

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİMDALI



**FARKLI SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN DNA
HASARI OLUŞTURMA ORANLARI VE ÇEVRESEL
FAKTÖRLERİN BU ORAN ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nursel HASANOĞLU AKBULUT

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY

BALIKESİR-2017

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN DNA
HASARI OLUŞTURMA ORANLARI VE ÇEVRESEL
FAKTÖRLERİN BU ORAN ÜZERİNE ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nursel HASANOĞLU AKBULUT

TEZ SINAV JÜRİSİ

**Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU
Uludağ Üniversitesi
Başkan**

**Prof. Dr. Mehmet Faruk AYDIN
Balıkesir Üniversitesi
Üye**

**Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY
Balıkesir Üniversitesi
Üye**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY**

Bu araştırma; Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2017/066 nolu proje ile desteklenmiştir.

BALIKESİR-2017



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KABUL VE ONAY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan
“FARKLI SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN DNA HASARI OLUŞTURMA ORANLARI VE ÇEVRESEL FAKTÖRLERİN BU ORAN ÜZERİNE ETKİLERİ” başlıklı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14 / 08 / 2017

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU
Uludağ Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Mehmet Faruk AYDIN
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY
Balıkesir Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi, sınav jüri komisyonu tarafından imzalanarak ~~18. / 08. / 2017~~ tarihinde teslim edilmiştir.

Prof. Dr. Özlem YAVUZ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından ve yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim (24/07/2017).

Nursel HASANOĞLU AKBULUT



TEŐEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen danıŐman hocam Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY' a, tezin istatistiksel çalıŐmalarına olan katkısından dolayı Doç. Dr. Mesut SAÇKES' e çalışma sũresince tũm zorlukları benimle gũgũsleyen eŐim Sertan AKBULUT' a, babam İzzet HASANOĞLU'na, annem Dilber HASANOĞLU' na, kardeŐim Tansel HASANOĞLU' na, ve Yũksek lisans çalışmam boyunca her konuda yardım eden laboratuvar çalışma arkadaŐım Elif DURMUŐ' a sonsuz teŐekkũrlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Yapısı.....	3
2.1.1. Seminifer Tübüller.....	4
2.1.2. Leydig Hücreleri.....	8
2.1.3. Kan Testis Bariyeri.....	8
2.2. İntratestiküler Kanallar.....	9
2.2.1. Tubuli Rekti.....	9
2.2.2. Rete Testis.....	9
2.2.3. Duktuli Efferentes.....	10
2.3. Ekstratestiküler Kanallar.....	10
2.3.1. Duktus Epididimis.....	10
2.3.2. Duktus (Vas) Deferens.....	11
2.3.3. Duktus Ejakulatoryus.....	11
2.4. Yardımcı Üreme Bezler.....	11
2.4.1. Seminal Vezikül.....	11
2.4.2. Prostat.....	12
2.4.3. Bulboüretal Bez.....	12
2.5. Penis.....	13
2.6. Spermatogenez ve Hormonal Kontrolü.....	13
2.6.1. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü.....	13
2.6.2. Spermatogenez.....	15

2.6.3. Spermiyogenez.....	16
2.6.4. Sperm Hücresi.....	17
2.7. Semen Analizi.....	19
2.7.1. Semen Toplanması.....	20
2.7.2. Makroskopik İnceleme.....	21
2.7.3. Mikroskopik İnceleme.....	23
2.7.4. Normal Sperm Morfolojisinin Sınıflandırılması.....	29
2.7.5. Anormal Sperm Morfolojisinin Sınıflandırılması.....	30
2.7.6. Teratozoospermi İndeksi (TZI).....	37
2.8. Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	38
2.8.1. Basit Yıkama Yöntemi.....	39
2.8.2. Swim-up Yöntemi.....	40
2.8.3. Swim-down Yöntemi.....	41
2.8.4. Migrasyon-Sedimentasyon Yöntemi.....	42
2.8.5. Dansite Gradyent Yöntemi.....	43
2.8.6. Cam Yünü Filtrasyon Yöntemi.....	44
2.8.7. Cam Boncuk Yöntemi.....	45
2.8.8. Sephadex Yöntemi.....	46
2.9. Sperm DNA yapısı.....	46
2.10. Sperm DNA Hasarı.....	47
2.11. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri.....	50
2.11.1. Sperm Kromatin Yapısı Tayini (SCSA).....	50
2.11.2. TdT-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL).....	51
2.11.3. Akridin Turuncusu Yöntemi (AOT).....	51
2.11.4. Anilin Mavisi (AB).....	51
2.11.5. Toluidin Mavisi (TB).....	52
2.11.6. Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET).....	53
2.11.7. Sperm Kromatin Ayırma Testi (HoloSperm, SCD).....	54
2.12. İnfertilite.....	54

2.13. Çevresel Faktörler ve İnfertilite.....	56
2.14. Sigara Kullanımı ve Erkek İnfertilitesi.....	57
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	60
3.1. Hasta Seçimi.....	60
3.2. Semen Örneklerinin Eldesi.....	60
3.3. Hasta Grupları.....	61
3.4. Semen Örneklerine Uygulanan İncelemeler ve İşlemler.....	61
3.4.1. Spermiyogram Testi.....	61
3.4.2. Dansite Gradyent Yöntemi ile Sperm Eldesi.....	62
3.4.3. Swim-up Yöntemi ile Sperm Eldesi.....	63
3.4.4. Spermilerin Morfolojik Değerlendirilmesi.....	63
3.4.5. Toluidin Mavisı Testi.....	65
3.5. Değerlendirme ve İstatistiksel Analiz.....	67
4. BULGULAR.....	68
4.1. Semen Analizi Bulguları.....	68
4.2. Morfoloji Bulguları.....	70
4.3. DNA Hasarı Bulguları.....	76
4.4. Diff-Quik Boyama Görüntüleri.....	79
4.5. Toluidin Mavisı Boyama Görüntüleri.....	81
5. TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
KAYNAKLAR.....	92
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	117
EK-2. ETİK KURUL ONAY RAPORU.....	118
EK-3. ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU.....	119
EK-4. ANKET.....	123

ÖZET

Farklı Sperm Hazırlama Yöntemlerinin DNA Hasarı Oluşturma Oranları ve Çevresel Faktörlerin Bu Oran Üzerine Etkileri

Üremeye Yardımcı Tedavilerden (ÜYTE), İntra Uterin İnseminasyon (IUI) erkek faktörlü infertilitenin tedavisinde olumlu sonuçlar alınmasını sağlamaktadır. Ancak ÜYTE' de yapılan sperm ayırma yöntemleri normal morfolojiye sahip sperm sayısını arttırmasına rağmen, diğer ölü, anormal spermelerin tamamını ve DNA hasarlı spermelerin hepsini ortadan kaldırmaz. Erkeğe bağlı infertilitede bireyin maruz kaldığı çevresel koşullar göz önüne alınmalıdır. Uzun yıllardan beri sigaranın erkek üreme sistemi üzerine etkisi araştırılmasına rağmen hala kesin sonuç elde edilememiştir. Bu tez çalışmasında farklı sperm hazırlama yöntemlerinin semen parametreleri, sperm morfolojisi ve spermde DNA hasarı üzerine etkilerinin sigara kullanımına bağlı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Androloji Laboratuvarına rutin spermiyogram testi için başvuran 40 adet gönüllü hasta yapılan anket sonucunda sigara içen ve içmeyen olarak gruplara ayrıldı. Hem yıkama işlemi öncesinde hem de dansite gradient ve swim-up yöntemleri sonrasında sperm konsantrasyonu, hareketliliği, morfolojisi ve DNA hasarı incelendi. Yıkama öncesinde baş anomali ve kuyruk anomali yüzdesi sigara içenlerde, normal sperm yüzdesi ise sigara içmeyenler fazla bulundu ($p<0,05$). Sperm ayırma tekniklerinden swim-up ve dansite gradient uygulanan gruplarda swim-up sonrası sigara içmeyen grupta progresif hareketli sperm yüzdesi daha fazla bulundu ($p=0.019$).

Sperm DNA hasarı tespiti için toluidin mavisi boyaması yapıldı. Sigara içen ve içmeyen hastalarda DNA hasarı yüzdeleri karşılaştırıldı, yıkama öncesi ve yıkama sonrasında gruplar arasında DNA hasarı yönünden önemli bir fark olmadığı bulundu. ($p>0,05$).

Sonuç olarak, daha kesin ve güvenilir bulgu ve sonuçlar elde etmek için popülasyon bazında veya örnek sayısı fazla hasta grupları tercih edilmelidir. Bunun yanında sigara kullanım düzeyleri veya sigara dumanına maruz kalma koşulları ayrıntılı olarak incelenmelidir.

Anahtar Kelimeler: DNA hasarı, semen analizi, sigara içme, sperm morfolojisi, toluidin mavisi.

ABSTRACT

The Incidence of DNA Damage Resulted From Different Sperm Preparation Methods and The Effects of Environmental Factors on This

Intra Uterine Insemination (IUI), which is an Assisted Reproduction Technique (ART), provides favorable results on the treatment of male factor infertility. But, sperm preparation methods do not totally remove the sperms with abnormalities or DNA damage, despite the fact that they do decrease the ratio of such sperm cells. The environmental factors affecting the men should also be accounted for the male factor infertility. One such factor is cigarette smoking. After long lasting years of research about the effects of cigarette on the male reproductive system and function, the results obtained are still controversial. This study aims to investigate the effects of two different sperm preparation techniques on the semen parameters, sperm morphology and DNA damage, according to the smoking habits of patients.

Forty voluntary male patients applied to the Balikesir University Medical Faculty Hospital Andrology Laboratory for their spermiogram analyses were included to this study. Patients were divided into two equal groups as smokers and non-smokers. Sperm concentration, motility, morphology and DNA damage ratios were analyzed before sperm preparation and after two different sperm preparation methods, namely density gradient and swim-up methods. Before sperm preparation, the ratios of sperm head and tail anomalies were higher in smokers, and the ratio of morphologically normal sperms was higher in non-smokers ($p < 0.05$). The progressively motile sperm ratios after swim-up technique were found to be higher in non-smokers when compared with the smokers ($p = 0.019$).

Toluidine blue staining was used for the detection of sperm DNA damage. No DNA damage difference was found between the smokers and non-smokers both before and after density gradient and swim-up methods ($p > 0.05$).

In conclusion; new studies with larger numbers of subjects are needed for more precise results about the effects of different sperm selection methods and smoking on the sperm DNA damage. Furthermore, smoking degree and conditions should be evaluated in a detailed fashion.

Key Words: Cigarette smoking, DNA damage, semen analyses, sperm morphology, toluidine blue.

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
LH	: Luteinleştirici Hormon
ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
TSH	: Tiroid Uyarıcı Hormon
IUI	: İntrauterin İnseminasyon
ÜYTE	: Üremeye Yardımcı Tedavi
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
OS	: Oksidatif Stres
TZI	: Teratozoospermi İndeksi
BSA	: Sığır Serum Albümini
SCSA	: Sperm Kromatin Yapısı Tayini
AOT	: Akridin Turuncu Testi
AB	: Anilin Mavisi
TB	: Toludin Mavisi
COMET	: Tek Hücre Jel Elektroforezi
SCD	: Sperm Kromatin Ayrılma Testi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
Cd	: Kadmiyum
TUNEL	: TdT-mediated-dUTP nick end labeling

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. İnsan Testis ve Epididimis Yapısı.....	4
Şekil 2.2. Seminifer Tübül Kesiti ve Leydig Hücreleri.....	5
Şekil 2.3. Seminifer Tübüllerde Germinal Epitel Kesit Görünümü.....	6
Şekil 2.4. Hipotalamo Hipofizer Gonadal Eksen ve Hormonal Feedback Mekanizmasının Şematik Çizimi.....	14
Şekil 2.5. Sperm Hücresi Şematik Çizim.....	18
Şekil 2.6. Sperm Aglutinasyon Dereceleri Gösterimi	27
Şekil 2.7. Normal Sperm Morfolojisi Şematik Çizim.....	29
Şekil 2.8. Normal Sperm Görüntüsü.....	30
Şekil 2.9. Makrosefalik Baş Defekti.....	30
Şekil 2.10. Yuvarlak Baş Defekti.....	31
Şekil 2.11. Amorf Baş Defekti	31
Şekil 2.12. Düzensiz Yüzeyli Baş Defekti.....	31
Şekil 2.13. Konik Baş Defekti.....	32
Şekil 2.14. Büyük Akrozomlu Baş Defekti.....	32
Şekil 2.15. Küçük Akrozomlu Baş Defekti.....	32
Şekil 2.16. Vakuollü Baş Defekti.....	33
Şekil 2.17. Bükülmüş Orta Parça Defekti.....	33
Şekil 2.18. Kalın Orta Parça Defekti.....	34
Şekil 2.19. Düzensiz Orta Parça Defekti.....	34
Şekil 2.20. Sitoplazmik Droplet.....	34
Şekil 2.21. Kıvrık Kuyruk Defekti.....	35
Şekil 2.22. Kuyruk Ucu Kıvrık Defekti.....	35
Şekil 2.23. İki Kuyruk Defekti.....	36
Şekil 2.24. Kıvrık Kuyruk Defekti.....	36
Şekil 2.25. Stumped Kuyruk Defekti.....	36
Şekil 2.26. Abaxial Kuyruk Defekti.....	36
Şekil 2.27. Flat Kuyruk Defekti.....	37
Şekil 2.28. Başsız Kuyruk (İğne Baş) Defekti.....	37
Şekil 2.29. Teratozoospermi İndeksi Formülü.....	38
Şekil 2.30. Swim-up Yöntemi	41

Şekil 2.31. Migrasyon-Sedimentasyon Tüpü.....	42
Şekil 2.32. Dansite Gradyent Yöntemi.....	45
Şekil 2.33. Sperm DNA Yapısı.....	47
Şekil 2.34. Sperm DNA Hasarı Temel Mekanizmalar.....	48
Şekil 2.35. İnsan Sperm Hücresinde AOT İle Floresan Mikroskopta Görüntüsü.....	52
Şekil 2.36. İnsan Sperm Hücresinde Toluidin Mavisini Boyanma Görüntüsü.....	53
Şekil 2.37. Sigara Kullanımının Erkek İnfertilisi Üzerine Etkisi.....	57
Şekil 3.1. Makler Sayım Kamarası.....	62
Şekil 4.1. Hasta Gruplarında Yıkama Öncesinde Morfolojik Kriterlerin Karşılaştırılması.....	71
Şekil 4.2. Hasta Gruplarında Yıkama Öncesinde TZI Değerlerin Karşılaştırılması.....	71
Şekil 4.3. Hasta Gruplarında Dansite Gradyent Sonrası Morfolojik Kriterlerin Karşılaştırılması.....	73
Şekil 4.4. Hasta Gruplarında Dansite Gradyent Sonrası TZI Değerlerin Karşılaştırılması.....	73
Şekil 4.5. Hasta Gruplarında Swim-up Sonrası Morfolojik Kriterlerin Karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.6. Hasta Gruplarında Swim-up Sonrası TZI Değerlerin Karşılaştırılması.....	75
Şekil 4.7. Hasta Gruplarında Yıkama Öncesi DNA Hasarı Karşılaştırılması.....	77
Şekil 4.8. Hasta gruplarında Dansite Gradyent Sonrası DNA Hasarı Karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.9. Hasta Gruplarında Swim-up Sonrası DNA Hasarı Karşılaştırılması.....	78
Şekil 4.10. Sigara İçen Hasta Grubuna Ait Spermilerin Diff-Quik İle Boyanma Görüntüsü.....	79
Şekil 4.11. Sigara İçmeyen Hasta Grubuna Ait Spermilerin Diff-Quik İle Boyanma Görüntüsü.....	80
Şekil 4.12. Sigara İçen Hasta Grubuna Ait Spermilerin Toluidin Mavisini İle Boyanma Görüntüsü.....	81
Şekil 4.13. Sigara İçmeyen Hasta Grubuna Ait Spermilerin Toluidin Mavisini İle Boyanma Görüntüsü.....	82

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Semen Parametreleri Eşik Değerleri Karşılaştırması.....	20
Tablo 2.2. Semen Kalitesine İlişkin Terminoloji.....	28
Tablo 4.1. Hasta Gruplarında Yıkama Öncesi Değerlerin Karşılaştırılması.....	68
Tablo 4.2. Hasta Gruplarında Dansite Gradyent ve Swim-up Sonrası Sperm Konsantrasyonu ve Hareketlilik.....	69
Tablo 4.3. Hasta Gruplarında Yıkama Öncesinde Morfolojik Değerlendirme Verileri.....	72
Tablo 4.4. Hasta Gruplarında Dansite Gradyent Sonrası Morfolojik Değerlendirme Verileri.....	74
Tablo 4.5. Hasta Gruplarında Swim-up Sonrası Morfolojik Değerlendirme Verileri	76
Tablo 4.6. Hasta Gruplarında Yıkama Öncesi ve Sonrasında DNA Hasarı Yüzdeleri.....	77

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), çiftlerin en az bir yıl süreyle, korunmasız olarak cinsel ilişkide bulunmasına rağmen gebelik gelişmemesini infertilite olarak tanımlamaktadır. Yaklaşık olarak 4.8 milyon çift korunmasız ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamamaktadır (Martinez ve ark., 2006). İnfertilite problemlerinin % 50' ye yakını erkek faktörlüdür. Son 50 yıl içerisinde semen kalitesinde meydana gelen azalma erkek faktörlü infertilite oranlarının bu düzeyde olmasını açıklamaktadır.

Androloji dalındaki ve yardımcı üreme teknikleri alanındaki gelişmeler, erkek faktörlü infertilitenin tedavisinde etkin yöntemlerin gelişmesini sağlamıştır. Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) metodlarının en eskisi İntrauterin İnseminasyon (IUI)'dur. IUI işlemi sırasında erkeğin verdiği semen örneği içerisinde sağlıklı sperm elde edilir ve eşinin uterusuna bir katater yardımıyla yerleştirilir. IUI için en sık kullanılan sperm seçme teknikleri basit yıkama, swim-up yöntemi, dansite gradiyent santrifüj yöntemidir. Bu yöntemlerin hepsi sağlıklı morfolojiye sahip hareketli sperm seçilebilmesini sağlamaktadır. Ancak elde edilen sperm DNA yapısı ve bütünlüğü hakkında bilgi vermemektedir.

Günümüzde, erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde en fazla kullanılan, en temel ve basit laboratuvar yöntemi rutin semen analizidir. Ancak, infertil erkeklerin yaklaşık % 15' inde semen analiz sonuçları normal olduğundan bu vakalarda fertilitenin kesin tanısı rutin semen analizi ile konulamamaktadır. Dolayısıyla fertil ve infertil erkeği kesin olarak birbirinden ayırmak, gebelik sonuçlarını öngörmek için yeni yaklaşımlara ihtiyaç artmıştır ve dikkatler sperm DNA yapısı üzerine yoğunlaşmıştır.

Son on yıllık süreçte, erkek infertilitesinde sperm nükleer DNA bütünlüğünün rolünü araştıran çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalarda DNA yapısını incelemek için Sperm kromatin yapısı tayini (SCSA), TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end

labeling), Akridin turuncu testi (AOT), Toludin mavisi (TB), Anilin mavisi (AB), Tek hücre jel elektroforezi (COMET), Sperm kromatin ayrılma testi (Halosperm SCD) gibi yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.

Sigara kullanımı, yaşam süresini, solunum fizyolojisini ve kardiyovasküler fizyolojiyi etkileyen sosyal alışkanlıklardan birisidir. Sigaranın bazı mutajenleri ve kanserojenleri içerdiği uzun yıllardan beri bilinmektedir. Yapılan çalışmalar, sigara kullanımının tüm önemli semen parametreleri (sayı, hareket ve morfoloji) üzerine olumsuz etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Buna bağlı olarak TZI değerleri etkilenmiştir (Gaur ve ark., 2007). Ayrıca sigara içenlerde sigarada bulunan karsinojen ve mutajenlerden dolayı DNA hasarı yüksek seviyede bulunmuştur (Potts ve ark., 1999). Diğer yandan yapılan bazı çalışmalarda sigaranın semen parametleri ve erkek üreme sistemi üzerine olumsuz etkisi olmadığı görüşü savunulmaktadır (Holzki ve ark., 1991; Goverde ve ark., 1995).

Bu tez çalışması farklı sperm hazırlama yöntemlerinin DNA bütünlüğü bozulmuş spermleri seçme oranlarını belirlemeyi ve sigara kullanımının bu oran üzerindeki olası etkilerini aydınlatmayı amaçlamıştır. Bu amaçla hastaların semenlerinden semen yıkama işlemi öncesi DNA hasarı görülme sıklığı belirlenecek elde edilen örneklerde iki farklı semen yıkama yöntemi (swim-up ve dansite gradiyent santirfüj) ile sperm seçimi yapıldıktan sonra seçilen spermlerde DNA hasarı görülme sıklığı belirlenecektir. Ayrıca hastalara uygulanan anket formu ile sigara kullanma durumu sorgulanacak ve bu faktöre maruz kalan hastalar ile kalmayanların DNA hasar oranları karşılaştırılacak, bu iki sperm seçme yönteminden birisinin sigara içen hastalarda kullanımının diğerine oranla üstünlüğü olup olmadığı araştırılacaktır.

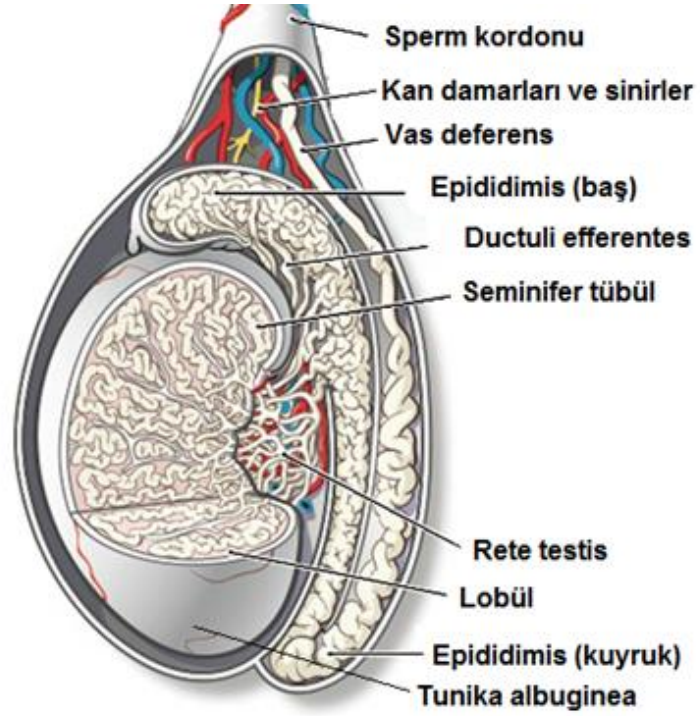
2. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi; sperm üreten ve androjenleri sentezleyip salgılayan testislerden, spermi taşıyan intratestiküler kanallardan (tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes) ve dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu olan ekstratestiküler kanallardan, (epididimis, vas deferens, ejakülatuar kanal ve erkek uretrasının bir parçası), salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoaya besin sağlayan aksesuar bezlerden (seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretal bez) ve erektil dokudan oluşan çiftleşme organı penisten oluşur (Kierszenbaum, 2006).

2.1. Testis Yapısı

Testisler elips şeklinde 4.5-5.1 cm uzunluğunda (Tishler, 1971; Winter ve Faiman, 1972), 2.5x4 cm genişliğinde (Middendorff ve ark., 2002) ve 15-25 ml hacminde organlardır (Prader, 1966). Testisler vücut dışında bulunan tek organ olup skrotum içinde bulunur. Skrotum deri ve fibromusküler yapıdadır. Deri kısmında bulunan kabartılar ile testisi, raphe scroti ile ikiye böler (Sancak ve Cumhuri, 1999). Skrotum içten dışa doğru internal spermatik fasya, kremaster fasya, eksternal spermatik fasya ve dartos kılıfından oluşur. Testisler en dışta tunika vaginalis, ortada tunika albuginea ve en içte tunika vaskülozadan oluşan zarlar ile sarıdır. Visseral ve pariyetal yapraklardan oluşan tunika vaginalisin bu yaprakları arasında, az miktarda seröz sıvı bulunmaktadır. Orta tabaka olan tunika albuginea ise elastik liflerden oluşmaktadır. Testis arka kısmında ise mediastinum testis yapısı bulunmaktadır.

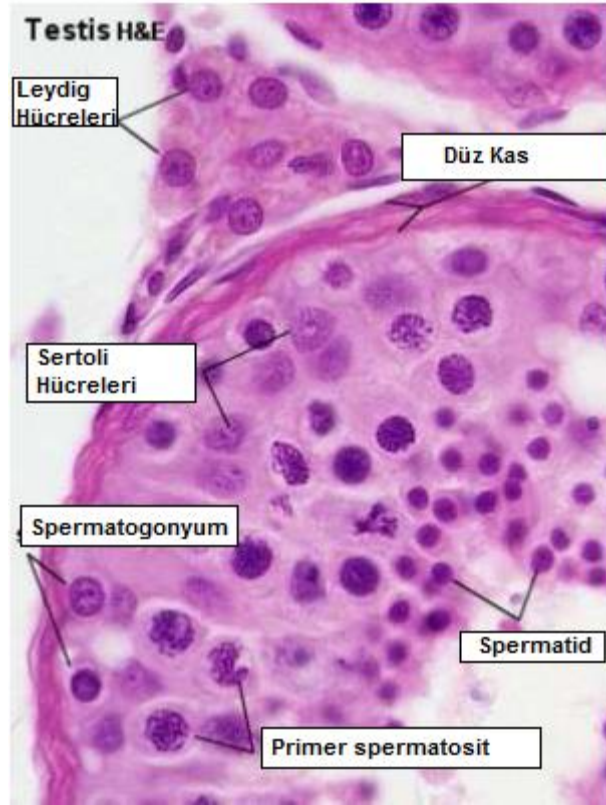
Testislerde spermatogenez vücut sıcaklığından 2-4 °C daha düşük sıcaklıkta gerçekleşir (Agger, 1971). Testisler vas deferense bağlanan epididimis ile ilişkilidir. Testislerin hormon (testosteron) ve erkek gamet hücresi (spermatozoa) oluşturmak gibi iki önemli fonksiyonu bulunmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. İnsan testis ve epididimis yapısı (Sharma ve Agarwal, 2011’ den uyarlanmıştır)

2.1.1. Seminifer Tübüller

Testis hacminin çoğunluğunu oluşturan seminifer tübüller bağ doku içinde sıkıca paketlenmiş biçimde bulunmaktadır. Seminifer tübüller Sertoli ile Spermatogenik hücreleri içeren özelleşmiş bir epitele sahiptir (Şekil 2.2). Spermatogenik hücreler, düzenli olarak çoğalan olgun sperme farklılaşan hücrelerdir. Bu hücreler testisin erken gelişim evresinde gonadal yolk kesesinden kaynaklanan ve gonadal kabartılarda kolonize olan primordial germ hücrelerinden gelişmektedir. Spermatogenik hücreler komşu Sertoli hücrelerinin arasında ilerleyici gelişim sergileyen ve belirgin olmayan tabakalar halinde düzenlenmektedir. Spermatogonyum olarak adlandırılan en inmatür spermatogenik hücreler bazal laminanın üzerinde uzanırlar. Spermatid olarak adlandırılan en matür hücreler sertoli hücrelerinin apikal bölümüne tutunurlar (Sharma ve Agarwal, 2011).

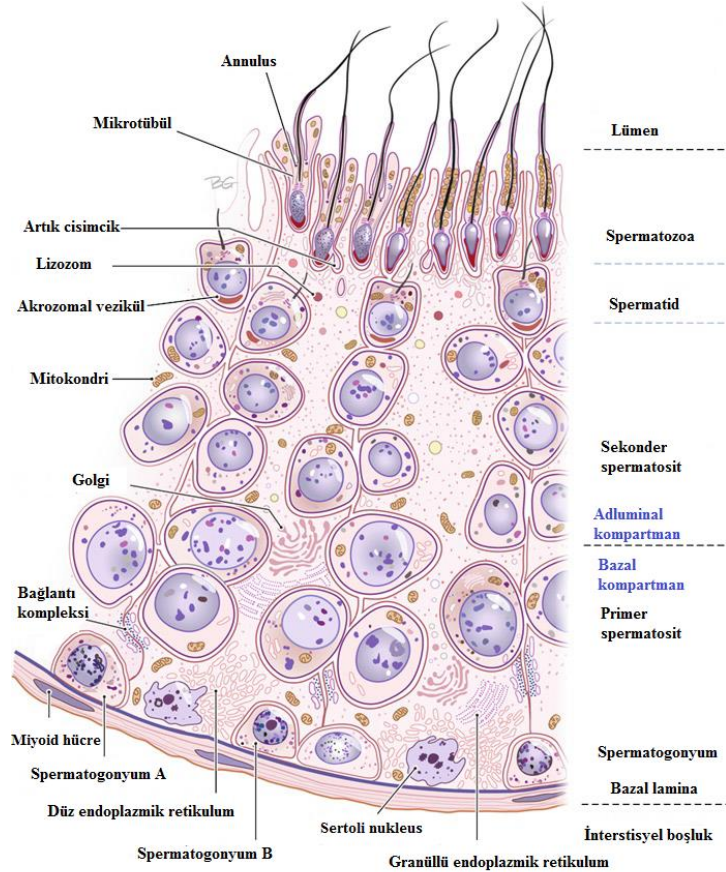


Şekil 2.2. Seminifer tübül kesiti ve leydig hücreleri (The University of Western Australia <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/malerepro/malerepro.htm> 9.07.2017).

Her testiste 250-1000 adet seminifer tübül bulunur ve her bir seminifer tübül de, yaklaşık olarak 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Spermatogenez bu tübüllerde gerçekleşir. Seminifer tübül etrafı üç farklı doku katmanı bulunan peritübüler yapıdan oluşur. İnterstisyumdan gelişen primitif bağ doku kökenli fibrositlerin oluşturduğu adventisyal katman dışta, miyoid hücrelerin oluşturduğu katman ortada ve germ hücrelerin hemen altında bulunan kollojen liflerin oluşturduğu katman ise içte bulunur. Seminifer tübül boşluğu birbirlerine zonula okludens ile bağlı sertoli hücreleri tarafından bazal kompartman ve adluminal kompartman olarak ikiye bölünür (Sharma ve Agarwal, 2011) (Şekil 2.3).

Seminifer tübüllerde bazal lamina ile ilişkili piramidal şekle sahip Sertoli hücreleri bulunur. Sertoli hücreleri spermatogenezin tüm hücreleri ile ilişkili olup onlara metabolik ve fiziksel destek sağlar (Roosen-Runge ve Holstein, 1978).

Seminifer tübüllerin yaklaşık olarak % 40' ını Sertoli hücreleri oluşturur ve tüm sertoli hücrelerinin neredeyse % 40' ı spermatidlere kadar uzanır. Sertoli hücrelerinin nükleusu birçok hücreden daha büyüktür ve 250-850 μm^3 arasında boyutlara sahiptir (Russell ve ark., 1990).



Şekil 2.3. Seminifer tübüllerde germinal epitel kesit görünümü (Sharma ve Agarwal, 2011' den uyarlanmıştır).

Her bir sertoli hücresi diğer 5 adet Sertoli hücresi ve 40-50 adet germ hücresi ile gelişim aşamasında bağlantılıdır. Germ hücrelerine yapısal, işlevsel ve metabolik destek olarak, spermatogenezin sorunsuz ilerlemesini sağlarlar. Sertoli hücrelerine aynı zamanda hemşire hücreler de denir (Sharpe ve ark., 2003).

Spermatogenez sırasında erken germ hücreleri epitel doku bölgesinde dinlenme fazındadır. Daha sonra gelişen germ hücreleri seminifer tübül lümenine doğru gelişme gösterir. Bu gelişme aşamasında hemşire hücreleri olarak bilinen sertoli

hücreleri germ hücrelerini besler ve ölen hücreleri fagosite eder. Spermatogenez sertoli hücreleri ve germ hücreleri arasındaki ilişki, hormonal kontrol ile sağlanır. Sertoli hücrelerinde bulunun FSH bağlayıcı reseptörlere bağlanan Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) Sertoli hücrelerinden Androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılanmasını uyarır (Fritz ve ark., 1976). ABP' ler spermatogenezin başlamasını, devam etmesini uyaran testosteron ile dihidrotestosteron gibi androjenlerin bağlanmasını ve salınımının artmasını sağlar.

Sertoli hücreleri aynı zamanda embriyonik gelişme sırasında erkek üreme kanalının gelişmesini baskılayan Anti-Müllerian Hormonu salgılar (Behringer, 1995; Josso ve ark; 2001). Hipofizde FSH düzenlenmesinde görevli anahtar makromolekül olan inhibin hormonunu salgırlar. Steroid yapıda olmayan inhibin, peptid yapısında bir maddedir. Sertoli hücrelerinde inhibin salgılanmasında da Sertoli hücreleri sorumludur.

