değerleri (M/ml) ile aynı hastaların apoptotik hücre yüzdelerini içeren sütun grafikler incelendiğinde, genel olarak sperm konsantrasyonu azaldıkça apoptoziste dalgalı bir artış söz konusudur (Şekil 3.6). Sperm konsantrasyonu normal düzeyli ve düşük düzeyli olan hasta gruplarında apoptozis yüzdeleri Student t Testi ile %95 güven aralığına göre karşılaştırıldığında, p değeri 0.7464 olarak bulunmuştur ($p > 0.05$) (Tablo 3.3). Bu durumda, sperm konsantrasyonu normal ve düşük olan hasta grupları arasında apoptotik sperm yüzdesi açısından farklar istatistik açıdan önemsizdir.



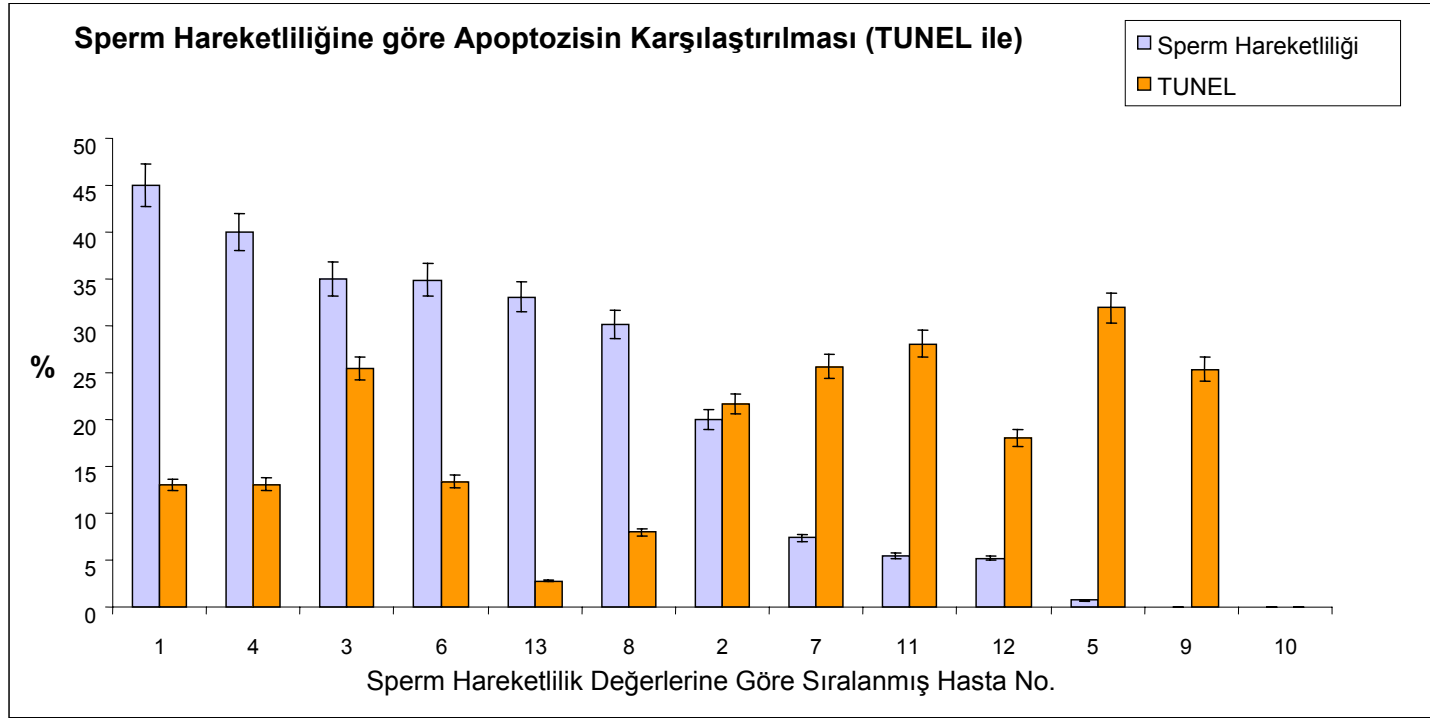
Şekil 3.6: Sperm konsantrasyon değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik sperm yüzdelерinin karşılaştırması.

Tablo 3.3: Sperm konsantrasyonu normal ve düşük grupların apoptotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri (%95 güven aralığına göre)

Sperm Konsantrasyonuna göre Apoptozis	n	Mean	SE	SD
Normal	10	18.311	3.0269	9.572
Hasta	2	20.670	2.6800	3.790
Mean difference	-2.359			
95% CI	-18.168 to 13.450			
SE	7.0950			
t statistic	-0.33			
DF	10.0			
2-tailed p	0.7464			

3.3.2.2. Sperm hareketliliği-Sperm apoptozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Büyükten küçüğe doğru sıralanmış sperm hareketlilik değerleri (%) ile aynı hastaların apoptotik hücre yüzdelerini içeren sütun grafikler incelendiğinde, genel olarak sperm hareketliliği azaldıkça apoptoziste bir artış görülmektedir (Şekil 3.7). Sperm hareketliliği normal düzeyli ve düşük düzeyli olan hasta gruplarında apoptozis yüzdeleri Student t Testi ile %95 güven aralığına göre karşılaştırıldığında, p değeri 0.0145 olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 3.4). Bu durumda, sperm hareketliliği normal ve düşük olan hasta grupları arasında apoptotik sperm yüzdesi açısından farklar istatistik açıdan önemlidir.



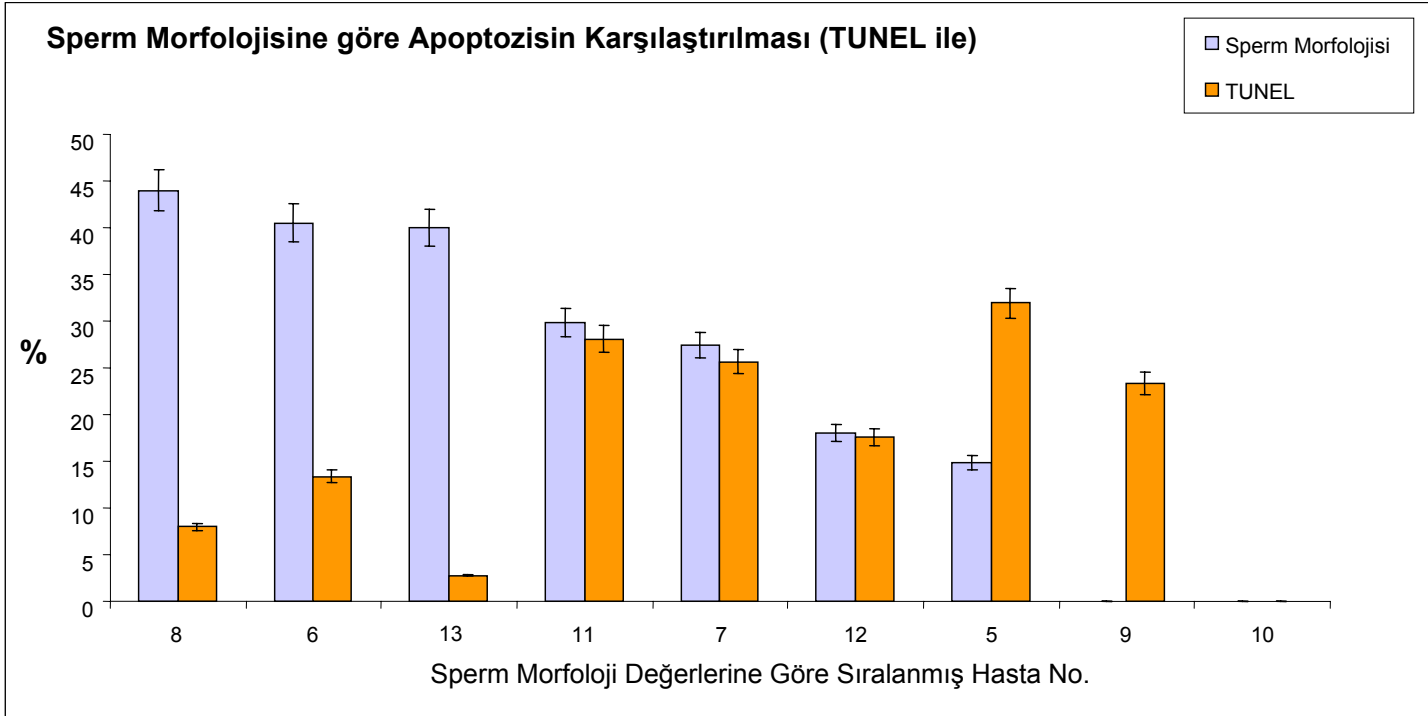
Şekil 3.7: Sperm hareketlilik değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik sperm yüzdelерinin karşılaştırması.

Tablo 3.4: Sperm hareketliliği normal ve düşük grupların apoptotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri (%95 güven aralığına göre)

Sperm Hareketliliğine göre Apoptozis	n	Mean	SE	SD
Normal	5	12.538	3.7662	8.422
Hasta	6	24.787	2.0033	4.907
Mean difference	-12.249			
95% CI	-21.427 to -3.070			
SE	4.0574			
t statistic	-3.02			
DF	9.0			
2-tailed p	0.0145			

3.3.2.3. Sperm morfolojisi-Sperm apoptozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Büyükten küçüğe doğru sıralanmış sperm morfoloji değerleri (%) ile aynı hastaların apoptotik hücre yüzdelerini içeren sütun grafikler incelendiğinde, genel olarak sperm morfolojisi bozuldukça apoptoziste büyük bir artış görülmektedir (Şekil 3.8). Sperm morfoloji yüzdeleri normal düzeyli ve düşük düzeyli olan hasta gruplarında apoptozis yüzdeleri Student t Testi ile %95 güven aralığına göre karşılaştırıldığında, p değeri 0.0040 olarak belirlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 3.5). Bu durumda, sperm morfolojisi normal ve düşük olan hasta grupları arasında apoptotik sperm yüzdesi açısından farklar istatistik açıdan önem taşımaktadır.



Şekil 3.8: Sperm morfoloji değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik sperm yüzdelерinin karşılaştırması.

