

**T.C.**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLERİ BABA YAŞININ OKSİDATİF STRES, DNA  
FRAGMENTASYONU, KROMATİN YAPI VE PARP PROTEİNİNİN  
EKSPRESYON SEVİYELERİNE OLAN ETKİSİ**

**AYLİN YAŞAR**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE**

**2022**

**T.C.  
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLERİ BABA YAŞININ OKSİDATİF STRES,  
DNA FRAGMENTASYONU, KROMATİN YAPI  
VE PARP PROTEİNİNİN EKSPRESYON  
SEVİYELERİNE OLAN ETKİSİ**

**AYLİN YAŞAR  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI  
PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU-ZERGEROĞLU  
II. TEZ DANIŞMANI  
DR. ÖĞR. ÜYESİ SEDA KARABULUT**

**GEBZE  
2022**

**T.R.**  
**GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY**  
**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**THE EFFECT OF ADVANCED PATERNAL  
AGE ON OXIDATIVE STRESS, DNA  
FRAGMENTATION, CHROMATIN STRUCTURE  
AND EXPRESSION LEVELS OF PARP PROTEIN**

**AYLİN YAŞAR**

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

**THESIS SUPERVISOR**

**PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU-ZERGEROĞLU**

**II. THESIS SUPERVISOR**

**ASSIST. PROF. DR. SEDA KARABULUT**

**GEBZE**

**2022**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 09/06/2022 tarih ve 2022/28 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 13/06/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Aylin YAŞAR'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

**JÜRİ**

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Hilal EREN GÖZEL

ÜYE

: Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

**ONAY**

Gebze Teknik Üniversitesi ..... Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun  
...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

## ÖZET

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre kısırlık, en az 12 ay boyunca korunmasız cinsel ilişkiye girmesine rağmen hamile kalamama olarak tanımlanmaktadır. İleri baba yaşı için en yaygın olarak kullanılan sınır, gebe kalma anında 40 yaş ve üstü olarak tanımlanmaktadır. Çalışmalar, yaşlanma ile oksidatif stres, DNA fragmentasyonu ve spermde kromatin bütünlüğünün bozulması arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada; ileri baba yaşının oksidatif stres, DNA fragmentasyonu, kromatin yapısı ve PARP protein ekspresyon düzeyleri üzerine etkileri incelenerek ileri baba yaşı ile infertilite arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmaktadır.

İnfertilite nedeniyle tüp bebek merkezine başvuran hastalardan 20 ileri yaşa sahip (>40 yaş) ve 20 genç yaşa sahip (<40 yaş) erkekte Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) ve Annexin V/Propidyum İyodür (PI) boyama yöntemi ile DNA fragmentasyonu; Total Oksidan Seviyesi (TOS) ve Total Antioksidan Seviyesi (TAS) analizi ile oksidatif durum; Toluidine Mavi boyaması ile kromatin yapı ve İmmünohistokimyasal analiz ile PARP ekspresyon seviyesi analizleri yapılmıştır.

Çalışmamız sonucunda ileri yaştaki erkeklerde (>40) genç erkeklere (<40) göre daha yüksek seviyede sperm kromatin bütünlüğü bozulması ve DNA fragmentasyonu olduğu gözlemlenmiştir. Buradan yola çıkarak ileri baba yaşının sperm DNA ve kromatin yapısını bozabileceği ve dolayısıyla infertiliteye neden olabileceği sonucuna ulaşılabilmektedir. Ancak oksidatif stres ve PARP ekspresyonunda istatistiksel istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar gözlemlenmemiştir. İleri baba yaşının infertilite etkileriyle ilgili yapılacak daha ileri analizlere ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler: İleri baba yaşı, Oksidatif stres, DNA fragmentasyonu, Kromatin yapı, PARP.**

## SUMMARY

According to the World Health Organization, infertility is defined as the inability to get pregnant despite having frequent unprotected sexual intercourse for at least 12 months. The most commonly used limit for advanced paternal age is defined as 40 years and above at the time of conception. Studies have shown that there is a relationship between aging and oxidative stress, DNA fragmentation and disruption of chromatin integrity in sperm.

In this study; it is aimed to investigate the relationship between advanced paternal age and infertility by examining the effects of advanced paternal age on oxidative stress, DNA fragmentation, chromatin structure and expression levels of PARP protein.

DNA fragmentation rates were investigated by Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) and Annexin V/Propidium Iodide (PI) staining method; Total Oxidant Level (TOS) and Total Antioxidant Level (TAS) analysis for oxidative status determination; Toluidine Blue staining for chromatin structure determination and Immunohistochemical analysis for PARP expression level in 20 older (>40 of age) and 20 young (<40 of age) men from patients who applied an IVF center due to infertility.

As a result of our study, it was observed that older men (>40) had a higher sperm chromatin integrity disruption and DNA fragmentation than younger men (<40). It can be concluded that the advanced paternal age may disrupt the sperm DNA and chromatin structure and thus may cause infertility. However, significant difference results were not observed in oxidative stress and PARP expression. Further analyzes are needed to clarify the effects of advanced paternal age on infertility.

**Keywords: Advanced paternal age, Oxidative stress, DNA fragmentation, Chromatin structure, PARP.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresinde bu süreci en güzel ve verimli şekilde geçirmem konusunda bana destek olan, yardıma ihtiyacım olduğu her zaman ulaşılabilir olduğum, yapabileceğimin en iyisini yapmam konusunda beni cesaretlendiren, bu süreç boyunca her aşamada varlıklarını hissettiğim ve akademik hayatın yanı sıra özel hayatımda da rahatça sohbet edip tecrübelerinden yararlanabildiğim çok değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Asuman Demiroğlu-Zergeroğlu ve Dr. Öğr. Üyesi Seda Karabulut'a sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte birlikte düşüp el ele birlikte kalktığım, iyi ki birlikte bu yolda olduk diyebildiğim yol arkadaşlarım Şeyda, Can ve Melek'e teşekkür ederim.

Sen yaparsın diyerek beni cesaretlendiren, bu süreçte desteğini hep hissettiğim, sevgisiyle geleceğe umutla baktıran nişanlım Turgay Akpolat'a çok teşekkür ederim.

Bu zorlu yüksek lisans süreci dahil olmak üzere eğitim hayatımda ve hayatımın diğer her anında beni her daim cesaretlendiren, destekleyen ve bunu her zaman hissettiren dünyanın en güzel kalpli insanı olan hayattaki en iyi arkadaşım canım annem Nurhayat Yaşar'a, bugüne kadar benim için her şeyin en iyisi ve en güzeli olsun diye uğraşan dünyanın en çalışkan insanı olan canım babam Cevat Yaşar'a ve arkamda, sağımda, solumda varlığını hep hissettiğim en büyük destekçim, bazen küçük münzur kardeşim ama aslında ağabeyim olan canımın içi Orhan Yaşar'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması G.T.Ü BAP 2021-A-101-10 tarafından desteklenmiştir, teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı 2021/1 kapsamında tarafıma burs desteği sağladığı için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	13
1.1. Tezin Amacı	14
2. GENEL BİLGİLER	15
2.1. İnfertilite	15
2.1.1. Erkek İnfertilitesi	15
2.1.2. İleri Baba Yaşı ve İnfertilite	16
2.2. Oksidatif Stres	18
2.2.1. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi	19
2.2.2. İleri Baba Yaşı ve Oksidatif Stres	22
2.3. DNA Fragmantasyonu ve Erkek İnfertilitesi	24
2.3.1. İleri Baba Yaşı ve DNA Fragmantasyonu	25
2.4. Kromatin Yapı ve Erkek İnfertilitesi	26
2.4.1. İleri Baba Yaşı ve Kromatin Yapı	27
2.5. PARP Proteini ve Erkek İnfertilitesi	27
2.5.1. PARP Enziminin Eşey Hücre Ölümündeki Rolü	28
2.5.2. İleri Baba Yaşı ve PARP	30
3. MATERYAL VE METOT	31
3.1. Etik Onayı	31
3.2. Hastaların Seçilmesi ve Sperm Örneklerinin Toplanması	31
3.3. Hasta Dışlama Faktörleri	31
3.4. Sperm Örneklerinin Hazırlanması	32
3.5. Spermioqram (Sperm analizi)	32

3.5.1. Sperm Konsantrasyonu	32
3.5.2. Sperm Morfolojisi	33
3.5.3. Sperm Motilitesi	33
3.6. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi	33
3.6.1. Total Oksidan Seviye Tespiti	35
3.6.2. Total Antioksidan Seviye Tespiti	36
3.7. DNA Fragmantasyonu Analizi	37
3.7.1. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)	37
3.7.2. Annexin V/Propidyum İyodür (PI) Boyama	38
3.8. Sperm Kromatin Yapı Analizi	39
3.9. PARP Proteini İmmünohistokimyasal Analizi	40
3.10. Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar	42
3.11. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. Sperm Parametreleri Analizi	44
4.2. Oksidatif Stres Parametreleri Analizi	45
4.3. DNA Fragmantasyonu Analizi	47
4.4. Sperm Kromatin Yapı Analizi	50
4.5. PARP Proteini İmmünohistokimyasal Ekspresyonu Analizi	53
5. TARTIŞMA	58
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	75

# SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

## Simgeler ve Açıklamalar

### Kısaltmalar

cPARP	: Bölünmüş PARP (cleaved PARP)
Cu	: Bakır
DAB	: Diaminobenzidin
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ED	: Erektile disfonksiyon
Fe	: Demir
IRS	: İmmünoreaktivite Skor
İHC	: İmmünohistokimya
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
PI	: Propidyum İyodür
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
RONT	: Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SCSA	: Sperm Chromatin Structure Assay (Sperm Kromatin Yapı Analizi)
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TAS	: Toplam Antioksidan Seviyesi
TOS	: Toplam Oksidan Seviyesi
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling

# ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.2.1: Membran bağlı NADPH oksidaz enzimi ve NADPH dehidrojenaz tarafından reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi.	21
2.2.1.2: Reaktif oksijen türlerinin (ROT) fizyolojik ve patolojik rolü; endojen ve eksojen seminal reaktif oksijen türleri kaynakları tarafından aşırı ROT üretimi.	22
3.6.1: Total Oksidan Seviyesi (TOS) kiti.	34
3.6.2: Total Antioksidan Seviyesi (TAS) kiti.	34
3.6.1.1: Kitin içerisinde hazır bulunan Reagent 1'in tüm kuyucuklara eklenmesi.	35
3.6.1.2: Spektrofotometre ile absorbans ölçümü.	36
3.7.1: HaloSperm kit.	38
3.8: Toluidine Mavi boyası.	39
3.9.1: Mouse and Rabbit Specific HRP (ABC) Detection IHC kit.	42
3.9.2: DAB Substrat kit.	42
4.1: Sperm parametreleri analiz sonuçları.	45
4.2: Oksidatif stres indeksi analizi sonuçları.	47
4.3.1: DNA fragmentasyonu analizi sonuçları.	48
4.3.2: SCSA ile analiz edilen halo gözlenmeyen DNA'sı fragmente olmuş sperm hücreleri.	49
4.3.3: SCSA ile analiz edilen halo gözlenen DNA'sı fragmente olmamış sperm hücreleri.	49
4.3.4: DNA fragmentasyonu (Annexin V/Propidyum İyodür (PI) boyama) analiz sonuçları.	50
4.4.1: Sperm kromatin yapısı analizi sonuçları.	52
4.4.2: Kromatin yapısı normal ve bozulmuş olan sperm hücreleri.	53
4.5.1: Immünoreaktivite Skor (IRS) analizi sonuçları.	55
4.5.2: PARP protein ekspresyonu immünohistokimyasal analizi.	56
4.5.3: PARP protein ekspresyonu immünohistokimyasal analizi.	56
4.5.4: PARP protein ekspresyonu immünohistokimyasal analizi.	57

# TABLÖLAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.1: Sperm parametreleri istatistiksel analizi.	44
4.2.1: Tüm hastaların oksidatif stres parametre değerleri.	46
4.2.2: Oksidatif stres indeksinin istatistiksel analizi.	47
4.3: DNA fragmantasyonu istatistiksel analizi.	48
4.4.1: Tüm hastaların kromatin yapısı inceleme sonuçları.	51
4.4.2: Sperm kromatin yapı bütünlüğünün istatistiksel sonuçları.	52
4.5.1: Tüm hastaların PARP protein ekspresyonu inceleme sonuçları.	54
4.5.2: PARP protein ekspresyonu istatistik sonuçları.	55

# 1. GİRİŞ

İnfertilite; Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından çiftlerin çeşitli korunma yöntemlerinden herhangi birini kullanmadan en az bir yıl boyunca düzenli olarak ilişkiye girmelerine rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanmaktadır [Zegers-Hochschild et al., 2009]. Korunma yöntemlerinden herhangi birini kullanmayan çiftlerin yaklaşık %15'i bu durumdan etkilenmektedir [Sharlip et al., 2002]. İnfertil çiftlerin yaklaşık %85'inin tanımlanabilir bir nedeni bulunurken; çiftlerin kalan %15'inde de "açıklanamayan infertilite" bulunmaktadır [Carson and Kallen, 2021]. Bu sorunun son yıllara kadar kadın kaynaklı olduğu düşünülmesine rağmen yapılan çalışmalarla tek taraflı bir durum olmadığı ortaya çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan çok merkezli bir çalışma, vakaların %38'inde sorunun ağırlıklı olarak kadınlardan kaynaklı olduğunu, %20'sinde sorunun ağırlıklı olarak erkeklerden kaynaklı olduğunu, %27'sinde her iki partnerde de anormalliklerin bulunduğunu ve kalan %15'inde ise kesin bir infertilite sebebi belirlenemediğini ortaya çıkarmaktadır [De Kretser, 1997].

Günümüzde çiftler çocuk sahibi olmayı otuzlu yaşlarının sonlarına kadar geciktirmektedir. Bu durumda çiftlerin kariyer hedefleri, eğitim sürelerinin uzaması, eskiye göre hayat beklentilerinin artması, yaşam şartları ve ekonomik şartlar ile doğum kontrol yöntemlerinin kullanılması gibi sebepler çocuk sahibi olma yaşını yükseltmektedir [Kervancıoğlu Demirci vd., 2020]. Bunların yanı sıra, gebe kalmaya yönelik geleneksel yöntemler başarılı olmazsa gelişen tüp bebek tedavisinin imdada yetişeceğine dair güvence çiftlerin çocuk sahibi olmayı geciktirme eğilimiyle sonuçlanmaktadır [Kovac et al., 2013].

Biyolojik saat nedeniyle kadınlarda 50 yaşın üzerinde fertilite oranı oldukça düşükken; erkeklerde sperm ve androjen üretiminin ömürleri boyunca sürmesi ve 50 yaşın üstünde de baba olabilmesinden dolayı fertilite sınırının belirlenmesi zorlaşmaktadır [Kervancıoğlu Demirci vd., 2020]. Bu nedenle ileri anne yaşının infertilite ile olan ilişkisi, ileri baba yaşının infertiliteyle olan ilişkisinden daha açık olmakla birlikte, günümüzde ileri baba yaşı araştırılmaya devam edilmektedir [Yıldırım vd., 2020]. Kadınlarda otuzlu yaşlarının sonlarına doğru oosit üretiminde kayda değer bir düşüş meydana gelirken, yaşın spermatogenez üzerindeki etkisi daha az tanımlanmaktadır. Kadınlar, çocuk sahibi olmalarının doğal bir sınırı olduğunu

yıllardır bilmektedirler. Erkeklerde ise çocuk sahibi olma konusunda bilinen bir yaş sınırı bulunmamakta ve ileri babalık yaşının etkileri tam olarak anlaşılamamaktadır [Kovac et al., 2013].

İleri baba yaşı, infertilite ve diğer üreme riskleriyle alakalı olup henüz tanımı için bir fikir birliği bulunmamaktadır. İleri baba yaşı için Amerikan Tıbbi Genetik Koleji ve diğer topluluklar tarafından en sık kullanılan sınır, gebe kalma anında 40 yaş ve üstü olarak tanımlamaktadır [Brandt et al., 2019]. İleri baba yaşının evrensel bir tanımı ve kesin bir yaş sınırı olmamasından dolayı bu konuda çalışma yapılması zor bir hale gelmektedir. Bu nedenle ileri baba yaşına dayalı daha fazla veri toplamaya, kılavuzlara ve sonuç araştırmalarına ihtiyaç duyulmaktadır [Kovac et al., 2013].

Yapılan araştırmaların çoğu erkek yaşının infertiliteye neden olmadığı yönünde bir sonuç vermesine rağmen [Dain et al., 2011], özellikle son zamanlarda ilerleyen erkek yaşı ile sperm parametreleri, sperm fonksiyonu ve genetiği arasındaki ilişkiyi araştıran araştırmaların sayısında önemli bir artış gözlenmektedir [Kervancıoğlu Demirci vd., 2020], [Kovac et al., 2013], [Yıldırım vd., 2020].

## **1.1. Tezin Amacı**

Bu tez çalışmasında; ileri baba yaşının oksidatif stres, DNA fragmantasyonu, kromatin yapısı gibi genetik parametreler ve PARP proteininin ekspresyon düzeyleri üzerine etkisinin incelenmesi ile literatürdeki ileri baba yaşı ve infertilite arasındaki ilişki hakkındaki belirsizlikleri aydınlatmak hedeflenmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İnfertilite

İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü'ne göre çiftlerin korunmasız olarak en az 12 ay düzenli olarak ilişkiye girmelerine rağmen gebeliğin oluşmaması durumu olarak tanımlanmaktadır [Zegers-Hochschild et al., 2009]. Korunmayan ve düzeli ilişkiye giren çiftlerin %85'inde 12 ay içinde gebelik meydana gelirken %15'inde infertilite görülmektedir [Sharlip et al., 2002]. İnfertilite vakaları dünya genelinde, %40-50 oranında kadın kaynaklı, %30-40 oranında erkek, %20 oranında hem erkek hem kadın kaynaklı olabilirken kalan %10'luk oranında ise infertilitenin nedenininin tam olarak anlaşılamadığı durum olan açıklanamayan infertilite olarak sınıflandırılmaktadır [Agarwal et al., 2015].

İnfertilite sorunu yaşayan çiftler yardımla üreme teknikleri sayesinde çocuk sahibi olma şansı taşımaktadırlar. Ancak bu yöntem ile de gebeliğin meydana gelmesi kesin olmadığından hem maddi hem manevi olarak çiftler zorluk yaşayabilmektedir. Son zamanlarda infertilite tedavisi ve yardımla üreme tekniklerinde başarı şansı yaklaşık %40 civarındadır ve bu başarı birçok parametreye bağlı olduğundan bu oranı artırmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır [Sadeghi, 2018].

#### 2.1.1. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite; erkek, kadın kaynaklı veya açıklanamayan nedenlere bağlı olabilmektedir. Erkek infertilitesi birçok araştırmaya konu olmaktadır. Çiftlerin yaşadığı infertilitede erkekler bu sorunun %20'sinden tek başına sorumlu durumdayken toplam vakalarda yaklaşık %50'sininden sorumlu olduğu bildirilmektedir [Agarwal et al., 2015].

Erkek infertilitesi tanısının koyulmasında ilk sırada gelen en önemli basamak semen analizi yapmaktır [Sharma et al., 2015]. Erkek bireylerden üreme hücrelerinin temininin, kadın hastalardan üreme hücrelerinin temin edilmesine kıyasla son derece kolay olmasından dolayı semen analizi laboratuvar koşullarında yapılan en basit testlerden olmaktadır. Bundan dolayı da erkek infertilitesinin araştırılması için bir avantaj oluşmaktadır [Kervancıoğlu Demirci vd., 2020]. Semen analiziyle ele alınan

sperm sayısının infertilite ile ilgili önemli fikirler edinme fırsatı sunmaktadır [Colasante et al., 2018]. Yapılan bir çalışmada, son 50 yılda sperm sayısında bir düşüşün olduğu belirlenmiş ve erkek infertilitesinin bir dereceye kadar sperm sayısı ile ilişkili olması sebebiyle erkek infertilitesinin arttığı ortaya konmuştur [Carlsen et al., 1992].

Erkek infertilitesine neden olan birçok faktör bulunmaktadır. Bu nedenler arasında çevresel faktörler, yaşam tarzı faktörleri ve hormonal bozukluklar, genetik hastalıklar gibi sağlık faktörleri sayılabilmektedir [Kesari et al., 2018]. Ayrıca fiziksel aktivite eksikliği, kötü beslenme ve aşırı kafein tüketiminin de erkek infertilitesini arttırdığı belirlenmiştir [Ilacqua et al., 2018]. Bunların yanı sıra oksidatif strese neden olabilecek alkol, uyuşturucu ya da sigara tüketimi, psikolojik stres, radyasyona maruz kalma gibi faktörlerde bu soruna neden olabilmektedir. Varikosel varlığı, enfeksiyon, iltihaplanma gibi durumlarda oksidatif stres kaynaklı erkek infertilitesi ile ilişkilendirilmektedir [Dutta, 2019]. Erkek infertilitesinin, cep telefonu ve dizüstü bilgisayar gibi çeşitli teknolojik cihazların sık kullanımına bağlı olarak sokrotumun ısıya ve radyasyona yoğun bir şekilde maruz kalması durumundan etkilendiği düşünülmektedir [Kesari et al., 2018], [Ilacqua et al., 2018], [Du Plessis et al., 2014].

