



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

**İZOLE TERATOZOOSPERMİ GRUBU HASTALARDA SPERM  
DNA FRAGMENTASYONU VE MATURASYONU SONUÇLARININ  
SPERM MORFOLOJİ SONUCU NORMAL OLAN HASTA GRUBU  
İLE EMBRİYO GELİŞİM VE GEBELİK ORANLARININ  
KARŞILAŞTIRILMASI**

ONAT UĞURLU

DANIŞMAN  
PROF. DR. RECAİ PABUÇCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA 2018





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

**İZOLE TERATOZOOSPERMİ GRUBU HASTALARDA SPERM  
DNA FRAGMENTASYONU VE MATURASYONU SONUÇLARININ  
SPERM MORFOLOJİ SONUCU NORMAL OLAN HASTA GRUBU  
İLE EMBRİYO GELİŞİM VE GEBELİK ORANLARININ  
KARŞILAŞTIRILMASI**

ONAT UĞURLU

DANIŞMAN  
PROF. DR. RECAİ PABUÇCU

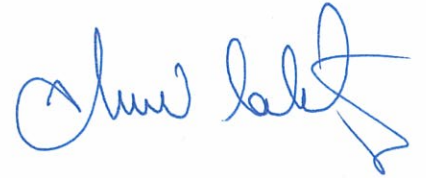
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA 2018

## KABUL VE ONAY

ONAT UĞURLU tarafından hazırlanan "İZOLE TERATOZOOSPERMİ GRUBU HASTALARDA SPERM DNA FRAGMENTASYONU VE MATURASYONU SONUÇLARININ SPERM MORFOLOJİ SONUCU NORMAL OLAN HASTA GRUBU İLE EMBRİYO GELİŞİM VE GEBELİK ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI" başlıklı bu çalışma, 31/08/2018 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tezli Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Başkan : DOÇ. DR. AHMET HAKAN HALİLOĞLU



Danışman : PROF. DR. RECAİ PABUÇCU



Üye : DOÇ.DR İSKENDER SİNAN ÖZKAVUKCU



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Enstitü Müdürü

PROF. DR. BİLGE ONARLIOĞLU



## BİLDİRİM

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

( ) Tezimin/Raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

( ) Tezim/Raporum sadece Ufuk Üniversitesi yerleşkelerinden erişime açılabilir.

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

[Tarih ve İmza]

[Öğrencinin Adı Soyadı]

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi ve tez hazırladığım dönemde bilgi,birikim ve tecrübesiyle bana her daim yol gösteren, mesleki ve etik olgulara yaklaşımı, araştırmacı kişiliğiyle kendisini her zaman örnek alacağım değerli **PROF.DR. RECAİ PABUÇCU** hocama,

Tez araştırmamda hiçbir desteğini esirgemeyen değerli **MSc. Bio. SEMRA SERTYEL**'e,

Tezi hazırladığım süre boyunca bana manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürü borç bilirim.



## ÖZET

UĞURLU Onat, İzole Teratozoospermi Grubu Hastalarda Sperm DNA Fragmantasyonu Ve Maturasyonu Sonuçlarının Sperm Morfoloji Sonucu Normal Olan Hasta Grubu İle Embriyo Gelişim Ve Gebelik Oranlarının Karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2018

Birçok araştırma erkek infertilitesi ve gebelik başarısızlığının normal olmayan sperm morfolojisi ile ilişkili olduğunu saptamıştır. Öte yandan sperm DNA hasarı sadece infertil veya subfertil hastalarla sınırlı değil, sperm morfolojisi normal olan hastalarla da ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Yayınlanan pek çok yazıda ICSI ile sperm morfolojisi arasında bir ilişki bulunamamıştır. Sperm morfolojisinin sperm DNA'sını etkileyebildiğine dair araştırmalar mevcuttur. Paternal etkinin embriyo gelişim sürecindeki gen ekspresyonunun hangi aşamasında devreye girdiği, bu hasarlı DNA'nın embriyoyu hangi gelişim aşamalarında etkilediği araştırılmak istenmektedir. Bu hasarlı sperm DNA'sının sperm DNA fragmentasyon testiyle tespit edilip, normozoospermi ve izole teratozoospermi grubu hastalarda anlamlı bir sonuç vererek değişip değişmediği incelenecektir. Sperm DNA fragmentasyon parametresinin izole teratozoospermi hasta grupları üzerine prediktif sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz. İzole teratozoospermi hasta gruplarında normal morfolojili sperme rastlanmadığı için spermatogenesis süreci boyunca kromatin modellemesindeki değişiklikler hep aynı ve hatalı düzeyde gerçekleşmiş olmalıdır. Bunun bize izole teratozoospermi hasta grubu için prediktif sonuçlar verip vermediğini normal hasta gruplarıyla karşılaştırarak araştırılacaktır.

Sperm DNA'sının izole teratozoospermi hasta grubunda daha iyi kromatin kondensasyonu göstermesi, sadece uygulanacak yardımcı üreme tekniği yönteminin seçilmesi açısından değil, tanısal ve tedavi edici bakış açısından da önemlidir. Paternal gen ifadesinin embriyonun erken ve geç dönemlerinde gerçekleştiğini ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: sperm DNA fragmentasyonu, sperm morfolojisi, embriyo gelişimi, gebelik oranları

## ABSTRACT

UĞURLU Onat, Comparing The Result Of Sperm DNA Fragmentation And Maturation In The Isolated Group Of Patients With Teratozoospermia And The Group Of Patients With Normal Sperm Morphology Results In Terms Of Embryo Development And Pregnancy Rates, Master's Thesis, Ankara 2018

Many researches suggest that male infertility and pregnancy failure have something to do with abnormal sperm morphology. On the other hand, it has also been indicated that damage to sperm DNA is not limited to the infertile and subfertile patients but it can also be related with the patients whose sperm morphology is normal. In many published articles, it is shown that there is no connection between ICSI and sperm morphology. There are also researches suggesting that sperm morphology can affect the sperm DNA. Researches wanted to be conducted about in which level of gene expression during the gastrulae does the paternal effect activates and during which development process does the damaged DNA affect embryo. This sperm DNA will determined with sperm DNA fragmentation test and analysed whether it has significantly different results in the groups of patients with noormozoospermia and isolated teratozoospermia. We believe that DNA fragmentation parameter will cause predictive results in the group of patients with isolated teratozoospermia. Because normal morphology sperm was not detected in isolated group of patients with teratozoospermia, the changes in the chromatin modelling along the spermatogenesis process come into being in the same way and in a faulty way. To determine whether this results in predictive results in isolated group of patients with teratozoospermia, a research will be conducted in comparison with the normal group of patients.

The better condensation of sperm DNA in the group of patients with isolated terastozoospermia does not only help choosing a better assisted reproductive technique but also help in the diagnosis and treatment. There are researches asserting that paternal gene come into being the in the early and late phase of embryo.



Keywords: sperm DNA fragmentation, sperm morphology, embryo development, pregnancy rate



## İÇİNDEKİLER

### KABUL VE ONAY

### BİLDİRİM

TEŞEKKÜR .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	v
TABLolar LİSTESİ .....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
GRAFİKLER LİSTESİ .....	xi
SİMGE VE KISALTMALAR .....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. SPERMATOGENESIS .....	2
2.1.1. Spermatozitojeniz .....	3
2.1.2. Mayoz .....	4
2.1.3. Spermiojeniz .....	7
2.1.4. Spermatojeniz Dzenlenmesi .....	8
2.1.5. Epididimal Olgunlaşma .....	8
2.2. OLGUN SPERMİUMUN YAPISI .....	8
2.2.1. Flagellum .....	10
2.2.2. Sperm Başı .....	11
2.3. KAPASİTASYON VE AKROZOM REAKSİYONU .....	11
2.4. SPERM DNA FRAGMENTASYONU .....	13
2.4.1. Sperm DNA Fragmentasyonu Tespit Yöntemleri .....	14

2.4.1.1. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL) .....	14
2.4.1.2. COMET.....	15
2.4.1.3. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) .....	16
2.4.1.4. Acridine Orange Testi .....	17
2.4.1.5. Toluidine Blue Testi .....	18
2.4.1.6. Sperm Chromatin Dispersion.....	19
2.4.1.7. Acidic Aniline Blue .....	21
2.5. SPERM DNA FRAGMENTASYONU İÇİN SPERM HAZIRLAMA VE SEÇİM TEKNİKLERİ .....	22
2.5.1. İntrasitoplazmik Morfolojik Olarak Seçilmiş Sperm Enjeksiyonu (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection - IMSI) .....	25
2.6. SEMEN PARAMETRELERİ.....	27
2.6.1. Semen Hacmi.....	27
2.6.2. Semen pH'sı.....	27
2.6.3. Sperm Motilitesi.....	27
2.6.4. Sperm Morfolojisi.....	30
2.6.5. Sperm Konsantrasyonu.....	31
2.6.6. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Semen Parametreleri Referans Değerlerinin Yıllara Göre Değişimi.....	33
2.7. FERTİLİZASYON.....	33
2.7.1. Zona Pellucida'ya Bağlanma .....	34
2.7.2. Sperm - Oosit İlişkisi.....	35
2.7.3. Kortikal Reaksiyon.....	36
2.7.4. Zona Reaksiyonu .....	36
2.7.5. Pronükleusların Gelişimi.....	36
2.8. EMBRİYO GELİŞİMİ.....	38

2.8.1. Klivaj.....	38
2.8.2. Kompaktlaşma Ve Blastokist.....	43
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>47</b>
3.1. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLEN HASTA GRUPLARI VE ÖZELLİKLERİ .	47
3.1.1. Parametrelerin Elde Edilme Ve İnceleniş Detayları .....	47
3.1.2. İncelenmiş Parametreler .....	48
3.1.3. Araştırmaya Dahil Edilmiş Hasta Detayları.....	48
3.1.4. Araştırmaya Dahil Olmama Ve Araştırmaya Almama Kriterleri .....	48
3.1.5. Araştırmadan Çıkarılma Kriterleri .....	49
3.2. HASTADAN SEMEN ÖRNEĞİNİN ALINMASI.....	49
3.3. ALINAN ÖRNEĞİN LİKEFASİYON İÇİN MUHAFAZA EDİLMESİ .....	50
3.4. UYGULANAN SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİ .....	50
3.4.1. Swim-Up.....	50
3.4.2. Dansite Gradyent .....	51
3.5. YUMURTA TOPLAMA İŞLEMİ (OOCTE PICK-UP - OPU) .....	51
3.6. OOSİT SOYMA İŞLEMİ (DENÜDASYON) .....	53
3.7. İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU (Intracytoplasmic Sperm Injection - ICSI).....	53
3.7.1. ICSI Dishlerinin Hazırlanması .....	53
3.7.2. ICSI PROTOKÜLÜ .....	54
3.8. SPERMAC BOYAMA PROSEDÜRÜ .....	54
3.9. SPERM DNA FRAGMENTASYONU TESPİTİ İÇİN TOLUIDİN BLUE BOYAMA TEKNİĞİ.....	55
3.10. EMBRİYO SKORLAMASI.....	56
3.10.1. 3.Gün Embriyo Skorlaması .....	56
3.10.2. 5.Gün Embriyo Skorlaması .....	57

4. BULGULAR.....	58
5. TARTIŞMA .....	75
6. SONUÇ.....	78
7. KAYNAKLAR.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	86



## TABLolar LİSTESİ

**Tablo 1:** Dünya Sağlık Örgütü Semen Parametreleri Referans Değerlerinin Yıllara Göre Değişimi

**Tablo 2:** Çalışmaya dahil edilen izole teratozoospermi (Grup A) grubu hastaların bilgileri

**Tablo 3:** Çalışmaya dahil edilen normozoospermi (Grup B) grubu hastaların bilgileri

**Tablo 4:** İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının ortalamaları arasındaki ilişkiler

**Tablo 5:** İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının sperm DNA fragmentasyon oranlarına göre 3.günde gelişen embriyo skorlaması

**Tablo 6:** İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının sperm DNA fragmentasyon oranlarına göre 5.günde gelişen embriyo skorlaması

**Tablo 7:** İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının 5.günde gelişen embriyo skorlaması

**Tablo 8:** İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının sperm DNA fragmentasyon oranlarına göre gebelik oranlarının karşılaştırılması

**Tablo 9:** Sperm morfolojisi ve sperm DNA fragmentasyon oranlarının korelasyonunun incelenmesi

## ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 1:** Hipotalamus – hipofiz ve gonodal eksenin salgı yolları ve salgı ürünleri

**Şekil 2:** a) Ad (koyu) spermatogonia b) Ap (soluk) spermatogonia

**Şekil 3:** Spermatogenesis

**Şekil 4:** Olgun sperm hücresi kısımları

**Şekil 5:** A) Spermin akrozom reaksiyonu B) Spermin kapasitasyonu

**Şekil 6:** TUNEL: Mavi spermler TUNEL negatif, yeşil spermler TUNEL pozitif DNA fragmentasyonunu gösterir

**Şekil 7:** COMET, A) DNA fragmentasyonu içermeyen spermler, B) Yüksek seviyede DNA fragmentasyonu içeren spermler

**Şekil 8:** Sperm DNA fragmentasyonu tespiti için Acridine Orange testi

**Şekil 9:** Sperm DNA fragmentasyonu tespiti için Toluidine Blue testi

**Şekil 10:** Sperm DNA fragmentasyonu tespiti için Sperm Chromatin Dispersion Testi

**Şekil 11:** Sperm DNA fragmentasyonu tespiti için Aniline Blue testi

**Şekil 12:** a) Düşük büyütme, b-d)Yüksek büyütme, c) Sperm baş morfolojisi ve vakuollerin varlığının ayrıntılı görüntülenmesi, d) Vakuol içermeyen bir sperm hücresi

**Şekil 13:** Sperm anomalileri

**Şekil 14:** A) 2PN oluşumu, B) 2 hücre klivaj embriyosu, C) 3 hücre klivaj embriyosu, D) 4 hücre klivaj embriyosu, E) 5 hücre klivaj embriyosu, F) 8 hücre klivaj embriyosu

**Şekil 15:** Gardner kriterlerine göre blastokist embriyo skorlaması

## GRAFİKLER LİSTESİ

**Grafik 1:** 5.gün Grade 1 embriyo gelişim oranlarının izole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarında sperm DNA fragmentasyon oranlarındaki değişime göre karşılaştırılması

**Grafik 2:** 5.gün Grade 1 ve Grade 2 embriyo gelişim oranları toplamının izole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarında sperm DNA fragmentasyon oranlarındaki değişime göre karşılaştırılması





**SİMGE VE KISALTMALAR**

ICSI	: Intracytoplasmic Sperm Injection
HTF	: Human Tubal Fluid
IVF	: In vitro Fertilizasyon
OPU	: Oocyte Pick Up
HSA	: Human Serum Albumin
PN	: Pronükleus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
FIX	: Fiksasyon
ML	: Mililitre
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
IMSI	: Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection
SCD	: Sperm Chromatin Dispersion
TdT	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TUNEL	: TdT-dUTP Nick-End-Labeling
SCSA	: Sperm Chromatin Structure Assay
AO	: Acridine Orange
TB	: Toluidine Blue
ROS	: Reactive Oxygen Species

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Paternal etkinin embriyo gelişim sürecindeki gen ekspresyonunun hangi aşamasında devreye girdiği, hasarlı sperm DNA'sının bu ifade edildiği embriyonun hangi gelişim aşamalarında etkilediği araştırılmak istenmektedir. Bu hasarlı sperm DNA'sının sperm DNA fragmentasyon testiyle tespit edilip, sperm morfolojisi normal ve izole teratozoospermi grubu hastalarda anlamlı bir sonuç vererek değişip değişmediği incelenecektir. Sperm DNA fragmentasyon parametresinin izole teratozoospermi hasta grupları üzerine prediktif sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz. İzole teratozoospermi hasta gruplarında normal morfolojili sperme rastlanmadığı için spermatogenesis süreci boyunca kromatin modellemesindeki değişiklikler hep aynı ve hatalı düzeyde gerçekleşmiş olmalıdır. Bunun bize izole teratozoospermi hasta grubu için prediktif sonuçlar verip vermediğini normal hasta gruplarıyla karşılaştırarak araştırılacaktır.

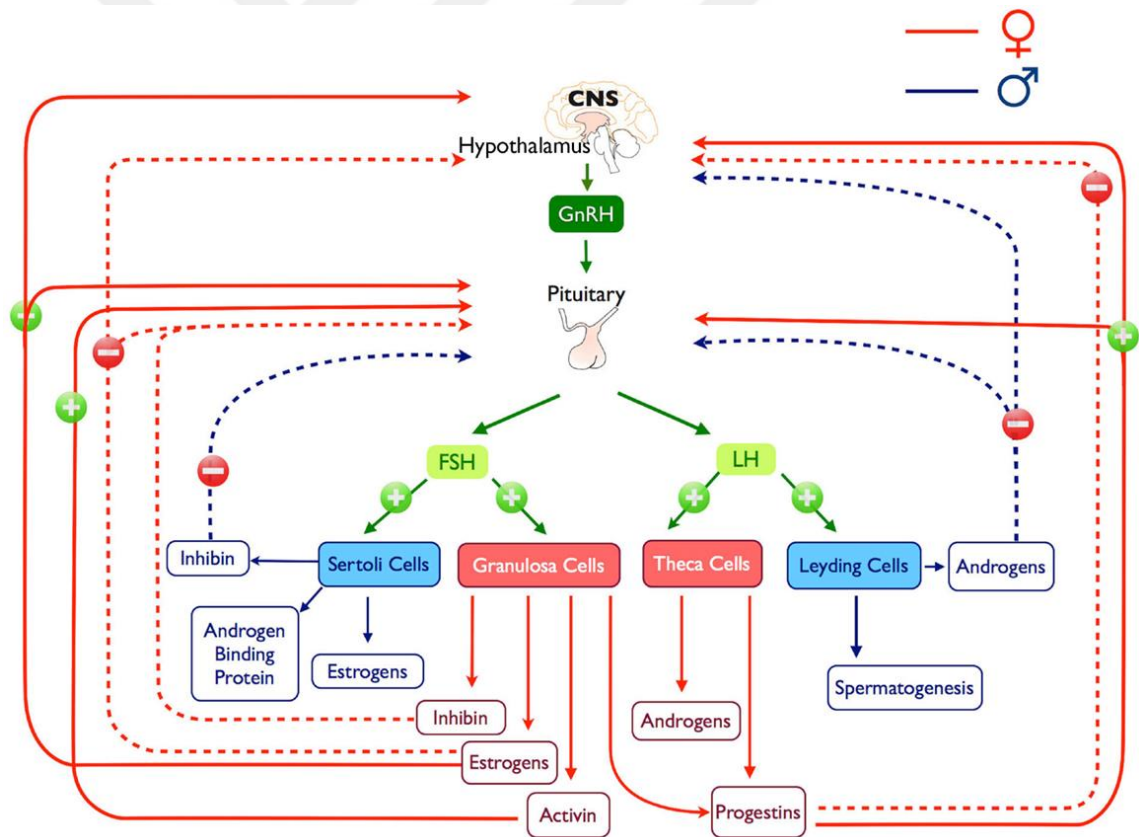
Sperm DNA'sının izole teratozoospermi hasta grubunda daha iyi kromatin kondensasyonu göstermesi, sadece uygulanacak yardımcı üreme tekniği yönteminin seçilmesi açısından değil, tanıs ve tedavi edici bakış açısından da önemlidir. Embriyo gelişimleri üzerine etkileri konusunda da prediktif sonuçlar vermesi muhtemeldir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi testis, penis, üreme yolları ve yardımcı bezlerden oluşmuştur. Bu sistem spermatozoa olarak bilinen erkek üreme hücrelerinin üretilmesi ve dişi üreme yoluna bu hücrelerin taşınmasından, erkek üreme hücrelerini besleyecek sıvıların üretilmesinden ve depolanmasından, erkek üreme hormonlarının üretilmesinden sorumludur.

### 2.1. SPERMATOGENESIS

Spermatogenesis, primordial germ hücrelerinin olgun spermatozoa'ya dönüşme sürecidir. Puberte ile birlikte adenohipofizden salgılanan FSH ve LH hormonu salgılanması ile primordial germ hücreleri gelişimini tetikler.



Şekil 1: Hipotalamus – hipofiz ve gonadal eksenin salgı yolları ve salgı ürünleri

(1)

Spermatogenesis, bu germ hücrelerinden spermatazoa üremek için 64 günlük bir süreçtir.