Tablo 3.5: Sperm morfolojisi normal ve düşük grupların apoptotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri (%95 güven aralığına göre)

Sperm Morfolojisine göre Apoptozis	n	Mean	SE	SD
Normal	3	8.057	3.0603	5.301
Hasta	5	25.404	2.3341	5.219
Mean difference	-17.347			
95% CI	-26.723 to -7.972			
SE	3.8314			
t statistic	-4.53			
DF	6.0			
2-tailed p	0.0040			

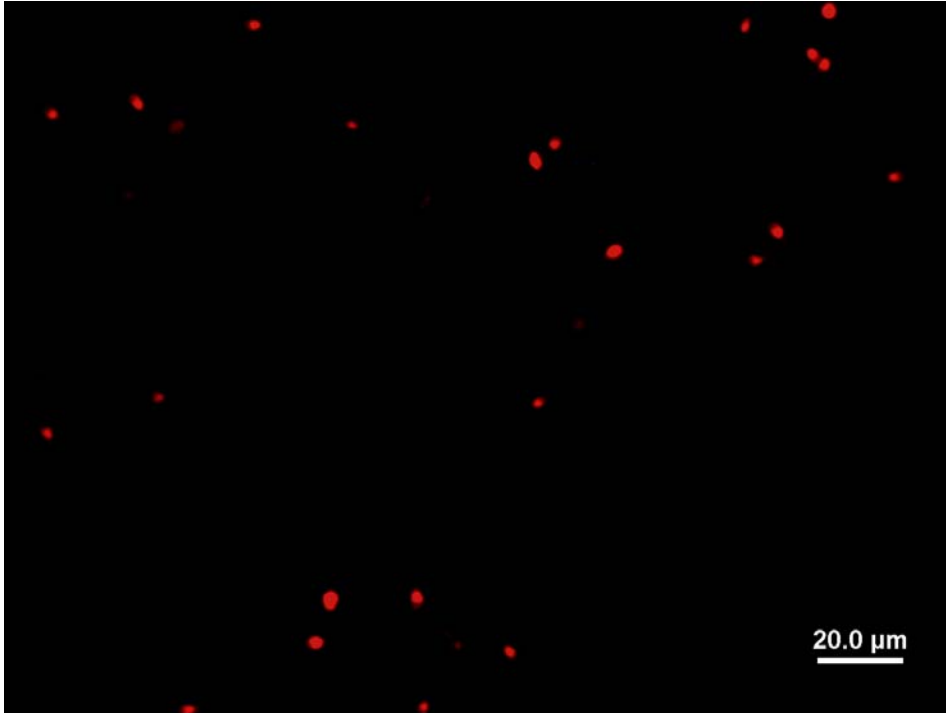
3.3.3. Apoptozis belirlemelerine ilişkin genel sonuçlar

Apoptozis belirleme yöntemlerinden ikisi, Ho342 ve TUNEL uygulamalarıyla belirlenmiş apoptotik sperm hücrelerinin sayısal değerleri TUNEL ile daha yüksek bulunmuştur.

Sperm parametrelerinden; sperm konsantrasyonu ile apoptotik sperm oranları arasında bir ilişki görülmemiştir. Sperm hareketliliği ve sperm morfolojileri ile apoptozis arasında ise ters bir korelasyon vardır. Sperm hareket yüzdeleri ile sağlıklı morfoloji yüzdeleri azaldıkça, apoptotik sperm sayısı artmaktadır.

3.4. Nekrozisin Belirlenmesi

Nekrotik sperm hücrelerinin belirlenmesi için propidium iodide (PI) ile floresan işaretleme (Şekil 3.9) yapılmıştır. Uygulama sonucu elde edilen + PI işaretlenmeleri sayılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.9: Propidium iodide yöntemleriyle nekrotik spermelerin belirlenmesi.

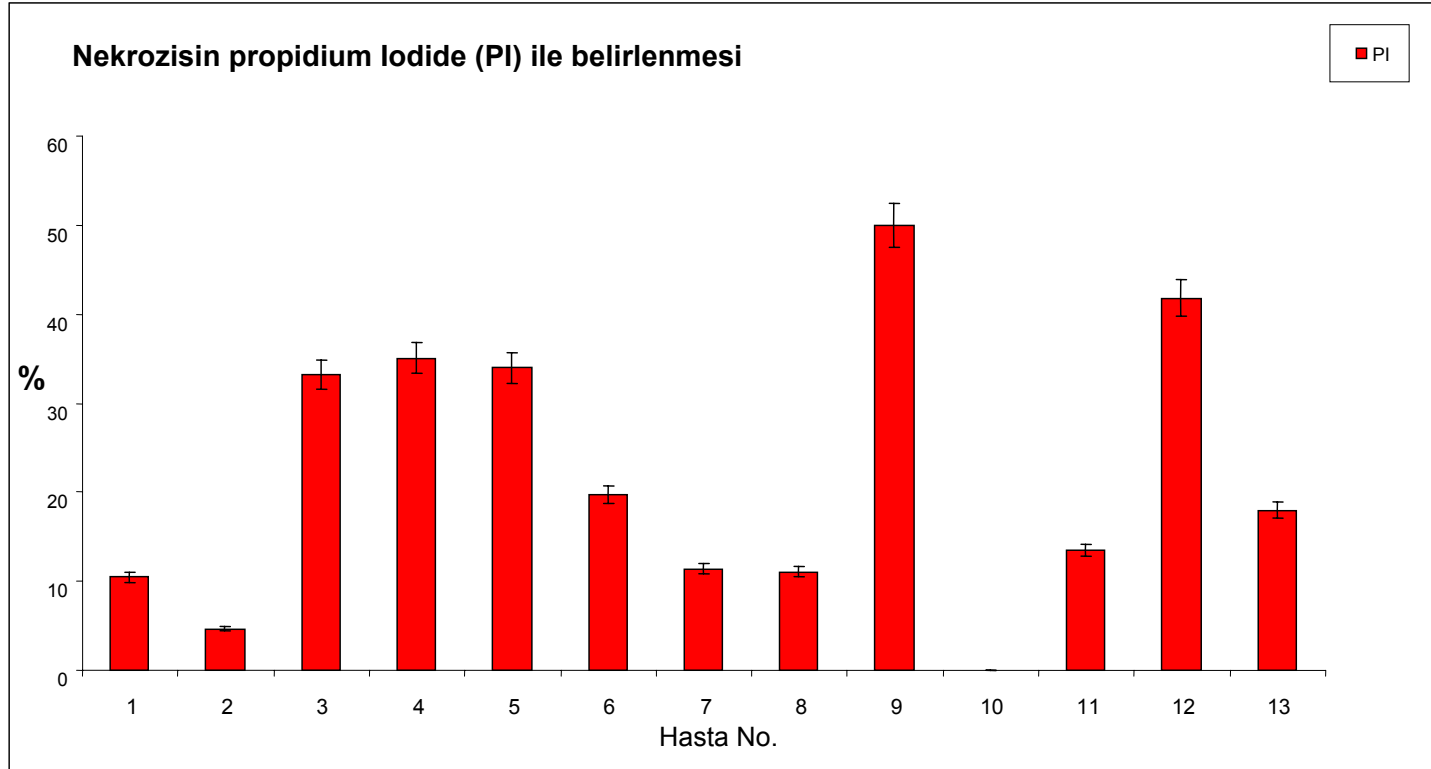
3.4.1. Propidium iodide yöntemiyle belirlenmiş sperm nekrozisinin istatistiksel değerlendirmesi

PI uygulaması ile nekrotik spermelerin normal spermlere olan oranları ve bunların hastalara göre dağılım yüzdeleri hesaplanmıştır (Tablo 3.6). Her hastaya ait bu oranlar %95 güven aralığına göre sütun grafiklerle gösterilmiştir (Şekil 3.10).

Tablo 3.6: Propidium iodide uygulaması sonucu, nekrotik sperm oranlarının hastalara göre dağılımı (%).

Hasta No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13
Nekrotik Sperm (%)													
Propidium iodide (PI) ile	10.46	4.66	33.20	35.06	34.00	19.72	11.36	11.07	50.00	0.00	13.50	41.80	17.99

* Vasektomi ameliyatlı hastadır.



Şekil 3.10: PI uygulaması ile belirlenen nekrotik sperm yüzdelerinin hastalara göre karşılaştırılması (%95 güven aralığına göre)

3.4.2. Semen parametreleri-Sperm nekrozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Semen parametrelerinden olan sperm konsantrasyonu (M/ml), sperm hareketliliği (%) ve sperm morfolojisi (%) ile sperm nekrozisi arasında olası bir korelasyonun belirlenmesi amacıyla istatistiksel karşılaştırmalar yapılmıştır.

İlk olarak; seçilen semen parametresi ile nekrotik hücre yüzdeleri arasındaki korelasyonu belirlemek için her hastaya ait semen parametre değerleri ile nekrozis yüzdeleri aynı sütun grafiklerde gösterilmiştir. Korelasyon olup olmadığını grafiklerde daha kolay izleyebilmek için sperm konsantrasyonu en yüksek hastadan en düşüğe doğru bir sıralama yapılmıştır. **İkinci olarak**; WHO (1999) kriterleri referans değerlerine göre gerçekleştirilen semen analiz sonuçlarına dayanarak, her parametre için ayrı ayrı, **normal** ve **düşük düzeyli** olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Bu gruplara dahil edilen hastalarda PI floresan işaretleme yöntemine göre belirlenen nekrotik sperm hücre yüzdeleri iki grup arasında (normal düzey-düşük düzey) Student t Testi kullanılarak %95 güven aralığına göre ($p<0.05$) istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. 10 numaralı hasta, vasktomü ameliyatlı olması nedeniyle (tüm semen parametreleri sıfır) hesaplamalara dahil edilmemiştir.

