

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ESER ELEMENTLERİN YOL AÇTIĞI DNA
HASARLARININ SEMİNAL PLAZMA VE SPERM
KROMATİN YAPISI ÜZERİNE ETKİSİNİN TEK HÜCRE
JEL ELEKTROFOREZ (COMET ASSAY) YÖNTEMİ İLE
ANALİZİ**

PINAR ALTINER

**DANIŞMAN
PROF. DR. IŞIL ALBENİZ**

**BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
BİYOFİZİK PROGRAMI**

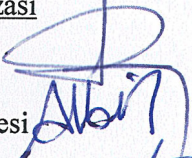
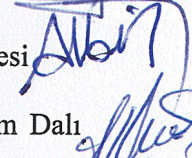
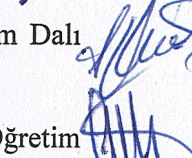
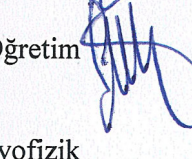
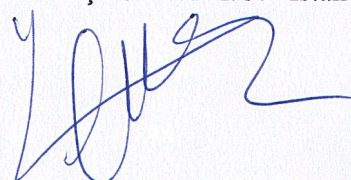
İSTANBUL-2013

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı Biyofizik Programında Pınar Altınar tarafından hazırlanan "Eser Elementlerin Yol Açtığı DNA Hasarlarının Seminal Plazma ve Sperm Kromatin Yapısı Üzerine Etkisinin Tek Hücre Jel Elektrophorez (Comet Assay) Yöntemi İle Analizi" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

05 / 07 / 2013

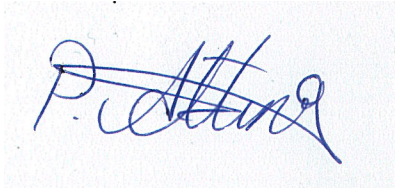
Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u> | <u>İmzası</u> |
|--|---|
| 1.Prof.Dr.Rüstem NURTEN İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı |  |
| 2.Prof.Dr.İşıl ALBENİZ İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi |  |
| 3.Prof.Dr.Tülay İREZ Yeni Yüzyıl Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi |  |
| 4.Prof.Dr.Şükrü ÖZTÜRK İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi |  |
| 5.Doç.Dr.Leman YALÇINTEPE GÜNEŞTUTAR İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi |  |

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

PINAR ALTINER



İTHAF

Ailem ve yanımda olan tüm dostlarıma ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde bana her zaman destek olan, deneysel ve teorik çalışmalarında beni yönlendiren, deneyimleri ve bilgi birikimi ile beni aydınlatan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Işıl Albeniz'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni destekleyen başta İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Rüstem Nurten'e ve tüm Biyofizik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen ve bana her zaman moral veren Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Tülay İrez'e, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Adli Tıp Enstitüsü'nde eser element ölçümlerinde yardımları olan araştırma görevlisi Sayın Selda Mercan'a ve laborant Sayın Murat Yayla'ya, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üreme Endokrinolojisi ve Infertilite Bilim Dalı'ndan Sayın Dr. Naciye Erol'a, Üroloji Anabilim Dalı Androloji Bilim Dalı'ndan Sayın Biyolog Tayyar Demiryürek'e, İ.Ü. DETAE İmmunoloji A.D.'nden Sayın Dr. Suzan Adın Çınar'a, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı'ndan Sayın Dr. Sevim Purisa'ya tezime sağladıkları katkılar için teşekkür ederim.

Ayrıca bana inanan ve beni yürekten destekleyen aileme ve dostlarıma çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 5703

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET.....	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. SPERMATOGENEZ.....	3
2.1.1. Spermatositogenez.....	4
2.1.2. Mayoz Bölünme	4
2.1.3. Spermiyogenez	4
2.1.3.1. Golgi Fazı.....	5
2.1.3.2. Başlık Fazı.....	5
2.1.3.3. Akrozomal Faz	6
2.1.3.4. Maturasyon (olgunlaşma) evresi	6
2.1.4. Kromatin yapılanması.....	6
2.2. SPERMİN YAPISI.....	7
2.2.1. Baş	7
2.2.1.1. Akrozom.....	7
2.2.1.2. Çekirdek	8
2.2.2. Boyun.....	8
2.2.3. Kuyruk	9
2.2.3.1. Orta parça	9
2.2.3.2. Esas parça.....	9
2.2.3.3. Son parça.....	9

2.3. İNFERTİLİTE.....	9
2.3.1. Erkek İnfertilitesi.....	10
2.3.1.1. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri.....	10
2.4. SPERM DNA HASARLARI.....	11
2.4.1. Nükleer DNA Hasarı Ve Kaynağı.....	11
2.4.2. Spermatozoon DNA Hasarı ve Erkek İnfertilitesi.....	11
2.5. SPERMATOGENEZ VE APOPTOZ.....	12
2.6. COMET ANALİZİ İLE DNA HASARININ BELİRLENMESİ.....	12
2.6.1. COMET ASSAY METODOLOJİSİ.....	13
2.6.2. ‘‘COMET ASSAY’’ BASAMAKLARI.....	13
2.7. ÇEVRESEL ETMENLER.....	15
2.7.1. Sigara.....	15
2.7.2. Eser Elementler.....	16
2.7.2.1. Bakır (Cu).....	16
2.7.2.2. Kurşun (Pb).....	17
2.7.2.3. Nikel (Ni).....	17
2.7.2.4. Alüminyum (Al).....	18
2.7.2.5. Krom (Cr).....	18
2.7.2.6. Mangan (Mn).....	18
2.7.2.7. Vanadyum (V).....	19
2.8. İNDÜKTİF OLARAK EŞLEŞMİŞ PLAZMA KÜTLE SPEKTROMETRESİ (ICP-MS).....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. GEREÇLER.....	22
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler.....	22
3.1.1.1. Kimyasal Maddeler.....	22
3.1.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler.....	23
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	23
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Denekler.....	24
3.1.3.1. Hasta Seçimi.....	24
3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler.....	24
3.1.4.1. Tek Hücre Jel Elektrophoresis Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	24
3.1.4.2. Eser Element Analizi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	26

3.1.4.3. Anilin Mavisi ile Kromatin Kondansasyonunun Gösterilmesi İçin Kullanılan Çözeltiler.....	26
3.1.4.4. Sperm Nuklear Kromatin Dekondansasyon Testi İçin Kullanılan Çözeltiler ...	26
3.2. YÖNTEMLER	27
3.2.1. Spermin Fiziksel İncelemesi	27
3.2.1.1. Likefaksiyon (Sıvılaşma)	27
3.2.1.2. Görünüm	27
3.2.1.3. Hacim	27
3.2.1.4. Viskozite	27
3.2.1.5. pH	27
3.2.2. Mikroskopik Muayene	27
3.2.3. Sperm Sayısı.....	27
3.2.4. Motilite Tayini.....	28
3.2.5. Morfoloji Tayini	28
3.2.5.1. Diff-Quik Boyama Prosedürü	28
3.2.6. Swim-Up Tekniği ile Hareketli Sperm Eldesi.....	28
3.2.7. Anilin Mavisi ile Kromatin Kondansasyonunun Gösterilmesi	28
3.2.8. Sperm Nuklear Kromatin Dekondansasyon Testi	29
3.2.9. “Tek Hücre Jel Elektroforez” Yöntemi (Comet Analizi) İle DNA Hasar Analizi	29
3.2.9.1. Slayt Tabanlarının Hazırlanması	29
3.2.9.2. Hücre İzolasyonu/Uygulanması	29
3.2.9.3. Mikrojel Slaytlarının Elektroforezi.....	29
3.2.9.4. DNA Hasarının Değerlendirilmesi	30
3.2.10. ICP-MS ile Eser Element Analizi.....	30
3.2.11. Anneksin V-PI Akım Sitometri Yöntemi ile Apoptoz ve Nekroz Analizi	31
4. BULGULAR	33
4.1. Hasta Değerlendirmesi.....	33
4.2. Spermin Fiziksel İncelenmesi	33
4.2.1. Sperm Sayısı.....	34
4.2.2. Morfoloji	35
4.2.2.1. Normal Morfoloji.....	36
4.2.2.2. Baş Anomalisi	37
4.2.2.3. Boyun Anomalisi	38

4.2.2.4. Kuyruk Anomalisi	39
4.2.3. Motilite.....	40
4.2.3.1. Hızlı İleri	40
4.2.3.2. Yavaş İleri	41
4.2.3.3. Yerinde Hareketli.....	42
4.2.3.4. Yerinde Duran	43
4.3. Sperm Nuklear Kromatin Dekondansasyon Testi	44
4.4. Anilin Mavisi ile Kromatin Kondansasyonunun Gösterilmesi	46
4.5. “Tek Hücre Jel Elektroforez” Yöntemi (Comet Analizi) İle DNA Hasar Analizi..	47
4.6. Eser Elementler	52
4.6.1. Semendeki Vanadyum Konsantrasyonu	52
4.6.2. Semendeki Alüminyum Konsantrasyonu	53
4.6.3. Semendeki Krom Konsantrasyonu	53
4.6.4. Semendeki Mangan Konsantrasyonu	54
4.6.5. Semendeki Nikel Konsantrasyonu.....	55
4.6.6. Semendeki Bakır Konsantrasyonu.....	56
4.6.7. Semendeki Kurşun Konsantrasyonu.....	57
4.7. Anneksin V ve Propidium İodid ile Apoptotik ve Nekrotik Sperm Hücrelerinin Belirlenmesi	58
4.7.1. Anneksin V ve Propidium İodid ile Boyanmış Sperm Hücreleri.....	58
5. TARTIŞMA	61
KAYNAKLAR	68
ETİK KURUL KARARI	79
ÖZGEÇMİŞ	80

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1:	Spermatozoon sayılarının istatistiksel değerlendirmesi.....	35
Tablo 4-2:	Normal morfolojiye sahip spermilerin istatistiksel değerlendirmesi.....	36
Tablo 4-3:	Baş anomalisine sahip spermilerin istatistiksel değerlendirmesi.....	37
Tablo 4-4:	Boyun anomalisine sahip spermilerin istatistiksel değerlendirmesi.....	38
Tablo 4-5:	Kuyruk anomalisine sahip spermilerin istatistiksel değerlendirmesi.....	39
Tablo 4-6:	Hızlı ileri harekete sahip spermilerin istatistiksel değerlendirmesi.....	41
Tablo 4-7:	Yavaş ileri harekete sahip spermilerin istatistiksel değerlendirmesi.....	42
Tablo 4-8:	Yerinde hareketli spermilerin istatistiksel değerlendirmesi.....	43
Tablo 4-9:	Yerinde duran spermilerin istatistiksel değerlendirmesi.....	44
Tablo 4-10:	Sperm nuclear kromatin dekonkansasyon testi istatistiksel değerlendirmesi.....	45
Tablo 4-11:	Anilin mavisi ile kromatin kondansasyonunun istatistiksel değerlendirmesi.....	47
Tablo 4-12:	Hiç kırığa sahip olmayan comet analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	48
Tablo 4-13:	En çok kırığa sahip olan comet analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	49
Tablo 4-14:	Semende vanadium analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	52
Tablo 4-15:	Semende alüminyum analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	53
Tablo 4-16:	Semende krom analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	54
Tablo 4-17:	Semende mangan analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	55
Tablo 4-18:	Semende nikel analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	56
Tablo 4-19:	Semende bakır analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	57
Tablo 4-20:	Semende kurşun analizinin istatistiksel değerlendirmesi.....	58
Tablo 4-21:	Anneksin V ve PI ile boyanmış sperm hücrelerinin istatistiksel değerlendirmesi.....	60

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Spermatogenez.....	3
Şekil 2-2: Spermatogenez.....	5
Şekil 2-3: Sperm morfolojisi.....	7
Şekil 2-4: Sperm hücresi kesiti.....	8
Şekil 2-5: ICP-MS cihazı.....	21
Şekil 4-1: Hasta değerlendirmesine göre yaş ortancaları.....	33
Şekil 4-2: Spermin fiziksel incelemesine göre semen hacmi ortancaları.....	34
Şekil 4-3: Sperm sayısı.....	34
Şekil 4-4: Diff-Quik boyama prosedürü ile sperm morfolojisinin gösterilmesi.....	35
Şekil 4-5: Normal morfolojiye sahip sperm ortancaları.....	36
Şekil 4-6: Baş anomalisine sahip sperm ortancaları.....	37
Şekil 4-7: Boyun anomalisine sahip sperm ortancaları.....	38
Şekil 4-8: Kuyruk anomalisine sahip sperm ortancaları.....	39
Şekil 4-9: Hızlı hareketli harekete sahip sperm ortancaları.....	40
Şekil 4-10: Yavaş ileri harekete sahip sperm ortancaları.....	41
Şekil 4-11: Yerinde hareketli sperm ortancaları.....	42
Şekil 4-12: Yerinde duran sperm ortancaları.....	43
Şekil 4-13: Sperm nuklear kromatin dekondansasyon testi.....	44
Şekil 4-14: Sperm nuklear kromatin dekondansasyon testi yüksek pozitif sperm ortancaları.....	45
Şekil 4-15: Anilin mavisi ile kromatin kondansasyonunun gösterilmesi.....	46
Şekil 4-16: Anilin mavisi ile kromatin kondansasyonunun gösterilmesinde histon pozitif anormal kromatin kondansasyon ortancaları.....	47
Şekil 4-17: Comet analizine göre kırığı olmayan sperm DNA ortancaları.....	48
Şekil 4-18: Comet analizine göre en çok kırığa sahip sperm DNA ortancaları.....	49
Şekil 4-19: Comet analizi I. Grup.....	50
Şekil 4-20: Comet analizi II. Grup.....	50

Şekil 4-21: Comet analizi III. Grup.....	51
Şekil 4-22: Comet analizi IV. Grup.....	51
Şekil 4-23: Semendeki vanadyum ortancaları.....	52
Şekil 4-24: Semendeki alüminyum ortancaları.....	53
Şekil 4-25: Semendeki krom ortancaları.....	54
Şekil 4-26: Semendeki mangan ortancaları.....	55
Şekil 4-27: Semendeki nikel ortancaları.....	56
Şekil 4-28: Semendeki bakır ortancaları.....	57
Şekil 4-29: Semendeki kurşun ortancaları.....	58
Şekil 4-30: Anneksin V ve PI ile boyanmış sperm hücrelerinin akım sitometrik incelenmesi.....	59
Şekil 4-31: Şekil 4-31: Anneksin V ve PI ile boyanmış sperm ortancaları.....	59

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Al	Alüminyum
ATP	Adenozin Tri Fosfat
Cr	Krom
Cu	Bakır
DNA	Deoksiribonukleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embriology (Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği)
ICP-MS	İndüklenmiş Eşleşmiş Plazma Emisyon Spektroskopisi
ICSI	Intracytoplazmic Sperm Injection (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
Mn	Mangan
Ni	Nikel
NMPA	Normal Melting Point Agaroz (Normal Erime Noktalı Agaroz)
LMPA	Low Melting Point Agaroz (Düşük Erime Noktalı Agaroz)
PAS	(Periyodik-asit Schiff)
PBS	Phosphate Buffer Saline (Fosfat Tuzu Tamponu)
Pb	Kurşun
RNA	Ribonukleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TH1/TH2B	Testis-spesific Histon (Testise özel histon)
TP1/TP2	Transition Proteins (Geçiş Proteinleri)
V	Vanadyum
ZP	Zona Pellusida

ÖZET

Altınar P. (2013). Eser Elementlerin Yol Açtığı DNA Hasarlarının Seminal Plazma ve Sperm Kromatin Yapısı Üzerine Etkisinin Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet Assay) Yöntemi ile Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul

Spermatozoonların genetik yapısındaki bozulma ile infertilite arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Bu ilişkinin infertilitedeki önemi farklı mekanizmalar ile açıklanmış in vivo ve in vitro çalışmalarla da gösterilmiştir. Son yıllarda kromatin hasarları, fertilizasyon ve embriyo gelişim bozukluğu sık durulan konular arasındadır. Çevresel etmenler spermatozoanın oosit ile etkileşimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Anormal kromatin yapılanması infertil erkeklerde, fertil erkeklere göre daha sık görülmektedir. Spermatozoonların genetik yapısındaki bozulma oranı arttıkça doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır. IVF (In Vitro Fertilizasyon) laboratuvarına başvuran hastalardan alınan semen örnekleri ile yapılan fiziksel ve mikroskopik analiz sonuçları hastanın sperm genetik yapısı ile ilgili analiz sonuçları ile fark gösterebilmektedir.

Bu bilgilerden yola çıkarak, sperm kaynaklı sorunların daha net anlaşılması ve üreme tekniklerinde uygulanan rutin analizlere ek olarak ultrayapısal çalışmaların infertiliteye olan katkısı çalışmamızda incelendi. Sigara içimine bağlı olarak IVF merkezine başvuran fertil ve infertil erkeklerden semen örnekleri alındı. Fertil sigara içmeyen (I), fertil sigara içen (II); infertil sigara içmeyen (III), infertil sigara içen (IV) erkekler olarak gruplandırıldı. Toplam 52 semen örneği ile çalışıldı (n=13). Toplanan semen örneklerinde sırasıyla makroskopik ve mikroskopik semen analizi, sperm kromatin yapısı, DNA hasarı, apoptoz ve eser element analizi değerlendirmeleri yapıldı. Sperm kromatin yapısı; sperm kromatin dekonkansasyon testi ve anilin mavisi testi ile araştırıldı. DNA hasarı Comet analiz yöntemi ile değerlendirildi. DNA hasarına maruz kalmış hücrelerde Apoptoz Annexin V-PI boyama yöntemi kullanılarak akım sitometri analizleriyle belirlendi. Seminal plazmada ICP-MS (İndüktüf olarak eşleştirilmiş plazma emisyon spektroskopisi) cihazı ile bakır, kurşun, nikel, alüminyum, vanadyum, krom ve mangan gibi eser elementlerin analizi yapıldı.

Dört grup aralarında karşılaştırıldığında sperm sayısı ($p_1=0,012$), morfolojisi ($p_2<0,001$), sperm nuklear kromatin dekonkansasyonu ($p_3<0,001$), anilin mavisi ile kromatin kondansasyonu, ($p_4<0,001$), comet analizi ($p_5<0,001$) ve apoptoz ($p_6=0,001$) kriterlerinde istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı fark bulundu. Sperm motilitesi, semen hacmi ve yaş kriterleri arasında fark olmakla birlikte istatistiksel açıdan ilişki bulunmadı. Sigara içimine bağlı olarak 2 grup karşılaştırıldığında (II ve IV) semende bazı eser element düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. (Al $p_7=0,003$, Pb $p<0,001$, Mn $p_9=0,005$, Ni $p_{10}=0,031$ V $p_{11}=0,004$). Sperm kaynaklı sorunların daha net anlaşılması için yardımla üreme tekniklerinde uygulanan rutin analizlere ek olarak yaptığımız ultrayapısal çalışma sonuçlarının infertilite merkezine başvuran çiftlerin klinik tedavi gelişimine kolaylık ve katkı sağlayacağı ve etkili olabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Comet Assay, DNA hasarı, sperm, infertilite, eser element

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 5703

ABSTRACT

Altiner P. (2013). The Analysis Of The Effects Of The DNA Damage Caused (Induced) By The Trace Elements On Seminal Plasma And Sperm Chromatine Structure By Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay). İstanbul University, Institute Of Health Science, Department Of Biophysics. Post Graduate Thesis. İstanbul.

There is a strong relationship between genetic disruption of spermatozoon and infertility. The importance of this relationship was explained and shown with in vivo and in vitro studies. In recent years chromatin damages, fertilization and embryonic developmental anomalies are the most investigated subjects. Environmental factors can affect the interaction between spermatozoa and oocyte negatively. Abnormal chromatin structuring are seeing more often in infertile men than fertile men. Becoming pregnant in normal way is getting hard when the damage rates in spermatozoon chromatin status increase. The microscopical and physiological analysis of semen samples collected from patients who applied to the IVF laboratory, may differs from the analytical results of the semen's genetic profile of the patient.

Based on this informations, to understand sperm welded problems and contribution of ultrastructural studies additively IVF routine analyses to infertility was examined in our study. Semen samples was taken by the infertile men who applied IVF centre and fertile men depends on smoking status. Groups are fertile non-smoker men (I), fertile smoker men (II); infertile non-smoker men (III), infertile smoker men (IV). The study was executed 52 semen samples (n=13). Macroscopic and microscopic semen analysis, sperm chromatin status, DNA damage, apoptosis and trace element analysis was done with the semen samples. Sperm chromatin status was investigated with sperm chromatin decondensation assay and aniline blue assay. DNA damage was measured with Comet assay. Apoptosis was defined at the cells which exposed to DNA damage Annexin V-PI staining procedure and flow cytometry analysis. Trace elements analysis like copper, lead, nickel, chrome, vanadium, manganese, aluminium was done with ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry).

When four groups compared to each other sperm number ($p_1=0,012$), sperm morphology ($p_2<0,001$), nuclear chromatin decondensation ($p_3<0,001$), chromatin packaging ($p_4<0,001$), DNA damage rate ($p_5<0,001$) and apoptosis ($p_6=0,001$) criterias was found statistically significant difference. When four groups compared to each other sperm motility, semen volume and age criterias was different. But the difference was not significant. When two groups compared to each others depending on smoking (II and IV) some trace elements rates was found statistically significant different (Al $p_7=0,003$, Pb $p_8<0,001$, Mn $p_9=0,005$, Ni $p_{10}=0,031$ V $p_{11}=0,004$). To explain the issues caused by sperm clearly, in addition to the regular analysis that we have done on assisted reproductive technology, result of the ultrastructural study could be helpful, improver and effective for the clinical treatment of couples whom applied to the IVF center.

Key Words: Comet Assay, DNA damage, sperm, infertility, trace element

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No: 5703

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Spermatozoon DNA hasarının infertilitedeki önemi şimdiye kadar farklı mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmıştır (1-3). Spermatozoonların genetik yapısındaki bozulma ile infertilite arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Spermatozoon DNA hasarlarının infertilitesindeki önemi in vitro ve in vivo çalışmalarla da gösterilmiştir (4, 5). Özellikle kromatin hasarları fertilizasyon ve embriyo gelişim bozukluğu son yıllarda üzerinde sık durulan konular arasındadır. Birçok çevresel faktör, değişik mekanizmalarla spermatozoanın oosit ile etkileşimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Ayrıca, anormal kromatin organizasyonu infertil erkeklerde, fertil erkeklere göre daha sık görülmektedir (6,7). Morfolojik olarak normal sperm yüzdesi % 30'dan az olan erkekler normal sperm yüzdesi % 30'dan fazla olan erkeklere göre daha fazla protamin eksikliği ve DNA hasarına sahiptir (8).

DNA hasarı normal DNA metabolizması işleyişinde kendiliğinden veya bazı çevresel faktörlerin etkisiyle oluşmaktadır. Fertiliteyi etkileyen en önemli etkenlerden biri de germ hücrelerinde artmış sıklıkta mutasyonlara yol açan DNA hasarıdır. DNA hasarlı spermatozoon oranı arttıkça doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır. Erkek infertilitesinde, spermatozoon DNA hasarının kaynağı farklı mekanizmalarla açıklanmaya çalışılmıştır. Bu mekanizmalardan oksidatif stress, sperm kromatin yapısı ve apoptoz üzerinde durulmuştur.

İnsan vücudunda önemli miktarlarda bulunan karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N), fosfor (P) ve kükürt (S)'den başka daha pek çok elementin yanında bakır, kurşun, nikel, alüminyum, vanadium, krom gibi eser elementler de vardır. Eser elementlerin vücuttaki düzeylerinde artış, azalma veya oranlarındaki değişmelerin semenin kalitesini etkilediği ve bazı hastalıkların seyrinde, tedaviden alınan cevabın değerlendirilmesinde ve prognozunda önemli olduğu düşünülmektedir (9-11).

Tez çalışmamızda infertilite merkezine başvuran sigara içen ve içmeyen erkeklerden ve fertil olan sigara içen ve içmeyen erkeklerden seminal plazma örnekleri alındı.

Sigara içimiyle artan eser elementlerin, sperm sayısı, motilitesi, morfolojisi, kromatin yapısı ve sperm DNA hasarı üzerindeki etkileri değerlendirildi. Bu parametreler birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu.

Semen örneklerinde sırasıyla sperm morfolojisi, motilitesi gibi rutin analizlere ek olarak sperm kromatin yapısına, bakır, kurşun, nikel, alüminyum, krom, mangan ve vanadyum gibi eser element miktarına bakıldı. Gruplar arasındaki anlamlılığı değerlendirildi. DNA hasarının hassas bir şekilde ölçülmesine olanak tanıyan “Comet Assay” tek hücre jel elektroforez tekniği kullanıldı. Ayrıca, normal spermatogenezis sırasında germ hücre ölüm mekanizmasının altında yatan nedenlerden biri olan insanları da kapsayan pek çok memeli türünde spermatogenezisi düzenleyen önemli mekanizmalardan apoptoz Anneksin V – PI boyama yöntemi kullanılarak akım sitometri tekniği ile saptandı.

Çalışmadan elde edilecek bulguların, IVF merkezine başvuran erkeklerin semen örnekleri üzerinde yapılan fiziksel ve mikroskopik analizlerin yanısıra DNA hasarının “Comet Assay” tekniği ile görüntülenmesi ve diğer ultrayapısal deneyler ile desteklenip, infertil çiftlerin klinik tedavi gelişimine, sorunun kaynağının aydınlatılmasına kolaylık ve katkı sağlayacağı yönünde değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

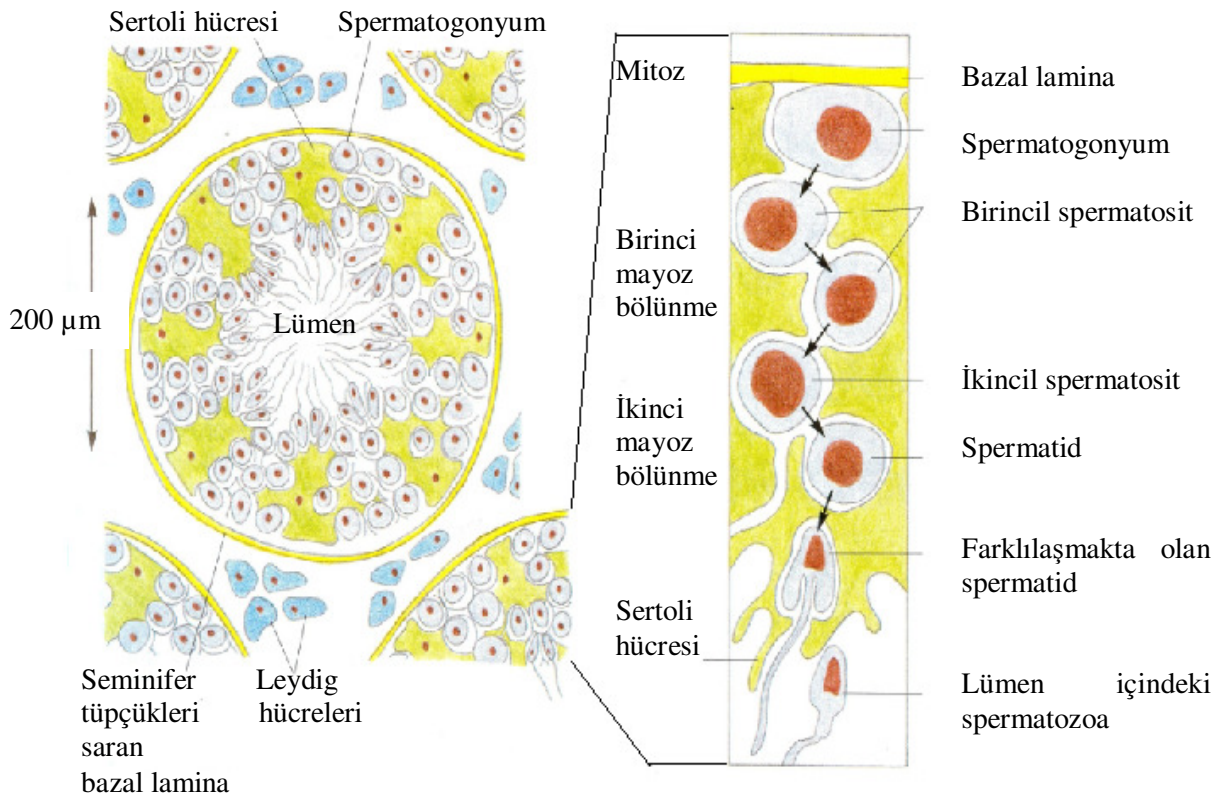
2.1. SPERMATOGENEZ

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır.