Sertoli hücrelerin sitoplazmalarında Charcot-Bottcher kristalleri ile Annullate Lamellae adı verilen tipik şekilli membran özelleşmelerine sıklıkla rastlanır (Fawcett ve Burgos 1960). Sertoli hücrelerinin başlıca fonksiyonları aşağıdaki gibi sıralanır;

- Seminifer tübül epitelinin bütünlüğünün kalıcı olmasını sağlarlar.
- Salgıladıkları sıvı ile sperm hücrelerinin kanal içerisine akmasını sağlarlar.
- Kan-testis bariyerinin oluşumuna katkı sağlarlar.
- Germ hücrelerinin desteklenmesini beslenmesini sağlarlar.
- Steroidogeneze ve steroid metabolizmasına katılırlar.
- Androjen bağlayıcı protein (ABP), inhibin ve Anti-Müllerian Hormonu salgırlar.
- Artık cisimcikleri ve gelişmeyen germ hücreleri fagosite ederler.
- LH, FSH ve testosteron reseptörlerini bulundururlar.

2.1.2. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri testis bağ dokusu içerisinde bulunan granüllü sitoplazmaya sahip poligonal şekilli hücrelerdir. Testis hacminin yaklaşık olarak % 5-12' sini oluştururlar. Bu hücreler tek tek ya da gruplar halinde bulunabilmektedir. Leydig hücreleri testosteron hormonunun temel kaynağıdır (Payne ve ark., 1980). LH hormonu Leydig hücrelerini uyararak testosteron salgılanmasını sağlamaktadır. Bu salgılanma hipofiz bezinde negatif feedback ile düzenlenir (Sharma ve Agarwal, 2010). Leydig hücrelerinden salınan testosteron hormonu; hipotalamo-hipofizer-gonadal eksen aktivasyonunda, erkek seksüel davranışlarının oluşumunda, spermatogenezin başlaması ve devamlılığında ve erkek genital organların gelişiminde anahtar rol oynar.

2.1.3. Kan-Testis Bariyeri

Kan-testis bariyerinin oluşmasından Sertoli hücreleri sorumludur (Mruk ve Cheng, 2004). Kan-testis bariyerinin varlığı 1900' ların başında testis dokusunun boyanması ile ortaya çıkarılmıştır. Ancak öyle bir bariyerin varlığı yıllar boyunca kabul edilmemesine rağmen çeşitli boyaların ve radyoaktif işaretleyici materyallerin testis lümenine tam anlamı ile geçmemesi kan-testis bariyerinin varlığını kanıtlamıştır (Chiquoine, 1964). Bazal kısımda konumlanan bitişik Sertoli hücreleri arasındaki özelleşmiş hücre bağlantıları kan-testis bariyerini oluşturur. Bu özelleşmiş bağlantılar seminifer tübül katmanında bulunmaktadır. Kan-testis bariyeri ile seminifer tübül epiteli seminifer tübül lümenine uzanan adluminal kompartıman oluşacak biçimde 2' ye bölünür. Bazal kısımda spermatogonyum ve primer spermatozoidler bulunurken, adluminal kısımda ise sekonder ve spermatiler bulunur (Su ve ark., 2011). Bu sayede anatomik/fizyolojik bir bariyer sağlanarak moleküllerin adluminal kompartımana girmesini engellenir.

Kan testis bariyeri ayrıca sistemik dolaşımdan germ hücrelerine doğru su, elektrolit, besin ve biyomoleküllerin geçişini düzenleyerek, germ hücrelerine uygun bir mikroçevre oluşturur (Papaioannou ve ark., 2009). Kan-testis bariyeri aynı zamanda immünolojik sistem bariyer görevi görür. İmmün hücrelerinin hareketini

kısıtlayarak, seminifer tübül epitelinde sitokinlerin seviyesini düzenler (Mital ve ark., 2011). Spermatozoalar pberte zamanı üretilse de yaşamın ilk yılında immün sistem tarafından tanınmazlar. Bu nedenle kan-testis bariyeri spermatozoa hücresi için koruyucu bir ortam sağlar (Johnson ve ark., 2008).

2.2. İnratestikler Kanallar

2.2.1. Tubuli Rekti

Tubuli rekti seminifer tübül ağlarını rete testis kanalına bağlayan intratestiküler bir kanallardır (Roosen-Runge, 1961). Kıvrımlı seminifer tübüller mediastinuma yaklaştıka düzleşir ve tubulu rekti adını alır. Bu kanallar kısa dar ve düzgün seyreden 1 mm uzunluğunda ve 20-25 mm çapında borucuklardır. Seminifer tübüllerin sonunda ve rete testis kısmında olduğu için ilk yapılan çalışmalarda ya seminifer tübül devamı ya da yapısı gereği rete testis kısımlarının parçası olarak düşünülmüştür (Bustos-Obregon,1976). Tubulu rekti epiteli spermatogonyal hücreler taşımazlar, Sertoli hücrelerinden değişen prizmatik hücreler taşırlar. Mediastinum testisin periferinde yer alan tubuli rekti kanalları tek katlı kübik epitel ile döşelidir (Batislam ve Başar, 2004).

2.2.2. Rete Testis

Mediastinum testis bölgesinde konumlanan rete testis labirent biçimli kanalların birbiri ile bağlantılı şekilde bulunması ile oluşur. Seminifer tübüllerin bağlandığı tubuli rekti kanalları rete testis kanallarının içine boşalır. Rete testis epiteli tek katlı kübik epitel ile dşeli olup apikal yüzeylerinde mikrovilluslar vardır. Epitel hücreleri ayrıca lateral bağlantılar ile birbirlerine bağlantılıdır (Dym, 1972). Yapılan alışmalar seminifer tübüllerde üretilen sıvının kanallardakine göre daha az protein içerdiğini göstermiştir. Özellikle rete testisten elde edilen sıvılarda yüksek miktarda serum proteini (albumin, γ -globulin) bulunduğu gösterilmiştir (Koskimies ve Kormano, 1973). Bu durum seminifer tübüllerden gelen sıvının rete testis kanallarında değiştiğini ortaya koymaktadır (Koskimies ve ark., 1971).

2.2.3. Duktuli Efferentes

Duktuli efferentes kanalları, rete testisin devamı olarak testis dışına çıkan kanallardır. Testisin dışında tepesi mediastinum testise bakan piramidal bir yapı oluşturan bu kanallar testis ile epididimis arasında bağlantı sağlar (Kenneth ve Rex, 1994). Her bir kanal túbülün dışı bağ doku ile sarılır. Duktuli efferentes kanalları tek katlı prizmatik epitel ve kübik epitel ile döşelidir. Prizmatik hücreler daha koyu boyanır, asidofiliktir ve lümeneye bakan yüzeylerinde silyalar bulunmaktadır (Hoffer, 1972). Bu silyalar epididimise doğru hareketi sağlamaktadır. Kübik hücreler ise, daha açık boyanır. Kübik hücreler silyasız, ancak fırçamsı kenarlıdır (Hamilton ve ark., 1977). Bu kanallar seminifer túbüllerden gelen sıvının çoğunun emilmesini ve spermlerin epididimise ulaşmasını sağlamaktadır.

2.3. Ekstratestiküler Kanallar

2.3.1. Duktus Epididimis

Duktuli efferentesin devamında, uzun çok kıvrımlı, tek bir kanaldır. İnsanlarda 6-7 m uzunluğundadır (Turner, 1995). Epididimisin anatomik yapısı genel olarak; başlangıç kısmı, baş, gövde ve kuyruk bölümleri olarak ayrılmaktadır. Her bölge lümen ve lümen etrafında esas epitel hücreler ve bazal hücrelerle döşelidir (Lasserre ve ark., 2001). Duktus epididimis, spermatozoanın taşınması, depo edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca testislerden salınan spermatozoalar hareketsiz, olgunlaşmamış ve oositi dölleme yetenekleri yoktur (Flesch ve Gadella, 2000). Duktus epididimisi döşeyen epitel hücreleri, androjen kontrolü altında salgıladıkları proteinler ile spermatozoaya uygun ortam sağlarlar (Herms ve ark., 1994). Diğer bir deyişle, epididimal olgunlaşma olarak tanımlanan değişimle spermatozoayı fertilizasyona uygun hale getirir (Toshimori, 2003).

Epiteli bazal hücreler ve prizmatik yapıda esas hücrelerden oluşmuştur. Prizmatik hücrelerin lümenine bakan yüzeylerinde stereosilyalar bulunur. Bazal hücreler açık renkte boyanır ve poligonal şekilli hücrelerdir. Bunlara ilaveten epitel hücreleri arasında Halo hücreleri (berrak hücreler) olarak adlandırılan lenfosit benzeri

hücrelerde bulunur. Histolojik olarak baş ve gövde bölümleri arasında fark görülmez. Kuyruk kısmı ejakülasyondan önce olgun spermilerin depo edildiği yer olması nedeniyle dilatasyon gösterir. Kuyruk kısmında bazal hücreler daha fazladır.

2.3.2. Duktus (Vas) Deferens

Duktus epididimisin kuyruğu ile devam eden bu kanal prostatik üretraya doğru açılmaktadır. Epididimisten farkı olarak yapısındaki kalın kas tabakası ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. Vas deferens epididimisten gelen spermatozoaların ilave sıvılarla birlikte üretraya iletilmesini sağlamaktadır. Duktus deferensin duvarı; tunika mukoza, tunika muskularis, tunika adventisya tabakalarından oluşmaktadır. Tunika mukoza yüzeyi yalancı çok katlı stereosilyalı prizmatik epitel dōşelidir. (Batislam ve Başar, 2004). Vas deferens kanalının son kısmı, genişleyerek ampulla duktus deferens kısmını oluşturmaktadır.

2.3.3. Duktus Ejakulatoryus

Duktus Ejakulatoryus, prostat bezini üst kısmından giren ve uzunluğu 2 cm, çapı 0.5 mm olan bir kanaldır (Batislam ve Başar, 2004). Burada sağ ve sol olmak üzere üretraya açılmaktadır. Epitel tabakası tek katlı prizmatikten çok katlı değişken epitele kadar değişmektedir. Vas deferensteki gibi kas tabakası gözlenmemektedir.

2.4. Yardımcı Üreme Bezleri

2.4.1. Seminal Vezikül

Seminal vezikül bezleri anatomik olarak; posteriorda mesane, superiorda prostat bezi, lateral kısmında ise vas deferens ile ilişkilidir. Sağ ve solda ampulla duktus deferensin alt ucuna açılan, kıvrımlı kese şeklinde ve her biri 5-7 cm uzunluğunda ve 13 ml hacminde olan bezlerdir. Seminal vezikül çok kıvrımlı bir bez yapısına sahip olduğu için salgılama kapasitesi fazladır. Bunun yanında epitelinde

salgı hücreleri ve bazal hücreler bulunmaktadır. Ancak yapısında nöroendokrin hücreler yoktur (Laczko ve ark., 2005). Vas deferensteki gibi tunika mukoza, tunika muskularis, tunika adventisya katmanlarından oluşur. Epitel yapısı tek katlı prizmatik hücreden, yalancı çok katlı epitele farklılık göstermektedir. Spermatozoanın fertilitasını etkileyen fruktoz salgılamaktadır. Seminal vezikülün salgılama işlevi testosteron hormonu ile kontrol edilmektedir.

2.4.2. Prostat

Prostat; yaklaşık 20 gr ağırlığında, 3cm uzunluğunda, 4 cm genişliğinde, 2 cm kalınlığında, mesane ve simfisis pubis ile rektum arasına yerleşmektedir. Sıkı fibromusküler stroma içerisine gömülmüş 30-50 adet tübüloalveoler bezden oluşur. Bu bezlerin kanalları doğrudan prostatik üretraya açılmaktadır (Jesik ve ark., 1982). Prostat bezi bugünde kabul edilen bölgelere ayrılmıştır (McNeal, 1983). Prostatik üretra, prostat bezini anterior fibromusküler bölge (% 30) ve posterior glandüler bölge (% 70) olarak ikiye bölmektedir. Posterior kısmı tranzisyonel, merkezi ve periferik bölge olarak ayrılmaktadır. Merkezi bölge prostat hacminin % 25' ini, periferik bölge ise % 70' ini oluşturmaktadır. Prostat bezi kalsiyum, sitrat iyonu, fosfat iyonu ve fibrinolizin içeren süte benzer sıvı salgılar. Fibronizin semen likefaksiyonunda etkilidir. Prostat bezinin kapsülü vas deferensin kasılmalarıyla eş zamanlı olarak kasılır. Böylece prostat sıvısı semene eklenir. Prostat salgısının hafif alkali özelliği ovumun başarılı bir şekilde döllenmesi için önemlidir. Kadının vajinal salgıları asit özelliktedir. Sperm pH 6,0 ile 6,5' e ulaşınca kadar hareketlilik göstermez. Bezler tek katlı ya da yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Prostat lümeninde kalsiyum birikmesi sonucu prostatik taşlar (corpora amilasea) ortaya çıkmaktadır (Batislam ve Başar, 2004).

2.4.3. Bulboüretal Bez

Bulboüretal bezler (Cowper bezleri), yaklaşık olarak 5mm çapında üretranın alt iki yanında, iki kanalla üretraya katılan iki küçük bileşik tübülo-alveolar bezdir. Epiteli prostat epiteline benzerlik gösterir ve mikrovilluslu kübik epitel hücreye kadar

değişiklik göstermektedir. Cinsel uyarı sırasında salgısını penil üretraya boşaltarak kayganlık sağlamaktadır (Batislam ve Başar, 2004).

2.5. Penis

Penis idrar boşaltım organı kopulasyon organı olarak işlev yapmaktadır. Üç erektil yapıdan oluşmaktadır. Penisin kesitinde üstte yer alan çift olanı korpus kavernozum, altta ise üretrayı saran ve tek olan korpus spongiosum olarak isimlendirilmektedir. Kavernoze dokular afferent arter ile efferent ven arasında oluşmuş geniş sünger görünümlü sinüs yapılarından oluşmaktadır. Bu kavernoze yapıları dıştan tunika albuginea sarmaktadır. Penis dışardan ise keratinize çok katlı deri ile sarılmıştır (Batislam ve Başar, 2004).

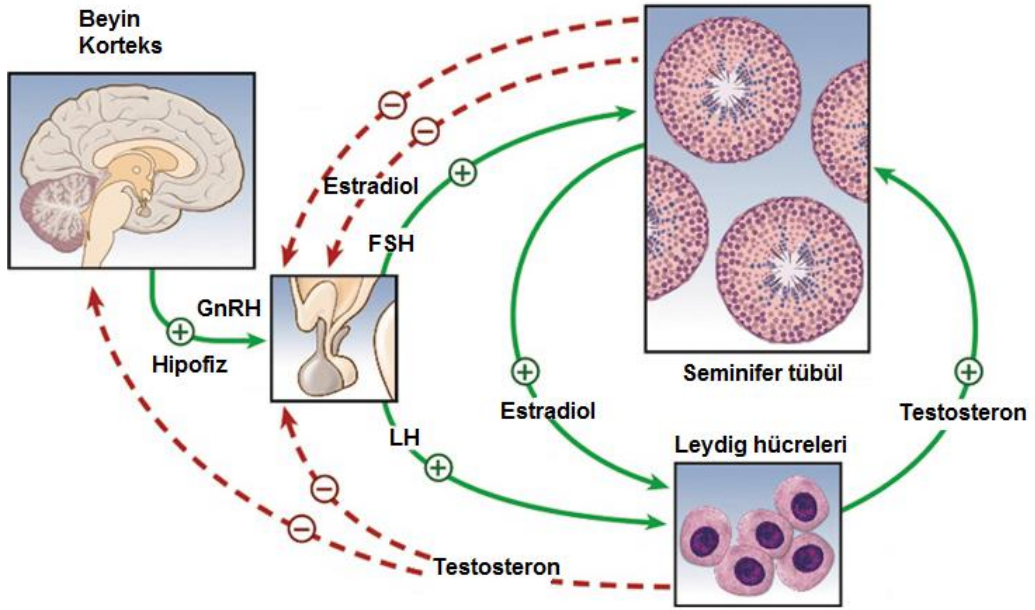
2.6. Spermatogenez ve Hormonal Kontrolü

2.6.1. Spermatogenezin Hormonal Kontrolü

Spermatogenez hipotalamustan hormonal kontrol ile başlatılır. Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) hipofizin ön lobundan Luteinleştirici hormon (LH) ve Folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını uyarır. LH hormonu testis intersitisyumunda bulunan Leydig hücrelerini uyararak testosteron üretiminin başlamasını sağlar. FSH hormonu ise Sertoli hücrelerini uyararak spermatogenez gelişim aşamalarının oluşmasını sağlar (Şekil 2.4). LH ve FSH hormonlarına ek olarak adenohipofizden salınan adrenokortikotropik hormonu (ACTH), Prolaktin hormonu, tiroid uyarıcı hormon (TSH) spermatogenezde rol oynamaktadır.

Androjenler, spermatogenezde etkisi olan en önemli hormonlardır. Dihidrotestosteron; erkeklerde testosteron hormonunun 5- α -Redüktaz enzimi aracılığı ile dönüşümünden oluşur. Hem testosteron hem de dihidrotestosteronun ikisi de birçok genin aktivitesini ve hamilelik dönemindeki gelişim aşamalarını düzenleyen hormonlardır (Wilson, 1992). Östrojen spermatogenezin başlaması için gereklidir

(Lubahn ve ark., 1993; Smith ve ark., 1994). Sertoli hücrelerinin farklılaşması sırasında östrojen seviyesi minimum seviyeye düşer. Ergenlik öncesi yıllarda östrojen salınımı leydig hücrelerinden androjen üretimini durdurur. Puberte dönemi başladığı zaman östrojen seviyesi düşer ve leydig hücrelerinden androjen üretimini ile spermatogenez başlar. Tiroid hormonları da spermatogenezde anahtar rol oynayan sertoli hücrelerinin farklılaşmasında ve gelişmesinde önemlidir.



Şekil 2.4 Hipotalamo hipofizer gonadal eksen ve hormonal feedback mekanizmasının şematik çizimi (Sharma ve Agarwal 2011' den uyarlanmıştır).

Tüm bu hormonlar birbirleri ile ilişki içerisinde spermatogenez oluşumunu kontrol eder. Bunun yanında sertoli hücrelerinden direk olarak salınan büyüme faktörleri de kontrol mekanizması içine dahildir. α - β (TGF), İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve Beta fibroblast büyüme faktörü (FGF) embriyonik gelişim sırasında hücre göçünde, mayoz bölünmenin düzenlenmesi ve hücre farklılaşması ile ilişkilidir.

2.6.2. Spermatogenez

Diploid spermatogonyumların spermatidlere dönüşmesi spermatogenez olarak tanımlanmaktadır (Roosen-Runge ve Holstein, 1978). Spermatogenez, primitif ve totipotent kök hücrelerden değişimle sperm hücresi oluşturan kompleks bir işlemdir. Bu işlem sırasında mitoz, mayoz bölünme ile birlikte hücrel farklılaşma görülmektedir.

Spermatogenez; spermatogonyumların olgunlaşması ve farklılaşması, mayoz bölünme ve spermiyogenez olarak üç bölüme ayrılabilir. İnsanlarda bu işlem puberte ile başlar ve yaşam boyu devam eder. Gonositler, spermatogonyumlara farklılaştığı zaman mitoz bölünme erken embriyonik dönemde başlar. Spermatogonyumlar seminifer tübül içinde bazal membran üzerinde yerleşim göstermektedirler. Lümeneye doğru primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatid şeklinde değişim geçirirler. Spermatogonyumlar ve primer spermatositler bazal kompartmanda diğer hücreler ise adluminal kompartmanda bulunmaktadır.

Seminifer tübüllerde spermatogonyumlar; koyu tip A, açık tip A ve Tip B spermatogonyumlar olarak üç farklı tipte olmaktadır. Koyu tip A spermatogonyumlar, seminifer tübüllerde kök hücreler olup, koyu renk boyanırlar ve oval bir nükleus ile granüler kromatine sahiptirler. Bu hücreler mitoz bölünme ile koyu tip A spermatogonyumları ve açık tip A spermatogonyumları oluşturmaktadırlar. Açık tip A spermatogonyumlarda oval nükleuslu ve granüler kromatinlidir. Tip A spermatogonyumlardan sonra mitotik bölünmelerle oluşan tip B spermatogonyumlar en çok bulunan spermatogonyum tipidir (Clermont, 1972). B tipi spermatogonyumlarda son mitoz bölünmelerle primer spermatositleri oluştururlar. Primer spermatositler diploiddir ve 4N DNA içerirler. Oluşan bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profaz evresine (leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez) girerler. Profazın leptoten evresinde kromozomlar kısalıp kalınlaşır. Zigoten evresinde tetrad olarak isimlendirilen homolog kromozomlar arasında sinaps ve sinaptonemal kompleks oluşturur. Pakiten evresinde ise kromozomlar iyice kısalıp kalınlaşarak crossing over olarak isimlendirilen, sperm hücresine genetik çeşitlilik sağlayacak gen değişimini gerçekleştirirler. Metafaz evresinde kromozomlar ekvatorial bölümde dizilir. Anafaz aşamasında ise homolog kromozomlar karşı kutuplara doğru çekilmeye

başlar. Telofaz aşamasında ise hücre bölünmesinin de tamamlanması ile sekonder spermatositler meydana gelir (Sharma ve Agarwal, 2011). Sekonder spermatositler, 2N DNA içermektedir. DNA replikasyonu olmadan ikinci mayoz bölünmeye giren bu hücrelerin bölünmesi sonunda spermatidler oluşur. Spermatidler birbirinden tam olarak ayrılmazlar. Sitoplazmik köprüler ile birbirlerine bağlı kalırlar. Oluşan bu spermatidler haploid kromozoma ve 1N miktarda DNA'ya sahiptirler. Oluşan spermatidler bir sitodiferansiyon süreci olan spermiyogenez ile sperm hücrelerine dönüşürler.

2.6.3. Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatidlerin sperm hücrelerine dönüşümünün evresidir. Bu dönüşüm sırasında mayoz bölünmeden sonra elde edilen spermatidler morfolojik olarak değişim geçirmektedir. Spermiyogenez üç faz ile tanımlanır.

Golgi fazında; spermatid nükleusu etrafında golgi kompleksi ve mitokondriler gelişir ve farklılaşır. Akrozomal veziküller ortaya çıkar. Bu bölgede nükleus yoğunluğunda artış gözlenir Sentiol çifti karşı kutba hareket eder ve sitoplazmadaki mitokondriler hücre zarına doğru dizilirler (Sharma ve Agarwal 2011).

Başlık fazında; akrozomal vezikül genişleyerek nükleusu başlık halinde sarar. Nükleus uzunluğu artar. Akrozomun karşı kutbunda flagellum oluşturacak yapılar gelişir. Mitokondriler boyun bölgesinden annulusa göç eder. Mitokondrilerle çevrili olan bu bölge orta parçayı temsil eder (Sharma ve Agarwal 2011).

Olgunlaşma fazı, sperm hücrelerinin son şeklini aldığı spermiyogenezin son evresidir. Sperm hücrelerinin artık cisimleri sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Flagellum silya yapısı gösterir. Özel şekle sahip sperm hücresi haploid kromozom seti taşımaktadır (Sharma ve Agarwal 2011).

2.6.4. Sperm Hücresi

Sperm hücresi özelleşmesini tamamlamış bölünme ve büyüme özelliği olmayan bir hücredir. Her sperm hücresi genetik materyali taşıyan bir baş, hareketi sağlayan bir kuyruk ve bu iki kısım arasında yerleşmiş olan orta parçadan oluşur (Şekil 2.5). Sperm hücresi büyük nükleusa sahipken, pek çok vücut hücresinin tersine çok az miktarda sitoplazmaya sahiptir (Sharma ve Agarwal, 2011).

Sperm başı

Sperm başı, oval biçimlidir ve 4.0-5.0 μm uzunluğa, 2.5-3.5 μm genişliğe sahiptir. Normal uzunluk genişlik oranı 1.50-1.70' tir (Rousseaux ve ark., 2008). Spermin baş bölüm yapısına ait bozukluklar; başın şekli veya boyutu ile ilgilidir. Makrosefalik baş, vakuollü baş, konik baş ve çift başlılık gibi diğer anomali tipleri sıralanabilir. DNA ve proteinden oluşan nükleus sperm başının % 65' ini oluşturmaktadır. X veya Y kromozomunu oluşturan DNA, baş kısmında kodlanır ve saklanır.

Akrozom

Akrozom sperm başının % 70' lik kısmını kaplayan bölgedir (Oliva ve ark., 2008). Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde sperm hücresinde akrozom bölgesi akrozomal ve postakrozomal bölge olarak iki kısma ayrıldığı görülmektedir. Akrozom bölgesi fertilizasyon için gerekli hyaluronidaz, proakrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir (Baker ve ark, 2008). Fertilizasyon sırasında akrozomal membran ve plazma membranı kaynaşarak akrozomun enzimleri salgılamasını sağlamaktadır.

Bağlantı Parçası

Baş kısmında bulunan çekirdeğe tutunan proksimal sentriol ve aksoneme kaynaklık eden distal sentriolden oluşmaktadır (Sharma ve Agarwal 2011).

Orta Parça

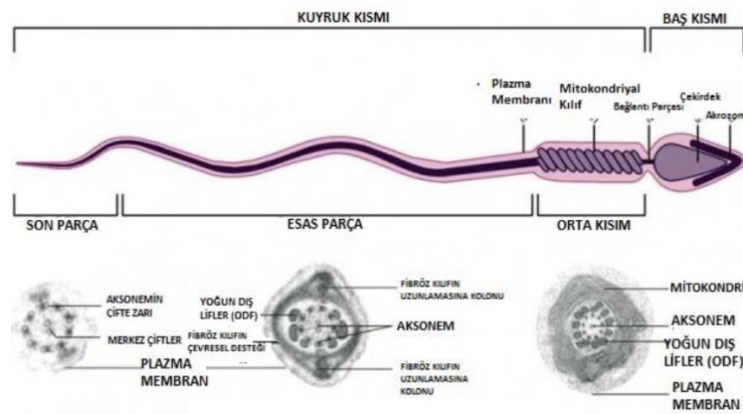
Sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu kuyruğun orta parçası baş bölgesinden sarmalımsı dizilmiş mitokondriyal kılıfa kadar uzanır. 9+2 mikrotübüler aksonem kuyruğun merkezini kaplar. Mitokondriyal kılıfla aksonem arasında dokuz dış yoğun lif bulunur. Mitokondriyal halkanın son kısmı annulus olarak isimlendirilmektedir (Sharma ve Agarwal 2011).

Esas Parça

Kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lif ile sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur (Sharma ve Agarwal 2011).

Son Parça

Dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın kaybolması sonucu yalnız aksonem bulunan kuyruğun son parçası ışık mikroskopunda görülmemektedir (Sharma ve Agarwal 2011).



Şekil 2.5. Sperm hücresi şematik çizim
(Claire ve ark., 2009 uyarlanmıştır).

2.7. Semen Analizi

İnfertilite; eşlerin herhangi bir gebeliği önleyici yöntem kullanmamalarına rağmen en az 1 yıl içerisinde gebelik elde edilememesi olarak tanımlanır. Çiftler arasında görülen infertilitenin nedenleri incelendiğinde yaklaşık olarak % 50' lik kısmında erkeğe bağlı faktörler görülmektedir (ASRM, 2013; WHO, 2010). Erkeğe bağlı infertilite faktörlerini araştırmak için erkeğin geçmiş yıllara ait sağlık durumları incelenmeli ve en az üç ay ara ile en az iki veya üç adet semen analizi gerçekleştirilmelidir.

Semen analizi erkeğe bağlı infertilite faktörlerinin tanımlanması için en önemli araştırma yöntemidir. Semen analizi; sperm üretimi, olgunlaşması, taşınması, aksesuar bezlerin durumu hakkında bilgi vermektedir. Bunun yanında semen pH' ı hacmi, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, sperm morfolojisi, sperm canlılığı ve semendeki lökosit konsantrasyonu belirlenerek değerlendirilir.

Modern semen analizi Macomber ve Sander tarafından kan sayımında kullanılan sayım kamarası ile 1920' lerde gerçekleştirilmiştir. Her bir mililitrede 100 milyon sperm bulunduğunu göstermişlerdir (Macomber ve Sander, 1929). 1950'lerde Macleod ve arkadaşları 1.000 fertil ve 1.000 infertil çiftlerde semen parametrelerini karşılaştırmışlardır (Macleod ve Gold 1951a; Macleod ve Gold 1951b).

Dünya çapında semen analizinin standardize edilmesi amacıyla Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1980 yılında ilk semen analizi el kitabını yayınlamıştır. Sonraki yıllarda 1987, 1992, 1999 ve 2010 yıllarında araştırmacıların fikir birliği için bu kitabın yeni versiyonlarını yayınlamıştır. 1980 ve 1999 yıllarında arasında yayınlanan bu dört el kitabında semen analizinde referans eksikliğinden dolayı birlik sağlanmamıştır. En son 2010 yılında yayınlanan WHO ise 1.953 semen analizi ve 5 çalışmanın verilerine dayanılarak hazırlanmıştır (Cooper ve ark., 2010). Diğer WHO semen analizi el kitaplarına göre 2010 yılında yayınlanan WHO el kitabında önemli değişiklikler olmuştur. Değişikliklerden bir tanesi semen referans değerlerinin diğer WHO el kitaplarına göre düşmüş olmasıdır (Tablo2.1).

Bunun yanında 2010 yılında yayınlanan WHO el kitabında referans alınan semen parametrelerinin 10 hasta dışında hepsinin 31 yaş altı hasta grubuna ait olması değerlerin güvenilirliğini etkilediği savunulmaktadır. Ayrıca semen örneği alınan 1.953 hastanın % 55' lik kısmının batıdaki Avrupa ülkelerine ait olması diğer bir sorun teşkil etmektedir. Çünkü daha önce yapılan çalışmalarda farklı ülkelerde semen parametrelerinin değiştiği gösterilmiştir (Jorgensen ve ark., 2001). Son yayınlanan WHO el kitabı içerisine dahil edilen daha önceki çalışmalardan bazıları Tygerberg kriterlerinden farklı David sperm morfoloji kriterlerini kullanmıştır (Auger ve ark., 2001; Bonde ve ark., 1988; Jorgensen ve ark., 2001). Bu yüzden sperm morfoloji kriterlerini tanımlamada tam olarak bir güvenilirlik söz konusu olamamıştır.

Tablo 2.1. Semen parametreleri eşik değerleri karşılaştırması.

Semen Parametreleri	WHO 1999	WHO 2010
Semen hacmi (ml)	2	1,5
Sperm konsantrasyonu (10^6 /ml)	20	15
Toplam sperm sayısı (10^6 /ejakülat)	40	39
Toplam motilite (PR+NP, %)	50	40
İleriye doğru hareketlilik (PR, %)	25	32
Vitalite (canlı spermler, %)	75	58
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	14	4

2.7.1. Semen Toplanması

Semen örneği incelenecek ortama yakın bir sıcaklıkta ve inceleme yerine yakın bir odada verilmelidir. Semen numunesi 2-7 gün cinsel perhiz aralığında olan spermiyogram hastalarından alınmalıdır. Semen örneği alınacak kişiye semenin verilmesi konusunda yazılı ve sözlü bilgilendirme yapılmalıdır. Numune mastürbasyon ile elde edilmeli ve içerisine koyulacak cam veya plastik kap toksik olmayan geniş ağızlı olmalıdır. Kişinin adı ya da numarasını içeren barkod kabın

üzerine yapıştırılmalıdır. Bazı durumlarda semen örneği evde verilebilir. Örnek laboratuvara getirilirken 20 °C – 37 °C arasında tutulmalıdır (WHO, 2010).

2.7.2. Makroskopik İnceleme

Semen örneği, WHO (2010) kriterlerine göre makroskopik olarak koagülasyon, likefaksiyon, renk, koku, hacim, viskozite ve pH açısından değerlendirilir.

Koagülasyon ve Likefaksiyon

Toplama kabına alınan semen ejakülasyonunun hemen ardından seminal vezikülün salgıladığı protein kinaz enziminin etkisiyle yarı katı koagüle kitle şeklindedir. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde genellikle likefiye olmaya (incelmeye) başlar. Likefaksiyon devam ederken semen daha homojen ve hemen hemen su gibi bir hale gelir. Son evrelerde yalnızca küçük koagülasyon alanları kalır. Semen prostatik proteazlar tarafından sıvılaştırılması likefaksiyon olarak tanımlanır. Likefaksiyon normal bir semen örneğinde 37°C’de yaklaşık 15-60 dakika içinde gerçekleşir. Likefaksiyon işlemi ile semen içerisinde bulunan spermatozoa hareket etme yeteneği kazanır. Bazı durumlarda ise likefiye olmamakta ve semen örneğinin makroskopik değerlendirilmesi zorlaşır. Bu durumlarda semen örneğine bromelanin eklenir (WHO, 2010).

Viskozite

Likefiye olan semen örneği çapı yaklaşık olarak 1,5 mm olan steril tek kullanımlık pipet ile yer çekimi etkisiyle damlamaya bırakılır. Damlama sırasında semen uzunluğu 2 cm’ den kısa olmalıdır. Visköz özellik gösteren semen damlası 2 cm’ den uzundur. Visköz semen homojen yapışkandır ve bu özellik likefiye durumun aksine zamanla değişmez. Yüksek viskozite özelliği, numunenin elastik özelliği olarak

tanılmaktadır. Viskoziteyi azaltma işlemi gecikmiş likefaksiyondaki gibidir (WHO, 2010).

