

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

**TOLUIDİN MAVİSİ, ANİLİN MAVİSİ VE SPERM
KROMATİN DİSPERSİYON TESTLERİ İLE SPERM DNA
HASAR ORANLARININ KIYASLANMASI**

Biyolog Yeliz HATİBOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2014

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

**TOLUIDİN MAVİSİ, ANİLİN MAVİSİ VE SPERM
KROMATİN DİSPERSİYON TESTLERİ İLE SPERM DNA
HASAR ORANLARININ KIYASLANMASI**

Biyolog Yeliz HATİBOĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Vildan KARPUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2014

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezindeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Yeliz Hatiboğlu



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. TESTİSLER.....	4
4.1.1. Seminifer Tübüller	5
4.1.1.1. Sertoli Hücreleri.....	6
4.1.1.2. Leydig Hücreleri.....	7
4.2. GAMETOGENEZ	8
4.3. SPERMATOGENEZ	8
4.3.1. Spermatozitojeniz	9
4.3.2. Mayoz.....	10
4.3.3. Spermiyogenez.....	11
4.4. SPERMİN YAPISI	13
4.4.1. Baş.....	13
4.4.2. Boyun	14
4.4.3. Kuyruk	14
4.5.SPERMİN MEMBRANI.....	16
4.6. SPERM DNA YAPISI	16
4.7. SPERMİN DNA HASARI	17
4.8. ERKEK İNFERTİLİTESİ	18

4.8.1. Semen Analizi	18
4.8.1.1. Sperm Hücresi Sayımı (Konsantrasyon)	18
4.8.1.2. Sperm Hareketliliği (Motilitesi)	19
4.8.1.3. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi.....	19
4.8.1.4. Semen Değişkenlikleri İçin Terminoloji	20
4.8.2. Sperm Morfolojik Anomalileri	21
4.9. ERKEK İNFERTİLİTESİNDE TANI YÖNTEMLERİ	23
4.9.1. Sperm Fonksiyon Değerlendirme Testleri	23
4.9.1. Sperm Kromatin Yapısı Testleri	23
4.10. ANİLİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ	24
4.10.1. Anilin Mavisi ve Özellikleri	25
4.11. TOLUİDİN MAVİSİ YAPISI VE ÖZELLİKLERİ.....	26
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
5.1. HASTA GRUPLARI.....	27
5.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	27
5.3. HİSTOKİMYASAL YÖNTEM	27
5.3.1. Toluidin Mavisi İle Boyama Yöntemi.....	27
5.3.2. Anilin Mavisi İle Boyama Yöntemi	28
5.3.3. Sperm Kromatin Dağılımı (SCD)- Sperm DNA Fragmantasyon Analizi.....	28
6. BULGULAR	30
6.1. SPERM SAYISINA GÖRE TOLUİDİN MAVİSİ, ANİLİN MAVİSİ VE SPERM KROMATİN DAĞILIM (SCD) TESTLERİ SONUCUNDAKİ DNA HASARI ORTALAMALARI	30

6.2. SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE TOLUIDİN MAVİSİ, ANİLİN MAVİSİ VE SPERM KROMATİN DAĞILIM (SCD) TESTLERİ SONUCUNDAKİ DNA HASARI ORTALAMALARI	31
6.3. SPERM KROMATİN DAĞILIM (SCD) TESTİ SONUCUNDAKİ DNA HASARININ SPERM SAYISINA, SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE YORDANMASINA İLİŞKİN BULGULAR	32
6.3.1. Sperm Kromatin Dağılım (SCD) Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısına Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular	32
6.3.2. Sperm Kromatin Dağılım (SCD) Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Motilitesine Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular.....	33
6.4. TOLUIDİN MAVİSİ TESTİ SONUCUNDAKİ DNA HASARININ SPERM SAYISINA, SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE YORDANMASINA İLİŞKİN BULGULAR.....	34
6.4.1. Toluidin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısına Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular	34
6.4.2. Toluidin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Motilitesine Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular	34
6.5. ANİLİN MAVİSİ TESTİ SONUCUNDAKİ DNA HASARININ SPERM SAYISINA, SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE YORDANMASINA İLİŞKİN BULGULAR	35
6.5.1. Anilin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısına Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular	35
6.5.2. Anilin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Motilitesine Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular	36
6.6. SCD, ANİLİN MAVİSİ VE TOLUIDİN MAVİSİ TESTLERİ SONUCUNDAKİ DNA HASARININ SPERM SAYISI, SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE YORDANMASINA İLİŞKİN BULGULAR	37

6.6.1. SCD Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısı ve Sperm Motilitesi Değişkenlerine Göre Yordanmasına İlişkin Çoklu Regresyon Analizi Sonuçlarına İlişkin Bulgular	37
6.6.2. Toluidin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısı ve Sperm Motilitesi Değişkenlerine Göre Yordanmasına İlişkin Çoklu Regresyon Analizi Sonuçlarına İlişkin Bulgular	38
6.6.3. Anilin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısı ve Sperm Motilitesi Değişkenlerine Göre Yordanmasına İlişkin Çoklu Regresyon Analizi Sonuçlarına İlişkin Bulgular	40
6.7. SPERM SAYISI ,SPERM MOTİLİTESİ, TOLUIDİN MAVİSİ, ANİLİN MAVİSİ VE SCD TESTLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİYE YÖNELİK BULGULAR	42
7. TARTIŞMA.....	53
8. SONUÇ.....	58
9. TEŞEKKÜR	61
10. KAYNAKLAR.....	62

SİMGE VE KISALTMALAR

AB	Anilin Mavisi
AAB	Asidik Anilin Mavisi
ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
AOT	Akridin Turuncu Testi
CMA3	Kromomisin A3
COMET	Tek Hücre Jel Elektroforezi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
FISH	DNA Ayrılım Testi
g	Gram
HBA	Hyaluronik Asit Bağlama Testi
HCl	Hidroklorik Asit
HOS	Hipoozmolar şişme testi
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
PGH	Primordial Germ Hücreleri
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPL	Tekrarlayan Gebelik Kaybı
cm³	Santimetreküp
SCD	Sperm Kromatin Dağılımı
SCSA	Sperm Kromatin Yapısı Testi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-EDTA	Sperm Kromatin Dekondansasyon Testi
TUNEL	Terminal Deoksinüklotidil Transferaz Aracılı 'Nick-End Labelling Testi
TB	Toluidin Mavisi

WHO Dünya Sağlık Örgütü
YÜT Yardımla Üreme Teknikleri

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 27/11/2013 tarih ve 14-85 numaralı karar ile onaylanmıştır.

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 28.03.2014 tarih ve 2014-01-03 proje numarası ile desteklenmesine karar verilmiştir.

Araştırma Projesi No: HE/1822103

1. ÖZET

İnfertil çiftlerin yaklaşık %20'sinde sadece erkek faktörü temel nedendir. İnfertil ve fertil erkekleri birbirinden ayırmak için sperm DNA bütünlüğü üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Sperm kromatininin bütünlüğü, özellikle intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulamalarında, fertilizasyon başarısında önemli rol oynar. İnfertil erkeklerde sperm DNA hasarı yüksek olarak saptanmaktadır ve yardımla üreme tekniklerinin başarı oranları ile ters ilişkilidir. Yardımla üreme tekniklerinde sperm DNA hasarı varlığını tespit etmek için uygulanan testler bulunmaktadır. Sperm DNA hasar oranı anilin mavisi, toludin mavisi ve sperm kromatin dağılım testi ile değerlendirilebilir.

Toluidine mavisi; sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan temel boyadır. Zayıf paketlenmiş kromatine veya hasarlı DNA'ya sahip nükleustaki sperm DNA'sının fosfat rezidüleri toluidin mavisi gibi baz boyalara bağlanmaya daha eğilimlidir. Bu nedenle, ışık mikroskopunda hasarlı sperm mavi ile boyanırken normal sperm renksiz kalacaktır. Bu testin DNA yapısı ve paketlenme için hassas bir test olduğu bildirilmiştir.

Anilin mavisi; sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan asidik bir boyadır. Hasarlı DNA'ya sahip sperm sıklıkla rezidüel histonları açığa çıkarmaktadır. Bu rezidüel histonlar zayıf kromatin paketlenmesine, ana nükleoproteinlere kolay ulaşılmasına ve de anilin mavisi gibi asidik boyalara bağlanmaya yatkınlığa yol açmaktadırlar. Anilin mavisi, spermde kondansasyon anomalisi ile birlikte morfolojisini de değerlendiren bir boyadır. Anilin ile boyama sonucunda olgun sperm başları (matur sperm) açık mavi, olgunlaşmamış sperm başları (immatur sperm) koyu mavi boyanır.

Sperm kromatin dağılım testi; sperm DNA fragmentasyonu ile direkt ilişkili uyarılmış kondensasyon (yoğunlaştırma) prensibine dayanmaktadır. Çok küçük halo veren ya da hiç halo oluşturmayan spermler fragmente DNA içeren spermlerdir. Bu test spermdeki DNA'nın parçalanma oranını göstermektedir.

Bu çalışmamızda semen alınan hasta örneklerine toludin mavisi, anilin mavisi ve sperm kromatin dağılım testi kullanılarak infertil erkeklerin sperm DNA hasar oranlarını karşılaştırmayı amaçlamaktayız.

Anahtar Kelimeler: sperm, toluidin mavisi, anilin mavisi, sperm kromatin dağılım testi (SCD).

2. SUMMARY

Toluidine Blue, Aniline Blue And Sperm Chromatin Distribution (SCD) With Tests of Sperm DNA Damage Ratio Comparison

Men factor is the only basic reason, in almost 20 percent of infertile couples. There are more studies about DNA integrity in order to separate infertile an fertile men from each other. Entry of spermatozoa chromatin, especially at the ICSI implementations, has an important role in fertilization achievement. Ratio of spermatozoa DNA damage high in infertile men, however this is related inversely to success ratio of asisted reproductive technique. There are some tests to find spermatozoa DNA damage in assisted reproductive techniques. Spermatozoa DNA damage can be evaluated with aniline blue, toluidine blue and sperm chromatin dispersion tests.

Toluidine blue is the basic color evaluate sperm chromatin integrity. Wead-packed chromatin or spermatoza DNA's phosphate residue which have damaged DNA at nucleus tend to join basic color like toludine blue. For this reason, while damaged spermatozoa is being staining with blue, in light microscope, normal spermatozoa will remain colorless. This test is stated as a sensitive test for DNA structure and packing.

Aniline blue is the asidic color that is used to evaluate spermatozoa chromatin integrity. Spermatozoa which has DNA damage frequently reveal residual histones. These residual histones cause weak chromatine packing, main nucleoprotein to reach easily and the tendency of connecting to asidic color like aniline blue. Aniline blue is the color which evaluate not only condonsation abnormal but also its morphology. As a result of mature sperm head staining with aniline, light blue, immature sperm heads is painted dark blue.

Sperm chromatin dispersion test is based on principle that is induced condensation principle related to sperm DNA fragmentation directly. Spermatozoa including fragmented DNA are the spermatozoa which have small halo or not having halo at all. This test indicate ratio of DNA's fragmentation in spermatozoa.

In this project, we objective to compare spermatozoa DNA damage ratio of infertile men by using test of toluidine blue, aniline blue and sperm chromatine dispersion.

Key Words : Spermatozoa, toluidine blue, aniline blue, sperm chromatin dispersion test (SCD).

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite her evli çiftten %10-15 inde görülmeye başlanmış olup, günümüzde infertilite problemi yaşayan çiftlerin sayısı giderek artmaktadır. Erkek faktörünün neden olduğu infertilitede sperm DNA'sında oluşan hasarın araştırılmasına yönelik çalışmalar artış göstermeye başlamıştır (1, 2).

Yardımla üreme tekniklerinde (YÜT), erkeğe bağlı infertilitenin nedenlerini bulmak için; semen analizi ile sperm sayısı, spermin morfolojik yapısı ve sperm hareketliliği değerlendirilir. Rutin semen analizi ile fertil ve infertil erkeği ayırmak güç olduğundan, yapılan çalışmalar sperm DNA bütünlüğü üzerine yoğunlaşmıştır. Sperm sayısı normal olan bireylerde (normospermi) de sperm DNA'sındaki hasara bağlı olarak döllenme problemleri yaşanmaktadır (2, 3).

Sperm DNA yapısındaki bütünlüğün tanısının konması için bir çok test geliştirilmiştir. Bu testler; Akridin Turuncu Testi (Acridine Orange Test- AOT), Toluidin Mavisi (Toluidine Blue- TB), Anilin Mavisi (Aniline Blue-AB), TUNEL [TheTerminalDeoxynucleotidyl Transferase- Mediated Deoxyuridine (TdT) Triphosphate (dUTP) Nick EndLabeling Assay], Asıl Çentik Okuma Tayini (In Situ Nick Translation Assay NT), Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (COMET), Sperm Kromatin Ayrılma Testi (Halosperm Test- Sperm Chromatin Dispersion Test-SCD), Sperm Kromatin Yapısı Tayinidir (Sperm Chromatin Structure Assay-SCSA). Her uygulanan testin aynı sonucu verip vermediği ile klinikte uygulanma süreleri ve belli bir standarda sahip olup olmadıkları fertilizasyondaki başarıda önemlidir (4, 5).

Bu çalışmada infertilite sorunu yaşayan erkek bireylerden alınan semen örneklerinde Toluidin Mavisi, Anilin Mavisi ve Sperm Kromatin Dağılımı (SCD) testleri kullanılarak sperm kromatin yapısı ve yoğunlaşması arasındaki ilişkileri karşılaştırma yaparak uygulanan sperm DNA hasar oranları testlerinden hangisinin daha verimli olduğunu tespit etmeyi amaçlamaktayız.

4. GENEL BİLGİLER

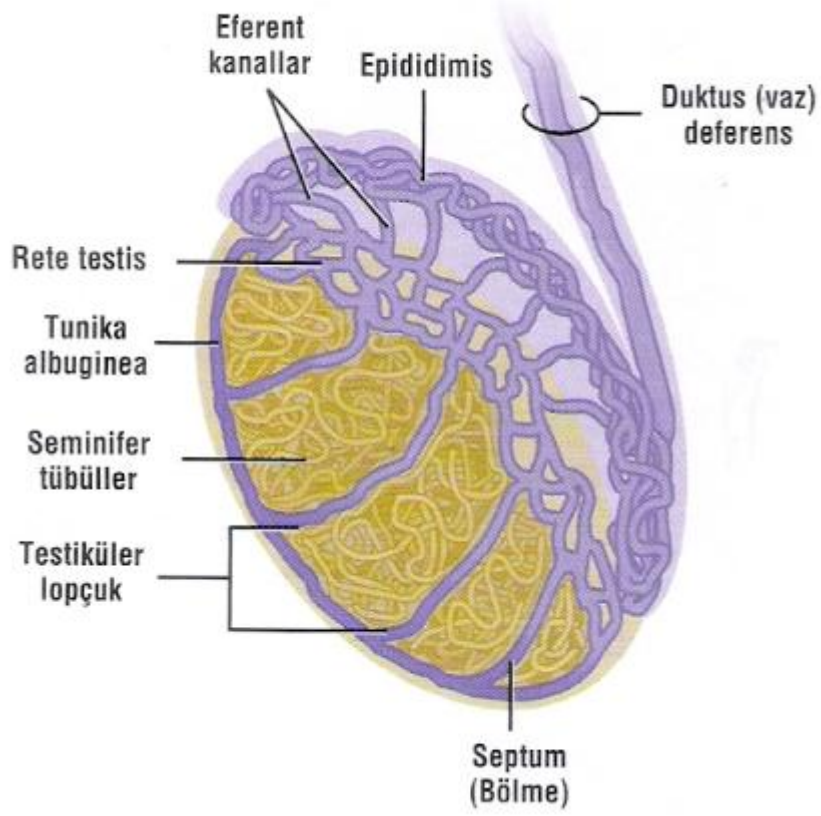
4.1. TESTİSLER

Erkek üreme sistemi skrotum içinde asılı bulunan iki adet testis, epididimis, genital kanallar, yardımcı üreme bezleri ve penisten oluşmaktadır (6).

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum içinde ayrı bölümlerde yerleşmiş oval şekilli organlardır. Karın boşluğunun dışında olmalarından dolayı testislerin ısıları vücut ısısından 2 °C daha düşüktür ve bu değer spermatogenez için idealdir.

Testislerin çevresinde tunika albugenia denilen fibromüsküler yapıdan oluşan bir bağ dokusu tabakası bulunur (7, 8). Tunika albugenia testisin arka yüzünde kalınlaşır ve mediastinum testisi oluşturur. Burada bezin içine giren fibröz septumlar dokuyu testiküler lobüllere ayırır. Her lobülde bir ile dört adet kıvrımlı yapıda olan seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüllerin duvarı epitel ile döşelidir. Mediastinum testis içinde yer alan, boşluklar ağı olarak bilinen yapıya rete testis denir. Bu yapı seminifer tübüllerin epitel duvarı; testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonları toplayan kanallar ağından oluşur (7, 8, 9) (Şekil 1).

Testisler hem sperm üretimi hem de androjenleri (testosteron ve türevlerini) üreterek salgırlar. Testisler, bileşik tübüler yapıda iç salgı (endokrin) ve dış salgı (ekzokrin) bezi gibi düşünülebilirler. Ekzokrin salgısı, canlı sperm hücreleridir. Endokrin salgı Leydig hücreleri ve Sertoli hücreleri arasındaki ilişkiler ile ayarlanır (7, 10).

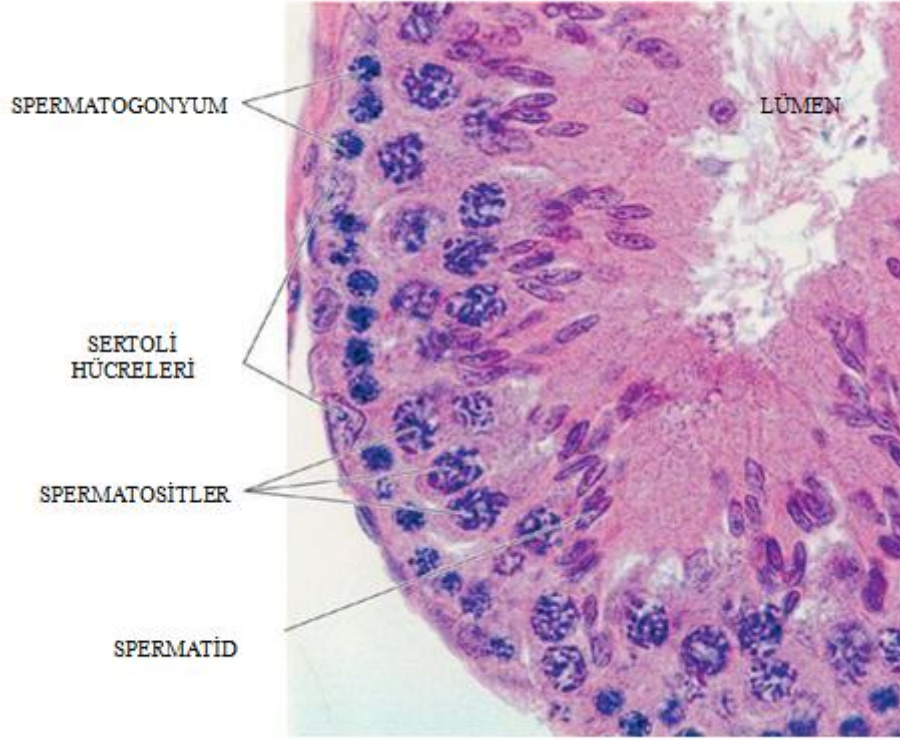


Şekil 1. Testis ve kanalları (11)

4.1.1. Seminifer Túbüller

Seminifer túbüller duvarlarında birkaç hücre tabakası kalınlığında epitele sahiptirler ve merkezde bir lümen taşırlar. Seminifer epitel bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrelenmiştir (7, 8). Yuvarlak şekle sahip olan seminifer túbüller kan damarlarıyla birlikte bir miktar lenfosit, plazma hücresi ve Leydig (interstisyel) hücrelerini içeren az miktarda bağ dokusu ile birbirinden ayrılmışlardır (12).

Seminifer túbüllerin epiteli; sertoli hücreleri ve gelişmekte olan germ hücrelerini (spermatogenik seriyi: Spermatogonyum, primer spermatozoid, sekonder spermatozoid, spermatid, sperm) içeren hücrelerden oluşur (13) (Şekil 2).