Olgunlaşmamış eşey hücrelerinin ileri derecede özelleşmiş sperm haline gelinceye kadar geçirdiği sürece spermatogenez denir. Spermatogenez pubertayla birlikte başlar yaşlılığın son dönemlerine kadar sürebilir.

Spermatogenez farklı özellikte 3 ayrı evreden oluşur:

1. Spermatositogenez
2. Mayoz bölünme
3. Spermiyogenez



Şekil 2-1: Spermatogenez (24)

2.1.1. Spermatositogenez

Spermatositogenez’de spermatogonium A’lar bir dizi mitoz bölünme gerçekleştirirler ve sürekli spermatogonium A’ları oluştururlar. Bu bölünmenin sonucunda oluşan spermatogonium A’ların bir kısmı mitoz bölünme göstererek spermatogonium B’leri oluşturur. Oluşan spermatogonium B’ler mitoz bölünme ile primer spermatositi meydana getirirler. Spermatogonium B’ye dönüşemeyen spermatogonium A’lar ana hücre olarak kalır. Spermatositogenez burada tamamlanır (12-14).

2.1.2. Mayoz Bölünme

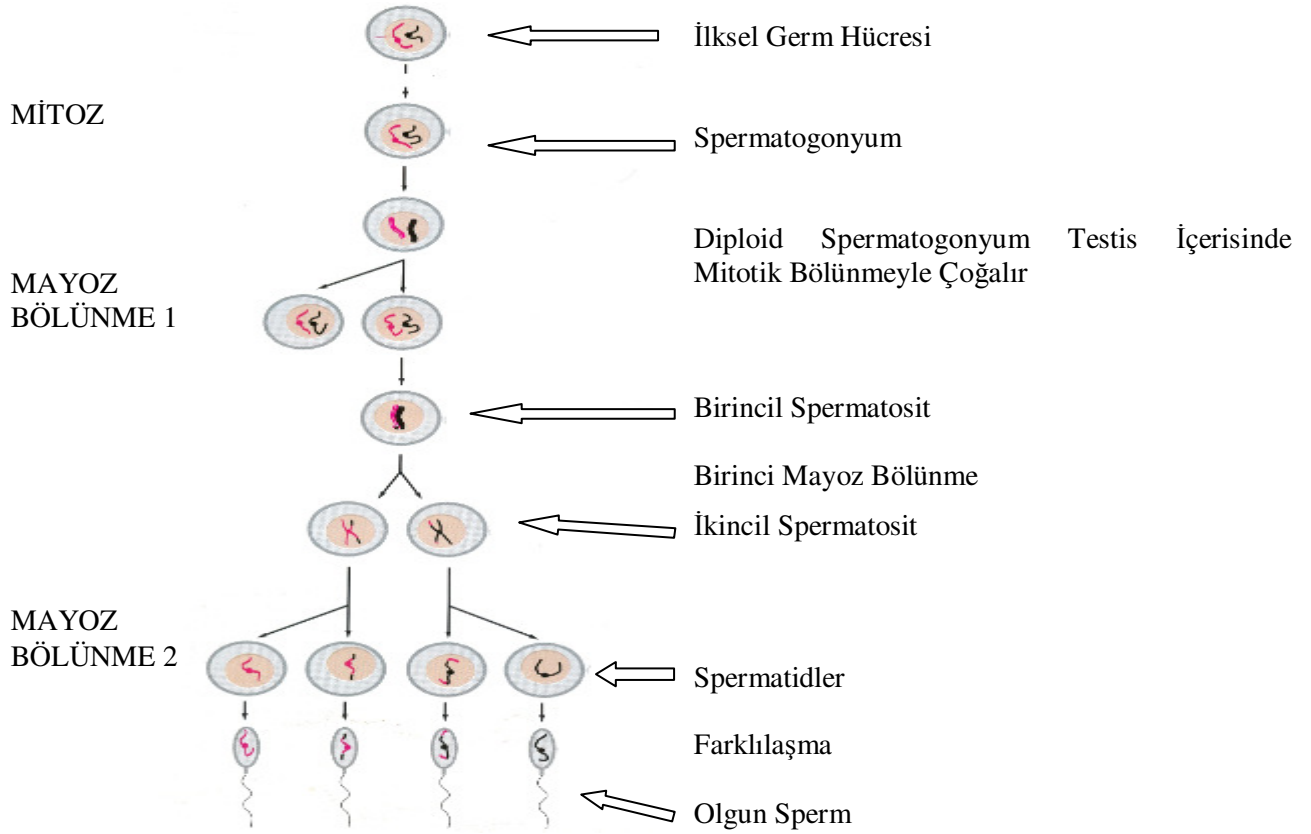
Daha sonra primer spermatositler 1. mayoz bölünmeye girerler ve sekonder spermatositi oluştururlar. 1. Mayozun yaklaşık 22 gün süren profaz evresi vardır. 1. Mayozun profaz evresinde görülen kroosing-over aşamasında genetik çeşitlilik sağlanır.

I. mayozun başında diploid kromozomlu iken I. Mayozun sonunda haploid kromozom sayısı olur. Daha sonra sekonder spermatositin II. mayozu geçirmesi ile de spermatit adı verilen hücreler oluşur. II. mayozda kromozom sayısı değişmez fakat DNA sayısı yarıya iner. Her bir diploid sekonder spermatositte iki tane monoploid spermatid oluşur. Birinci mayoz bölünme günler bazında bir süreç olmasına karşın ikinci mayoz bölünme dakikalar bazında olduğu için seminifer tübüllerde primer spermatositler en çok gözlenen hücrelerdir. Daha sonraki aşamada spermiyogenez başlar (13,14).

2.1.3. Spermiyogenez

Spermiyogenez, spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA’sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoona dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez.

Spermatitten olgun spermium oluşumuna kadar geçen süreç sertoli hücresi sitoplazmasında gerçekleşir. Yeni oluşan spermatitler birbirlerine protoplazmik köprüler ile bağlıdır. Bu bağlantıları ile birlikte sertoli hücresi sitoplazmasına doğru girerler ve burada bir dizi gelişim evresi geçirirler (15). Bunlar golgi fazı, başlık fazı, akrozomal faz ve maturasyon evreleridir.



Şekil 2-2: Spermatogenez (24)

2.1.3.1. Golgi Fazı

Spermatidin sitoplazması, çekirdeğin yakınında yer alan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriyumlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz yüzlü endoplazmik retikulum tübüllerini içerir. PAS (Periyodik-asit Schiff) ile boyanan bol glikoproteinli proakzomal granüller Golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek akrozomal vezikül adı verilen bir zarla çevrilir ve tek bir akrozomal granülü oluştururlar (14,16).

2.1.3.2. Başlık Fazı

Akrozomal vezikülün zarının yeniden şekillenmesi ile akrozomal kep adı verilen yapı gelişir. Çekirdek yüzeyinde giderek büyüyerek, çekirdeğin ön kısmını tamamen kaplayan bir başlık oluşturur. Akrozomal maddelerin bu yapı içine dağılması ile yapısını tamamlar, burada granüler filamentöz bir yapı oluşur ve akrozomal kep (akrozom) adını alır (14,16).

2.1.3.3. Akrozomal Faz

Akrozom vezikülü ve granülü, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Spermiyogenezin bu evresinde spermatid, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir ve aksonem lümene doğru uzanır. Ayrıca, çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden biri gelişerek kamçıyı oluşturur. Mitokondriler de kamçının proksimal kısmı etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge, spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur. Kamçı hareketi, mikrofibriller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur. Bu proteinlerin eksikliğinde, hareketsiz spermler ve infertilite görülür (14,16).

2.1.3.4. Maturasyon (olgunlaşma) evresi

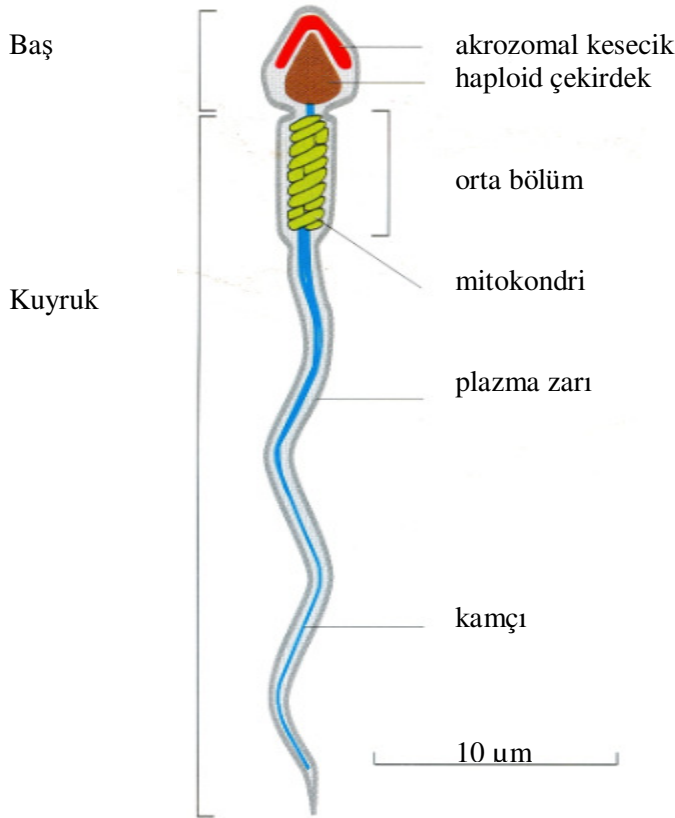
Spermiyogenez sırasında geriye kalan artık sitoplazma, Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine bırakılırlar (14,16).

2.1.4. Kromatin yapılanması

Spermiyogenezin başlangıcında haploid spermatidler tipik bir nukleozomal kromatin yapısı gösterirler. Bu evredeyken bol miktarda ribozomal olmayan RNA transkripsiyon aktiviteleri vardır. Ancak, spermiyogenez ilerledikçe boncuk dizilimi şeklinde görünüm veren (klasik nukleozom yapısı nedeniyle) kromatin yapısı yerini düz kromatin liflerine bırakır. Bunlar artık transkripsiyon yapmazlar ve yan yana iplikçikler tarzında toplanırlar. Spermatogenez ve spermiyogenez sırasında kromozomal proteinler üzerinde yapılan çalışmalar, spermatosit ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde somatik histonların ve testise spesifik TH1 ve TH2B histonların bulunduğunu, oysa ileri evre spermatidlerde TP1 ve TP2 geçiş (transition) proteinlerinin, daha ileride ise artık protamin P1 ve P2 proteinlerinin yer aldığını göstermiştir. Gerçekten de, ratlarda spermatogenezin 12. ve 16. basamakları arasında nukleusta TP1 ve TP2 proteinleri bulunurken, 16. basamaktan sonra P1 ve P2 proteinleri ortaya çıkmaktadır (18-19).

2.2. SPERMİN YAPISI

Bir spermatozoon baş, boyun ve kuyruk bölgelerinden oluşur.



Şekil 2-3: Sperm Morfolojisi (24)

2.2.1. Baş

Toplam uzunluğu yaklaşık 60 µm kadar olan spermatozoon baş kısmının boyu 3-5 µm, eni 2-3 µm dir. Başın esas görevi; DNA materyalini taşımak ve korumaktır. Baş bölgesi, lizozomal organelin bulunduğu akrozom, fertilizasyon için oosite tutunma bölgesi olan ekvator bölgesi ve akrozom sonrası bölgeyi içerir (20).

İnsan spermiumunun başı, 4-5 µm uzunlugunda, 2.5-3.5 µm genişliğindedir. Akrozom ve çekirdek olmak üzere iki kısımda incelenir.

2.2.1.1. Akrozom

Başlık şeklinde başın ön kısmında bulunur. Sperm başının (nükleusun) % 40-70'ini kaplayan oval yapıda görülmektedir. Dış ve iç olmak üzere iki membran tarafından sarılmıştır. Lizozomun değişik bir hali olarak değerlendirilebilir. Fertilizasyon için

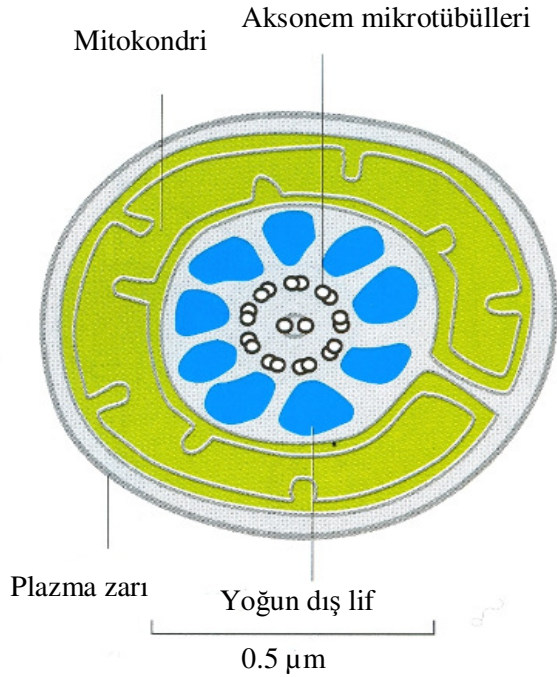
gerekli olan bir çok hidrolitik enzim içerir. Akrozomda bulunan en önemli enzimler hiyalüronidaz, proakrozin, akrozin, esteraz, nöraminidaz, asit fosfataz, fosfolipaz, arilsülfataz B, N-asetil glukozaminidaz, arilamidaz, kollajenazdır. Ovumun fertilizasyonu sırasında akrozomal membranın oosit plazma membranı ile birçok bölgeden birleşmesi ile akrozom reaksiyonu oluşmakta ve enzimatik yapı serbestleşmektedir. Akrolizin tarafından aktive edilen proakrozin, ejakülasyondan sonra akrozin haline dönüşerek servikal kanaldaki mukus viskozitesinin düşürülmesinde önemli rol oynar. Akrozin granüloza hücrelerinin çevresinde bulunan proteinlerin ayrılmasında görev yapar. Akrozinin zona pellusida (ZP)'yı geçmekte önemli bir rolü vardır. Akrozomal bölgede vakuoller de bulunmaktadır (21,22).

2.2.1.2. Çekirdek

Kromatin ve çekirdek membranından oluşur. Kromatini sıkıca paketlenmiştir. Bu özellik spermiuma hareketlilik sağlar. Çekirdek haploid sayıda kromozom içerir ve oosite girmeden ve protaminler ayrılmadan DNA aktive olamaz (23).

2.2.2. Boyun

Yaklaşık 0.3 μm uzunluğundadır. Segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriolden meydana gelir.



Şekil 2-4: Sperm hücresi kesiti (24)

2.2.3. Kuyruk

Yaklaşık 55 μm uzunluğundadır. Kuyruğun merkezi kısmını bir çift santral, dokuz çift çevresel mikrotubuler yapıdan oluşan aksonem adlı yapı oluşturur ve bu önemli bir değişme göstermeksizin, boyundan başlayıp kuyruğun son uç kısmına kadar uzanır. Aksonem, kuyruğa hareketlilik, kalın ve koyu dış fibriller ise diklik sağlayan yapılardır (15). Kuyruğun başa yakın kısmında, aksonem çevresinde helikal yapıda sıralanmış mitokondriler ve arka kısmında yoğun fibrilleri çevreleyen fibröz bir kılıf bulunur. Bu fibriller ile fibröz kılıf kuyruğun iskeletini meydana getirir.

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

2.2.3.1. Orta parça

Yaklaşık 3,5 μm uzunluğundadır. Aksonem ile çevresindeki 9 kalın dış fibril ve bunları saran helikal yapıdaki mitokondrion tabakasından oluşur. Bu sarmalın 11-15 döngüsü vardır ve her dönemece ortalama 2 mitokondri denk gelir. Mitokondriler sperme hareket için gerekli olan enerjiyi üretirler.

2.2.3.2. Esas parça

Hücresinin hareketli olan parçasıdır. 0,5 μm çapındadır, 40 μm uzunluğundadır. Aksonem, onu çevreleyen kalın dış fibriller yapı, fibröz tabaka ve en dıştaki plazma membranından oluşur.

2.2.3.3. Son parça

3 μm uzunluğundadır. Kuyruğun son kısmında kalın fibriller ve fibröz tabaka kaybolur. Bu bölgede önce dynein kolları yok olur, daha sonra merkezdeki mikrotübül çiftleri kaybolur ve dıştaki çiftlerin ikisi ortaya hareket ederken kalan 7'si onların etrafını sarar. Bu sırada B tübülleri de açılarak kaybolur. Kuyruğun ucuna gelindikçe aksonemin mikrotübül yapısı sona erer (14,16).

2.3. İNFERTİLİTE

İnfertilite, çiftlerin bir yıl süre ile korunmaksızın düzenli cinsel ilişkide bulunmasına rağmen gebe kalamamasıdır. Üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık % 10-15'i bu durumdan etkilenmektedir. Normal şartlar altında kadınlarda her adet döngüsünde % 25 gebelik şansı vardır. Kadınlarda fertilité 20-25 yaşlarında en fazla olmakla birlikte, 35 yaştan sonra kaliteli oosit sayısında düşüş gözlenir ve 40 yaşından sonra en düşük düzeye

geçer. Erkeklerde ise 20-30 yaşlarında en fazla olan fertilité, 40 yaşından sonra düşüŖe geçer ve bu Ŗekilde ileri yaşlara kadar sürer. İnfertil çiftlerde; erkek faktörü yaklaşık % 20, kadın ile beraber ve açıklanamayan grup içine alındığında yaklaşık % 50 oranında infertilite söz konusudur (25-27).

Üreme çağındaki erkeklerin yaklaşık % 6'sında infertilite problemi ortaya çıkmakta ve bu sorunu yaşayan erkeklerin yaklaşık % 90'ı bozuk spermatogeneze sahiptir (28).

2.3.1. Erkek İnfertilitesi

2.3.1.1. Erkek İnfertilitesinin Nedenleri

Dünya Sağlık Örgütü'nün çok merkezli araştırmalarının sonucunda infertilite kliniklerine başvuran çiftlerin en az % 48'inde erkek kaynaklı nedenler bulunmaktadır.

% 41 oranında kadın, % 24 oranında erkek, % 24 kadın ile erkek beraber ve % 11'inde de bir neden gösterilememiştir (29).

ESHRE (Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneğı) tarafından infertil erkekler üzerinde yapılan geniş ölçekli bir çalışmada ise, yapılan tüm değerlendirmelere rağmen yaklaşık hastaların 1/3'üne tanı konulamamıştır. Bundan sonraki ikinci geniş grup ise varikozel grubudur (30).

Aşağıda bu çalışmaya ait erkek infertilite nedenleri görölmektedir. Bunlar çoktan aza doğru;

1. Nedeni açıklanamayan grup % 31.1
2. Varikozel % 15.6
3. Endokrin hipogonadizm % 9.0
4. Subklinik enfeksiyonlar % 8.0
5. İnmemiş testis % 7.8
6. Malign hastalıklarda semen dondurulması % 6.5
7. Eretil disfonksiyon, hipospadias % 6.0
8. Diğer çeşitli nedenler % 5.5
9. İmmünolojik % 4.5
10. Genel ve sistemik hastalıklar % 3.1
11. Obstrüktif patolojiler % 1.7
12. Jinekomasti % 1.1
13. Testis tümörleri % 0.3

Erkek infertilitesi klinik Ŗekillerine göre 5 ana grupta sınıflandırılmaktadır (31).

- A- Mekanik infertilite
- B- Azoospermi
- C- İmmünolojik infertilite
- D- Anormal semen kalitesi
- E- Sperm disfonksiyonu (Açıklanamayan infertilite)

2.4. SPERM DNA HASARLARI

Çeşitli hem iç hem de dış nedenlerden dolayı DNA’da değişik düzeyde hasarlar meydana gelmektedir. (32-34). DNA’da oluşan bu hasarların başlıcaları;

Kromatin yapısının bozulması (35), bazların kimyasal olarak değişmesi (36), kromatin yapısındaki anomaliler (37), DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları (36,38). DNA’da mutasyonlar (38) gibi bir takım yapısal bozulmalardır. Anormal kromatin organizasyonu infertil erkeklerde, fertil erkeklere göre daha sık görülmektedir.

Sperm kromatin hasarının belirlenmesinde DNA kromatin olgunlaşması/DNA bütünlüğüne bakılmaktadır. 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 (39-43).

2.4.1. Nükleer DNA Hasarı Ve Kaynağı

Erkek germ hücre hattında tanımlanan iki tip DNA hasarı mevcuttur. Birincisi replikasyon hataları ikincisi DNA fragmentasyonudur (44). Bunların nedenleri; spermatozoon olgunlaşma aşamasındaki hatalı paketlenme (45), apoptozun yol açtığı DNA fragmentasyonu (46), oksidatif stresdir (47).

2.4.2. Spermatozoon DNA Hasarı ve Erkek İnfertilitesi

Spermatozoon DNA hasarlarının infertilitedeki önemi çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir. Sperm sağlığı ile ilgili diğer ileri testlerden biri DNA integrite saptama testidir. DNA hasarı ve sperm kromatininde anormallikler; kromatin paketlenmesi, apoptozisinde bozukluk ve oksidatif stres sonucu oluşabilir. Yüksek düzeyde reaktif oksijen radikallerinin; infertil erkeklerde görülen tek ve ya çift sarmallı DNA fragmentasyonuna neden olduğu söylenmektedir. Sperm DNA hasarı; sigara içimi,

semen örneklerinin hazırlanması işlemi sırasında, kemoterapötik ilaçlar ve radyasyon sonucu oluşabilir. Artmış düzeydeki DNA hasarı IVF sikluslarına giden çiftlerdeki fertilizasyon ve gebelik oranlarındaki azalma ile birlikte görülmektedir. Spermilerin % 30'undan fazlasında DNA hasarı var ise fekundite (doğurganlık) azalır. Özellikle ICSI (intrastitoplazmik sperm enjeksiyonu) gibi yardımla üreme tekniklerinde DNA fragmantasyonlu spermatozoon ile oositin fertilize olma riski yüksektir (51).

2.5. SPERMATOGENEZ VE APOPTOZ

Doku canlılığında, enfekte hücrelerin yokedilmesinde ve normal fizyolojik ortamın devamlılığında etkisi olan apoptozis, testiküler dokuda da sık saptanan bir olaydır. Spermatogenezde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ek olarak germ hücre ölümü de gözlenir ve bu sperm oluşumunda önemli rol oynar (52,53). Apoptoz, spermatogenez esnasında programlı hücre ölümüne neden olur (54). Bu durum spermatozoanın normal gelişimi için mutlaka gereklidir (55). Kerr tarafından yapılan bir çalışmaya göre testiste sürekli olarak apoptozis gerçekleşmektedir (56). Testiste, germ hücrelerinin % 75'i apoptozise maruz kalır (57). Apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (58-61). Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir (55,62-64). Spermatogenezde apoptozisin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (65-66). Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere maruz kalması germ hücrelerinde apoptozu artıran diğer bir faktördür (67). Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (68-70).

2.6. COMET ANALİZİ İLE DNA HASARININ BELİRLENMESİ

Hücrelerde DNA hasarı ilk kez 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından belirlendi. Daha sonra bu teknik geliştirilerek hücrelerde DNA hasar tespitinin hassasiyetini arttırmak için Ostling ve Johanson tarafından elektroforez basamağı eklendi. Bu yöntemin geliştirilmesi için atılan önemli son adım da sadece çift sarmal kırıkları değil tek sarmal kırıklarının da anlaşılması için nötral değil alkali koşullarda işlemin yapılması idi. Bu nedenle 1988 yılında Singh ve ark. yüksek alkali ortamda (pH

>13) yöntemi uygulamışlardır. Bugün hala Singh ve ark.'nın geliştirmiş olduğu, hem tek hem de çift zincir kırıklarının anlaşılmasını sağlayan metod kullanılmaktadır.

2.6.1. COMET ASSAY METODOLOJİSİ

Tek hücreli jel elektroforezi veya sıklıkla tercih edilen diğer adıyla “Comet Assay” tekniği hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanan non-invaziv, hızlı ve hassas bir floresan mikroskopik yöntemdir. Yaşlanma, moleküler epidemiyoloji, klinik ve genetik toksikoloji alanların da önemli uygulamaları olan “Comet Assay” son yıllarda giderek artan bir sıklıkta apoptoz, oksidatif stres-antioksidan çalışmalarında da yer almıştır (71).

Mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülen hücreler, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süpersarmal DNA'nın serbestleşmesi için lizis işlemine tabi tutulur. Alkali ortamda süpersarmal yapı gevşer, açılır ve kırıklar ortaya çıktıktan sonra elektroforez etkisi ile kırılmış DNA zincirleri anoda doğru göç edip kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur. Lizis basamağından sonra ilave kırıklar oluşmaması için işlemler mümkün olduğunca karanlık ortamda gerçekleştirilmelidir. Comet sayımı deneye hakim tek bir kişi tarafından yapılmalıdır.

2.6.2. “COMET ASSAY” BASAMAKLARI

1. Hücrelerin hazırlanması: Kültüre edilmiş hücreler, tam kan örnekleri, kemik iliği, doku örnekleri, sperm hücreleri materyal olarak kullanılabilir. Tam kan örneklerinde DNA hasar çalışmasında heparinize kan kültür ortamına alınır, düşük erime noktalı agaroz ile karıştırılarak kullanılır. Kan örneklerinde hücre fraksiyonları histopak ile izole edildikten sonra kullanılır. Fibroblast ve çeşitli doku örneklerinde ise tripsin-EDTA ile muamele edilerek önce proteinler uzaklaştırılır. Semen örneklerinde semen içeriğinden hücreler izole edilir. Bu tip ön işlemlerle serbestleşen hücreler agaroz jel ile kaplama yapılmış lamalar üzerine uygulanırlar.

2. Hücrelerin jele gömülmesi : Hücreler hazırlanmadan önce normal erime noktalı agaroz jel mikroskop lamalarına tamamen yayılır. Düşük erime noktalı agaroz jel içinde süspansiyon edilmiş hücreler kaplama yapılmış olan lamaların üzerine yayılır. Yaklaşık 10.000 hücre ile işlemin gerçekleştirilmesi en idealidir.

3. Lizis: Agaroz jel donduktan sonra yüksek konsantrasyonda tuz, deterjan ve proteinaz K içeren lizis çözeltisinde gece boyu bekletilir. Lizis işlemi sırasında membranlar parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten uzaklaştırılır.

4. Alkali ortamda DNA süpersarmal yapısının çözülmesi: Hazırlanmış olan preparatlar çift sarmal DNA yapısının açılması için elektroforez öncesinde yüksek alkali özellikteki ($\text{pH} > 13$) elektroforez tamponunda inkübe edilir. Alkali tampon içerisinde çekirdekteki çift sarmal DNA, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar. İşlem süresi hücre tipine göre değişmekle birlikte genellikle 20-40 dk olarak uygulanmaktadır.

5. Elektroforez: Alkali ortamda DNA sarmalının açılmasından sonra, jel içinde oluşan tek zincir DNA alkali koşullarda elektroforeze tabi tutularak comet oluşumu sağlanır. Elektrik akımı uygulandığı zaman, anoda doğru hareket eden DNA parçaları bir kuyruklu yıldız görüntüsü verir. Hasarsız DNA ise çekirdekten çıkamaz. Elektroforez 24 V, 300 mA akım ve yine hücre tipine göre 15-25 dk süre içinde gerçekleştirilir.

6. Nötralizasyon: Alkali ortamda elektroforezden sonra, jel pH'sının nötralizasyonu için lamalar uygun bir tamponla ($\text{pH} 7,5$) 5er dk üç defa yıkanır. Nötralizasyondan sonra lamaların boyanma işlemine geçilir.

7. DNA'nın boyanması: "Comet" in görüntülenmesi için floresan boya ve uygun büyütme seçilir. İşaretleme için en çok kullanılan floresan boya etidyum bromürdür. Boyama sonrasında floresan mikroskopunda anoda doğru göç eden DNA fragmanları kuyruklu yıldız görüntüsü verir, hasarsız DNA ise yuvarlağımsı bir şekilde görülür.

