



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

**SPERM DNA FRAGMENTASYONU %30'UN ÜZERİNDE OLAN  
HASTALARIN MICROCHIP VE TESA YÖNTEMLERİYLE ELDE  
EDİLEN SPERMLER İLE YAPILAN MİKROENJEKSİYON İŞLEMİ  
SONUCU EMBRİYO GELİŞİM HIZI, KALİTESİ VE GEBELİK  
SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

MUSTAFA AKBAYIR

DANIŞMAN  
PROF. DR. AHMET HAKAN HALİLOĞLU

( YÜKSEK LİSANS TEZİ )  
RETROSPEKTİF ARAŞTIRMA

ANKARA  
2018





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

**SPERM DNA FRAGMENTASYONU %30'UN ÜZERİNDE OLAN  
HASTALARIN MICROCHIP VE TESA YÖNTEMLERİYLE ELDE  
EDİLEN SPERMLER İLE YAPILAN MİKROENJEKSİYON İŞLEMİ  
SONUCU EMBRİYO GELİŞİM HIZI, KALİTESİ VE GEBELİK  
SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

MUSTAFA AKBAYIR

DANIŞMAN  
PROF. DR. AHMET HAKAN HALİLOĞLU

( YÜKSEK LİSANS TEZİ )

RETROSPEKTİF ARAŞTIRMA

ANKARA  
2018

## KABUL VE ONAY

Mustafa AKBAYIR tarafından hazırlanan "Sperm DNA Fragmantasyonu %30'un Üzerinde Olan Hastaların Microchip ve TESA Yöntemleriyle Elde Edilen Spermiler ile Yapılan Mikroenjeksiyon İşlemi Sonucu Embriyo Gelişim Hızı, Kalitesi ve Gebelik Sonuçlarının Karşılaştırılması" başlıklı bu araştırma, 31/08/2018 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından retrospektif olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Recai PABUÇCU

Danışman : Prof. Dr. Ahmet Hakan HALILOĞLU

Üye : Doç. Dr. İskender Sinan ÖZKAVUKÇU

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.



Prof. Dr. Bilge ONARLIOĞLU

## BİLDİRİM

Hazırladığım tezin tamamen kendi araştırmam 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 tamamı her yerden erişime açılabilir.

( + ) Tezim sadece Ufuk Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.

( ) Tezimin ..... yıl süreyle erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin tamamı her yerden erişime açılabilir.

Mustafa AKBAYIR

## İTHAF

“Sperm DNA Fragmantasyonu %30'un Üzerinde Olan Hastaların Microchip ve TESA Yöntemleriyle Elde Edilen Spermier İle Yapılan Mikroenjeksiyon İşlemi Sonucu Embriyo Gelişim Hızı, Kalitesi ve Gebelik Sonuçlarının Karşılaştırılması” İsimli Araştırmamı Babam Mehmet AKBAYIR'a İthaf Ediyorum.



## TEŞEKKÜR

Ufuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakóltesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki eğitimim süresince emeği geçen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Recai PABUÇCU'ya ve tez danışmanım Prof. Dr. Ahmet Hakan HALİLOğLU'na ders dönemim ve tez dönemim boyunca her zaman yanımda oldukları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yıllardır hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman en büyük destekçilerim olan aileme ve değerli çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Mustafa AKBAYIR

## İÇİNDEKİLER

İTHAF .....	İ
TEŞEKKÜR.....	İİ
İÇİNDEKİLER .....	İİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	VI
SEMBOLLER / KISALTMALAR .....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT .....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. SPERMATOZOANIN YAPISI .....	3
2.1.1. Baş:.....	3
2.1.2. Kuyruk: .....	4
2.1.2.1. Boyun:.....	5
2.1.2.2. Orta parça: .....	5
2.1.2.3. Esas parça: .....	5
2.1.2.4. Son parça: .....	5
2.2. SPERMATOGENEZ.....	6
2.2.1. Spermatositogenez .....	7
2.2.1.1. Koyu Tip A.....	7
2.2.1.2. Açık Tip A.....	7
2.2.1.3. Tip B.....	8
2.2.2. Mayoz Bölünme .....	8
2.2.3. Spermiyogenez.....	9
2.2.3.1. Akrozom Gelişimi .....	9
2.2.3.2. Flagellum Gelişimi.....	10
2.2.3.3. Nükleer Yoğunlaşma .....	10
2.3. SEMEN ANALİZİ .....	11
2.3.1. Semen Numunesi Toplama .....	12
2.3.1.1. Ön Hazırlık .....	12
2.3.1.2. Tanısal veya Araştırma Amacıyla Semen Toplanması.....	13



2.3.1.3. ÜYTE İçin Semen Steril Toplanması .....	13
2.3.1.4. Numunelerin Güvenli Biçimde İşlenmesi.....	13
2.3.2. Makroskobik Değerlendirme.....	14
2.3.2.1. Likefaksiyon .....	14
2.3.2.2. Semen Viskozitesi.....	14
2.3.2.3. Ejakülatın Görünümü.....	15
2.3.2.4. Semen Hacmi .....	15
2.3.2.5. Semen pH'si.....	16
2.3.3. Mikroskobik Değerlendirme .....	17
2.3.3.1. Sperm Motilitesi.....	17
2.3.3.2. Sperm Vitalitesi.....	18
2.3.3.3. Sperm Sayısı .....	19
Makler Sperm Sayma Kamerası; .....	19
2.3.4. Semen Kalitesine İlişkin Terminoloji.....	20
2.4. ERKEK İNFERTİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ .....	21
2.4.1. Sperm DNA Fragmantasyonu Mekanizması .....	21
2.4.1.1. Spermatozoa Kromatin Paketlenmesi; .....	22
2.4.1.2. Apoptoz.....	22
2.4.1.3. ROS (Reaktif Oksijen Türleri); .....	23
2.4.2. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri .....	24
2.4.2.1. Toluidin Mavisi Boyaması .....	24
2.4.2.2. Anilin Mavisi Boyaması .....	25
2.4.2.3. Terminal Uridine Nick- End Labeling (TUNEL) Metodu.....	27
2.4.2.4. Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi .....	28
2.4.2.5. Akridin Turuncu Boyaması .....	29
2.4.2.6. Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD) - HALOSPERM®.....	29
2.4.2.7. Fluorescent İn Situ Hibridization (FISH).....	30
2.4.2.8. İn Situ-Nick Translasyon (ISNT) Yöntemi .....	31
2.5. SPERM ELDE ETME YÖNTEMLERİ.....	32
2.5.1. MICROCHIP.....	32
2.5.2. TESTİKÜLER SPERM ASPİRASYONU (TESA) .....	33
2.6. ICSI PROSEDÜRÜ .....	34
2.6.1. Temel Unsurlar .....	34

2.6.2. Uygulama.....	34
2.7. FERTİLİZASYON .....	35
2.8. EMBRİYO GELİŞİMİ VE SINIFLANDIRILMASI .....	36
2.8.1. Temel Unsurlar .....	36
2.8.2. Blastokist Değerlendirilmesi .....	36
2.8.2.1. Genişleme Derecesi ve Hatching Durumu.....	36
2.8.2.2. İç Hücre Kütlesi (ICM) Sınıflandırması .....	37
2.8.2.3. Trofektoderm Sınıflandırması .....	37
3. METRYAL VE METOD .....	40
3.1. ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ.....	40
3.2. YÖNTEM.....	41
3.2.1. TOLUIDİN MAVİSİ İLE SPERM DNA FRAGMENTASYON TAYİNİ.....	42
3.2.1.1. Toluidin Mavisi Protokolü ve Boya Malzemesi Hazırlanması .....	42
3.2.1.2. Toluidine Blue Boyama Yöntemi Basamakları .....	42
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	43
4. BULGULAR .....	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	46
6. KAYNAKLAR .....	49
7. ÖZGEÇMİŞ.....	60

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Spermatozoanın yapısı.....	3
Şekil 2. Spermaozoanın kuyruk yapısı.....	4
Şekil 3. Spermatogenez.....	6
Şekil 4. Spermiyogenez.....	9
Şekil 5. Makler sperm sayma kamerası.....	19
Şekil 6. Toluidin mavisi molekül yapısı.....	26
Şekil 7. Toluidin mavisi boyaması.....	25
Şekil 8. Anilin mavisi molekül yapısı.....	25
Şekil 9. Anilin mavisi boyama yöntemi ile normal kromatin yoğunlaşması.....	26
Şekil 10. Anilin mavisi boyama yöntemi ile anormal kromatin yoğunlaşması.....	26
Şekil 11. Kromatin kırıklarının TUNEL metodu ile işaretlenmesi.....	27
Şekil 12. Spermdede apoptozun saptanması için TUNEL testi.....	27
Şekil 13. Sperm protamin eksikliğinin değerlendirilmesi için CMA3 testi.....	28
Şekil 14. Akridin turuncu boyaması.....	29
Şekil 15. Halosperm yöntemiyle sperm DNA fragmentasyonu testi.....	30
Şekil 16. FISH yöntemiyle tespit edilen normal ve anöloid sperm nükleusu.....	30
Şekil 17. ISTN testinin yorumlanması.....	31
Şekil 18. Mikroakışkan kanal sistemi.....	33
Şekil 19. Embriyo genişleme ve hatching durumu.....	37
Şekil 20. Blastosist sınıflandırma örnekleri.....	38
Şekil 21. Gardner ve Schoolcraft'ın BKS (blastosist kalite skorum) sistemi.....	39

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Semboller ve Kısaltmalar Listesi.....	vii
Tablo 2. Semen karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri.....	17
Tablo 3. Semen kalitesine ilişkin terminoloji.....	20
Tablo 4. Blastosist sınıflandırma tablosu.....	38
Tablo 5. Gardner ve Schoolcraft'ın blastosist kalite skoru.....	39
Tablo 6. TESA ve microchip gruplarında embriyo gelişim karşılaştırılması.....	44
Tablo 7. TESA ve microchip gruplarında gebelik sonucu karşılaştırılması.....	45

## SEMBOLLER / KISALTMALAR

**Tablo 1:** Semboller ve Kısaltmalar Listesi

<b>FISH</b>	Fluorescent In Situ Hybridization
<b>FSH</b>	Folikül Stümüle Edici Hormon
<b>DNA</b>	Deoksiribo Nükleik Asit
<b>ICSI</b>	Intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu
<b>IUI</b>	Intrauterin İnseminasyon
<b>IVF</b>	In vitro fertilizasyon
<b>ODF</b>	Outer Dense Fiber (Yoğun Dış Lifler)
<b>SCD</b>	Sperm Kromatin DNA Testi
<b>TdT</b>	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>TUNEL</b>	Terminal Uridine Nick- End Labeling
<b>ÜYTE</b>	Üremeye Yardımcı Teknikler
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>TESA</b>	Testiküler Sperm Aspirasyonu
<b>TESE</b>	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
<b>MESA</b>	Mikroskopik Epididimal Sperm Aspirasyonu
<b>ICSI</b>	Intracytoplasmic Sperm İnjection
<b>hCG</b>	İnsan Koryonik Gonadotropik Hormonu
<b>GnRH</b>	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

## ÖZET

[AKBAYIR Mustafa]. [Sperm Dna Fragmentasyonu %30'un Üzerinde Olan Hastaların Microchip ve TESA Yöntemleriyle Elde Edilen Spermiler İle Yapılan Mikroenjeksiyon İşlemi Sonucu Embriyo Gelişim Hızı, Kalitesi ve Gebelik Sonuçlarının Karşılaştırılması], [Yüksek Lisans Tezi], Ankara, [2018]

Bu araştırmada; sperm DNA fragmentasyonu %30 ve üzerinde olan hastaların, sperm elde etme yöntemlerinden olan TESA ve microchip tedavisi sonrası embriyo gelişimleri ve gebelik oranları üzerine etkileri incelenmiştir. Tedavilerin ne derece etkili olduğunu gözlemleyip tüp bebek merkezlerine başvuran infertil hastalara sunulacak tedavi yöntemlerini arttırmak amaçlanmıştır.

TESA ve microchip tekniklerinin embriyo gelişimine olan etkisi karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). TESA ve microchip tekniklerinin uygulandığı iki ayrı grubun gebelik sonuçları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ). Ancak sayısal verilerdeki gebelik sonucuna bakıldığında, TESA %52,8'lik bir oranla microchip tekniğinin %40'lık oranına göre daha avantajlı sayılabilir. Her iki sperm elde etme yönteminde de elde edilen spermlerdeki DNA fragmentasyon oranının düştüğü birçok araştırmada desteklenmiştir. Buna itafen seçilecek olan spermelerin büyük bir kısmı hasarsız olup, hasarsız sperm ile ICSI yapılan ve sonucunda oluşan embriyo parametrelerinin daha iyi olacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla gebelik oranının embriyo kalitesine bağlı olarak artacağı savunulmaktadır.

Daha doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek amacıyla, aynı gruplarda büyük ölçekli bir popülasyonda değerlendirilme yapılabilir.

**Anahtar Sözcükler:** İnfertilite, DNA fragmentasyonu, TESA, Microchip.

## ABSTRACT

[AKBAYIR Mustafa]. Comparison between microinjection procedure with sperms that are obtained by microchip and TESA methods, in embryo development rate, quality and pregnancy outcomes of patient whose sperm DNA fragmentation %30 or more, [Master Thesis], Ankara, [2018]

In this study , we examined the effect of TESA and Microchip sperm in patients who has %30 or more Sperm DNA Fragmentation to the Development Rate and Pregnancy Outcomes. It was aimed to observe how effective treatments were and improve the treatment methods to be offered to infertile patients who applied to IVF centers.

In the Results , There is no significant difference between the use of TESA and Microchip sperm to the Embryo Development Rate, and Pregnancy outcomes.( $p>0,05$ ). However , when we checked the pregnancy rate outcomes in numerical data TESA can be considered to the advantageous at a rate of %52.8 compared to the rate of % 40.0 of microchip technique. The both of sperm retrieval method reduces the sperm DNA fragmentation rate and this is highlighted by many researches. It is thought that most of the sperms to be selected for this purpose are will be undamaged, So the embryo parameters that are made with ICSI and resulting with undamaged sperm will be better. It is therefore argued that the pregnancy rate will increase depending on the embryo quality.

This study aims to contribute to the literature and in order to obtain more accurate and reliable results, a large-scale population assessment can be made in the same groups.

**Key Words:** infertility, DNA fragmentation, TESA, Microchip

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, bir çiftin herhangi bir kontrasepsiyon yöntemi kullanmaksızın bir yıl boyunca düzenli ilişkiye girdiği halde gebelik elde edememesi durumudur. İnfertiliteye yol açan nedenlerden bir kısmı genetik temele dayanırken, bir kısmı ise sonradan oluşmaktadır. (1)

Erkek ilişkili faktörler, infertilitenin yaygın sebebi olmaya devam etmektedir. İnfertilite vakalarının yaklaşık % 20' sinden tek başına sorumludur, erkek ve kadın faktörünün bir arada olduğu vakaların % 30-40' ında ek bir artışa neden olmaktadır. (2,3). Buna bağlı olarak fertil ve infertil erkeği kesin olarak birbirinden ayıracak, gebelik sonuçlarının ilerisini kestirecek yeni belirteçlere ihtiyaç artmıştır ve sperm DNA bütünlüğü üzerine dikkatler artmıştır. Son on yılda, araştırmalar erkek infertilitesinde sperm DNA bütünlüğü üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda, sperm DNA'sının bütünlüğünün, erkek infertilitesinin belirlenmesinde iyi bir öngörü sağlayabileceği gözlemlenmiştir (4).

Spermiyogenez sırasında ve sonrasında apoptoz, hasarlı sperm hücrelerinin yok edilmesi için gereken normal bir mekanizmadır. Germ hücrelere hafif ila orta derecede genotoksik ve sitotoksik etkiler apoptozu etkiler. Somatik hücrelerin aksine, ejakülattaki spermlerin apoptoza girme kabiliyeti tam olarak bilinmemektedir. Yapılan son çalışmalarda apoptozun, spermatogenezi düzenleyen en önemli mekanizmalardan biri olduğunu ve insanlar da dahil olmak üzere birçok memeli türdeki germ hücrelerinin ölümünün bu mekanizmaya dayanarak gerçekleştiği düşünülmektedir (5,6). Apoptoz, spermatogenez sırasında çeşitli patolojilerin oluşması veya spermatogenez kontrol sisteminin başlattığı bir sürecin sonucu olarak düşünülebilir (7). Yapılan bir çalışmada; DNA onarım seviyelerinin azalması ve oluşan DNA hasarı sonucunda hatalı genetik bilgilerin embriyoya aktarılmasını engellemek için son adım olarak apoptoz düşünülmektedir (8).