Şekil 2. Seminifer tübül histolojik yapısı (14)

4.1.1.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış primordial hücrelerdir. Puberteye kadar daha baskın olan hücreler, puberteden sonra sayıları azalarak germinal hücreler arasına dağılmıştır (6, 7, 8). Sertoli hücreleri, tübülleri boyunca birbirleri ile sıkı bağlantılar (gap junction) yaparak seminifer tübülün epitelini ikiye ayırır.

- 1) Taban bölümü (bazal kompartman)
- 2) Lümen altı bölümü (adluminal kompartman)

Bazal kompartmanda, spermatogonyumlar, lümenaltı kompartmanda ise mayoz bölünmenin çeşitli aşamalarındaki primer spermatozitler, sekonder spermatozitler ve spermatisitler yer alır (10).

Sıkı bağlantılarla birbirlerine bağlanan sertoli hücreleri spermatogenez sırasında destek hücreleri olarak işlev görür. Sıkı bağlantılar ile bazı yapıların kandan seminifer

tübül lümenine geçişini engelleyerek 'kan-testis bariyeri' oluştururlar. Kan- testis bariyeri ile spermler kan dolaşımında bulunan antikorlardan koruyarak, hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır (6, 8, 12).

Sertoli hücrelerinin testisin ana işlevlerinin düzenlenmesinde önemli görevleri vardır. Bu hücreler:

1-Gelişmekte olan spermatogenez hücrelerinin desteklemesini, korumasını ve beslemesini,

2-Kan-testis bariyerinin kontrolünü,

3-Folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarımına cevap verirler. FSH androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve sekresyonunun düzenlenmesini,

4-Artık cisimlerin fagosite edilmesini,

5-Germ hücrelerinin seminifer tübül lümenine doğru pasif hareketlerini (spermiasyon),

6-Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılanmasını,

7- Spermatogenezin parakrin kontrolünün gerçekleştirilmesini,

8-Leydig hücreleri ve peritübüler hücrelerin fonksiyonlarında parakrin kontrolü sağlar (6, 9, 10, 15).

4.1.1.2. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri, steroidogenezin düzenlenmesinde ve testis homeostazının düzenlenmesinde önemli rol oynar. Leydig hücreleri interstisyel alanda düzensiz şekilde seminifer tübüllerin etrafında bulunurlar. Bu alanda aynı zamanda bol miktarda kan damarı, lenf damarı ve sinirler de bulunur (16, 17).

Leydig hücreleri erkek steroid hormonu olan testosteronun üretim ve salgılanmasından sorumlu olan hücrelerdir. Vücutta bulunan testosteronun %95'i testislerde, Leydig hücreleri içinde kolesterolden sentezlenerek yapılır (16, 18).

4.2. GAMETOGENEZ

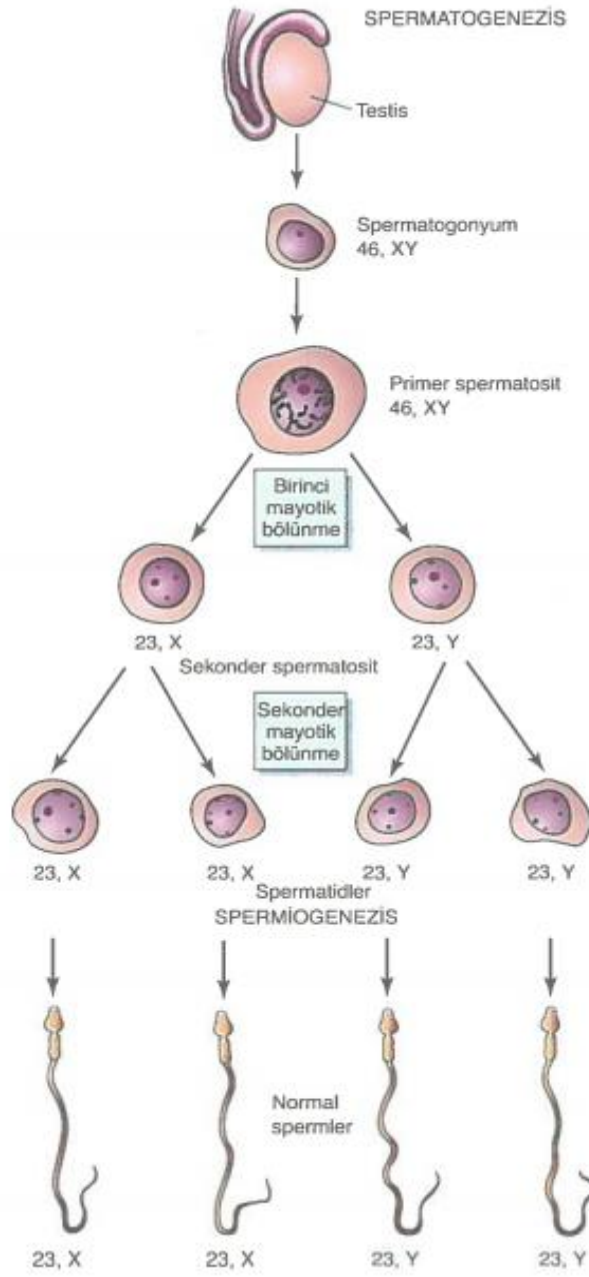
Gametler ikinci hafta boyunca epiblastın içinde oluşan ve daha sonra yolk kesesine göç eden primordial germ hücrelerinden (PGH) köken alırlar. Primordial germ hücreleri dördüncü haftadan itibaren, bu sefer yolk kesesinden, gelişmekte olan gonadlara doğru yer değiştirmeye başlarlar ve hedeflerine beşinci haftada ulaşırlar. Göç süreci ile devam eden mitoz bölünme, gonada ulaştıktan sonra da devam eder. Daha sonra germ hücreleri fertilizasyona hazırlık için özelleşmiş üreme hücreleri olan gametlerin gelişimini kapsayan gametogenez sürecine girerler (19, 20).

Gametogenez diploid gamet hücresinden mayoz bölünme ile haploid gamet hücresi olan sperm ve yumurtanın oluşma sürecidir (19, 21).

4.3. SPERMATOGENEZ

Spermatogenezis; erkek germ hücrelerinin oluşmasını, sayılarının artmasını ve olgun spermelere dönüşmesini sağlayan bir süreçtir. Her biri spesifik germ hücre tipiyle bağlantılı olmak üzere üç evrede incelenebilir;

- Spermatositogenez (proliferasyon): Spermatogonyum
- Mayoz bölünme (redüksiyon): Spermatositler
- Spermiyogenez (farklanma): Spermatidler (12, 21) (Şekil-3).



Şekil 3. Spermatogenez (20)

4.3.1. Spermatozotogenez

Spermatozotogonyumlar kendi içlerinde üç farklı şekilde ayrılırlar; Açık A, koyu A ve B spermatozotogonyumlar. Açık veya koyu A tipi spermatozotogonyumlar B tiplerinden daha azdır. A tipi spermatozotogonyumların sitoplazmasında organeller dağınıktır, mitokondrileri yuvarlak

şekillidir ve çekirdek yakınında bulunurlar. Bunlarda belirgin golgi kompleksi ve dağınık ribozomlar izlenir. Oval ve yuvarlak bu hücreler yaklaşık 12 µm. çapındadır ve her biri bazal lamina üstüne otururlar. Açık A tipi spermatogonyumlar yedek hücre olup, gerektiğinde spermatogenezi başlatırlar. B tipi spermatogonyumlar en çok bulunan tip olmakla birlikte çekirdeği merkezi olarak yerleşmiş ve yuvarlak şekle sahiptir. Bazal lamina üzerine otururlar fakat bazal lamina ile bağlantıları daha azdır. Sitoplazmalarında A tipine göre daha fazla ribozom içerirler (8, 10).

Pubertededen sonra seminifer tübüllerin germinal epitelindeki kök hücreler (tip A spermatogonyum) aralıklarla DNA'larını ikiye katlayarak mitoz ile bölünürler. Her bir mitoz bölünme iki kardeş hücreyi oluşturur: bir diğer tip A spermatogonyum ve ikinci tip hücre olan B spermatogonyum (12).

Tip B spermatogonyumlar mitoz yoluyla diploid yapıda olan primer spermatositleri oluşturur. Bütün spermatogonyum hücreleri seminifer tübülün bazal bölümünde bulunurken, primer spermatositler lümeneye komşu bölüme geçer. Bu süreç insanda 3 gün kadar kısa bir sürede gerçekleşir (12, 15).

4.3.2. Mayoz

Dinlenme evresindeki spermatositler mayoz bölünme için DNA sentezlemeye başlarlar ve ardından mayoz bölünmenin uzun profaz evresine girerler (21). Bu sırada belirgin bir büyüme göstererek çapları 18 mikrona ulaşır. Hücrelerin sitoplazması spermatogonyumlarınkine benzerdir. DNA sentezinin başlamasıyla hücreler bazal membrandan uzaklaşırlar ve sertoli hücreleri arasında kurulmuş olan kan testis bariyerini aşarlar (10). Spermatositler kan-testis bariyerini geçtikten sonra, iki önemli olay gelişir. Birincisi spermatositler ile sertoli hücre yüzeyinde ve sertoli hücreleri arasında spermatogenezin sonunda kadar sürecek olan yapısal ve işlevsel bir ilişki gelişmesidir. İkincisi ise mayoz bölünmenin profaz evresinden itibaren, spermatositlerin yeni yüzey antijenleri geliştirmeye başlamalarıdır. Bu özellik spermatogenez sonuna kadar sürmektedir (21).

İlk mayoz bölünmeden hemen önce primer spermatositler DNA'larını replike ederler. Böylece 46 kromozom yapısına sahip primer spermatosit ilk mayoz bölünmeden sonra 23 kromozoma sahip sekonder spermatosit olarak adlandırılır. Sekonder spermatositler ikinci

mayoz bölünmeyi tamamlayarak yeni spermatid hücrelerini oluştururlar. Spermatid hücreleri 23 kromozom yapısına sahiptir. Spermatidler spermleri oluşturmak için spermiyogenez (matürasyon) sürecinden geçerler (12).

4.3.3. Spermiyogenez

Erken dönemde spermatidler nispeten küçük, küresel şekilli hücrelerdir. Nükleusları ince kromatinlidir, arada yoğun kromatin yumakları vardır. Küçük hücre zarının altında dizilmiş olan mitokondriler spermatid sitoplazmasının tanınmasını kolaylaştırır. Spermiyogenez; spermatidin sperme farklılaşmasını sağlayan 3 ana olay ile karakterizedir. Bunlar; flagellum (kamçı) gelişmesi, akrozom gelişmesi ve nükleer yoğunlaşmadır (7, 10) (Şekil 4).

1) Flagellum (kuyruk) gelişmesi: Kuyruk distal sentriyolden gelişir. Keratin içeren yoğun dış lifler ve fibröz kılıf ile çevrili aksoneme sahiptir. Mitokondriler kuyruğun proksimal bölümü çevresinde sarmalımsı kılıf oluşturur (22).

2) Akrozom gelişmesi: Döllenme için gerekli olan hidrolitik enzimlerin depolanması ve sürekli sentezinin gerçekleştiği akrozomal keseyi içerir. Akrozom gelişmesi dört ardışık evreden oluşur: Golgi evresi, kep evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi (7).

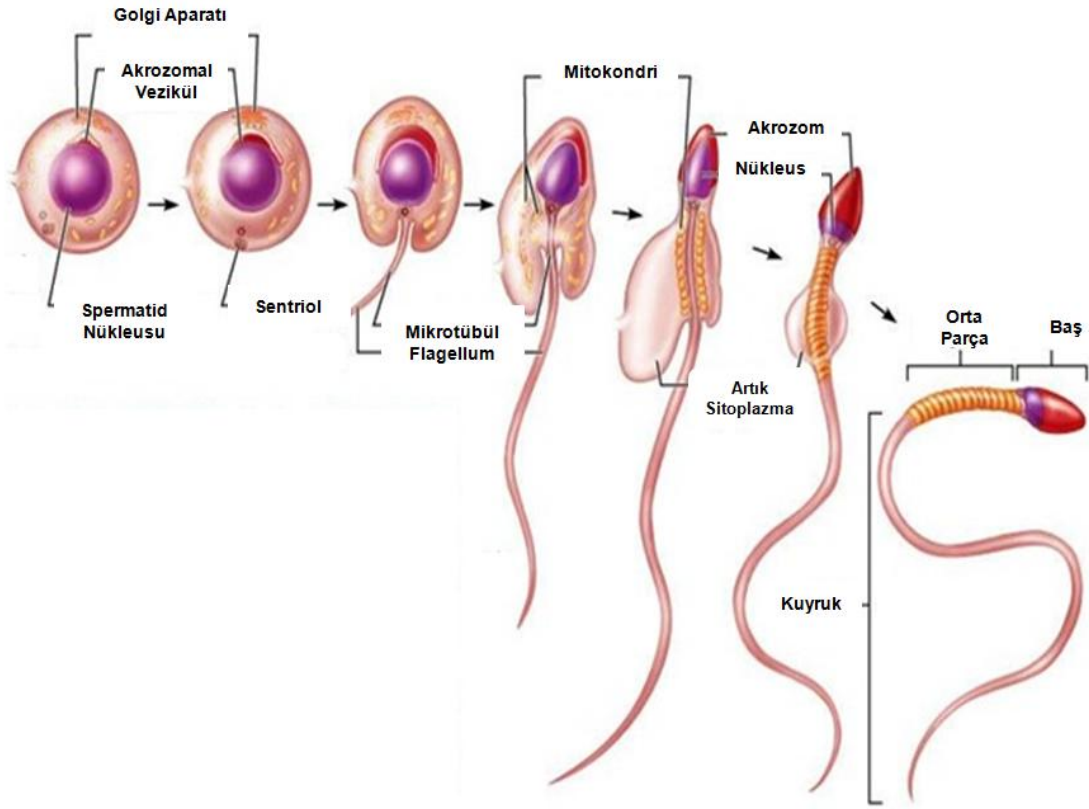
- **Golgi Evresi:** Spermatidlerin sitoplazması, nükleusun yakınında belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazma retikulumu tübülleri içerir. Proakrozomal granüller golgi kompleksinde birikirler ve bunun hemen sonrasında birleşerek membranla sınırlanmış bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluştururlar. Akrozomal granül giderek koyulaşır büyür. Sentriyol çiftleri nükleusun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın konuma gelirler. Sitoplazmadaki mitokondriler hücre çeperine doğru dizilirler (9, 10).

- **Kep Evresi:** Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılarak akrozom başlığını oluşturur. Akrozom başlığı akrozom içeriğini kapsayacak biçimde iç ve dış akrozom zarlarını oluşturur. Nükleus zarı ve iç akrozom zarı arasında granüler - filamentöz bir madde meydana gelir Akrozom bölgesindeki nükleus zarı porlarını kaybeder ve daha yoğun görünür. Buna neden iç tarafındaki kromatin yoğunlaşmasıdır (9, 23, 24).

- **Akrozomal Evre:** Akrozomal evre spermatid morfolojisinin çok sayıda değişikliğe uğraması ile karakterizedir. Akrozom; hyaluronidaz, asit fosfataz, akrozin, nöraminidaz ve tripsin benzeri proteaz olan hidrolitik enzimleri içerir. Hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelirken, nükleus daha yoğun hale gelir. Nükleus yoğunlaşır, hafifçe düzleşir ve incelik uzar, hücre membranının üzerine doğru ilerler ve burada tam bir sperm başını oluşturur. Nükleus koyu renkli, küçük, armut şekilli bir yapıdır. Bu arada distal sentriolden çıkan mikrotübüller aksonem denilen yapıyı oluşturur ve kuyruk uzamaya başlar. Mitokondriler kuyruğun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça olan kalınlaşmış bölgeyi oluştururlar (9, 24, 25).

- **Matürasyon Evresi :** Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler ayrılmaz ve sitoplazmik köprüler ile birbirlerine bağlı kalırlar. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprüler artık cisimcik olarak dökülmeye başlarlar. Spermatidin arasındaki protoplazmik köprülerin kalkmasıyla artık cisimcikler sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek, spermler seminifer tübülün lümenine doğru bırakılır. Olgunlaşan spermlerde; sperm başı, sentriyoller ile mitokondrilerden oluşan kuyruk bölümü şekillenir. Mitokondriden oluşan bir kılıf gerekli enerjiyi sağlar. Testis içinde spermlerin metabolik ihtiyaçları sertoli hücreleri tarafından sağlanırken, testis dışında epididimden ve sekonder seks organlarından salgılanan maddeler ile beslenirler (10, 15, 24).

3) Nükleer Yoğunlaşma: Somatik histonlar (H1, H2A, H2B, ve H4) arjinin- ve lizin-zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nükleer yoğunlaşma oluşur. Bu somatik histonların protaminlere dönüşmesinden sonra, nükleozomlar kaybolur ve nükleus materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilirler. Protaminlerdeki disülfid çapraz bağlar sağlam bir yapı kazanarak kromatinin dirençli olmasını, stabilizasyonunu sağlar (7, 26).



Şekil 4. Spermiyogenez (27)

4.4. SPERMİN YAPISI

Bir sperm; baş, boyun ve kuyruk bölgesinden oluşur. Toplam uzunluğu yaklaşık 60 μm kadar olan spermin boyu 4-5 μm , eni 3 μm ' dir. Spermin baş ve kuyruk bölümlerini bir plazma membranı sarar (23) (Şekil 5).

4.4.1. Baş

Sperm başının fonksiyonları; DNA'yı içermesi, koruması ve oositin döllenmesi (fertilizasyon) sırasında bu içeriğini oosite aktarmasıdır. Sperm başı; kondanse nükleus, akrozomal kese ve plazma membranı olmak üzere üç bölgeden oluşur.

Kondanse Nükleus: Arginin ve sisteinden oldukça zengin bazik proteinlerle kaplı genomik DNA'yı içerir. Somatik histonların yerine protaminler bulunduğundan dolayı

nukleozomları yoktur. Sistein miktarının fazla olmasından dolayı disülfit çapraz bağları fazladır. Bu da nükleusa sağlamlık ve dayanıklılık kazandırır (7, 23).

Akrozomal Kese: Akrozomal kese 3 ögeden oluşur. 1) Dış akrozomal membran, 2) İç akrozomal membran, 3) Hidrolitik enzimler.

Akrozomal kesenin incelmış bölgesi kuyruğa doğru uzayarak ekvatoryal segmenti oluşturur. Dış akrozomal membran ile iç akrozomal membran arasında yer alan hidrolitik enzimler akrozomal matriks içerisinde yer alırlar. Proakrozin öncülerinden köken alan hyaluronidaz ve akrozin esas iki enzimdir. Bu enzimler fertilizasyonun başlamasına yardımcı olurlar. (7, 22).

Plazma Membranı: Plazma membranı elemanları; Zona pelusidaya kuvvetli bağlanma yatkınlığına sahip sperm reseptörleri ve fertilindir. Fertilin disintegrin protein ailesi içinde yer alan heterodinamik bir proteindir. Fertilin sperm-oosit plazma membranlarının füzyonuna katılır (7).

4.4.2. Boyun

Sperm başı ile kuyruğu arasındaki kısa parçadır. Bölünmüş kolonlar ve yoğun fibröz yapıdan oluşmaktadır. Uzunluğu yaklaşık 0,3 µm olup, yapısında bağlantı parçası ve proksimal sentriol bulunur. Proksimalde iki çift bölünmüş sütun, 2 major ve 2 minör sütun yapmak üzere başın alt kısmında birleşirler. Distalde ise her sütun birbiri üzerine çaprazlaşır ve orta parçada dış yoğun liflerle birleşir. Bu sütunların görevi, boyun bölgesine esneklik kazandırmak ve bazal plak bağlantısında gerilim yaratmadan bükülmeyi sağlamaktır. Distal sentriyol ise spermiyogenezin ileri evrelerinde ortadan kalkmaktadır. Bunlar aksonemin oluşumu sırasında önemli bir rol oynar. Proksimal sentriyol 9 adet üçlü dış mikrotübül içerir. Ortada ise mikrotübül çifti yoktur (10, 24, 28).