8. Comet görüntülerinin sayılması ve DNA hasarının belirlenmesi: Güvenilir sonuçlar elde edebilmek için değerlendirme deneyimli bir kişi tarafından yapılmalıdır. "Comet" lerin sayılmasında iki farklı yol izlenebilir:

a) Görsel analiz: Görsel değerlendirmeye göre "comet" ler DNA göç uzunluğuna göre 3 kategoride tanımlanır. Sınıflandırma "comet" lerin görünümüne göre şöyle tanımlanır: Parlak başlı objeler ve görünmeyen kuyruklar 0 kategorisine girer (kuyruksuz yuvarlak şeklindeki görüntüler), çok küçük başlı cometler ve uzun dağınık kuyruklar 2. kategoriye girer, 0-2 kategorileri arasında yer alan "comet" ler kolaylıkla ayırt edilebilecek şekilde yer alır. Sayım işlemi için her lamdan rastgele 100 "comet" seçilir ve her birine içinde bulundukları kategoriye göre bir değer verilir.

b) Bilgisayarlı görüntü analizi: Mikroskop ile bağlantılı olan kamera sistemi ile "comet" lerin görüntüleri tespit edilir. Bu işlem için üretilen yazılımlar ile otomatik değerlendirme yapılır. Programlar kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans

yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreleri belirleyebilecek şekilde tasarlanmıştır (72).

2.7. ÇEVRESEL ETMENLER

Kimyasal kirleticiler erkek infertilitesine etki eden en önemli faktörler arasındadır. Türkiye’de ve dünya genelinde yaygın olarak kullanılan sigara da içerdiği pek çok zararlı kimyasaldan ötürü araştırmaya dahil edilmiştir.

2.7.1. Sigara

Dünyanın en hızlı yayılan ve en uzun süren salgını olarak nitelendirilen tütün ilk kez Amerika’da üretilmiş ve kısa sürede tüm dünyaya yayılmıştır. Özellikle I. ve II. Dünya savaşlarındaki cephedeki askerlere sigara gönderilmesi sigara tiryakiliğinin yayılmasında büyük etkileri olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından sigara kullanmak, biyo-sosyopsikolojik zehirlenme olarak tarif edilmektedir (73).

Dünya genelinde sigara kullanıma karşı pek çok kampanya yürütülüyor olmasına karşın, sigara tüm dünyada halen çok yaygın olarak kullanılmaktadır. ABD’deki üreme çağındaki erkeklerin yaklaşık % 35’i, kadınların % 30’u sigara içmektedir. Avrupa’da sigara oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır, halkın % 35’i sigara içmektedir. Özellikle Türkiye, Yunanistan ve Bulgaristan gibi doğu Avrupa’da bulunan ülkelerde bu oran % 44’lere ulaşmaktadır (74,75).

Sigara içilmesi sırasında tütün yapraklarının yanması ile pek çok yanma ürünü oluşumu gözlenir. Sigara dumanı içerisinde bilinen yaklaşık 4700 bileşik vardır. Bu bileşenlerden pek çoğu farmakolojik olarak aktif, toksik, mutajenik, karsinojenik olarak bilinmektedir. Bunlardan bazıları oksidanlar, prooksidanlar, serbest radikaller, redükleyici ajanlar, formaldehid, asetaldehid, akrolein gibi aldehit ve ketonlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, fenolik bileşikler, karboksilik asitler, steroidler, nitrozamindir (76,77).

Sigara akciğer kanseri, kronik bronşit ve koroner kalp hastalıklarına yol açtığı bilinmektedir. Ağırlıklı sigara kullanımının olduğu ülkelerde akciğer kanserinin % 80 90’nından, kronik bronşit ve amfizem ölümlerinin % 75-90’nından, koroner kalp hastalığı ölümlerinin % 25-30’undan sigara sorumlu tutulmaktadır (78).

Sigaranın infertilite nedeni olabileceği uzun yıllardır tartışılmaktadır. Fertilite, hipotalamus-hipofiz-over aksı, gametler ve endometriuma kadar birçok sistemin normal çalışması sonucunda oluşur. Üreme karmaşık bir sistemdir ve sistemin içindeki yapılar birçok faktörden oldukça kolay etkilenmektedir (79-80). Sigara içmenin sperm kalitesini

etkileyip etkilemediği konusunda henüz bir sonuca varılamamıştır. Bazı araştırmacılara göre sigara sperm yoğunluk ve motilitesini bozmakta fakat morfolojiyi etkilememektedir (81). Bazılarına göre ise sigara yoğunluk ve motilite ile birlikte morfolojiyi de bozmaktadır (82).

İn vitro fertilizasyon üzerine yapılan bazı çalışmalardan çıkan bulgulara göre sigaranın in vitro fertilizasyonda, fertilizasyon oranını azalttığı, oosit sayısını azalttığı, gebelik oranlarını düşürdüğü ve düşük oranlarını artırdığı bildirilmektedir (83,84).

Sigara dumanının katran olarak adlandırılan kısmında, kinon, semikinon, hidrokinon, gaz fazı, karbon ve oksijen merkezli serbest radikaller yüksek oranlarda bulunmaktadır (85).

2.7.2. Eser Elementler

Makro elementler, günde 100 mg'dan fazla miktarda gerekli olan ve dokularda mg/kg doku düzeylerinde bulunan elementlerdir. C, H, O ve N karbonhidratlar, lipidler, proteinler ve nükleik asitlerin yapı taşı olan makro elementlerdir. Na, K, Cl, Ca, P, Mg ve S insan vücudunda bulunan makro minerallerdir. Bunlardan başka vücutta çok az bulunan elementler vardır. Bunlara eser element denir.

Eser elementler, günde 100 mg'dan fazla miktarda gerekli olan ve dokularda mg/kg doku düzeylerinde bulunan elementlerdir. Fe, Cu, Zn, Co, Mn, Cr, Mo, Se, F ve I eser elementlerdir.

Ultra eser elementler, günde 100 µg kadarı gerekli olan ve dokularda µg/kg doku düzeylerinde bulunan elementlerdir. As, B, Br, Cd, Pb, Li, Ni, Si, Sn, V ve Sr ultra eser elementlerdir.

Bir element, yeterli miktarda alınmadığında organizmada bir fonksiyon bozukluğu görülürse ve sadece o elementin fizyolojik miktarları bu bozukluğu önler veya ortadan kaldırırse esansiyel element olarak adlandırılır (86).

Eser elementler biyolojik sistemleri etkileyerek, çeşitli mekanizmalar yoluyla biyolojik sistemlerde rol oynamaktadır (87).

2.7.2.1. Bakır (Cu)

Vücuttaki bakır düzeyi oldukça düşüktür ancak, bu normal vücut işlevleri için oldukça önemlidir (88). Organizmaya, bakır pek çok işlev için gereklidir. Bakırın plazmadaki miktarı genelde sabit olsa bile çeşitli patolojik ve normal durumlarda değişebilir. Bakırın en çok bulunduğu organlar sırası ile karaciğer, kalp, böbrek, beyin,

pankreas, göz ve saçtır (89). Hücre içinde en çok mitokondrilerde bulunur. İnsan vücudunda anahtar görevi yapan bir çok enzimin yapı taşıdır. Bu enzimlerden bazıları sitokrom oksidaz, seruloplazmin, katalaz, hemokuprindir (90). Bakır enerji veya antioksidan metabolizmasında rol alan çeşitli metalloenzim ve metalloproteinler için önemlidir. Bundan başka, sinirleri saran koruyucu kılıfın oluşumu da vücuttaki bakır miktarına bağlıdır. Bakırın sıçan ve köpek spermeleri üzerine oldukça toksik etki gösterdiği bilinmektedir (91). Bazı çalışmalardan çıkan sonuçlara göre bakır, spermeler üzerine en toksik etkili elementtir (92).

2.7.2.2. Kurşun (Pb)

Kurşunun eser miktarları bile sindirim sisteminden absorbe edilerek kanla dokulara iletilir. Ancak, gıda güvenliğinin önemslenmemesi ve bilinçsiz beslenme alışkanlıklarının yaygınlığı sorunu genelleştirmektedir (93).

Alkollü içkiler ve sigara kullanımı önemli düzeyde kurşun alımına yol açan alışkanlıklardır (94). Mesleki olarak kurşuna maruz kalmanın semen kalitesini bozduğuna, düşük sayısını artırdığına, testis fonksiyonlarına etki ettiğine dair çalışmalar mevcuttur (95,96). Petrol ya da metal bağlantılı işleri kurşuna maruziyeti artıran faktörlerdendir. Bu mesleklerde çalışan erkeklerin sperm kalitelerinde düşüş olmaktadır (97).

2.7.2.3. Nikel (Ni)

Nikel doğada çok yaygın bulunan bir metaldir. Nikel ve nikel bileşenleri sağlığa zarar veren maddelerdir. İnsanlar genel olarak nikel hava, su ve yemek yoluyla maruz kalmaktadır. Nikel maruziyeti bulunan hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan araştırmalar nikel bileşenlerinin toksik ve karsinojen etkisi olduğunu göstermiştir (98).

Nikel içeren ürünlerin fazla tüketimi, nikel ve bileşenlerinin üretimi, kullanımı ve imhasında oluşan çevre kirliliği kaçınılmazdır. İnsanlar nikel, solunum yoluyla, ağız yoluyla, içme suyuyla, bazı gıdaların tüketimiyle veya sigara içilmesiyle maruz kalabilir. Bu kirlilik, nikelin deriyle temasından oluşan nikel alerjisi, akciğer kanseri, gırtlak kanseri ve böbrek hastalıkları gibi önemli rahatsızlıklara yol açmaktadır (99).

Nikel, toksik ve karsinojenik bir metal olup sperm DNA'sı birincil hedeflerinden biridir. Deneysel olarak Ni klorite maruz bırakılan erkek farelerin sperm sayılarının düştüğü ve kromozomal anomalilerin olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda Ni uygulaması az oranda Cu seviyesinin artışı sağlar. Bu anomaliliklerin olası mekanizmaları Ni ve Cu

aracılı redoks reaksiyonlarında ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin yarattığı DNA hasarını kapsamaktadır (100).

2.7.2.4. Alüminyum (Al)

Alüminyum, yeni teknolojilerin de etkisiyle kullanımı giderek artan bir ürün olarak 21. yüzyıl metali olarak görülmektedir. 1890lı yıllardan bu yana alüminyumun endüstriyel çapta üretimi çok kolaylaşmıştır.

İnsan sağlığı ile ilişkisi gittikçe önem kazanan alüminyum genellikle zararsız olarak bilinse de; yüksek derişimlerine ya da düşük dozlarına uzun süreli maruz sağlık sorunlarına neden olabilmektedir. Bu yüzden vücuda fazla alüminyum alınması sakıncalıdır. Alüminyumun Alzheimer (101) nöromotor hastalıklar (102) hematolojik system (103) ile ilişkisini araştıran çalışmalar mevcuttur.

Sıçanlarla yapılan bir araştırmada periton içine enjekte edilen alüminyum sülfatın sıçan testisinde yol açtığı germinatif hasar ve böbrekte özellikle tübüler sisteme yaptığı dejeneratif hasar gösterilmiştir. Bu organlarda gösterilen histolojik hasarın Al ile birlikte periton içine vitamin E verilmesiyle ortadan kalktığı bildirilmiştir (104,105).

2.7.2.5. Krom (Cr)

Krom doğal olarak kayalarda, bitkilerde, toprakta, volkanik tozlarda ve gazlarda bulunur. İnsanlarda ve bitkilerde esas olarak bulunan üç değerli krom ise glüköz, yağ ve protein metabolizmalarında önemli rol oynar. İnsanlar mesleki ya da endüstriyel olarak yüksek dozda kroma maruz kalırlar (106).

Krom bileşenlerinin erkek üreme sistemine toksik etki yaptığına dair sınırlı da olsa bilgiler mevcuttur. Çin’de yapılan bir araştırmada elektro kaplama işinde çalışan ve krom maruziyeti bulunan 21 işçi kontroller ile karşılaştırıldığında düşük sperm sayısı ve motilitesine karşılık artmış Folikül Stimulan Hormon’a rastlanmıştır. Yine yapılan başka bir çalışmaya göre krom ve nikel maruziyeti bulunan erkeklerde artmış sperm kuyruk hasarları, azalmış sperm sayısına rastlanmıştır (107).

Kemirgenlerin testiküler fonksiyonlarında ve insan spermi üzerine kromun toksik etkileri yapılan bazı araştırmalarla gösterilmiştir (108).

2.7.2.6. Mangan (Mn)

Mangan vücutta birçok metalloenzimin yapısında 2+ veya 3+ bulunan bir biyoelementtir. Günlük gereksinimi 2.5- 5 mg kadardır. Besinlerle alınan Mn’in ince

bağırsaklardan henüz tam olarak açıklanamayan bir mekanizmayla emildiği, kalsiyum, fosfor, ferik sitrat ve soya proteininin emilimini azalttığı gösterilmiştir. Mn metabolizması emilimden ziyade atılımına göre düzenlenmekte, fazlası safrayla atılmaktadır. Mangan plazmada transmanganin adlı β 1-globüline bağlanarak taşınır. Erişkin bir kişinin vücudunda, başta karaciğer ve retina olmak üzere tüm dokulara dağılmış halde toplam 10- 20 mg Mn bulunur. Mn özellikle hücrenin mitokondri kesitinde boldur. Gözyaşının Mn konsantrasyonunun serumun 50 katı olduğu gösterilmiştir (86).

Mn toksisitesi madenciler, kaynakçılar, ilaç, seramik, çömlek ve cam üretiminde çalışanlarda sık görülür. Yapılan bazı araştırmalar manganın semen kalitesi ve infertiliteyi etkileyerek üreme fonksiyonlarını değiştirdiğini bulmuştur.

Mesleki olarak mangan maruziyeti bulunan erkeklerin fertilitelerinin bozulduğu, erkek farelerin yüksek dozda mangan aldıktan sonra fertilité ve üreme sistemlerinde bozukluk olduğu bildirilmiştir (109-111).

2.7.2.7. Vanadyum (V)

İnsanlarda vanadyumun özgün bir fonksiyonu tanımlanmamıştır. Tiroid metabolizması ile ilgili olduğu V^{4+} / V^{5+} redoks çifti oluşturarak enzim düzenleyicisi veya kofaktörü olarak görev yaptığı düşünülmektedir. Ayrıca vanadyum bileşiklerinin insüline benzer etkiler ve antitümoral etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Pentavalan vanadat iyonunun fosfat anyonuna yapısal benzerliğinden dolayı ATPazlar ve fosfatazlar gibi enzimler üzerine inhibitör etkili olduğu ileri sürülmektedir (86).

Vanadyum erkek üreme sisteminin fonksiyonlarını etkileyen endüstriyel bir tehlikedir. Vanadyum maruziyeti farkedilir spermatogenik tutuklanmaya, olgun sperm sayısında ve anormal sperm sayısında artışa neden olmuştur. Vanadyum aynı zamanda sıçanlarda genital organlarda dejenerasyona neden olur (112).

2.8. İNDÜKTİF OLARAK EŞLEŞMİŞ PLAZMA KÜTLE SPEKTROMETRESİ (ICP-MS)

İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS); her türlü katı ve sıvı örnekte çok sayıda elementin çok kısa bir sürede hassas ve doğru olarak ölçülmesine olanak tanıyan bir sistemdir. Kalitatif, yarı-kantitatif veya kantitatif analiz yapılarak doğada ve dolayısı ile canlı organizmada bulunabilen pek çok temel ve toksik elementin analiz edilmesini sağlayan bir inorganik analiz tekniğidir.

Analitik bir cihaz olarak ICP-MS iki üniteden oluşmaktadır:

- 1) İndüktif olarak eşleştirilmiş plazma (ICP) ve
- 2) Kütle spektrometresi (MS) (Şekil 2-5).

Analiz edilmek istenen örnekteki elementler ICP de iyonlaştırıldıktan sonra kütle spektroskopisine gönderilirler ve burada kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılarak ölçülürler. ICP-MS'teki plazma optik emisyon spektrometresinde kullanılan Argon (Ar) plazması ile aynıdır. Periyodik tablodaki birçok elementin birinci iyonlaşma enerjileri Argonun iyonlaşma enerjisinden (15.76 eV) küçük olduğu için elementler plazma içerisinde pozitif iyonlara dönüşürler. Bir ICP-MS cihazında esas olarak şu bölümler bulunmaktadır:

1. Örnek gönderici sistem,
2. ICP,
3. Aktarıcı koniler (interface cones),
4. İyon lens sistemi,
5. Kütle seçici (mass filter),
6. Dedektör (electron multiplier tube) ve
7. Vakum sistemi.

ICP-MS direk olarak çözeltide iz element derişimlerinin belirlenmesinde uygundur. Birçok element için gözlenebilme sınırı ng/L'nin (ppb ve daha düşük derişimler) altındadır. Çok sayıda elementi aynı anda analiz edebilme özelliği sayesinde nitel analizlerde ve izotop oranlarının belirlenmesinde olduğu gibi, başta metalik elementler olmak üzere periyodik tablodaki elementlerin büyük çoğunluğunun nicel ve yarı-nitel tayinlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. ICP-MS'in çalışma aralığı diğer yöntemlere oranla oldukça geniştir. Birçok element için pg-mg/L arasında kalibrasyon grafikleri çizilebilmektedir ve bu farklı derişime sahip birçok elementin aynı anda analizine olanak sağlamaktadır. Değişik örnek göndericilerle (Laserle aşındırma-Laser Ablation-ICP-MS) eşleştirildiğinde ICP-MS, sıvı örnekler dışında katı örneklerin analizinde de sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Diğer tekniklerle de eşleştirilebilen örnek gönderme sistemleri (hidrür oluşturma, elektrotermal ısıtma, lazerle parçalama, akışa enjeksiyon sistemi, çeşitli sisleştiriciler, vb.) aynı şekilde ICP-MS ile de kullanılabilir. ICP-MS'e likit kromatografisi (LC), iyon kromatografisi (IC)

ve gaz kromatografisi (GC) gibi kromatografik sistemler de eklenerek elementlerin türleri oldukça hassas bir şekilde belirlenebilmektedir (113).



Şekil 2-5: ICP-MS cihazı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Maddeler

3.1.1.1. Kimyasal Maddeler

Triton X-100 (Merck)

Hematoksilin (Merck)

Eosin (Merck)

Glutaraldehit (Sigma)

Anilin (Sigma)

Sperm yıkama mediumu (Vitrolife)

İzotonik (Eczacıbaşı)

İmmersiyon yağı (Merck)

Normal erime noktalı agaroz (Sigma)

Düşük erime noktalı agaroz (Sigma)

Etidyum bromür (M.Biotech)

Trizma Base (Sigma)

İndiyum (Merck)

Galyum (Merck)

Multi-Element standart (Inorganic Ventures)

NaCl (Sigma)

NaOH (Sigma)

EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit) (Amresco)

SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) (Sigma)

3.1.1.2. Çalışmada Kullanılan Kitler

Anneksin V-Fitc Assay Kit (AbD Serotec)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Derin dondurucu (-80 ° C) (Nuaire),

Distile su cihazı (GFL),

Elektroforez güç kaynağı (Model 1000/500 Biometra),

Işık Mikroskobu (Nikon),

Faz-Kontrast Mikroskobu (Nikon),

Floresan mikroskobu (Olympus BX51),

Görüntüleme sistemi (DP2-BSW),

ICP-MS (Thermo X Series 2),

Örnek Tablası (Cetac Asx-520),

Laminar hava akım cihazı (Forma Scientific),

Mini DNA elektroforez tankı (Biogen),

Mini santrifüj (Hettich-Eppendorf),

Santrifüj (Hettich-Universal 30 RF),

Santrifüj (Magafuge 1.0 Heraeus),

pH metre (Hanna),

Vorteks (Biosan),

Isıtıcı Tabla (Stuart),

Mini yatay elektroforez tankı (Biolab),

Elektroforez güç kaynağı (Model 1000/500 Biometra),

FACS Flow Sitometri (Beckon&Dickinson),

Otoklav (Hirayama),

Lam (Citoglas),

Lamel (Honka),

Polipropilen Steril Kap (Firatmed).

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Denekler

3.1.3.1. Hasta Seçimi

Deneylerde kullanılan insan semen örnekleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Ünitesinden temin edilmiştir. Çalışmada toplam 52 erkek ile çalışılmıştır. İnfertil sigara içen 13 erkek, infertil sigara içmeyen 13 erkek, fertil sigara içen 13 erkek, fertil sigara içmeyen 13 erkek çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya katılan tüm hastaların klinik bilgileri mevcuttur.

Tez çalışmaya başlamadan önce, yerel etik kurul onayı alınarak yapılan çalışmalar prosedüre uygun şekilde yazılı olarak beyan edilmiştir.

3.1.4. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

3.1.4.1. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi İçin Kullanılan Çözeltiler

PBS (Tuz içeren yıkama eriyiği)

1,44 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 g/l KH_2HPO_4

8,0 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

800 ml dH_2O ile çözülerek pH:7.4 olacak şekilde ayarlanır ve son hacim 1 lt'ye tamamlanır.

Normal Erime Noktalı Agaroz (%1)

30 mg Normal Erime Noktalı Agaroz

3000 μl dH_2O içerisinde çözülür.

Düşük Erime Noktalı Agaroz (%1)

10 mg Normal Erime Noktalı Agaroz

1000 μl dH_2O içerisinde çözülür.

Lizis Tamponu

2,5 M NaCl

100 mM EDTA

10 mM Trizma Base

% 1 Triton X-100

pH 10 olacak şekilde ayarlanır ve son hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Elektroforez Tamponu

200 g NaOH

500 ml dH₂O içinde çözülür.

14,89 g EDTA

pH 10 olacak şekilde ayarlanır ve son hacim dH₂O ile 200 ml'ye tamamlanır.

Bu hazırlanan iki çözeltiden

30 ml NaOH

5 ml EDTA

pH >13 olacak şekilde ayarlanır ve son hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Nötralizasyon Tamponu

48,5 g Trizma Base

pH 7,5 olacak şekilde ayarlanır ve son hacim dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Boyama Solüsyonu

10X Stok:

10 mg etidyum bromür (20 µg/mL)

50 ml dH₂O ile karıştırılır.

1X Stok:

10X stoktan 1 ml alınır ve son hacim 9 ml dH₂O ile tamamlanır.

3.1.4.2. Eser Element Analizi İçin Kullanılan Çözeltiler

Nitrik Oksit (%2)

%65'lik Nitrik Asitten 15,38 ml

dH₂O ile son hacim 500 ml'ye tamamlanır.

3.1.4.3. Anilin Mavisi ile Kromatin Kondansasyonunun Gösterilmesi İçin Kullanılan Çözeltiler

Anilin Mavisi

5 g Anilin Mavisi

100 ml PBS

100 ° C'de kaynayınca kadar ısıtılır ve sonra soğumaya bırakılır. Boyanın pH'sı %100 asetik asit ile 3,5'e ayarlanır.

Glutaraldehit (%3)

12 ml %25'lik hazır glutaraldehit

100 ml PBS ile tamamlanır.

3.1.4.4. Sperm Nuklear Kromatin Dekondansasyon Testi İçin Kullanılan Çözeltiler

Borat Tamponu

Na₂B₄O₇.H₂O 19,07 g/lt

1 M NaOH ile pH 9.0 'a ayarlanarak 1000 ml 'ye tamamlanır.

SDS/EDTA solüsyonu (%1 SDS 6mM EDTA)

1,0 gr SDS

0,228 gr EDTA

Borate Buffer ile 100 ml'ye tamamlanır.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. Spermin Fiziksel İncelemesi

3.2.1.1. Likefaksiyon (Sıvılaşma)

Normal bir sperm örneği oda ısısında 60 dakika içerisinde likefiye edildi. Likefaksiyon sonunda örnek iyice karıştırıldı. Daha sonra aşağıdaki basamaklara geçildi.

3.2.1.2. Görünüm

Spermin muayenesi hemen likefaksiyondan sonra ya da 1 saat içerisinde yapıldı. Normalde homojen, gri-opelasan görünümde idi. Opasifikasyonun azalması sperm konsantrasyonunun düşük olduğunu düşündürdü. Kahverengi-kırmızı örnekler eritrosit bulunduğunu akla getirdi. Toplanan sperm örnekleri bu bilgiler açısından değerlendirildi.

3.2.1.3. Hacim

Ejakulatın hacmi dereceli, konik tabanlı silindir tüplerde yapıldı.

3.2.1.4. Viskozite

Likefiye olduktan sonra ejakulat 5 ml'lik bir pipete çekilmiş ve kendi ağırlığı ile pipetin ucundan damlaması sağlandı. Bu sırada akarak uzayan damlanın boyu ölçüldü. 2 cm'den fazla uzaması viskozitenin artmış olduğunu gösterdi. Normal ejakulat pipetin ucundan küçük damlalar halinde döküldü.

3.2.1.5. pH

Bunun için 6.1 - 10.0 arasında pH ölçebilen indikatör kağıtlar kullanıldı. Bir damla sperm bu kağıt üzerine damlatıldı. Oluşan renk değişimi, skala ile karşılaştırılarak pH tayin edildi. pH tayini ejakulat alındıktan sonra 1 saat içerisinde yapıldı. Normal değerler 7.2 - 8.0 arasındır.

3.2.2. Mikroskopik Muayene

İlk muayenede sperm konsantrasyonu, motilitesi, aglütinasyon ve spermatozoa dışı hücrelerin varlığı araştırıldı.

3.2.3. Sperm Sayısı

Sperm hücrelerinin ejakulattaki konsantrasyonunu belirlemek için Neubauer kamera kullanıldı. Neubauer kamerada sperm sayımında 1/20 oranında ejakulat sulandırılarak sayım yapıldı. Neubauer kamerada her biri 16 küçük kare içeren 5 büyük

karedeki spermiler sayıldı. 1/20 sulandırma 5 karede sayılan sperm sayısı 1 milyon ile çarpıldı.

3.2.4. Motilite Tayini

Her bir spermatozoanın motilitesi 4 derece üzerinden değerlendirilerek kaydedildi:

- a. ileri-hızlı
- b. ileri-yavaş
- c. yerinde hareketli
- d. hareketsiz

4-6 mikroskop alanı taranarak 100 spermatozoa sayıldı. Her bir spermatozoa hangi kategoriye göre hareket ediyorsa kaydedildi. Her kategori için ortalama yüzde değerleri hesaplandı. Aynı işlem ayrı bir semen damlası alınarak 2 kez tekrarlandı. Sonuçta iki inceleme neticesinin ortalaması alındı.

3.2.5. Morfoloji Tayini

3.2.5.1. Diff-Quik Boyama Prosedürü

Lam üzerine bir damla semen damlatıldı, diğer bir lam ile semenin damlatıldığı lama 30°- 45° ‘ lik bir açıyla yayma yapıldı.Yaymalar önce Diff-quik fiksatifinde fikse edildi. Daha sonra sırayla solüsyon 1 (eosin) ve 2 (azure solüsyonu) de 5'er saniye bekletilerek boyandı. Üçüncü adım sonrası lamlar deiyonize su ile yıkandı. Fazla boya uzaklaştırıldı. En son lamlar kapatıcı ile kapatıldı.

Spermin morfolojik özellikleri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2010 kriterleri kullanılarak belirlendi (114).

3.2.6. Swim-Up Tekniği ile Hareketli Sperm Eldesi

Eppendorf içindeki semen konik bir tüpe alındı. Üzerine kendi hacmi kadar medium eklendi.1600 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı. Üzerine yine kendi hacmi kadar medium eklendi ve karıştırıldı. 1600 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı. Peletin üzerine 1 ml medium eklendi. Kaliteli spermilerin yukarı yüzmesi için 20 dakika beklendi (115).

3.2.7. Anilin Mavisi ile Kromatin Kondansasyonunun Gösterilmesi

Üst kısımdan alınan spermiler lamlara damlatılıp, damla lamel yardımıyla lamin ucuna kadar yayılıp/itilip kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlar bir kapta glutaraldehit içine alınıp +4°C’de 30 dakika bekletildi. Lamin ön-arka yüzü izotonikle yıkandı. Lamaların

üzerini kaplayacak kadar Anilin Mavisi damlatılıp, 7-8 dk karanlık ortamda bekletildi. Tekrar izotonikle lamın ön-arka yüzü yıkandı. Kuruması için eğik bir şekilde oda sıcaklığında bırakıldı. Mikroskopta 100 x Oil İmmersionda çeşitli alanlardan iyi yapıya sahip 100 adet sperm seçilerek boyanma durumlarına göre sperm kromatin yapıları değerlendirildi (116).

