



T. C.
UFUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**SPERM DNA FRAGMENTASYONU % 30 VE ÜZERİNDE OLAN
HASTALARIN I. EJEKÜLAT VE II. EJEKÜLAT SPERM KULLANIMI
SONRASI EMBRİYONİK GELİŞİM HIZI KALİTESİ VE GEBELİK
SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

CEM SANCAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2018



T.C
UFUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**SPERM DNA FRAGMENTASYONU % 30 VE ÜZERİNDE OLAN
HASTALARIN I. EJEKÜLAT VE II. EJEKÜLAT SPERM KULLANIMI
SONRASI EMBRİYONİK GELİŞİM HIZI KALİTESİ VE GEBELİK
SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

CEM SANCAR

DANIŞMAN
PROF. DR. RECAİ PABUÇCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2018

KABUL VE ONAY

Cem SANCAR tarafından hazırlanan ‘‘ Sperm DNA fragmantasyonu % 30 ve üzerinde olan hastaların I. Ejekülat ve II. Ejekülat sperm kullanımı sonrası embriolojik gelişim hızı kalitesi ve gebelik sonuçlarının karşılaştırılması’’ başlıklı bu çalışma, 12.02.2018 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından BİTİRME TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

: Prof. Dr. Emel KOPTAGEL

Danışman

: Prof. Dr. Recai PABUÇCU

Üye

: Prof. Dr. Gamze Sinem ÇAĞLAR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım



Prof. Dr. Gürbüz ERDOĞAN

Enstitü Müdürü

BİLDİRİM

Hazırladığım tezin/raporun tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin kağıt ve elektronik kopyalarının Ufuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullardan birine göre saklanmasına izin verdiğimi onaylarım:

- (+) Tezimin/Raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.
- () Tezim/Raporum sadece Ufuk Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.
- () Tezimin/Raporumun yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

12.02.2018

CEM SANCAR

İTHAF

Yapmış olduğum ‘‘Sperm DNA fragmantasyonu % 30 ve üzerinde olan hastaların I. Ejekülat ve II. Ejekülat sperm kullanımı sonrası embriolojik gelişim hızı kalitesi ve gebelik sonuçlarının karşılaştırılması’’ isimli çalışmamı sevgili annem Serpil KARAKOCA’ya ithaf ederim.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince teorik ve deneysel yönden altyapı oluşturmamı sağlayan, bu süreçte tecrübeleri ile destek olan, tez çalışmalarım için olanak sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Recai PABUÇCU'ya

Eğitim hayatımdaki ilgi, alaka ve davranışlarıyla bana örnek teşkil eden Prof. Dr. Gamze Sinem ÇAĞLAR'a ve Doç. Dr. Göksan Emre PABUÇCU'ya

Çalışma sürecim boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu sektörde ilerlememde büyük katkıları olan, Emb. Semra SERTYEL'e

Hayatımın her anında varlığıyla yanımda olan sevgili annem, babam ve dayım Serpil Karakoca, Hüseyin SANCAR ve Prof. Dr. Yalçın KARAKOCA'ya

Yüksek Lisans eğitimim süresince her zaman yanımda olan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili arkadaşım Pelin MENTEŞOĞLU'na sonsuz teşekkürü borç bilirim.

CEM SANCAR

ÖZET

SANCAR Cem. Sperm DNA Fragmantasyonu % 30 ve Üzerinde Olan Hastaların I. Ejekülat ve II. Ejekülat Sperm Kullanımı Sonrası Embriyonik Gelişim Hızı Kalitesi ve Gebelik Sonuçlarının Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2018.

Araştırmamızın amacı; İnfertilite nedeni bilinmeyen hasta grubunda tekrarlayan denemeleri olan çiftlerden Sperm DNA Fragmantasyonu %30 ve üzerinde olan erkek hastalarda, II. Ejekülat (0-3 Gün Perhiz Süresi) tedavisi kullanımı sonrası gelişen embriyoları ve gebelik oranlarını, I. Ejekülat (3-7 Gün Perhiz Süresi) ile yapılan denemelerinde gelişen embriyo skorları ve gebelik durumlarıyla karşılaştırmaktır. Yapılan çalışmanın sonucunda perhiz süresinin sperm parametrelerine etkileri ve sonuçlarının da embriyo üzerindeki etkileri hakkında bir öngörü oluşturmak amaçlanmıştır.

2010-2017 yılları arasında Centrum Tüp Bebek Merkezinde en az 2 tüp bebek denemesi olan, Sperm DNA Hasarı %30'un üzerinde olan ve farklı cinsel perhiz süreleriyle tedavi gören bireylerin embriyo ve gebelik sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmiştir.

Araştırmanın sonucunda kısa perhiz süresinin sperm parametreleri ve embriyo skorları üzerinde olumlu etkileri tespit edilmiş fakat istatistiksel sonuçlar anlamlı çıkmamıştır.

Anahtar Kelimeler : Sebebi bilinmeyen İnfertilite, DNA Hasarı, Embriyo gelişimi, İkinci Ejekülat , Birinci Ejekülat,

ABSTRACT

SANCAR Cem. Comparison of I. Ejaculate and II. Ejaculate's Embryonic development and pregnancy rates, patients who have sperm DNA Fragmentation %30 and over, Master's Thesis, Ankara, 2018.

The purpose of our research is , compare the embryo scoring and pregnancy rates which were prepared from first ejaculation , with second ejaculation embryo scoring and pregnancy rates in unexplained patient group who has recurrent trials with Sperm DNA Fragmentation of %30 or more. In the end of the study we aimed to make a prediction about the effects of abstinence day on sperm parameters and the results of effect on the embryo

We evaluated the embryo scoring and pregnancy rates which is made from different abstinence day

As a results of the study we observed that , short abstinence day effects positive to sperm parameters and embryo scoring but statistical results were not found significant

Key Words: Unexplained infertility , DNA Fragmentation, Embryo development , Second ejaculation , First ejaculation

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 SPERMİN YAPISI	3
2.1.1 Sperm Başı	3
2.1.2 Sperm Boynu	4
2.1.3 Sperm Kuyruğu	4
a) Bağlantı bölümü	4
b) Orta bölüm	4
c) Esas bölüm	5
d) Son bölüm	5
2.2 SPERMATOGENEZ	5
2.2.1 Spermatositogenez	6
2.2.2 Mayoz Evresi	6
2.2.3 Spermiogenez	7

2.3 SEMEN ANALİZİ	7
2.3.1 Semen Makroskopik Olarak İncelenmesi	10
2.3.2 Semen Mikroskopik Olarak İncelenmesi	10
2.3.3 Semene Ait Spesifik Testler	12
2.4 Sperm DNA Hasarı	12
2.4.1 Anormal kromatin paketlenmesi	13
2.4.2 Apoptozis	13
2.4.3 Reaktif oksijen türevleri	14
2.5 Sperm DNA Fragmantasyon Analizi	15
2.5.1 Sperm DNA hasarı tespit yöntemleri	15
2.5.1.1 Sperm kromatin yapısı tayini	15
2.5.1.2 Toluidine Blue ile DFI tayini	16
2.5.1.3 Acridine orange testi	17
2.5.1.4 Anilin mavisi testi	17
2.5.1.2 Tek hücre jel elektroforezi	18
2.5.1.6 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) testi	18
2.6 EMBRİYO GELİŞİMİ	19

2.6.1 Embriyo Derecelendirme	20
2.6.2 Embriyoların 2. Ve 3. Gün Değerlendirmesi.....	21
2.6.3 Embriyoların 4. Ve 6. Gün Değerlendirmesi	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1 Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri	25
3.2 Örnek Alımı Ve Spermiogram Testi	26
3.3 TB İle Sperm DNA Fragmantasyon Tayini	26
3.3.1 Laboratuvar Malzemeleri.....	27
3.3.2 Fiksasyon malzemeleri ve hazırlanışı	27
3.3.3 Boyama ve malzeme hazırlanışı	27
3.4 Boyama İşlemi	28
4. SONUÇ VE BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	35
6. KAYNAKLAR	39
EK 1	42
EK 2.....	44
7. ÖZGEÇMİŞ.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

ICSI: Intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IUI: İntrauterin İnseminasyon

IVF: In vitro fertilizasyon

ODF: Outer Dense Fiber (Yoğun Dış Lifler)

SCD: Sperm Kromatin DNA Testi

TdT: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz

TUNEL: TdT-dUTP nick-end-labelling

ÜYT: Üremeye Yardımcı Teknikler

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: DSÖ Semen Parametreleri Referans Değerleri

Tablo 2: Kruger Kesin Terimlerine Göre Sperm Morfolojisi

Tablo 3: Sperm DNA Hasarına Sebep Olan Faktörler

Tablo 4: Araştırmaya katılan bireylerin eşlerinin yaşı ve DNA fragmentasyonlarının değerlendirilmesi

Tablo 5: Araştırmaya katılan bireylerin I. Ejekülat tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi

Tablo 6: Araştırmaya katılan bireylerin II. Ejekülat tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi

Tablo 7: Araştırmaya katılan bireylerin ejakülat tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi

Tablo 8: Araştırmaya katılan bireylerin ejakülat tedavi sonuçlarına göre elde edilen embriyolarının değerlendirilmesi

Tablo 9: Araştırmaya katılan bireylerin DNA fragmentasyonlarına göre değerlendirilmesi

Tablo 10: Araştırmaya katılan bireylerin ejakülat tedavilerine göre gebelik durumları

Tablo 11: Hastaların Denemelerindeki Embriyo Skor Ortalamaları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 : Spermin Yapısı

Şekil 2: Spermatogenez

Şekil 3: Sperm Makler Görüntüsü

Şekil 4: Reaktif Oksijen Türleri

Şekil 5: Flow Sitometri ile DNA Hasarı Tespiti

Şekil 6: Toluidine Blue Mikroskop Görüntüsü

Şekil 7: Akridin Turuncu Testi Mikroskop Görüntüsü

Şekil 8: Anilin Blue Testi Mikroskop Görüntüsü

Şekil 9: Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET)

Şekil 10: Tunel Testi Mikroskop Görüntüsü

Şekil 11: Akrozom Reaksiyonu

Şekil 12: 2pn Mikroskop Görüntüsü

Şekil 13: 2. Gün Embriyosu

Şekil 14: 3. Gün Embriyosu

Şekil 15: 5. Gün Embriyosu

Şekil 16. 5. Gün Embrioları

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm parametreler referans değerler içerisinde olmasına rağmen gebelik elde edilememesi durumuna, açıklanamayan ya da sebebi bilinmeyen infertilite denir. Son zamanlarda araştırmacılar yardımcı üreme tekniklerinde geliştirilen yeni yöntem ve metodlar ile açıklanamayan infertilite grubundaki hastalara yönelik tedavi yöntemini belirlemeye çalışmaktadırlar.

Sperm DNA Hasarı; Sperm oluşumu sürecinde hücrenin genetik materyalinin çeşitli sebeplerden dolayı bütünlüğünü kaybetmesidir. Bu etkenler biyolojik ve çevresel faktörler ile sperm DNA Hasarına yol açabilir. Bu etkenler elimine edilirse ICSI işlemi öncesi hasarsız sperm kullanımı, başarı şansını artırır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre belirlenen optimum cinsel perhiz süresi 3 ile 7 gün arasındadır. Fakat yapılan bazı araştırmalar, 0-3 gün cinsel perhiz süreli spermelerde motilite, morfoloji ve sperm DNA hasarında olumlu yönde gelişmeler olduğunu vurgulamıştır. Bu nedenle DSÖ henüz sperm DNA hasarı için cinsel perhiz süresini standardize edememiştir (1).