Sperm örneklerinde DNA fragmantasyon oranı; infertil bireylerdeki oranın, fertil bireylerdeki orana göre daha yüksek seviyede olduğu bilinmektedir (9). DNA fragmantasyonu tespit yöntemleri ile her yöntemde farklı değerler elde edilmiştir. Fakat sonuçlar genellenecek olursa, fertil bireylerin sperm DNA hasar oranı karşılaştırıldığında, infertil bireylerin sperm DNA hasar oranının anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (9,10).

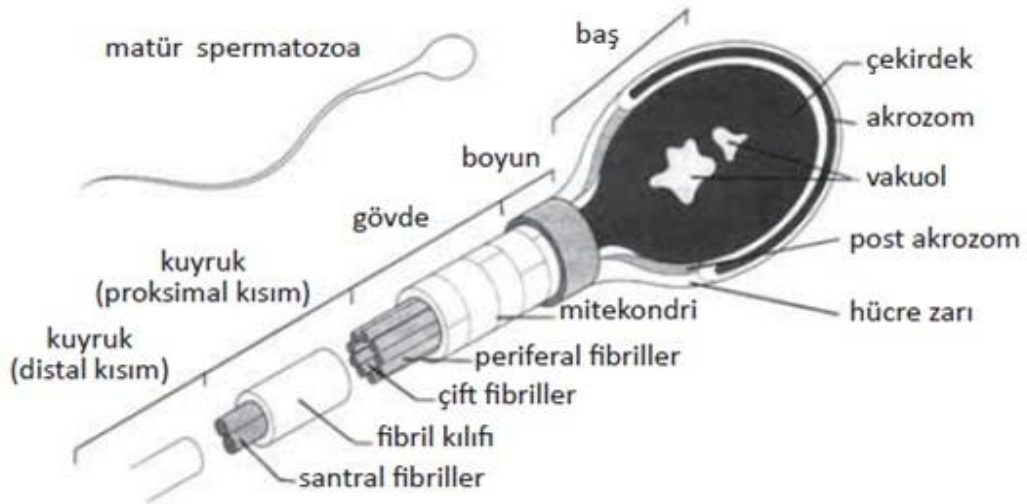
**Bu tezin amacı;** Sperm DNA Fragmantasyonu %30 ve üzerinde olan hastaların TESA ve microchip tedavisi sonrası embriyo gelişimleri ve gebelik oranları üzerine etkilerini saptamak. Tedavilerin ne derece etkili olduğunu görüp tüp bebek merkezlerine başvuran infertil hastalara sunulacak tedavi yöntemlerini arttırmaktır. TESA yöntemiyle elde edilen spermlerin, ejakülattan elde edilen spermlere göre DNA fragmantasyon oranı oldukça düşük olduğundan, seçilen yöntemlerden biridir. Aynı amaçla yine microchip uygulaması da ejakulat sonucu elde edilen spermlerin microchip yöntemiyle seçilen spermlerde de DNA fragmantasyon oranlarının düşük olduğu düşünülerek bu iki teknikte yapılan mikroenjeksiyon işleminin sonuçları incelenmektedir. Her iki tabloda embriyo gelişim hızları, kalitesi ve gebelik sonuçlarıyla doğrudan bağlantı kurularak değerlendirilecektir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. SPERMATOZOANIN YAPISI

Spermatozoa morfolojik olarak baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur. Baş bölgesi akrozomal ve postakrozomal olmak üzere iki kısım, kuyruk ise boyun, orta kısım, esas kısım ve son kısım olmak üzere dört bölümde incelenmektedir. Toplam uzunluğu yaklaşık 60  $\mu\text{m}$  kadar olan spermin baş kısmının boyu 4-5  $\mu\text{m}$ , eni 3  $\mu\text{m}$ ' dir. Spermin baş ve kuyruk bölümlerini bir plazma membranı sarar (Şekil 1) (11).



Şekil 1: Spermatozoanın yapısı (11)

#### 2.1.1. Baş:

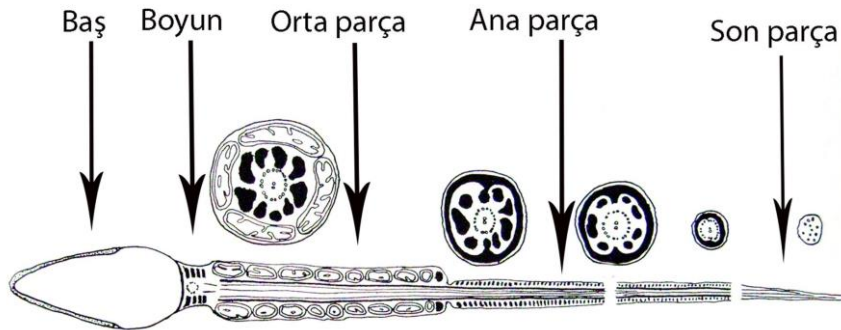
Baş kısmı; akrozom, nükleer membran ve nükleustan oluşmaktadır. Akrozom, lizozomal bir organel olup, glikoprotein yapısındadır ve hidrolik enzimler içerir (hyaluronidaz, aril ülfataz, akrosin, asit fosfataz, nöroaminidaz). Akrosin, bir proteazdır ve akrozomun fertilizasyon sürecinde zona pellucidayı eritmesinde başlı başına bir rolü vardır. (12,13)

Çekirdekdeki DNA, taşıma için en az hacimde, oldukça sıkı bir şekilde paketlenir ve yazılıma kapalıdır. Birçok sperm kromozomu, basit, oldukça pozitif yüklü protein olan protamin olarak paketlenir ve somatik hücrelerde histon içermez. Akrozomal kese, sperm başı ve nükleer membranın ön ucunda özelleşmiş bir salgı kesesidir. Akrozomal kese, sperm zona pellucidaya nüfuz ederek delmesine yardımcı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom tepkimesi, ovum ile temas ettiğinde, sperm içeriğinin ekzositozu ile salınır ve bu reaksiyon, sperm ovuma sıkıca bağlanmasına yardımcı olan spesifik proteinlerin ortaya çıkmasına neden olur (11).

### 2.1.2. Kuyruk:

Hareket eden kuyruk uzun bir kamçıdır ve orta akson çekirdeğinin hemen arkasında bulunan bazal cisimden çıkar. Akson sperm kuyruk hareketinin temelini oluşturur. Aksonem, eşit aralıklı, iki tek merkez mikrotübülü çevreleyen dokuz çift mikrotübülden oluşur. Sperm kamçısı, aksonemin 9 + 2 kalıbını çevreleyen dokuz yoğun dış lif içerir. Lifler bükülme ve daralma özelliklerine sahiptir (11).

Spermatozoa kuyruğu; boyun, orta parça, esas parça ve son parça olarak dört kısımda incelenir (Şekil 2).



**Şekil 2:** Spermatozoanın kuyruk yapısı (14)

### **2.1.2.1. Boyun:**

Spermin başı ile kuyruğu arasındaki proksimal sentriollerin oluşturduğu yoğun fibröz yapıdaki bağlantı parçasıdır (15). Proksimalde, iki majör ve iki minör olmak üzere başın alt kısmında bu iki çift fibröz yapı birleşmektedir. Distalde ise üst üste çapraz bir yapı oluşturarak orta parçanın dış fibrilleriyle birleşirler. Böylece boyun bölgesine esneklik kazandırarak baş ve orta parça arasında gerilim yaratmadan esnemeyi sağlar (16,17).

### **2.1.2.2. Orta parça:**

Aksonem, dokuz mikrotübül çifti içeren iki kat çiftli mikrotübüler bir yapıdan oluşur ve orta kısım, yoğun dış fibrilleri çevreleyen mitokondriyal ve aksonemlerden oluşur. Bu yapılar sperm hareketini sağlamak için mitokondrinin oluşturduğu ATP'yi mekanik enerjiye çevirerek yapar. Orta parça distale doğru incilir ve esas parçayı birleştiren bir halka ile biter (18).

### **2.1.2.3. Esas parça:**

Esas parçanın aksonem yapısının çevresinde kalın dış fibriller bulunur. En dış kısmında ise plazma membranı ile sarılı fibröz kılıf yer alır. Spermatozoanın en uzun parçasıdır ve çapı yaklaşık olarak 0,5  $\mu\text{m}$ , uzunluğu ise 40  $\mu\text{m}$ ' dir. Fibröz kılıf, yapısındaki disülfid bağları sayesinde oldukça dayanıklı ve sıkı bağlanmıştır. Spermatozoanın kuyruk hareketlerini kısıtlar ve doğrusal hareket etmesi için kontrol eder (15,19).

### **2.1.2.4. Son parça:**

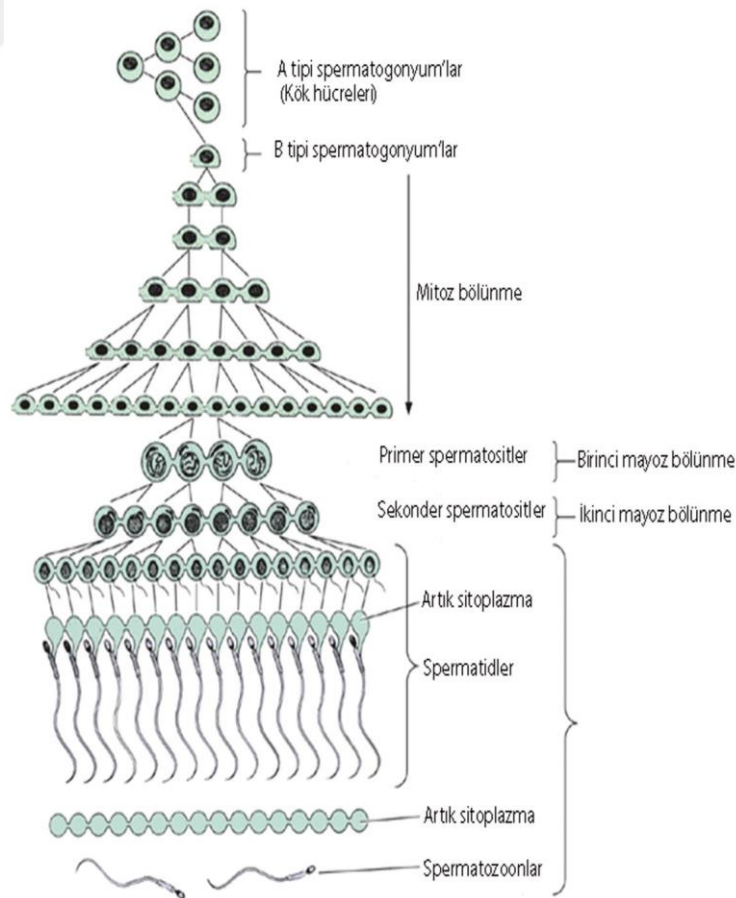
Fibröz kılıfın distal bölgesi çekirdek bölümünün uzak ucunu tanımlar. Buradaki kuyruk parçası son parça adını alır. 5-7  $\mu\text{m}$  uzunluğundadır ve sadece flagellum membranla kaplı akson tarafından oluşturulmuştur. Bu nedenle silyuma benzemektedir (20)

## 2.2. SPERMATOGENEZ

Spermatogenez ergenlikten önce başlar, gonadotropin düzeyi ilişkisiyle orantılı olarak yaşam boyu sürer (21,22)

Spermatogenez süreci, spermatogoniumların poliferasyonu, mayoz bölünme ve spermiyogenez aşamalarından oluşan, germ hücre bölünmesi ve oluşumundaki karmaşık bir süreçtir. Bununla birlikte sitoplazmik yapı değişikliği ve somatik hücre histonlarının protaminlerle yer değiştirdiği görülür (15) (Şekil 3).

Yapısal olarak anormal ve genetik olarak bozulmuş spermier arasında önemli bir ilişki olduğu bilinmemektedir. Germ hücrelerinin farklılaşmasından olgun spermier oluşuma kadar, spermatogenezdeki uzun olaylar hem yapısal hem de genetik hasarın net bir yolu haline geliyor (23).



Şekil 3: Spermatogenez (14)

Spermatogenez, spermatozoa oluşumunda proliferatif ve hücresel değişiklikleri içerir ve üç fazda incelenir;

**1. Spermatositogenez (Poliferasyon):** Tip A spermatogonia, birçok kez bölünerek sayıca çoğalır ve Tip B spermatogenezini oluşturur. Son spermatogoninin bölünmesiyle, birincil spermatositler meydana gelir.

**2. Mayoz Bölünme (Redüksiyon):** Spermatositler kromozom sayısını yarıya indirmek ve spermatid kümeleri oluşturmak için iki matriste ayrılır.

**3. Spermiyogenez (Farklanma):** Spermatidler bir dizi hücre değişikliklerine uğrarlar ve farklanma sonucu spermatozoaya dönüşürler (24).

### 2.2.1. Spermatositogenez

Spermatogonialar bazal lamina üzerine yerleşir ve puberteden sonra testosteron hormonu etkisiyle hücre döngüsüne girerler. Koyu Tip A, açık Tip A, ve Tip B olmak üzere üç tip spermatogonia vardır (12,24).

#### 2.2.1.1. Koyu Tip A

Küçük küp şeklinde görünümündedir ve oval yassılaştırmış çekirdeğinin heterokromatini bol olduğu için koyu bir görünüme sahiptir. Bu hücreler rezerv hücrelerdir ve hücre siklusuna girmezler. Ancak mitoz bölünme ile koyu Tip A ve açık Tip A'yı oluştururlar (24).

#### 2.2.1.2. Açık Tip A

Açık tip A spermatogoniumlar, poliferasyon aşamasında testosteron hormonu ile uyarılır. Mitoz bölünme sonucu bu spermatogoniumlar sayılarını arttırarak açık Tip A ve Tip B spermatogoniumları oluştururlar (15,19).

### 2.2.1.3. Tip B

Bazal lamina üzerindedir ancak bağlantıları daha azdır. Çekirdekleri yuvarlak ve sitoplazmasında A tiplerine göre daha fazla ribozom vardır. Tip B spermatogoniumlar mitoz bölünme sonucu primer spermatositleri meydana getirirler (15,19)

### 2.2.2. Mayoz Bölünme

Tip B spermatogoniumların son mitozundan sonra oluşan spermatositler, mayoz bölünme için DNA sentezlemeye başlarlar ve 22 günlük uzun profaz evresine girerler (13).

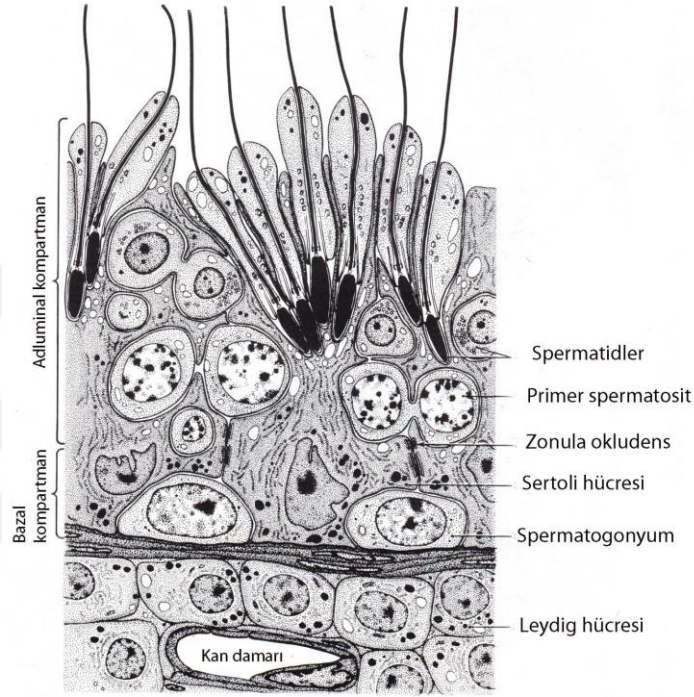
İlk mayoz bölünmeden hemen önce primer spermatositler DNA'larını eşlerler. Böylece 46 kromozom yapısına sahip primer spermatosit ilk mayoz bölünmeden sonra 23 kromozomlu sekonder spermatosite dönüşürler. Sekonder spermatositler ikinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak yeni spermatid hücrelerini oluştururlar. Spermatid hücreleri 23 kromozomludur ve spermeleri oluşturmak için spermiyogenez (matürasyon) sürecinden geçerler (25).