3.2.8. Sperm Nuklear Kromatin Dekondansasyon Testi

Üst kısımdan alınan spermler minik cam tüplere konulup üzerlerine 1 ml SDS-EDTA eklenip, 7 dakika beklendi. SDS-EDTA'lı tüpten alınan örnek lama yayılıp lamel yardımıyla lamın ucuna kadar yayılıp/itilip kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamlar fiksatif içine alınıp 10 dk beklenip lamın ön-arka yüzü izotonikle yıkandı. Lamlar Eosin içinde 1 dakika bekletilip lamın ön-arka yüzü izotonikle yıkandı. Lamlar son olarak hematoksin içinde 2 dk bekletildi ve lamın ön-arka yüzü izotonikle yıkandı. Kuruması için eğik bir şekilde oda sıcaklığında bırakılıp, lam-lamel arası preparat hazırlanarak mikroskopta incelendi. Normal, şüpheli, kıvrık, çok kıvrık olarak değerlendirildi (117).

3.2.9. “Tek Hücre Jel Elektroforez” Yöntemi (Comet Analizi) İle DNA Hasar Analizi

3.2.9.1. Slayt Tabanlarının Hazırlanması

% 1'lik düşük erime noktalı agaroz ve % 1'lik normal erime noktalı agaroz distile su içerisinde hazırlandı. Agaroz çözülünceye kadar ısıtıldı. Lamlar metanole batırılıp, ateşten geçirildi. NMPA sıcakken lamın üzerine dökülüp (160µl) , kuruması için ya açık havada ya da 50 ° C' lik ortamda bekletildi. Kullanana kadar oda sıcaklığında tutuldu (yüksek nemli ortamda).

3.2.9.2. Hücre İzolasyonu/Uygulanması

Hazırlanmış olan lamın üzerine, 5-10 µl PBS içinde 10.000 hücre olacak şekilde 75µl LMPA ile karıştırılıp yavaşça yayıldı. 5-10 dk tabakanın sertleşmesini beklendi.

3.2.9.3. Mikrojel Slaytlarının Elektroforezi

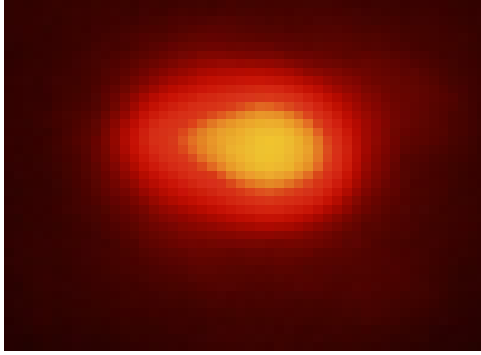
Yaklaşık 4 ° C'de bir gece liziz solüsyonunda bırakılan slaytlar mümkün olduğunca yakın aralıklarla jel kutusuna dizildi. Taze hazırlanmış Elektroforez Tamponu slaytların üzeri tamamen kapanacak şekilde dolduruldu. 20-40 dk boyunca tampon içinde bekletilip, güç kaynağı 25 volt 300 mA olacak şekilde ayarlandı. Slaytlar 20-30 dakika elektroforeze maruz bırakılıp, akım kesildi. Slaytlar tampondan çıkarılıp, kuru bir yere

dizildi. Üzerlerine nötralizasyon tamponu dökülüp 5 dakika beklendi ve aynı işlem iki kere daha tekrarlandı. Slaytlar 80 µl EtBr ile boyanıp, 5 dakika bekletilerek ve soğuk distile su ile boyanın fazlası akıtılarak lamel ile kapatıldı.

3.2.9.4. DNA Hasarının Değerlendirilmesi

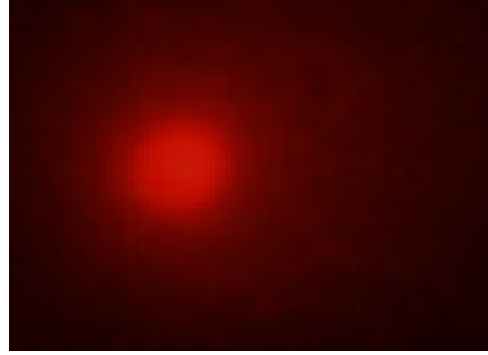
40 x objektif altında floresan mikroskop ile değerlendirme yapıldı. Rastgele seçilmiş 100 hücre sayıldı. Kuyruk uzunluklarına göre kategorize edildi. Hiç kuyruğu olmayanlar (0), (Şekil 3-1), orta derece uzunlukta kuyruğa sahip olanlar (1) (Şekil 3-2) ve en uzun kuyruğa sahip olanlar (2) grubuna (Şekil 3-3) (Şekil 3-4) dahil edildi.

0. Grup



Şekil 3-1: 0. grup comet görüntüsü

1. Grup



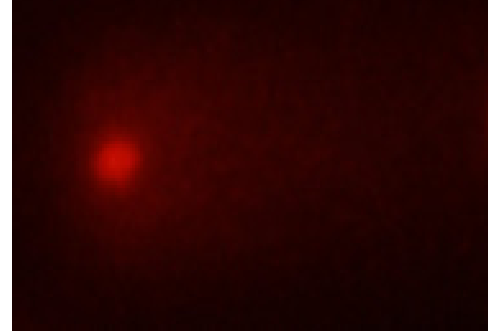
Şekil 3-2: 1. grup comet görüntüsü

2. Grup



Şekil 3-3: 2. grup comet görüntüsü

2. Grup



Şekil 3-4: 2. grup comet görüntüsü

(Görüntüler bu tez çalışmasının bulgularından elde edilmiştir)

3.2.10. ICP-MS ile Eser Element Analizi

-80 ° C'de saklanmış olan hücreler çözüldükten sonra her bir semen örneğinden 500µl alınıp 15 ml'lik falkon tüpe konuldu ve üzerine iç standartlar olarak adlandırılan 50 µl indium ve 50 µl galyum eklendi. Daha sonra % 2'lik nitrik asit ile 5 ml'ye tamamlandı. Homojen bir yapı elde etmek için vortekslendi. Tüpler örnek tablasına sırasıyla dizildi. ICP-MS cihazı da örnekleri sırasıyla değerlendirmeye alındı.

3.2.11. Anneksin V-PI Akım Sitometri Yöntemi ile Apoptoz ve Nekroz Analizi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne yerleşirler. Dış yüze yerleşmiş olan PS'ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (118).

Anneksin V/Propidium İodid (PI) boyalı hücrelerin akım sitometride analizi, anneksin V ve PI negatif (çift negatif), anneksin V pozitif ve PI negatif (tek pozitif) veya anneksin V ve PI pozitif (çift pozitif) kesimlenmiş hücrelerin tayinini sağlar. Örnekler tek parametrelili histogramda veya çift parametrelili noktasal grafikte analiz edilebilir. Bu grafikte dağılımlarına göre; apoptozun erken evrelerindeki hücreler, noktasal grafiğin alt sağ köşesinde tek pozitif anneksin V-bağlı hücreler olarak konumlanır ve bu evrede hücre membranları hala bütünlüklerini korudukları için PI hücre içerisine nüfuz edememektedir. Apoptozun sonraki evrelerinde, hem Anneksin V hem de PI hücre içerisinde bulunur. Nekrotik hücre ölümüne giden hücreler de aynı şekilde hem anneksin V hem de PI ile boyanmaktadır.

-80 ° C'de saklanmış olan hücreler çözöldükten sonra PBS ile iki defa yıkandı. "Anneksin V-Fitc Assay" kiti içeriğinde bulunan bağlama tamponu 1:4 oranında distile su ile seyreltilti. Hücreler bağlama tamponu ile $2-5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde süspanse hale getirildi. Her bir tüpe 195 µl hücre süspansiyonu , 5 µl Anneksin V eklenip karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra hücreler 190 µl bağlama tamponunda yıkandı ve 190 µl bağlama tamponunda resüspanse edildi. 100 µl Propidyum İodit solüsyonu da eklendi ve tüplerin üzerleri alüminyum folyo ile kaplanıp akım sitometri cihazında ölçümleri yapıldı.

3.2.12. İstatistik Analiz

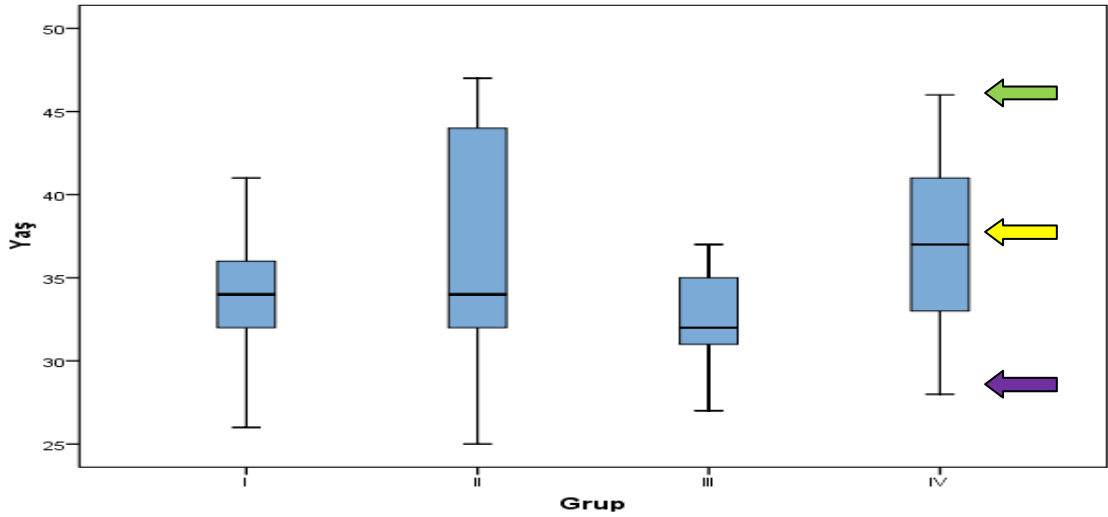
Normallik denetimi Shapiro Wilk testi ve histogram grafikleri çizilerek yapıldı. Tanımlayıcı değerler ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (minimum-maksimum) şeklinde sunuldu. 4 grup arasındaki karşılaştırmalar Kruskal-Wallis H testi ile yapıldı. Kruskal-Wallis H testi sonrası Bonferoni düzeltmeli ikili karşılaştırmalar Mann Whitney U testi ile değerlendirildi (anlamlılık sınırı $p < 0,0083$ olarak alındı). Sigara içen-içmeyen ikili grup kıyasında normal dağılım gösterenler bağımsız gruplarda T testi, diğerleri

Mann Whitney U testi ile değ erlendirildi. Analizler SPSS 21 istatistik paket programında yapıldı. Testler  ift yönlü ve anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Hasta Değerlendirmesi

Araştırmaya katılan hastaların doğum yılı bilgileri alındı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. İnfertil sigara içen grubun (I) yaş ortancası 34 (26-41) iken, infertil sigara içmeyen grubun (II) yaş ortancası 34 (25-47), fertil sigara içen grubun (III) yaş ortancası 32 (27-37), fertil sigara içmeyen grubun (IV) yaş ortancası 37 (28-46) olarak bulundu (Şekil 4-1) Yaş değişkeni 4 grup arasında benzer bulundu ($p>0,05$).

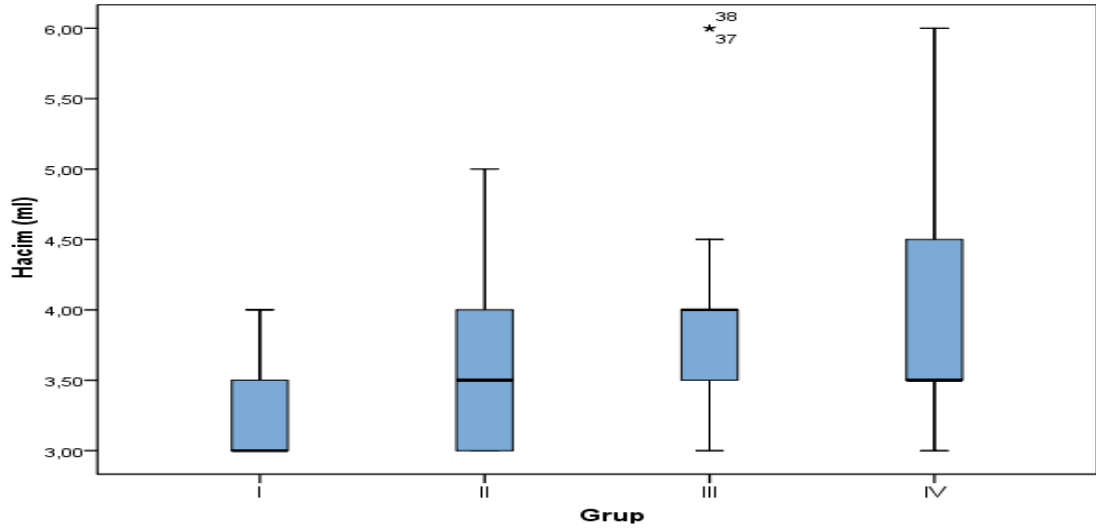


Şekil 4-1: Hasta değerlendirmesine göre yaş ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen. Yeşil ok (→) maksimum değerini, sarı ok (→) ortanca değerini, mor ok (→) minimum değerini vermektedir.

4.2. Spermin Fiziksel İncelenmesi

Semen örneklerinin incelenmesi likefaksiyon (sıvılaşma), pH, hacim, görünüm ve viskozite kategorilerinde yöntemler bölümünde açıklandığı şeklinde yapıldı.

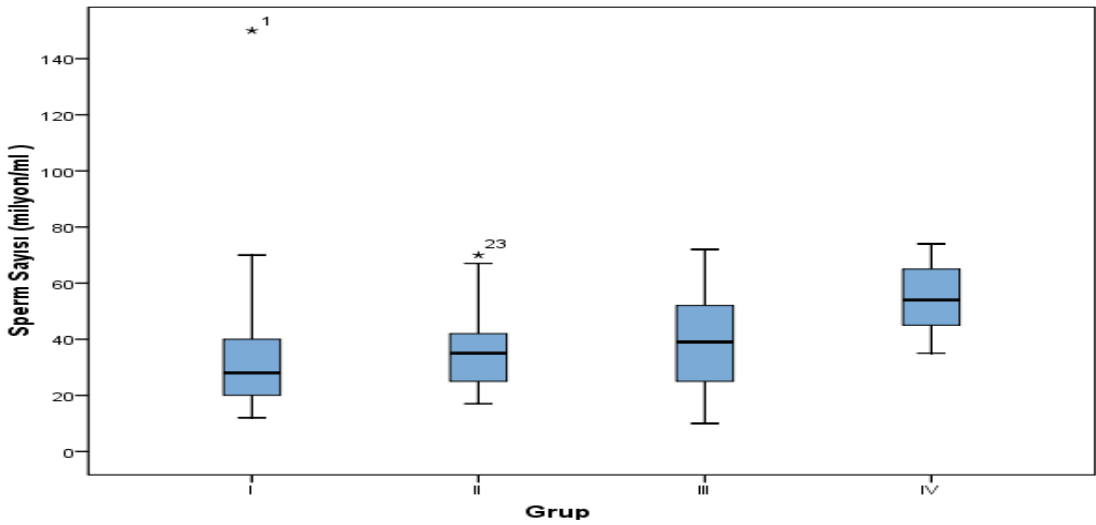
İnfertil sigara içen grubun semen hacimleri ortancası 3 (3-4) iken, infertil sigara içmeyen grubun semen volümleri ortancası 3.5 (3-5), fertil sigara içen grubun semen hacimleri ortancası 4 (3-6), fertil sigara içmeyen grubun semen volümleri ortancası 3.5 (3-6) olarak bulundu (Şekil 4-2). Hacim değişkeni 4 grup arasında benzer bulundu ($p>0,05$).



Şekil 4-2: Spermin fiziksel incelemesine göre semen hacmi ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen V. Fertil sigara içmeyen.

4.2.1. Sperm Sayısı

Neubauer kamerasında yapılan sayım ile semen içinde sperm konsantrasyonu tespit edildi. İnfertil sigara içen grubun sperm sayı ortancası 28 (12-150) iken, infertil sigara içmeyen grubun sperm sayı ortancası 35 (17-70), fertil sigara içen grubun sperm sayı ortancası 39 (10-72), fertil sigara içmeyen grubun sperm sayı ortancası 54 (35-74) olarak bulundu (Şekil 4-3). Sperm sayı değişkeni gruplar arasında Kruskal-Wallis testine göre ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0,012$). İkili kıyaslamalarda 4. grup 1. gruptan ($p=0,005$), 4. grup 2. gruptan ($p=0,006$) anlamlı olarak farklı bulundu (Tablo 4-1).



Şekil 4-3: Sperm sayısı ($\times 10^6/\text{ml}$) . I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen

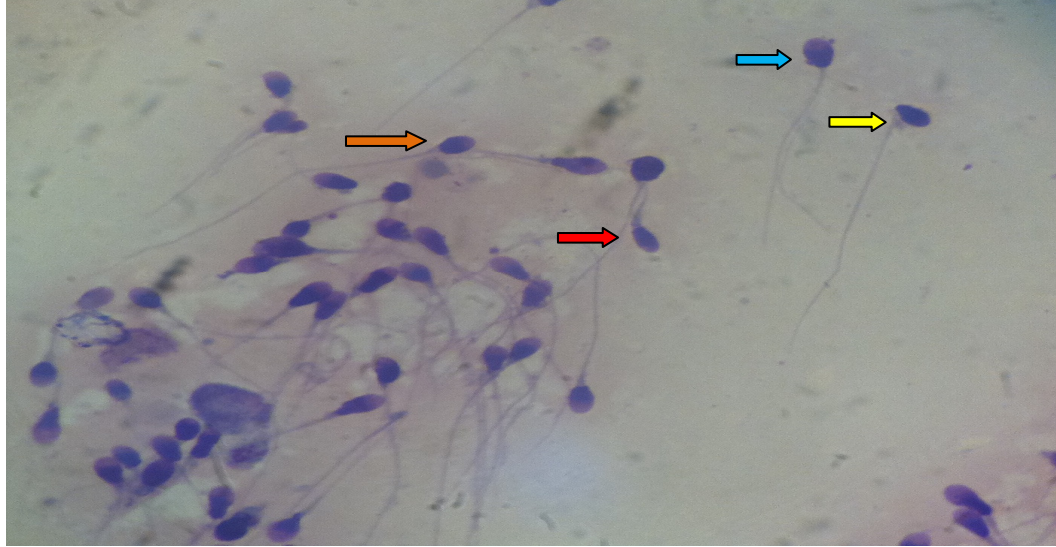
Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	28	12	150	0,012**
İnfertil Sigara İçmeyen	13	35	17	70	
Fertil Sigara İçen	13	39	10	72	
Fertil Sigara İçmeyen	13	54	35	74	

Kruskal-Wallis testi **p<0,01 ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-1: Sperm sayılarının ($\times 10^6/\text{ml}$) istatistiksel değerlendirmesi

4.2.2. Morfoloji

Semen analizi, ışık mikroskopunda Dünya Sağlık Örgütü'nün (2010) (21) morfoloji kriterlerine göre yapılan incelemede Diff-Quik boyama prosedürü yöntemlerde anlatıldığı gibi uygulandı (Şekil 4-4). Sperm morfolojisi; normal, baş, boyun, kuyruk olarak dört grupta incelendi.



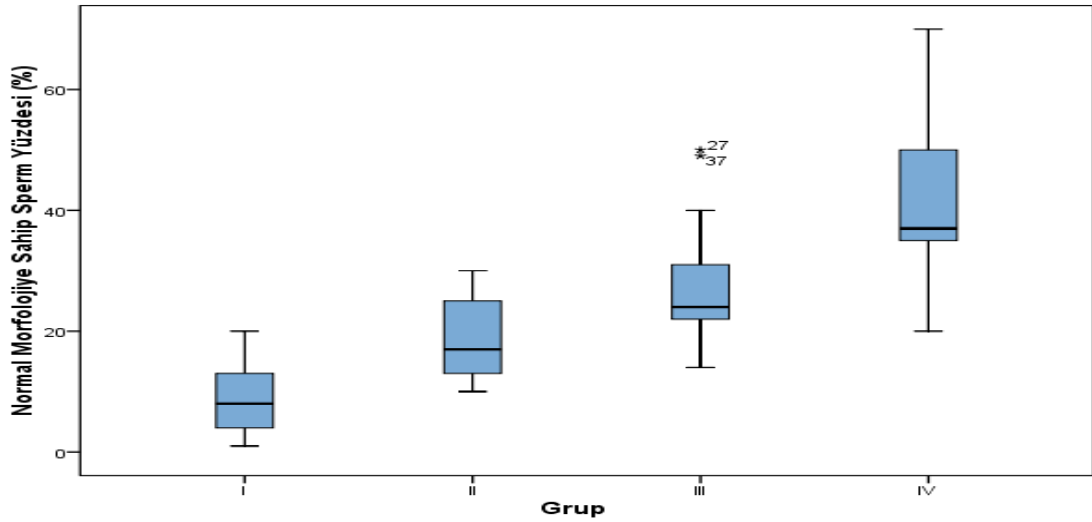
Şekil 4-4: Diff-Quik boyama prosedürü ile sperm morfolojisinin gösterilmesi.

Normal sperm (→), baş anomali olan sperm (→), boyun anomali olan sperm (→), kuyruk anomali olan sperm (→).

Morfoloji bakımından gruplar incelendiğinde spermlerin gruplara dağılımı şu şekilde idi:

4.2.2.1. Normal Morfoloji

İnfertil sigara içen grubun normal morfolojiye sahip sperm sayısı ortancası 8 (1-20) iken, infertil sigara içmeyen grubun normal morfolojiye sahip sperm sayısı ortancası 17 (10-30), fertil sigara içen grubun normal morfolojiye sahip sperm sayısı ortancası 24 (14-50), fertil sigara içmeyen grubun normal morfolojiye sahip sperm sayısı ortancası 37 (20-70) olarak bulundu (Şekil 4-5). Analiz sonuçlarına göre sperm normal morfoloji değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testine göre çok ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 2. grup 1. gruptan ($p=0,008$), 3. grup 1. gruptan ($p<0,001$), 4. grup 1. gruptan ($p<0,001$), 4. grup 2. gruptan ($p<0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4-2).



Şekil 4-5: Normal morfolojiye sahip sperm ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen.

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	8	1	20	<0,001***
İnfertil Sigara İçmeyen	13	17	10	30	
Fertil Sigara İçen	13	24	14	50	
Fertil Sigara İçmeyen	13	37	20	70	

Kruskal-Wallis testi *** $p<0,001$ çok ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-2: Normal morfolojiye sahip spermilerin istatistiksel değerlendirilmesi

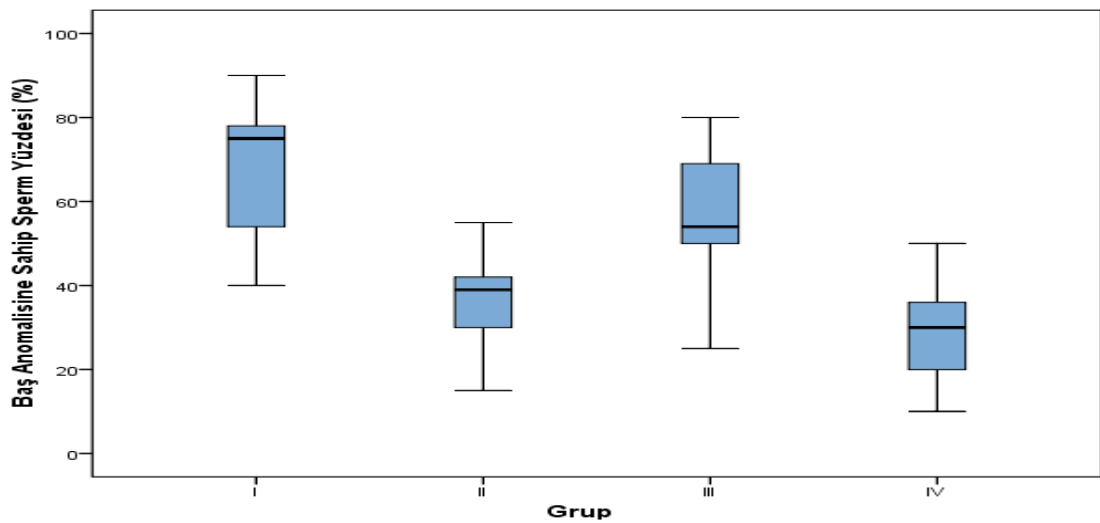
4.2.2.2. Baş Anomalisi

Baş anomalisine sahip sperm gruplarına göre incelendiğinde: İnfertil sigara içen grubun baş anomalisine sahip sperm sayı ortancası 75 (40-90) iken, infertil sigara içmeyen grubun baş anomalisine sahip sperm sayı ortancası 39 (15-55), fertil sigara içen grubun baş anomalisine sahip sperm sayı ortancası 54 (25-80), fertil sigara içmeyen grubun baş anomalisine sahip sperm sayı ortancası 30 (10-50) olarak bulundu (Şekil 4-6). Analiz sonuçlarına göre sperm baş anomalisi değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testine göre çok ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 1. grup 2. gruptan ($p<0,001$), 1. grup 4. gruptan ($p<0,001$), 3. grup 4. gruptan ($p<0,001$), 3. grup 2. gruptan ($p=0,003$) anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4-3).

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	75	40	90	<0,001***
İnfertil Sigara İçmeyen	13	39	15	55	
Fertil Sigara İçen	13	54	25	80	
Fertil Sigara İçmeyen	13	30	10	50	

Kruskal-Wallis testi *** $p<0,001$ çok ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-3: Baş anomalisine sahip spermelerin istatistiksel değerlendirilmesi.



Şekil 4-6: Baş anomalisine sahip sperm ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen.

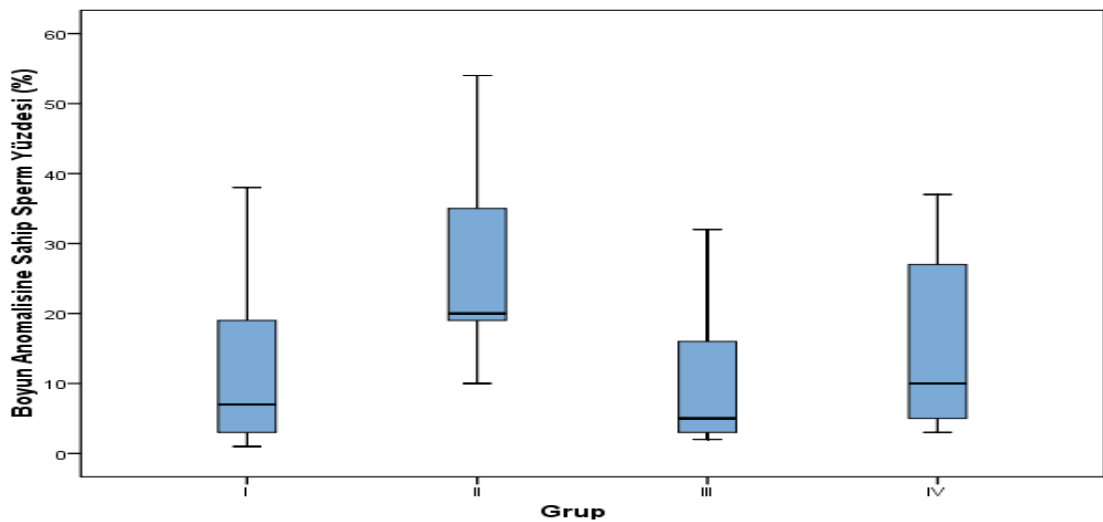
4.2.2.3. Boyun Anomalisi

Boyun anomalisine sahip sperm gruplarına göre incelendiğinde: İnfertil sigara içen grubun boyun anomalisine sahip sperm sayısı ortancası 7 (1-38) iken, infertil sigara içmeyen grubun boyun anomalisine sahip sperm sayısı ortancası 20 (10-54), fertil sigara içen grubun boyun anomalisine sahip sperm sayısı ortancası 5 (2-32), fertil sigara içmeyen grubun boyun anomalisine sahip sperm sayısı ortancası 10 (3-37) olarak bulundu (Şekil 4-7). Analiz sonuçlarına göre sperm boyun anomalisi değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testine göre ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0,003$). İkili kıyaslamalarda 2. grup 3. gruptan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,001$) (Tablo 4-4).

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	7	1	38	0,003**
İnfertil Sigara İçmeyen	13	20	10	54	
Fertil Sigara İçen	13	5	2	32	
Fertil Sigara İçmeyen	13	10	3	37	

Kruskal-Wallis testi ** $p<0,01$ ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-4: Boyun anomalisine sahip spermelerin istatistiksel değerlendirilmesi



Şekil 4-7: Boyun anomalisine sahip sperm ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen.