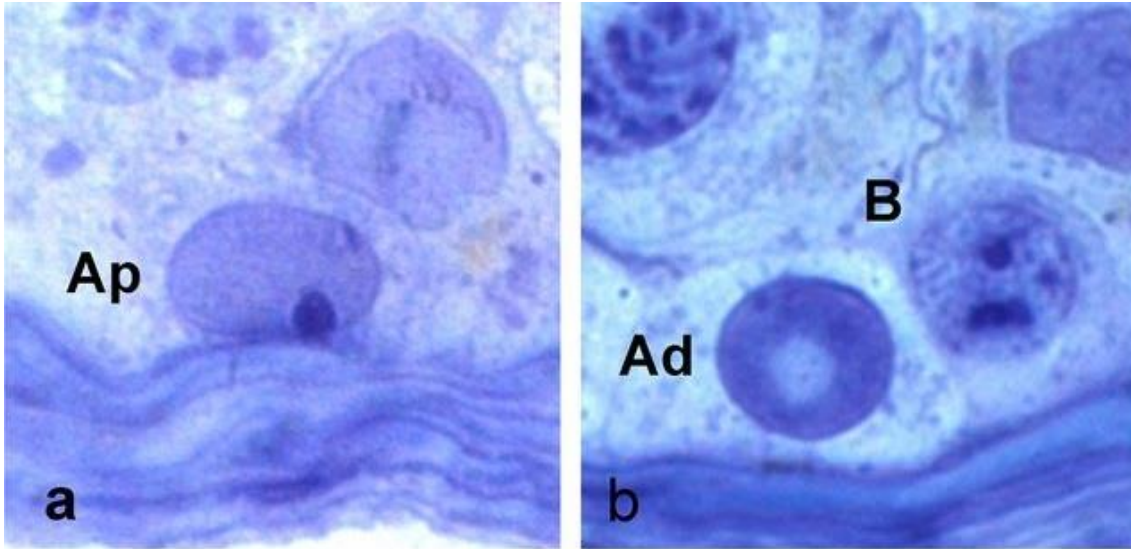
Spermatogenesis üç aşamaya ayrılır:

1. Spermatositogenez
2. Mayoz
3. Spermiyogenez

Bu üç evre spermatogonia, spermatosit ve spermatid ile ilişkilendirilir.

### 2.1.1. Spermatositogenez

Mitotik aşama olarak bilinen bu faz seminifer tübülün tabana yakın zarında spermatogonial kök hücrelerin bölünmesiyle başlar. Bu süreçte spermatogonia bir takım farklılaşmalar geçirir. Spermatogonia seminifer tübülün bazalında diploid hücrelerdir ( $2n$ ). Primordial germ hücrelerinden spermatogonial kök hücreler açığa çıkar ve bu kök hücre popülasyonlarından Tip A spermatogonia oluşur, bu hücrelerin oluşmasıyla spermatogenez başlamıştır. Tip A spermatogonia histolojik boyolarla boyandığında Ad (koyu) ve Ap (soluk) olmak üzere 2 tip alt grup gösterir. Ad tipte olanlar Ap'yi oluşturabilecek rezerv veya proliferatif olmayan spermatogonial hücre popülasyonunu temsil edebilir. Tip A spermatogonia bir seri mitoz bölünme geçirerek kendinin kopyası hücreler oluşturur. Bu hücreler daha sonra primer spermatosit oluşturmak üzere mitoz bölünmeyle farklılaşacak Tip B spermatogonia'yı oluşturur. Spermatogonia, mayozdan sonra sitokinezin tamamlanmamış olmasından dolayı tamamen ayrılmaz ve hücreler arası köprülerle birleşmeye devam eder. Bu hücreler arası kontraksiyon spermatogenezin tüm aşamalarında gözlenmeye devam edecek ve biyokimyasal etkileşimlere katkı sağlayacaktır. Tip B spermatogonia mitozla primer spermatositleri oluşturur.



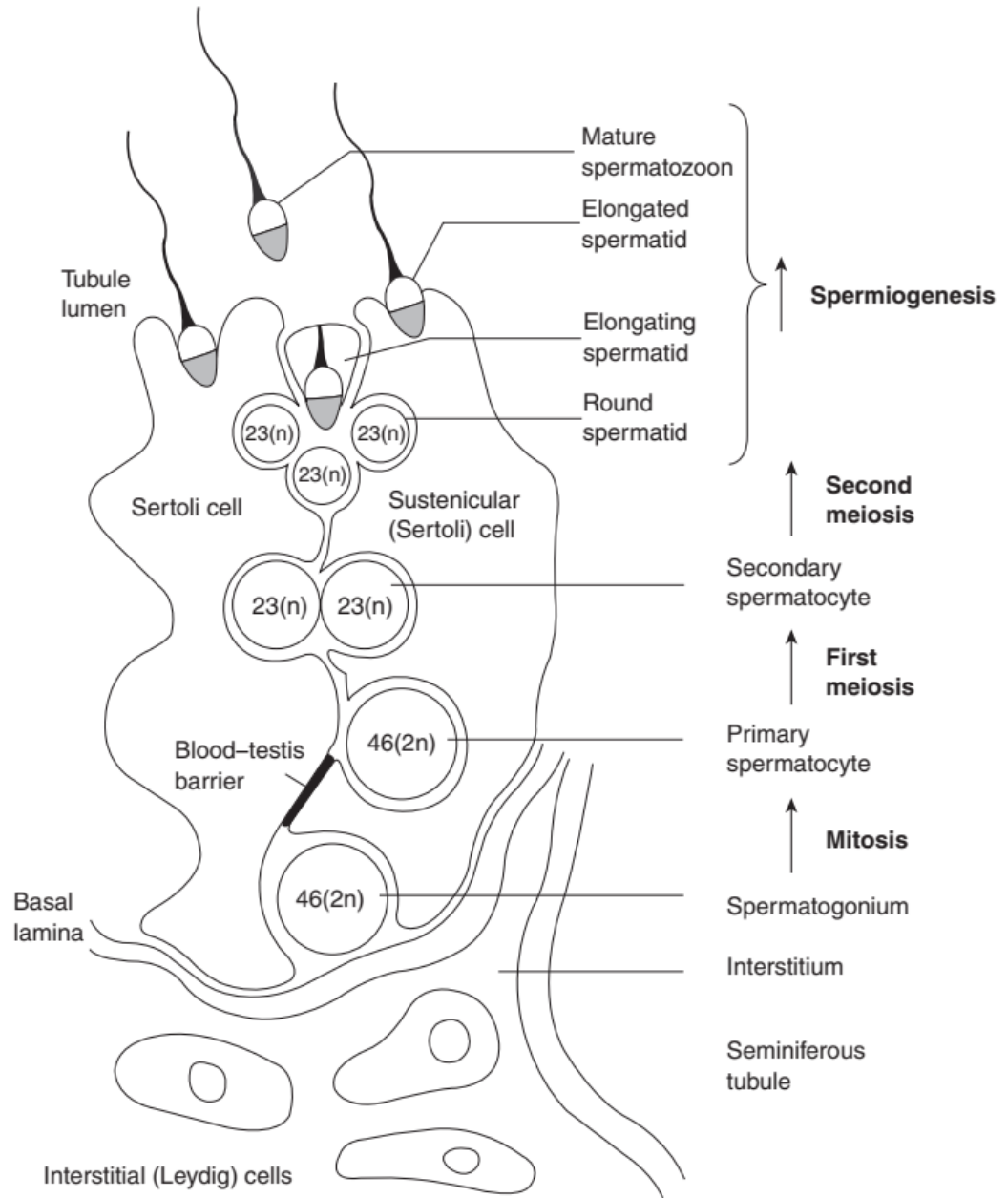
Şekil 2: a) Ad (koyu) spermatogonia b) Ap (soluk) spermatogonia (2)

### 2.1.2. Mayoz

1. mayoz profaz-1 aşaması leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez evrelerinden oluşur. Leptoten evresinde kromozomlar kısalıp kalınlaşarak yoğunlaşır. Zigoten evresinde homolog kromozomlar orta noktalarından birleşir bu olaya sinapsis denir. Sinapsis oluştuğunda bu bölge sinaptomel kompleks olarak isimlendirilir. Pakiten evresinde sinaptomel komplekse ait 4 adet kromatid tetrad yapısını oluşturur. Bu evrede homolog kromozomlar arasında crossing over gerçekleşir. Diploten evresinde crossing over tamamlanır. Kromatitler diploten evresinde birbirinden ayrılmaya başlar. Kromatitlerde crossing over'ın gerçekleştiği bölgelerde ayrılma tam olarak gerçekleşmediğinden kiazmata denilen bölgeler oluşur. Diploten evresinin sonuna doğru crossing over tamamlanır. Diaknez evresinde kromozomlar birbirinden ayrılır. Tip B spermatogonia preleptoten spermatositlerin gelişimine yol açar ve sertoli hücrelerinin taban zarından ayrılarak primer spermatositleri oluşturur. Preleptoten evresinde DNA miktarları iki katına çıkar. Diploid ( $2n$ ) 46 kromozom sayısına sahip primer spermatositler birinci mayoza girer. DNA replikasyonu ile tetraploid yapıda 2 kromatidli yapılar oluşturur. Anneden ve babadan gelen bu kromozomlar homolog kromozom çiftleri oluşturur. Türetilen homolog kromozomlar arasında mayozun profazında genetik materyal değişimi (crossing

over) gerekleŒir. Birinci mayozon bitiminde primer spermatoŒitlerden, sekonder spermatoŒitler oluŒmuŒtur. 1. mayoz sonunda haploid kromozoma sahip, diploid DNA 2 adet spermatoŒit oluŒmuŒtur. Bunlar 2. mayoz geçirerek 4 tane spermatoŒid oluŒturur. 2. mayozda kromozom sayısı deėiŒmeden, DNA miktarı yarıya inmiŒtir.





Şekil 3: Spermatogenesis (3)

### 2.1.3. Spermioyogenez

Spermioyogenez, spermatidlerin nükleuslarının yapısıl Şekillenmesi, sitoplazmasını yitirmesini, organel oluşumunu, akrozom ve flagellum gibi aksesuar yapılarının oluŐması dönemidir. Bu aşama sertoli hücrelerinin sitoplazmasında gerçekleşir. Spermioyogenezde merkezi konumda bulunan çekirdek ve spermatidler uzadıkça nkleusuda uzar böylece baŐlangıçtaki yoŐunluĐundan daha yoŐun bir hal alır. Spermatidlerin endoplazmik retikulumlarında üretilen hidrolitik enzimlerle golgi proakrozomal granülleri oluşur. Proakrozomal granüller, akrozom granüllerini oluşturur ve çekirdek zarına tutunurlar. Çekirdek zarının yaklaŐık üçte ikilik kısmını örten bu veziküler yapı, baŐlık adında yapıyı oluşturur. BaŐlık içerisinde akrozin, hyaluronidaz, nöraminidaz, aril sülfataz gibi hidrolitik enzimler bulunur. Bu enzimler spermin oosite giriŐinde, oositin zone pellucida tabakasının eritilmesinde görev alır.

Sentrioller, nükleusun altında konumlanır, distal ve proksimal sentriolleri oluşturur. Flagellum aksiyal filamenti (aksonem), spermatidin erken evresinde distal sentriol tarafından oluşturulur. 9+9+2 yapısında mikrotübül düzenleniŐi ile karakterizedir.

Aksonem spermatidlerde tomurcuk Şeklinde çıkıntı gösterir. Nükleer membrana yapışan proksimal sentriol boyun kısmını oluŐturacaktır.

Spermiasyon, spermatidlerin sertoli hücrelerinden tübülün lümenine atılması işlemidir. Hücreler arası sitoplazmik bağlar artık olarak kalır ve rezidüel cisim olarak atılır. Sertoli hücreleri protoplazmik bileŐenleri geri dönüŐtürmek için rezidüel cismi fagosite eder.



#### **2.1.4. Spermatogenesisin Düzenlenmesi**

Spermatogenesis, spesifik genlerin indüksiyon veya ekspresyonunu içeren kompleks bir işlemdir.

Germ hücresine özgü transkripsiyon faktörü siklik adenosin monofosfat (cAMP) duyarlı eleman modülatörü (CREM), mayoz sonrası gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir faktördür.

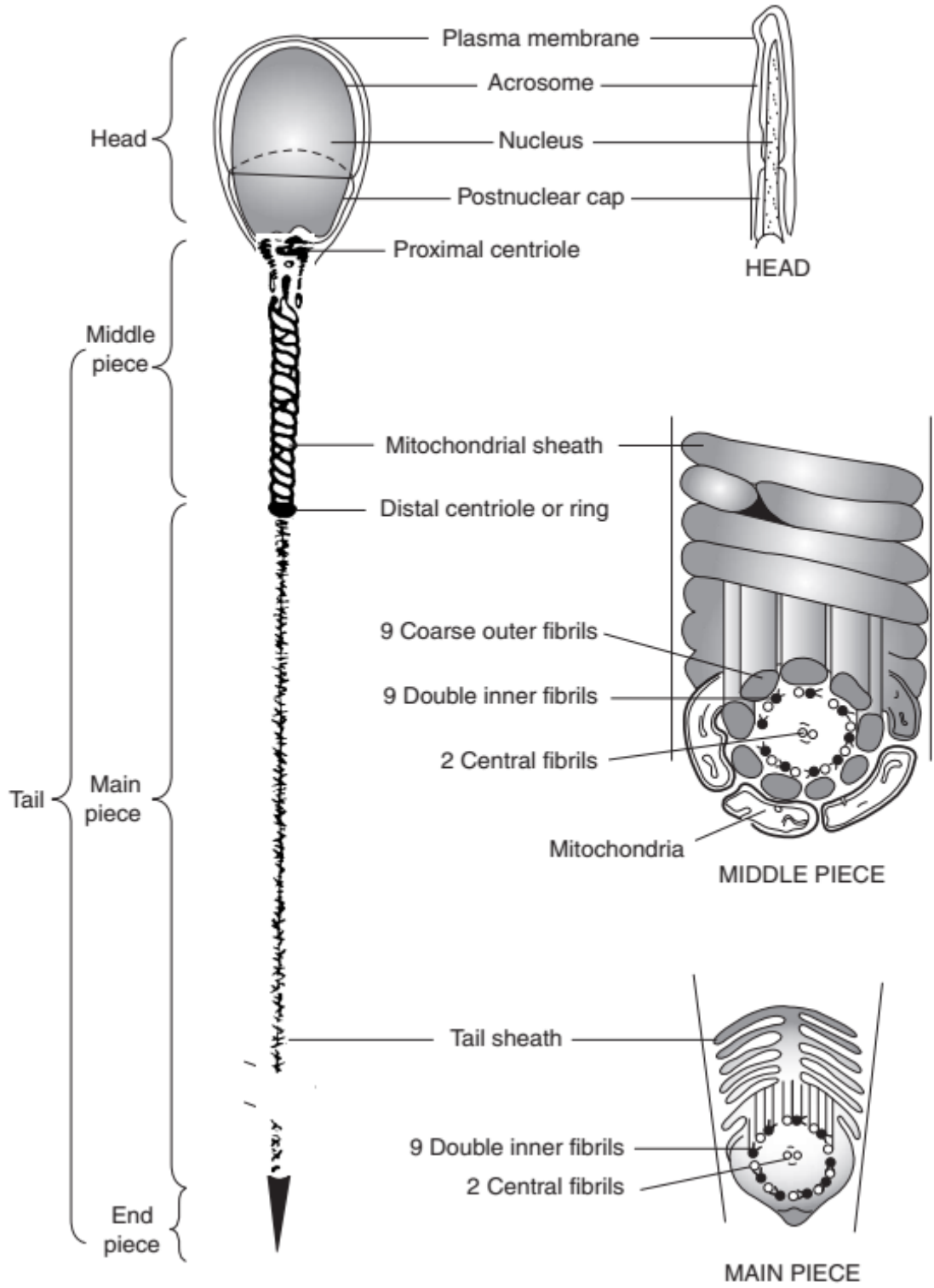
Germ hücrelerinde dört çeşit gen kümesi gözlenir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz gibi germ hücresi homologları, transkripsiyona uğramış izoform yapıda germ hücreleri, germinal hücre farklılaşmasında düzenlenmiş yapılar ve benzersiz yapıları içerir.

#### **2.1.5. Epididimal Olgunlaşma**

Sperm epididime geldiğinde hareketsizdir. Spermatozoonun epididim boyunca yapığı yolculuk sırasında, sperm membranı negatif yükle yüklenir ve oosite bağlanmada etkili antijenler sentezlenir. Sperm membranı fiziksel ve kimyasal değişim geçirir. Epididimin kaput bölgesinden kaudaya doğru geçiş sırasında sperm hareketlilik kazanmıştır ve bu hareketlilik maksimum düzeye ulaşmıştır. ATP, cAMP ve magnezyum hareketliliği tetikleyicidir. Sperm hareketlilik kazandıktan sonra hareketliliğin devam edebilmesi için semen içerisinde fruktoz gibi kaynaklara gereksinim duyacaktır.

### **2.2. OLGUN SPERMİUMUN YAPISI**

Elektron mikroskobu ve transmisyon elektron mikroskobu spermin yapısını, ışık mikroskobuyla yapılan aydınlık saha mikroskobik incelemesine göre daha iyi ortaya koyar. Spermium, temel olarak baş ve kuyruktan (flagellum) oluşmaktadır.



Şekil 4: Olgun sperm hücresi kısımları (3)

### 2.2.1. Flagellum

Spermatozoon, anatomik olarak bir flagelluma sahiptir. Ortalama 50 µm uzunluğundaki bu yapı gereği 4 kısımda incelenebilir:

- 1) Boyun
- 2) Orta parça
- 3) Esas parça
- 4) Son parça

Boyun bölgesi spermin posterioründe, çekirdeğin arkasında segmentli bir yapıda bağlantı kısmıyla sperm başına bağlanır. Kalın mikrotübüller ve proksimal sentriolü içerir.

Orta parça aksonemi içerir. Flagellumda aksiyal lifin aksonu tüm yapı boyunca uzanır. Aksonun kendisi, iki merkezi filamentin etrafında radyal olarak düzenlenmiş dokuz çift mikrotübülden oluşur. Her çift mikrotübül 26 nm çapında ve yan yana dizili tamamlanmış (A altbirim) 13 protofilament ve tamamlanmamış (B altbirim) 10 protofilamentten meydana gelir. A'dan B ye uzanan protein yapıda dynein kollar sayesinde sperm motilitesinde önemli rol oynar. Çiftler neksin proteini tarafından bağlanır. Spiral lifle çevrelenmiş merkezdeki mikrotübüller radyal yapıda uzantılarla A altbirime bağlanır. Mikrotübüller, yoğun kontraktıl yapı gösteren liflerle çevrelenir. Radyal dizilmiş yoğun fibrillerin dış periferi mitokondrilerle kaplıdır. Sperm motilitesi için gerekli enerji bu mitokondriyonlarda üretilir.

Esas parça orta parçaya, orta parçanın distalinden bağlanır. Son parçanın annulustan itibaren uzanan dış mikrotübül yapısı posterior olarak devam eder ve gittikçe kaybolur.

Son parça, plazma membranıyla kaplıdır ve içinde sadece aksonemi barındırır. Aksonem spermin motilitesini sağlar.

