

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

VARİKOSEL OLGULARINDA SPERM MORFOLOJİSİ VE DNA
HASARLARININ İNCELENMESİ

Hazırlayan
Özge ÖZÇOBAN

Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN

Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2015
KAYSERİ

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

VARİKOSEL OLGULARINDA SPERM MORFOLOJİSİ VE DNA
HASARLARININ İNCELENMESİ

Hazırlayan
Özge ÖZÇOBAN

Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN

Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2015
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

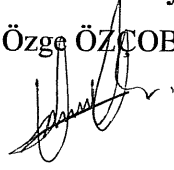
Adı-Soyadı: Özge ÖZÇOBAN

İmza:

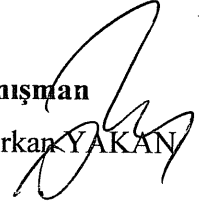
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Varikosel Olgularında Sperm Morfolojisi ve DNA Hasarlarının İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Özge ÖZÇOBAN

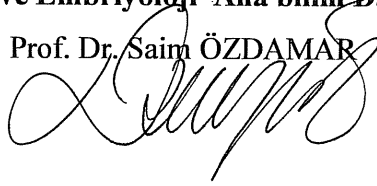


Danışman
Prof. Dr. Birkay YAKAN



Histoloji ve Embriyoloji Ana bilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR



Prof. Dr. Birkan YAKAN danışmanlığında Özge ÖZÇOBAN tarafından hazırlanan “Varikozel Olgularında Sperm Morfolojisi ve DNA Hasarlarının İncelenmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

20/01/2015

JÜRİ

Danışman: Prof. Dr. Birkan YAKAN (Histoloji-Embriyoloji AD)

Üye: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR (Histoloji-Embriyoloji AD)

Üye: Prof. Dr. Yusuf BARAN (İYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik AD)

İmza

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/...../2015 tarih ve ... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../2015

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini aktaran, emek ve hoş görüşünü hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Birkan YAKAN'a, çalışmamda bana vermiş olduğu her türlü destekten dolayı,

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. Başkanı, Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a, her türlü yardımlarından ve desteğinden dolayı,

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ'e, her türlü yardımlarından ve desteğinden dolayı,

Yanında çalışmaktan onur duyduğum, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Arzu YAY'a, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı,

Engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıklar A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Ali ÜNAL'a, her türlü desteğini hiçbir zaman esirgemediği için,

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik öğretim üyesi Prof. Dr. Yusuf BARAN'a, hiçbir yardımını ve desteğini esirgmeden yanımda olduğu için,

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik A.D. Öğr. Gör. Dr. Fazile CANTÜRK'e, her konuda yardımlarını esirgemediği için,

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Figen NARİN'e, biyokimyasal analizlerin yapılması aşamasında yardımlarından dolayı,

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik A.D. öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ferhan ELMALI'ya, sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı,

Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D. yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, her türlü desteklerinden ve yardımlarından dolayı,

Çalışmamızı destekleyen Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi'ne, Bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan aileme ve Deniz YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım,

Özge ÖZÇOBAN

Ocak 2015

VARİKOSEL OLGULARINDA SPERM MORFOLOJİSİ VE DNA HASARLARININ İNCELENMESİ

Özge ÖZÇOBAN

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2015

Danışman: Prof. Dr. Birkan YAKAN

ÖZET

Varikozel, spermatik kordu saran pampiniform pleksus venlerinin anormal genişlemesi olarak tanımlanır. Klinik bulgulara göre varikozel evre 1, 2 ve 3 olmak üzere 3 grupta sınıflandırılır.

Çalışmamızın amacı, varikozel evreleri arasında semen parametreleri, biyokimyasal parametreler ve DNA hasarı yönünden fark olup olmadığını ortaya koymaktır.

Çalışmada, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Polikliniğine başvuran 60 hastaya ait semen ve kan örnekleri kullanıldı; grup 1: sağlıklı erkekler (n=20), grup 2: varikozel evre 1-2 (n=20) ve grup 3: varikozel evre 3 (n=20). Semen örneklerine alkali comet assay yöntemi, anilin mavisi ve Periyodik asit Schiff (PAS) boyaması uygulandı. Olgulardan alınan kan örneklerinde ise plazma katalaz (KAT), Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri ve Malondialdehit (MDA) düzeyleri değerlendirildi.

Comet assay bulgularına göre; grup 2 ve grup 3 comet parametreleri grup 1'e göre kayda değer daha yüksekti ($p<0,001$). Histolojik bulgulara göre; grup 1'de, normal sperm morfoloji ortalaması %14, grup 2'de %6, grup 3'te ise % 4'ün altında idi. Biyokimyasal analizlere göre; grup 2 ve grup 3'te SOD ve KAT aktivitelerinde azalma, MDA seviyesinde artış gözlemlendi.

Sonuç olarak, varikozel derecesi arttıkça DNA hasarı ve MDA düzeyinde artma, SOD ve KAT enzim aktivitelerinde azalma tespit edildi. Çalışmamızda varikozel evre 1 ve 2'de de infertilite yönünden anlamlı DNA hasarı olduğunu gösterdik. Elde ettiğimiz sonuçlar, rutin semen analizi ve morfolojik analizlerin yanı sıra sperm DNA hasarını göstermenin de prediktör olarak kullanılabileceğini öngörmektedir.

Anahtar Kelimeler: Varikozel evreleri, erkek infertilitesi, DNA hasarı, sperm morfolojisi

EVALUATION OF SPERM MORPHOLOGY AND DNA DAMAGE WITH VARICOCELE

Özge ÖZÇOBAN

Erciyes University, Institute Of Medical Sciences

Department Of Histology And Embryology

MSc Thesis, January 2015

Supervisor: Prof. Dr. Birkan YAKAN

ABSTRACT

Varicocele can be defined as the extraordinary expanding of pampiniform plexus veins which wraps the spermatic cord. According to clinical findings, varicocele can be divided into three groups; 1st, 2nd and 3rd grade.

The aim of our research is to show differences among three different varicosele grades according to the result of their semen parameters, biochemical parameters and DNA damage.

In this study, semen and blood samples of 60 patients who applied to Erciyes University, Medical Faculty, Urology Polyclinic were used; grup 1: healthy men, group 2: varicocele grade 1 and 2, group 3: varicocele grade 3. Semen samples were examined with the method of alkali comet assay, aniline blue and Periodic acid Schiff (PAS) staining. Blood samples taken from the events were assessed plasma Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) enzyme activities and Malondialdehyde (MDA) levels.

According to comet findings; group 2 and group 3 parametres were significantly higher than group 1 ($p < 0,001$). According to histological findings; normal sperm morphology average was %14 in group 1, %6 in group 2 and below %4 in group 3. According to biochemical findings; we observed that decreased CAT, SOD activities and increased in MDA level for group 2 and group 3.

In conclusion, it was determined that there was an increased in DNA damage and MDA level, a decreased in SOD and CAT enzyme activities with the increase of varicocele grade. In our research we showed that varicocele grade 1 and 2 had also significant DNA damage in terms of infertility. The results we obtained foresee detection of DNA damage also can be used as a predictor as well as routine semen and morphological analysis.

Key words: Varicocele grades, male infertility, DNA damage, sperm morphology

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Testisler.....	3
2.1.1 Testisin Embriyolojik Gelişimi.....	3
2.1.2 Testisin Anatomisi.....	4
2.1.3 Testisin Histolojisi.....	5
2.1.3.1 Seminifer Tübüller.....	5
2.1.3.2 Sertoli Hücreleri.....	6
2.1.3.3 İnterstisyel Doku.....	8
2.1.4.Spermatogenez.....	8
2.1.5.Testisin Damarlanması.....	11
2.1.6.Boşaltım Kanalları.....	11
2.1.7.Yardımcı Üreme Bezler.....	11
2.2 Sperm Morfolojisinin Klinik Önemi.....	12
2.2.1 Anormal Sperm Morfolojileri.....	13
2.3.Sperm Hücrelerinde DNA Hasarı.....	15
2.4.Varikosel.....	16
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1 Comet Yöntemiyle Spermde DNA Hasarının Belirlenmesi.....	17
3.2.Enzim Aktivitelerinin Tayini.....	18
3.2.1.Malondialdehit (MDA) Tayini.....	19
3.2.2.Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini.....	19
3.2.3.Katalaz(KAT) Aktivitesi Tayini.....	20

3.3.Anilin Mavisi Boyaması.....	21
3.4.Periyodik Asit Schiff Boyaması.....	21
3.5 İstatiksel Analiz.....	22
4.BULGULAR.....	23
4.1.DNA Hasar Tayini (Comet Assay)	23
4.2.Serumda Biyokimyasal Analizler.....	27
4.2.1.Serumda MDA Düzeyleri.....	28
4.2.2.Serumda KAT Aktivitesi.....	29
4.2.3.Serumda SOD Aktivitesi.....	30
4.3.Sperm Morfoloji Değerlendirilmesi.....	30
4.3.1.Anilin Mavisi Boyaması.....	30
4.3.2.Periyodik Asit Schiff Boyaması.....	35
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
6.KAYNAKLAR.....	42
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	
ETİK KURUL KARARI	

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1 Gruplar arası comet parametrelerinin karşılaştırılması.....	24
Tablo 4.2. Gruplar arası enzim parametrelerinin karşılaştırılması.....	28
Şekil 2.1. Spermatogenez sırasında, spermatogonyumdan spermatozoona kadar devam eden hücresel farklılaşma evreleri.....	10
Şekil 2.2. Sperm baş defektleri-1	14
Şekil 2.3. Sperm baş defektleri-2.....	14
Şekil 2.4. Sperm boyun defektleri.....	14
Şekil 2.5. Sperm kuyruk defektleri.....	15
Şekil 3.1. MDA standartlarından elde edilen grafik.....	19
Şekil 3.2. SOD standartlarından elde edilen grafik.....	20
Şekil 3.3. KAT standartlarından elde edilen grafik.....	21
Şekil 4.1. Gruplar arası L Head değerinin karşılaştırılması.....	24
Şekil 4.2. Gruplar arası L Tail değerinin karşılaştırılması.....	25
Şekil 4.3. Gruplar arası L Comet değerinin karşılaştırılması.....	25
Şekil 4.4. Gruplar arası Tail DNA değerinin karşılaştırılması.....	26
Şekil 4.5. Gruplar arası Head DNA değerinin karşılaştırılması.....	26
Şekil 4.6. Gruplar arası sperm comet görüntüleri A) Grup 1 (Kontrol Grubu) B) Varikozel evre 1 C) Varikozel evre 2 D) Varikozel evre 3 (Etidyum bromid boyama, x100).....	27
Şekil 4.7. Gruplar arası MDA düzeyleri.....	28
Şekil 4.8. Gruplar arası KAT aktiviteleri.....	29
Şekil 4.9. Gruplar arası SOD aktiviteleri.....	30
Şekil 4.10. A) A) Grup 1 (kontrol grubu), normal (anilin mavisi -, boya almamış) sperm B) Grup 2 (varikozel evre 1-2) normal (anilin mavisi -, boya almamış) sperm C) Grup 2 küçük baş form, kondensasyon anomalisi olan (anilin mavisi +, koyu mavi) sperm, * epitel parçaları D) Grup 2 incelmış form, anilin mavisi (+) sperm (Anilin mavisi, x100).....	32

Şekil 4.11. Grup 3 (Varikosel evre 3) sperm hücreleri A) Anormal morfoloji, kondensasyon anomalisi olan sperm hücresi B) Anormal morfolojili, kondensasyon anomalisi olan sperm, * epitel parçaları C) Anormal morfolojili, anilin mavisi (+) sperm, * epitel parçaları D) İncelmiş form, anilin mavisi (+) sperm hücresi (Anilin mavisi, x100).....	33
Şekil 4.12. Hasta gruplarında gözlemlenen anormal morfolojili, kondensasyon anomalisi olan anilin mavisi (+) sperm A - B Varikosel evre 1 C - D Varikosel evre 2 E - F Varikosel evre 3 (Anilin mavisi, x100).....	34
Şekil 4.13. Gruplar arası sperm hücreleri Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyaması, x100.....	35

KISALTMALAR VE SİMGELER

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
Bax	: Apoptozis baskılayıcı genler
Bcl 2	: Apoptozis baskılayıcı genler
CASP	: Comet Assay yazılım projesi
KAT	: Katalaz
DMSO	: Dimetil sulfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EUA	: Avrupa Üroloji Derneği
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
ICSI	: Mikroenjeksiyon
IVF	: In vitro fertilizasyon
KOH	: Potasyum Hidroksit
L Comet	: Comet uzunluğu
L Head	: Baş uzunluğu
L Tail	: Kuyruk uzunluğu
LH	: Luteinizan hormon
M	: Molar
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
ng	: Nanogram

OAT	: Oligoastenoooteratospermi
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PBS	: Fosfat Buffer Salin
p53	: Tumor Supresör Protein
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
S-Fas	: Soluble fas
SCSA	: Sperm Kromatin Yapısı Tayini
SS	: Standart Sapma
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SHBG	: Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TUNEL	: Apoptozis belirleme yöntemi
KO	: Ksantin Oksidaz

1.GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertiliteyle ilgili çalışmalara göre çiftlerin %20-25'inin düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen birinci yılın sonunda çocuk sahibi olamadıkları görülmektedir (1). Bu oran ikinci yılın sonunda %10-15 düzeylerine gerilemektedir. Buna göre infertilite süresinin uzamasıyla çocuk sahibi olma oranlarının azaldığı anlaşılmaktadır. İnfertilite, çiftlerin ruh sağlığını ve sosyal yaşamlarını etkileyen önemli bir sorun olup infertilite sebepleri incelenirken olguların %50'sinde sadece kadın faktörünün, %30'unda sadece erkek faktörünün ve geri kalan %20'lik grupta da hem erkek hem de kadın faktörünün rol oynadığı bilinmektedir (1,2). Erkeklerde infertilite nedenleri araştırılmasında Avrupa Üroloji Derneği (EAU) kılavuzlarında varikoselin erkeklerdeki infertilite etiyolojisindeki oranı % 41.2 olarak belirtilmektedir (3). Literatürdeki başka çalışmalarda da erkekler arasında infertilite sebepleri içerisinde idiyopatik faktörler dışlandığında etiyolojideki en sık nedenin varikosele olduğu anlaşılmaktadır (4).

Subfertil erkeklerde varikoselin spermatogenez üzerine etkisi genellikle düşük sperm miktarı, sperm hareketliliğinde azalma ve anormal sperm morfolojisinde artışla ilişkilendirilmiştir. Varikoselin semen parametreleri ve infertilite üzerine etkisi birçok patofizyolojik mekanizma ile açıklanmıştır. Bu mekanizmalar başlıca; testiküler ısı artışı, venöz basınç artışı, hormonal işlev bozukluğu, epididimal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyon bozuklukları, renal-adrenal reflü, DNA hasarı ve oksidatif stres gibi mekanizmalardır (5). DNA hasarı, son yıllarda spermatogenez ile varikosele ilişkisi ile ilgili araştırmaların yoğunlaştığı bir mekanizmadır. Sperm DNA hasarının infertil erkeklerde yüksek oranda saptandığı ve tedavi sonrası anlamlı düzeylerde iyileşme sağlandığı birçok çalışmada gösterilmiştir (6-7). Varikosele, DNA hasarını temelde iki mekanizma ile yapmaktadır. İlki, varikoselin mitokondriyal inaktivasyona sebep olarak sperm DNA

fragmantasyonunda artışa neden olması, diğeri ise apoptozisi düzenleyen soluble Fas gen düzeyinde azalma ile sperm hücresinin apoptozisinde artış sağlamasıdır (8,9). Güncel literatürde yeni gelişmelere paralel olarak üzerinde en çok çalışılan mekanizma oksidatif streştir. Yapılan güncel çalışmalarda varikoselli hastalarda internal spermatik vende normalde fizyolojik düzeylerde olması gereken antioksidan enzim aktivitesinde artış saptanmıştır (10). Yine varikozel sperm DNA hasarlarının onarılmasında görev yapan DNA polimeraz aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. Yüksek serbest oksijen radikal düzeyleri kromozomal kırıkların artışına, DNA fragmantasyonunda artışa ve bu da akrozom bütünlüğünde bozulmalara neden olarak infertiliteye yol açmaktadır (11-13).

Varikozel olguları değerlendirilirken tıbbi ve üreme öyküsünün alınmasını takiben fizik muayene ve semen analizi yapılması esastır. Fizik muayene bulgularına göre varikozel, evre 1, evre 2 ve evre 3 olmak üzere üç grupta sınıflandırılır (14). Varikozel, infertilitenin cerrahi olarak düzeltililebilir en sık nedenidir. Tedavide genellikle varikozel evre 3 teşhisi konan hastalar için varikoselektomi tercih edilirken, evre 1 ve evre 2 varikoselli hastalara müdahale edilmemektedir. (15).

Çalışmamızın amacı, Comet assay ile sperm DNA hasarını incelemek; malondialdehit (MDA) düzeyini, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) enzim aktivitelerini tayin ederek oksidatif stres düzeyini araştırmak ve sperm morfolojisini inceleyerek farklı varikozel evre'li infertil hastalar ile normal sağlıklı erkeklerin karşılaştırıldığı gruplarda sperm nukleer DNA hasarını araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

Erkek genital sistemi bir çift testis, genital boşaltım yolları (tubuli rekti, rete testis, ductuli efferentes, ductus epididymis, ductus deferens, ductus ejakulatoryus ve üretra), bu yollara açılan yardımcı bezler (vezikula seminalis, prostat, bulboüretral bezler) ve dış genital organ olan penisten oluşur (16).