#### **Mayoz bölünmenin üç önemli sonucu:**

1. Sperm ve oosit, her bir çift homolog kromozomun sadece bir temsilcisini içerir.
2. Anne ve babanın kromozomları rastgele dağıtılır.
3. Çapraz geçiş (crossing over) genetik çeşitliliği artırır (26).

### 2.2.3. Spermiyogenez

Spermiyogenez, spermatidlerin spermiumlara kadarki olgunlaşma sürecidir. Spermatidin spermiuma farklılaşmasını sağlayan 3 ana olay vardır. Bunlar Akrozom evresi, flagellum gelişimi ve nükleer yoğunlaşmadır (Şekil 4) (26,20).



Şekil 4: Spermiyogenez (14)

#### 2.2.3.1. Akrozom Gelişimi

Fertilizasyon için gerekli olan hidrolitik enzimlerin depolanması için akrozomal kesenin oluşum sürecidir. Akrozomun gelişmesi; golgi evresi, kep evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi olmak üzere 4 evrede gerçekleşir (Şekil 4) (26).

**Golgi evresi:** Bu evrede proakrozomal granüller golgi aygıtında toplanır ve bu granüller tek bir fibröz zarla çevrilir. Böylece tek bir akrozomal vezikülü oluştururlar (26).

**Kep evresi:** Akrozomal granül, akrozom vezikülü tarafından oluşturulan kepin içine yerleşir ve nükleusun ön kısmını kaplar (24).

**Akrozomal evre:** Manşet oluşmasıyla birlikte spermatid belirgin olarak uzar, sitoplazma çekirdeğin arkasına doğru flajelin proksimaline doğru hareket eder. Böylece hücrenin ön ucundaki membran ile akrozom membranı, arada sitoplazma kalmayacak biçimde birleşir (24). Akrozom, fertilizasyon için gerekli hyalüronidaz ve proakrozin gibi hidrolitik enzimler içerir. Ovumun fertilizasyonu sırasında akrozom reaksiyonu oluşmakta ve enzimatik yapı serbestleşmektedir (19)

**Olgunlaşma evresi:** Sertoli hücresiyle bağlantı ayrılır ve spermatozoalar serbestleşir. Bu arada spermiyum oluşumu sırasında artan sitoplazma fazlalıkları sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir (19,27).

### 2.2.3.2. Flagellum Gelişimi

Flagellum, distal sentriolden gelişir. Keratin içeren dış yoğun fibriller ve fibröz kılıf ile çevrili aynı merkezde dizim yaparak 9+2 mikrotübül aksonem yapısına ulaşırlar. Mitokondriler ise kuyruğun proksimal bölgesinde sarmal kılıf oluşturarak esas parçayı meydana getirir (28).

### 2.2.3.3. Nükleer Yoğunlaşma

Somatik histonlar (H1, H2A, H2B, ve H4) arjinin ve lizin zengin protaminlere dönüştüğünde nükleer yoğunlaşma meydana gelir. Bu somatik histonların protaminlere dönüşmesinden sonra, nükleozomlar kaybolur ve nükleusu yoğunlaştırmak için kromatin lifler yan yana dizilirler. Protaminlerdeki disülfid çapraz bağlar sağlam bir yapı kazanarak kromatinin dirençli olmasını ve stabilizasyonunu sağlar (26,29).



### 2.3. SEMEN ANALİZİ

Semen analizi, bireyin klinik durumu hakkında bize genel bilgi sağlar. Doğru sonuçlar ve yararlı veriler elde etmek için semenin toplanması ve değerlendirilmesi, kabul görmüş yöntemlerle uygun şekilde yapılmalıdır.(12).

Ejekülatın spermden zengin olan ilk kısmının kaybı, ejakülatın son kısmının kaybına göre analiz sonuçlarını daha olumsuz etkilemektedir. Spermatozoa, epididimde toplanır daha sonra aksesuar cinsiyet bezlerin aktivitesi sonucu seyreltilerek üretra içine aktarılır. Epididimin işlevleri bozulmadığı sürece spermlerin vitalitesi ve kromatini cinsel perhizin uzamasından etkilenmemektedir (12).

Epididimler tek bir ejakülasyonda tamamen boşalmadığından bir önceki ejakülasyondan bir miktar spermatozoa kalmaktadır. Kalan spermatozoalar, bir sonraki ejakülasyonda semenin kalitesini olumsuz etkilemektedir. Fakat etki boyutunu saptamak zor olduğu için semen analizinde hesaba katılmamaktadır (12).

Bu türde değişken ve kontrol edilmesi olanaksız faktörler göz önüne alındığında, bir kez alınan semen numunesi üzerinden semen analizi yaparak doğru sonuca ulaşmak mümkün değildir. Bu nedenle ayrı zamanlarda alınan iki veya üç numuneyi analiz etmek daha doğru sonuç verir (12).

**Semen analizi aşağıdaki adımları içerir:**

**1) İlk 5 dakika içerisinde:**

- Numune kabı likefaksiyon için 37°C'de inkübatörde bekletilir.

**2) 30 - 60 dakika arasında:**

- Likefaksiyon ve semen görünümleri değerlendirilmesi.
- Sperm hacmi ölçümü.
- Semen pH'sının ölçülmesi (gerekirse).

- Sperm sayısını ve motilitesini değerlendirmek üzere makler kamerasının hazırlanması.
- Sperm canlılığının değerlendirilmesi (motilite oranı düşükse).
- Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için semen yayıcı preparat hazırlanması.
- Sperm konsantrasyonunu değerlendirmek için semenin seyreltilmesi.
- Sperm antikör testinin (MAR) uygulanması (gerekirse).
- Peroksidaz (+) hücrelerin değerlendirilmesi (lökositler varsa).
- IB testi uygulanması (gerektiğinde).
- Semen santrifüjü (eğer biyokimyasal testler yapılacaksa).

### **3) 3 saat içerisinde:**

- Numunelerin kaydedilip mikrobiyoloji laboratuvarına nakli (gerekirse).

### **4) 4 saat sonra:**

- Hazırlanan yayma preparatlarının fiksasyonu, boyanması ve sperm morfolojisinin değerlendirilmesi (12).

## **2.3.1. Semen Numunesi Toplama**

### **2.3.1.1. Ön Hazırlık**

- Semeni ortam sıcaklığına bağlı değişikliklere marz bırakmamak için numunenin verildiği özel odanın laboratuvara olabildiğince yakın mesafede olmasına dikkat edilmelidir. Böylece numunenin toplanması ile analizi arasındaki zaman farkı en aza indirgenmiş olacaktır.
- Numune en az iki en çok yedi günlük cinsel perhiz süresi sonunda alınmalıdır. İlave olarak ikinci ve üçüncü analiz için numune gerekirse, her defasında cinsel perhiz sürelerinin aynı olması istenmelidir.
- Bireye semen numunesinin doğru bir şekilde toplanabilmesi için anlaşılır yazılı ve sözlü bilgilendirme yapılmalıdır. Numunenin bir kısmının ziyan olması halinde görevliye bildirilmesi gerektiği söylenmelidir.

- Semen toplama raporunda řu bilgiler yer almalıdır; kişinin adı soyadı, doğum tarihi, eşinin adı, cinsel perhiz sũresi, numunenin eksiksiz olup olmadığı, numunenin alındığı tarih ve saat, semen analizine başlama saati (12).

### **2.3.1.2. Tanısal veya Araştırma Amacıyla Semen Toplanması**

- Ejakũlat, geniş ağızlı ve steril bir kap içine alınmalıdır. Cam veya plastik malzemeden yapılmış olan numune toplama kabı, spermatozoa ağısında toksik etki oluşturmamalıdır.
- Ejakũlasyondan sonra ortam sıcaklığı spermatozoayı olumsuz olumsuz yũnde etkilemeyecek dũzeyde olması için, numune kabı 20°C - 37°C arasında bir ortamda tutulmalı, kabın ũzerine erkeğin adı soyadı, eşinin adı, kod numarası, numunenin alındığı tarih ve saat yazılı olmalıdır.
- Semen likefiye olması için numune kabı 37°C'lik bir inkũbatũrde bırakılır.
- Semen numunesinde, spermden zengin ilk kısım eksikse semen toplama raporuna mutlaka kaydedilmelidir. Numune eksikliğinde ũncekiyle eşit bir cinsel perhiz sũresi sonunda tekrar ikinci bir numune toplanmalıdır (12).

### **2.3.1.3. ũYTE İçin Semen Steril Toplanması**

- Numune kapları, karıştırma pipetleri ve pipet uğları steril tek kullanımlık toksik olmayan maddelerden olmalıdır. Semen toplama işlemi, tanı amağlı numune toplamada uygulandığı gibi olmalıdır (12).

### **2.3.1.4. Numunelerin Gũvenli Biçimde İşlenmesi**

Semen numuneleri tehlikeli enfeksiyon etkenleri (ŕrn: HIV, hepatit virũsleri veya herpes simpleks virũsũ) iğerebildiğinden, biyolojik açıdan riskli maddeler olarak ele alınmalıdır. Numune; biyolojik analiz, IUI, IVF veya ICSI için işlemlerden geğirilecekse yada semen kũltũrũ yapılacaksa steril malzemeler ve teknikler kullanılmalıdır (12).

### **2.3.2. Makroskobik Değerlendirme**

Semen analizi, likefaksiyondan hemen sonra nitel inceleme ile başlamalıdır. Semen özelliklerini olumsuz yönde etkileyen dehidratasyon veya ısı dalgalanmasını önlemek için, ejakülasyondan tercihen 30 – 60 dakika içerisinde analiz gerçekleştirilmelidir (12).

#### **2.3.2.1. Likefaksiyon**

Ejakülasyondan hemen sonra, toplama kabındaki semen tipik olarak bir koagüle kitle şeklindedir. Oda sıcaklığında birkaç dakika içinde, genellikle likefiye olmaya (incelmeye) başlar. Bu arada semende, heterojen koagüle alanların karışımı görülür. Likefaksiyon devam ederken semen daha homojen hale gelir (12). Bu durum prostat salgılayan fibrolitik enzimlerden kaynaklanır. Bununla birlikte, fibrinojen ve aminopeptidaz olarak bilinen iki proteolitik enzim ile gerçekleşir. Bu nedenle likefaksiyon normal prostatik fonksiyon sergilemektedir (23,24).

Likefaksiyon işlemi 37°C'de bir inkübatör içerisinde iki boyutlu karıştırıcıyla nazikçe ve sürekli olarak karıştırılması durumunda daha homojen bir numune elde edilebilir. Son aşamalarda sadece küçük koagüle alanlar kalabilir. Semen oda sıcaklığında likefiye olması ortalama 15 dakika sürer. Likefaksiyon nadiren 60 dakikaya uzayabilir. 60 dakika ve daha fazla sürede hala tam likefiye olmuyorsa bu durum kaydedilmelidir (12).

#### **2.3.2.2. Semen Viskozitesi**

Likefaksiyondan sonra semenin, geniş kalibreli (yaklaşık 1,5 mm çapında) olan tek kullanımlık bir plastik pipet ile aspire edilerek ve yer çekimi ile yavaşça damlatılmaya bırakıldığı zaman oluşan iplikçiğin gözlenmesiyle numunenin viskozitesi tahminen hesaplanabilir (12).

Viskozite normal ise, semen pipetten farklı küçük damlacıklar halinde düşer. Viskozite anormal ise, damla 2 cm'den uzun bir iplikçik oluşturur (12).

Alternatif olarak viskozite, numuneye bir cam çubuk yerleştirilerek ve çekilerek oluşan iplikçiğin uzunluğunun gözlenmesi ile de değerlendirilebilir. 2 cm'den uzun iplikçik oluşturan semenin viskozitesi anormal olarak kaydedilir(12).

Artan viskozite, seminal, vesikül ve prostat gibi genital yapıların enfeksiyonlarına sekonder olarak anormal prostat fonksiyonunun ortaya çıkması ile oluşabilir. Bu aynı zamanda, uygun olmayan saklama kaplarının kullanılması veya hastanın sıklıkla ejakülasyon yapması gibi fizyolojik bir nedenden kaynaklanmaktadır (23).

“Yüksek viskozite, sperm motilitesi ve konsantrasyonunun belirlenmesini, antikor kaplı spermlerin saptanmasını ve biyokimyasal belirteçlerin ölçümünü olumsuz etkileyebilir” (12).

### **2.3.2.3. Ejakülatın Görünümü**

Normal şartlarda likefiye olmuş semen örneği; homojen, gri opak bir görünümde dir. Sperm konsantrasyonu çok düşükse, opak görünmeyebilir veya herhangi bir nedenden rengi farklı olabilir. Örneğin; eritrositler varsa kırmızı-kahverengi (hemospermi) veya hasta bazı vitamin ilaçları kullanıyorsa sarı olabilir (12).

### **2.3.2.4. Semen Hacmi**

Semen hacminin ölçülmesinde günümüzde hala kullanılmakta olan yöntem; 15 ml'lik bir boyuta konik tüpe yerleştirmek ve 0,1 ml'ye kadarki yerlerde okumaktır. Hacim hesaplamaları aynı zamanda semen kabının boş ağırlığı ile semen koyduktan sonraki ağırlık arasındaki farkın hesaplanması ile yapılabilir (23).

Ejakülat hacmi; seminal keseler, prostat bezi, bulboüretral bezler, epididimden gelen sıvılar ve spermatozoaların hacmi ile tamamlanır. Hacmin doğru saptanması, semen analizi için son derece önemlidir, çünkü ejakülattaki spermatozoa oranının ve diğer hücrelerin toplam sayısının hesaplanmasında belirleyicidir (12).

Semen hacminin WHO kriterlerine göre alt referans sınırı 1,5 ml'dir. Semen hacmi 1 ml'den düşükse, semen numunesinin doğru şekilde alınmış olup olmadığı kontrol edilmelidir. Bu nokta çok önemlidir çünkü semen numunesinin ilk kısmı en üst düzeyde sperm içerir ve en yüksek motiliteye sahiptir (23).

Yüksek semen hacmi, aksesuar bezlerin inflamasyonu sonucu aktif eksüdasyonu yansıttığı düşünülmektedir. Düşük semen hacmi ise ejakülatör kanalın obstrüksiyonu veya seminal keselerin gelişmemiş olması gibi doğumsal kaynaklı bir belirti olarak görülebilir (12).

### **2.3.2.5. Semen pH'si**

Semen pH'si, başlıcası alkalen seminal kese salgısıyla, asidik prostat salgısı olan farklı aksesuar bez salgılarının pH değerleri arasındaki dengeyi temsil eder. pH, likefaksiyondan sonra sabit bir zaman, tercihen 30 dakika geçtikten sonra ölçülmelidir. Ancak her durumda, üretiminden itibaren oluşan CO<sub>2</sub> kaybından etkilendiği için, pH ölçümü ejakülasyondan sonraki bir saat içinde mutlaka yapılmış olmalıdır. Normal numuneler için 6,0–10,0 arasındaki pH kağıdı kullanılmalıdır.

- Semen numunesi iyice karıştırılır.
- pH kâğıdının üzerine bir damla semen düzgünce yayılır.
- Semeni absorbe eden bölgenin homojen olarak renklenmesi beklenir.
- pH'yı okumak için oluşan renk, kalibrasyon şeridiyle karşılaştırılır (12).