### **2.1.2. İleri Baba Yaşı ve İnfertilite**

Son dönemlerde baba yaşının da yükseldiği gözlenmektedir. Baba olma yaşı ile ilgili olarak farklı ülkelerde yapılan çalışmalardaki veriler ile de baba olma yaşının yükseldiği desteklenmektedir [Kervancıoğlu Demirci vd., 2020]. ABD'de son kırk yılda ortalama baba yaşı 27,4'ten 30,9'a yükselmiş olup; 1972 ve 2015 yılları arasında 40 yaş üstü baba olma %4,1'den %8,9'a ve 50 yaş üzerinde ise %0,5'ten %0,9'a yükselmiştir [Khandwala et al., 2017]. Yine benzer bir artış 1980 ve 2002 yılları arasında İngiltere ve Galler'de ortalama babalık yaşının 29,2'den 32,1'e çıkmasıyla birlikte kaydedilmiştir [Bray et al., 2006].

Çiftlerin bebek sahibi olma isteğini ileri yaşlara ertelemelerinin nedenleri muhtemelen çok faktörlü olmakla birlikte son yıllardaki modern toplumsal baskılar ve beklentilerden kaynaklanabilmektedir [Kovac et al., 2013]. Günümüzdeki çiftlerin eğitim düzeyindeki değişiklikler, kariyer, ekonomik şartlar ve hayat beklentilerinin artması evlenme ve çocuk sahibi olma yaşlarını yükseltmektedir [Yıldırım vd., 2020].

Bunlara ek olarak, yardımcı üreme teknolojilerinin kullanımının artması ve artan yaş gibi doğal yolla gebe kalmanın önündeki bazı engellere rağmen yine bu teknolojiler sayesinde gebelik sağlanmasına da güvenerek bebek sahibi olma ertelenebilmektedir [Mazur et al., 2018]. Ancak bu teknolojilerin gelişmesine rağmen ileri baba yaşı doğurganlık ve yavru sağlığı üzerindeki olumsuz etkisini destekleyen artan veriler göz önüne alındığında, bu durum çiftler için önem göstermektedir.

Erkeklerin çocuk sahibi olabileceği yaş hakkında bilinen bir sınır bulunmadığı için ileri babalık yaşının etkileri araştırılmaya devam edilmektedir. İleri baba yaşı için kesin bir tanım bulunmamakla birlikte kullanılan en yaygın kriter gebe kalma sırasındaki yaşın 40 ve üstü olması durumudur [Mazur et al., 2018].

Kadınlarda ileri yaşın bebek sahibi olma üzerindeki olumsuz etkisi ve nedenleri iyi belgelenmiş olmasına rağmen ileri baba yaşının etkisi ve nedenleri hakkında daha az şey bilinmektedir [Mazur et al., 2018]. Ancak bu konu özellikle son yıllarda daha fazla dikkat çekmiş olup üzerinde yapılan araştırmalar artmaktadır. Yapılan bir araştırma artan baba yaşı ile sadece mutasyonun artmadığını aynı zamanda sperm kalitesinin de olumsuz etkilediğini bildirmektedir [Yenice vd., 2016]. Yine yapılan çeşitli çalışmalar sperm parametrelerinin infertilite ile ilgili önemli bilgiler sunduğunu belirterek semen hacminin, sperm motilitesinin ve sperm morfolojisinin yaş ile azaldığını göstermektedir [Kühnert and Nieschlag, 2004]. Erkeklerde testis yaşlanması, semen kalitesini etkileyebilen ve sonuç olarak dölleme kapasitesinin azalmasına ve düşük yapma riskinin artmasına neden olan üreme hormonal ve hücrel değişikliklere neden olduğu yapılan araştırmalarla ortaya koyulmaktadır [Nijs vd., 2011]. Ayrıca çiftlerde hem erkek 40 yaşından büyük hem de kadın partner ileri yaştaysa, çocuk sahibi olma ihtimalinin azalması durumu görülmektedir [Kühnert and Nieschlag, 2004]. De La Rochebrochard & Thonneau (2002), büyük bir retrospektif popülasyona dayalı çalışmada, erkek yaşı 40 ve üstü olduğunda gebelik sonucu üzerinde net bir olumsuz etki belirlemiştir [Nijs vd., 2011]. Yapılan son çalışmalarda, ileri yaşta erkeklerin, sperm genetiğindeki genel olumsuz değişiklikler de dahil olmak üzere, daha kötü semen parametrelerine sahip olduğunu doğrulamaktadır [Mazur et al., 2018].

Bunlara ek olarak, erkekler yaşı ilerledikçe, ürolojik sorunlarda ortaya çıkabilir ve bu da bir erkeğin doğurganlık potansiyelini olumsuz etkileyebilmektedir [Mazur et al., 2018]. Ayrıca ilerleyen yaş ile erektil disfonksiyon (ED) arasındaki ilişki iyi bilinmektedir [Selvin vd., 2007]. Araştırmalar erektil disfonksiyon'un gebeye kalmaya

engel olduğunu göstermektedir [Brewis and Meyer, 2005] ve bu yüzden ileri baba yaşının ED'den dolayı bebek sahibi olmada sorun çıkarabileceği açıktır. Yapılan diğer araştırmalar; ejakülatör disfonksiyon 50-54 yaşındaki erkeklerde %3'ten 70-78 yaşındakilerde %35'e yükseldiğini göstermektedir [Blanker et al., 2001]. Ayrıca özellikle ileri yaştaki erkeklerde görülebilen prostat kanseri ve mesane kanseri gibi hastalıklarla ilişkili diğer durumlarda erkeğin doğurganlık potansiyelini olumsuz etkileyebilmektedir [Avellino et al., 2017].

## 2.2. Oksidatif Stres

Dış kabuklarında eşleşmemiş bir veya daha fazla elektron içeren kısa ömürlü yüksek derecede reaktif atomlar veya moleküllere serbest radikaller denmektedir. Serbest radikaller, oksijen belirli moleküllerle etkileşime girdiğinde meydana gelebilmektedir [Chandrasekaran et al., 2017]. Hücrelerde tek bir elektron kaybederek veya alarak üretilen serbest radikaller oksidan veya indirgeyici gibi davranmaktadırlar [Lobo et al., 2010]. Serbest radikaller oldukça yüksek reaktivlik gösterdiklerinden dolayı lipidleri, amino asitleri ve karbonhidratlar gibi hücrel makromolekülleri okside edebilmektedir. Bunların yanı sıra DNA mutasyonlarına neden olabilmektedir [Sanocka and Kurpisz, 2004].

Oksijen ve nitrojenin reaktif radikal ve radikal olmayan türevlerini ifade etmek için sırasıyla reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif nitrojen türleri (RNT) terimleri kullanılmaktadır [Powers et al., 2011]. Çeşitli endojen ve eksojen süreçlerle üretilen reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (RONT) üretimi çeşitli olumsuzluklara sebep olabilmektedir. Bu olumsuz etkiler antioksidan savunma biyolojik sistemleri sayesinde nötralize edilmektedir. Oksidatif stres, RONT üretimi ve bu antioksidan savunmalar arasında dengesizliğin ortaya çıkmasıyla meydana gelmektedir [Liguori et al., 2018]. Bu şekilde meydana gelen oksidatif stres çeşitli akut ve kronik hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. Bu hastalıkların başında kanser, diyabet, Alzheimer dahil olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalıklar, böbrek hastalıkları, hipertansiyon, yüksek kolesterol ve obezite gelmektedir [Liguori et al., 2018].

### 2.2.1. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi

Sperm hücresi işlev bozukluğunun en önemli sebeplerinden biri oksidatif strestir. Yapılan çalışmalar, spermatozoanın hem yapısal hem de işlevsel bütünlüğünün bozulmasında oksidatif stresin etkili olduğunu ortaya koymaktadır [Aitken and Baker, 2006]. Yine yapılan bir çalışmadan alınan istatistiklerde infertil erkeklerin yaklaşık %40'ının seminal plazmalarında yüksek ROT seviyelerinin saptandığı görülmektedir. Bu sonuçlardan da oksidatif stresin erkek infertilitesinin en önemli nedenlerinden biri olduğu anlaşılmaktadır [Lanzafame et al., 2009].

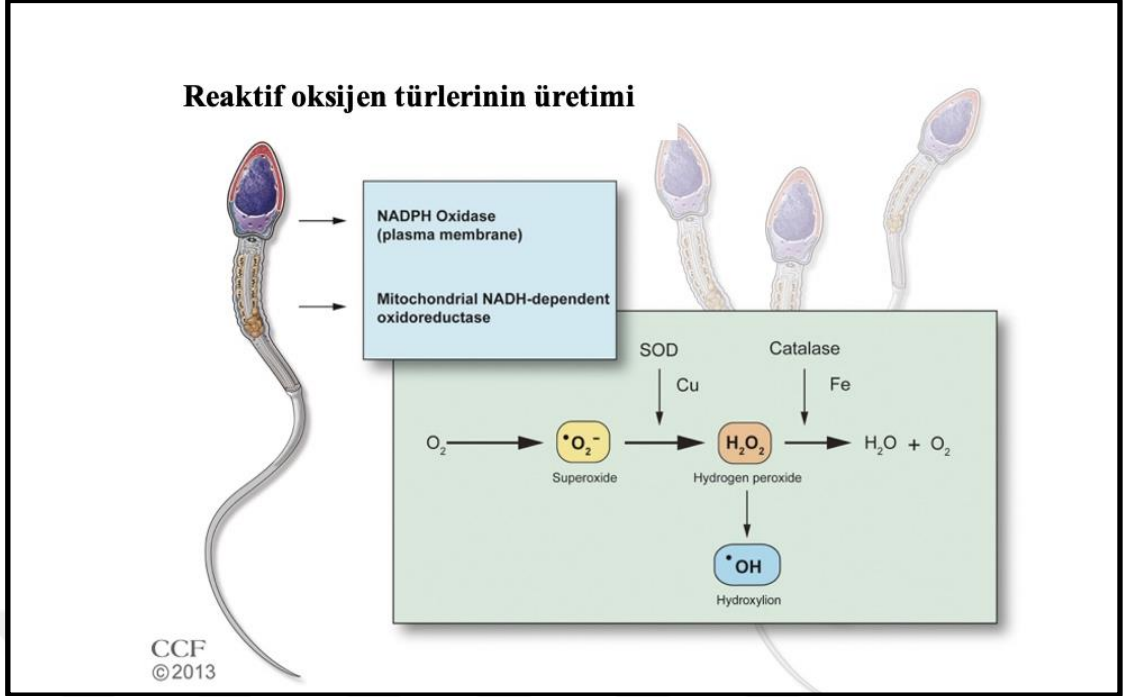
Sağlıklı bir vücutta pro-oksidanlar ve antioksidanlar denge durumundadır. Sperm, antioksidan savunma mekanizmaları ile donatılmıştır ve reaktif oksijen türlerini bastırması olağandır. Bu antioksidan savunma mekanizmaları sayesinde gonadal hücreler ve olgun spermiler oksidatif hasardan korunmaktadır [Henkel, 2011]. Aksi durumda ise kontrolsüz ROT üretimi, seminal plazmanın antioksidan kapasitesini aşarak antioksidan savunma mekanizmasını bastırıp oksidatif stres ile sonuçlanmaktadır. Düşük ROT seviyeleri normal sperm işlevi için gerekli durumdayken; yüksek ROT seviyeleri spermilerin kalitesinin düşmesine neden olarak dölleme kapasitelerini bozabilir [Agarwal et al., 2014]. ROT çeşitli olumsuz durumlara sebep olabilmektedir; lipitlere, proteinlere ve DNA'ya saldırabilir, enzimatik sistemleri değiştirebilir, geri döndürülemez değişikliklere ve hücre ölümüne neden olabilir, ayrıca, erkek infertilitesi ile ilgili olan semen parametrelerinde düşüşe yol açabilmektedir [Lanzafame et al., 2009].

Bazı durumlarda oksidanların neden olduğu hasar onarılabilirken spermatozoa, ihtiyaç duyulan sitoplazmik enzim onarım sistemlerini içermediklerinden oksidatif stresin sebep olduğu hasarı onaramazlar. Bundan dolayı, spermatozoa oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır [Saleh and Agarwal, 2002]. Spermatozoa hücre zarı çoklu doymamış yağ asitleri bakımından oldukça zengin durumdadır. Bu durum bu hücreleri oksijenin sebep olduğu hasara ve böylelikle de lipid peroksidasyonuna karşı hassas duruma getirmektedir. Bunun sonucunda ise oksidatif strese karşı bu hücreler daha duyarlı olmaktadır. Ardından, lipid peroksidasyonundan hızlı bir hücre içi ATP kaybı, aksonom hasarına, sperm canlılığının azalmasına ve orta parça sperm morfolojik kusurlarının artmasına neden olur ve bunların tümü, sperm motilitesinin azalmasına katkıda bulunur [Bansal and Bilaspuri, 2011],[Gharagozloo and Aitken, 2011]. Aynı

zamanda bu programlanmış sıralı bozulma yolu zayıf dölllenme, zayıf embriyonik gelişim, gebelik kaybı, doğum kusurları ve çocukluk kanseri gibi sorunlar ile sonuçlanması gerçeği nedeniyle oksidatif stres büyük bir endişe alanı haline gelmektedir [Tremellen, 2008], [Aitken et al., 2010].

Sperm plazma membranı seviyesinde nikotinamid adenin dinükleotit fosfat oksidaz sistemi (1) ve mitokondriyal seviyede nikotinamid adenin dinükleotit bağımlı oksido-redüktaz reaksiyonu (2) olmak üzere iki yöntemle spermatozoada ROT üretimi gerçekleşebilir. ROT'un ana kaynağı olarak bunlardan ikinci mekanizma gibi görünmektedir. Hareketlilikleri için sürekli bir enerji kaynağı gerekli olduğu için spermatozoa mitokondri açısından oldukça zengindir [Henkel, 2011]. Bundan dolayı, semende işlevi olmayan spermatozoanın varlığı, ROT üretimini önemli ölçüde artırır, bu da mitokondriyal işlevini ve bunun sonucunda da motilite gibi spermin işlevini etkilemektedir.

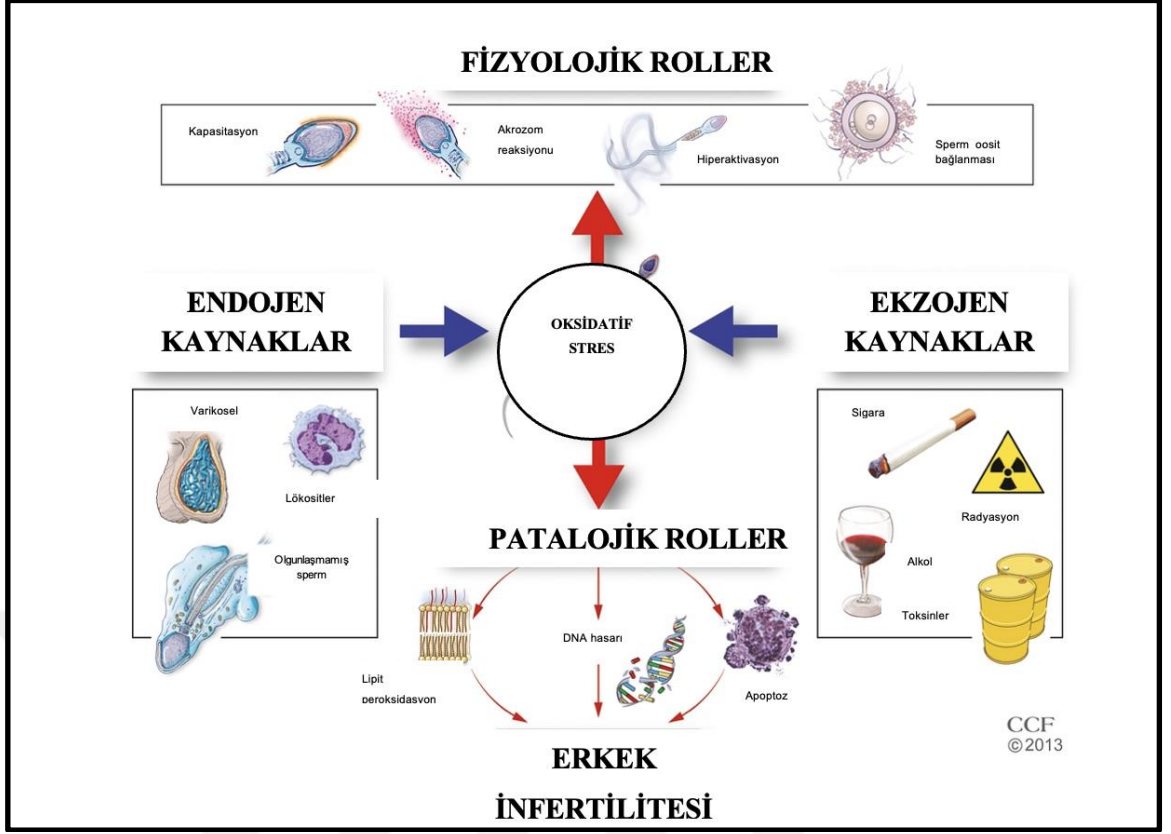
$O_2^-$  ; insan spermatozoasında üretilen ROT'un büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır.  $H_2O_2$  üretmek için  $O_2^-$ 'nin elektronu indirgenmiş bu ürünü dismutasyon reaksiyonu ile kendisiyle reaksiyona girmektedir. Demir ve bakır gibi geçiş metallere varlığında,  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$ , son derece reaktif ve yıkıcı  $OH^-$  üretmek için Haber-Weiss reaksiyonuna girmektedir (Şekil 2.2.1) [Agarwal et al., 2018].  $OH^-$  radikalleri, lipid peroksidasyon kaskadının son derece güçlü başlatıcılarıdır ve membran akışkanlığının bozulmasından dolayı sperm fonksiyonunun kaybına yol açabilmektedir [Chen et al., 2013].



Şekil 2.2.1: Membran bağlı NADPH oksidaz enzimi ve NADPH dehidrojenaz tarafından reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi. NADPH: nikotinamid adenin dinükleotit fosfat, NADH: nikotinamid adenin dinükleotit, SOD: süperoksit dismutaz, Cu: bakır, Fe: Demir.

Sperm hücrelerinin içerisinde bulunduğu ve sperm hücrelerini besleyen bir ortam sunan seminal plazmada bulunan ROT, çeşitli endojen ve eksojen kaynaklardan meydana gelmektedir. Seminal plazmanın içerisinde sperm hücreleri dışında; olgun ve olgunlaşmamış hücreler, lökositler, varikozel ve epitel hücreleri dahil olmak üzere farklı hücre tipleri bulunmaktadır. ROT'un ana endojen kaynakları olarak lökositler ve olgunlaşmamış spermatozoa kabul edilmektedir. Aşırı sigara ve alkol tüketimi, radyasyon ve toksinler ise eksojen ROT kaynakları olarak kabul edilmektedir (Şekil 2.2.1.2) [Choudhary et al., 2010], [Esteves, 2002], [Robert, 2021].

Patolojik seviyelerdeki yüksek ROT konsantrasyonları antioksidan savunma sistemlerini aştığında yani aradaki denge bozulduğunda DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve apoptoz gibi ciddi durumlar meydana gelip sperm motilitesi ve sperm canlılığı kaybına neden olarak erkek infertilitesine yol açarken; fizyolojik seviyelerdeki (düşük ve kontrollü) ROT konsantrasyonları hücre içi sinyal yollarını düzenleyerek kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyonu gibi süreçlerde önemli rol oynamaktadır (Şekil 2.2.1.2) [Saleh and Agarwal, 2002]. Şekil 2.2.1.2, menide artan ROT üretiminin erkek infertilitesi ile ilişkisini özetlemektedir [Robert, 2021].



Şekil 2.2.1.2: Reaktif oksijen türlerinin (ROT) fizyolojik ve patolojik rolü; endojen ve eksojen seminal reaktif oksijen türleri kaynakları tarafından aşırı ROT üretimi.

Araştırmalar hücrelerdeki oksitlenmiş moleküllerin yaklaşık %70 civarının proteinler olduğunu göstermektedir. Bu sonuca dayanarak ROT'un ana hedeflerinin proteinler olduğu bilinmektedir [Dahl et al., 2015]. Oksidatif stresten kaynaklanan proteinlerde meydana gelen modifikasyonlar, protein işlevlerinin bozulmasına ya da normal sperm fizyolojisi için gerekli olan sinyal yollarında çeşitli sorunlara sebep olabilmektedir [Dahl et al., 2015], [O'Flaherty and Matsushita-Fournier, 2017]. Bu modifikasyonların erkeklerde sperm motilitesinin azaltılmasında ve dolayısıyla erkek infertilitesinde önemli rol oynadığı ortaya konmaktadır [O'Flaherty and Matsushita-Fournier, 2017].