4.4.3. Kuyruk

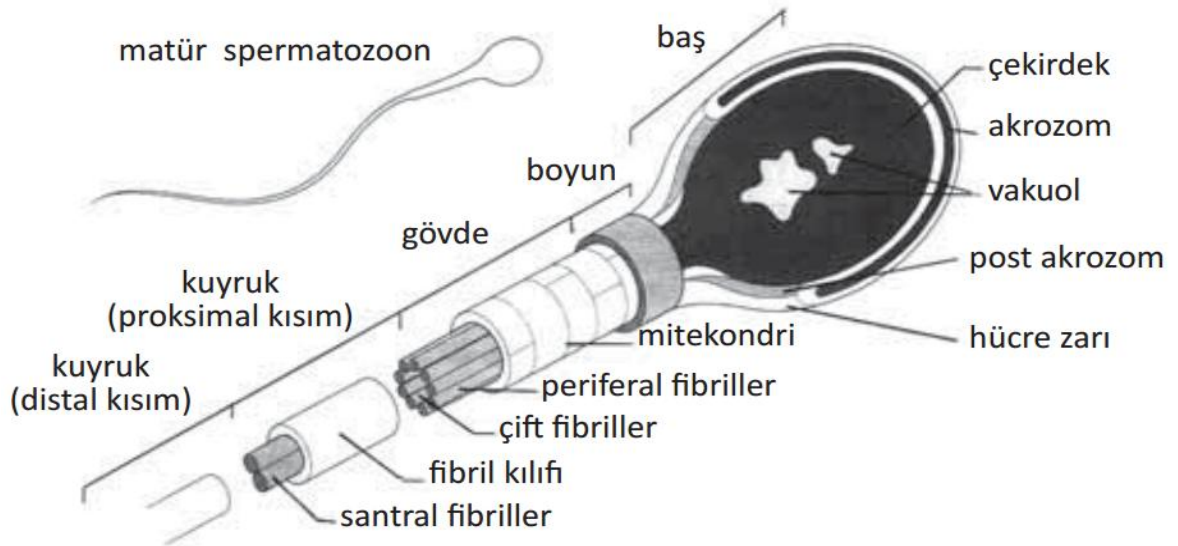
Hareketlilik ve enerji üretiminden sorumlu olan bölgedir. Sperm kuyruğu; orta parça, esas parça ve son parça üç parçadan oluşur.

Orta parça: Sarmal olarak dizilmiş mitokondrilerin oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüller aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı

parçasından kuyruk boyunca uzanır. Orta parçada mitokondriler sarmal şeklinde düzenlenmiştir ve enerji için gerekli yapıdır. İç mitokondriyal membran enerji üretiminden sorumludur ve flagella motiliteden sorumludur. Proksimalden distale gittikçe çapı azalır. Orta parça, mitokondriyel sarmalın son halkası olan annulus ile sonlanırken 9+2 tübül yapısı 7 parça halinde devam eder (7, 24).

Esas parça: Kuyruğun en uzun parçasıdır, uzunluğu 40 µm. kadardır. Yedi dış yoğun lifçe sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Fibröz kılıf, eş uzaklıktaki uzamına kolonlardan çıkan dairesel iskelet tarafından oluşturulur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf, spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan proteinler olan keratin içerir (7, 23).

Son parça: Dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı sadece aksonem bulunan kuyruğun son parçasıdır. 3 µm uzunluğundadır. Kuyruğun son kısmında kalın fibriller ve fibröz tabaka kaybolur. Bu bölgede önce dynein kolları yok olur, daha sonra merkezdeki mikrotübül çiftleri kaybolur ve dıştaki çiftlerin ikisi ortaya hareket ederken kalan, 7'si onların etrafını sarar. Bu sırada B tübüleri de açılarak kaybolur. Kuyruğun ucuna gelindikçe aksonemin mikrotübüler yapısı sona erer (10).



Şekil 5. Spermin yapısı (1)

4.5. SPERM MEMBRANI

Sperm membranı oositi tanıma, oosite yapışma ve spermin oositi döllemesi açısından önemli bir role sahiptir. Sperm membranı; lipid, protein ve karbonhidrat yapısındadır. Lipidlerin esas görevi membran yapısını oluşturarak stabilizasyonunu sağlamak, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit-sperm birleşmesinde rol almaktır. İnsan spermleri; yüksek oranda fosfotidil kolin, fosfotidil etanolamin ve sfingomiyelin içerir. Fosfolipidlerle birlikte kolesterol sperm membranının bütünlüğünü ve impermeabilitesini sağlar. Sperm membranının yapısında, mannoz ve glukoz gibi monosakkaridler ile disakkaridler bulunur. Tirozin, triptofan ve histidin ise esas aminoasit yapısını oluşturmaktadır .

Sperm membranında bilinen moleküller; tirozin kinaz reseptörü, protein kinaz, galaktozil transferaz, spermadezin, progesteron reseptörü gibi spesifik antijenler, ekstraselüler matriks proteinleri (vitronektin, fibronektin, laminin, kollajen), hücre-hücre ya da hücre matriks etkileşimini yürüten nonspesifik proteinler, PH-20, PH-30, G proteinlerinden oluşmaktadır. Sperm plazma membranı bütünlüğü kaybı sonucu normal semen parametreleri gözlenirken erkek infertilitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (29, 30, 31).

4.6. SPERM DNA YAPISI

Sperm nükleuslarındaki yaklaşık 1 m. uzunluğundaki DNA, somatik hücre nükleusunun %10'undan daha küçük bir volüm içine sığabilmek için sıkıca paketlenmelidir. Memelilerde sperm nükleusu nükleer halka denilen tek tip bir yapı içerir. DNA spermatogenez sırasında sperme özel protaminler ile nükleer histonların bir araya gelmesiyle sıkılaştırılmaktadır. Sistein bakımından zengin protaminler arasındaki disülfid çapraz bağlantıları sperm nükleusunun sıkıştırılması ve stabilizasyonundan sorumludur. Bu nükleer sıkıştırma oksidasyon veya sıcaklık yükselmesi gibi dış faktörlerden sperm genomunu korumak için gerekli olduğu düşünülmektedir (12, 32).

Spermatogenez sırasında DNA öncelikle histonun kullanıldığı primer kompaktlaşma ile nükleozomlar içinde paketlenir. Mayoz bölünmeyi izleyen spermiyogenezin sekonder spermatosit evresinde histonlar önce transizyonel proteinlerle ve daha sonrada

protaminlerle yer değiştirir. Sıkılaşmış DNA, protaminler üzerinde bulunan sülfidril gruplarının oksidasyonu ile şekillenen disülfid bağları sayesinde bir arada tutulan kangallaşmış, ortası delik bir halka olan kromatin, bir spiral şekildedir. Sperm nükleusunun DNA'sı bu halkaya demirlenmiş bir şekilde bulunur. (12, 33).

4.7. SPERM DNA HASARI

Sperm DNA bütünlüğü; doğal ve yardımcı yöntemlerle başarılı bir fertilizasyon için aynı zamanda embriyo, fetüs ve çocuğun normal gelişimi için önemlidir. Sperm DNA hasarı ve apoptoz erkek faktörü verimliliği için önemli göstergelerdir ve erkek infertilitesi ile anlamlı bir ilişkisi vardır. Fertil erkeklerin de düşük yüzdelerde sperm DNA hasarına sahip oldukları tespit edilmiştir (33, 34, 35). Çeşitli iç ve dış faktörlerden dolayı sperm DNA'sında hasar meydana gelmektedir. Sperm DNA hasarına neden olabilecek üç olası mekanizma mevcuttur. Bunlar; abortif apoptoz, anormal kromatin paketlenmesi ve oksidatif strestir (36). Bu mekanizmalara neden olan faktörler sperm DNA'sında bulunan tek ve çift ipliklerin kırılmasıyla sperm DNA hasarını meydana getirmektedir. DNA hasarı, tek ve çift DNA iplik kırıklarının her ikisiyle karakterizedir ve özellikle infertil erkeklerin ejakülatında sıktır. Bu hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonunun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi, kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları, DNA da mutasyonlar gibi bir takım yapısal bozulmalardır (32).

Spermiyogenez sürecinde karşılaşılan sorunlardan dolayı protamin eksikliği, sperm kromatin yapısı anomalileri ortaya çıkmaktadır. İnfertil erkeklerde yaklaşık % 5 -15% arasında bir protamin eksikliği görülürken, fertil erkekler tam bir protamin eksikliğine sahip değillerdir (32).

Sperm DNA hasarı infertil erkeklerin % 25'inde ejakülat içinde tespit edilmiş olan yüksek düzeyde reaktif oksijen türlerinin yüksek seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS) lökositler tarafında üretilir. Düşük düzeyleri normal sperm fonksiyonu için gerekli olmasına rağmen, yüksek düzeyde ROS üretimi sperm kromatin üzerinde hasarlandırıcı etkiye neden olur (32, 36).

4.8. ERKEK İNFERTİLİTESİ

Üreme çağındaki çiftlerin bir sene boyunca düzenli cinsel ilişki sonrasında ancak %85'inde gebelik oluşması, çiftlerin % 15'inde infertilite sorunu olduğunu göstermektedir. Çiftlerde erkek faktörünün neden olduğu infertilite oranı %40 kadardır (3, 37).

4.8.1. Semen Analizi

Semen sıvısı, spermin testis ve epididimis salgısının, ejakülasyon sırasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerin salgılarının birleşmesiyle oluşur. Sonuç olarak, oluşan viskozitesi yüksek sıvı semen adını alır. Bu salgıda sperm, semen sıvısının %5'ini oluşturur. Normal semen miktarı kişiden kişiye farklılık göstermek ile birlikte 2-6 ml. arasındadır (38).

Semen analizi ile semen içerisinde bulunan spermlerin motilite, morfolojisi ve canlılık oranını tespit etmek mümkündür. Semen örneği alındıktan sonra 5-30 dakika içerisinde likefiye (37°C) edilir. Likefikasyondan sonra semenin hacmi, pH'sı, rengi, kokusu, viskozitesi değerlendirilir. Daha sonra morfolojik değerlendirme için mikroskopik inceleme yapılır. İlk mikroskopik değerlendirme sırasında konsantrasyon, motilite, mukus iplikleri formasyonu, sperm agregasyon ve aglütinasyonu ve spermden farklı hücresel elemanların değerlendirmesi yapılabilir (39). Spermin mikroskopik incelenmesinde, spermin sayımı, hareketliliği (motilite), ve morfolojik değerlendirilmesi önemlidir (2, 12).

4.8.1.1. Sperm Hücresi Sayımı (Konsantrasyon)

Ejakülatta bulunan sperm sayısı likefikasyonunu tamamlamış örnekte iki yöntemle değerlendirilebilir; 1) spermlerin hepsi immobilize edilerek sayım yapılır, 2) hareketli ve hareketsiz spermler birlikte değerlendirilir. Sperm sayımı için hemositometre, microcell, CellVU, Standart Count, Makler gibi çeşitli sayım kamaraları kullanılmaktadır. Sperm konsantrasyonu milyon/ml olarak değerlendirilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) standartlarına göre 20 milyon/ml ve daha fazla olması normal kabul edilmektedir (21, 38).

4.8.1.2. Sperm Hareketliliği (Motilitesi)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre sperm hareketliliği 'a', 'b', 'c', 'd' olmak üzere dört kategoride değerlendirilmektedir.

a) Hızlı, progresif hareketli sperm.

b) Progresif hareketli sperm; yavaş veya duraklayarak hareket eden spermeleri tanımlar.

c) Nonprogressif hareketli sperm; yerinde hareketliliği tanımlar.

d) Hareketsiz sperm. (38, 40).

4.8.1.3. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Semen analizinde en önemli kriter sperm morfolojik olarak sınıflandırılmasıdır. Sperm morfolojik olarak değerlendirilmesi hem WHO (Dünya Sağlık Örgütü) kriterlerine hem de Kruger kriterlerine göre yapılabilmektedir (10) (Şekil 6).

Normal sperm morfolojik Kruger kriterleri ve WHO kriterlerine göre özellikleri şu şekildedir:

Kruger Kriterleri:

Baş; Düzgün oval yapıda olmalı, akrozom başın ön kısmının %40-70'ni kaplamalıdır. Normal baş ölçümlerinde uzunluk 3-5 μm , en ise 2-3 μm 'dir. Başın eni, uzunluğunun 3/5 ve 2/3'ü arasında değişmelidir. Sınırdaki normal baş şekilleri oval şekle yakın baş ile beraber belirgin bir şekil bozukluğu olmasa da bu anormal kabul edilir.

Boyun; İmplantasyon başın uzun eksenini boyunca ve intakt olmalıdır.

Orta Kısım; Silindirik şekilli ve başa uzun eksenini doğrultusunda bağlanmış olmalıdır. Eni yaklaşık 1 μm 'dir. Yaklaşık olarak baş uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır. Hiçbir sitoplazmik artık olmamalıdır.

Kuyruk; Düzgün yapıda, uzunluğu 35-45 μm , orta kısımdan biraz daha ince olmalıdır. Kıvrım ve bükülme varsa anormal kabul edilir (6, 37, 41).

WHO Kriterleri:

Baş; Oval şekilli ve düzgün kenarlı olmalıdır. Akrozom başın 1/3' ten fazlasını kaplamalıdır. Normal baş ölçümleri uzunluk 4-5 μm , en 2-3 μm 'dir. Başın eni boyunun

1/2-1/3'ü arasında olmalıdır. Yuvarlak, armut, iğne şeklinde, çift olan ve şekilsiz başlar daima anormal kabul edilir.

Boyun; WHO kriterlerinde boyun hakkında bir değerlendirme mevcut değildir.

Orta kısım; Silindir şekilli ve kuyruktan hafifçe kalın olmalıdır. Dış kısmı düzenli olmalı, eni boyunun 1/3'den az olmamalıdır. Başın büyüklüğünün 1/2'sini geçen sitoplazmik artıklar anormal kabul edilir.

Kuyruk; Silindir şeklindedir. Kıvrım ve bükülme olmamalıdır. Düzgün dış yapıya sahip, 45µm uzunluğunda ve tek olmalı, bükülmemiş olmalıdır (37, 41, 42).

4.8.1.4. Semen Değişkenlikleri İçin Terminoloji

Sperm hücresi sayısı, motilitesi, morfolojisi ve miktarına göre yapılan sınıflandırma şeklidir (38, 40, 43).

Normospermi: ml.'deki sperm hücresi sayının 20 milyon/ ml. ve üzeri olmasıdır.

Polispermi: ml.'deki sperm hücresi sayının 20 milyon/ ml.'den çok fazla olmasıdır.

Oligospermi: ml.'deki sperm hücresi sayının 20 milyon/ ml.'den az olmasıdır.

Azospermi: Tüm ejakülatta hiç sperm hücresinin bulunmamasıdır.

Astenospermi: Motilitenin düşük (%30'dan daha az) olmasıdır.

Aspermi: Seminal plazma üretiminin olmamasıdır.

Nekrospermi: Sperm hücrelerinin ölü olmasıdır.

Teratospermi: Morfolojik olarak anormal sperm hücrelerinin çoğunlukta olmasıdır.

Lökositospermi: Semende lökositlerin 1milyon/ml.'den fazla olmasıdır.

Hiperspermi: Semen hacminin 6 ml.'den daha fazla olmasıdır.

Hipospermi: Semen hacminin 1 ml. veya daha az olmasıdır.

Globozoospermi: Sperm hücresinde akrozom bulunmamasıdır.

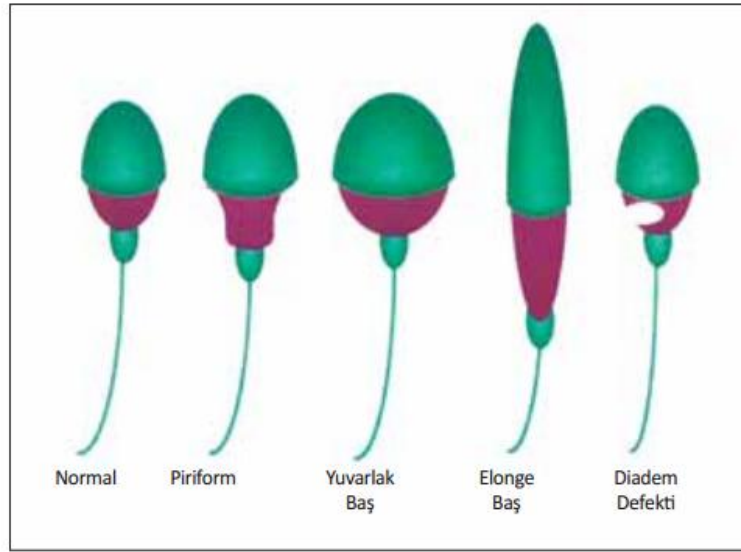
Nükleer Anomali: Sperm hücresinin başının toplu iğne şeklinde olmasıdır (pinhead).

Kriptoospermi: Taze örnekte spermatozoa olmayıp, yüksek hızda santrifüj sonrası görülmesidir.

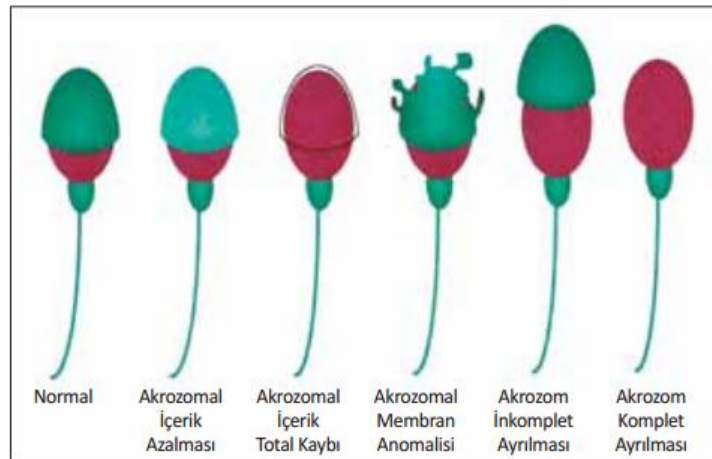
4.8.2. Sperm Morfolojik Anomalileri

Morfolojik değerlendirmede baz alınan normal görünüm dışında; baş, boyun ve kuyruk bölgesinde gözlenebilecek olası morfoloji anomalileri bulunmaktadır.

Baş anomalileri: Büyük ya da küçük, konik, piriform, yuvarlak, amorf, vakuollü (>2'den fazla vakuol, vakuoler alan boyanması %20'den fazla), çift başlı veya bunların kombinasyonu şeklinde görülebilmektedir (Şekil 7 ve Şekil 8).

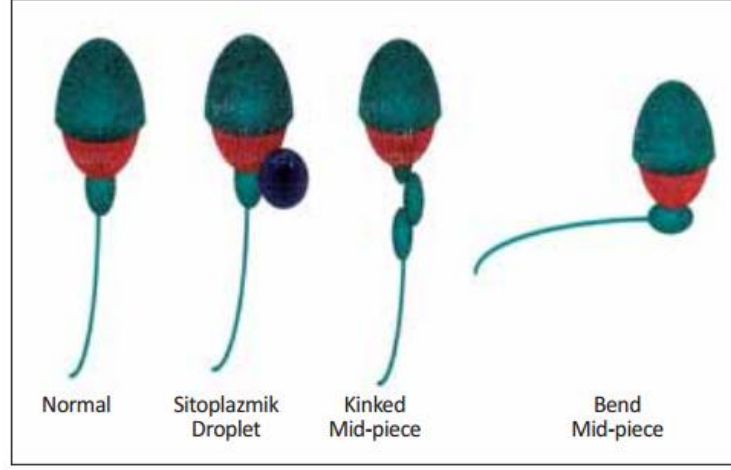


Şekil 7. Sperm baş anomalileri (1)



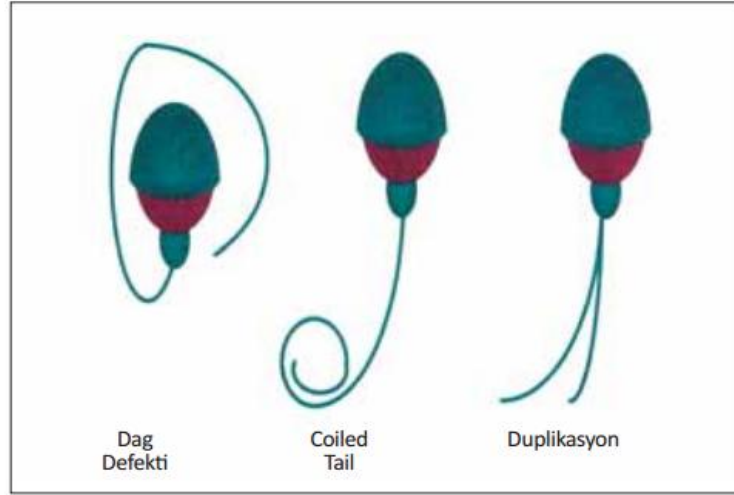
Şekil 8. Sperm baş anomalileri (1)

Boyun ve orta kısım anomalileri: Başın asimetrik olarak orta parçaya girmesi, kalın ya da düzensiz olması, ince olması veya bunların kombinasyonudur (Şekil-9).



Şekil 9. Sperm boyun anomalileri (1)

Kuyruk anomalileri: Kısa, birden çok, kırık, keskin açılı, koil şekilli, düzensiz ve bunların kombinasyonlarıdır (Şekil 10).