Normal semen pH'sı 7,2 – 8,0 aralığında hafif alkalendir (12). Akut enfeksiyon halinde veya geç semen analizinde pH 8,0'ın üzerine çıkabilir (24)

**Tablo 2:** Semen karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri (12)

Parametre	Alt referans limiti
Semen hacmi (ml)	1,5 (1,4–1,7)
Toplam sperm sayısı ( $10^6$ /ejakülat)	39 (33–46)
Sperm konsantrasyonu ( $10^6$ / ml)	15 (12–16)
Toplam motilite (PR+NP, %)	40 (38–42)
İleriye doğru hareketlilik (PR, %)	32 (31–34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55–63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3,0–4,0)
<b>Uzlaşılan diğer eşik değerler</b>	
pH	$\geq 7,2$
Peroksidaz pozitif lökositler ( $10^6$ /ml)	$< 1,0$
MAR testi (parçacıklara bağlı hareketli sperm, %)	$< 50$
İmmunobead test (kürelerin bağlandığı hareketli sperm, %)	$< 50$
Seminal çinko ( $\mu\text{mol}$ /ejakülat)	$\geq 2,4$
Seminal fruktoz ( $\mu\text{mol}$ /ejakülat)	$\geq 13$
Seminal nötral glikozidaz (mU/ejakülat)	$\geq 20$

### 2.3.3. Mikroskopik Değerlendirme

#### 2.3.3.1. Sperm Motilitesi

Spermatozoaların motilitesi progresif, nonprogresif ve immotil olarak üç grupta derecelendirilir:

1. Progresif Motilite (PR): Hızdan bağımsız olarak doğrusal ve ileri yönde aktif olarak hareket etmesidir.
2. Nonprogresif Motilite (NP): İleriye doğru hareketin olmadığı diğer hareketlilik kalıplarıyla yerinde hareket sağlamasıdır.
3. İmmotilite (IM): hareketsiz spermatozoa (12).

### 2.3.3.2. Sperm Vitalitesi

Spermatozoanın canlılık derecesidir ve tüm numunelerde vitalite oranı saptanabilmektedir. Ancak sperm motilitesinin %40'tan az olduğu numunelerde vitalite parametresi çok daha önemlidir. Doğal olarak ölü sperm oranının, hareketsiz sperm oranını geçmemesi gerekir. Bu nedenle motilite oranıyla bu testin sağlanması yapılabilir. Normal şartlarda canlı sperm oranı, hareketli sperm oranını aşmaktadır (12).

Canlı spermlerin oranı, boyama testi veya hipoozmotik basınç testi ile sağlam membranlı spermler belirlenerek vitalitesi değerlendirilir. Boyama testinde canlı olmayan hücreler, normalde membrana penetre olmayan boyaların hücre içine girmesine izin verir. Boyanan hücreler bize ölü spermatozoaları göstermektedir. Hipoozmotik basınç testinde ise sağlam membranlı (canlı) spermatozoaların hipotonik sıvılarda şişeceği ilkesine dayanır. Ölü spermatozoaların ise mebranları zarar gördüğü için şişmez (12).

Semen numunesi alınıp likefaksiyon süreci tamamlandıktan hemen sonra tercihen 30 dakika içerisinde sperm vitalitesi değerlendirilmelidir. Dehidratasyon ve ısı değişikliklerinin sperm vitalitesini olumsuz yönde etkileyeceğinden, bu zararlı etkileri sınırlamak için ejakülasyondan sonraki ilk 1 saat içerisinde mutlaka değerlendirilmelidir. (12).

Hareketsiz spermlerin ölü veya canlı oldukları klinik açıdan son derece önemlidir. Canlı ancak hareketsiz spermatozoaların yüksek oranda olması, sperm kuyruğunda morfolojik kusurların bir işareti olabilir. Hareketsiz ve ölü spermatozoaların yüksek oranda olması ise epididim patolojisinin bir göstergesi olabilir (12).



### 2.3.3.3. Sperm Sayısı

Ejakülattaki sperm sayısı, semenin değerlendirilmesi sırasında ölçülen sperm konsantrasyonundan hesaplanır. Sperm konsantrasyonu, semenin birim hacmindeki spermatozoa sayısını göstermektedir. Semendeki spermatozoa konsantrasyonu fertilité ve gebelik oranları ile korelasyon göstermesine rağmen, seminal veziküllerin ve prostat sıvılarının salınan hacminden etkilenir ve testis fonksiyonunun spesifik bir ölçüsü değildir (12).

#### Makler Sperm Sayma Kamerası;

Makler® sperm sayma kamerası hızlı ve ideal biçimde sperm sayısı ve motilitesini değerlendirmek için kullanılan bir sayma kamerasıdır. Optik olarak düz iki parça camdan meydana gelir. Üst cam, kapak görevi görmekte birlikte merkezinde her biri 0,1x0,1 mm'lik 100 kareye bölünmüş 1mm<sup>2</sup>'lik ince klavuz çizgiler bulunmaktadır. Analiz edilmiş biçimi ise; iyice sıvılaşmış ve karıştırılmış ancak seyreltilmemiş semenden küçük bir damla alınarak diskin merkezine konular ve üzerine kapama camı kapatılarak mikroskop altında 20'lik objektif ile sayım yapılabilir. Yukarıdan aşağıya ya da soldan sağa 10 karelik bir alan içindeki sperm sayılır. Bulunan sayı ml'de kaç milyon sperm olduğunu gösterir. Sperm sayımı yapılan alandaki hareketsiz sperm sayılır ve toplam sperm sayısı ile orantılanarak hareketli (motil) sperm sayısı hesaplanır. (Şekil 5) (30).



Şekil 5: Makler Sperm Sayma Kamerası (30)

### 2.3.4. Semen Kalitesine İlişkin Terminoloji

**Tablo 3:** Semen Kalitesine İlişkin Terminoloji (12)

Aspermi	Semen yok (retrograd ejakülasyon var veya yok)
Astenozoospermi	İleri hareketli spermilerin (PR) yüzdesi alt referans limitin altında
Astenoteratozoospermi	Hem ileri hareketli spermilerin (PR) hem de morfolojik olarak normal spermilerin yüzdesi alt referans limitlerinden düşük
Azospermi	Ejakülatta hiç sperm yok
Kriptozoospermi	Taze preparatlarda sperm olmamasına rağmen santrifüjlenmiş pellette gözlenir
Hemospermi (Hematospermi)	Ejakülatta eritrositlerin varlığı
Lökospermi (lökosito-spermi, piyospermi)	Ejakülatta eşik değer üstünde lökosit varlığı
Nekrozoospermi	Ejakülatta düşük yüzdede canlı ve yüksek yüzdede cansız spermier
Normozoospermi	Alt referans limitlerine eşit veya yüksek toplam sperm sayısı, ileriye doğru hareketli ve morfolojik olarak normal spermatozoa yüzdeleri
Oligoastenozoospermi	Alt referans limitlerinden düşük toplam sperm sayısı ve ileri hareketli spermatozoa yüzdesi
Oligoastenoteratozoospermi	Alt referans limitlerinden düşük toplam sperm sayısı, hem ileri hareketli hem de morfolojik olarak normal spermilerin yüzdeleri
Oligoteratozoospermi	Alt referans limitlerinden düşük toplam sperm sayısı ve morfolojik olarak normal spermilerin yüzdesi
Oligozoospermi	Alt referans limitinden düşük toplam sperm sayısı
Teratozoospermi	Alt referans limitinden düşük yüzdede morfolojik olarak normal spermier

## 2.4. ERKEK İNFERTİLİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Erkek infertilitesinin teşhisi öncelikle semen analizi ile konmalıdır. Ancak fertil ve infertil erkekleri birbirinden ayıracak kesin tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmuş ve sperm DNA fragmantasyonu üzerindeki çalışmalar ile sperm fonksiyonuna yönelik testler geliştirilmiştir (31).

Erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden biri, sperm DNA yapısının bozulmasıdır. Düşük kaliteli sperm DNA'sı fertilizasyonun bozulmasına neden olur. In vitro fertilizasyon (IVF) hastalarında spermatozoa fertilizasyon oranlarında genetik kusurlar azalmıştır. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sırasında DNA hasarlı spermin kullanılması durumunda, embriyoların genetik yapısı bozulabilir. Sonuç olarak, DNA fragmantasyon oranının bilgisi, fertilizasyon başarısı ve sağlıklı embriyo gelişiminde önemlidir (32).

### 2.4.1. Sperm DNA Fragmantasyonu Mekanizması

Sperm DNA fragmantasyonuna neden olabilecek üç temel mekanizma vardır. Bunlar; spermatogenez sırasında yanlış kromatin paketlenmesi, ejakülasyon öncesi apoptoz, ejakülatta yüksek oranda ROS türlerinin oluşması (25).

Spermdeki DNA hasarı; hem mitokondriyal, hem de nükleer DNA'da gerçekleşebilir. Bu hasar, sperm hücrelerinin taşınması ya da üretim sürecinde meydana gelir ve spermatogenez süreci boyunca apoptoz gözlenir. Spermatogenez sürecinde sperm kromatinin yeniden biçimlendirilmesi sırasında DNA zincir kırıkları meydana gelebilir. Bu mekanizmalardan sperm DNA fragmantasyonu için esas rol oynayanlardan diğeri ise, spermlerin epididime taşınması sırasındaki post-testiküler hasardır. DNA fragmantasyonu, testiküler spermler ile karşılaştırıldığında kaudal epididim ve ejakülasyon spermlerinde daha yüksektir (33).

#### **2.4.1.1. Spermatozoa Kromatin Paketlenmesi;**

Sperm kromatini, DNA ve sperm nükleer proteinlerinin sıkı bir şekilde paketlenmesiyle oluşur. Bu nükleer proteinler çoğunlukla bazik özellik gösteren protaminlerden oluşmaktadır. Sperm DNA iplikleri bu protaminlerin etrafında düzenli ve sıkı ilmekler oluşturacak biçimde sarmalanmıştır. Spermatozoa kromatin yapısının büyük bir kısmı protaminlerle sıkıca paketlenmişken, %15'lik bir kısmı histonlarla daha gevşek bir yapıda paketlenmiştir. Fertil erkeklerde bu oran korunurken, infertil erkeklerde bu oranın artmış olduğu gösterilmiştir. Bu anormal kromatin paketlenmesi, spermin dış strese daha duyarlı olduğunu düşündürmektedir (27, 34).

#### **2.4.1.2. Apoptoz**

Apoptoz vücutta bulunan bütün dokuların normal şekilde fonksiyonlarını sürdürebilmelerinde önemli rol oynar. Bu durum spermatozoa için de aynıdır. İnfertilite nedeni olarak bilinen faktörler, spesifik mekanizmalarla apoptoza yol açar. Apoptoz doğal olarak meydana gelebildiği gibi ROS, hormonal faktörler ve çevresel toksinlerin etkileriyle de uyarılabilmektedir. Aynı zamanda spermatogonia sayısı, sertoli hücrelerinin destek kapasitesini aşarsa fazla hücreler yine apoptoz ile parçalanırlar (35).

Apoptoz ve mitoz bölünme, dokuda sürekli denge halinde gerçekleşir ve süreklilik gösterir. Buna dayalı olarak bir dokuda hücre poliferasyonu mitozla gerçekleşirken, o dokuda olması gereken hücre sayısı apoptoz ile belirlenir. Apoptoz sürecinde kromatin yoğunlaşması sonucu nükleozomal DNA fragmentasyonu ve apoptotik cisimcikler görülür (36).

Apoptozun DNA fragmentasyonuna etkisi biyokimyasal bir süreçtir. DNA, endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar, endonükleazı serbestleştirmek için DNA yıkımını başlatırlar. Çekirdek içine giren  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  bağımlı nükleazlar, DNA kırıklarını oluştururlar (37).

Yapılan bir çalışmada apoptozun; DNA hasarı ve DNA onarımının azalması sonucunda, hatalı DNA materyalinin embriyoya geçmesini engelleyen son basamak olduğu düşünülmüştür (38). Erkek üreme sisteminde lökositlerin etkisi gösterilmiştir ancak seminal lökositlerin işlevi tam olarak bilinmemektedir. Enfeksiyon yokluğunda ürogenital kanallardaki mevcut lökositlerin asıl fonksiyonlarından biri, apoptotik spermatozoaları yıkmak olabilir (39).

#### **2.4.1.3. ROS (Reaktif Oksijen Türleri);**

“Serbest radikaller, dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, kararlı olmayan bileşiklerdir. Bu çiftlenmemiş elektron, serbest radikallere büyük bir reaktivite kazandırarak protein, lipit, DNA ve nükleotid koenzimler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır” (40).

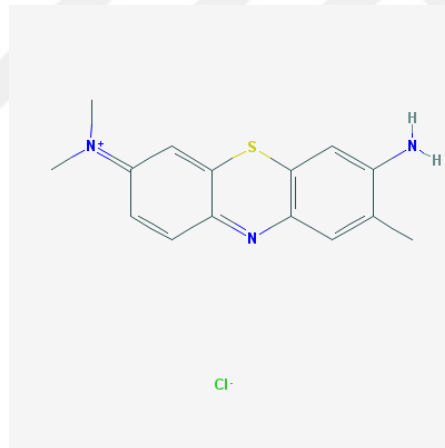
Semendeki ROS kaynağı lökositler ve morfolojik olarak anormal spermatozodur. Lökositler spermatozoaya göre çok daha fazla ROS kaynağı olduğu bilinmektedir. Semendeki lökositleri prostat ve epididim oluşturmaktadır. Lökositler mikroorganizmalara karşı koyarken ortama süperoksit ( $O_2^-$ ) salarlar. Bu süperoksit anyonu diğer ROS ve oksidanlarla reaksiyona girerek hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil grubu ( $OH^-$ ) veya hipoklorid ( $ClO^-$ ) gibi toksik maddelerin oluşmasına neden olur (41, 42).

ROS' un diğer kaynağı olan spermatozoa, diğer hücrelere göre daha hassastır. Çünkü spermatozoanın plazma membranı yüksek oranda yağ asitleri, sitoplazmalarında ise düşük konsantrasyonda antioksidan enzimler içerirler. Matürasyonunu tamamlayamayan spermatozoa, spermiyogenezin son safhasında sitoplazma fazlalığından kurtulamaz ve normalden daha fazla ROS yapar. Bu nedenle ROS toksisite mekanizması sonucu spermatozoa nükleusunda DNA hasarı oluşması muhtemeldir (42, 43, 44)

## 2.4.2. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri

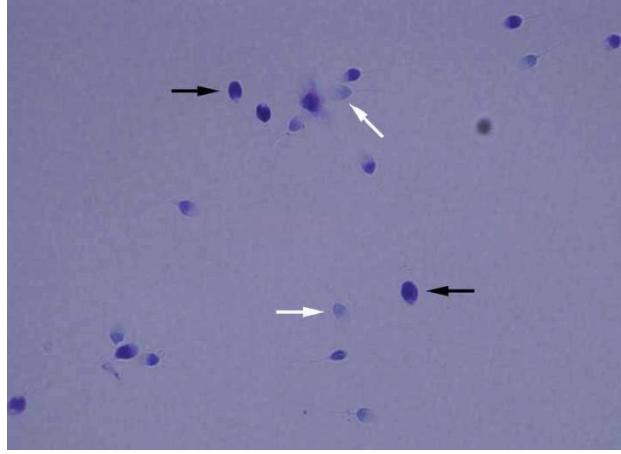
### 2.4.2.1. Toluidin Mavisi Boyaması

Kromatinin metakromatik boyanmasında kullanılır. Yoğunlaşmış hasarlı kromatine ağır bir şekilde bağlanır. Toluidin mavisi DNA paketlenmesinde hassastır. Zayıf spermatozoa bütünlüğünü ve şiddetli DNA hasarını gösterir (A40). Katyonik bir boya olan toluidin mavisinin DNA veya nükleohistonlara interkalasyon (araya girme) veya agregasyon (kümeleşme) yoluyla bağlandığı düşünülmektedir. Toluidin mavisi sperm DNA'sında bulunan histonların fosfat gruplarına bağlanarak sperm kromatin yoğunlaşmasının ortaya çıkmasını sağlar (Şekil 7) (45,46).



**Şekil 6:** Toluidin mavisi molekül yapısı (47)

Erenpreiss 2004'te toluidin mavisi ile yaptığı çalışmada sperm DNA fragmantasyonunu göstermede diğer metotlarla korelasyon gösterdiğini saptamıştır (48).