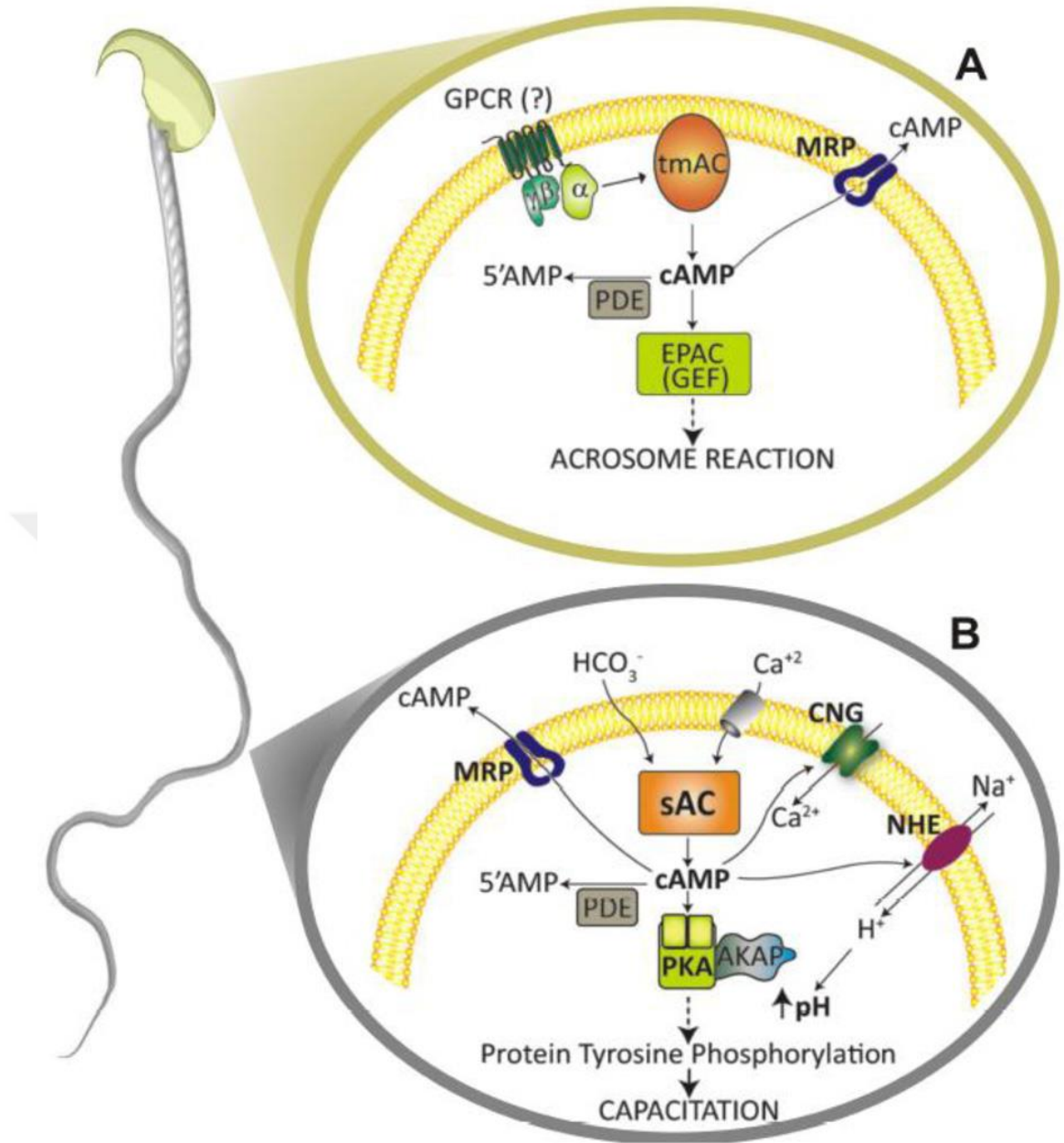
### 2.2.2. Sperm Başı

Sperm başı, paternal genetik bilginin nesiller arasında aktarılmasını sağlayacak DNA yapısına sahiptir. Çekirdek içinde DNA, bağlayıcı histonlar ve protaminler kondense pozitif yüklü yapı oluşturup 4-5 µm uzunluğunda ve 3-4 µm genişliğindedir.

Nükleusun kranial kısmında golgi tarafından akrozomal kep oluşturulur. Anterior bölgenin üçte ikilik bir kısmında akrozin, hyaluronidaz, nöraminidaz, aril sülfataz gibi hidrolitik enzimler bulunur. Spermin oositle birleşmesi sırasında bu enzimler zona pellucida'nın eritilip spermin girişini sağlamaktadır. Spermin postakrozomal bölgesi döllenme sırasında oosit zarıyla temas halinde olacağından önemli bir bölgedir.

### 2.3. KAPASİTASYON VE AKROZOM REAKSİYONU

Kapasitasyon, ejakülasyondan sonra spermin fallop tüplerine kadar olan yolculuğunda bir dizi geçirdiği kimsayal değişiklikler bütünüdür. Kapasite olmamış bir sperm oosit membranıyla kaynaşamaz ve döllenme gerçekleştiremez. Kapasitasyon sadece 37-39°C aralığında gerçekleşir. Tirozin fosforilasyonu, membran iyon değişikliği, aktif motilitenin desteklenmesi gibi değişiklikleri içerir. Akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi için kapasitasyonun tamamlanmış olması gerekir. Akrozom reaksiyonu, spermin dış akrozomal membranının plazma zarıyla birleşerek hidrolitik enzimlerin zona pellucida'ya göçüdür. Akrozom reaksiyonu sadece  $Ca^{2+}$ , varlığında gerçekleşir.



Şekil 5: A) Spermin akrozom reaksiyonu B) Spermin kapasitasyonu (4)

## 2.4. SPERM DNA FRAGMENTASYONU

Sperm DNA'sı ortalama 60 kb büyüklüğünde olan yapıdadır. Sperm nükleoproteinleri %80 oranında sıkıştırılmış yapıda bulunur ancak bu diğer canlı türlerinde daha gevşek yapıdadır. P1 ve P2 protaminleri içeren sperm DNA'sı, P1 protamini P2'ye göre daha yoğundur, bu ise artan disülfid bağlarının sayısı ile açıklanabilir. Diğer türlerden farklı olarak P2 protaminin düşük yoğunluktaki bu yapısı sperm DNA fragmentasyonunun primer sebebi olabilir.

Spermiyogenez sırasında protaminler, histonlarla yer değiştirir. TP1 ve TP2 geçiş proteinleri etkindir. Anilin boyaması ile TP1 ve TP2'nin protamin histon değişiminde rolü ispatlanmıştır (5, 6).

Sperm DNA'sının sıkı paketlenmiş yapıda olması protamin yapısına bağlıdır. Döllenme sırasında deformasyona ve persiste histonların varlığını azaltmak için sperm DNA'sının kompleks yapısı karardır. Sperm hücresi motilitesi sıkı paketlenmiş sperm DNA'sına ihtiyaç duymaktadır.

Sperm DNA'sı herhangi bir onarım mekanizmasına sahip değildir. Somatik hücrelerinin aksine spermde oluşabilecek DNA hasarı embriyonel açıdan daha yıkıcı sonuçlara neden olmaktadır. Paternal genomun ekspresyonunun gerçekleşmeye başladığı andan itibaren kromozomal sapmalar sebebiyle, döllenmede ve embriyo gelişiminde sorunlar ortaya çıkabilir (7).

Bu noktada onarım mekanizması olan oositi açıklamak gerekir ancak oositin sperm DNA'sında tek zincir kırıklarını, çift zincir kırıklarına göre daha kolay onarabildiği bilinmektedir. Ancak onarım DNA hasarı çok genişse embriyo, paternal DNA'nın tamamını degregasyona uğratabilir (8).

Sperm DNA'sı kromatinlerin yeniden şekillenmesi sırasında topoizomeraz, oksidatif stres ve apoptoz sebebiyle hasar ortaya çıkartabilir.

Apoptotik hücre ısı, radyasyon, kimyasal ve toksik maddeler gibi etkileşimlerle oluşabilir. Reaktif oksijen seviyesi fas proteininin ligandlara bağlanmasını tetikleyebilir ve hücre apoptoza sürüklenir. Semen parametresi normal bireylerde %10'dan daha az bir seviyede ejakülatta atıldığı gözlenir.

Sertoloji hücrelerinde apoptotik hücrelerin sayısı kontrol altında tutulmalıdır. Round spermatid formları sertoli hücrelerinde meydana geldiğini düşünecek olursak reaktif oksijen seviyesini sertoli hücreleri süperoksit dismutaz, transferez ve peroksidaz gibi enzimler varlığında sürekli belirli bir seviyenin altında tutmaya çalışır, bu hem hücresel bölünmelerin hem de apoptotik hücrelerin kontrolünü sağlar.

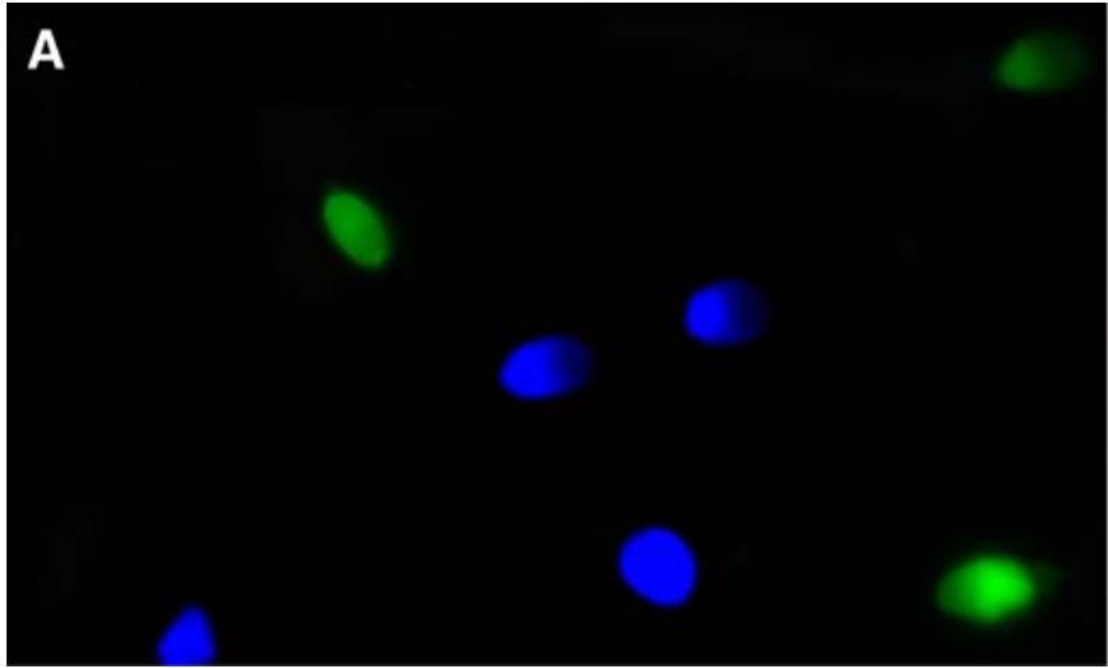
Sperm DNA fragmantasyonu sigara, radyasyon, kemoterapi, kimyasal maddeler (bisfenol A, epoksi reçinesi), ısı, hava kirliliği, insektisit ve pestisitler (DDT), lökospermi, varikozel, kanser gibi faktörler sebebiyle orataya çıkmaktadır.

Yardımcı üreme tekniklerinde sperm dondurulması gibi iatrojenik etkiye sahip işlemler sperm DNA fragmantasyonunu arttırmaktadır.

#### **2.4.1. Sperm DNA Fragmantasyonu Tespit Yöntemleri**

##### **2.4.1.1. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL)**

Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı dUTP etiketleme tayiniyle (TUNEL), DNA'nın sarmalındaki kırıklarda dUTP'lerin bağlanması temelli TdT enzimiyle katalizlenen bir reaksiyondur. Enzim DNA sarmalının hidroksi uçlarına bağlanır ancak sarmalın hidroksi uçlarını kapaması enzimin tutunmasını engeller. Sperm denatürasyonu gerçekleşmeden bir tayin yöntemidir. Ortalama 500-600 hücrenin sayıldığı florasan ışıkta etiketlenerek spermlerin DNA fragmantasyonunun tespit yöntemidir.

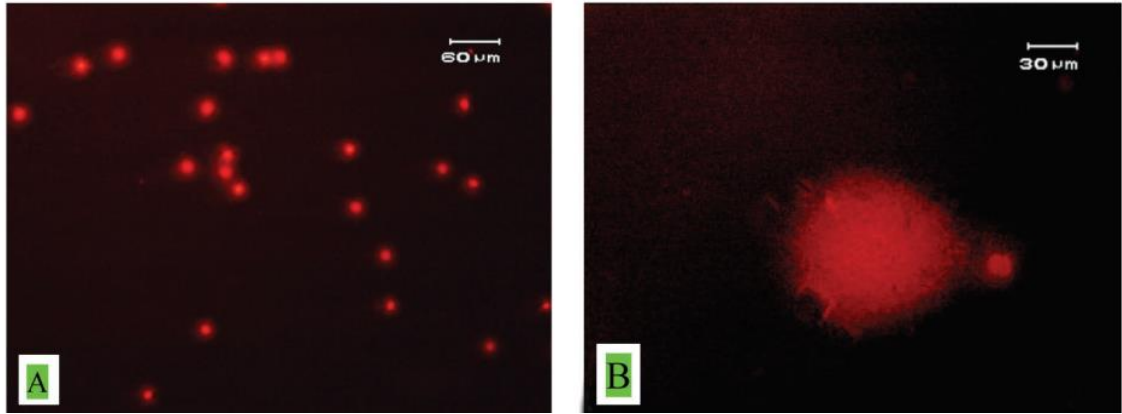


Şekil 6: TUNEL: Mavi spermeler TUNEL negatif, yeşil spermeler TUNEL pozitif DNA fragmantasyonunu gösterir (9)

#### 2.4.1.2. COMET

Bir tek hücre jel elektroforezidir. İmmotil sperm agaroz içerisinde sabitlenip, liziz'de elektroforeze bırakılır. Negatif yüklü DNA, pozitif yüklü uca doğru çekilir. Sperm nükleusundan çıkan DNA iplikcikleri ile gelen sinyal ne kadar kuvvetliyse DNA hasarında o derece fazladır. Ortalama 100 hücreyle bir analiz tamamlanabilir. Sperm sayısı düşük olgularda COMET analiz yönteminin seçilmesi uygun olacaktır.





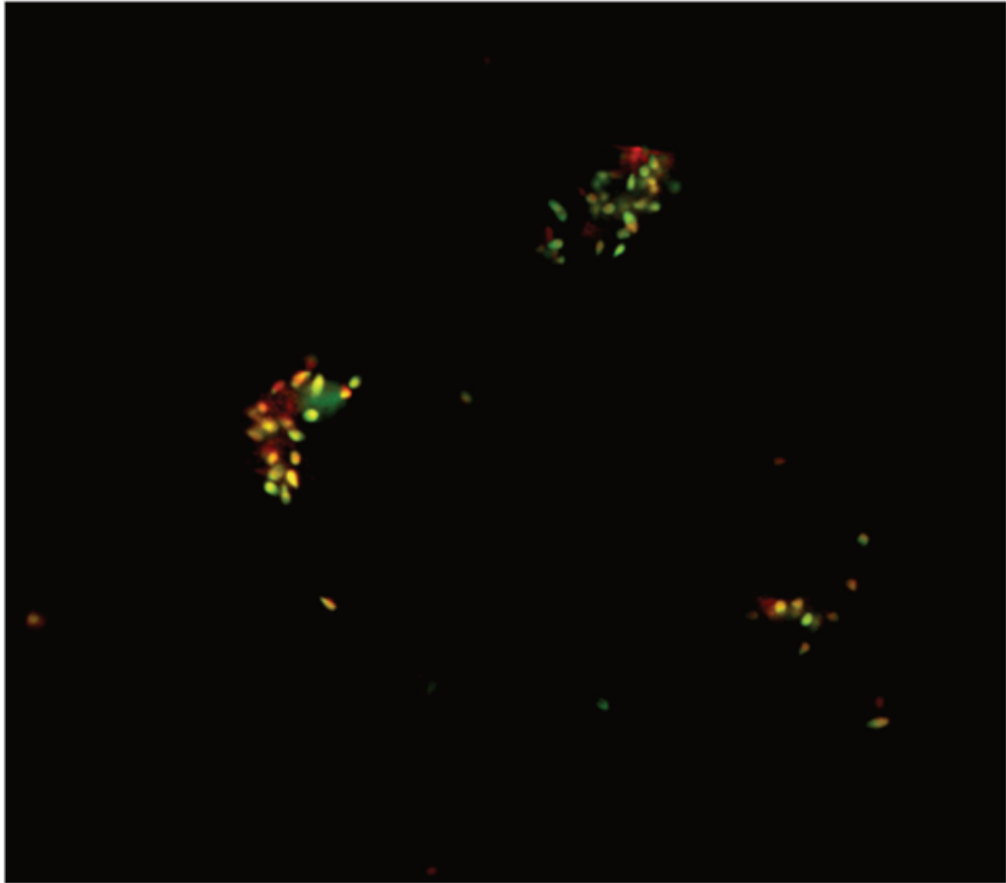
Şekil 7: COMET, A) DNA fragmentasyonu içermeyen sperm, B) Yüksek seviyede DNA fragmentasyonu içeren sperm (10)

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

Akış sitometrik bir testtir. Denatüre olmuş DNA in situ duyarlılığı ölçülmektedir. Metakromatik olarak gruplanan DNA'lar mavi lazer ışık altında, kırmızı renkte denatüre DNA, yeşil ışık normal DNA yapısını göstermektedir. Ortalama 15,000 sperm analiz edilir. Florasan ışık altında metakromatik boyanan hücreler kırmızı ve yeşil renklere göre gruplandırılıp sayılır. P2 protamini gibi düşük kondanse yapı gösteren veya seminal üreme hücresi dışındaki yapılarla bu kırmızı renkteki denatüre DNA oranı yanıltıcı sonuç verebilir. %15 altında kırmızı renkte boyanan denatüre DNA yapısı, iyi derecede sperm DNA yapısı bütünlüğünü gösterir. %15-30 arasındaki kırmızı renkteki denatüre DNA oranı orta düzey sperm DNA yapısı bütünlüğünü gösterir. %30'dan büyük kırmızı renkte boyanan denatüre DNA yapısı, kötü sperm DNA yapısı bütünlüğünü gösterir. DFI (DNA Fragmentation Index) kavramı kırmızı renkteki denatüre DNA oranı ile ilişkilendirilir. HDS kavramı ise immatür spermatozoon'u temsil eder. HDS için %15 cut-off değeri olarak belirlenmiş bu değer altında az sayıda immatür hücre, bu değer üstünde çok sayıda immatür hücre olduğu sonucuna varılır.

#### 2.4.1.4. Acridine Orange Testi

Fikslenmiş denatüre DNA'nın mikroskop altında acridine orange ile boyanarak, incelemede kırmızı; normal DNA bütünlüğüne sahip spermilerin yeşil renk vermesi ile ilişkilidir. Cut-off değeri %30'dur. Bu değerin üstünde yeşil renk veren sperm DNA bütünlüğü oranı normaldir. SCSA'de kullanılan otomasyon sistemlerinin analiz kabiliyeti, insan gözüyle saymaya göre çok daha yüksektir. SCSA'den farklı olarak lam-lamel yüzey boyanması ve mikroskop altındaki analizde farklı sonuçlar çıkarabilmekte ayrıca analizi yapan kişinin öznelliğine dayalı bir tespit yöntemi olduğundan sonuçların güvenilirliği SCSA yöntemine göre daha düşüktür.



Şekil 8: Sperm DNA fragmentasyonu tespiti için Acridine Orange testi (11)

#### 2.4.1.5. Toluidine Blue Testi

Orthokromatik ve metakromatik bir boyama tekniğidir. Sperm DNA'sının denatürasyonu ile sperm DNA'sına tutunan toluidine blue ışık mikroskopunda analizine dayanan bir yöntemdir. Açık mavi, mavi, mor menekşe, pembe, koyu mavi renkleri gösterir. Koyu mavi ve pembe renkler düzgün paketlenmemiş sperm DNA'sının, sperm hücresinin baş kısmına aldığı yüksek düzeyde toluidine blue yüzünden kaynaklanır. Açık mavi, mavi ve mor menekşe renkleri normal DNA bütünlüğüne sahip spermlerin göstergesidir.

Metakromatik mor boyama, sperm DNA'sının açıkta kalan fosfat gruplarına toluidine blue'nun bağlanmasıyla oluşur. Metakromatik boyama, yüksek boya konsantrasyonu ile spermin kötü kromatin bütünlüğünün göstergesidir (12). Metakromatik boyama kooperatif boyama tekniği olduğundan bu testle sadece ciddi orandaki DNA hasarları ortaya çıkar (13). Ortokromatik mavi boyama, düşük boya konsantrasyonu ile kromatin üzerindeki açıktaki fosfat gruplarına erişilebilirliğin az olduğu daha açık bir renk ile karakterizedir. Yüksek oranda paketlenmiş kromatin veya katlantılar yaparak açıktaki fosfat gruplarının erişilebilirliğinin az olduğu sperm hücrelerinde açık mavi ve mavi tonları daha yüksek oranda gözlenmiştir (14).