2.1. TESTİSLER

2.1.1. Testisin Embriyolojik Gelişimi

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti sekonder oositi döleyen sperm türüne bağlı olarak fertilizasyonda belirlenir (17). Testisler vitellus kesesi endoderminden köken alan primordiyal germ hücrelerinden ve ara mezodermin oluşturduğu genital kabartıdan gelişir. Primordiyal germ hücreleri gelişimin üçüncü haftasında allantoise yakın bir yerde, vitellus kesesi duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirir. Ameboid hareketlerle son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler, beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve altıncı haftada genital kıvrımlara tamamen yerleşirler. Böylece henüz farklılaşmamış fetal gonad gebeliğin altıncı haftasında ortaya çıkmış olur (18, 19). Gebeliğin yedinci haftasından önce, her iki cinsin gonadları benzerdir ve farklılaşmamış gonadlar olarak adlandırılırlar. Gonadların erkek ya da dişiliğe farklılaşmaları XX veya XY kromozom karyotipine bağlıdır (17).

Genetik olarak XY olan embriyoda primitif germ kordonları Y kromozomu üzerindeki testis belirleyici faktör etkisiyle gebeliğin yedinci haftasının başında hızla çoğalır. Sonra, kordonlar testis veya meduller kordonları oluşturmak üzere gonadın medulla bölgesini doldurur. Bu kordonlar gonadın hilusunda ince ve daha küçük kordonlara parçalanıp ağ şekline dönüşerek rete testisi oluştururlar. Gelişim ilerledikçe testis kordonları yüzey epiteliyle olan ilişkilerini kaybederler. Bu, testisin üzerinde yer alan fibröz yapıdaki tunika

albuginea sayesinde olur. Kordonlar puberteye kadar kapalı durumdadır. Bu dönemde lümen oluşarak seminifer tübüller belirir. Seminifer tübüller rete testis lümenine bağlanıp sonrasında duktuli efferentes ile devam ederler. Bunlar ise Wolff kanalına dökülerek duktus deferens oluştururlar (20). Leydig hücreleri, 8-18. haftalar arasında interstisyel dokudaki mezenkimal hücrelerin hızlı değişimi sonucu ortaya çıkar. Gebeliğin ortasına gelindiğinde, testisin %50'sini bu hücreler oluştururken doğuma doğru sayıları giderek azalır (21).

Başlangıçta lomber bölgede bulunan testisler, üçüncü fetal aydan itibaren skrotuma doğru inişe başlarlar. Hutson (20) hipotezine göre testisin inişinin iki evresi vardır: İlki transabdominal evredir. Bu evre androjenden bağımsızdır ve iniş Anti-Mülleryan hormon (AMH) etkisiyle olur. Testis karın arka duvarı boyunca inişe geçer; gebeliğin 17. haftasında iç inguinal halka hizasına gelir ve gebeliğin 28. haftasına kadar burada kalır. İkincisi inguinokrotal evre olarak adlandırılır. Testis bu dönemde inguinal kanal yoluyla karın ön duvarını geçerek skrotuma iner. Testis gebeliğin yedinci ayından sonra inguinal kanalı geçmiş ve doğumdan hemen önce de gelişimini tamamlamış halde skrotumdaki yerini alır (21, 22).

2.1.2. Testisin Anatomisi

Erişkin bir erkeğin testisi 4x3-5x3 cm boyutlarında oval şekilli organlardır. Her birinin hacmi 30 ml kadardır. Testisin anterolateral 2/3 bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür. Testis, fibroblastlar ve kollajenden oluşan yoğun bir yapı olan tunika albuginea adı verilen kompakt bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Tunika albugineanın altında nispeten daha gevşek bağ dokusu yapısında, tunika vaskulosa adını alan damarlı bir tabaka yer alır. Tunika albuginea testisin arkasında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Burada, tunika albugineanın iç yüzünden çıkan fibröz septumlar testisi yaklaşık 250 adet, piramit biçimli lobüllere ayırır. Herbir lobülün içinde bir ile dört arasında değişen sayıda kıvrımlı seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller rete testis adı verilen kanal ağına açılırlar. Tunika albugineanın üzerinde peritonun uzantısı olan iki tabakalı tunika vaginalis yer almaktadır. Anteriorda, testise yakın olan ve epididimi çevreleyen kısmına visseral tabaka, daha dışta yer alan kısmına ise parietal tabaka adı verilir. Bunların da dışında sırasıyla, fascia spermatica interna, musculus cremaster, fascia spermatica externa, tunika dartos ve deri yer alır (20,23). Spermatik kordon; duktus

deferens, duktus deferensin arter ve veni, testiküler arter, plexus pampiniformis, plexus deferentialis, processus vaginalis peritonei, musculus cremaster, arteria cremasterica, vena cremasterica, lenf damarları, ilioinguinal sinir ve genitofemoral sinirin genital dallarından oluşur. Tüm bu oluşumlar birbirine gevşek bir bağ dokusuyla bağlanmış ve dıştan kas lifleri ile fascia spermatica externa, fascia cremasterica, fascia spermatica interna adı verilen zarlarla sarılmıştır (20).

2.1.3 Testisin Histolojisi

Testisler, tunika albuginea adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar (septum), testisi lobüllere ayırır. Her bir testis yaklaşık 250 lobül içerir. Bu uzantılar tam değildir ve bölmeler çoğunlukla birbiriyle ilişkilidir. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 arasında değişen seminifer tübüller yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve intersitisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içerir (23). Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgılar (24).

2.1.3.1.Seminifer tübüller

Her testiste yaklaşık 250-1000 adet seminifer tübül bulunur. Her seminifer tübül karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşeli olup, yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 m'dir. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller ya da tubuli recti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanallarının oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anostomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır (24).

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Seminifer epitelde 2 tip

hücre vardır: Sertoli ya da destek hücreleriyle spermatogenezdeki seriyi oluşturan hücrelerdir. Spermatogenik seri hücreleri 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir; işlevleri spermatozoonları üretmektir. Spermatozoon üretimi spermatogenez olarak adlandırılır. Bu süreç, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri içerir ve hücreler sonunda spermatozoonlara farklılaşır; bu aşama spermiyogenez olarak adlandırılır (24).

2.1.3.2. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri saran piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopunda, spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda uzantı nedeniyle, Sertoli hücrelerinin sınırları iyi belirlenemez. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin çok sayıda düz endoplazmik retikulum, az sayıda granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozomlar içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış nükleusunda çok sayıda girintiler, belirgin nükleolus ve az miktarda heterokromatin bulunur (24).

Yan yana bulunan Sertoli hücreleri, hücrenin alt yan yüzeylerinde (bazolateral) engelleyici sıkı ilişkiler ile birbirlerine bağlanarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Spermatogonyumlar, bu bariyerin altında yer alan bazal kompartmanda yerleşmiştir. Spermatogenez sırasında, spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan bazı hücreler bu bağlantı noktalarından bir şekilde geçerek, bariyerin üzerinde yer alan adluminal kompartmana ulaşırlar. Spermatisitler ve spermatidler, bariyerin üzerinde, Sertoli hücrelerinin yan ve üst kenarlarındaki derin girintilerinde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin flagellaları (kuyruklar) geliştikçe, bunlar Sertoli hücrelerinin üst uçlarından çıkan saçaklar halinde görülürler. Sertoli hücreleri aynı zamanda 'gap junction' adı verilen bağlantılar yaparlar. Bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Bu da yukarıda söz edilen seminifer epitel döngüsünün ilişkilerinde önemli olabilir (24).

Sertoli hücrelerinin önemli işlevleri vardır;

1.Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi: Spermatogenik seri hücreleri birbirine stoplazmik köprülerle bağlanmışlardır. Bu hücre ağı, Sertoli hücrelerinin yaygın sitoplazmik dallanmalarıyla

fiziksel olarak desteklenir. Spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar kan-testis bariyeriyle izole edildiği için, bu spermatogenik hücreler besin maddeleri ve metabolitlerin alınıp verilmesinde Sertoli hücrelerine muhtaçtır. Sertoli hücre bariyeri gelişen sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan da korur. Bu bariyer kan-testis bariyeri olarak tanımlanır. Seminifer tübüllerin iç kısmı ile kan arasında bir bariyerin bulunması testiküler sıvıda kandan gelen çok az madde bulunmasına yol açar (24).

2.Fagositoz: Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde atılır.Fagosit edilen bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücresindeki lizozomlar tarafından sindirilir.

3.Sekresyon: Sertoli hücreli sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve spermilerin taşınmasında kullanılan bir sıvı salgılar. Androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimi Sertoli hücreleri tarafından follikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir ve seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiole çevirebilir. Bu hücreler aynı zamanda, adenohipofizden FSH sentezini ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgılar.

4.Anti-Müllerian Hormon (AMH) Üretimi: Müller kanalını baskılayıcı hormon olarak da adlandırılan bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testesteron ise Wolf (mezonefrik) kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar. Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme çağı süresince bölünmezler. Enfeksiyon, kötü beslenme, X ışınlarına maruz kalma gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklı hücrelerdir ve bu zararlı etkilere maruz kaldıklarında sağ kalım oranları spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha yüksektir. Memelilerde spermatozoonlar, büyük olasılıkla, Sertoli hücresinin üst sitoplazmasında bulunan mikrotübüller ve mikroflamentlerin katılımıyla, hücresel hareketler sonucu salınırlar (24).

2.1.3.3. İnterstisyel Doku

Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemlidir. Testislerde seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, kan ve lenf damarlarıyla doldurulmuştur.

Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin geçişine izin verir. İnterstisyel alanda lenf damarlarının oluşturduğu yoğun ağ, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Ergenlikte bir hücre tipi daha işlevsel olarak belirgin hale gelir. Bu, yuvarlak ya da poligonal şekilli, merkezi bir nükleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir. Bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir ve steroid salgılayan hücre özelliklerini gösterir. Bu hücreler sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondrilerde ve düz endoplamik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası iş birliğe bir örnek oluşturur (25).

İnterstisyel hücrelerin hem işlevsellikleri ve hem de sayıları hormonal uyarılara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında plasentadan üretilen gonadotropik hormon, anne kanından fetüse geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Bu hormonların varlığı, erkek genital organlarının embriyonik farklılaşması için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 4. ayında kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar ve sonra testosteron sentezinde bir azalmayla gerilerler. Daha sonra gebeliğin geri kalan süresi boyunca ve hipofizden salgılanan LH (luteinizan hormon) uyarısı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları puberte öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (25,26).

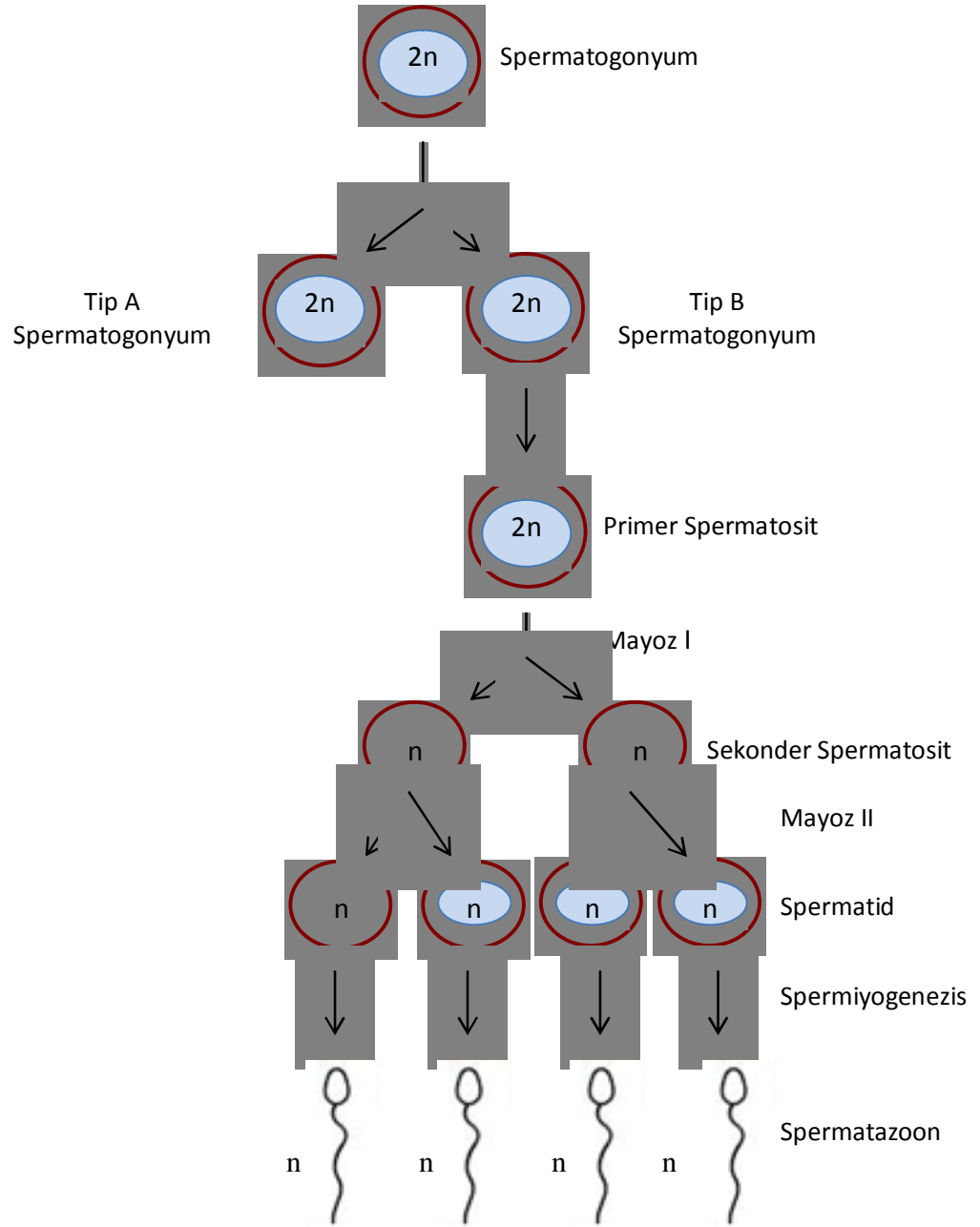
2.1.4 Spermatogenez

Spermatogenez, spermatozoon üretim sürecidir. Süreç ilkel primitif bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyum, 12 µm çapında, bazal laminanın hemen üzerinde yer alan küçük yuvarlak bir hücredir. Cinsel olgunluk çağında spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir: A tipi spermatogonyumlar olarak da adlandırılan kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da süregiden mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluştururlar. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncü (progenitör) hücrelerdir (27).

Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) ve 4N DNA içerir (N haploid kromozom sayısını [insanlarda 23 kromozom] ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını gösterir). Oluşmalarından hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamada görülecektir. Primer spermatositler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir ve nükleuslarında kangal oluşturma sürecinin değişik safhalarında kromozomların bulunmasıyla tanınırlar (16).

Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatositler olarak adlandırılan ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Kromozomlardaki bu sayıya azalmaya (46'dan 23'e) her hücredeki DNA miktarlarının eksilmesi (4N'den 2N'e) eşlik eder. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur. Çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalır ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye girerler. Sekonder spermatositlerin bölünmesi 23 kromozom içeren iki hücrenin yani spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır. Spermatositlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı (DNA sentezi) görülmediği için, ikinci bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (N) hücreler meydana gelir. Böylece mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid sayıda kromozom içeren hücreler oluşur. Döllenmeyle bunlar normal diploid sayıya (2N) dönerler (16,27).

Spermiyogenez spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoona dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler, küçük boyutları (7-8 μ m çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tübüllerde lümen yakınında (jokstaluminal) yerleşmişlerdir. Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, nükleus yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum gelişmesini ve sitoplazmanın çoğunun kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Sonuçta, daha sonra seminifer tübül lümenine salınan olgun spermatozoon oluşur (Şekil 2.1) (16).



Sekil 2.1. Spermatogenez sırasında, spermatogoniumdan spermatozoona kadar devam eden hücresel farklılaşma evreleri.

2.1.5. Testisin Damarlanması

Testisler arterlerini aorta abdominalisten alırlar. Arteria testikularis testisin arka kenarından bezin içine sokulur ve mediastinum testiste birçok dallar verir. Bu dallar septula testisleri izleyerek bezin her tarafına dağılırlar. Testisler hipoksiye karşı çok duyarlıdırlar ve bu nedenle kansız kaldıklarında ciddi hasarlar meydana gelebilir. Venler duktus deferensin etrafında plexus pampiniformis denilen bir ven ağı meydana getirirler (17). Bu ağdan önce iki, sonra birer tane vena testikularis meydana gelir. Vena testikularis dekstra, vena kava inferior'a; vena testikularis sinistra, vena renalis'e dökülür. Plexus pampiniformisi yapan venlerin genişlemesi varikozel olarak tanımlanan hastalığı meydana getirir (23,28).

2.1.6 Boşaltım Kanalları

Testis içi boşaltım yollarından tubuli seminiferi rekti (düz tohum borucukları) kısa ve düz borulardır. Seminifer tübüllerini rete testise bağlar (29). Rete testis mediastinumda kübik epitelle döşeli labirent şekilli kanallar halinde gözlenir. Kübik epitel hücreleri mikrovillus ve tek bir flagellum içerir (29).

Duktuli efferentes 10-20 adet kısa borucuktur. Rete testisi duktus epididimise bağlar. Henüz hareket yeteneği kazanmamış olan spermatozoonların iletilmesine yardımcı olurlar (30). Duktus epididimis oldukça kıvrıntılı ve uzun bir borudur. Testisin arka kısmında yerleşmiştir. Baş, gövde ve kuyruk bölümü vardır. Duktus deferensle devam eder. Spermatozoonların olgunlaştığı ve depolandığı bölümdür. Testisten gelen sıvının % 90'ı duktuli efferentes ve duktus epididimisten geri emilir. Duktus deferens spermatik kordon yapısına katılır, stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ve altındaki gevşek fibroelastik bağ dokusu lümenine katlantılar yapar, duktus deferens üreteri çaprazladıktan sonra iğ seklinde genişler ve ampulla kısmını yapar. Duktus ejakulatoryus kısa ve düz bir kanaldır. Prostat içinde seyreder ve prostatik üretraya açılır (30).