Renk ve Koku

Likefiye olmuş semen örneği opak bir görünüme sahiptir. Sperm konsantrasyonuna bağlı olarak opak rengi değişebilmektedir. Cinsel perhiz süresi uzadıkça ve enfeksiyon varlığında renk sarıya döner. Semen içeriğinde eritrosit olduğunda renk kırmızı, kahverengiye döner. Düşük konsantrasyonlu semen örneğinde opak görünüm azalır. Ayrıca rengi alınan ilaçlara bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Semen örneğinin prostat benzerlerinin aktivitesine bağlı olarak kendine has kokusu vardır (WHO, 2010).

Hacmi

Semen hacminin en iyi ölçülme şekli içerisine alındığı kap ile birlikte ölçülmesidir. Numune önceden tartılmış, temiz, tek kullanımlık bir kap içine alır. Semen ve kap birlikte tartılır. Son değerden kabın ağırlığı çıkartılarak hacim hesaplanır. Semen yoğunluğunun 1 g/ml olduğu varsayılarak hacmi hesaplanır (Auger ve ark., 1995; Cooper ve ark., 2007). WHO (2010) kriterine göre semen hacim alt sınırı 1,5 ml' dir.

pH

Likefiye olmuş semen örneğinde pH ölçümü 30 dakika sonra ölçülebilir. pH aralığı 6-10 olan kağıt üzerine semen yayılır ve 30 saniye sonunda pH değeri hesaplanır. Alt sınır değeri 7,2 olarak kabul edilmektedir (WHO, 2010).

2.7.3. Mikroskopik İnceleme

Semen örneğinin mikroskopik değerlendirilmesinde faz-kontrast mikroskobu kullanılması önerilir. İlk mikroskopik incelemede semen x100 büyütme altında incelenir. Bu ilk incelemede mukus iplikçik oluşumu, sperm agregasyonu ve aglütinasyonu, sperm dışındaki hücrelerin varlığı ve sperm baş ve kuyrukları incelenir. Daha sonra x200 veya x400 büyütme altında sperm hareketliliği değerlendirilir.

Islak Preparat Hazırlama

Semen örneğinin değerlendirilmesi için ıslak preparat hazırlarken 10 µl örnek lam üzerine koyulur ve 22 mm × 22 mm lamel (alan: 484 mm²) kapatıldığında yaklaşık 20.7 µm derinlik sağlanmış olur. Hava kabarcığının oluşmamasına dikkat edilmelidir. Örnek yayılması tamamlandıktan sonra ıslak preparat değerlendirilir. Oluşturulan sayma alanının 20 µm derinlikten az olması sperm hücrelerinin hareketini azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Le Lannou ve ark., 1992; Kraemer ve ark., 1998).

Sperm Agregasyonu

WHO (2010) kriterlerine göre hareketsiz spermelerin birbirlerine, sperm dışı hücrelere veya hareketli spermelerin mukus iplikçiklerine bağlanması agregasyon olarak değerlendirilir.

Sperm Aglütinasyonu

Sperm aglütinasyonu hareketli spermelerin birbirlerine; baş-başa, kuyruk-kuyruğa veya karışık şekilde yapışması olarak değerlendirilir. Aglütinasyonun şekli 1-4 ile derecelendirilirken yapışma yerine göre A-E şeklinde değerlendirilir (Şekil 2.6).

- Derece 1: Aglütinasyon kümesinde bağlı olan sperm hücre sayısı < 10 şeklinde olup, çoğu sperm hücresi serbesttir.

- Derece 2: Aglutinasyon kümesinde bağlı sperm sayısı 10-50 şeklinde olup, izole gruba göre daha az serbest sperm hücresi vardır.
- Derece 3: Aglutinasyon kümesinde bağlı sperm sayısı > 50 şeklinde olup, bazı sahalarda serbest sperm hücresi görülür.
- Derece 4: Sperm hücrelerinin tümü aglutine olmuştur ve her aglutinatlar birbirleri ile bağlantılıdır (WHO, 2010).

Sperm hareketi (Motilite)

Semen içerisinde sperm hareketi üreme potansiyelini belirlemedeki en önemli unsurlardan bir tanesidir. Sperm hareketi likefaksiyonunu tamamlamamış semen örneğinden 30 dk içinde değerlendirilmelidir. Faz-kontrast mikroskobu altında yaklaşık 20 µm derinlik oluşturulan ıslak preparatta x200 veya x400 büyütmede 200 sperm hücresi sayılarak aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir.

- İlerleyici (Progresif-PR) hareket
- İlerleyici (Nonprogresif-NP) olmayan hareket
- Hareketsiz (İmmotil-IM)

WHO (2010) kriterlerine göre hareketin alt referans sınırı (PR+NP): % 40 ve ileri doğru hareketin (PR) alt sınırı: % 32 olarak belirlenmiştir.

Sperm konsantrasyonu

Toplam sperm sayısı ve sperm konsantrasyonu gebe kalma oranı ile ilişkili olup, semen yapısına katılan sıvıların miktarından etkilenir (Slama ve ark., 2002). Semen analizinde sperm konsantrasyonu ile total sperm sayısı anlamları birbirleri ile karıştırılmaktadır. Sperm konsantrasyonu birim hacimdeki sperm sayısını ifade ederken, total sperm sayısı ise birim hacimdeki sperm sayısının semen hacim değeri ile çarpılması sonucu elde edilmektedir. Sperm konsantrasyonunu belirlemede fiksatifle sulandırılmış semen örneği mikroskop altında x400 büyütmede Geliştirilmiş Neubauer Sayım Hemositometresi ile incelenmesi önerilmektedir (WHO, 2010).

Ancak sperm sayımında kullanılan özel olarak üretilen Horwell veya Makler sayım kamaraları da kullanılabilir (Makler, 1978; Makler, 1980). Bu sayım kamaralarında aynı zamanda sperm hareketi ve morfolojisi incelenebilir (Imade ve ark., 1993; Shiran ve ark., 1995). WHO (2010) kriterlerine göre hareketin alt referans sınır değeri $15 \times 10^6/\text{ml}$ ' dir. Semen kalitesine ilişkin terminoloji Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği referans değerleri arasında bulunmayan semeni değerlendirmek için kullanılmaktadır (Tablo 2.2).

Sperm canlılık (vitalitesi)

Canlılık sperm hücre membran bütünlüğünü olarak tanımlanır. Progresif hareketin toplam sperm yüzdesinin % 40'ından az olduğu durumlarda canlılık önemlidir. Ayrıca doğru hareketlilik değerlendirmesi hareketsiz spermlerin ölü spermlerin yüzdesini geçmediği durumlardaki canlılık ile doğrulanabilir (Mortimer, 1994). Sperm canlılık belirleme yöntemleri temelde hücre membranının boyayı hücre içine almamasına veya hücre içine almasına bağlıdır. Canlılık belirlemede ışık mikroskobunda; eozin, eozin-nigrozin, tripan mavisi gibi boyalar kullanılırken floresan mikroskobunda ve flow sitometride propidium iyodür, hoechst, etidyum homodimer 1, Yo-Pro-1 kullanılabilir (Gillan ve ark., 2005; WHO, 2010). Canlılık için diğer bir yöntem ise hipozmotik şişme testidir. Canlılık testinde WHO (2010) kriterlerine göre alt referans sınır değeri % 58 olarak kabul edilmektedir.

Sperm Morfoloji


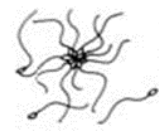






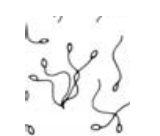



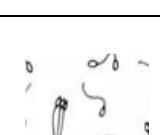

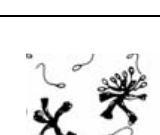
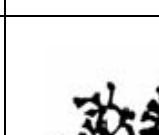
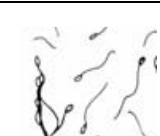



Semen analizindeki en önemli parametrelerden biri sperm morfoloji değerlendirmesidir. Sperm morfolojisinin fertilitenin belirlenmesinde ana belirleyici olduğu bilinmektedir (Phetudomsinsuk ve ark., 2008). Ayrıca normal morfolojiye sahip sperm yüzdesinin fertilizasyon kapasitesi ile pozitif ilişkilidir. Sperm morfolojisi ile ilgili çalışmalar çok eski yıllarda başlamasına rağmen Dünya Sağlık Örgütü 1980-2010 yılları arasında birçok tanımlamaya yer verilmiştir (Kruger ve ark., 1987;

Menkveld ve ark., 1990). Yapılan alışmalarda Tygerberg kriterleri tanımlanmıştır. Kruger ve ark. (1988) sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde 3 grup tanımlamıştır.

- 1- Normal morfolojiye sahip grup (% 14' ten fazla normal morfolojili sperm bulunması)
- 2- İyi prognozlu grup (% 5 -14 arası normal morfolojili sperm bulunması) ve 3)
- 3- Kötü prognozlu grup (%4' ten az normal morfolojili sperm bulunması) şeklinde tanımlanmıştır WHO (2010) kriterlerine gÖre % 4' lük grup değerlendirmede kullanılmaktadır.

Sperm morfolojisinin belirlenmesinde öncelikle likefiye semen lama yayılır, havada kurutulur ve boyanır. Morfoloji belirlenmesinde başlıca Papanicolaou, Hematoksilen, Giemsa ve Nigrosin-Eosin boyama yöntemleri kullanılmaktadır.

Ayrıca laboratuvarında hızlı, güvenilir ve çabuk sonuç veren Spermac ve Diff-Quik gibi hazır boyalarda kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü 2010 yılında yayınladığı kitapçıkta sperm morfolojisinin belirlenmesinde Papanicolaou, Shorr ve hızlı boyama tekniklerinden Diff-Quik boyama tekniğinin ideal olduğunu belirtti (WHO, 2010). Papanicolaou boyaması semendeki sperm dışı hücreleri ve sperm hücrelerini ayırt etmede kullanılır. Ayrıca sperm başının akrozomal bölgesi, postakrozom bölgesi, orta parça, kuyruk bölgesi tanımlamak için ideal boyama yöntemidir. Diğer bir yöntem olan Shorr boyamasının da Papanicolaou boyası ile benzer oranda normal morfolojiye sahip sperm gösterdiği tespit edildi (Meschede ve ark., 1993). Androloji laboratuvarında hızlı sonuç veren ve WHO (2010) önerdiği bir diğer yöntem Diff-Quik boyama tekniğidir. Bu teknik Papanicolaou boyama yöntemi ile karşılaştırıldığında önemli bir fark olmadığı gösterilmiştir (Kruger ve ark., 1987).

	Aglütinasyon derecesi			
	1. Derece (< 10 sperm/ aglutinat, birçok serbest sperm)	2. Derece (< 10 sperm/ aglutinat, birçok serbest sperm)	3. Derece (> 50 sperm / aglutinat, bazı spermiler hala serbest)	4. Derece (spermilerin hepsi aglutine olmuş ve aglutinatlar birbirleriyle bağlantılı)
A.Baş-baş				
B.Kuyruk-kuyruğa				
C.Kuyruk ucu-kuyruk ucuna				
D.Karışık				
E.Yumaklaşmış				

Şekil 2.6. Sperm aglütinasyon dereceleri gösterimi (WHO, 2010).

Tablo 2.2. Semen kalitesine ilişkin terminoloji (WHO, 2010).

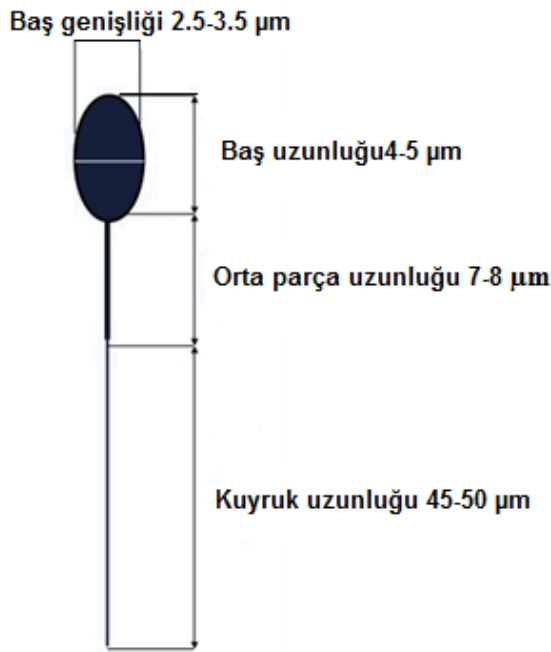
Aspermi	Semenin olmaması durumudur.
Astenozoospermi	İlerleyici (Progresif-PR) harekete sahip spermelerin yüzdesinin alt referans değerinden az olması durumudur.
Astenoteratozoospermi	İlerleyici (Progresif-PR) harekete ve normal morfolojiye sahip spermelerin yüzdesinin alt referans değerinden az olması durumudur.
Azoospermi	Semende hiç sperm bulunmaması durumudur.
Kriptoospermi	Normal semende sperm görülmemesine rağmen santrifüj yapılmış semende sperm bulunması durumudur.
Hemospermi	Semende eritrosit bulunması durumudur.
Lökospermi	Semende sınır değerinin üstünde lökosit bulunması durumudur.
Nekrozoospermi	Cansız spermelerin yüzdesinin canlı spermelerin yüzdesinden fazla olması durumudur.
Normozoospermi	Alt referans değerlerine eşit veya yüksek sperm konsantrasyonu ve ilerleyici (Progresif-PR) harekete ve normal morfolojiye sahip spermelerin bulunması durumudur.
Oligoastenozoospermi	Alt referans değerlerinden düşük sperm konsantrasyonu ve ilerleyici (Progresif-PR) sahip spermelerin bulunması durumudur.
Oligoastenoteratozoospermi	Alt referans değerlerinden düşük sperm konsantrasyonu ve ilerleyici (Progresif-PR) harekete ve normal morfolojiye sahip spermelerin bulunması durumudur
Oligoteratozoospermi	Alt referans değerlerinde düşük sperm konsantrasyonu ve normal morfolojiye sahip spermelerin bulunması durumudur.
Oligozoospermi	Alt referans değerlerinde düşük sperm konsantrasyonunun bulunması durumudur.
Teratozoospermi	Alt referans değerlerinde düşük normal morfolojiye sahip spermelerin bulunması durumudur.

2.7.4. Normal Sperm Morfolojisinin Sınıflandırılması

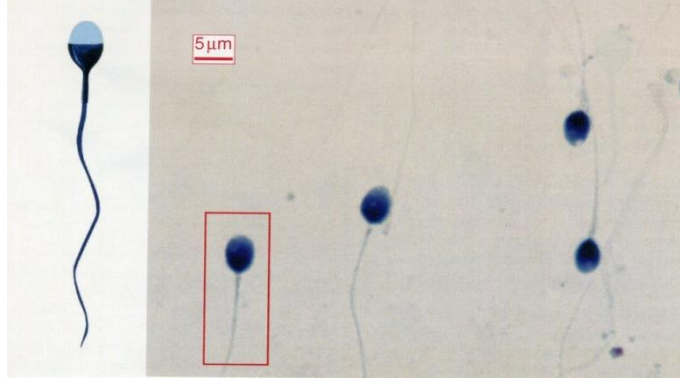
Her sperm; bir baş, orta parça ve kuyruktan oluşur. Sperm hücresinin normal sayılabilmesi için bütün kısımlarının normal olması gerekir (Şekil 2.7).

Baş; sınırları belli oval yapılı ve 4.0-5.0 μm boyunda ve 2.5-3.5 μm genişliğinde olmalıdır (Şekil 2.8). Akrozom bölgesi başın % 40-70' ini oluşturacak boyutta olması gerekir (Menkveld ve ark., 2001). Akrozom bölgesinde ya hiç vakuol bulunmamalı ya da büyük veya iki küçük vakuol içermesi halinde, bu vakuoller başın % 20' si ve daha fazlasını kaplamamalıdır. Post-akrozomal alan ise vakuol içermemelidir. Orta parça; ince, sınırları belli ve yaklaşık olarak sperm başı uzunluğunda olmalıdır. Bu parçanın ana eksenini sperm başının ana eksenine aynı hizada bulunmalıdır. Sperm başının 1/3' ünden fazlasını kaplarsa anomali sayılır (Mortimer ve Menkveld, 2001).

Kuyruk boyunca genişlik aynı olmalıdır. Kuyruk orta parçadan daha ince ve yaklaşık 45 μm uzunlukta (baş uzunluğunun yaklaşık 10 katı) olmalıdır. Kuyruktaki kıvrımlar keskin bir açı ile oluşmuyorsa anomali sayılmaz.



Şekil 2.7. Normal sperm morfolojisi şematik çizim.



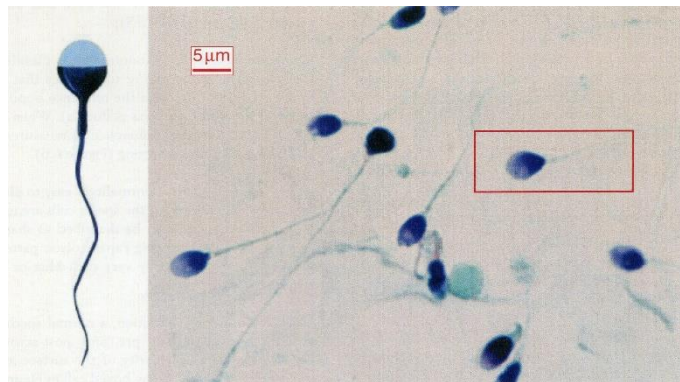
Şekil 2.8. Normal sperm (Kruger ve Franken, 2009).

2.7.5. Anormal Sperm Morfolojisinin Sınıflandırılması

İnsan semen örneği morfolojik olarak şekil bozukluğu gösteren sperm hücresi içerebilmektedir. Anormal sperm tanımlamada kullanılan defektler; Baş, Orta parça ve kuyruk defektleri olarak sınıflandırılabilir. Bu defektlerde kendi içinde alt defektlere ayrılmaktadır.

Baş Defektleri

Baş boyutları, akrozom boyutları, baş şekli ve baş bölgesinde yer alan vakuoller başlıca anomali nedenleridir. Baş defektlerine ait şematik çizim ve resimler **Şekil 2.9-2.16'** da gösterilmiştir (Kruger ve Franken, 2009).



Şekil 2.9. Makrosefalik baş defekti.



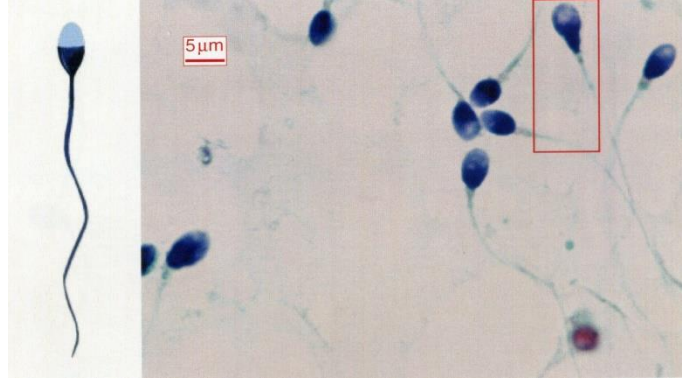
Şekil 2.10. Yuvarlak baş defekti.



Şekil 2.11. Amorf baş defekti.



Şekil 2.12. Düzensiz yüzeyli baş defekti.



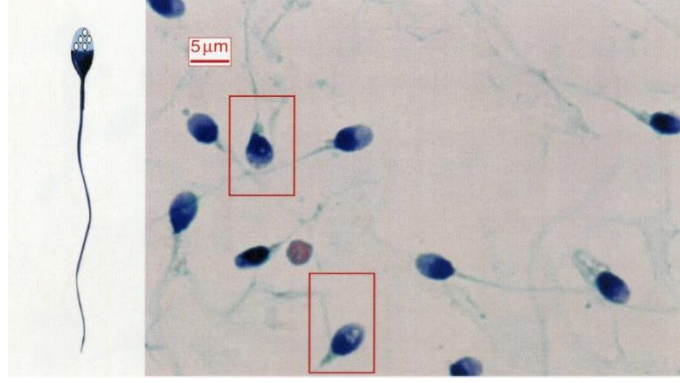
Şekil 2.13. Konik baş defekti.



Şekil 2.14. Büyük akrozomlu baş defekti.



Şekil 2.15. Küçük akrozomlu baş defekti.



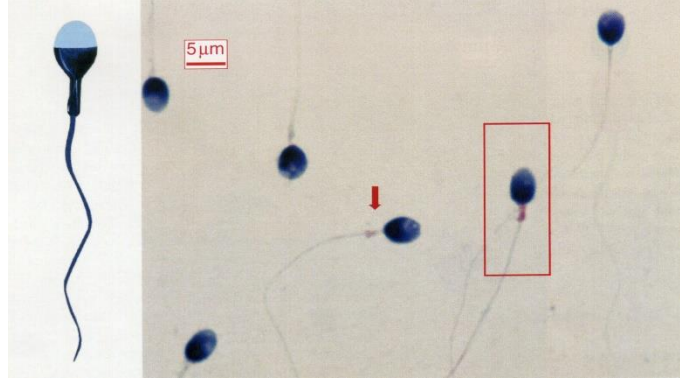
Şekil 2.16. Vakuollü baş defekti.

Orta Parça Defektleri

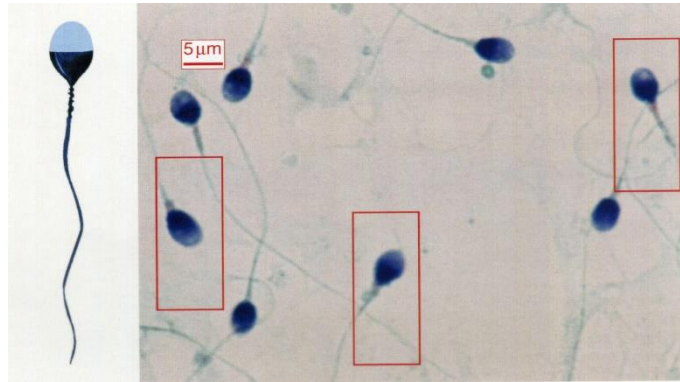
Orta parça anomalileri genellikle mitokondri, sentrioller, mikrotübüller ve büyük sitoplazmik dropletlerle ilişkilidir. Orta parça defektleri baş ve kuyruk anomalileri olarak da ortaya çıkar (Menkveld ve ark. 1990). Orta parça defektleri spermatid nukleusu ve sentriol arasında ilişkiden ortaya çıkar. Orta parça defektlerine ait şematik çizim ve resimler **Şekil 2.17-2.20**' de gösterilmiştir (Kruger ve Franken, 2009).



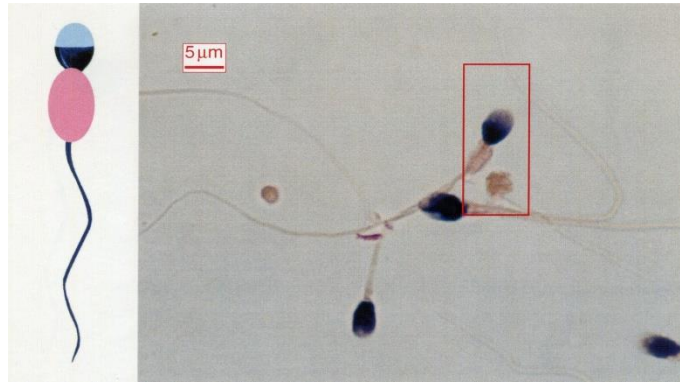
Şekil 2.17. Bükülmüş orta parça defekti.



Şekil 2.18. Kalın orta parça defekti.



Şekil 2.19. Düzensiz orta parça defekti.

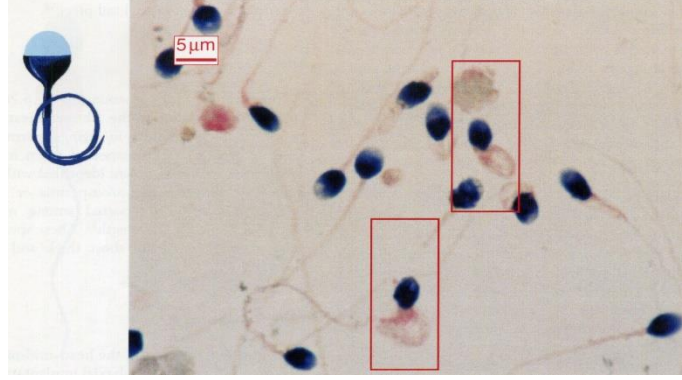


Şekil 2.20. Sitoplazmik droplet.

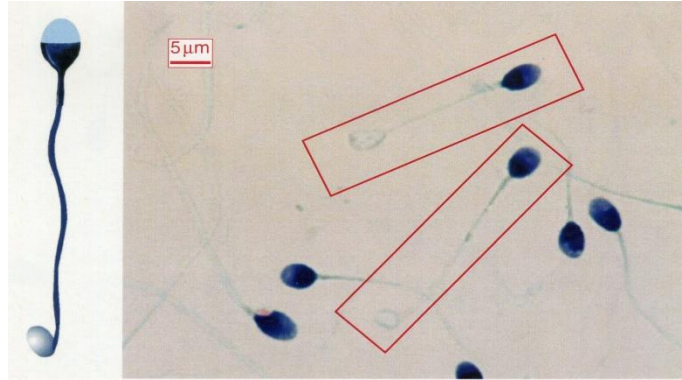
Kuyruk defektleri

Kuyruk şekli, kalınlığı, uzunluğu ve sayısındaki değişiklikler anomalilere neden olabilir. Semen içerisinde başsız (asefalik, başı toplu iğne başı) sperm hücreleri

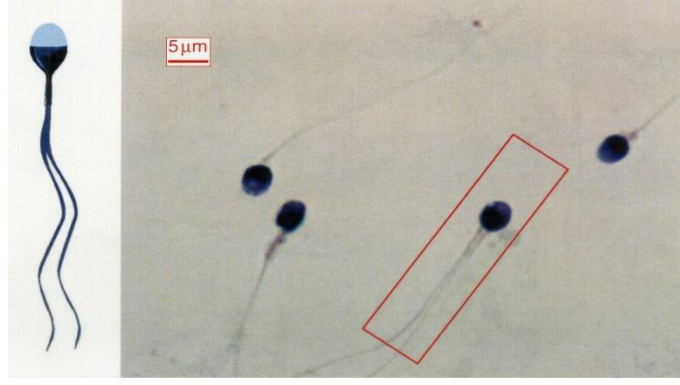
de gözlemlenmektedir (Şekil 2. 28). Başsız sperm oluşumu sentriol-kuyruk birleşmesindeki hatadan kaynaklanmaktadır. Daha sonra sperm ve kuyruk ayrılır. Başlar ayrıca sertoli hücreleri tarafından genellikle fagosite edilir (Chemes ve Rawe, 2003). Kuyruk defektlerine ait şematik çizim ve resimler Şekil 2.21-2.27' de gösterilmiştir (Kruger ve Franken, 2009).



Şekil 2.21. Kıvrık kuyruk defekti.



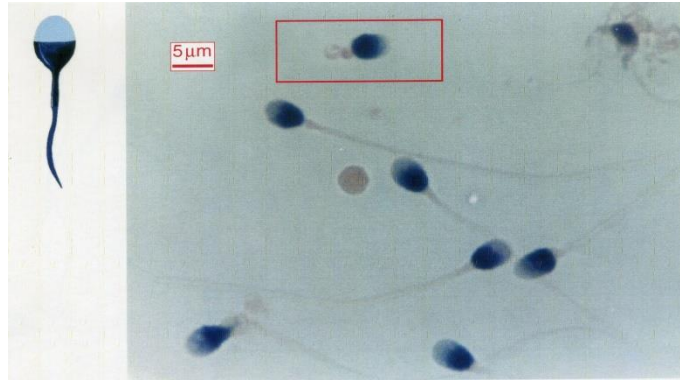
Şekil 2.22. Kuyruk ucu kıvrık defekti.



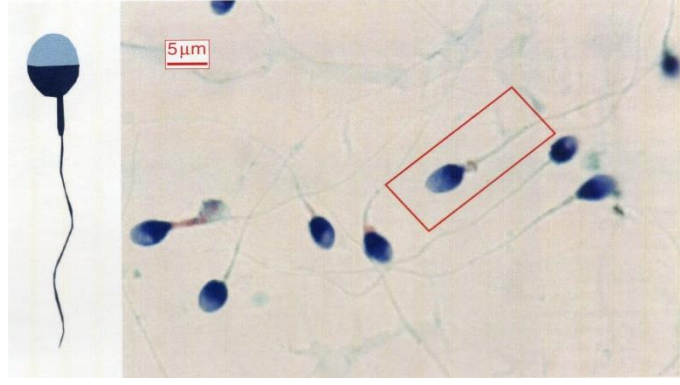
Şekil 2.23. İki kuyruk defekti.



Şekil 2.24. Kıırık kuyruk defekti.



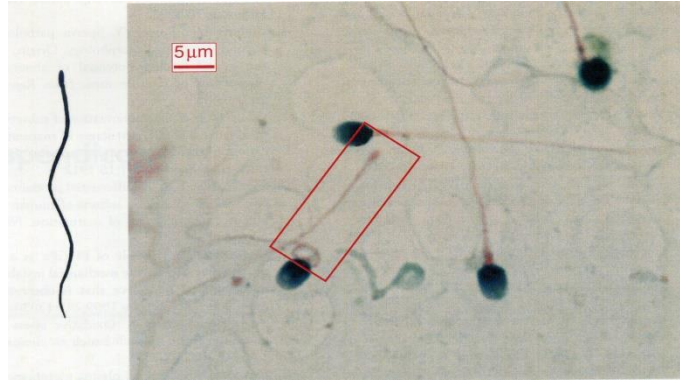
Şekil 2.25. Stumped kuyruk defekti.



Şekil 2.26. Abaxial kuyruk defekti.



Şekil 2.27. Flat kuyruk defekti.



Şekil 2.28. Başsız kuyruk (İğne baş) defekti.

2.7.6. Teratozoospermi İndeksi (TZI)

Treatozoospermi indeksi (TZI) her anormal sperm hücresinde bulunan anormal özellik sayısını göstermektedir. Her bir anormal sperm hücresi maksimum olarak baş,

orta parça, kuyruk ve sitoplazmik droplet olmak üzere 4 adet anormal özellik gösterebilmektedir (WHO, 1992). Bu anormal özellikler sperm hücresinde sadece bir tane olabildiği gibi, iki, üç veya dört de olabilmektedir. TZI hesaplaması yapılırken en az 200 adet sperm hücresinde morfoloji değerlendirilir. Tespit edilen anomali sayısı, anormal özellik gösteren sperm hücresi sayısına bölünür. Böylece anormal olan her bir sperm hücresi için ortalama anomali sayısı hesaplanmış olur. İşlemin formülü aşağıdaki gibidir (Şekil 2.29).

$$\text{TZI} = \frac{\text{Baş anomali sayısı} + \text{Orta parça anomali sayısı} + \text{Kuyruk anomali sayısı} + \text{Sitoplazmik droplet sayısı}}{\text{Anormal sperm sayısı}}$$

Şekil 2.29. Teratozoospermi indeksi formülü

TZI değerlerinde eşik değer WHO için, 1,60 iken diğer yapılan diğer çalışmada 2.09 olarak değerlendirilmiştir (WHO, 1999;Menkveld ve ark., 2001).

2.8. Sperm Hazırlama Yöntemleri

İlk olarak 1978 yılında, Üremeye Yardımcı Tedavilerden (ÜYTE) İn Vitro Fertilizasyon (IVF), ile doğum gerçekleştikten sonra bilim insanları ve hekimler androlojik durumlara dikkat çekerek sperm ayırma tekniklerinin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmışlardır. IVF ile tubal infertilite kaynaklı durumlar tedavi edilirken, erkeklerde düşen semen kalitesine bağlı olarak, semen içerisinde hareketli ve sağlıklı sperm seçme yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. İlk olarak bir veya iki yıkama prosedürü içeren sperm ayırma yöntemi kullanılmıştır (Edwards ve ark; 1969; Lopata ve ark., 1978). Daha sonra Swim-up sonrası tek yıkama yöntemi tanımlanmıştır (Mahadevan ve Baker, 1984). İnsan sperm ayırma yöntemlerinde ilk denemeler yayınlandıktan sonra hareketli ve reaktif oksijen türlerinden (ROS) arınmış sperm elde etme yönünde ayırma yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır.

Üremeye Yardımcı Tedavilerden (ÜYTE), İn Vitro Fertilizasyon (IVF) başlaması ile 1980' lerde farklı sperm ayırma yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır.