Denatüre olmuş sperm DNA'sını yüksek doğrulukta boyayan toluidine blue, acridine orange yöntemindeki denatüre DNA boyamasıyla  $r = 0.70$  ve  $r = 0.67$   $P < 0.01$  anlamlılık düzeyinde korele sonuçlar vermiştir (13). Ayrıca SCSA ve TUNEL yöntemiyle  $r = 0.84$  ve  $r = 0.80$ ,  $P < 0.001$  anlamlılık düzeyinde korele sonuçlar vermiş, doğruluğu kanıtlanmıştır (14). SCSA, TUNEL, acridine orange ve toluidine blue birbirleriyle yakın ilişkili olsalar da aynı değerlerdir. Toluidine blue ile koyu tonlarda mor renkli sperm oranı, SCSA'daki DFI'dan daha yüksek ve bu iki testteki iki değerde TUNEL sonuçlarından daha yüksek çıkmıştır. Toluidine blue testi, SCSA ile ölçülen HDS ve DFI değerleri bakımından toplam normal olmayan kromatin konformasyonunu tespit etme kabiliyetine sahip olduğu dikkati çekmektedir (14). Ancak periferik yaymalarda yapılan hatalar, lam-lamel yüzey boya kalıntısı, semen kalıntıları analizde farklı sonuçlar

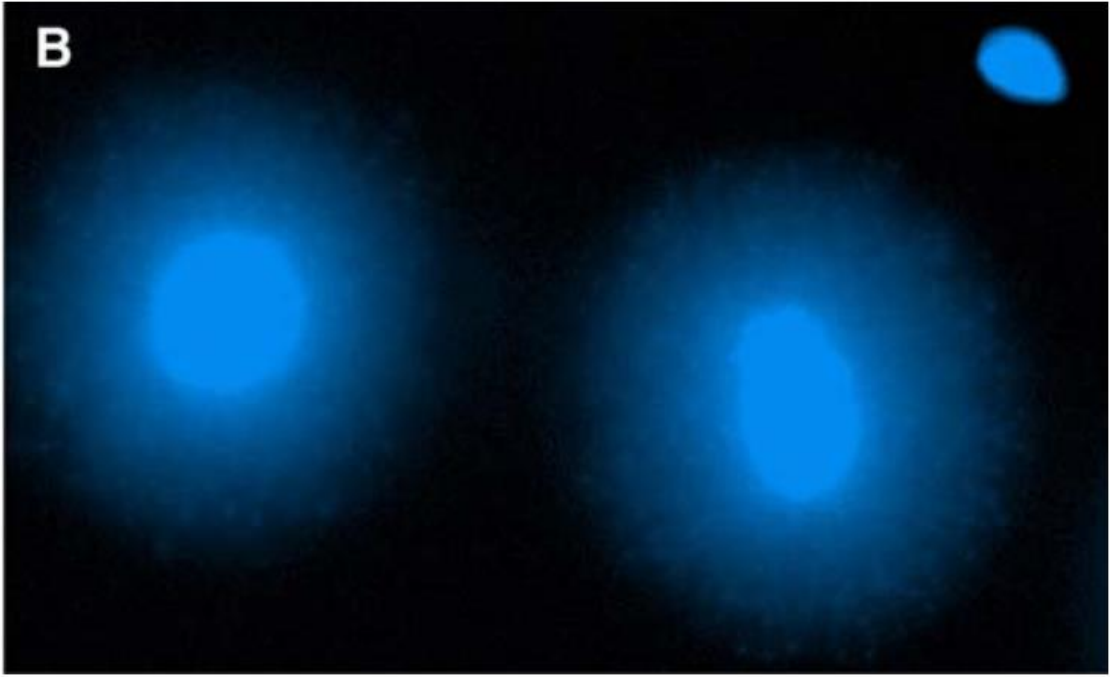
çıkmasına neden olabilir. Analizi yapan kişinin öznel bir değerlendirme yöntemi olabileceğinden güvenilirliği SCSA yöntemine göre daha düşüktür.



Şekil 9: Sperm DNA fragmentasyonu tespiti için Toluidine Blue testi (15)

#### 2.4.1.6. Sperm Chromatin Dispersion

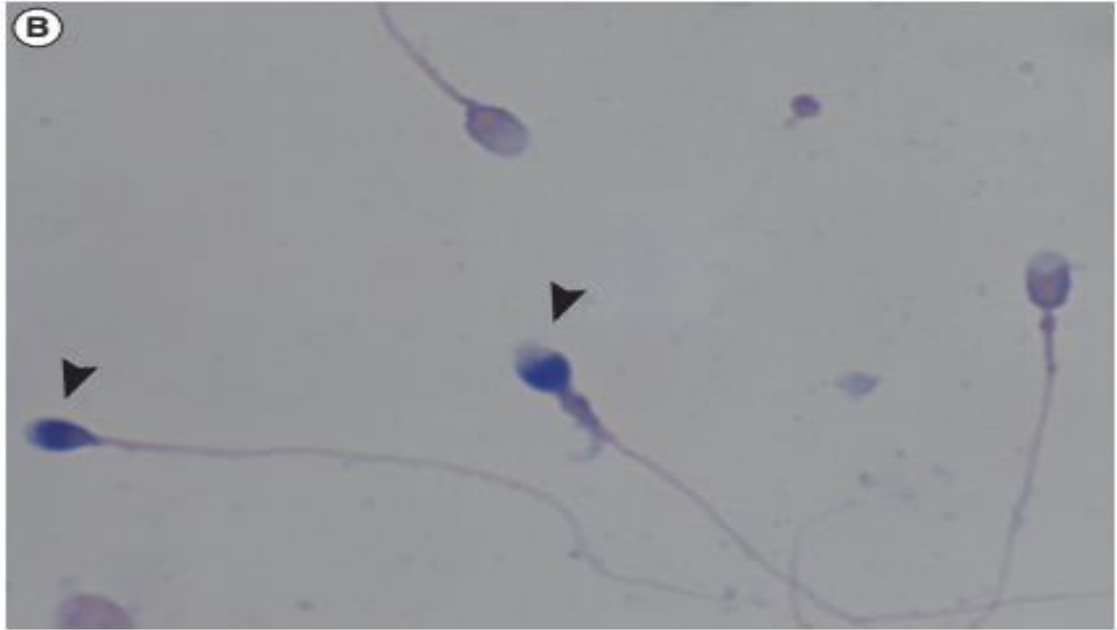
Denatüre edilmiş sperm DNA'sının çekirdek proteinleri uzaklaştırılıp sulu agaroz içerisindeki görüntüsünün floresan mikroskopundaki analizi yöntemidir. Nükleotidler spermin çevresine yayılır. Bu bölge halo bölgesi olarak isimlendirilir. Sperm DNA hasarının yüksek olduğu durumlarda halo bölgesindeki yayılmalarda daha geniş olacaktır. Mikroskop altında ortalama 500 sperm analiz edilir. Diğer testlerin aksine öznel taşıyamayacak kadar özgün bir testtir. Renk tayini gerektirmeksizin halo bölgelerinin genişliği ve şekli temeline dayanmaktadır.



Şekil 10: Sperm DNA fragmentasyonu tespiti için Sperm Chromatin Dispersion Testi, Sağ üst köşedeki halo içermeyen sperm sperm DNA fragmentasyon göstergesi, halo bölgesinin genişlediği ortadaki sperm DNA fragmentasyonu içermeyen spermelerdir (9)

#### 2.4.1.7. Acidic Aniline Blue

Lizin, arginin ve sistein acidic aniline blue ile boyanması yöntemidir. Lizin için reaksiyon gösteren bu boya, immatür spermin lizin seviyesindeki fazlalık boyanın nüfuz etmesiyle sonuçlanır. Ancak matür spermler sistein ve arginin bakımından yüksek, lizin seviyesi bakımından düşüklerdir. Bu da boyanın daha düşük oranda nüfuz edeceğinin ya da hiç nüfuz etmeyeceğinin göstergesidir. Işık mikroskopuyla yapılan analizde ortalama 200 sperm sayılması yeterlidir. Analizin sağlıklı olabilmesi için eozin-Y gibi yardımcı solüsyonların kullanılması, boyanın nüfuz etmediği spermlerin tayininin yanlış yapılmasının önüne geçecektir.



Şekil 11: Sperm DNA fragmentasyonu tespiti için Aniline Blue testi (15)

## 2.5. SPERM DNA FRAGMENTASYONU İÇİN SPERM HAZIRLAMA VE SEÇİM TEKNİKLERİ

IVF ve ICSI'da spermin seminal plazmandan ayrılabilmesi için uygulanmakta olan swim-up ve dansite gradyent yöntemlerindeki santrifüjleme etkisiyle sperm DNA'sındaki fragmentasyon oranı artabilmektedir. Santrifüjlemenin defalarca tekrarlanmasıyla sperm DNA yapısı ve bütünlüğünü etkileyen reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmaktadır.

Swim-up yönteminin sperm DNA fragmentasyonu seviyesini düşürmede etkili olduğu saptanmıştır (16, 17). Swim-up yöntemi ile dansite gradyent yöntemi karşılaştırıldığında swim-up yöntemiyle elde edilen spermin DNA bütünlüğü oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (18). Swim-up ve dansite gradyent yöntemlerinin birlikte yapıldığı sperm hazırlama tekniği sayesinde sperm DNA fragmentasyonu seviyesinin düştüğü gözlemlenmiştir (19).

Buna karşılık swim-up yöntemiyle sperm baş morfolojisine, akrozomal bölge düzensizliğine, dekondanse kromatine sahip immatür spermler elde edilebilmektedir (20). Dansite gradyent bu zayıf yanları karşısında swim-up yönteminden daha üstün ancak, ardışık santrifüjleme etkisiyle ROS oluşumuna neden olmaktadır. Yine de yapılan karşılaştırmalı analizde dansite gradyent yönteminin sperm DNA fragmentasyonu seviyesini düşürmede daha etkili olduğu gösterilmiştir (21).

Zeta Potential yönteminde, olgun bir sperm hücresi - 16 – 20 mV arasında negatif bir sperm membran yüküne sahiptir. Santrifüj işleminin pozitif yüklü bir tüpte gerçekleştirdiği işlemde, elektrik yükleri aracılığıyla tüp yüzeyine yapışan negatif yüklü, kaliteli spermler elde edilir. Bu yöntemle matür sperm oranı, kondanse DNA bütünlüğü oranı, sperm morfolojisi ve progresif motilite oranları yüksek spermler elde edilir. Oligozoospermik örnekler için uygun bir yöntem değildir. Dansite gradyent ile zeta potential yönteminin birlikte yapılmasıyla fertilizasyon ve gebelik oranları istatistiksel açıdan anlamlı olacak şekilde artmış ancak dansite gradyent yöntemi ile zeta potential yöntemi karşılaştırıldığında zeta potential yöntemi daha yüksek gebelik oranları vermiş, bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir (22). Dansite gradyent yöntemi ve zeta yönteminin her

ikisinde de işlem sonrası daha az sperm DNA fragmentasyonu saptanmış ancak zeta yöntemi, dansite gradyent yöntemine göre daha da az sperm DNA fragmentasyon oranı çıktısı vermiş ve daha fazla sayıda sperm elde edilmiştir (22).

Manyetik destekli hücre sıralama (Sperm Selection Using Magnetic Activated Cell Sorting - MACS) sisteminde normal matür sperm hücreleri, apoptotik sperm hücrelerinden yüksek oranda DNA bütünlüğü sayesinde ayrılır. Manyetik molekül ajan, apoptotik hücrelere bağlanır. Manyetik moleküller annexin V ile kaplıdır. Sistem manyetik moleküllerin manyetik bir kolandan geçirilmesiyle bu manyetik kolona bağlanan apoptotik hücrelerin ayırt edilmesini sağlar. Manyetik kolona tutunmamış sperm normal morfolojili ve düşük DNA fragmentasyon oranına sahip spermelerdir. Normal morfolojili ve düşük DNA fragmentasyon oranına sahip spermeler kolona yapışmadığından tampon bir çözeltiyle yıkanmak suretiyle akarlar (23).

Elektroforez (Microflow) yönteminde matür sperm hücresi sialik asit sayesinde daha yüksek derecede negatif yüklüdür. Boyut ve membran yükü farklılıklarına dayanarak, semendeki diğer hücreleri anormal morfolojili ve immatür sperm hücrelerinden ayırmaktadır. Mikroakışkan odacıkların dışı elektrotlarla kaplı içi ise polikarbonat yapıda bir membran içeren 5 µm kalınlığında bir yapıdır. Bu yapı semendeki epitel hücreleri ve lökositleri elemektedir. Pozitif yüklü toplama odasına doğru akış bu membrandan geçen sperm hücrelerinin 18-21 mV bir voltaj ile eleme yoluyla seçimine dayanır (24). Toplama odasına protamin içeriği normal seviyede, sperm DNA fragmentasyon oranı daha az, çok sayıda sperm geçer (23).

Motil sperm organel morfoloji değerlendirmesi (Motile Sperm Organelle Morphology Examination - MSOME) tekniği altı bin altı yüz kat (6600x) büyütmede gerçekleşir. ICSI yöntemine göre dört yüz kat (400x) büyütmede sperm baş, boyun, orta parça, esas parça ve son parça morfolojik defektlerini saptamada daha hassastır. Nomarski optikleri kullanılarak ters faz kontrast mikroskopta işlem gerçekleştirilir. MSOME sperm akrozom, postakrozomal bölge, boyun, mitokondri, nükleus ve kuyruk bölgelerinin ayrıntısını dört yüz kat



(400x) büyütme göre daha ayrıntılı biçimde ortaya koymakta, ICSI yöntemini geliştirici bir etki sağlamaktadır. MSOME tekniği kullanılarak yapılan bir araştırmada oligozoospermik grupta mitokondriyal aktivitenin zayıf olması, kromatin decondansasyonu, sperm anöplidileri ile ilişkili olduğunu ancak bu grupta MSOME ile tek bir hareketli sperm için yapılan seçimde bu parametrelerin, seçim yapılmayan sperm hücrelerine göre daha kaliteli olduğunu göstermiştir (25). ICSI'da enjekte edilen spermin gerçek zamanlı olarak MSOME değerlendirmesiyle seçilmesi ve bu spermin kullanılması, intrasitoplazmik morfolojik olarak seçilmiş sperm enjeksiyonu (Intracytoplasmic Morphologically-Selected Sperm Injection - IMSI) olarak adlandırılmıştır (26).

Çift kırılma (Birefringence) yöntemine göre ışık akrozomal bölgeden geçerken protoplazmada çift kırılıma uğrar. Protoplazmanın ve protein filamanlarının durumuna göre kısmi veya tüm çift kırılma gerçekleşmektedir. Kısmi çift kırılma akrozom reaksiyonu geçirmemiş bir sperm ile ilişkilidir ve akrozom reaksiyonuna girmiş bir sperm akrozom reaksiyonuna girmemiş spermden ayırt etmek için kullanılmıştır (27, 28). Kısmi çift kırılma, tüm çift kırılma ile karşılaştırıldığında sperm DNA fragmentasyonu oranı anlamlı şekilde düşük çıkmıştır (29).

Mikroakışkanlar (Microfluidics), spermleri kanallar sisteminden geçirerek morfolojik ve progresif motilitelerine göre ayırt edilmesine dayalı bir tekniktir. Polydimethylsiloxane (PDMS) polimerler yapıları kanallar sistemidir. Mikroakışkan cihaz ve swim-up yöntemiyle yapılan bir çalışmada sperm DNA fragmentasyon oranı mikroakışkan sistemde %8,4 iken swim-up yönteminde %16,4 çıkmıştır (30).

### 2.5.1. İntrasitoplazmik Morfolojik Olarak Seçilmiş Sperm Enjeksiyonu (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection - IMSI)

IMSI ile sperm eldesi, morfolojik olarak spermelerin seçim kriterlerine göre en iyi kalitedeki sperm hücrelerini oositle birleştirme esasına dayanır. IMSI ile sperm nükleer vakuollerinin saptanması ve sperm kalitesinin skorlanması esasına dayanarak yapılan bir çalışmada, blastokist dönemi embriyoların gelişiminde önemli ölçüde negatif etki yapan nükleer vakuollerin saptanmasında yardımcı olduğu saptanmıştır. Blastokist formasyonundaki embriyolar için grade 1 ve grade 2 kalitesindeki spermle gerçekleştirilen IMSI, grade 3 ve grade 4 kalitesindeki spermle gerçekleştirilen IMSI gruplarına göre istatistiksel açıdan 0,001 anlamlılık düzeyinde anlamlıdır ve daha fazla oranda blastokist embriyo geliştirmiştir (31).

Sperm baş morfolojisini, taşıdıkları vakuol sayısını ve vakuol büyüklüklerini esas alan bir skora geliştirilmiştir (31). Buna göre:

Grade 1: Sperm baş morfolojisi normal form, vakuol içermeyen spermlerdir.

Grade 2: Sperm baş morfolojisi normal form, 2 veya daha az sayıda küçük vakuoller içeren spermlerdir.

Grade 3: Sperm baş morfolojisi normal form, 2'den fazla sayıda küçük vakuoller içeren veya 1 adet büyük vakuol içeren spermlerdir.

Grade 4: Büyük bir vakuol, anormal sperm baş morfolojisi veya diğer defektler içeren spermlerdir.

Sperm baş bölgesindeki vakuolizasyonlar sperm DNA fragmentasyonunun bir göstergesidir ve embriyo gelişimini negatif yönde etkilemektedir (25). Sistematik bir çalışma ile ICSI ve IMSI'yi karşılaştıran meta-analizde IMSI'nın klinik sonuçlar açısından daha başarılı sonuçlar ortaya koyduğunu göstermiştir (32).

IMSI'da mikroskopik değerlendirme kriterleri sperm akrozom, postakrozomal lamina, boyun, mitokondri, kuyruk ana parçası ya da flagellum ve nükleus kısımlarının incelenmesine dayalıdır (33). Buna göre:

Sperm baş morfolojisi: Küçük oval, büyük oval, 2.9  $\mu\text{m}$ 'den dar, 3.7  $\mu\text{m}$ 'den geniş, 4.2  $\mu\text{m}$ 'den kısa, bölgesel bozukluklar

Akrozomal bölge: Yokluğu, kısmi oluşu, kabarcıklı oluşu (prüzsüz bir yüzeye sahip olmaması)

Postakrozomal lamina: Yokluğu, kabarcıklı olması

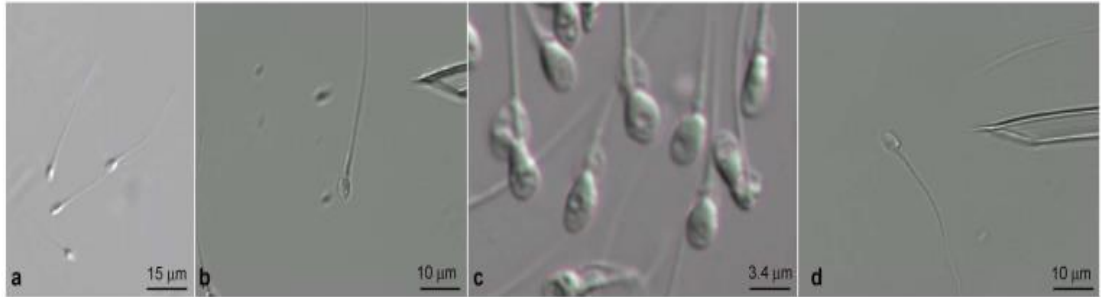
Kromatin içeriği: Nükleer alanın %4'ten daha az bir kısmının vakuol içermesi

Sperm kuyruk morfolojisi: Eksiklik, sarmal, kırık, birden çok sayıda kuyruk içermesi, kısa, küt olması

Sperm boyun morfolojisi: Abaksiyal oluşum, düzensizlik, sitoplazmik droplet

Mitokondri: Eksiklik, kısmi oluşu, düzensizlik

6600x 'lik toplam büyütme = mikroskop büyütmesi (150x) X video çoğaltıcı büyütmesi (0.99x) X video büyütmesi (44.45x) sonucunda açığa çıkar (34).



Şekil 12: a) Düşük büyütme, b-d)Yüksek büyütme, c) Sperm baş morfolojisi ve vakuollerin varlığının ayrıntılı görüntülenmesi, d) Vakuol içermeyen bir sperm hücresi (33)

## **2.6. SEMEN PARAMETRELERİ**

### **2.6.1. Semen Hacmi**

Semen ejakülasyonla atıldıktan sonra yoğun bir yapıda olup vezikula seminalis'ten gelen ve prostattan salgılanan sıvıları içermektedir. Semen ejakülasyonla atılırken ki ilk kısım prostat sıvısıyla çevrili sperm hücrelerini içerir. Semen glandula bulbo-üretalis ve epididimden gelen sıvılarında içerdiği bilinmektedir. Semen hacmi için cut-off değeri Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 standartlarına göre 1,5 ml'dir.

Toplam semen hacmini dereceli serolojik pipetlerle ölçmek mümkündür, ancak bu yöntemle semenin tamamının serlojik pipet içerisine alınması mümkün olmadığından 0,1-0,2 ml yanılma payı ile sonuç verebilir. Bunun yanında semen kabının darası alınıp, hastanın ejakülasyondan sonraki brüt kütlesinin tekrar hesaplandıktan sonra semenin net kütlesinde raporlanması Dünya Sağlık Örgütü 2010 standartlarına göre mümkündür. Semen özgülüğü ve kütlesinden hacmine geçiş yapılabilir.

### **2.6.2. Semen pH'sı**

Yardımcı üreme bezlerinden gelen sıvıların oluşturduğu asidik ve alkali sıvılar pH=7,2 düzeyinde değer verir. Analiz yapılırken heterojen yapıdaki semenin homejenize edilmesi ve pH ölçümünün daha sonra yapılması sonucun doğruluğu açısından önemlidir.