## 2.2.2. İleri Baba Yaşı ve Oksidatif Stres

Yapılan araştırmalar artan yaşla birlikte oksidatif stresin erkek infertilitesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir [Jervis and Robaire, 2004]. Bu araştırmalar; yaşın ilerlemesi ilgili değişikliklerden bazıları, antioksidan savunma sistemlerinin

bileşenlerinin değişmiş dağılımı [Mueller et al., 1998] ve antioksidan savunmalarda yer alan gen ürünlerinin ekspresyonunun azalması [Jervis and Robaire, 2002] gibi durumların oksidatif stresin epididim yaşlanmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Sperm üretimi sürekli meydana gelmesine rağmen yaşın ilerlemesi ile antioksidan savunma sistemi zamanla daha verimsizleşmekte ve spermatozoada yüksek seviyelerde ROT birikmektedir. Bundan dolayı da oksidasyon-redüksiyon dengesi bozulur ve oksidatif strese neden olabilmektedir [Jervis and Robaire, 2004], [Weir and Robaire, 2007]. Bundan dolayı yaşla birlikte artan oksidatif stres sperm hücrelerine zarar vererek ileri yaştaki erkeklerde infertilitesinde önemli sebeplerinden biri olabilir ve oksidatif stresin neden olduğu hasarın yaşa bağlı birikimini gösteren kanıtlar oldukça fazladır [Beckman and Ames, 1998].

Yapılan çalışmalar oksidatif stresin, sperm DNA'sında nükleik asit baz hasarı oluşturabildiğini ortaya çıkarmaktadır. Guanin bazı yüksek redoks potansiyeline sahip olduğundan dolayı ROT'un DNA'daki guanine saldırısı kolaylaşmaktadır. DNA'daki oksidatif hasarın bir belirteci olarak; 8-oxodG yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmalarda bu belirtecin infertil erkeklerin spermlerinde yükseldiği gözlenmektedir [Aitken et al., 2014]. Çift zincirli DNA kırılmalarındaki 3'-hidroksil uçlarını etiketleyerek DNA fragmentasyonu tespit eden Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) deneyi ile 8-oxodG ve sperm DNA hasarının yüksek oranda ilişkili olduğu belirlenmektedir. Bundan dolayı spermde meydana gelen DNA hasarının oksidasyondan kaynaklandığı araştırmalar ile kanıtlanmaktadır [Aitken et al., 2014]. Bundan dolayı DNA üzerindeki oksidatif hasar, DNA replikasyonunun engellenmesine ve sorunlu DNA onarımına yol açabilmektedir [Pole et al., 2016]. Sonuç olarak, yaşlı erkek eşey hücrelerinde onarılmadan kalan DNA hasarı, gelecek nesillere aktarılabilen ve büyük olasılıkla sonraki neslin sağlığı üzerinde olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir.

Yaşlanmanın oksidatif stres teorisi; yaşa bağlı fonksiyonel kayıpların RONT tarafından oksidatif hasarın lipid, protein ve DNA gibi makromoleküllerde birikmesinden kaynaklandığına dair yapısal hasara dayalı hipoteze dayanmaktadır [Beckman and Ames, 1998]. Oksidatif stresin sebep olduğu yaşlanmanın kesin mekanizması hala net olarak ortaya konmuş olmasa da muhtemelen artan RONT miktarları, replikasyon sırasında meydana gelen hasarlara cevap olarak hücrel

proliferasyonu engelleyen fizyolojik bir mekanizma olan hücrel yaşlanmayı indüklemektedir [Pole et al., 2016].

Selvaratnam ve Robaire gerçekleştirdikleri bir araştırmada *Sod1* ve *Cat* nakavt farelerini inceleyerek erkek eşey hücrelerinde yaşlanma ve oksidatif stresin neden olduğu etkilerini araştırdı [Selvaratnam and Robaire, 2016]. SOD1;  $O_2^{\cdot-}$ 'yi parçalayan ve CAT;  $H_2O_2$ 'yi nötralize eden ROT nötralizasyon yolundaki enzimatik antioksidanlardır. Yapılan çalışmada tüm yaşlı farelerde sertoli hücrelerinin, eşey hücrelerinin ve doğurganlığın oldukça azaldığını açığa çıkarmışlardır. Bunun yanı sıra yaşlanma ve *Sod1* geninin nakavt olduğu durumda, oksitlenmiş DNA'ya (8-oxodG) sahip daha yüksek sayıda spermatozoa ile sonuçlanmıştır [Selvaratnam and Robaire, 2016].

Hayvanlarda yapılan araştırmalardakine benzer şekilde, ileri yaştaki erkeklerde spermatogenez sırasında yaşla birlikte artan mitotik bölünme sayısı ve oksidatif stres sebebiyle genç erkeklere göre yüksek seviyelerde DNA hasarı gözlenmektedir [Kovac et al., 2013]. Örneğin; bir çalışmada 20-57 yaşları arasındaki 66 erkek incelenmiş olup 35 yaş üstündeki erkeklerin spermlerinin genç erkeklerin spermlerine göre önemli ölçüde daha fazla DNA kırılmasının olduğu açığa çıkmıştır [Singh et al., 2003]. Spermde meydana gelen DNA fragmentasyonunun çeşitli sebepleri vardır. Bu sebepler yaşlanmaya ek olarak enfeksiyonlar, tıkanıklık, iltihaplanma gibi durumların yanı sıra oksidatif stres olabilmektedir [Kovac et al., 2013], [Sharma et al., 2015].

### **2.3. DNA Fragmentasyonu ve Erkek İnfertilitesi**

Erkek infertilitesinin altında genetik anormallikler, varikosel, oksidatif stres, sistemik hastalık ve enfeksiyonlar, değişen yaşam tarzı gibi çeşitli faktörler var olduğu bilinmektedir [Tahmasbpour et al., 2014], [Cho et al., 2016]. Bu faktörlerin tümü, sperm DNA fragmentasyonunu etkileyebilmektedir [Selvam and Agarwal, 2018].

Yavruya DNA'nın yarısı babadan geldiği için sperm üzerinde DNA hasarının etkilerinin dikkate alınması oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle bu konu üzerine yapılan araştırmalar erkek infertilitesini etkileyen en önemli faktörlerden birinin de spermde DNA fragmentasyonu olduğunu göstermektedir [Zeqiraj et al., 2018]. Sperm DNA fragmentasyonunda meydana gelen bir artışın doğal üremeyi etkilediği çeşitli araştırmalar tarafından ortaya konmaktadır [Simon et al., 2019].

Sperm üzerinde bazı testler yapılmaktadır. Bunlardan biri de erkek fertilitasını değerlendirmede güvenilir olarak kabul edilen ve spermogram olarak adlandırılan bir semen analizidir [Høst et al., 2001]. Bu analiz, bir erkeğin menisinin ve içerdiği spermün belirli özelliklerini değerlendirmektedir [Burgos, 1952]. Ancak spermogram analizi bazı eksiklere sahiptir bu yüzden her zaman sperm kalitesini ve sağlığını kesin olarak gösteremediğinden fertil erkek ile infertil erkekleri doğru bir şekilde ayırt edememektedir [Agarwal and Said, 2003]. DSÖ 2010'a göre infertil erkeklerin yaklaşık %15'i normal sperm parametrelerine sahiptir bu nedenle sadece semen analizine bakmak spermün sağlığı konusunda yeterli bilgi sağlayamamaktadır [Agarwal and Allamaneni, 2005]. Genetik bilginin doğru bir şekilde ortaya çıkarılması için DNA molekülünde hasarın olmaması esastır [Gandini et al., 2004]. Sperm DNA fragmentasyonu %30'u aşarsa, sperm kalitesinin önemli ölçüde düştüğü söylenebilmektedir. DNA fragmentasyon yüzdesine bağlı olarak, yardımcı üreme tekniklerinden uygun olanı seçmek mümkündür [Virro et al., 2004].

### **2.3.1. İleri Baba Yaşı ve DNA Fragmentasyonu**

Semen kalitesinde düşüş ve sperm DNA fragmentasyonunda artışın sırasıyla 35 ve 40 yaşından sonra arttığı çeşitli araştırmalar ile ortaya konmaktadır [Dunson et al., 2004], [Stewart and Kim, 2011], [Kimberly et al., 2012]. İleri yaştaki infertil erkekler fertil erkeklerle karşılaştırıldığında, infertil erkeklerde daha anormal sperm kromatin yapısı ve daha fazla sperm DNA'sında kırılmalarının meydana geldiği gözlenmektedir [Plastira et al., 2007].

Yapılan bir araştırmada; 277 normozoospermik erkek gözlemlenmiş ve genç erkeklere kıyasla 40 yaş üstü erkeklerde önemli ölçüde daha yüksek DNA fragmentasyonu indeksi yüzdesi tespit edilmiştir [Das et al., 2013]. Yapılan farklı bir çalışmada da; Wyrobek ve ark. yaşları 22-80 arasında olan 97 erkeği gözlemlenmiş olup FGRF3 genindeki mutasyonlar ve DNA fragmentasyonu olan spermelerin yüzdesi arasında anlamlı bir pozitif ilişki bulmuştur [Wyrobek et al., 2006].

İleri baba yaşının DNA fragmentasyonu üzerindeki etkisini inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bir çalışma farklı yaş gruplarındaki normozoospermik, subfertil ve infertil erkeklerde DNA fragmentasyonu karşılaştıran sistematik bir inceleme yapılmıştır [Gonzalez et al., 2022]. Yapılan incelemeler sonucunda ileri baba

yaşının DNA fragmentasyonundaki artışla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Yapılan çalışmalardan dört tanesi normozoospermik ve subfertil erkekler üzerinde yapılmıştır [Colasante et al., 2018], [Moskovtsev et al., 2006], [Brahem et al., 2011], [Guo et al., 2020]. Bu dört çalışmadan üçü normozoospermik erkekler arasında bile ileri baba yaşının artan DNA fragmentasyonu lehine anlamlı bir fark ( $p<0.01$ ) göstermektedir [Colasante et al., 2018], [Moskovtsev et al., 2006], [Guo et al., 2020]. Bunlara ek olarak kanıtlanmış birincil veya ikincil infertiliteye sahip fertil ve infertil erkekler arasındaki DNA fragmentasyonunu inceleyen altı çalışma bulunmaktadır [Petersen et al., 2018], [Kaarouch et al., 2018], [Cohen-Bacrie et al., 2009], [Evenson et al., 2020], [Antonouli et al., 2019], [Blachman-Braun et al., 2020]. Bu çalışmaların hepsi ileri baba yaşı ile artan DNA fragmentasyonu lehine anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

## 2.4. Kromatin Yapı ve Erkek İnfertilitesi

Kimyasallar, toksinler, sıcaklık ve hastalıklar gibi çeşitli etkenler sperm kromatin yapısını etkilemektedir [Love et al., 2002]. Sperm kromatin yapısının normal olması genetik bilginin sıkıntısız ve doğru bir şekilde iletilmesi için gereklidir.

Bir spermin verimli olarak kabul edilebilmesi için oldukça kompakt ve yoğunlaşma yeteneğine sahip olması gerekmektedir; bu nedenle oluşan sperm kromatin yapı anormalliği erkek infertilitesine neden olabilmektedir [Agarwal and Said, 2003].

Erkek eşey hücrelerinde kromatin yapı; histonların protaminlerle yer değiştirdiği zaman, spermatidlerin sperme olgunlaşması sırasında önemli bir yeniden şekillenme geçirir [Balhorn et al., 2000]. Bu basamak spermatogenezdeki kritik basamaktır [Güneş and Kulaç, 2013]. Bu süreç, kromatinin çok kararlı toroidal yapılarda düzenlendiği ve sperm DNA'sının sıkıca paketlenildiği benzersiz bir yapı haline gelmesine yol açmaktadır [Balhorn et al., 2000], [Güneş and Kulaç, 2013]. Bu çok sıkıştırılmış sperm kromatin yapısı, olgun spermin hidrodinamik bir nükleer form kazanmasını sağlayıp baba genomunun oosite güvenli bir şekilde teslim edilmesini garanti etmektedir [Oliva, 2006]. Uygun histon ve protaminin yer değiştirmesinin bozulması, sperm kromatin yoğunlaşmasının azalmasına böylece erkek infertilitesine neden olabilmektedir [Francis et al., 2014]. İnsanlarda protamin 1 (P1) ve protamin 2

(P2) olmak üzere iki çeşit protamin bulunmaktadır. Bunların ekspresyonundaki ve işlenmesindeki hatalar sperm kromatin yoğunlaşmasını etkileyip değiştirebilmektedir. Meydana gelen bu problemler de erkek infertilitesinde rol oynamaktadır. Ayrıca, P1:P2 normal oranı 0.8-1.2 iken bu orandaki bozulmanın semen kalitesinin kötüleşmesinde, DNA fragmentasyonunda artışın olmasında ve erkek infertilitesinde rol oynadığı ortaya konmaktadır [Francis et al., 2014].

#### **2.4.1. İleri Baba Yaşı ve Kromatin Yapı**

Yapılan araştırmalar yaşlanmanın sperm kromatin durumunda olumsuz etkiler oluşturduğunu ortaya koymaktadır [Plastira et al., 2007], [Winkle et al., 2009]. Başka çalışmalarda ilerleyen baba yaşı ile kromatin yapıdaki bozukluk arasında uyumlu bir bağlantı göstermektedir [Wyrobek et al., 2006].

Sperm DNA/kromatin yapı ile artan yaş arasında zayıf fakat anlamlı korelasyonlar olduğu yapılan son araştırmalarda da açığa çıkarılmaktadır. Bu nedenle doğurganlığın da ilerleyen baba yaşı ile azaldığı söylenebilmektedir [Gao et al., 2021].

İleri yaştaki erkekler, daha kötü sperm miktarı ve kalitesine, daha fazla DNA fragmentasyonuna ve anormal kromatin yapısına, bunlardan dolayı da daha yüksek infertiliteye sahip olabilmektedir. Bunların yanı sıra; kadın yaşı, çeşitli hastalıklar, sahip olunan yaşam tarzı gibi faktörler de üremeyi etkilediğinden dolayı dikkate alınmalıdır [Gao et al., 2021].

#### **2.5. PARP Proteini ve Erkek İnfertilitesi**

Kusursuz bir DNA erkek fertilitesi için hayati önem taşımaktadır. Sperm; DNA'daki kırıklar, baz uyumsuzlukları ve baz eksizyonu gibi çeşitli sorunların onarımı için oldukça fazla molekül ve yol içermektedir [Agarwal et al., 2009]. Bunlardan biri de DNA onarım enzimi olan Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)'tır. Yapılan araştırmalarda PARP'ın, eşey hücrelerinde DNA hasar onarımında oldukça önemli bir role sahip olmasının [Atorino et al., 2001] yanı sıra testis eşey hücrelerinde de önemli olduğu kanıtlanmaktadır [Di Meglio et al., 2004], [Hikim et al., 2003], [Meyer-Ficca et al., 2005]. Aynı zamanda, insan ejakülat sperminde PARP için benzer önemli bir rol üzerine hala araştırmalar sürmektedir ve son yıllarda da bu konu

hakkındaki araştırmalar artarak devam etmektedir [Sakkas et al., 1999], [Stáhl et al., 2006], [Mahfouz et al., 2009]. Yapılan araştırmalarda PARP enziminin ekspresyonunun olgun sperm ve fertil erkeklerde yüksek olduğu gözlenmektedir [Said and Khosravi, 2012].

PARP'ın DNA onarım görevine ek olarak hem apoptozda hem de nekrozda rol aldığı ortaya konmaktadır [Heeres and Hergenrother, 2007], [Oliver et al., 1999], [Zerfaoui et al., 2008]. Eğer DNA'da düşük hasar oluşursa, PARP diğer onarım enzimlerini yardıma alarak DNA onarımını sağlayabilmektedir [Heeres and Hergenrother, 2007]. DNA'da hasar meydana geldiğinde, kaspaz-3 proteinin aktive olması PARP'ı bölmesine ve böylece PARP'ın aktivasyonunu engelleyerek apoptozun meydana gelmesine yol açmaktadır [Kaufmann et al., 1993]. Ancak eğer DNA'da yüksek hasar oluşursa, PARP aşırı aktif hale gelip ATP/NAD tükenmesine ve nekroza sebep olabilmektedir [Berger et al., 2020].

Sperm DNA'sında; kromatin yeniden şekillenmesi ya da oksidatif stres gibi çeşitli nedenlerle meydana gelen kırıklardan dolayı PARP aktive olabilmektedir. Apoptozun geręekleřmesinde anahtar rol oynayan kaspaz-3, PARP'ı bölerek onu etkisiz hale getirmekte ve PARP'ın DNA'yı onarmasını engellemektedir [Kaufmann et al., 1993]. Bundan dolayı; apoptozun bir belirteci olarak, bölünmüş PARP (cPARP) kabul edilebilmektedir [Pacher and Szabo, 2008], [Duriez and Shah, 1997]. İnfertil erkeklerin spermde daha yüksek seviyede cPARP bulunması, apoptoz ile erkek infertilitesi arasındaki bir ilişki olabileceğini ortaya koymaktadır [Kaufmann et al., 1993], [Mahfouz et al., 2009].

### **2.5.1. PARP Enziminin Eşey Hücre Ölümündeki Rolü**

Apoptoz; programlanmış hücre ölümlerinden biridir ve bu mekanizma hücreler için çok önemli bir role sahiptir. Apoptoz çeşitli durumlarda meydana gelebilmektedir. Örneğin, belirli hüresel kontrol noktalarını geğemeyen hücreleri ortadan kaldırma görevi görebilmektedir [Baum et al., 2005]. Yapılan alışmalar, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri sırasında eşey hücre ölümünün çeşitli problemleri ortadan kaldırmak için oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Bu problemlerden bazıları mayoz sırasında kromozomal düzenlemedeki hatalar veya DNA'daki onarılmamış kırılmalar

olabilmektedir. Bunların yanı sıra, genetik anormalliklerin yavrulara iletilmesini engellemek için apoptoz oldukça büyük bir öneme sahiptir [Print and Loveland, 2000].

Memeli spermatogenezinde apoptoz var olması gereken önemli ve normal bir mekanizmadır. Olgun sperm meydana gelmesi ve bir anormalliği olan spermi ortadan kaldırmak için spermatogenezin tüm aşamaları boyunca anlık olarak düzenlenmektedir. Spermatogenez sırasında çok fazla sayıda sperm ölmekte ve ayıklanmaktadır. Bunun birden fazla sebebi olabilmektedir. Bunlardan bazıları; sertoli hücrelerinin sadece sınırlı sayıda eşey hücresini koruyabilmesi ve diğer fazla olan eşey hücrelerinin yok edilmesi ile sonuçlanması olabilmektedir [Baum et al., 2005].

PARP, DNA'da oluşan hasarların onarımında önemli ve kanıtlanmış bir role sahip olmasının yanı sıra apoptozda da oldukça önemli rol oynamaktadır. Apoptoz meydana geldiğinde DNA zincirinde oluşan kopmalar PARP'ın aktive olmasına sebep olabilmektedir. Ölmekte olan hücrede; PARP'ın bu aktivasyonunun DNA hasarını onarmaya yönelik olabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır [Tanori et al., 2008], [Ohashi et al., 1983], [Spina-Purrello et al., 2008]. Yapılan çalışmalar, spermatid ve spermatozoid olgunlaşması durmuş olan infertil erkeklerde apoptozun arttığını ortaya koymaktadır [Lin et al., 1997]. İnfertil erkeklerdeki artan bu apoptoz oranı, DNA hasarı yüksek olan eşey hücrelerinin ayıklanmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Tesarik ve arkadaşları, tam spermiyogenez bozukluğu olan erkekleri, tamamlanmamış spermiyogenez bozukluğu olan başka bir azospermik erkek grubuyla karşılaştırdı. Bu karşılaştırma sonucu; apoptotik DNA hasarının, birinci gruba kıyasla ikinci grupta daha yüksek olduğunu göstermektedir [Tesarik et al., 1998]. Maymon ve arkadaşları, daha yakın tarihli bir çalışmada, olgunlaşmanın durdurulması sırasında insan spermatozoidlerinde PAR düzeylerinin varlığının daha yüksek olmasının, bozulmuş spermatogenez sırasında DNA zincir kırılmalarının daha çok oluşmasıyla ilişkili olabileceğini açıklamaktadır [Maymon et al., 2006].