Mahadevan ve Baker (1984) klasik swim-up sonrası daha gelişmiş ve hareketli sperm sayısını arttırıcı yöntemlerden dansite gradiyent ve filtrasyon yöntemini geliştirilmiştir. Sperm ayırma yöntemlerinden dansite gradiyent ve filtrasyon yöntemi migrasyon yöntemlerinden farklılık gösterir. Migrasyon yöntemi swim-up ve migrasyon-sedimentasyon yöntemleri şeklinde alt gruplara ayrılabilir (Tea ve ark., 1984; Zavos ve ark., 2000). Dansite gradiyent yöntemi ile ayırmak için ilk olarak Ficoll® (Bongso ve ark., 1989), Nycodenz (Gellert-Mortimer ve ark., 1988) ve Percoll® (Hyne ve ark., 1986) medyumları kullanılmaktaydı. Ancak 1996 yılında Percoll® endotoksin kontaminasyonu riski taşıdığı için üretimi durdurularak androloji laboratuvarlarında kullanılması uygun bulunmamıştır.

İdeal bir sperm ayırma tekniğini; hızlı ve maliyeti düşük, en fazla sayıda hareketli sperm elde edilmeye yönelik, sperm hasarına veya spermde herhangi fizyolojik değişime neden olmayan ölü spermleri, lökosit, bakterileri ve reaktif oksijen türlerini (ROS) ayırmaya yönelik olmalıdır.

2.8.1. Basit Yıkama Yöntemi

Basit yıkama yönteminde, likefiye olan semen kültür medyumunu ile seyreltikten sonra 300g-500g arasında 10 dakika santrifüj edilir üst fazı atılır kalan pellet tekrar medyum ile santrifüj edilerek altta kalan pellet uygun kültür medyumunu hacmi ile süspansiyon haline getirir. Basit yıkama metodunda az sayıda uygulanan santrifüj basamağı sperm hücresinde ROS' a dayalı DNA hasarını en aza indirir (Bjorndahl ve ark., 2010). Artan ROS kaynaklı DNA hasarı sperm hücresinde sperm hareketini düşürdüğü, apoptotik sperm sayısının artmasına neden olduğu ve sperm membran bütünlüğünü azalttığı gösterilmiştir (Makker ve ark., 2009). Basit yıkama tekniği genellikle uygun parametrelere sahip semen için kullanılması uygundur. Bunun yanında bu teknik uygun spermlerin seçiminde kullanıldığı için intrauterin inseminasyonda (IUI) tercih edilmektedir.

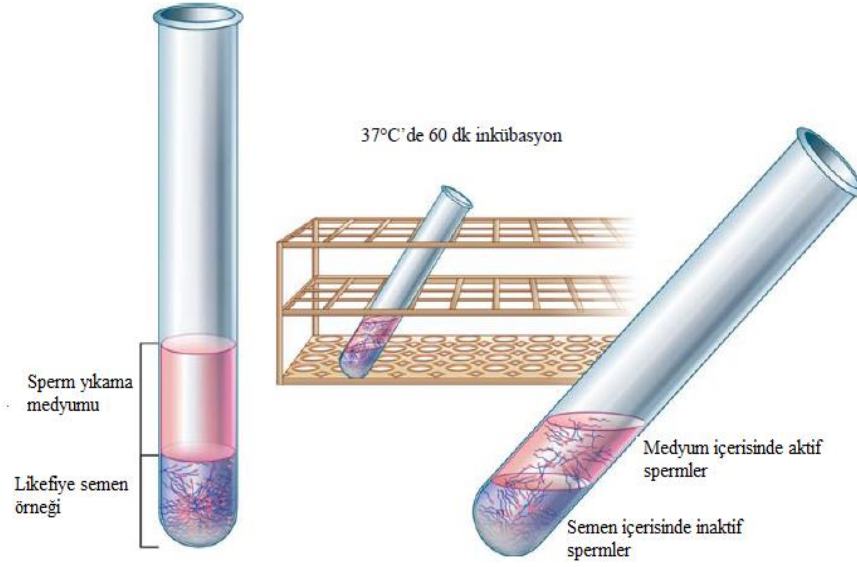
2.8.2. Swim-up Yöntemi

Swim-up sperm yıkama yöntemi çoğunlukla en çok tercih edilen tekniktir. Mahadevan ve Baker (1984) tarafında geliştirilen bu yöntem tüm IVF laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Bu yöntem hücre pelletinde ya da likefiye semende gerçekleştirilebilir. Swim-up tekniği erkeğe bağlı infertilite durumlarında çok tercih edilmemesine rağmen, normozoospermi hastalarda ve kadına bağlı infertilite durumlarında daha çok tercih edilmektedir.

Genel olarak swim-up yöntemi yıkamadan sonra elde edilen hücre pelletine uygulanır. Likefiye olan semen 15 ml' lik tüpe koyularak kültür medyumu ile 10 dakika 1600 rpm santrifüj edilir. Üstte kalan süpernatant kısmı atılarak altta kalan pellet tekrar kültür medyumu ile santrifüj edilir. Altta kalan hücre pelleti üzerine kültür medyumu edilerek 15 ml' lik test tüpü 45 derece eğimli bir şekilde 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası süpernatant kısmından hareketli spermlerin olduğu kısım alınarak kültür medyumu ile tekrar süspansiyon haline getirilerek intrauterin inseminasyonda kullanılır. Bu teknik ile elde edilen spermler yüksek harekete (> % 90) sahiptir. Aynı zamanda hücre pelletinde var olan birçok tabaka potansiyel hareketli spermin alt tabakada kalmasına ve medyum içerisine geçememesine neden olur. Ek olarak swim-up sonrası normal kromatine sahip spermlerin sayısının azaldığı gösterilmiştir (Henkel ve ark., 1994). Bu tekniğin diğer bir dezavantajı hücre pelletinde elde edildiği için burada bulunan lökosit ve hücre kalıntıları yüksek derecede reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine neden olur. Sperm hücre membranında çoklu doymamış yağ asitleri bulunduğu için ROS tarafından kolaylıkla hasara uğratılabilirler (Aitken ve Clarkson, 1987).

Ayrıca swim-up yöntemi değiştirilerek likefiye semene uygulanmıştır (Mortimer, 1994). Bu yöntemde kültür medyumu likefiye semen üzerine ya da likefiye semeni kültür medyumun altına koyulur. Daha sonra tüp 45 derece eğimli bir şekilde 37 °C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılır (Şekil 2.30). Hareketli spermler kültür medyumu içerisine yüzer. Az sayıda sperm elde edilmesine rağmen hareketi yüksek spermler elde edilir. Test tüpü içinde 250 µl semen örneği için 500-600 µl medyum koyularak 37 °C' de 30-60 dakika inkübasyona bırakılmasının ve inkübasyon sonunda

medyumun % 75 ya da % 80 toplanmasının uygun olduğu yapılan çalışmada gösterilmiştir (Mortimer, 1990).



Şekil 2.30. Swim-up yöntemi (Beydola ve ark 2013'den uyarlanmıştır).

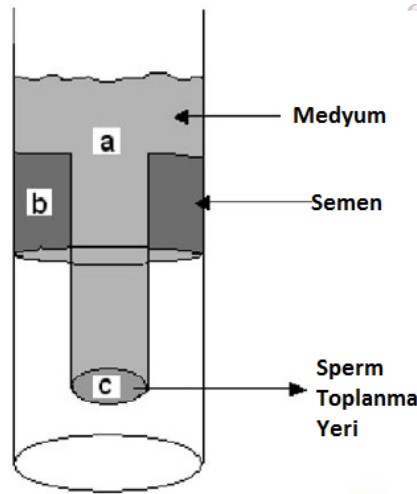
Diğer yandan hyaluronik asit ile hazırlanmış medyum (SpermSelect™, Pharmacia, Uppsala, Sweden) ile swim-up tekniği uygulanan semenden daha fazla sayıda hareketli sperm elde edilmiş ve IVF uygulamalarında hamilelik oranı arttığı gösterilmiştir (Wikland ve ark., 1987; Huszar ve ark., 1990). Uygulanan bu hyaluronik asit özellikli medyum akrozom reaksiyonlarını tetikler ancak, diğer swim-up medyumların göre daha pahalıdır (Slotte ve ark., 1993).

2.8.3. Swim-Down Yöntemi

Swim-down yöntemi sperm hücrelerinin doğal hareketine bağlıdır. Bu teknikte yoğunluğu semene göre fazla olan sığır serum albümini (BSA) içeren medyum test tüpünün alt kısmına koyularak üzerine likefiye semen örneği koyulur (Ericsson ve ark., 1973). 37 °C' de 60 dakika inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda hareketli spermeler aşağıya doğru yani medyum içerisine hareket ederler.

2.8.4. Migrasyon-Sedimentasyon Yöntemi

Daha gelişmiş sperm ayırma tekniği Tea ve ark. (1984) tarafından migrasyon-sedimentasyon yöntemi olarak geliştirilmiştir. Bu yöntem swim-up yöntemine sedimentasyon (çöktürme) basamağının eklenmesiyle oluşturulmuştur. (Tea ve ark., 194). Özel plastik veya cam malzemeden olan migrasyon-sedimentasyon tüpleri içerisinde koni benzeri yapı bulunur. (Şekil 2.31).



Şekil 2.31. Migrasyon-sedimentasyon tüpü
(Cardona Maya ve ark., 2007' den uyarlanmıştır).

Geleneksel swim-up yöntemlerinden farklı olarak bu yıkama yönteminde sperm direk olarak semenden elde edilir. Sperm 1 saat süre sonunda koninin içine yüzerler. Santrifüj basamağı gerektiren diğer yöntemlere göre migrasyon-sedimentasyon yönteminde daha dikkatli çalışılmalıdır. Bu yöntemde hareketli sperm elde edilmesine rağmen verim düşüktür. Bu yüzden IVF için uygun değildir. Ayrıca kullanılan tüpler pahalıdır (Henkel ve Schill, 2003).

Diğer yandan yapılan bazı çalışmalarda sonucu IVF için daha sağlıklı ve hareketli spermleri elde edilmesinde bu tekniğin dansite gradiyent yöntemine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (Sánchez ve ark., 1996). Ayrıca bu teknikle düşük

kalitede semenden bile yüksek verimlikte spermleri elde edilmesinde etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır (Hinting ve Lunardhi, 2001).

2.8.5. Dansite Gradyent Yöntemi

Dansite gradyent santrifüj yöntemi sperm hücrelerini kendi yoğunluklarına göre ayırmaktadır. Dansite gradyentler ya devamlı ya da kesintili şekilde olmaktadır. Devamlı gradyentler kesin sınır beli olmaz, ancak kesintili gradyentlerde kesin sınır bulunur (Henkel ve Schill, 2003). Üremeye yardımcı tekniklerinde en yaygın olarak kullanılan iki aşamalı kesintili gradyent yöntemidir. (Bjorndahl ve ark., 2010).

Bu yıkama işleme sonucunda her bir sperm yoğunluğuna göre tüp içerisinde konumlanır (Bjorndahl ve ark., 2010). Morfolojik olarak normal ve normal olmaya spermlerin farklı yoğunluğa sahiptirler. Olgun ve morfolojik olarak normal sperm 1.10 g/ml yoğunluğa sahipken, morfolojik olarak normal olmayan sperm ise 1.06-1.09 g/ml yoğunluğuna sahiptir (Oshio ve ark., 1986). Santrifüj sonrası %45 -%90 medyumda lökosit, hücre döküntüleri, anormal morfolojiye sahip spermler ile hareketi az spermler bulunur. Yüksek hareketliliğe sahip spermler ise santrifüj tüpünün içerisinde en altta pellet içerisinde bulunur. Santrifüj hızı ve zamanı ROS oluşumunu etkilemektedir. Bunun yanında ROS oluşumunu engellemek için hareketli spermleri içeren hücre pelleti bir an önce ayrılmalıdır.

Dansite gradyent yöntemi ile ayırmak için ilk olarak Ficoll® kullanılmaktaydı. (Harrison, 1976). Daha sonra polivinilpirolidon (PVP) kaplı koloidal silika partikülleri içeren Percoll® kullanılmaya başlandı (Hyne ve ark., 1986). Ancak 1996 yılında Percoll® endotoksin kontaminasyonu riski taşıdığı için üretimi durdurularak androloji laboratuvarlarında kullanılması uygun bulunmadı. Ayrıca Percoll® hücre membran yapılarını değiştirerek inflamatuvar oluşumuna neden olduğu ortaya çıkarılmıştır (Arcidiacono ve ark., 1983).

Percoll® yerine ÜYTE için 90' ların ortalarında IxaPrep® (MediCult, Copenhagen, Denmark), SilSelect® (FertiPro N.V., Beernem, Belgium), PureSperm® (NidaCon Laboratories AB, Gothenburg, Sweden) ve Isolate® (Irvine Scientific, Santa

Ana, CA, USA) tanıtılmaya başlanmıştır. Percoll®' den farklı olarak bu ürünler polivinilpirolidon (PVP) kaplı kolloidal silika partikülleri içermek yerine silan kaplı kolloid silika partikülleri içermekte ve düşük toksisite özelliğine sahiptirler.

Daha önce yapılan bazı çalışmalar Percoll® ve PureSperm® kullanılan yıkamalar arasında önemli bir fark olmadığını göstermiştir (Söderlund ve Lundin, 2000). Diğer yandan farklı çalışmada PureSperm® ile daha fazla hareketli sperm elde edildiği gösterilmiştir (Chen ve Bongso, 1999).

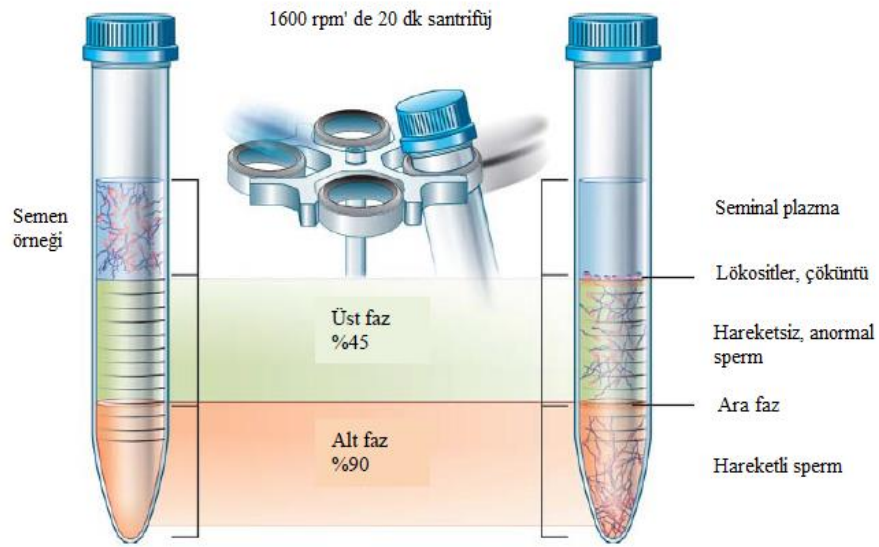
Üremeye yardımcı tekniklerinde en yaygın olarak kullanılan iki aşamalı kesintili gradiyent yönteminde 1 ml % 40 (v/v) dansite gradyan medyumunu 1 ml % 80 (v/v) dansite gradyan medyumuna üzerine yayarak bir test tüpü içinde dansite gradyan medyumunu hazırlanarak üzerine 1 ml semen numunesi koyulur. 15–30 dakika 300–500 g'de santrifüjlendikten sonra Sperm pelletinden süpernatanın (üst fazın) çoğunu atılır (Şekil 2.32). Pellet 5 ml takviyeli medyum ile yeniden süspansiyon haline getirilip ve 4–10 dakika 200 g'de santrifüjlenir. Son oluşan pellet 0,5 ml kültür medyumuna içinde süspansiyon haline getirilir (WHO, 2010).

2.8.6. Cam Yünü Filtrasyon Yöntemi

Cam yünü filtrasyon yöntemi hareketli spermleri hareketsiz spermlerden ayırmak için cam yünü kullanılması şeklinde tanımlanmıştır (Paulson ve Polakoski, 1977). Bu teknik spermin cam yününden kendi hareketine bağlıdır. Cam yünü filtrasyon yönteminde sperm eldesinin başarısı kullanılan cam yünü özelliğine bağlıdır (Sánchez ve ark., 1999). Bu yüzden cam yünü'nün kimyasal yapısı, yüzey gerilimi, cam yünü por aralığı filtrasyonu etkilemektedir.

Cam yünü filtrasyon yöntemi swim-up ve migrasyon yöntemi ile karşılaştırıldığında hareketli sperm sayısı daha fazladır (Berger ve ark., 1985). Bu yüzden oligozoospermi ve astenozoospermi hastalarında kullanılmaktadır. Ayrıca cam yünü filtrasyon yöntemiyle % 90 oranında lökosit ayırdığı gösterilmiştir (Henkel ve ark., 1997). Cam yünü filtrasyon ile seçilen spermde, normal kromatin kondensasyonu gösterdiği bulunmuştur (Henkel ve ark., 1994). Bu yöntemde özel cam yünü 2 ml' lik

bir enjektör içine 6-7 mg tartılarak koyulur ardından 4-5 ml kültür solüsyonu ile yıkanır. Daha sonra ıslatılmış cam yünü üzerine maksimum 2 ml likefiye semen eklenerek 37 °C’ de 5 dakika boyunca süzülmesi beklenir. Ardından 400 µl kültür solüsyonu yardımı ile cam yünü içerisinde kalmış semeninde süzülmesi sağlanır ve süzülen tüm semen 1/3 oranında kültür solüsyonu ile sulandırılarak 300g’de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant atıldıktan sonra pellet medyum içerisinde tekrar süspansiyon edilerek kullanılır.



Şekil 2.32. Dansite gradiyent yöntemi (Beydola ve ark 2013'den uyarlanmıştır).

2.8.7. Cam Boncuk Yöntemi

Cam boncuk kolon yöntemi ilk olarak ölü ve canlı spermleri ayırmak için kullanılmıştır (Bangham ve Hancock, 1955; McGrath ve ark., 1977). Bu yöntem daha sonra hamster sperm hücrelerinde in vitro olarak kapasitasyonda kullanılmıştır (Lui ve ark., 1979). Diğer yandan insan sperm hücrelerinde hareketli sperm seçiminde bu teknik ile yüksek verim elde edilmiştir (Daya ve ark., 1987). Bu teknikte likefiye olan ve 1:1 oranında medyum ile sulandırılan semen örneği içerisinde altta 5 mm üstte ise 0.075-0.15 mm boyutlarında ve 1 gr cam boncuklar bulunan pipet içerisine koyularak 37 °C’

de sperm ayırma işlemi gerçekleştirilir. Yapılan çalışmalara rağmen üreme yardımcı teknikler için kullanılan sperm hazırlama yöntemi olarak kabul edilmemektedir.

2.8.8. Sephadex Kolon Yöntemi

Sperm hazırlama yöntemlerinden diğer biri 90'lı yılların başında geliştirilen sephadex kolon yöntemidir (Drobnis ve ark., 1991). Ayrıca bu teknik ticari olarak satılan (SpermPrep®) kitin çalışma prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem swim-up ve migrasyon-sedimentasyon yöntemi ile karşılaştırıldığında pellet haline gelmiş semenden elde edilen verim daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Gabriel ve Vawda, 1993). Diğer yandan geleneksel swim-up yöntemiyle karşılaştırıldığında elde edilen gebelik oranının daha yüksek olduğu bulunmuştur (Zavos ve Centola, 1992). Yine yapılan diğer bir çalışmada percoll gradiyent ayırma yöntemine göre normal kromatin kondensasyonu gösteren sperm sayısının daha fazla olduğu bu yöntemde gösterilmiştir (Hammadeh ve ark., 2001).

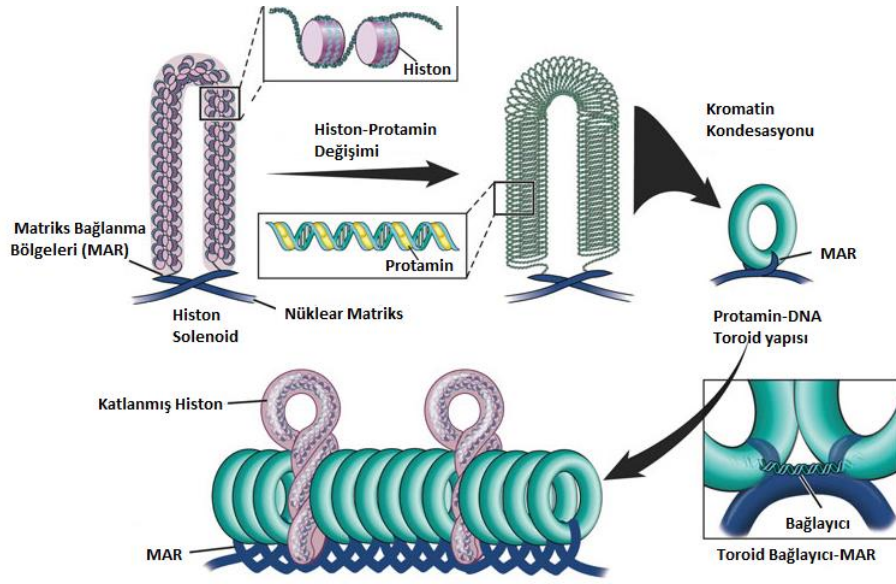
2.9.Sperm DNA Yapısı

Somatik hücrelerin aksine, sperm DNA yapısı özel protein yapısı ile sıkıca paketlenmiştir. İnsanlarda sperm DNA yapısı üç temel bölümde incelenmektedir (Şekil 2.33). Birinci bölüm, sperm DNA yapısı protaminler tarafından toroidler şeklinde sarmal halindedir. İkinci bölüm, daha küçük DNA parçası ise histonlara bağlıdır. Üçüncü olarak, kalan DNA yapısı sperm nükleer matriksine yaklaşık 50 kb aralıklarla MAR (Matriks Bağlanma Bölgeleri) bölgelerinden bağlanır (Ward, 2010).

Spermde bulunan protamin bağlı DNA yapısından dolayı sperm DNA'sı diğer hücrelere göre daha fazla korunmaktadır. Protaminlerde bulunan pozitif arjinin bağlanma bölgeleri DNA yapısında fosfodiester bağlanma bölgelerini nötralize ederek bağlanır. Sonuç olarak sperm DNA'sı toroid yapısını kazanır (Ward, 2010). Sperm DNA'sında % 12-20' lik kısım histonlara bağlı kalan bölgelerdedir. Bu bölgeler rastgele seçilmezler, genlerin promotor bölgelerinde görülmektedir. Spermiyogenez ve fertilizasyon sonrası gelişim için önemli genler bu protaminle değişmeyen

bölgelerde bulunur (Hammoud ve ark., 2009). Sperm DNA yapısı 20-120 kb aralılarla MAR ile matriks kısmına bağlanır. Bu bölgeler DNA replikasyonu ve gen ifadesi için özel bölgelerdir (Sharma ve ark., 2007).

Yapısında bulunan özel histon ve MAR bölgeleri sperm DNA' sının embriyo gelişmesinde önemli olduğunu göstermektedir. Bu nedenler ÜYTE'te uygulanan yöntemlerde sperm DNA bütünlüğü göz önüne alınmalıdır. (Agarwal ve Singh, 2012).



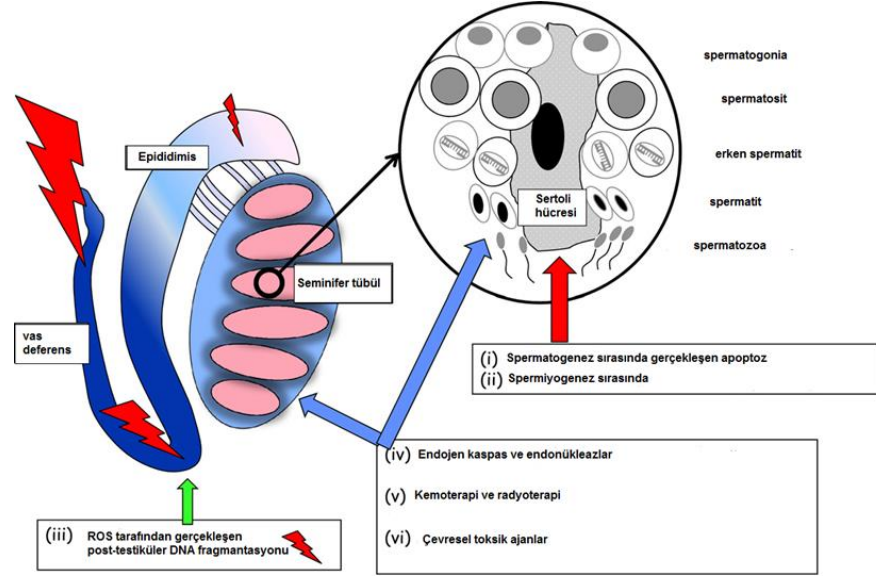
Şekil 2.33. Sperm DNA yapısı (Agarwal ve Singh, 2012' den uyarlanmıştır).

2.10. Sperm DNA Hasarı

Spermatozoada DNA hasarı, hem mitokondrial DNA hem de nükleer DNA' yı etkilemektedir. DNA hasarı altı farklı faktör tarafından tetiklenmektedir (Şekil 2.34).

- 1- Spermatogenez sırasında gerçekleşen apoptoz ile gerçekleşir.
- 2- Spermioyenez sırasında kromatininin yeniden düzenlenmesi sırasında gerçekleşir.
- 3- Epididimis ve seminifer tübüllere sperm taşınması sırasında hidroksil radikal ve nitrik oksit gibi oksijen radikalleri tarafından post-testiküler DNA hasarı oluşması ile gerçekleşir.

- 4- Endojen kaspas ve endonükleazlar tarafından spermatozoada DNA hasarı oluşturması ile gerçekleşir.
- 5- Kemoterapi ve radyoterapi sırasında gerçekleşir.
- 6- Çevresel toksik ajanlar tarafından gerçekleşir.



Şekil 2.34. Sperm DNA hasarı temel mekanizmalar (Sakkas ve Alavarez, 2010' dan uyarlanmıştır).

Bu etkenlerden en önemli rol alan ise; epididimis sperm taşınması sırasında post-testiküler DNA hasarıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda DNA fragmentasyonunun testis içinde bulunan spermatozoaya göre epididimisin kaudal bölgesi ile semen içerisinde bulunan spermatozoada daha fazla olduğu gösterilmiştir (Ollero ve ark., 2001; Greco ve ark., 2005).

Spermatogenez sırasında apoptoz olayının % 50-60' ından sertoli hücreleri sorumludur. DNA hasarı tespit edilen üreme hücreleri erken evrelerde fagosit edilmektedir. Ancak bazı durumlarda sertoli hücreleri tarafından apoptoz edilmesi gereken hücreler spermatogenez sürecinden geçer ve semen içerisine kadar ulaşır (Billig ve ark., 1996). Spermiyonegez sırasında da histon-protamin değişimini sırasında DNA hasarı oluştuğu gösterilmiştir (Marcon ve ark., 2004).

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Oksidatif stres (OS), reaktif oksijen türleri (ROS) ve onların antioksidanları arasındaki dengesizlikten oluşmaktadır. Antioksidanlar; enzimatik veya nonenzimatik yolla ROS' a karşı savunma gerçekleştirmektedirler. Süperoksit dismutaz, katalaz, glutation peroksidaz başlıca enzimatik antioksidanlardır. Vitamin E ve C ise nonenzimatik antioksidanlardır.

Oksijen metabolizması sırasında oluşan süperoksit radikali, hidrojen peroksit, ve hidroksil radikalleri, reaktif oksijen türleridir. Fazla miktarda ROS varlığı oksidatif stres yaratarak, protein, lipid ve DNA' da hasar oluşturmaktadır. Sperm hücresi de diğer tüm aerobik hücreler gibi ROS' a karşı dengede kalmaya çalışmaktadır. Yapılan çalışmalarda inferil erkeklerde % 40 oranında daha fazla ROS tespit edilmiştir. (Iwasaki ve ark., 1992). Bu durum infertil erkeklerde ROS ile infertilite arasındaki ilişkinin önemini ortaya koymaktadır.

Oksidatif stres ile erkek üreme sistemi arasındaki ilişki ilk kez 1943 yılında tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada aerobik koşullarda inkübasyona bırakılan sperm hücrelerinin hareketinin katalaz enzimi aktivitesi ile oluştuğu gösterilmiştir. Bu durum sperm hücrelerinin normal metabolizması içinde az miktarda ROS ürettiğini kanıtlamıştır (MacLeod, 1943). Spermatogenez sırasında düşük seviyede üretilen serbest radikallerin sperm kapasitasyonu için gerekli olduğu bilinmektedir. Hidrojen peroksidin akrozom reaksiyonu ve sperm hiperaktivasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (De Lamirande ve Gagnon, 1993).

Semen içinde ROS kaynağı lökositler ve sperm hücreleridir. Daha önce yapılan çalışmalarda, Lökositospermide düşük semen kalitesi, hareketi ve defektif fertilizasyon tespit edilmesi bu durumu desteklemektedir (Saleh ve ark., 2002; Moskovtsev ve ark., 2007).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda yüksek seviyede ROS üreten immatür spermlerin olgun spermlerde DNA hasarına neden olduğu ve bu hasarın epididimis ve seminifer tübüllere hareketi sırasında da oluştuğu ortaya koyulmuştur (Ollero ve ark.,

2001). ROS, DNA hasarını doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir. Sperm ayırma tekniklerinde kullanılan santrifüj metodu immatür sperm ve olgun sperm yakın ilişkili olduğu için ROS ile doğrudan spermde DNA hasarı oluşmasına neden olmaktadır (Twiggs ve ark., 1998). Ayrıca ROS dolaylı olarak endojen kaspas ve endonükleazları etkileyerek DNA hasarı oluşmasına neden olabilmektedir. ROS etkili DNA hasarlarını ortadan kaldırmak için antioksidanlar kullanılmaktadır. Daha önce yapılan çalışmada, antioksidan kullanımının sperm DNA hasarını azalttığını gösterilmiştir (Greco ve ark., 2005).

Fare sperm hücresi ile yapılan çalışmalarda 40 °C’ de tutulan spermelerde DNA fragmentasyonunun arttığı gösterilmiştir. İnsan spermeleri fare spermelerinden farklı olarak DNA paketlenmesi düşük protaminden dolayı daha heterojendir. Bu yüzden yüksek sıcaklıklarda insan spermi daha kolay etkilenir (Bianchi ve ark., 1993). Ayrıca, çevresel toksik ajanlardan hava kirliliğine maruz kalan insanlara DNA fragmentasyonunun daha fazla olduğu ortaya koyulmuştur (Rubes ve ark., 2007).

2.11. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri

Geçen 20 yıl içinde sperm DNA fragmentasyonu tespiti için birçok test geliştirilmiştir. Bu yöntemler; Sperm kromatin yapısı tayini (SCSA), TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling), Akridin turuncu testi (AOT), Toluidin mavisi (TB), Anilin mavisi (AB), Tek hücre jel elektroforezi (COMET), Sperm kromatin ayrılma testi’dir (Halosperm SCD).

2.11.1. Sperm Kromatin Yapısı Tayini (SCSA)

SCSA testi anormal sperm DNA’ sının ısı veya asite maruz bırakılması sonucu gerçekleşen denatürasyon oluşması prensibine dayanmaktadır (Evenson ve ark., 2007). Bu testte akridin turuncusu eklendikten sonra oluşan denatürasyon sonucu renk değişimi gözlenmektedir. Bu renk değişimi eklenen asit ile yeşilden kırmızıya gerçekleşir. Değerlendirme akım sitometrisi ile yapılmaktadır (Darzynkiewicz ve ark., 1975). Elde edilen DNA fragmentasyon indeksi ‘DFI’ olarak gösterilmektedir.

2.11.2. TdT-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

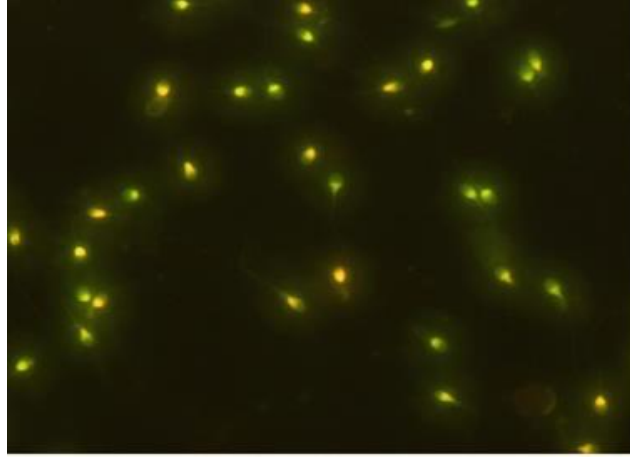
TUNEL testi DNA hasarını tespit etmede SCSA testinden sonra en sık kullanılan yöntemdir. Bu testte DNA hasarından ziyade DNA kırıkları tespit edilmektedir. İşaretlenen DNA kırıkları İşaretlenen bu kırıklar ışık mikroskobu floresan mikroskobu veya akım sitometrisi ile ölçülür (Gorczyca ve ark., 1993). Elde edilen spermeler TUNEL pozitif ya da negatif olarak sınıflandırıldıktan sonra total sperm sayısına oranlanarak değerlendirilmektedir.