2.1.7 Yardımcı Üreme Bezler

Vesikula seminalisler kıvrıntılı uzunlamasına divertiküllerle lümeni labirent şeklinde izlenen bir çift bezdir. İnsanda ejakulatın % 70'lik bölümü bu bezin salgısıdır. Salgı, visköz ve sarımsıdır, semenin rengini verir. Bol fruktoz içerir. Fruktoz spermatozoonlar için besin kaynağıdır (31).

Prostat bezi erkek üreme sisteminin en büyük ve tek olan bezidir. Bileşik tubüloalveolar bir bezdir. Mesanenin hemen altında üretrayı çevreler. Bez salgısını kendi boşaltım kanallarıyla prostatik üretraya boşaltır. Prostat salgısı asit fosfataz, lipidler, proteolitik enzim, fibrinolizin ve sitrik asitten çok zengindir (26,29). Ayrıca çinko, fosfolipid, spermin ve fosfataz da salgılar (28).

Bulboüretral bezler (Cowper bezleri), 3-5 µm çapında küçük bileşik tubulo-alveolar bezlerdir. Mukus salgısı ile üretra lümeni için kayganlaştırıcı işlev görür (29,30) (Şekil.2.1).

2.2. Sperm Morfolojisinin Klinik Önemi

Günümüzde infertil çiftlerin çocuk sahibi olabilmesi için kullanılan tekniklere her gün yenileri eklenmekte ve başarıyla uygulanmaktadır. Klasik *in vitro* fertilizasyon yöntemlerinde başarıyı etkileyen faktörler araştırıldığında, spermin morfolojik özelliklerinin fertilizasyon üzerinde direkt etkili olduğu saptanmıştır. Özel bir boyama sonrası sperm morfoloji özellikleri incelenerek sperm örneğinin fertilite kapasitesi belirlenir (32). İlk kez 1992 yılında Kruger ve Menkveld isimli araştırmacının dikkat çektiği Tygerberg kriterleri, spermin *in vitro* ortamdaki fertilizasyon potansiyelini belirlemede en sıklıkla başvuru alan değerlendirme haline gelmiştir (33,34). Semen analizinde değerlendirilen parametreler içerisinde spermin dölleme potansiyeli konusunda en önemli bilgiyi sperm hareketliliği ve sperm morfolojisi vermektedir. Kruger'in kesin kriterleri, morfoloji konusunda çok daha detaylı bir inceleme imkânı sağlaması nedeniyle en çok kabul gören metottur. Bu kriterlere göre yapılan incelemede spermin baş, boyun ve kuyruk bölgesine ait toplam 38 farklı başlıkta anomali ayrı ayrı değerlendirilmektedir (33). Bu değerlendirme sonucunda %4'ün altında normal morfolojili sperm gözlenmesi durumu "teratozoospermi" olarak tanımlanır. Bir başka deyişle Kruger'e göre yapılan sınıflamada %4'ün altında normal formların bulunması durumunda, anomalilerin alt dağılımına bakılmaktadır (34).

Kruger kriterlerine göre şiddetli sperm baş anomalilerinin %80'den fazla görülmesi önemli olarak kabul edilmektedir. Klasik *in-vitro* fertilizasyon (IVF) yöntemlerinde başarıyı etkileyen faktörler araştırıldığında, spermin morfolojik özelliklerinin fertilizasyon üzerinde direkt etkili olduğu saptanmıştır. IVF defertilizasyon oranının ve gelişen embriyo sayısının yüksek oluşu sonucu doğrudan etkilemesi açısından son derece önemlidir (33). Bu bulgular

Kruger'in kesin kriterlerinin kullanıldığı geniş kapsamlı çalışmaların sonuçlarıdır. Sperm morfolojisinin kesin kriterlerle değerlendirilmesi fertilizasyon oranının önceden tahmin edilerek önlem alınmasına ve hatta çiftin direkt olarak mikro enjeksiyon (ICSI) programına yönlendirilmesine neden olabilir. Benzer biçimde, sperm morfolojisinin kesin kriterlerle değerlendirilmesi sperm fonksiyon testleriyle de önceden tahmin edilen sonuçları vermektedir (32).

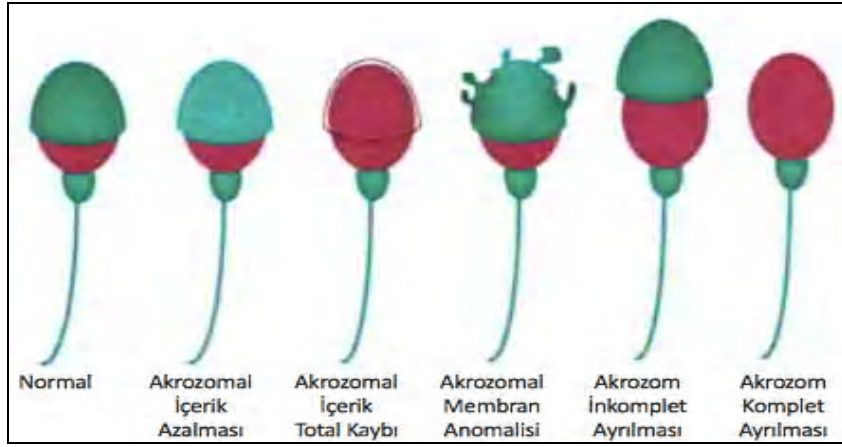
2.2.1 Anormal sperm morfolojileri

Mikroskop altında incelemelerde, ideal bir spermatozoonun başı oval, 4-5 µm uzunlukta, 2,5-3,5 µm genişlikte düzgün konturlu, iyi sınırlanmış olmalıdır. Spermatozoonun çekirdeği yoğun görünümlü (heterokromatinli) olmalı ve baş bölgesini doldurmalıdır. Akrozom (soluk ön bölge) baş alanının % 40-70'ini kaplamalıdır. Kuyruk başın tabanında, simetrik olarak yerleşmeli, halkasız, çentiksiz, kendi üzerine bükülmemiş olmalıdır (35). Alt dağılımda sperm başına ait anomaliler şiddetli ve hafif olarak ayrılmaktadır.

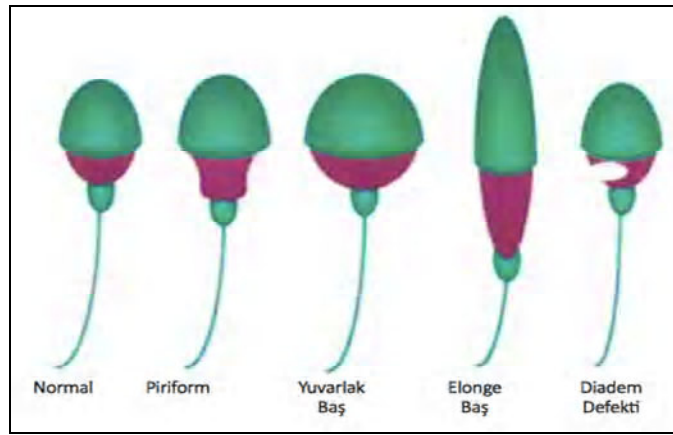
Baş: Büyük, küçük, incelmış (elonge), armut (piriform) şekilli, çift başlı, amorf, nokta baş (pinhead), vakuollü, büyük akrozomlu (baş hacminin %70'inden daha büyük bir alanı kaplaması), küçük akrozomlu (baş hacminin %40'ından daha küçük bir alanı kaplaması) olabilir (Şekil 2.2 ve 2.3).

Boyun: Kırık boyun (baş ile arasında 90 dereceden az açı olması), sitoplazmik atık (droplet) içerebilir (Şekil 2.4).

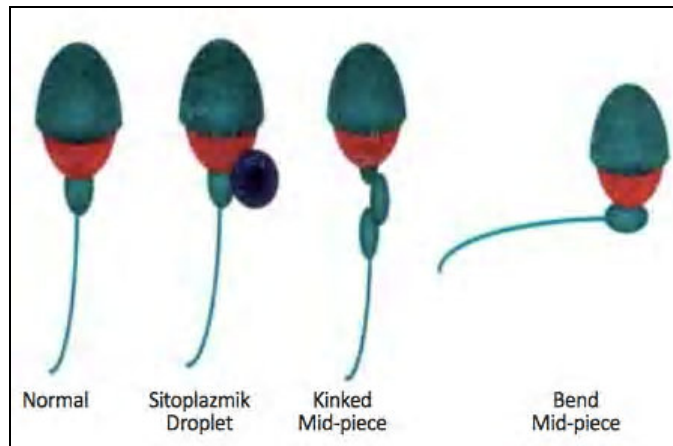
Kuyruk: Kısa, kalın, çift kuyruk, kıvrık kuyruk, halka kuyruk, dag defekti (kuyruğun baş etrafında daire çizmesi) veya bunların kombinasyonundan oluşabilir (Şekil 2.5) (35-37).



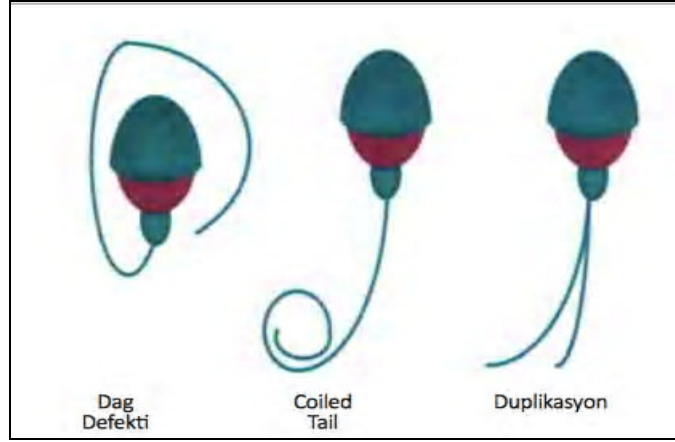
Şekil 2.2. Sperm baş defektleri-1 (37).



Şekil 2.3. Sperm baş defektleri-2 (37).



Şekil 2.4. Sperm boyun defektleri (37).



Şekil 2.5. Sperm kuyruk defektleri (37).

2.3. Sperm Hücrelerinde DNA Hasarı

Son yıllarda erkek infertilitesi alanında olağanüstü ilerlemeler elde edilmiştir. Rutin semen analizi üreme kapasitesini göstermekte zayıf bir prediktördür. Birçok çalışmada sperm morfolojisi değerlendirilmesinin infertilite sebebini belirlemede yetersiz olduğu bildirilmiştir (38). Sperm DNA hasarlarının oluşumunda başlıca üç önemli mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan ilki matür (olgun) spermde anormal kromatin paketlenmesi olup, yapılan çalışmalarda sperm DNA hasarlarının çoğunun spermde anormal kromatin paketlenmesine bağlı olduğu gösterilmiştir (39-41). Sperm DNA hasarının görülmesine neden olan diğer mekanizma, spermatogenez sırasında hasarlı germ hücresinin genetik havuzdan fonksiyonel olarak elimine olabildiği programlı hücre ölümü olan apoptozisten, hasarlı DNA'ya sahip spermatozoonların kaçmasıdır (42-44). Üçüncü mekanizma ise kötü semen kalitesine eşlik eden, özellikle azalmış protaminasyon ve disülfid bağ yapımı varlığında reaktif oksijen türevlerinin aşırı üretilmesinin neden olduğu sperm DNA hasarıdır (45).

Sperm DNA fragmentasyon testleri ile fertil erkeklerin infertil olanlardan ayırtedilebileceğini gösteren birçok kanıt mevcuttur. DNA hasarı, intrinsik (örneğin protamin eksikliği) veya ekstrinsik (örneğin sigara içilmesi, infeksiyonlar, testiküler hipertermi, varikozel) sebeplerle olabilir. Eşlerinde DNA hasarı yüksek olan çiftlerde doğal gebelik potansiyeli daha düşüktür. Her ne kadar varikozel onarımının spontan gebelik oranlarını iyileştirdiğine dair net kanıtlar bulunmasa da, varikoselektomi sperm

parametrelerini (sayı, total ve progresif motilite) düzeltmekte, sperm DNA hasarını ve seminal oksidatif stresi azaltmakta ve sperm ultramorfolojisini iyileştirmektedir. Bu konuda yakın gelecekte daha iyi prediktif değeri olan yöntemlerin geliştirilmesi beklenmektedir (38).

2.4 Varikosel

Varikosel, testiküler venlerdeki geri akımla karakterize, testiküler venlerin ve pampiniform pleksusun anormal tıkanma sonucu genişleyip kıvrılmasıdır (46). Varikoselin oluşum sebebi ile ilgili olarak kesin olmamakla birlikte, muhtemelen venöz kapakların yetersizliği veya yokluğu, kollateral damar veya inferior vena kava ile sol renal ven arasında artmış basınç gradientine bağlı olduğu düşünülmektedir (47,48). Primer varikosel, internal spermatik vendeki kapakçıkların doğumsal yetersizliği nedeniyle kanın spermatik korddan pampiniform pleksusa geri akımıyla oluşur. Sekonder varikosel ise spermatik venler üzerinde basınç artısına neden olan karın içi ve periton arkası patolojilerin birlikteliğinde karşımıza çıkar. Primer varikosel tüm popülasyonun %15'ini, infertilite kliniklerine başvuran erkeklerin %21-39'unu oluşturmakta olup en sık tedavi edilebilen erkek infertilite nedenidir (49,50). Varikosel genellikle tek taraflıdır ve en sık sol tarafta görülür. Çift taraflı da olabilir. Varikosel, testis yapısına zarar verici bir etki yapar ve testiste yapısal küçülme ve işlevsel zayıflama meydana gelir (51). Varikosel, sperm yapısını, sayısını, hareketliliğini olumsuz etkileyebilir. Her ikisi de farklı etki gösterebilmektedir. Bazen tüm sperm parametrelerini etkileyebileceği gibi, sadece sayı, sadece şekil veya sadece hareket bozukluğuna yol açabilmektedir. Bazı durumlarda ise, varikosel olmasına rağmen sperm üretimi hiç etkilenmeden tamamen normal devam edebilmektedir (52).

Varikosel fizik muayene bulgularına göre 1970 yılında Dubin ve Amelar tarafından yapılan ve bugün bile kullanılan şekilde sınıflandırılır (14). Buna göre;

Evre 1. Sadece val salva manevrası ile palpe edilen varikosel.

Evre 2. Val salva olmaksızın dinlenme sırasında ya da normal solunumla palpe edilen varikosel.

Evre 3. Dinlenme anında ya da normal solunumla palpe etmeye gerek olmadan gözle görülebilen varikosel (14).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, TYL-2013-4598 no'lu proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir ve Erciyes üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır.

Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji polikliniğine başvuran kasık ağrısı, infertilite, testislerde şişme gibi şikayetlerle gelen ve tetkikler sonucu varikozel tanısı konan 40 hasta ve kontrol grubu olarak değerlendirilmek üzere sağlıklı kabul edilen 20 hastanın sperm örnekleri üzerinde yapılmıştır. Çalışma 3 gruba bölünerek değerlendirildi. Grup 1 sağlıklı erkek (n=20), grup 2 varikozel evre 1 ve varikozel evre 2 tanısı almış erkekler (n=20), grup 3 varikozel evre 3 tanısı almış erkekler (n=20) şeklinde belirlendi. Üç günlük cinsel perhizle gelen hastalardan semen örnekleri toplandı. Örneklerin toplanmasında steril ve geniş ağızlı plastik kaplar kullanıldı. Örnekler 37°C'de etüvde 1 saat inkübe edilerek likefiye olması sağlandı. Semen likefiye olduktan sonra sayı, motilite, pH, morfoloji ve DNA hasarı yönünden incelenmek üzere ayrıldı. Aynı hastalardan biyokimya tüplerine kan örnekleri alınarak -80°C'de saklamak koşuluyla, biyokimyasal analizlerin yapılması için bekletildi.

3.1 Comet Yöntemiyle Spermde DNA Hasarının Belirlenmesi

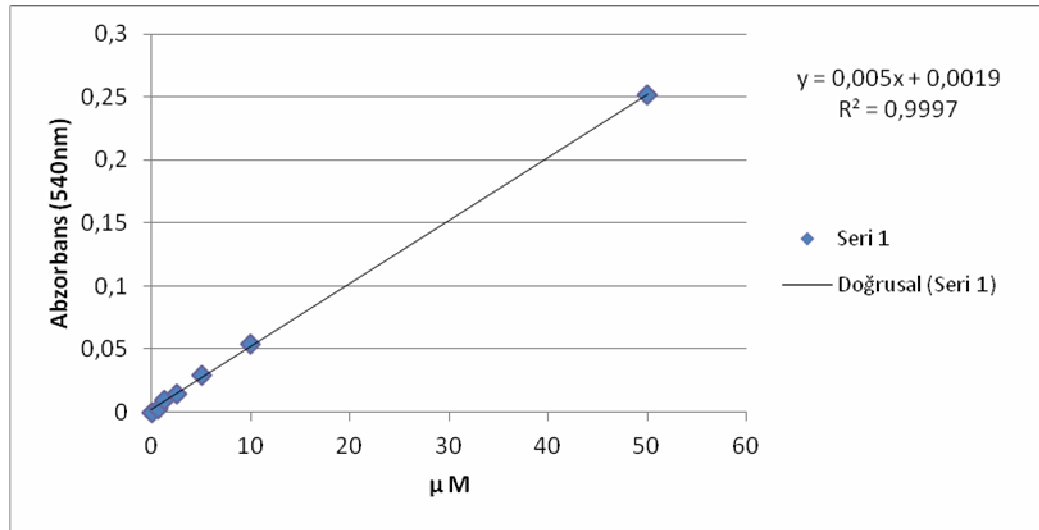
Comet yöntemi, alkali pH da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüke sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı şekilde göç etmeleri esasına dayanır. Mikroskop lamı üzerindeki agaroz jel içine gömülen hücreler, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süperkoil DNA'nın serbestleşmesi için lizis işlemine tabi tutulur. Alkali ortamda süperkoil yapının gevşeyerek açılması ve kırıkların ortaya çıkması sağlandıktan sonra uygulanan

elektroforezde kırılmış DNA zincirleri anoda doğru göçerek bir kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur. Kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreler belirlenerek hasar boyutu hesaplanır. Kuyruktaki % DNA floresansı, DNA zincir kırığı sıklığı ile doğru orantılıdır.