### **2.6.3. Sperm Motilitesi**

Sperm motilitesi, erkek yaşı, cinsel perhiz süresi, testislerin maruz kaldığı dış faktörler (ısı, radyasyon, kimyasal maruziyet) tarafından etkilenebildiği gibi semenin asitlik-baziklik derecesi, ortam ısısı gibi faktörler etki etmektedir. Spermin elde edilme yöntemi doğrudan, muhafaza koşulları (ortam ısısı, saklandığı kabın toksisitesi, pH'sı) spermin motilitesine dolaylı yoldan etki eden faktörler arasındadır.

Semen analizinde, ejakülatın semen kabına alındıktan sonra dış ortamla maruziyetinin kesilip, herhangi bir kontaminasyon olmadan likefaksiyon 37°C'de inkübe edilmesi gerekmektedir. Likefaksiyon ortalama 15 dakika içerisinde gerçekleşir, bu sürenin ardından en fazla 30 dakika içerisinde semen analizinin ve semen motilitesinin tayininin yapılmış olması gerekmektedir. Artan sürelerde semen pH'sı ve ısıya bağlı etkenlerden sperm motilitesi düşecektir. Sperm motilitesinin analizi için 10 µl'lik bir semenin lam-lamel arası ışık mikroskobu veya tercihen faz-kontrast mikroskobunda incelenmesi gerekmektedir. Mikroskobun tablasının sıcaklığında analizi etkileyecek faktörler arasındadır. Tablanın 27-37°C arasında olduğundan emin olunmalıdır. Mikroskobik incelemede en az 5 ile 10 lam-lamel görüntü alanını değerlendirilmesi, değerlendirmede aglütinasyon, agregasyon gibi parametrelerin raporlanması, en az 200 spermin değerlendirmeye alınmış olması gerekir. Mikroskobik alanlardan incelemeye alınan bölgenin tekrar değerlendirilmemesi için lam-lamel yüzeyinin değişik bölgelerinin değerlendirilmesi doğru bir analiz için oldukça önemlidir.

Değerlendirmede lam-lamel yüzeyinin ve mikroskobik yaklaşmanın derecesinde önemlidir. Dört yüz kat (x400) büyütmede inceleme yapılabilir. Lam-lamel derinlik hesabında ise 20 µl'lik derinlik için 22x22 mm lamel kullanılması ve 10 µl semen damlatılması gerekmektedir.

Sperm motilitesini hesaplamada yardımcı araçlardan makler kamarasında kullanılmaktadır. Makler yüzeyinde bir satır veya sütunda toplam 10 karede sperm motilitesi analizi yapılmalı ve raporlanmalıdır.

Sperm motilitesi analizinde kullanılan sınıflandırma:

+4 Motilite: Doğrusal bir hat boyunca, hızlı hareket gösteren spermatozoonlardır.

+3 Motilite: Doğrusal bir hat boyunca progresyon gösteren ancak +4 motiliteli gruba göre daha yavaş veya doğrusal bir hat boyunca hareket etmeyen spermatozoonlardır.

+2 Motilite: Yerinde hareketlilik gösteren spermatozoonlardır.

+1 Motilite: Hareketsiz spermatozoonlar bu grupta yer alır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 standartlarına göre sperm motilitesi cut-off değeri %40'tır. İleri hareketlilik içinse cut-off değeri %32'dir.

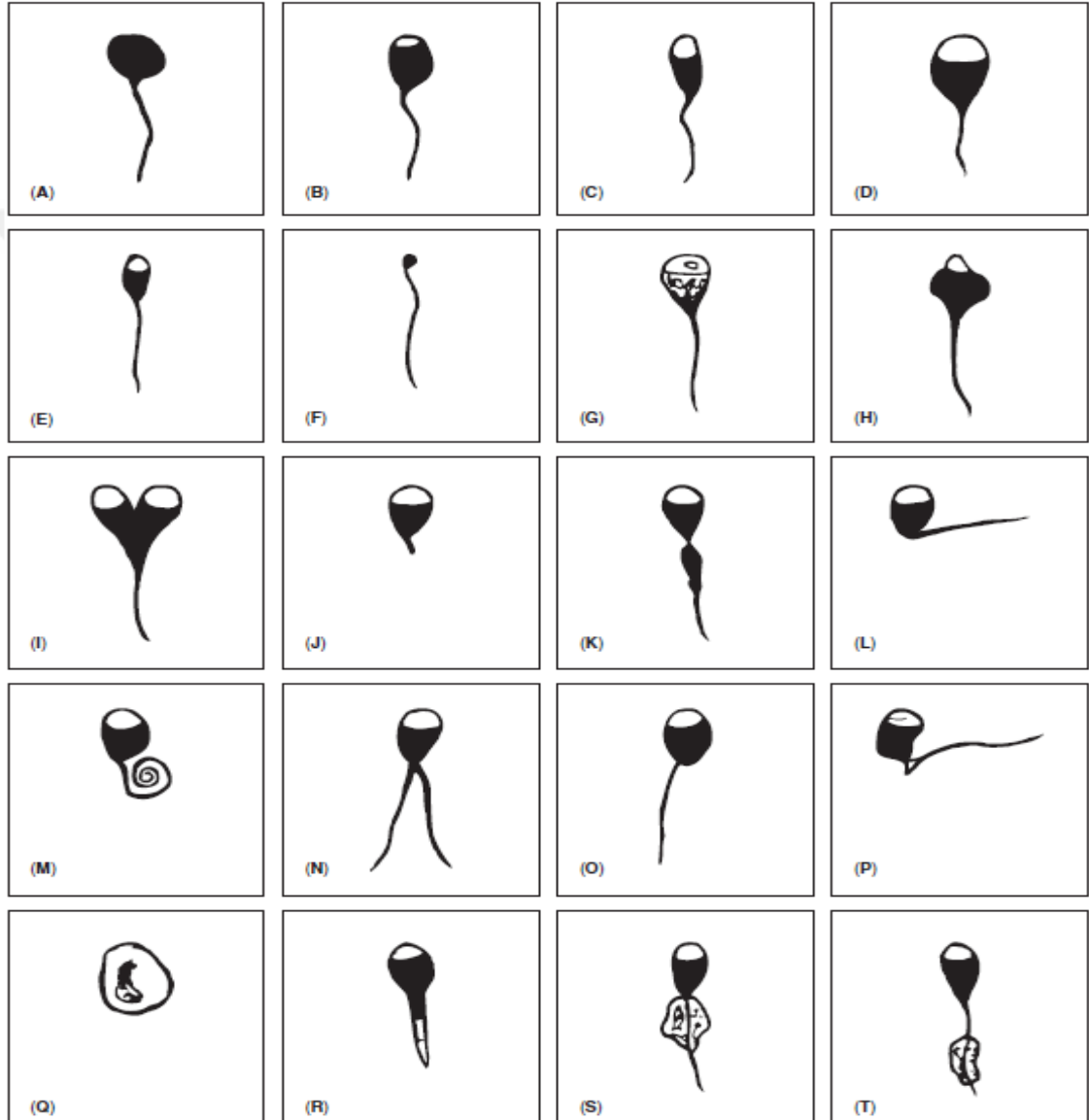
İleri hareketlilik A+B yani +4 ve +3 motiliteye sahip spermatozoonların toplanmasıyla elde edilir.

Toplam sperm motilitesi ise A+B+C yani +4,+3 ve +2 motiliteye sahip spermatozoonların toplanmasıyla elde edilir.



#### 2.6.4. Sperm Morfolojisi

Sperm morfolojisi normal bir spermin sperm başı 4-5  $\mu\text{m}$  uzunluğunda ve 3-4  $\mu\text{m}$  genişliğinde oval, sperm başının hatları düzgün bir şekilde olmalıdır. Flagellum ortalama 50  $\mu\text{m}$  uzunluğunda olmalı ve bu yapının boyun, orta parça, esas parça, son parça kısımlarının defekt içermemesi gerekmektedir.



Şekil 13: Sperm anomalileri: A) Round baş, akrozom yok, B) Küçük akrozom, C) Elongate baş, D) Megalo baş, E) Küçük baş, F) Pinhead, G) Vakuol içeren baş, H) Amorf baş, I) Çift baş, J) Serbest baş, K) Amorf baş, L) Kırık boyun,

M) Kıvrık kuyruk, N) Çift kuyruk, O) Abaksiyal kuyruk eki, P) Çoklu defekt, Q) İmmatür germ hücresi, R) Elonge spermatid, S) Proksimal sitoplazmik droplet, T) Distal sitoplazmik droplet (35)

Sperm baş anomalileri: Makrosefal baş (büyük baş), küçük baş, tapered (uzun) baş, round sperm baş anomalisi, amorf baş, akrozomal bölge %40'tan alanı kapsıyorsa, akrozomal bölge sperm başının %70'inden büyük bir alanı kapsıyorsa, diadem defektleri (vakuoller), düzgün olmayan sperm baş bölgesi sınırları, piriform baş, iğne uçlu (pinhead), çift baş.

Sperm boyun ve orta parça anomalileri: Boyun bölgesindeki sınırları düzgün olmayan, uzun veya kısa orta parça, abaksiyal olarak baş bölgesine bağlanma, bükük ve açılı olması, kruger kriterlerinde ortalama kalınlığı 1 µm olarak belirlenmiş değerlerin üstündeki ve altındaki değerler, boyun bölgesindeki sitoplazmik taşmalar (sitoplazmik dropletler), sperm başının %50'sinden daha fazla kalınlıktaki orta parça bölgesi, kuyuksuz sperm.

Sperm kuyruk anomalileri: Kıvrık kuyruk, uzun ve kısa kuyruk, birden fazla sayıda kuyruk içeren sperm (çift, üçlü), bükük ve açılı kuyruk, küt kuyruk, terminal droplet.

Sperm morfoloji testi Papanicolaou, Shorr, SPERMAC ve Diff-Quik boyaları kullanılarak yapılabilir. Sperm morfoloji testi için en ideal boya Papanicolaou'dur. Akrozomal bölge boyanmasını en iyi şekilde ortaya koymaktadır. Diff-Quik, Papanicolaou'ya göre boyama işleminin daha kısa sürmesi yüzünden tercih edilebilir.

### 2.6.5. Sperm Konsantrasyonu

Sperm sayısının mililitre başına sayısı ve toplam ejakülattaki sayısının tayini semen analizinde önemlidir. Sperm konsantrasyonu tayininde hemositometre, Makler kamarası ve tek kullanımlık sayım kamaraları kullanılmaktadır. Spermin sayısı örneğin likefaksiyon durumu, sayım işlemi sırasında ışığa maruz kaldığı bölge, homejenizasyon, sayım kamarasına yükleme prosedürünün doğruluğu gibi faktörler sperm sayımının doğruluğunu etkilemektedir. Makler gibi sperm



sayım kamarasının sperm seyreltmesine gerek olmaksızın sayma işlemine geçilebilir, katman oluşmadan spermelerin çift sayımının önüne geçilebilmesi, sperm motilitesinin tayini, tekrar kullanılabilmesi ve temizliğinin pratik oluşu sebebiyle tercih edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 laboratuvar el kitabında sperm sayısı cut-off değeri <15 milyon / ml olarak belirlenmiştir.

Hemositometrenin derinliğinden on kat daha dar olan Makler sayım kamarasında (10 mikron), 0,1 x0,1 mm'lik 100 tane kare bulunmaktadır. Homojenizasyon ve likefaksiyon işlemi tamamlanmış ejakülattan 10 µl alınarak sayım kamarasının içerisine yerleştirilir ve mikroskopik incelemesi x20'lik objektifle gerçekleştirilir. Dikey veya yatay 10 karedeki sperm sayılır ve milyon/ml sayısı olarak sonuç raporlanır. Sayım yapılırken işlemin kısa sürede gerçekleştirilmesi, spermelerin mikroskop ışığının olduğu bölgede toplanması yüzünden yanıltıcı sonuç verebileceğinden önemlidir. Sayım kamarasının sıcaklığında 27 - 37°C aralığında olmalıdır.

### 2.6.6. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Semen Parametreleri Referans Değerlerinin Yıllara Göre Değişimi

Tablo 1: DSÖ Semen Parametreleri Referans Değerlerinin Yıllara Göre Değişimi (36)

SEMEN PARAMETRELERİ	DSÖ 1987	DSÖ 1992	DSÖ 1999	DSÖ 2010
Hacim (mL)	≥ 2	≥ 2	≥ 2	≥ 1,5
Sperm Konsantrasyonu (10 <sup>6</sup> /mL)	≥ 20	≥ 20	≥ 20	≥ 15
Toplam Sperm Sayısı (10 <sup>6</sup> )	≥ 40	≥ 40	≥ 40	≥ 39
Toplam Motilite (%)	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 40
Progresif Motilite (%)	≥ 25	≥ 25 (a)	≥ 25 (a)	≥ 32 (a+b)
Canlılık (%)	≥ 50	≥ 75	≥ 75	≥ 58
Morfoloji (%)	≥ 50	≥ 30	≥ 14	≥ 4
Lökosit Sayısı (10 <sup>6</sup> /mL)	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0

### 2.7. FERTİLİZASYON

Fertilizasyon, sperm ve oositin nükleer materyal ve sitoplazmalarının birleşmesidir. Tuba uterina'nın ampulla bölgesinde gerçekleşen dölleme öncesinde sperm bir kapasite olmalıdır. Kapasite olmamış bir sperm, oosit membranıyla kaynaşamaz ve dölleme gerçekleştiremez. Spermatogenesis'de epididimiste spermlerin spermlerin kapasite olmaları baskılanır. Ancak kadının servikal mukus tabakasıyla karşılaştığında tirozin fosforilasyonu, membran iyon değişikliği, aktif motilitenin desteklenmesi gibi değişiklikler geçirir. Akrozom reaksiyonu, spermin dış akrozomal membranının plazma zarıyla birleşerek

akrozin, esteraz, nöraminidaz enzimlerinin zona pellucida'ya göçüdür. Akrozom reaksiyonu sadece  $Ca^{2+}$  varlığında gerçekleşir. Motil spermelerin kümülüs hücreleri arasında daha kolay ve hızlı ilerleyebilmesi, zona pellucida ve oosit membranına ulaşabilmesi için hiperaktivasyon geçirir. Fertilizasyonda, sperm ve oosit membranları arasında fertilin-integrin kompleksi şeklinde birbirine tutunma gerçekleşir. Daha sonra oosit, spermelerin tutunmasını ve penetrasyonuna engel olmak için kortikal ve zona reaksiyonları geçirir. Zona pellucida'nın glikoprotein yapısı enzimler aracılığıyla ZP2 ve ZP3 proteinlerini uzaklaştırır.

### 2.7.1. Zona Pellucida'ya Bağlanma

Motil bir sperm hücresi, oositin kümülüs hücre tabakasını geçerek oositin oolemmasına ulaşabilmesi için zona pellucida tabakasına postakrozomal bölgeden yapışması gerekmektedir.

Sperm akrozom reaksiyonunu zona pellucida tabakasına bağlandıktan sonra geçirir. Zona pellucida'nın glikoprotein yapısı, sperm akrozom reaksiyonunu aktive eder. Zona pellucida tabakası üzerinde ZP3 proteinlerinin yapısı, sperm akrozom reaksiyonunu uyarır ve sperm akrozomal enzimlerini zona pellucida üzerine boşaltır, birincil bağlanmayı böylece tamamlar.

İkincil bağlanma ise zona pellucida'nın glikoprotein yapısında yer alan ZP2 proteinine bağlanan spermelerin, akrozomal aktivasyon yanı sıra akrozom membranı ve enzimleriyle ilişkisini belirtir.

Zona pellucida sperm morfolojisi seçiminde rol oynar. Sperm morfolojisi normal olmayan spermeler zona pellucida'nın ZP2 gibi bağlanma noktalarına ulaşamaz.

$Ca^{2+}$  osilasyonu varlığında akrozom reaksiyonlarını ve hiperaktivasyonlarını tamamlamış spermeler flagellumlarında güçlü bir itme kuvveti kazanır ve bu kuvvet sayesinde zona pellucida'ya penetre olur.

### 2.7.2. Sperm - Oosit İlişkisi

Zona pellucida ile oosit membranı arasındaki alan perivitellin boşluktur. Spermatozoon zona pellucida ve oosit membranını teğet biçimde geçer. Kapasitasyonunu tamamlamış bir sperm akrozom reaksiyonu geçirir ancak bu sayede zona pellucida'ya bağlanma ve füzyon gerçekleşir.

Sperm oosit membranıyla yüzey ilişkisi kurar. Metafaz 2 bir oositte, metafaz plağının çevresinde olmamak kaydıyla sperm oosit membranı bağlantısı gerçekleşir. Benzer şekilde intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (Intracytoplasmic Sperm Injection - ICSI) işleminde, oositin kutup cisimciğinin saat 12 yönünde tutulması, metafaz plağının kutup cisimciği çevresinde bulunduğu öngörülmesi ve bu plağa zarar vermeden işlemin gerçekleştirilmesi temeline dayanır. Sperm oosit membranına ekvatoryal-postakrozomal bölgeden bağlanır. Membranların birbirine kaynaşmasından sonra spermin nükleer ve sitoplazmik materyali oositinkiyle birleşir, bu birleşmede oositin aktin ve miyoz fibrinleri etkilidir. Sitoplazmanın içinde immotil olan spermin, pasif yolla hareketiyle kromatin sitoplazmada dağılır.

Sitoplazmik ve nükleer birleşmenin yanında hücre membranlarında birbirine karışır. Spermin oositin oolemmasına tutunduğu bölgede spermin akrozomal membranı bu bölgede kalır.

Spermatozoon flagellumunun orta parçası aksonemi içerir. Flagellumda aksiyal lifin aksonu tüm yapı boyunca uzanır. Aksonun kendisi, iki merkezi filamentin etrafında radyal olarak düzenlenmiş dokuz çift mikrotübülden oluşur. Mikrotübüller çevresindeki fibrillerin dış periferi mitokondrilerle kaplıdır. Spermin oosite füzyonu sırasında postakrozomal membran, nükleer materyal, sitoplazmik organeller tamamı alınırken sperm flagellumunun bir kısmı veya tamamı sitoplazma içerisine girer. Paternal kaynaklı mitokondrionlar oosit sitoplazması tarafından yok edilir.

### 2.7.3. Kortikal Reaksiyon

Oosit sitoplazmasına çoklu sperm girişini önleyebilmek için, fertilizasyondan sonra kortikal granüller aktif taşınmayla dışarı salınır ve kortikal reaksiyon gerçekleşir. Kortikal granüller, spermin zona pellucida'yı aşip perivitellin aralığı geçerek oolemma ile birleştiği noktadan itibaren oolemma ile birleşerek içeriğini perivitellin boşluğu bırakır.

Memelilerde kortikal reaksiyon fertilizasyondan bağımsız olarak immatür oositlerde çoklu sperm girişine engel olmak için engel oluşturur. Bu bir koruma mekanizmasıdır ve sperm immatür oosit içerisine girmeden gerçekleşir.

Ca<sup>2+</sup> osilasyonu, endoplazmik retikulum aracılığıyla gerçekleşir. Inozitol trifosfat (IP3) sayesinde fertilizasyondan sonra hücre içi Ca<sup>2+</sup> oranı artış gösterir. Protein kinaz C, fosforilasyonla oosit aktivasyonunu sağlar. Kalsiyum osilasyonunda ve Protein kinaz C'nin fosforilasyonunda fosfolipaz C $\zeta$  (zeta) oldukça önemli bir rol oynar.

### 2.7.4. Zona Reaksiyonu

Kortikal reaksiyon zona reaksiyonunu tetikler. Perivitellin aralığındaki kortikal enzimler beta-1,4-Galactosyltransferase (GalTase) noktalarını yok eder. ZP3 proteinlerinin inaktivasyonu bu yolla gerçekleşir. Kortikal enzimler ayrıca ZP2 proteinini ayrıştırır ve bağlantı noktası kaybolur.

Kortikal granüller endoplazmik retikulumdan Ca<sup>2+</sup> osilasyonu ile aktif taşınmayla perivitellin aralığına salgılanması ve ikinci mayoz bölünmenin tamamlanması oositin aktive olduğunun birincil göstergesidir.

### 2.7.5. Pronükleusların Gelişimi

Paternal kaynaklı pronükleus sperm nükleus zarı erimesi ve bunu takiben sperm kromatin dekondeksasyonu, pronükleus zarının oluşumu aşamalarını geçirir. Sperm kromatinin veziküler yapıda dekondeksasyon olur ve oosit sitoplazması içinde yayılır.

Çekirdek zarı içermeyen canlı türlerinde zarın yıkımı ve yapımı gerekli olmaksızın fertilizasyon gerçekleşmektedir.

Nükleus, spermatidden izole edilerek paternal pronükleusun gözlemlenebilmesi mümkündür. ICSI ile sperm nükleer membran doğrudan, membran yıkılmadan enjekte edilir.

Spermin nükleer materyali histon ve protamin yapısı sıkıca paketlenmiştir. P1 ve P2 protaminlerinden oluşan nükleer yapı protaminin daha yoğun yapısı sebebiyle dış mutajenlere karşı kapalıdır.