Çalışmamızda sperm DNA hasarı %30'un üzerinde olan, kısa perhiz süresi ve 3-7 günlük perhiz süresinin sperm parametrelerine etkileri, takiben yapılan ICSI işlemi sonucu ortaya çıkan embriyo kaliteleri, gebelik oranları retrospektif olarak karşılaştırılmış ve literatüre katkı sağlamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

İnfertilite, bir yıl boyunca herhangi bir korunma yöntemi kullanmaksızın düzenli cinsel ilişkide bulunulduğu halde gebeliğin olmaması durumudur. İnfertilite, ‘primer infertilite’ (daha önce hiç gebelik oluşmaması) ve ‘sekonder infertilite’ (öncesinde gebelik elde edilmiş fakat son 1 yılda gebelik elde edilmemiş) olarak iki başlıkta incelenebilir (2).

Üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık % 10-15'ini infertildir. Doğum kontrol yöntemleri kullanmayan fertil çiftlerin % 57'si ilk üç ay içinde, %72'si altı ay içinde ve % 85'i bir yıl içinde gebe kalabilmektedir (3).

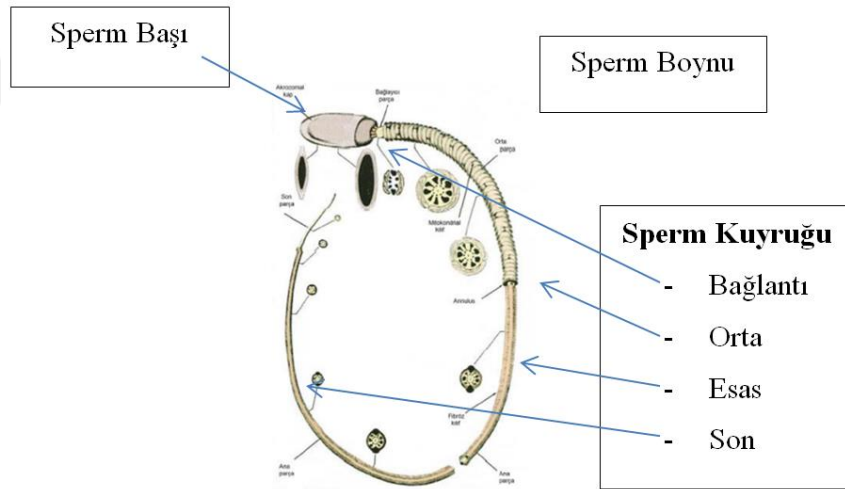
İnfertil çiftlere sunulan tedavi yöntemleri arasında Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYTE), fertilite problemi olan hastaların başvurabileceği ve tedavi görebileceği önemli bir alandır. Genel olarak, in vitro fertilizasyon (IVF), overlerden oositlerin toplanmasını, in vitro ortamda oosit fertilizasyonunu ve embriyoların uterusu transferini (ET) içerir. Bazı IVF işlemleri, doğrudan oosit içine sperm enjekte edilerek gerçekleştirilir (Mikroenjeksiyon = ICSI). Spermin değerlendirilmesi infertil çiftlerin tedavi sürecinin belirlenmesinde ve izlenecek yolun belirlenmesinde önemli bir rol içerir (4).

Erkek germ hücrelerindeki DNA fragmantasyonu çalışmaları ve üreme sonuçları üzerindeki etkilerinin farkındalığı gittikçe artmaktadır. Yapılan çalışmalarda; sperm DNA fragmantasyonu tespiti ile infertil ve fertil erkek hastalar arasında belirgin oranda DNA fragmantasyonu farkı saptanmış ve doğurganlığın azalması ile bağlantıları gösterilmiştir. Sperm DNA fragmantasyonunun fertilizasyon başarısızlığı, implantasyon problemleri, gebelik kayıpları ve yavaş embriyo gelişimine sebebiyet verdiği gösterilmiştir (5). İnfertil erkeklerin değerlendirmesinde sperm DNA hasarının tespiti

için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Sperm DNA'sının fizyolojik/moleküler bütünlüğü, semen kalitesinin değerlendirmesinde yeni bir parametredir ve potansiyel doğurganlık belirleyicisidir. Sperm DNA fragmentasyonu oranlarının bilinmesi, infertil çiftlerin fertilizasyon başarısına ve uygulanacak tedavi sürecinde embriyonun maruz kalabileceği risklerin kısmen öngörülmesine olanak sağlamaktadır. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda sperm parametreleri (sperm konsantrasyonu, motilite, morfoloji, vitalite) ile sperm DNA hasar oranları arasındaki ilişki gösterilmiştir. Genellikle DNA Fragmentasyon oranı %30 ve üzerinde olan hastalarda implantasyon başarısızlığına ve/veya gebelik kayıplarına neden olmaktadır (6).

2.1. SPERMİN YAPISI

Sperm uzunluğu 60µm kadardır. Baş, boyun, ve kuyruk bölümünden oluşmaktadır.



Şekil 1. Spermin Yapısı (7)

2.1.1. Sperm Başı

Sperm başı 4.5x3µ'dir. Başın 2/3 ön kısmı akrozom adı verilen bir kılıfla kaplanmıştır. Sperm hücresinin genetik materyali baş kısmında bulunur. Akrozom, dış ve iç olmak

üzere iki katmana sahiptir. Büyük bir kısmı plazma membranıdır. Spermiler sıkıştıkça, plazma zarı ve dış akrozom kılıf, içindeki enzimleri serbest bırakmak için (akrozomal tepki) birleşir ve açılır. Bu enzimler, spermın yumurtayı çevreleyen zarları ve hücre tabakalarını aşmasını sağlar. Sperm başının büyük kısmı anterior hidrolitik enzimler taşıyan akrozom ile kaplı nükleusdan oluşmaktadır (8).

2.1.2. Sperm Boynu

Boyun, kuyruk ile sperm başı arasında 0.5 µm uzunluğunda kısa bir parçadır. Sperm hücrelerine gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondriler burada bulunur. Bağlantı parçası segmentli kolon şeklindedir ve proksimal sentriol ile kalın mikrotubuluslardan oluşmaktadır (9).

2.1.3. Sperm Kuyruğu

Fertilizasyonun gerçekleşmesi için hareketlilik gerekli bir özelliktir. Spermin kuyruk bölgesi, enerji üretim bölgesi olup, sperm hareketinden sorumludur. Kuyruğun hareketi, spermın boyun kısmında bulunan mitokondrilerden gelen enerji ile mikrotübüllerin birbiri üzerine kayması ile oluşmaktadır (8).

Sperm kuyruğu dört parçadan oluşmaktadır :

a) Sperm bağlantı bölümü (Connecting Piece)

Sperm baş ve kuyruk arasındaki kısa segmenti oluşturur. Bölünmüş kolonlardan ve yoğun lifli yapıdan oluşmaktadır. Kapitulumun ve sperm kasının kaudal taban tabakası sperm başı ve kuyruk arasında bulunur. Kapitum çizgili bir yaka ile devam eder ve daha sonra orta kısımdaki dış yoğun lifler tarafından yönlendirilir. Aynı yapı aksonu çevreler. Sperm başı ile kuyruk arasındaki süreklilik, bağlantı parçası olarak adlandırılır.

Kapitülumdan geriye doğru uzanan 9 parça sütun, fiber yapılarla birbirine bağlanmaktadır. Dolayısıyla bağlantı parçası kesintisizdir (8).

b) Orta bölüm (Middle Piece)

Akson boyunca bulunan 9 yoğun dış lif her biri bir mikrotubuler "çift" ile ilişkilidir. Bu bölümdeki mitokondriyal yapı sarmal olarak düzenlenmiştir ve enerji için gereklidir. İç mitokondriyal membran enerji üretiminden sorumludur ve flagella motiliteden sorumludur. Bu yapı çapı proksimalden distale doğru azalır. Distal uçlar, orta bölüm ile göbek bölümünü birbirine bağlayan bir halka ile sona erer (8).

c) Esas bölüm (Principal piece)

Aksonem ve fibröz kılıftan oluşur. Halka ve terminal yapısı arasındaki kısımdır. Fibröz kılıf, aksonem ve yoğun dış lif bandajı. Fibröz kılıf yapısı disülfid bağlarına bağlı olarak oldukça kararludur ve sperm hareketliliğine yardımcı olur (8).

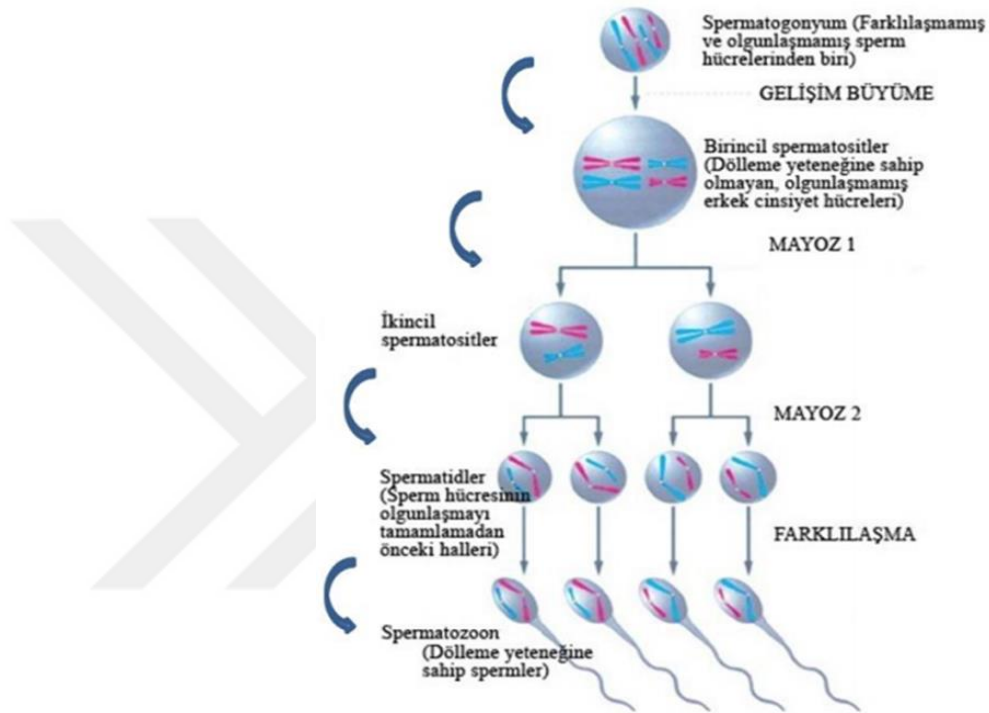
d) Son bölüm (Terminal piece)

Yoğun dış lif ve fibröz kılıf yoktur, sadece 9 + 2 aksonemal yapılar mevcuttur (8).

2.2 SPERMATOGENEZ

Erkek germ hücreleri olan spermler, spermatogenez olarak adlandırılan sürecin sonunda oluşurlar. Bu süre zarfında, spermatogoniumdan sperm hücresine kadar ilerleyen bir maturasyon vardır. Spermlerin asıl işlevi erkek vücudundaki genetik materyali oosite ulaştırmaktır. Sperm hücrelerinin bu görevi yerine getirmesi için, spermlerin morfolojik

ve fizyolojik gelişime uğramaları gerekir. Buna ek olarak, uygun bir kromozomal ve genetik organizasyon önemlidir, yani kromozom ve DNA (Deoksiriboz Nükleik Asit) bütünlüğü bulunmalıdır. Spermatogenez sırasında, spermatozoa, gelecekteki morfolojik ve fizyolojik gelişimde, normal sperm fonksiyonu için gerekli epididimal olgunlaşma sürecine katılmaktadır. Bu nedenle, spermatogenez esnasında bir aksaklık meydana gelirse, hatalı sperm üretimi gerçekleşebilir (6).



Şekil 2: Spermatogenez (10)

2.2.1 Spermatositogenez

Spermatogoniumlardan mitoz bölünme ile Spermatogonia'A jenerasyonları , kök hücrelere ve ara Spermatogonia A lar oluşur. Spermatogonia A'lar farklılaşarak Spermatogonia B'yi oluşturur (11).