İnsan ejakülat sperminde PARP'ın varlığını araştıran çalışmalar sürmekte ve başarıyla sonuçlanmaktadır. Jha ve arkadaşları tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada, ejakülat sperminde PARP'ın çeşitli izoformlarının bulunduğu görülmektedir. Yapılan bu çalışmalarda immünolokalizasyon paternleri, PARP'ın sperm başlarında akrozomal bölgelerine yakın kısımlarında var olduğu ortaya konulmaktadır [Jha et al., 2009]. Bu çalışmada, PARP varlığı ve sperm olgunluğu arasında doğrudan bir ilişki olduğu gösterilmektedir. Olgun sperm ve olgunlaşmamış sperm karşılaştırılmış ve olgun spermde PARP'ın çeşitli izoformlarının artan varlığı

görülmektedir. Ayrıca, fertil erkekler ve infertil erkekler karşılaştırılıp fertil erkeklerden alınan ejakülat spermelerde daha yüksek seviyede PARP izoformları görülmektedir. Kısaca, Jha ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışma, PARP varlığı ve erkek fertilitesi ile bir ilişki ortaya koymaktadır [Jha et al., 2009]. İnfertil erkeklerin spermide PARP varlığının azalmasının, düşük kaliteli semen örneklerinde görülen artan DNA hasarının nedeni olabileceğini düşündürmektedir.

### **2.5.2. İleri Baba Yaşı ve PARP**

Yaşlanma süreci, bir erkeğin doğurganlık potansiyelini etkileyebilecek olan DNA'da hasar meydana gelmesine neden olmaktadır. PARP; telomer onarımı, bağışıklık cevapları, DNA onarımı ve hücre ölümündeki işlevi aracılığıyla yaşlanmada da önemli rol oynamaktadır [Beneke and Bürkle, 2007]. Yakın tarihli bir çalışmada El-Domyati ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, farklı yaş gruplarındaki fertil erkeklerden sperm numuneleri toplayıp PARP varlığı ve aktivitesindeki değişiklikleri incelemektedir [El-Domyati et al., 2009]. Bu çalışmada, PARP'ın izoformu olan PARP1 ve DNA onarım partneri XRCC1'in ekspresyonu, genç erkeklerin spermatositlerinde daha düşüktü, bu erkeklerin Sertoli hücreleri ise daha düşük PAR seviyeleri gösterdi. Yaşın artması ile PARP1 ve DNA onarım enzimlerin görünen bu genel artış, yaşın bir sonucu olarak DNA yapısının bozulmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir [El-Domyati et al., 2009]. Özellikle üreme tıbbında ve ileri baba yaşı ile PARP'ın DNA onarımındaki rolünü tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

### **3. MATERİYAL VE METOT**

Çalışmamızın deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde ve İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde (REMER) yapılmıştır.

#### **3.1. Etik Onayı**

Çalışmamızın etik onayı İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel olmayan Etik Kurulu'ndan 01/04/2021 tarihinde 376 karar numarası ile alınmıştır.

#### **3.2. Hastaların Seçilmesi ve Sperm Örneklerinin Toplanması**

Medicana Çamlıca Hastanesi Yardımcı Üreme Teknikleri Merkezi'ne infertilite nedeniyle Ağustos 2021- Ekim 2021 tarihleri arasında başvuran 40 erkek hasta çalışmaya alınmıştır. Bu hastalardan 20'si ileri yaşa sahip (>40) ve 20'si genç yaşa (<40) sahip erkeklerdi. Sperm örnekleri, hastalardan 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yoluyla alınmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ, 2010) tarafından belirlenen sperm parametrelerine göre normozoospermi değerlerine sahip olan erkek hastalar seçilmiştir.

#### **3.3. Hasta Dışlama Faktörleri**

Çalışmamıza azoospermi olan hastalar, varikozel tedavisi ve ürogenital bölgesinde enfeksiyon bulguları olan hastalar dahil edilmemiştir. Ayrıca, herhangi bir kronik hastalığa sahip olan, sigara ve alkol kullanan, çalışma ortamında radyasyona veya toksik maddelere maruz kalan, kabakulak gibi enfeksiyonların bulunduğu ya da geçirilmiş testis ameliyatı olan erkek hastalar çalışmaya alınmamıştır.

### **3.4. Sperm Örneklerinin Hazırlanması**

Hastalardan alınan sperm örneklerinin 200'er µl'si spermiyogram (konsantrasyon, motilite ve morfoloji) için ayrılmıştır. Ayrıca sperm örneklerinden SCSA ve Annexin V/Propidyum İyodür (PI) boyama ile sperm DNA fragmentasyonunu analiz etmek için belli bir miktarı ayrılmıştır.

Hastaların sperm örneklerinin 10 µl'si lam üzerine alınarak yapılacak analizler için yayma yapılmış ve preparatlar kapalı ve serin bir ortamda saklanmıştır. Yayma preparatı hazırlamak için lam üzerine 10 µl sperm örneği eklenip 45°'lik açıyla tutulmuş lamel yardımıyla yayma yapılmıştır. Ardından kurumaya bırakılmış ve kuruduktan sonra kapalı ve serin bir ortamda saklanmıştır. Geriye kalan sperm örneğinden 200 µl alınıp 10 dakika boyunca 2500 rpm'de santrifüj edilmiş, total oksidan ve antioksidan seviyeleri (TAS-TOS) analizi yapılana kadar -20°C'de saklanmıştır. Ayrıca, sperm kromatin yapı analizi (Toluidine Blue) ve protein (PARP)'nin immünohistokimyasal analizi için 10 µl sperm örneği ile yayma işlemi yapılmıştır.

### **3.5. Spermiogram (Semen analizi)**

En az 2 günlük (2-5 gün) cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yoluyla steril bir kaba alınan sperm örnekleri, 37°C sıcaklıktaki inkübatörde yaklaşık 20 dakika bekletilmiş ve likefiye olması sağlanmıştır. Likefaksiyon sürecinin ardından ilk 30 dakikada sperm parametreleri analiz edilmiştir. Sperm parametrelerinin analizi esnasında sperm örnekleri 5°C'de inkübe edilmiştir. Sperm parametrelerinin analizi için en az 100 sperm hücresi sayılmıştır. Belirtilen sperm parametrelerinin belirlenmesi ve sperm yıkama prosedürü DSÖ kriterlerine uygun olarak yapılmıştır (DSÖ, 2010).

#### **3.5.1. Sperm Konsantrasyonu**

Sperm konsantrasyonunun ölçümü için Makler sperm sayma kamarasına (Sefi-medical, İsrail) 10 µl semen örneği koyulduktan sonra faz kontrast mikroskopunda

40X objektif altında 100 karede bulunan sperm sayılarak sperm konsantrasyonu değerlendirilmiştir ve mil/ml olarak verilmiştir.

### **3.5.2. Sperm Morfolojisi**

10 µl semen örneği lam üzerine koyulmuş ve lamel kullanarak 45° açı ile yayma smear yapılmıştır. Havada kurutulan yayma preparatı ilk olarak Diff Quik (EMS, Amerika) boyama kitinin fiksatifinde 10 saniye tutularak fikse edilmiştir ve Diff Quik boyama kitinin A (ksantin boyası) ve B (azine A ve metilen mavisi) solüsyonlarında sırasıyla 30'ar saniye bekleterek kurutulmuştur. İmmersiyon yağı kullanılarak X100 objektif altında en az 100 sperm hücresi sayılmış ve Kruger's strict criteria kullanılarak analiz edilmiştir [Check et al., 1992]. Sayılan hücreler morfolojik olarak normal sperm ile anormal sperm olarak ayrılmıştır. Sperm hücreleri normal, baş anomalisi, boyun anomalisi ve kuyruk anomalisi olmak üzere dört farklı gruba ayrılmış ve sonuç yüzde olarak belirlenmiştir.

### **3.5.3. Sperm Motilitesi**

Sperm motilitesinin analizi için faz kontrast mikroskopunda (Zeiss axio, Almanya) 40X objektif altında en az 100 sperm sayılmış ve sperm 3 gruba ayrılmıştır:

- +4 motilite, progresif motil (ileri hızlı hareketli) spermeleri,
- +3 motilite, yavaş hareketli spermeleri,
- +2 motilite, yerinde hareketli spermeleri tanımlamaktadır.

Motilite değerleri yüzde (%) belirlenmiştir. Toplam motilite; +4 motilite, +3 motilite ve +2 motilitenin toplamı olarak hesaplanmıştır.

## **3.6. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi**

Oksidatif stres, Şekil 3.6.1 ve Şekil 3.6.2'de görülen ticari test kitleri olan Rel Assay Diagnostics (Sigma Aldrich) Total Oksidan Seviyesi (TOS) ve Total

Antioksidan Seviyesi (TAS) kitleri kullanılarak ölçülüp hesaplanmış ve belirlenmiştir. Bu analiz için 38 hasta ile çalışılmıştır (n=38). Bu hesaplamalar kit protokolünde yer alan formüller ile yapılmıştır.

$$\text{Oksidatif stres indeksi (OSİ)} = \text{TOS} / (\text{TAS} * 10)$$

(3.6)



Şekil 3.6.1: Total Oksidan Seviyesi (TOS) kit.



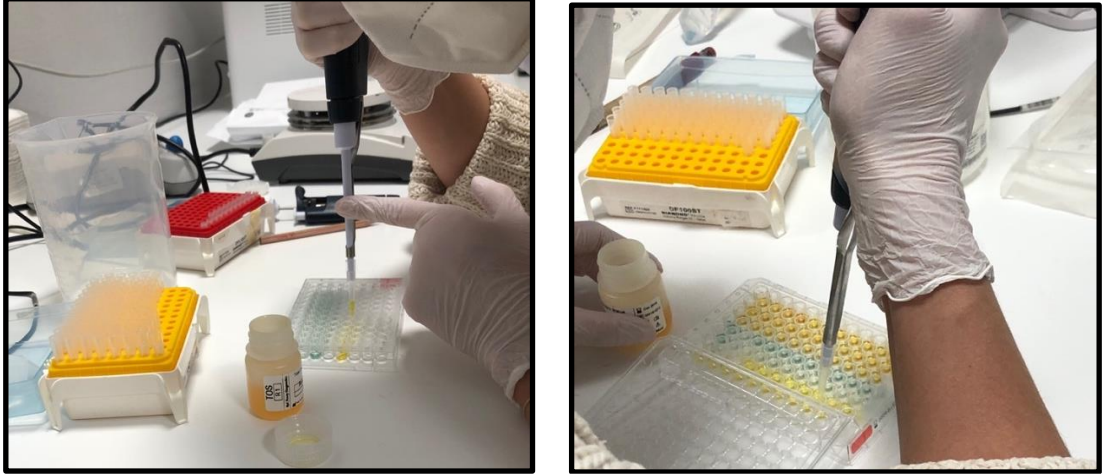
Şekil 3.6.2: Total Antioksidan Seviyesi (TAS) kit.

### 3.6.1. Total Oksidan Seviye Tespiti

Total oksidan seviyesi testi Rel Assay TOS Kit (Sigma-Aldrich) protokolüne göre yapılmıştır. Bu protokole göre; 96 well plate'in uygun kuyucuklarına 7,5 µl Standart 1'den (double distile su), 7,5 µl kitin içerisinde hazır bulunan Standart 2'den (Stock Stabilized Standart) eklenmiştir. Diğer kuyucuklara 7,5 µl hastaların sperm örneklerinden eklenmiştir. Ardından, kitin içerisinde hazır bulunan Reagent 1'den (Assay Buffer) 50 µl Standart 1, Standart 2 ve sperm örneklerinin bulunduğu tüm kuyucuklara eklenmiştir (Şekil 3.6.1.1). İlk absorbans noktası için spektrofotometre ile 530 nm'de başlangıç absorbansı okunmuştur (Şekil 3.6.1.2). İlk ölçümden sonra Standart 1, Standart 2 ve tüm sperm örneklerinin üzerine 2,5 µl kitin içerisinde hazır bulunan Reagent 2 (Prokromojen Solüsyonu) yavaşça eklenmiştir. 96 well plate oda sıcaklığında hafifçe çalkalanmış ve 5 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak spektrofotometre ile 530 nm'de ikinci kez absorbans okuması yapılmıştır ve veriler kaydedilmiştir. Kaydedilen veriler ile TOS sonucu hesaplanmıştır.

$$\text{Sonuç} = (\Delta\text{Abs Örnek} / \Delta\text{Abs Standart2}) \times 10$$

(3.7)



Şekil 3.6.1.1: Kitin içerisinde hazır bulunan Reagent 1'in tüm kuyucuklara eklenmesi.



Şekil 3.6.1.2: Spektrofotometre ile absorbans ölçümü.

### 3.6.2. Total Antioksidan Seviye Tespiti

Total antioksidan seviyesi testi de Rel Assay TOS Kit (Sigma-Aldrich) protokolüne göre yapılmıştır. Bu protokole göre; 96 well plate'in uygun kuyucuklarına 3 µl Standart 1'den (double distile su), 3 µl kitin içerisinde hazır bulunan Standart 2'den (1.0 mmolTrolox Equiv/L) eklenmiştir. Diğer kuyucuklara 3 µl hastaların sperm örneklerinden eklenmiştir. Ardından, 50 µl kitin içerisinde hazır bulunan Reagent 1'den (Assay Buffer) Standart 1, Standart 2 ve sperm örneklerinin bulunduğu tüm kuyucuklara eklenmiştir. İlk absorbans noktası için spektrofotometre ile 660 nm'de başlangıç absorbansı okunmuştur. İlk ölçümden sonra Standart 1, Standart 2 ve tüm sperm örneklerinin üzerine 7,5 µl kitin içerisinde hazır bulunan Reagent 2 (Renklendirilmiş ABST Radikal Solüsyonu) yavaşça eklenmiştir. 96 well plate oda sıcaklığında hafifçe çalkalanmış ve 5 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak spektrofotometre ile 660 nm'de ikinci kez absorbans okuması yapılmıştır ve veriler kaydedilmiştir. Kaydedilen veriler ile TAS sonucu hesaplanmıştır.

$$\text{Sonuç} = [(\Delta\text{Abs Standart1}) - (\Delta\text{Abs Örnekte})] / [(\Delta\text{Abs Standart1}) - (\Delta\text{Abs Standart2})]$$

(3.8)

## 3.7. DNA Fragmentasyonu Analizi

### 3.7.1. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

DNA fragmentasyonu; ileri yaşa (>40) sahip hasta gruplarından 4 tane ve genç yaşa (<40) sahip hasta gruplarından 4 tane olmak üzere toplam 8 sperm örneğinde HaloSperm kiti (Halotech DNA SL, Halosperm HT-HS10, İspanya) kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 3.7). Bu deney, Halosperm sperm DNA fragmentasyon kiti içerisindeki protokol ile yapılmıştır. Öncelikle bu kitin içerisinde bulunan agaroz tüp, 5 dakika boyunca 95°C-100°C'de su banyosunda erimesi için bekletilmiştir. Ardından eriyen agaroz jel 5 dakika boyunca 37°C etüvde inkübe edilmiştir. 5 dakika sonra ependorf tüpüne konulan 25 µl sperm örneklerinin her birine hazırlanan 50 µl agaroz jel eklenmiş ve hızlı bir şekilde kit içerisinde yer alan super-coated lamlara (Şekil 7) yayılıp dikkatlice lamellerle kapatılıp 5 dakika boyunca +40 °C'de inkübe edilmiştir. Bu sırada kitin içerisindeki denatürasyon ajanından (DA) 80 µl üzerine 10 ml distile su eklenmiştir. 5 dakika sonunda örneklerin lamelleri üzerinden yavaşça kaydırılıp uzaklaştırılmıştır ve 6 dakika boyunca oda sıcaklığında yatay olarak hazırlanan DA solüsyonunun içerisinde bekletilmiştir. Bu işlem esnasında kitin içerisindeki lizis solüsyonundan 10 ml kadar bir kaba konulmuştur. 6 dakika sonunda DA solüsyonundan çıkarılan sperm örnekleri yatay olarak 23 dakika boyunca oda sıcaklığında lizis solüsyonunda bekletilmiştir. Bu işlemden sonra örnekler distile su ile 5 dakika boyunca yıkanmış ve %70, %90 ve %100'lük artan etanol serilerinde dehidrasyon işlemi için 2'şer dakika bekletilip karanlık bir ortamda kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan ve hazır hale gelen örneklere fiksatif (metil alkol içerisinde trimethan boyası), solüsyon 1 (ksantin boyası) ve solüsyon 2 (azine A ve metilen mavisi)'den oluşan Diff Quik seti ile boyama işlemi yapılmıştır. Kuruyan preparatlar fiksatife konulmadan sırasıyla solüsyon 1 ve solüsyon 2'den geçirilip kurumaya bırakılmıştır. Işık mikroskopunda 100X objektifte immersiyon yağı damlatılarak görüntülenmiştir. Görüntüleme normal DNA yapısına sahip spermelerde halo yapısı

gözlenmiştir. DNA fragmentasyonu olan spermelerde halo yapısı gözlenmemiş ya da baş yapısı bozulmuş bir görüntü elde edilmiştir.



Şekil 3.7.1: HaloSperm kit.

### 3.7.2. Annexin V/Propidium Iodide (PI) Boyama

Sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonunu analiz etmek için başlangıçta TUNEL testi yapılması planlanlanmış olup fakat finansal nedenlerle yapılamadığından Annexin V/Propidyum İyodür (PI) boyama testi ile bu parametere değerlendirilmiştir. Bu test ticari test kiti olan Calbiochem® Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II ile yapılmıştır. Hastalardan elde edilen sperm hücreleri 1X PBS ile yıkanıp 5 dakika boyunca 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant uzaklaştırılmıştır ve toplam 2-3 yıkama için tekrarlanmıştır. Ardından hücre peletini 1X Binding Buffer içinde  $2-5 \times 10^5$  hücre/ml'lik konsantrasyona yeniden süspansiyon edilmiştir. Daha sonra 195 µl hücre süspansiyonu temiz bir tüpe aktarılıp üzerine 5 µl Annexin V-FITC eklenmiştir. Sonrasında karıştırıp 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sperm hücrelerini 1X Binding Buffer ile yıkayıp ve 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant uzaklaştırılmış ve kalan hücre peletini 190 µl 1X Binding Buffer içinde tekrar süspansiyon edilmiştir. Ardından 10 µl Propidium Iodide (PI) (final konsantrasyon = 1 µg/ml) eklenmiştir. Son olarak sperm örnekleri konfokal mikroskop altında analizleri yapılmıştır.

### 3.8. Sperm Kromatin Yapı Analizi

Sperm kromatin yapı analizi Toluidin Blue boyama yöntemiyle yapılmıştır. Toluidine Blue boyası, DNA zincirinin fosfat grubuna bağlanıp spermin kromatin yoğunlaşmasını ve bu yöntem dolaylı olarak DNA fragmentasyonunu açığa çıkarmaktadır. Hastaların yayılmış sperm örneklerinin preparatları %96'lık etanol (Merck, Almanya) ve 1:1 oranında aseton (Bdh prolabo, Fransa) içerisinde 1 saat boyunca 4°C'de fikse edilmiştir. 1 saat sonra örnekler fiksasyon solüsyonundan alınarak oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ardından, boyanın fosfat gruplarına bağlanabilmesi için örnekler 5 dakika 4°C'de 0.1 N HCl (Merck K50227117 818, Almanya) içerisinde hidrolize edilmiştir. Bu işlemden sonra, örnekler 5 dakika boyunca distile su ile yıkanmıştır. Örnekler %1 Toluidin Blue (Empire Genomics, Amerika) boyasında 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek boyanmıştır (Şekil 3.8) ve tekrar distile su ile 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Boyanmış örnekler ışık mikroskopunda 100X objektifte immersiyon yağı damlatılarak görüntülenmiştir. Koyu mavi boyanmış spermler kromatin yapısı bozulmuş olarak ve soluk mavi olan spermler ise kromatin yapısı bozulmamış olarak değerlendirilmiştir. Her örnek için en az 100 hücre sayılıp boyanmış ve boyanmamış spermlerin yüzdeleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.8: Toluidine Mavi Boyası.