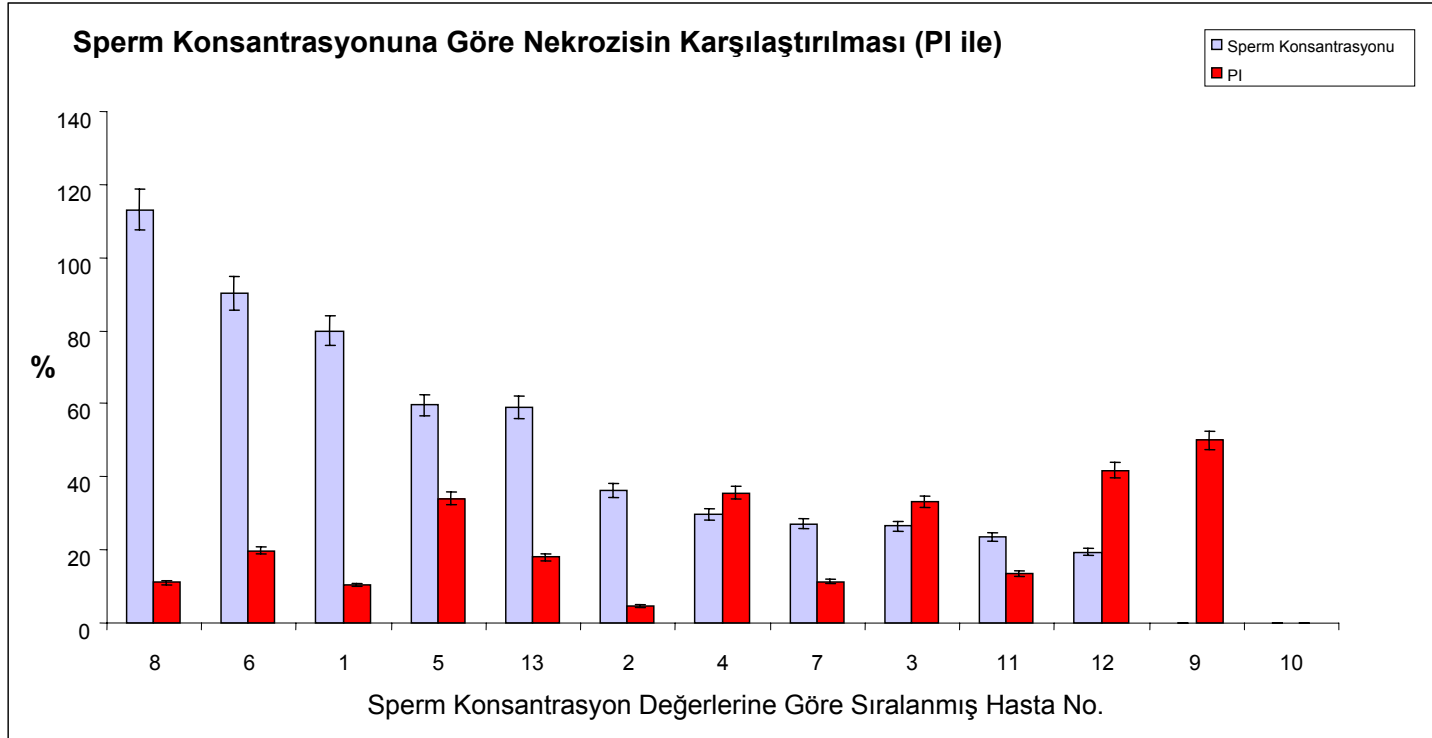
3.4.2.1. Sperm konsantrasyonu-Sperm nekrozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Büyükten küçüğe doğru sıralanmış sperm konsantrasyon değerleri (M/ml) ile aynı hastaların nekrotik hücre yüzdelerini içeren sütun grafikler

incelendiğinde, genel olarak sperm konsantrasyonu azaldıkça nekroziste artış görülmektedir (Şekil 3.11). Sperm konsantrasyonu normal düzeyli ve düşük düzeyli olan hasta gruplarında nekrozis yüzdeleri Student t Testi ile %95 güven aralığına göre karşılaştırıldığında, p değeri 0.0096 olarak bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 3.7). Bu durumda, sperm konsantrasyonu normal ve düşük olan hasta grupları arasında nekrotik sperm yüzdesi açısından farklar istatistik açıdan önem taşımaktadır.

Tablo 3.7: Sperm konsantrasyonu normal ve düşük grupların nekrotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri (%95 güven aralığına göre)

Sperm Konsantrasyonuna göre Nekrozis	n	Mean	SE	SD
Normal	10	19.156	3.5490	11.223
Hasta	2	45.900	4.1000	5.798
Mean difference	-26.744			
95% CI	-45.390 to -8.098			
SE	8.3685			
t statistic	-3.20			
DF	10.0			
2-tailed p	0.0096			



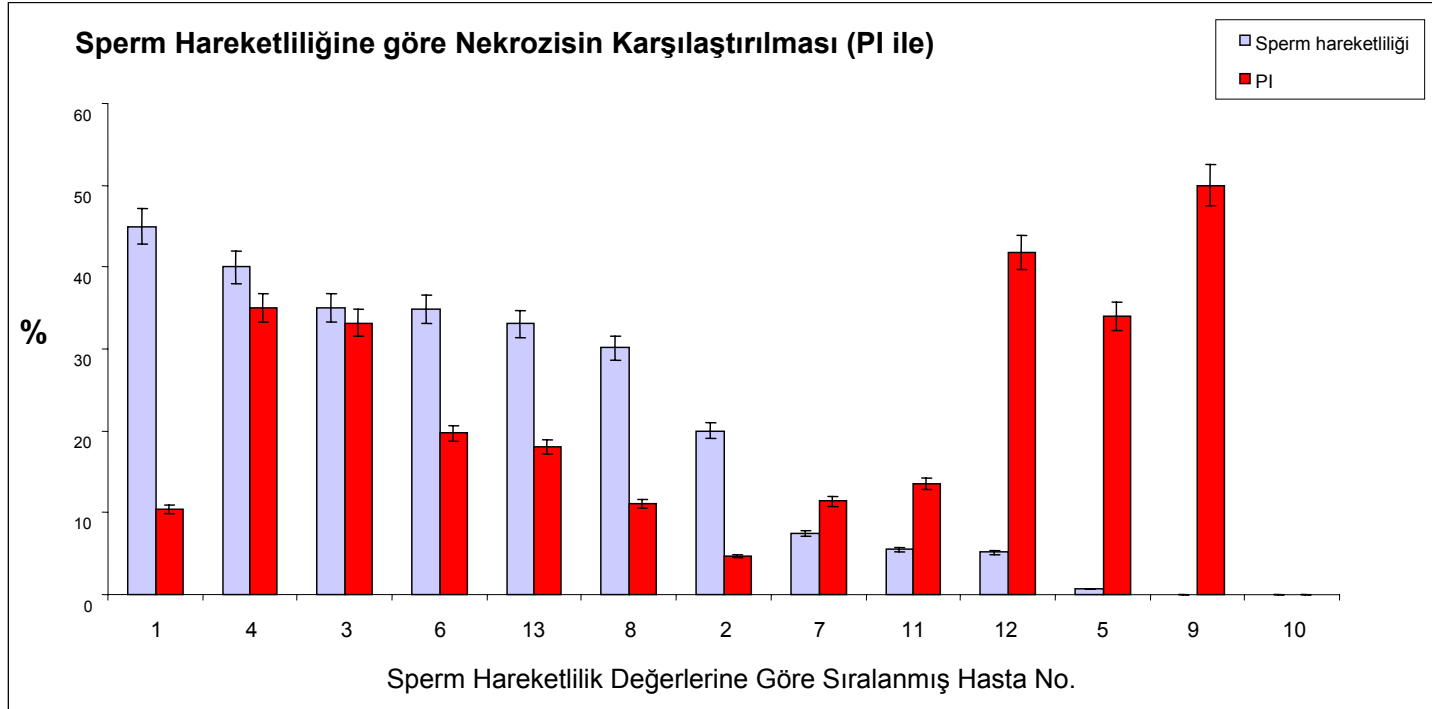
Şekil 3.11: Sperm konsantrasyon değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla nekrotik sperm yüzdelерinin karşılaştırması.

3.4.2.2. Sperm hareketliliği-Sperm nekrozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Büyükten küçüğe doğru sıralanmış sperm hareketlilik değerleri (%) ile aynı hastaların nekrotik hücre yüzdelerini içeren sütun grafikler incelendiğinde, hareketlilik değerlerinin en düşük olduğu düzeylerde nekrotik hücre oranlarında çok fazla artışlar olmakla birlikte, sperm hareketliliği ile nekrozis arasında bir korelasyon görülmemiştir. (Şekil 3.12). Sperm hareketliliği normal düzeyli ve düşük düzeyli olan hasta gruplarında nekrozis yüzdeleri Student t Testi ile %95 güven aralığına göre karşılaştırıldığında, p değeri 0.9759 olarak elde edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 3.8). Bu durumda, sperm hareketliliği normal ve düşük olan hasta grupları arasında nekrotik sperm yüzdesi açısından farklar istatistik açıdan önem taşımamaktadır.

Tablo 3.8: Sperm hareketliliği normal ve düşük grupların nekrotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri (%95 güven aralığına göre)

Sperm Hareketliliğine göre Nekrozis	n	Mean	SE	SD
Normal	6	21.250	4.3457	10.645
Hasta	6	21.505	6.9743	17.083
Mean difference	-0.255			
95% CI	-18.564 to 18.054			
SE	8.2174			
t statistic	-0.03			
DF	10.0			
2-tailed p	0.9759			



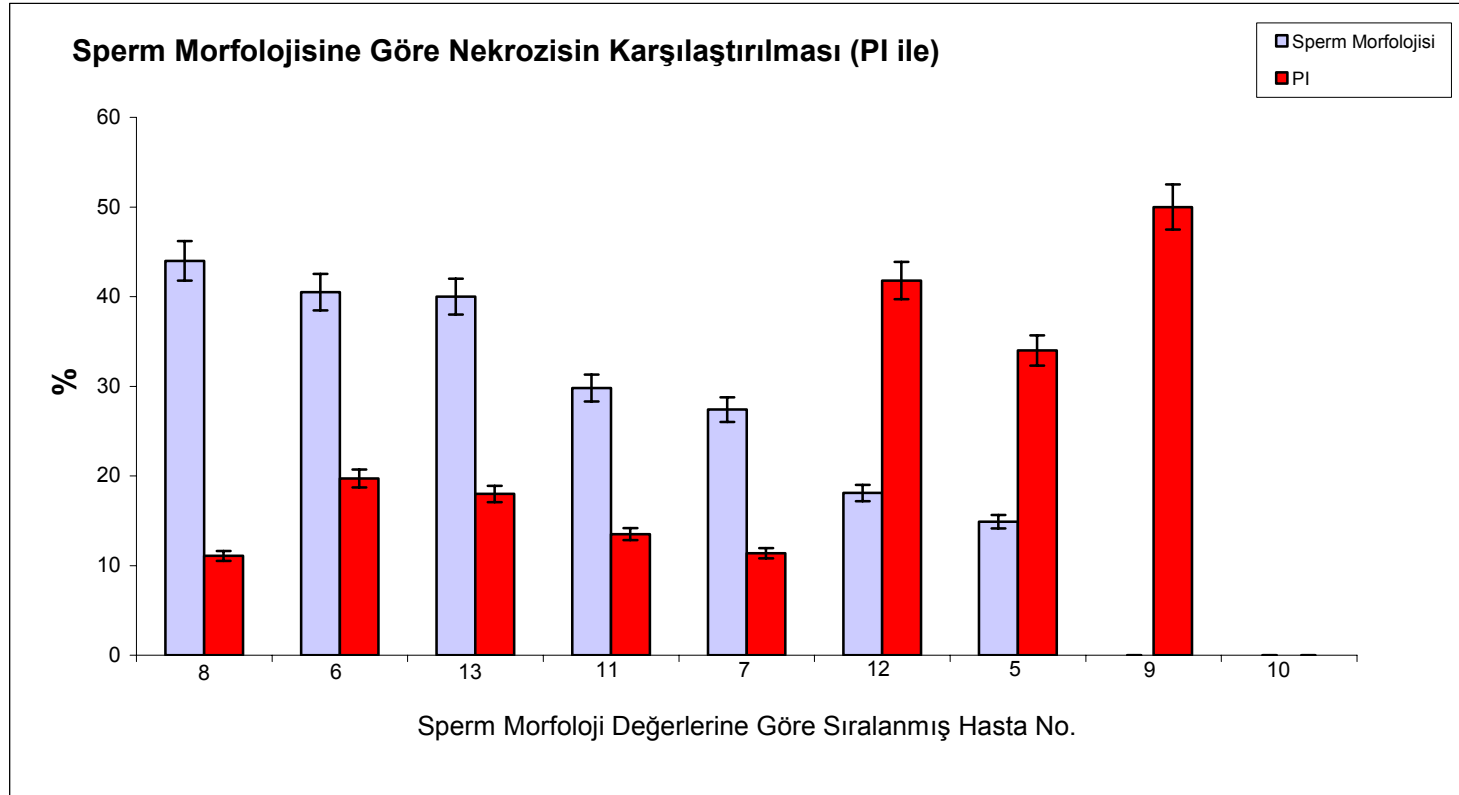
Şekil 3.12: Sperm hareketlilik değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla nekrotik sperm yüzdelerinin karşılaştırması.