Şekil-10. Sperm kuyruk anomalileri (1)

Fazla sitoplazma kalıntısı: Spermatogenik süreçte üretilen anormal sperm ile ilgilidir. Büyük miktarda düzensiz sitoplazma içerir ve orta kısım defektleri ile ilgilidir. Bu anormal aşırı artmış sitoplazma sitoplazmik droplet değildir (1).

4.9. ERKEK İNFERTİLESİNDE TANI YÖNTEMLERİ

Erkek infertilitesinin tespiti öncelikli olarak semen analizi ile konulmaktadır. Fakat fertil ve infertil erkekleri birbirinden kesin ayıracak yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmuş ve sperm DNA hasarı üzerindeki çalışmalar ile sperm fonksiyonuna yönelik testler geliştirilmiştir (2). Bu testler sperm fonksiyonuna yönelik ve sperm kromatin yapısını incelemeye yönelik olarak ayrılmaktadır.

4.9.1. Sperm Fonksiyon Değerlendirme Testleri

Spermin oositi fertilize etmesinden gebelik oluşmasına kadar geçirilen aşamalar ve başarılı bir gebeliğin oluşması ancak sperm fonksiyonunun normal olması ile mümkündür. Fonksiyonel olarak normal bir sperm; iyi morfolojiye sahip olmalı, hızlı hareket yeteneği olmalı, membran geçirgenliği normal olmalı, akrozom reaksiyonunu gerçekleştirebilmeli, oosit zona pellusidasını penetre edebilmeli ve oosit sitoplazmasında iyi kondanse olabilmelidir. Sperm fonksiyonunun tespit edilmesinde kullanılan testler şunlardır:

- Antisperm antikorları
- Postkoital test
- Hipoozmolar şişme testi (HOS)
- Akrozin tayini
- Akrozom reaksiyonu,
- Hamster yumurta penetrasyon testi,
- Hemizona bağlanma testi
- Servikal mukus penetrasyon testi
- Hyaluronik asit bağlama testi (HBA) (44, 45).

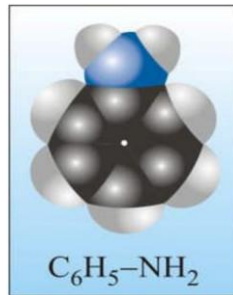
4.9.2. Sperm Kromatin Yapısı Testleri

Düşük sayı, motilite ve anormal morfoloji gibi bozuk semen parametreleri sıklıkla yüksek sperm DNA hasarı ile birliktelik göstermektedir ancak normal semen paramaterelerine sahip hastaların %8'inde sperm DNA hasarı olduğu da bilinmektedir (2). Sperm DNA'sında meydana gelen hasarları tespit etmede kullanılan testler şunlardır:

- Sperm kromatin yapısı testi (SCSA)
- Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı “Nick-end Labelling” (TUNEL) assay
- Sperm kromatin decondansasyon testi (SDS- EDTA)
- Sperm kromatin dağılımı (SCD)
- Anilin mavisi testi
- DNA ayrılım testi (FISH)
- İn situ nick translation (Asıl çentik okuma tayini)
- Acridine orange
- Kromomisin A3 (CMA3)
- Toluidin mavisi testi
- 8-OHdG ölçümü
- COMET (Tek hücre jel elektroforezi) (2, 5, 26).

4.10. ANİLİN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Aromatik aminlerin bazlığı alifatik aminlerden daha düşüktür. Bunun sebebi ise azot atomu üzerinde bulunan ortaklaşmamış elektron çiftinin halkaya verilerek, azot atomunun dışarıdan gelecek olan bir protonu kuvvetli olarak tutamamasındandır. Anilin ve türevleri, lastik, boya, petrol, tekstil ve ilaç endüstrisinde olduğu kadar çeşitli analitik amaçlı uygulamalarda da eskiden beri çok kullanılan ve zamanla da önemleri artan zayıf bazik karakterli maddelerdir. Renksiz, yağ görünümünde, özel kokulu ve zehirlidir. Molekül ağırlığı 93.126 g., donma noktası - 6°C, kaynama noktası 184°C, yoğunluğu 1.022 g/cm³ olan bir sıvıdır. Anilin, amino grup benzen ve fenilamin olarak da adlandırılır (46) (Şekil 11).



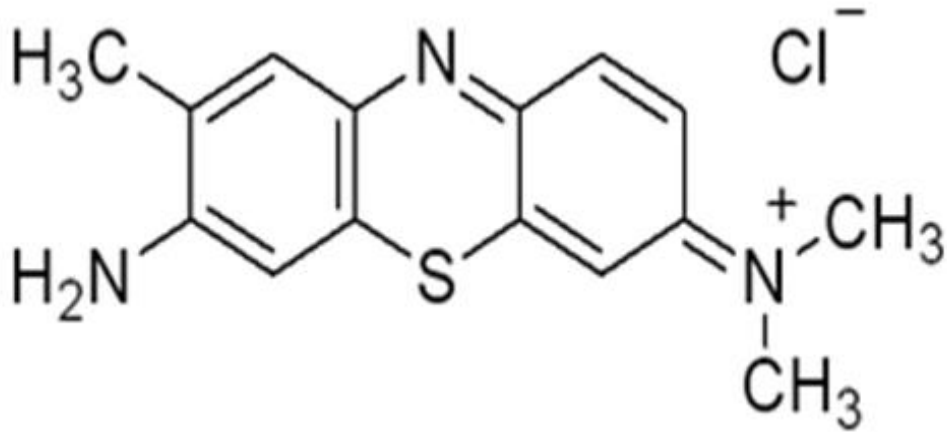
Şekil 11. Anilin kimyasal yapısı (46)

4.11. TOLUIDİN MAVİSİ YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Toluidin mavisi, tolonyum klorit içeren katyonik bir boya maddesidir (51). Molekül ağırlığı 305,84 g/mol olan toluidin mavisi tiazin grubunun üyesidir. Tiazin grubundaki katyonik boyalar bazı hücre yapı taşlarını boyanın asıl renginden farklı boyar. Metokromazi olarak tanımlanan bu özelliğe sahip toluidin mavisi solüsyon halindeyken mavi-mor renklidir; amino dimetil aminotolufenatiazonyum klorit'in çinko klorit çift tuzudur. Su ve alkolde kısmen çözünür (47, 52) (Şekil 13).

Hücre nükleusundaki deoksiribonükleik asit ile hücre sitoplazmasındaki ribonükleik asit tolonyum klorit'i spesifik olarak sabitler. Nükleik asitlerin yükleri ilk basamakta fosforik asit gruplarının iyonlarına ayrılmasıyla oluşur. İzoelektrik nokta çok düşüktür ve nükleik asitler (-) yüklüdürler. Bu nedenle nükleik asitlerin boyanmasında toluidin mavisi kullanılır (47).

Katyonik bir boya olan toluidin mavisinin DNA veya nükleohistonlara interkalasyon (araya girme) veya agregasyon (kümeleşme) yoluyla bağlandığı düşünülmektedir. Toluidin mavisi sperm DNA'sında bulunan histonların fosfat gruplarına bağlanarak sperm kromatin yoğunlaşmasının ortaya çıkmasını sağlar (49, 53).



Şekil 13. Toluidin mavisi kimyasal yapısı (54)

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1. HASTA GRUPLARI

Bu çalışmaya infertilite problemi ile tüp bebek merkezine başvuran, yaşları 22-42 arasında değişen, normospermik, oligospermik, astenospermik 47 erkek bireyden alınan semen örnekleri dahil edildi.

5.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle kliniğe gelen hastalardan, hastanın adının, soyadının yazılı olduğu steril kaplara, masturbasyon yöntemi ile alındı. Sperm likefikasyonu sağlandıktan sonra mililitredeki sperm sayısını belirlemek üzere, Makler sayma kamarasına (Counting Chamber Makler, Sefi Medikal Instruments, İsrail) küçük bir damla semen örneği konuldu. Toplam sperm sayısı ve progresif hareketli ve immotil sperm sayısı ile motilite değerlendirildi. Makler sayma kamarasına (Makler chamber, Sefi Medikal Instr. İsrail) 10µl semen koyularak ve X20 büyütme altında 10 kare sayılarak konsantrasyon ve motilite belirlenerek morfolojisi, faz kontrast mikroskopta, X100 büyütmede Kruger kriterlerine göre değerlendirilip, not edildi.

5.3. HİSTOKİMYASAL YÖNTEM

Alınan semen örneklerine sırasıyla; toluidin mavisi, anilin mavisi ve sperm kromatin dağılım (SCD) testleri uygulandı.

5.3.1. Toluidin Mavisi İle Boyama Yöntemi

Hastalardan alınan semen örneklerinde yıkama yapılarak lam üzerine 10 µl. semen örneği damlatılarak yayma (smear) yapıldı. Yayma yapılan preparatlar havada kurutulup

%4 formalin ile fikse edilip kurutuldu. 4 °C 'de 0.1 N HCl de 5 dk boyunca hidroliz edilip, 2'şer dakika distile suda 3 kere durulandı. Daha sonra % 0.05 lik toludine blue ile 10 dk oda sıcaklığında boyandı. Boyama sonrası preparatlar 1'er dk 2 kere distile suda durulandı. Kısa bir süre kurutulduktan sonra Ecomount ile kapatılarak, faz kontrast mikroskopta X100 büyütmede immersion yağı ile incelenerek, 100 sperm sayıldı.

5.3.2. Anilin Mavisi İle Boyama Yöntemi

Hastalardan alınan semen örneklerinde yıkama yapılarak lam üzerine 10 µl. semen örneği damlatılarak yayma yapıldı. Yayma (smear) yapılan preparatlar havada kurutulup, oda sıcaklığında %4 formalin ile fikse edilip kurutuldu. Preparatlar 1'er dk olmak üzere 2 kere durulanıp, % 4 asetik asit (pH 3.5) çözeltisi içinde % 5 anilin mavisi ile 10 dakika boyandı. Boyama sonrası 2'şer dakika 3 kere distile su ile durulanan preparatlar havada kurutulup, Ecomount ile kapatıldı. Faz kontrast mikroskopta immersion yağı ile X100 büyütmede incelenerek, 100 sperm hücresi sayıldı.

5.3.3. Sperm Kormatin Dağılımı (SCD)- Sperm DNA Fragmentasyon Analizi

Semen örneği konsantrasyonu 5-10 ml/10⁻⁴ olacak şekilde sperm yıkama solüsyonu ile sulandırıldı. Agaroz içeren eppendorf içinde mikrodalga fırında akışkan hale gelene kadar yaklaşık 3-4 dk çevrilir. Agarozdan 20 µl semenden 15 µl alınarak iyice karıştırılıp, 14 µl karışımdan lam üzerine koyularak üzerine lamel kapanır. Buzdolabında yaklaşık 5 dk. bekledikten sonra lamel sıyrılarak yavaşça çıkartıldı. Lizis solüsyonunda oda sıcaklığında bekletildi. Asit denaturant solüsyonu hazırlandı (10 ml distile suyun içerisine 80 µl denaturant solüsyon eklendi). Asit denaturant solüsyon inkübasyon yapılacak kabın içine dökülüp, Lam yatay bir pozisyonda denaturant solüsyonu içerisinde 7 dk. bekletildi. 10 ml lizis solüsyonu farklı bir inkübasyon kabına döküldü. Lam yatay bir pozisyonda lizis solüsyonu içerisinde 25 dk. bekletildi. Lizis solüsyonunu uzaklaştırmak için lam, yeterli miktarda distile su içeren inkübasyon kabında 5 dk. bekletildi. Lam yatay olarak önce %70 etanol, %90 etanol ve daha sonra %100 etanol içeren kaplarda 2'şer dk. tutulup, lam oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Boyama için, yatay tutulan lamın üzerine Eosin solüsyonu

(kırmızı) damlatıldı ve 6 dk. bekletildi. Eosin solüsyonu lamın üzerinden dökülerek Azur B solüsyonu (mavi) damlatılıp 6 dk. bekletildi. Lam oda sıcaklığında kurutuldu.

6. BULGULAR

6.1. SPERM SAYISINA GÖRE TOLUIDİN MAVİSİ, ANİLİN MAVİSİ VE SPERM KROMATİN DAĞILIM (SCD) TESTLERİ SONUCUNDAKİ DNA HASARI ORTALAMALARI

Sperm sayısına göre toluidin mavisi, anilin mavisi ve sperm kromatin dağılımı testleri sonucundaki DNA hasarı ortalamaları Tablo 1'de gösterilmektedir.

DEĞİŞKENLER		TOLUIDİN MAVİSİ			ANİLİN MAVİSİ			SCD		
		n	$\bar{X} \pm SS$	p	n	$\bar{X} \pm SS$	p	n	$\bar{X} \pm SS$	p
SPERM SAYISI	NORMOSPERMİ	38	35,26 ± 15,516	,001	38	25,92 ± 14,557	,004	38	9,55 ± 6,603	,006
	OLİGOSPERMİ	33	48,55 ± 17,057		33	35,64 ± 12,449		33	14,30 ± 7,634	

İstatiksel anlamlılık ($p < 0.05$)

Tablo 1. Sperm sayısına göre toluidin mavisi, anilin mavisi ve sperm kromatin dağılım testleri sonucundaki DNA hasarı ortalamaları

Hastaların sperm sayısına göre toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları incelendiğinde normospermik grupta DNA hasarı ortalaması $35,26 \pm 15,516$ iken oligospermik grupta $48,55 \pm 17,057$ olduğu saptanmıştır. Sperm sayısına göre anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları incelendiğinde normospermik grupta $25,92 \pm 14,557$ iken oligospermik grupta $35,64 \pm 12,449$ olduğu saptanmıştır. Sperm sayısına göre sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasar oranı ise; normospermik grupta $9,55 \pm 6,603$ iken oligospermik grupta $14,30 \pm 7,634$ olduğu saptanmıştır (Tablo 1).

Hastaların sperm sayısına göre toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları karşılaştırıldığında; normospermik ve oligospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Hastaların sperm sayısına göre anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı

ortalamları karşılaştırıldığında normospermik ve oligospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Hastaların sperm sayısına göre sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları karşılaştırıldığında normospermik ve oligospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ($p<0.05$), oligospermik hastaların sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarı ortalamalarının normospermik hastaların sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarı ortalamalarına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p=,006$).

6.2. SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE TOLUIDİN MAVİSİ, ANİLİN MAVİSİ VE SPERM KROMATİN DAĞILIM (SCD) TESTLERİ SONUCUNDAKİ DNA HASARI ORTALAMALARI

Sperm motilitesine göre toluidin mavisi, anilin mavisi ve sperm kromatin dağılımı testleri sonucundaki DNA hasarı ortalamaları Tablo 2'de gösterilmektedir.

DEĞİŞKENLER		TOLUIDİN MAVİSİ			ANİLİN MAVİSİ			SCD		
		n	$\bar{X} \pm SS$	p	n	$\bar{X} \pm SS$	p	n	$\bar{X} \pm SS$	p
SPERM MOTİLİTESİ	NORMOSPERMİ	35	41,49±18,762	,982	35	28,17 ± 13,481	,193	35	7,63 ± 4,243	,000
	ASTENOSPERMİ	36	41,39 ±16,357		36	32,64 ± 15,056		36	15,78 ± 7,721	

İstatistiksel anlamlılık ($p<0.05$)

Tablo 2. Sperm sayısına göre toluidin mavisi, anilin mavisi ve sperm kromatin dağılım testleri sonucundaki DNA hasarı ortalamaları

Hastaların sperm motilitesine göre toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları incelendiğinde normospermik grupta DNA hasarı ortalaması 41,49±18,762 iken astenospermik grupta 41,39 ±16,357 olduğu saptanmıştır. Sperm sayısına göre anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları incelendiğinde normospermik grupta 28,17 ± 13,481 iken astenospermik grupta 32,64± 15,056 olduğu saptanmıştır. Sperm sayısına göre sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasar oranı ise;

normospermik grupta $7,63 \pm 4,243$ iken astenospermik grupta $15,78 \pm 7,721$ olduğu saptanmıştır (Tablo 2).

Hastaların sperm motilitesine göre toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları karşılaştırıldığında normospermik ve astenospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).

Hastaların sperm motilitesine göre anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları karşılaştırıldığında normospermik ve astenospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).

Hastaların sperm motilitesine göre sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları karşılaştırıldığında normospermik ve astenospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ($p < 0.05$), astenospermik hastaların sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarı ortalamalarının normospermik hastaların sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarı ortalamalarına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p = ,000$).

6.3. SPERM KROMATİN DAĞILIM (SCD) TESTİ SONUCUNDAKİ DNA HASARININ SPERM SAYISINA, SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE YORDANMASINA İLİŞKİN BULGULAR

6.3.1. Sperm Kromatin Dağılım (SCD) Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısına Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular

Sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarının sperm sayısına göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları Tablo 3' te gösterilmektedir.

Modelin Özeti

Model	R	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini Standart Hata	p
1	,166 ^a	,028	,013	7,392	,166

a. Yordayıcı: (Sabit), sperm sayısı

b. Bağımlı Değişken: SCD

Tablo 3. Sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarının sperm sayısına göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları

Analiz sonuçları incelendiğinde sperm sayısının SCD testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olmadığı görülmektedir ($R=0.166$, $R^2= 0.028$, $p>0.05$) (Tablo 3).

6.3.2. Sperm Kromatin Dağılım (SCD) Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Motilitesine Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular

SCD testi sonucundaki DNA hasarının sperm motilitesine göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları Tablo 4'te gösterilmektedir.

Modelin Özeti					
Model	R	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini Standart Hata	p
1	,631 ^a	,398	,389	5,818	,000

a. Yordayıcı: (Sabit), sperm motilitesi

b. Bağımlı Değişken: SCD

Tablo 4. Sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarının sperm motilitesine göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları

Analiz sonuçları incelendiğinde sperm motilitesinin SCD testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olduğu görülmektedir ($R= 0.631$, $R^2= 0.398$, $p<0.05$) (Tablo 4).

6.4. TOLUIDİN MAVİSİ TESTİ SONUCUNDAKİ DNA HASARININ SPERM SAYISINA, SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE YORDANMASINA İLİŞKİN BULGULAR

6.4.1. Toluidin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısına Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular

Toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının sperm sayısına göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları Tablo 5'te gösterilmektedir.

Modelin Özeti

Model	R	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini Standart Hata	p
1	,345 ^a	,119	,106	16,504	,003

a. Yordayıcı: (Sabit), sperm sayısı

b. Bağımlı Değişken: toluidin mavisi

Tablo 5. Toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının sperm sayısına göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları

Analiz sonuçları incelendiğinde sperm sayısının toluidin mavisi testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olduğu görülmektedir ($R= 0.345$, $R^2=0.0119$, $p<0.05$) (Tablo 5).

6.4.2. Toluidin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Motilitesine Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular

Toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının sperm motilitesine göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları Tablo 6'da gösterilmektedir.

Modelin Özeti

Model	R	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini Standart Hata	p
1	,048 ^a	,002	-,012	17,563	,689

a. Yordayıcı: (Sabit), sperm motilitesi

b. Bağımlı Değişken: toluidin mavisi

Tablo 6. Toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının sperm motilitesine göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları

Analiz sonuçları incelendiğinde sperm motilitesinin toluidin mavisi testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olmadığı görülmektedir (R= 0.048, R²=0.002, p>0.05) (Tablo 6).

6.5. ANİLİN MAVİSİ TESTİ SONUCUNDAKİ DNA HASARININ SPERM SAYISINA, SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE YORDANMASINA İLİŞKİN BULGULAR

6.5.1. Anilin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısına Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular

Anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının sperm sayısına göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları Tablo 7'de gösterilmektedir.

Modelin Özeti

Model	R	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini Standart Hata	p
1	,336 ^a	,113	,100	13,639	,004

a. Yordayıcı: (Sabit), sperm sayısı

b. Bağımlı Değişken: aniline mavisi

Tablo 7. Anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının sperm sayısına göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları

Analiz sonuçları incelendiğinde sperm sayısının anilin mavisi testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olduğu görülmektedir ($R= 0.336$, $R^2=0.113$, $p<0.05$) (Tablo 7).

6.5.2. Anilin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Motilitesine Göre Yordanmasına İlişkin Bulgular

Anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının sperm motilitesine göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları Tablo 8'de gösterilmektedir.