2.11.3. Akridin Turuncusu Testi (AOT)

Akridin turuncusu özellikle DNA üzerine etkili sitokimyasal bir boyadır. Bu boya floresan mikroskop görüntülemelerinde kullanılmaktadır (Şekil 2.35). Akridin turuncusu genetik materyalde DNA ve RNA' ya bağlanarak sperm kromatin denatürasyonunu yansıtmaktadır. AOT boyamada normal çift sarmallı DNA' ya bağlandığında yeşil, tek zincirli denatüre DNA' ya bağlandığında kırmızı renk oluşur (Ichimura ve ark., 1971). AOT boyama, çift sarmallı DNA ve tek zincir DNA arasında metakromatik boyama özelliğine dayanan ucuz ve kolay bir yöntemdir (Tejada ve ark., 1984;Virant-Klun ve ark., 2001). Bu yöntemde floresan mikroskopta renklerin çabuk kaybolması testin negatif yönünü ortaya koymaktadır.

2.11.4. Anilin Mavisi (AB)

Asidik bir boya olan anilin mavisi boyanma yönteminde lizin ve arjinin yönünden zengin histonların ayrılmasını sağlamaktadır. İmmatür sperm hücrelerinde lizin yönünden zengin histon proteinleri mavi renk ile boyanırken, olgun sperm hücrelerinde düşük lizin içeren histon proteinlerinden dolayı mavi boyanmaz (Hammadeh ve ark., 2001). Anilin mavisi boyanma yönteminde ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirme yeterlidir.

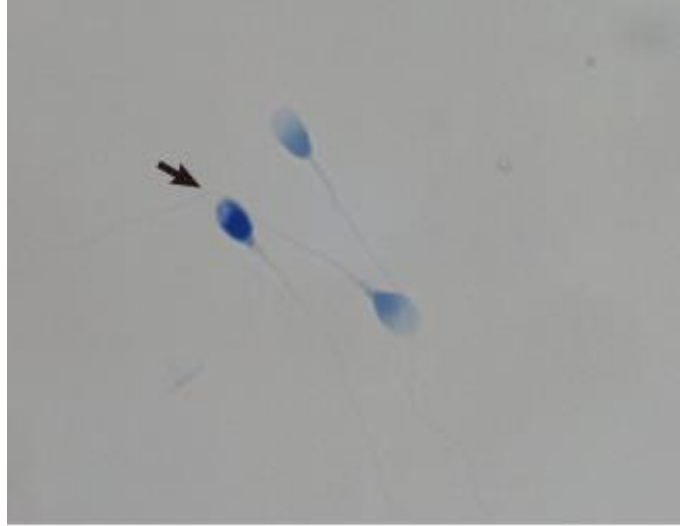


Şekil 2.35. İnsan sperm hücresinde AOT ile floresan mikroskopta görüntüsü (Evenson, 2011).

2.11.5. Toluidin Mavisi (TB)

Toluidin boyama kromatin yapısını metakromatik boyanma özelliği sağlamaktadır (Şekil 2.36). Bu boya sıkı paketlenmemiş kromatin veya hasarlı DNA'ya sahip sperm hücresinde fosfat rezidülerini boyar. Sperm hücreleri bu boyama yönteminde ışık mikroskobu değerlendirmelerinde metakromatik özellik gösterdiği için açık mavi ve mor menekşe görüntüsü gösterir (Erenpreiss ve ark., 2001). Anormal DNA'ya sahip spermiler koyu mavi veya mor renkte boyanırken, normal DNA'ya sahip spermiler yeşil veya açık mavi renkte boyanmaktadır (Erenpreiss ve ark., 2004). TB boyama yönteminin güvenilirliği az olmasına rağmen AOT boyama yöntemi ile karşılaştırıldığında sonuçların benzerlik gösterdiği bulunmuştur Ayrıca SCSA ve TUNEL teknikleri ile benzerlik gösterdiği ortaya koyulmaktadır (Erenpreiss ve ark., 2004).

TB boyama yöntemi ucuz ve kolay bir yöntem olmasının yanında, ışık mikroskobu ile incelenen preparatlar kalıcı olmaktadır. Bunu yanında TB yöntemi ile boyanan smear örnekleri morfoloji değerlendirmesinde de kullanılabilir. Ancak yapılan incelemeler, kişiler arasında farklılık gösterebilmektedir (Tsarev ve Erenpreiss, 2011).



Şekil 2.36. İnsan sperm hücresinde toludin mavisi boyanma görüntüsü (Kim ve ark., 2013).

2.11.6. Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET)

Tek hücre jel elektroforezi sperm hücresinde DNA hasarını tespit etmede en etkili yöntemlerden bir tanesidir. Bu yöntemde hem tek hem de çift zincir DNA hasarı tespit edilmektedir. Yoğunluğu azaltılmış spermeler agaroz jele yüklenir ve floresan özellikli boya ile yürütülür. DNA hasarı olan spermelerde kuyruklu yıldız görüntüsü oluşurken, bozulmamış DNA içeren spermeler hareket etmez. İlk olarak COMET yöntemi nukleus yapısını tanımlamak için kullanılmıştır (Cook ve ark.,1976). Daha sonra yapılan alkalın jel elektroforezine maruz bırakılan spermelerde kuyruklu yıldız görüntüsü olanlarda tek zincir DNA hasarı tespit edilmiştir (Collins ve ark., 1997). Çift zincir DNA hasarı tespit edilen spermelerin nötr ortama maruz bırakılması gerektiği öngörülmüştür (McVicar ve ark. 2004). Ancak yapılan karşılaştırma sonucu alkalın ortama maruz bırakılan spermelerde nötr ortamdaki spermelerden daha fazla DNA hasarı olduğu tespit edilmiştir (Angelis ve ark., 1999). Daha önce yapılan çalışmalarda COMET yöntemi ile TUNEL testi sonuçları karşılaştırıldığına sonuçların benzer olduğu gösterilmiştir (Aravindan ve ark., 1997).

2.11.7. Sperm Kromatin Ayırma Testi (HoloSperm, SCD)

Sperm kromatin ayırma testi, çabuk sonuç veren ve pahalı laboratuvar ekipmanları ihtiyaç duyulmayan bir testtir. Son zamanlarda Bu testin ticari versiyonu olan HoloSperm® (Halotech, Madrid, Spain) kullanılmaktadır. Bu testte denatüre olması için agaroz jele denatürasyonu sağlayan solüsyon eklendikten sonra sperm hücresi membranı ve proteinleri uzaklaştırmak için lizis tampon eklenir. Bu işlem sonrasında sağlam DNA içeren sperm hücrelerinde DNA etrafında tipik halo görüntüsü oluşur. fragmente DNA sperm hücrelerinde ise küçük halo görüntüsü verir ve ya hiç halo görüntüsü oluşmaz (Fernandez ve ark., 2005).

2.12. İnfertilite

İnfertilite, dünya çapında on çiftten birinde ortaya çıkan sağlık problemi olmaya başlamıştır (Boivin ve ark., 2007). Yaklaşık olarak 4.8 milyon çift korunmasız ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamamaktadır (Martinez ve ark., 2006). İnfertilite problemlerinin yaklaşık % 50' si erkek faktörlüdür. Dünya çapında farklı bölgelerde erkek faktörlü infertilite problemlerinin görülme sıklığı % 2.5-12 arasında değişiklik göstermektedir (Agarwal ve ark., 2015).

Son 50 yıl içinde yapılan çalışmalardan bazıları erkek semen kalitesinin yıllar içinde azaldığını gösterirken, bazı çalışmalarda ise herhangi bir değişim olmadığını göstermiştir. Yapılan bir çalışmada 1938-1990 yılları arasında sperm sayının her yıl % 1 oranında azaldığı gösterilmiştir (Carlsen ve ark., 1992). Diğer bir çalışmada ise Amerika Birleşik Devletlerinde bu azalma oranının her yıl % 1,5, Avrupa' da ise % 3 olduğu, batılı olmayan ülkelerde ise herhangi bir değişim olmadığı bulunmuştur (Swan ve ark., 1997). Yapılan diğer bir çalışmada yıl olarak daha erken doğan erkeklerin semen parametreleri karşılaştırıldığında, azalma olduğu tespit edilmiştir (Jorgensen ve ark., 2011). Yapılan çalışmaların kapsadığı yıllarda testis kanserinde meydana gelen artış, bu durumun etkilerini ortaya koymuştur (Schmiedel ve ark., 2003; Huyghe ve ark., 2003). Ayrıca yıllar içinde semen kalitesinin azaldığı görüşünü destekleyenler, bu durumun yaşanan coğrafi konumda görülen değişikliklerle ilgili olabileceğini savunmaktadır (Skakkebaek ve ark., 2006).

Erkek semen parametreleri ile ilgili yapılan çalışmalarda cinsel perhiz sürelerinin farklılığı veya analizin yöntemi ve yapan teknisyenin farklılığı savunulan görüşün doğrululuğunu etkilemektedir (Agarwal ve ark., 1995; Auger ve ark., 2000). Ayrıca çalışmalarda erkeklerin yaş durumu, çalışmaya katılan sayısı, mevsimsel durumlar göz önüne alınmalıdır. Örneğin daha önce yapılan çalışmada semen kalitesinin bahar döneminde arttığı, yaz döneminde ise azaldığı gösterilmiştir (Gyllenborg ve ark.,1999).

Erkek genitöüriner fonksiyonlardaki bozulma genetik faktörlerden çok çevresel faktörlerle ilişkilidir. Örneğin; coğrafik konumdaki değişiklik, hava kirliliği, endüstriyel atık/ağır metal üreme sistemini olumsuz etkilemektedir. Ayrıca sigara içme, kafein ve alkol tüketme gibi kişisel yaşam özellikleri de erkek üreme sistemini etkilemektedir. Tüm bunların yanında kanser, kriptorşidizm gibi daha bir çok faktörün erkek üreme sistemini üzerine etkili olduğu bilinmektedir (Chia ve ark., 2010).

Semen analizi ile ilgili yapılan çalışmalarda infertilite durumları değerlendirilirken, yaşam kalitesini etkileyen sigara veya uyuşturucu kullanma durumu göz önüne alınmalıdır. Sigara içme durumunun semen kalitesini olumsuz etkilediği bilinmektedir (Sadeu ve ark., 2010). Sigarada bulunan nikotin, serbets radikallari üretmektedir (Traber ve ark., 2000). Sigara içen erkeklerde, sigara içmeyenlere göre seminal oksidatif stres daha fazladır ve semen içerisinde bulunan lökosit sayısı artmaktadır (Close ve ark., 1990). Bunun yanında sigara içenlerde sigarada bulunan karsinojen ve mutajenlerden dolayı DNA hasarı yüksek seviyede bulunmuştur (Potts ve ark., 1999).

Ancak bazı çalışmalarda sigara kullanımının semen parametreleri ve erkek üreme sistemi üzerine olumsuz etkisi olmadığı savunulmaktadır. Yapılan bir çalışmada sigara kullanımını semen parameterlerini değiştirmediği ancak yuvark hücre sayısını ve lökosit sayısını arttırdiği gösterilmiştir (Trummer ve ark ., 2002). Benzer olarak sigara içenin spermatogenez üzerine olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir (Holzki ve ark., 1991).

2.13. Çevresel Faktörler ve İnfertilite

Çevresel faktörlerin, spermatogenez üzerine etkilerini tam olarak tespit etmek oldukça zordur. Geçtiğimiz 10 yıl içinde, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelere kimyasal endüstride meydana hızlı gelen gelişim, doğada fazla miktarda ksenobiyotik olmasına neden olmuştur. Ksenobiyotikler, biyolojik sisteme zararlı; pestisit, herbisit, kozmetik ürünler ve temizlik maddeleri gibi yabancı moleküllerdir. Kimyasal toksisite son zamanlarda artmakta ve hatta meydana gelen zararlı etkileri uzun yıllar sonra bile karşımıza çıkmaktadır.

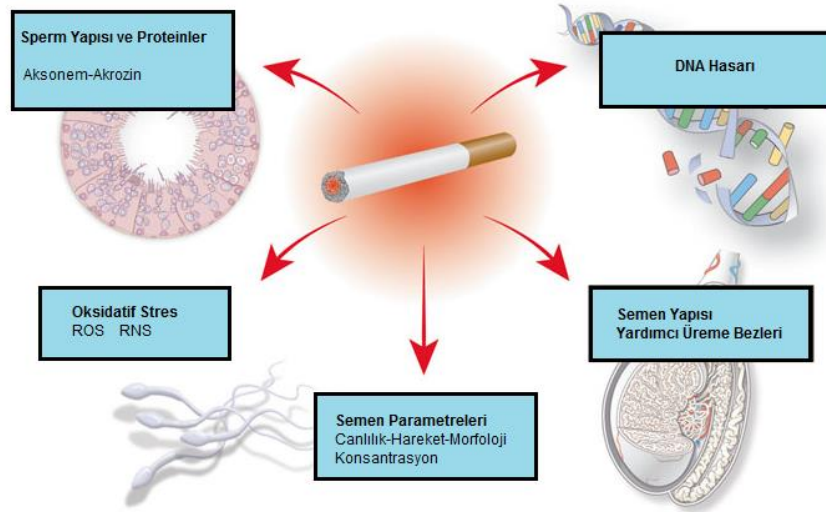
Radyasyon gibi ksenobiyotikler olgun testis içinde direk olarak erkek üreme hücrelerini etkilemektedir. Diğer bir deyişler erkek üreme hücrelerini üreten kök hücrelerde meydana gelen tamir mekanizmaları sayesinde en düşük DNA hasarı oluşan hücrelerdir (Hill ve ark., 2004). Ancak spermatogenez sırasında, sperm hücreleri epididimis içinde 2-12 gün, dişi üreme sisteminde ise 2 gün kalabilir. Bu zamanlarda sperm hücreleri DNA hasarına karşı en duyarlıdır (Aitken ve Sawyer, 2003). Bunun yanında ksenobiyotikler sadece erkek üreme sisteminde değil aynı zamanda dişi üreme sisteminde bozukluklara neden olarak, doğan erkek bireylerde testiküler disgenезis sendromuna neden olmaktadır. Buna bağlı olarak gelecek yaşamda; düşük semen kalitesi, testis kanseri, hipospadias gibi hastalılara neden olmaktadır. (Fisher ve ark., 2003).

Daha önce yapılan çalışmalarda, ağır metal, organik çözücüler ve pestisit gibi maddelerin gonadotoksisite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu maddeler, direk olarak seminifer tübül ve hipotalamo-hipofizer-gonadal eksene etki ederek, sperm hareket ve sayısının azalmasına, sperm morfolojisi üzerine etki ederek infertiliteye neden olmaktadır (Kumar, 2004).

Hava kirliliğine bağlı olarak üretilen ROS, düşük semen kalitesine neden olan önemli bir faktördür. Hava kirliliğine daha fazla maruz kalan erkeklerle yapılan çalışmada; kanda methemoglobininin arttığı, semen kalitesinin ise düştüğü gözlemlenmiştir (De Rosa ve ark., 2003). Ayrıca kadın bireylerde ise hava kirliliğine bağlı olarak hamilelikte düşükler gözlenmiştir (Sallmen ve ark., 2000).

2.14. Sigara Kullanımı ve Erkek İnfertilitesi

Sigara kullanmanın; yaşam süresine, solunum fizyolojisine, kardiyovasküler fizyolojiye ve genel sağlık durumuna olumsuz etkisi kanıtlanmıştır. Ancak erkek infertilitesi üzerine olumsuz etkisi tam olarak gösterilememektedir. Dünya popülasyonunun üçte biri sigara kullanmakta ve sigara kullanan erkeklerin çoğu ergenlik döneminde. Amerika’ da erkeklerin % 30’ u kadınların ise % 35’ i sigara kullanmasına rağmen, sigara kullanımı ile erkek infertilitesi arasındaki ilişki tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, yapılan çalışmalarda sigara kullanımının infertilite oluşmasında risk oluşturduğu görüşü kabul edilmektedir (ASRM, 2008). Sigara kullanımı erkek üreme sistemi ile ilgili birçok fonksiyonu etkilemektedir (Şekil 2.37).



Şekil 2.37. Sigara kullanımının erkek infertilitesi üzerine etkisi (Haque ve ark., 2014’den uyarlanmıştır).

Sigara dumanı iki faza ayrılmaktadır. Bunlar partiküler faz ve gaz fazıdır. Nikotin ve katran partiküler fazda bulunurken, karbonmonoksit ise gaz fazda bulunur. Radyoaktif polonyum, bezopiren, dimetilbenzen, naftalin, kadmiyum (Cd) gibi karsinojen ve mutajenler, sigarada bulunmaktadır (Colagar ve ark., 2007). Günde 20 adetten fazla sigara içenlerde semen içerisinde yüksek seviyede Cd tespit edilmiştir. Cd seviyesinin ise direk olarak sperm sayısı ve hareketi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Saaranen ve ark., 1989). Sigara kullanma durumu ise aktif ve pasif içicilik olarak

ikiye ayrılmaktadır. Aktif sigara içenler direk olarak, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri gibi yüksek seviyede ROS' a maruz kalırlar. (Saleh ve ark., 2002). Bunların yanında, N-nitrozamin (TSNA), N'nitrosornikotin (NNN) gibi karsinojenlerden etkilenmektedirler. Son olarak DNA hasarına neden olan, 3-metil-nitrozamin propanol (MNPA) sigarada bulunmaktadır (Haque ve ark., 2014).

Sigara, tüm semen parametreleri (sayı, hareket ve morfoloji) üzerine olumsuz etkiye sahiptir. Sigara kullanım miktarı ile semen hacmi arasında zıt ilişki ortaya koyulmuştur (Gaur ve ark., 2007). Sigarada bulunan nikotinin, sperm sayısını ve normal sperm morfolojisini düşürdüğü gösterilmiştir (Gornig ve Schirren, 1996).

Klinik insan çalışmalarında sigara içenlerde; düşük sperm sayısı ve konsantrasyonunun yanında infertilite nedeni olan, oligospermi ve azospermi görülmüştür (Hassa ve ark., 2006). Ayrıca sperm ayırma tekniklerinden swim-up öncesi ve sonrası elde edilen bulgularda sigara içmeyenlerde, sperm sayısı ve hareketi, sigara içenlere göre daha fazla bulunmuştur (Colagar ve ark., 2007). Son zamanlarda sigara içenlerden elde edilen semen analizlerinde fazla sayıda anormal sperm görülmektedir. Bu durumun da elde edilen TZI değerlerini etkilediği gösterilmiştir (Gaur ve ark., 2007).

Semen analizinden elde edilen veriler sigara içen bireylerde, bireye dayalı farklılıklar gösterebilmektedir. Bazı çalışmalarda sigara içenlerde sperm hücrelerinin özelliklerini daha ayrıntılı incelemeyi uygun görmüştür. Bu doğrultuda sigara içen bireylerde aksonem yapısında değişiklikler tespit edilmiştir (Yeung ve ark., 2009). Bunu yanında akrozom yapısında bulunan akrozin enzimi, sigara içenlerde azalmış ve infertiliteye neden olmuştur (Gerhard ve ark., 1989).

Reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklı oksidatif stres (OS) sperm hücrelerinin küçük sitoplazmalarından dolayı, sperm hücrelerinde daha kolay hasar meydana getirmektedir. Oksidatif stres de canlılığın azalmasına, hareketin düşmesine neden olmaktadır. Benzer olarak, süperoksit, nitrojen peroksit gibi reaktif nitrojen türleri (RNS) sperm kalitesini etkilemektedir. Sigara içme ROS ve RNS oluşmasına neden olan dış faktörlerdendir. Sigara içenlerde % 48 oranında semende lökosit ve % 107 oranında ROS seviyesinde artış bulunmuştur. Bu zararlı etkiler göz önünde

bulundurulduğunda sigara içmenin OS yaratarak, infertilite oluşmasına neden olduğu açıkça gösterilmektedir (Kothari ve ark., 2010). Antioksidanlar ise ROS' un olumsuz etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Askorbik asit gibi semende doğal olarak bulunan antioksidanlar, sigara içenlerde % 20-40 daha düşük seviyede tespit edilmiştir (Dawson ve ark., 2007).

Diğer yandan yapılan çalışmalarda sigaranın semen parametreleri üzerine olumsuz etkisi olmadığını savunmaktadır. Sigara kullanımının erkek üreme sistemine olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir. Anormal sperm sayısının sigara kullanımı ile ilgili olmadığı gösterilmiştir (Hoidas, ve ark., 1985). Diğer bir çalışmada ise sigara kullanan deney grubu ile sigara kullanmayan deney grubu arasında semen parametreleri karşılaştırılmış ve sigaranın semen parametreleri üzerine etkisi olmadığı ortaya koyulmuştur (Dikshit ve ark., 1987). Sigara kullanımının DNA hasarı üzerine olumsuz etkisi olmadığı yapılan diğer bir çalışma ile gösterilmiştir (Oldereid ve ark., 1989).

Sigara kullanım miktarının semen kalitesi üzerine etkisi karşılaştırıldığında, düşük semen kalitesinin sigara kullanımıyla ilgili olmadığı ortaya çıkarılmıştır (Goverde ve ark., 1995). 889 bireyle yapılan bir çalışmada sigara kullanmayan, ağır içiciler ve orta düzeyde içiciler olarak ayrılan bireylerde semen parametreleri ve serum FSH, LH düzeyleri arasında önemli bir fark olmadığı gösterilmiştir (Pasqualotto ve ark., 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Çalışma Kasım 2016 ve Nisan 2017 tarihleri arasında Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Androloji Laboratuvarına rutin spermiyogram testi için başvuran, örnek veren ve çalışmaya katılmayı kabul eden 40 erkek gönüllüye ait semen örnekleri ile gerçekleştirildi. Bu araştırma hastalarının, rutin spermiyogram testi yapıldıktan sonra artan ve normalde tıbbi atık olarak laboratuvar ortamından uzaklaştırılan semenleri ile gerçekleştirildi. Çalışmamız Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Uygulamalar Etik Kurulu' nun 19.10.2016 tarih 2016/106 nolu izni ile gerçekleştirildi (bkz. EK-2). Çalışmaya katılan her hasta için bilgilendirilmiş gönüllü olur formu ile izinleri alındı (bkz. EK-3). Ayrıca çalışmaya katılmayı kabul eden gönüllü hastalara sigara veya ilaç kullanımı, mesleki maruziyetler vb. gibi çevresel etkenlerle temaslarını belirlemek için araştırmacı tarafından hazırlanan Çevresel Etkenlere Maruziyet Anketi uygulandı (bkz. EK-4). Gönüllü hastaların semen örneklerinden mikroskopik olarak değerlendirme sonucu azospermi tanısı konulanlar çalışma dışında tutuldu.

3.2. Semen Örneklerinin Eldesi

Androloji laboratuvarına spermiyogram testi için başvuran ve çalışmaya katılmada gönüllü olan hastalar kendilerine ayrılan özel odada masturbasyon yöntemi ile elde ettikleri semen örneklerini steril, plastik kaplara koyarak laboratuvarımıza teslim ettiler. Semen örnekleri 37 °C sıcaklıktaki inkübatörde bekletilerek likefaksiyonlarının tamamlanması sağlandı. Likefiye semen ile hastanın rutin spermiyogram testine yönelik incelemeler tamamlandıktan sonra kalan semen, tıbbi atık olarak laboratuvardan uzaklaştırılmak yerine, çalışmaya dahil edildi.

3.3. Hasta Grupları

Çalışmaya dahil olan hastalara Çevresel Etkenlere Maruziyet Anketi uygulandı. Anket değerlendirmesi sonucunda hastalarda en sık rastlanan çevresel etken sigara kullanımı olduğu için bu faktörün incelenmesine karar verildi ve hastalar sigara içen ve içmeyen olarak iki gruba ayrıldı. Sigara içmeyen olgular için en az 1 yıl sigara içmiyor olmak koşulu uygulandı. Sigarayı 1 yıl içinde bırakanlar ise çalışmaya dahil edilmedi. Her iki grupta 20 hasta yer aldı.

3.4. Semen Örneklerine Uygulanan İncelemeler ve İşlemler

Tüm hastalardan elde edilen semen örneklerinde spermiyogram testi, morfolojik inceleme ve toluidin mavisi ile DNA hasarı incelemesi gerçekleştirildi. Ardından her bir örnek iki eşit hacme ayrıldı. Bunlardan birisinden dansite gradiyent yöntemi ile diğerinden ise swim-up yöntemi ile spermeler elde edildi. Son olarak iki farklı yöntem ile elde edilen spermelerin konsantrasyon, sayı ve hareketlilik tayinleri yapıldı, morfolojik değerlendirmeleri ve toluidin mavisi ile DNA hasarı incelemeleri gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan yöntemlerin detayları aşağıda belirtilmiştir.

3.4.1. Spermiyogram Testi

37 °C sıcaklıkta inkübatörde yaklaşık 20 dakika likefiye olan semen örneklerinin analizi yapıldı. Semen analizinde ilk olarak makroskobik inceleme yapılarak, semenin kokusu, görünümü, hacmi ve viskozitesi değerlendirildi. Daha sonra mikroskobik incelemeleri yapmak için semenden alınan 10 µl hacmindeki örnek derinliği 0.01 mm olan Makler sayım kamerasının ortasına damlatılarak üzerine grid camı kapatıldı (Şekil 3.1). Olympus BX53 ışık mikroskobunda 200X büyütme altında yapılan değerlendirme ile sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı ve hareketliliği değerlendirildi.



Şekil 3.1. Makler Sayım Kamarası

3.4.2. Dansite Gradyent Yöntemi ile Sperm Eldesi

Dansite gradyent yöntemi aşağıda basamakları tarif edilen biçimde gerçekleştirildi.

- 1- 15 ml hacimli Falkon tüpünün en altına 1 ml %80'lik kolloid solüsyonu (PureSperm®80, Nidacon) eklendi.
- 2- Aynı falkon tüpü içerisine %80'lik kolloid solüsyonun üzerine 1 ml %40'lık kolloid solüsyonu (PureSperm®40, Nidacon) eklendi.
- 3- Falkon tüpünün en üst kısmına da 1 ml semen eklendi.
- 4- Falkon tüpü x500g'de 20 dakika santrifüj edildi.
- 5- Santrifüj tamamlandıktan sonra süpernatant kısmı atıldı.
- 6- Falkon tüpünün alt kısmında kalan pellet 5 ml medyum (PureSperm®Wash, Nidacon) içeren yeni bir falkon tüpüne alınarak çözüldü.
- 7- Falkon içerisinde medyum ile çözülen bu pellet x500g' de 10 dakika santrifüj edildi.
- 8- Santrifüj tamamlandıktan sonra süpernatant kısmı atıldı.
- 9- Son aşamada altta kalan pellet 0,5 ml kültür medyumu (PureSperm®Wash, Nidacon) içinde yeniden süspansiyon haline getirildi. Takip eden metotlarda bu sperm süspansiyonu kullanıldı.

3.4.3. Swim-up Yöntemi ile Sperm Eldesi

Swim-up yöntemi aşağıda basamakları tarif edilen biçimde gerçekleştirildi.

- 1- Likefiye olan 1 ml semen örneği 15 ml hacimli falkon tüpü içerisine koyuldu.
- 2- İçerisinde semen örneği bulunan falkon tüpüne semen üzerine gelecek şekilde yavaşça 2 ml semen yıkama solüsyonu (PureSperm®Wash, Nidacon) eklendi.
- 3- Tüpü 45 derece eğimli olarak 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon işlemi sonunda tüp nazıkçe dik duruma getirilerek kültür medyumunun en üstteki 1 ml’lik kısmı alındı. Bu kısım ileri hareketli spermleri içermektedir.
- 5- Bu 1 ml’lik kısım içerisinde 2 ml medyum bulunan yeni bir falkon tüpüne alınarak medyum ile seyreltildi.
- 6- Falkon tüpü x500g’de 10 dakika santrifüj edildi
- 7- Santrifüj tamamlandıktan sonra süpernatant kısmı atıldı.
- 8- Son aşamada altta kalan pellet 0,5 ml kültür medyumu (PureSperm®Wash, Nidacon) içinde yeniden süspansiyon haline getirildi
Takip eden metotlarda bu sperm süspansiyonu kullanıldı.

3.4.4. Spermlerin Morfolojik Değerlendirilmesi

Morfolojik değerlendirme hem sperm ayırma öncesi hem de dansite gradiyent ve swim-up yöntemi ile elde edilen sperm örneklerinde gerçekleştirildi. Morfoloji değerlendirme yöntemi aşağıda basamakları tarif edilen biçimde gerçekleştirildi.

- 1- Yıkama öncesi ve yıkama yöntemlerinden sonra elde edilen semen örneğinden 10 µl lam üzerine yayıldı.
- 2- Lamlar havada kurutuldu.
- 3- Havada kurutulan lamlar kit protokolüne uygun olarak; 1 dakika fiksatif ile tespit edildi.
- 4- Tespit işlemi gerçekleşen preparatlar kit içerisindeki Quik-Diff Red solüsyonu ile 1 dakika boyandı.

- 5- Lamlar yıkanmadan sonra kit içerisindeki Quik-Diff Blue solüsyonu ile 30 saniye boyandı.
- 6- Boyanan preparatlar akan çeşme suyunda yıkandı.
- 7- Havada kurulan preparatlar entellan ile kapatılarak $\times 1000$ 'lik büyütmede incelendi.

Örneklerde sperm morfoloji değerlendirilmesi en az 200 sperm hücresinde aşağıda belirtilen Kruger kesin kriterlerine göre yapıldı.

- Sperm başı sınırları belli oval yapılı olmalıdır.
- Sperm uzunluğu 4.0-5.0 μm , genişliği ise 2.5-3.5 μm olmalıdır.
- Akrozom bölgesinin başın %40-70 ini oluşturacak büyüklükte olmalıdır.
- Post-akrozomal alanda vakuol bulunmamalıdır.
- Orta parça ve kuyruk anomalisi bulunmamalıdır.
- Orta parça; ince, sınırları belli ve yaklaşık olarak sperm başı uzunluğunda olmalıdır.
- Orta parçanın ana eksenini sperm başının ana eksenine aynı hizada bulunmalıdır.
- Orta parça eni 1 mikron, uzunluğu baş uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır.
- Kuyruk boyunca genişlik aynı olmalıdır. Kuyruk orta parçadan daha ince ve yaklaşık 45-55 μm uzunlukta (baş uzunluğunun yaklaşık 10 katı) olmalıdır.

Sperm morfoloji değerlendirmesinde ise dikkat edilen hususlar aşağıda belirtilmiştir.

- Sperm hücresinin bütününün morfolojisi değerlendirmeye katılmalıdır.
- Değerlendirme $\times 100$ büyütme alanında yapılmalıdır.
- Değerlendirme esnasında hücre kümelerinin bulunduğu bölgelerdeki sperm hücreleri dikkate alınmamalıdır.
- Serbest kuyruklar (iğne başlar) ve serbest başlar (bir baş ve kuyruğa sahip olan germ hücreleri olarak tanımlanan) sperm olarak sayılmadıklarından, anomali olarak da kabul edilmemelidir (WHO, 2010).

Tespit edilen baş, orta parça ve kuyruk anomalileri, droplet varlığı ve normal morfolojiye sahip olan sperm oranları yüzde olarak ifade edildi. Morfolojik değerlendirme sonrasında Teratozoospermi İndeksi (TZI) hesaplandı.

3.4.5. Toluidin Mavisi Testi

DNA hasarının incelenmesinde Toluidin mavisi ile boyama yöntemi kullanıldı. Toluidin mavisi boyası Erenpreiss ve ark. (2001) tanımlandığı biçimde ve aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı.

Gerekli Malzemeler

- Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4)
- Sitrik Asit Monohidrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$)
- Hidroklorik Asit (HCl)
- %96'lık Etanol
- Toluidin Blue Toz ($\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 0.5\text{ZnCl}_2$)
- Aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)
- Tersiyer Bütanol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)
- Distile Su

Solüsyonların Hazırlanması

0,2 M Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) solüsyonu için;

- **Distile su:** 100 ml
- **Na_2HPO_4 :** 2,83 gr

0,1 M Sitrik Asit Monohidrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) solüsyonu için;

- **Distile su:** 100 ml
- **Na_2HPO_4 :** 2,10 gr

0,1N HCl çözeltisi için;

- **Distile su:** 1000 ml
- **%37'lik HCl:** 8,28 ml

Fiksatif için;

- **%96'lık etanol:** 100 ml
- **Aseton:** 100 ml

- 1- Elde edilen, 0,2 M Sitrik Asit Monohidrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) solüsyonundan 75,30 ml ve 0,2 M Disodyum Hidrojen Fosfat (Na_2HPO_4) solüsyonundan 24,70 ml alınarak pH 3.5 McIlvain's buffer hazırlandı.
- 2- pH 3.5 McIlvain's bufferın 50 ml' si alındı ve üzerine üzerine 50 ml distile su eklendi.
- 3- %50'lik 100 ml McIlvain's buffer içerisine 0,05 gr toz toluidin mavisi eklendi ve karıştırıldı.