3.4.2.3. Sperm morfolojisi-Sperm nekrozisi ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

Büyükten küçüğe doğru sıralanmış sperm morfoloji değerleri (%) ile aynı hastaların nekrotik hücre yüzdelerini içeren sütun grafikler incelendiğinde, genel olarak düzgün morfolojiye sahip spermleri fazla olan bireylerde nekrozis düşük, deformasyonlu spermleri fazla olan bireylerde nekrozis yüksek orandadır (Şekil 3.13). Ancak, sperm morfoloji yüzdeleri normal düzeyli ve düşük düzeyli olan hasta gruplarında nekrotik sperm yüzdeleri Student t Testi ile %95 güven aralığına göre karşılaştırıldığında, p değeri 0.2306 olarak belirlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo 3.9). Bu durumda, sperm morfolojisi normal ve düşük olan hasta grupları arasında nekrotik sperm yüzdesi açısından farklar istatistik açıdan önemsizdir.

Tablo 3.9: Sperm morfolojisi normal ve düşük grupların apoptotik sperm yüzdelerinin Student t Testi ile istatistiksel değerleri (%95 güven aralığına göre)

Sperm Morfolojisine göre Nekrozis	n	Mean	SE	SD
Normal	3	16.260	2.6426	4.577
Hasta	5	30.132	7.6644	17.138
Mean difference	-13.872			
95% CI	-39.319 to 11.575			
SE	10.3998			
t statistic	-1.33			
DF	6.0			
2-tailed p	0.2306			



Şekil 3.13: Sperm morfoloji değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla nekrotik sperm yüzdelerinin karşılaştırması.

3.4.3. Nekrozis belirlemelerine ilişkin genel sonuçlar

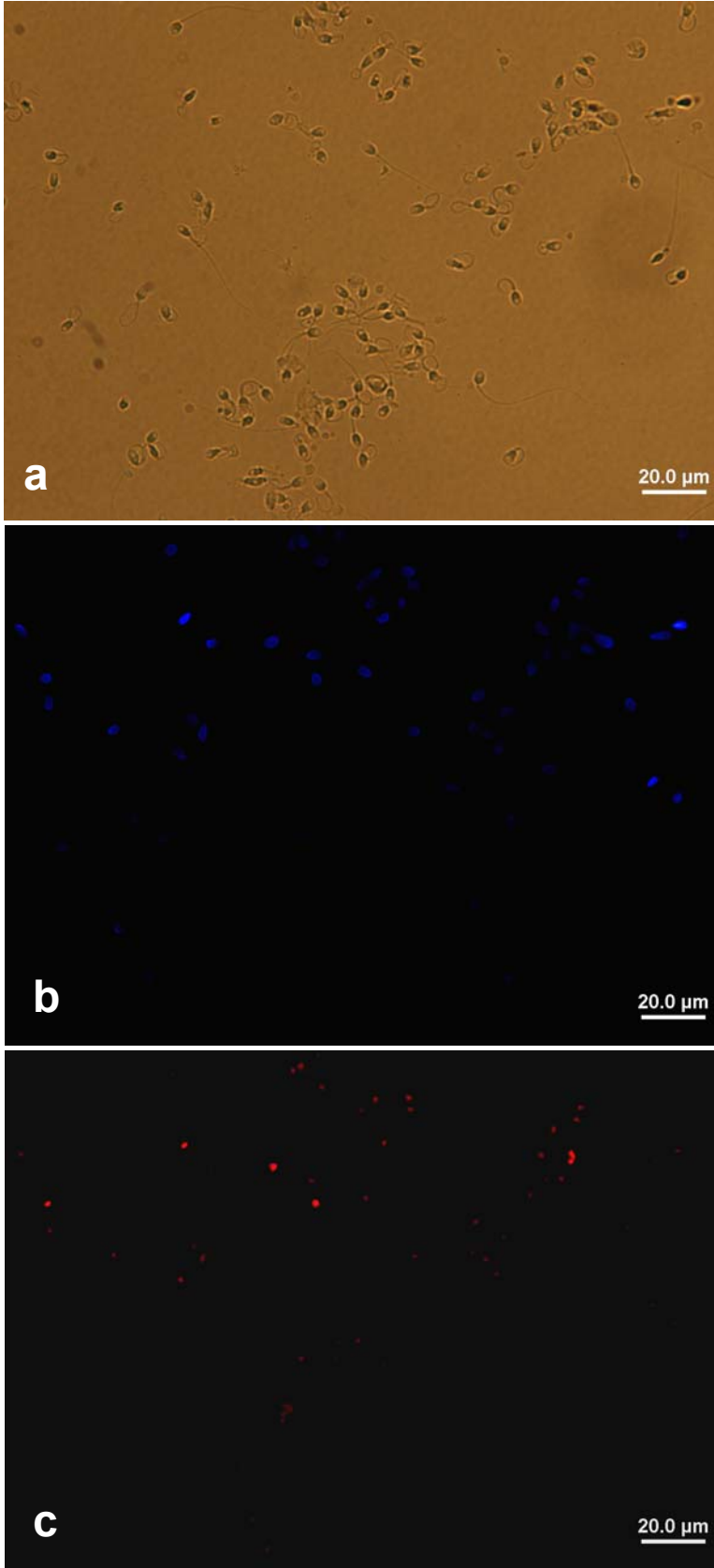
Nekrozis belirleme yöntemi için kullanılan PI'nın floresan ışıma reaksiyonları ile yapılan sayımlar sonucunda;

Sperm parametrelerinden; sperm konsantrasyonu ile nekrotik sperm oranları arasında bir ilişki görülmüştür. Sperm konsantrasyonu azaldıkça nekrotik sperm yüzdesi artmaktadır. Sperm hareketliliği ve sperm morfolojileri ile nekrozis arasında ise anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

3.5. Apoptozis-Nekrozis İlişkisi

Apoptozis ve nekrozis oranlarının hastalara göre dağılımlarının karşılaştırılması için tespitsiz materyalde benzer preparasyon yöntemlerinin kullanıldığı floresan işaretli Ho342 ve PI tercih edilmiştir. Bölgelere ardışık uygulanan Ho342 ve PI, uygun filtrelerle aynı bölgelerden fotoğraflanarak + reaksiyonlar sayılmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu bölgelerin aydınlık alan fotoğrafları da alınarak total hücre sayılarına göre apoptotik-nekrotik spermilerin normal spermilere olan oranları ve bunların hastalara göre dağılım yüzdeleri hesaplanmıştır (Şekil 3.14a,b,c, Tablo 3.10). Her hastaya ait bu oranlar %95 güven aralığına göre sütun grafiklerle gösterilmiştir (Şekil 3.15).

Bu karşılaştırmaya göre Ho342 ve PI yöntemleriyle belirlenmiş apoptotik ve nekrotik sperm hücreleri karşılaştırıldığında, nekrotik olanların yüzdesel değerleri apoptotik olanlardan genelde daha fazladır ve her bir hasta için farklar %95 güven aralığına göre istatistiksel açıdan da önem taşımaktadır (Şekil 3.15, 3.16a,b).

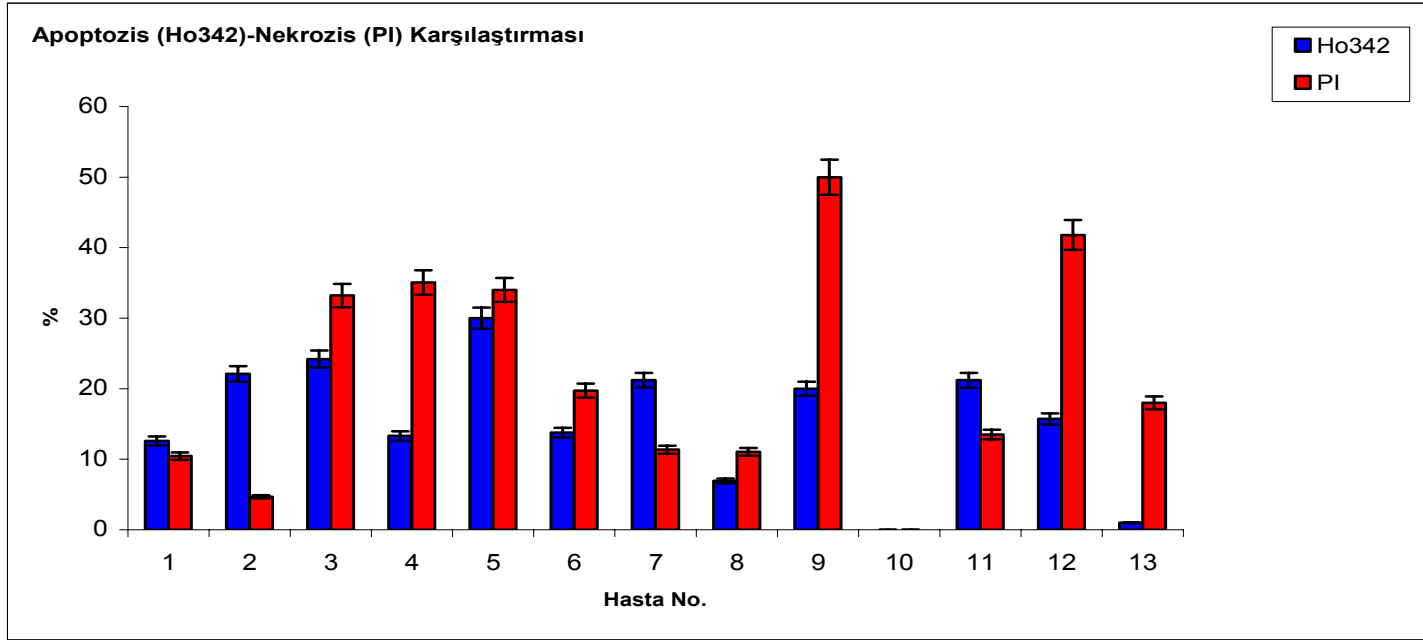


Şekil 3.14: Sperm yayma preparatta aynı bölgenin aydınlık alan (a), Ho342 (b) ve PI (c) ile karşılaştırılması.