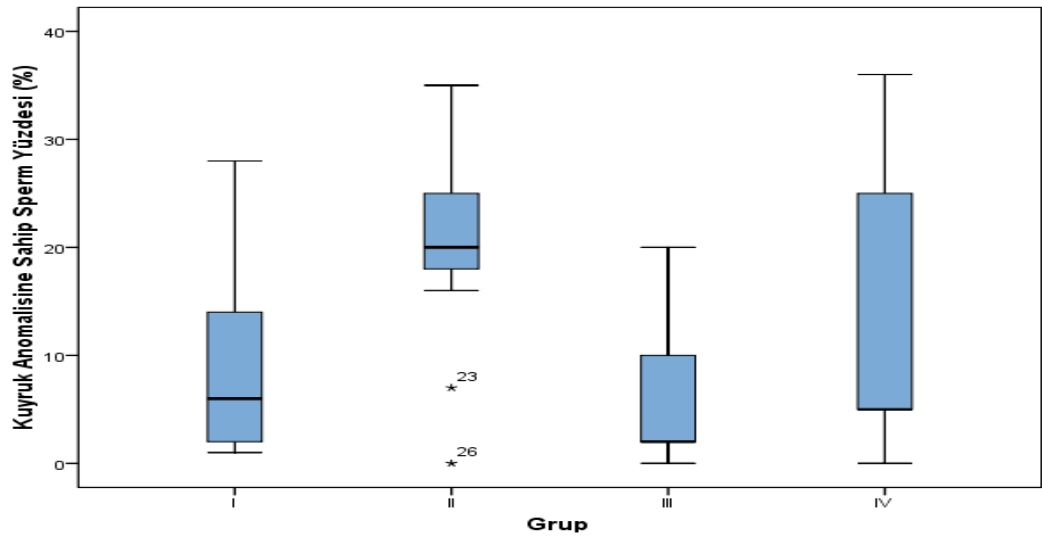
4.2.2.4. Kuyruk Anomalisi

Kuyruk anomalisine sahip spermler gruplara göre incelendiğinde: İnfertil sigara içen grubun kuyruk anomalisine sahip sperm sayısı ortancası 6 (1-28) iken, infertil sigara içmeyen grubun kuyruk anomalisine sahip sperm sayısı ortancası 20 (0-35), fertil sigara içen grubun kuyruk anomalisine sahip sperm sayısı ortancası 2 (0-20), fertil sigara içmeyen grubun kuyruk anomalisine sahip sperm sayısı ortancası 5 (0-36) olarak bulundu (Şekil 4-8). Analiz sonuçlarına göre sperm kuyruk anomalisi değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testine göre ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0,011$). İkili kıyaslamalarda 2. grup 3. gruptan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,001$) (Tablo 4-5).

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	6	1	28	0,011**
İnfertil Sigara İçmeyen	13	20	0	35	
Fertil Sigara İçen	13	2	0	20	
Fertil Sigara İçmeyen	13	5	0	36	

Kruskal-Wallis testi ** $p<0,01$ ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-5: Kuyruk anomalisine sahip spermilerin istatistiksel değerlendirilmesi



Şekil 4-8: Kuyruk anomalisine sahip sperm ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen.

4.2.3. Motilite

Motilite bakımından gruplar 4 kategoride değerlendirildi. Bu kategoriler:

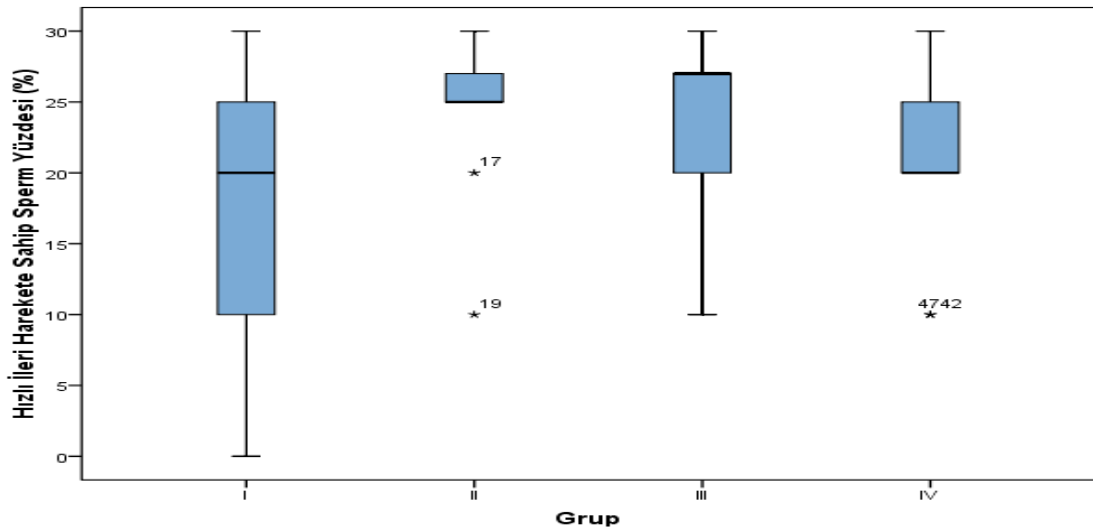
- Hızlı ileri
- Yavaş ileri
- Yerinde hareketli
- Yerinde duran

4.2.3.1. Hızlı İleri

Hızlı ileri spermilerin gruplara dağılımı şu şekilde idi:

İnfertil sigara içen grubun hızlı ileri motiliteye sahip sperm sayı ortancası 20 (0-30) iken, infertil sigara içmeyen grubun hızlı ileri motiliteye sahip sperm sayı ortancası 25 (10-30), fertil sigara içen grubun hızlı ileri motiliteye sahip sperm sayı ortancası 27 (10-30), fertil sigara içmeyen grubun hızlı ileri motiliteye sahip sperm sayı ortancası 20 (10-30) olarak bulundu (Şekil 4-9).

Tüm bu grupların analizleri Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre dört grup arasında spermilerin hızlı ileri motilitesinde anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,225$) (Tablo 4-6).



Şekil 4-9: Hızlı ileri harekete sahip sperm ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen.

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	20	0	30	0,225
İnfertil Sigara İçmeyen	13	25	10	30	
Fertil Sigara İçen	13	27	10	30	
Fertil Sigara İçmeyen	13	20	10	30	

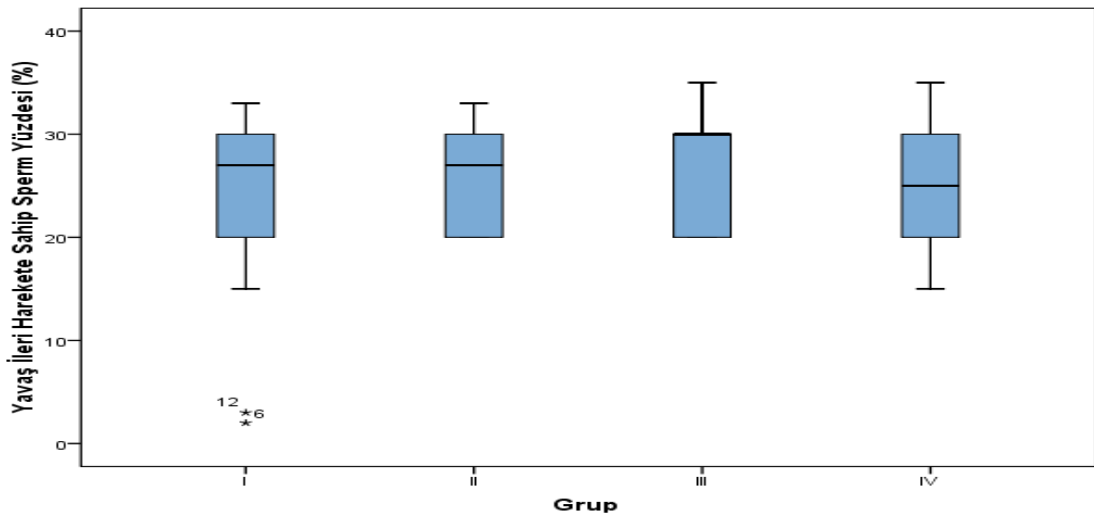
Kruskal-Wallis testi

Tablo 4-6: Hızlı ileri harekete sahip spermilerin istatistiksel değerlendirilmesi

4.2.3.2. Yavaş İleri

İnfertil sigara içen grubun yavaş ileri motiliteye sahip sperm sayı ortancası 27 (2-33) iken, infertil sigara içmeyen grubun yavaş ileri motiliteye sahip sperm sayı ortancası 27 (20-33), fertil sigara içen grubun yavaş ileri motiliteye sahip sperm sayı ortancası 30 (20-35), fertil sigara içmeyen grubun yavaş ileri motiliteye sahip sperm sayı ortancası 25 (15-35) olarak bulundu (Şekil 4-10).

Tüm bu grupların analizleri Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre dört grup arasında spermilerin hızlı ileri motilitesinde anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,917$) (Tablo 4-7).



Şekil 4-10: Yavaş ileri harekete sahip sperm ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen.

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	27	2	33	0,917
İnfertil Sigara İçmeyen	13	27	20	33	
Fertil Sigara İçen	13	30	20	35	
Fertil Sigara İçmeyen	13	25	15	35	

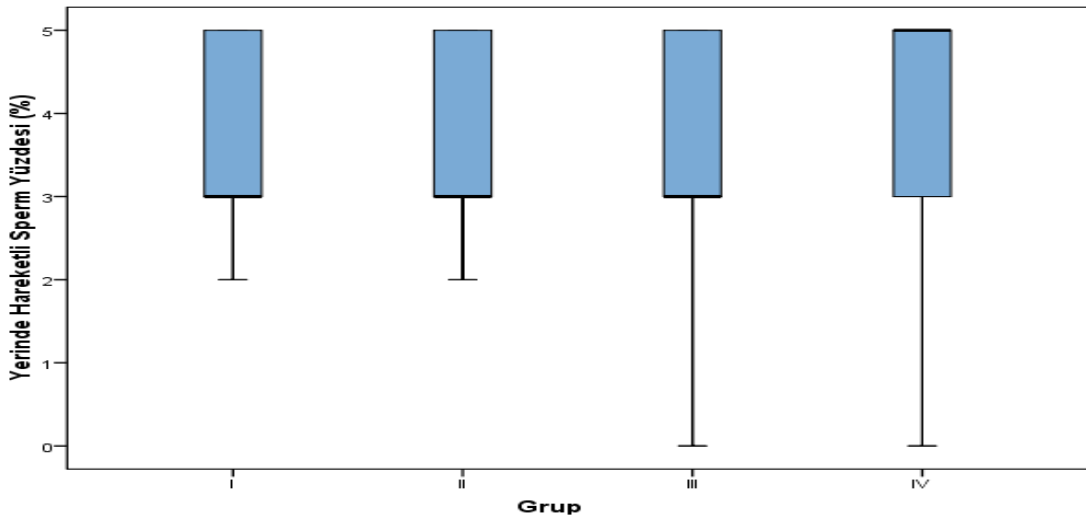
Kruskal-Wallis testi

Tablo 4-7: Yavaş ileri harekete sahip spermelerin istatistiksel değerlendirilmesi

4.2.3.3. Yerinde Hareketli

İnfertil sigara içen grubun yerinde hareketli motiliteye sahip sperm sayı ortancası 3 (2-5) iken, infertil sigara içmeyen grubun yerinde hareketli motiliteye sahip sperm sayı ortancası 3 (2-5), fertil sigara içen grubun yerinde hareketli motiliteye sahip sperm sayı ortancası 3 (0-5), fertil sigara içmeyen grubun yerinde hareketli motiliteye sahip sperm sayı ortancası 5 (0-5) olarak bulundu (Şekil 4-11).

Tüm bu grupların analizleri Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre dört grup arasında spermelerin hızlı ileri motilitesinde anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,675$) (Tablo 4-8).



Şekil 4-11: Yerinde hareketli sperm ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen 4. Fertil sigara içmeyen.

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	3	2	5	0,675
İnfertil Sigara İçmeyen	13	3	2	5	
Fertil Sigara İçen	13	3	0	5	
Fertil Sigara İçmeyen	13	5	0	5	

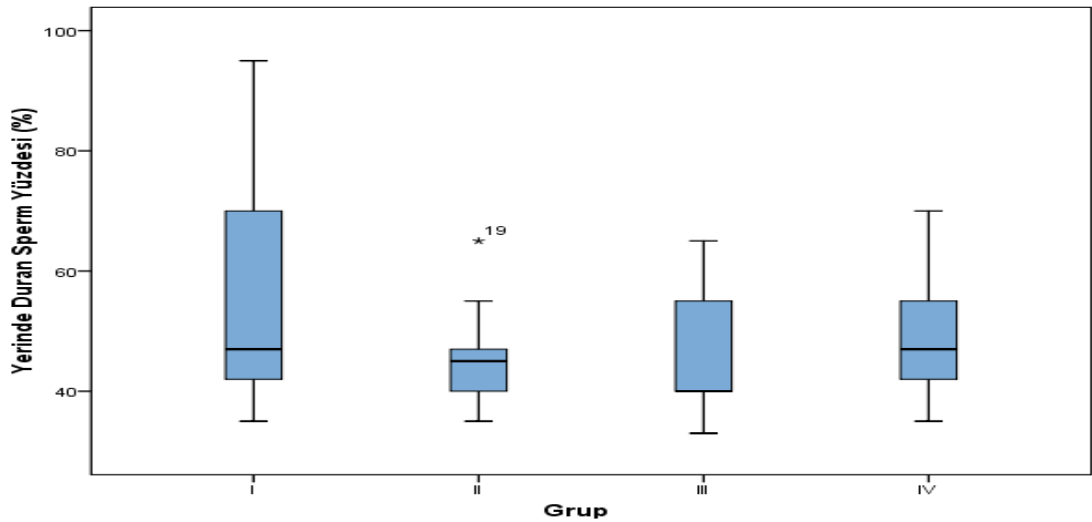
Kruskal-Wallis testi

Tablo 4-8: Yerde hareketli spermelerin istatistiksel değerlendirilmesi

4.2.3.4. Yerde Duran

İnfertil sigara içen grubun yerinde duran motiliteye sahip sperm sayı ortancası 47 (35-95) iken, infertil sigara içmeyen grubun yerinde duran motiliteye sahip sperm sayı ortancası 45 (35-65), fertil sigara içen grubun yerinde duran motiliteye sahip sperm sayı ortancası 40 (33-65), fertil sigara içmeyen grubun yerinde duran motiliteye sahip sperm sayı ortancası 47 (35-70) olarak bulundu (Şekil 4-12).

Tüm bu grupların analizleri Kruskal-Wallis testi ile yapıldı. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre dört grup arasında spermelerin hızlı ileri motilitesinde anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,428$) (Tablo 4-9).



Şekil 4-12: Yerde duran sperm ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen.

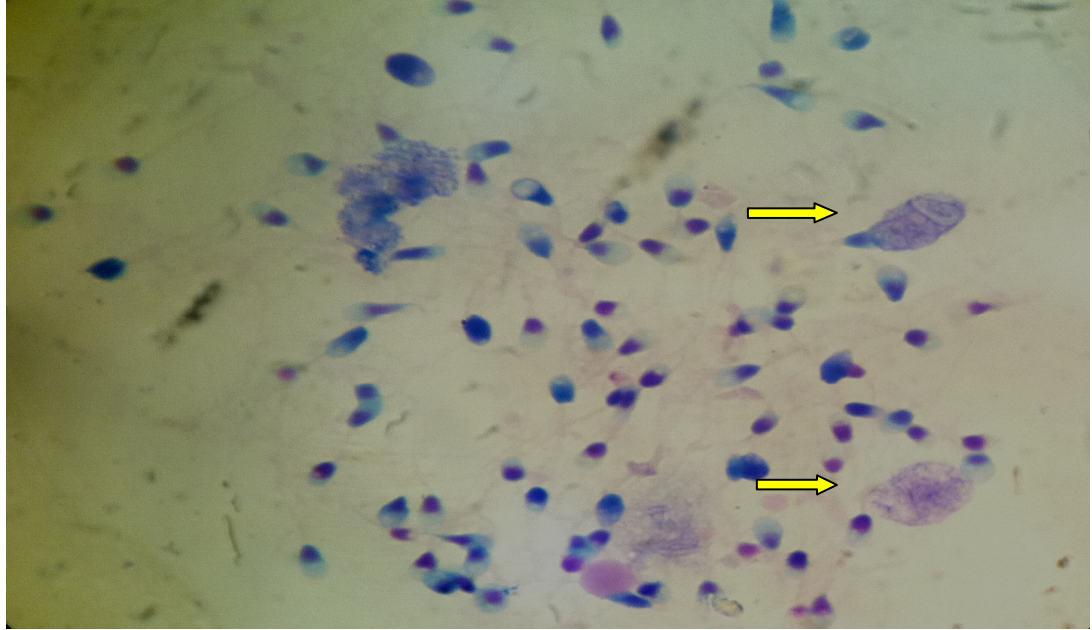
Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	47	35	95	0,428
İnfertil Sigara İçmeyen	13	45	35	65	
Fertil Sigara İçen	13	40	33	65	
Fertil Sigara İçmeyen	13	47	35	70	

Kruskal-Wallis testi

Tablo 4-9: Yerde duran spermilerin istatistiksel değerlendirilmesi

4.3. Sperm Nuklear Kromatin Dekondansasyon Testi

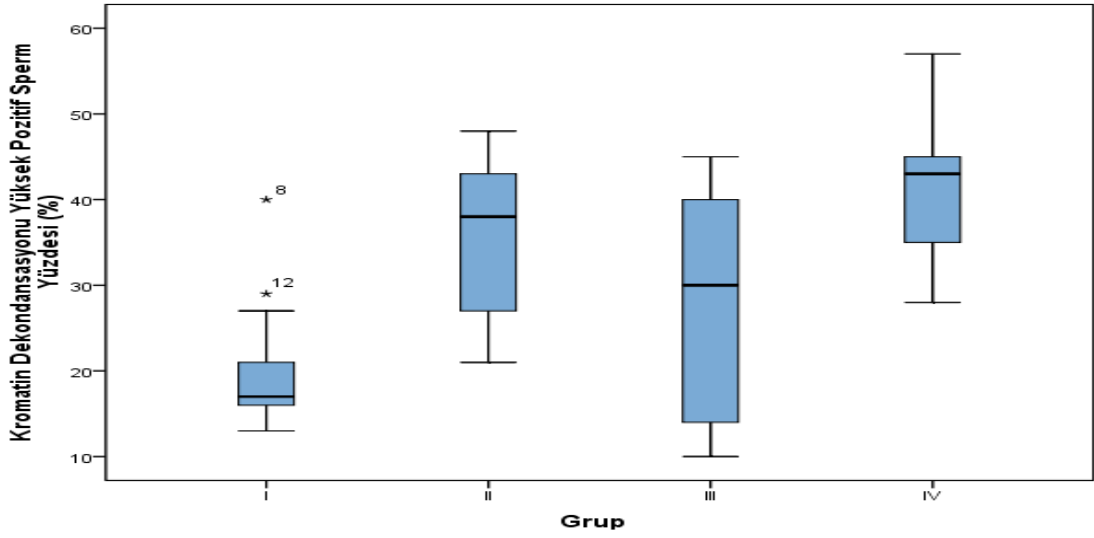
Sperm kromatin yapısındaki bozukluğu ölçmek için uygulanan bir test olan sperm kromatin nuklear dekonansasyon testinde spermier şişme oranlarına göre 4 gruba ayrıldı (En çok şişenden hiç şişmeyeine doğru A4-A1) Test sonuçlarına göre en çok şişen spermier en iyi dölleme yeteneğine sahip olduğu için bu gruptaki (A4) (Şekil 4-13) spermierin oranı istatistiksel olarak değerlendirildi.



Şekil 4-13: Sperm nuklear kromatin dekonansasyon testi.

Sarı ok (→) ile gösterilmiş olanlar en çok şişen, kromatin dekonansasyonu yüksek pozitif spermierdir.

İnfertil sigara içen gruptaki A4 sperm sayı ortancası 17 (13-40) iken, infertil sigara içmeyen grubun A4 sperm sayı ortancası 38 (21-48), fertil sigara içen grubun A4 sperm sayı ortancası 30 (10-45), fertil sigara içmeyen grubun A4 sperm sayı ortancası 43 (28-57) olarak bulundu (Şekil 4-14). A4 sperm değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 2. grup 1. gruptan ($p<0,001$), 4. grup 1. gruptan ($p<0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4-10).



Şekil 4-14: Sperm nuklear kromatin decondansasyon testi yüksek pozitif sperm ortancaları I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen

Grup No	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	17	13	40	<0,001***
İnfertil Sigara İçmeyen	13	38	21	48	
Fertil Sigara İçen	13	30	10	45	
Fertil Sigara İçmeyen	13	43	28	57	

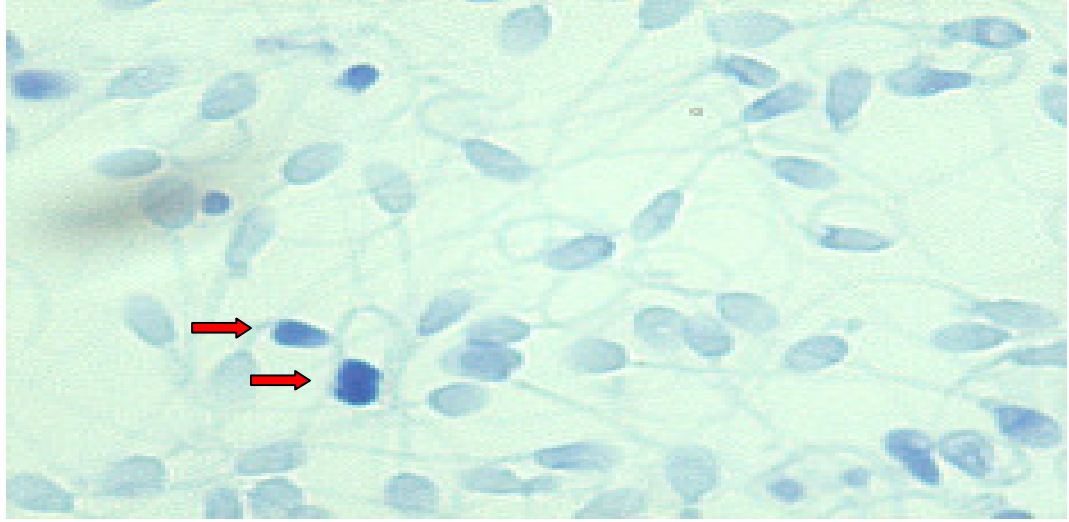
Kruskal-Wallis testi

*** $p<0,001$ çok ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-10: Sperm nuklear kromatin decondansasyon testi istatistiksel değerlendirmesi.

4.4. Anilin Mavisi ile Kromatin Kondansasyonunun Gösterilmesi

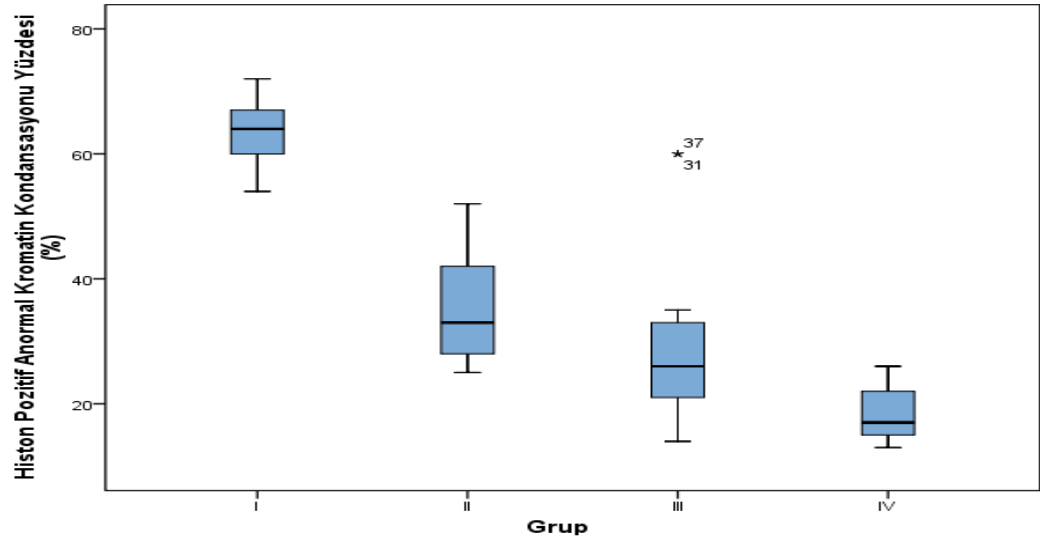
İkinci test olan Anilin Mavisi testinde spermler boyanma şekillerine göre iki gruba ayrıldı. Sperm boyanma durumlarına göre iki gruba ayrıldı (B1-B2) Burada verilen değerler (B1) kromatin paketlenmesinde sorunu olduğu düşünülen spermeleri yansıtmaktadır (Şekil 4-15). B1 grubundaki spermelerin istatistiksel değerlendirmesi yapılmıştır (Şekil 4-16).



Şekil 4-15: Anilin mavisi ile kromatin kondansasyonunun gösterilmesi

Kırmızı ok () ile gösterilmiş olan spermeler histon yapısından protamin yapısına geçememiş olan anilin ile boyanmış olan spermelerdir.

İnfertil sigara içen gruptaki B1 sperm sayısı ortancası 64 (54-72) iken, infertil sigara içmeyen grubun B1 sperm sayısı ortancası 33 (52-13), fertil sigara içen grubun B1 sperm sayısı ortancası 26 (14-60), fertil sigara içmeyen grubun B1 sperm sayısı ortancası 17 (13-26) olarak bulundu (Şekil 4-16). Anilin testine göre sorunlu sperm değişkeni (B1) dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p < 0,001$). İkili kıyaslamalarda 1. grup 2. gruptan ($p < 0,001$), 1. grup 3. gruptan ($p < 0,001$), 1. grup 4. gruptan ($p < 0,001$), 3. grup 4. gruptan ($p = 0,007$), 2. grup 4. gruptan ($p < 0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4-11).



Şekil 4-16: Anilin mavisi ile kromatin kondansasyonunun gösterilmesinde histon pozitif anormal kromatin kondansasyon ortancaları. I.İnfertil sigara içen II.İnfertil sigara içmeyen III. Fertil sigara içen IV. Fertil sigara içmeyen

Grup No	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	64	54	72	<0,001***
İnfertil Sigara İçmeyen	13	33	25	52	
Fertil Sigara içen	13	26	14	60	
Fertil Sigara İçmeyen	13	17	13	26	

Kruskal-Wallis testi ***p<0,001 çok ileri düzeyde anlamlı

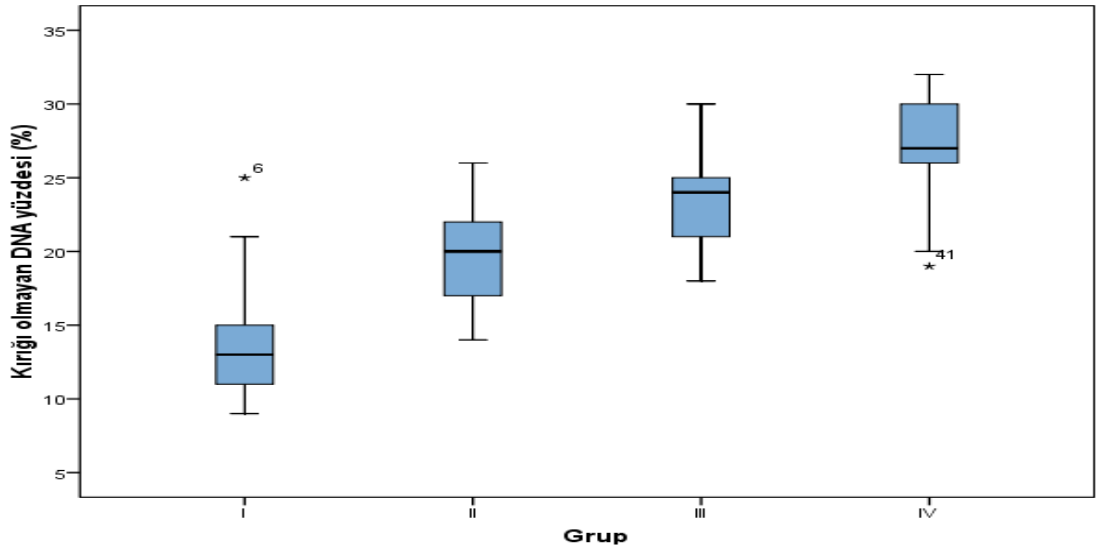
Tablo 4-11: Anilin mavisi ile kromatin kondansasyonunun istatistiksel değerlendirmesi

4.5. “Tek Hücre Jel Elektroferez” Yöntemi (Comet Analizi) İle DNA Hasar Analizi

Yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde hücre ile muamele edilmiş mikrojel slaytlar hazırlanır. Lizis tamponu etkisi ile DNA'nın açığa çıkması sağlanıp elektroferez etkisi ile kırıklar floresan boya da eklenmesi ile görünür hale getirildi. Rastgele 100 hücre her bir slayt üzerinde sayılarak değerlendirme yapıldı (Şekil 4-19) (Şekil 4-20) (Şekil 4-21) (Şekil 4-22).