Modelin Özeti

Model	R	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini Standart Hata	p
1	,201 ^a	,040	,026	14,186	,094

a. Yordayıcı: (Sabit), sperm motilitesi

b. Bağımlı Değişken: aniline mavisi

Tablo 8. Anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının sperm motilitesine göre yordanmasına ilişkin regresyon analizi sonuçları

Analiz sonuçları incelendiğinde sperm motilitesinin anilin mavisi testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olmadığı görülmektedir ($R= 0.201$, $R^2=0.040$, $p>0.05$) (Tablo 8).

6.6. SCD, ANİLİN MAVİSİ VE TOLUIDİN MAVİSİ TESTLERİ SONUCUNDAKİ DNA HASARININ SPERM SAYISI, SPERM MOTİLİTESİNE GÖRE YORDANMASINA İLİŞKİN BULGULAR

6.6.1. SCD Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısı ve Sperm Motilitesi Değişkenlerine Göre Yordanmasına İlişkin Çoklu Regresyon Analizi Sonuçlarına İlişkin Bulgular

Sperm sayısı ve sperm motilitesi değişkenlerine göre SCD testi sonucundaki DNA hasarının yordanmasına ilişkin çoklu regresyon analizi sonuçları Tablo 9'da gösterilmektedir.

Tanımlayıcı İstatistik

	X ± SS	n
SCD	11,76 ± 7,442	71
Sperm Sayısı	47,20 ± 48,131	71
Sperm Motilitesi	44,72 ± 23,794	71

Korelasyon

		SCD	Sperm Sayısı	Sperm Motilitesi
r	SCD	1,000	-,166	-,631
	Sperm Sayısı	-,166	1,000	,276
	Sperm Motilitesi	-,631	,276	1,000
p	SCD	.	,083	,000
	Sperm Sayısı	,083	.	,010
	Sperm Motilitesi	,000	,010	.
n	SCD	71	71	71
	Sperm Sayısı	71	71	71
	Sperm Motilitesi	71	71	71

Modelin Özeti

Model	R	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini Standart Hata	p
1	,631 ^a	,398	,380	5,860	,000

a. Yordayıcı: (Sabit), sperm motilitesi, sperm sayısı

b. Bağımlı Değişken: SCD

Tablo 9. Sperm sayısı ve sperm motilitesi değişkenlerine göre SCD testi sonucundaki DNA hasarının yordanmasına ilişkin çoklu regresyon analizi değerleri

Yordayıcı değişkenlerle (sperm motilitesi ve sperm sayısı) bağımlı değişken arasındaki ikili ve kısmi korelasyonlar incelendiğinde, SCD testi sonucundaki DNA hasarı ile sperm motilitesi arasında negatif ve orta düzeyde bir ilişkinin ($r=-0.631$) olduğu, ancak diğer değişken kontrol edildiğinde iki değişken arasındaki korelasyonun $r= -0.617$ olduğu belirlenmiştir. Sperm sayısı ve SCD testi arasında negatif ve düşük düzeyde ($r=-0,166$) bir ilişki olduğu, ancak diğer değişken kontrol edildiğinde iki değişken arasındaki korelasyonun $r= 0.011$ olduğu saptanmıştır (Tablo 9).

Sperm sayısı ve sperm motilitesi değişkenleri birlikte, SCD testi sonucundaki DNA hasarı ile anlamlı bir ilişki vermektedir ($R= 0.631$, $R^2= ,398$, $p<0.01$) (Tablo 11). Sperm sayısı ve sperm motilitesi birlikte, SCD testi sonucunda DNA hasarındaki toplam varyansın %39,8'ini açıklamaktadır.

6.6.2. Toluidin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısı ve Sperm Motilitesi Değişkenlerine Göre Yordanmasına İlişkin Çoklu Regresyon Analizi Sonuçlarına İlişkin Bulgular

Sperm sayısı ve sperm motilitesi değişkenlerine göre toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının yordanmasına ilişkin çoklu regresyon analizi sonuçları Tablo 10'da gösterilmektedir.

Tanımlayıcı İstatistik

	X ± SS	n
Toluidin Mavisi	41,44 ± 17,457	71
Sperm Sayısı	47,20 ± 48,131	71
Sperm Motilitesi	44,72 ± 23,794	71

Korelasyon

		Toluidin Mavisi	Sperm Sayısı	Sperm Motilitesi
r	Toluidin Mavisi	1,000	-,345	-,048
	Sperm Sayısı	-,345	1,000	,276
	Sperm Motilitesi	-,048	,276	1,000
p	Toluidin Mavisi	.	,002	,344
	Sperm Sayısı	,002	.	,010
	Sperm Motilitesi	,344	,010	.
n	Toluidin Mavisi	71	71	71
	Sperm Sayısı	71	71	71
	Sperm Motilitesi	71	71	71

Modelin Özeti

Model	R	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini Standart Hata	p
1	,348 ^a	,121	,096	16,602	,012

a. Yordayıcı: (Sabit), sperm sayısı

b. Bağımlı Değişken: toluidin mavisi

Tablo 10. Sperm sayısı ve sperm motilitesi değişkenlerine göre toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının yordanmasına ilişkin çoklu regresyon analizi değerleri

Yordayıcı değişkenlerle (sperm motilitesi ve sperm sayısı) bağımlı değişken arasındaki ikili ve kısmi korelasyonlar incelendiğinde, toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ile sperm motilitesi arasında pozitif ve çok düşük düzeyde bir ilişkinin ($r=-0,048$) olduğu, ancak diğer değişken kontrol edildiğinde iki değişken arasındaki korelasyonun $r=0.052$ olduğu belirlenmiştir. Sperm sayısı ve toluidin mavisi testi arasında negatif ve düşük düzeyde ($r=-0,345$) bir ilişki olduğu, ancak diğer değişken kontrol edildiğinde iki değişken arasındaki korelasyonun $r=-0.346$ olduğu saptanmıştır (Tablo 10).

Sperm sayısı ve sperm motilitesi değişkenleri birlikte, toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ile anlamlı bir ilişki vermektedir ($R= 0.348$, $R^2= 0.120$, $p<0.05$) (Tablo 10). Sperm sayısı ve sperm motilitesi birlikte, toluidin testi sonucunda DNA hasarındaki toplam varyansın %12,1'ini açıklamaktadır.

6.6.3. Anilin Mavisi Testi Sonucundaki DNA Hasarının Sperm Sayısı ve Sperm Motilitesi Değişkenlerine Göre Yordanmasına İlişkin Çoklu Regresyon Analizi Sonuçlarına İlişkin Bulgular

Sperm sayısı ve sperm motilitesi değişkenlerine göre anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının yordanmasına ilişkin çoklu regresyon analizi değerleri Tablo 11'de gösterilmektedir.

Tanımlayıcı İstatistik		
	X ± SS	n
Anilin Mavisi	30,44 ± 14,376	71
Sperm Sayısı	47,20 ± 48,131	71
Sperm Motilitesi	44,72 ± 23,794	71

Korelasayon

		Aniline Mavisi	Sperm Sayısı	Sperm Motilitesi
r	Aniline Mavisi	1,000	-,336	-,201
	Sperm Sayısı	-,336	1,000	,276
	Sperm Motilitesi	-,201	,276	1,000
p	Aniline Mavisi		,002	,047
	Sperm Sayısı	,002		,010
	Sperm Motilitesi	,047	,010	
n	Aniline Mavisi	71	71	71
	Sperm Sayısı	71	71	71
	Sperm Motilitesi	71	71	71

Modelin Özeti

Model	R	R ²	Düzeltilmiş R ²	Tahmini Standart Hata	p
1	,354 ^a	,125	,100	13,641	,011

a. Yordayıcı: (Sabit), sperm motilitesi, sperm sayısı

b. Bağımlı Değişken: anilin mavisi

Tablo 11. Sperm sayısı ve sperm motilitesi değişkenlerine göre anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarının yordanmasına ilişkin çoklu regresyon analizi değerleri

Yordayıcı değişkenlerle (sperm motilitesi ve sperm sayısı) bağımlı değişken arasındaki ikili ve kısmi korelasyonlar incelendiğinde, anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ile sperm motilitesi arasında negatif ve çok düşük düzeyde bir ilişkinin ($r=-0.201$) olduğu, ancak diğer değişken kontrol edildiğinde iki değişken arasındaki korelasyonun $r=-0,119$ olduğu belirlenmiştir. Sperm sayısı ve anilin mavisi testi arasında negatif ve düşük düzeyde ($r=-0.336$) bir ilişki olduğu, ancak diğer değişken kontrol edildiğinde iki değişken arasındaki korelasyonun $r=-0.298$ olduğu saptanmıştır (Tablo 13).

Sperm sayısı ve sperm motilitesi değişkenleri birlikte, anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ile anlamlı bir ilişki vermektedir ($R=0.354$, $R^2=0.125$, $p<0.05$) (Tablo 13). Sperm sayısı ve sperm motilitesi birlikte, anilin mavisi testi sonucunda DNA hasarındaki toplam varyansın %12,5'ini açıklamaktadır.

6.7. SPERM SAYISI ,SPERM MOTİLİTESİ, TOLUIDİN MAVİSİ, ANİLİN MAVİSİ VE SCD TESTLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİYE YÖNELİK BULGULAR

Sperm sayısı, sperm motilitesi, SCD, toluidin mavisi, anilin mavisi testleri arasındaki ilişki Tablo 12'de gösterilmektedir.

		Korelasyon				
		Sperm Sayısı	Sperm Motilitesi	Toluidin Mavisi	Aniline Mavisi	SCD
Sperm Sayısı	r	1	,276*	-,345**	-,336**	-,166
	p		,020	,003	,004	,166
	n	71	71	71	71	71
Sperm Motilitesi	r	,276*	1	-,048	-,201	-,631**
	p	,020		,689	,094	,000
	n	71	71	71	71	71
Toluidin Mavisi	r	-,345**	-,048	1	,438**	,215
	p	,003	,689		,000	,072
	n	71	71	71	71	71
Aniline Mavisi	r	-,336**	-,201	,438**	1	,294*
	p	,004	,094	,000		,013
	n	71	71	71	71	71
SCD	r	-,166	-,631**	,215	,294*	1
	p	,166	,000	,072	,013	
	n	71	71	71	71	71

*. $p < 0,05$

** $. p < 0,01$

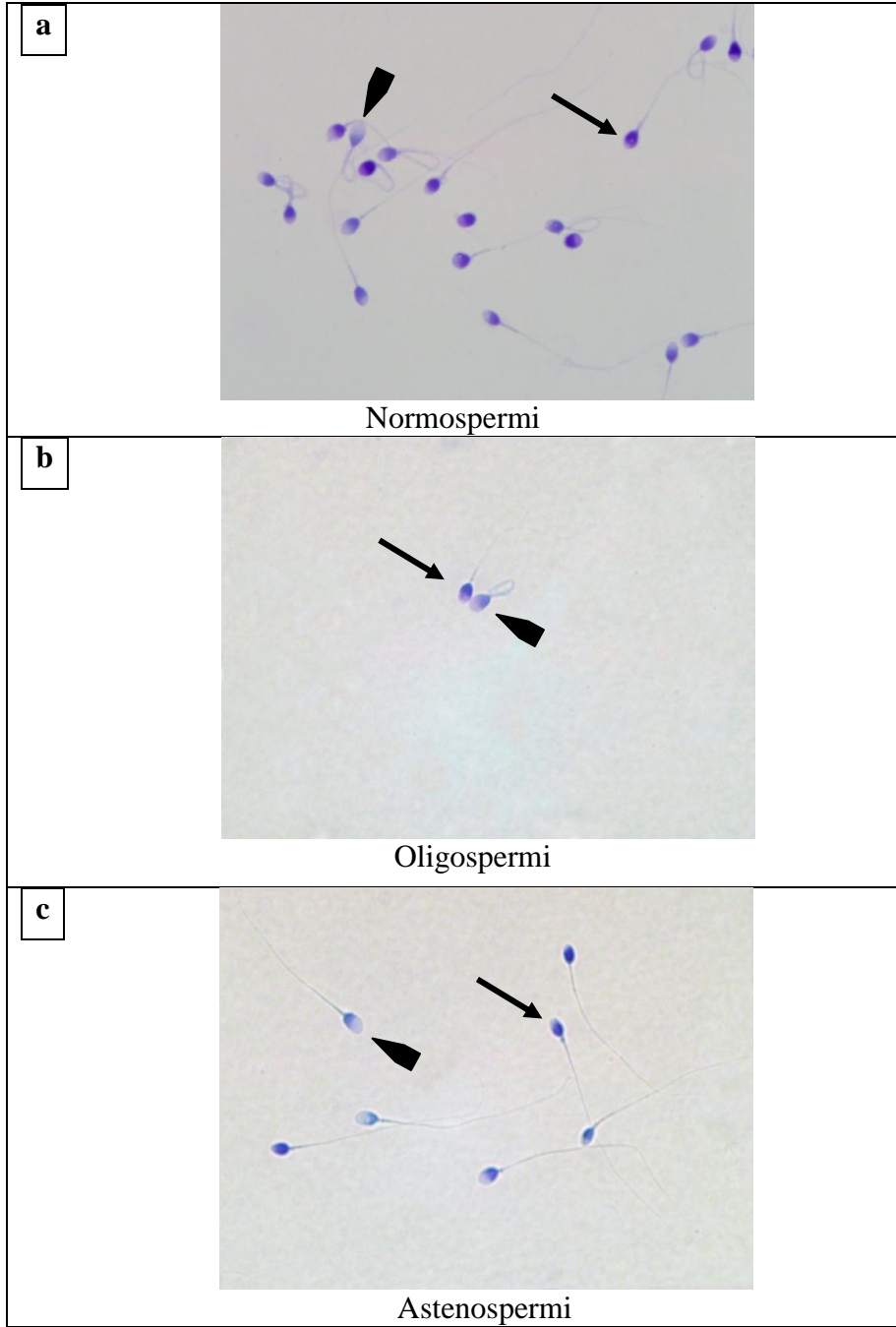
Tablo 12. Sperm sayısı, sperm motilitesi, SCD, toluidin mavisi, anilin mavisi testleri arasındaki ilişki

Sperm sayısı ile sperm motilitesi arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki ($r=0.276$, $p<0.05$) olduğu bulunmuştur. Sperm sayısı ile toluidin mavisi testi arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki ($r=-0.345$, $p<0.01$) olduğu belirlenmiştir. Sperm motilitesi ile toluidin mavisi arasında negatif yönde, çok düşük bir düzeyde ve anlamlı olmayan bir ilişki olduğu

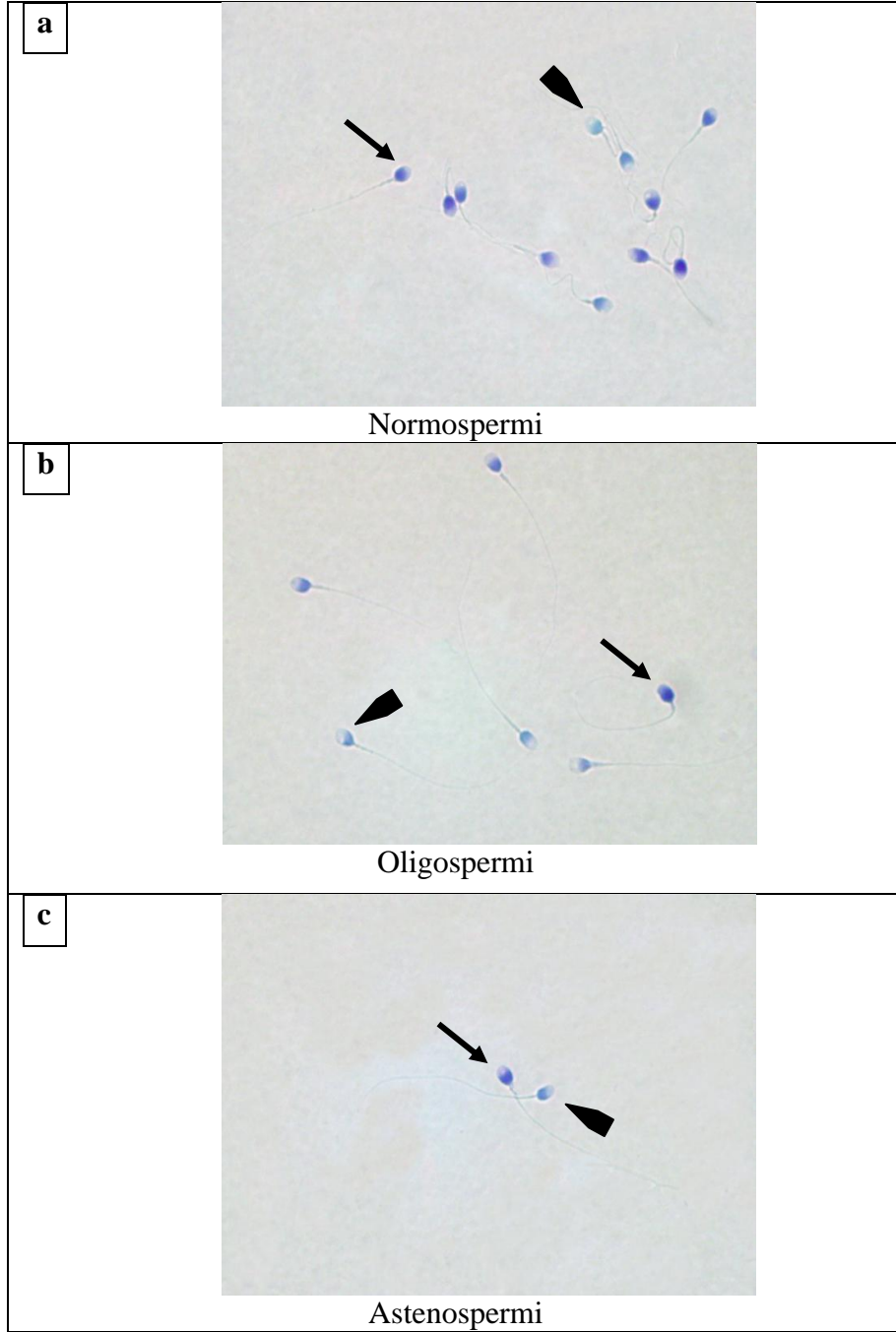
($r=-0,048$, $p>0.05$); Sperm sayısı ile anilin mavisi testi arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki ($r=-0.336$, $p<0.01$) olduğu belirlenmiştir. Sperm motilitesi ile anilin mavisi testi arasında negatif yönde fakat anlamlı olmayan bir ilişki ($r=-0.201$, $p>0.05$) olduğu tespit edilmiştir. SCD testi ile sperm sayısı arasında negatif yönde anlamlı olmayan bir ilişki ($r=-0.166$, $p>0.05$); Sperm motilitesi ile SCD testi arasında negatif yönde ve orta düzeyde anlamlı bir ilişki ($r=-0.631$, $p<0.01$) olduğu belirlenmiştir (Tablo 12).

Testler arasında ilişki durumlarına bakıldığında; toluidin mavisi ile anilin mavisi testi arasında pozitif yönde ve yüksek düzeyde anlamlı bir ilişki ($r= 0.438$, $p<0.01$) olduğu bulunmuştur. Toluidin mavisi ile SCD testi arasında ise düşük düzeyde ve anlamlı olmayan bir ilişki ($r=0.215$, $p>0.05$) olduğu belirlenmiştir. Anilin mavisi ile SCD testi arasında da düşük düzeyde ve anlamlı bir ilişki ($r=0.2094$, $p<0.05$) olduğu bulunmuştur (Tablo 12).