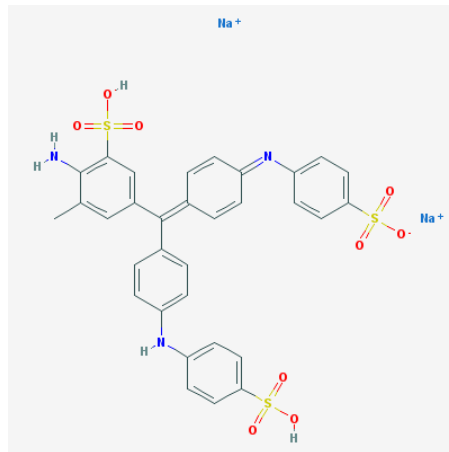


**Şekil 7:** Toluidin mavisi boyaması (49).

Beyaz oklarla gösterilen başları açık mavi sperm hücresi normal olarak skorlanırken, siyah oklarla gösterilen başları mor (koyu mor) sperm hücresi, kromatin hasarlı olarak skorlanır (49).

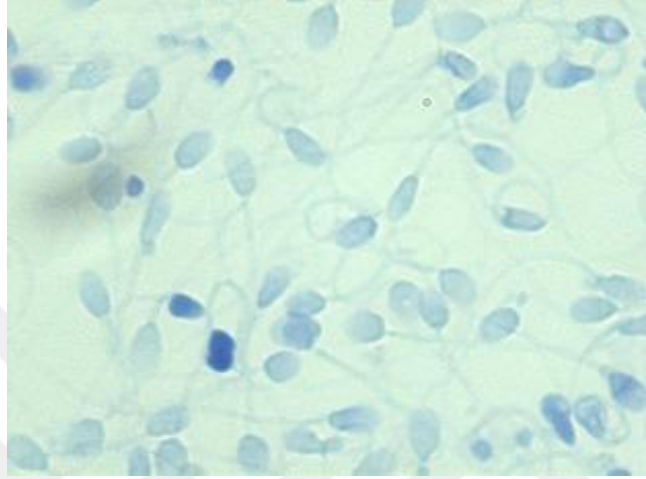
#### 2.4.2.2. Anilin Mavisi Boyaması

Histonlar ile protaminler arasında ayırım yapma prensibine dayanır. Lizinden zengin histonlarla, arjinin/sistein zengini protaminlerin ayırımında kullanılan bir boyadır (Şekil 8) (50).

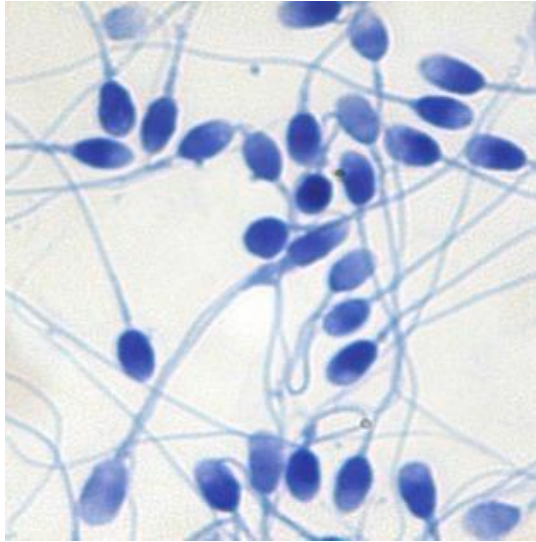


**Şekil 8:** Anilin mavisi molekül yapısı (51)

Matür spermatozoanın arjinin-sistein zengini protaminli nükleusu çok düşük lizin içerdiği için anilin mavisiyle tamamen boyanmayacaktır (Şekil 9). İmmatür spermatozoanın lizinden zengin histon taşıyan nükleusu sonuç olarak daha koyu mavi rengi alacaktır (Şekil10) (50).



**Şekil 9:** Anilin mavisi boyama yöntemi ile görülen normal kromatin yoğunlaşması (52)

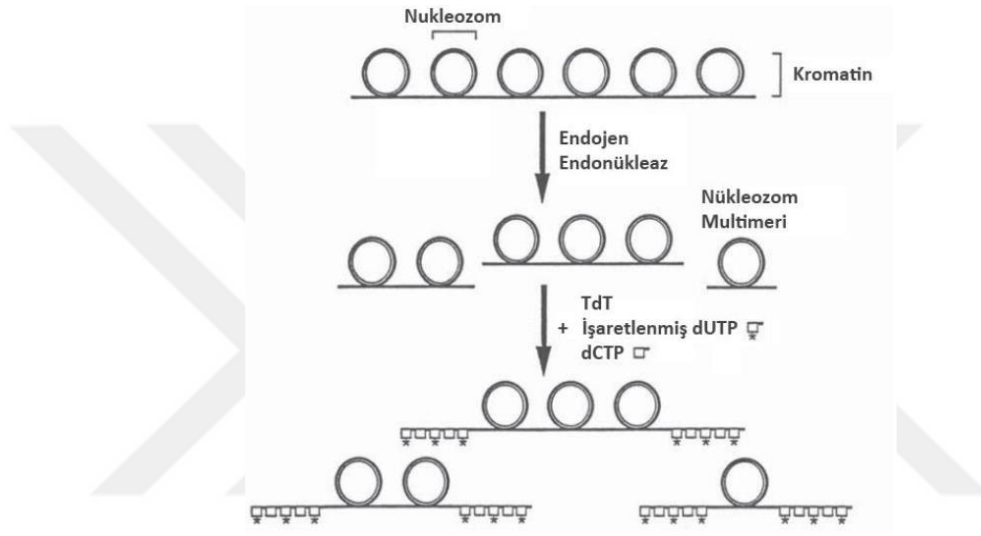


**Şekil 10:** Anilin mavisi boyama yöntemi ile görülen anormal kromatin yoğunlaşması (52)

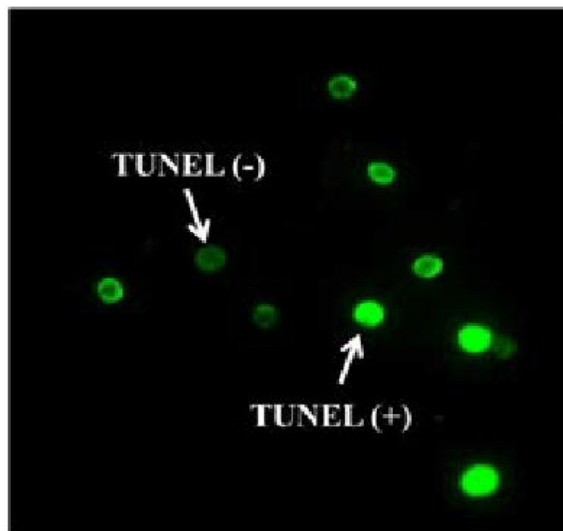


### 2.4.2.3. Terminal Uridine Nick- End Labeling (TUNEL) Metodu

Apoptoz sürecince meydana gelen DNA kırılmalarını tespit etmek amacıyla kullanılan yöntemlerden biridir. Biotin, digoxigenin, fluorescein gibi farklı enzimatik işaretleyiciler ile işaretlenen DNA kırıkları; ışık mikroskobu, floresan mikroskobu ve flow sitometri ile belirlenebilir. Böylece apoptotik hücrelerin ve DNA fragmentasyon yüzdelerinin ölçülmesi mümkün olmaktadır (Şekil11) (53).



Şekil 11: Kromatin kırıklarının TUNEL metodu ile işaretlenmesi (54)

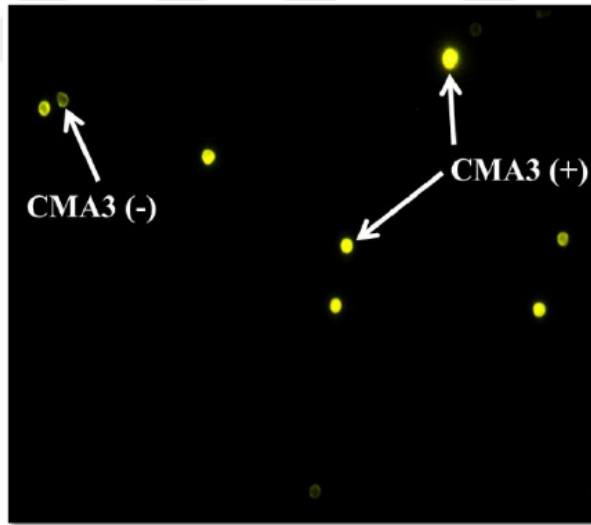


Şekil 12: Spermdede apoptozun saptanması için TUNEL testi (55)

Floresan mikroskobu altında normal DNA (apoptotik olmayan sperm) açık yeşil renkte görülürken hasar görmüş DNA (apoptotik sperm) parlak yeşil ( $\times 100$  mercek büyütme) olarak görülür (Şekil 12) (55).

#### 2.4.2.4. Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi

Spermatozoada zayıf paketlenen kromatinde, indirekt yolla protaminden eksik DNA'nın görüntülenmesinde kullanılan guanin–sitozin spesifik bir boyadır. CMA3 ve protaminler DNA'da aynı yere bağlanır. Bu yüzden yüksek CMA3 floresanı, spermatozoanın düşük protaminasyonunun işaretidir (Şekil 13). CMA3 yöntemi, spermatozoa kromatin değerlendirilmesinde diğer yöntemlerle güçlü korelasyon gösterir (56).

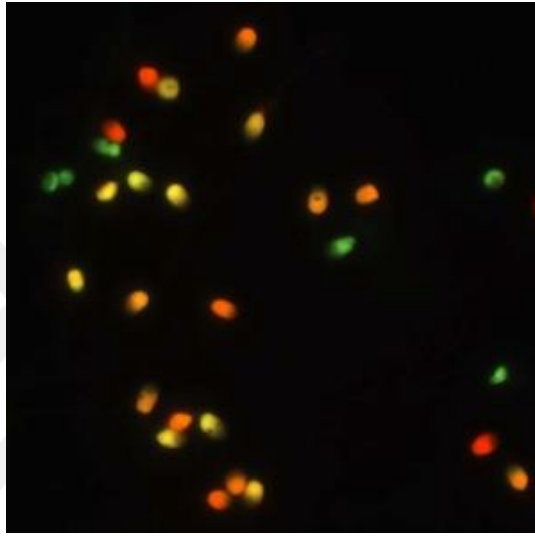


**Şekil 13:** Sperm protamin eksikliğini değerlendirilmesi için CMA3 testi (55)

Parlak sarı yuvarlak başlı sperm hücreleri CMA3(+) protamin eksikliğini gösterirken, sarımsı yeşil yuvarlak başlı sperm hücrelerini CMA3(-) normal protamin içeriğini (flöresan mikroskobu,  $\times 100$  mercek büyütme) göstermektedir (Şekil 13) (55).

#### 2.4.2.5. Akridin Turuncu Boyaması

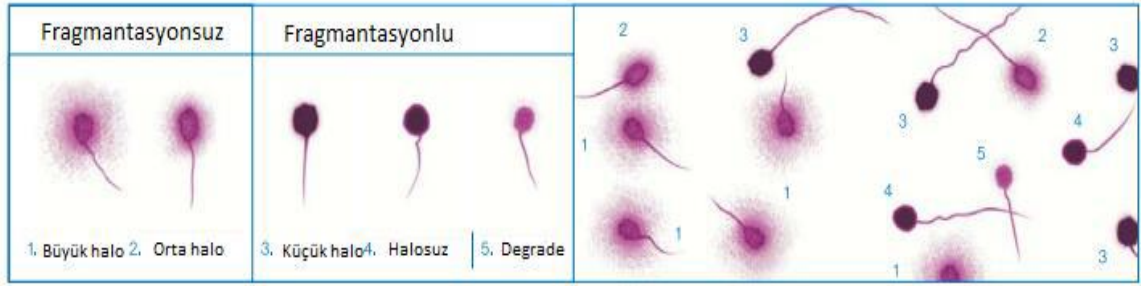
Spermatozoa DNA'sına asit ilavesiyle denatürasyon hassasiyetinin ölçülmesine dayanır. Floresan mikroskopta görüntülenebilir. Yeşil renkte görüntülenenler normal DNA'ya sahip spermatozoaları gösterirken, sarı ve kırmızı renkte görüntülenenler DNA hasarı olan spermatozoaları gösterir (Şekil 14) (57).



Şekil 14: Akridin turuncu boyaması (58)

#### 2.4.2.6. Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD) - HALOSPERM®

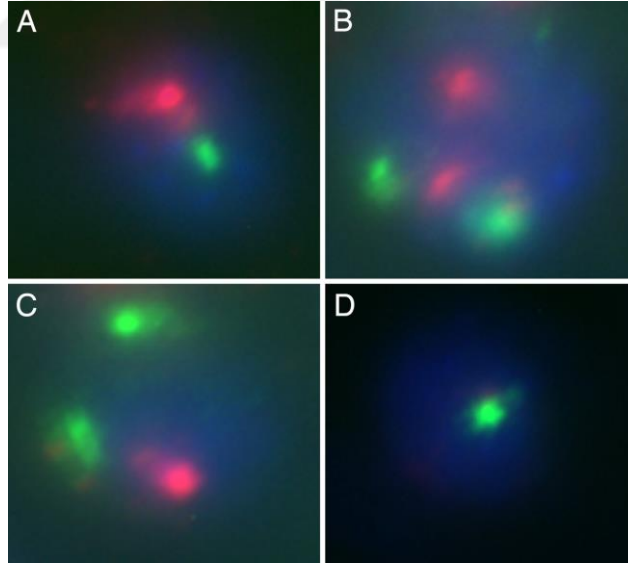
DNA kırıklarının saptanması için spermler asit ile denatüre edilir ve nükleer proteinlerin çıkmasından sonra gelişen halo değerlendirilir. Bu sınıflandırma haloların büyüklüğü ile orantılı olarak yapılmaktadır. Eğer Sperm DNA fragmentasyonu yok ise veya minimal düzeyde ise sperm etrafında büyük halo oluşturur (Şekil 15). Sperm DNA fragmentasyonu çok olan spermlerde halo yoktur ya da çok minimal seviyededir (59).



**Şekil 15:** Halosperm yöntemiyle sperm DNA fragmentasyonu testi (59)

#### 2.4.2.7. Fluorescent İn Situ Hibridization (FISH)

Agar matrikse gömülü hücreler alkali solüsyona maruz bırakılarak, DNA çift iplikçiklerinin tek sarmal DNA'ya dönüşmesi sağlanır. DNA kırılması arttıkça tek sarmal DNA oluşum oranı artar. Bu yöntem in situ olarak DNA kırıklarının ve miktarının belirlenmesine olanak sağlar (Şekil 16) (60).

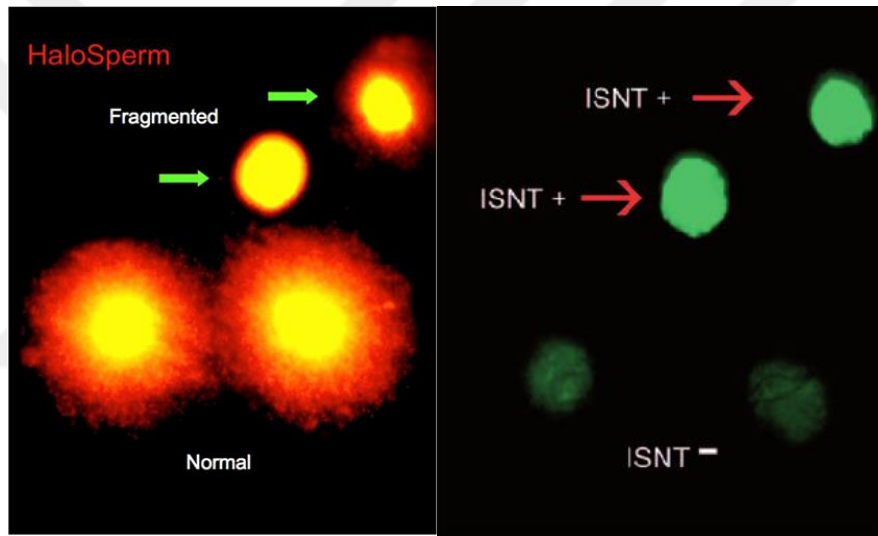


**Şekil 16:** FISH yöntemiyle tespit edilen normal ve anöloid sperm nükleusu (61)

(A) normal, (B) ve (C) hiperploid, (D) hipoploid kromozom yapısındadır.