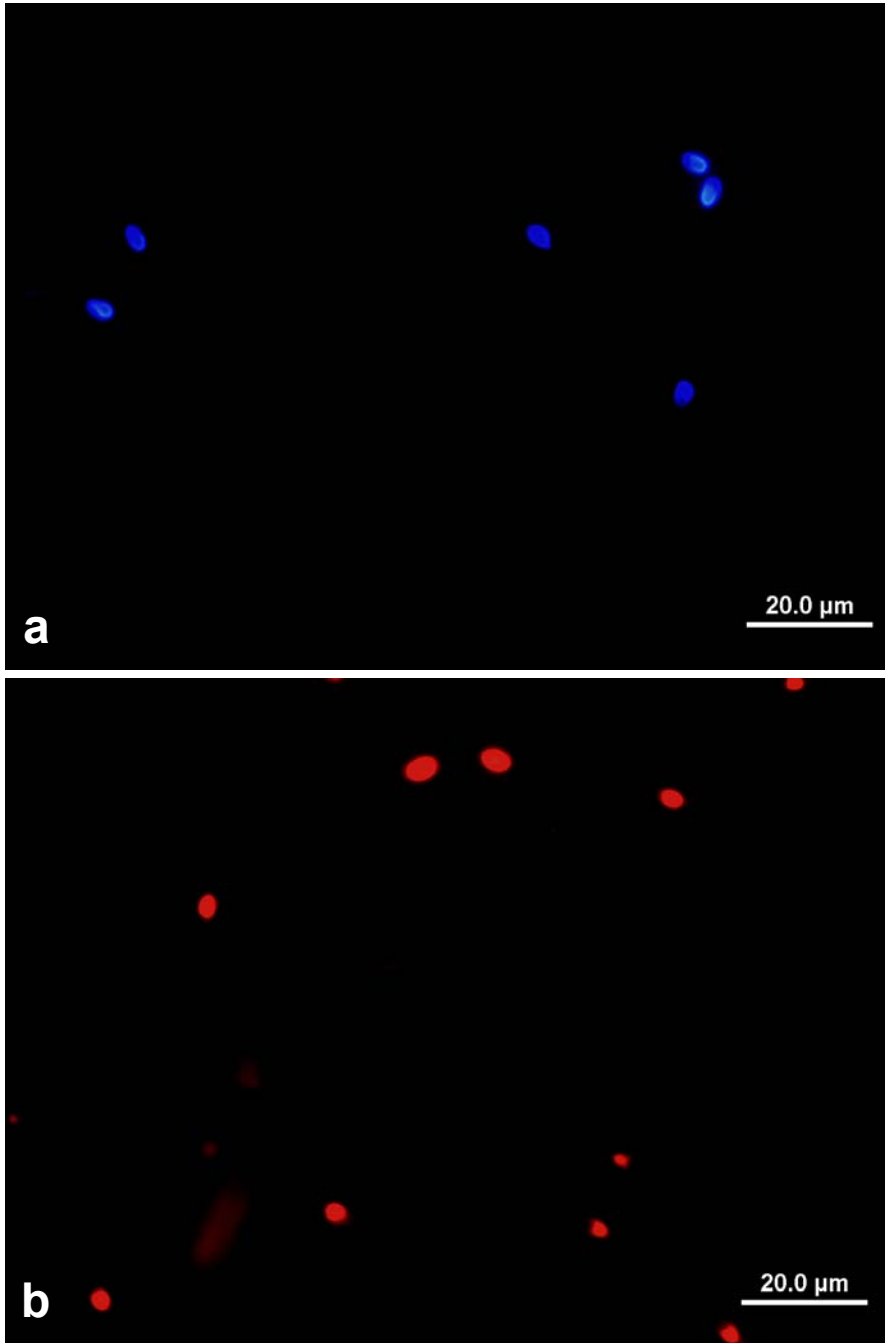
Tablo 3.10: Ho342 (apoptozis için) ve PI (nekrozis için) uygulaması sonucu, apoptotik-nekrotik sperm yüzdelerinin hastalara göre dağılımı.

Hasta No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*	11	12	13
Apoptotik-Nekrotik Sperm (%)													
Apoptotik sperm (Ho342 ile)	12.60	22.11	24.21	13.31	30.00	13.78	21.21	6.92	20.00	0.00	21.20	15.71	1.00
Nekrotik sperm (PI ile)	10.46	4.66	33.20	35.06	34.00	19.72	11.36	11.07	50.00	0.00	13.50	41.80	17.99

* Vasektomi ameliyatlı hastadır.



Şekil 3.15: Ho342 ve PI uygulamaları ile belirlenen apoptotik ve nekrotik sperm yüzdelерinin hastalara göre karşılaştırılması (%95 güven aralığına göre)



Şekil 3.16: Ho342 ile işaretli (a) apoptotik hücrelerle PI ile işaretli (b) nekrotik hücrelerin verdiği floresan ışımada farkı.

Tüm hastalarla oluşturulan iki grup (apoptotik-nekrotik), Student t Testi kullanılarak %95 güven aralığına göre ($p < 0.05$) istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda, p değeri 0.2211 olarak bulunmuştur ($p > 0.05$) (Tablo 3.11). Bu durumda, apoptotik ve nekrotik sperm yüzdesi açısından farklar istatistik açıdan önem taşımamaktadır.

Tablo 3.11: Tüm hastalar için apoptotik ve nekrotik sperm yüzdelерinin karşılaştırılmasına ilişkin Student t Testi ile istatistiksel değerler (%95 güven aralığına göre)

Tüm hastalara göre Apoptozis-Nekrozis Karşılaştırması	n	Mean	SE	SD
Apoptozis	13	15.542	2.4748	8.923
Nekrozis	13	21.755	4.2812	15.436
Mean difference	-6.213			
95% CI	-16.419	to 3.993		
SE	4.9451			
t statistic	-1.26			
DF	24.0			
2-tailed p	0.2211			

3.5.1. Semen parametreleri-Sperm apoptozis-nekrozis ilişkisinin istatistiksel değerlendirmesi

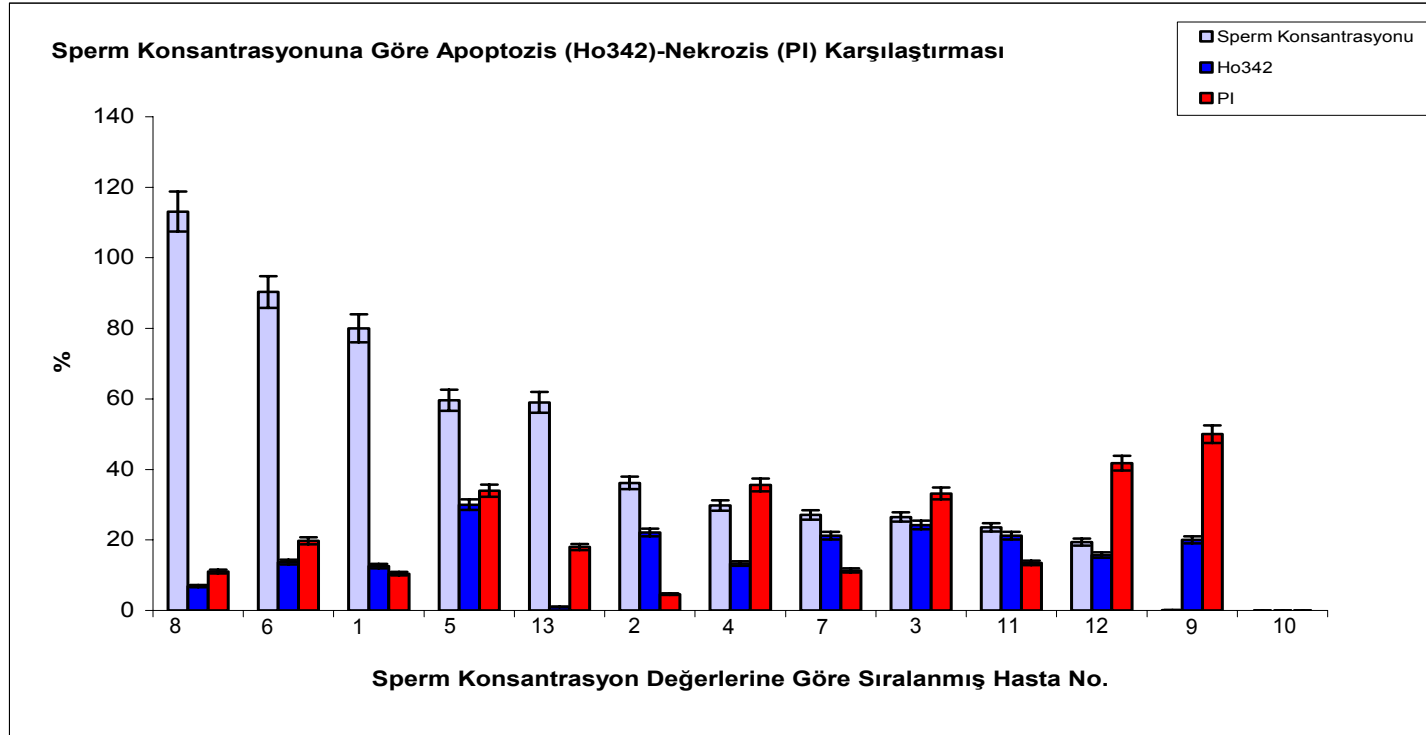
Semen parametrelerinden olan sperm konsantrasyonu (M/ml), sperm hareketliliği (%) ve sperm morfolojisi (%) ile sperm apoptozis ve nekrozisi arasında olası bir korelasyonun belirlenmesi amacıyla istatistiksel karşılaştırmalar yapılmıştır.

Büyükten küçüğe doğru sıralanmış **sperm konsantrasyonu** (M/ml) ile sperm **apoptozis-nekrozis** ilişkisine ait sütun grafikler incelendiğinde; genel olarak sperm konsantrasyonu azaldıkça apoptoziste dalgalı bir artış söz konusudur. Nekrozis ise daha düzgün ve apoptozise oranla daha yüksek düzeyde bir artış göstermektedir (Şekil 3.17).