Spermdeki DNA kırıkları tespit etmek için uygulanan Comet yönteminde kuyruk uzunluklarına göre cometler 3 kategoriye ayrıldı. Elektroferez sonrası kuyruk

oluşumuna göre hiç kuyruk oluşturmamayanlar (0) ve uzun kuyruk oluşturan spermilerin (2) gruplara dağılımı sırasıyla şu şekilde idi: İnfertil sigara içen gruptaki 0. grup comet sayı ortancası 26 (18-50) iken, infertil sigara içmeyen grubun 0. grup comet sayı ortancası 40 (28-52), fertil sigara içen grubun 0. grup comet sayı ortancası 48 (36-60), fertil sigara içmeyen grubun 0. grup comet sayı ortancası 54 (38-64) olarak bulundu (Şekil 4-17). 0. grup değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 2. grup 1. gruba göre ($p=0,002$), 3. grup 1. gruba göre ($p<0,001$), 4. grup 1. gruba göre ($p<0,001$), 4. grup 2. gruba göre ($p=0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4-12).



Şekil 4-17: Comet analizine göre kırığı olmayan sperm DNA ortancaları. 1.İnfertil sigara içen 2.İnfertil sigara içmeyen 3. Fertil sigara içen 4. Fertil sigara içmeyen.

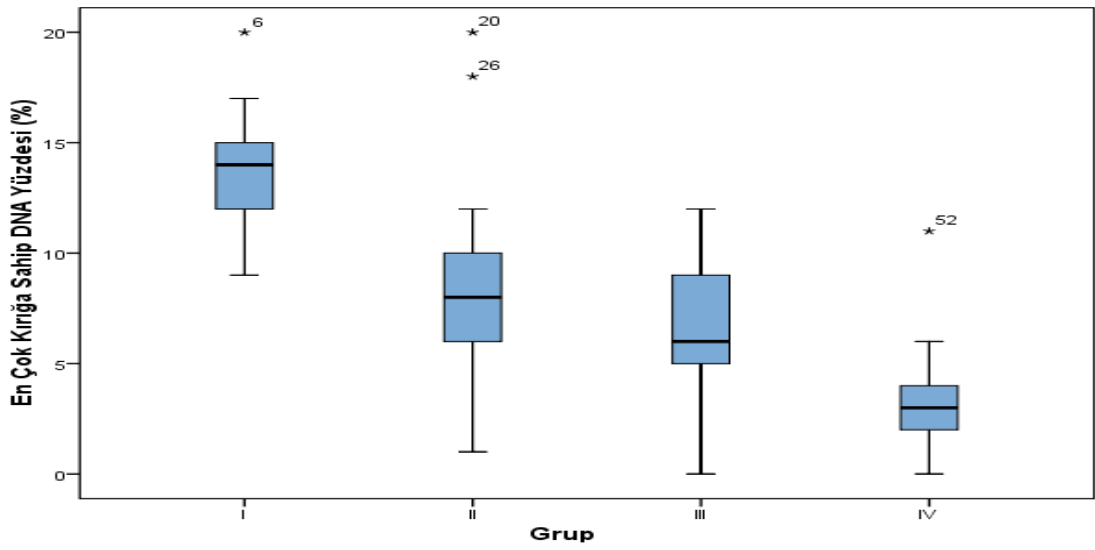
Grup No	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	26	18	50	0,035*
İnfertil Sigara İçmeyen	13	40	28	52	
Fertil Sigara İçen	13	48	36	60	
Fertil Sigara İçmeyen	13	54	38	64	

Kruskal-Wallis testi

* $p<0,05$ düzeyinde anlamlı

Tablo 4-12: Hiç kırığa sahip olmayan comet analizinin istatistiksel değerlendirmesi

İnfertil sigara içen gruptaki 2. grup comet sayı ortancası 28 (18-40) iken, infertil sigara içmeyen grubun 2. grup comet sayı ortancası 16 (2-40), fertil sigara içen grubun 2. grup comet sayı ortancası 12 (0-24), fertil sigara içmeyen grubun 2. grup comet sayı ortancası 6 (0-22) olarak bulundu (Şekil 4-18). 2. grup değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 1. grup 2. gruba göre ($p=0,008$), 1. grup 3. gruba göre ($p<0,001$), 1. grup 4. gruba göre ($p<0,001$), 2. grup 4. gruba göre (0,002) anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4-13).



Şekil 4-18: Comet analizine göre en çok kırığa sahip sperm DNA ortancaları.

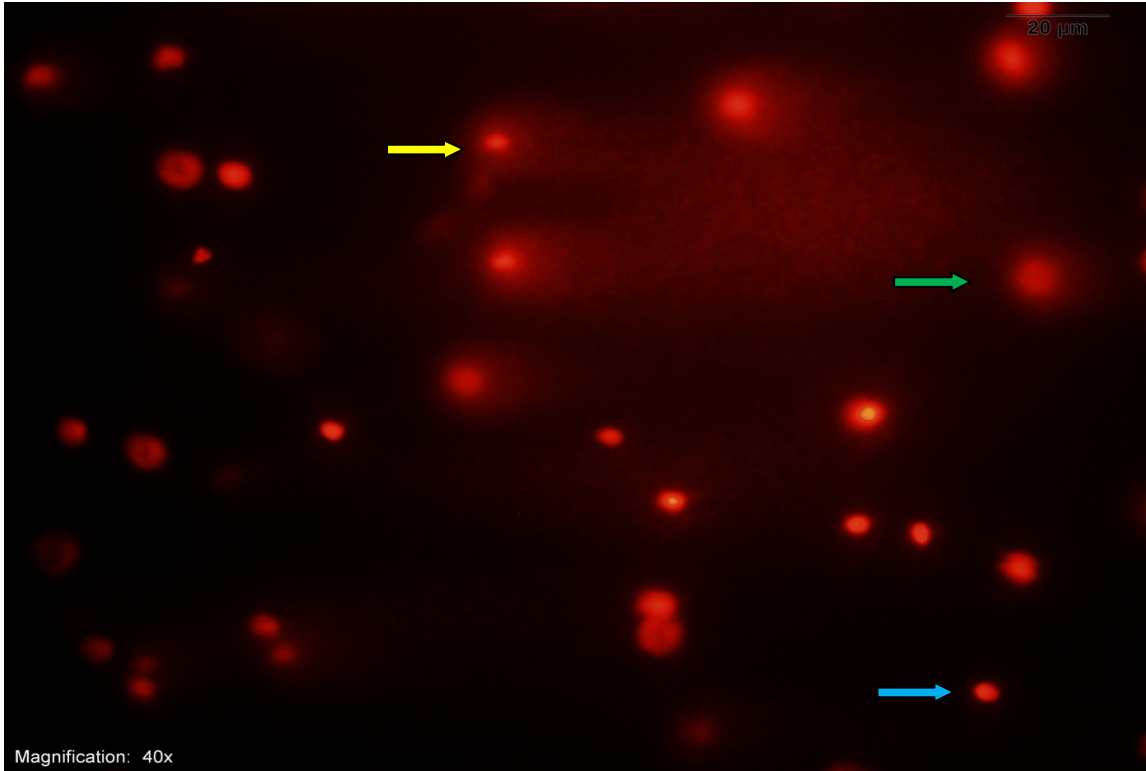
1.İnfertil sigara içen 2.İnfertil sigara içmeyen 3. Fertil sigara içen 4. Fertil sigara içmeyen.

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	28	18	40	0,042*
İnfertil Sigara İçmeyen	13	16	2	40	
Fertil Sigara İçen	13	12	0	24	
Fertil Sigara İçmeyen	13	6	0	22	

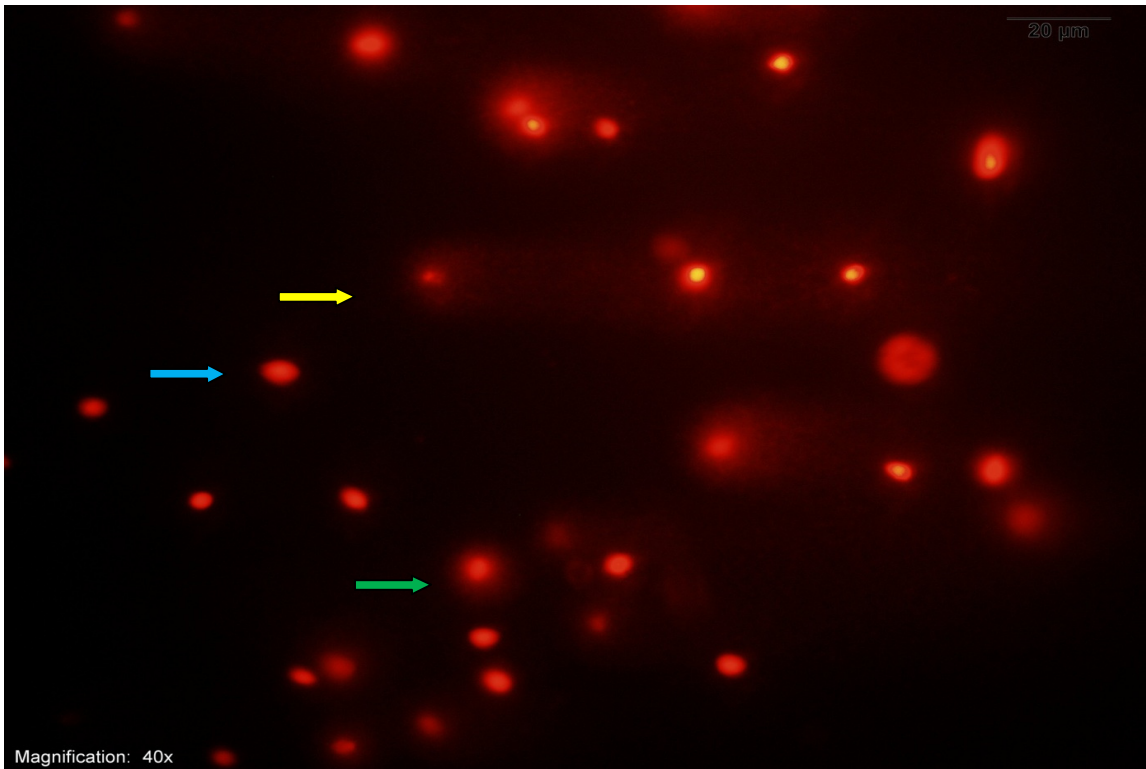
Kruskal-Wallis testi

* $p<0,05$ düzeyinde anlamlı

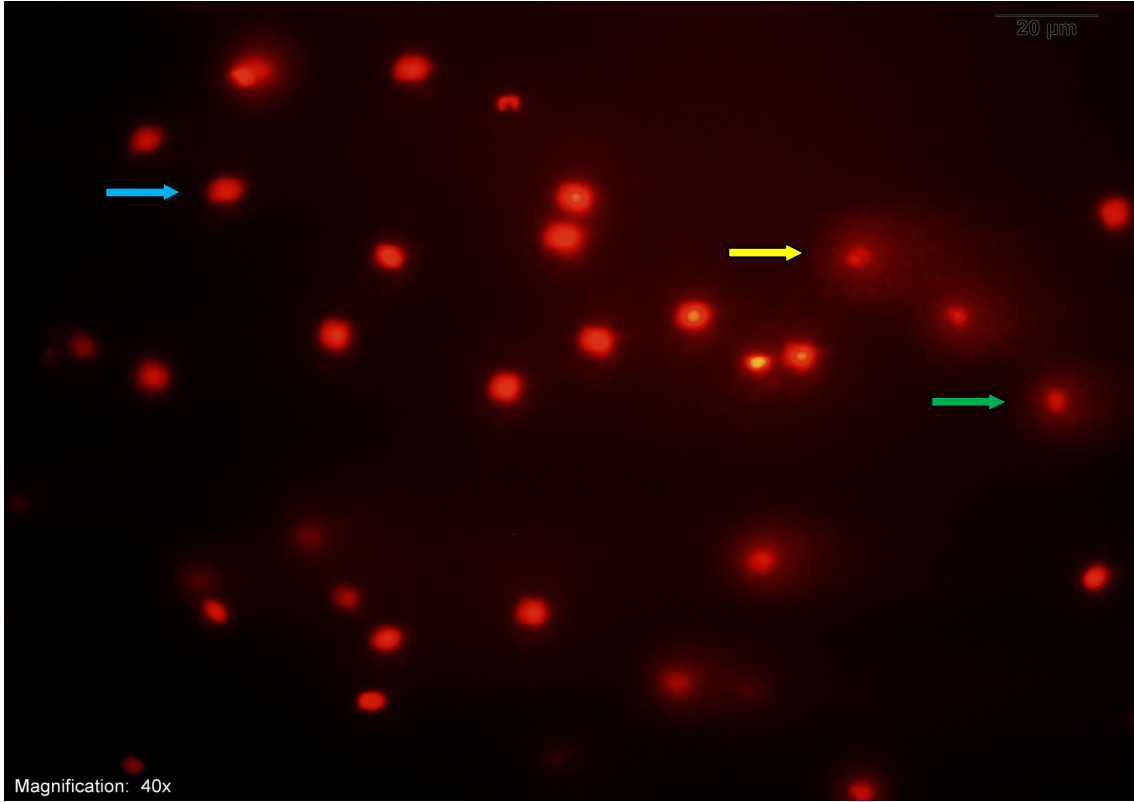
Tablo 4-13: En çok kırığa sahip olan comet analizinin istatistiksel değerlendirmesi



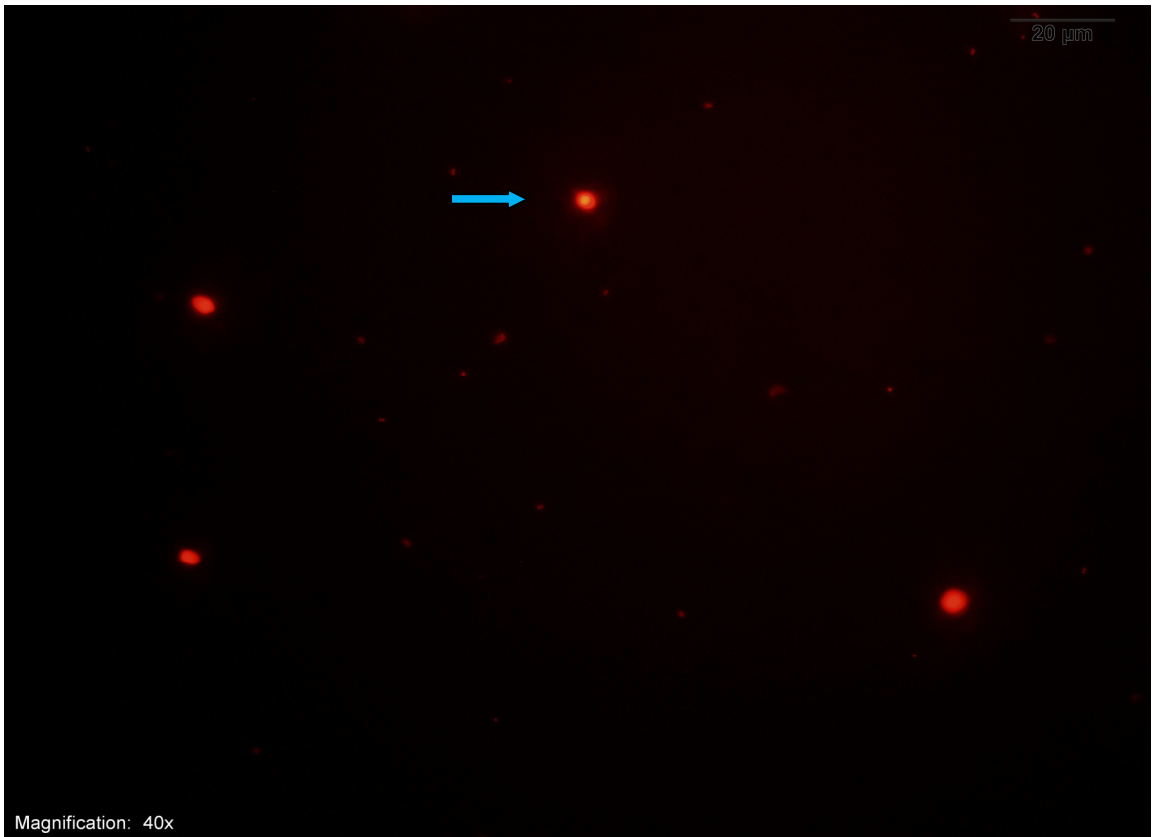
Şekil 4-19: Comet analizi I. grup. Sarı ok (→) ; en ileri derece kırığa sahip olan grup, yeşil ok (→) ; orta derece kırığa sahip olan grup, mavi ok (→) ; hiç kırığa sahip olmayan grup.



Şekil 4-20: Comet analizi II. grup. Sarı ok; en ileri derece kırığa sahip olan grup, yeşil ok; orta derece kırığa sahip olan grup, mavi ok; hiç kırığa sahip olmayan grup.



Şekil 4-21: Comet analizi III. grup. Sarı ok; en ileri derece kırığa sahip olan grup, yeşil ok; orta derece kırığa sahip olan grup, mavi ok; hiç kırığa sahip olmayan grup.



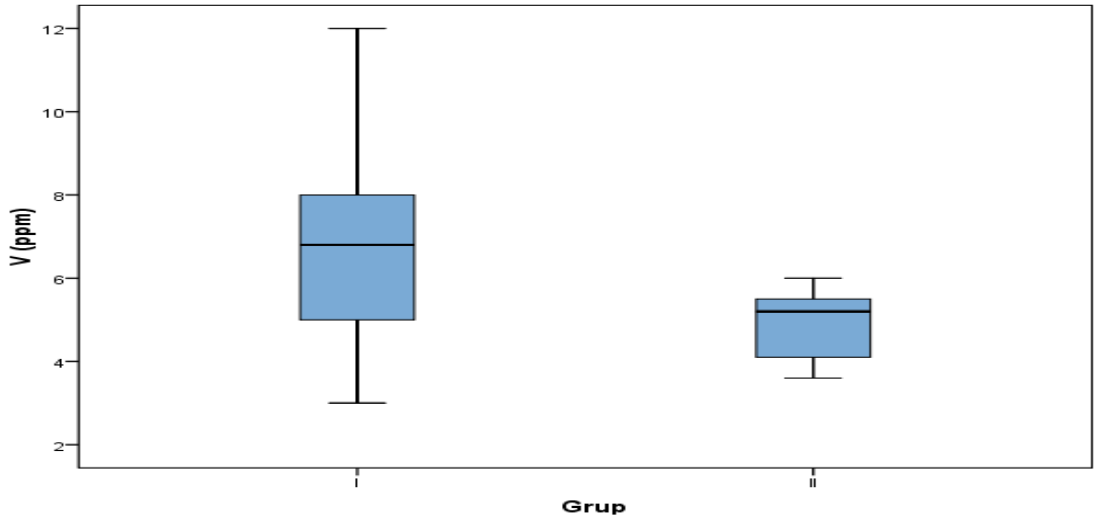
Şekil 4-22: Comet analizi IV. grup. Mavi ok; hiç kırığa sahip olmayan grup.

4.6. Eser Elementler

Sigara kullanmalarına göre hastalar sigara içenler (I) ve içmeyenler (II) olarak iki gruba ayrıldı ve eser element analizleri yapıldı. Eser element ölçümleri -80°C 'de saklanmış olan hücreler kullanılarak yöntemler bölümünde anlatıldığı şekilde ICP-MS cihazında değerlendirildi.

4.6.1. Semendeki Vanadyum Konsantrasyonu

İnfertil sigara içen gruptaki Vanadyum ortancası 5,41 (3,08-10,07) iken, infertil sigara içmeyen grubun Vanadyum ortancası 4,15 (3,68-5,77), fertil sigara içen grubun Vanadyum ortancası 7,97 (5,03-12,8), fertil sigara içmeyen grubun Vanadyum ortancası 5,52 (4,5-6,04) olarak bulundu (Şekil 4-23). Vanadyum değişkeni iki grup arasında T testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulundu ($p=0,004$). Sigara içen grupta Vanadyum (V) değeri ($6,79\pm 2,34$), sigara içmeyen gruba ($4,98\pm 0,81$) göre daha yüksek bulundu ($p=0,004$) (Tablo 4-14).



Şekil 4-23: Semendeki vanadyum ortalamaları. 1. Sigara içen 2. Sigara içmeyen.

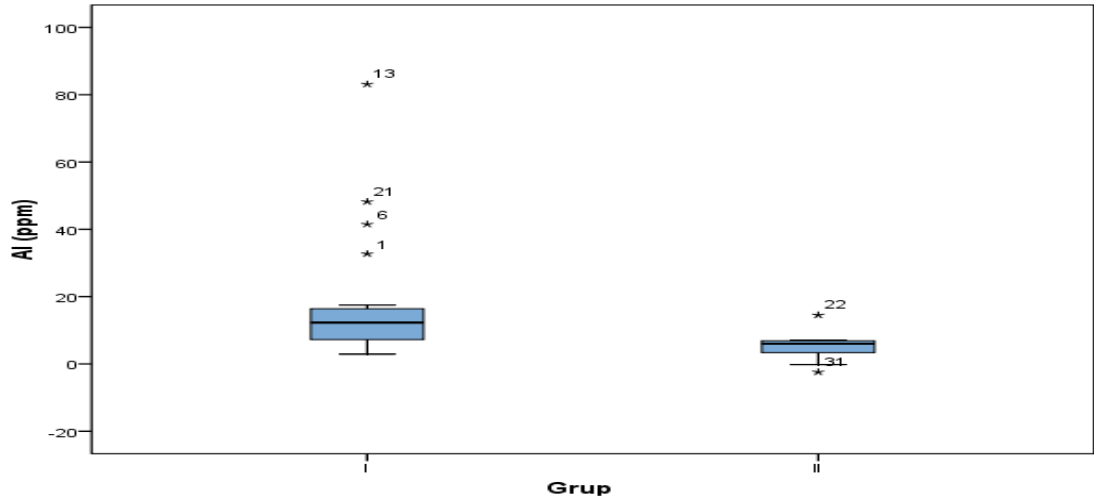
Grup No	N	Ortalama	Standart Sapma	p
Sigara İçen	26	6,79	2,34	0,004**
Sigara İçmeyen	26	4,98	0,81	

T testi ** $p<0,01$ ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-14: Semende vanadyum analizinin istatistiksel değerlendirmesi

4.6.2. Semendeki Alüminyum Konsantrasyonu

İnfertil sigara içen gruptaki Alüminyum ortancası 8,64 (2,91-41,58) iken, infertil sigara içmeyen grubun Alüminyum ortancası 4,80 (-2,42-7,04), fertil sigara içen grubun Alüminyum ortancası 12,97 (6,64-83,11), fertil sigara içmeyen grubun Alüminyum ortancası 6,08 (3,36-14,59) olarak bulundu (Şekil 4-24). Alüminyum değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulundu ($p=0,003$). Sigara içen grupta alüminyum (Al) değeri 12,33 (2,91-83,11), sigara içmeyen gruba 6 (-2,42-14,59) göre daha yüksek bulundu ($p=0,003$) (Tablo 4-15).



Şekil 4-24: Semendeki alüminyum ortancaları. 1. Sigara içen 2. Sigara içmeyen

Grup No	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
Sigara İçen	26	12,33	2,91	83,11	0,003**
Sigara İçmeyen	26	6	-2,42	14,59	

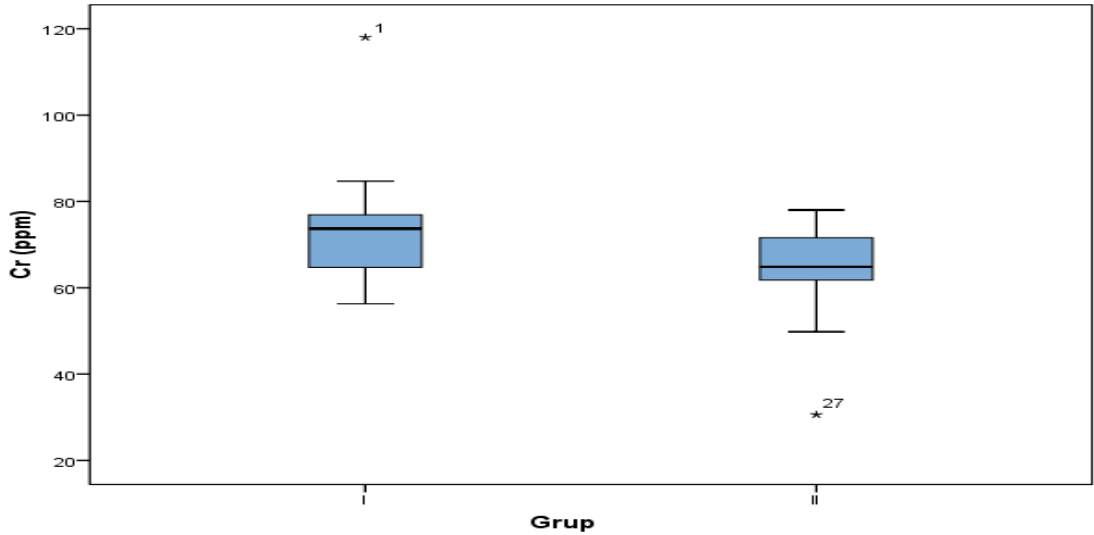
Mann-Whitney testi ** $p<0,01$ ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-15: Semende alüminyum analizinin istatistiksel değerlendirmesi

4.6.3. Semendeki Krom Konsantrasyonu

İnfertil sigara içen gruptaki Krom ortancası 67,29 (56,38-118) iken, infertil sigara içmeyen grubun Krom ortancası 64,29 (30,67-78,04), fertil sigara içen grubun Krom ortancası 75,91 (60,27-84,72), fertil sigara içmeyen grubun Krom ortancası 65,05

(61,84-75,26) olarak bulundu (Şekil 4-25). Krom değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulmadı ($p=0,118$). Sigara içen grupta krom (Cr) değeri 73,74 (56,38-118), sigara içmeyen gruba 64,90 (30,67-78,04) göre daha yüksek bulundu ($p=0,118$) (Tablo 4-16).



Şekil 4-25: Semendeki krom ortancaları. 1. Sigara içen 2. Sigara içmeyen

Grup No	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
Sigara İçen	26	73,74	56,38	118	0,118
Sigara İçmeyen	26	64,90	30,67	78,04	

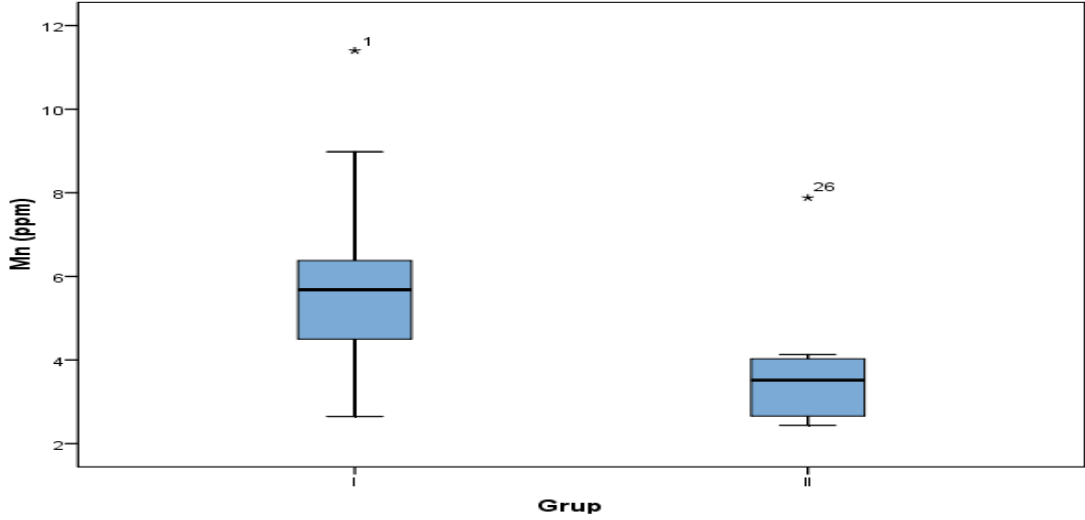
Mann-Whitney testi

Tablo 4-16: Semende krom analizinin istatistiksel değerlendirmesi

4.6.4. Semendeki Mangan Konsantrasyonu

İnfertil sigara içen gruptaki Mangan ortancası 5,79 (2,65-11,40) iken, infertil sigara içmeyen grubun Mangan ortancası 2,69 (2,49-3,65), fertil sigara içen grubun Mangan ortancası 5,68 (2,95-8,98), fertil sigara içmeyen grubun Mangan ortancası 4,03 (2,44-7,88) olarak bulundu (Şekil 4-26). Mangan değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulundu ($p=0,005$). Sigara içen grupta mangan (Mn) değeri 5,68

(2,65-11,40), sigara içmeyen gruba 3,52 (2,44-7,88) göre daha yüksek bulundu ($p=0,005$) (Tablo 4-17).