Veziküler yapıda decondense olan sperm kromatini oosit içine yayılır ve endoplazmik retikulum ile sarılır. Paternal kaynaklı pronükleus bu şekilde oluşur.

Maternal kaynaklı pronükleus, kardeş kromatidler ayrılarak oosit sitoplazması içinde zıt kutuplara dağıldığı anafaz 2 evresinde dağınık halde bulunurken, kromozomlar veziküller yapılar içerisinde alarak birleşmesiyle pronükleusu oluşturur.

Sentrozomların asterleri ve mikrotübül yapısı pronükleusların konumlarının belirlenmesinde etkin bir rol alır. Paternal kaynaklı pronükleus ve maternal kaynaklı pronükleusu aster mikrotübül yapısı merkeze iter. Uygun bir gelişimde eşit büyüklükte ve merkezi konumda bulunan pronükleuslar, yapılacak transferin belirlenmesinde ve anöploidinin öngörülmesinde önem arz eder. Paternal kaynaklı pronükleusun asterlerle itilmeden önceki penetrasyon yolu, spermin oosite giriş yaptığı bölgeden itibaren, kopulasyon yolu ise maternal pronükleusla merkezi konumda karşılaşmasını ifade eder.

Merkezi maternal ve paternal pronükleusların, pronükleer membranların eriyerek çekirdekçiklerin kaynaşması ve pronükleusların birleşmesi singami olarak tanımlanır.

## 2.8. EMBRİYO GELİŞİMİ

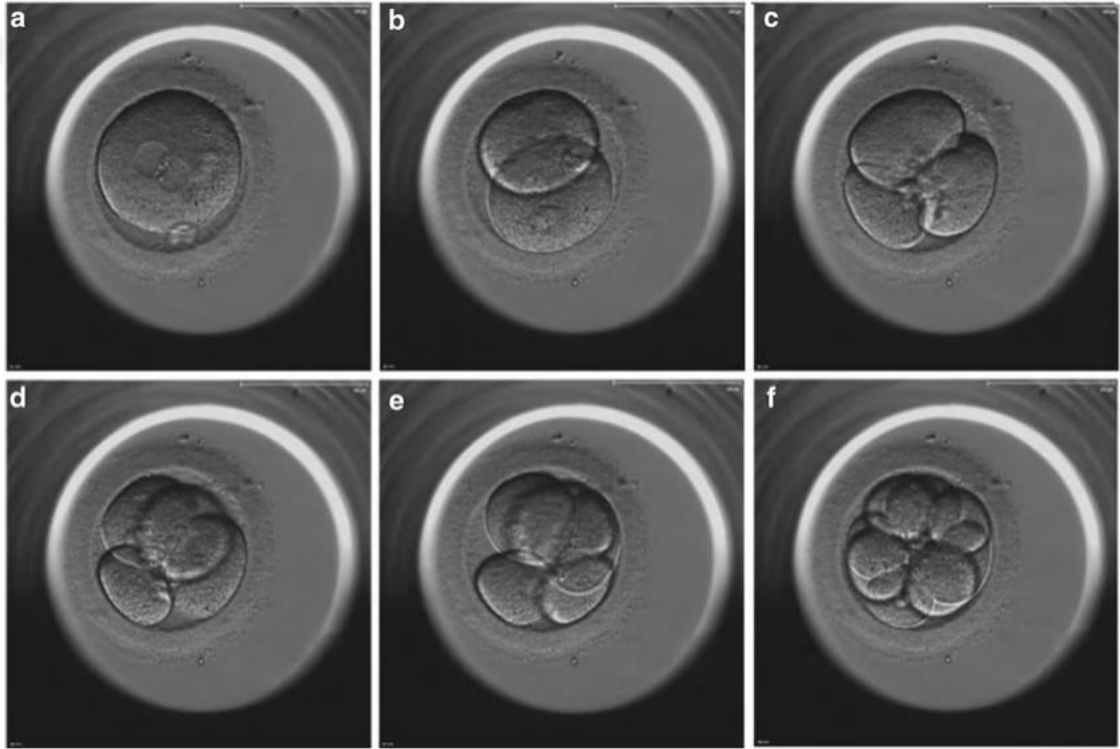
Tuba uterina'nın ampulla bölgesinde döllenme gerçekleştikten sonra zigot silli epitel yardımıyla uterusu doğru hareket eder. Bu yolculuk boyunca hücresel bölünme düzeyinde değişim geçiren embriyo, hacminde bir büyüme gözlenmezken arka arkaya iki, dört, sekiz ve on altı hücre olmak üzere hücreler meydana getirir, her bir hücreye blastomer adı verilir. Blastomerler, totipotent kök hücrelerdir. Blastokist bir embriyo endometriyum iç yüzeyine implante olmak için hatching blastokist formuna geçer ve zone pellucida'dan ayrılan embriyo endometriyuma implante olur.

Hücresel düzeyde bölünmede mitotik bölünmenin kontrolü önem taşır. DNA replikasyonu için gerekli hücresel organellerin, RNA ve proteinlerin sentezinin gerçekleştiği evre G1 evresidir. Protein sentezinin G1 evresine göre sentez hızı en üst düzeye çıkmış, histon ve nükleoproteinler DNA yapısına katılıp DNA replikasyonu gerçekleşmiş olduğu ve sentriollerin sayısının iki katına çıktığı evre S evresidir. G2 evresinde protein ve RNA sentezinin devam ettiği ve tübülün proteinin ve MPF (Maturation Promoting Factor) sentezlendiği evredir. M evresinde kromatinin kondansasyonu ve decondansasyonu gerçekleşir. Karyokinez ve sitokinez birbirini takip eden bölünmelerle gerçekleşmeye devam eder.

### 2.8.1. Klivaj

Zigot, karyokinez ve sitokinez sonrasında birbirine eşit büyüklükte iki hücre oluşturur ve bu hücreler blastomer olarak isimlendirilir. Blastomerlerin büyüklüğü, genetik materyalin paylaşımı düzgün biçimde gerçekleşmediğinde anormal kromozom sayısına sahip çoklu çekirdek içeren blastomerler gözlemlenebilir ve bu embriyolar transfer için uygun değildir. Hücre bölünmesi önce iki hücre daha sonra bu iki hücrenin tekrar bölünmesiyle dört hücre oluşturur. Her hücre bölünmesinde sitoplazmik materyal, kromozomlar ve organeller paylaşıldığı için blastomer hacimlerinde de bir küçülme ancak büyüklüklerin birbirine eşit olması beklenir. Blastomerlerin sayısı, hacmi, morfolojisi ve intraselüler sitoplazmik fragmentasyon gibi parametreler

embriyonel seçimde skorum parametreleridir. Transfer öncesinde embriyonel seçim implantasyon başarısını arttıracığından doğru embriyonun seçilmesi önem taşımaktadır. Sitoplazma ve karyokinez her bir blastomer için gerçekleşir, blastomer sayısı her bölünmede iki katına çıkan embriyolar eşzamanlı bir bölünme geçirir. Buna karşılık hücresel bölünme eşzamanlı bir biçimde gerçekleşmek yerine mitozun farklı zamanlarda gerçekleşmesine bağlı olarak embriyo ikinci günde üç blastomer, üçüncü günde de altı, yedi blastomerde içerebilir. Hücresel bölünmeyi bu düzeyde geçiren embriyolar ise eşzamanlı bölünmeyen embriyolardır.



Şekil 14: A) 2PN oluşumu, B) 2 hücre klivaj embriyosu, C) 3 hücre klivaj embriyosu, D) 4 hücre klivaj embriyosu, E) 5 hücre klivaj embriyosu, F) 8 hücre klivaj embriyosu

Perivitellin aralığındaki sitoplazmik fragmentasyon, hücrenin toplam hacmindeki oranına bakılarak belirlenir ve bir oran şeklinde ifade edilir. Blastomer morfolojisinin kontrolünde blastomer şekli, çok çekirdekli olup olmaması



perivitellin aralıktaki sitoplazmik fragmantasyon sebebiyle yapılan skorlamayı zorlaştırabilmektedir.

Embriyoların fragmantasyon içerip içermemesi ve fragmantasyon oranının artmasına bağlı olarak, gebelik oranları ile korelasyonunu içeren birçok çalışma yapılmıştır. Fragmente olmayan embriyoların, fragmente embriyolara göre transferiyle daha yüksek gebelik oranları sağlandığı gösterilmiştir (37-39).

Kromozomal anomaliler ile fragmente embriyolar arasında ilişki incelendiğinde ileri yaş kadın gruplarında fragmantasyon oranının yüksek olduğu embriyolarda poliploidi ve mozaisizm oranı artmaktadır (40-42).

İlk klivaj değerlendirmesi IVF veya ICSI'dan 24-28 saat sonra yapılmalıdır (43-45). İlk klivaj değerlendirmesinde düşük kalitede sınıflanmış bir embriyo, transfer gününde iyi bir gelişim kalitesine gelmiş olsa dahi düşük implantasyon oranları göstermişlerdir (44, 46, 47). Klivaj değerlendirmesinde diğer embriyo kontrolleri 40-44. saat ve 64-68 saatlerinde yapılmalıdır (48-50).

Klivaj embriyoları skorlamasında 3 karakterli bir sınıflama yöntemi bulunmaktadır (51).

- Birinci karakter embriyonun içerdiği blastomer sayısını (sayı olarak)
- İkinci karakter blastomer morfolojisini (harf olarak)
  - A- Simetrik Blastomer
  - B- Simetrik Olmayan Blastomerler
  - C- Sitoplazma defektine sahip blastomerler
- Üçüncü karakter embriyonun fragmantasyon oranını (sayı olarak)
  - 1- Fragmantasyon içermeyen embriyo
  - 2- Fragmantasyon oranı %20'den az embriyo
  - 3- Fragmantasyon oranı %20-50 arasındaki embriyo
  - 4- Fragmantasyon oranı %50'den fazla embriyo

Bu kriterlere göre 4B2, 8A1 gibi skorlama yapılabilmektedir.

Üçüncü gün embriyo skorlamasını blastomerlerin durumu ve embriyo fragmentasyon oranlarına göre sayı cinsinden puanlama yaparak inceleyen bir başka sistem bulunmaktadır (48).

1. Blastomerler eşit büyüklükte
2. Kompaktlaşma belirtileri göstermesi
3. Blastomerlerin perivitellin aralıktaki boşluğu oldukça az bırakarak genişlemesi (zona pellucida'ya değmesi)
4. Blastomerlerin sitoplazmalarının vakuol içermemesi
5. Sitoplazmik çukurların varlığı

Fragmantasyon İçin:

FP-1: Tek bir blastomer ile birlikte minimum seviyede fragmentasyon

FP-2: Sitoplazmik fragmentasyonun bir kısmının perivitellin aralıktaki lokalizasyonu

FP-3: Embriyonun kavitesinde ve perivitellin aralıkta dağılmış fragmentasyon

FP-4: Tek bir blastomer büyüklüğünde dağılmış fragmentasyon parçaları ve simetrik olmayan blastomer büyüklükleri

FP-5: Fragmentasyonun neredeyse embriyonun tamamına yayılmış olması ve blastomerlerin ayırt edilemeyişi

3.Gün Embriyo Kalitesi Skoru = Blastomerlerin sayısı – 2 (eğer FP>2) + 0,4 x n  
(n=Blastomer Morfolojisi Skoru)

Üçüncü gün embriyoları için diğer bir sınıflama beş farklı gelişim kademesinde blastomer ve embriyo fragmentasyon oranını birlikte değerlendirmiştir (52).

Grade 1: Embriyo blastomerleri eşit büyüklükte ve fragmentasyon içermemektedir.

Grade 2: Embriyo blastomerleri eşit büyüklükte ve düşük oranda fragmentasyon içermektedir.

Grade 3: Embriyo blastomerlerinin büyüklüğü farklı ancak bu fark çok belirgin değildir. Fragmentasyon oranı az veya hiç yoktur.

Grade 4: Embriyo blastomerleri eşit veya eşit olmayan büyüklüktedir. Fragmantasyon oranı oldukça yüksektir.

Grade 5: : Embriyo blastomerleri herhangi bir boyuttadır. Çok fazla oranda ya da embriyonun tamamını kaplamış fragmantasyona sahiptir.

Embriyonel gelişimleri 16-18 saat, 25-27 saat ve 64-67 saat aralıklarında değerlendiren ve bu gelişim kademelerinde her bir aşamadaki durumu ayrı olarak puanlayan ve bu puanlarla toplam bir skor hesaplayan yöntem mevcuttur (43). Toplamda en fazla 100 puan üzerinden olmak üzere geliştirilen bir skora sistemidir. Buna göre:

- 16-18 saat aralığında nükleusların belirli bir aksiyal eksen üzerinde hizalanmış ise: 20 puan
- 25-27 saat aralığında:
  - Blastomerlerin bölünmesi düzenli ve simetrikse: 30 puan
  - Fragmantasyon için:
    - Fragmantasyon yok ise: 30 puan
    - Fragmantasyon %20'den az ise: 25 puan
    - Fragmantasyon %20'den çok ise: 0 puan
- 64-67 saat aralığında blastomer sayısı:
  - 7 ve grade 1, 8 ve grade 1, 8 ve grade 2, 9 ve grade 1 ise: 20 puan
  - 7 ve grade 2, 9 ve grade 2, 10 ve grade 1, 11 ve grade 1, kompaktlaşma: 10 puan

(Grade 1: Simetrik blastomerler ve fragmantasyon içermeyen embriyolar; Grade 2: Belirgin olmayan oldukça az seviyede düzensiz, pürüzlü yapıda ve düzgün morfolojiye sahip olmayan blastomerler, %20'den az fragmantasyon içeren embriyolar; Grade 3: Çok belirgin biçimde düzensiz, pürüzlü yapıda ve düzgün morfolojiye sahip olmayan blastomerler, %20'den fazla fragmantasyon içeren embriyolar)

### 2.8.2. Kompaktlaşma Ve Blastokist

Embriyonel gelişimin üçüncü klivaj aşamasında RNA ve protein sentezinde artış ve buna bağlı olarak genomun transkripsiyonu ile blastomerler birbirlerine karşı itilir ve aralarında membran bileşimlerinde bağlantı gerçekleşir. Sıkı bağlantı birimleri (tight junction) ve desmozomlar blastomerler arasında membran bileşimindeki bağlantıyı gerçekleştirir. İntegral ve periferel proteinler bağlantının oluşturulmasında görev alır. Gap junction bölgeleri blastomerler arasında iletişimin ve sitoplazmik metabolit transferini sağlar. Blastomerlerin birleşme noktalarındaki fragmente hücreler, granüle hücreler kompaktlaşma gerçekleştiremez. E-kadherinin blastomerlerin zona pellucida bölgelerinde dağılarak, hücre sınırlarını ortadan kaldırıcı ve blastomerlerin ek bir yapı gibi gözükmelerini sağlayacaktır. Kompaktlaşmadan sonra morula evresi başlayacak, mitotik aktivitenin hızlanmasıyla RNA ve protein sentezi artacak fosfat gruplara eklenecektir.

12-32 blastomere sahip embriyo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve ATPaz aktivitesiyle blastosel oluşumu gerçekleşir. Bu evre kavitasyon evresi olarakta bilinmektedir.

Trofoektoderm hücreleri, embriyonun zona pellucida'ya bakan bölgesindeki blastomerlerin oluşturduğu epitel tabakası ile oluşur.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ve ATPaz aktivitesiyle embriyonun merkezindeki artan ozmotik basınç ile blastosel oluşur. Embriyonun iç tarafındaki blastomerler iç hücre kitlesini oluşturmak üzere farklılaşır. Embriyo kavitesi, trofoektoderm hücrelerinin dizilişi, iç hücre kitlesindeki hücreleri sayısı ve paketlenmesi gibi faktörlere bakılarak blastokist bir embriyonun skorlaması yapılmaktadır. İnce bir zona pellucida tabakası, trofoektoderm hücrelerinin dizilişi ve hücrele yüzeylerinin düzgünlüğü, çok hücreli sıkı paketlenmiş bir iç hücre kitlesi iyi gelişmiş bir blastokist dönemi embriyosunu tanımlar.

Blastokist embriyolar Gardner ve ark. (53) kriterlerine göre:

Grade 1: Early blastosist - blastosel embriyonun hacminin yarısından daha azdır.

Grade 2: Blastosist - blastosel embriyonun hacminin yarısından daha büyük veya eşittir.

Grade 3: Full blastosist - blastosel embriyoyu tamamen doldurur.

Grade 4: Expanded blastosist – blastosel hacmi erken embriyonunkinden daha büyüktür ve zona pellucida incelmıştır.

Grade 5: Hatching blastosist – Trofoektoderm hücresi zona pellucida'dan çıkmaktadır.

Grade 6: Hatched blastosist – Blastosist zona pellucida'dan tamamen dışarı çıkmıştır.

İç hücre kitlesi ve trofoektoderm tabakası sınıflandırması grade 3'ten grade 6'ya kadar olan embriyolar için yapılmalıdır Buna göre:

A: İç hücre kitlesindeki hücreler sıkıca paketlenmiş ve birçok hücre bulunmaktadır.

B: İç hücre kitlesindeki hücreler gevşek bir şekilde paketlenmiş ve birkaç hücre bulunmaktadır.

C: İç hücre kitlesi çok az hücreden oluşmaktadır.

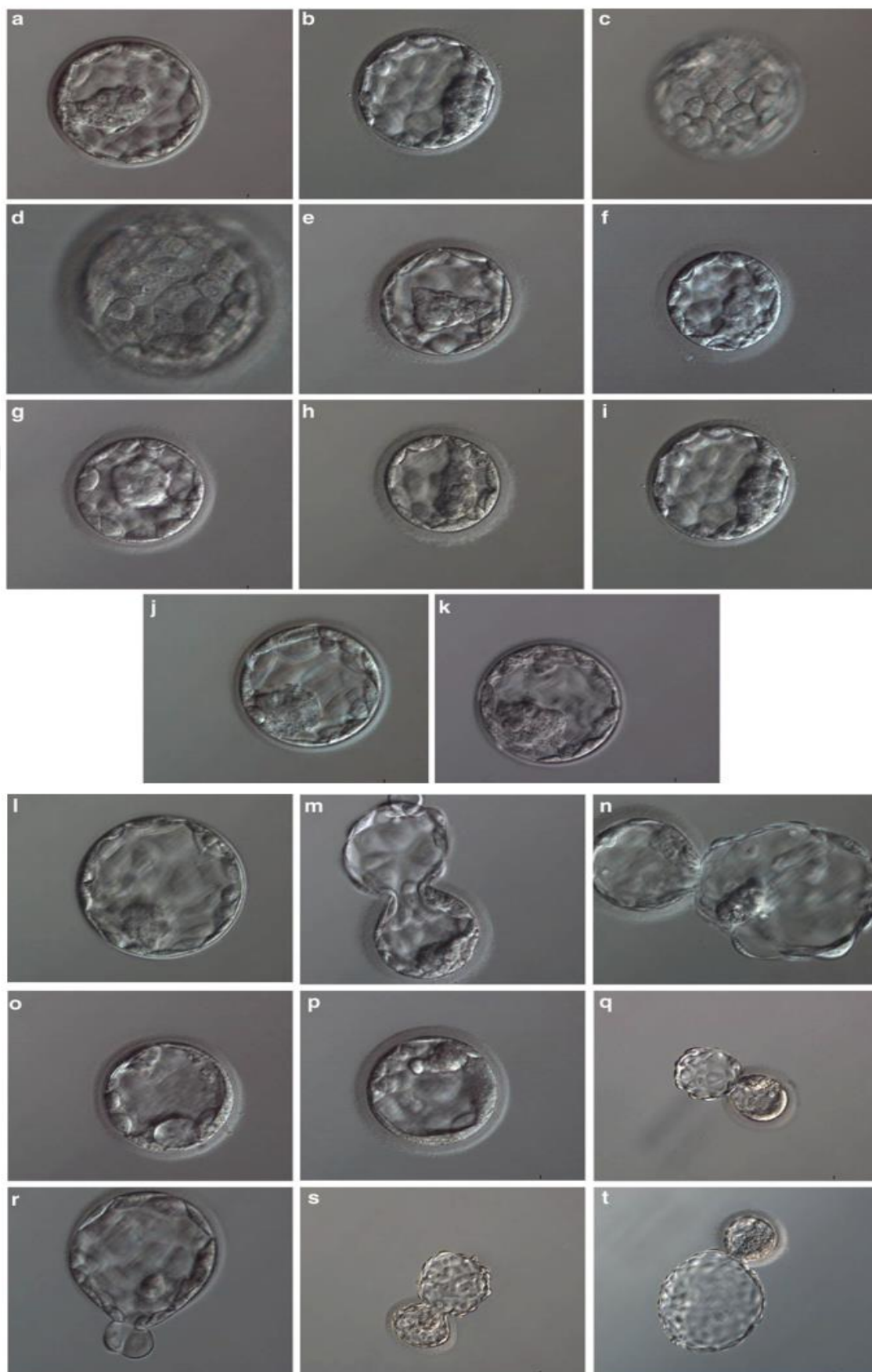
Trofoektoderm hücrelerinin sınıflandırması:

A: Epitelyum tabakası sıkı bir örgü oluşturmuştur ve birçok hücreden oluşmaktadır.