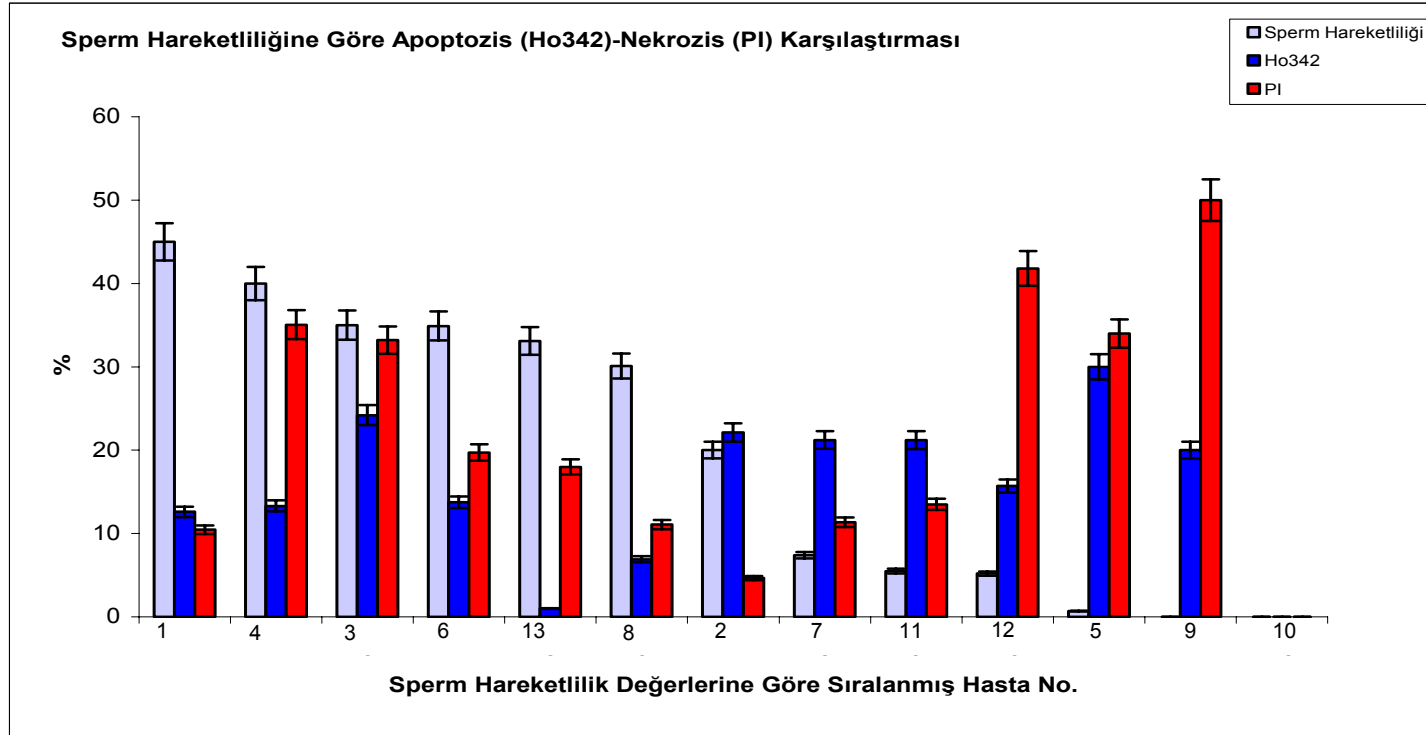
Büyükten küçüğe doğru sıralanmış **sperm hareketliliği** (%) ile sperm **apoptozis-nekrozis** ilişkisine ait sütun grafikler incelendiğinde; genel olarak sperm hareketliliği azaldıkça apoptoziste düzenli bir artış görölmektedir. Nekrozis ise daha yüksek oranlarda olmakla birlikte düzensiz bir artış göstermektedir (Şekil 3.18).

Büyükten küçüğe doğru sıralanmış **sperm morfolojisi** (%) ile sperm **apoptozis-nekrozis** ilişkisine ait sütun grafikler incelendiğinde; genel olarak sperm morfolojisi bozuldukça apoptoziste daha düzenli bir artış görölmektedir. Nekrozis ise daha yüksek oranlarda olmakla birlikte düzensiz bir artış gösterir (Şekil 3.19).

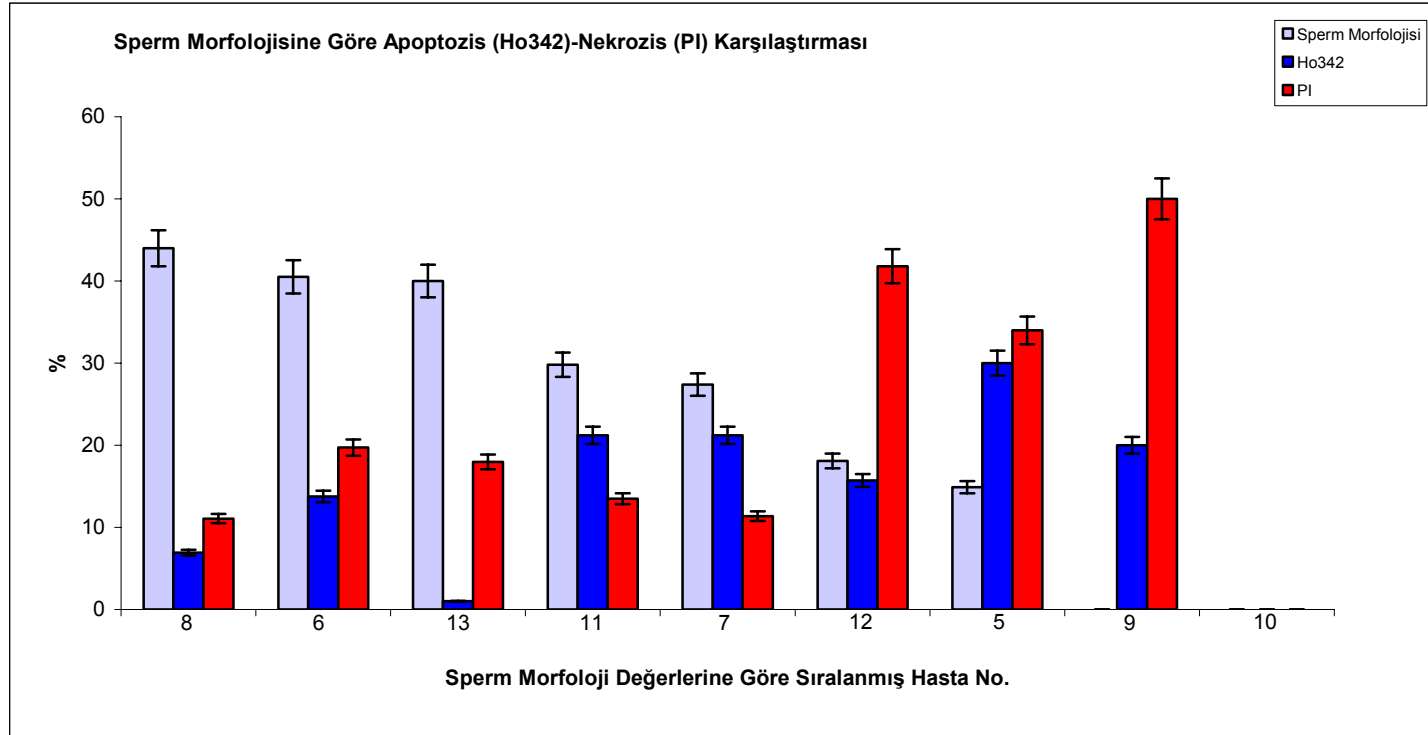
Sonuç olarak; Semen parametrelerinden hareketlilik ve morfoloji değişimleri sperm apoptozisi ile ilişkili görölürken, konsantrasyon değişimleri nekrozis ile ilişkili bulunmuştur.



Şekil 3.17: Sperm konsantrasyon değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik-nekrotik sperm yüzdelerinin karşılaştırması.



Şekil 3.18: Sperm hareketlilik değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik-nekrotik sperm yüzdelerinin karşılaştırması.



Şekil 3.19: Sperm morfoloji değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanmasıyla apoptotik-nekrotik sperm yüzdelerinin karşılaştırması.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Erkek partner, infertilite kliniklerine gelen vakaların yaklaşık %30-50'sinde hesaplanan sperm hatalarıyla çiftlerin infertilitesinde en büyük etken olarak tanımlanmaktadır. Erkek, fertilizasyon potansiyellerinin en iyi göstergelerinden biri, sperm morfolojisidir (Nikolettos ve ark., 1999). Morfoloji ile birlikte spermilerin sayısı ve hareketliliği de infertiliteyi belirlemede kullanılır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO, 1999) göre yapılan standart **semen analizleri**, özellikle sperm konsantrasyonu ve hareketliliği, infertil bir çiftin incelenmesinde her zaman zorunlu bir test olarak kabul edilir. Ancak bir semen analizi sadece geniş teşhis kategorileri sağlamaya yardımcı olur (Sakkas ve ark. , 2004).

Yardımcı Üreme Tekniklerinden erkek infertilitesinin tedavisinde çığır açan ICSI (intrazitoplazmik sperm enjeksiyonu) ile, daha önceden başarısız olmuş IVF (in-vitro fertilization) denemeleri olan veya ciddi derecede bozuk sperm parametreleri bulunan infertil hastalarda fertilizasyon ve gebelik elde edebilme şansı ortaya çıkmıştır (Nikolettos ve ark., 1999).

ICSI uygulaması için düşük kalitede spermatazoa kullanılması konusunda sorular artmıştır. Doğal seçilme süreçlerinde, DNA'sı hasar görmüş spermatazoanın oosite ulaşma şansı düşük olmaktadır. Diğer yandan ICSI hareketsiz spermelerde de uygulanabilir ve bu da embriyo içinde hasarlı DNA'nın üretilmesine sebep olur (Oosterhuis ve ark., 2004). Hasarlı DNA içeren sperm ile gerçekleşen fertilizasyon fetal mutasyonlara neden olmakta ve belki de doğacak çocuğun kanser riskini artırmaktadır (Chohan ve ark., 2006). Hollanda'da, bu nedenle hareketsiz

spermelerde ICSI uygulaması yapılmamaktadır. Ancak Almanya ve diğer ülkelerde ICSI için hareketsiz spermeler kullanılmaktadır (Oosterheus ve ark., 2004). Bu olasılıklar göze alındığında ICSI için kullanılan hasar görmemiş spermatazoa için marker bulmak önemlidir ve bunun için de ejaküle spermatazoanın olası hücre ölüm mekanizmalarını anlamak gerekmektedir.