### 3.9. PARP Proteini İmmünohistokimyasal Analizi

İmmünohistokimyasal boyama yöntemi ile PARP proteininin ekspresyonu belirlenmiştir. Bu yöntemde Mouse and Rabbit Specific HRP (ABC) Detection IHC Kit (Abcam, ab93677, İngiltere) kullanılarak PARP proteininin ekspresyonu ve lokalizasyonu belirlenmiştir (Şekil 3.9.1). İlk olarak yayması yapılmış sperm örneklerinin bulunduğu lamların kenarları, PAP pen hidrofobik kalem ile çizilerek sınırlandırılmıştır. Preparatlar %4'lük paraformaldehit ile 30 dakika oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi tamamlandıktan sonra preparatlara üzerini tam olarak kaplayacak şekilde PBS (Sigma-Aldrich P4417-100, Amerika) damlatılıp 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivasyonunu inhibe etmek amacıyla metanol içerisinde %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hazırlanmıştır. Cam şale içerisine preparatlar bu solüsyon içerisinde oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Ardından 20 ml sitrat buffer 180 ml distile su içerisine eklenerek 200 ml Citrate Buffer solüsyonu hazırlanmıştır. Antijenlerin geri kazanımı amacıyla mikrodalgada ısıtma yöntemi kullanılmıştır. Sitrat kabına konulan hazırlanmış bu sitrat buffer solüsyonu mikrodalgada 800 Watt'ta 3 dakika kaynatılmıştır. Bu işlemden sonra, mikrodalgadan çıkartılıp kabın içerisine preparatlar yerleştirilmiş ve 800 Watt'ta 20 saniye daha kaynatılmıştır. Ardından mikrodalga 200 Watt'a alınmış ve 20 dakika boyunca kaynamaya bırakılmıştır. Sonrasında preparatların içinde bulunduğu kap mikrodalgadan çıkarılarak 20 dakika soğumaya bırakılmıştır. Preparatlar sitrat kabından alınmış humidified chamber içerisine yerleştirilmiştir ve üzerlerini tam olarak kaplayacak şekilde PBS damlatılıp 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Preparatlara antikörlerin spesifik olmayan bağlanmalarını engellemek için kitin içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan protein blocking solüsyonu preparatların üzerine damlatılıp 10 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. PARP primer antikoru (Invitrogen AHO1232) 1:100 dilüsyonda hazırlanmış ve ıslak peçeteler kullanılarak hazırlanan nemli bir ortam haline getirilen humidified chamber içerisinde her bir preparat üzerine 50 µl damlatılıp üzerleri parafilm ile kaplanarak 1 gece boyunca +4 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 16-18 saatlik inkübasyon sonrası, preparatlara üzerini tam olarak kaplayacak şekilde PBS damlatılıp 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkanan preparatlar üzerine kit içerisinde hazır olan Biotinylated Goat Anti-Polyvalent (Mouse and Rabbit Specific HRP Detection IHC Kit, ab93677;

Abcam) damlatılarak 10 dakika bekletilmiştir. 10 dakika sonra, preparatlara üzerini tam olarak kaplayacak şekilde PBS damlatılıp 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Ardından her bir preparat üzerine 3'er damla olacak şekilde Streptavidin Peroxidase (Mouse and Rabbit Specific HRP Detection IHC Kit, ab93677; Abcam) damlatılıp 10 dakika bekletilmiştir. 10 dakika sonra, preparatlara üzerini tam olarak kaplayacak şekilde PBS damlatılıp 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır. İmmünohistokimyasal reaksiyon ile meydana gelen antijen-antikor kompleksinin görünür duruma getirebilmek amacıyla DAB Kromojen (Abcam, ab64238; İngiltere) hazırlanmış (Şekil 3.9.2) ve preparatlar üzerine 50 µl damlatılarak 8 dakika boyunca bekletilmiştir. Bu işlemden sonra, preparatlara üzerini tam olarak kaplayacak şekilde PBS damlatılıp 2 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından preparatlar karşıt boyama için Mayer's Hematoksilen (Bio Optica 05-06002/L, İtalya) içerisinde 2 dakika bekletilmiştir. 2 dakika ardından preparatlar çeşme suyu dolu cam şale içerisine alındı ve mordanlama işlemi için 10 dakika boyunca akan çeşme suyunun altında bekletilmiştir. Mordanlama işleminin ardından preparatlar 3-4 dakika Ksilen içerisine daldırılmıştır ve çıkarıldıktan sonra hava ile kurumaya bırakılmıştır. Bu işlem sonrası preparatlar hava ile kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatların üzerine birkaç damla Biomount (Bio Optica 05-BM500, İtalya) damlatılmış ve dikkatlice lamel ile kapatılmıştır. Işık mikroskopunda 100X objektifte immersiyon yağı damlatılarak görüntülenmiştir. Her örnek için en az 100 hücre sayılmıştır.

Analiz sonucunda elde edilen veriler için İmmünoreaktivite Skor (IRS) hesaplanmıştır. Her bir hasta spermlerinde baş, kuyruk, akrozom, stoplazmik droplet ve boyun olmak üzere 5 bölge 1,2 ve 3 rakamlarıyla şiddet seviyesi derecelendirilmiştir, ayrıca ekspresyonun görülmedikleri sayılmıştır. Bu bölgelerdeki şiddet seviyeleri toplanıp her sperm için bir IRS belirlenmiştir. Daha sonra toplam IRS sayılan sperm sayısına bölünerek ortalama alınmış ve yüzde hesaplanmıştır.



Şekil 3.9.1: Mouse and Rabbit Specific HRP (ABC) Detection IHC kit.



Şekil 3.9.2: DAB Substrat kit.

### 3.10. Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

- 10X Phosphate Buffered Saline (PBS) Stok Solüsyonu Hazırlama

10X PBS stok solüsyonu hazırlamak için öncelikle 800 ml distile su içerisinde 80 gr NaCl, 2 gr KCl, 2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21,6 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, Amerika) çözülmüştür. Ardından solüsyon distile su ile 1 litreye tamamlanmış ve pH'ı 7,4'e ayarlanmıştır. Bu şekilde elde edilen 10X PBS stok solüsyonu distile su ile 1X PBS'e seyreltilerek kullanılmıştır.

- %4 Paraformaldehit Fiksatif Çözeltisi Hazırlama

32 gr paraformaldehit 800 ml 1X PBS içerisine eklenmiştir. Çözünmeyi sağlayabilmek ve karışımın homojen olabilmesi için solüsyon içerisine 10 küçük NaOH tableti eklenmiş ve karışım berraklaşana kadar manyetik karıştırıcı üzerinde bekletilmiştir. Karışım berraklaştıktan sonra soğumaya bırakılmış ve ardından filtreden geçirilmiştir. Son olarak pH'ı 7,3 olarak ayarlanmıştır.

- %3 Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Çözeltisi Hazırlama

Hazır olarak satılan Hidrojen Peroksit (Fisher Scientific JT Baker, Amerika) %30'luktur. %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hazırlamak için toplam hacim 80 ml olacak şekilde 72 ml metanol (Merck 10600925, Almanya) ve 8 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karıştırılmış ve böylece %3'e seyreltilmiştir.

- Citrate Buffer Solüsyonu Hazırlama

Hazır olarak satılan Citrate Buffer (Bio Optica 15M-103, İtalya) solüsyonunun kullanımı için distile su ile 1:10 oranında dilüsyon işlemi yapılmıştır.

- Primer Antikor (PARP) Hazırlama

Dilüsyon denemeleri sonrası PARP primer antikorunun (Invitrogen AHO1232) dilüsyon oranı 1:100 olarak belirlenmiş ve PBS ile dilüsyonu yapılarak hazırlanmıştır.

- DAB Kromojen/Substrat Hazırlama

Hazır olarak satın alınan DAB Kromojen/Substrat kit (Şekil 3.9.2) (Abcam, ab64238; İngiltere) prosedürüne uygun olacak şekilde 1:50 oranında hazırlanmıştır.

### 3.11. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızın istatistiksel analizleri SPSS for Windows 22.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Normal dağılım göstermeyen ortalama değişkenlerin analizi için Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. Bu sonuçlar %95 güven aralığında analiz edilip, anlamlılık seviyesi ( $p<0,05$ ) olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

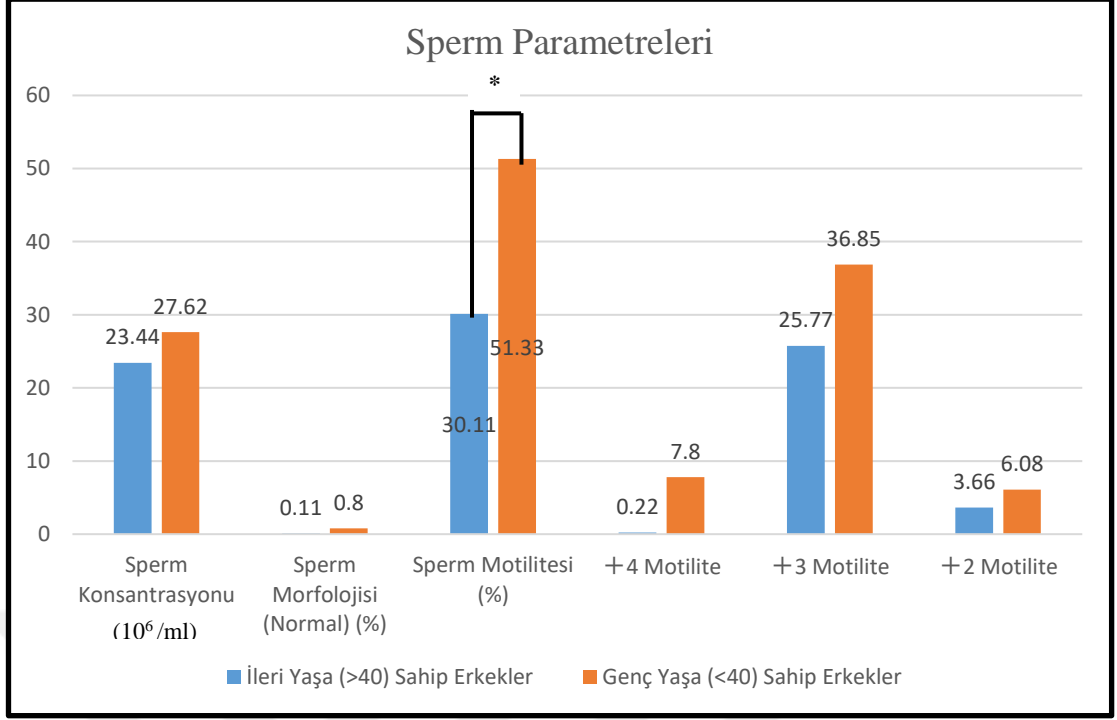
### 4.1. Sperm Parametreleri Analizi

İleri yaşa (>40) ve genç yaşa (<40) sahip erkek hastaların sperm parametreleri (sperm konsantrasyonu, sperm morfolojisi ve sperm motilitesi) analiz sonuçları Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

İstatistiksel sonuçlara göre sperm parametreleri analizi sonucunda ileri yaştaki erkeklerin (>40) sperm motilitesinin (%) genç yaşa sahip erkeklere (<40) göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede düşük olduğu gözlemlenmiştir ( $p<0,003$ ).

**Tablo 4.1:** Sperm parametreleri istatistiksel analizi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

	İleri Yaşa (>40) Sahip Erkekler	Genç Yaşa (<40) Sahip Erkekler	<i>p</i> value
<b>Sperm Konsantrasyonu (10<sup>6</sup>/ml)</b>	23,44 $\pm$ 26,30	27,62 $\pm$ 23,76	0,446
<b>Sperm Morfolojisi (Normal) (%)</b>	0,11 $\pm$ 0,33	0,80 $\pm$ 1,08	0,138
<b>Sperm Motilitesi (%)</b>	30,11 $\pm$ 12,62	51,33 $\pm$ 18,63	0,003*
+ 4 Motilite	0,22 $\pm$ 0,66	7,8 $\pm$ 15,79	0,108
+ 3 Motilite	25,77 $\pm$ 14,74	36,85 $\pm$ 16,54	0,263
+ 2 Motilite	3,66 $\pm$ 5,31	6,08 $\pm$ 5,67	0,318



Şekil 4.1: Sperm parametreleri analiz sonuçları.  
\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p<0,003$ )

## 4.2. Oksidatif Stres Parametreleri Analizi

Oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS ve OSİ) sonuçları, Tablo 4.2.1, Tablo 4.2.2 ve Şekil 4.2’de gösterilmiştir. İstatiksel veriler her parametrenin altında belirtilmiştir.

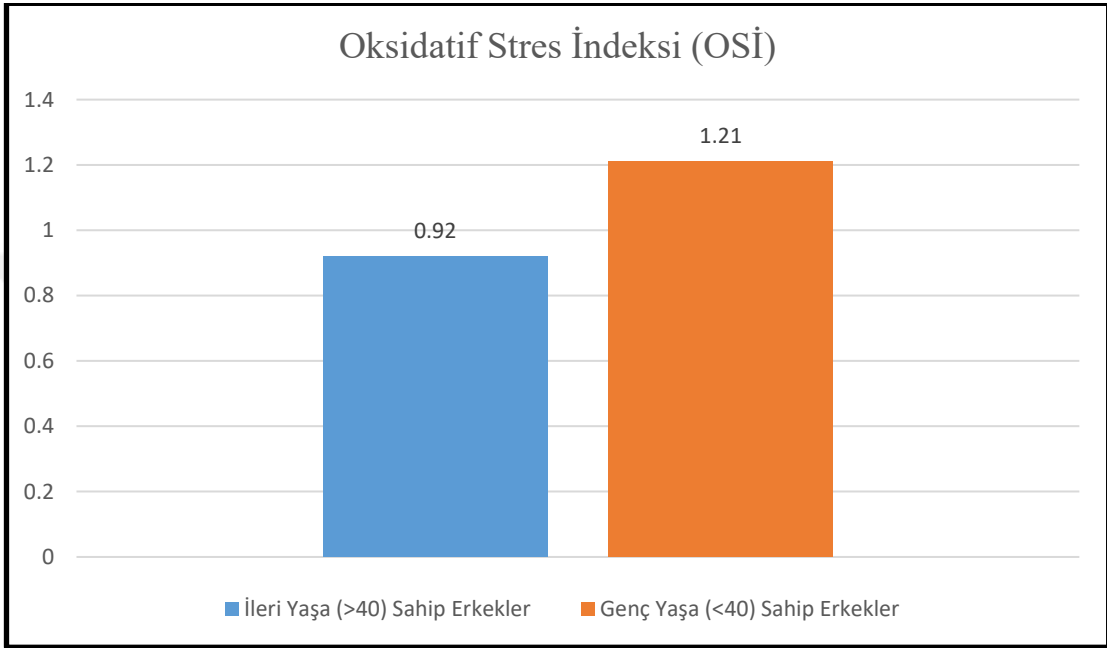
İstatistik sonuçlarına göre ileri yaşa (>40) ve genç yaşa (<40) sahip erkek hastaların oksidatif stres indeksi (OSİ) arasında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ( $p<0,820$ ).

Tablo 4.2.1: Tüm hastaların oksidatif stres parametre değerleri (n=38). TAS: Total antioksidan seviyesi, TOS: Total oksidan seviyesi, OSİ: Oksidatif stres indeksi.

Hastalar	TAS	TOS	OSİ
Hasta1	1,78	11,29	0,63
Hasta2	1,6	10,96	0,68
Hasta3	1,34	11,93	0,88
Hasta4	1,02	11,61	1,13
Hasta5	1,73	9,03	0,52
Hasta6	2,13	6,77	0,31
Hasta7	1,73	4,83	0,27
Hasta8	2,15	9,67	0,44
Hasta9	1,6	11,47	0,71
Hasta10	1,49	11,76	0,78
Hasta11	1,18	10,29	0,86
Hasta12	1,15	15,58	1,35
Hasta13	0,96	11,17	1,15
Hasta14	1,12	13,82	1,23
Hasta15	1,15	13,52	1,17
Hasta16	0,63	15,88	2,51
Hasta17	1,55	12,94	0,83
Hasta18	1,12	13,82	1,23
Hasta19	1,69	14,7	0,86
Hasta20	1,44	9,67	0,66
Hasta21	1,89	12,58	0,66
Hasta22	0,13	9,032	6,86
Hasta23	6,67	12,05	0,18
Hasta24	1,75	16,76	0,95
Hasta25	1,16	13,23	1,13
Hasta26	1,13	16,47	1,44
Hasta27	1,47	15	1,01
Hasta28	1,35	11,764	0,86
Hasta29	1,01	10,88	1,07
Hasta30	1,33	9,11	0,68
Hasta31	1,52	11,17	0,73
Hasta32	1,53	15,58	1,01
Hasta33	1,83	15,88	0,86
Hasta34	1,55	12,35	0,79
Hasta35	0,78	16,76	2,13
Hasta36	1,3	12,64	0,96
Hasta37	1,41	12,64	0,89
Hasta38	6,67	12,05	0,18

Tablo 4.2.2: Oksidatif stres indeksinin istatistiksel analizi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

	<b>İleri Yaşa (&gt;40) Sahip Erkekler</b>	<b>Genç Yaşa (&lt;40) Sahip Erkekler</b>	<b><i>p</i> değeri</b>
<b>Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)</b>	0,92 $\pm$ 0,49	1,21 $\pm$ 1,43	0,817



Şekil 4.2: Oksidatif stres indeksi (OSİ) analizi sonuçları

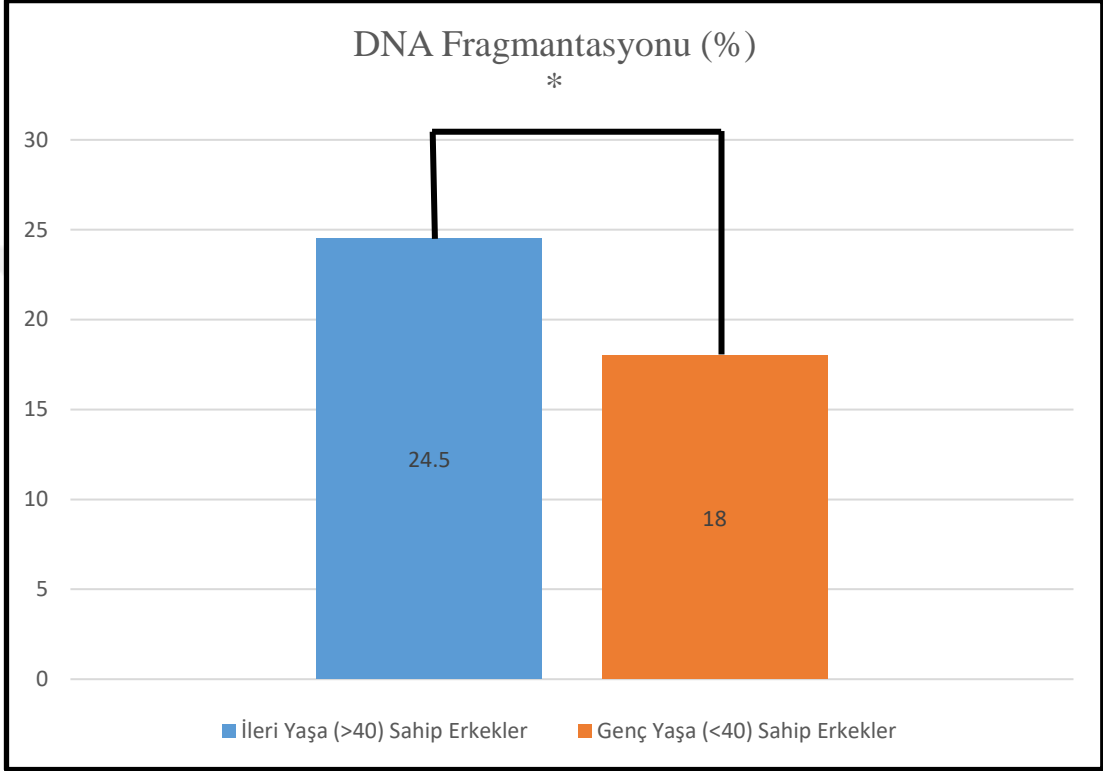
### 4.3. DNA Fragmentasyonu Analizi

Çalışmamızda DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi sonuçları Tablo 4.3 ve Şekil 4.3.1, Şekil 4.3.2 ve Şekil 4.3.3'de gösterilmiştir.

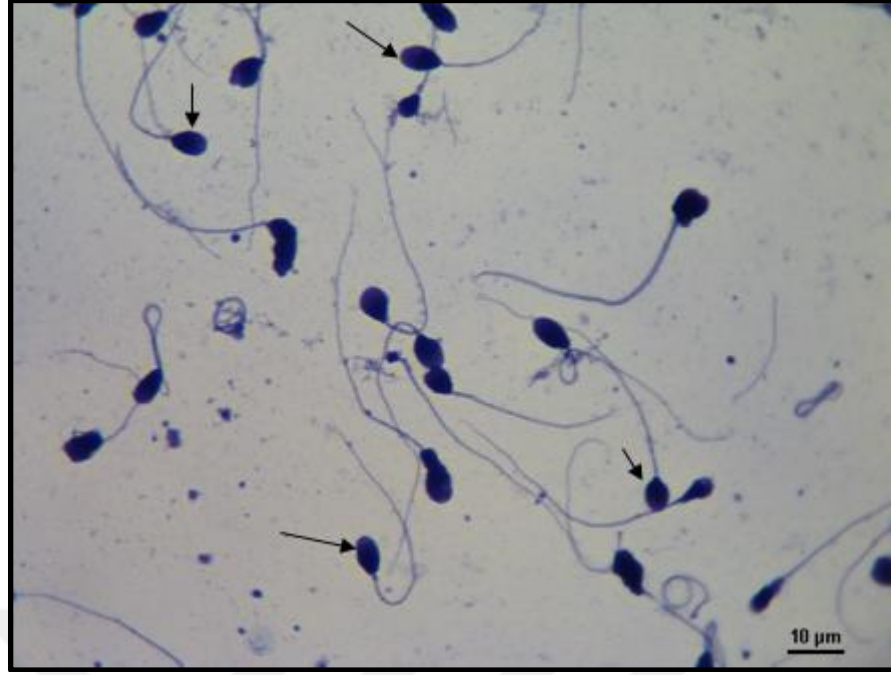
İstatistiksel sonuçlara göre DNA fragmentasyonu analizi sonucunda ileri yaştaki erkeklerin (>40) ortalama DNA fragmentasyonunun genç yaşta sahip erkeklere (<40) göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu gözlemlenmiştir ( $p < 0,029$ ).