### 2.4.2.8. İn Situ-Nick Translasyon (ISNT) Yöntemi

NT yöntemi biyotinenen deoksiüridin trifosfatın (dUTP) ssDNA kırıklarında kalıp bağımlı DNA polimeraz I enzimi tarafından katalizlendiği reaksiyonda kaynaşması esasına dayanır. Spesifik olarak endojen DNA hasarını tespit eder ve değişken seviyelerini içeren spermatozoayı boyar. NT yöntemi spermatozoada, nükleer DNA'nın yeniden modellenmesi sırasında meydana gelen anomalileri gösterir (50). Halosperm tekniği ile korelasyon göstermektedir (Şekil 17) (62).



Şekil 17: ISTN testinin yorumlanması (62)

Spermatozoa, büyük haloya sahipse ISTN-, küçük haloya sahipse yada halo yoksa ISTN+ olarak isimlendirilmiştir. Yani ISTN- ile gösterilenler DNA fragmentasyonu olmayan spermatozoaları, ISTN+ ise DNA fragmentasyonu olan spermatozoaları göstermektedir (Şekil 17) (62).

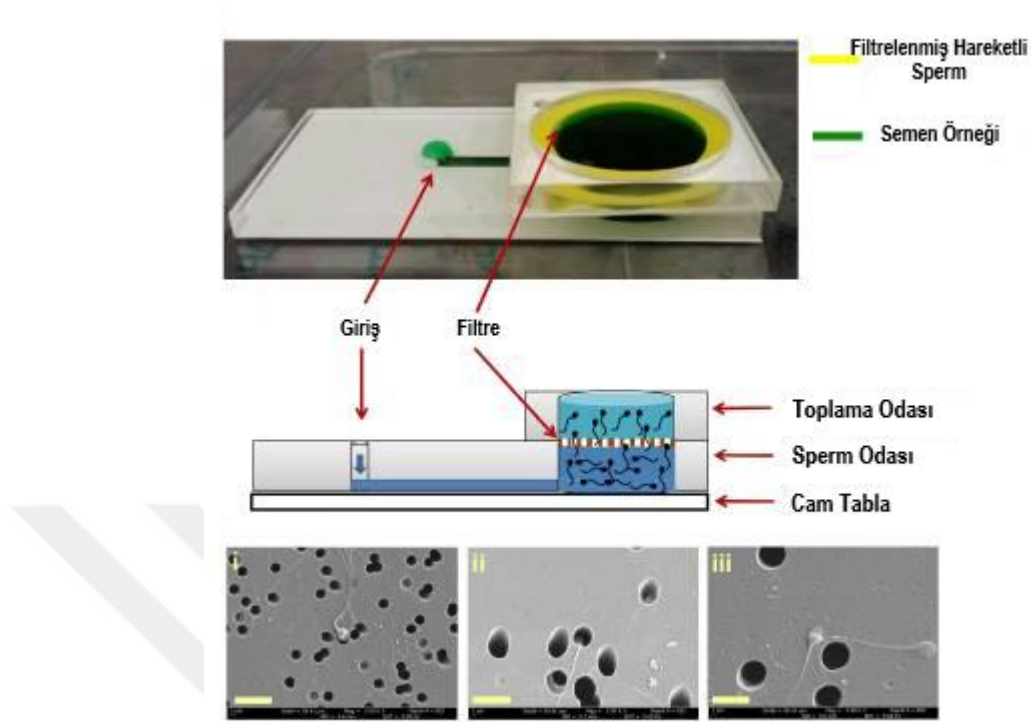
## 2.5. SPERM ELDE ETME YÖNTEMLERİ

### 2.5.1. MICROCHIP

DNA hasarının önüne geçebilecek, sperm seçimine yönelik geliştirilen yöntemlerden biride “mikroakışkan kanal sistemi (spermchip)” yöntemidir. Aslında bu yöntem geliştirilirken doğal ortamdan esinlenilmiştir. Bu sistem, spermin intrauterin ortam, servikal ve vajinal kanal mikro çevresine benzeyen bir mikrokanal içerikli çip özelliğindedir (63).

Mikroçipte 1.5 mm kalınlığında Polimetilmetakrilat kombinasyonu (PMMA) ve 50 mikron kalınlığında çift taraflı yapışkanlı (DSA) film mikroakışkan kanalları oluşturulmuştur. Sperm hareketliliğinin otomatik olarak kaydedilmesini sağlamak için mikro boşaltıcı kanala bir lenssiz şarj kuplaj cihazı (CCD) entegre edilmiştir. Entegre sistem, mikroakışkan bir kanal ile donatılmıştır. Mikro akışkan kanal ortamı, serum eklenmiş yeni insan tübül sıvısı (HTF) ortamı ile önceden doldurulmuştur. Sperm numunesi, kolonun üst kanal girişine pipetle gönderilir. Sperm'in belli bir uzunluktaki kanal sistemlerinden yüzmesi beklenir. Yüzen sperm toplanır ve ICSI için kullanılır. Buna ek olarak, mikroçip kombine bir cihaza (CCD) yerleştirilebildiğinden, sperm gölgesi hareketini izleyerek de kayıt yapılabilir (Şekil 18) (63).

Genel olarak, sperm hazırlama ve seçimin teknik açıdan zor olduğu bilinmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, kullanımı kolay, tekrarlanabilir ve güvenilir olduğu için mikroakışkan cihazın avantajlı olduğu düşünülmektedir. (64).



**Şekil 18:** Mikroakışkan kanal sistemi (65)

### 2.5.2. TESTİKÜLER SPERM ASPİRASYONU (TESA)

Testis sperminin perkütan aspirasyonu. Mikro cerrahi ile sperm bulma şansı yüksek olan hastalarda tercih edilir. Nonobstrüktif azospermide de tercih edilebilir. TESA, invaziv sperm elde etmenin en iyi yöntemidir. 10-20 kez 23 yüksek emme kuvveti ile iğne ile testise girilmektedir. Hematom, ağrı, testis ve epididimal hasarın sık görülen komplikasyonlarıdır. Testisteki spermatozoa içeren bölgeleri tespit etmek için tanısal haritalama yöntemi olarak kullanılabilir (66).

## 2.6. ICSI PROSEDÜRÜ

ICSI; spermin doğrudan oositin sitoplazmasına invaziv olarak yerleştirildiği metottur. ICSI yönteminin kaliteliteli sperm ve oosit varlığında diğer yöntemlere göre başarı oranı daha fazladır (67).

ICSI'de polivinilprolidon (PVP), viskozite özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılır. PVP, spermin hareket yeteneğini azaltarak yavaşlamasını sağlar, böylece yakalanarak kuyruk kırma işlemi doğru şekilde gerçekleştirilir. PVP'nin yoğunluğundan dolayı mikroenjeksiyon sırasında sperm kontrollü bir şekilde oosit sitoplazmasına enjekte edilebilir (68).

### 2.6.1. Temel Unsurlar

- Enjeksiyon pipeti yardımıyla sperm boynunun hemen altından kuyruk kısmı kırılarak sperm hareketsizleştirilir.
- Sperm, oosit sitoplazmasının içine enjekte edilir. Enjeksiyon pipetiyle birlikte dışarı çıkmamasına dikkat edilir.
- Spermin perivitellin boşluğa atılmasını engellemek için, az miktarda sitoplazma içeri çekilerek zona pellucida'nın kırılması sağlanır.
- ICSI için kullanılan PVP hacmi en aza indirgenmelidir (68).

### 2.6.2. Uygulama

1. ICSI damlacığının merkezine 1-2 µL sperm süspansiyonu yerleştirilir. Spermin, damlacığın dış çevresine göçünü kolaylaştırmak için ısıtıcı tabla üzerinde birkaç dakika ısıtılır.
2. Spermin enjeksiyon pipeti içerisine yapışmasını engellemek için ICSI için hazırlanan PVP ile doldurulur.
3. Soyulmuş ve hazırlanmış oositler, G-MOPS™/G-MOPS™ PLUS ya da G-GAMETE™ damlacıklarına yerleştirilir.



4. Enjeksiyon pipeti kullanılarak seçilen sperm kuyruğu kırılır ve bir sperm hareketsizleştirilir. Spermin boyun bölgesi hasar görmemelidir. Çünkü bu bölgede kromozomların göçünü sağlayan entrioller hayati önem taşımaktadır. Hareketsiz hale gelen sperm aspire edilir.
5. Oosit damlacına odaklanılır ve oositi sabitlemek amacıyla bir holding pipet kullanılır. Kutup cisimciği saat 7 yada 1 yönünde olacak şekilde oosit konumlandırılır. Sperm, saat 4 yönünde olabilecek en az miktarda PVP ile oosite enjekte edilmelidir. Böylece oosit en az zararla ICSI işlemine tabi tutulmuş olur.
6. Tüm oositlere sperm enjekte edildikten sonra birkaç yıkama damlacığında yıkayıp, gece boyu kültürlemek için kültür sistemlerine yerleştirilir.
7. Ertesi gün oositler 2 PN ve 2 kutup cisimciğinin durumuna göre göre fertilizasyon açısından değerlendirilip, fertilize olanlar yeni bir kültür kabına transfer edilir (68).

## 2.7. FERTİLİZASYON

Fertilizasyon; sperm ve oositin, nükleus ve sitoplazmik organellerinin birleşmesi sonucu yeni birey meydana getirmesindeki olaylar bütünüdür (69).

Bir oositin fertilize olabilmesi için birinci kutup cisimciğini atması gerekirken, spermatozoanın ise kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarını tamamlaması gerekir (70).

Fertilizasyon üç temel aşamada gerçekleşmektedir;

1. Spermatozoanın oosite tutunması
2. Gametlerin birleşmesi ve oositin aktivasyonu
3. Spermatozoa nükleusunun dekonpensasyonu ve pronükleus oluşumu (70).

## 2.8. EMBRİYO GELİŞİMİ VE SINIFLANDIRILMASI

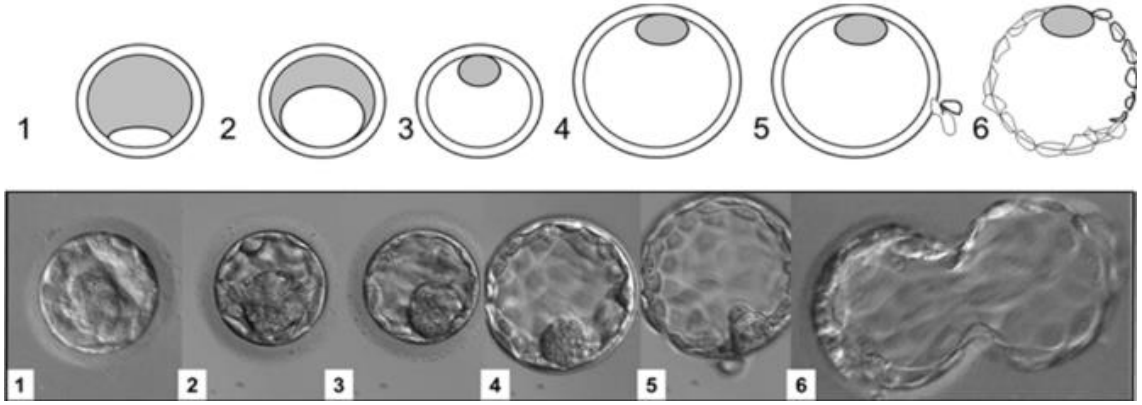
### 2.8.1. Temel Unsurlar

- Zigot morfolojisi; blastokist gelişimi, implantasyon ve gebelik ile doğru orantılıdır.
- Skorlama sistemi, zigotun gelişim kapasitesini değerlendirmek için kullanılmaktadır ve iki pronükleusun (2PN) morfolojisi temeline dayanmaktadır.
- Pronükleer Skorlama; 3. Gün veya blastosist skorlama ile ilişkilendirilebilir (68).

### 2.8.2. Blastokist Değerlendirilmesi

#### 2.8.2.1. Genişleme Derecesi ve Hatching Durumu

1. **Erken Blastosist;** blastosel kavitesi, embriyo hacminin yarısından daha az olan embriyolar.
2. **Blastosist;** blastosel kavitesi, embriyo hacminin yarısından büyük ya da yarısına eşit olan embriyolar.
3. **Tam Blastosist;** blastosist kavitesi, embriyo iç hacmini tamamen dolduran embriyolar.
4. **Ekspanse Blastosist;** blastosist hacmi artık erken embriyonun hacminden daha büyük ve zonası incelmış olan embriyolar.
5. **Hatching Blastosist;** trofektoderm hücreleri, zona yoluyla çıkıntı yapmaya başlayan embriyolar.
6. **Full Hatching Blastosist;** zonadan tamamen çıkmış olan embriyolar (Şekil 19) (68).



**Şekil 19:** Embriyo genişleme ve hatching durumu (71)

Gardner ve Schoolcraft, blastosist genişlemesi ile ilgili olarak blastosistlere 1 ile 6 arasında sayısal puan vermiştir.

### 2.8.2.2. İç Hücre Kütle (ICM) Sınıflandırması

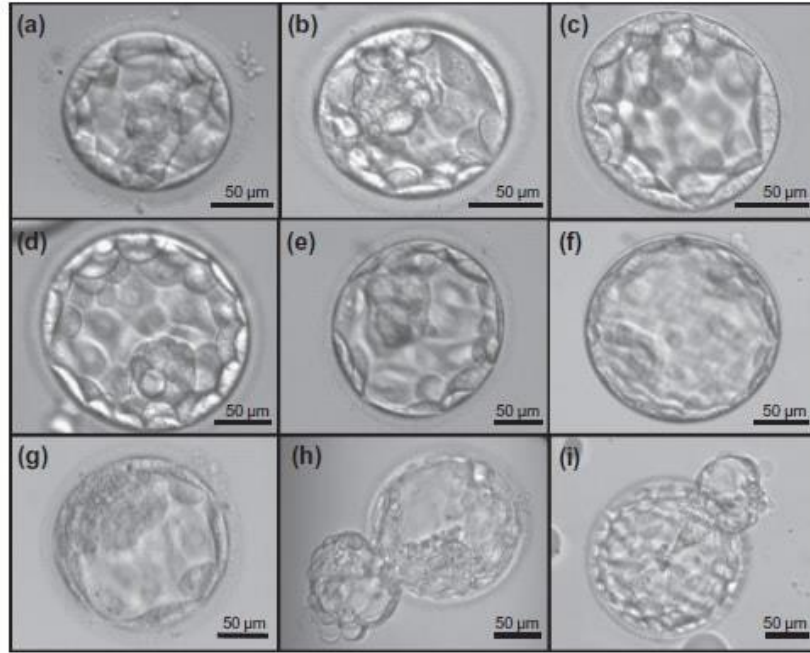
- A. Sıkı biçimde gruplanmış, çok sayıda hücre
- B. Gevşek biçimde gruplanmış, birkaç hücre
- C. Çok az sayıda hücre

### 2.8.2.3. Trofektoderm Sınıflandırması

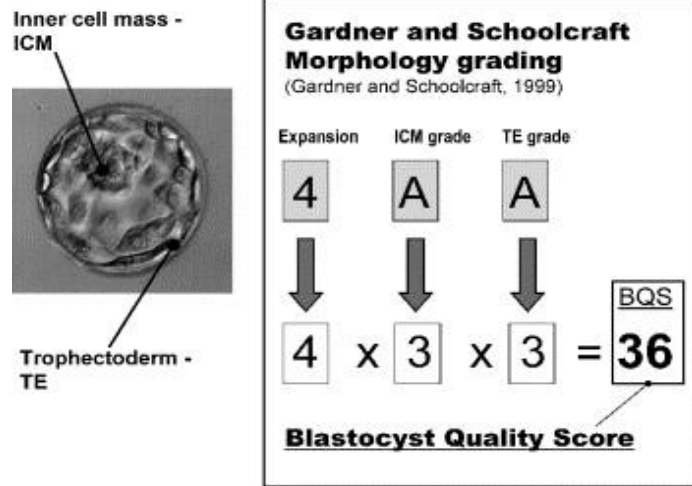
- A. Birbirine bağlı bir epitelyum oluşturan çok sayıda hücre
- B. Gevşek bir epitelyum oluşturan az sayıda hücre
- C. Çok az sayıda hücre (68).