Dilüe edilmiş semen örnekleri +4°C’de de 10 dakika 300 g de santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve geriye kalan sperm hücreleri fosfat buffer salin (PBS) ile yıkandı. Spermde DNA hasarı, yüksek alkali şartlarda tek hücre jel elektroforez (comet) kullanılarak araştırıldı. Kısaca, her bir mikroskop lamı PBS de hazırlanmış % 1’lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, ilk katın üstüne 37°C’de % 0,7’lik düşük erime noktalı agarozun 100 ml ile 10 ml hücre süspansiyonu karıştırıldı ve birinci katın üzerine yayıldı. Lamalar +4°C’de buz aküsünün üzerinde 5 dakika katılaşmaya bırakıldı. Lameller lamlardan kaldırıldı, taze hazırlanmış soğuk lizis çözeltisinde (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100, %10 DMSO ve 40 mM dithiothreitol, pH:10) 1 saat +4°C’de lize edildi. Daha sonra lizis çözeltisine 100 mg/ml proteinase K (Sigma) eklenerek, lamalar 37°C’de bir gece inkübe edildi. Lamalar lizis çözeltisinden alındı, yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH: 13) ile dolduruldu ve lamalar yerleştirildi, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dakika bekletildi. 8°C’de 12 V-250 mA’ de 20 dakika elektroforez uygulandı. Daha sonra lamalar alkali iyon ve deterjanların uzaklaştırılması için nötralizasyon çözeltisi (0.4 M Tris, pH 7.5) ile yıkandı. Nötralizasyondan sonra 50 ml etidyum bromid (1 mg/ml) ile boyandı ve lamelle kapatıldı. Bütün işlemler DNA hasarını önlemek için karanlıkta uygulandı. Görüntüler floresan mikroskop (Olympus, BX51, Japan) kullanılarak 100X büyütmeyle çekildi. Rastgele seçilmiş 100 hücre görüntüsü Comet Assay Software Project (CASP-1.2.2, Windows 2010) ile analiz edildi. Hasar sperm başından göç etmiş, comete neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi, kuyruklu hasarlı, kuyuksuz hasar görmemiş olarak düşünüldü.

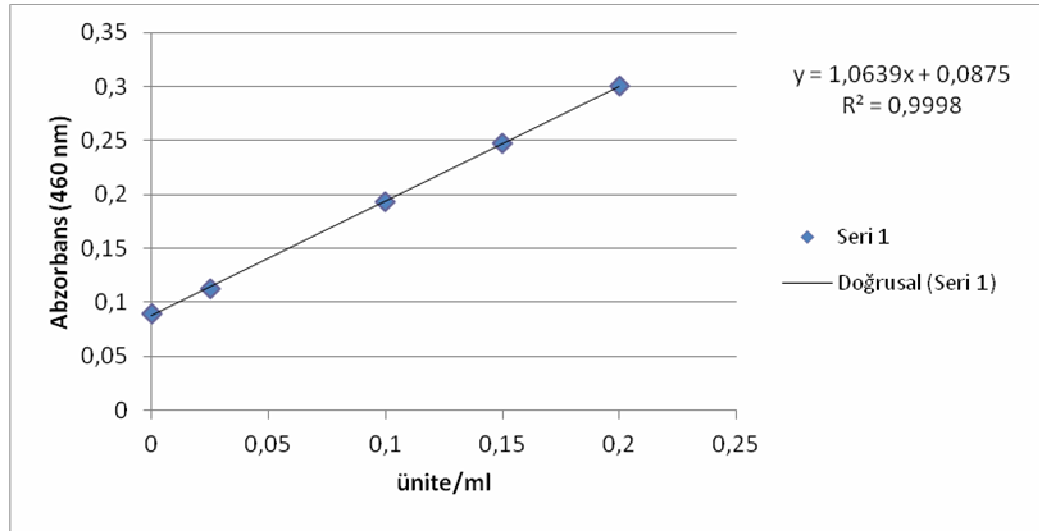
3.2 Enzim Aktivitelerinin Tayini: Biyokimyasal analizler için tüm olgulardan EDTA’lı tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edilerek -80°C’de çalışma gününe kadar saklandı. Tüm ölçümler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D’ da yapıldı.

3.2.1 Malondialdehit (MDA) Tayini: Standartlar CAYMAN Tbars Assay kit protokolünde belirtildiği gibi hazırlandı. Kan örneklerinin plazma kısımları cam tüplere alınarak numaralandırıldı. Ayrıca 8 cam tüp standartlar için numaralandırılarak hazırlandı. Her bir tübe 100 µl örnek ya da standart ardından Tiyobarbitürik asit-sodyum dodesil sülfat (TBA-SDS) solüsyonu eklenerek vortekslendi. Üzerlerine 4 ml renkli reaktif eklenerek tüpler, bir saatliğine kaynayan suda bekletildi. Bir saat sonunda reaksiyonun durdurulması için buz üzerinde 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler, 10 dakika 1600 g'de +4°C'de santrifüj edildi ve ardından her bir kuyucukda 150 µl olacak şekilde pipetlendi. 540 nm dalga boyunda abzorban ölçümleri yapılarak değerler kaydedildi (Şekil 3.1).



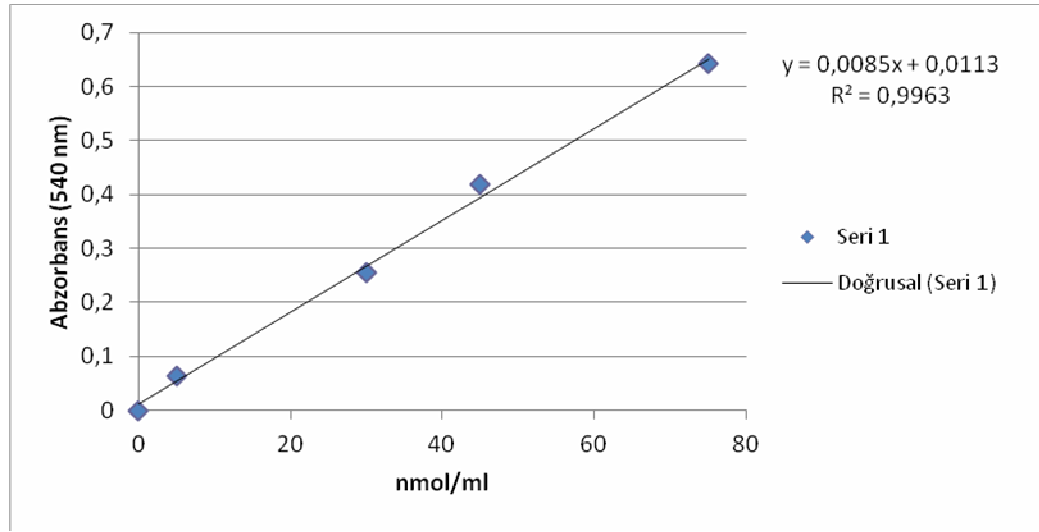
Şekil 3.1. MDA standartlarından elde edilen grafik.

3.2.2 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Tayini: Standartlar CAYMAN Süperoksit dismutaz kit protokolünde belirtildiği gibi hazırlandı. Her bir kuyucuğa sırasıyla, 10 µl örnek ya da standart, 200 µl dilüe edilmiş Radikal detector son olarakda 20 µl dilüe edilmiş Ksantin oksidaz (KO) eklenerek reaksiyonun başlaması sağlandı ve 20 dakika çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübasyon için bekletildi. 460 nm dalga boyunda plate reader ile abzorban değerleri ölçüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. SOD standartlarından elde edilen grafik.

3.2.3 Katalaz (KAT) Aktivitesi Tayini: Standartlar ve pozitif kontrol CAYMAN Katalaz kit protokolünde belirtildiği gibi hazırlandı. Her bir kuyucuğa 20 µl örnek, 30 µl metanol ve 100 µl dilüe edilmiş assay buffer eklendi. Bütün kuyucuklara hidrojen peroksit (H_2O_2) eklenerek reaksiyonun başlaması sağlandı. 20 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için 30 µl potasyum hidroksit (KOH) eklendi ve ardından 30 µl katalaz purpald her bir kuyucuğa eklenerek, 10 dakika inkübasyon için oda sıcaklığında bekletildi. 10 µl katalaz potasyum periodat eklendi ve 5 dakika çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. 540 nm dalga boyunda plate reader ile absorbans değerleri ölçüldü (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. KAT standartlarından elde edilen grafik.

3.3 Anilin Mavisi boyaması

Dilüe edilmiş semen örnekleri +4°C’de 10 dakika 300 g’de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan kısım PBS ile yıkandı. Yıkanan örneklerin her birinden 5 µl lama damlatılarak yayma preparatlar hazırlandı ve havada kurutuldu. Her bir preparat PBS içerisinde dilüe edilmiş %3 yoğunlukta gluteraldehit ile tespit edildikten sonra havada kurutuldu. Ardından 5 dakika %5 aköz anilin mavisi solüsyonu (pH=3.5) ile boyandı. Her lamda 100 sperm hücresi ışık mikroskopunda x100 büyütmede değerlendirildi. Koyu mavi boyanmış sperm nükleusları anilin mavisi (+), boya almamış spermler anilin mavisi (-) olarak değerlendirildi.

3.4 Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyaması: Dilüe edilmiş semen örnekleri +4°C’de 300 g’de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan kısım PBS ile yıkandı. Yıkanan örneklerin her birinden 5 µl lama damlatılarak yayma preparatlar hazırlandı ve havada kurutuldu. Her bir preparat PBS içerisinde dilüe edilmiş %3 yoğunlukta gluteraldehit ile tespit edildikten sonra havada kurutuldu. Ardından 5 dakika periyodik asit ile muamele edildi. Preparatlar distile suda yıkandıktan sonra Schiff çözeltisinde 15 dakika bekletildi ardından çeşme suyunda yıkanarak 8 dakika hematoksilin ile boyandı. Çeşme suyunda yıkandıktan sonra havada kurutuldu. Her lamda 100 sperm hücresi ışık mikroskopunda x100 büyütmede değerlendirildi.

3.5 İstatiksel Analizler: Veriler IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (Armonk, New York, ABD: IBM Corp.) istatistik paket programında değerlendirildi. Özet istatistik olarak birim sayısı (n), yüzde (%), ortalama $\pm$ standart sapma ($\bar{x} \pm ss$), medyan, birinci ve üçüncü çeyreklik [$Medyan(Q_1-Q_3)$] değerleri verildi. Sayısal değişkenlerin normal dağılımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar normal dağılım gösteren değişkenlerde Tek Yönlü Varyans Analizi, fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırmaları ise Tukey testi ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde gruplar arası karşılaştırmalar Kruskal-Wallis Analizi, fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırmaları ise nonparametrik Tukey testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1 DNA Hasar Tayini (Comet Assay)

Yapılan çalışmada, varikozel olgularında sperm hücresi DNA'sında meydana gelen tek ve çift iplik kırılmalarını belirlemek için alkali comet tekniği kullanıldı. Baş uzunluğu (length head), kuyruk uzunluğu (length tail), comet uzunluğu (length comet), başta % DNA (head DNA) ve kuyrukta % DNA (tail DNA) parametreleri CASP (Comet Assay Software Project-1.2.2) kullanılarak analiz edildi. Hasar, hücre başından göç etmiş comete neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi. Kuyruk uzunluğu, baş ve kuyruktaki floresans yüzdesi, kuyruk momenti gibi çeşitli parametreler belirlenerek hasar boyutu hesaplandı. Kuyruktaki % DNA floresansı, DNA zincir kırığı sıklığı ile doğru orantılı olduğu kabul edildi (Şekil 4.6).

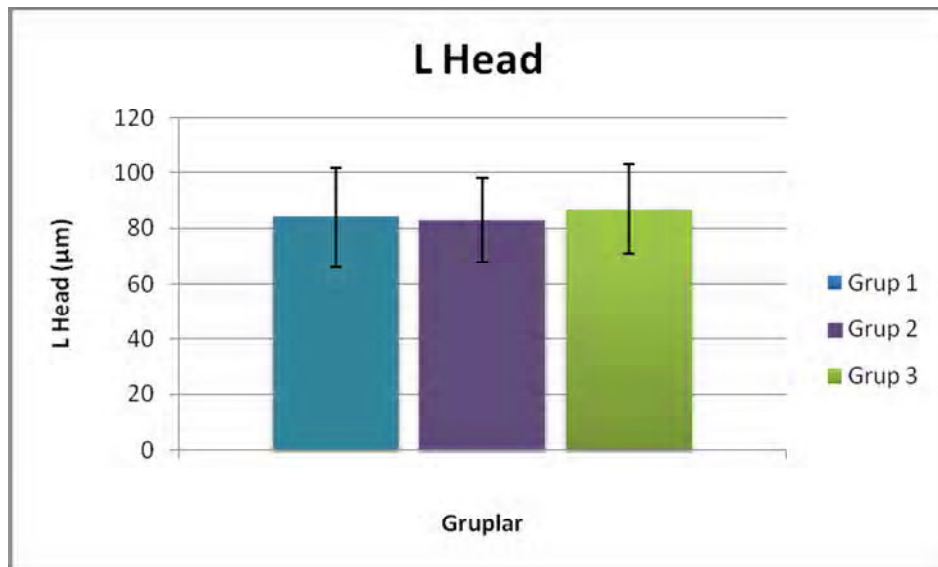
Varikoselin bütün evrelerinde grup 1'e göre comet parametrelerinde (L head, L Tail, L comet, tail DNA) artış gözlemlendi ve gruplar arası comet parametreleri değerlendirildiğinde en fazla artış varikozel evre 3 olarak tespit edildi.

Grup 1, grup 2 ve grup 3 ile karşılaştırıldığında; grup 2 ve grup 3 comet parametrelerinde grup 1'e göre artış gözlemlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Grup 2 ve grup 3 kendi aralarında karşılaştırıldığında grup 3 comet parametrelerinde grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,001$) (Tablo 4.1).

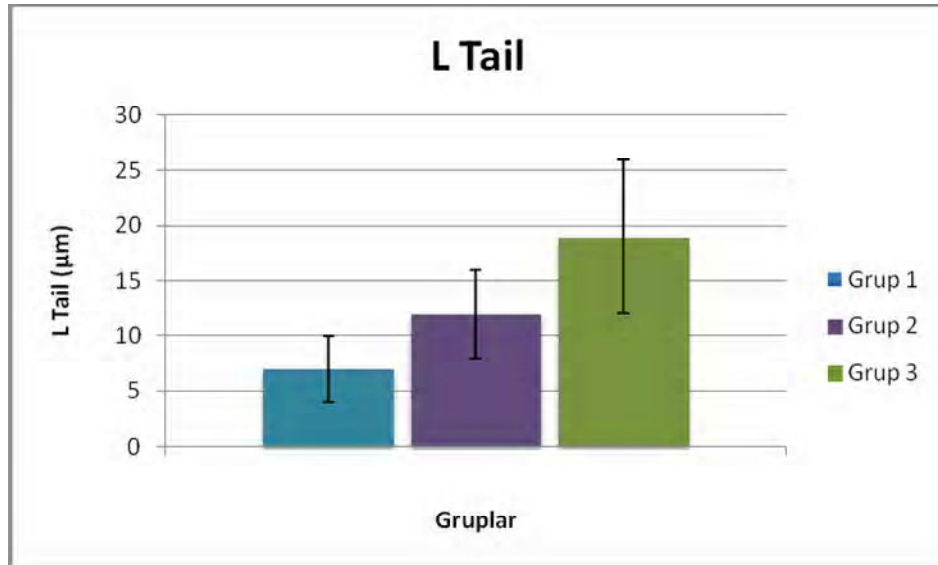
Tablo 4.1 Gruplar arası comet parametrelerinin karşılaştırılması.

Gruplar	L Head μm Ortalama $\pm$ SS	L Tail μm Ortalama $\pm$ SS	L Comet μm Ortalama $\pm$ SS	Head DNA (%) Ortalama $\pm$ SS	Tail DNA (%) Ortalama $\pm$ SS
Grup 1 (n=20)	84 $\pm$ 18	7 $\pm$ 3	91 $\pm$ 18	95 $\pm$ 3	4 $\pm$ 1
Grup 2 (n=20)	83 $\pm$ 15	12 $\pm$ 4	95 $\pm$ 16	90 $\pm$ 5	9 $\pm$ 4
Grup 3 (n=20)	87 $\pm$ 16	19 $\pm$ 7	106 $\pm$ 17	78 $\pm$ 8	22 $\pm$ 8
p	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

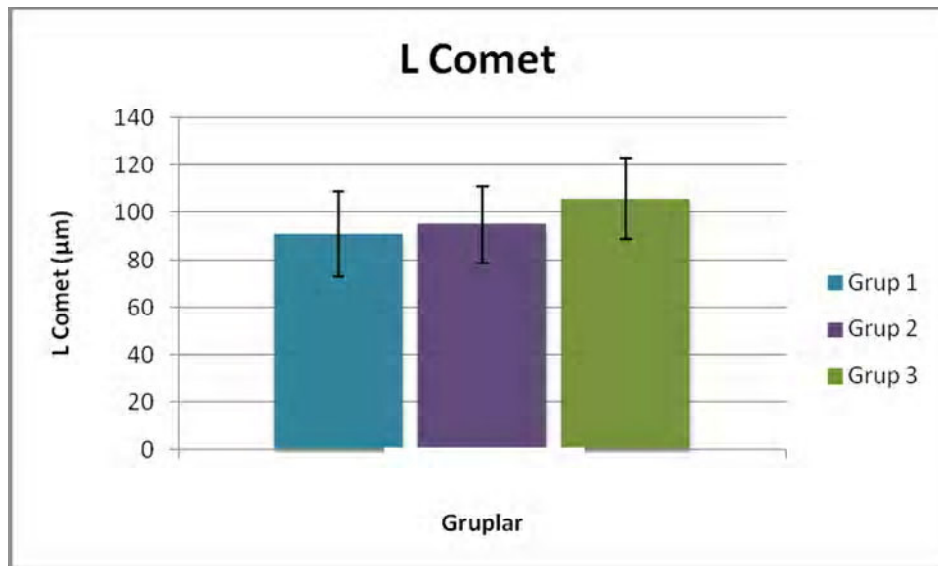
L Head değeri, gruplar arası karşılaştırıldığında grup 3 L Head değeri, istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde diğer gruplara göre daha yüksekti ($p<0,001$). Grup 1 ve grup 2 karşılaştırıldığında aralarında sayısal bir fark olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,348$) (Tablo 4.1) (Şekil 4.1).