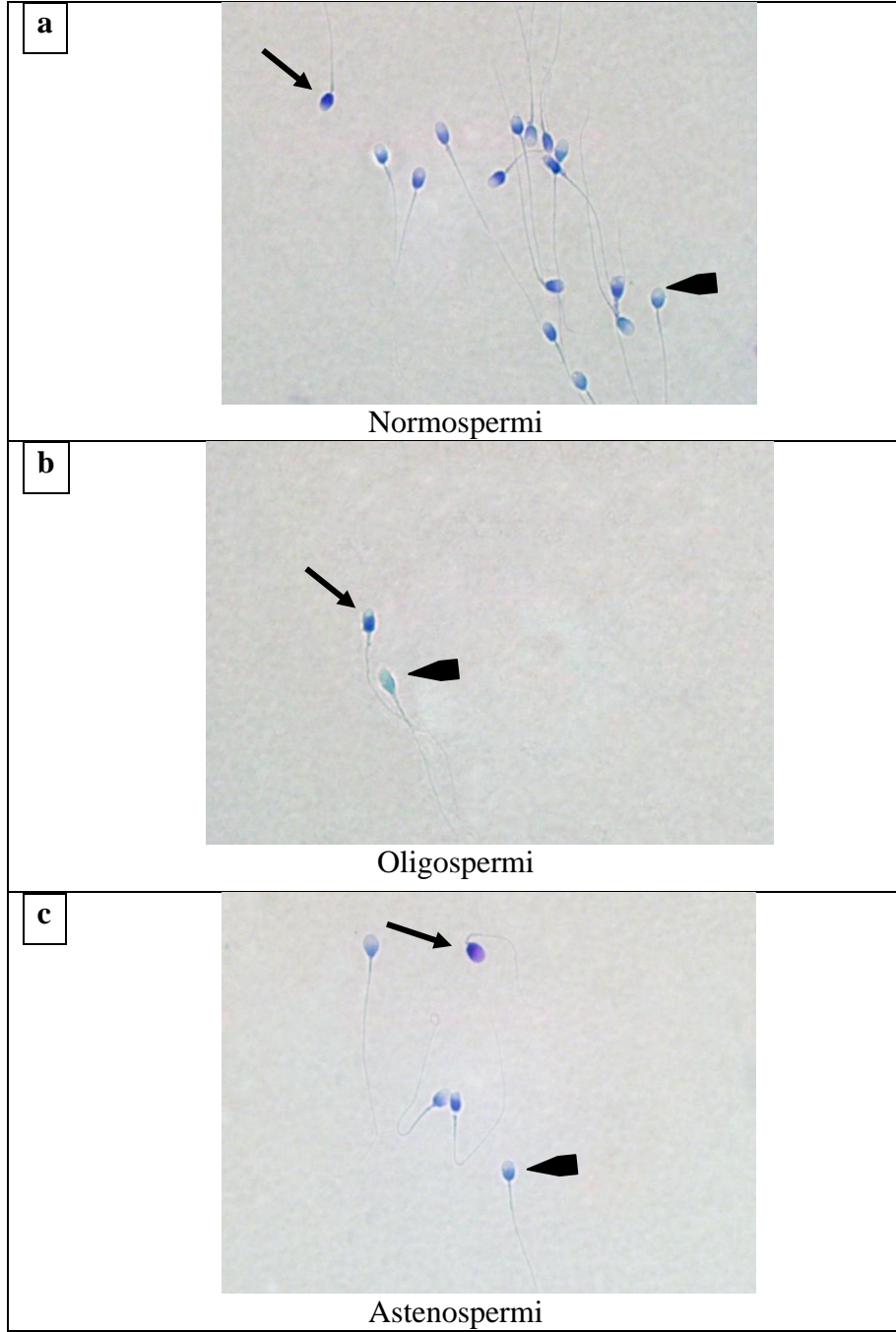
Toluidin mavisi ile boyama yapıldığında immatur sperm başları (olgunlaşmamış / DNA hasarı olan) açık mavi/mor gözlemlenirken, matur (olgun) sperm başları koyu mavi/mor şeklinde gözlemlenmektedir (Resim 1-2-3). Anilin mavisi ile koyu mavi boyanan sperm başları immatur (olgunlaşmamış / DNA hasarı olan) sperm, boya almayan açık renk olanlar ise matur (olgun) sperm olarak gözlemlenmektedir (Resim 4-5-6). Sperm kromatin testi sonucu sperm başında halo oluşturmayan spermler, immatur sperm (olgunlaşmamış/ DNA hasarı olan) olarak gözlemlenirken, halo oluşturan spermler, matur (olgun) sperm olarak gözlemlenmektedir (Resim 7-8-9).



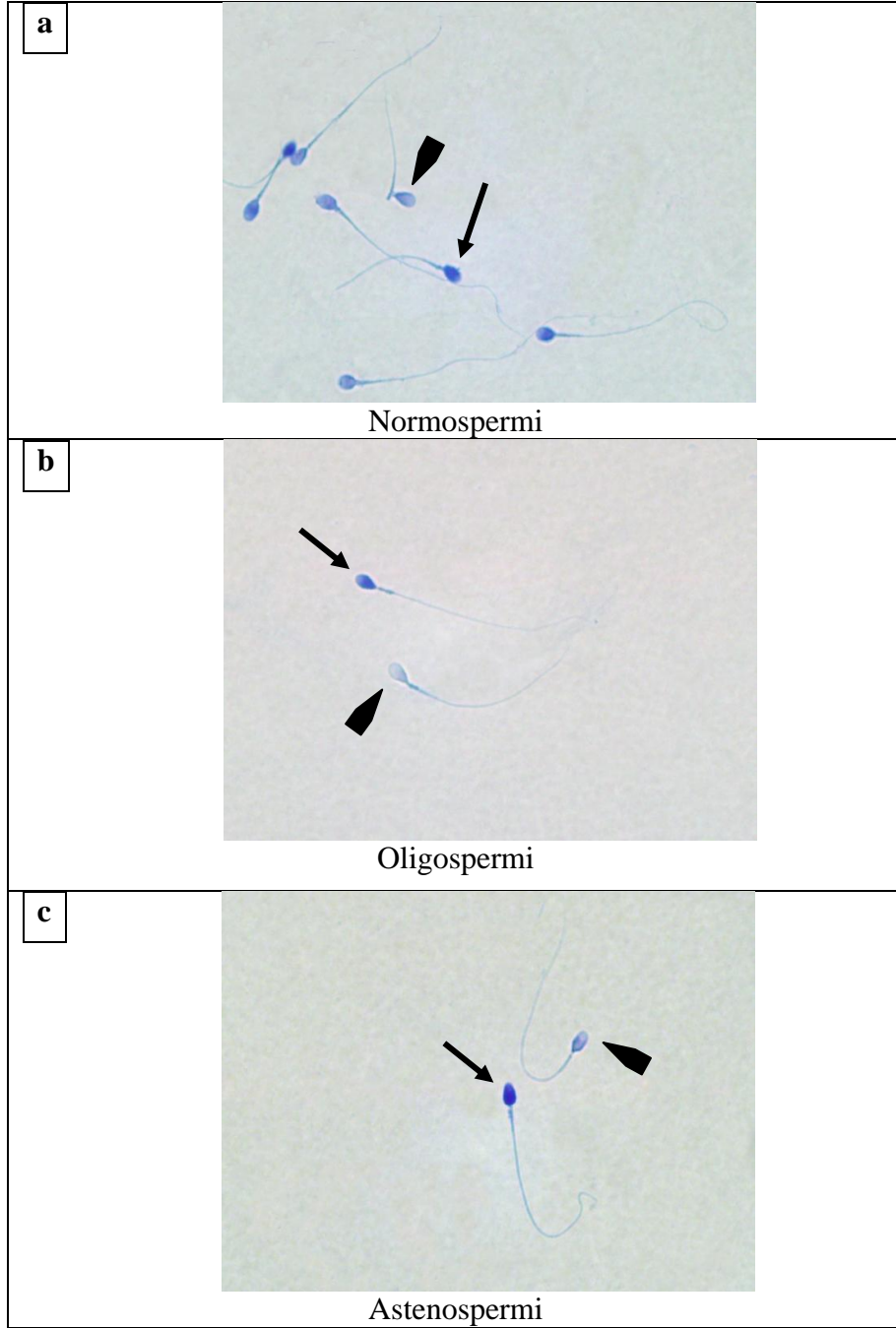
Resim 1. Toluidin mavisi (TB) ile boyanan Normospermi(a), Oligospermi (b), Asthenospermi (c). (→) ile gösterilen sperm DNA hasarı olan (koyu mavi-mor boyanan) sperm. (▶) ile gösterilen sperm normal DNA'ya sahip olgun sperm (açık mavi-mor boyanan). Büyütme: X 100 (immersiyon)



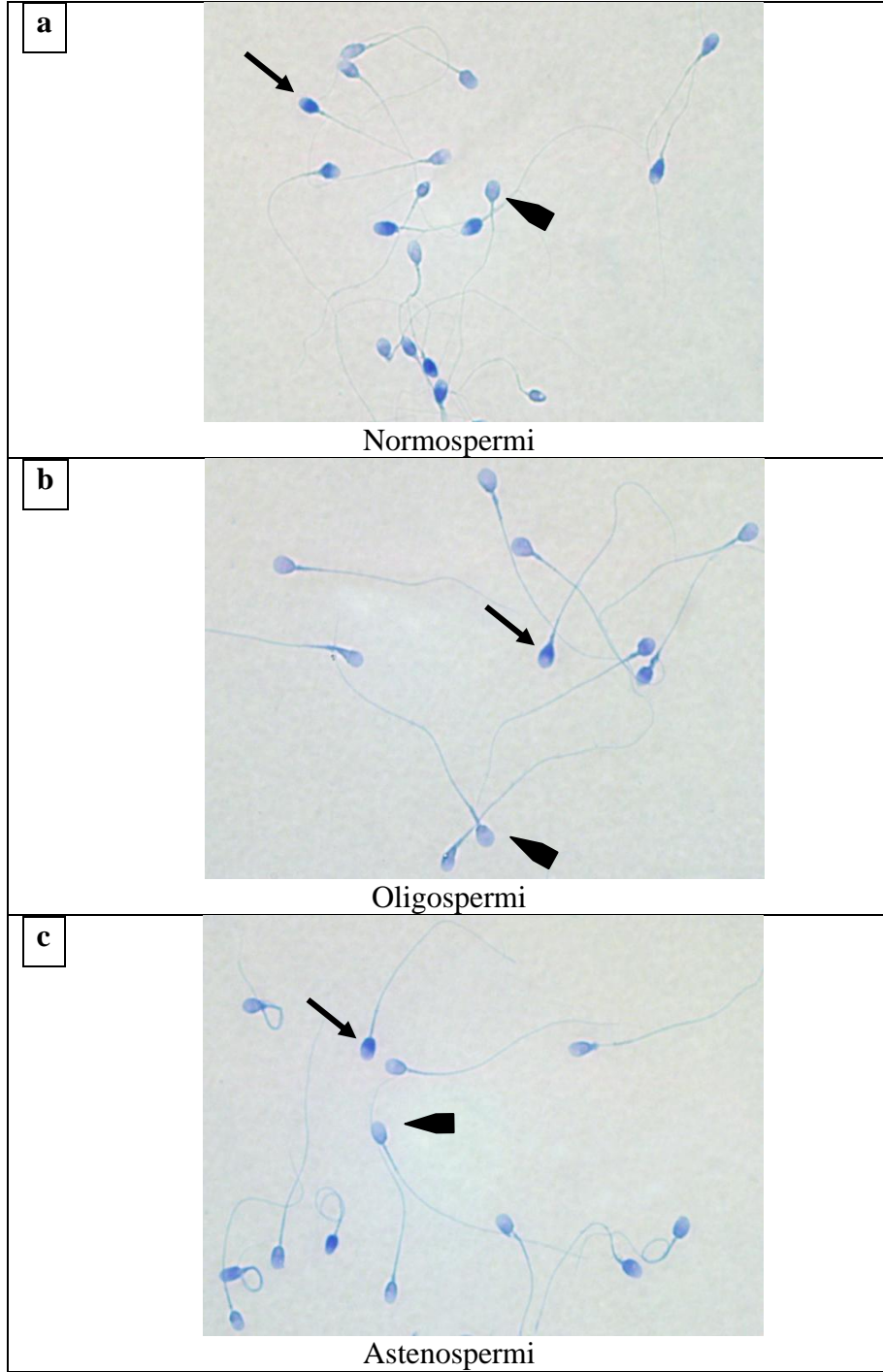
Resim 2. Toluidin mavisi (TB) ile boyanan Normospermi(a), Oligospermi (b), Asthenospermi (c). (**→**) ile gösterilen sperm DNA hasarı olan (koyu mavi-mor boyanan) sperm. (**▶**) ile gösterilen sperm normal DNA'ya sahip olgun sperm (açık mavi-mor boyanan). Büyütme: X 100 (immersiyon)



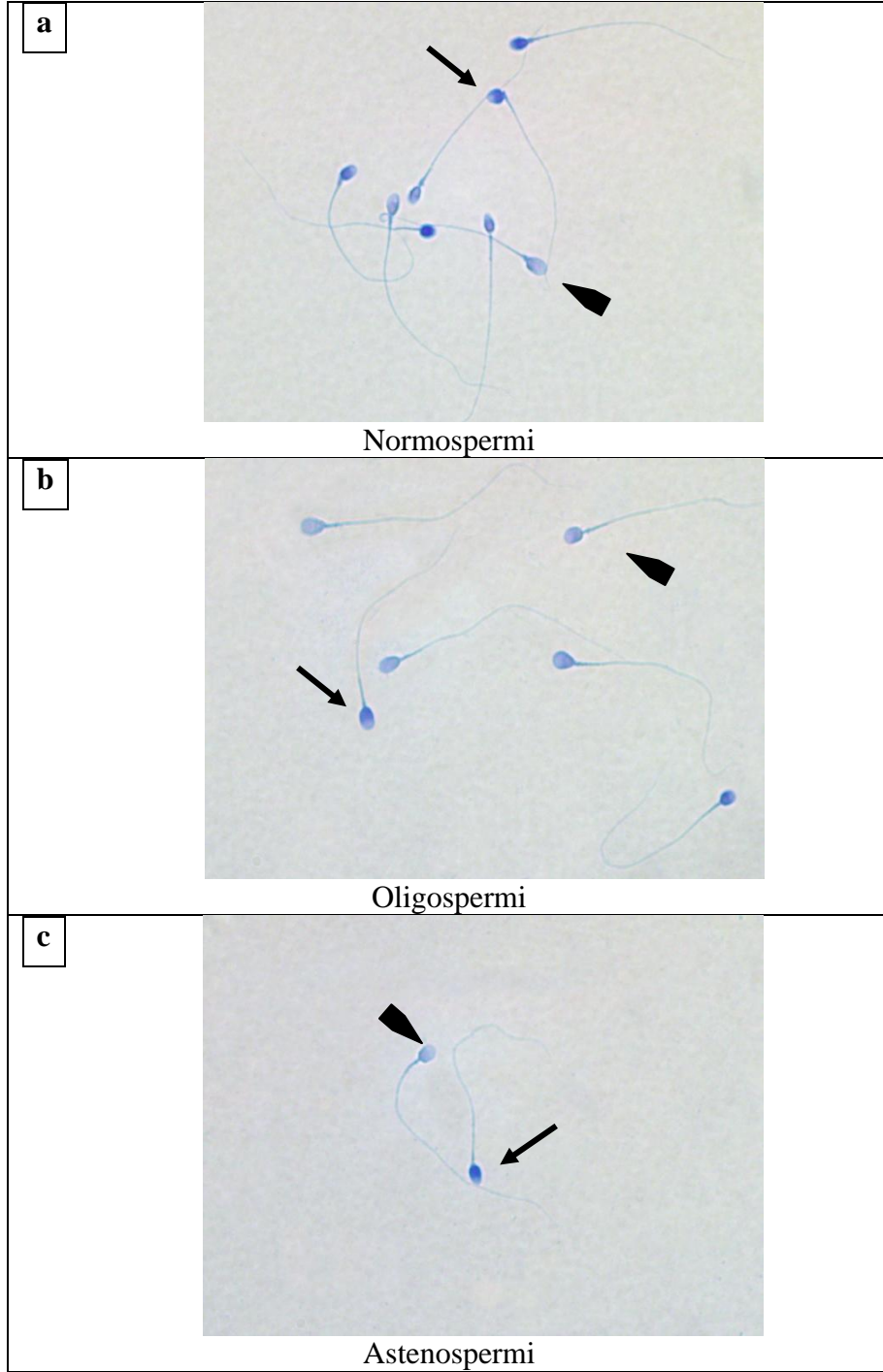
Resim 3. Toluidin mavisi (TB) ile boyanan Normospermi(a), Oligospermi (b), Asthenospermi (c). (\rightarrow) ile gösterilen sperm DNA hasarı olan (koyu mavi-mor boyanan) sperm. (\blacktriangleright) ile gösterilen sperm normal DNA'ya sahip olgun sperm (açık mavi-mor boyanan). Büyütme: X 100 (immersiyon)



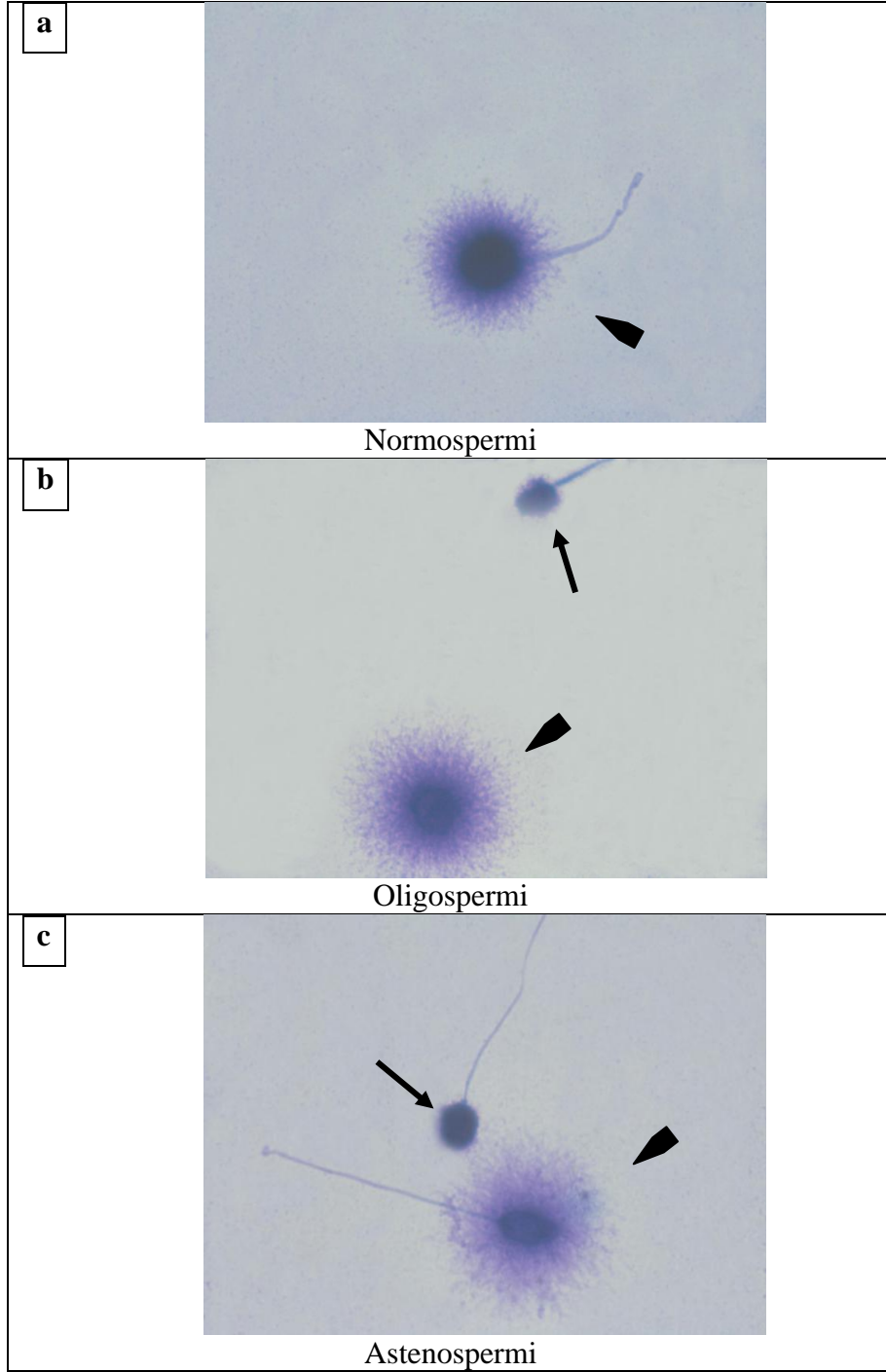
Resim 4. Anilin mavisi (AB) ile boyanan Normospermi(a), Oligospermi (b), Asthenospermi (c). (\rightarrow) ile gösterilen spermeler DNA hasarı olan (koyu mavi boyanan) spermeler. (\blacktriangleright) ile gösterilen spermeler normal DNA'ya sahip olgun spermeler (açık mavi boyanan). Büyütme: X 100 (immersiyon)