2.2.2 Mayoz Evresi

Primer spermatositler 46 kromozom sayısına ve $2n$ DNA miktarına sahiplerdir 1. mayoza girer ve DNA'larını replike ederler. Kromozomlarının her biri 2 kromatidli hale gelerek tetraploid olur. Anne ve babadan gelen bu kromozomlar homolog kromozom çiftlerini oluşturacak şekilde dizilirler. Crossing Over'dan sonra homolog kromozomlar kutuplara çekilir ve iki adet yeni hücre oluşur. Sekonder spermatositler homolog kromozomların yarısını (23 diploid kromozom) ve DNA'nın yarısını ($2n$ DNA) taşırlar (12).

2.2.3. Spermiogenez

Mayoz bölünmeler sonucu uygun genetik materyale sahip spermatidlerin sertoli hücreleri içindeki gelişim ve farklılaşma süreçleridir. Bu süreç sonunda spermatidler olgun spermiumlar şeklinde seminifer tübülün lümenine atılır (8).

Olgun Spermin özellikleri ;

- Olgun spermium 50-60 mikron uzunluğundadır. Dişi vücudunda 48-72 saat canlı kalır.
- Spermiumların dişi genital yollarındaki ters akıntıya karşı 3-3.6 mm/dakikada hareket etme kapasitelerine + rheotaxis adı verilir.
- Dişi genital organlarındaki bazı kimyasal maddelere ilgi duyarak daha hızlı ilerlemeleri ise +chemotaxis olarak adlandırılır.
- Sağlıklı bir erkek bir defada 3-4 cc ejakülat çıkarır ve bu da 200-300 milyon sperm taşır.
- Spermatogenez yaklaşık 70 gündür. Bu süreç 40 yaşına kadar sürer. İleri yaşlarda da kesilmez ancak azalır.

2.3 SEMEN ANALİZİ

İnfertilite, bir yıl boyunca korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik yokluğu olarak tanımlanır. İnfertil olguların %20'sini erkek faktör oluşturur. %30-40 oranında, hem erkek hem de kadın faktörler birlikte görülür. İnfertil erkeklerin değerlendirilmesi ayrıntılı bir öykü alma süreciyle başlar. İlk değerlendirme fiziksel muayene ve ilk laboratuvar muayeneleri ile tamamlanır. Geçmiş, fiziksel muayene ve laboratuvar bulgularına bağlı olarak, ayırıcı tanıda ek özel testler gerekebilir (13).

Sperm analizi ejakülatın değerlendirilmesidir. İnfertilite tanısı tek bir sperm analiziyle belirlenmemelidir. Spermatogenez 70 günlük bir süreçtir. Bu nedenle, 70 gün önce herhangi bir zararlı etki sperm özelliklerini etkileyebilir. Örneğin; yeni bir ateşli hastalık, sperm kalitesinde 3 aya kadar bozulmaya neden olabilir. Her bir hastanın iki aylık aralıklarla en az iki veya üç spermioqram testi yaptırması gereklidir. Sperm parametreleri DSÖ'nün belirttiği standartların altına düşükçe gebelik durumunun oluşma şansı azalır (14).

Semen analizi için incelenecek ejakülat, en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrasında mastürbasyon yoluyla steril bir kap içerisine alınmalı ve cinsel perhiz yedi günü geçmemelidir. Bu koşulların dışında yapılan spermioqram testleri sperm parametrelerini olumsuz olarak etkileyebilir. Numune en geç 30 dakika içerisinde incelenmek üzere laboratuvara getirilmelidir. Ejakülatın makroskopik incelemesinde sıvılaşma, viskozite, pH, semen miktarı, perhiz süresi değerlendirilir. Semen analizinin en önemli kısmı mikroskopik muayene yöntemidir. Mikroskopik incelemede sperm sayısı, motilite, yuvarlak hücrelerin sayısı, aglütinasyon derecesi ve morfoloji değerlendirilir. DSÖ tarafından 2009 yılında yayınlanan semen analizinin referans değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu referans sınırları, doğum kontrol yöntemlerinin bırakılmasını takip eden 1 yıl içerisinde eşleri hamile olan erkeklerin, sperm parametreleri referans alınarak hesaplanmıştır.

Tablo 1: DSÖ Semen Parametreleri Referans Değerleri (14)

<u>Parametre</u>	<u>Alt Referans Limiti</u>
Semen Hacmi (ml)	≥ 1.5 (1.4 – 1.7)
Ph	≥ 7.2
Sperm Konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	≥ 15
Toplam Sperm Sayısı (10 ⁶ /Eje)	≥ 39
Toplam Motilite (PR + NP, %)	≥ 40
Progresif Motilite (PR, %)	≥ 32
Sperm Morfolojisi (Normal Formlar, %)	≥ 4
Peroksidaz – Pozitif Lökositler (10 ⁶ /ml)	< 1.0
MAR Testi (Bağlı bulunan motil spermatozoa, %)	< 50
Immunobead Testi (Bağlı bulunan motil spermatozoa, %)	< 50
Seminal Fructose (mol / Eje)	13
Seminal Nötral Glukozidaz (mU / Eje)	20
Seminal Zinc (mol/Eje)	2.4

2.3.1 Semen Makroskopik Olarak İncelenmesi

Ejekülatın makroskopik incelemesi yapılırken öncelikle pipet ile likefaksiyon durumuna bakılmalıdır. Likefaksiyon spermin sıvılaşması olarak tanımlanabilir. Likefaksiyon yaklaşık 15-30 dakika arasında gerçekleşir. Bu sürenin dışında kalan spermelerde likefaksiyon problemi olduğu not edilmelidir. Likefaksiyonu sağlamak için ejakülatın, kabın içinde 37 °C'de tutulması litik süreci kolaylaştırır ve kısaltır. Buna ek olarak; renk, koku, viskozite ve diğer özellikleri belirlenmeli ve kaydedilmelidir (15).

Tablo 2. Kruger Kesin Terimlerine Göre Sperm Morfolojisi (16)

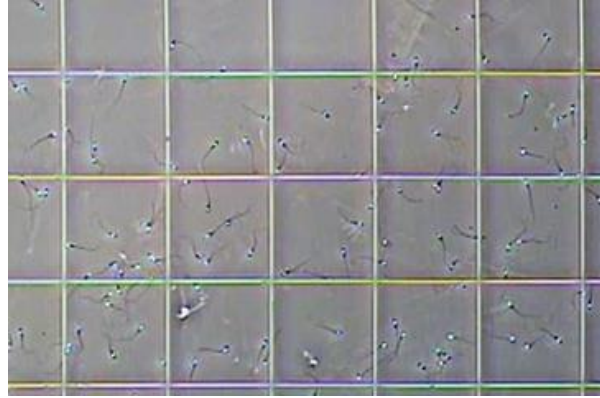
BAŞ	Uzunluk 5-6 Mikron / Genişlik 2,5-3,5 mikron
AKROZOM	Başın % 40-70'ini oluşturmali
ORTA PARÇA	Genişlik 1 mikron / Uzunluk 1.5 x Baş Uzunluğu
KUYRUK	Boy : 45 Mikron / Uniform / Orta parçadan daha ince / Kırılmamış / Kırık bulundurmamalı
STOPLAZMİK DAMLACIK	Baş alanının % 30-70'inden az sadece orta parçada lokalize

2.3.2 Semen Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Sperm sayısı normal değerleri DSÖ referanslarına göre asgari 15 milyon / ml'dir. Bu değer altındaki sperm sayısına oligozoospermi denir. Sayı 15 milyondan az ise, testosteron ve FSH düzeylerinin incelenmesi önerilir. Ejakülatta sperm hücresi yokluğuna azoospermi denir. Azoospermi; hormonal, genetik, kanal tıkanıklığı ya da spermatogenez sırasında oluşan problemlerden kaynaklanabilir (14).

Sperm motilitesi değerlendirmesi; likefaksiyon sonrası bir saat içinde yapılmalıdır. Bu süre zarfında oda sıcaklığında muhafaza edilmelidir. Sperm ileri hareketinin kalitesi kaydedilmeli ve değerlendirilmelidir. Hareketlilik; hızlı ileri hareketli sperm, yavaş ileri hareketli sperm, yerinde hareketli sperm ve hareketsiz sperm olarak dört ana grupta değerlendirilmelidir. DSÖ tarafından sperm analizini standartlaştırmak için yayınlanan laboratuvar klavuzu sperm hareketliliğini A, B, C ve D dört kategoride değerlendirmektedir. 'A'; hızlı ileri hareketli, 'B'; yavaş - ileri hareketli, 'C'; yerinde hareketli, 'D'; hareketsiz olarak tanımlanır. Spermdeki en yaygın hareket kategorisi değerlendirilir. Bu sistemde, her kategoriye giren sperm yüzdesi değerlendirilir (14).

Sperm morfolojisi; doğru morfolojik değerlendirme için sperm boyanması gereklidir. En sık kullanılan boyama yöntemi "Diff-Quick" metodudur. Değerlendirme için birçok kriter kullanılmasına rağmen, en sık kullanılan ölçütler DSÖ kriterleri ve Kruger'in kesin kriterleridir. Spermdeki genel kusurlar, baş defektleri; büyük, küçük, düz filiform, yuvarlak, amorf, vakuole edilmiş, küçük akrozomal, çift başlı ve bunların kombinasyonları şeklindedir. Boyun ve orta parçanın bozuklukları; bükülmüş boyun, başa düzensiz bağlanma, kalın boyun, ince boyun ve bunların kombinasyonları şeklindedir. Kuyruk kusurları; kısa, çoklu, ince, kırık, kıvrık, genişliği düzensiz olabilir ve bunların kombinasyonları olabilir. Ejakülatta normal morfolojiye sahip sperm oranı, DSÖ'nün Kruger kesin kriterlerine göre ≥ 4 (3.0-4.0) olmalıdır. Aglütinasyon; hareketli sperm hücrelerinin kafaları, boynu ve kuyruklarının tek tek veya çeşitli kombinasyonlarda birbirlerine yapıştığı anlamına gelir (14).



Şekil 3: Sperm Makler Görüntüsü (17)

2.3.3 Semene Ait Spesifik Testler

Sperm analizi erkeğin fertilitite potansiyelini her zaman tam olarak yansıtmayabilir. Bu vakalarda, tanı koymak için başka özel testlere ihtiyaç vardır. Sperm ve semenin spesifik testleri, erkek faktörün açıklanamayan infertilite vakaları ile ilişkili olup olmadığını belirler. ÜYTE ile tedavi seçerken bu testler yararlı olabilir (18). Bu testlerden bazıları; Sperm DNA Hasarı, Ros Testi, Sperm Enzimleri Testi, Sperm Antikor Testi, Sperm Vitalite Testi gibi testlerdir.

2.4 SPERM DNA HASARI

Yapılan son çalışmalarda sperm DNA hasarının fertilitiyi ve embriyo gelişimini etkilediği düşünülmektedir. Özellikle açıklanamayan infertiliteden sorumlu olabileceği halen çalışılmaktadır. Sperm oluşumu sürecinde hücrenin genetik materyali çeşitli sebeplerden dolayı bütünlüğünü kaybedebilmektedir. Bu hasarlı sperm hücreleri eliminasyona uğramadan ejakülata dahil olur ise açıklanamayan infertiliteye sebep olabileceği düşünülmektedir. Sperm DNA hasarına sebep olan faktörler iki başlıkta incelenir (4).

Tablo 3 : Sperm DNA Hasarına Sebep Olan Faktörler (19)

ÇEVRESEL FAKTÖRLER	BİYOLOJİK FAKTÖRLER
Radyasyona maruz kalma	Anormal Kromatin Paketlenmesi
Sigara alışkanlığı	Apoptozis
Kimyasal maddeye maruz kalma	Reaktif Oksijen Türevleri
Kemoterapi	
Varikosel	
Genital Enfeksiyonlar	

2.4.1 Anormal Kromatin Paketlenmesi

Sperm hücrelerinin genetik materyalini taşıyabileceği boyuta indirmek için, spermiogenez esnasında genetik materyalin diğer hücrelerden farklı olarak sıkıştırılmış bir biçimde paketlenmesi gerekir. Bu paketleme esnasında histon proteinleri yerini ara proteinlere bırakır, daha sonra ise protaminlere bırakır. Protaminler sayesinde halkasal bir şekil alan genetik materyal sperm başına sığabilecek duruma gelir. Bütün bu katlanma işlemleri sırasında oluşabilecek hatalar sperm DNA kırıklarına sebep olur (20).