**Şekil 4.1.** Gruplar arası L Head değerinin karşılaştırılması.

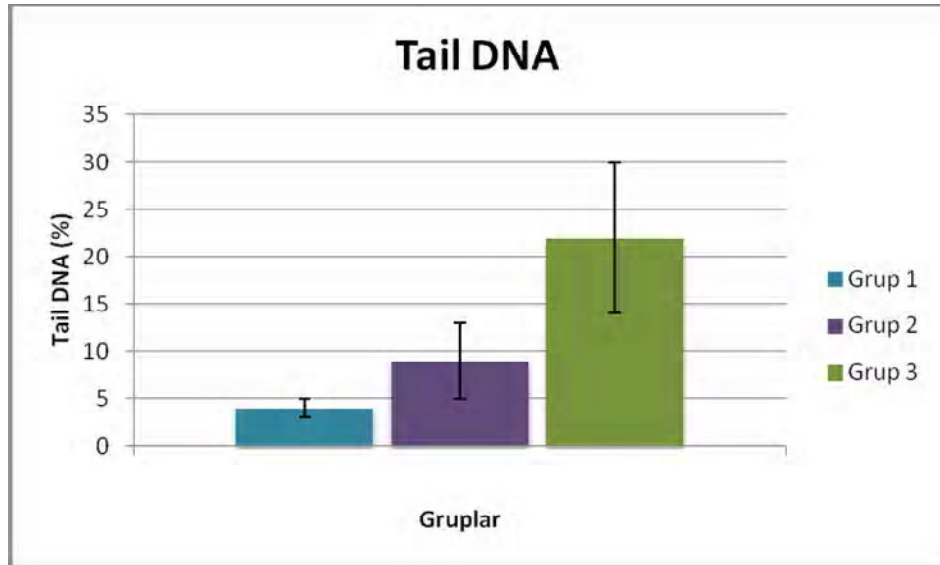
Gruplar arası L Tail (Şekil 4.2), L Comet (Şekil 4.3), Tail DNA (Şekil 4.4) değerleri karşılaştırıldığında grup 1’de en düşük, grup 3’te en yüksek olarak değerlendirildi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$) (Tablo 4.1).



Şekil 4.2. Gruplar arası L Tail değerinin karşılaştırılması.

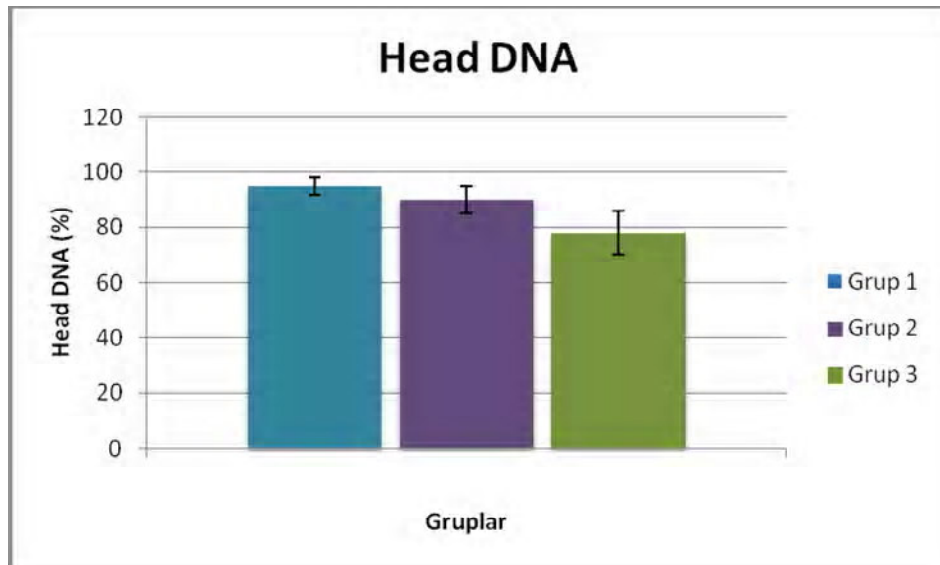


Şekil 4.3. Gruplar arası L Comet değerinin karşılaştırılması.

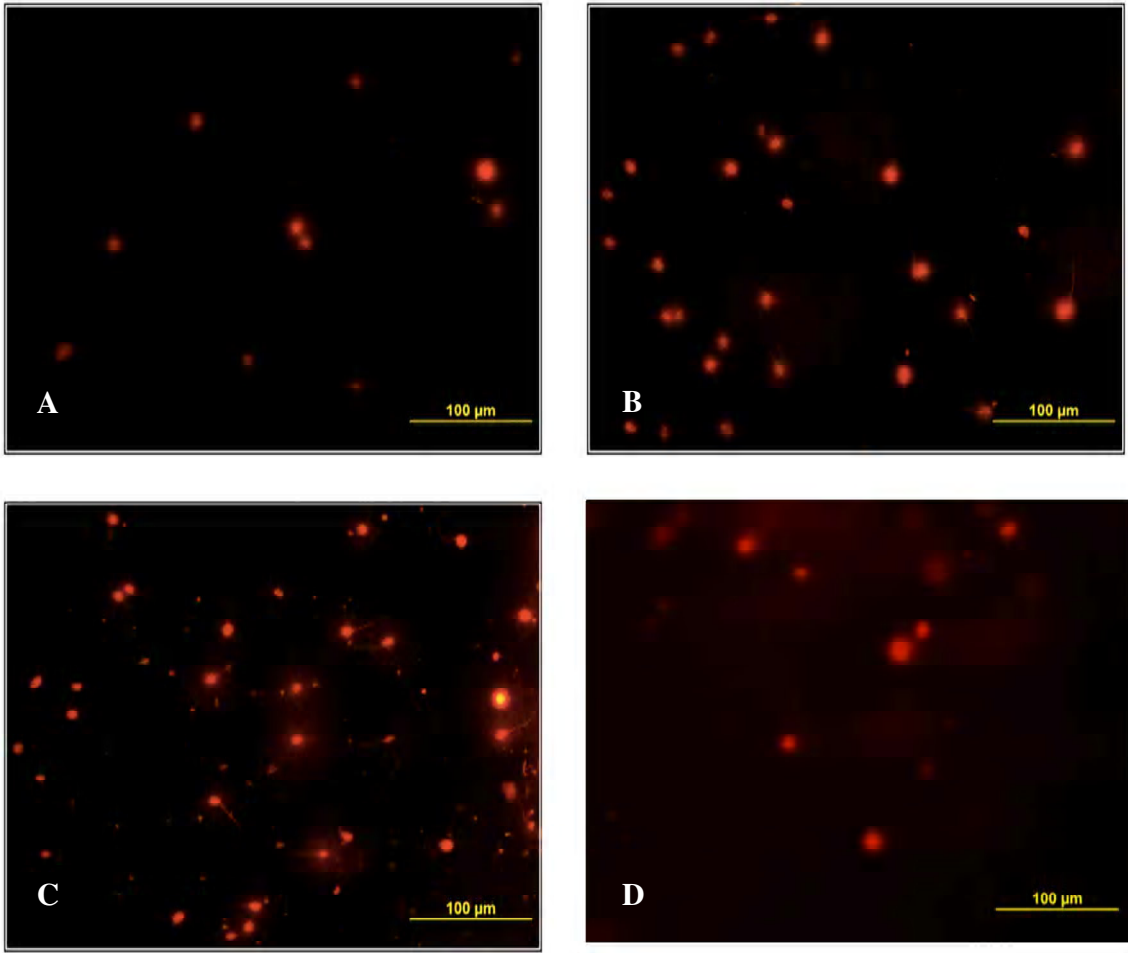


Şekil 4.4. Gruplar arası Tail DNA değerinin karşılaştırılması.

Head DNA değeri gruplar arası karşılaştırıldığında grup 1’de en yüksek, grup 3 de en düşük olarak değerlendirildi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 4.1).



Şekil 4.5. Gruplar arası Head DNA değerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.6. Gruplar arası sperm comet görüntüleri **A)** Grup 1 (Kontrol Grubu) **B)** Varikosel evre 1 **C)** Varikosel evre 2 **D)** Varikosel evre 3 (Etidium bromid boyama, x100).

4.2 Serumda Biyokimyasal Analizler

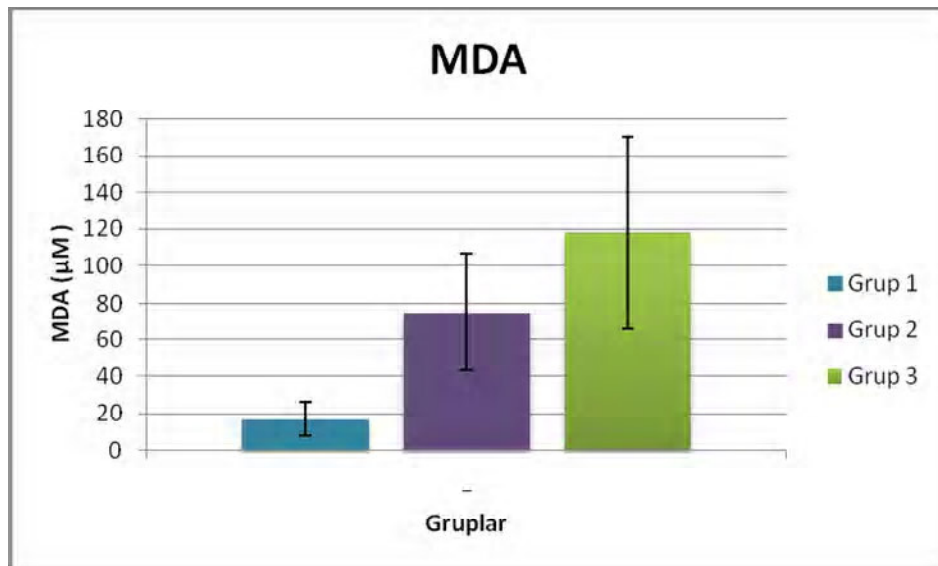
Olgulardan alınan kan örneklerinin plazmasında oksidan/antioksidan durumunun göstergesi olarak KAT ve SOD aktiviteleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçüldü. Ölçüm sonuçları Tablo 4.2’de verildi. $P < 0,01$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 4.2. Gruplar arası enzim parametrelerinin karşılaştırılması.

Gruplar	MDA (μ M) Ortalama $\pm$ SS	KAT (nmol/ml) Ortalama $\pm$ SS	SOD (ünite/ml) Ortalama $\pm$ SS
Grup 1 (n=20)	17 $\pm$ 9	25 $\pm$ 11	0,2 $\pm$ 0,1
Grup 2 (n=20)	75 $\pm$ 32	4 $\pm$ 2	0,06 $\pm$ 0,03
Grup 3 (n=20)	118 $\pm$ 52	2 $\pm$ 1	0,02 $\pm$ 0,01
p	0,01	0,01	0,01

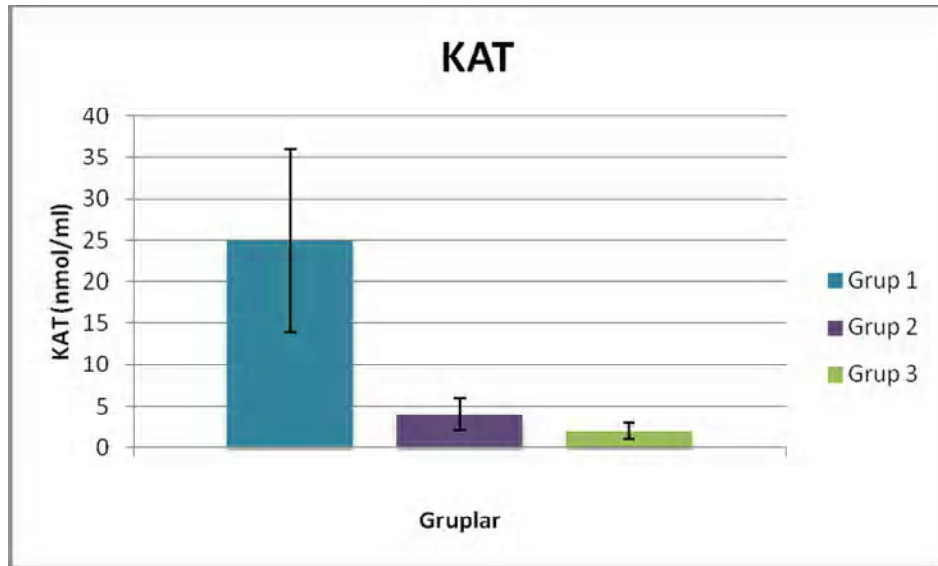
4.2.1 Serumda MDA Düzeyleri

Kan örneklerinin serumlarında lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak MDA düzeyleri ölçüldü. MDA düzeyleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.7’de gösterildi. Gruplar arası serum MDA düzeyleri karşılaştırıldığında, grup 3 MDA düzeyi grup 1 ve grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksekti ($p<0,01$). Grup 2 MDA düzeyi diğer gruplarla karşılaştırıldığında grup 1’den yüksek, grup 3’ten düşüktü ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,01$).

**Şekil 4.7.** Gruplar arası MDA düzeyleri.

4.2.2 Serumda KAT Aktivitesi

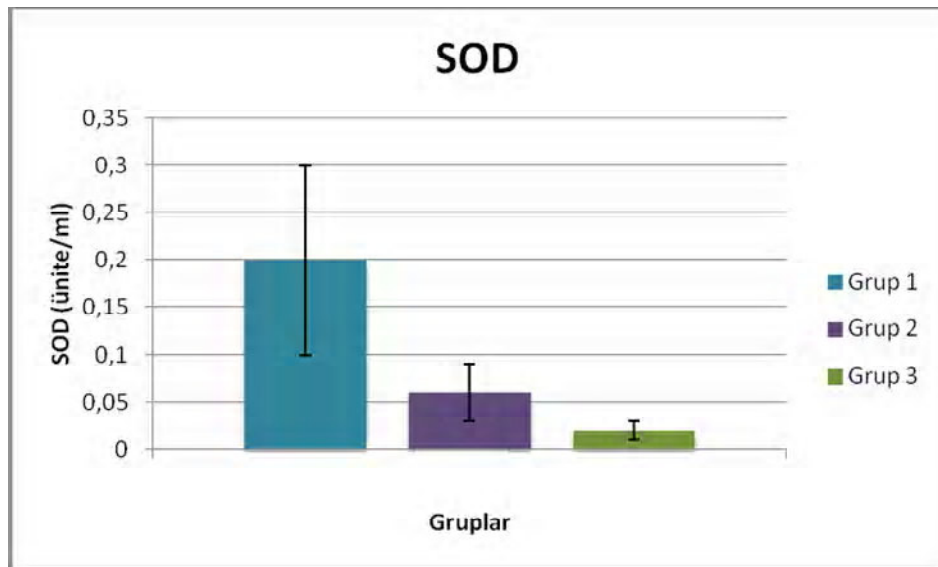
Kan örneklerinin serumlarında oksidan/antioksidan göstergesi olarak KAT aktiviteleri ölçüldü. KAT aktiviteleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.8’de gösterildi. Grup 1 diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksekti ($p<0,01$). Grup 2, grup 1 ve grup 3 ile karşılaştırıldığında; Grup 1’den istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşüktü ($p<0,01$), grup 3’ten sayısal olarak daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,302$). Grup 3, grup 1 ve grup 2 ile karşılaştırıldığında, grup 1’den istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşüktü ($p<0,01$), grup 2’den sayısal olarak daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,302$).



Şekil 4.8. Gruplar arası KAT aktiviteleri.

4.2.3 Serumda SOD Aktivitesi

Kan örneklerinin serumlarında oksidan/antioksidan göstergesi olarak SOD aktiviteleri ölçüldü. SOD aktiviteleri Tablo 4.2 ve Şekil 4.9'da gösterildi. Grup 1, grup 2 ve grup 3 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksekti ($p<0,01$). Grup 2, grup 1 ve grup 3 ile karşılaştırıldığında; Grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşüktü ($p<0,01$), grup 3'ten sayısal olarak daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,530$). Grup 3, grup 1 ve grup 2 ile karşılaştırıldığında, grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşüktü ($p<0,01$), grup 2'den sayısal olarak daha düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,530$).



Şekil 4.9. Gruplar arası SOD aktiviteleri.