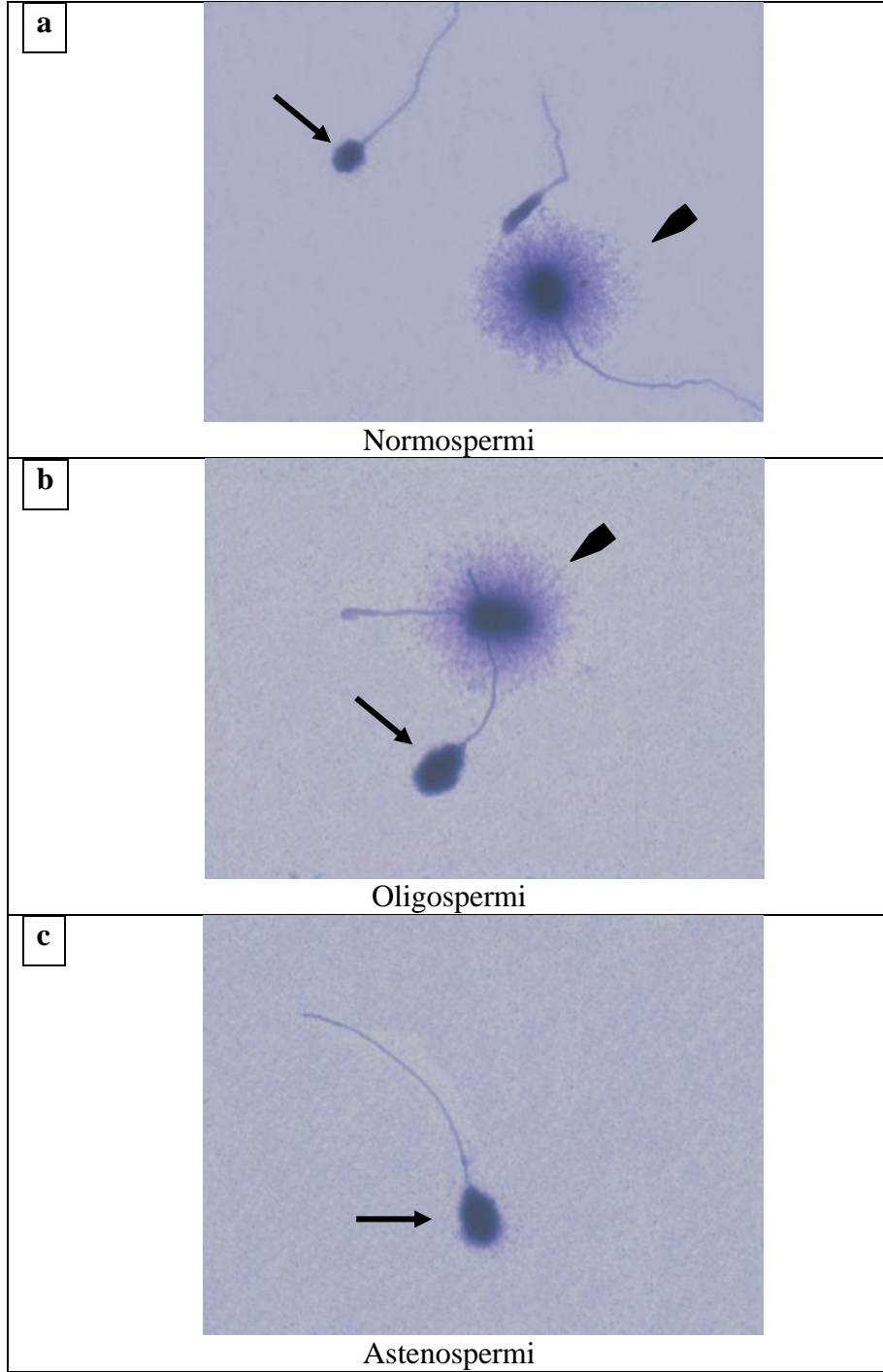
Resim 5. Anilin mavisi (AB) ile boyanan Normospermi(a), Oligospermi (b), Asthenospermi (c). (**→**) ile gösterilen sperm DNA hasarı olan (koyu mavi boyanan) sperm. (**▶**) ile gösterilen sperm normal DNA'ya sahip olgun sperm (açık mavi). Büyütme: X 100 (immersiyon)



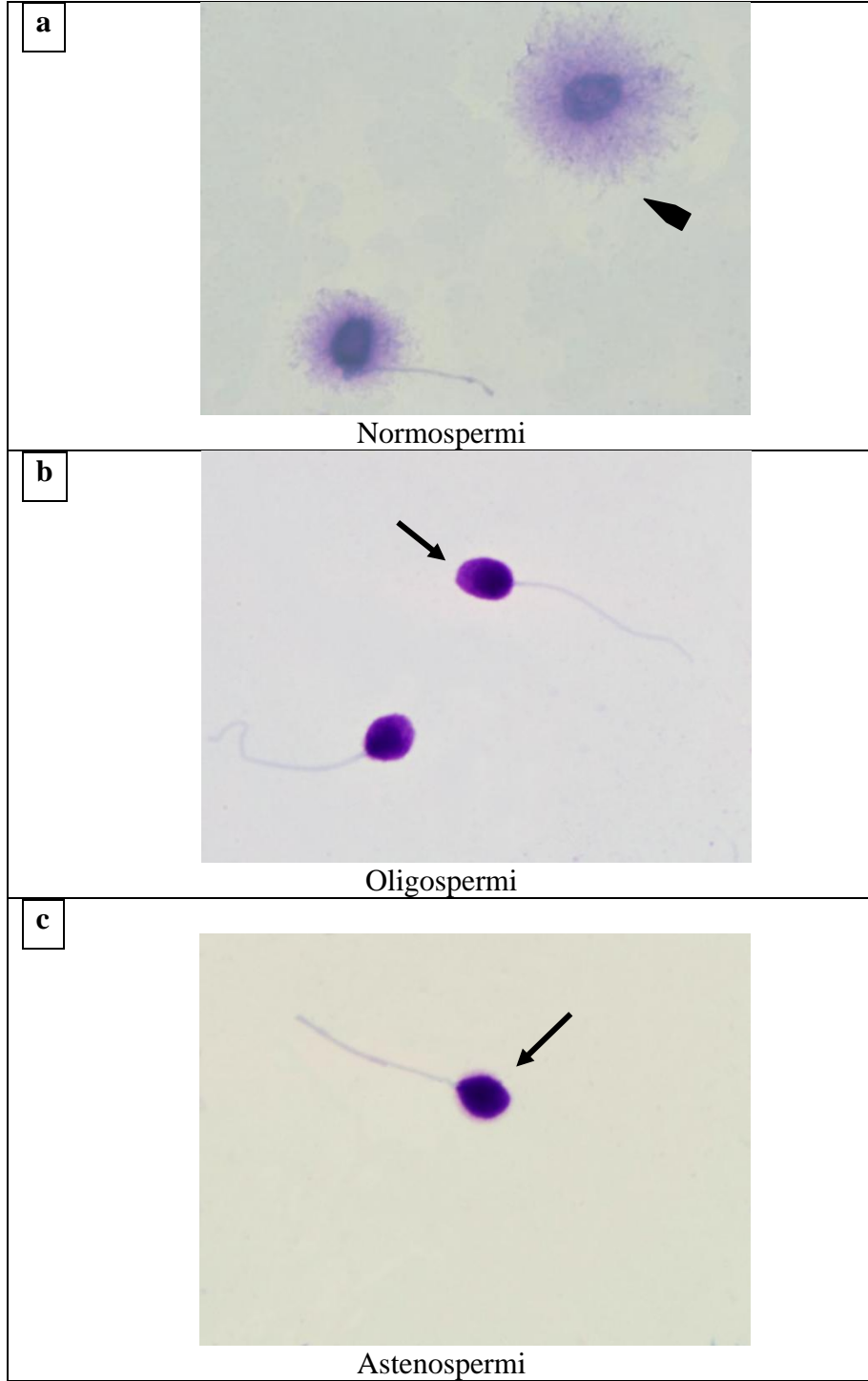
Resim 6. Anilin mavisi (AB) ile boyanan Normospermi(a), Oligospermi (b), Asthenospermi (c). (→) ile gösterilen sperm DNA hasarı olan (koyu mavi boyanan) sperm. (▶) ile gösterilen sperm normal DNA'ya sahip olgun sperm (açık mavi). Büyütme: X 100 (immersiyon)



Resim 7. Sperm kromatin dağılım testi uygulanan Normospermi(a), Oligospermi (b), Asthenospermi (c). (→) ile gösterilen sperm DNA hasarı olan (halo oluşturmayan) sperm. (▲) ile gösterilen sperm normal DNA'ya sahip olgun sperm (halo oluşturan). Büyütme: X 100 (immersiyon)



Resim 8. Sperm kromatin dağılım testi uygulanan Normospermi(a), Oligospermi (b), Asthenospermi (c). (→) ile gösterilen sperm DNA hasarı olan (halo oluşturmayan) sperm. (►) ile gösterilen sperm normal DNA'ya sahip olgun sperm (halo oluşturan). Büyütme: X 100 (immersiyon)



Resim 9. Sperm kromatin dağılım testi uygulanan Normospermi(a), Oligospermi (b), Asthenospermi (c). (→) ile gösterilen sperm DNA hasarı olan (halo oluşturmayan) sperm. (▶) ile gösterilen sperm normal DNA'ya sahip olgun sperm (halo oluşturan). Büyütme: X 100 (immersiyon)

7. TARTIŞMA

İnfertil çiftlerin yaklaşık %20'sinde erkek faktörü sadece temel nedendir. Sperm DNA bütünlüğünü farklı yönlerden değerlendiren birçok test olmakla birlikte, optimal teknik veya uygun klinik eşik değer seviyesi konusunda henüz bir fikir birliği yoktur. Son on yıllık süreçte, erkek infertilitesinde sperm DNA bütünlüğünün rolünü araştıran çalışmalar artmıştır (2). Bu çalışmalar sperm DNA bütünlüğünün, genetik materyalin iletimi ve başarılı gebelik sağlanması için hayati önem taşıdığını ortaya koymaktadır (4). Son yıllarda yapılan değerlendirmeler sonrasında sperm DNA hasarını ortaya koyan testler ile fertil ve infertil erkek tanımının daha net olarak yapılabileceği tezi ortaya atılmıştır (3).

Dadoune JP. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kromatin yoğunlaşmasının sperm kalitesinin bir göstergesi olup olmadığını araştırmışlar ve bu çalışma için spermleri asidik aniline mavisi (AAB) ile boyayarak incelemişlerdir. Sonuçlar morfolojik olarak incelendiğinde; yalnızca canlı ve boyanmamış sperm başlarının yüzdeleri arasında anlamlı farklılık bulmuşlardır (55).

Auger J. ve arkadaşları da fertil ve infertil erkekler arasındaki farkı göstermek için anilin mavisi boyama metodu kullanmışlar ve rutin semen analizine göre fertil ve infertil erkeği ayırt etmede sperm başının olgunluğunun değerlendirilmesinin geliştirilebilir olduğunu belirtmişlerdir (56).

Sellami A, infertil erkeklerde kaliteli sperm seçimi için uygulanan gradyan yoğunluk yönteminin, olgun sperm seçmede etkili olup olmadığını spermleri aniline mavisi yöntemi ile boyayarak incelemiştir. Bu çalışmada; sperm olgunlaşmaması ve akrozom anomalileri arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir (57).

Konuya ilişkin, sperm DNA parçalanması ve dekonduksiyon üzerinde erkek bireyin yaşının etkisi de araştırılmış; sperm DNA parçalanmasını değerlendirmek için TUNEL (Terminal deoksiniükleotidil transferaz aracılı 'Nick-end Labelling' testi) testi kullanılırken, kromatin yoğunlaşması, kromomisin ve anilin mavisi ile değerlendirilmiştir. Son iki boyama tekniğinde de sperm DNA'sının paketleme kalitesi ve atipik formların yüzdesi arasında negatif bir korelasyon gösterilmiştir. Araştırmacılar kromomisin ile ölçüm yaptıklarında, artan yaş ile sperm DNA parçalanmasının ve dekonduksiyonun da arttığını bildirmişlerdir. Ancak test anilin mavisi kullanarak gerçekleştirildiğinde, ters bir ilişki görülmektedir (58).

Kazerooni T. ve arkadaşları, kromomisin A3 ve anilin mavisini kıyasladıklarında olgu grubundaki hastalarda, kontrol grubundaki hastalara göre kromomisin A3 (CMA3) ve anilin mavisinin (AB) istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermişlerdir. Sperm morfolojisi ve ileri hareketliliği kıyasladıklarında, kromomisin A3 (CMA3) [(p=0.001 ve p=0.043)] ve anilin mavisini (AB) [(p=0.015 ve p=0.031)] arasında negatif korelasyon olduğunu görmüşlerdir. Bu araştırmacılar, kromomisin A3 (CMA3) ve anilin mavisini (AB) ile spermin kalitesinin değerlendirilmesini yaptıklarında, spontan tekrarlayan düşüklerde ve erkek faktörünün değerlendirilmesinde; semen analizini tamamlayıcı testlerden biri olarak belirlemişlerdir (59).

Franken DR. ve arkadaşları, normal morfoloji ve kromatin boyaması arasındaki ilişkiyi, kromomisin A3 (CMA3) ve asidik anilin mavisini (AAB) kullanılarak incelemişlerdir; normal morfoloji ile kromatin paketlenmesi arasında negatif ve anlamlı korelasyon bulmuşlardır (60).

Semen analizinin incelenmesine katkı sağlamak için sperm DNA hasarını tespit etmede bir çok test karşılaştırılarak araştırılmaya devam edilmiştir. Toluidin mavisini ve anilin mavisini boyama yöntemi ile anormal sperm kromatin yapısı ve kondensasyon yüzdeleri morfolojik olarak iki farklı grup arasında kıyaslama yapılarak ortaya konmuştur. Bu çalışmanın sonucunda normal ve anormal morfolojiye sahip gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Tekrarlayan spontan düşüklerde ve açıklanamayan infertilitede, çiftlerin değerlendirilmesinde sperm kromatin testlerinden faydalanabileceği belirtilmiştir (61).

Fertil ve infertil erkeklerin ayrımını yaparken erkek fertilité potansiyelinin değerlendirilmesi için toluidin mavisini testi, standart semen analizine ek test olarak kullanılabilirlik için önerilmiştir. Toluidin mavisini ile koyu boyanan sperm (immatur sperm) oranı arttıkça infertilite oranının da artacağı öngörülmüştür (62).

Bunların yanında IVF uygulamalarında, sperm inkübe edildikten sonra nükleer DNA ve kromatin yapısının önemli ölçüde etkilendiği tespit edilerek, inkübasyon sonrası toluidin mavisini ile boyanarak değerlendirmeye alınmıştır. Sperm DNA parçalanması ve toluidin mavisini ile koyu boyanma gösteren sperm oranı arasında güçlü bir pozitif korelasyon olduğu belirtilmiştir (63).

Sabina Valeanu ve arkadaşları; kaliteli olgun spermelerin seçiminde kullanılan gradyan yoğunluk yönteminin etkinliğini incelemek için yaptıkları bir araştırmada, sperm

kromatin yapısını toluidin mavisi ile boyayarak değerlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar gradyan yoğunluk yönteminin, normal morfolojiye, sağlıklı kromatin yapısına ve yüksek motilitiye sahip spermlerin ayrılmasında etkili bir yöntem olduğunu kanıtlanmışlardır (64).

Carretero MI. ve arkadaşları at spermleri üzerinde toluidin mavisi (TB) ve sperm kromatin dağılım (SCD) testleri ile sperm kromatin yapısına kriyoprezarvasyon sürecinin etkisini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada; toluidin mavisi ve sperm kromatin dağılım testleri arasında önemli bir fark gözlemlenmemişlerdir. Bu araştırmacılar; toluidin mavisi ve sperm kromatin dağılım testlerinin, kromatin yapısını değerlendirmek için kullanılabilir olabileceği; farklı in vitro işlemler için kullanılan bu yöntemin at spermi üzerindeki etkisinin de değerlendirmeye yardımcı olabileceğini belirtmişlerdir (65).

Bunların haricinde, fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ise etanolün; sperm sayısı ve sperm motilitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bunu analiz etmek için sperm kromatin yoğunlaşması ve DNA bütünlüğü; kromomisin A3 (CMA3), toluidin mavisi (TB), sodyum dodesil sülfat (SDS), ve sperm kromatin dağılım (SCD) testleri ile değerlendirilmiştir. Sperm apoptozu da TUNEL testi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak farelerde alkolün, sperm parametrelerinde; kromozom/ DNA bütünlüğü ve apoptoz üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu gösterilmiştir (66).

Chohan KR. ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada sperm kromatin yapısı testi (SCSA), TUNEL testi, sperm kromatin dağılım (SCD) testi ve akrinin turuncu boyama yöntemi kullanmışlardır. Çalışma sonucunda sperm DNA parçalanmasını incelediklerinde; TUNEL, SCD ve SCSA arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Bu testler ile DNA parçalanmasına bakıldığında benzer değerlerin tespit edildiğini belirtmişlerdir (4).

Köpek spermi üzerinde yapılan bir çalışmada, sperm kromatin dağılım (SCD) testi kullanılarak DNA fragmentasyon indeksi incelenmiştir. Bu çalışmada, dondurarak saklama yönteminin, sperm motilitesi ve morfolojisi üzerinde hasar verici etkiye sahip olup olmadığına bakılmıştır. Bir kontrol grubu ile beraber, dondurma işleminden önce ve çözündükten sonra spermler değerlendirmeye alınmıştır. Dondurulup çözülmüş sperm, SCD testi ile değerlendirildiğinde DNA'da hasar meydana gelmediği görülmüştür (67).

Ribas-Maynou J. ve arkadaşları, sperm kromatin dağılımı (SCD) testi, sperm kromatin yapısı (SCSA), TUNEL, alkali COMET (Tek hücre jel elektroforezi) ve nötr COMET testleri arasındaki farkları; fertil ve infertil erkekler arasında kıyaslamışlardır. TUNEL, SCSA, SCD ve alkali COMET testlerinde fertil ve infertil erkekler arasında

sperm DNA parçalanmasında farklılıklar bulunurken, nötr COMET testi ile incelendiğinde bu iki grupta sperm DNA parçalanmasında fark bulmamışlardır. Bu çalışmanın sonucunda; nötr COMET testi dışındaki SCSA, TUNEL, alkali COMET, SCD testlerinin fertil ve infertil erkeklerin ayırt edilmesinde yararlı olduğunu belirlemişlerdir (68).

Wang YJ., tekrarlayan gebelik kaybı (recurrent pregnancy loss- RPL) öyküsü olan hastalarda, sperm DNA fragmentasyonunu sperm kromatin dağılımı testi (SCD) ile incelemiştir. Tekrarlayan gebelik kaybına sahip olan grup ile fertilitesi kanıtlanmış grup arasında, sperm motilitesinde anlamlı bir fark gözlemlemiştir. Sperm DNA fragmentasyon oranı, RPL (tekrarlayan gebelik kaybı) olan grupta artış göstermiştir. Sonuç olarak; RPL öyküsü olan erkekler ile fertil erkekler kıyaslandığında, RPL öyküsü olan erkeklerde DNA hasarı ve motilite düşüklüğünün yüksek olduğu belirlenmiştir (69).

Absalan F. ve arkadaşları, tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü olan hastalar ile fertil bireyler arasında, sperm DNA hasar oranlarını değerlendirmişlerdir. Bu çalışma sonucunda; tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü bulunan hastalarda, bilinen sperm parametrelerine ek olarak, erkek faktörünün değerlendirilmesinde SCD (sperm kromatin dağılımı) gibi testlerin önemli olduğunu vurgulamışlardır (70).

Velez de la Calle JF ve arkadaşlarının 622 çift üzerinde yaptıkları çalışmada; fertilizasyon oranı, embriyo kalitesi ve tahmini gebelik sonucuna göre sperm DNA parçalanmasını, sperm kromatin dağılımı (SCD) testi ile araştırmışlardır. Bu araştırmacılar sperm DNA parçalanma hızı ile sperm motilitesi, morfolojisi ve konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlemlemiştir. Ayrıca sperm DNA fragmentasyon oranı ve fertilizasyon oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulmuşlardır. Aynı çalışmada embriyo kalitesi ile ilgili olarak, sperm DNA parçalanması ve embriyo kalitesi arasında bir ilişki gözlemlemiştir. Klinik gebelik ve sperm DNA fragmentasyonu arasında da anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Bu çalışmanın sonucu olarak; sperm DNA parçalanma değerlendirilmesi için sperm kromatin dağılımı (SCD) testinin yararlı olduğunu teyit etmişlerdir (71).