2.4.2 Apoptozis

Apoptozis vücuttaki hücrelerin programlı ölümü olarak tanımlanabilir. Spermatogenez sırasında iki apoptotik görev vardır. Birincisi anormal spermatozoonları elemine etmek; ikincisi ise germ hücrelerinin sayısını sınırlandırmaktır. Apoptoz esnasında oluşabilecek herhangi bir hatada bu spermatozoonlar yok edilmeyebilir. Böylece DNA hasarlı sperm hücreleri ejakülata dahil olur.

Yapılan son çalışmalar sonucu bazı proteinlerin apoptozis mekanizması ile ilişkili olduğunu vurgulamış ve bu proteinlerin miktarlarına göre apoptozis mekanizmasında değişmelerin olabileceğini öngörmüştür. Apoptozis mekanizmasında olabilecek her aksaklık hasarlı genetik materyale sahip spermın ejakülata aktarılmasına bu da sperm DNA fragmentasyonunun yükselmesine sebep olacaktır.

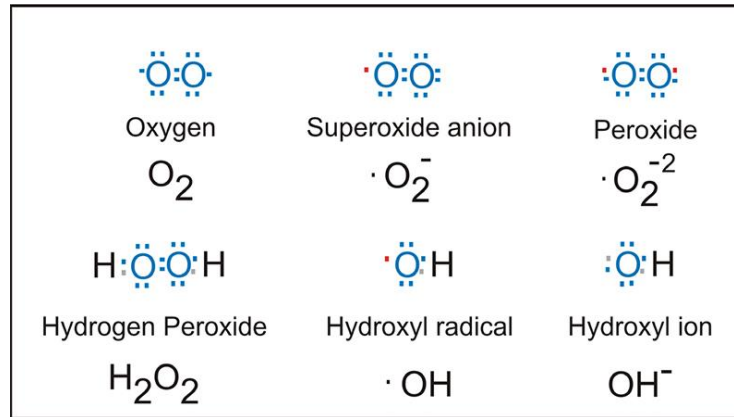
Bazı araştırmalar apoptozis yoğunluğu arttıkça sperm motilite yüzdesinin de anlamlı derecede arttığını gözlemlemiştir. Bu sebeple hasarlı spermın eliminasyonu sonucu ejakülata dahil olan spermde motilite oranının artması beklenir (22).

2.4.3 Reaktif Oksijen Türevleri

Oksijen vücut gereksinimleri için en önemli moleküllerden biridir. Vücudun günlük işleyişi sırasında reaktif oksijen türevleri ortaya çıkar ve vücutta yayılır. Vücutta serbest halde bulunan reaktif oksijen grupları herhangi bir oksijen molekülü ile karşılaştığında DNA, protein, nükleotid ve lipid gruplarına zarar verir. Oksidanlara karşı vücudun savunması olarak antioksidanlar devreye girer. Bu ikisi arasında oluşan bir dengesizlik hali oksidatif strese yol açmaktadır (21).

Reaktif oksijen oluşumu spermın sağkalımı için sorunlar teşkil etmektedir. Sperm hücreleri epididimisten geçişi sırasında lipid içeriğinde değişkenlik göstermektedir (22).

Bütün bu mekanizmalar reaktif oksijenlerin spermın genetik materyalinde, morfolojisinde istenmedik durumlara yol açmaktadır. Fakat kapasitasyon mekanizması defekt gören spermın bir kısmına tekrardan dölleyebilme yeteneği kazandırabilir (22).



Şekil 4: Reaktif Oksijen Türleri (21)

2.5. SPERM DNA FRAGMENTASYON ANALİZİ

Sperm DNA fragmentasyonu birçok olguda zaman içerisinde değişen ve gelişen bir parametredir. Kabul edilen standartlara göre; hasar gören spermin sayısının % 15'in altında olması beklenmektedir. %15-30 ara safha; %30'dan fazla anormal sperm içeren spermogram sonucuna sahip erkekler yüksek DNA Fragmentasyonuna sahip olarak kabul edilir. Böyle yüksek DNA parçalanması olan sperm örnekleri ICSI için kullanıldığında başarısız döllenme oranları, gebelik kayıpları yavaş embriyo gelişimleri görülmüştür (23).

DFI <%15 : İyi Fertil Fertil Potansiyel
Potansiyel

%15- 30 DFI: Orta Fertil

>%30 DFI: Kötü fertil potansiyel

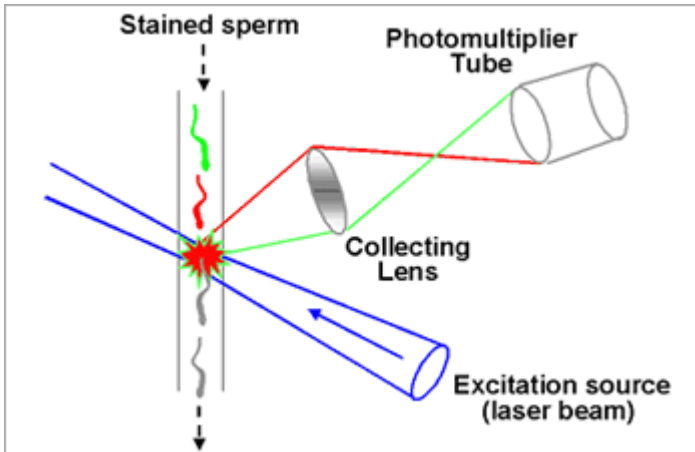
2.5.1 Sperm Dna Hasarı Tespit Yöntemleri

Erkek infertilitesinin teşhisinde DSÖ semen parametreleri, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisine dayanmaktadır. Bunula beraber bu parametrelerin hiçbirinin tek bir çiftin tek başına doğurganlık potansiyelinin değerlendirmesinde güvenilir derecede yeterli olmadığı bilinmektedir. Özellikle sebebi bilinmeyen, açıklanamayan infertilite hastalarında bu parametreler referans sınırları arasındadır.

Sperm DNA fragmantasyonu birçok olguda zaman içerisinde değişen ve gelişen bir parametredir. DNA fragmantasyonu ölçümünde aşağıdaki tayinlerden yararlanılır.

2.5.1.1. Sperm Kromatin Yapısı Tayini (Sperm Chromatin Structure Assay)

SCSA anormal kromatin yapısına sahip DNA'nın, asit ve ısıya maruz kaldığında denatürasyonuna daha yatkın olması prensibine dayanarak getirilmiştir. Akridin turuncusu asit eklendikten sonra denatürasyona bağlı olarak renk değişimi göstermektedir. Bu renk değişimi akım sitometri tekniği kullanılarak belirlenmektedir. SCSA ile ölçülen DNA denatürasyonu, DNA fragmantasyon indeksi (DFI) olarak tanımlanmıştır. Bu testin en önemli avantajı standardizasyonunun olmasıdır.



Şekil 5: Flow Sitometri ile DNA Hasarı Tespiti (24)

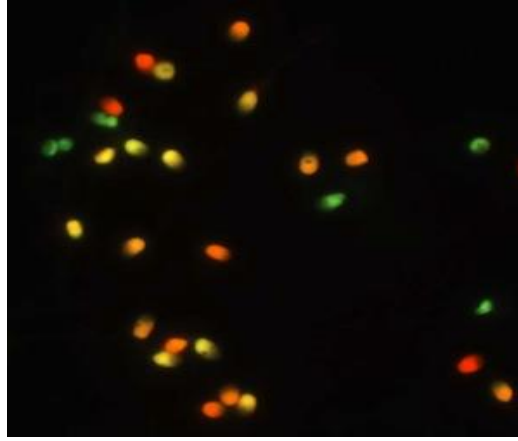
2.5.1.2. Toluidine Mavisi ile DFI Tespiti

Toluidine Blue fosfat rezidülerini boyayan temel boyadır. Doğru olarak paketlenmiş kromatin yapısı ve fragmente uçlarında yer alan fosfat boyanmaya zemin hazırlar. Boya fragmente yapıya katılarak sperme mavi rengini verir. Normal mikroskop ile değerlendirmek yeterli olur ancak kişiler arası ve kişiler içi değişkenliklere açıktır.

**Şekil 6:** Toluidine Blue Boyama Yöntemi(25)

2.5.1.3. Akridin Turuncu Testi (AOT)

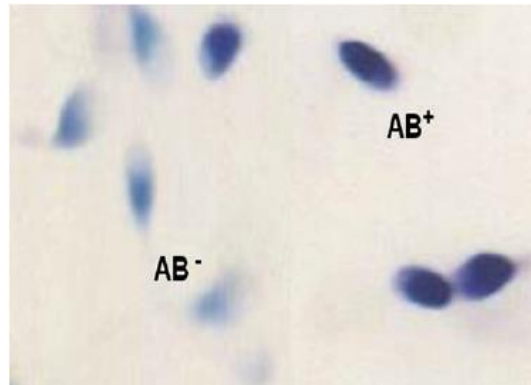
Akridin orange boyası nükleik asite özgü katyonik bir boyadır. Bu teknikte floresan mikroskop kullanılır. Hızlı, basit ve pahalı olmayan bir yöntemdir. Boyamaya bağlı olarak renk defektleri , renk ayrımının gözlemsel olması ve renklerin hızlı kaybolması bu tekniğin dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır (26).



Şekil 7 : Akridin Turuncu Testi Mikroskop Görüntüsü (27)

2.5.1.4. Anilin Mavisı Testi

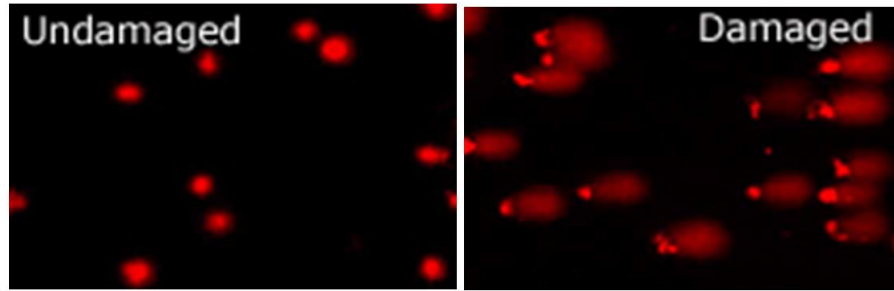
Anilin mavisı asidik bir boyadır ve hasarlı DNA'ya sahip spermde rezidüel histonların açığa çıkması sonucu nükleoproteinlere daha kolay ulaşılabilir ve bu durum anilin mavisinin DNA'yı boyamasını sağlar. Basit ve ucuz bir tekniktir, analiz için ışık mikroskobu yeterlidir, ancak AOT'de olduğu gibi heterojen boyama tekniği en önemli dezavantajıdır (27).



Şekil 8 : Anilin Blue Testi Mikroskop Görüntüsü(27)

2.5.1.5. Tek Hücre Jel Elektroföresi (COMET)

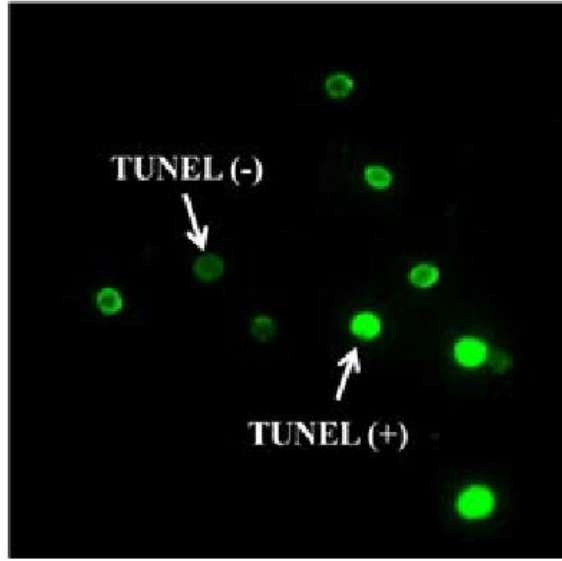
Yoğunluğu azaltılmış sperm agaroz jel tabakları arasına yerleştirilir ve floresan bağlayan boya eklenmiş elektroforetik bir gradiente maruz bırakılır. Hasarlı DNA'ya sahip yapı elektroforez esnasında hareket eder ve kuyruklu yıldız görüntüsü ortaya çıkar. Sağlam DNA yapısı ise hareket etmez. Boyanma yoğunluğu ve kuyruklu yıldızın kuyruk uzunluğu DNA fragmentasyonunun derecesini belirler (25).