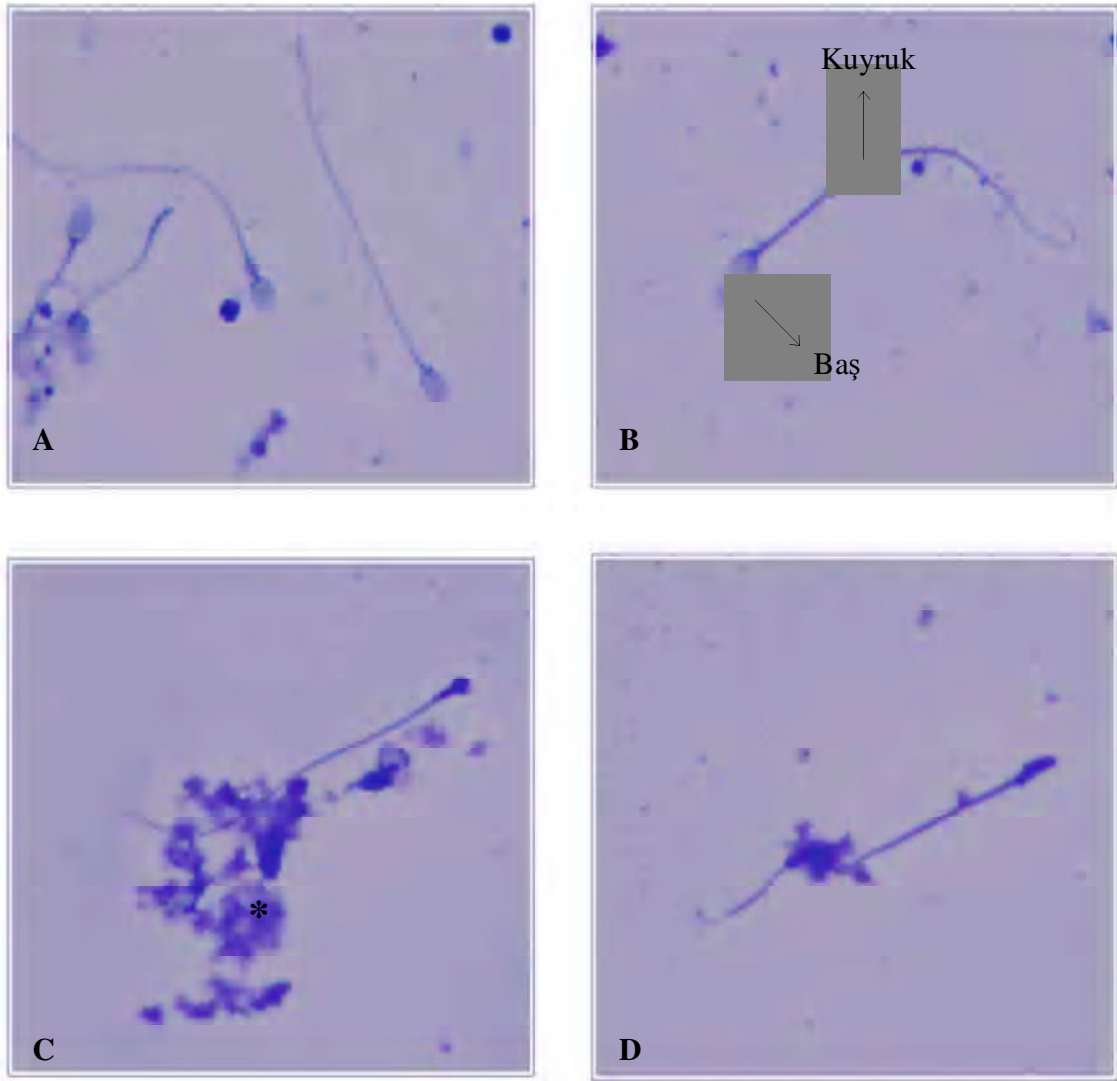
4.3.Sperm Morfoloji Değerlendirilmesi

4.3.1 Anilin Mavisi Boyaması

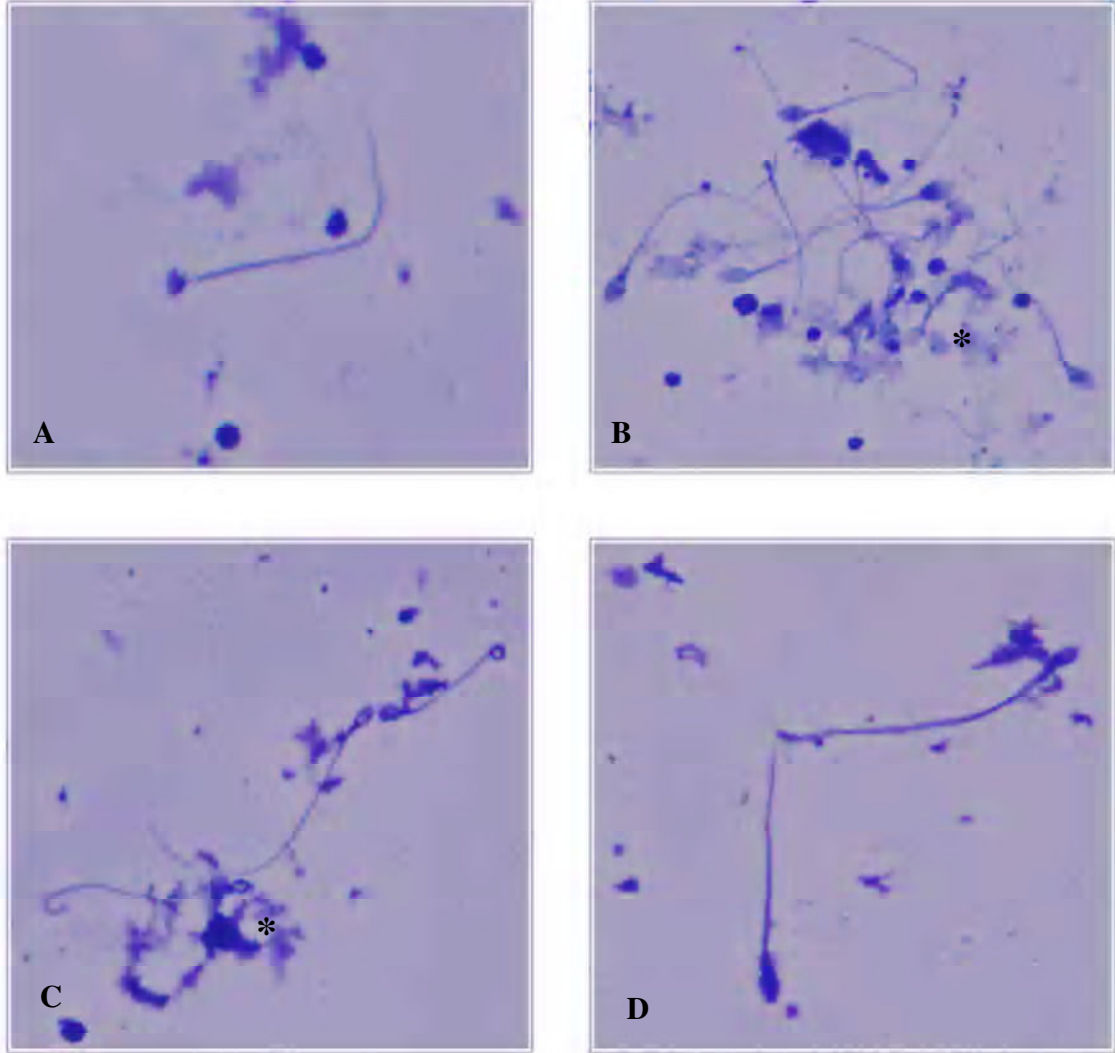
Bu çalışmada kromatin kondensasyon anomalisi saptamada anilin mavisi boyaması tercih edilmiştir (59). Zayıf kromatin paketlenmesi ve muhtemel DNA hasarı infertilite ile ilişkilidir. Koyu mavi boyanan sperm (anilin mavisi +) kondensasyon anomalisi pozitif,

boya almamış spermiler (anilin mavisi -) normal olarak değerlendirildi. Spermilerin morfolojileri net olarak değerlendirilebildi. Buna göre grup 2 ve grup 3 spermelerde amorf hücre görünümü, immatür germ hücre sayılarında artış ve incelmış form artması gibi durumlar gösterilmiştir. Özellikle incelmış form morfoloji yüzdesi fazladır (Şekil 4.10 ve 4.11).

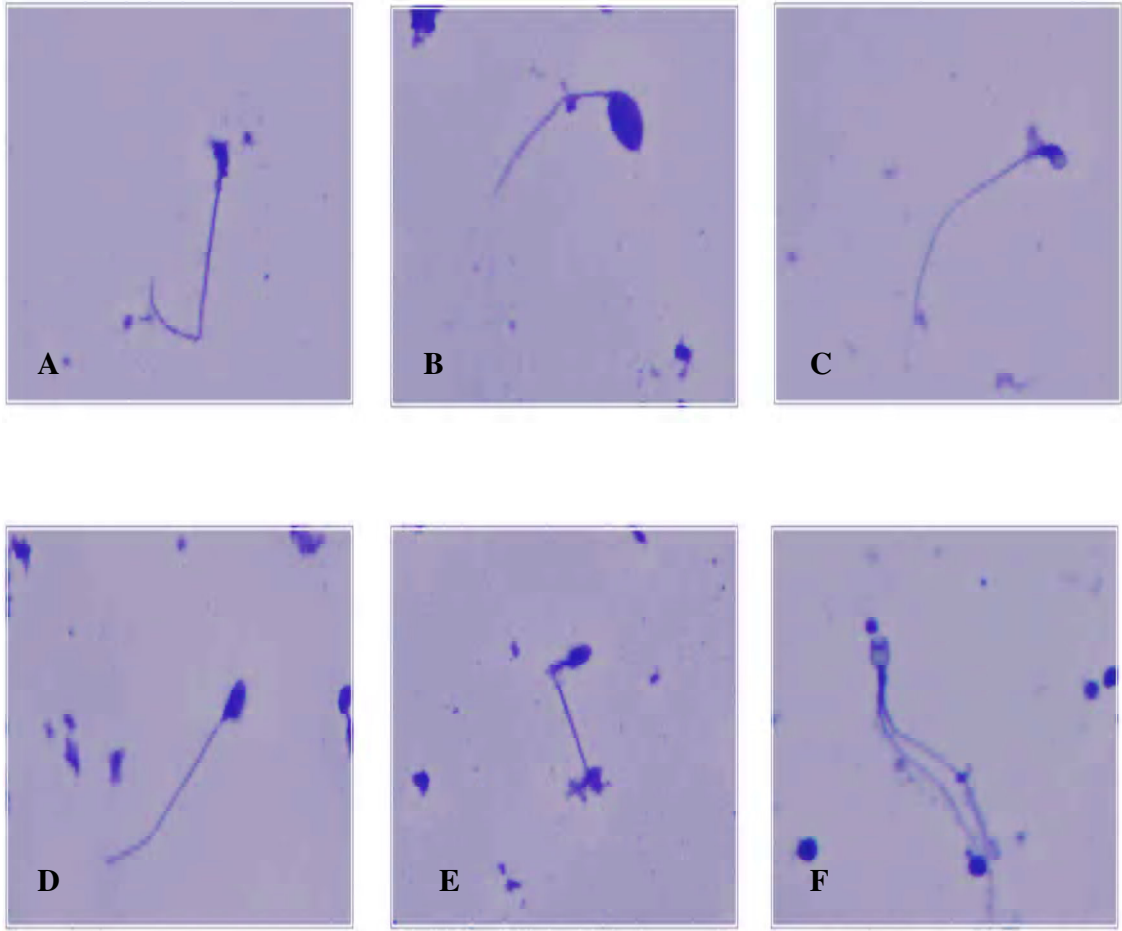
Yaptığımız çalışmada anormal morfolojideki spermilerin, anilin blue ile boyanma miktarı, normal morfolojideki spermilerin boyanma miktarından oldukça fazlaydı (Şekil 4.12). Ayrıca bazı morfolojik formlarla (sitoplazmik droplet, küçük akrozumlu ve akrozomsuz spermiler, incelmış form spermiler) kondensasyon anomalisinin pozitif korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Grup 1’de, normal sperm morfoloji ortalaması %14, grup 2’de %6, grup 3’te ise % 4’ün altında idi. Buna paralel olarak anormal morfolojili spermin daha fazla sayıda bulunduğu grup 3’teki boyanma yüzde oranı, grup 2’ye oranla fazla bulundu. Anilin mavisi boyaları ile yapılan ışık mikroskopi değerlendirmesinde, sperm başı yapısındaki anomalilerin, kondensasyon defektlerinin ve DNA hasarlarının oranlarını grup 1’e göre grup 3 ve grup 2’de daha fazla belirledik. Elde ettiğimiz görüntülerde grup 2 ve grup 3’te epitel parçalarının yoğun olarak bulunduğu gözlemlendi.



Şekil 4.10. A) Grup 1 (kontrol grubu), normal (anilin mavisi -, boya almamış) sperm B) Grup 2 (varikozel evre 1-2) normal (anilin mavisi -, boya almamış) sperm C) Grup 2 küçük baş form, kondensasyon anomalisi olan (anilin mavisi +, koyu mavi) sperm, * epitel parçaları D) Grup 2 incelmış form, anilin mavisi (+) sperm (Anilin mavisi, x100).



Şekil 4.11. Grup 3 (Varikose evre 3) sperm hücreleri **A)** Anormal morfoloji, kondensasyon anomalisi olan sperm hücresi **B)** Anormal morfolojili, kondensasyon anomalisi olan sperm, * epitel parçaları **C)** Anormal morfolojili, anilin mavisi (+) sperm, * epitel parçaları **D)** İncelmiş form, anilin mavisi (+) sperm hücresi (Anilin mavisi, x100).

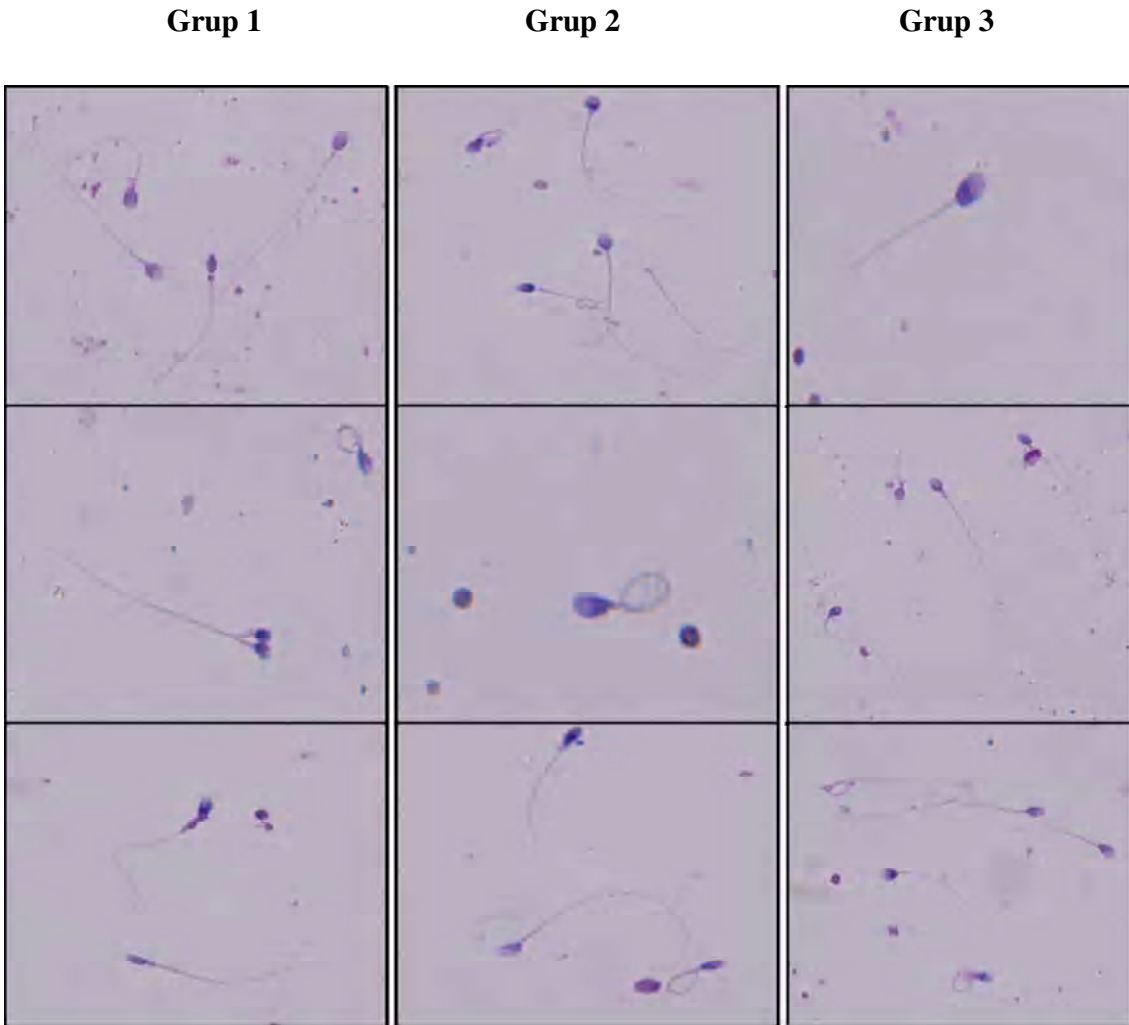


Şekil 4.12. Hasta gruplarında gözlemlenen anormal morfolojili, kondensasyon anomalisi olan anilin mavisi (+) spermler **A - B** Varikozel evre 1 **C - D** Varikozel evre 2 **E - F** Varikozel evre 3 (Anilin mavisi, x100).

4.3.2 Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyaması

Sperm membranının yapısı protein, lipid ve karbonhidratlar olmak üzere 3 esas yapı elemanından meydana gelen lipoglikoproteinlerden oluşmuştur. Çalışmamızda, glikojen içeriğindeki değişim, glikozaminoglikan tabakası ve sperm morfolojisi yönünden gruplar arasında PAS yöntemiyle herhangi bir farklılık bulunup bulunmadığı amaçlandı.

Elde ettiğimiz bulgulara göre; Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 boyanma özelliklerine göre karşılaştırıldığında sperm hücresinin boyanma miktarı dikkate alındı ancak gruplar arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Gruplar arası sperm hücreleri, Periyodik Asit Schiff (PAS) boyaması, x100

5.TARTIşMA VE SONUÇ

Pleksus pampiniformisin dilatasyonu olarak bilinen ve zamanla testiküler fonksiyonlarda bozulmaya yol açabilen varikosel, infertilitenin cerrahi olarak düzeltilebilir en sık nedenidir. Tedavide açık cerrahi teknikler (inguinal, subinguinal, yüksek ligasyon, skrotal yaklaşım), laparoskopik varikosektomi, embolizasyon ve skleroterapi gibi girişimsel radyolojik teknikler kullanılmaktadır (52,53). Uygulanan bu tedavi yaklaşımlarının avantajları ve dezavantajları olmakla beraber, varikosel evre 3 teşhisi konan hastalarda cerrahi tedavi yöntemleri tercih edilirken, evre 1 ve evre 2 varikoselli hastalara genellikle müdahale edilmemektedir (53).