Yaptığımız bu çalışmada literatürde daha önce kıyaslanmayan; toluidin mavisi, anilin mavisi ve sperm kromatin dağılımı (SCD) testlerini kullandık. Bu testler ile normospermik, oligospermik ve astenospermik gruplardaki DNA hasar oranlarını tespit ettik. Toluidin mavisi ve anilin mavisi testine göre SCD' nin daha anlamlı bir farklılık gösterdiğini bulduk. Aynı zamanda sperm kromatin dağılımı testi ile sperm motilitesini

karşılaştırdığımızda; motilitenin artarken, sperm kromatin dağılım oranının azaldığını tespit ettik. Daha detaylı çalışmalar planlandığında hasta sayısı artırılıp; ayrıca yaş, sigara kullanımı ve alkol tüketimi gibi parametreler de göz önünde bulundurularak, IVF uygulamalarında kullandığımız toluidin mavisi, anilin mavisi ve SCD testlerinden, “ SCD testi” nin güvenilirliğinin daha fazla öne çıkacağını düşünüyoruz.

8. SONUÇ

Çalışmamıza infertilite nedeni ile IVF merkezine başvurmuş olan yaşları 22-42 arasında değişen 47 erkek birey dahil edildi. Bu bireylerden alınan semen örneklerine rutin semen analizi dışında sperm kromatin dağılım testi, toluidin mavisi testi ve anilin mavisi testleri uygulanıp sperm DNA hasar oranları saptandı.

Sperm sayısı ile sperm motilitesi üzerinde SCD, toluidin mavisi ve anilin mavisi testlerinin etkilerini karşılaştırdığımızda;

1. Toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları hastaların sperm sayısına göre karşılaştırıldığında normospermik ve oligospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı ($p<0.05$).
2. Anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları hastaların sperm sayısına göre karşılaştırıldığında normospermik ve oligospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu saptandı ($p<0.05$).
3. Oligospermik hastaların sperm kromatin dağılım testi (SCD) sonucundaki DNA hasarı ortalamalarının normospermik hastaların sperm kromatin dağılım testi (SCD) sonucundaki DNA hasarı ortalamalarına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$).
4. Toluidin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları hastaların sperm motilitesine göre karşılaştırıldığında normospermik ve astenospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ($p>0.05$).
5. Anilin mavisi testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları hastaların sperm motilitesine göre karşılaştırıldığında normospermik ve astenospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı ($p>0.05$).
6. Sperm motilitesine göre sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarı ortalamaları karşılaştırıldığında normospermik ve astenospermik hastaların DNA hasarı ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu ($p<0.05$), astenospermik hastaların sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarı ortalamalarının normospermik hastaların sperm kromatin dağılım (SCD) testi sonucundaki DNA hasarı ortalamalarına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p=,000$).
7. Sperm sayısının SCD testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olmadığı görüldü ($p>0.05$).

8. Sperm motilitesinin SCD testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olduğu görüldü ($p<0.05$).
9. Sperm sayısının toluidin mavisi testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olduğu görüldü ($p<0.05$).
10. Sperm motilitesinin toluidin mavisi testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olmadığı görüldü ($p>0.05$).
11. Sperm sayısının anilin mavisi testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olduğu görüldü ($p<0.05$).
12. Sperm motilitesinin anilin mavisi testi sonucunda elde edilen DNA hasarının anlamlı bir yordayıcısı olmadığı görüldü ($p>0.05$).
13. Sperm sayısı ile sperm motilitesi arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki ($r=0.276$, $p<0.05$) olduğu bulundu.
14. Sperm sayısı ile toluidin mavisi testi arasında negatif yönde fakat anlamlı bir ilişki ($r=-0.345$, $p<0.01$) olduğu belirlendi. Sperm motilitesi ile toluidin mavisi arasında negatif yönde, çok düşük bir düzeyde ve anlamlı olmayan bir ilişki olduğu ($r=-0,048$, $p>0.05$);
15. Sperm sayısı ile anilin mavisi testi arasında negatif yönde anlamlı bir ilişki ($r=-0.336$, $p>0.01$) olduğu belirlendi. Sperm motilitesi ile anilin mavisi testi arasında negatif yönde anlamlı olmayan bir ilişki ($r=-0.201$, $p>0.05$) olduğu tespit edildi.
16. SCD testi ile sperm sayısı arasında negatif yönde anlamlı olmayan bir ilişki ($r=-0.166$, $p>0.05$); Sperm motilitesi ile SCD testi arasında negatif yönde ve orta düzeyde anlamlı bir ilişki ($r=-0.631$, $p<0.01$) olduğu belirlendi.

Testler arasında ilişki durumlarına bakıldığında; toluidin mavisi ile anilin mavisi testi arasında pozitif yönde ve yüksek düzeyde anlamlı bir ilişki ($r= 0.438$, $p<0.01$) olduğu tespit edildi. Toluidin mavisi ile SCD testi arasında ise düşük düzeyde ve anlamlı olmayan bir ilişki ($r=0.215$, $p>0.05$) olduğu belirlendi. Anilin mavisi ile SCD testi arasında da düşük düzeyde ve anlamlı olmayan bir ilişki ($r=0.294$, $p>0.05$) olduğu bulundu.

Yapılan araştırmalar infertil erkeklerin değerlendirilmesinde bir çok literatürde belirtildiği gibi rutin semen analizine ek olabilecek testler kullanılması gerektiğini söylemektedirler. Bu testlerin karşılaştırılmaları ile ilgili literatür çalışmaları gün geçtikçe artmaktadır. Bizim çalışmamızda, literatürde önceden yapılan çalışmalar doğrultusunda sperm kromatin dağılım (SCD) testinin diğer testlere göre daha güvenilir olduğu görüldü. Bu bilgiler ışığında, sperm kromatin hasar yapısını tespit etmek için kullanılan yöntemler

içerisinde SCD testine yer verilerek, IVF merkezine başvuran erkeklerde fertilizasyon başarısının artacağını düşünürüz. Ayrıca daha önce de belirttiğimiz gibi hastanın yaşı, sigara kullanımı ve alkol tüketimi gibi parametrelerin de araştırmaya eklenerek, SCD testinin güvenilirliğinin daha da artacağını ummaktayız.

9. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi, değerlendirilmesi, tamamlanmasında, bilgisi ve deneyimleri ile bana yol gösterip, sabrını ve gülüyüzünü esirgemeyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Vildan KARPUZ'a,

Tez konumun belirlenmesinde, yönlendirilmesinde, bilimsel katkıları ve deneyimlerini esirgemeyip desteğini gösteren bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Canan HÜRDAĞ'a,

Tezimin gerçekleşmesi için örneklerin temin edilmesini sağlayarak tez çalışmamın ilerlemesinde desteğini gösteren, bilgi, öneri ve tecrübelerini esirgemeyen hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Evrim ÜNSAL'a,

İstatistik tabloların hazırlanması, düzenlenmesi ve neticelendirilmesinde, bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyen hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Albena GAYEF'e,

Sperm kromatin dağılım testinin yapılmasına yardımcı olup, desteklerini esirgemeyen Gen-Art Tüp Bebek, Kadın Sağlığı ve Üreme Biyoteknoloji Merkezi çalışanlarına,

Tezimin her evresinde farklı konulardan desteklerini ve yardımlarını gösteren kuzenlerime ve yeğenlerime,

Bütün eğitimim boyunca bana destek olan, hayatıma her daim anlam katan, maddi manevi desteklerini esirgemeyip, her türlü fedakarlıkta bulunarak bana güç veren canım aileme,

Sonsuz teşekkür ediyorum.

10. KAYNAKLAR

1. Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi. *Turk Urol Sem.* 2011, 2: 11-17.
2. Koyuncu H. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri. *Turk Urol Sem.* 2011, 2: 18-23
3. Boynukalın FK, Güven S, Günalp S. Sperm DNA Hasarı ve Üremeye Yardımcı Teknikler. *J Turk Soc Obstet Gynecol.* 2014, 1: 52-58.
4. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *J Androl.* 2006, 27: 53–59.
5. Agarwal A, Said TM. Sperm Chromatin Assessment. In: Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. United Kingdom, Informa Healthcare, 2012.
6. Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçioğlu O, Kadioğlu A. Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi. İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, 2013.
7. Abraham L. Kierszenbaum. Çeviri Editörü: Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
8. Gartner LP, Hiatt JL. Çeviri Editörleri: Dağdeviren A, Müftüoğlu FS, Karabay G. Renkli Histoloji Atlası. Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, 2009.
9. Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO. Çeviri Editörleri: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B. Temel Histoloji. İstanbul, Barış Kitabevi, 1998.
10. Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi. İstanbul, Türk Androloji Derneği Yayını, 2004.
11. Eroschenko VP. Çeviri Editörü: Demir R. Di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. Ankara, Palme Yayıncılık, 2001.
12. Elder K, Dale B. Çeviri Editörü: İrez T. İn Vitro Fertilizasyon. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2014.
13. Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK. Phenotyping Male Infertility in The Mouse: How to Get The Most Out of a 'Non-Performer'. *Human Reproduction Update.* 2010, 2: 205–224.

14. Spermatogenezis (t.y.). Erişim: 20.06.2014,
<http://veterinerhistoloji.atauni.edu.tr/dersnot/Spermatogenezis.pdf>
15. Junqueira LC, Carneiro J. Çeviri Editörleri: Solakoğlu S, Aytekin Y. Temel Histoloji Text & Atlas. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2009.
16. Goluzza T, Boscanin A, Cvetko J, Kozina V, Kosovic M, Bernat MM, Kasum M, Kaştelan Z, Jezek D. Macrophages and Leydig Cells in Testicular Biopsies of Azoospermic Men. *BioMed Research International*. 2014, 2014: Article ID 828697, pages 4.
17. Beyaz F, Küçük Bayram G, Alan E. Tavşan Testis ve Epididimisinde Makrofajların İmmunohistokimyasal Lokalizasyonu. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*. 2009, 6(2): 97-103.
18. Leydig hücreleri (t.y.). Erişim: 20.06.2014,
http://www.kaanaydos.net/ders_notlari_leydig.php
19. Sadler TW. Çeviri Editörü: Başaklar AC. Langman Medikal Embriyoloji. Ankara, Palme Yayıncılık, 2005.
20. Moore KL, Persaud T.V.N. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Çeviri Editörü: Dalçık H, Yıldırım M. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi, 2009.
21. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, 2008.
22. Doğan, ř. (2008). Seminal Plazma Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Sperm DNA Fragmentasyonu ve Apoptozu Sürecinde İnfertiliteye Olan Etkisinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.
23. Ross HM, Romrel LJ, Kaye GI. Histology, a Text and Atlas. Third Edition. Baltimore, Williams & Wilkins, 1995.
24. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Philedelphia, W.B. Saunders Company, 1997.
25. Deveci E. Ürogenital Sistem ve Hastalıkların Biyolojik Temelleri Ders Notları. Erişim: 20.06.2014, www.dicle.edu.tr/Contents/ec282de7-12a2-48e4-ab2e-c1b8ac739289.pdf
26. Avcı B. Farklı Fiksasyon Protokolleri ile Sperm Kromatin Kondansasyon Anomalisinin Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2006, 32(2): 55-59.

27. Difference Between Spermatogenesis and Spermiogenesis. Erişim: 20.06.2014, <http://www.majordifferences.com/2013/06/difference-between-spermatogenesis-and.html#.U5wpKR9gEqR>
28. Kalem, H.H. (2011). Erkek İnfertilitesinde Sperm Apoptozunun İnteruterin İnseminasyon ve İnteritoplazmik Sperm İnjeksiyon Sonuçlarına Etkisi. Uzmanlık Tezi, Cerrahpařa Tıp Fakóltesi, İstanbul.
29. Zülfikaroğlu G, Özgür H, Polat S. Kapasitasyonun Moleküler Temelleri. *Archives Medical Review Journal*. 2010, 1: 12-24.
30. Rajeev SK, Reddy KV. Sperm Membrane Protein Profiles of Fertile and Infertile Men: Identification and Characterization of Fertility-Associated Sperm Antigen. *Human Reproduction*. 2004, 2: 234-242.
31. Poulos A and White IG. The Phospholipid Composition of Human Spermatozoa and Seminal Plasma. *J. Reprod. Fert.* 1973, 35(2): 265-272.
32. Zini A, Libman J. Sperm DNA Damage: Clinical Significance in The Era of Assisted Reproduction. *CMAJ*. 2006, 175(5): 495-500.
33. Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı Hasarı. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi*. 2006, 20(1): 85-95.
34. Tavukuoğlu İç, Al-Azawi T, Khaki AA, Khaki A, Khalil A, Al-Hasani S. Clinical Value of DNA Fragmentation Evaluation Tests Under ART Treatments. *J Turkish-German Gynecol Assoc*. 2012, 13: 270-274.
35. Khalili MA, Nazari S, Denghani-Firouzabadi R, Talebi A, Baghazadeh-Naeini S, Sadeghian- Nodosan F, Agha-Rahimi A. Comparing The Roles of Sperm Chromatin Integrity and Apoptosis in Intrauterine Insemination Outcomes of Couples with Mild Male and Female Factor Infertility. *J Reprod Infertil*. 2014, 15(1): 35-40.
36. Yaman Ö, ayan S, Orhan İ, Usta MF, Aşçı R, Semerci B, Kadioğlu A. Androloji Ürolojide Yeni Ufuklar. İstanbul, Güneş Tıp Kitabevleri, 2010.
37. Kayıkçı MA, am HK, Akman Y, Erol A. Erkek İnfertilitesini Deđerlendirmede Semen Analizinin Özellikleri ve Rolü. *Düzce Tıp Fakóltesi Dergisi*. 2002, 4(3): 35-38.
38. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Laboratuvar El Kitabı: İnsan Semeni ve Sperm- Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi. Çeviri Editörü: Günalp S. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2011.

39. Gökçe A. Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Standart Semen Analiz. *Turk Urol Sem.* 2011, 2: 1-7.
40. Tapısız ÖL, Altınbaş ŞK, Abike F, Göktolga Ü. Jinekolog Gözü İle Semen Analizi ve Son Gelişmeler. *J Turk Soc Obstet Gynecol.* 2012, 9(1): 25-31.
41. David KG, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Çeviri Editörleri: İrez T, Arda O, Kaleli S. Yardımla Üreme Teknikleri Temel Kitabı (Laboratuvar ve Klinik Görüşler). İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009.
42. Özçınar E. Semen Analizi: 2010 Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Spermiyogram. *Izın Univ Med J.* 2014,1: 48-51.
43. Satar DA, Gençdal S. Sperm Değerlendirmesi. *Archives Medical Review Journal.* 2013, 22(4): 532-542.
44. Hossain A, Hossain S, Phelps J. Human Sperm Bioassay. In: Medical and Surgical Management of Male Infertility. Ed: Rizk B, Aziz N, Agarwal A, Sabanegh E. USA, 2014.
45. Agarwal A, Bragais FM, Sabanegh E. Assessing Sperm Function. *Urol Clin N Am.* 2008, 35: 157-171.
46. Milli Eğitim Bakanlığı. Kimya Teknolojisi Organik Maddeler-3. Ankara, MEB, 2008.
47. N. Ozban, Ö. Özmutlu. Mikropreparasyon Yöntemleri. İstanbul, İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, 1994.
48. Anilin Blue (t.y.). Erişim: 20.06.2014, http://en.wikipedia.org/wiki/Aniline_Blue_WS
49. Nabi A, Khalili MA, Halvaei I, Ghasemzadeh J, Zare E. Seminal Bacterial Contaminations: Probable Factor in Unexplained Recurrent Pregnancy Loss. *Iran J Reprod Med.* 2013, 11: 925-932.
50. Hammadeh ME, Al-Hasani S, Stieber M, Rosebaum P, Küpker D, Diedric K, Schmidt W. The Effect of Chromatin Condensation (Aniline Blue Staining) and Morphology (Strict Criteria) of Human Spermatozoa on Fertilization, Cleavage and Pregnancy Rates in an Intracytoplasmic Sperm Injection Programme. *Human Reproduction.* 1996, 11: 2468-2471.
51. Toludin Blue (t.y.). Erişim: 20.06.2014, http://en.wikipedia.org/wiki/Toluidine_blue_stain

52. Ertekin B. (2009). Oral Liken Planus Tanılı Hastalarda Displazik ve Malign Değişimlerin Saptanması Amacıyla, Biyopsi Öncesinde Toluidin Mavisi Uygulama Yönteminin Etkinliği. Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
53. Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Porentezari M. Effects of Experimentally-Induced Diabetes on Sperm Parameters and Chromatin Quality in Mice. *Iran J Reprod Med.* 2013, 1: 53-60.
54. Toluidin Blue Chemical Structure (t.y.). Erişim: 20.06.2014, <http://www.guidechem.com/products/6586-04-5.html>
55. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscota ML. Correlation Between Defects in Chromatin Condensation of Human Spermatozoa Stained by Aniline Blue and Semen Characteristics. *Andrologia.* 1988, 20(3): 211-217.
56. Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline Blue Staining as a Marker of Sperm Chromatin Defects Associated With Different Semen Characteristics Discriminates Between Proven Fertile and Suspected Infertile Men. *Int J Androl.* 1990, 13(6): 452-462.
57. Sellami A, Chakroun N, Ben Zarrouk S, Sellami H, Kebaili S, Rebai T, Keskes L. Assessment of Chromatin Maturity in Human Spermatozoa: Useful Aniline Blue Assay for Routine Diagnosis of Male Infertility. *Advances in Urology.* 2013, 2013: Article ID 578631, pages 8.
58. Beloc S. Paternal Age and Sperm DNA Decay: Discrepancy Between Chromomycin and Aniline Blue Staining. *Reproductive BioMedicine.* 2009, 19(2): 264-269.
59. Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J. Evaluation of Sperm's Chromatin Quality with Acridine Orange Test, Chromomycin A3 and Aniline Blue Staining in Couples with Unexplained Recurrent Abortion. *J Assist Reprod Genet.* 2009, 26: 591-596.
60. Franken DR, Franken CJ, de la Guerre H, de Villiers A. Normal Sperm Morphology and Chromatin Packaging: Comparison Between Aniline Blue and Chromomycin A3 Staining. *Andrologia.* 1999, 31(6): 361-366.
61. 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.

62. Tsarev I, Bungum M, Giwercman A, Erenpreisa J, Ebessen T, Ernst E, Erenpreiss J. Evaluation of Male Fertility Potential by Toluidine Blue Test for Sperm Chromatin Structure Assessment. *Human Reproduction*. 2009, 7: 1569-1574.
63. Jee BC, Suh CS, Shin MS, Lee HJ, Lee JH, Kim SH. Sperm Nuclear DNA Fragmentation and Chromatin Structure in One-Day-Old Ejaculated Sperm. *Clin Exp Reprod Med*. 2011, 38(2): 82-86.
64. Valeanu S, Simionescu G, Doroftei B and Cumpata S. Sperm Chromatin Structure and The Sperm Parameters Characteristics After Processing by The Density Gradient. *Current Opinion in Biotechnology*. 2013, 24(1): S107.
65. Carretto MI, Arraztoa CC, Ferrante A, Caldevilla M, Santa Cruz R, Neild D. Evaluation of Stallion Sperm DNA During Cryopreservation Using the Toluidine Blue Stain and the Sperm Chromatin Dispersion Test. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2012, 32(8): 480.
66. Rahimipour M, Talebi AR, Anvari M, Sarcheshmeh AA, Omidi M. Effects of Different Doses of Ethanol on Sperm Parameters, Chromatin Structure and Apoptosis in Adult Mice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2013, 170: 423-428.
67. Urbano M, Dorado J, Ortiz I, Morrel JM, Demyda- Peyras S, Galvez MJ, Alcaraz L, Ramirez L, Hidalgo M. Effect of Cryopreservation and Single Layer Centrifugation on Canine Sperm DNA Fragmentation Assessed by The Sperm Chromatin Dispersion Test. *Animal Reproduction Science*. 2013, 143(1-4): 118-125.
68. Ribas-Maynou J, Garcia Peiro A, Fernandez-Encinas A, Abad C, Amengual MJ, Prada E, Navarro J, Benet J. Comprehensive Analysis of Sperm DNA Fragmentation by Five Different Assays: TUNEL Assay, SCSA, SCD Test and Alkaline and Neutral Comet Assay. *Andrology*. 2013, 1(5): 715-722.
69. Wang YJ, Li DW, Zhang WL, Zhang RQ, Wang GN, Zhang RR. Correlation of Recurrent Pregnancy Loss With Sperm Parameters and Sperm DNA Fragmentation. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2012, 29(5): 602-605.
70. Absalan F, Ghannadi A, Kazerooni M, Parifar R, Jamalzadeh F, Amiri S. Value of Sperm Chromatin Dispersion Test in Couples with Unexplained Recurrent Abortion. *J Assist Reprod Genet*. 2012, 29(1): 11-14.

71. Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C, Wittemer C, Thonneau P. Sperm Deoxyribonucleic Acid Fragmentation as Assessed by The Sperm Chromatin Dispersion Test in Assisted Reproductive Tecnology Programs: Results of a Large Prospective Multicenter Study. *Fertil Steril*. 2008, 90(5): 1792-1799.