B: Birkaç hücreden oluşmaktadır.

C: Gevşek bir epitelyum tabakası ve çok az hücreden oluşmaktadır.

Bu sınıflamaya göre 5AA, 4AB gibi blastokist dönemi embriyoları için sınıflama yapılabilmektedir.



Şekil 15: Gardner kriterlerine göre blastokist embriyo skorlaması: a,b) İç hücre kitlesi sınıflamasında sıkıca paketlenmiş, Grade A olarak sınıflanır; c,d) Trofoektoderm hücreleri çok sayıda ve birbirine yapışık, Grade A olarak sınıflanır; e-h) 3AA; i-l) 4AA; m,n) 5AA; o,p) 3CC; q,r) 5BB; s,t) 5BA

Rehman ve ark.(54) blastokist kalite skorlamasını sayısal olarak ifade eden bir başka yöntem geliştirip Gardner sınıflamasını expansion derecesi (1'den 6'ya kadar derecelendirme), iç hücre kitlesi ve trofoektoderm tabakası kalitesini A = 3, B = 2, C = 1 değerleriyle ifade edip her bir değeri birbiriyle çarpmaktadır. Örneğin 4AA bir blastokist  $4 \times 3 \times 3 = 36$  puan ile ifade edilmektedir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLEN HASTA GRUPLARI VE ÖZELLİKLERİ

Çalışmaya tüp bebek tedavisi görmek için Centrum Klinik Kadın Sağlığı Ve Tüp Bebek Merkezi'ne 2016-2017 yılları arasında başvuran 63 hasta dahil edilmiştir. Başvuran hastalarda erkeklerin sperm morfoloji değerlendirmesi sonuçlarına göre 34 birey izole teratozoospermi (zero normal), 29 birey normozoospermi'dir. Bu bireylerin tüp bebek tedavisine başlamadan önce Toluidine Blue yöntemiyle sperm DNA fragmantasyon oranları ölçülmüştür. Çalışma retrospektif bir çalışmadır, uygulanacak protokollerin bütün hastalar için belirli bir standartizasyonda olmasına dikkat edilmiştir. Çalışmaya katılan 63 hasta için uygulanmış protokoller çalışmada yer verilmiştir.

##### 3.1.1. Parametrelerin Elde Edilme Ve İnceleniş Detayları

Sperm Morfoloji sonuçları ve sperm DNA fragmantasyon sonuçları Centrum Klinik Kadın Sağlığı Ve Tüp Bebek Merkezi laboratuvar veritabanından elde edilmiştir. Sperm morfoloji değerlendirilmesi için SPERMAC Boyama Tekniği dışında uygulanmış hiçbir teknik araştırmaya dahil edilmemiştir. Sperm DNA fragmantasyonu için Toluidine Blue testi dışında uygulanmış hiçbir teknik araştırmaya dahil edilmemiştir.

Embriyo gelişim skorları ve Beta hCG değerleri bu hasta grupları için Embriyoloji Centrum Klinik Kadın Sağlığı Ve Tüp Bebek Merkezi Embriyoloji laboratuvar defterine ayrıntılı olarak istenilen kriterler çerçevesinde işlenmiştir, bu verilerin tamamlayıcısı ve gerek ek bilgilerin tedariki için hastalara ait Embriyoloji Laboratuvar formlarına ulaşılmıştır.

Embriyo transferinden 12 gün sonra Centrum Tüp Bebek gebelik takip listesinden hastaların Beta hCG değerleri kontrol edilmiş ve pozitif veya negatif şeklinde sonuç raporlanmıştır. Beta hCG değeri, gebelik sonucu negatif olan kadınlarda (ve embriyonun tutunmaması halinde) sıfır veya sıfıra çok yakın (0.1 - 0.001) olacaktır. Gebelik varlığında değer genellikle 10'un üzerinde hatta 50,



100 veya daha yüksek değerlerdedir. Kanda Beta hCG değeri yükselişi takip edilir ve ilgili doktor vaginal ultrasonografi ile kese oluşumunu kontrol etmiştir.

### **3.1.2. İncelenmiş Parametreler**

Araştırmaya kruger kriterlerine göre sperm morfoloji sonuçları, sperm DNA fragmentasyon yüzdesi sonuçları, semen hacmi (ml), sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, toplam sperm motilitesi, ileriye doğru sperm hareketliliği, toplanan oosit sayısı, toplanan olgun oosit sayısı, fertilize olan oosit sayısı, fertilizasyon oranı, 3.gün gelişen embriyo sayısı, 3.gün gelişen embriyo oranı, blastokist embriyo sayısı, blastokist embriyo oranı, transfer edilen embriyo sayısı, embriyo gelişim skorları, gebelik oranlarını tayin edebilmek için Beta hCG değerleri, implantasyon oranı dahil edilmiştir.

### **3.1.3. Araştırmaya Dahil Edilmiş Hasta Detayları**

Araştırmada 18-65 yaş arası hastalar incelenmiştir. OPU (oocyte pick-up) günü spermleri kullanılacak bireyin işlem öncesinde son 6 ay herhangi bir ilaç kullanmamıştır. Semeni doğrudan ejakülasyon yoluyla vermiştir. Erkek bireylerde sperm morfolojisi ve sperm DNA fragmentasyon test sonuçlarını içeren hastalar araştırmaya dahil edilmiştir. Kadınlarda AMH değerleri normal, endometriyum kalınlığı normal bireyler araştırmaya dahil edilmiştir.

### **3.1.4. Araştırmaya Dahil Olmama Ve Araştırmaya Almama Kriterleri**

18-65 yaş dışındaki hastalar araştırmaya dahil edilmemiştir. Sperm örneğini mastürbasyonla ejakülasyon dışında herhangi bir yolla verenler araştırmaya dahil edilmemiştir. Erkeklerde ilaç kullanan bireyler araştırmaya dahil edilmemiştir. Yine erkeklerde 14 günden fazla perhizli bireyler araştırmaya dahil edilmemiştir. Kadınlarda AMH değeri az olan ve endometriyum kalınlığı anormal olan bireyler araştırmaya dahil edilmemiştir.

### 3.1.5. Araştırmadan ıkarılma Kriterleri

OPU (oocyte pick-up) günü oosit alınamayan çift araştırmadan çıkarılmıştır. Semende sperme rastlanmayan (azospermik) birey ve eşi araştırmadan çıkarılmıştır.

### 3.2. HASTADAN SEMEN ÖRNEĞİNİN ALINMASI

1. OPU (yumurta toplama) günü ejakülat vermek için gelen hastaya ejakülat verme odasında vereceği ejaklatın kendisine ait olduğunu belirten bir onam formu imzalatılır.
2. Semen verecek olan hastaya ejakülat verme teknikleri ayrıntılarıyla anlatılır.
3. Semen rneği, steril kapalı kap içinde kabul edilir.
4. Ejakülat vereceği kap, hastanın gözü önünde açılır.
5. Steril ejakülat kabının içerisine eliyle temas etmeden, semeni tek seferde mastürbasyon yoluyla kabın içerisine vermesi istenir.
6. Ejakülat vermeden önce ellerini yıkaması ve kurulaması, örnek verirken vazelin, krem, jel kullanmadan vermesi gerektiği belirtilir.
7. Ejaklatın steril semen verme kabı içine alındıktan sonra ağzının sıkıca kapatılması, rneği zaman geçmeden androloji laboratuvarına teslim etmesi gerektiği söylenir.
8. Ejaklatın tamamının örnek kabının içerisine alındığından emin olunmalı, özellikle ejaklatın ilk kısmının sperm yoğunluğu açısından en zengin kısım olduğu açıklanır ve kabın dışarısına kaçırmadan ejaklatı vermesi gerektiği belirtilir.
9. Hastaya semen kabı teslim edilmeden hemen önce semenin alındığı saat, hasta adı, hastanın da göreceği şekilde kutu üzerine cam kalemiyle yazılır. Yazı için gazlı kalem kullanılmamalıdır çünkü spermatotoksik madde içeriğinden dolayı ve sperm motilitesi ve vitalitesi etkilenebilir.

### 3.3. ALINAN ÖRNEĞİN LİKEFASİYON İÇİN MUHAFAZA EDİLMESİ

Ejekülat steril kapalı kap içerisinde teslim alındıktan sonra, içerisindeki örnek herhangi bir kontaminasyona uğramadan likefaksiyon için 37°C'de inkübatörde 15 dakika bekletilir.

### 3.4. UYGULANAN SPERM HAZIRLAMA TEKNİKLERİ

#### 3.4.1. Swim-Up

1. 15-30 dakika 37°C'de likefiye olmuş semen örneği, pasteur pipetiyle (Falcon® Disposable Transfer Pipets 3ml) homojenize edilir.
2. Konik bir tüpe (Falcon 15ml Conical Centrifuge Tubes) likefiye olmuş ve homojenize edilmiş semenden 2 ml alınarak aktarılır. Üzerine 1:1 oranında, 2 ml sperm yıkama medyumunu (Irvine Scientific Sperm Washing Medium) eklenip tekrar homojenize edilir.
3. Konik tüp, 1600 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. İşlem sonrasında pellet oluşur. Pellet üzerinde kalan seminal plazma ve medyum karışımı pasteur pipetiyle atılır.
4. Tüpteki pellet üzerine 1,5 – 2 ml sperm yıkama medyumunu tekrar eklenip ve homojenize edilir, 1600 rpm'de 5dk santrifüj edildikten sonra pellet üzerindeki seminal plazma ve medyum karışımı pasteur pipetiyle atılır.
5. Konik tüp, zeminle 45° 'lik açı yapacak şekilde üzerine 0,3 – 0,5 ml sperm yıkama medyumunu eklenip ve 37°C'de yüzdürmeye bırakılır. Yüzdürme işlemi 45°'lik roklar içerisinde gerçekleştirilir.
6. İnkübasyona bırakılan konik tüp üzerindeki medyumun bulanıklaştığı gözlemlenmelidir. Spermin yüzmesi için 60 dakikalık bir inkübasyon gerekmektedir.
7. Pellet üzerindeki sperm yıkama medyumununun yüzeyinden cam pasteur pipeti ile 0,1 – 0,4 ml çekilerek Falcon Round-Bottom Tubes 5 ml içerisine aktarılır.
8. Aktarılan kısmın, protokolün düzgün işlediğinin teyidi amaçlı lam-lamel arası preparat incelemesinin yapılması gerekir.

### 3.4.2. Dansite Gradyent

1. 15-30 dakika 37°C'de likefiye olmuş semen örneği, pasteur pipetiyle (Falcon® Disposable Transfer Pipets 3ml) homojenize edilir.
2. Konik bir tüpe (Falcon 15ml Conical Centrifuge Tubes) 0,5 ml %80'lik gradyent medyumunu üzerine 0,5 ml %40'lık gradyent medyumunu birbirine karışmayacak şekilde eklenir.
3. 1,5- 2 ml likefiye olmuş semen %80'lik ve %40'lık gradyent medyumlarının üzerine birbirlerine karışmayacak şekilde eklenir. Semen, %40 ve %80'lik medyum içeren 3 katmanlı tabaka oluşur.
4. Konik tüp, 1300 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
5. 0,5 ml %80 lik kısım pasteur pipeti ile çekilip ve atılır. Üzerine 1 ml sperm yıkama medyumunu (Irvine Scientific Sperm Washing Medium) eklenir ve homojenize edilir.
6. Konik tüp, 2600 rpm'de 8 dakika santrifüj edilir. Süpernatant, tüpün içerisinde kalan hacim (pellet+süpernatant) 0,5 ml oluncaya kadar çekilip atılır.
7. Üzerine 1 ml sperm yıkama medyumunu eklenir ve homojenize edilir. Daha sonra tekrar 2600 rpm'de 8 dakika santrifüj edilir.
8. Konik tüpün içerisinde kalan kısım 0,3 ml olacak şekilde geriye kalan kısım çekilip atılır.
9. 0,3 ml kısım homojenize edilir lam-lamel arası preparat incelemesinden sonra Falcon Round-Bottom Tubes 5 ml içerisine aktarılır.

### 3.5. YUMURTA TOPLAMA İŞLEMİ (OOCYTE PICK-UP - OPU)

Ovaryumlara tek veya çift lümenli iğnelerle girilerek, folüküllerin yıkama sıvısıyla (flush medyum) yıkanıp oositlerin negatif basınç aracılığıyla steril tüplere alınıp, bu tüplerin içerisindeki sıvının ışık mikroskobu altında oositlerin toplanması işlemidir. Folikül yıkama solüsyonları, Flush medyumunu gibi medyumlar dış ortam medyumunu olduğu için pH sabitleyici bir tampon, kan pıhtılaşmalarını önlemek için heparin içermektedir.

#### Yumurta toplama işlemi prosedürleri:

1. Ultrason vajinal prob ve ucunda steril opu iğnesi (tek veya çift lümenli) aracılığıyla transjainal folikül aspirasyonu gerçekleştirilir.
2. Tüplerin ısıtıcı blok içerisinde 37°C olması gerekmektedir.
3. Aspirasyon tüplerinin, inceleme için döküldüğü petri dishleri yine 37°C olmalıdır.
4. Flush medyum 37°C olmalı aspirasyonda bu ısının düşmeden korunarak işlemin gerçekleştirilmesi önemlidir.
5. Negatif basınç aracılığıyla folüküllerin içerisindeki oosit kümülüs-korana kompleksleri Falcon Round-Bottom 17x100 mm tüplere alınır.
6. Aspirasyon tüpleri, hemşire aracılığıyla embriyoloji laboratuvarına iletilir.
7. Aspirasyon tüpleri ışığa maruz bırakılmadan, embriyolog aracılığıyla 100x15 mm 'lik petri dishine dökülüp; tüpün içerisinde kalabilecek kalıntıları tekrar toplamak için flush medyum ile yıkanır.
8. Folikül sıvısı içeren tüpler mikroskop altında incelendikten sonra toplanan oositler, OPU sabahı hazırlanan %5 HSA içeren HTF medyumunun bulunduğu üzeri mineral yağ ile kapatılmış daha küçük dishlere alınır ve kümülüs tabakası disekte edilir. (HSA içeren HTF medyumunu OPU işleminden bir gün önce hazırlanmış olmalıdır).
9. Diseksiyon, ucu eğri insülin enjektörü ile yapılmalıdır. Embriyolog sağ ve sol eline birer insülin enjektörü alıp ve bir eliyle kümülüs hücrelerini dish'in tabanına sabitleyip diğer eliyle de kümülüs tabakasını mekanik yolla oositten ayırır.
10. Diseksiyon işleminden sonra oosit, steril cam pastör pipetleri yardımıyla oositin çapına uygun olan büyüklükteki polish yapılmış bir cam pastör pipetiyle kültür medyumlarına aktarılır.
11. Kültür medyumlarında 2 saat inkübe edildikten sonra denüstasyon işlemine geçilir.

### 3.6. OOSİT SOYMA İŞLEMİ (DENÜDASYON)

ICSI işleminin başarıyla gerçekleştirilebilmesi için kümülüs hücreleri oositten ayıklanmalıdır. Diseksiyon işleminin doğru yapılmış olması, denüstasyon işleminin daha kaliteli yapılmasına olanak sağlar. Diseksiyon sırasında iyi disekte edilmemiş veya yıkanmamış artık kalan kümülüs hücreleri, denüstasyon sırasında oositlerin cam pastör pipeti iç yüzeyine yapışmasına ve işlemin daha zor gerçekleşmesi hatta işlemin kalitesinin daha kötü olmasına neden olmaktadır. Diseksiyondan arta kalan daha büyük kümülüs tabakasına sahip oositler daha uzun süreler denüstasyon için enzimatik ortamda bekletilmekte ve bu da oosite zarar vermektedir. Denüstasyon hem mekanik hem kimyasal bir işlemdir. Mekanik kısım için oositler enzim içerisinde bekletilmeli, ucu farklı büyüklükteki pipetlerle al-ver yapılarak işlem gerçekleştirilmelidir. Kimyasal kısmı için ticari olarak mevcut hyaluronidaz enzimi kullanılmaktadır. Hyaluronidaz enzimi içerisinde oosit 10 saniyeden fazla tutulmamalıdır. Denüstasyon işleminde çok fazla oosit varsa bütün oositler aynı anda değil işlem birkaç parçaya bölünerek tekrarlanmalıdır. Enzim içerisinden alınan KOK (kümülüs-oosit-kompleksi) farklı damlacıklarda seyreltilip mekanik işleminde etkisiyle kümülüsten arındığı gözlenir ve işlem sonrası tekrar kültür ortamına alınır.

### 3.7. İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU (Intracytoplasmic Sperm Injection - ICSI)

#### 3.7.1. ICSI Dishlerinin Hazırlanması

Sperm havuzu, sperm toplama damlacığı, oosit mikroenjeksiyon damlacıkları, PVP ve yıkama damlacıkları %5'lik HSA içeren HTF (HEPES'li) medyumunu ile hazırlanır. Toplamda 11 adet 5 µl'lik damlacık, 1 adet 50 µl'lik sperm toplama havuzu ve 2 adet 5 µl'lik yıkama damlacıkları ve 5 µl'lik PVP havuzu hazırlanır. Bütün damlacıkların üzeri kapanacak şekilde mineral yağ ile kapatılır ve inkübe edilir. PVP havuzu, ICSI işleminden 1 saat kadar önce %5'lik HSA içeren HTF (HEPES'li HTF) çekilerek üzerine PVP basılır.

### 3.7.2. ICSI PROTOKÜLÜ

1. 30° açılı mikroenjeksiyon ve holding pipetleri uç kısımları zemine paralel olacak şekilde manipülatörün kolları sabitlenir.
2. Spermeler hareketsiz ise pertoksifilin türevli medyumlar sperm havuzunun üzerine doğrudan basılabileceği gibi, morfolojik açıdan seçim yapılması gerekiyorsa sperm toplama damlacığına götürülebilir veya mikroenjeksiyon pipetine hareketli spermeler doğrudan alınıp PVP damlacığına götürülerek sperm immobilizasyonu ve sperm aktivasyonu gerçekleştirilir.
3. Spermeler kuyruk kırma işleminden sonra mikroenjeksiyon pipetinin içerisine alınabilecek en az PVP medyumunu ile birlikte alınır.
4. Holding pipeti, oositi 1.kutup cisimciği saat 12 hizasında olacak şekilde konumlandırılarak tutulur.
5. ICSI mikroenjeksiyon pipeti ve holding pipeti paralel olacak şekilde konumlandırılır.
6. Pipetlerin oosite aynı düzlemde olması gerekir. ICSI pipeti PVP damlacığının kenarına götürülüp, PVP damlacığı kenar çizgisi ICSI pipetiyle net olacak şekilde ayarlanır.
7. Oosit sitoplazmasının içine girildikten sonra oolemmenin tamamen delinebilmesi için oosit sitoplazmasının çok az bir kısmı ICSI pipetine çekilip ve oolemmenin tamamen delindiğinden emin olunduktan sonra bir adet sperm hücresi oosit sitoplazmasının içerisine bırakılır.

### 3.8. SPERMAC BOYAMA PROSEDÜRÜ

1. Likefiye olmuş semen preparat yayması yapıldıktan sonra 25°C'de 15-20 dakika bekletilip ve kurumaması sağlanır.
2. Lam, FIX isimli fiksatif solüsyonunda 15 saniye veya 48 saat aralığında olmak üzere fiksasyona maruz bırakılır.
3. FIX solüsyonundan çıkartılan lam 10 kez distile suyun dolu olduğu yıkama şalesine batırılıp çıkartılarak yıkanır, kurutma kağıdıyla fazla su sızdırılır.

4. SPERMAC A solüsyonunda 90 saniye bekletilir.
5. Lam, 10 kez distile suyun dolu olduğu yıkama şalesine batırılıp çıkartılarak yıkanır, kurutma kağıdıyla fazla su sızdırılır.
6. SPERMAC B solüsyonunda 90 saniye bekletilir.
7. Lam, 10 kez distile suyun dolu olduğu yıkama şalesine batırılıp çıkartılarak yıkanır, kurutma kağıdıyla fazla su sızdırılır.
8. SPERMAC C solüsyonunda 90 saniye bekletilir.
9. Lam, 10 kez distile suyun dolu olduğu yıkama şalesine batırılıp çıkartılarak yıkanır, kurutma kağıdıyla fazla su sızdırılır.
10. Oda sıcaklığında 15 dakika kuruması sağlanır.
11. Bin kat (1000X) büyütmede ışık mikroskopunda immersiyon yağıyla mikroskopik inceleme yapılır.