Toluidin Boyama Yöntemi

- 1- Yıkama öncesi ve yıkama yöntemlerinden sonra elde edilen semen örneğinden 10 μ l lam üzerine yayıldı
- 2- Lamlar havada kurutuldu.
- 3- Kuruyan preparatlar; % 96 ethanol/aseton (1:1) fiksatif ile +4 °C' de 30 dakika tespit edildi.
- 4- +4 °C' de fikse edilen preperatlar havada kurutuldu.
- 5- Preparat zayıf bir asit olan 0,1N HCl ile +4 °C' 5 dakika hidroliz edildi.

- 6- Hidroliz işleminden sonra preparatlar 3x2 dakika distile suda yıkandı.
- 7- Oda sıcaklığında %0.05' lik toluidin mavisi boyasında 5 dakika bekletildi
- 8- Boyama işleminden sonra preparatlar 2x3 dakika distile su ile yıkandı.
- 9- Preparatlar yıkama işleminden sonra tersiyer bütanol ile 2x3 dakika 37 °C'de dehidratasyon yapıldı.
- 10- Dehidratasyondan sonra preparatlar ksilen ile oda sıcaklığında 2x3 dakika parlatıldı.
- 11- Son aşamada preparatlar entellan ile kapatıldı. Işık mikroskopunda $\times 1000$ 'lik büyütmede incelendi (Erenpreiss ve ark., 2001).

Metakromatik özellik gösteren boya sayesinde hasarlı DNA yapısı gösteren spermiler koyu mavi veya mor renkte boyanırken, normal DNA' ya sahip spermiler yeşil veya açık mavi renkte boyandı. Her örnek için en az 200 spermdeki hasarlı DNA değerlendirildi ve oranı % olarak belirlendi.

3.5. Değerlendirme ve İstatistiksel Analiz

Araştırma verileri Varyans Analizi (ANOVA) ve Tekrarlanmış Ölçümler için Karışık Varyans Analizi (Split-Plot ANOVA) testleri kullanılarak analiz edildi. Sigara içen ve içmeyen hastaların yıkama öncesi ve sonrası yapılan ölçümleri ANOVA testi ile karşılaştırıldı. Dansite gradiyent ve Swim-up yöntemleri arasında sigara kullanım durumuna göre yapılan karşılaştırmalarda ise Tekrarlanmış Ölçümler için Karışık Varyans Analizi testi kullanıldı. Değişkenlerin normallik ve varyansların homojenliği gibi ANOVA test varsayımlarını karşıladığı gözlenmiştir. Tüm analizler SPSS sürüm 24 kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler grafik olarak SigmaPlot 10.0 ile yapıldı. α - anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Semen Analizi Bulguları

Bu çalışmaya, Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Androloji Laboratuvarına rutin spermiyogram testi için başvuran gönüllü 40 hasta dahil edildi. Hastalar sigara kullan (n:20) ve sigara kullanmayan (n:20) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Sigara içen ve içmeyen hasta grubuna ait sperm hazırlama işlemlerinden önce yapılan semen analizine ait bulgular karşılaştırıldı. Sigara içen grupta yaş ortalaması 31,65 ($\pm 6,67$), sigara içmeyen grupta ise yaş ortalaması 30,70 ($\pm 3,58$) idi. Semen hacim ortalamaları sigara içenlerde, 3,50 ($\pm 0,98$) ml, sigara içmeyen grupta ise 3,74 ($\pm 1,65$) ml olarak bulundu. Ortalama sperm konsantrasyonu, sigara içen grupta 90,60 ($\pm 63,35$) milyon/ml sigara içmeyen grupta 86,90 ($\pm 57,87$) milyon/ml, toplam sperm sayısı (TSS) ise sigara içen grupta 290,55 ($\pm 215,76$) milyon adet, sigara içmeyen grupta 296,55 ($\pm 229,43$) milyon adet, sperm hareketliliği değerlendirildiğinde, progresif hareketli sperm yüzdesi sigara içenlerde % 34,95 ($\pm 23,07$), sigara içmeyen grupta % 45,15 ($\pm 20,72$) bulundu. Elde edilen bu değerler arasında, istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p > 0.05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hasta gruplarında yıkama öncesi değerlerin karşılaştırılması.

Değişkenler	Sigara içen grup	Sigara içmeyen grup	P değeri
	Ort \pm SS	Ort \pm SS	
Yaş (yıl)	31,65 ($\pm 6,67$)	30,70 ($\pm 3,58$)	0,578
Hacim (ml)	3,50 ($\pm 0,98$)	3,74 ($\pm 1,65$)	0,574
Konsantrasyon (milyon/ml)	90,60 ($\pm 63,35$)	86,90 ($\pm 57,87$)	0,848
TSS (milyon adet)	290,55 ($\pm 215,76$)	296,55 ($\pm 229,43$)	0,933
Progresif hareketli sperm (%)	34,95 ($\pm 23,07$)	45,15 ($\pm 20,72$)	0,150

Semen örneklerine, sperm seçim yöntemlerinden swim-up ve dansite gradiyent yöntemi uygulandıktan sonra elde edilen örneklerde de sperm konsantrasyonu ve progresif hareketli sperm yüzdesi belirlendi. Dansite gradiyent sonrası sigara içen grupta sperm konsantrasyonu 71,00 ($\pm 88,44$) milyon/ml, sigara içmeyen grupta 80,70 ($\pm 70,60$) milyon/ml, progresif hareketli sperm yüzdesi sigara içen grupta % 47,53 ($\pm 28,53$), sigara içmeyen grupta % 60,65 ($\pm 21,96$) olarak bulundu. Swim-up sonrası sigara içen grupta sperm konsantrasyonu 15,75 ($\pm 19,78$) milyon/ml, sigara içmeyen grupta 23,40 ($\pm 28,53$) milyon/ml, progresif hareketli sperm yüzdesi sigara içen grupta % 59,60 ($\pm 33,14$), sigara içmeyen grupta % 80,40 ($\pm 18,85$) olarak bulundu. Sigara içen ve içmeyen grupta dansite gradiyent yöntemi sonrası sperm konsantrasyonu ve progresif hareketli sperm yüzdeleri ile swim-up yöntemi sonrası sperm konsantrasyonu arasında önemli bir fark yoktu ($p > 0,05$). (Tablo 4.2). Ancak sigara içen ve içmeyen hasta gruplarında swim-up sonrası progresif hareketli sperm yüzdesi karşılaştırıldığında sigara içmeyen grupta progresif hareketli sperm yüzdesinin anlamlı olarak daha yüksek olduğu bulundu (Tablo 4.2). ($p = 0,019$).

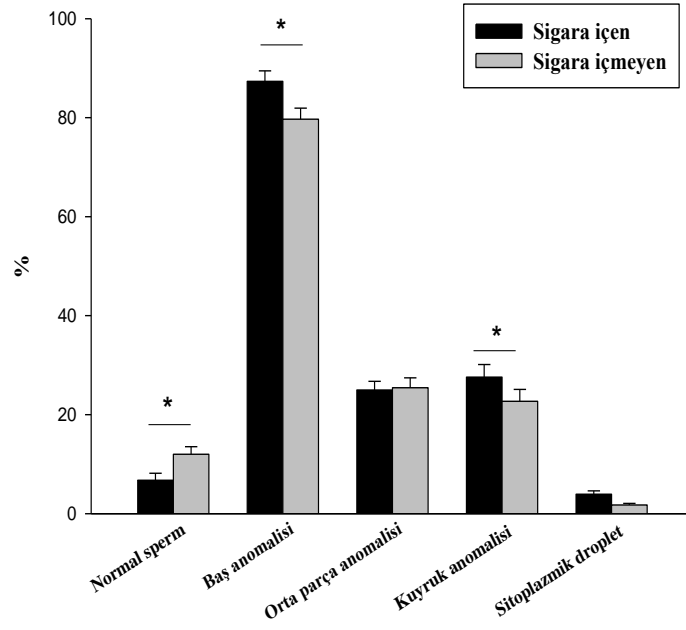
Tablo 4.2. Hasta gruplarında dansite gradiyent ve swim-up sonrası sperm konsantrasyonu ve hareketlilik.

Değişkenler	Sigara içen grup	Sigara içmeyen grup	P değeri
	Ort \pm SS	Ort \pm SS	
Dansite gradiyent sonrası sperm konsantrasyonu (milyon/ml)	71,00 ($\pm 88,44$)	80,70 ($\pm 70,60$)	0,714
Swim-up sonrası sperm konsantrasyon (milyon/ml)	15,75 ($\pm 19,78$)	23,40 ($\pm 28,53$)	0,344
Dansite gradiyent sonrası progresif hareketli sperm (%)	47,53 ($\pm 28,53$)	60,65 ($\pm 21,96$)	0,112
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm (%)	59,60 ($\pm 33,14$)	80,40 ($\pm 18,85$)	0,019*
* $p < 0,05$			

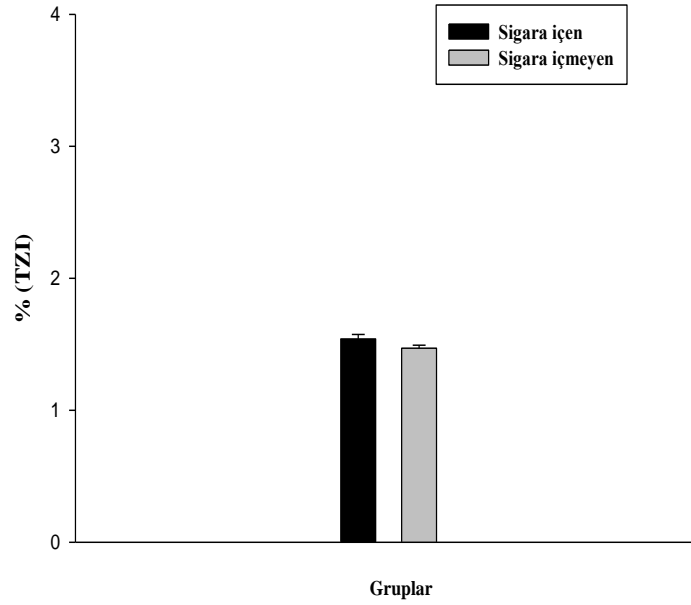
40 hastanın tamamında iki farklı sperm hazırlama yöntemi yani dansite gradiyent ve swim-up yöntemleri sonrasında elde edilen spermelere ait veriler karşılaştırıldığında, swim-up yöntemi sonrasında elde edilen sperm konsantrasyonunda önemli derecede azalma olduğu görüldü. Bu farkın istatistiksel analizine ait p değeri sigara içen grup için $p=0,000$, sigara içmeyen grup için ise $p=0,003$ idi.

4.2. Morfoloji Bulguları

Hastalardan elde edilen sperm örneklerinde hem yıkamalar öncesi hem de dansite gradiyent ve swim-up işlemleri sonrası morfoloji değerlendirmesi amacıyla Diff-Quik ile boyanan yayma preparatlar kullanıldı. Kruger' in kesin kriterlerine göre yapılan incelemede tüm hastalara ait yıkama öncesi, normal sperm, baş, orta parça, kuyruk anomalisine ve sitoplazmik droplete sahip sperm yüzdeleri belirlendi Her örnek için hazırlanan bir preparatta en az 200 adet sperm hücresi değerlendirildi. Sayılan anomalilerin hiçbirine sahip olmayan sperm normal kabul edildi (Şekil 4.1). Yıkama öncesi verileri incelendiğinde sigara içenlerde normal sperm % 6,75 ($\pm 6,40$), sigara içmeyen grupta % 12 ($\pm 6,81$) olarak bulundu. Anomaliler incelendiğinde baş anomalisinin sigara içen grupta % 87,35 ($\pm 9,39$), sigara içmeyen grupta % 79,70 ($\pm 18,85$), orta parça anomalisinin sigara içen grupta % 25 ($\pm 7,73$), sigara içmeyen grupta 25,45 ($\pm 8,98$), kuyruk anomalisinin sigara içen grupta % 27,60 ($\pm 11,33$), sigara içmeyen grupta % 22,70 ($\pm 10,81$), sitoplazmik dropletin ise sigara içen grupta % 3,95 ($\pm 2,92$) sigara içmeyen grupta % 1,75 ($\pm 1,48$) olduğu görüldü. Yıkama öncesi normal sperm oranı sigara içmeyen hastalarda anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,016$). Yine hem baş anomali yüzdesi ($p=0,017$) hem de kuyruk anomali yüzdesi ($p=0,05$) sigara içenlerde daha fazla oranda izlendi. Bu iki grup arasında sitoplazmik droplet ve orta parça anomali açısından önemli bir fark yoktur ($p>0,05$) (Tablo 4.3). Sigara içen ve içmeyen hasta gruplarında yıkama öncesi TZI değerleri de karşılaştırıldı (Şekil 4.2). Sigara içen grupta TZI değeri % 1,54 ($\pm 0,15$), sigara içmeyen grupta % 1,47 ($\pm 0,13$) olarak bulundu. TZI değerleri açısından gruplar arasında önemli bir fark görülmedi ($p>0,05$).



Şekil 4.1. Hasta gruplarında yıkama öncesinde morfolojik kriterlerin karşılaştırılması (* $p < 0.05$) (Sütunlar $ORT \pm SE$).

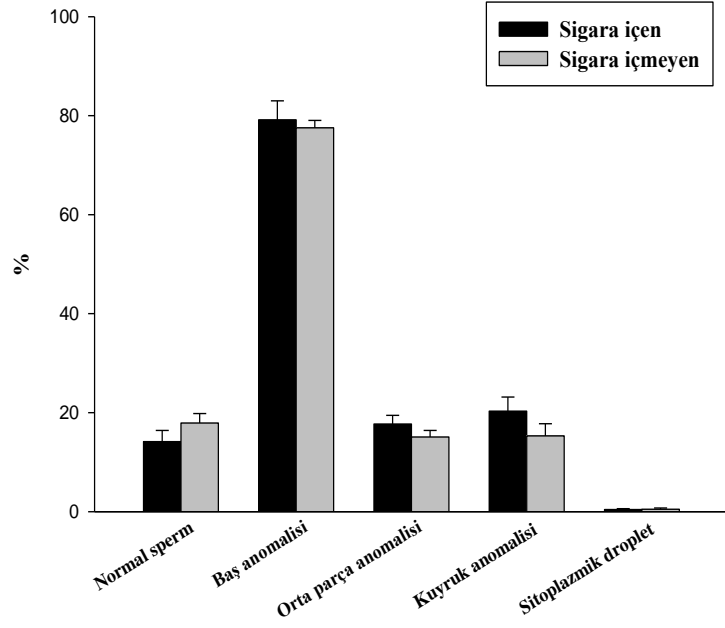


Şekil 4.2. Hasta gruplarında yıkama öncesinde TZI değerlerin karşılaştırılması (Sütunlar $ORT \pm SE$).

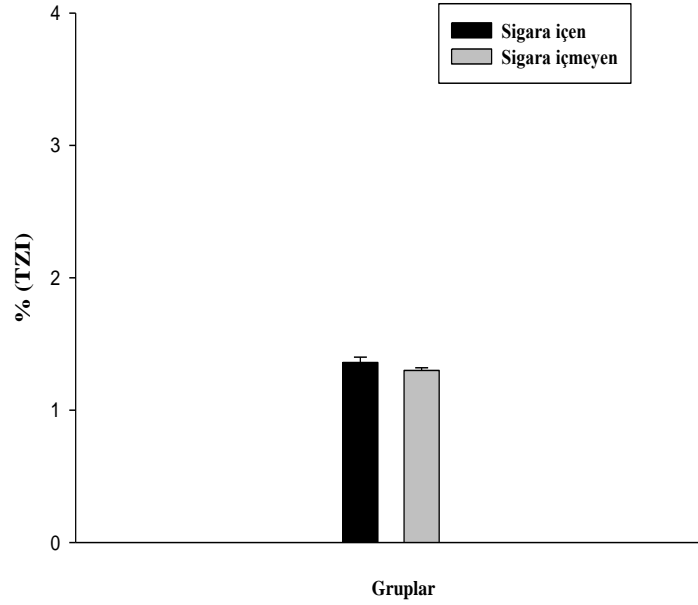
Tablo 4.3. Hasta gruplarında yıkama öncesinde morfolojik değerlendirme verileri.

Değişkenler	Sigara içen grup	Sigara içmeyen grup	P değeri
	Ort±SS	Ort±SS	
Normal sperm (%)	6,75 (±6,40)	12 (±6,81)	0,016*
Baş anomalisi (%)	87,35 (±9,39)	79,70 (±18,85)	0,017*
Orta parça anomalisi (%)	25 (±7,73)	25,45 (±8,98)	0,866
Kuyruk anomalisi (%)	27,60 (±11,33)	22,70 (±10,81)	0,05*
Sitoplazmik droplet (%)	3,95 (±2,92)	1,75 (±1,48)	0,111
TZI (%)	1,54 (±0,15)	1,47 (±0,13)	0,188
* p < 0.05			

Morfolojik değerlendirmeler swim-up ve dansite gradiyent yöntemi sonrası elde edilen spermelerde de gerçekleştirildi. Sigara içen ve içmeyen hastalarda dansite gradiyent yöntemi ile elde edilen spermelerin morfoloji değerlendirilmesine ait veriler karşılaştırıldı (Şekil 4.3). Sigara içen hastalarda normal sperm oranı % 14,15 (±10,11), sigara içmeyen grupta % 17,90 (±8,59), baş anomalisi sigara içen grupta % 79,15 (±13,78), sigara içmeyen grupta % 77,55 (±9,56), orta parça anomalisi sigara içen grupta % 17,70 (±7,92), sigara içmeyen grupta 15,10 (±5,81), kuyruk anomalisi sigara içen grupta % 20,30 (±12,87), sigara içmeyen grupta % 15,30 (±11,11), sitoplazmik droplet ise sigara içen grupta % 0,45 (±0,75), sigara içmeyen grupta ise % 0,50 (±1,05) bulundu. TZI değeri sigara içen ve içmeyen hasta gruplarında karşılaştırıldı (Şekil 4.4). Sigara içen grupta % 1,36 (±0,18), sigara içmeyen grupta % 1,30 (±0,12) olarak bulundu. Sigara içen ve içmeyen grupta dansite gradiyent sonrası elde edilen değerler arasında, istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur (p>0.05) (Tablo 4.4).



Şekil 4.3. Hasta gruplarında dansite gradiyent sonrası morfolojik kriterlerin karşılaştırılması (Sütunlar ORT±SE).

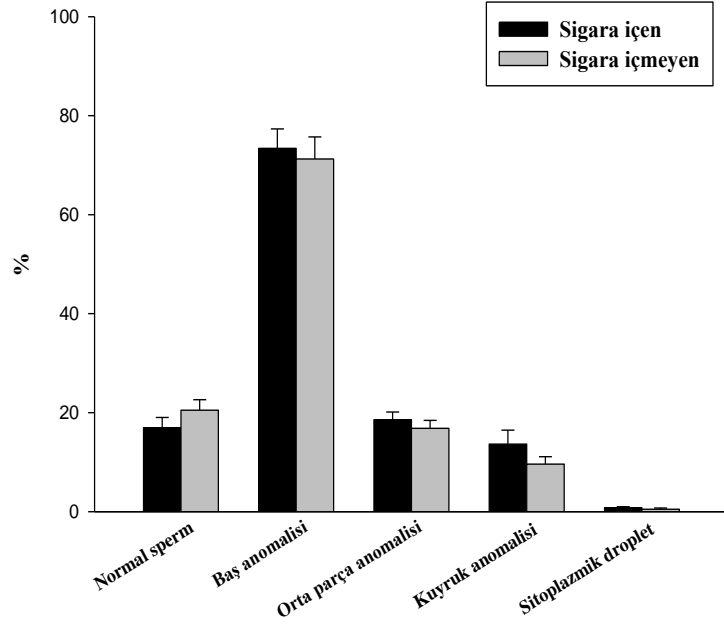


Şekil 4.4. Hasta gruplarında dansite gradiyent sonrası TZI değerlerin karşılaştırılması (Sütunlar ORT±SE).

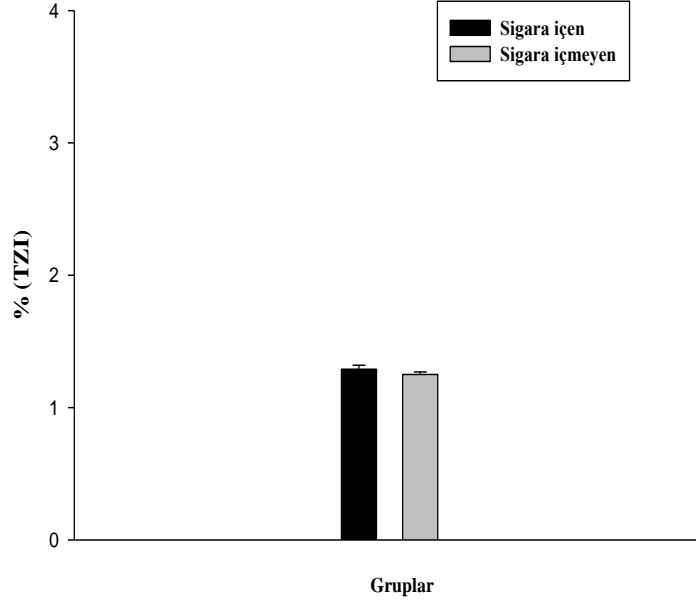
Tablo 4.4. Hasta gruplarında dansite gradiyent sonrası morfolojik değerlendirme verileri.

Değişkenler	Sigara içen grup	Sigara içmeyen grup	P değeri
	Ort±SS	Ort±SS	
Normal sperm (%)	14,15 (±10,11)	17,90 (±8,59),	0,214
Baş anomalisi (%)	79,15 (±13,78)	77,55 (±9,56)	0,719
Orta parça anomalisi (%)	17,70 (±7,92)	15,10 (±5,81)	0,244
Kuyruk anomalisi (%)	20,30 (±12,87)	15,30 (±11,11)	0,197
Sitoplazmik droplet (%)	0,45 (±0,75)	0,50 (±1,05)	0,864
Dansite gradiyent sonrası TZI değeri (%)	1,29 (±0,15)	1,30 (±0,12)	0,283

İki grup arasında swim-up sonrası da spermelerde morfoloji değerlendirilmesi yapıldı (Şekil 4.5). Sigara içenlerde normal sperm % 16,95 (±9,36), sigara içmeyen grupta % 20,50 (±9,45), baş anomalisi sigara içen grupta % 73,40 (±17,53), sigara içmeyen grupta % 71,25 (±19,96), orta parça anomalisi sigara içen grupta % 18,60 (±6,85), sigara içmeyen grupta % 16,85 (±7,11), kuyruk anomalisi sigara içen grupta % 13,65 (±9,60), sigara içmeyen grupta % 9,60 (±6,81), sitoplazmik droplet ise sigara içen grupta % 0,80 (±0,89), sigara içmeyen grupta ise % 0,60 (±1,18) bulundu. TZI değeri sigara içen ve içmeyen grupta karşılaştırıldı (Şekil 4.6). TZI değeri sigara içen grupta % 1,29 (±0,15), sigara içmeyen grupta % 1,25 (±0,10) olarak bulundu. Bu iki grup arasında sperm morfoloji değerlendirmesinde önemli bir fark yoktur ($p>0.05$) (Tablo 4.5).



Şekil 4.5. Hasta gruplarında swim-up sonrası morfolojik kriterlerin karşılaştırılması (Sütunlar ORT±SE).



Şekil 4.6. Hasta gruplarında swim-up sonrası TZI değerlerin karşılaştırılması (Sütunlar ORT±SE).

Tablo 4.5. Hasta gruplarında swim-up sonrası morfolojik değerlendirme verileri.

Değişkenler	Sigara içen grup	Sigara içmeyen grup	P değeri
	Ort±SS	Ort±SS	
Normal sperm (%)	16,95 (±9,36)	20,50 (±9,45),	0,214
Baş anomalisi (%)	73,40 (±17,53),	71,25 (±19,96)	0,719
Orta parça anomalisi (%)	18,60 (±6,85)	16,85 (±7,11),	0,433
Kuyruk anomalisi (%)	13,65 (±9,60)	9,60 (±6,81),	0,214
Sitoplazmik droplet (%)	0,80 (±0,89),	0,60 (±1,18)	0,551
Swim-up sonrası TZI değeri (%)	1,29 (±0,15)	1,25 (±0,10)	0,399

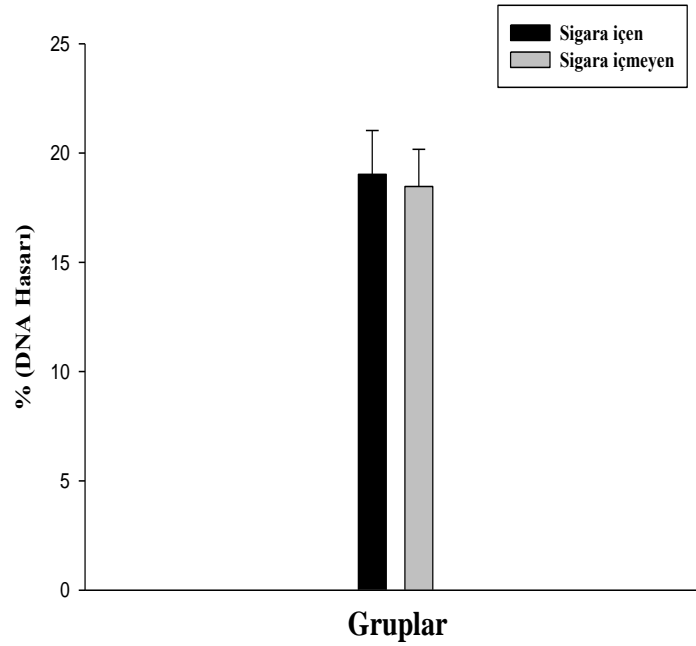
4.3. DNA Hasarı Bulguları

Sigara içen ve içmeyen hastalardan elde edilen sperm örnekleri hem yıkama öncesi hem de iki yöntem sonrasında DNA hasarı değerlendirmesi amacıyla Toluidin mavisi ile boyandı. Her bir lamda en az 200 adet sperm hücresi sayıldı ve DNA hasar oranı yüzde olarak hesaplandı.

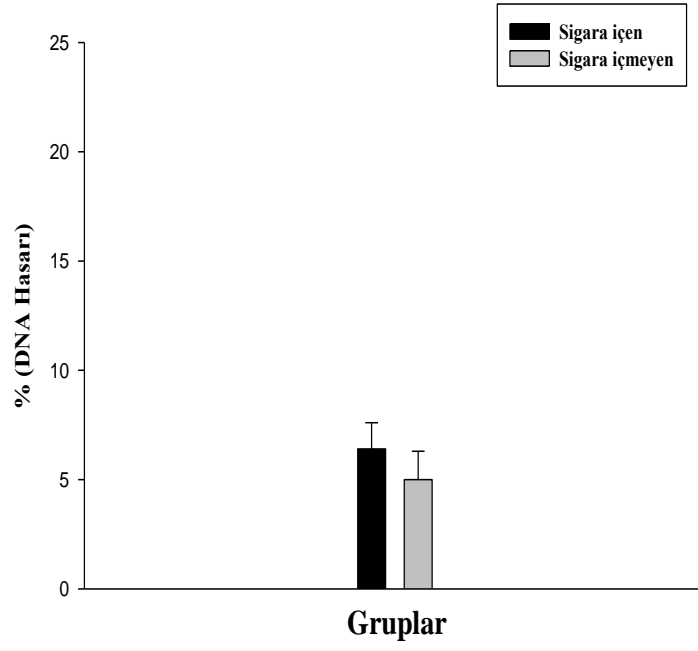
Yıkama öncesinde sperm DNA hasarı sigara içen grupta % 19,03 (±9,19), sigara içmeyen grupta ise % 18,47 (±7,88) olarak bulundu (Şekil 4.7). Elde edilen semen örnekleri dansite gradiyent ve swim-up yöntemi ile yıkandıktan sonra % DNA hasarı belirlendi. Dansite gradiyent yıkama sonrasında DNA hasarı sigara içen grupta % 6,40 (±5,46), sigara içmeyen grupta % 5,00 (±5,88) olarak bulundu (Şekil 4.8). Swim-up sonrası DNA hasarı sigara içen grupta % 3,60 (±3,96) sigara içmeyen grupta % 3,15 (±3,60) olarak bulundu (Şekil 4.9). Elde edilen bu değerler arasında, istatistiksel olarak önemli bir fark yoktur ($p>0.05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Hasta gruplarında yıkama öncesi ve sonlarında DNA hasarı yüzdeleri.

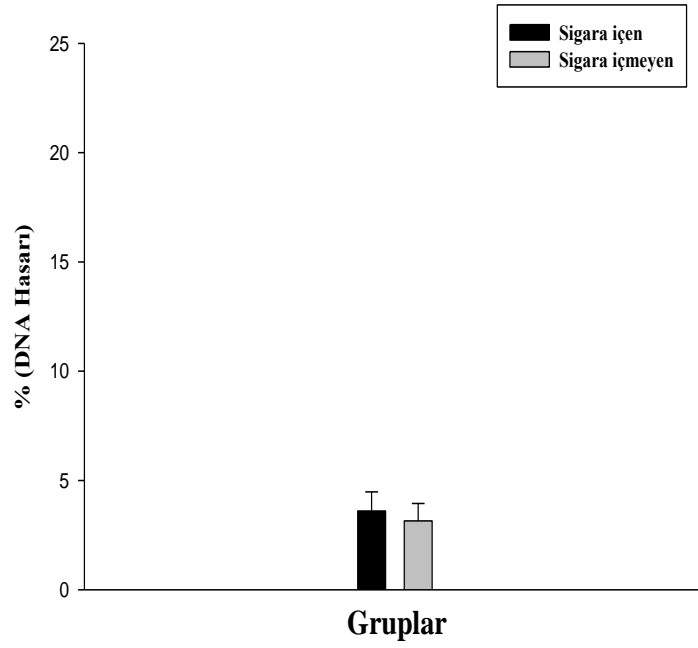
Değişkenler	Sigara içen grup	Sigara içmeyen grup	P değeri
	Ort±SS	Ort±SS	
Yıkama öncesi DNA hasarı (%)	19,03 (±9,19)	18,47 (±7,88)	0,836
Dansite gradiyent sonrası DNA hasarı (%)	6,40 (±5,46)	5,00 (±5,88)	0,440
Swim-up sonrası DNA hasarı (%)	3,60 (±3,96)	3,15 (±3,60)	0,709



Şekil 4.7. Hasta gruplarında yıkama öncesi DNA hasarı karşılaştırılması (Sütunlar ORT±SE).

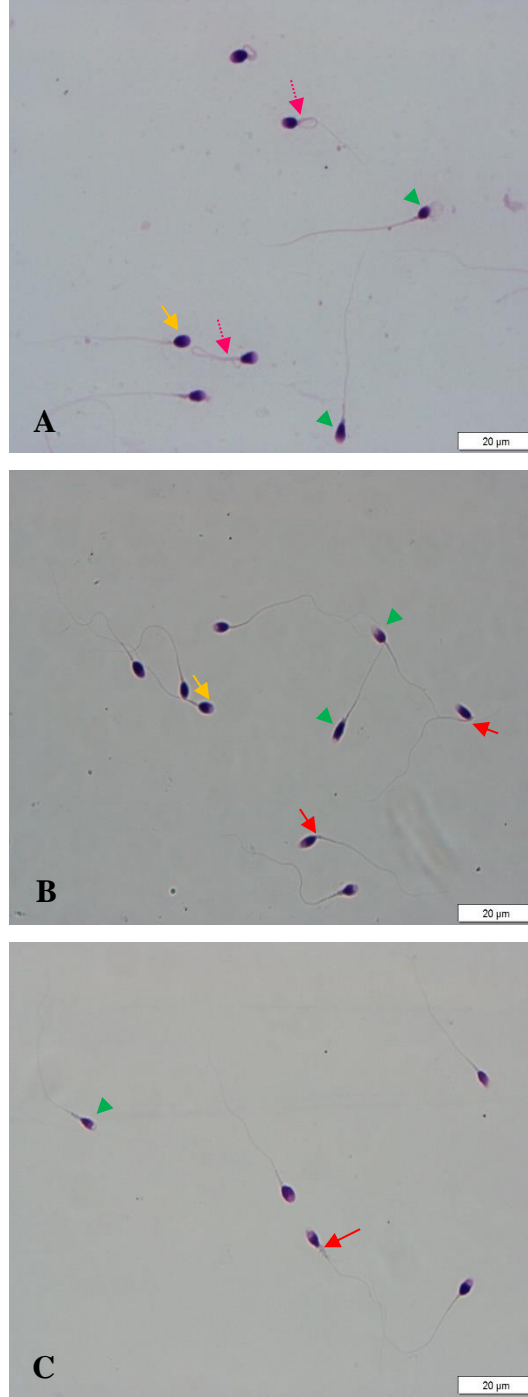


Şekil 4.8. Hasta gruplarında dansite gradiyent sonrası DNA hasarı karşılaştırılması (Sütunlar ORT±SE).