Tablo 4.3: DNA fragmentasyonu istatistiksel analizi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

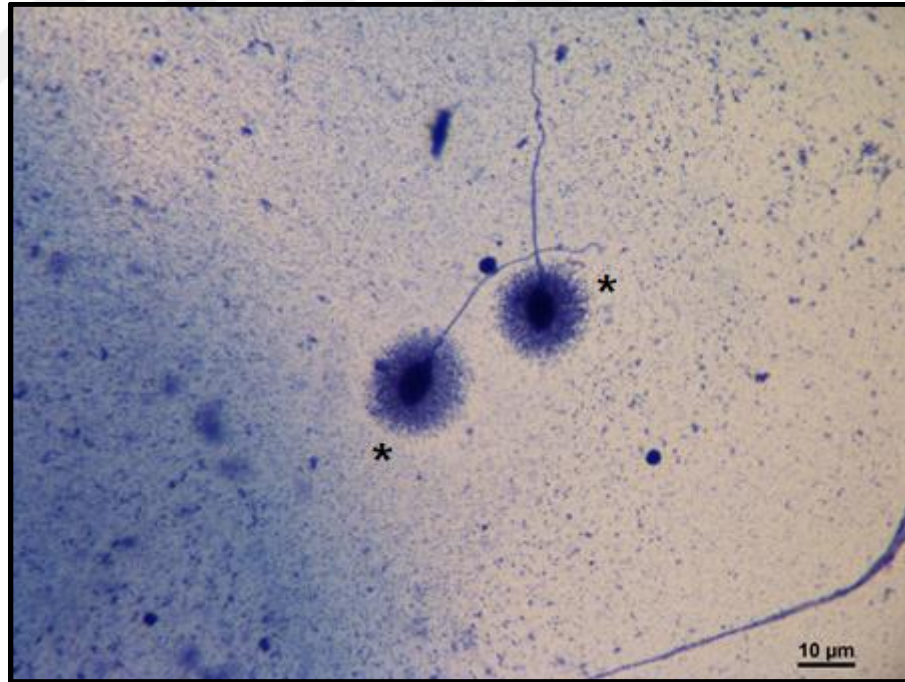
	<b>İleri Yaşa (&gt;40) Sahip Erkekler</b>	<b>Genç Yaşa (&lt;40) Sahip Erkekler</b>	<b><i>p</i> değeri</b>
<b>DNA Fragmentasyonu (%)</b>	24,50 $\pm$ 1,29	18,00 $\pm$ 1,82	0,029*



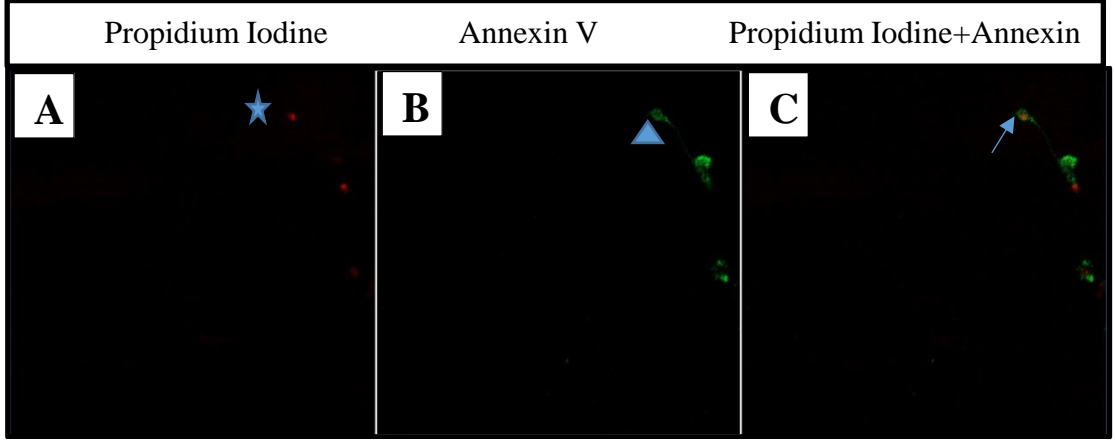
Şekil 4.3.1: DNA fragmentasyonu analizi sonuçları.  
\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,029$ )



Şekil 4.3.2: SCSA ile analiz edilen halo gözlenmeyen DNA'sı fragmente olmuş sperm hücreleri. Ok ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmektedir (ışık mikroskopi, görüntü 100X büyütme).



Şekil 4.3.3: SCSA ile analiz edilen halo gözlenen DNA'sı fragmente olmamış sperm hücreleri. Yıldız ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu görülmemektedir (ışık mikroskopi, görüntü 100X büyütme).



Şekil 4.3.4: DNA fragmantasyonu (Annexin V/Propidyum İyodür (PI) boyama) analiz sonuçları. (A) Yıldız ile gösterilen hücre PI ile boyandığında kırmızı, (B) ok başı ile gösterilen hücre Annexin V ile boyandığında yeşil ve (C) her ikisi ile boyanması sonucu ok ile gösterilen hücre sarı olarak görülmekte ve geç apoptotik veya nekrotik hücreyi belirtmektedir.

#### 4.4. Sperm Kromatin Yapı Analizi

Çalışmamızda sperm kromatin yapı analizi için Toluidin Mavi analizi sonuçları Tablo 4.4.1, Tablo 4.4.2 ve Şekil 4.4.1’de, görüntüleri ise Şekil 4.4.2’de gösterilmiştir.

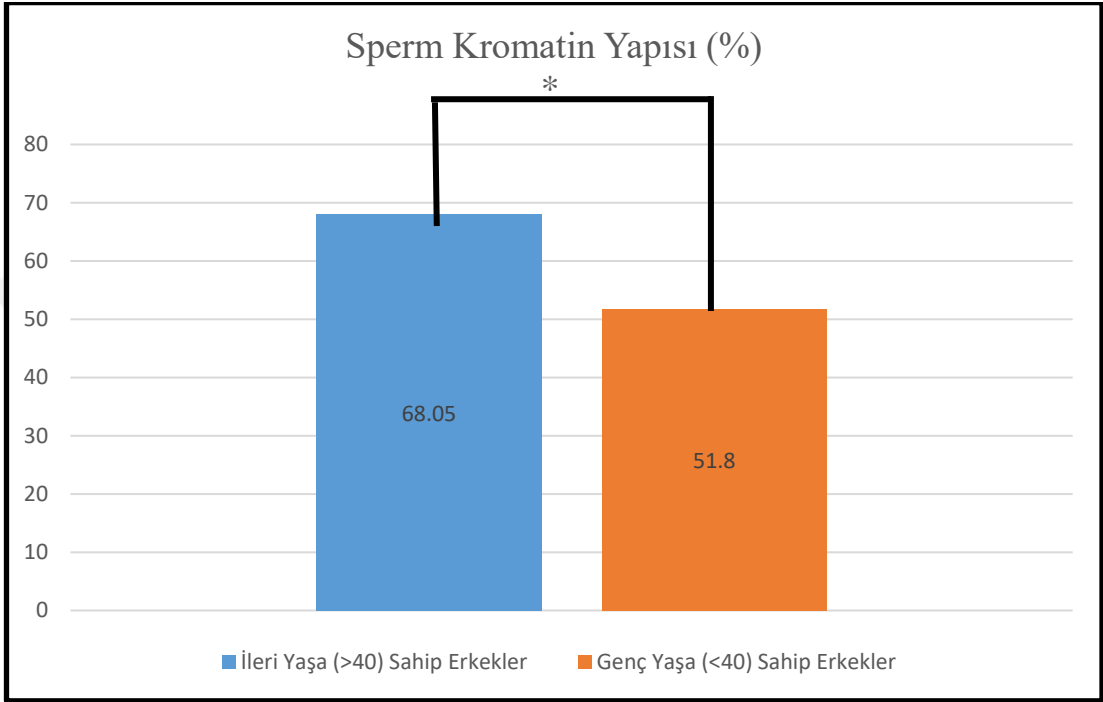
İstatistiksel sonuçlara göre sperm kromatin yapı analizi sonucunda ileri yaştaki erkeklerin (>40) ortalama sperm kromatin yapısı bozukluğu genç yaşa sahip erkeklere (<40) göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu gözlemlenmiştir ( $p<0,000$ ).

Tablo 4.4.1: Tüm hastaların sperm kromatin yapısı inceleme sonuçları. KB: Kromatin yapısı, (+): kromatin yapısı normal, (-): kromatin yapısı bozuk.

	<b>Kromatin Yapı (%)</b>	
	<b>KY (+)</b>	<b>KY (-)</b>
<b>Hastalar</b>	54	46
<b>Hasta1</b>	45	55
<b>Hasta2</b>	36	64
<b>Hasta3</b>	36	64
<b>Hasta4</b>	20	80
<b>Hasta5</b>	38	62
<b>Hasta6</b>	44	56
<b>Hasta7</b>	20	80
<b>Hasta8</b>	42	58
<b>Hasta9</b>	21	79
<b>Hasta10</b>	17	83
<b>Hasta11</b>	48	52
<b>Hasta12</b>	47	53
<b>Hasta13</b>	36	64
<b>Hasta14</b>	20	80
<b>Hasta15</b>	12	88
<b>Hasta16</b>	28	72
<b>Hasta17</b>	22	78
<b>Hasta18</b>	29	71
<b>Hasta19</b>	24	76
<b>Hasta20</b>	54	46
<b>Hasta21</b>	57	43
<b>Hasta22</b>	20	80
<b>Hasta23</b>	41	59
<b>Hasta24</b>	28	72
<b>Hasta25</b>	59	41
<b>Hasta26</b>	68	32
<b>Hasta27</b>	49	51
<b>Hasta28</b>	64	36
<b>Hasta29</b>	57	43
<b>Hasta30</b>	59	41
<b>Hasta31</b>	38	62
<b>Hasta32</b>	51	49
<b>Hasta33</b>	69	31
<b>Hasta34</b>	40	60
<b>Hasta35</b>	58	42
<b>Hasta36</b>	24	76
<b>Hasta37</b>	49	51
<b>Hasta38</b>	52	48
<b>Hasta39</b>	25	75
<b>Hasta40</b>	56	44

Tablo 4.4.2: Sperm kromatin yapı bütünlüğünün istatistiksel sonuçları. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

	<b>İleri Yaşa (&gt;40) Sahip Erkekler</b>	<b>Genç Yaşa (&lt;40) Sahip Erkekler</b>	<b><i>p</i> değeri</b>
<b>Sperm Kromatin Yapısı (%)</b>	68,05 $\pm$ 12,20	51,80 $\pm$ 14,85	0,000*



Şekil 4.4.1: Sperm kromatin yapısı analizi sonuçları.

\* İstatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,000$ )



Şekil 4.4.2: Kromatin yapısı normal ve bozulmuş olan sperm hücreleri. Kromatin yapısı bozulmuş olanlar koyu mavi olarak boyanmış ve ok ile gösterilmiştir. Kromatin yapısı normal olan sperm hücreleri açık mavi boyanmış ve yıldız ile gösterilmiştir (ışık mikroskobu, görüntü 100X büyütme).

#### 4.5. PARP Proteini Ekspresyonu Analizi

Çalışmamızda immünohistokimyasal boyama yöntemi ile ileri yaşa (>40) ve genç yaşa (<40) sahip erkek hastalarda PARP proteininin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. İmmünoreaktivite Skor (IRS) analiz sonuçları Tablo 4.5.1, Tablo 4.5.2 ve Şekil 4.5.1’de, mikroskop görüntüleri ise Şekil 4.5.2, Şekil 4.5.3 ve Şekil 4.5.4’de gösterilmiştir.

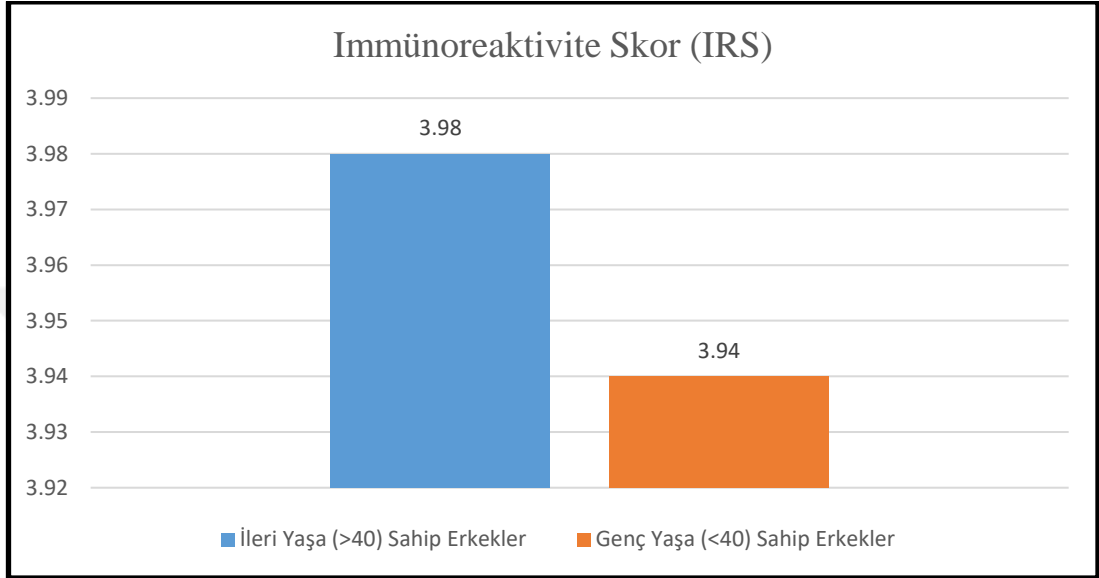
İstatistik sonuçlarına göre ileri yaşa (>40) ve genç yaşa (<40) sahip erkek hastalarda PARP proteininin ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ( $p<0,947$ ).

Tablo 4.5.1: Tüm hastaların PARP protein ekspresyonu inceleme sonuçları.

<b>Hastalar</b>	<b>Immünoreaktivite Skor (IRS)</b>
Hasta 1	4,6
Hasta 2	3,8
Hasta 3	2,48
Hasta 4	3,8
Hasta 5	5,76
Hasta 6	5,4
Hasta 7	4,64
Hasta 8	2,76
Hasta 9	3,52
Hasta 10	3,56
Hasta 11	4
Hasta 12	2,04
Hasta 13	2,16
Hasta 14	5,04
Hasta 15	4,56
Hasta 16	6,64
Hasta 17	3,36
Hasta 18	2,56
Hasta 19	3,84
Hasta 20	5,2
Hasta21	4,04
Hasta22	4,72
Hasta23	5,52
Hasta24	2,88
Hasta25	3,72
Hasta26	4,96
Hasta27	3,4
Hasta28	3,72
Hasta29	4,28
Hasta30	6,64
Hasta31	2,74
Hasta32	4
Hasta33	4,04
Hasta34	3,92
Hasta35	2,6
Hasta36	3,12
Hasta37	3,32
Hasta38	4,32
Hasta39	3,44
Hasta40	3,6

Tablo 4.5.2: PARP protein ekspresyonu istatistik sonuçları. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

	<b>İleri Yaşa (&gt;40) Sahip Erkekler</b>	<b>Genç Yaşa (&lt;40) Sahip Erkekler</b>	<b><i>p</i> değeri</b>
<b>İmmünoreaktivite Skor (IRS)</b>	3,98 $\pm$ 1,25	3,94 $\pm$ 0,97	0,947



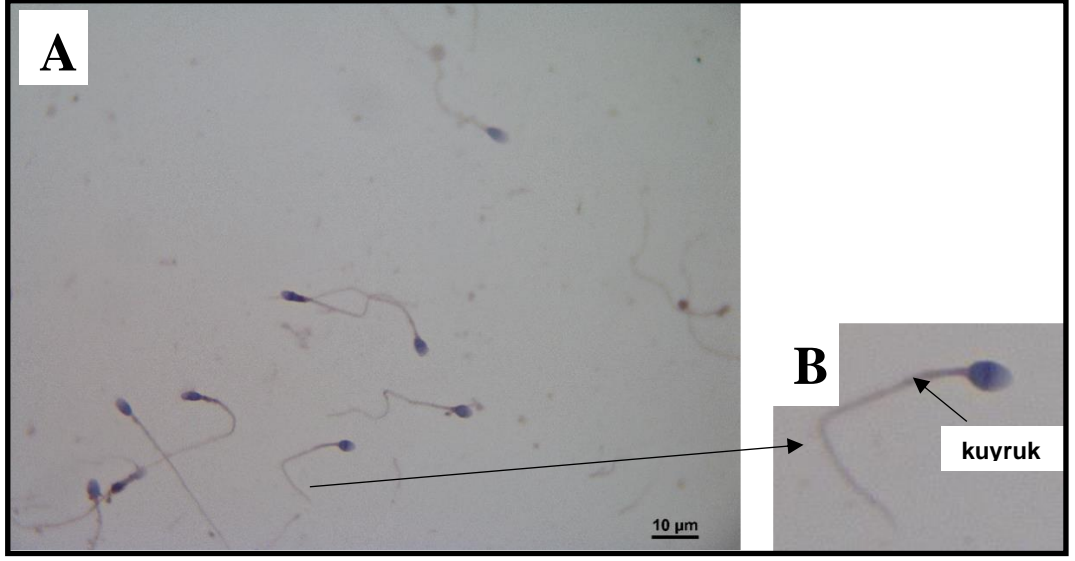
Şekil 4.5.1: İmmünoreaktivite Skor (IRS) analizi sonuçları



Şekil 4.5.2: PARP protein ekspresyonu immünohistokimyasal analizi. Ok kuyruğu, ok başı ise boyun bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir (ışık mikroskopi, görüntü 100X büyütme).



Şekil 4.5.3: PARP protein ekspresyonu immünohistokimyasal analizi. (A) Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun ışık mikroskopi görüntüsü (100X büyütme). (B) Ok ile gösterilen sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun %300 büyütülmüş görüntüsü.



Şekil 4.5.4: PARP protein ekspresyonu immünohistokimyasal analizi. (A) Sperm hücresinin kuyruk bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun ışık mikroskopu görüntüsü (100X büyütme). (B) Ok ile gösterilen sperm hücresinin kuyruk bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun %300 büyütülmüş görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA

Son zamanlarda, çiftlerin genellikle ileri yaşta anne ve baba olma eğiliminde oldukları gözlemlenmektedir. Yapılan araştırmalar ile ileri anne yaşının etkileri iyi tanımlanmış olsada, ileri baba yaş hem bilinen hem de bilinmeyen riskler taşır.

Çalışmamızda, literatürdeki ileri baba yaşı ve infertilite arasındaki ilişki hakkındaki belirsizlikleri aydınlatma amacıyla ileri baba yaşının oksidatif stres, DNA fragmantasyonu, kromatin yapısı gibi genetik parametreler ve PARP proteininin ekspresyon düzeyleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla, sperm parametreleri (konsantrasyon, morfoloji ve motilite), oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS, OSİ değerleri), DNA fragmantasyonu ve kromatin yapı bütünlüğü gibi genetik yapı parametreleri, PARP proteininin ekspresyon seviyeleri araştırılmış ve analiz edilmiştir.

Çalışmamıza, sonuçları etkileyebilecek tüm diğer parametrelerin etkisini minimize edebilmek ve oksidatif stresin etkilerini direkt olarak analiz edebilmek için sperm parametrelerinde problem belirlenmemiş normozoospermik (DSÖ,2010 kriterlerine göre), 40 yaş altı ve 40 yaş üstü olmak üzere iki ayrı yaş grubundaki erkekler dahil edilmiştir. Araştırılan tüm parametreler, aşağıda tartışılmıştır.

Semen analizi aracılığı ile sperm parametreleri hakkında kolaylıkla bilgi edinilebilmektedir. Yapılan çalışmalar infertilite ile sperm konsantrasyonu, morfolojisi ve motilitesi gibi çeşitli sperm parametreleri arasında önemli bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır [Colasante et al., 2018], [Ok et al., 2008]. Baba yaşı ve sperm parametreleri arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmaların çoğu yaşın artması ile sperm bu parametrelerin olumsuz etkilendiğini göstermektedir [Sharma et al., 2015], [Kidd et al., 2001].