Şekil 9 : Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET)(19)

2.5.1.6. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) Testi

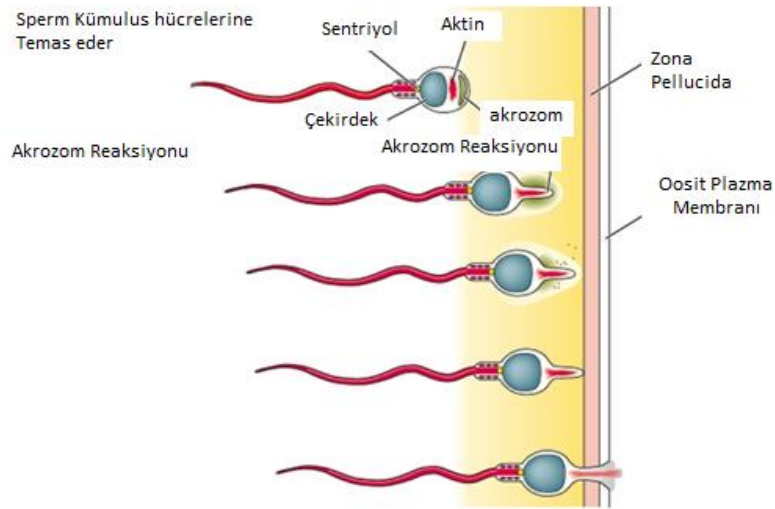
Tunel testi ile hem tek hemde çift DNA zincirindeki hasarlar tespit edilebilmektedir. TdT enzimi ile tek veya çift DNA zincirindeki kırıklar dUTP ile birleşir ve bu noktalar işaretlenir. İşaretlenen noktalar Işık Mikroskobu, Floresan Mikroskobu ya da Akım Sitometrisi ile değerlendirilir. Tunel testi SCSA'den sonra sperm DNA hasarını tespit etmekte en çok kullanılan testtir. Tunel testi ile asıl tespit edilen DNA hasarından çok DNA kırıklarıdır. SCSA gibi standardizasyonun tam sağlanamamış olması testin en önemli dezavantajıdır (28).



Şekil 10 : Tünel Testi Mikroskop Görüntüsü (28)

2.6. EMBRİYO GELİŞİMİ

Fertilizasyon, sperm hücreninin sekonder oosit ile temas etmesiyle başlar. Akrozom reaksiyonu ile corona radiatları temizlenen oositin zona pellucida'sı yine akrozomdan salınan nöraminidaz ve akrozin enzimleri ile delinir. Buna Zona Reaksiyonu adı verilir. Spermium oosit içerisine girdiğinde sekonder oosit 2.mayozu tamamlayarak ovum haline geçer. Oluşan ikinci kutup cisimciği 1.si ile birlikte dejenere olarak kaybolacaktır. İki olgun cins hücreninin nükleusları pronükleus halini alır. Ardından kaynaşarak ilk ve olgun somatik hücreyi, zigotu yaparlar (29).

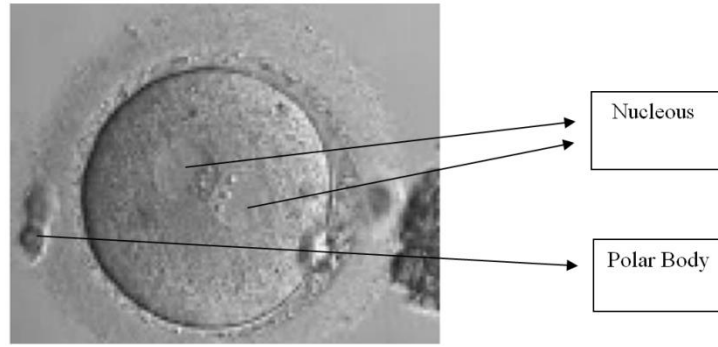


Şekil 11: Akrozom Reaksiyonu (30)

2.6.1. Embriyo Derecelendirme

Embriyolar ICSI işlemi yapıldıktan sonra gün aşırı gelişim kontrolü yapılır. Embriyo kalitesi gebeliğin oluşması için gereken en önemli etkenlerden biridir. Embriyoda herhangi bir fragmentasyon veya gerileme durumunun olması olumsuz olarak değerlendirilir ve embriyonun gebelik oluşturma ihtimalini azaltır.

ICSI işlemi yapılan oositlerin yaklaşık %40 - %50'si blastosist evresine ulaşır. Bunların ise yaklaşık %30-50'si implantasyon başarısı getirir. Bu sebeple embriyo derecelendirmesini yapıp transfer için en iyi embriyoyu seçmek oldukça önemlidir (Jonathan Van Blerkom, 1992). Embriyonun normal gelişimini direkt olarak oositin nükleer ve stoplazmik maturasyonuna bağlıdır. Fertilize oosit 2 Pronucleus ve 2 polar body'e sahip olmalıdır. Uygun oosit ile ICSI işlemi yapıldıktan 16- 18 saat sonra PN değerlendirmesi yapılabilir. 2 pronucleus da aynı boyutlarda olup karşılıklı ve merkezde konumlanmış olmalıdır (31).

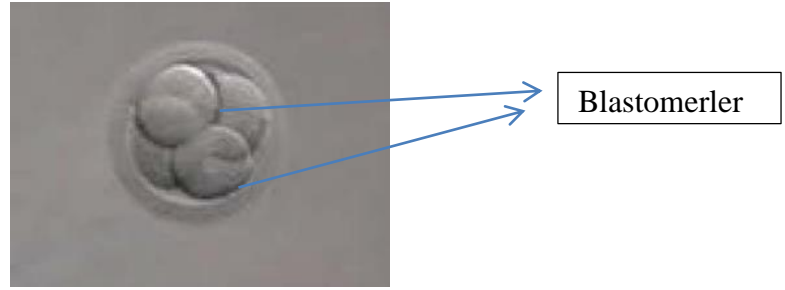


Şekil 12: 2pn Mikroskop Görüntüsü (31)

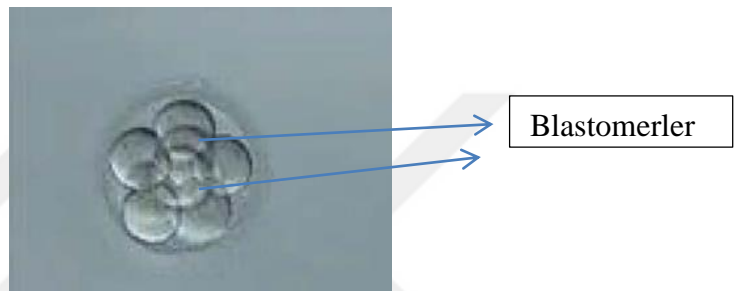
İlk bölünme değerlendirmesi; zigotun bölünmeye başlama zamanı embriyonun hem kalitesini hem de implantasyonu için bir öngörü oluşturur (32). Erken bölünmeye başlayan kromozomal olarak geç bölünenlere göre daha az hatalıdır.

2.6.2. Embiyoların 2. ve 3. Gün Değerlendirmesi

İnseminasyondan 43-45 saat sonra 2. gün değerlendirme, 67-69 saat sonra ise 3. gün değerlendirme yapılır. Morfolojik olarak skora; blastomer sayısı, blastomerlerin eşit büyüklükte olması, blastomerlerin tek çekirdekli olmasına bakılarak belirlenir. Bu değerlendirmede en sık görülen endikasyonlar; fragmentasyon, çok çekirdeklilik ve asimetridir. Mozaizm, haploidi, polyploidi gibi anomalilere sebep olurlar. Fragmentasyon düzeyi %35'in üzerinde olan embriyolarda mozaizm ve diğer post-zigotik anomaliler görülür (33). 2. gün Embriyo hücre sayısı 4 olmalıdır. Bunun yanında hücre boyu eşit ise 1, değil ise 2 rakamlarıyla belirtilir. Fragmentasyon ise seviyesine göre düşükten yükseğe doğru 1, 2 veya 3 numaralandırılmasıyla yapılır. 3.gün embriyo hücre sayısı 8 olmalıdır hücre boyu ve fragmentasyonu da 2. gündeki gibi belirlenir.



Şekil 13: 2. Gün Embriyosu (33)



Şekil 14: 3. Gün Embriyosu (33)

2.6.3 Embriyoların 4. ve 6. Gün Değerlendirmesi (Morula ve Blastosist)

Embriyonun genom aktivasyonundan sonra birleşme başladığı için önemlidir. Bu evrede trofoektoderm değerlendirilmesi implantasyon için önemli bir öngörü oluşturur. İç hücre kitle değerlendirilmesi ise fetus gelişimi için önemli bir öngörü oluşturur. Blastosist gelişimi üzerinde embriyonun 3. gündeki hücre sayısının önemi vardır (33) .



Şekil 15. 4. Gün (33)

4. gün embriyosu inseminasyondan 91-93 saat sonra değerlendirilir. Değerlendirme aşağıdaki gibi yapılır (33) ;

MOR1 Kalite: Tüm embriyo iç hücre kitlesinin birleşmesi.

MOR2 Kalite: İç hücre kitlesinin büyük çoğunluğunun birleşmesi.

MOR3 Kalite: İç hücre kitlesinin yarısından daha küçük kısmının birleşmiş 2,3 blastomerin dışarda kalmış olması.

5. gün embriyosu inseminasyondan 115-117 saat sonra değerlendirilir. Değerlendirme 1'den 6'ya kadar numaralandırılarak yapılabilir (33).

1. Kalite : Kavitenin embriyonun yarısından daha az yer kaplaması.

2. Kalite : Kavitenin embriyonun yarısından daha fazla yer kaplaması.

3. Kalite : Kavitenin tamamının Blastosist olup trofoektoderme baskı yapması.

4. Kalite : Baskıdan dolayı Zona Pellucida'nın oldukça incelmış olması.

5.Kalite : Embriyonun bir parçasının zonayı aşır dışarı çıkması.

6. Kalite : Embriyonun tamamının dışarı çıkması.

5. gün embriyosu iç hücre kitlesinin durumunu belirlemek için A B ve C harfleri aşağıdaki gibi kullanılır.

A: Birçok hücrenin sayısı , Sıkı paketlenme

B: Ortalama Hücre sayısı, Gevşek paketlenme

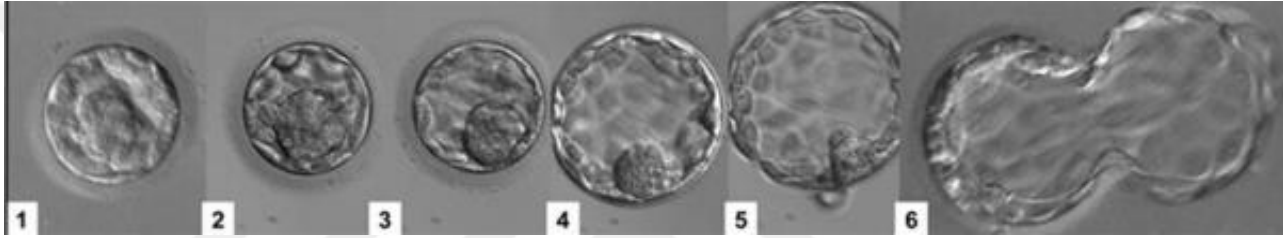
C: Az sayıda hücre sayısı

5.Gün embriyosu dış hücre kitlesinin durumunu belirlemek için A B ve C harfleri aşağıdaki gibi kullanılır (33).