Şekil 4-26: Semendeki mangan ortancaları. 1. Sigara içen 2. Sigara içmeyen

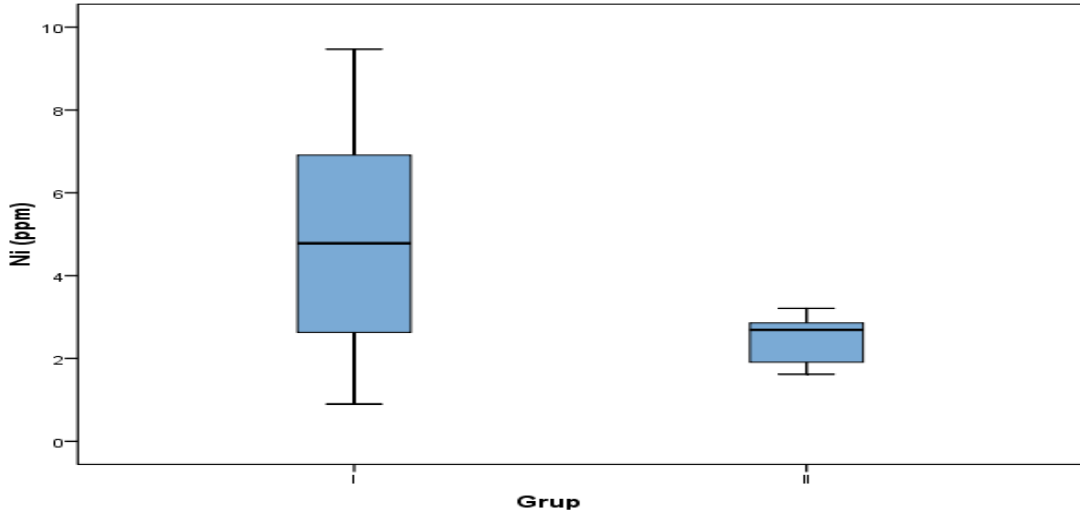
Grup No	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
Sigara İçen	26	5,68	2,65	11,40	0,005**
Sigara İçmeyen	26	3,52	2,44	7,88	

Mann-Whitney testi ** $p<0,01$ ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-17: Semende mangan analizinin istatistiksel değerlendirmesi

4.6.5. Semendeki Nikel Konsantrasyonu

İnfertil sigara içen gruptaki Nikel ortancası 3,88 (1,49-9,03) iken, infertil sigara içmeyen grubun Nikel ortancası 2,79 (2,59-3,21), fertil sigara içen grubun Nikel ortancası 5,45 (0,90-9,47), fertil sigara içmeyen grubun Nikel ortancası 1,91 (1,62-2,86) olarak bulundu (Şekil 4-27). Nikel değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulundu ($p=0,031$). Sigara içen grupta nikel (Ni) değeri 54,78 (0,90-9,47), sigara içmeyen gruba 2,69 (1,62-3,21) göre daha yüksek bulundu ($p=0,031$) (Tablo 4-18).



Şekil 4-27: Semendeki nikel ortancaları. 1. Sigara içen 2. Sigara içmeyen

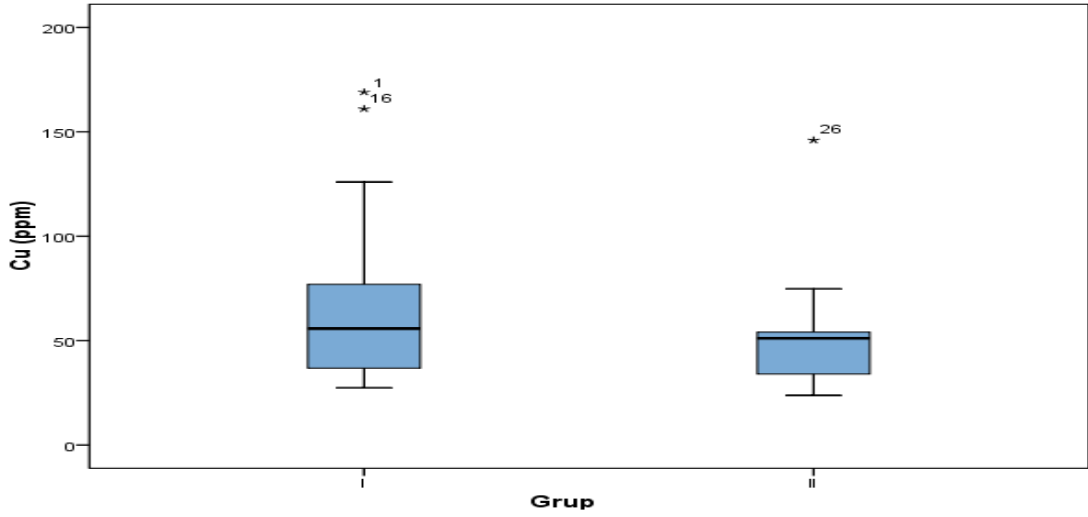
Grup No	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
Sigara İçen	26	4,78	0,90	9,47	0,031*
Sigara İçmeyen	26	2,69	1,62	3,21	

Mann-Whitney testi *p<0,05 düzeyinde anlamlı

Tablo 4-18: Semende nikel analizinin istatistiksel değerlendirmesi

4.6.6. Semendeki Bakır Konsantrasyonu

İnfertil sigara içen gruptaki Bakır ortancası 56,34 (28,38-169,70) iken, infertil sigara içmeyen grubun Bakır ortancası 49,41 (23,84-74,81), fertil sigara içen grubun Bakır ortancası 42,55 (27,47-161,40), fertil sigara içmeyen grubun Bakır ortancası 51,47 (34,07-146,90) olarak bulundu (Şekil 4-28). Bakır değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulunmadı ($p=0,499$). Sigara içen grupta Bakır (Cu) değeri 55,87 (27,47-169,70), sigara içmeyen gruba 51,18 (23,84-146,90) göre daha yüksek bulundu ($p=0,499$) (Tablo 4-19).



Şekil 4-28: Semendeki bakır ortancaları. 1. Sigara içen 2. Sigara içmeyen.

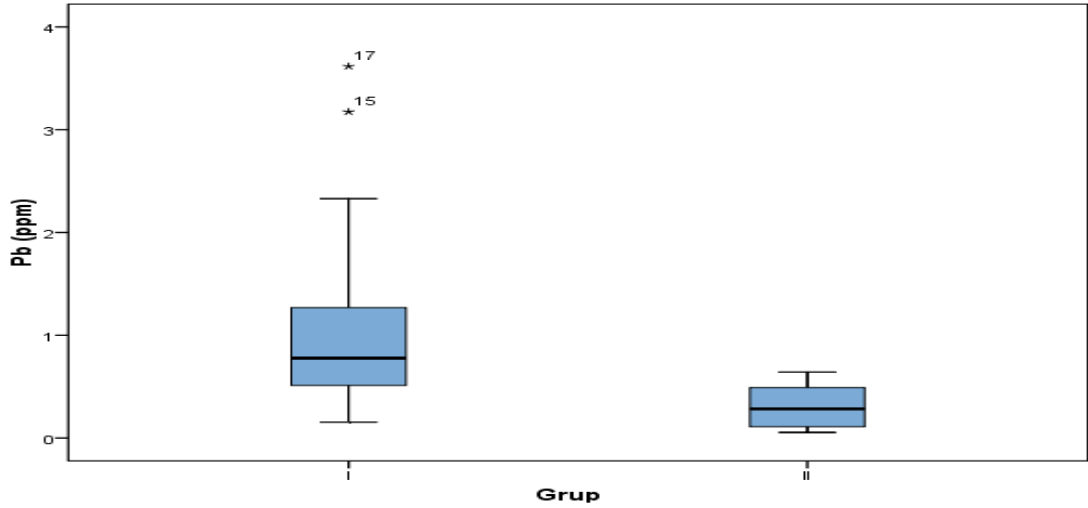
Grup No	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
Sigara İçen	26	55,87	27,47	169,70	0,499
Sigara İçmeyen	26	51,18	23,84	146,90	

Mann-Whitney testi

Tablo 4-19: Semende bakır analizinin istatistiksel değerlendirilmesi

4.6.7. Semendeki Kurşun Konsantrasyonu

İnfertil sigara içen gruptaki Kurşun ortancası 0,69 (0,15-2,32) iken, infertil sigara içmeyen grubun Kurşun ortancası 0,11 (0,05-0,60), fertil sigara içen grubun Kurşun ortancası 0,96 (0,37-3,61), fertil sigara içmeyen grubun Kurşun ortancası 0,34 (0,22-0,64) olarak bulundu (Şekil 4-29). Kurşun değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak çok ileri düzeyde fark bulundu ($p < 0,001$). Sigara içen grupta Kurşun (Pb) değeri 0,77 (0,15-3,61), sigara içmeyen gruba 0,28 (0,05-0,64) göre daha yüksek bulundu ($p < 0,001$) (Tablo 4-20).



Şekil 4-29: Semendeki kurşun ortancaları. 1. Sigara içen 2. Sigara içmeyen.

Grup No	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
Sigara İçen	26	0,77	0,15	3,61	<0,001***
Sigara İçmeyen	26	0,28	0,05	0,64	

Mann-Whitney testi ***p<0,001 çok ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-20: Semende kurşun analizinin istatistiksel değerlendirilmesi

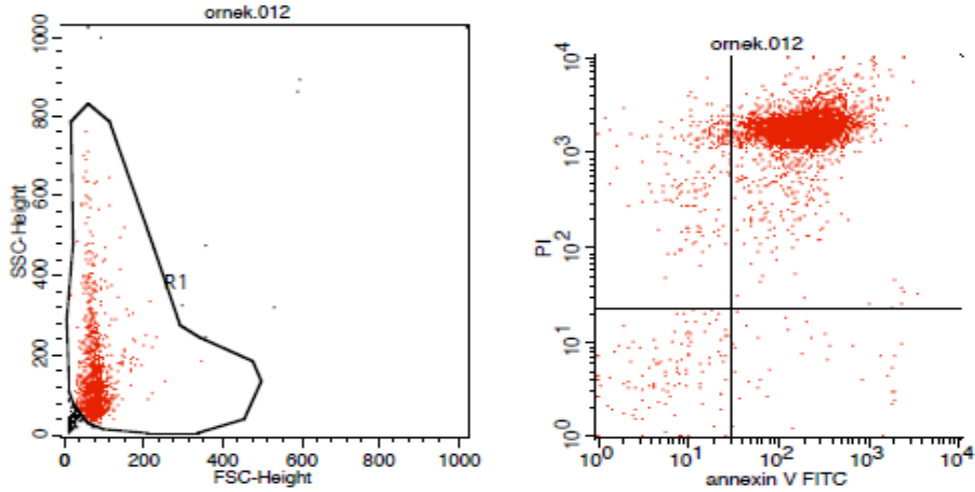
4.7. Anneksin V ve Propidium İodid ile Apoptotik ve Nekrotik Sperm Hücrelerinin Belirlenmesi

-80 ° C’de saklanmış olan hücreler çözüldükten sonra çalışma “Anneksin V-Fitc Assay” kiti protokolü ile yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi akım sitometri cihazında ölçümler yapıldı. Dörde ayrılmış olan nokta grafik histogramında, sağ üst köşede anneksin V ve PI ile boyanmış hücreler (Şekil 4-30).

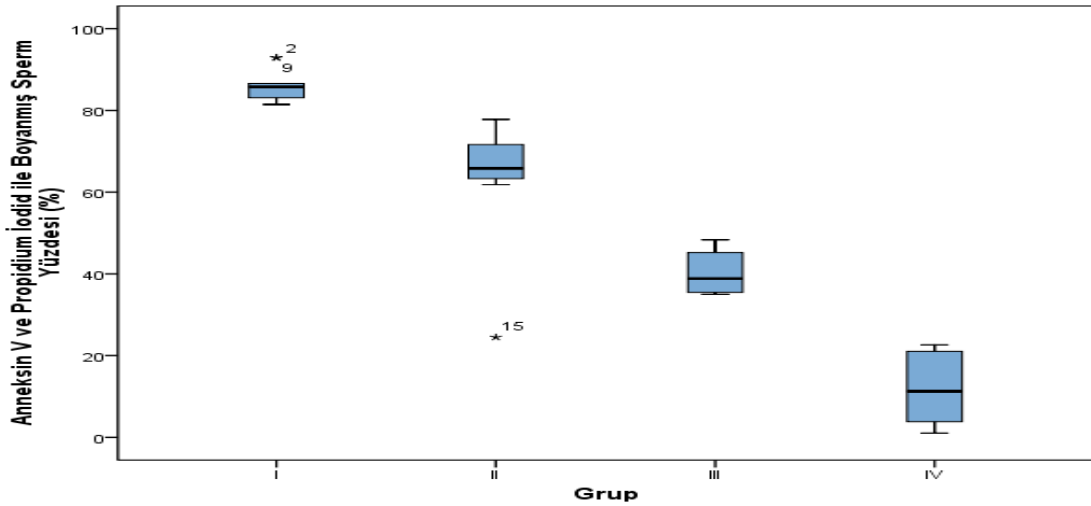
4.7.1. Anneksin V ve Propidium İodid ile Boyanmış Sperm Hücreleri

İnfertil sigara içen grubun hem Anneksin V hem PI ile boyanmış sperm sayı ortancası 85,77 (81,45-92,93) iken, infertil sigara içmeyen grubun sperm sayı ortancası 65,83 (24,49-77,81), fertil sigara içen grubun sperm sayı ortancası 38,85 (35,01-48,33), fertil sigara içmeyen grubun sperm sayı ortancası 11,26 (1,03-22,64) olarak bulundu (Şekil 4-31).

Anneksin V ve PI ile boyanmış sperm hücreleri dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 1. grup 2. gruptan ($p=0,001$), 1. grup 3. gruptan ($p<0,001$), 1. grup 4. gruptan ($p=0,001$), 2. grup 4. gruptan ($p=0,003$), 3. grup 4. gruptan ($p=0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 4-21).



Şekil 4-30: Anneksin V ve Propidium İodid ile boyanmış sperm hücrelerinin akım sitometrik incelenmesi.



Şekil 4-31: Anneksin V ve PI ile boyanmış sperm ortancaları. 1.İnfertil sigara içen 2.İnfertil sigara içmeyen 3. Fertil sigara içen 4. Fertil sigara içmeyen.

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	p
İnfertil Sigara İçen	13	85,77	81,45	92,93	<0,001***
İnfertil Sigara İçmeyen	13	65,83	24,49	77,81	
Fertil Sigara İçen	13	38,85	35,01	48,33	
Fertil Sigara İçmeyen	13	11,26	1,03	22,64	

Mann-Whitney testi ***p<0,001 çok ileri düzeyde anlamlı

Tablo 4-21: Anneksin V ve PI ile boyanmış sperm hücrelerinin istatistiksel değerlendirmesi

5. TARTIŞMA

Hem iç hem de dış olmak üzere çeşitli nedenlerden dolayı sperm DNA'sında değişik düzeyde hasarlar meydana gelmektedir (32-34). Spermilerin olgunlaşma aşamasında DNA hasarlarına yol açan sebeplerin başında hatalı kromozom paketlenmesi (45), apoptozun yol açtığı DNA fragmantasyonu (46) ve oksidatif stres (47) gibi önemli parametreler sayılabilir.

İnsanlarda sperm kromatini protaminler tarafından sıkıca paketlenmiştir. Protaminler, sperm nükleusunun kompaktlaşmasından ve stabilizasyonundan sorumludur. Özel DNA dizilerinde, yaklaşık sperm DNA'sının %15'lik bir kısmında, DNA histon proteinleri tarafından paketlenmiş olarak bulunmaktadır. Histon bağlı DNA dizileri daha gevşek bir yapıya sahiptir ve bu DNA dizilerinin fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminde yer aldığı düşünülmektedir. Sperm histon/protamin oranının infertil bireylerde daha yüksek olduğu gösterilmiş olup yüksek histon/protamin oranının kromatin yoğunlaşmasını engellediği ve DNA'yı hasara açık hale getirdiği düşünülmektedir.

Ward ve Coffey'in 1991 yılında yaptığı çalışmaya göre, spermiyogenez sırasında sperm kromatin paketlenmesinde, histon yapısından protamin yapısına geçemeyen sperm DNA'da hasar meydana getirmektedir. Protamin-DNA birleşmesi ile, genetik materyal daha az yer kaplayacak tarzda paketlenmekte olup, bunun sonucunda da spermin hareketinin devamı için daha az enerjiye ihtiyaç gösterir hale gelmektedir. Buna ek olarak, yüksek düzeydeki bu agregasyon sayesinde sperm, fiziksel ve kimyasal etkilere karşı daha iyi korunabilmektedir. Dekondansasyon sadece ooplazmanın içerisinde olabilir. Disülfid bağları kırılır ve protaminden oluşan histonlar, ovum kökenli histonlar ile yer değiştirirler (Longo,1985). Protaminlerdeki herhangi bir anomali veya eksiklik paketlenmeyi bozarak, sperm kalitesini ve dolayısıyla fertilizasyon kapasitesini azaltır. Bu olaylar sırasında protaminin yer değiştirmesinde ortaya çıkabilecek bir bozukluk, paketlenme anomalisine neden olabilir (119).

Sperm kromatin nuklear dekonkansasyon testi rutin semen analizinde tespit edilemeyen açıklanmamış infertil erkeklerin sperm hücrelerinin fonksiyonel özellikleri için klinik olarak uygulanmasının çok yararlı olacağı ifade edilmektedir. (120).

Yaptığımız çalışmada sperm nuklear kromatin dekonkansasyon testi değerlendirmesi için spermler şişme oranlarına göre en az şişenden en çok şişene doğru dört gruba ayrıldı. İstatistik değerlendirilmesi yapılan grup (A4) en çok şişen yani oosit içine aktarıldıktan sonra dekonkansasyonu gerçekleştirecek olan gruptur. A4 sperm değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 2. grup 1. gruptan ($p<0,001$), 4. grup 1. gruptan ($p<0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu istatistik sonuçları değerlendirildiğinde infertilite ve sigara kullanımının, sperm kromatininin oosit içine girdikten sonraki durumu üzerinde etkili olduğu ortaya çıktı.

DNA hasarını belirlemek için kullanılan bir yöntem olan anilin testi ile yapılan bir çalışmaya göre %30'un altında ve üstünde değer verenler olarak iki grup oluşturulmuştur. 1. grupta %30'dan az olan 2. grupta ise %30'a eşit ve fazla olan örnekler bulunmaktadır. Sperm kromatin kondansasyonunun IUI (Intra Uterin İnseminasyon) sonrasında fertilizasyonda başarısızlık üzerinde oldukça etkili olduğu bulunmuştur. (132).

Çalışmamızda anilin mavisi ile kromatin kondansasyonunu gösterdik. Bu değerlendirme için spermler anilin ile boyanma (B1) ve boyanmama (B2) durumlarına göre iki gruba ayrıldı. Sorunlu sperm değişkeni (boyanan-B1) dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 1. grup 2. gruptan ($p<0,001$), 1. grup 3. gruptan ($p<0,001$), 1. grup 4. gruptan ($p<0,001$), 3. grup 4. gruptan ($p=0,007$), 2. grup 4. gruptan ($p<0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu. İnfertilite ve sigara kullanımı birleştiği zaman sperm kromatin yapısında histon proteinlerinin protaminlere dönüşmesinde etkili olduğu ortaya çıktı.

Spermatogeneizde germinal hücre kaybı önemli rol oynar. Bu durum spermin normal gelişimi için mutlaka gereklidir (55). Sperm apoptozu erkek infertilitesi için bir tür belirleyicidir. Normalde DNA'sı hasarlı olan spermler apoptoz yolu ile elense de bazen bu yoldan kaçan ve semene karışan spermler de görülebilmektedir. Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogeneizde bozulma ve infertilite oluşabilir (68-70). Hasarlı hücreleri elemek için gerçekleşen apoptoz olayı endonukleaz kırık oluşumuna neden olmaktadır.

Bazı yayınlarda fragmente DNA'ya sahip sperm ve apoptotik ve nekrotik sperm içeren vakalarda başarısız döllenme veya düşük oranını daha sık olarak bildirilmektedir (121). Fakat, bazı araştırmacılar DNA fragmentasyonunun fertilizasyon ve sperm hızını negatif etkilemesine rağmen gebelik üzerine etkisi olmadığını iddia etmektedirler (122).

DNA fragmentasyonunun azalması yönünde pek çok çalışmalar yapılmıştır. İnsan sperminde swim-up ile yıkama öncesi ve sonrasında DNA fragmentasyon durumu karşılaştırıldığında swim up sonrası hazırlanan örneklerde yıkama öncesine göre nekrotik, apoptotik ve sitoplazmik artık bulunan spermelerin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Ancak immatür, akrozomu bozuk spermelerin swim up sonrasında da hala var oldukları gözlenmiştir (123).

Yapılan pek çok çalışma çevresel etmenler, sigara ve apoptozun spermdede kromatin kondansasyonunu bozduğunu göstermiştir. Sperm kromatin yapısında yeterli gelişim gözlenmediği takdirde sperm DNA'sı kırık oluşumuna daha eğilimli hale gelmektedir.

İnfertilitenin sperm apoptozuna olan ilişkisinin araştırıldığı bir çok çalışmada spermelerde düzensiz nükleer kromatin biçimi, nükleer kromatin parçalanması, apoptotik cisimcikler içeren yoğun yuvarlağımsı tomurcuklanma gösteren nukleuslu spermeler, nükleer kromatin içinde vakuollerin bulunuşu ve bu vakuollerin bazılarının içindeki membransal cisimlerin (miyelin figürlerin) varlığı tanımlanmıştır (124-126).

Chen ve ark yaptığı bir çalışmaya göre ejaküle spermdede apoptoz yüzdesi ile sperm motilitesi, morfolojisi ve kuyruk hasarları arasında pozitif yönde bir korelasyon saptanmıştır (127). Yapılan başka bir araştırmaya göre erken apoptotik sperm yüzdesi sigara kullananlarda kullanmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur (128).

Yaptığımız çalışma sonuçlarına göre; Anneksin V ve PI ile boyanmış sperm hücreleri dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 1. grup 2. gruptan ($p=0,001$), 1. grup 3. gruptan ($p<0,001$), 1. grup 4. gruptan ($p=0,001$), 2. grup 4. gruptan ($p=0,003$), 3. grup 4. gruptan ($p=0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu.

Biz yaptığımız çalışmada sperm kromatin dekontansasyon testi ve anilin mavisi testi swim-up tekniği sonrası yapılmış fakat anneksin V-akım sitometri tekniği ve comet testi herhangi bir ön işlem yapılmadan gerçekleştirildi. Bunun nedeni bugün halen IVF laboratuvarlarında rutin analizlerde swim-up tekniği kullanılıyor olmasıdır. Çalışmada

kullanılan diğer analizler ise doğal semen yapısındaki bozukluk oranlarını anlamak için yapıldığından ön işlem kullanılmadı. Bu nedenle özellikle apoptoz ve nekroz oranının yüksek çıkması bu durumdan kaynaklanmış olabilir.

Spermin genetik yapısındaki bozuluk ile infertilite arasında önemli bir bağ bulunmaktadır. İnfertil çiftlerin yaklaşık yarısında “erkek faktörü” öne çıkar. Bazı çalışmalarda infertil erkeklerin spermelerindeki DNA hasarı oranı, fertil erkeklerin spermelerindeki DNA hasarından daha yüksek bulunmuştur (129-130). Hastalık nedeni ve tedavisi için semen analizi yapılması mutlaka gerekli olsa da yeterli değildir. Sperm DNA hasarlarının infertilitedeki önemi çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir. Kötü kalitedeki sperm DNA'sının doğal yolla gebe kalma şansını azaltabileceği pek çok çalışma ile ortaya konmuştur (131). Tedavi şansı sadece klinik tanıyla değil, aynı zamanda infertilitenin altında yatan gerçek nedenlerin belirlenmesiyle daha fazla artmaktadır.

Eğer yumurta kısmen hasarlı DNA'ya sahip sperm ile döllenmişse sperm DNA'sının tamir mekanizmalarında bozukluk olduğu için doğan çocukta kanser gibi risk etmenleri de ayrıca görülmektedir.

Eser elementler, çeşitli mekanizmalar yoluyla biyolojik sistemlerde rol oynamaktadır (87). Eser elementler vücutta bulunmaları gereken optimal değerler dışına çıktıklarında pek çok mekanizmayı etkileyerek olumsuz durumların oluşmasına neden olmaktadır. Pek çok eser elementin semen konsantrasyonunun sperm kalitesi üzerine etkili olduğuna dair araştırmalar mevcuttur (92, 97, 100, 108).

ICP-MS cihazı ile yaptığımız eser elementleri ölçme çalışmamızın değerlendirmelerine göre; vanadyum değişkeni iki grup arasında T testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulundu ($p=0,004$). Sigara içen grupta Vanadyum (V) değeri ($6,79 \pm 2,34$), sigara içmeyen gruba ($4,98 \pm 0,81$) göre daha yüksek bulundu ($p=0,004$). Alüminyum değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulundu ($p=0,003$). Sigara içen grupta alüminyum (Al) değeri $12,33$ ($2,91-83,11$), sigara içmeyen gruba 6 ($-2,42-14,59$) göre daha yüksek bulundu ($p=0,003$). Krom değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulunmadı ($p=0,118$). Sigara içen grupta krom (Cr) değeri $73,74$ ($56,38-118$), sigara içmeyen gruba $64,90$ ($30,67-78,04$) göre daha yüksek bulundu ($p=0,118$).). Manganez

değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulundu ($p=0,005$). Sigara içen grupta mangan (Mn) değeri 5,68 (2,65-11,40), sigara içmeyen gruba 3,52 (2,44-7,88) göre daha yüksek bulundu ($p=0,005$). Nikel değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulundu ($p=0,031$). Sigara içen grupta nikel (Ni) değeri 54,78 (0,90-9,47), sigara içmeyen gruba 2,69 (1,62-3,21) göre daha yüksek bulundu ($p=0,031$). Bakır değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak fark bulunmadı ($p=0,499$). Sigara içen grupta Bakır (Cu) değeri 55,87 (27,47-169,70), sigara içmeyen gruba 51,18 (23,84-146,90) göre daha yüksek bulundu ($p=0,499$). Kurşun değişkeni iki grup arasında Mann-Whitney testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında anlamlı olarak çok ileri düzeyde fark bulundu ($p<0,001$). Sigara içen grupta Kurşun (Pb) değeri 0,77 (0,15-3,61), sigara içmeyen gruba 0,28 (0,05-0,64) göre daha yüksek bulundu ($p<0,001$).

Semen analizi günümüzde infertilite tanısı için uygulanan rutin bir işlemdir. Bu analiz içine hacim, sayı, morfoloji ve motilite kriterleri girmektedir.

USDHHS (United States Department of Health and Human Services)'nin 2004'te yaptığı açıklamaya göre klinik bulgular hala net olmasa da sigara kullanan erkeklerde düşük semen hacmi ve sperm sayısına ayrıca artmış anormal morfolojik formlara rastlandığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda sperm sayı değişkeni gruplar arasında Kruskal-Wallis testine göre ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0,012$). İkili kıyaslamalarda 4. grup 1. gruptan ($p=0,005$), 4. grup 2. gruptan ($p=0,006$) anlamlı olarak farklı bulundu. Hacim değişkeni 4 grup arasında benzer bulundu ($p>0,05$).