Sperm konsantrasyonu ile ilgili yapılan çalışmaların bir kısmı yaşın artmasıyla sperm konsantrasyonunun azaldığını, bir kısmı ise yaşın artmasıyla konsantrasyonun arttığını ileri sürmektedir. Yapılan bir çalışmada yaşın ilerlemesiyle sperm konsantrasyonunda kademeli bir artışın olduğunu ortaya koyulmuştur [Levitas et al., 2005]. Yine yapılan başka bir araştırmada yaşın artmasıyla sperm konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış olduğunu iddia etmişlerdir [Brahem et al., 2011]. Yaşın artmasıyla sperm konsantrasyonunun arttığını gösteren çalışmaların yanı sıra yaşın artmasıyla konsantrasyonun azaldığını ortaya koyan birçok çalışma

bulunmaktadır [Haidl et al., 1996], [Eskenazi et al., 2003], [Centola et al., 1999]. Ayrıca, yaşın artması ile sperm konsantrasyonu arasında tutarlı bir ilişki bulunmadığını öne süren çalışmalar da bulunmaktadır [Dain et al., 2011], [Kidd et al., 2001], [Schwartz et al., 1983], [Aboulghar et al., 2007]. Literatürdeki araştırmalara bakıldığında yapılan çalışmaların çoğu yaşın artmasıyla sperm konsantrasyonunun da arttığı sonucunu desteklemektedir. Bizim çalışmamızda sperm konsantrasyonu sonuçlarına bakıldığında 40 yaş altı erkeklerde sperm konsantrasyonu ( $10^6/ml$ ) değeri ortalama 27,62 olarak ve 40 yaş üstü erkeklerin sperm konsantrasyonu ( $10^6/ml$ ) değeri ortalama 23,44 olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ( $p<0,446$ ).

Bir diğer parametre olan sperm morfolojisine bakıldığında da araştırmaların sonuçları arasında farklılar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda ilerleyen erkek yaşı ile normal sperm morfoloji yüzdesinin azaldığı görülmektedir [Brahem et al., 2011], [Guzick et al., 2001]. Çalışmalar, normal sperm morfolojisinde her yaş için %0,2 ila %0,9'luk bir azalma olduğunu ve bunun 20 yıllık bir süre boyunca normal sperm morfolojisinde %4 ila %18'lik bir azalmaya neden olduğunu göstermektedir [Keel et al., 2006], [Harris et al., 2011], [Auger et al., 1995]. Yapılan başka bir çalışmada erkek yaşının ilerlemesi ile normal sperm morfoloji yüzdesinin azalmadığı görüşü iddia edilmiştir [Dain et al., 2011]. Farklı bir çalışmada ise normal sperm morfolojisi ile yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunamadığı belirtilmiştir [Andolz et al., 1999]. Bizim çalışmamızın sonucuna baktığımızda 40 yaş altı erkeklerde normal sperm morfoloji yüzdesi ortalama 0,8 iken 40 yaş üstü erkeklerin normal sperm morfoloji yüzdesi ortalama 0,1'dir. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ( $p<0,138$ ).

Sperm konsantrasyonu ve sperm morfoloji analiz sonuçlarının diğer çalışmalar ile aralarındaki bu farklılıkların sebebi çalışılan hasta gruplarındaki erkeklerin cinsel yoksunluk süresi, beslenme alışkanlıkları, etnik kökenlerin farklı olması, örneklem büyüklüğünün değişken olması ve yaş gruplarının farklı olmasından kaynaklanıyor olabilmektedir [Bujan et al., 1988], [Pino et al., 2020]. Bizim sonuçlarımızın literatürdeki araştırmalardan farklı olmasının sebepleri de çalışmalardaki hastaların sayılarının, etnik kökenlerinin ve yaş gruplarının farklı olmasından dolayı olabileceği düşünülmektedir.

Sperm parametrelerinden biri olan motiliteye bakıldığında ise yapılan çalışmalarda ilerleyen erkek yaşı ile sperm motilite yüzdesinin azaldığını ileri

sürmektedir [Andolz et al., 1999], [Verón et al., 2018]. Bir başka çalışmada da motilitenin 40 yaşından sonra istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını ortaya koymaktadır [Agarwal and Sekhon, 2011]. Bizim çalışmamızda bu araştırma sonuçlarını destekler nitelikte olup sperm motilitesi ileri yaşa (>40) sahip erkeklerde %30,11 iken genç yaşa (<40) sahip erkeklerde %51,33'tür ve yaşın ilerlemesiyle sperm motilitesinin (%) istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı gözlemlenmiştir ( $p<0,003$ ).

Sperm hücresi işlev bozukluğunun en önemli sebeplerinden biri oksidatif strestir. Yapılan çalışmalar, spermatozoanın hem yapısal hem de işlevsel bütünlüğünün bozulmasında oksidatif stresin etkili olduğunu ortaya koymaktadır [Henkel, 2011]. Yapılan çalışmalarda yaşla birlikte artan oksidatif stresin sperm hücrelerine zarar verdiğini ve oksidatif stresin neden olduğu hasarın yaşa bağlı birikimini ortaya koymaktadır [Beckman and Ames, 1998]. Yapılan diğer araştırmalarda yaşın ilerlemesi ile antioksidan savunma sistemlerinin bileşenlerinin dağılımının değiştiğini [Mueller et al., 1998] ve antioksidan savunmalarda yer alan gen ürünlerinin ekspresyonunun azaldığını [Jervis and Robaire, 2002] göstermektedir.

Çalışmamızda oksidatif stres parametreleri olan Total Oksidan Seviyesi (TOS), Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki oksidatif dengeyi ortaya koyan Oksidatif Stres İndeks (OSİ) değerleri incelenmiştir. Çalışmamızda 40 yaş altı erkeklerde OSİ değeri ortalama 1,21 olarak ve 40 yaş üstü erkeklerin OSİ değeri ortalama 0,92 olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ( $p<0,817$ ).

Literatürdeki çalışmaların aksine bizim çalışmamızda iki grup arasında anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bu sonuç bize oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengeyi ifade eden OSİ değerinin, bu iki gruptaki hastaların normozospermik vakalardan seçilmesinden kaynaklı olarak çok yüksek olmaması nedeniyle elde edildiğini düşündürmektedir. Ayrıca, çalışmamızdaki hastalarda antioksidan seviyelerinin yüksek bulunmasından kaynaklı olarak bu sonuçların dengelenmiş olabileceği düşünülmektedir. Antioksidan seviyeleri; beslenme tarzı, alınan takviye ediciler ve yaşam şartlarıyla ilişkili olabilmektedir; anlamlı bir sonuç elde edememizin sebebi olarak bu konu ile ilgili elimizde hasta verileri olmadığından kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızdaki gruplardan 40 yaş altı hastaların yaş ortalaması 30 ve 40 yaş üstü hastaların yaş ortalaması ise 45'tir. Bu durum iki grubun yaş ortalamalarının birbirine yakın olmasından dolayı da fark gözlenmemiş olabileceğini düşündürmüştür.

Yavruya DNA'nın yarısı babadan geldiğinden dolayı sperm üzerinde DNA hasarının incelenmesi oldukça büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple bu konu üzerine yapılan çalışmalar, erkek kısırlı ğını etkileyen en önemli sebeplerden birinin spermde DNA fragmentasyonu olduğunu göstermektedir [Zeqiraj et al., 2018]. Sperm DNA fragmentasyonunda meydana gelen bir artışın doğal üremeyi etkilediği çeşitli araştırmalar tarafından ortaya konmaktadır [Simon et al., 2019].

İleri baba yaşı ve DNA fragmentasyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır. Sperm DNA fragmentasyonunda artışın sırasıyla 35 ve 40 yaşından sonra arttığı çeşitli araştırmalar ile ortaya konmaktadır [Dunson et al., 2004], [Stewart and Kim, 2011], [Kimberly et al., 2012]. İleri yaştaki infertil erkekler fertil erkekler ile karşılaştırıldığında, infertil erkeklerde daha fazla sperm DNA'sında kırılmalarının meydana geldiği gözlenmektedir [Plastira et al., 2007]. Wyrobek ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yaşları 22-80 arasında olan 97 erkek spermi incelenmiş olup *FGRF3* genindeki mutasyonlar ve DNA fragmentasyonu olan spermlerin yüzdesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif ilişki bulmuştur [Wyrobek et al., 2006]. Bunların yanı sıra kanıtlanmış birincil veya ikincil kısırlığa sahip fertil ve infertil erkekler arasındaki DNA fragmentasyonu inceleyen altı çalışma bulunmaktadır [Petersen et al., 2018], [Kaarouch et al., 2018], [Cohen-Bacrie et al., 2009], [Evenson et al., 2020], [Antonouli et al., 2019], [Blachman-Braun et al., 2020]. Bu çalışmaların hepsi ileri baba yaşı ile artan DNA fragmentasyonu lehine anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda DNA fragmentasyonu, geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği (SCSA) ile ileri yaşa (>40) sahip hasta gruplarından 4 tane ve genç yaşa (<40) sahip hasta gruplarından 4 tane olmak üzere toplam 8 sperm örneğinde HaloSperm kit kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarında göre 40 yaş üstündeki erkek hastalarda DNA fragmentasyonu 40 yaş altındaki erkek hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek gözlemlenmiştir ( $p<0,029$ ). Çalışmamızın bulguları literatürdeki diğer çalışmaları destekler niteliktedir. Çalışmamız sonucuna göre ileri baba yaşının DNA fragmentasyonuna sebep olup infertiliteye sebep olabileceği çalışmamızın hipotezini de destekler niteliktedir.

Semen analizinin geleneksel parametreleri üreme potansiyelinin değerlendirilmesi için yetersiz kalmaktadır [Agarwal and Allamaneni, 2005]. Bundan dolayı kromatin yapısı infertil çiftlerde klinik gidişatın şekillendirilmesinde çok önemli bir parametre olduğu kabul edilmektedir. Çeşitli kimyasallar, toksinler, radyasyon, sıcaklık ve hastalıklar gibi çeşitli etkenler sperm kromatin yapısını olumsuz yönde etkilemektedir [Love et al., 2002]. Sperm kromatin yapısının normal olması genetik bilginin sıkıntısız, eksiksiz ve doğru bir şekilde iletilmesi açısından önem teşkil etmektedir [Agarwal and Said, 2003]. Spermde kromatin yapısının normal olması sağlıklı embriyo büyümesi ve gelişimi için de oldukça önemli ve gereklidir [Deenadayal Mettler et al., 2020]. Bir spermin sağlıklı olarak kabul edilebilmesi için kompakt ve yoğunlaşma yeteneğine sahip olması gerekmektedir; bu sebeple sperm kromatin yapısının bozuk olduğu durumlar erkek kısırlığına neden olabilmektedir [Agarwal and Said, 2003].

İlerleyen yaşa sahip erkekler anormal kromatin yapısına ve bundan dolayı da infertiliteye sahip olabilmektedir. Yapılan çalışmalar yaşlanmanın sperm kromatin yapısında olumsuz etkiler oluşturduğunu ortaya koymaktadır [Plastira et al., 2007], [Winkle et al., 2009]. Yine yapılan başka çalışmalarda da ilerleyen baba yaşı ile kromatin yapıdaki bozukluk arasında anlamlı bir ilişki olduğu ortaya koyulmaktadır [Wyrobek et al., 2006].

Sperm kromatin yapı analizi için metakromatik nükleer bir tiyazin boyası olan toluidine mavisi (TB), mikroskopik bir yöntem olarak çalışmalarda kullanılmaktadır [Erenpreisa et al., 2003]. Çalışmamızın bulguları literatürdeki diğer çalışmaları destekler niteliktedir. Bizim çalışmamıza göre 40 yaş üstündeki erkek hastaların sperm kromatin yapısı bozukluğunun 40 yaş altındaki erkek hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu gözlemlenmiştir ( $p < 0,000$ ). Buradan yola çıkarak ileri baba yaşının sperm kromatin yapısını bozup infertiliteye neden olabileceği çalışmamızın hipotezini destekler niteliktedir.

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP); DNA'daki kırıklar, baz uyumsuzlukları ve baz eksizyonu gibi çeşitli sorunların onarımında rol oynayan bir DNA onarım enzimidir [Agarwal et al., 2009]. Eğer DNA'daki hasar az ise, PARP diğer onarım enzimleriyle DNA onarımını sağlayabilmektedir [Heeres and Hergenrother, 2007]. Literatürde, PARP'ın bu görevinin yanı sıra hem apoptozda hem de nekrozda rol aldığı ortaya konmaktadır [Heeres and Hergenrother, 2007], [Oliver et al., 1999], [Zerfaoui et al., 2008]. DNA'da hasar meydana geldiğinde, kaspaz-3 proteinin aktive olmasıyla

PARP bölünür ve PARP'ın aktivasyonu engellenerek apoptozun meydana gelmektedir [Kaufmann et al., 1993]. Bu sebepten apoptozun bir belirteci olarak, bölünmüş PARP (cPARP) kabul edilebilmektedir [Pacher and Szabo, 2008], [Duriez and Shah, 1997]. Böylece, infertil erkeklerin sperminde daha yüksek seviyede cPARP bulunması, apoptoz ile erkek infertilitesi arasındaki bir ilişki olabileceğini ortaya koymaktadır [Kaufmann et al., 1993], [Mahfouz et al., 2009]. Bu infertilite vakalarında görülen artan apoptoz oranı, fazla DNA hasarı olan üreme hücrelerinin yok edilmesine bağlı olabilir. Ayrıca, eğer DNA'da yüksek hasar oluşursa, PARP aşırı aktif hale gelip ATP/NAD tükenmesine ve nekroza da sebep olabilmektedir [Berger et al., 2020]. Yapılan araştırmalarda PARP enziminin ekspresyonunun olgun sperm ve fertil erkeklerde yüksek olduğu gözlenmektedir [Said and Khosravi, 2012].

PARP; telomer onarımı, bağışıklık cevapları, DNA onarımı ve hücre ölümündeki işlevi aracılığıyla yaşlanmada da önemli rol oynamaktadır [Beneke and Bürkle, 2007]. Yaşlanma bir erkeğin fertilitate potansiyelini etkileyebilecek olan DNA'da hasar meydana gelmesine sebep olmaktadır. Yakın tarihli bir çalışmada El-Domyati ve arkadaşları farklı yaş gruplarındaki fertil erkekler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, yaşın artması ile PARP1 ve diğer DNA onarım enzimlerinde artış gözlemlenmiştir [El-Domyati et al., 2009]. Bu artış, erkek yaşının ilerlemesinin bir sonucu olarak sperm kromatin yapısının bozulmasıyla ilişkili olabilir.

Bizim çalışmamızda istatistik sonuçlarına göre ileri yaşa (>40) ve genç yaşa (<40) sahip erkek hastalarda PARP proteininin ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p < 0,947$ ). Bunun sebebi; çalışmamızdaki gruplardan 40 yaş altı hastaların yaş ortalaması 30 ve 40 yaş üstü hastaların yaş ortalaması ise 45'tir. İki grubun yaş ortalamalarının birbirine yakın olmasından dolayı da fark gözlenmemiş olabileceği düşünülmektedir. Bunların yanı sıra hasta gruplarındaki erkeklerin beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzlarının farklı olması da anlamlı bir sonuç elde etmemize engel olmuş olabileceğini düşündürmüştür.

PARP'ın hücrel süreçlerdeki rolü iyi tanımlanmış olsa da erkek doğurganlığındaki rolü henüz yeterince aydınlatılamamıştır. PARP'ın spermatogenez sırasında testiste ve ejaküle edilmiş spermatozoada tespit edilmesi bir rolünün olduğunu düşündürecek kadar yeterli kanıt bulunmaktadır [Mahfouz et al., 2009], [Jha et al., 2009]. Özellikle ileri baba yaşı ile PARP'ın sperm DNA onarımındaki rolünü tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

Aboulghar M., Mansour R., Al-Inany H., Abou-Setta A. M., Aboulghar M., Mourad L., Serour G., (2007), "Paternal age and outcome of intracytoplasmic sperm injection", *Reproductive biomedicine online*, 14(5), 588-592.

Agarwal A., Allamaneni S. S., (2005), "Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come", *Fertility and Sterility*, 84 (4), 850-853.

Agarwal A., Mahfouz R. Z., Sharma R. K., Sarkar O., Mangrola D., Mathur P. P., (2009), "Potential biological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in male gametes", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7 (1), 1-20.

Agarwal A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M. R., (2015), "A unique view on male infertility around the globe", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13 (1), 1-9.

Agarwal A., Rana M., Qiu E., AlBunni H., Bui A. D., Henkel R., (2018), "Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility", *Andrologia*, 50 (11), 1-13.

Agarwal A., Said T. M., (2003), "Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility", *Human Reproduction Update*, 9 (4), 331-345.

Agarwal A., Sekhon, L. H., (2011), "Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified?", *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India*, 27 (1), 74-85.

Agarwal A., Virk G., Ong C., Du Plessis S. S., (2014), "Effect of oxidative stress on male reproduction". *The World Journal of Men's Health*, 32 (1), 1-17.

Aitken R. J., Baker M. A., (2006), "Oxidative stress, sperm survival and fertility control", *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250 (1-2), 66-69.

Aitken R. J., Baker M. A., Iuliis G. N. D., Nixon B., (2010), "New insights into sperm physiology and pathology", *Handbook of Experimental Pharmacology*, 198, 99-115.

Aitken R. J., Smith T. B., Jobling M. S., Baker M. A., De Iuliis G. N., (2014), "Oxidative stress and male reproductive health", *Asian Journal of Andrology*, 16 (1), 31-38.

Andolz P., Bielsa M. A., Vila J., (1999), "Evolution of semen quality in North-eastern Spain: a study in 22 759 infertile men over a 36 year period", *Human Reproduction*, 14 (3), 731-735.

Antonouli S., Papatheodorou A., Panagiotidis Y., Petousis S., Prapas N., Nottola S. A., Prapas Y., (2019), "The impact of sperm DNA fragmentation on ICSI outcome in cases of donated oocytes", *Archives of gynecology and obstetrics*, 300(1), 207-215.

Atorino L., Di Meglio S., Farina B., Jones R., Quesada P., (2001), "Rat germinal cells require PARP for repair of DNA damage induced by  $\gamma$ -irradiation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment", *European journal of cell biology*, 80 (3), 222-229.

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

Avellino G., Theva D., Oates R. D., (2017), "Common urologic diseases in older men and their treatment: how they impact fertility", *Fertility and Sterility*, 107 (2), 305-311.

Balhorn R., Brewer L., Corzett M., (2000), "DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: Analysis of toroid stability using single DNA molecules", *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 56 (S2), 230-234.

Bansal, A. K., Bilaspuri, G. S. (2011). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Veterinary medicine international*, 2011, 1-7.

Baum J. S., George J. S., McCall K., (2005), "Programmed cell death in the germline", In *Seminars in cell & developmental biology*, 16 (2), 245-259.

Beckman K. B., Ames B. N., (1998), "The free radical theory of aging matures", *Physiological reviews*. 78, 547-581.

Beneke S., Bürkle A., (2007), "Poly (ADP-ribosyl) ation in mammalian ageing", *Nucleic acids research*, 35 (22), 7456-7465.

Berger N. A., Sims J. L., Catino D. M., Berger S. J., (2020), "Poly (ADP-ribose) polymerase mediates the suicide response to massive DNA damage: studies in normal and DNA-repair defective cells, In *ADP-ribosylation, DNA repair and cancer*", 1st Edition, CRC Press.

Blachman-Braun R., Best J. C., Sandoval V., Lokeshwar S. D., Patel P., Kohn T., Ramasamy R., (2020), "Sperm DNA fragmentation index and high DNA stainability do not influence pregnancy success after intracytoplasmic sperm injection", *F&S Reports*, 1(3), 233-238.

Blanker M. H., Bosch J. R., Groeneveld F. P., Bohnen A. M., Prins A. D., Thomas S., Hop, W. C., (2001), "Erectile and ejaculatory dysfunction in a community-based sample of men 50 to 78 years old: prevalence, concern, and relation to sexual activity", *Urology*, 57 (4), 763-768.

Bohr V., Anson R. M., Mazur S., Dianov G., (1998), "Oxidative DNA damage processing and changes with aging", *Toxicology letters*, 102, 47-52.

Brahem S., Mehdi M., Elghezal H., Saad A., (2011), "The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population", *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(5), 425-432.

Brandt J. S., Cruz Ithier M. A., Rosen T., Ashkinadze E., (2019), "Advanced paternal age, infertility, and reproductive risks: a review of the literature", *Prenatal Diagnosis*, 39 (2), 81-87.

Bray I., Gunnell D., Smith G. D., (2006), "Advanced paternal age: how old is too old?" *Journal of Epidemiology & Community Health*, 60 (10), 851-853.

Brewis A., Meyer M., (2005), "Marital coitus across the life course", *Journal of Biosocial Science*, 37 (4), 499-518.

Bujan L., Mieusset R., Mondinat C., Mansat A., Pontonnier F., (1988), "Sperm morphology in fertile men and its age related variation", *Andrologia*, 20(2), 121-128.  
Burgos M H., (1952), "El espermotodiagnostics [Spermiogram]". *La Semana Medica*, 101 (24), 766-75.

Carlsen E., Giwercman A., Keiding N., Skakkebaek N. E., (1992), "Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years", *British medical journal*, 305 (6854), 609-613.

Carson S. A., Kallen A. N., (2021), "Diagnosis and management of infertility: a review", *Jama*, 326 (1), 65-76.

Centola G. M., Eberly S., (1999), "Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration", *Fertility and sterility*, 72(5), 803-808.

Chandrasekaran A., Idelchik M. D. P. S., Melendez J. A., (2017), "Redox control of senescence and age-related disease", *Redox biology*, 11, 91-102.