A: Çok sayıda hücre, Birleşik bir tabaka

B: Daha Az hücre sayısı ve sıkı olmayan tabaka

C: Az hücre sayısı



Şekil 16. 5. Gün Embriyoları (33)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Yapılan çalışma 2016 – 2017 yılları arasında Centrum Tüp Bebek Merkezinde yapılmış Retrospektif, Gözlemsel / Analitik / Kohort veri tarama çalışmasıdır.

3.1. ARAŞTIRMAYA DAHİL ETME KRİTERLERİ

Çalışmamızda oluşturulan hasta grubu Centrum Klinik'de 2010-2017 yılları arasında tüp bebek tedavisine başlayan ve Sperm DNA Fragmentasyon İndeksi %30 ve üzerinde olan hastalardan oluşturulmuştur. Erkek bireyler için çalışmaya dahil edilme kriterleri DFI %30 ve üzerinde olması, varikosel, inmemiş testis, testis tümörü gibi herhangi bir rahatsızlığının olmaması ve 18-50 yaş aralığında olmasıdır. Toluidine Blue testinin gözleme fazlasıyla dayalı bir boyama olması sayımın rahat olması ve doğruluk oranının artması sebebiyle sperm sayıları 5 milyon / ml' den yüksek olan ve en az 200 sperm sayılan hastalar çalışmaya alınmıştır.

Kadınlarda ise çalışmaya dahil edilme kriterleri olarak AMH seviyesi 1 - 7 aralığında olması, myom ya da herhangi bir tubal faktör bozukluğunun olmaması olarak belirlenmiştir. Diğer kadın faktörleri dışlanmıştır.

I. ve II. ejakülat embriyo gelişimleri ve gebelik sonuçlarının tespit edilmesi için tekrarlayan denemeleri olan hastalar çalışmaya dahil edilmiştir. İlk denemelerinde I. Ejakülat spermi ile embriyosu elde edilmiş ve transferi gerçekleşmiş, ikinci denemelerinde ise II. Ejakülat spermi ile embriyosu elde edilmiş ve transferi gerçekleşmiş hastalar çalışmaya dahil edilebilir.

72 saat ile 168 saat arasında (3-7 gün) cinsel perhiz sonucu elde edilen sperm I. Ejekülat, 0 ile 72. Saat arası perhiz süresi ile elde edilen sperm ise II. Ejekülat kategorisi içerisine alınmıştır. II. Ejekülatlar genellikle ard arda alınan örneklerden oluşsa da bu durum çalışma sırasında değişkenlik göstermiştir.

3.2. ÖRNEK ALIMI VE SPERMİOGRAM TESTİ

Örneğin steril koşullarda alınması testin güvenilirliği için en önemli basamaklardan biridir. Doğru bir işlem için, örnekler masturbasyon ile verilmeli, masturbasyon sırasında herhangi bir kayganlaştırıcı kullanılmamıştır. Örnek alımı sırasında gerekli etiketlemeler yapılmış ejekülatlar perhiz süresine göre I. ve II. ejekülat olarak doğru bir şekilde not alınmıştır. Alınan örneğin üzerine hastanın bilgileri okunabilir şekilde not edilmeli ve hastaya gerekli bilgiler doğru bir şekilde anlatılmalıdır. Hastaya örneği dışarıya kaçırmaması gerektiğini belirtmek önemlidir. Böyle bir durumda örnek alımı en uygun zamanda tekrarlanmalı ve spermioqram testi yapılmalıdır. Mecbur kalınmadıkça örnek merkezde alınmalı, örnek verildikten sonra en geç 15 dakika içerisinde 37 °C olan inkübatöre alınmalı ve likefiye olması için beklenmelidir. Likefaksiyon işlemi 15-30 dk arasında gerçekleşmektedir.

Örnek likefiye olduktan sonra homojenize edilmekte ve makler kamerasına 1 damla damlatılarak sperm sayımı, motilite oranının belirlenmesi, progresyonun belirlenmesi, cinsel perhiz süresinin not edilmesi gerekmektedir.

3.3 TOLUIDINE BLUE İLE SPERM DNA FRAGMENTASYON TAYİNİ

Toluidine blue boyası ile DFI hesaplamak için ‘‘IHC World / Toluidine Blue Staining Protocol for Mast Cells NovaUltra Special Stain Kits’’ protokolü kullanılmış ve **Ek 1’de** protokol kaynağı gösterilmiştir.

3.3.1 Laboratuvar Malzemeleri;

1. 6 Adet Şale
2. Lam Lamel
3. Işık Mikroskobu
4. İmmersiyon Yağı

3.3.2 Fiksasyon Malzemeleri ve Hazırlanışı

1. Aseton
2. Ethanol %96 Extra Saf

Fiksatif; şale içerisine 25ml %96’lık ethanol ve 25ml asetonun şale içerisinde homojenizasyonu yapılır.

3.3.3 Boyama Malzemeleri ve Hazırlanışı;

1. Toluidine Blue
2. Mcvallin Tamponu (Di sodium hydrogen phosphate dehydrate , Distile su , Sitrik Asit)

Mcvallin Tamponu :

1. 14,2 gr Na_2HPO_4
2. 9,6 gr Sitrik Asit
3. 500 ml Distile su

Karıştırarak homojenize edilir

Toluidine Blue:

1. 47,5 ml mcvallin Tamponu
2. 2.5 ml Toluidine Blue Boyası

Karıştırarak homojenize edilir

HCL Tamponu Hazırlanışı:

1. Distile su
2. HCL

50 ml distile suya 5 ml HCL eklenir. Homojenize edilir

3.4 BOYAMA İŞLEMİ

Likefiye olan örnekler laminar flow içerisinde lam üzerine pastör pipeti yardımı ile bir damla alınarak damlatılır. Lamel ile 45 derecelik açı oluşturduktan sonra örnek lam üzerine yayılır. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.

Kuruyan örnek önceden hazırlanıp +4 derecede bekletilen fiksatif içerisinde 30 dakika tutulmuştur. Burda amaç spermilerin lam üzerine yapışmasıdır. Fiksasyon sonrası lam 5 dakika boyunca +4 derecede bulunan HCL içerisinde bekletilir. Burdaki amaç Toluidine Blue'nun asidik yüzey ile teması sonrası sperm hücrelerine nüfuz etmesini sağlamaktır. Daha sonra 3 aşamalı distile su ile yıkama işlemi yapılır. Aynı ayrı hazırlanan 3 adet distile su şalesine 2'şer dakika olmak üzere toplamda 6 dakika bekletilir. Yıkama işleminin ardından lam %5'lik Toluidine Blue ile doldurulan şaleye 5 dk bırakılır. Son aşamada boyanın lam üzerinden akması için üzerinden distile su akıtılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Preparat ışık mikroskopunda 1000x'lik büyütmede bakılır. 400 adet sperm sayımı sonrası hasarlı olan (koyu mavi renkli) spermilerin oranı %' lik dilime uyarlanarak tespit edilir.

4. SONUÇ VE BULGULAR

Geriye dönük taramalarımız sonucu çalışmamıza dahil olabilecek 25 hasta ve bu hastalardan elde edilen 98 adet I. Ejekülat embriyosu, 112 Adet II. Ejekülat embriyosu tespit edilebilmiştir. Hastaların vermiş olduğu 2 farklı perhiz süresine sahip sperm örneği ile eşlerinden toplanan oositlere ICSI işlemi uygulandıktan sonra embriyo gelişimleri takip edilmiştir. Çalışmaya katılan kadınların 23 yaş ile 49 yaş arasında bulunmakta olup, yaş ortalamaları $36,56 \pm 6,48$ 'dir. Sonuçlara ilişkin değerler aşağıda verilmiştir.

Tablo 4. Çalışmaya katılan bireylerin eşlerinin yaşı ve DNA fragmantasyonlarının değerlendirilmesi

	\bar{X}	SS	Medyan	Min	Maks.
Eşin Yaşı	36,56	6,48	37,0	23,0	49,0
DNA Fragmantasyonu	41,86	12,63	39,0	30,0	85,0
\bar{X} aritmetik ortalama, SS; standart sapma, Min; minimum değer, maks;maksimum					

Tablo 5. Çalışmaya katılan bireylerin I. Ejekülat tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi

	\bar{X}	SS	Medyan	Min	Maks
Sperm Sayısı	41,84	32,85	24,0	5,0	120,0
Perhiz	3,16	0,47	3,0	3,0	5,0
Motilite	49,88	17,76	48,0	21,0	75,0
Toplam Oosit	6,72	4,08	6,0	1,0	16,0
M2	4,36	2,86	4,0	1,0	14,0
Fert	3,88	2,91	3,0	1,0	14,0

Embriyo Günü	4,16	1,18	4,0	3,0	8,0
\bar{X} aritmetik ortalama, SS; standart sapma, Min; minimum değer, maks;maksimum					

Matur oosit yüzdesi : %65

Fertilizasyon oranı :

%88

I. ejakülattan yapılan sperm tahlilleri sonucu ortalama sperm sayısı $41,84 \times 10^6/\text{ml}$, motilite %49,88 bulunmuştur. Bu hastaların her birinin eşlerinden ortalama 6,72 oosit toplanmıştır ve bunlardan 4,36'sı olgun oositir. Yapılan ICSI işlemi sonrası her bir hastada ortalama 3,88 fertilizasyon yakalanmıştır. Yani fertilizasyon oranımız $3,88/4,36$ 'dan %88 bulunmuştur. Yapılan işlemler sonucu embriyolar ortalama 4,16. gün transfer edilmiştir.

Tablo 6. Çalışmaya katılan bireylerin II. Ejekülat tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi

	\bar{X}	SS	Medyan	Min	Maks
Sperm Sayısı	42,57	32,89	40,0	5,0	110,0
Motilite	51,52	18,34	54,0	20,0	85,0
Toplam Oosit	6,36	4,38	6,0	1,0	16,0
M2	5,08	3,75	4,0	1,0	15,0
Fert	4,64	3,28	3,0	1,0	15,0
Embriyo Günü	4,64	1,11	4,0	3,0	5,0
\bar{X} aritmetik ortalama, SS; standart sapma, Min; minimum değer, maks;maksimum					

Matür Oosit Yüzdesi : %79

Fertilizasyon oranı:

%91

II. ejakülattan yapılan sperm tahlilleri sonucu ortalama sperm sayısı $42,57 \times 10^6/\text{ml}$, motilite %51,52 bulunmuştur. Bu hastaların her birinin eşlerinden ortalama 6,36 oosit toplanmıştır ve bunlardan 5,08'i olgun oositir. Yapılan ICSI işlemi sonrası her bir hastada ortalama 4,64 fertilizasyon yakalanmıştır. Yani fertilizasyon oranımız

4,64/5,08'den %91 bulunmuştur. Yapılan işlemler sonucu embriyolar ortalama 4,64. gün transfer edilmiştir

Tablo 7. Çalışmaya katılan bireylerin ejakülat tedavi sonuçlarına göre değerlendirilmesi

	I. EJEKULAT	II. EJEKULAT	p
Sperm Sayısı	24,0 (5,0 – 120,0)	40,0 (5,0-110,0)	0,858
Motilite	49,88 ± 17,76	51,52 ± 18,34	0,657
Mature Oosit	4,0 (1,0 - 14,0)	4,0 (1,0-15,0)	0,475
Fertilizasyon	3,0 (1,0 - 14,0)	3,0 (1,0-15,0)	0,432

II. ejakülat tedavisi uygulanan grubun I. ejakülat uygulanan gruba göre sperm sayısı ve motilite değerleri daha yüksek olmasına karşı anlamlı bir farklılık yoktur ($p>0,05$). Sperm sayısı ve motilite ejakülate göre anlamlı değişiklik göstermemiştir. Veri normal dağılmadığı için medyan değerine bakıldı ve aynı hastalar üzerinde çalışıldığı için Wilcoxon Singed-Rank Test uygulandı. Median değerleri arasında farklılık olmasına rağmen test istatistiği anlamsız çıkmıştır.