**Tablo 4:** Blastosist sınıflandırma tablosu (68)

Genişleme Derecesi / Hatching Durumu	İç Hücre Kütle (ICM)			Trofektoderm		
	A	B	C	A	B	C
3: Tam Blastosist						
4: Ekspense Blastosist						
5: Hatching Blastosist						
6: Full Hatching Blastosist						

**Şekil 20:** Blastosist sınıflandırma örnekleri (72)

(a) 3AA; (b); 3AB; (c) 3BA; (d) 4AA; (e) 4AB; (f) 4BA; (g) 4CC; (h) 5AA; (i) 5CA.



**Şekil 21:** Gardner ve Schoolcraft'ın BKS (blastosist kalite skorum) sistemi (73)

Blastosist morfolojisinin sayısal BKS ye dönüşüm yöntemi (Şekil 21). BKS, 1'den 6'ya kadar olan genişleme derecesinin yanı sıra ICM ve TE derecelerine göre bir sınıflama sistemidir. Bu sisteme göre A=3, B=2 ve C=1 olarak sayısal ifadelerle temsil edilmiştir. Bu durumda zaten sayısal değerde olan genişleme derecesi ile ICM ve TE sayısal değerlere dönüştürülür, bu üç sayının çarpımı ise bize BKS'yi verecektir (73).

**Tablo 5:** Gardner ve Schoolcraft'ın blastosist kalite skoru (73)

Gardner ve Schoolcraft'ın blastosist kalite skoru					
Morfoloji	BKS	Morfoloji	BKS	Morfoloji	BKS
1AA	9	3AA	27	5AA	45
1AB/1BA	6	3AB/3BA	18	5AB/5BA	30
1BB	4	3BB	12	5BB	20
1AC/1CA	3	3AC/3CA	9	5AC/5CA	15
1BC/1CB	2	3BC/3CB	6	5BC/5CB	10
1CC	1	3CC	3	5CC	5
2AA	18	4AA	36	6AA	54
2AB/2BA	12	4AB/4BA	24	6AB/6BA	36
2BB	8	4BB	16	6BB	24
2AC/2CA	6	4AC/4CA	12	6AC/6CA	18
2BC/2CB	4	4BC/4CB	8	6BC/6CB	12
2CC	2	4CC	4	6CC	6

### 3. METRYAL VE METOD

Araştırmamız 2016-2017 yılları arasında Centrum Tüp Bebek Kliniğinde retrospektif olarak yapılmıştır.

Araştırma gruplarımız, TESA ve microchip teknikleri ile DNA fragmantasyonuna uğramamış sperm elde edilme amacı güdülerek ICSI işlemine tabi tutulan hastalardan oluşturulmuştur. Araştırmamız bu iki tekniği karşılaştırmaya yönelik olduğu için TESA ve microchip teknikleri embriyo gelişimi ve gebelik sonuçlarına göre karşılaştırılmıştır.

#### 3.1. ARAŞTIRMAYA DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

Bu araştırma 2012-2017 yılları arasında Centrum Tüp Bebek Kliniği'nde yapılan geriye dönük taramalardan elde edilmiştir. Hasta grubu, tüp bebek tedavisine başlayan ve Sperm DNA Fragmantasyon İndeksi %30 ve üzerinde olan hastalardan oluşturulmuştur.

Araştırmamız, hastaların demografik özelliklerine bakılmaksızın homojen bir şekilde yürütülmüştür. Hasta grupları için araştırmaya dahil edilmesindeki temel kriter, DFI değerinin %30 ve üzerinde olmasıdır. Diğer kriterler ise; varikosel, İnmemiş testis, testis tümörü gibi herhangi bir rahatsızlığının olmamasıdır. Hasta gruplarının 20 - 44 yaş aralığında olmasıdır. Toluidin Mavisi 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 araştırmaya katılmıştır. Hastalardan ortalama 300 sperm sayılmasına dikkat edilmiştir.

Kadınlarda ise dahil edilme kriterleri olarak AMH seviyesi 1 - 7 aralığında olması, myom ya da herhangi bir tubal faktör bozukluğunun olmaması yaş aralığının 20 – 44 aralığında olması olarak belirlenmiştir.

### 3.2. YÖNTEM

Sperm DNA fragmantasyonu %30'un üzerinde olan hastaların bir kısmının tedavisinde TESA, bir kısmının tedavisinde de microchip kullanılmıştır. Tedavi günü örnek vermeye gelen hastaların tümüne DNA fragmantasyon tayini yapılmak üzere öncelikle makler kamerasında sperm sayılarına bakılmıştır. Sperm sayısı 5 milyon/ml' den yüksek olan hastaların DNA fragmantasyonuna bakılmıştır.

Bu araştırmada hastaların DNA fragmantasyonu tayini için toluidin mavisi boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu teknikle hazırlanan preparatlar kontrast ışık mikroskopunda incelenerek DNA fragmantasyon oranı belirlenmiştir. Bu hastalar arasında %30 ve üzeri olanların DNA Fragmantasyon verileri araştırmada karşılaştırılmak üzere toplanarak TESA uygulanan hastalar ve microchip uygulanan hastalar olmak üzere iki paralel grup oluşturulmuştur. Bu hastaların tedavi sonucu embriyo gelişimleri ve gebelik takipleri karşılaştırılmıştır.

Araştırma grubuna alınan hastaların embriyo gelişimi için istatistikle bir sonuç almak için embriyo kaliteleri üç grupta sayısal olarak sınıflandırılmıştır. 0: kötü kalite, 1: orta kalite ve 2: kaliteli olarak nitelendirilmiştir. Bu değerlendirmede embriyo günü beklenen kaliteye göre Gardner ve Schoolcraft'ın BKS sistemi üzerinden sınıflandırma yapılmıştır. BKS 24 ve üzeri olanlar kaliteli yani "2", 16 ve 24 e kadar olanlar orta kalitede yani "1", 16'dan daha düşük değerdeki embriyolar ise kötü kalite yani "0" olarak gruplandırılmıştır. Embriyolar skorlandıktan sonra her hasta için embyoların aritmetik ortalaması alınarak kaydedilmiştir.

#### **Araç Gereçler**

Aseton, %96 ekstra saf etanol, toluidin mavisi, hidroklorik asit (HCl), sitrik asit, disodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), distile su, lam – lamel, kontrast ışık mikroskobu, immersiyon yağı, 6 adet şale.

### 3.2.1. TOLUIDİN MAVİSİ İLE SPERM DNA FRAGMENTASYON TAYİNİ

#### 3.2.1.1. Toluidin Mavisi Protokolü ve Boya Malzemesi Hazırlanması

##### **Toluidin Mavisi:**

Formül:  $C_{15}H_{16}ClN_3S$

Molekül ağırlığı: 305.824 g/mol (47)

**Toluidin Mavisi Hazırlanması:** %5 oran sağlayacak biçimde 47,5 ml Mcilvaine tampon ile 2,5 ml toluidin mavisi homojenize edilir. Oda sıcaklığında saklanır. (74)

**Mcilvaine Tamponunun Hazırlanması:** 500 ml distile su, 14,2 g  $Na_2HPO_4$  (disodyum fosfat) ve 9,6 g sitrik asit ile homojenize edilir (pH3,5) (75).

**Fiksatif Hazırlanması:** %96 ekstra saf etanol ile aseton 1/1 oranında şale içerisinde homojenize edilir. +4 derecede saklanır. (75)

**HCl Tamponu Hazırlanması:** 50ml Distile Su ile 5 ml HCl Şale içerisinde homojenize edilir. +4 derecede saklanır.

**Distile Su:** Şale içerisine lamel seviyesince distile su eklenir.

#### 3.2.1.2. Toluidine Blue Boyama Yöntemi Basamakları

1. Semen örneği 30 - 60 dakika arası likefaksiyon için 37°C'lik inkübatörde bekletilir. Likefiye olan örnek, laminar flow içerisinde lam üzerine pastör pipeti yardımı ile 1 damla alınarak damlatılır. Lamel ile lamel arasında 45°C'lik açı oluşturulduktan sonra yayma yapılır.
2. Lam 37°C'de kurutulur.
3. Kuruyan preparattaki spermler yapışması için +4°C'de saklanan fiksatif şalesine atılır ve 30 dk burada tutulur.



4. Fiksatiften çıkarılan örnek +4°C'de muhafaza edilen HCl'de 5 dk bekletilir. Bu aşama toluidin mavisi aşaması için bir hazırlıktır. Toluidin mavisi, asidik ortama mavi rengini kolayca verebilir.
5. HCl'den çıkan örnek arındırılmak üzere 3 adet distile suda ikişer dakika bekletilir.
6. Örnek boyanmak üzere toluidin mavisi solüsyonunda 5dk bekletilir. Mavi boya genomik olarak bütünlüğünü kaybetmiş spermlerin DNA'sındaki kırıklara yerleşir.
7. Son olarak boyadan alınan preparat 1-2 saniye boyunca distile suya bırakılır ve lamın yüzeyindeki toluidin mavisinden arındırılır.
8. Preparatın oda sıcaklığında havada kuruması beklenir.
9. Kuruyan preparat 100x'lik objektifte incelenmek üzere mikroskoba yerleştirilir.
10. Koyu mavi renkte görülen spermler DNA bütünlüğünü kaybetmiş hasarlı sperm olarak nitelendirilir. Açık mavi renkteki spermler ise DNA bütünlüğünü koruyan hasarsız sperm olarak nitelendirilir.
11. Preparattan ortalama 300 sperm sayılır ve ortalaması yüzde olarak belirlenir. (75)

### 3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu araştırmanın istatistiksel analizi SPSS v:24.0 kullanılarak yapılmıştır. Gruplar frekans analizi ile ortaya konmuş olup, gruplar arasında nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grupların sonuçlarla olan ilişkisini saptamak için ise Chi-Square testi kullanıldı.  $P < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

#### 4. BULGULAR

Bu retrospektif araştırmaya dahil edilen olgular, 2016 ve 2017 yılları arasında Centrum Tüp Bebek Merkezi'ne erkek infertilitesi Őikayeti ile başvuran hastalar arasından araştırmaya dahil edilme kriterlerine göre seçilmiştir. Sperm DNA hasarını belirlemek amacıyla toluidin mavisi boyama yöntemi uygulanmış olup, her olgu için ortalama 300 sperm sayılmıştır. Sperm DNA hasarı %30 ve uzeri olan erkek hastalara TESA veya microchip işlemleri uygulanmıştır. TESA uygulanan (n:40, %50) ve microchip uygulanan (n:40, %50) hastalar iki gruba ayrılmıştır. Embriyo gelişimi ve gebelik sonuçları kaydedilmiştir. Kadın yaşı 20-44 aralığında tutulmuş olup, embriyo gelişimi ve gebelik oranlarında erkek yaşı baz alınmamıştır.

Gelişen blastosistler Gardner'ın tanımlamış olduğu i hücre kitlesi ile TE hücrelerinin morfolojisi ile gelişen blastosistin ekspansiyon ve fragmantasyon derecesine göre değerlendirilmiştir (Tablo 6).

**Tablo 6:** TESA ve microchip gruplarında embriyo gelişimi karşılaştırılması

Embriyo Gelişimi							
Uygulanan İşlem	N	Mean	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum	P
TESA	40	1,5924	0,34618	1,6000	0,75	2,00	0,379
Microchip	40	1,6427	0,35610	1,6870	0,33	2,00	
Total	80	1,6175	0,34987	1,6425	0,33	2,00	

*Mann-Whitney U test*

Embriyo gelişimi için bu sonuçlara göre TESA ve microchip tekniklerinin embriyo gelişimine olan etkisi karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p>0,05$ ), (Tablo 6).

## Gebelik Tayini

Embriyo transferinden 12 gün sonra kanda belirlenen  $\geq 15$  mIU/mL  $\beta$ -hCG değeri ve bundan 2 gün sonra tekrarlanan  $\beta$ -hCG testinde en az iki katına çıkmış olan  $\beta$ -hCG değeri, başarılı gebelik olarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 7:** TESA ve microchip gruplarında gebelik sonucu karşılaştırılması

Uygulanan İşlem	Gebelik Sonucu		Total	P
	Pozitif	Negatif		
TESA	19	17	36	0,264
	%52,8	%47,2	%100,0	
Microchip	16	24	40	
	%40,0	%60,0	%100,0	
Toplam	35	41	76	
	%46,1	%53,9	%100,0	

*Chi-Square Tests*

TESA ve microchip tekniklerinin uygulandığı iki ayrı grubun gebelik sonuçları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p > 0.05$ ), (Tablo 7).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

TESA epididime iğne ile invaziv girişim yapılarak sperm elde etme yöntemidir. TESA; IVF ve ICSI için diğer yöntemlere göre sperm elde etme başarısı yönünden ortalamayı yakalamıştır. Bazı merkezlerde ilk seçenek olarak kullanılmaktadır çünkü doku hasarının ve doku kaybı riskinin az olması nedeniyle tercih edilen minimal invaziv girişimdir (76,77).

Asghar W. ve arkadaşları swim-up yöntemi ile microchip yöntemini DNA fragmentasyon oranı ve ROS açısından değerlendirmişlerdir. DNA fragmentasyon incelemesi açısından kullanılan chip metaryelinin kanal boyu uzunluğu 8 µm olarak belirlendiğinde fragmente DNA'ya sahip sperm hücrelerinin elenerek geride kaldığını gözlemlemişlerdir. Swim-up yöntemi kullanıldığında ROS ve DNA fragmentasyon oranları anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır. Bu çalışmaya göre microchip yöntemi, santrifüzsüz motil ve morfolojik olarak normal spermler elde edilmesi açısından swim-up yöntemine alternatif bir teknik olarak sunulmuştur (65).

Wang S. ve arkadaşları swim-up ve microchip yöntemleriyle ROS ve DNA fragmentasyon oranlarını karşılaştırmak üzere çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, microchip yönteminin swim-up yöntemine kıyasla santrifüj kullanmadan motil ve morfolojik olarak normal spermlerin seçilmesi ve fragmente DNA ya sahip hücrelerin ayıklanması açısından daha verimli bulmuşlardır (63).

Biz de yapmış olduğumuz araştırmada, DNA fragmentasyon oranı %30 ve üzeri olan hasta gruplarından microchip yöntemi uygulananları tespit ettik ve bu hastaların embriyo gelişim ve gebelik sonuçlarını araştırdık. Microchip uygulanan 40 infertil erkekte yapmış olduğumuz incelemelerde embriyo gelişimini 0, 1 ve 2 olarak gruplandırdığımız embriyoların gelişim ortalaması  $1,6427 \pm 0,35610$  olarak saptanmıştır. TESA uygulanan hastalarla karşılaştırdığımızda ise istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ( $p=0,379$ ). Yani embriyo gelişim hızı ve kalitesini bu skala çerçevesinde düşündüğümüzde ortalaması 1,5 ve üzeri olan değerleri kaliteli olarak sınıflandırabiliriz. Bu nedenle ortalama  $1,6427 > 1,5$  olduğundan microchip uygulanan hastaların embriyoları kalitelidir diyebiliriz. Aynı şekilde gebelik oranı ise %40 pozitif olduğu görülmüştür. TESA uygulanan hastaların %52,8'lik oranına karşılık istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ( $p=0,264$ ).

Esteves S.C. ve arkadaşları DNA fragmentasyon oranı %30 olan 172 hastayı çalışmaya dahil etti. 81 hastanın ICSI' sinde testis spermi kullanıldı. 91 hastanın ise ejakülat spermi kullanıldı. Klinik gebelik oranları; testis spermlerinde %51,9, ejakülat spermlerinde %40,2 olarak belirlemişlerdir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız kabul edilmiştir (78).

Al-Malki AH. ve arkadaşları asthenozoospermi olan hastalarda TESA yöntemi ile elde ettikleri spermler ile ICSI sonucu gebelik oranlarını değerlendirmişlerdir. Verilere göre şiddetli asthenozoospermi olan çiftlerde gebelik oranları, TESA-ICSI ve ejakülat-ICSI grupları arasında anlamlı bir fark olmadığını öne sürmüşlerdir (79).