Sperm morfolojisi Dünya Sağlık Örgütü tarafından belirlenen ölçütlere uygun; normal, anormal baş, anormal boyun ve anormal kuyruk olarak dört gruba ayrılmış ve değerlendirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre sperm normal morfoloji değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testine göre çok ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0,001$). İkili kıyaslamalarda 2. grup 1. gruptan ($p=0,008$), 3. grup 1. gruptan ($p<0,001$), 4. grup 1. gruptan ($p<0,001$), 4. grup 2. gruptan ($p<0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu. Sperm baş anomalisi değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testine göre çok ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p<0,001$). İkili

kıyaslamalarda 1. grup 2. gruptan ($p<0,001$), 1. grup 4. gruptan ($p<0,001$), 3. grup 4. gruptan ($p<0,001$), 3. grup 2. gruptan ($p=0,003$) anlamlı olarak yüksek bulundu. Sperm boyun anomalisi değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testine göre ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0,003$). İkili kıyaslamalarda 2. grup 3. gruptan anlamlı olarak yüksek bulundu. Sperm kuyruk anomalisi değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testine göre ileri düzeyde anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0,011$). İkili kıyaslamalarda 2. grup 3. gruptan anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,001$). Normal morfolojinin hem infertilite hem de sigara ile bağlantılı olduğu, anomalilikler arasında boyun ve kuyruk anomalisinin sigaradan daha çok infertilite ile ilişkili olduğu, baş anomalisinin ise hem infertilite hem de sigara ile artış gösterdiği saptanmıştır.

Tek hücreli jel elektroforezi veya sıklıkla tercih edilen diğer adıyla “Comet Assay” tekniği hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak ve miktarını belirlemek için uygulanır non-invaziv, hızlı ve hassas bir floresan mikroskopik yöntemdir. Yaşlanma, moleküler epidemiyoloji, klinik ve genetik toksikoloji alanların da önemli uygulamaları olan “Comet Assay” son yıllarda giderek artan bir sıklıkta apoptoz, oksidatif stres-antioksidan çalışmalarında da yer almıştır (71).

Bu çalışmada tek hücre jel elektroforez tekniği kullanarak hem infertilitenin hem de sigara kullanımının sperm DNA’sında kırık oluşması üzerinde oldukça etkili olduğunu bulduk. Çalışmamızı destekler nitelikte olan önceki yıllara ait çok sayıda araştırma da bulunmaktadır (133).

Comet analizini 3 gruba ayırarak değerlendirdik. Hiç kuyruk oluşturmayanlar (0. grup), orta uzunlukta kuyruk oluşturanlar (1. grup) ve çok uzun kuyruk oluşturanları (2. grup). 0. grup değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4-18). İkili kıyaslamalarda 2. grup 1. gruba göre ($p=0,002$), 3. grup 1. gruba göre ($p<0,001$), 4. grup 1. gruba göre ($p<0,001$), 4. grup 2. gruba göre ($p=0,001$) anlamlı olarak yüksek bulundu. 2. grup değişkeni dört grup arasında Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre gruplar arasında çok ileri düzeyde anlamlı olarak fark bulundu ($p<0,001$) (Şekil 4-19). İkili kıyaslamalarda 1. grup 2. gruba göre ($p=0,008$), 1. grup 3. gruba göre ($p<0,001$), 1. grup 4. gruba göre ($p<0,001$), 2. grup 4. gruba göre ($p=0,002$) anlamlı olarak yüksek

bulundu. Bu testin sonucuna göre de infertilite sigara kullanımı ile birleştğinde DNA’da hasar oranı artmaktadır.

Bütün bulguları değerlendirdiğimizde hem infertilite problemi olan hem de sigara içen erkeklerde fertil olan ve sigara içmeyen gruba göre; sperm morfoloji ve sayı kriterlerinde kötü olduğu, sperm DNA’sının paketlenmesinde daha çok soruna sahip olduğu yine sperm DNA’sında daha fazla oranda kırığa sahip olduğu ve son olarak apoptoz ve ya nekroz yoluna giren sperm sayısının daha fazla olduğu istatistiksel olarak bulunmuştur.

Sperm morfoloji ve sayı kriterleri halen tüm IVF laboratuvarlarında rutin tanı olarak kullanılmaktadır. Yapılan bu çalışma ile görülmüştür ki hem sperm sayısı hem de sperm morfolojisi infertil erkeklerde sigara içimi ile birleşince yüksek derecede olumsuz etki yaratmaktadır.

Sonuç olarak sperm kaynaklı infertilite sorunlarının daha net anlaşılması için yardımla üreme tekniklerinde uygulanan rutin analizlerin yanı sıra yapılan ultrayapısal çalışmaların infertilite problemi ile ilgili tedavi gelişimine, sorunun kaynağının anlaşılmasına kolaylık ve katkı sağlayabileceği yönünde düşüncemizi desteklemektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi Pg, Bianchi U Origin of DNA Damage In Ejaculated Human Spermatozoa. Rev Reprod. 1999 Jan;4(1):31-7.
- 2- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi Gc, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature Of DNA Damage In Ejaculated Human Spermatozoa And The Possible Involvement Of Apoptozis. Biol Reprod. 2002 Apr;66(4):1061-7.
- 3- Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine Blue Cytometry Test For Sperm Dna Conformation: Comparison With The Flow Cytometric Sperm Chromatin Structure And Tunel Assays. Hum Reprod. 2004 Oct;19(10):2277-82. Epub 2004 Jul 22.
- 4- Evenson Dp, Jost Lk, Marshall D, Zinaman Mj, Clegg E, Purvis K, De Angelis P, Claussen Op. Utility Of The Sperm Chromatin Structure Assay As A Diagnostic And Prognostic Tool In The Human Fertility Clinic. Hum Reprod. 1999 Apr;14(4):1039-49.
- 5- Lopes S, Sun Jg, Jurisicova A, Meriano J, Casper Rf. Sperm Deoxyribonucleic Acid Fragmentation Is Increased In Poor-Quality Semen Samples And Correlates With Failed Fertilization In Intracytoplasmic Sperm Injection. Fertil Steril. 1998 Mar;69(3):528-32.
- 6- Alaa Hamada, Sandro Esteves And Ashok Agarwal. Unexplained Male Infertility – Looking Beyond Routine Semen Analysis. European Urological Review, 2012;7(1):90–6
- 7- Roxani Angelopoulou, Konstantina Plastira And Pavlos Msaouel. Spermatozoal Sensetive Biomarkers To Defective Protaminosis And Fragmented DNA. Reproductive Biology And Endocrinology 2007, 5:36.
- 8- Elisabetta Tosti1 And Adriana Fortunato. Is Sperm Chromatin Packaging Relevant For IVF Success? Tosti And Fortunato, J Fertiliz In Vitro 2011, 1:2.
- 9- Bremner I. Symposium on metal toxicites. Proc. Nutr. Soc. 38:235, 1979.
- 10- Klatzo I, Wisniewski HM, Streicher E. Experimental Production of Neurofibrillary Degeneration. J Neuropath Exp Neur. 1965; 24 : 187-99.
- 11- Kumar ve ark. (2005) Semen quality of industrial workers occupationally exposed to chromium.

- 12- Yen & Jaffe Üreme Endokrinolojisi Fizyoloji, Patofizyoloji ve Klinik Muayene Strauss Barbieri Çeviri Editörü Prof. Dr. Serdar Günalp Güneş Kitabevi.
- 13- Doç. Dr. Kadriye Akgün Dar Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Ders Notları
- 14- Ross H.M, Kaye G, Pawlina W. Histology, a text and atlas, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 2003, 690-96.
- 15- Abraham L, Kierszenbaum Histology and Cell Biology, 2th edition. Mosby. 2002;529-550.
- 16- Gartner LP, Hiatt JL: Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W.B.Saunders Company, 1997; 493-98.
- 17- Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. Mol Reprod Dev 2001;58(4):357-8.
- 18- Huszar G and Vigue L. Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. Mol Reprod Dev.1990;25:258-62.
- 19- <http://www.androloji.info>
- 20- WHO : World Health Organization Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Sperm-Cervical Mucus İntraction. 4th Ed. New York: Cambridge University Press: Cambridge.1999.
- 21- Ford WC. World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. 2010;56-63.
- 22- Clinical Atlas of Sperm Morphology Acyhut M. Phadke Kitap
- 23- Dynamics of the Mammalian Sperm Head Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology Volume 204, 2009, pp 45-51
- 24- Molecular Biology of The Cell
- 25- "Men's Health - Male Factor Infertility". University of Utah Health Sciences Center. 2003-04-01. Archived from the original on 2007-07-04. Retrieved 2007-11-21.
- 26- Brugh VM, Lipshultz LI (2004). "Male factor infertility". Medical Clinics of North America88 (2): 367–85.
- 27- Hirsh A (2003). "Male subfertility". BMJ 327 (7416): 669–72.
- 28- Jégou B, Pineau C, Toppari J. Spermatogenesis in vitro in mammals. In Assisted Reproductive Technology. Jonge CD, Barratt CLR, eds. Cambridge University Press: Cambridge 2002;3-25.

- 29- WHO; Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple.1993; P: 7, Cambridge University Press.
- 30- The ESHRE Capri Workshop. Guidelines to prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility. 1996. Milan: Oxford University Press.
- 31- Anthony V Hirsh. The investigation and therapeutic options for infertile men presenting in assisted conception units. In: In vitro fertilization and assisted reproduction: the Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice. Second ed, Brinsden PR, ed. New York: Parthenon Publishing. 1999;27-52.
- 32- Horak S, Polanska J, Widlak P. Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. *Mutat Res Gen Tox En* 2003; 537: 53-65
- 33- Susan M Duty, Narendra P Singh, Manori J Silva, Dana B Barr, John W Brock, Louise Ryan, Robert F Herrick, David C Christiani, and Russ Hauser The relationship between environmental exposures to phtalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay *Environ Health Perspect*. 2003 July; 111(9): 1164–1169. Research Article
- 34- Narendra P Singh, Charles H Muller, Richard E Berger, Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm *Volume 80, Issue 6, December 2003, Pages 1420–1430*
- 35- Sperm DNA Bridges from Sperm to Egg to Inculcate Genetic Variability: A Review S. Mishra and S. Nanda *Asian Journal of Biotechnology* 3 (1): 22-37, 2011
- 36- Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, et al. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology* 2004; 61: 1661-1673.
- 37- Leopardi P, Villani P, Cordelli E, et al. Assesment of the in vivo genotoxicity of vanadate: Analysis of micronuclei on DNA damage induced in mice by oral exposure. *Toxicol Lett* 2005; 158:39-49.
- 38- Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, et al. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res-Fund Mol M* 1999; 423: 103-111.
- 39- Sakkas D. Moffat O. Nature of dna damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. *Biol reprod*. 2002;66:1061-67
- 40- Sakkas D, Mariethoz E., Manicardi G, Bizzaro D, ve ark. Origin of dna damage in ejaculated human spermatozoa.*Rev Reprod*.1999; 4:31-37.

- 41- Aitken R.J.,Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Biol reprod 2001;122:497–506.
- 42- Saleh R A., Agarwal A. Oxidative Stress And Male Infertility :From Research Bench To Clinical Practice- Review. J Androl, 2002. 23,No.6.
- 43- Agarwal A, Said TM.. Role of sperm chromatin abnormalities and dna damage in male infertility. Hum Reprod Upd. 2003;9:331-34
- 44- Oxford JournalsMedicineHuman ReproductionVolume 20, Issue 12Pp. 3446-3451. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility M. Sergerie, G. Laforest, L. Bujan, F. Bissonnette and G. Bleau
- 45- Sakkas D, Mariethoz E., Manicardi G, Bizzaro D, ve ark. Origin of dna damage in ejaculated human spermatozoa.Rev Reprod.1999; 4:31-37.
- 46- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, And Darzynkiewicz, Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to degeneration in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells.; Exp. Cell Res.1993;207: 202-205
- 47- Oxidative stress & male infertility Kartikeya Makker, Ashok Agarwal & Rakesh Sharma Indian J Med Res 129, April 2009, pp 357-367
- 48- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF.Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 1998; 69(3):528-32.
- 49- Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction Armand Zini, Jamie Libman CMAJ August 29, 2006 vol. 175 no. 5 doi: 10.1503/cmaj.060218
- 50- Sharma R.K., Said T., Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome Asian J Androl. 2004;6:139-48.
- 51- Clinical implications of sperm dna damage.Lewis SE, Simon L. hum fertil (camb). 2010 dec;13(4):201-7.
- 52- Sinha Hikim A P, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X-H. Swerdloff R S. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. J Clin Endoc and Metab, 83: 152,1998.
- 53- Sharpe R M: Regulation of spermatogenesis. in The Physiology of Reproduction. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven Press. New York, pp: 1364-1434, 1994.

- 54- Beumer T L, Roepers L H, Gademan S U, Lock M T W, Tycho KB, Kal H B, Rooij D G. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development*. 56: 353-359, 2000.
- 55- Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol*. 86: 598-606, 2000.
- 56- Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of celi types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 95: 825-830, 1992.
- 57- Hsueh A J W, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal Cell Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research*. 51: 432-457, 1996.
- 58- Ayaşhoğlu E. Apoptoz. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi*. 21: 57-62, 2001.
- 59- Hikim S, Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff R S. Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. 57: 136-141, 2000.
- 60- Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassali P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J*, 24: 2262-2270, 1997.
- 61- Wyllie A H. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*, 53: 451-465, 1997.
- 62- Davis J R, Firlit C F. The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril*. 17: 187-200, 1986.
- 63- Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Celi Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Celi Survival. *Pediatric Research*. 40: 351-356, 1996.
- 64- Ikeda M, Kodama H, Fukuda J. Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ celi apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr*. 61:393-399, 1999.
- 65- Tapanainen J S, Tilly J L, Vihko K K, Hsueh A J W. Hormonal control of apoptotic celi death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular celi survival factors. *Mol Endocrinol*, 7: 643-650, 1993
- 66- Yin Y, Hawkins K L, Devvolf W C, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ celi apoptosis in adult mice. *J Androl*. 18: 159-165, 1997

- 67- Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl*. 19:487-497, 1998.
- 68- Kerr JFR, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-245, 1972.
- 69- Cohen J J. Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol Today*. 14:126-130, 1993.
- 70- Korsmeyer S J. Regulators of cell death. *Reviews*. 11: 101-105.
- 71- Haines GA, Hendry JH, Daniel CP, Morris ID Germ Cell and Dose-Dependent DNA Damage Measured by the Comet Assay in Murine Spermatozoa after Testicular X-Irradiation. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 67, 854–861 (2002).
- 72- Dincer Y, Kankaya S. DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010;30(4):1365-73.
- 73- Kesim MD. Sigara ve Gebelik. *Sisli Etfal Hastanesi Tıp Bülteni*. 2004;38(2),7-14.
- 74- The Practice Committee of the American Society for Reproductive medicine: American Society for Reproductive medicine, Birmingham, Alabama. *Fertil Steril* 2004;82:62-67.
- 75- Fıçıcıoğlu C, Devranoglu B, Özden S, Yaltı S, Gürbüz B, Erkanlı G. Sigara içiminin semen kalitesi üzerine etkisi. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*. 2002;4:48-52.
- 76- Golding JF.: Smoking. In: Brewis RAL, Gibson GJ, Geddes DM. *Respiratory Medicine*. London. WB Saunders Company, 1990: 445-460.
- 77- Janoff A, Pryor WA, Bengali ZH.: Effects of Tobacco smoke components on cellular and biochemical processes in the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 136: 1058-1064.
- 78- Peksen Y. Sigara içiminin nedenleri, epidemiyolojisi, pasif içicilik. In: Tür A (ed). *Sigaranın sağlığa etkileri ve bırakma yöntemleri*. Logos 1995;1-28.
- 79- Augood C, Duckitt K, Templeton AA. Smoking and female infertility: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 1998; 13: 1532-1539.
- 80- Hull M, North k, Taylor H, Farrow A, Ford CNC, Delayed conception and active and passive smoking. *Fertil Steril* 2000; 74: 725-733.
- 81- Mumcu G: Sigaranın fertilité ve gebelik üzerine etkileri. Özyardımcı N, editor. *Sigara ve sağlık*, Bursa 2002; 257-280.

- 82- Carroll EW. Cellular adaptation, injury and death and wound healing. Stead. Pathophysiology. Lippincott, Philadelphia, 1998; 39.
- 83- Elenbogen A, Lipitz S, Mashiach S. The effect of smoking on the outcome of in vitro fertilization embryo transfer. Hum Reprod 1991;6:242-244.
- 84- Shara F Beatse S, Leonardi M. Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidence by the clomiphene citrate challenge test. Fertil Steril 1994; 62:257-262.
- 85- Cruch DF., Prior W.A, Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicologic implications. Environ Health Perspect 1985; 64,111-126.
- 86- Gürdöl ve Ademoğlu (1991 p.624) Biyokimya
- 87- Cavallo F, Gerber M, Marubini E, et al. Zinc and copper in breast cancer, a joint study in northern Italy and Southern France. Cancer 67:738-745, 1991.
- 88- Wai Yee Wong, Gert Flik, Pascal M.W. Groenen, Dorine W. Swinkels, Chris M.G. Thomas, Jenny H.J. Copius-Peereboom, Hans M.W.M. Merkus, Re'gine P.M. Steegers-Theunissen. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. Reproductive Toxicology 15 (2001) 131–136.
- 89- Harold HS. Current concepts on trace minerals. Med. Clin. Of North Amer. Vol:54, 1970.
- 90- Stanwell-Smith R, Thompson SG, Haines AP, Ward RJ, Cashmore G, Stedronska J, Hendry WF. A comparative study of zinc, copper, cadmium, and lead levels in fertile and infertile men. Fertil Steril. 1983 Nov;40(5):670-7.
- 91- Umeyama T, Ishikawa H, Takeshima H, Yoshii S, Koiso K, A comparative study of seminal trace elements in fertile and infertile men. Fertil Steril. 1986 Sep;46(3):494-9.
- 92- Aydın ŞN. Mineraloji-Petrografi-Jeokimya ve İnsan Sağlığı Arasındaki Bağlıntılar. Jeoloji Mühendisliği, 1989; 34-35: 18-27.
- 93- Trachtenbarg DE. Tedavi Ne Zaman Gereklidir? Kurşunun Atılması. Sendrom, 1996; 9: 70-76.
- 94- Alexander BH, Checkeoway H, Netten CV, Muller CH, Ewers TG, Kaufman JD, et al. Semen quality of men employed at lead smelter. Occup Environ Med 1996;53:411-6.
- 95- Cadmium, Lead, and Other Metals in Relation to Semen Quality: Human Evidence for Molybdenum as a Male Reproductive Toxicant John D. Meeker, Mary G.

Rossano, Bridget Protas, Michael P. Diamond, Elizabeth Puscheck, Douglas Daly, Nigel Paneth, and Julia J. Wirth. *Environ Health Perspect.* 2008 November; 116(11): 1473–1479. Published online 2008 July 1. doi: 10.1289/ehp.11490.

96- Kaiser R, Henderson AK, Daley WR et al. Blood lead levels of primary school children in Dhaka, Bangladesh. *Environ Health Perspect.* 2001; 109(6): 563-566.

97- Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. S Telisman, P Cvitković, J Jurasović, A Pizent, M Gavella, and B Rocić. *Environ Health Perspect.* 2000 January; 108(1): 45–53.

98- M. Cempel, G. Nikel. Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. *Polish J. of Environ. Stud.* Vol. 15, No. 3 (2006), 375-382.

99- Kazimierz S Kasprzak, F.William Sunderman Jr. Jr., Konstantin Salnikow. Nickel Carcinogenesis. *Mutation Research* 533 (2003) 67–97.

100- Carcinogenesis vol.20 no.5 pp.893–898, 1999 Effects of Ni(II) and Cu(II) on DNA interaction with the N-terminal sequence of human protamine P2: enhancement of binding and mediation of oxidative DNA strand scission and base damage Rongti Liang, Sema Senturker, Xianglin Shi, Wojciech Bal, Miral Dizdaroglu, Kazimierz S.Kasprzak.

101- Bharathi, Vasudevaraju P, Govindaraju M, et al. Molecular Toxicity of Aluminium in Relation to Neurodegeneration. *Indian J Med Res* 2008; 128 :545-556.

102- Oğuz EO, Yüksel H, Enli H ve diğerleri. Alüminyum Sülfatın "Ross" Cinsi Term Besi Cıvı Karaciğerinde Yarattığı Toksik ve İnflamatuvar Hasar. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.* 2008; 61(1).

103- Kutlubay R, Oğuz EO, Can B, et al. Vitamin E Protection from Testicular Damage Caused by Intraperitoneal Aluminium. *Int J Toxicol.* 2007; 26(4): 297-306.

104- Kutlubay R, Oğuz EO, Güven C, et al. Histological and Ultrastructural Evidence for Protective Effects on Aluminium-Induced Kidney Damage by İntraperitoneal Administration of Alpha-Tocopherol. *Int J Toxicol.* 2007; 26(2): 95-101.

105- http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1194947362170

106- The influence of occupational exposure on male reproductive function Tina Kold Jensen¹, Jens Peter Bonde² and Michael Joffe³ *Oxford Journals Medicine Occupational Medicine* Volume 56, Issue 8 Pp. 544-553.

107- Battersby S, Chandler JA, Morton MS: Toxicity and uptake of heavy metals by human spermatozoa. *Fertil Steril* 1982, 2:230-235.

- 108- Kruczynski D, Passia D: Distribution of heavy metals in human ejaculate—a histochemical study. *Acta Histochem* 1986, 2:187–192.
- 109- Anderson JG, Cooney PT, Erikson KM: Inhibition of DAT function attenuates manganese accumulation in the globus pallidus. *Environ Toxicol Pharmacol* 2007, 2:179–184.
- 110- Elbetieha A, Bataineh H, Darmani H, et al: Effects of long term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. *Toxicol letters* 2001, 119:193–201.
- 111- Effects of manganese on routine semen quality parameters: results from a population-based study in China. Yuyan Li, Junqing Wu, Weijin Zhou and Ersheng Gao Li et al. *BMC Public Health* 2012, 12:919.
- 112- Chandra AK, Ghosh R, Chatterjee A, Sarkar M. *Toxicol Mech Methods*. Protection against vanadium-induced testicular toxicity by testosterone propionate in rats. 2010 Jul;20(6):306-15.
- 113- http://icpmslab.mersin.edu.tr/icp_ms_nedir.php
- 114- Moska N, Murray E, Wakefield P, Matson P. The staining pattern of human sperm with Diff Quik: relationship with sperm head morphology and a sperm chromatin structure assay (SCSA) *Reproductive Biology* 2011 11 1: 55–59.
- 115- Jameel T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. *JPMMA* 58:71;2008.
- 116- Salsabili N, Mehraei A, Jalalizadeh B, Pourmand G, Jalaie S. Correlation of Sperm Nuclear Chromatin Condensation Staining Method with Semen Parameters and Sperm Functional Tests in Patients with Spinal Cord Injury, Varicocele, and Idiopathic Infertility. *Urol J*. 2006 Winter;3(1):32-7.
- 117- Shete SA, Hulke SM, Thakare A, Patil P. Study of reduced glutathione in seminal plasma and spermatozoa nuclear chromatin decondensation test (NCDT) in human subjects with different fertility potential. *Int J Biol Med Res*. 2012; 3(2): 1636-1639.
- 118- <http://biyokimya.uludag.edu.tr>
- 119- <http://www.kaanaydos.net>
- 120- Lipitz S, Bartoov B, Rajuan C, Reichart M, Kedem P, Mashiach S, Dor J. Sperm head ultramorphology and chromatin stability of males with unexplained infertility who fail to fertilize normal human ova in vitro. *Andrologia*. 1992 Sep-Oct;24(5):261-9.

- 121- Siddighi S, Wc Patton, Jd Jacobson, A. King, Pj Chan Correlation of sperm parameters with apoptosis assessed by dual fluorescence DNA integrity assay Archives of Andrology, 2004; 50:311–314.
- 122- Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates Fertil Steril. 2005; 84,1:130-40.
- 123- Piomboni P, Bruni E, Capitani S, Gambera L, Moretti E, La Marca A, De Leo V, Baccetti B. Ultrastructural and dna fragmentation analyses in swim-up selected human sperm Arch Androl. 2006;52:51–59.
- 124- Smith, D.C., Barratt, C.L.R. and Williams, M.A. The characterisation of nonsperm cells in the ejaculates of fertile men using transmission electron microscopy. Andrologia, 1989; 21, 319-333.
- 125- Muratori, M., Piomboni, P., Baldi, E., Filimberti, E., Pecchioli, P., Moretti, E., Gambera, L., Baccetti, B., Biagiotti, R., Forti, G. and Maggi, M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. Journal of Andrology, 2000; 21, 903-912.
- 126- Baccetti, B., Collodel, G. and Piomboni, P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. Journal of Submicroscopy, Cytology and Pathology, 1996; 28, 587-596.
- 127- Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, Singh NP. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. J Androl. 2006 Jan-Feb;27(1):112-20.
- 128- Zhou NY, Cao J, Cui ZH, Han X, Cai M, Bao HQ, Li YF, He JL. [Effects of smoking on sperm apoptosis and semen quality of adult males in the main urban area of Chongqing]. Zhonghua Nan Ke Xue. 2009 Aug;15(8):685-8.
- 129- Hughes, C.M., Lewis, S.E.M., McKelvey-Martin, V.J. and Thompson, W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human sperm from fertile and infertile man, using a modified comet assay. Mol. Hum. Reprod., 1996; 2, 613–619.
- 130- McVicar CM, McClure N, Williamson K, Dalzell LH, Lewis SE. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. Fertil Steril. 2004; 81,1, 767 -774.
- 131- Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewis SE. Sperm DNA damage has a negative association with live-birth rates after IVF. Reprod Biomed Online. 2013 Jan;26(1):68-78.

132- Mohamed EE, Mohamed MA. Effect of sperm chromatin condensation on the outcome of intrauterine insemination in patients with male factor infertility. *J Reprod Med.* 2012 Sep-Oct;57(9-10):421-6.

133- Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar M, Singh G, Mukherjee S, Malhotra N, Kumar R, Gupta NP, Mittal S, Dada R. Comet assay: a prognostic tool for DNA integrity assessment in infertile men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res.* 2010 May;131:675-81.

ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☐		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama			
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐				
	SIGORTA	☐				
	ARAŞTIRMA BUTÇESİ	☒				
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐				
	ILAN	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐				
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:01	Tarih: 13/01/2012				
	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında görevli Doç.Dr. Işıl ALBENİZ 'in sorumluluğunda ve Yüksek Lisans Öğrencisi Pınar ALTINER'in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik								
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN								
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi *		Katılım **		İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Prof. Dr. Rukiye EKER ÖMEROĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	KATILMAI	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Prof. Dr. Pınar SAİP	Onkoloji	I.Ü. Onkoloji Enstitüsü	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Dr. Muhtar ÇOKAR	Deontolog	İstanbul İnsan Kaynağını geliştirme Vakfı	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Prof.Dr. Ayşen BULUT	Halk Sağlığı	Emekli	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Doç.Dr. Tufan TÜKEK	İç Hastalıkları	Okmeydanı Eğitim ve Araş.Hast.İç Hast.1.Dahiliye Kliniği	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Prof. Dr. Ünal KUZGUN	Ortopedi	Emekli	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Prof. Dr. Ahmet O. ARAMAN	Eczacılık	I.Ü. Eczacılık Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK	Hukukçu	İstanbul Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Prof. Dr. Demir TIRYAKI	Biyofizik	Emekli	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
vl. Kerim AKMAN	İİBF İktisat bölümü	Özel (Ekonomist)	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		
Dr. Sevdâ ÖZEL	Biyostatistik	I.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐		

* :Araştırma ile ilişkisi
 ** :Toplantıda Bulunma

Bu karar araştırma projesinin etik açıdan değerlendirme sonucunu bildirmektedir. Klinik ilaç araştırması projeleri için, etik kurulu onayı sonrasında, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 5/a. maddesi gereğince, Sağlık Bakanlığına da başvurulması ve gerekli izin alınması gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Pınar	Soyadı	Altın
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	29.05.1988
Uyruğu	Türk	TC Kim No	38563040874
Email	pınaraltın@yahoo.com	Tel	0505 911 93 47

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik ABD	2013
Lisans	İstanbul Üniversitesi	2010
Lise	Özel İstanbul Ar-El Lisesi	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
.			-
.			-
.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Çok iyi	İyi	63.75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	73.876	77.139	79.398
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	İyi
Excel	İyi
Powerpoint	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Davul çalmak, seyahat etmek, kayak yapmak, yemek yapmak.