I. ejakülat ve II. ejakulat tedavileri kullanılan hastalarda M2 oosit ve bu oositlerin fertilizasyon oranları arasında anlamlı bir değişiklik yoktur ($p>00,05$).

Tablo 8: Çalışmaya katılan bireylerin ejakülat tedavi sonuçlarına göre elde edilen embriyolarının değerlendirilmesi

	N	%	
I. Ejekülat	Gelişimi Durmuş Embriyolar	28	28,9
	Gelişimi Yavaş Embriyolar	26	26,8
	İyi Gelişim Gösteren Embriyolar	43	44,3

	Toplam	97	100,0
II. Ejekülat	Gelişimi Durmuş Embriyolar	33	29,7
	Gelişimi Yavaş Embriyolar	22	19,8
	İyi Gelişim Gösteren Embriyolar	56	50,5
	Toplam	111	100,0

I. Ejekülat sonucunda iyi gelişim gösteren embriyo sayısı 43 (%44,3) iken, II. Ejekülat sonucunda iyi gelişim gösteren embriyo sayısı 56 (%50,5)'dir.

Tablo 9. Çalışmaya katılan bireylerin DNA fragmantasyonlarına göre değerlendirilmesi

	DNA Fragmantasyonu									p	
	30-39,9 (n:14)			40-49,9 (n:7)			50 ve üstü (n:4)				
	Medyan	Min	Max	Medyan	Min	Max	Medyan	Min	Max		
Kadın Yaşı	35,00	28,00	49,0	36,50	23,00	40,0	39,00	37,00	44,0	0,379	
I. Ejekülat sonuçları	Sperm Sayısı	23,50	5,00	90,0	61,00	6,00	96,0	24,00	16,00	120,0	0,295
	Motilite	44,50	21,00	75,0	54,00	25,00	70,0	60,00	30,00	72,0	0,894
	Toplam Oosit	7,00	1,00	16,0	6,00	4,00	15,0	4,00	1,00	6,0	0,196
	M2	4,50	1,00	14,0	3,50	1,00	8,0	4,00	1,00	5,0	0,817
	Fert	3,00	1,00	14,0	3,00	1,00	7,0	3,00	1,00	4,0	0,630
II. Ejekülat sonuçları	Sperm Sayısı	32,50	5,00	100,0	46,50	6,00	110,0	40,00	9,00	110,0	0,620
	Motilite	55,00	21,00	85,0	40,00	20,00	85,0	48,00	22,00	80,0	0,420
	Toplam Oosit	6,50	1,00	16,0	4,50	4,00	16,0	4,00	1,00	6,0	0,410
	M2	5,00	1,00	15,0	4,00	1,00	9,0	3,00	1,00	6,0	0,412
	Fert	4,00	1,00	15,0	3,50	1,00	8,0	3,00	1,00	5,0	0,700

⁶Normal dağılım göstermeyen verilerde medyan (minimum – maksimum değer). Gruplar arası karşılaştırmada kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

I. Ejekülat uygulaması sonuçlarına göre sperm sayısı en yüksek 2. grupta, motilite en yüksek 3. grupta, toplam oosit en yüksek 1.grupta, M2 en yüksek 1.grupta, fertilizasyonda bütün gruplarda yaklaşık olarak aynıdır. Fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. (p>0,05)

Tablo 10. Çalışmaya katılan bireylerin ejakülat tedavilerine göre gebelik durumları

Gebelik	I. Ejekülat		II. Ejekülat		
	n	%	n	%	
	1	4,0	1	4,0	0,240
Negatif	22	88,0	17	68,0	
Pozitif	1	4,0	6	24,0	
Yok	1	4,0	1	4,0	

I. Ejekülat tedavisi sonucunda 1 (%4,0) hastada gebelik oluşurken II. ejakülat tedavisi sonucunda 6 (%24,0) hastada gebelik oluşmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı değildir.

Tablo 11: Hastaların Denemelerindeki Embriyo Skor Ortalamaları

	I. EJEKULAT	II. EJEKULAT
1. HASTA	0	0,555
2. HASTA	2	1
3. HASTA	1,333	0
4. HASTA	1,5	1,5
5. HASTA	2	2
6. HASTA	1,333	1,333
7. HASTA	2	0,8333
8. HASTA	0,42857	2
9. HASTA	2	1,8
10. HASTA	1,1428	1,75
11. HASTA	2	0
12. HASTA	2	1
13. HASTA	2	0,8333
14. HASTA	0,571	0,8
15. HASTA	1	2

16. HASTA	1,33	1
17. HASTA	0,7143	2
18. HASTA	2	0,8
19. HASTA	1,33	0,75
20. HASTA	1	2
21. HASTA	1	1
22. HASTA	0,33	1,33
23. HASTA	1,33	2
24. HASTA	0,8	2
25. HASTA	1,33	2
	1,29	1,3298

5. TARTIŞMA

Yardımlı üreme tekniklerinde sperm ve oosit kalitesi, ICSI işlemi öncesi embriyonun gelişimi üzerinde etkili olan en önemli parametrelerden biridir. Gerek morfolojik gerek embriyonun genetik materyalinde oluşan anormal durumlar, fertilizasyondan gebeliğe kadar olan tüm aşamalarda olumsuz etkiler gösterebilir.

Erkek infertilitesinde sperm DNA hasarının kaynağı şimdiye kadar birçok farklı mekanizma ile açıklanmaya çalışılmıştır. Bunlardan ilki spermatogenez sırasında spermatozoonun kromatin paketlenmesi sırasında olduğu görüşüdür (20, 43, 44). İkinci faktör ise reaktif oksijen maruziyetinde kalan spermelerde oluşan DNA kırıklarındır (43, 44, 18). Üçüncüsü ise germ hücrelerindeki apoptozis mekanizmasında oluşan eliminasyon hatası sonucu ejakülate dahil olan hasarlı spermelerdir.

Yapmış olduğumuz ‘‘Sperm DNA Fragmantasyonu %30’un üzerinde olan hastaların I. Ejekülasyon ve II. Ejekülasyon sperm kullanımı sonrası embriyo gelişim hızı, kalitesi ve gebelik sonuçlarının karşılaştırılması’’ isimli retrospektif çalışmamızın sonucunda II. Ejekülat kullanılan vakalarda embriyo skorlamaları sonucunda daha iyi bir netice elde edilmiştir. Fakat gerekli istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, gerek sperm parametrelerinde gerek II. Ejekülat kullanılan embriyo skorlamalarında ortaya çıkan fark anlamlı değildir. Literatürler artan cinsel perhiz süresi ile sperm sayısında ve semen volümünde artış olduğunu fakat morfoloji ve motilite oranlarında daha kötüye giden bir grafik olduğunu söylemiştir (30). Sperm DNA Hasarı ve cinsel perhiz arasındaki ilişkiyi araştıran bir çok araştırma olmasına rağmen bu çalışmalar sonucunda net bir cinsel perhiz süresi belirlenememiştir (36).

I. Ejekülat embriyolarındaki yavaş gelişimin sebebi, artan perhiz süresi boyunca reaktif oksijen maruziyetinde kalan spermelerde oluşan motilite, morfoloji ve sperm DNA hasarı gibi faktörlerin sperm kalitesini etkilemesi sonucu embriyonun gelişiminde bir gerilemeye sebep olmuş olabilir (35).

Yapılan bir çok çalışmada, normozoospermi grubu hastalarında azalan cinsel perhiz süresinin oligozoospermik hastalara göre sperm sayısı ve volüm parametresi için referans değerlere yaklaşık 3 kat daha yakın olduğu gözlemlenmiştir. Bu yüzden II. Ejekülat kullanılacak oligozoospermik hastalarda en az iki gün cinsel perhiz süresi ile pooling işlemi yapılması başarıyı arttırmak için önerilmiştir. Kısa perhiz süresi ml'deki sperm sayısını ve volümü düşürdüğü için oligozoospermik hasta gruplarında tercih edilmemeli, klinik pratikte ikinci ejekülat tedavisinin özellikle normozoospermik bireylere uygulanması önerilmiştir (37).

Kullandığımız veriler incelendiğinde, II. Ejekülatta düşmesi beklenen sperm sayısında %1,7'lik bir artış gözlemlenmiştir. Beklenmeyen bu fark için kesin bir yorum yapabilmek henüz mümkün değildir. Fakat normozoospermi grubu hastaların yoğunluğu buna sebebiyet vermiş olabilir. Perhiz süresince testiste reaktif oksijen maruziyetine kalan ve mitokondriyel enerjileri tükenen spermelerde motilite oranının düşmesi beklenmektedir. II. Ejekülatta elde edilen veriler ışığında bu artış gözlemlenmiştir fakat istatistiksel anlamlı değildir.

De Jonge ve arkadaşları (36) 1, 3, 5, ve 8 günlük cinsel perhiz sürelerinin kıyaslandığı çalışmalarında yapmış oldukları artan perhiz süresi ile birlikte semen volümü ve sperm konsantrasyonunun arttığı fakat total, progresif motilite ve morfolojinin cinsel perhiz süresi ile ilişkili olmadığını tespit etmişlerdir.

Biz de yaptığımız çalışmada ejekülatlar arası sperm sayıları arasında anlamlı bir fark gözlemleyemedik. Fakat bunun sebebini hasta grubumuzda normozoospermia grubuna dahil birçok hastanın bulunması olabilir şeklinde yorumlayabiliriz.

Carlsen ve arkadaşları (37) ejakulasyon sıklığının semen parametrelerine etkisinin değerlendirildiği çalışmada sperm konsantrasyonunun ve toplam sayının 4. güne kadar belirgin artış gösterdiğini, sonrasında ise artmaya devam etmekte fakat artış oranı daha az

olduğunu ortaya koymuştur. Yine bu çalışmada morfoloji ve total motilitenin cinsel perhiz süresinden etkilenmediği tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada sperm motilitesinin II. Ejekülatta arttığını fakat bu artışın anlamlı olmadığını gözlemledik. Bunun sebebi olarak da reaktif oksijen maruziyetinde daha az kalan spermilerin hareketlilik ve canlılık fonksiyonlarını kaybetmemiş olması olarak yorumlayabiliriz.

Elzanaty ve arkadaşları (38) 2-3 gün, 4-5 gün, 6-7 gün cinsel perhiz sürelerinin sperm parametreleri üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmada ise sperm konsantrasyonu ve total sayının 4-5 gün perhizi olan grupta 2-3 güne göre anlamlı olarak yüksek olduğu fakat 6-7 gün perhizi olan grupla benzer olduğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada progresif motilitenin 4-5 gün perhiz süresi olan grupta diğer gruplara göre fazla olduğu 2-3 gün olan grubun motilitesinin 6-7 gün olan gruba göre artmış olduğu saptanmıştır.

Desai ve arkadaşları (21) tek bir fertil erkeğin 1-10 gün cinsel perhiz süreleri sonrası elde edilen 36 semen örneğinin semen parametreleri ve reaktif oksijen radikalleri açısından değerlendirildiği çalışmalarında, reaktif oksijen radikalleri düzeylerinin cinsel perhiz süresi ile ilişkisiz olduğunu, semen parametrelerini etkilemediğini saptamışlardır. Oksidatif stresin bağımsız bir infertilite nedeni olduğunu vurgulamışlardır.

Embriyonun döllenme ve 5. güne gitme oranını gözlemlediğimizde; II. Ejekülat embriyolarının I. Ejekülat embriyolarına göre gelişimi yaklaşık yarım gün ileridedir. Bu sonuçtan II. Ejekülat tedavisinin embriyonun 5. güne gitme kuvvetini arttırdığı düşünülebilir. Fakat döllenme oranındaki saptanan %3'lük fark için kesin bir yorum yapılamaz.