Check J. H., Adelson H. G., Schubert B. R., Bollendorf A., (1992), "Evaluation of sperm morphology using Kruger's strict criteria", *Archives of Andrology*, 28 (1), 15-17.

Chen S. J., Allam J. P., Duan Y. G., Haidl G., (2013), "Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches", *Archives of gynecology and obstetrics*, 288 (1), 191-199.

Cho C. L., Esteves S. C., Agarwal A., (2016), "Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation", *Asian Journal of Andrology*, 18 (2), 186-193.

Choudhary R., Chawala V. K., Soni N. D., Kumar J., Vyas R. K., (2010), "Oxidative stress and role of antioxidants in male infertility", *Pakistan Journal of Physiology*, 6 (2), 54-59.

Cohen-Bacrie P., Belloc S., Ménézo Y. J., Clement P., Hamidi J., Benkhalifa M., (2009), "Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients", *Fertility and Sterility*, 91(5), 1801-1805.

Colasante A., Minasi M. G., Scarselli F., Casciani V., Zazzaro V., Ruberti A., Greco E., (2018), "The aging male: relationship between male age, sperm quality and sperm DNA damage in an unselected population of 3124 men attending the fertility centre for the first time", *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*, 90 (4), 254-259.

Dahl J. U., Gray M. J., Jakob, U., (2015), "Protein quality control under oxidative stress conditions", *Journal of Molecular Biology*, 427 (7), 1549-1563.

Dain L., Auslander R., Dirnfeld M., (2011), "The effect of paternal age on assisted reproduction outcome", *Fertility and Sterility*, 95 (1), 1-8.

Das M., Al-Hathal N., San-Gabriel M., Phillips S., Kadoch I. J., Bissonnette F., ... & Zini A., (2013), "High prevalence of isolated sperm DNA damage in infertile men with advanced paternal age", *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(6), 843-848.

De Kretser D. M., (1997), "Male infertility", *The lancet*, 349 (9054), 787-790.

Deenadayal Mettler A., Govindarajan M., Srinivas S., Mithraprabhu S., Evenson D., Mahendran T., (2020), "Male age is associated with sperm DNA/chromatin integrity", *The Aging Male*, 23 (5), 822-829.

Di Meglio S., Tramontano F., Cimmino G., Jones R., Quesada P., (2004), "Dual role for poly (ADP-ribose) polymerase-1 and-2 and poly (ADP-ribose) glycohydrolase as DNA-repair and pro-apoptotic factors in rat germinal cells exposed to nitric oxide donors" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1692 (1), 35-44.

Du Plessis Stefan S., Ashok Agarwal., Edmund S. Sabanegh Jr., (2014), "Male infertility: a complete guide to lifestyle and environmental factors", 1st Edition, Springer New York.

Dunson D. B., Baird D. D., Colombo B., (2004), "Increased infertility with age in men and women", *Obstetrics & Gynecology*, 103(1), 51-56.

Duriez P., Shah G. M., (1997), "Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death", *Biochemistry and Cell Biology*, 75 (4), 337-349.

Dutta S., Majzoub A., Agarwal A., (2019), "Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management", *Arab journal of urology*, 17 (2), 87-97.

El-Domyati M. M., Al-Din A. B. M., Barakat M. T., El-Fakahany H. M., Xu, J., Sakkas D., (2009), "Deoxyribonucleic acid repair and apoptosis in testicular germ cells of aging fertile men: the role of the poly (adenosine diphosphate-ribosyl) ation pathway", *Fertility and sterility*, 91(5), 2221-2229.

Erenpreisa J., Erenpreiss J., Freivalds T., Slaidina M., Krampe R., Butikova J., Pjanova D., (2003), "Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image

cytometry algorithm”, *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 52 (1), 19-27.

Eskenazi B., Wyrobek A. J., Slotter E., Kidd S. A., Moore L., Young S., Moore D., (2003), “The association of age and semen quality in healthy men”, *Human reproduction*, 18 (2), 447-454.

Esteves S. C., (2002), “Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study” *International Braz j Urol: Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 28 (5), 484-485.

Evenson D. P., Djira G., Kasperson K., Christianson J., (2020), "Relationships between the age of 25,445 men attending infertility clinics and sperm chromatin structure assay (SCSA®) defined sperm DNA and chromatin integrity", *Fertility and Sterility*, 114(2), 311-320.

Francis S., Yelumalai S., Jones C., Coward K., (2014), “Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment”, *Human fertility*, 17 (2), 80-89.

Gandini L., Lombardo F., Paoli D., Caruso F., Eleuteri P., Leter G., Spano M., (2004), “Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage”, *Human Reproduction*, 19 (6), 1409-1417.

Gao J., Yuan R., Yang S., Wang Y., Huang Y., Yan L., Qiao J., (2021), “Age-related changes in human conventional semen parameters and sperm chromatin structure assay-defined sperm DNA/chromatin integrity”, *Reproductive BioMedicine Online*, 42 (5), 973-982.

Gharagozloo P., Aitken R. J., (2011), “The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy”, *Human reproduction*, 26 (7), 1628-1640.

Gonzalez D. C., Ory J., Blachman-Braun R., Nackeeran S., Best J. C., Ramasamy R., (2022), "Advanced Paternal Age and Sperm DNA Fragmentation: A Systematic Review", *The world journal of men's health*, 40(1), 104.

Guo L. Y., Zhou H., Liu M., Li Q., Sun X. F., (2020), "Male age is more critical to sperm DNA integrity than routine semen parameters in Chinese infertile males", *Andrologia*, 52(1), e13449.

Guzick D. S., Overstreet J. W., Factor-Litvak P., Brazil C. K., Nakajima S. T., Coutifaris C., Vogel D. L. (2001), “Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men”, *New England Journal of Medicine*, 345(19), 1388-1393.

Güneş S., Kulaç T., (2013), “The role of epigenetics in spermatogenesis”, *Turkish Journal of Urology*, 39 (3), 181–187.

Haidl G., Jung A., Schill W. B., (1996), “Ageing and sperm function”. *Human Reproduction*, 11 (3), 558-560.

Harris I. D., Fronczak C., Roth L., Meacham R. B., (2011), "Fertility and the aging male", *Reviews in urology*, 13 (4), 184-190.

Heeres J. T., Hergenrother P. J., (2007), "Poly (ADP-ribose) makes a date with death", *Current opinion in chemical biology*, 11 (6), 644-653.

Henkel R. R., (2011), Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 13 (1), 43.

Hikim A. P. S., Lue Y., Diaz-Romero M., Yen P. H., Wang C., Swerdloff R. S., (2003), "Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 85 (2-5), 175-182.

Høst E., Ernst E., Lindenberg S., Smidt-Jensen S., (2001), "Morphology of spermatozoa used in IVF and ICSI from oligozoospermic men", *Reproductive Biomedicine Online*, 3 (3), 212-215.

Ilacqua A., Izzo G., Emerenziani G. P., Baldari C., Aversa A., (2018), "Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16 (1), 1-11.

Jervis K. M., Robaire B., (2002), "Changes in gene expression during aging in the Brown Norway rat epididymis", *Experimental Gerontology*, 37 (7), 897-906.

Jervis K. M., Robaire, B., (2004), "The effects of long-term vitamin E treatment on gene expression and oxidative stress damage in the aging Brown Norway rat epididymis", *Biology of Reproduction*, 71 (4), 1088-1095.

Jha R., Agarwal A., Mahfouz R., Paasch U., Grunewald S., Sabanegh E., Yadav S. P., Sharma R., (2009), "Determination of Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) homologues in human ejaculated sperm and its correlation with sperm maturation", *Fertility and sterility*, 91 (3), 782-790.

Kaarouch I., Bouamoud N., Madkour A., Louanjli N., Saadani B., Assou S., Sefrioui O., (2018), "Paternal age: negative impact on sperm genome decays and IVF outcomes after 40 years", *Molecular reproduction and development*, 85(3), 271-280.

Kaufmann S. H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N. E., Poirier G. G., (1993), "Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis", *Cancer research*, 53 (17), 3976-3985.

Keel B. A., (2006), "Within-and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors", *Fertility and sterility*, 85(1), 128-134.

Kervancıoğlu Demirci E., Kervancıoğlu G., Yıldırım Ş., Yetkin Yıldırım G., Polat İ., (2020), "2866 Semen analiz raporunda, yaş faktörünün semen değerleri üzerine olası etkisinin araştırılması", *Androloji Bülteni*, 22 (2), 90-93.

Kesari K. K., Agarwal A., Henkel R., (2018), "Radiations and male fertility", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16 (1), 1-16.

Khandwala Y. S., Zhang C. A., Lu Y., Eisenberg, M. L., (2017), "The age of fathers in the USA is rising: an analysis of 168 867 480 births from 1972 to 2015", *Human Reproduction*, 32 (10), 2110-2116.

Kidd S. A., Eskenazi B., Wyrobek A. J., (2001), "Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature", *Fertility and sterility*, 75(2), 237-248.

Kimberly L., Case A., Cheung A. P., Sierra S., AlAsiri S., Carranza-Mamane B., Case A., Dwyer C., Graham J., Havelock J., Hemmings R., Lee F., Liu K., Murdock W., Senikas V., Vause T. D., Wong B. C., (2012), "Advanced reproductive age and fertility: no. 269, November 2011", *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 117(1), 95-102.

Kovac J. R., Addai J., Smith R. P., Coward R. M., Lamb D. J., Lipshultz L. I., (2013), "The effects of advanced paternal age on fertility", *Asian Journal of Andrology*, 15 (6), 723-728.

Kühnert B., Nieschlag E., (2004), "Reproductive functions of the ageing male", *Human reproduction update*, 10 (4), 327-339.

Lanzafame F. M., La Vignera S., Vicari E., Calogero A. E., (2009), "Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility", *Reproductive Biomedicine Online*, 19 (5), 638-659.

Levitas E., Lunenfeld E., Weiss N., Friger M., Har-Vardi I., Koifman, A., Potashnik G., (2005), "Relationship between the duration of sexual abstinence and semen quality: analysis of 9,489 semen samples", *Fertility and sterility*, 83(6), 1680-1686.

Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte, D., Abete, P., (2018), "Oxidative stress, aging, and diseases", *Clinical Interventions In Aging*, 13, 757-772.  
Lin W. W., Lamb D. J., Wheeler T. M., Lipshultz L. I., Kim E. D. (1997), "In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis", *Fertility and Sterility*, 68 (6), 1065-1069.

Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010), "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health", *Pharmacognosy Reviews*, 4 (8), 118.

Love C. C., Thompson J. A., Lowry V. K., Varner, D. D., (2002), "Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility", *Theriogenology*, 57 (3), 1135-1142.

Mahfouz R. Z., Sharma R. K., Poenicke K., Jha R., Paasch U., Grunewald S., Agarwal A., (2009), "Evaluation of poly (ADP-ribose) polymerase cleavage (cPARP) in ejaculated human sperm fractions after induction of apoptosis", *Fertility and sterility*, 91 (5), 2210-2220.

Mahfouz R. Z., Sharma R. K., Said T. M., Erenpreiss J., Agarwal A., (2009), "Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa", *Fertility and sterility*, 91 (4), 1110-1118.

Maymon B. B. S., Cohen-Armon M., Yavetz H., Yogev L., Lifschitz-Mercer B., Kleiman S. E., Paz G. (2006), "Role of poly (ADP-ribosyl) ation during human spermatogenesis", *Fertility and sterility*, 86 (5), 1402-1407.

Mazur D. J., Lipshultz L. I., (2018), "Infertility in the Aging Male", *Current Urology Reports*, 19 (7), 1-9.

Meyer-Ficca M. L., Scherthan H., Bürkle A., Meyer R. G., (2005), "Poly (ADP-ribosyl) ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis", *Chromosoma*, 114 (1), 67-74.

Moskovtsev S. I., Willis J., Mullen J. B. M., (2006), "Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility", *Fertility and Sterility*, 85(2), 496-499.

Mueller A., Hermo L., Robaire B., (1998), "The effects of aging on the expression of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of the Brown Norway rat", *Journal of Andrology*, 19 (4), 450-465.

Nijs M., De Jonge C., Cox A., Janssen M., Bosmans E., Ombelet W., (2011), "Correlation between male age, WHO sperm parameters, DNA fragmentation, chromatin packaging and outcome in assisted reproduction technology". *Andrologia*, 43 (3), 174-179.

O'Flaherty C., Matsushita-Fournier D., (2017), "Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa", *Biology of Reproduction*, 97 (4), 577-585.

Ohashi Y., Ueda K., Kawaichi M., Hayaishi O., (1983), "Activation of DNA ligase by poly (ADP-ribose) in chromatin", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80 (12), 3604-3607.

Ok E., Özyurt D., Gülekli B., (2008), "Asthenozoospermia olgularında sperm morfolojisi değerlendirmede Spermac ve Diff-quick boya yöntemlerinin karşılaştırılması", *Gülhane Tıp Dergisi* 50 (1), 23-26.

Oliva R., (2006), "Protamines and male infertility", *Human reproduction update*, 12 (4), 417-435.

Oliver F. J., Menissier-de Murcia J., Nacci C., Decker P., Andriantsitohaina R., Muller S., de Murcia, G., (1999), "Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF- $\kappa$ B activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice", *The EMBO journal*, 18 (16), 4446-4454.

Pacher P., Szabo C., (2008), "Role of the peroxynitrite-poly (ADP-ribose) polymerase pathway in human disease", *The American journal of pathology*, 173 (1), 2-13.

Petersen C. G., Mauri A. L., Vagnini L. D., Renzi A., Petersen B., Mattila M., Franco Jr J. G., (2018), "The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples", *JBRA assisted reproduction*, 22(4), 323.

Pino V., Sanz A., Valdés N., Crosby J., Mackenna A., (2020), "The effects of aging on semen parameters and sperm DNA fragmentation", *JBRA assisted reproduction*, 24 (1), 82-86.

Plastira K., Msaouel P., Angelopoulou R., Zanioti K., Plastiras A., Pothos A., Mantas D., (2007), "The effects of age on DNA fragmentation, chromatin packaging and conventional semen parameters in spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic patients", *Journal of assisted reproduction and genetics*, 24(10), 437-443.

Pole A., Dimri M., Dimri G. P., (2016), "Oxidative stress, cellular senescence and ageing" *AIMS molecular science*, 3 (3): 300-324.

Powers S. K., Ji L. L., Kavazis A. N., Jackson M. J., (2011), "Reactive oxygen species: impact on skeletal muscle" *Comprehensive Physiology*, 1 (2), 941.

Print C. G., Loveland K. L., (2000), "Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis", *Bioessays*, 22 (5), 423-430.

Robert K. A., Sharma R., Henkel R., Agarwal A., (2021), "An update on the techniques used to measure oxidative stress in seminal plasma", *Andrologia*, 53 (2), 1-18.

Sadeghi M. R., (2018), "The 40th anniversary of IVF: has ART's success reached its peak?", *Journal of Reproduction & Infertility*, 19 (2), 67.

Said T. M., Khosravi, F., (2012), "Role of caspase, PARP, and oxidative stress in male infertility" In *Studies on Men's Health and Fertility*, Humana Press, 237-254.

Sakkas D., Mariethoz E., Manicardi G., Bizzaro D., Bianchi P. G., Bianchi U., (1999), "Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa", *Reviews of reproduction*, 4, 31-37.

Saleh R. A., Agarwal A., (2002), "Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice", *Journal of Andrology*, 23 (6), 737-752.

Sanocka D., Kurpisz M., (2004), "Reactive oxygen species and sperm cells", *Reproductive biology and endocrinology*, 2 (1), 1-7.

Schwartz D., Mayaux M. J., Spira A., Moscato M. L., Jouannet P., Czyglik F., David G., (1983), "Semen characteristics as a function of age in 833 fertile men", *Fertility and sterility*, 39(4), 530-535.

Selvam M. K. P., Agarwal A., (2018), "A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: laboratory assessment", *Arab Journal of Urology*, 16 (1), 65-76.

Selvaratnam J. S., Robaire B., (2016), "Effects of aging and oxidative stress on spermatozoa of superoxide-dismutase 1-and catalase-null mice", *Biology of Reproduction*, 95 (3), 60-1.

Selvin E., Burnett A. L., Platz E. A., (2007), "Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in the US", *The American Journal of Medicine*, 120 (2), 151-157.

Sharlip I. D., Jarow J. P., Belker A. M., Lipshultz L. I., Sigman M., Thomas A. J., Sadovsky R., (2002), "Best practice policies for male infertility", *Fertility and Sterility*, 77 (5), 873-882.

Sharma R., Agarwal A., Rohra V. K., Assidi M., Abu-Elmagd M., Turki R. F., (2015), "Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13 (1), 1-20.

Simon L., Emery B., Carrell D. T. (2019), "Sperm DNA fragmentation: consequences for reproduction", In *Genetic Damage in Human Spermatozoa*, 1166- 87-105.

Singh N. P., Muller C. H., Berger R. E., (2003), "Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm", *Fertility and Sterility*, 80 (6), 1420-1430.

Spina-Purrello V., Patti D., Giuffrida-Stella A. M., Nicoletti V. G., (2008), "PARP and cell death or protection in rat primary astroglial cell cultures under LPS/IFN $\gamma$  induced proinflammatory conditions", *Neurochemical research*, 33 (12), 2583-2592.

Ståhl O., Eberhard J., Jepson K., Spano M., Cwikiel M., Cavallin-Ståhl E., Giwercman A., (2006), "Sperm DNA integrity in testicular cancer patients", *Human Reproduction*, 21 (12), 3199-3205.

Stewart A. F., Kim E. D., (2011), "Fertility concerns for the aging male", *Urology*, 78(3), 496-499.

Tahmasbpour E., Balasubramanian D., Agarwal A., (2014), "A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART)", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31 (9), 1115-1137.

Tanori M., Mancuso M., Pasquali E., Leonardi S., Rebessi S., Di Majo V., Saran A., (2008), "PARP-1 cooperates with Ptc1 to suppress medulloblastoma and basal cell carcinoma", *Carcinogenesis*, 29 (10), 1911-1919.

Tesarik J., Greco E., Cohen-Bacrie P., Mendoza C., (1998), "Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure", *Molecular human reproduction*, 4 (8), 757-762.

Tremellen K., (2008), "Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective", *Human Reproduction Update*, 14 (3), 243-258.

Verón G. L., Tissera A. D., Bello R., Beltramone F., Estofan G., Molina R. I., Vazquez-Levin M. H., (2018), "Impact of age, clinical conditions, and lifestyle on routine semen parameters and sperm kinematics", *Fertility and Sterility*, 110(1), 68-75.

Virro M. R., Larson-Cook K. L., Evenson D. P., (2004), "Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles", *Fertility and sterility*, 81(5), 1289-1295.

Weir C. P., Robaire, B., (2007), "Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat", *Journal of Andrology*, 28 (2), 229-240.

Winkle T., Rosenbusch B., Gagsteiger F., Paiss T., Zoller, N. (2009), "The correlation between male age, sperm quality and sperm DNA fragmentation in 320 men attending a fertility center", *Journal of assisted reproduction and genetics*, 26 (1), 41-46.

Wyrobek A. J., Eskenazi B., Young S., Arnheim N., Tiemann-Boege I., Jabs E. W., Evenson, D., (2006), "Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25), 9601-9606.

Yenice G.M., Tuğcu V., (2016), "Tekrarlayan gebelik kayıplarında erkek kaynaklı nedenler ve tedavi yöntemleri", *Androloji Bülteni*, 18 (65), 111-114.

Yıldırım B., Keskin İ., Sağıroğlu Y. ve Karabulut S., (2020), "Erkek yaşı sperm parametrelerini etkiliyor mu? Türk popülasyonuna ait ilk seri", *Androloji Bülteni*, 22 (4), 213-218.

Zegers-Hochschild F., Adamson G. D., De Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K., Van der Poel S., (2009), "The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009", *Human reproduction*, 24 (11), 2683-2687.

Zeqiraj A., Beadini S., Beadini N., Aliu H., Gashi Z., Elezaj S., Shabani, A., (2018), "Male infertility and sperm DNA fragmentation", *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 6(8), 1342-1345.

Zerfaoui M., Suzuki Y., Naura A. S., Hans C. P., Nichols C., Boulares A. H. (2008), "Nuclear translocation of p65 NF- $\kappa$ B is sufficient for VCAM-1, but not ICAM-1, expression in TNF-stimulated smooth muscle cells: differential requirement for PARP-1 expression and interaction", *Cellular signalling*, 20 (1), 186-194.

## ÖZGEÇMİŞ

Aylin Yaşar, 2015 yılında başladığı Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nü 2020 yılında başarıyla tamamladı. Lisans eğitimi süresince Bahçeşehir Üniversitesi ve Yeditepe Üniversitesi Araştırma Laboratuvarlarında gönüllü ve zorunlu staj eğitimlerini tamamladı. 2020 yılında yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. 2022 yılında Bahçeşehir Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde Yönetici Asistanı pozisyonunda çalışmaya başlamış olup halen çalışmaya devam etmektedir.