Biz de yapmış olduğumuz araştırmada DNA fragmantasyonu %30 ve üzeri olan hasta gruplarından TESA yöntemi uygulananları tesbit ettik ve bu grubun gebelik sonuçlarını araştırdık. TESA uygulanan 40 infertil erkekte yapmış olduğumuz araştırmada embriyo gelişim ortalaması  $1,5924 \pm 0,34618$  olarak saptanmıştır. Microchip uygulanan hastalarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $p=0,379$ ). Bu sonuca göre kalite yönünden ortalama  $1,5924 > 1,5$  olduğundan TESA uygulanan hastaların embriyoları kalitelidir diyebiliriz. TESA grubunun gebelik oranı ise % 52,8 pozitif olduğu tespit edilmiştir. Microchip uygulanan hasta grubumuzla gebelik sonuçları karşılaştırıldığında %40'lık orana karşılık aralarında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ( $p=0,264$ )

Bu araştırmada 40 microchip ve 40 TESA uygulanan hastalar birbirleri ile karşılaştırılarak embriyo gelişimleri ve gebelik sonuçları incelenmiştir. TESA ve microchip uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Araştırmanın daha geniş hasta gruplarıyla yapılacak olan yeni çalışmaların yararlı olabileceği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Simpson, Joe Leigh. Disorders of gonads and internal reproductive ducts. *Principle and Practice of Medical Genetics*. New York: Churchill Livingstone 1990;1599.
2. Mau-Holzmann U. A. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenetic and Genome Research*. 2005;111(3-4):317-336.
3. Ferlin A, Garolla A, Foresta C. Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities. *Cytogenetic and genome research*. 2005;111: 310-316.
4. Koyuncu H. Methods for the determination of sperm DNA damage. *Turk Urol Sem*. 2011; 2:18-23.
5. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human reproduction*. 2002;17(10):2665-2672.
6. Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, et al. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. *Journal of andrology*. 2006;27(1):112-120.
7. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 2000;15(4):830-839.

8. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertility and sterility*. 2003;80(6):1420-1430.
9. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of reproduction*. 1997;56(3):602-607.
10. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Sakkas D, Bianchi U. A cytochemical study of mature mouse spermatozoa after C-banding treatment. *European journal of histochemistry: EJH*. 1993;37(2):155-159.
11. Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Turk Urol Sem*. 2011;2:11-7.
12. Kadioğlu A, Kendirci M, Aktan G, Yaman Ö, Çayan S. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 2010; WHO Laboratuvar El Kitabı: İnsan Semeni ve Sperm- Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi. 5. Baskı, Çeviri Editörü: Günalp S. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2011.
13. Mack S, Bhattacharyya AK, Joyce C, Van der Ven H, Zaneveld LJD. Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol Reprod*. 1983;28(5):1032-42.
14. Spermatogenesis [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 17 Mayıs 2018] Erişim adresi:  
<http://veterinerhistoloji.atauni.edu.tr/dersnot/Spermatogenezis.pdf>



15. Ross H.M, Kaye G, Pawlina W. Histology, a text and atlas, 4th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003.
16. Gartner LP, Hiatt JL. Integument. *Color textbook of histology*. WB Saunders Company, Philadelphia. 1997.
17. Hatiboğlu Y. Toluidin Mavisi, Anilin Mavisi ve Sperm Kromatin Dispersiyon Testleri ile Sperm DNA Hasar Oranlarının Kıyaslanması [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: İst. Bilim Üniversitesi; 2014
18. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Essential Cell Biology*. 1983; Hücrenin Moleküler Biyolojisi. 4. Baskı, Çeviren: Altungöz O, Akçalı C, Çırakoğlu B ve ark. Ankara: TÜBA yayınları, 2008.
19. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 3rd ed. Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1997;493-498.
20. Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, ve ark. Erkek reproduktif sistem hastalıkları ve tedavisi. *Kendirci M, Miroğlu C. Varikosel patofizyolojisi*. İstanbul: Türk Androloji Derneği Yayınları. 2004;427-46.
21. Steven Ward W. Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1993;48(6):1193-1201.
22. De Kretser DM, Loveland KL, Meinhardt A, Simorangkir D, Wreford N. Spermatogenesis. *Human reproduction*. 1998;13(suppl\_1):1-8.

23. Oehninger SC, Kruger TF. Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi. Çeviri Editörü: Doç. Dr. Mete Kilciler. İstanbul; Habitat Matbaası ISBN: 978-975-00515-9-3, 2009;1-240.
24. Hassa H. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuar Uygulamaları. 1. Baskı. Eskişehir, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları; 2003:127-165.
25. Elder K, Dale B. In-Vitro Fertilization. 2010; İn Vitro Fertilizasyon. 3. Baskı, Çeviri Editörü: İrez T. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2014.
26. Kierszenbaum AL. [Histology and Cell Biology](#). 2002; Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. 1. baskı, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006.
27. Oğuz Y. Sperm Hazırlama Yöntemi Olarak "Swim-Up Ve Gradient" Tekniklerinin Dna Fragmantasyonuna Etkilerinin Karşılaştırılması [Uzmanlık Tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2013
28. Doğan Ş. Seminal Plazma Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) Sperm DNA Fragmantasyonu ve Apoptozu Sürecinde İnfertiliteye Olan Etkisinin Değerlendirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2008
29. Avcı B. Farklı Fiksasyon Protokolleri ile Sperm Kromatin Kondansasyon Anomalisinin Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2006;32(2):55-59.

30. Dinç T. Spermatozoaların Miktar, Biçim ve Hareket Bakımından Normal Olan Erkeklerde Sperm Dondurma - Çözme İşleminde DNA Hasar Tayini [Yüksek Lisans Tezi]. İstanbul: Maltepe Üniversitesi; 2015
31. Koyuncu H. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri. *Turk Urol Sem.* 2011;2:18-23.
32. Aksoy E, Aktan TM, Duman S, Dursunoğlu D, Cüce G. Farklı semen parametrelerinde ışık mikroskobu düzeyinde spermatozoa morfolojisi ve nükleer kondansasyon değerlendirmesi. *Zeynep Kamil Tıp Bülteni*, 2009;40(3): 111-117.
33. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility*. 2010;93(4):1027-1036.
34. Tesarik, J., Mendoza, C., & Greco, E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*. 2002;17(1):184-189.
35. Høst E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 2000;79(7):559-563.
36. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407(6805):770.

37. Brooks NL. *Apoptotic markers in ejaculated human spermatozoa* (Doctoral dissertation, University of the Western Cape). 2005.
38. Singh NP, Muller CH, Berger RE. DNA double strand breaks and apoptosis in human sperm: effects of donor age. *Fertility and Sterility*. 2002;78:S69-S70.
39. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human reproduction*. 2002;17(10):2665-2672.
40. Diplock A. Healthy lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. *ILSI Europe concise monograph series*. 1998;59.
41. Lamirande ED, Gagnon C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *International Journal of Andrology*. 1993;16(1):21-25.
42. Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;3(1):67.
43. Sikka SC. Andrology lab corner: Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of andrology*. 2004;25(1):5-18.
44. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001;122(4):497-506.

45. Nabi A, Khalili MA, Halvaei I, Ghasemzadeh J, Zare, E. Seminal bacterial contaminations: Probable factor in unexplained recurrent pregnancy loss. *Iranian journal of reproductive medicine*. 2013;11(11):925.
46. Mangoli E, Talebi AR, Anvari M, Porentezari M. Effects of Experimentally-Induced Diabetes on Sperm Parameters and Chromatin Quality in Mice. *Iran J Reprod Med*. 2013;11(1):53-60.
47. Toluidine Blue [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 22 Mayıs 2018]. Erişim adresi:  
[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Toluidine Blue O#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Toluidine%20Blue%20O#section=Top)
48. Erenpreiss J, Jepson K, Giwercman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Human Reproduction*. 2004;19(10):2277-2282.
49. Lakpour N, Mahfouz RZ, Akhondi MM, Agarwal A, Kharrazi H, Zeraati H, et al. Relationship of seminal plasma antioxidants and serum male hormones with sperm chromatin status in male factor infertility. *Systems biology in reproductive medicine*. 2012;58(5):236-244.
50. Agarwal A, Sharma R, Ahmad G. Sperm chromatin assessment. In *Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Fifth Edition*. CRC Press. 2017;65-87.

51. Aniline Blue [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 22 Mayıs 2018]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/131675892#section=Top>
52. Irez, T., et al. "Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques." *Andrologia* 47.4 (2015): 438-447.
53. Aydin MS, Senturk GE, Ercan F. Cryopreservation increases DNA fragmentation in spermatozoa of smokers. *Acta histochemica*. 2013;115(4):394-400.
54. Jamur M C, Oliver C. (2010). Permeabilization of cell membranes. In *Immunocytochemical methods and protocols*. Humana Press. 2010;63-66
55. Ghasemzadeh J, Talebi AR, Khalili MA, Fesahat F, Halvaei I, Nabi A, et al. Sperm parameters, protamine deficiency, and apoptosis in total globozoospermia. *Iranian journal of reproductive medicine* 2015;13(8):495.
56. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Human Reproduction*. 2000;15(5):1112-1116.
57. Cebesoy FB, Ünlü C, Aydos K, Baltacı V. The relationship between sperm morphology-acridine orange staining and fertilization rate-embryo quality in ICSI. *J Turkish German Gynecol Assoc*. 2006;7(2):110-114.

58. Andrology Research Acridine Orange [Internet]. 2018 [Erişim Tarihi 22 Mayıs 2018]. Erişim adresi:

<https://medicine.utah.edu/surgery/andrology/research/gallery.php>

59. elik Seren Askorbik Asit, Glutasyon Ve Taurin Kompleksinin Sperm Kriyoprezervasyonuna Motilite Ve Dna Fragmantasyonu Açısından Etkisi [Yüksek Lisans Tezi] İstanbul: İst. Maltepe Üniversitesi; 2016

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

61. Brown KH, Schultz IR, Cloud JG, Nagler JJ. Aneuploid sperm formation in rainbow trout exposed to the environmental estrogen 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(50):19786-19791.

62. Esteves SC, Verza S, Sharma RK, Gosálvez J, Agarwal A. (2015). Role and Significance of Sperm Function in Men with Unexplained Infertility. Springer, New York, NY. 2015;91-119.

63. Wang S, Inci F, Demirci U. Assisted Reproductive Microchip Technologies to Improve Infertility. 2015.

64. Zhang X, Khimji I, Gurkan UA, Safaee H, Catalano PN, Keles HO, et al. Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting. *Lab on a Chip*. 2011;11(15):2535-2540.

65. Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, et al. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Advanced healthcare materials*. 2014;3(10):1671-1679.
66. Carpi A, Fabris FGM, Palego P, Di Coscio G, Romani R, Nardini V, et al. Fine-needle and large-needle percutaneous aspiration biopsy of testicles in men with nonobstructive azoospermia: safety and diagnostic performance. *Fertility and sterility*. 2005;83(4):1029-1033.
67. Yagci A. (2013). İn Vitro Fertilizasyon ve İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu İçin Hyaluronik Asit'e Bağlanma İle Sperm Seçme Tekniği. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2013;32(1).
68. Gardner DK. G5 Series™ Embriyo Kültür Medyumları'nın David K. Gardner tarafından önerilen kullanımı. 1. Baskı. Vitrolife AB; 2007.
69. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. *Ankara; Güneş Tıp Kitapevleri*. 2008.
70. Longo FJ. Fertilization, 2nd ed. London: Chapman and Hall; 1997.
71. Blastosist [İnternet]. 2018 [Erişim Tarihi 18 Haziran 2018]. Erişim Adresi: <https://fertilitypedia.org/edu/reproductive-cells/blastocyst>
72. Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJG, Klein BM, et al. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reproductive biomedicine online*. 2013;27(4):353-361.



73. Rehman KS, Bukulmez O, Langley M, Carr BR, Nackley AC, Doody KM, et al. Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertility and sterility*. 2007;87(5):1041-1052.
74. Toluidine Blue Staining of Paraffin Sections Used on Plant Sections [Internet]. Mart 2013 [Erişim Tarihi 11 Haziran 2018]. Erişim Adresi: [https://www.biogeniccolombia.org/uploads/9/3/9/5/9395218/toluidine\\_blue\\_staining\\_of\\_paraffin\\_sections.pdf](https://www.biogeniccolombia.org/uploads/9/3/9/5/9395218/toluidine_blue_staining_of_paraffin_sections.pdf)
75. Erenpreisa J, Erenpreiss J, Freivalds T, Slaidina M, Krampe R, Butikova J, et al. Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry Part A*. 2003;52(1):19-27.
76. Esteves SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian journal of andrology*. 2015;17(3):459.
77. Tournaye H. Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection: which method is to be preferred? *Human Reproduction*. 1999;14(1):71-81.
78. Esteves SC, Sánchez-Martín F, Sánchez-Martín P, Schneider DT, Gosálvez J. Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertility and sterility*. 2015;104(6):1398-1405.
79. Al-Malki AH, Alrabeeah K, Mondou E, Brochu-Lafontaine V, Phillips S, Zini A. Testicular sperm aspiration (TESA) for infertile couples with severe or complete asthenozoospermia. *Andrology*. 2017;5(2):226-231.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Mustafa AKBAYIR  
Doğum Yeri ve Tarihi : KIRŞEHİR / 15.01.1988

### Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK YÜKSEK OKULU HEMŞİRELİK BÖLÜMÜ  
Yüksek Lisans Öğrenimi :  
Bilimsel Faaliyetleri :

### İş Deneyimi

Stajlar : Centrum Tüp Bebek Merkezi  
Projeler :  
Çalıştığı Kurumlar : ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
İBNİ SİNA EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ  
DERİ VE ZÜHREVİ HASTALIKLAR A.B.D.

### İletişim

E-Posta Adresi : mustafaakbayir88@gmail.com




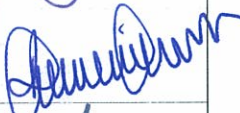



Tarih : 31/08/2018

**UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
**GİR İŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMA**  
**DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ONAY FORMU**

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROJE BAŞVURU TARİH /SAYI▶	26052017-13
	ARAŞTIRMANIN ADI	Sperm DNA Fragmantasyonu %30'un Üzerinde Olan Hastaların Microchip ve TESA Yöntemleriyle Elde Edilen Spermiler İle Yapılan Mikroenjeksiyon İşlemi Sonucu Embriyo Gelişim Hızı, Kalitesi ve Gebelik Sonuçlarının Karşılaştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI	Doç. Dr. A. Hakan HALİLOĞLU
DEĞERLENDİLEN BELGELER	ARAŞTIRMANIN YERİ	X
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	X
	GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU	X
	OLGU RAPOR FORMU	
	ARAŞTIRMANIN BÜTÇESİ	
KARAR BİLGİLERİ	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ (varsa)	
	Değerlendirme amacıyla Ufuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nden gönderilen Fakültemiz Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. A. Hakan HALİLOĞLU'nun sorumluluğunda Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans öğrencisi Mustafa AKBAYIR'ın yüksek lisans tezi olarak tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler 26/05/2017 tarihinde Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırma Değerlendirme Komisyonu'nda çalışma esasları doğrultusunda ve araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş araştırma etiğine uygun tasarlanmış olmasından dolayı onay verilmesine karar verilmiştir.	

**KOMİSYON BİLGİLERİ**

**ÜYELER**

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	E/K	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr. Dikmen ARIBAL	Genel Cerrahi	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ferit PEHLİVAN	Biyofizik	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof.Dr. Halil DEĞERTEKİN	İç Hastalıkları	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Recai PABUÇCU	Kadın Hastalıkları ve Doğum	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Arzu PAMPAL	Çocuk Cerrahisi	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr. Berrin YÜKSEL	Tıbbi Genetik	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Yrd. Doç.Dr. Handan DOĞAN	Patoloji	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Yrd.Doç.Dr. Şahika GÜNER	Tıbbi Farmakoloji	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Ecz. Nilgün SÜER	Eczacı	UFUK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

E/K: Cinsiyeti; \*Araştırmayla ilişki; \*\* Toplantıda bulunma