İnfertil hastaların testis biyopsilerinde yüksek oranlarda **apoptozis** olduğu TUNEL yöntemi ve morfometrik çalışmalarla ortaya konmuştur. Yeni yapılan çalışmalarda ise, infertil hastaların ejakülat spermelerinde apoptozisin tipik göstergeleri olan DNA parçalanması (TUNEL yöntemi) ve fosfatidil serinin plazma membranı translokasyonu (AnneksinV/Propidium iodide yöntemi) saptanmıştır. Bu belirleyicileri rutin semen analizleri ile göstermek olası değildir ve bu spermeler normal olarak değerlendirilip, ICSI yöntemi ile oosite enjekte edilirse hasarlı genomdan dolayı ciddi sorunlara yol açabilir (Weng ve ark., 2002). İnfertil bir çifti tedavi etmek için kullanımı artan “Yardımcı Üreme Teknikleri” nin başarısı için kesinlikle daha spesifik sperm hatalarını ve bunların kaynaklarını tanımlamak ve yeni teşhis yöntemleri geliştirmek gerekir.

Ejaküle spermelerde apoptozisi belirlemek için farklı apoptotik işaretleyiciler kullanılmıştır: **1.** DNA zincirlerindeki kırıkları belirleyen TUNEL yöntemi (Bacetti ve ark., 1996; Anzar ve ark., 2002; Sakkas ve ark., 2002; Lachaud ve ark., 2004; Liu ve ark., 2004; Oosterhuis ve ark., 2004; Sakkas ve ark., 2004; Brugnon ve ark., 2006), **2.** Fosfatidilserinin (PS) yer değiştirmesini belirleyen yöntemler (Shen ve ark., 2000; Ricci ve ark., 2002), **3.** Caspase-3 aktivasyonu (Weng ve ark., 2002; Paasch ve

ark., 2003; Almedia ve ark., 2005; Said ve ark., 2005b; Borroso ve ark., 2006), **4.** MMP integrity testi (Said ve ark., 2005b; Borroso ve ark., 2006); **5.** Membrana-bağılı reseptörler Fas ve p53 (Sakkas ve ark., 1999a; 2002); **6.** Kromatin fragmentasyonu (Sakkas ve ark., 1999a; Siddighi ve ark., 2004; Chen ve ark., 2006); **7.** Hoechst 33342 (Bisbenzimide, Ho342) floresan boyaması (Watkins ve ark., 1996; Zhang ve Kiechle, 1997; Sara ve ark., 2003).

Ho342 floresan boyası, parçalanmış DNA'da açığa çıkan A-T'ce zengin bölgelere bağlanarak apoptotik hücreyi mavi renkte işaretler (Vermes ve ark., 2005; Watkins ve ark., 1996; Zhang ve Kiechle, 1997; Sara ve ark., 2003). **TUNEL** yöntemi, DNA kırıklarının (nick) terminal deoksinukleotidil transferaz enzimi (TdT) ile belirlenmesi mantığına dayanır. TdT enzimi, işaretli nukleotidlerin DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanmasını katalizler (Bacetti ve ark., 1996; Anzar ve ark., 2002; Sakkas ve ark., 2002; Lachaud ve ark., 2004; Liu ve ark., 2004; Oosterhuis ve ark., 2004; Sakkas ve ark., 2004; Brugnon ve ark., 2006). Bu çalışmada canlı materyalde Ho342, tespitli materyalde TUNEL kullanılarak, yöntemler arası karşılaştırma yapılmış ve işaretli ejakule sperm oranları farklı bulunmuştur.

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, **apoptotik hücre** oranları ile **sperm konsantrasyonu** arasında ters bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Sun ve ark., 1997; Oosterhuis ve ark., 2000; Ricci ve ark., 2002). Buna karşın, anneksinV-TUNEL yöntemiyle hem sperm konsantrasyonu hem de total sperm sayısı ile pozitif bir korelasyon olduğu (Shen ve ark., 2002), anneksinV/PI yöntemi ile de anormal semenli örnekler arasında apoptotik indeks, canlılık ve apoptotik sperm

hücre oranında kayda değer bir farklılık olmadığı (Ricci ve ark., 2002) belirlenmiştir. Bu çalışmada da TUNEL yöntemi ve istatistiksel hesaplamalarla, sperm konsantrasyonu ile apoptotik hücre sayısında anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır.

Benzer çalışmalar **sperm hareketliliği** açısından da gerçekleştirilmiş ve apoptotik hücre oranları ile sperm hareketliliği arasında kayda değer ters bir korelasyon bulunmuştur (Barroso ve ark., 2000; Oosterhuis ve ark., 2002; Shen ve ark., 2002). Çalışmamızdaki istatistiksel uygulamalar da benzer sonuçları göstermiştir.

Semen parametrelerinin bir diğeri olan **sperm morfolojisi** ile apoptotik hücre oranları arasındaki ilişki de araştırılmış, bu çalışmada da belirlendiği gibi; çeşitli baş, boyun ve kuyruk hasarları gösteren anormal sperm morfolojileri ile apoptotik hücreler arasında pozitif ilişki bulunmuştur (Gandini ve ark., 2000; Shen ve ark., 2002). Kaspaz-3 aktivasyon testi ölçümleri ve DNA difüzyon testi ile, normal sperm morfolojisi ile apoptozis arasında ters bir korelasyon bulunmuştur (Said ve ark., 2005b; Chen ve ark., 2006). Sperm boyun kısmı hasarları ve sperm kuyruk hasarları ile apoptozis arasında kayda değer pozitif bir ilişki bulunmuştur (Weng ve ark., 2002; Chen ve ark., 2006; Aziz ve ark., 2007).

Anormal semen parametreleri ile apoptozis korelasyonları konusunda ayrıntılı çalışmalar yapılmış olmasına karşın, **nekrozis** ile ilişkisine yeterince ilgi gösterilmemiştir. Semen örneklerinde yaşa bağlı nekrotik sperm miktarları, yaşlanmayla doğru orantılı olarak artış göstermektedir (Siddighi ve ark., 2007). Nekrotik sperm popülasyonları Anneksin V

işaretlemesi ile (Lachaud ve ark., 2004; Oosterhuis ve ark., 2004; Brugnon ve ark., 2006) veya bu çalışmada da nekrozisi belirlemek için kullanılan PI ile floresan boyama yapılarak gösterilebilir (Sara ve ark., 2003; Siddighi ve ark., 2004). Nekrotik hücrelerin zayıf hücre membranını kırmızı renkte işaretleyen PI kullanımıyla, nekrozis ve semen parametrelerinden sperm konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon bulunurken, sperm hareketliliği ve morfolojisi açısından tam bir korelasyon saptanamamıştır. Ancak, nekrotik hücrelerin oranı ile apoptotik hücrelerin oranı karşılaştırıldığında, ejakule spermelerde nekrozisin apoptozisten genelde daha yüksek olduğu sonucuna varılabilir.

Sonuç olarak; tedavide kullanımı artan yardımcı üreme tekniklerinin başarısı için özgün sperm hatalarını ve bunların kaynaklarını tanımlamak çok önemlidir. Yeni ve daha hassas teşhis yöntemleriyle spermelerin farklı düzeylerde incelenmesine olanak sağlayacak her bilgi değer taşımaktadır. Apoptozisle ilgili tartışmalı literatüre katkı sağlamak ve nekrozisle ilgili yeni bulgular elde etmek üzere yapılan bu çalışmanın, alanındaki bilgilere bir yarar sağlaması beklenmektedir.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

Akşit H. Ve Bildik A., 2008: Apoptozis. YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi 19(1): 55-63

Allard EK, Boekelheide K, 1996: Fate of germ cells in 2,5-hexanedione-induced testicular injury.II.Atrophy persists due to a reduced stem cell mass and ongoing apoptosis. Toxicol Appl Pharmacol 137(2):149-56.

Almeida C., Cardoso F., Sousa M., Viana P., Goncalves A., Silva J. and Barros A., 2005: Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swim-up preparation in relation to sperm quality. Hum Reprod 20,1307–1313.

Anzar M., He L., Buhr M.M., Kroetsch T.G.and Pauls K.P., 2002: Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. Biology of Reproduction 66,354-360.

Aydos K., 2005: Spermatozoa Metabolizmasına Değişik Bir Bakış: Kompartmantalizasyon. Turkish German Gynecol Assoc, Vol. 6(3); 2005:204-209

Aziz N., Said T., Paasch U., and Agarwal A., 2007: The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. Human Reproduction Vol.22, No.5 pp. 1413–1419

- Bacetti B., Collodel G., Piomboni P.,** 1996: Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9) *J Submicrosc Cytol Pathol*, 28(4):587-96.
- Balcan E., Deveci R., Keskin N., Yıkılmaz M.S., Sarıbek B.,** 2007: Tunikamisin uygulanmış fare karaciğer dokusunda histopatolojik değişiklikler. 18. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, sayfa 157.
- Bartke A.,** 1995: Apoptosis of male germ cells, ageneralized or a cell type-specific phenomenon? *Endocrinology*. 136(1):3-4.
- Billig H., Furuta I., Rivier C., Tapanainen J., Parvinen M., Hsueh A.J.,** 1995: Apoptosis in human germ cells:developmental changes in gonodotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology*. 136(1):5-12.
- Brugnon F., Assche E.V., Verheyen G., Sion B., Boucher D., Pouly J.L, Janny L., Devroey P., Liebaers I. and Steirteghem A.V.,** 2006: Study of two markers of apoptosis and meiotic segregation in ejaculated sperm of chromosomal translocation carrier patients. *Human Reproduction* 21(3):685-693.
- Barroso G., Taylor S., Morshedi M., Manzur F., Gavino F. and Oehninger S. ,** 2006: Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril* 85,149–154.

Carrell D., Wilcox A., Lowy L., Peterson M., Jones K., Erickson L., Campbell B, Branch W., and Hatasaka H., 2003: Elevated Sperm Chromosome Aneuploidy and Apoptosis in Patients With Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Obstetrics and Gynecology* Vol. 101, No. 6

Cayli S., Sakkas D., Vigue L., Demir R., Huszar G., 2004: Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod.*10:365–372.

Chen Z., Hauser R., Trbovich AM., Shifren JL., Dorer DJ., Godfrey-Bailey L. and Singh NP., 2006: The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *J Androl* 27,112–120

Chohan K., Griffin J., Lafromboise M.,† Christopher JD. Carrell J., Carrell DT., 2006: Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *Journal of Andrology*, Vol. 27, No. 1

Clermont Y., 1972: Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52; 198-236.

Cohen J J., 1993: Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 15: 35-43.