Literatürde varikosel ve sperm DNA hasarına yönelik birçok çalışma mevcuttur. Erkeklerde DNA kalitesi üreme yeteneği ile eşdeğerdir. DNA hasarlı sperm, fertilizasyon gerçekleştirebilir ancak anöploidi oranı yüksek embriyo oluşumu; erken dönem gebelik kayıpları, epigenetik değişimlere bağlı olarak metabolik hastalık riski, çocukluk ağı kanserleri gibi problemler halen araştırma konularını oluşturmaktadır (54). Yapılan alışmalar, varikoselin semen parametreleri üzerindeki etkisini, sperm DNA'sında anlamlı bir hasara sebep olduğunu, testis Sertoli ve Leydig hücrelerinin yapısını bozarak hormonal harabiyete yol açtığını, ROS düzeylerindeki artışa ve doğrudan oksidatif hasara neden olduğunu göstermiştir (14). Biz alışmamızda bu bilgiler ışığında farklı varikosel'in farklı evrelerindeki infertil hastalar ile normal sağlıklı erkeklerin karşılaştırıldığı gruplarda, oksidatif stres düzeyini tayin ederek sperm morfoloji ve nükleer DNA hasarını araştırdık.

Varikoselin sperm DNA'sına etki mekanizması günümüzde hala tam olarak bilinmemekle birlikte bu konuda pek çok teori ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalarda varikoselli olgularda skrotum yüzey ısılarının varikoseli olmayanlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Varikosel patolojisi bulunan erkek olgularda varikoseli bulunmayan

oligozoospermiklere göre intraskrotal ısı 0.6°C daha fazla bulunmuştur (55). Benzer pek çok çalışmada bu durumun ortaya konulduğu görülmektedir. Yine de bu konuda henüz kanıt düzeyi yüksek çalışmaların olmadığı görülmektedir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada skrotal ısı artışı ile testis volümünün ters korelasyon gösterdiği ve varikoselektomi operasyonu sonrası ısı artışının düzenlendiği ve testis volümünün arttığı bildirilmiştir (14). Yapılan pek çok hayvan çalışmasında ısı ve testiküler histolojideki değişikliklerin ilişkisinin incelendiği görülmektedir. Artan skrotal ve intratestiküler ısının hangi mekanizma ile spermatogenezi bozduğu tam olarak bilinmemekle birlikte seminifer tübül ve Leydig hücre düzeyinde nükleer DNA ve RNA bağlayıcı proteinlerde direkt termal hasar sonucu spermatogenezin etkilendiğinden kuşulanılmaktadır. Bununla ilişkili olarak kısa dönemde Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunun bozulmadığı düşünülmektedir (56).

Varikozel patolojisine ikincil olarak artan venöz basınç artışının testis kan akımını etkileyebileceği belirtilmiştir. Camoglio ve arkadaşları (57) yaptıkları deneysel bir çalışmada varikozel oluşturulmuş ratlarda kontrol grubuna göre adenin nükleotid konsantrasyonunun azaldığını ve NAD-sitokrom-c redüktaz aktivitesinin düştüğünü göstermişlerdir. Artan venöz basınç intratestiküler onkotik ve hidrostatik basınçlarda artışa neden olarak parakrin mekanizmayı bozarak hormon salınımını değiştirebilir. Varikosele bağlı infertilite ya da spermatogenez bozukluğunda diğer bir faktörün renal venden ve adrenal yapılardan testise olan reflü ile kan akımının azalması ya da hipoksi durumları olarak ileri sürülmektedir. Varikoselli erkeklerin yaklaşık %50'sinde sol spermatik vende retrograd kan akımının olduğu bildirilmektedir. Venografik çalışmalarda venöz reflüdeki artış belgelenmiştir. Buna göre çalışmalarda varikoselli olgularda böbrek ve adrenalden katekolaminler, prostoglandin E ve F gibi metabolitlerin yüksek konsantrasyonda reflüsü sözkonusu olabilmektedir (56). Cohen ve arkadaşlarının (57) yapmış olduğu çalışmada, varikozel cerrahisi sırasında testiküler geri akımın olduğu venlerden alınan kandaki katekolamin düzeyinin periferik venden alınan kandaki katekolamin düzeyinden 3 kat daha fazla olduğu kontrol grubunda ise 1.5 kat daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. Venlerdeki bu artmış katekolamin ters akım sistemi yolu ile pleksus pampiniformis düzeyinde testiküler arterlere geçerek arterlerdeki noradrenalin düzeyini arttırmakta ve arteriyollerde buna bağlı oluşan vazokonstriksiyon testiküler hipoksiye katkıda bulunmaktadır. Bu

durumum dolaylı olarak DNA hasarına sebep olacağı bildirilmiştir.

Varikosel patolojisine bağlı olarak otoimmün reaksiyonla ya da akrozom reaksiyonunun bozulmasına bağlı olarak sperm fonksiyonlarının bozulabileceği de belirtilmiştir (58). Günümüzde oksidatif strese ikincil olarak artan reaktif oksijen radikallerinin hücrelerde lipid peroksidasyonuna yol açarak hasar oluşturduğu bilinmektedir. Bu reaktif oksijen radikallerinin hedefi hücre membranındaki doymamış yağ asitleri olup, bu yapıların bulunduğu her hücreyi etkileyebilmektedirler. Sperm membranı da doymamış yağ asitlerinden zengin olduğu için varikosel patolojisine bağlı olarak artan reaktif oksijen radikallerinin sperm yapısını bozabileceği belirtilmiştir (59). Köksal ve arkadaşları (60) yaptıkları deneysel çalışmada varikosel modeli oluşturulmuş ratlarda reaktif oksijen radikallerinin normal popülasyondan daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Sol varikoseli olan olguların incelendiği klinik bir çalışmada, ROS'un varikosel ile arttığı ve buna bağlı olarak DNA fragmentasyonunda bir artış olduğu bildirilmiştir (61). Benzer şekilde Allamaneni ve arkadaşları (62) varikosel evre 3'ün evre 1 ve 2 ile karşılaştırıldığında seminal ROS seviyelerinin anlamlı olarak değerlendirildiğini rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada Ötünçtemur ve arkadaşları (63) varikoselin etki mekanizmalarını araştırarak varikoseli olan erkeklerde serum, testis ve semende serbest oksijen radikallerinin arttığını bildirmişlerdir. Biz çalışmamızda farklı varikosel evrelerdeki olgularda ROS ve antioksidan parametrelerini değerlendirdik. Bizim sonuçlarımız Allamaneni ve ark.'nın verileriyle uyumludur. Varikosel derecesi arttıkça ROS parametrelerinin arttığı, antioksidan seviyelerinin ise anlamlı bir şekilde azaldığını gösterdik. Grup 1 diğer gruplar ile karşılaştırıldığında MDA seviyesi daha düşük, KAT ve SOD aktiviteleri ise daha yüksek bulunmuştur. Grup 2 ve 3 kendi aralarında karşılaştırıldığında grup 3'te MDA seviyesi anlamlı derecede grup 2'den yüksek, SOD ve KAT aktiviteleri ise düşük olarak tespit edilmiştir. Bu biyokimyasal bulgular, grup 2 ve grup 3'te oksidatif hasara bağlı DNA hasarının göstergesidir.

Yapılan çalışmalarda hücrelerin membranında "Fas" ve "Fas ligand" olarak bilinen hücre ölümü sinyallerini kontrol eden spesifik membran reseptörlerinin bulunduğu ve immünohistokimyasal olarak Fas'ın germ hücrelerinde, Fas ligand'ın ise Sertoli hücrelerinde olduğu ortaya konulmuştur (64). Fas, Fas liganda bağlandığı zaman hücre

membranının iç kısmında bulunan procaspas-8'i aktive eder ve aktive caspas-8, diğer kaspazlar gibi apoptozisi kontrol eden caspas-3'ü aktive eder. Nükleer seviyede ise apoptozisi kontrol eden p53 ve pro-apoptotik Bax ve anti-apoptotik Bcl-2 geni bulunmaktadır. p53 geni, tümör süpresör bir gen olup DNA hasarına yanıt verir ve geçici olarak hücre siklusunu G1 fazında durdurarak DNA tamiri için yeterli süreyi sağlar (65). DNA hasarı geri dönüşümsüz ise p53 Fas reseptörlerini ve Fas genini aktive ederek hücre ölümünü başlatır. Bcl-2 ise mitokondriden sitokrom-C salınımını stimüle veya inhibe ederek apoptozisi başlatabilir veya inhibe edebilir. Bu enzimin varlığı caspas-9'u stimüle eder, bu da apoptozis yolağının bir parçası olan caspas-3'ü stimüle eder (66). Ishikawa ve arkadaşları (67) Fas'a bağımlı apoptozisin blokörü olan "soluble- Fas" (s-Fas)'ın seminal plazma içindeki konsantrasyonunun ölçüldüğü bir çalışmada, oligospermisi olan varikoselli hasta grubunda s-Fas miktarının azalmış olduğunu ve bunun da apoptozisi artırarak sperm parametrelerinde bozukluklar ile dolaylı olarak DNA hasarına yol açtığını göstermişlerdir.

Yukarıda sayılan patolojilere bağlı olarak sperm morfolojisinde ve testiküler histolojide değişiklikler ortaya konulmuştur. Buna göre spermelerde amorf hücre görünümü, immatür germ hücre sayılarında artış ve incelmış (elonge) form artması gibi durumlar gösterilmiştir. MacLeod ve arkadaşları (68) tarafından varikoselli olguların %90'ından fazlasında saptanan artmış immatür hücreler ile incelmış formun olması stres paterni olarak tanımlanmıştır. Varikoselli hastalar üzerindeki diğer çalışmalarda, sperm morfolojileri normal ve anormal morfoloji şeklinde bir bütün olarak ele alınmış ve değerlendirmeler buna göre yapılmıştır. Avcı ve arkadaşları'nın (69) çalışmasında morfoloji ve kondensasyon değerlendirmesi için en güvenilir ve pratik yöntemin anilin mavisi boyaması olduğu rapor edilmiştir. Sperm kromatin hasarının bir problem olarak görülmesi gerektiğini savunan birçok çalışma vardır. Ngo ve arkadaşları (54) çok sayıda çalışma ile sperm kromatin hasarının fertilité ile olan ilişkisini göstermiştir. Yaptıkları bir çalışmada kromatin hasarlı babalardan doğan çocuklarda doğum defektlerinde artış riski olduğunu bildirmişlerdir. Hooiveld ve arkadaşları (70) yaptıkları çalışmada kimyasal boyalara maruz kalan erkeklerin spermelerinde anormal kromatin paketlenmesi olduğunu ve çocuklarında meydana gelen doğumsal defektleri göstermişlerdir. Ji ve arkadaşları (71) sigara içen erkeklerde sperm kromatin hasarı olduğunu ve çocuklarında çocukluk çağı kanserlerin

artışını göstermişlerdir. Biz de bu çalışmalardan yola çıkarak anilin blue boyaması ile morfoloji ve kromatin kondensasyon değerlendirmesini birlikte yaptık. Çalışmamızda bazı morfolojik formlarla (sitoplazmik droplet, küçük akrozomlu ve akrozomsuz spermiler, immatür spermiler) kondensasyon anomalisinin pozitif korelasyon gösterdiğini saptadık. Bizim çalışmamıza benzer şekilde Cebesoy ve arkadaşları'nın (72) çalışmasında acridin orange boyaması uyguladıkları ICSI sperm örneklerinde sperm morfolojisi ile kromozom yapısı arasında net bir ilişki olduğu bildirilmiştir.

Sperm hücresindeki DNA hasarı ile sperm morfolojisi ve motilitesi gibi parametreler arasında bir ilişki olup olmadığı, pek çok araştırmacı tarafından araştırılmıştır. Saleh ve arkadaşları (73) yaptıkları çalışmada sperm DNA'sındaki hasarın üreme üzerine olumsuz etkisi olduğu sonucuna varmışlardır. ROS'un sebep olduğu DNA hasarı hücrelerin apoptozisini hızlandırmaktadır. Bu da infertiliteye sebep olan sperm sayısının azalması ile ilgili olarak, üreme biyolojisi üzerine olumsuz bir etki yapmaktadır. Birçok çalışmada sperm morfoloji değerlendirilmesinin infertilite sebebini belirlemede yetersiz olduğu bildirilmiştir. Bu sebeple son yıllarda sperm DNA hasarını belirlemek için farklı yöntemler tercih edilmektedir. Buna karşın bazı çalışmalarda ise sperm DNA hasarının tespiti için kullanılan yöntemlerin sperm morfolojik değerlendirmesinde bir üstünlüğü olmadığı savunulmaktadır (74). Biz çalışmamızda sperm morfolojisi ile sperm DNA hasarını birlikte değerlendirdik ve aralarında pozitif bir korelasyon olduğu kanaatindeyiz. Ying-Jun Wang ve arkadaşları (75) 1963'den Ağustos 2011'e kadar yayınlanmış olan, varikosel ve DNA hasarı arasındaki ilişkiyi inceleyen birbirinden bağımsız 83 çalışmanın tarandığı bir meta analiz ile sperm DNA hasarını belirleyen en etkili yöntemlerin, TUNEL, Comet assay ve sperm kromatin yapısı tayini (SCSA) olduğunu göstermişlerdir. Simon ve arkadaşları (76) yaptıkları bir çalışmada sperm DNA hasarının embriyo kalitesini etkilediği düşüncesiyle, comet assay yöntemini kullanarak infertil çiftlerde DNA hasarı yönünden spermatozoon analizi yapmışlar ve 3 grupta sınıflandırmışlardır: Düşük hasar, orta hasar ve yüksek hasar. Çiftlerin infertilite sebepleri 3 grupta (erkek, kadın ya da açıklanamayan) sınıflandırılmıştır. Her embriyo, iyi, orta ve kötü kalite olarak kategorize edilmiş ve DNA hasarının embriyo kalitesi üzerindeki etkisine bakıldığında, düşük DNA hasarına sahip spermatozoon grubunun anlamlı bir şekilde daha yüksek, iyi kalitede embriyo yüzdesine sahip olduğunu

göstermişlerdir. Biz de bu sebeple çalışmamızda varikoselin farklı evrelerindeki DNA hasarını göstermek için comet assay kullandık. Comet assay, basit, hızlı, duyarlı olması, farklı hücre tipleri ve DNA hasar çeşitleri için uygulanabilirliği, en önemlisi ise radyoaktif işaretleme gerektirmemesi nedeniyle DNA hasar ölçümünde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (77). Çalışmamızın comet assay sonuçlarına dayanarak; varikosel evre 1 ve 2 içeren olgularda beklenenden daha fazla sayıda sperm hücresinde DNA hasarı olduğunu, varikosel evre 3'lü olguların sperm hücrelerinin tamamında yüksek DNA hasarı olduğunu söyleyebiliriz. Elde ettiğimiz comet bulguları, biyokimyasal parametreler ve morfolojik değerlendirmeler ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak, çalışmamızda varikoselin bütün evrelerinde farklı derecelerde DNA hasarı tespit edilmiştir ve varikosel teşhisi konan hastalarda morfolojik incelemeler yanı sıra DNA hasar analizi için comet assay gibi yöntemlerin de prediktör olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz. Ancak bu konuda daha çok preklinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

6.KAYNAKLAR

1. Cayan S, Erdemir F, Ozbey I ve ark. Can varicocele significantly change the way couples use assisted reproductive technologies. J Urol 2002; 167: 1749-1752.
2. Dohle GR. EAU Kılavuzları, Male Infertility 2008; 6.
3. Goldstein M, Chan PT, Sigman M. American Urological Association Guidelines. Annual meeting, s 17-22, May 2008, Orlando.
4. Daitch JA, Bedaiwy MA, Pasqualotto EB, et al: Varicocele improves intrauterine insemination success rates in men with varicocele. J Urol 2001; 165: 1510-1513.
5. Mieusset R, Bujan L, Mondinat C et al. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. Fertil Steril. 1987; 48: 1006-1011.
6. Zini A, Blumenfeld A, Libman J, Willis J. Beneficial effect of microsurgical varicocele on human sperm DNA integrity. Hum Reprod. 2005; 20: 1018-1021.
7. Bungum M, Humaidan P, Spano M et al. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. Hum Reprod. 2004; 19:1401-1408.
8. Wu GJ, Chang FW, Lee SS et al. Apoptosis-related phenotype of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. Fertil Steril. 2009; 91: 831-837.
9. Fujisawa M, Ishikawa T. Soluble forms of fas and fas ligand concentrations in the seminal plasma of infertile men with varicocele. J Urol. 2003; 170: 2363-2365.

10. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PT et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int.* 2012; 109: 259-265.
11. Mostafa T, Anis T, El Nashar A et al. Seminal plasma reactive oxygen species-antioxidants relationship with varicocele grade. *Andrologia.* 2012; 44: 66-69.
12. Altunoluk B, Efe E, Kurutas EB et al. Elevation of both reactive oxygen species and antioxidant enzymes in vein tissue of infertile men with varicocele. *Urol Int.* 2012; 88: 102-106.
13. Cayan S, Kadioğlu A. Varikoselin tanı ve tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Türk Üroloji Dergisi* 2005; 31: 57-63.
14. Kendirci M. Varikosel Patofizyolojisi. In: *Erkek Reprodüktif sistem ve hastalıkları.* Habitat Yayıncılık, 2004: s 463.
15. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelektomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril* 1970; 21: 606-609.
16. Özdamar S, Çetin N Sorkun H. Genel Embriyoloji. 1.Baskı Kayseri. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 2002.
17. Şeftalioğlu A. Genel ve özel insan embriyolojisi. 3. Baskı Ankara. Feryal Matbaası, 1998: s 346-350.
18. Moore KL. The Developing human. 4th ed. Philadelphia, Saunders Co, 1988: p 262-267.
19. Sadler TW (Çeviri: AC. Başaklar). Langman's Medikal Embriyoloji, 7. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık; 1996: s 274-275.
20. Jarow JP. Intratesticular arterial anatomy. *J Androl* 1990; 11: 55-59.
21. Petorak İ. Medikal embriyoloji, İstanbul Beta Basım Dağıtım A.Ş, 1986: s 220-223.
22. Rozanski TA, Bloom DA. The undescended testis: theory and management. *Urol Clin North Am* 1995; 22: 107-108.
23. Kuran O. Sistematik anatomi, İstanbul, Filiz Kitabevi, 1983: s 512-514.