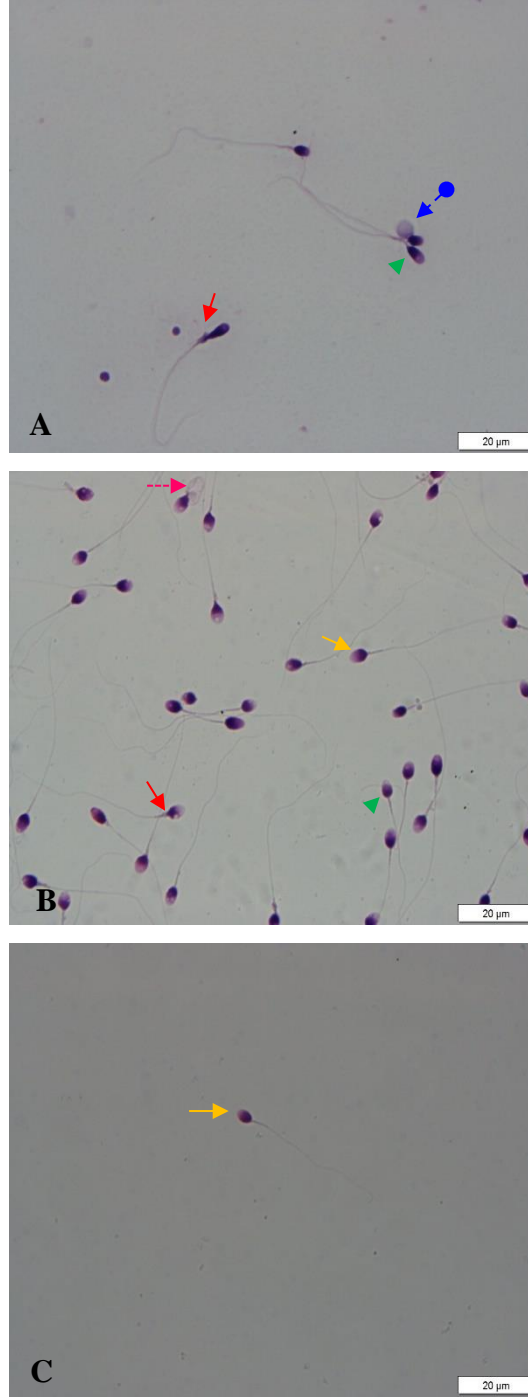


Şekil 4.9. Hasta gruplarında swim-up sonrası DNA hasarı karşılaştırılması (Sütunlar ORT±SE).

4.4. Diff-Quik Boyama Görüntüleri

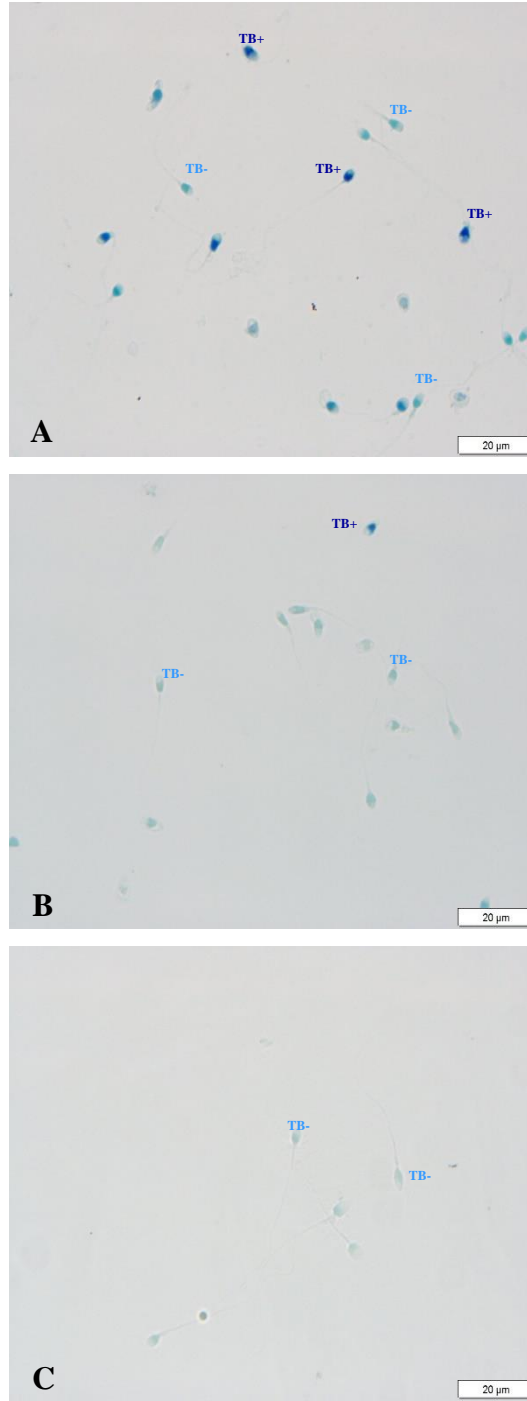


Şekil 4.10. Sigara içen hasta grubuna ait spermelerin Diff-Quik ile boyanma görüntüsü. Yıkama öncesi (A), dansite gradiyent, (B) swim-up (C). Normal morfolojide sperm (→), baş anomalisi (◀), orta parça anomalisi (→), kuyruk anomalisi (---▶).

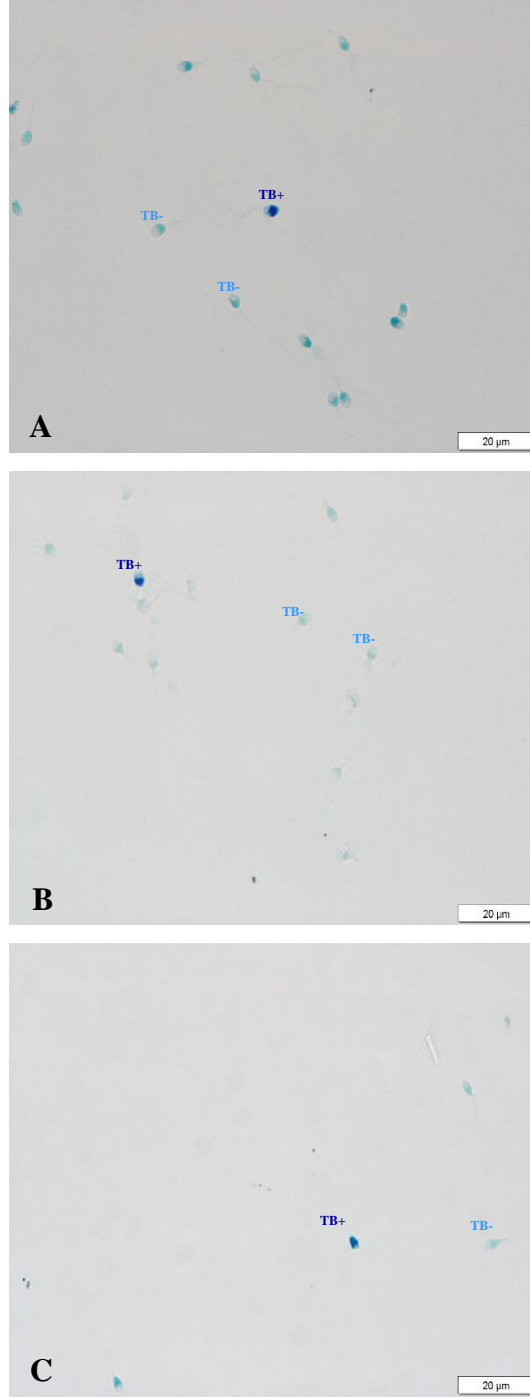


Şekil 4.11. Sigara içmeyen hasta grubuna ait spermilerin Diff-Quik ile boyanma görüntüsü. Yıkama öncesi (A), dansite gradiyent (B), swim-up (C). Normal morfolojide sperm (→), baş anomali (◀), orta parça anomali (→), kuyruk anomali (---▶), sitoplazmik droplet (●→).

4.5. Toludin Mavisi Boyama Görüntüleri



Şekil 4.12. Sigara içen hasta grubuna ait spermelerin Toluidin mavisi ile boyanma görüntüsü. Yıkama öncesi (**A**), dansite gradiyenti (**B**), swim-up (**C**). DNA hasarı içermeyen sperm (**TB-**), DNA hasarı içeren sperm (**TB+**).



Şekil 4.13. Sigara içmeyen hasta grubuna ait spermelerin Toluidin mavisi ile boyanma görüntüsü. Yıkama öncesi (A), dansite gradiyent (B), swim-up (C). DNA hasarı içermeyen sperm (TB-), DNA hasarı içeren sperm (TB+).

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışması, farklı sperm hazırlama yöntemlerinin semen parametrelerine, sperm morfolojisine, spermde DNA hasarı oluşturma oranının ve son zamanlara artan sosyal bir alışkanlık olan sigara kullanımının bu oran üzerine etkilerini belirlemeyi amaçlamıştır.

Günümüzde erkek üreme sisteminde özellikle, semen kalitesinde ve sperm üretiminde azalma, infertilite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak deneysel çalışmalarda göz önünde bulundurulmayan, sperm üretiminde bireysel farklılıklar, deneysel çalışmalarda kullanılan bireylerin farklı popülasyona ait olması, semen yorumlamada standart değerlere ulaşamaması, deneysel çalışmalarda hatalı veya eksik sonuçları karşımıza çıkarmaktadır. Buna ek olarak çelişkili sonuçlar elde edilmektedir.

Tüm bunlara rağmen, son zamanlarda erkek üreme sistemi ile ilgili hastalıklardaki artış, semen kalitesindeki azalma ile ilişkilendirilmektedir. Ancak semen kalitesi yorumlanmasında bireylerin maruz kaldığı çevresel faktörler, yaşam biçimi göz önüne alınmalıdır. Ağır metallere, organik çözücülere, pestisit gibi kimyasal maddelere temasın hem erkek hem de kadın üreme sisteminde bozulmalara neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmektedir (Schmiedel ve ark., 2003; Huyghe ve ark., 2003).

Özellikle yaşamı etkileyen sosyal alışkanlıklardan biri olan sigara kullanımı, yaşam süresini, solunum fizyolojisini, kardiyovasküler fizyolojiyi etkilediği bilinmektedir. Uzun yıllardan beri sigaranın erkek üreme sistemi ve infertilite üzerine etkisi araştırılmaktadır. Ancak erkeğe bağlı infertilite ile arasındaki ilişki tam olarak kanıtlanamamıştır. Yapılan çalışmalardan bazıları sigaranın semen parametreleri ve erkek üreme sistemi üzerine olumsuz etkiye sahip olduğunu savunurken, bazı

literatürler ise etkisi olmadığını savunmaktadır. Ancak yapılan çalışmaların çoğunda erkek infertilitesinde sigara kullanımının risk oluşturduğu görüşü ağır basmaktadır.

Daha önce yapılan çalışmalarda sigara kullanımının ROS'un oluşumuna neden olarak OS yarattığını ve bu durum da sperm hücresinde hasara neden olarak erkek infertilitesini tetiklediği gösterilmiştir (Kothari ve ark., 2010). Benzer olarak sigaranın direk olarak DNA hasarı oluşturmadığını OS yaratarak infertilite oluşumunu kolaylaştırdığı savunulmaktadır (Saleh ve ark., 2002). Ancak bu savunulan görüşe zıt çalışmalar yapılmaktadır. Bu zıt görüşlerin varlığı, yapılan farklı deneysel çalışmaların olması ve özellikle çalışmalara katılan hastaların farklı özellikleri ile açıklanabilmektedir.

Literatürde çalışmaların çoğu sigaranın infertilite ile ilgili olduğunu savunmasına rağmen, tam olarak kanıtlanmamıştır. 655 sigara içen ve 1131 sigara içmeyen olmak üzere toplam 1789 erkek ile yapılan çalışmada sigara içenlerin total sperm sayısı ve total sperm hareketinin sigara içmeyenlere göre daha az olduğu gösterilmiştir (Künzle ve ark., 2003). Günde 16 adetten fazla sigara tüketen bireylerde, kullanmayanlara göre semen hacminin daha düşük olduğu bulunmuştur (Saaranen ve ark.,1987). Diğer bir çalışmada ise, infertil sigara içen bireylerde sigara içmeyenlere göre, düşük sperm hareketi ve fazla sayıda anormal sperm tespit edilmiştir (Chia ve ark., 1994).

Sigara kullanımının semen kalitesi üzerine olumsuz etkisi çoğu literatürde kabul edilmesine rağmen, bazı çalışmalarda sigara kullanımının semen kalitesine etki etmediği gösterilmiştir (Dikshit ve ark., 1987, Goverde ve ark. 1995). Benzer olarak, 478 sigara içenin dahil olduğu diğer bir çalışmada sigara içen ve içmeyen grup arasında sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji açısından önemli bir fark olmadığı ortaya koyulmuştur (Trummer ve ark., 2002). Yapılan bir diğer çalışmada; sigara içen hasta grubunda semen parametrelerinin sigara içmeyenlere göre düşük olduğu bildirilmiş ancak istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı gösterilmiştir (Davar ve ark 2012). Bu tez çalışmasında yıkama öncesi yani bazal değerler arasında sigara içen ve içmeyen hasta gruplarında sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı (TSS) arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yoktu ($p>0.05$). Progresif hareketli

sperm sayısı sigara içmeyen grupta daha fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermedi ($p=0.150$).

Sigaranın semen hacmi üzerine olumsuz etkisi bazı çalışmalarda savunulurken, bazı çalışmalarda ise değiştirmedeği gösterilmiştir. 522 sigara içmeyen, 143 hafif düzeyde sigara içen (<10 sigara/gün), 154 orta düzeyde içici (11–20 sigara/gün) ve 70 ağır içici (20> sigara/gün) ile yapılan çalışmalarda sigara kullanım miktarına bağlı olarak semen konsantrasyonu ve motilite gibi değerlerin değişmediği ancak semen hacminin gruplar arasında farklılık gösterdiği bulunmuştur (Pasqualotto ve ark., 2006). Fakat yapılan diğer çalışmada, sigara içen ve sigara içmeyenler arasında semen hacmi açısından anlamlı farklılık olmadığı bulunmuştur. (Al-Matubsi ve ark 2011). Yaptığımız bu tez çalışmasında yıkama öncesi bazal semen hacimleri gruplar arasında karşılaştırıldığında, sigara içen grupta ortalama 3,50 ($\pm 0,98$) ml, sigara içmeyen grupta ise ortalama 3,74 ($\pm 1,65$) ml olarak bulundu. Gruplar arasında sigara kullanımına bağlı olarak semen hacmi açısından önemli bir fark görülmedi ($p=0,574$). Deneysel çalışmalar ve benzer tez çalışmaları arasında görülen çelişkili sonuçların önüne geçmek için coğrafik dağılımlı ve fazla örnek sayısı içeren çalışmaların yapılması bu durumu kesin sonuca bağlayabilecektir.

Semen konsantrasyonu, motilite ve hacim yanında sperm morfolojisi infertilite belirlenmesinde önemli bir kriterdir. Bazı çalışmalarda sigaranın morfoloji üzerine olumsuz etkisi savunulurken, diğer çalışmalarda ise etkisi olmadığı gösterilmiştir. Sigara tüketimine bağlı olarak normal sperm morfolojisinin azaldığı ancak baş anomali dışında diğer morfolojik defektlerin ise değişmediği gösterilmiştir (Chia ve ark., 1994a). Benzer olarak, sigara kullananların sigara kullanmayanlara göre daha az sayıda normal sperm morfolojisine sahip olduğu bulunmuştur (Künzle ve ark., 2003). Bu tez çalışması bu çalışmaları desteklemiştir. Yaptığımız çalışmada yıkama öncesi sigara içmeyen grupta normal sperm yüzdesi sigara içmeyenlere göre fazla bulundu ($p=0,016$).

Chia ve ark (1994b) sigara içenlerde sperm baş anomalisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Yaptığımız bu çalışmada önceki çalışmayı destekler niteliktedir. Sigara içenlerde baş anomali fazla bulundu ($p=0,017$). Benzer olarak kuyruk anomali yüzdesi sigara içenlerde daha fazla bulundu ($p=0,05$).

Diğer bir çalışmada ise sigara içen grupta içmeyen gruba göre sitoplazmik droplet sayısında artış görülmüştür (Mak ve ark., 2000). Bu tez çalışmasında yıkama öncesi, sitoplazmik droplet yüzdesi ise sigara içen grupta yüzde olarak fazla olmasına rağmen aralarında önemli bir fark yoktu ($p=0,111$). Bu durum, sigara kullanımının yıllar içinde artması ve buna paralel olarak erkeğe bağlı infertilitede artış görülmesi sigaranın sperm morfolojisini etkileyerek infertilitede etkin rol oynadığını düşündürmektedir. Sigaranın sperm morfolojisini etkileyerek TZI değerini değiştirdiği gösterilmiştir (Gaur ve ark., 2007). Bu tez çalışmasında ise yıkama öncesi sigara içen ve içmeyen grup karşılaştırıldığında sigara içenlerde TZI değeri fazla olmasına rağmen önemli bir fark görülmedi ($p=0.188$).

Sigara kullanımı sadece semen parametreleri üzerine etki etmez aynı zamanda üremeye yardımcı tekniklerinden, IVF, ICSC ve IUI' da başarı oranını düşürdüğü savunulmaktadır. Daha önce yapılan çalışmada sigara içen grupta swim-up sonrası sigara içmeyenlere göre semen parametreleri daha düşük bulunmuştur (Colagar ve Jorsaraee, 2007). Ayrıca IUI yapılan kadınlarda gebelik oranı eşi sigara içenlerde daha düşük bulunmuştur (İrez ve ark., 2013). Bunun yapılan IUI yöntemlerinden dansite gradiyent ve swim-up yöntemi semen parametreleri yönünden karşılaştırılması sonucunda total sperm sayısı, progresif hareketli sperm sayısı ve canlı sperm sayısı yönünden dansite gradiyent yönteminin daha etkili olduğu gösterilmiştir (Ricci ve ark., 2009). Ancak bir diğer çalışmada swim-up yöntemi ile yıkanan spermelerin, dansite gradient yöntemi ile yıkama yapılanlardan daha fazla hareket ve sperm sayısı içerdiğini bildirmiştir (Marchesi ve ark., 2010). Benzer olarak ise swim-up yöntemi elde edilen canlı sperm sayısının dansite gradiyent yöntemine göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Ricci ve ark., 2007). Yaptığımız bu tez çalışmasında sigaranın IUI için kullanılan sperm seçim yöntemlerinden swim-up ve dansite gradiyent sonrası sigara içen ve içmeyen gruplarda konsantrasyon ve progresif hareketli sperm yüzdesi karşılaştırıldı. Sigara içen ve içmeyen grupta dansite gradiyent yöntemi sonrası sperm konsantrasyonu ve progresif hareketli sperm yüzdeleri ve swim-up konsantrasyonu arasında önemli bir fark bulunmadı. Ancak sigara içen ve içmeyen hasta gruplarında swim-up sonrası progresif hareketli sperm yüzdesi karşılaştırıldığında sigara içmeyen grupta progresif hareketli sperm yüzdesi istatistiksel olarak fazla bulundu ($p=0,019$). Yıkama öncesi değerlerde gruplar arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmesine rağmen yıkama işlemi sonrası özellikle swim-up yönteminde sigara içmeyenlerde

progresif hareketli sperm sayısının daha fazla bulunması sigaranın sperm hareketini olumsuz etkilediğini ortaya koymaktadır.

Sigara içen grupta dansite gradiyent ve swim-up yöntemi karşılaştırıldığında swim-up yönteminde, sperm konsantrasyonunda önemli derecede azalma görüldü ($p=0,000$). Sigara içmeyen grupta da aynı şekilde dansite gradiyent ve swim-up yöntemi karşılaştırıldığında swim-up yönteminde, sperm konsantrasyonunda önemli derecede azalma görüldü ($p=0,003$).

Hareketli ve normal morfolojiye sahip spermelerin varlığı ÜYTE' de başarı oranını artırırken, anormal morfolojiye sahip spermelerin ise fertilizasyon başarısını azalttığı bilinmektedir. Ancak ÜYTE' de yapılan dansite gradiyent veya swim-up gibi yöntemler normal morfolojiye sahip sperm sayısını arttırmasına rağmen, diğer ölü ve anormal spermelerin tamamını ortadan kaldırmaz. Yapılan bir çalışmada swim-up sonrası uygulanan dansite gradiyent yönteminin kuyruk ve baş anomalilerini tek tek yapılan yöntemlere göre daha fazla azalttığını göstermiştir (Yamanaka ve ark., 2016). Yaptığımız tez çalışmasında sigaranın sperm ayırma teknikleri üzerine etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçlamıştır. Her iki grupta swim-up ve dansite gradiyent yöntemlerinden sonra spermelerde, Kruger' in kesin kriterlerine göre yapılan incelemede yıkama öncesinde, normal sperm, baş, orta parça, kuyruk anomalisine ve sitoplazmik droplete sahip sperm yüzdeleri karşılaştırıldı. İki grup arasında morfolojik değerler arasında önemli bir fark yoktu ($p>0.05$). Ancak swim-up yönteminde dansite gradiyent yöntemine göre kuyruk anomalisi sigara içen ve sigara içmeyen grupta yüzde olarak daha az olmasına rağmen, anlamlı bir farklılık görülmedi.

Semen analizi üreme ile ilgili sorunlar için belirleyicidir. 2010 yılında WHO semen analizi ilgili referans sınır değerlerini düşürmüştür (WHO, 2010). Bunun yanında infertilite belirlenmesinde belirleyici olan sperm DNA yapısının önemli olduğu vurgulanmaktadır. ÜYTE uygulamalarından sonra elde edilen başarısızlıkların nedenleri arasında erkeğe bağlı infertilitede sperm DNA hasarı gösterilmektedir. Sperm DNA hasarı hem mitokondrial DNA' da hem de nükleer DNA' da görülebilmektedir. Spermatogenez sırasında gerçekleşen apoptozun, spermiyogenez sırasında kromatininin yeniden düzenlenmesinin, post-testiküler hasarların,

kemoterapi ve radyoterapinin, çevresel toksik ajanların sperm DNA hasarı oluşumuna neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Sigarada bulunan başlıca alkaloid olan nikotinin, hücre membranında hasara ve DNA hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Arabi, 2004). Nikotinin metaboliti olan kotinininde semen parametrelerini düşürdüğü anormal sperm sayısını ve DNA hasarını arttırdığı ortaya koyulmuştur (Chen ve Kuo, 2007). Sigara içenlerde % 48 oranında semende lökosit ve % 107 oranında ROS seviyesinde artış bulunmuştur. Bu zararlı etkiler göz önünde bulundurulduğunda sigara içmenin OS yaratarak, infertilite oluşmasına neden olduğu açıkça gösterilmektedir (Kothari ve ark., 2010). Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu DNA hasarı, düşük semen kalitesi üremeye yardımcı tedavilerde açıkça ortaya koyulmuştur (Agarwal ve ark., 2006).

Fakat sigaranın sperm DNA hasarı oluşturma konusu hala tartışmalıdır. Yapılan çalışmaların bir kısmı sperm DNA hasarına bir etkisi olmadığını savunurken, diğer çalışmalarda ise ROS aracılığıyla sperm DNA hasarı oluşturduğu görüşünü savunmaktadır. 35 sigara içen ve 78 sigara içmeyen infertil erkeklerle yapılan çalışmada sigara içenlerde (4.7 +/- 1.2%) ve sigara içmeyenlerde (1.1 +/- 0.2%) sperm DNA hasarı karşılaştırılmış ve sigara içenlerde DNA hasarının fazla olduğu gösterilmiştir (Sun ve ark., 1997). Benzer olarak, fertil sigara içenlerde DNA hasarının ve semen içinde ROS'un daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Taha ve ark., 2012). Ayrıca yapılan diğer bir çalışmada sigara içenlerde DNA hasarı önemli derecede fazla bulunmasına rağmen diğer semen parametreleri arasında önemli bir fark olmadığı ortaya koyulmuştur (Sepaniak ve ark., 2006). Bu durum ayrıca sigaranın semen parametrelerinden bağımsız olarak sperm nükleer yapısında etkili olabileceğini göstermiştir.

Farklı olarak, sigara içmeyen, hafif düzeyde sigara içen (1-14 sigara/gün), ağır içici (15-40 sigara/gün) gruplarla yapılan çalışmada sigaranın DNA hasarı üzerine anlamlı bir etkisi olmadığını göstermiştir (Oldereid ve ark., 1989). Yaptığımız bu tez çalışmasında yıkama öncesi DNA hasar yüzdeleri sigara içen ve içmeyen gruplarda Toluidin mavisi boyaması yapılarak karşılaştırıldı ve aralarında önemli bir fark olmadığı tespit edildi (p=0,836).

Yardımcı üreme tedavilerinde DNA hasar oluşma durumunun belirlenmesine gün geçtikçe önem verilmektedir. Dansite gradiyent ve swim-up yöntemlerinin tek tek veya karşılaştırmalı olarak sperm DNA hasarı üzerine etkileri araştırılmaktadır. Literatürde, swim-up ve dansite gardiyent yönteminin sperm DNA hasar oranını azalttığı yönünde bir çok çalışma mevcuttur (Spano ve ark., 1999; Larson ve ark., 1999; Younğlai ve ark., 2001). Bu çalışmalar yıkama yöntemlerinin DNA hasar oranını azalttığını ve ÜYTE' de başarı oranını arttırdığını savunmaktadır. Ancak yıkama yöntemlerinin DNA hasarı oranı üzerine etkisi olmadığını savunan çalışmalarda mevcuttur (Sergerie ve ark., 2000; Belcheve ve ark., 2004). Bizim yaptığımız çalışmada sigara içen ve içmeyen gruplara uygulanan bu yıkama yöntemlerinin DNA hasarı üzerine etkilerini tespit etmeyi amaçladı. Yapılan yıkama yöntemleri sonucunda sigara içen ve içmeyen hasta gruplarında DNA hasarı yönünden önemli bir fark olmadığı bulundu ($p>0,05$). Bu tartışmalı sonuçlar sperm DNA hasarı oluşmasında sigara dışında diğer faktörleri tarafından etkili olabileceğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında farklı sperm hazırlama yöntemlerinin semen parametreleri, sperm morfolojisi ve spermde DNA hasarı üzerine etkilerini sigara kullanımına bağlı olarak inceledik. Balıkesir Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Androloji Laboratuvarına rutin spermiyogram testi için başvuran 40 adet gönüllü hasta yapılan anket sonucunda sigara içen ve içmeyen olarak ayrıldı. Likefiye olan semenler analiz edildi. Semen analizi sonucunda gruplar arasında yıkama öncesi sperm konsantrasyonu, progresif hareketli sperm sayısı, morfoloji açısından önemli bir fark görülmedi ($p>0,05$). Sperm ayırma tekniklerinden swim-up ve dansite gradiyent uygulanan sigara içen ve içmeyen hasta gruplarında swim-up sonrası progresif hareketli sperm sayısı sigara içmeyenlerde fazla bulundu ($p=0,019$). Yaptığımız çalışmada yıkama öncesi sigara içmeyen grupta normal sperm yüzdesi sigara içmeyenlere göre fazla bulundu ($p=0,016$). Baş anomali yüzdesi ise sigara içenlerde fazla bulundu ($p=0,017$). Kuyruk anomali yüzdesi ise sigara içenlerde anlamlı olarak daha fazla bulundu ($p=0,05$). Yıkamalar sonrası morfolojik değerler açısından önemli bir fark görülmedi ($p<0,05$).

Sigara kullanımının erkek infertilitesine etkisini belirlemek amacıyla yapılan semen parametreleri incelemelerinde çıkan sonuçlar hala tartışmalıdır. Sigaranın ROS'un oluşumuna neden olarak OS yarattığını ve bu durum da semen parametrelerinde ve sperm hücresinde DNA hasarına neden olduğu yapılan bazı çalışmalarda savunulurken bazı çalışmalarda etkisi olmadığı gösterilmiştir. Yaptığımız çalışmada yıkama öncesi ve yıkama sonrası DNA hasar yüzleri açısından önemli bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Bu tez çalışmasında ise sigaranın bazı morfolojik kriterleri etkilediğini ancak DNA hasarı oranına önemli bir etkisi olmadığı bulundu. Bu durum literatürdeki bazı çalışmaları destekler niteliktedir. Ancak hasta gruplarımızın az sayıda olması, gruplarda yapılan anket sonucunda verilen bilgilerin eksik veya yanlış olma ihtimali

veya sigara içmeyen grubun pasif olarak sigara dumanına maruz kalma ihtimali çalışmanın sonuçlarının kesin olma ihtimalini sınırlamaktadır.

Literatülerde sperm DNA hasarı tespit yöntemlerinin birçoğu karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Toluidin mavisi boyama yöntemi avantajları olduğu kadar dezavantajları olan bir yöntemdir. Bu boyama yönteminin SCSA ve TUNEL teknikleri ile benzerlik gösterdiği ortaya koyulsa da, yapılan incelemeler kişiler arasında farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda, sperm DNA hasarı tespitinde karşılaştırmalı olarak farklı yöntemler incelenmelidir.

Daha kesin ve güvenilir bulgu ve sonuçlar elde etmek için coğrafik dağılımlı, popülasyon bazında veya örnek sayısı fazla hasta grupları tercih edilmelidir. Bunun yanında sigara kullanım düzeyleri veya sigara dumanına maruz kalma koşulları ayrıntılı olarak incelenmelidir.

KAYNAKLAR

Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015, 13(1):37.

Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*, 2006, 86(4):878-885.

Agarwal A, Sidhu RK, Shekarriz M, Thomas Jr AJ. Optimum abstinence time for cryopreservation of semen in cancer patients. *J Urol*. 1995, 154(1):86–88.

Agarwal A. Singh A. Sperm DNA Damage and Antioxidant Use: Roles in Male Fertility. In Parekattil SJ Agarwal A(eds.), *Male Infertility Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants*, 1st ed. New York, Springer Science+Business, 2012:19-43.

Agger P. Scrotal and testicular temperature: its relation to sperm count before and after operation for varicocele. *Fertil Steril*, 1971, 22(5):286–97.

Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1987, 81(2):459-469.

Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon-not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol*, 2003;518:85–98.

Al-Matubsi HY, Kanaan RA, Hamdan F, Salim M, Oriquat GA, Al Hanbali OA. Smoking practices in Jordanian people and their impact on semen quality and hormonal levels among adult men. *Cent Eur J Public Health*. 2011, 19(1):54-9.

Angelis KJ, Dusinska M, Collins AR. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*, 1999, 20(10):2133–2138.

Arabi M. Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia*. 2004, 36(5): 305-310.

Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp Cell Res*, 1997, 236(1):231–237.

Arcidiacono A, Walt H, Campana A, Balerna M. The use of Percoll gradients for the preparation of subpopulations of human spermatozoa. *Int J Andr*, 1983, 6(5):433-445.

Auger J, Eustache F, Ducot B, Blandin T, Daudin M, Diaz I, Matribi SE, Gony B, Keskes L, Kolbezen M, Lamarte A, Lornage J, Nomal N, Pitaval G, Simon O, Virant-Klun I, Spira A, Jouannet P. Intra- and inter-individual variability in human sperm concentration, motility and vitality assessment during a workshop involving ten laboratories. *Hum Reprod*, 2000,15(11):2360–2368.

Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Suominen J, Toppari J, Vierula M, Jouannet P.. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Hum Reprod*, 2001, 16(12):2710–2717.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine*, 1995, 332(5):281-285.

Baker MA, Hetherington L, Reeves G, Muller J, Aitken RJ. The rat sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics*, 2008, 8(11):2312–2321.

Bangham AD, Hancock JL. A new method for counting live and dead bull spermatozoa. *Nature*, 1955, 176(4483):656.

Batıslam Ertan, M. Murad Basar: Erkek üreme sisteminin anatomisi. İçinde: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M (editörler). *Erkek Reprodüktif Hastalıkları ve Tedaivisi*. 1. Baskı. İstanbul, Türk Androloji Derneği Yayınları, 2004, 25-34.

Behringer RR. The müllerian inhibitor and mammalian sexual development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1995, 350(1333):285–289.

Belcheva A, Ivanova-Kicheva M, Tzvetkova P, Marinov M. Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. *Int J Androl*, 2004, 27(5):296-300

Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertil Steril*, 1985, 43(2):268-273.

Beydola T, Sharma R, Agarwal A. Sperm preparation and selection techniques. In: Rizk BRMB ed. *Medical and Surgical Management of Male Infertility*. New Delhi ; Philadelphia, Jaypee Brothers Medical Publishers; 2013, 244-251

Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod*, 1993;49:1083–1088.

Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update*, 1996, 2(2):103–117.

Bjorndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R. *Sperm Preparation A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology*. 1st ed. USA: Cambridge University Press 2010.pp.167-87

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 2007, 22(6):1506–1512.

Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first pregnancy planners. *Lancet*, 1988, 352(9135):1172–1177.

Bongso A, Ng SC, Mok H, Lim MN, Teo HL, Wong PC, Ratnam S. Improved sperm concentration, motility, and fertilization rates following Ficoll treatment of sperm in a human in vitro fertilization program. *Fertil Steril*, 1989, 51(5):850-854.

Bustos-Obregon E, Holstein AF. The rete testis in man: Ultrastructural aspects. *Cell Tiss. Res*, 1976, 175(1):1-15.