Elde ettiğimiz embriyoların gelişimlerini iyi gelişim, yavaş gelişim ve gelişimi durmuş olarak grupladığımızda II. Ejekülat embriyolarında iyi gelişim oranlarının %6 oranında daha yüksek yavaş gelişim oranlarının ise %7 daha düşük olduğunu saptadık. Fakat aralarındaki fark

istatistiksel olarak anlamlı değildi. Embriyoların gelişim ortalamalarında bu fark saptandıktan sonra hastalar denemelerine göre ayrıldı ve embriyo skorları kategorize edildi. Minimum 0 maximum 2 değerini alan embriyolar arasında II. Ejekülat lehine % 9,7 lik olumlu bir fark olduğu gözlemlendi.

Jurema ve arkadaşlarının (39) IUI sikluslarında değişen cinsel perhiz sürelerinin gebelik başarısı ile ilişkisi açısından değerlendirildiği çalışmada 3 gün ve altındaki cinsel perhiz sürelerinde gebelik başarısının artan günlere göre daha yüksek oranda olduğu bildirilmiştir.

Perhiz süresi embriyoyu dolaylı olarak etkilemektedir. Sperm kalitesini değiştirdiği öngörüsü varsayıldığında ICSI işlemi yapılan sperm embriyoya etkisi perhize göre değişkenlik göstermelidir. Fakat yaptığımız çalışmalar sonucunda perhiz süresindeki değişiklikler sperm parametrelerinde anlamlı değişikliklere sebep olmamış, dolayısıyla embriyo üzerinde de anlamlı bir değişikliğe neden olamamıştır.

Sonuç olarak II. Ejekülat kullanımı sonrası değişen sperm parametrelerinde ve bunların embriyo üzerindeki etkilerinde istatistiksel anlamlı bir fark gözlemlenememiştir. Bu sonuç kısa cinsel perhiz süresinin, 3-7 günlük perhiz süreli ejakülat ile arasındaki farkın %30 Sperm DNA Fragmentasyon ve üzerinde anlamlı olmadığını göstermiştir.

Çalışmamızın sonucunda Sperm DNA Fragmentasyonu %30'un üzerinde olan ve tekrarlayan denemeleri olan hastalarda testiküler sperm kullanımı ya da microchip kullanımının daha olumlu sonuçlar doğurabileceğini düşünmekte ve II. Ejekülatın testiküler operasyon görmek istemeyen ya da ekonomik nedenlerden dolayı diğer tedavi yöntemlerini tercih etmeyen hastalarda kullanılması tedaviye katkı sağlayacaktır. Çalışmamızın literatüre katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Cinsel perhiz süresinin sperm parametrelerine ve embriyo gelişimine etkisi hakkında daha çok çalışma yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Oldereid NB, Gordeladze JO, Kirkhus B, Purvis K, Human sperm characteristics during frequent ejaculation J Reprod Fertil. 1984 May;71(1):135-40.
2. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, et al. Definition and prevalence of subfertility and infertility. Hum Reprod 2005;20:1144-1147
3. Speroff, F.M., Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 2005, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 10. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. Fertil Steril, 2013. 99(1): p. 63.
4. Koyuncu ve arkadaşları (2011) Turk Uroloji Seminerleri , Semen analizi ve yorumlanması Sperm DNA Hasarı ve Yorumlanması Turk Urol Sem 2011; 2: 18-23
5. Kamal K. Ahuja, Sperm DNA Fragmentation Transl Androl Urol. (2017) Sep; 6(Suppl 4): S337–S338.
6. A. Shafik O. El Sibai, Sperm DNA fragmentation. Arch Androl. 2006 May-Jun;52(3):197-208.
7. Zamboni L. Archives of Pathology & Laboratory Medicine 01 Apr 1992, 116(4):325-344
8. Fawcett DW., The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the guinea pig. Z Zellforsch 1965; 67: 279-296
9. Curry MR, Sperm structure and function, in Gametes- the spermatozoon, I.G.J.a.Y.J. eds, Editor. Cambridge University Press. 1995; P. 45-69.
10. William H. Walker Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis 15 Jun 2011; 116-120
11. Oehninger S., Strategies for the Infertile Man. Sem Reproductive Med, 2001; 19 (3): 231-237.
12. Langman's Medical Embryology, 12th Edition 2012 20th Edition PDF
13. Wong WY, Flik G, Groenen PMW, Swinkels DW, Thomas CMG, Copius-peereboom JHJ, Merkus HMWM, Steegers-Theunissen RPM, The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. Rep Toxicol, 2001; 15: 131-136.
14. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction 5.th edition 2010; Page 8 – 30
15. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates

investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Human Reproduction*, 2000;15 (2): 351-365.

16. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. *Fertil Steril*. 1986 Dec;46(6):1118-23

17. A Makler - *Fertility and Sterility*, 1980; Volume 33, Issue 3, Pages 337–338

18. Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L., Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low quality semen. *Hum Genet*, 1998; 102: 129.

19. Ayşen Durmaz , Prof. Dr. Nurten Dikmen İnfertil Erkeklerdeki Sperm Dna Hasarının Comet Assay İle Tayini 2010 22-45

20. Ashok Agarwal, Chak-Lam Cho, Sandro C. Esteves, Ahmad Majzoub Implication of sperm processing during assisted reproduction on sperm DNA integrity *Transl Androl Urol*. 2017 Sep; 6(Suppl 4): S583–S585.

21. Desai NR, Mahfouz R, Sharma R, Gupta S, Agarwal A. Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study, *Fertil Steril* 2010;94(4):1541-3.

22. Cross NL, Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biol Reprod* 2003, 69:529-534.

23. Ashok Agarwal, Ahmad Majzoub, Sandro C. Esteves, Edmund Ko, Ranjith Ramasamy, Armand Zini, Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios, *Translational Andrology and Urology* 2016;5(6):935-950.

24. Evenson DP Sperm chromatin structure assay (SCSA®). *Methods Mol Biol*. 2013;927:147-64.

25. Jekaterina Erenpreisa, Juris Erenpreiss, Talivaldis Freivalds, Maija Slaidina, Rasma Krampe, Jelena Butikova, Andrey Ivanov, and Dace Pjanova Toluidine Blue Test for Sperm DNA Integrity and Elaboration of Image Cytometry Algorithm Cytometry 2003 March Part A 52A:19 –27

26. Irma Virant-Klun, Tomaz Tomazevic, and Helena Meden-Vrtovec Sperm Single-Stranded DNA, Detected by Acridine Orange Staining, Reduces Fertilization and Quality of ICSI-Derived Embryos *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2011 Aug 29 Vol. 19, No. 7,

27. Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*. 2004 Oct;36(5):321-6.

28. Agarwal A., Sharma R, Masaki J, Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. *Methods Mol Biol*. 2013;927:121-36

29. American Society For Reproductive Medicine – Fertil Steril 9th Edition Recommendations for Embryo Development 30 March 2017 Page 14-63
30. Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell*. 2000 Jul;92(3-4):255-66.
31. Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell*. 2000 Jul;92(3-4):255-66.
32. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod*. 1997 Jul;12(7):1531-6.
33. Munné S, Cohen J, Chromosome abnormalities in human embryos, *Hum Reprod Update*, 1998 Nov-Dec;4(6):842-55.
34. Le Lannou D, Colleu D, Boujard D, Le Couteux A, Lescoat D, Segalen J, Effect of duration of abstinence on maturity of human spermatozoa nucleus, *Arch Androl* 1986;17: 35–8.
35. Levitas E, Parnet A, Lunenfeld E, Bentov Y, Burstein E, Friger M, Potashnik G., Impact of hypnosis during embryo transfer on the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer: a case-control study., *Fertil Steril*. 2006 May;85(5):1404-8. Epub 2006 Mar 29
36. De Jonge C, lafromboise M, Bosmans E, Ombelet W, Cox A, Nijs M., Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertil Steril*. 2004 Jul;82(1):57-65
37. Carlsen E, Petersen JH, Andersson AM, Skakkebaek NE, Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality, *Fertil Steril* 2004;82(2):358-66.
38. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwerchman (2004). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod*; 11: 2904- 2911.
39. Jurema MW, Vieira AD, Bankowski B, Petrella C, Zhao Y, Wallach E, Zacur H. Effect of ejaculatory abstinence period on the pregnancy rate after intrauterine insemination. *Fertil Steril*. 2005 Sep;84(3):678-81

EK 1**Toluidine Blue Protokolü**

Mast hücreleri bağ dokusunda bulunur ve sitoplazmaları heparin ve histamin içeren granüller (metakromatik) içerir. Toluidin mavisi, mast hücrelerine mavi - mor ve arka planda mavi renk verir (ortokromatik boyama). Metakromasia, boya solüsyonundan farklı renkte boyanan doku elemanları, pH, boya konsantrasyonu ve bazik boyanın sıcaklığından kaynaklanmaktadır.

Mavi veya mor renkli boyalar kırmızı renk kayması gösterecek ve kırmızı boyalar metakromatik doku unsurlarıyla sarı renkli bir kayma gösterecektir.

Fiksasyon : 10% Formalin

Bölümler : 5 mikrolitre parafin bölümleri

Solüsyon ve Reaktifler :

Toluidine Blue Stock solüsyonu:

Toluidine mavisi O (Sigma) ----- 1 g

70% alkol ----- 100 ml

Çözünmesi için karıştırılmalı

Sodium Chloride (1%):

Sodium chloride ----- 0.5 g

Distilled water ----- 50 ml

Çözünmesi için karıştırılmalı (her seferinde bu solüsyon taze hazırlanmalıdır).

Prosedür

1. 30 dk Fiksasyon
2. 5 dk HCL maruziyeti

3. 2 Şer dakika arayla 3 kez distile su ile asitten arındırma
4. Toluidine mavisi maruziyeti
5. Preparatın havada kuruması



EK - 2**MAST HÜCRELERİ - TOLUIDINE MAVİSİ**

AMAÇ: Bu hücreler bağ dokusunda yaygın olarak bulunurlar. Mast Hücrelerinin sitoplazması, heparin ve histaminden oluşan granüller içerir. Bu granüller metakromatiktir.

PRENSİP: Genetik materyalinde hasarlar bulunan sperm hücreleri toluidine mavi boyası ile karşılaştığında kırmızı-mor (metachromatic staining) ve arka planında mavi renk gösterir. Hasarlı olmayan hücreler boyayı almaz ve açık mavi ya da beyaz renk gözükür

FİKSATİF : %100'lük Aseton ve %96'lık Etanol 1/1 oranda

TEKNİK : TB teknik

Toluidine Blue Stock Solüsyonu**Mevallin Tamponu :**

4. 14,2 gr Na_2HPO_4
5. 9,6 gr Sitrik Asit
6. 500 ml Distile su

Karıştırarak homojenize edilir

Toluidine Blue:

3. 47,5 ml mevallin Tamponu
4. 2.5 ml Toluidine Blue Boyası

Karıştırarak homojenize edilir

HCL Tamponu Hazırlanışı:

3. Distile su
4. HCL

50 ml distile suya 5 ml HCL eklenir. Homojenize edilir

7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : CEM SANCAR

Doğum Yeri ve Tarihi : 06/03/1991

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yüksek Lisans Öğrenimi : Ankara Ufuk Üniversitesi

Bilimsel Faaliyetleri :

İş Deneyimi

Stajlar : Ankara Centrum Tüp Bebek Merkezi , MEDICANA International Ankara

Projeler :


Çalıştığı Kurumlar : Medical Park İstanbul

İletişim

E-Posta Adresi : cemsncr@hotmail.com

Cep Telefonu : 0531 996 14 06

Tarih : 09.02.2018

	<p>Cem SANCAR</p> <p>Klinik Embriyoloji</p> <p>Ankara, 2018</p>	 <p>T.C. UFUK ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI SPERM DNA FRAGMENTASYONU % 30 VE ÜZERİNDE OLAN HASTALARIN I. EJEKÜLAT VE II. EJEKÜLAT SPERM KULLANIMI SONRASI EMBROLOJİK GELİŞİM HIZI KALİTESİ VE GEBELİK SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI</p> <p>CEM SANCAR YÜKSEK LİSANS TEZİ</p> <p>ANKARA 2018</p>
--	---	---