24. Junqueira L.C, Carneiro J. Temel Histoloji, çeviri Editörü: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2006; s 431-438.
25. Junqueira L.C, Carneiro J. Temel Histoloji, Çeviri Editörü: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2006; s 441-442.
26. Abraham L. Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 531-532.
27. Gartner LP, Hiatt JL, Color Textbook Histology. 2nd ed. W.B. Saunders Company, New York 2001: p 487-508.
28. April EW. NMS Klinik Anatomi. 3. Baskı. Çeviri Editörü: Yıldırım M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1998: s 425-461.
29. Erkoçak A. Genital Sistem, In: Özel Histoloji. 2. Baskı. Ankara üniversitesi tıp fakültesi yayınları, Ankara, 1990: s 166-194.
30. Tekelioglu M. Erkek Üreme Sistemi, In: Özel Histoloji. 1. Baskı. Ankara üniversitesi tıp fakültesi yayınları, Ankara, 2002: s 231-244.
31. Sermin P, Histoloji. 1. Baskı. Uludağ Üniversitesi Yayınları, 1990: s 260-287.
32. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJV et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Human Reproduction 1990; 5: 586.
33. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS et al. Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986; 46: 1118-1123.
34. Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF et al. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised medtods. Andrologia 1997; 29: 1-7.
35. Ford WC. World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. 2010: p 56-63.
36. Orhon E. Sperm Morfoloji Atlası, Türkiye infertilite vakfı yayınları, 1995: s 17-29.

37. Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. Turk Urol Sem 2011; 2: 11-18
38. Samlı M. Varikosel ve Sperm DNA Hasarı. Türkiye klinikleri Journal of Urology Special Topics. 2012; 5: s 16-24.
39. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzinkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. Exp Cell Res 1993; 207: 202-205.
40. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. Biol Reprod 1995; 52: 864-867.
41. Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F et al. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. Mol Hum Reprod 1996; 2: 139-144.
42. Sakkas D. The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. Human Reprod 1999; 14: 4-5.
43. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. Free Radic Biol Med 2000; 28: 529-536.
44. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D et al. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. Reprod Biomed Online 2003; 7: 428-432.
45. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1998; 69: 528-532.
46. Schlesinger MM, Wilets IF, Nagler HM. Treatment outcomes after varicocelectomy: A critical analysis. Urol Clin Nort Am 1994; 21: 517-529.
47. Chiou RK, Anderson JC, Wobig RK et al. Color doppler ultrasound criteria to

diagnose varicoceles: correlation of a new scoring system with physical examination. *Urology* 1997; 50: 953-956.

48. Hricak H, Filly RA. Sonography of scrotum. *Invest Radiol* 1993; 18: 112-121.
49. Hamm G, Fobbe F, Sorensen R et al. Varicoceles: combined sonography and thermography in diagnosis and post-therapeutic intervention. *Radiology* 1996; 160: 419-424.
50. Aslan H, Sakarya ME, Atilla MK. Clinical value of power Doppler sonography in the diagnosis of varicocele. *J Clin Ultrasound* 1998; 26: 229.
51. Rrumbullaku L, Boci R, Dedja A, Dautaj K. Sperm morphology in infertile men with varicocele. 1.st Balkan Symposium of Androloji. 12-14 June 1998, Alexandroupolis, Greece.
52. Khera M, Lipshultz LI. Evolving approach to the varicocele. *Urol Clin North Am* 2008; 35: 183-189.
53. Nöske HD, Weidner W. Varicocele—a historical perspective. *World J Urol* 1999;151-157.
54. Ngo AD, Taylor R, Roberts CL, Nguyen TV. Association between Agent Orange and birth defects: systematic review and meta-analysis. *Int J Epidemiol.* 2006; 35: 1220–1230.
55. Zorgniotti AW, Sealfon AI, Toth A. Chronic scrotal hypothermia as a treatment for poor semen quality. *Lancet* 1980; 26: 904-906.
56. Camoglio FS, Zampieri N, Corroppo M, Chironi C, Dipaola G, Giacomello L, Ottolenghi A. Varicocele and retrograde adrenal metabolites flow. An experimental study on rats. *Urol Int* 2004; 73: 337-342.
57. Cohen MS, Plaine L, Brown JS. The role of internal spermatic vein plasma catecholamine determinations in subfertile men with varicoceles. *Fertil Steril* 1975; 26: 1243-1249.
58. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK et al. Varicocele is associated with elevated

spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. J Urol 1999; 161: 1831-1834.

59. Görür S, Çayan S. Varikosel patofizyolojisinde güncel durum. Androloji Bülteni. 2010; s 37-40.
60. Köksal T, Erdoğan T, Toptaş B et al. Effect of experimental varicocele in rats on testicular oxidative stress status. Andrologia 2002; 34: 242-247.
61. Cayan S, Kadioğlu A. Varikoselin tanı ve tedavisinde güncel yaklaşımlar. Türk Üroloji Dergisi 2005; 31: 57-63.
62. Allamaneni SS, Naughton CK, Sharma RK et al. Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. Fertil Steril 2004; 82: 1684-1686.
63. Ötünçtemur A, Çakır S, Polat C, Özbek E. Varicocele and Oxidative Stress. Türkiye Klinikleri J Urology Special Topics 2012; 5: 25-37.
64. Lee J, Richburg JH, Shipp EB. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis is differentially up-regulated in Sertoli versus germ cell injury in the testis. Endocrinology 1999; 140: 852-858.
65. Fuchs EJ, McKenna KA, Bedi A. P53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires FAS/APO-1 independent activation of CPP32 beta. Cancer Res 1997; 57: 2550-2554.
66. Woo M, Hakem R, Soengas MS. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. Genes Dev 1998; 12: 806-819.
67. Fujisawa M and Ishikawa T. Soluble forms of Fas and Fas ligand concentrations in the seminal plasma of infertile men with varicocele. J of Urol 2003; 170: 2363-2365.
68. MacLeod J. Seminal cytology in the presence of varicocele. Fertil Steril. 1965; 16: 735-757.
69. Avcı B. Farklı Fiksasyon Protokolleri ile Sperm Kromatin Kondansasyon

Anomalisinin Değerlendirilmesi. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2006; 32: 55-59.

70. Hooiveld M, Haveman W, Roskes K et al. Adverse reproductive outcomes among male painters with occupational exposure to organic solvents. *Occup Environ Med* 2006; 63: 538-544.
71. Ji BT, Shu XO, Linet MS et al. Paternal pre-conception cigarette smoking and the risk of childhood cancer in the offspring of the nonsmoking mothers. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1997; 89: 238-244.
72. Cebesoy FB, Ünlü C, Aydos K, Baltacı V. Sperm morfolojisi ve acridine orange boyamasının ICSI'deki fertilizasyon oranları ve embriyo kalitesi ile ilişkisi. *Journal of Turkish-German Gynecological Association* 2006; 7: 110-114.
73. Saleh R, Agarwal A, Nada E et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and Sterility* 2003; 79: 1597-1603.
74. Güneş S, Sevgili E, Aşçı R. Sperm DNA Damage Mechanisms and Evaluation Assays: Review. *Türkiye Klinikleri J Urology* 2013; 4: 107-114.
75. Wang YJ, Zhang RQ, Lin YJ et al. Relationship between varicocele and sperm DNA damage and the effect of varicocele repair: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine* 2012; 25: 307-314.
76. Simon L, Murphy K, Shamsi MB et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction* 2014; 29: 2402-2414.
77. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26: 249-261.

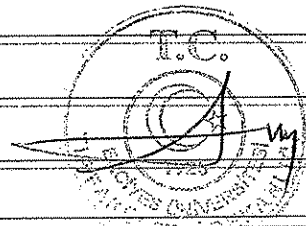
ETİK KURULUN ADI	: ERCİYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Varikozel olgularında sperm morfolojisi ve DNA hasarlarının incelenmesi		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Birkan Yakan		
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji		
	KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Birkan Yakan		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı/Kayseri		
	DESTEKLEYİCİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMCİLCİSİ			
	ARAŞTIRMA FAZİ	FAZ 1	☐	
		FAZ 2	☐	
FAZ 3		☐		
FAZ 4		☐		
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
	Yüksek Doz Araştırması	☐		
	Diğer İse Belirtiniz	☒	Yüksek Lisans Tezi	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ ☒	ÇOKMERKEZ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

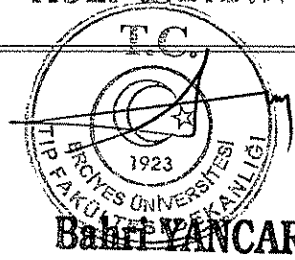
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	BELGE ADI	Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐
	SİGORTA	☐
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFERFORMU	☐
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐
	ILAN	☐
	YILLIK BİLDİRİM	☐
SONUÇ RAPORU	☐	

ASLI GİRİLDİ

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	

ASLI GİBİDİR



Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2013/196	Karar Tarihi : 05.03.2013
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
----------------------	--

ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK KURUL ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Tıbbi Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Nazan DOLU	Fizyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rekonst.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Polat DURUKAN	Acil Tıp	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Alper YURCI	İç Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Leyla HASDIRAZ	Göğüs Cerrahisi	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr. Ertuğrul MAVİLİ	Radyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Hasan B. ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Mehmet A. SOMDAŞ	KBB	Kayseri Eğitim Hastanesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yard. Doç. Dr. Ferhan ELMALI	Biyoistatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	Hukuk Müşaviri	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Ecz. Şükran TERZİ	Eczacı	Serbest Eczacı	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Yusuf Oğuz ALTUNTAŞ	Sivil Üye	Sivil-Tiyatro Sanatçısı	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

ÖZGEÇMİŞ

ÖZGE ÖZÇOBAN

Araştırma Görevlisi, Yüksek Lisans Öğrencisi

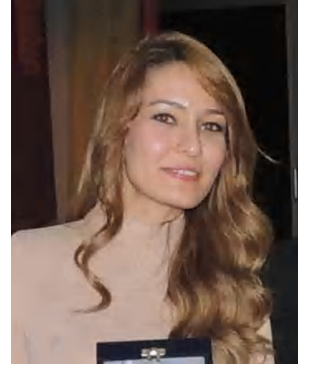
Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji A.D

Kayseri-Türkiye

E-mail: osge_oscoban@hotmail.com

Tel: +90 554 305 56 29



Doğum Tarihi ve Yeri: 15.01.1989 / Kayseri – Türkiye

Yabancı Dil: İngilizce (IELTS: 5,5)

ARAŞTIRMA ALANLARI

Sperm DNA hasarı, İnfertilite, Kanser kök hücresi, Tümör aşısı

EĞİTİM

Yüksek Lisans; 2011- ; Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.D

Lisans; 2007-2011; Erciyes Üniversitesi, Fen fakültesi, Biyoloji

ULUSAL VE ULUSLARARASI KONGRELERDE YAYINLANAN BİLDİRİLER

1. Cantürk F., Caner Y., **Özçoban Ö.**, Akkuş D., Yuldiz O., "Tüm Vücut Işınlamasına Maruz Kalmış Rat Böbreklerinde Pycnogenolün Radyokoruyucu Etkisinin Araştırılması ", ELEKTROMANYETİK ALANLAR VE ETKİLERİ , İSTANBUL, 8-9 Kasım 2013, ss.10-14

2. Unal,A.,**Özçoban Ö.**,Aydın G., “Tümör Hücresi ile uyarılmış, periferik kan mononükleer hücrelerinden dendritik hücre üretilmesi” , KARTEPE, 20-23 Mart 2014,ss 17-
3. Yakan B., **Özçoban Ö.**, Cantürk F., İrez T., Ekmekçioğlu O., Yildirim D., "Varikozel Olgularında Sperm Morfolojisi Ve Dna Hasarlarının İncelenmesi", XII. National Histology And Embryology Congress, Ankara University, ANKARA, TÜRKİYE, 27 Mayıs - 30 Haziran 2014, ss.70-71
4. Cantürk F., Caner Y., **Özçoban Ö.**, Yay A., Yıldız O.G., "Pycnogenolün Antioksidan Ve Radyokoruyucu Özelliğinin 18gy Gama Işınına Maruz Kalmış Rat Böbreklerinde Enzim, Hücre Ve Doku Düzeyinde Araştırılması. ", Deneyisel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight , NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, ss.10-10
5. Cantürk F., Caner Y., Yay A., **Özçoban Ö.**, Yıldız O.G., Ceylan D., "Ratlarda Tüm Vücut Işınlamasına Bağlı Karaciğer Hasarına Karşı Pycnogenolün Farklı Dozlarının Enzim, Hücre Ve Doku Düzeyinde Araştırılması. ", Deneyisel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight , NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, ss.11-11
6. Unal A, Birekul A, **Özçoban Ö.**, Pala Ç, Aydın G, Turak E, Kaynar L, Keklik M,Şıvgın S, Eser B,Çetin M, “Trombositopeninin Ve Tedavisinin Moleküler Esasları - Primary Myelofibrosis Successfully Treated With Alpha Beta Depleted Full Match Allogeneic Stem Cell Transplantation After Reduced İntensity Conditioning” Deneyisel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight,NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, ss.27-27
7. Birekul A, **Özçoban Ö.**, Aydın G, Ünal A, Turak E, Pala Ç, Kaynar L, Keklik M, Eser B, Çetin M, “P:29 - Kanserde Hedef Molekül Saptanması - Hematolojik Maligniteli Ve Solid Tm.Lü Hastalarda Kök Hücre Mobilizasyonunda, Plerixafor’un (Mozobil) Etkinliği” Deneyisel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, ss.38-38

8. Birekul A, **Özçoban Ö**, Aydın G, Ünal A, Kaynar L, Turak E, Pala Ç, Eser B, Çetin M, P:28 - Kanserde Hedef Molekül Saptanması - Kök Hücre Mobilizasyonunda Yüksek Ve Düşük Doz Siklofosfamid'in Etkinliğinin Ve Yan Etkilerinin Karşılaştırılması'' Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, ss.37-37
9. Ünal A, Öner İ, Turak E, Pala Ç, Kaynar L, Keklik M, Köker Y, Patıroğlu T, Şıvgın S, Canöz Ö, Eser B, Çetin M, **Özçoban Ö**, Birekul A, Aydın G '' Multiple Myeloma - Prevalence Of Monoclonal Gammopathy Of Undetermined Sıgnificance And Smoldering Myeloma In High Risk Patients With Elevated Esr And Older Than 50 Years'' Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight ,NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, ss.39-39
10. Ünal A, Uzer E, Köker Y, Şıvgın S, Kaynar L, Çetin M, Eser B, Birekul A, **Özçoban Ö**, Aydın G'' Akut Ve Kronik Lösemiler - Allojenik Kök Hücre Nakli Sonrası Graft Versus Host Hastalığı Gelişen Hastalarda İmmün Yapılanma İle Lenfoid Hücre Alt Gruplarının Dağılımı'' Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight NEVŞEHİR, TÜRKİYE, 18-20 Nisan 2014, ss.40-40

ÖDÜLLER

1. **Sözlü bildiri birincilik ödülü**, Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight, Nevşehir, Türkiye
2. **Sözlü bildiri translasyonel hematoloji ödülü**, Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight, Nevşehir, Türkiye
3. **Sözlü bildiri ikincilik ödülü**, 1.Kök hücre ve hücresel tedaviler kongresi, Kocaeli, Türkiye

KATILINAN TOPLANTILAR

1. 3.Ulusal Geriatrik Kongresi, Ankara , Türkiye, 2014
2. XII. Ulusal Histoloji-Embriyoloji Kongresi, Ankara, Turkey, 2014

3. Deneysel Hematoloji Kongresi & EBMT Highlight, Nevşehir, Türkiye, 2014
4. 1. Kök hücre ve hücrel tedaviler kongresi, Türkiye, 2014
5. 3. Uluslararası öğrenci kök hücre kongresi, Nevşehir, Türkiye, 2014
6. Elektro manyetik alanlar sempozyumu, İstanbul, Türkiye, 2013
7. 3. Ulusal deneysel hayvanlar bilim kongresi, Kayseri, Türkiye, 2013
8. 1. Educational Meeting on EBMT Highlight Symposium, Kayseri, Türkiye, 2013

STAJLAR

1. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kanser Genetik Laboratuvarı, 2014 (Mart-Nisan), İzmir
2. Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Androloji Laboratuvarı, 2013-2014, Kayseri
3. Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İmmünoloji Laboratuvarı, 2010-2011, Kayseri

SERTİFİKALAR

1. Pedagojik Eğitim Sertifikası, Erciyes Üniversitesi, Türkiye, 2012
2. Araştırmacılar için Deney Hayvanları kullanım sertifikası, Erciyes Üniversitesi, Türkiye, 2013
3. Yoğunlaştırılmış Kök hücre kursu-Erasmus, Erciyes Üniversitesi, Türkiye, 2013
4. Cryotome Eğitim sertifikası, Erciyes Üniversitesi, Türkiye, 2014

DENEYİMLER

1. **Sekreter**, Lösemi, Lenfoma Hasta Ve Yakınları Dayanışma, Eğitim Ve Geliştirme Derneği
2. **Sekreter**, Deneysel Hematoloji Derneği
3. **Üye**, Kök Hücre Ve Hücrel Tedaviler Derneği

4. **Organizasyon komite üyesi**, 1st Educational Meeting on EBMT Highlight Sempozyum
5. **Organizasyon komite üyesi**, 3. Uluslararası Öğrenci Kök Hücre Kongresi
6. **Organizasyon komite üyesi**, Deneysel Hematoloji Kongresi