Cardona Maya WD, Berdugo Gutiérrez JA, de los Ríos J, Cadavid Jaramillo AP. Functional evaluation of sperm in Colombian fertile men. *Arch Esp Urol*, 2007 60(7):827-31.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. 1992, 305(6854):609–613.

Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update*, 2003, 9(5):405-428.

Chen HW, Kuo CT. Cotinine characterization and quality effect of sperm for smoking and nonsmoking students. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2007, 79(1):11-14.

Chen MJ, Bongso A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum Reprod*, 1999, 14(3):759-764

Chia SE, Ong CN, Tsakok FM. Effects of cigarette smoking on human semen quality. *Arch Androl*, 1994a, 33(3):163–163.

Chia SE, Xu B, Ong CN, Tsakok FM, Lee ST. Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 1994b, 39(5):292-298.

Chia VM, Quraishi SM, Devesa SS, Purdue MP, Cook MB, McGlynn KA. International trends in the incidence of testicular cancer, 1973-2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010, 19(5):1151–1159.

Chiquoine AD Observations on the early events of cadmium necrosis of the testis. *Anat Rec*, 1964, 149(1):23–35

Claire L B, Katja MW, Gerard MG, Moira KO. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum. Reprod. Update*, 2009, 16(2);205-224.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*, 1972, 52(1):198–236.

Close CE, Roberts PL, Berger RE. Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol*, 1990, 144(4):900–903.

Colagar AH, Jorsaraee GA, Marzony ET. Cigarette smoking and the risk of male infertility. *Pak J Biol Sci*. 2007, 10(21):3870–3874.

Colagar AH, Jorsaraee GA, Marzony ET. Cigarette smoking and the risk of male infertility. *Pak J Biol Sci*, 2007, 10(21):3870-3874.

Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stětina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*, 1997, 375:183–193.

Cook PR, Brazell IA, Jost E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci*, 1976, 22(2):303–324.

Cooper TG Brazil C, Swan SH, Overstreet JW. Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *Journal of Andrology*, 2007, 28(1):1-4.

Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010, 16(3):231–245.

Çelik-Özenci Ç. Akkoyun A. Spermatogenez. İçinde: *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Ramazan D. (Çeviri editörü). Histology and Cell Biology, Kierszenbaum AL., 1. Baskı, Ankara Palme Yayıncılık, 2006; 531-550.

Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res*, 1975, 90(2):411-428.

Davar R, Sekhavat L, Naserzadeh N. Semen parameters of non-infertile smoker and non-smoker men. *Journal of Medicine & Life*, 2012, 5(4):465-468.

Dawson ED, Harris WA, Teter MC, Powell LC. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril*, 1992, 58(5):1034–9.

Daya S, Gwatkin RBL, Bissessar H. Separation of motile human spermatozoa by means of a glass bead column. *Gamete Res*, 1987, 17(4):375-380.

De Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med*, 1993, 14(2):157–166.

De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, Maisto A, Cimmino F, Puca G, Colao A, Lombardi G. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod*, 2003, 18(5):1055–1061.

Dikshit RK, Buch JG, Mansuri SM. Effect of tobacco consumption on semen quality of a population of hypofertile males. *Fertil Steril*, 1987 48 (2):334-336.

Drobnis EZ, Zhong CQ, Overstreet JW. Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing or Percoll gradients. *J Androl*. 1991, 12(3):201–208.

Dym M. The mammalian rete testis- a morphological examination . *Anat. Rec*, 1972, 186(4):493-523.

Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*, 1969, 221:632-635.

Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl*, 2001, 22(1):45–53.

Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod*, 2004, 19(10):2277–2282.

Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature*, 1973, 246(5433):421-424.

Evenson DP. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®): 30 Years of Experience with the SCSA®. In Zini A and Agarwal A (eds.). *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*, New York Springer Science+Business, 2011:125-149.

Evenson DP, Kasperson K, Wixon RL. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007, 65:93–113.

Fawcett DW, Burgos MH. Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue. *Am J Anat*, 1960, 107:245–270.

Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, LaFromboise M, De Jonge C. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*, 2005, 84(4):833–842.

Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM. Human ‘testicular dysgenesis syndrome’: a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Hum Reprod*. 2003, 18(7): 1383–1394.

Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1469(3):197–235.

Fritz IB, Rommerts FG, Louis BG, Dorrington JH. Regulation by FSH and dibutyryl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *J Reprod Fertil*, 1976, 46(1):17–24.

Gabriel LK, Vawda AI. Preparation of human sperm for assisted conception: a comparative study. *Arch Androl*. 1993, 30(1):1–6.

Gaur DS, Talekar M, Pathak VP. Effect of cigarette smoking on semen quality of infertile men. *Singapore Med J*, 2007, 48(2):119–123.

Gellert-Mortimer ST, Clarke GN, Baker HWG, Hyne RV, Johnston WI. Evaluation of Nycodenz and Percoll density gradients for the selection of motile human spermatozoa. *Fertil Steril*, 1988, 49(2):335–341.

Gerhard I, Fröhlich E, Eggert-Kruse W, Klinga K, Runnebaum B. Relationship of sperm acrosin activity to semen and clinical parameters in infertile patients. *Andrologia*, 1989, 21(2):146–154.

Gillan L, Evans G, Maxwell WM. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 2005,63(2):445–457

Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*, 1993, 53(8):1945-1951.

Gornig VM, Schirren C. Effect of exogenous toxins on fertility. *Fortschr Med*, 1996, 114(14):169–171.

Goverde HJ, Dekker HS, Janssen HJ, Bastiaans BA, Rolland R, Zielhuis GA. Semen quality and frequency of smoking and alcohol consumption-an explorative study. *Int J Fertil Menopausal Stud*, 1995 40(3):135-138.

Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod*, 2005, 20(1): 226–230.

Gyllenborg J, Skakkebaek NE, Nielsen NC, Keiding N, Giwercman A. Secular and seasonal changes in semen quality among young Danish men: a statistical analysis of semen samples from 1927 donorcandidates during 1977-1995. *Int J Androl*. 1999, 22(1):28–36.

Hamilton, DW, Olson GE, Cooper TG. Regional variation in the surface morphology of the epithelium of the rat ductuli efferentes, ductus epididymidis and vas deferens. *Anat. Rec*, 1977, 188(1):13-28.

Hammadeh ME, Zavos PM, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between the quality and function of sperm after semen processing with two different methods. *Asian J Androl*, 2001, 3(2):125–130.

Hammadeh ME, Zeginiadv T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E.. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assessment of male fertility. *Arch Androl*, 2001, 46(2):99–104.

Haque O, Vitale JA, Agarwal A, du Plessis SS. The effect of smoking on male Infertility In: du Plessis SS Agarwal A. Sabanegh Jr. ES (eds).*Male Infertility :A Complete Guide to Lifestyle and Environmental Factors* 1st ed. New York, Springer Science+Business, 2014:20-44.

Harrison RAP. A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert*, 1976, 48:347-353.

Hassa H, Yildirim A, Can C, Turgut M, Tanir HM, Senses T, Sahin-Mutlu F. Effect of smoking on semen parameters of men attending an infertility clinic. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2006, 33(1):19–22.

Henkel R, Franken DR, Lombard CJ, Schill WB. The selective capacity of glass wool filtration for normal chromatin condensed human spermatozoa: A possible therapeutic modality for male factor cases? *J Assist Reprod Genet*, 1994, 11(8):395-400.

Henkel R, Ichikawa T, Sánchez R, Miska W, Ohmori H, Schill WB. Differentiation of ejaculates in which reactive oxygen species are generated by spermatozoa or leukocytes. *Andrologia*, 1997, 29(6):295-301.

Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003, 1:108.

Hermo L, Oko R, Morales CR. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *Internacional Review of Cytology*, 1994,154:105-189.

Hill KA, Buettner VL, Halangoda A, Kunishige M, Moore SR, Longmate J, Scaringe WA, Sommer SS. Spontaneous mutation in Big Blue mice from fetus to old age: tissue-specific time courses of mutation frequency but similar mutation types. *Environ Mol Mutagen*. 2004, 43(2):110–120.

Hinting A, Lunardhi H. Better sperm selection for intracytoplasmic sperm injection with the side migration technique. *Andrologia*, 2001, 33(6):343-346.

Hoffer AP. The fine structure of the ductuli efferentes in mouse and rat. *Anat Rec*, 1972, 172:331-332.

Hoidas S, Williams AE, Tocher JL, Hargreave TB Scoring sperm morphology from fertile and infertile cigarette smokers using the scanning electron microscope and image analysis. *Fertil Steril*, 1985 43(4):595-598

Holzki G, Gall H, Hermann J. Cigarette smoking and sperm quality *Andrologia*, 1991, 23(2):141-144.

Huszar G, Willetts M, Corrales M. Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normozoospermic and oligozoospermic specimens. *Fertil Steril*, 1990, 54(6):1127-1134.

Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P. Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J Urol*. 2003;170(1):5-11.

Hyne RV, Stojanoff A, Clarke GN, Lopata A, Johnston WI. Pregnancy from in vitro fertilization of human eggs after separation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation. *Fertil Steril*, 1986, 45(1):93-96.

Ichimura S, Zama M, Fujita H. Quantitative determination of single-stranded sections in DNA using the fluorescent probe acridine orange. *Biochem Biophysiol Acta*, 1971, 240(4):485-95.

Imade GE, Towobola OA, Sagay AS, Otubu JA. Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler, and Horwells counting chambers. *Arch Andro*, 1993, 31(1):17-22.

Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*, 1992, 57(2):409–416.

İrez T, Öcal P, İdil M, Kaleli S, Uyar Y, Aydoğan B, Erol N, Sahmay S Effects of smoking cigarette on intrauterine insemination outcomes. *Basic Clin Sci*, 2013, 2: 20–24.

Jesik C, Holland J, Lee C. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate*, 1982, 3(1):81–97.

Johnson L, Thompson DL Jr, Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci*, 2008, 105(1–2):23–51.

Jørgensen N, Andersen AG, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, Andersen AN, Auger J, Cawood EH, Horte A, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Vierula M, Toppari J, Skakkebaek NE. Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod*. 2001, 16(5):1012–1019.

Jørgensen N, Vierula M, Jacobsen R, Pukkala E, Perheentupa A, Virtanen HE, Skakkebaek NE, Toppari J. Recent adverse trends in semen quality and testis cancer incidence among Finnish men. *Int J Androl*, 2011, 34(4 Pt 2):37–48.

Josso N, di Clemente N, Gouédard L. Anti-Müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 2001, 179(1-2):25–32.

Kenneth YI, Rex AH. Structure and function of the ductuli efferentes: a review microscopy research and technique, *Microscopy Research and Technique* 1994, 29(6):432-467.

Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, Kim SH, Moon SY, Choi YM. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in routine semen analysis. *Clin Exp Reprod Med*. 2013, 40(1):23–28.

Koskimies AI, Kormano M, Lahti A. A difference in the immunoglobulin content of seminiferous tubule fluid and rete testis fluid of the rat. *Reprod. Fertil*, 1971, 27(3):463-465.

Koskimies AI, Kormano M. The proteins in fluids from the seminiferous tubules and rete testis of the rats. *J Reprod Fertil*, 1973, 34:433-444.

Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol*. 2010, 48(5):425–435.

Kraemer M, Fillion C, Martin-Pont B, Auger J. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Human Reproduction*, 1998, 13(3):611-619.

Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo SS, Acosta AA. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Archives of Andrology*, 1987, 18(3):275-277.

Kruger TF, Franken DR. *Atlas of Human Sperm Morphology* Evaluation. 1st Ed. London, Informa Healthcare Press, 2009:49-83.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA. Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 1986, 46(6):1118-23.

Kumar S. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J Occup Health*, 2004, 46(1):1–19.

Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril*, 2003, 79(2):287-291.

Laczko I, Hudson DL, Freeman A, Feneley MR, Masters JR. Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *Prostate*, 2005;62(3):260–266.

Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod*. 1999, 14(8):2015-2019.

Lasserre A, Barrozo S, Tezón JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH. Human epididymal proteins and sperm function during fertilization: an update. *Biological Research*, 2001, 34(3-4):165-178.

Le Lannou D, Griveau JF, Le Pichon JP, Quero JC. Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Human Reproduction*, 1992, 7(10):1417-1421.

Lopata A, Brown JB, Leeton JF, Talbot JM, Wood C. In vitro fertilization of preovulatory oocytes and embryo transfer in infertile patients treated with clomiphene and human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*, 1978, 30(1):27-35.

Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993, 90(23):11162–11166.

Lui CW, Mrsny RJ, Meizel S. Procedures for obtaining high percentages of viable in vitro capacitated hamster sperm. *Gamete Res*, 1979, 2(3):207.

MacLeod JF. The role of oxygen metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol*. 1943;138:512–518.

Macleod JF, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril*. 1951a, 2(3):187–204.

Macleod JF, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *J Urol.* 1951b, 66(3):436–439.

Macomber D, Sanders MB. The spermatozoa count. *N Engl J Med.* 1929, 200(19):981–984.

Mahadevan M, Baker G. Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization. In: Wood C, Trounson A (eds) *Clinical In Vitro Fertilization*. Springer-Verlag, Berlin, 1984:83-97.

Mak V, Jarvi K, Buckspan M, Freeman M, Hechter S, Zini A. Smoking is associated with the retention of cytoplasm by human spermatozoa. *Urology.* 2000, 56(3):463-466.

Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress and male infertility. *Indian J Med Res,* 2009, 129(4):357-367

Makler A. A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil Steril,* 1978, 30(3):313-318.

Makler A. The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril,* 1980, 33(3):337-338.

Marchesi DE, Biederman H, Ferrara S, Hershlag A, Feng HL. The effect of semen processing on sperm DNA integrity: comparison of two techniques using the novel Toluidine Blue Assay. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010, 151(2):176-80.

Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod,* 2004, 70(4):910–918.

Martinez G, Daniels K, Chandra A. *Fertility of men and women aged 15–44 years in the United States: national survey of family growth. Natl Health Stat Report*, 2012, 12(51):1–28.

McGrath J, Hillman, N, Nadijcka M. Separation of dead and live spermatozoa. *Dev Biol*, 1977, 61(1):114- 117

McNeal JE. The prostate gland: morphology and pathobiology. *Monogr Urol*, 1983, 4(1):3–11.

McVicar CM, McClure N, Williamson K, Dalzell LH, Lewis EM. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril*, 2004, 81(1):767–774.

Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, de Villiers A. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. *Andrologia*, 1997, 29(1):1-7.

Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*, 1990, 5(5):586-592.

Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human Reproduction*, 2001. 16(6):1165-1171.

Meschede D, Keck C, Zander M, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. (1993). Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *International Journal of Andrology*, 1993, 16(6):362-369.

Middendorff R, Müller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF, Davidoff MS. The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and

relaxation activities regulated by cyclic GMP. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(7): 3486–3499.

Mital P, Hinton B, Dufour J. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod*, 2011 84(5):851-858.

Mortimer D, Menkveld R. Sperm morphology assessment historical perspectives and current opinions. *Journal of Andrology*, 2001, 22(2):192-205.

Mortimer D. *Practical laboratory andrology*. 1 st ed. Oxford University New York Press, 1994

Mortimer D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. *Reprod Fertil Dev*, 1994, 6(1):25-31.

Mortimer D: Semen analysis and sperm washing techniques. In: Gagnon C (ed). Boca Raton, CRC Press, 1990:263-284.

Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JB. Leukocytospermia: relationship to sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male factor infertility. *Fertil Steril*, 2007, 88(3):737–740.

Mruk DD, Cheng CY. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *EndocrRev*, 2004, 25 (5):747-806.

Oldereid NB, Rui H, Clausen OP, Purvis K. Cigarette smoking and human sperm quality assessed by laser-Doppler spectroscopy and DNA flow cytometry. *J Reprod Fertil*, 1989, 86(2):731-736.

Oliva R, Martinez-Heredia J, Estanyol JM. Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. *Syst Biol Reprod Med*. 2008, 54(1):23–36.

Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod*, 2001, 16(9): 1912–1921.

Oshio S, Kaneko S, Iizuka R, Mohri H. Effects of gradient centrifugation on human sperm. *Arch Androl*, 1987, 19(1):85-93.

Papaioannou MD, Pitetti JL, Ro S, Park C, Aubry F, Schaad O, Vejnar CE, Kühne F, Descombes P, Zdobnov EM. Sertoli cell Dicer is essential for spermatogenesis in mice. *Dev Biol*, 2009 326(1):250–259.

Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men *BJU Int*, 2006, 97(2):324-326.

Payne AH, Wong KL, Vega MM. Differential effects of single and repeated administrations of gonadotropins on luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two populations of Leydig cells. *J Biol Chem*. 1980, 255(15):7118–7122.

Phetudomsinsuk K, Sirinarumitr K, Laikul A, Pinyopummin A. Morphology and head morphometric characters of sperm in Thai native crossbred stallions. *ActaVet.Scand*, 2008, 50(1),1–9.

Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res*, 1999, 423(1–2): 103–111.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Smoking and infertility. *Fertil Steril*, 2008 ,90(5 Suppl): 254–259.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2013, 99(1):63.

Prader A. Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle*, 1966, 7(6):240–243.

Roosen-Runge EC. The rete testis in the albino rat. Its structure, development and morphological significance. *Acta Anat*, 1961, 45:1-30.

Roosen-Runge EC, Holstein A. The human rete testis. *Cell Tissue Res*, 1978, 189(3):409–433.

Rousseaux S, Reynoird N, Escoffier E, Thevenon J, Caron C, Khochbin S. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online*. 2008, 16(4): 492–503.

Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, Perreault SD. GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutat Res*, 2007, 625(1-2):20–28.

Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat*, 1990,188(1):21–30.

Saaranen M, Kantola M, Saarikoski S, Vanha-Perttula T. Human seminal plasma cadmium: comparison with fertility and smoking habits. *Andrologia*, 1989, 21(2):140–145.

Saaranen M, Suonio S, Kauhanen O, Saarikoski S. Cigarette smoking and semen quality in men of reproductive age. *Andrologia*, 1987;19(6):670–670.

Sadeu JC, Hughes CL, Agarwal S, Foster WG. Alcohol, drugs, caffeine, tobacco, and environmental contaminant exposure: reproductive health consequences and clinical implications. *Crit Rev Toxicol*, 2010, 40(7):633–652.

Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril*. 2010, 93(4):1027–1036.

Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril*, 2002, 78(6):1215–1224.

Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril*, 2002,78(3):491–499.

Sallmen M, Lindbohm ML, Nurminen M. Paternal exposure to lead and infertility. *Epidemiology*, 2000, 11(2):148–52.

Sancak B, Cumhuri M. *Fonksiyonel Anatomi*, 1. Baskı, Ankara, OTDÜ Gelişme Vakfı, 1999 317-328.

Sánchez R, Concha M, Ichikawa T, Henkel R, Schill WB. Glass wool filtration reduces reactive oxygen species by elimination of leukocytes in oligozoospermic patients with leukocytospermia. *J Assisted Reprod Genet*, 1996, 13(6):489-494.

Sánchez R, Stalf T, Khanaga O, Turley H, Gips H, Schill WB. Sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in andrological patients. *J Assist Reprod Genet*, 1996, 13(3):110-115.

Schmiedel S, Schuz J, Skakkebaek NE, Johansen C. Testicular germ cell cancer incidence in an immigration perspective, Denmark, 1978 to 2003. *J Urol*. 2003, 183(4):1378–1382.

Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology*, 2006, 223(1-2):54-60.

Sergerie M, Ouhilal S, Bissonnette F, Brodeur J, Bleau G. Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum Reprod*, 2000, 15 (6): 1314-1321.

Shaman JA, Yamauchi Y, Ward WS. The sperm nuclear matrix is required for paternal DNA replication. *J Cell Biochem*, 2007;102(3):680–688.

Sharma S. Agarwal A. Spermatogenesis: An Overview. In Zini A and Agarwal A (eds.), *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*, 1st ed. New York, Springer Science+Business, 2011:19-43.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 2003, 125(6):769–784.

Shiran E, Stoller J, Blumenfeld Z, Feigin PD, Makler A. Evaluating the accuracy of different sperm counting chambers by performing strict counts of photographed beads. *J Assist Reprod Genet*, 1995,12(7):434-42.

Skakkebaek NE, Andersson AM, Juul A, Jensen TK, Almstrup K, Toppari J, Jorgensen N. Sperm counts, data responsibility, and good scientific practice. *Epidemiology*. 2011, 22(5):620–621.

Skakkebaek NE, Jorgensen N, Main KM, Rajpert-De Meyts E, Leffers H, Andersson AM, Juul A, Carlsen E, Mortensen GK, Jensen TK, Toppari J. Is human fecundity declining? *Int J Androl*. 2006, 29(1):2–11.

Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jørgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J, Vierula M, Toppari J, Andersen AN, Keiding N, Skakkebaek NE, Spira A, Jouannet P. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Human Reproduction*, 2002, 17(2):503-515.

Slotte H, Akerlof E, Pousette A. Separation of human spermatozoa with hyaluronic acid induces, and Percoll inhibits, the acrosome reaction. *Int J Androl*, 1993, 16(6):349-354.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*. 1994, 331(16):1056–1061.

Söderlund B, Lundin K. The use of silane-coated silica particles for density gradient centrifugation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 2000, 15(4):857-860

Spano M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Nuclear chromatin variations in the human spermatozoa which underwent swim-up and cryopreservation, which were evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol Hum Reprod*, 1999, 5(1):29-37.

Su L, Mruk DD, Cheng CY. Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *J Endocrinol*, 2011, 208 (3):207-223.

Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 1997, 56 (3):602-607.

Swan SH, Elkin EP, Fenster L. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect*. 1997, 105(11):1228–1232.

Tea NT, Jondet M, Scholler R: A migration-gravity sedimentation method for collecting motile spermatozoa from human semen. In: Harrison RF, Bonnar J, Thompson W (eds). *In Vitro Fertilization, Embryo Transfer and Early Pregnancy* Lancaster MTP Press Ltd.,;1984:117-120.

Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S.. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 1984, 42(1):87–91.

The University of Western Australia.

<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/malerepro/malerepro.htm>

9.07.2017.

Tishler PV. Diameter of testicles. *N Engl J Med*, 1971, 285(26):1489.

Toshimori K. Biology of spermatozoa maturation: an overview with an introduction to this issue. *Microscopy Research and Technique*, 2003, 61(1):1-6.

Traber MG, Van Der Vliet A, Reznick AZ, Cross CE. Tobacco-related diseases. Is there a role for antioxidant micronutrient supplementation? *Clin Chest Med*. 2000, 21(1):173–187.

Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Human reproductive*, 2002, 17(6).1554-1559.

Tsarev I, Erenpreiss J. Cytochemical Tests for Sperm Chromatin Maturity. In Zini A and Agarwal A (eds.), *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*, 1st ed. New York, Springer Science+Business, 2011:19-43.

Turner TT. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *J Androl*, 1995, 16(4):292–298.

Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 1998, 13(7):1864–1871.

Urology. 2012 Oct; Taha EA, Ez-Aldin AM, Sayed SK, Ghandour NM, Mostafa T. Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. *Urology*, 2012, 80(4):822-825.

Virant-Klun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H. Sperm single- stranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet*, 2002, 19(7):319–328.

Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod*. 2010,16(1):30–36.

WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 1st ed. Singapore: Press Concern; 1980.

WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1987.

WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.

WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. 2000, Cambridge University Press: Cambridge.

WHO Laboratory Manual for The Examination and Processing of Human Semen. 2010, 5th edition, Cambridge University Press: Cambridge.

Wikland M, Wik O, Steen Y, Qvist K, Söderlund B, Janson PO: A selfmigration method for preparation of sperm for in vitro fertilization. *Hum Reprod*, 1987, 2(3):191-195.

Wilson JD. Syndromes of androgen resistance. *Biol Reprod*, 1992, 46(2):168–173

Winter JS, Faiman C. Pituitary-gonadal relations in male children and adolescents. *Pediatr Res*, 1972, 6(2):126–135.

Wong C-H, Cheng CY. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 2005, 71:263–296

Yamanaka M, Tomita K, Hashimoto S, Matsumoto H, Satoh M, Kato H, Hosoi Y, Inoue M, Nakaoka Y, Morimoto Y. Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms. *Fertility and Sterility*, 2009, 62(6): 599-606.

Yeung CH, Tüttelmann F, Bergmann M, Nordhoff V, Vorona E, Cooper TG. Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication. *Hum Reprod*, 2009, 24(6):1288–1295.

Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod*, 2001, 16(9): 1950-1953.

Zavos PM, Abou-Abdallah M, Aslanis P, Correa JR, Zarmakoupis- Zavos PN. Use of the multi-ZSC one-step standardized swimup method: recovery of high-quality spermatozoa for intrauterine insemination or other forms of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril*, 2000, 74(4):834-835.

Zavos PM, Centola GM. Methods of semen preparation for intrauterine insemination and subsequent pregnancy rates. *Tohoku J Exp Med*, 1992, 168(4):583–590

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Nursel Hasanoğlu Akbulut
Doğum tarihi	: 24.03.1987
Doğum yeri	: Tolbuhin
Medeni hali	: Evli
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 10600 Balıkesir
Tel	: 0266 244 00 10
Faks	: 0266 244 00 11
E-mail	: nurselgerbil@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Tekirdağ Tuğlacılar Anadolu Lisesi (2005)
Lisans	: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fakültesi (2006-2010)
Yüksek lisans	: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (2010-2013)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: İyi derecede (YÖKDİL:81.25, Mart 2017)
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
	Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği

EK-2. ETİK KURUL RAPORU

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	BALIKESİR ÜNİV. TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ	Çağış Yerleşkesi, Uşak yolu üzeri, 10145 BALIKESİR
	TELEFON	0266 612 14 61/1122
	FAKS	0266 612 14 59
	E-POSTA	etik.bautip@gmail.com

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Farklı Sperm Hazırlama Yöntemlerinin DNA Hasarı Oluşturma Oranları ve Çevresel Faktörlerin Bu Oran Üzerine Etkileri		
BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY	
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	
	SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi	
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
DİĞER:	<input type="checkbox"/>		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/106	Tarih: 19/10/2016	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacının/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmacının/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Doç. Dr. Fuat EREL	Göğüs Hastalıkları	Balıkesir Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Gülten ERKEN	Fizyoloji	Balıkesir Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Esin SÖĞÜTLÜ SARI	Göz Hastalıkları	Balıkesir Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. F. Bahar SUNAY	Histoloji ve Embriyoloji	Balıkesir Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd.Doç.Dr. Elif AKSÖZ	Tıbbi Farmakoloji	Balıkesir Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr. Mehmet ÇALIŞKAN	Halk Sağlığı	Balıkesir KEAS Organize Sanayii	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Av. Mustafa Tuğrul MENÇE	Avukat	Serbest	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	
Ecz. Hüsnü KUNDAKÇI	Eczacı	BAÜ Sağlık Uyg. ve Araştırma Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Serhat ALDEMİR		BEST A.Ş.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının:

Unvanı, Adı Soyadı: Doç.Dr. Fuat EREL

İmza:

EK-3. ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Farklı Sperm Hazırlama Yöntemlerinin DNA Hasarı Oluşturma Oranları ve Çevresel Faktörlerin Bu Oran Üzerine Etkileri

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ

Araştırma amacıyla yapılan bu çalışmaya davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

1) Çalışmanın amacı nedir?

Kısırlık görülme sıklığı giderek artan bir sağlık sorunudur. Ancak, son yıllarda geliştirilen yeni tedavi yöntemleri yüz güldürmektedir. Sık kullanılan bir tedavi yöntemi olan aşılama erkekten elde edilen meni (cinsel salgı) içerisinden sağlıklı görünen üreme hücreleri seçilmektedir. Ancak, görünüşte sağlıklı olan üreme hücrelerinin kalıtım maddesinin ne kadar sağlıklı olduğu konusunda sınırlı bilgi vardır. Bu çalışmanın amacı meniden erkek üreme hücresi elde etmekte kullanılan farklı yöntemlerin kalıtım maddesinin sağlıklı olmasına etkisini ve erkeğin sigara, ilaç kullanması gibi faktörlerin bu konudaki etkisini incelemektir.

2) Katılma koşulları nedir?

Bu çalışmaya dahil edilmeniz için doktorunuzun onayı yeterlidir.

3) Nasıl bir uygulama yapılacaktır?

Normalde spermiyogram tetkikiniz için Androloji Laboratuvarına verdiğiniz menide gerekli incelemeler yapıldıktan sonra artan 2-4 ml hacimli meni tıbbi atık kabına atılmaktadır. Bu çalışmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda çöpe atılan bu sıvıdan iki farklı yöntemle sağlıklı görünen üreme hücreleriniz seçilecek ve kalıtım

maddelerinin ne kadar sağlıklı olduğu incelenecektir. Ayrıca size sorulan birkaç soru ile yaşıınız, sigara içme durumunuz ve ilaç kullanma durumunuz öğrenilecektir.

4) Sorumluluklarım nedir?

Araştırma ile ilgili olarak herhangi bir sorumluluğunuz bulunmamaktadır.

5) Katılımcı sayısı nedir?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı yaklaşık 100'dür.

6) Katılımım ne kadar sürecektir?

Bu araştırma için katılımınız sadece örnek verme süreniz ile sınırlıdır.

Farklı Sperm Hazırlama Yöntemlerinin DNA Hasarı Oluşturma Oranları ve Çevresel Faktörlerin Bu Oran Üzerine Etkileri

7) Çalışmaya katılma ile beklenen olası yarar nedir?

Çalışmaya katılmanız size doğrudan bir yarar sağlamayacaktır. Ancak bu çalışma ile kısırlık sorunu yaşayan erkek hastaların tedavilerinde gelişmelere neden olacak sonuçlar elde edilme olasılığı bulunmaktadır.

8) Çalışmaya katılma ile beklenen olası riskler nelerdir?

Çalışmaya katılmaz durumunda sizi bekleyen olası bir risk bulunmamaktadır.

9) Hangi koşullarda araştırma dışı bırakılabilirim?

Araştırma dışı bırakılmanıza neden olacak herhangi bir durum yoktur.

10) Yeni bulgular

Araştırma sürecinde yapılan uygulamaya yönelik sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir.

11) Araştırma süresince çıkabilecek sorunlar için kimi aramalıyım?

Araştırma haklarınız veya araştırmayla ilgili herhangi bir soru için daha fazla bilgi temin edebilmemiz için **0 505 663 42 87** numaralı telefondan **Dr. F. Bahar Sunay** ile günün 24 saatinde erişime geçebilirsiniz.

12) Çalışma kapsamındaki giderler karşılanacak mıdır?

Bu çalışma için gerekli tüm masraflar araştırmacılar tarafından karşılanacaktır. Çalışma için sizden herhangi bir ücret talep edilmeyecektir.

13) Araştırmaya katılmayı kabul etmemem veya araştırmadan ayrılmam durumunda ne yapmam gerekir?

Araştırmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Çalışmaya **katılmama** veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan **çıkma** hakkına sahipsiniz. Her iki durumda da bir ceza veya hakkınız olan yararların kaybı kesinlikle söz konusu olmayacaktır.

14) Katılmama ilişkin bilgiler konusunda gizlilik sağlanabilecek midir?

Size ait kim tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir. Ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurular ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Farklı Sperm Hazırlama Yöntemlerinin DNA Hasarı Oluşturma Oranları ve Çevresel Faktörlerin Bu Oran Üzerine Etkileri

ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıda yer alan ve çalışmaya başlamadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 3 sayfalık metni okudum. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

"Farklı Sperm Hazırlama Yöntemlerinin DNA Hasarı Oluşturma Oranları ve Çevresel Faktörlerin Bu Oran Üzerine Etkileri" araştırma kapsamında kullanılan meni örneğimin

() Sadece yukarıda bahsi geçen araştırmada kullanılmasına izin veriyorum.

() Hiçbir koşulda kullanılmasına izin vermiyorum.

Gönüllünün (Kendi el yazısı ile)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Adresi:

Telefon No, Faks No:

Tarih (gün/ay/yıl): .../.../....

Açıklamaları Yapan Araştıracının (Doktorun)

Adı-Soyadı:

İmzası:

Tarih (gün/ay/yıl):.../.../.....

Onay Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin

Adı-Soyadı:

İmzası:

Görevi:

Tarih (gün/ay/yıl):...../...../.....

EK-4. ANKET

FARKLI SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİNİN DNA HASARI OLUŞTURMA ORANLARI VE ÇEVRESEL FAKTÖRLERİN BU ORAN ÜZERİNE ETKİLERİ ÇALIŞMASI ANKET FORMU

- 1) Adınız-Soyadınız:
- 2) Medeni durumunuz:
- 3) Yaşınız:
- 4) Mesleğiniz:
- 5) Sigara içiyor musunuz?
 - a) Hayır:
 - b) Evet:yıldır günde.....paket/adet
- 6) Düzenli kullandığınız bir ilaç var mı?
 - a) Hayır:
 - b) Evet: isimli ilacı yıldır günde adet kullanıyorum.
- 7) Bilinen bir sağlık sorununuz var mı?
 - a) Hayır:
 - b) Evet:hastasıyım, yıldır takip ediliyorum.
- 8) Geçtiğimiz 3 ay içerisinde ateşinizin yükselmesine neden olan bir hastalık geçirdiniz mi?
 - a) Hayır:
 - b) Evet: gün/hafta/ay önce