- Cooper GM.,** 1994: Programmed cell death. The cell. In: Cooper GM (ed) Chapter 14. Washington: ASM Pres; 592-596.
- Cummings M C.,** 1997: Winterford C M, Walker N I. Apoptosis. Am J Surg Pathol 21: 88-101.
- Dunkel L., Taskinen S., Hovatta O., Tilly JL., Wilkstrom S.,** 1997: germ cell apoptosis after treatment of cryptorchidism with human chorionic gonadotropin is associated with impaired reproductive function in the adult. J Clin Invest. 100(9):2341-2346.
- Erdoğan B B.,** 2003: Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi, 4: 165-174.
- Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A.,** 2000: Study of apoptotic DNA fragmentation human spermatozoa. Hum Reprod.15:830–839.
- Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S A.,** 1992: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493-501.
- Guzick DS., Overstreet JW., Factor-Litvak P., Brazil CK., Nakajima ST., Coutifaris C., Carson SA., Cisneros P., Steinkamph MP., Hill JA., Xu D. and Vogel DL.,** 2001: Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. New Eng J Med 345,1388–1393.

Henriksen K., Hakovirta H., Parvinen M., 1995: testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in-situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology*. 136(8): 3285-3291.

Henriksen K., Kangasniemi M., Parvinen M., Kaipia A., Hakovirta H., 1996: In-vitro, follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion. *Endocrinology*. 137(5): 2141-2149.

Irvine D.S., Twigg J.P., Gordon E.L., Fulton N., Milne P.A. and Aitken R.J., 2000: DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology* 21 33–44.

Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R., 1972: Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-245.

Lachaud C., Tesarik J., Canadas ML., Mendoza C., 2004: Apoptosis in human ejaculated spermatozoa. *Human Reproduction*, 19 (3):607-610.

Lee J., Richburg JH., Younkin SC., Boekelheide K., 1997: The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*. 138:2081–2088.

- Levy R. and Seifer-Aknin I.**, 2001: Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin (Paris)* 59(5):531-45
- Liu CH., Tsao HM., Cheng TZ., Wu HM., Huang CC., David CC., Lin PC and Lee MS.**, 2004: DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. *Journal of Assisted Reproduction and genetics*, vol.21, no.4
- Nagata S.**, 1997: Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365
- Nikolettos N., Küpker W., Demirel C.**, 1999: Fertilization potential of spermatozoa with abnormal morphology. *Hum Reprod*: 14: 47-70
- Nishihara H., Kondoh S K., Insel P A., Eckmann L.**, 2003: Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2. *PNAS*, 100: 8921-8926.
- Ombelet, W., Fourie, F., Vandeput, H.**, 1994: Teratozoospermia and invitro fertilization: a randomised prospective study. *Hum. Reprod.*, 9, 1479–1484.
- Oosterhuis G.J.E. , Vermes I.**, 2004: Apoptosis in human ejaculated spermatozoa. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*

- Ozenci C.C. Catalanotti J., Jakab A., Aksu C., Ward D., Bray-Ward P., Demir R., Huszar G., 2003:** Human Sperm Maintain Their Shape Following Decondensation and Denaturation for Fluorescent In Situ Hybridization: Shape Analysis and Objective Morphometry. *Biology of Reproduction* 69, 1347–1355
- Öktem S, Özhan M H, Özol D., 2001:** Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2 (1): 91-95.
- Paasch U, Grunewald S, Fitzl G and Glander HJ, 2003:** Deterioration of plasma membrane is associated with activation of caspases in human spermatozoa. *J Androl* 24,246–252.
- Print CG. and Loveland KL., 2000:** Germ cell suicide:new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 22: 423-430
- Ricci G., Perticarari S., Fragonas E., Giolo E., Canova S., Pozzobon C., Guaschino S. and Presani G., 2002:** Apoptosis in human sperm: its correlation with semenquality and the presence of leukocytes. *Human Reproduction* Vol.17, No.10: 2665-267
- Said TM., Paasch U., Grunewald S., Baumann T., Li L., Glander HJ. and Agarwal A., 2005b:** Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online* 10,740–746.
- Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi PG. and Bianchi U., 1999a:** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 4,31–37.

- Sakkas D., Mariethoz E. and St John JC., 1999b:** Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 251,350–355.
- Sakkas D., Moffatt O., Manicardi GC., Mariethoz E., Tarozi N and Bizzaro D., 2002:** Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66,1061–1067.
- Sakkas D., Seli E., Bizzaro D., Tarozi N. and Manicardi GC., 2003:** Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 7,428–432.
- Saraste A and Pulkki K., 2000:** Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45: 528-537.
- Sara CR., Jacobson J., Patton W., King A., Chan PJ., 2003:** Dual fluorescence analysis of DNA apoptosis in sperm. *J Obstet Gynecol* 188:1156-7
- Schlegel J., Peters I., Orrenius S., Miller DK., Thornberry NA, Yamin TT., Nicholson DW., 1996:** CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 271(4): 1841-4

- Shen H. and Ong C., 2000:** Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 28, 529–36.
- Sharpe, R., 1994:** Regulation of spermatogenesis. In *The Physiology of Reproduction* (E. Knobil and J. D. Neill, Eds.), Vol. 2, pp.:1363-1434. Raven Press. New York.
- Siddighi S., Patton WC., Jacobson JD., King A. and Chan PJ., (2004)** Correlation of sperm parameters with apoptosis assessed by dual fluorescence DNA integrity assay. *Arch Androl* 50,311–314.
- Siddighi S., Chan C.a., Patton W.C., Jacobsan J.D., Chan P.J., 2007:** Male Age and Sperm Necrosis in Assisted Reproductive Technologies. *Urol Int.* 79:231–234
- Sun JG, Jurisicova A, Casper RF., 1997;** Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 56:602–607.
- Tomatır A G., 2003:** Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T. Klin. J. Med. Sci.*, 23: 499-508.
- Walker P.R, Leblanc J., Smith B., Pandey S., Sikorska M., 1999:** Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Enzymology*, 17: 329-338.
- Watkins A.M., Chan P.J., Kalugdan T.H., Patton W.C., Jacobson J.D. and King A., 1996:** Analysis of the flow cytometer stain

Hoechst 33342 on human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* vol.2 no.9 pp. 709-712

Weng S.L., Taylor S.L., Morshedi M., Schuffner A., Duran E.H., Beebe S., Oehninger S., 2002; Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod.* 8:984–991

Wijman J.H., Jonker R.R., Keijzer R., Velde C.J.H., Cornelisse C.J., Dierendonck J.H.V., 1993: A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41 (1): 7-12.

World Health Organization, 1999: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interactions. 4th edn, Cambridge University Press, Cambridge.

Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C., 1995; A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods.* 184:39–51.

Yılmaz İ., Çek M., 2005: Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinin apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği doktora tezi.

Türk G., Aksu E.H., Bozkurt T., 2006: Spermatozoon DNA'sı Hasarı.
F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi 20(1), 85-95

Zhang X. and Kiechle F.L., 1997: Mechanism of Hoechst 33342-induced apoptosis in BC3H-1 myocytes. Annals of Clinical and Laboratory Science, Vol 27, Issue 4, 260-275.

EK

T.C
SAĞLIK BAKANLIĞI
TEPECİK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA
HASTANESİ BAŞTABİBLİĞİ-İZMİR
YEREL ETİK KURULU

Toplantı Sayısı : 68

Tarih : 26.04.2007

Karar No : 10

Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Didem ARSLAN tarafından yürütülmesi planlanan "Normal-Anormal Morfoloji Gösteren İnsan Spermlerinde Apoptozis ve Nekrozisin Belirlenmesi ve Sialik Asitle ilişkisi" başlıklı tezi için araştırma dosyası incelenmiş, laboratuarlardan sorumlu başhekim yardımcısı Dr.Bülent ALBAYRAK'ın 19.04.2007 tarihli olur yazısı görülmüş, çalışmanın gerekçe protokol ve Etik açıdan uygun olduğu ve Didem ARSLAN sorumluluğunda yürütülmesine oy birliği ile karar verilmiştir.

BAŞKAN : Doç. Dr. F. Esra ÖZER

Doç. Dr. Mehtap ÇINAR

Dr. Coşkun YILDIZ

Dr. Cezmi KARACA

Dr. Oğuz MERTOĞLU

Dr. Işıl ÇOKER (izimli)

Dr. Süheyla CUMURCU

Ecz. Elvan GÖKMEN

T.C.Sağlık Bakanlığı Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Yerel Etik Kurulu
 Yenışehir 35310-İZMİR

Telefon : 0 232 4696969 / 1043 Fax : 0 232 4330756

ÖZGEÇMİŞ

Didem Arslan, 03.03.1982 tarihinde Zonguldak ilinde doğmuştur. Orta öğretimini Fener Ortaokulu'nda, Lise Öğrenimini Mehmet Çelikel Süper Lisesi'nde tamamlamıştır. 2000 yılında bu liseden mezun olduktan sonra aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girmiştir. 2004 yılında Botanik Ağırlıklı öğretim programından Biyolog diplomasını alarak mezun olmuştur. 2006 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başlamıştır.

Katıldığı Kurs ve Kongreler

2008 (Eylül-1hafta) Kök Hücre ve Uygulama Alanları Kursu kapsamında Flow Sitometri Uygulamaları ve Konfokal Mikroskop Uygulamaları Kursu, KÖGEM, Kocaeli-Türkiye

2008 (18.08-20.08) Epicentre Firması Moleküler Biyoloji Ürünleri Eğitimi Kursu, Madison- Wisconsin, ABD

2008 (11.06-13.06) Çevre Biyoteknolojisinde FISH Uygulamaları, İstanbul-Türkiye

2008 (29.04-01.05) Kök Hücre ve Gen Terapi Sempozyumu kapsamında Temel Moleküler Biyoloji Teknikler ve Bakteriyel Klonlama Teknikleri Kursu, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul-Türkiye

2008 (09.04) Hücre Ölümü, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul-Türkiye

2008 (2.11-3.11) Gen Terapi Sempozyumu, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul-Türkiye

2007 (26.08-29.08) 18. Elektron Mikroskobu Kongresi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir-Türkiye

2007 (01.02-04.02) 4. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu, İstanbul Üniversitesi, İstanbul- Türkiye

2007 (10.01-12.01) Biyolojik Araştırmalarda Deneye Hayvanlarının Kullanılması Kursu, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul-Türkiye

2003 (Eylül-1 hafta) 10. Ulusal Biyoloji Öğrencileri Kursu, Marmara Üniversitesi, İstanbul-Türkiye

2002 (Temmuz-1 hafta) Biyolojik Bilimlerde Araştırma Yöntemleri Yaz Okulu, Ege Üniversitesi, İstanbul-Türkiye.