### **3.9. SPERM DNA FRAGMENTASYONU TESPİTİ İÇİN TOLUIDİN BLUE BOYAMA TEKNİĞİ**

1. Semen 37°C'de 15 dakika likefaksiyona maruz kaldıktan sonra lam üzerine preparat yayması yapılır. Preparat 15 dakika havada kurutulur.
2. Kuru preparat yaymaları 96% Ethanol : Acetone (1:1) ile 4°C de 30 dakika fikse edilip ve havada kurutulur. (Oda sıcaklığında 1 ay saklanabilmektedir)
3. Preparatlar 4°C'de 5 dakika 0.1 N HCl de hidroliz edilip ve distile su içinde 3 kere her birinde 2 dakika olmak üzere yıkanır.
4. Boyama için %0,05 Toluidine blue (Gurr-BDH Chemicals Ltd., Poole, UK) içinde 5 dakika bekletilir.
5. Boyama tamponu, 50% McIlvain's citrate phosphate tamponu (pH 3.5) içerir.
6. Lamlar kısa bir süre distile su ile dolu yıkama şalesinde yıkanır ve alt yüzey kurutma kağıdı ile kurulanır.
7. Değerlendirme, bin kat (1000X) büyütme altında immersiyon yağı ve objektifi kullanılarak yapılır. Preparatın farklı bölgelerinden minimum 500 hücre sayılarak değerlendirilir. Aydınlık sperm hücre başı: açık mor (LV),



mavi (B) açık mavi (LB) renginde görünenler normal DNA bütünlüğüne sahip olarak skorlanır. Koyu olanlar: koyu mavi (DB), mor (V) renginde görünenler ise hasarlı DNA bütünlüğüne sahip olarak skorlanır.

### 3.10. EMBRİYO SKORLAMASI

#### 3.10.1. 3.Gün Embriyo Skorlaması

Grade 1: Embriyo blastomerleri eşit büyüklükte ve fragmantasyon içermemektedir.

Grade 2: Embriyo blastomerleri eşit büyüklükte ve düşük oranda fragmantasyon içermektedir.

Grade 3: Embriyo blastomerlerinin büyüklüğü farklı ancak bu fark çok belirgin değildir. Fragmantasyon oranı az veya hiç yoktur.

Grade 4: Embriyo blastomerleri eşit veya eşit olmayan büyüklükte. Fragmantasyon oranı oldukça yüksektir.

Grade 5: : Embriyo blastomerleri herhangi bir boyuttadır. Çok fazla oranda ya da embriyonun tamamını kaplamış fragmantasyona sahiptir.

Verilerin analizinde istatistiki hesaplamanın yapılabilmesi için verilerin yetersizliği, istatistiki hesaplamanın varsayımlarının yerine getirilebilmesi için grupların birleştirilmesi yapılmıştır. Buna göre 3.gün embriyolarının skorlaması (55);

Grade 1: Embriyo blastomerleri eşit büyüklükte, homojen ve fragmantasyon içermemektedir.

Grade 2: Embriyo blastomerlerin biraz bozuk veya düzensiz bir şekilde olduğu ve fragmantasyon oranı %10'a kadar olan embriyolardır.

Grade 3: Embriyo blastomerleri herhangi bir boyuttadır , homojen ve eşit dağılımlı değildir. %50'ye kadar fragmantasyon içermektedirler.

### 3.10.2. 5.Gün Embriyo Skorlaması

Blastokist embriyolar Gardner ve ark. (53) kriterlerine göre:

Grade 1: Early blastosist - blastosel embriyonun hacminin yarısından daha azdır.

Grade 2: Blastosist - blastosel embriyonun hacminin yarısından daha büyük veya eşittir.

Grade 3: Full blastosist - blastosel embriyoyu tamamen doldurur.

Grade 4: Expanded blastosist – blastosel hacmi erken embriyonunkinden daha büyüktür ve zona pellucida incelmıştır.

Grade 5: Hatching blastosist – Trofoektoderm hücresi zona pellucida'dan çıkmaktadır.

Grade 6: Hatched blastosist – Blastosist zona pellucida'dan tamamen dışarı çıkmıştır.

İç hücre kitlesi ve trofoektoderm tabakası sınıflandırması grade 3'ten grade 6'ya kadar olan embriyolar için yapılmalıdır.

Buna göre:

A: İç hücre kitlesindeki hücreler sıkıca paketlenmiş ve birçok hücre bulunmaktadır.

B: İç hücre kitlesindeki hücreler gevşek bir şekilde paketlenmiş ve birkaç hücre bulunmaktadır.

C: İç hücre kitlesi çok az hücreden oluşmaktadır.

Trofoektoderm hücrelerinin sınıflandırması:

A: Epitelyum tabakası sıkı bir örgü oluşturmuştur ve birçok hücreden oluşmaktadır.

B: Birkaç hücreden oluşmaktadır.

C: Gevşek bir epitelyum tabakası ve çok az hücreden oluşmaktadır.

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya 63 hasta katılmıştır. Bunların 34 tanesi izole teratozoospermi olan hasta grubudur ve Grup A olarak tanımlanmıştır. Hastaların geriye kalan 29 tanesi normozoospermi olan hasta grubudur ve yüzde 4 normal ve üzeri sperm morfolojisine sahiptir, Grup B olarak tanımlanmıştır.



Tablo 2: Çalışmaya dahil edilen izole teratozoospermi (Grup A) grubu hastaların bilgileri

	Grup A		
	Ort±SS	Min.-Max.	Medyan
<b>Semen Hacmi (ml)</b>	3,456±1,509	1-6	3
<b>Sperm Konsantrasyonu (10<sup>6</sup>/ ml)</b>	32,38±18,47	2-75	35
<b>Toplam Sperm Sayısı (10<sup>6</sup>/Ejakülat)</b>	108,07±79,57	10-294	87
<b>Toplam Sperm Motilitesi (PR+NP, %)</b>	45,82±7,868	31-60	46
<b>İleriye Doğru Sperm Hareketliliği (PR, %)</b>	31,12±6,044	18-45	30
<b>Sperm Morfolojisi (Normal Formlar, %)</b>	0 (Zero Normal)		
<b>Sperm DNA Fragmantasyon Oranı</b>	23,419±11,672	4-51,5	22,75
<b>Toplanan Oosit Sayısı</b>	8,62±5,075	1-19	9
<b>Toplanan Olgun Oosit Sayısı</b>	7,21±4,491	1-18	6,5
<b>Fertilize Olan Oosit Sayısı</b>	3,88±2,371	1-10	4
<b>Fertilizasyon Oranı (%)</b>	53,88		
<b>3.Gün Gelişen Emb. Sayısı</b>	3,71±2,236	1-10	3,5
<b>3.Gün Gelişen Emb. Oranı (%)</b>	95,45		
<b>Blast Emb. Sayısı</b>	2,24±1,924	1-8	2
<b>Blast Emb. Oranı (%)</b>	57,58		
<b>Transfer Edilen Embriyo Sayısı</b>	1,68±0,475	1-2	2
<b>Gebelik Oranı (%)</b>	26,47		
<b>İmplantasyon Oranı (%)</b>	22,81		

Tablo 2'ye göre izole teratozoospermi grubu (Grup A) hastalarda ortalama semen hacmi 3,456±1,509 ml (min.-maks. 1-6 ve medyan 3) 'dir. Sperm konsantrasyonu ortalama 32,38±18,47 milyon/ml (min.-maks. 2-75 ve medyan 35) 'dir. Toplam sperm sayısı ortalaması ise 108,07±79,57 milyon/ml (min.-maks. 10-294 ve medyan 87) 'dir. Toplam sperm motilitesi ortalaması (progresif

+ non-progresif) %45,82±7,868 (min.-maks. 31-60 ve medyan 46) 'dir. İleriye doğru sperm hareketliliği ortalaması (sadece progresif) %31,12±6,044 (min.-maks. 18-45 ve medyan 30) 'dür. Kruger kriterlerine göre sperm morfolojisi zero normal hasta grubu seçilmiştir, bu hastaların sperm morfoloji analizlerinde kruger kriterlerine göre normal morfolojili sperme rastlanmamıştır. Sperm DNA fragmentasyon oranı ortalama %23,419±11,672 (min.-maks. 4-51,5 ve medyan 22,75) 'dir. Bu hasta grubundaki kadınlardan ortalama 8,62±5,075 (min.-maks. 1-19 ve medyan 9) oosit toplanmıştır. Bu toplanan oositlerin ortalama 7,21±4,491 (min.-maks. 1-18 ve medyan 6,5) tanesi olgundur. Fertilize olan oosit sayısı 3,88±2,371 (min.-maks. 1-10 ve medyan 4) 'tir. Fertilizasyon oranı ise %53,88'dir. Üçüncü gün gelişen embriyo sayısı ortalama 3,71±2,236 (min.-maks. 1-10 ve medyan 3,5) 'dir. Üçüncü gün gelişen embriyo oranı %95,45'tir. Blast embriyo sayısı ortalama 2,24±1,924 (min.-maks. 0-8 ve medyan 2) 'dür. Blast embriyo oranı %57,58 'dir. Transfer edilen embriyo sayısı ortalama 1,68±0,475 (min.-maks. 1-2 ve medyan 2) 'tir. İzole teratozoospermi hasta grubunda gebelik oranı %26,47, implantasyon oranı ise %22,81 'dir.

Tablo 3: Çalışmaya dahil edilen normozoospermi (Grup B) grubu hastaların bilgileri

	Grup B		
	Ort±SS	Min.-Max.	Medyan
<b>Semen Hacmi (ml)</b>	3,31±1,448	1-6	3,5
<b>Sperm Konsantrasyonu (10<sup>6</sup>/ ml)</b>	35,55±22,184	2-80	33
<b>Toplam Sperm Sayısı (10<sup>6</sup>/Ejakülat)</b>	108,59±81,40	12-320	77
<b>Toplam Sperm Motilitesi (PR+NP, %)</b>	51,97±12,385	30-70	51
<b>İleriye Doğru Sperm Hareketliliği (PR, %)</b>	38,55±12,243	20-60	40
<b>Sperm Morfolojisi (Normal Formlar, %)</b>	5,9±1,611	4-8	6
<b>Sperm DNA Fragmentasyon Oranı</b>	13,991±12,3	1,25-49,75	8,75
<b>Toplanan Oosit Sayısı</b>	9,76±4,564	2-17	9
<b>Toplanan Olgun Oosit Sayısı</b>	8,07±4,131	1-15	8
<b>Fertilize Olan Oosit Sayısı</b>	7,86±4,147	1-15	7
<b>Fertilizasyon Oranı (%)</b>	97,44		
<b>3.Gün Gelişen Emb. Sayısı</b>	7,41±4,339	1-15	7
<b>3.Gün Gelişen Emb. Oranı (%)</b>	94,3		
<b>Blast Emb. Sayısı</b>	6,28±3,9	1-12	6
<b>Blast Emb. Oranı (%)</b>	79,82		
<b>Transfer Edilen Embriyo Sayısı</b>	1,97±0,186	1-2	2
<b>Gebelik Oranı (%)</b>	55,17		
<b>İmplantasyon Oranı (%)</b>	40,35		

Tablo 3'e göre normozoospermi grubu (Grup B) ortalama semen hacmi 3,31±1,448 ml (min.-maks. 1-6 ve medyan 3,5) 'dir. Sperm konsantrasyonu ortalama 35,55±22,184 milyon/ml (min.-maks. 2-80 ve medyan 33) 'dir. Toplam sperm sayısı ortalama 108,59±81,40 milyon/ml (min.-maks. 12-320 ve medyan 77) 'dir. Toplam sperm motilitesi (progresif + non-progresif) ortalama

%51,97±12,385 (min.-maks. 30-70 ve medyan 51) 'tir. İleriye doğru sperm hareketliliği (sadece progresif) ortalama %38,55±12,243 (min.-maks. 20-60 ve medyan 40) 'tür. Kruger kriterlerine göre normal sperm morfolojisi ortalama %5,9±1,611 (min.-maks. 4-8 ve medyan 6) 'dir. Sperm DNA fragmantasyon oranı ortalama %13,991±12,3 (min.-maks. 1,25-49,75 ve medyan 8,75) 'tür. Bu hasta grubundaki kadınlardan ortalama 9,76±4,564 (min.-maks. 2-17 ve medyan 9) oosit toplanmıştır. Bu toplanan oositlerin ortalama 8,07±4,131 (min.-maks. 1-15 ve medyan 8) tanesi olgundur. Fertilize olan oosit sayısı 7,86±4,147 (min.-maks. 1-15 ve medyan 7) 'dir. Fertilizasyon oranı ise %97,44'tür. Üçüncü gün gelişen embriyo sayısı ortalama 7,41±4,339 (min.-maks. 1-10 ve medyan 3,5) 'dur. Üçüncü gün gelişen embriyo oranı %94,3'tür. Blast embriyo sayısı ortalama 6,28±3,9 (min.-maks. 1-12 ve medyan 6) 'dur. Blast embriyo oranı %79,82'dir. Transfer edilen embriyo sayısı ortalama 1,97±0,186 (min.-maks. 1-2 ve medyan 2) 'tir. Normozoospermi hasta grubunda gebelik oranı %55,17, implantasyon oranı ise %40,35'tir.

Tablo 4: İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının ortalamaları arasındaki ilişkiler

	<b>GRUP A</b>	<b>GRUP B</b>	<b>P</b>
<b>Hasta Sayısı</b>	34	29	
<b>Semen Hacmi (ml)</b>	3,456±1,509	3,31±1,448	NS
<b>Sperm Konsantrasyonu (10<sup>6</sup>/ ml)</b>	32,38±18,47	35,55±22,184	NS
<b>Toplam Sperm Sayısı (10<sup>6</sup>/Ejakülat)</b>	108,07±79,57	108,59±81,40	NS
<b>Toplam Sperm Motilitesi (PR+NP, %)</b>	45,82±7,868	51,97±12,385	P≤0,05
<b>İleriye Doğru Sperm Hareketliliği (PR, %)</b>	31,12±6,044	38,55±12,243	P≤0,05
<b>Sperm Morfolojisi (Normal Formlar, %)</b>	0 (Zero Normal)	5,9±1,611	P≤0,05
<b>Sperm DNA Fragmantasyon Oranı</b>	23,419±11,672	13,991±12,3	P≤0,05
<b>Toplanan Oosit Sayısı</b>	8,62±5,075	9,76±4,564	NS
<b>Toplanan Olgun Oosit Sayısı</b>	7,21±4,491	8,07±4,131	NS
<b>Fertilize Olan Oosit Sayısı</b>	3,88±2,371	7,86±4,147	P≤0,05
<b>Fertilizasyon Oranı (%)</b>	53,88	97,44	P≤0,05
<b>3.Gün Gelişen Emb. Sayısı</b>	3,71±2,236	7,41±4,339	P≤0,05
<b>3.Gün Gelişen Emb. Oranı (%)</b>	95,45	94,3	NS
<b>Blast Emb. Sayısı</b>	2,24±1,924	6,28±3,9	P≤0,05
<b>Blast Gelişim Oranı (%)</b>	57,58	79,82	P≤0,05
<b>Transfer Edilen Embriyo Sayısı</b>	1,68±0,475	1,97±0,186	P≤0,05
<b>Gebelik Oranı (%)</b>	26,47	55,17	P≤0,05
<b>İmplantasyon Oranı (%)</b>	22,81	40,35	P≤0,05

Tablo 4'e göre semen hacmi ortalamaları iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık 3,456±1,509 / 3,31±1,448 (p>0,05) göstermemektedir. Sperm konsantrasyonu (10<sup>6</sup>/ ml) ortalamaları izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık



32,38±18,47 / 35,55±22,184 ( $p>0,05$ ) göstermemektedir. Toplam sperm sayısı ( $10^6$ /Ejakülat) ortalamaları izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 108,07±79,57 / 108,59±81,40 ( $p>0,05$ ) göstermemektedir. Toplam sperm motilitesi ortalamaları izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 45,82±7,868 / 51,97±12,385 ( $P \leq 0,05$ ) göstermiştir. Benzer şekilde ileriye doğru sperm hareketliliği ortalamaları izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 31,12±6,044 / 38,55±12,243 ( $P \leq 0,05$ ) göstermiştir. İzole teratozoospermi ve normozoospermi hasta grubunda normal sperm morfolojisi skoru ortalamaları istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir ( $P \leq 0,05$ ). Sperm DNA fragmentasyon oranı ortalamaları izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 23,419±11,672 / 13,991±12,3 göstermiştir ( $P \leq 0,05$ ). Toplanan oosit sayısı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 8,62±5,075 / 9,76±4,564 ( $p>0,05$ ) göstermemektedir. Toplanan olgun (M2) oosit sayısı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 7,21±4,491 / 8,07±4,131 ( $p>0,05$ ) göstermemiştir. Fertilize olan oosit sayısı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 3,88±2,371 / 7,86±4,147 ( $P \leq 0,05$ ) göstermiştir. Fertilizasyon oranı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 53,88 / 97,44 ( $P \leq 0,05$ ) göstermiştir. Üçüncü gün gelişen embriyo sayısı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık göstermiş olsa da 3,71±2,236 / 7,41±4,339 ( $P \leq 0,05$ ), üçüncü gün gelişen embriyo oranları izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 95,45 / 94,3 ( $p>0,05$ ) göstermemiştir. Blast embriyo sayısı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 2,24±1,924 / 6,28±3,9 ( $P \leq 0,05$ ) göstermiştir. Blast embriyo gelişim oranı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatikselsel olarak anlamlı bir farklılık 57,58 / 79,82 ( $P \leq 0,05$ ) göstermiştir. Transfer edilen embriyo sayısı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık  $1,68 \pm 0,475 / 1,97 \pm 0,186$  ( $P \leq 0,05$ ) göstermiştir. Gebelik oranı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık  $26,47 / 55,17$  ( $P \leq 0,05$ ) göstermiştir. İmplantasyon oranı izole teratozoospermi ve normozoospermi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık  $22,81 / 40,35$  ( $P \leq 0,05$ ) göstermiştir.



Tablo 5: İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının sperm DNA fragmantasyon oranlarına göre 3.günde gelişen embriyo skorlaması. (Grade 1: Embriyo blastomerleri eşit büyüklükte, homojen ve fragmantasyon içermemektedir. Grade 2: Embriyo blastomerlerin biraz bozuk veya düzensiz bir şekilde olduğu ve fragmantasyon oranı %10'a kadar olan embriyolardır. Grade 3: Embriyo blastomerleri herhangi bir boyuttadır, homojen ve eşit dağılımlı değildir. %50'ye kadar fragmantasyon içermektedirler.)

	SDFO (%)	3.Gün Embriyo Gelişimleri							
		Grade 1		Grade 2		Grade 3		Arrest	
		n	%	n	%	n	%	n	%
GRUP A	0-10	8/18	44,4	8/18	44,4	2/18	11,1	0	0
	11-20	6/32	18,8	16/32	50	9/32	28,1	1/32	3,1
	21-30	5/41	12,2	28/41	68,3	6/41	14,6	2/41	4,9
	30>	1/41	2,4	16/41	39	21/41	51,2	3/41	7,3
GRUP B	0-10	96/133	72,2	28/133	21,1	5/133	3,8	4/133	3
	11-20	26/50	52	20/50	40	1/50	2	3/50	6
	21-30	5/32	15,6	19/32	59,4	4/32	12,5	4/32	12,5
	30>	1/13	7,7	8/13	61,5	2/13	15,4	2/13	15,4

$P \leq 0,05$

Tablo 5'e göre üçüncü günde izole teratozoospermik grupta yer alan çiftlerin embriyo gelişim kaliteleri ile sperm DNA fragmantasyon oranları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde ( $P \leq 0,05$ ) bir ilişki vardır. Bu ilişki sperm DNA fragmantasyon oranı %0-10 arasında olan grupta grade 1 de %44,4'tür ve bu değer istatistiksel açıdan anlamlıdır. Sperm DNA fragmantasyon oranının en düşük olduğu bu aralıkta iyi kalitede embriyo gelişmesi beklenen bir durumdur. Sperm DNA fragmantasyon oranı %11-20 olduğu aralıkta grade 2'de %50 iken

grade 1'de %18,8'dir. Sperm DNA fragmentasyon oranının %11-20 olduğu bu aralıkta embriyolar grade 2'de daha fazla gelişim göstermiştir. Sperm DNA fragmentasyon oranı %21-30 olduğu aralıkta grade 2'de %68'3'tür. Sperm DNA fragmentasyon oranının %21-30 olduğu bu aralıkta embriyolar grade 2'de diğer bütün gruplara oranla daha fazla gelişim göstermiştir. Sperm DNA fragmentasyon oranı %30 ve üzeri olduğu grupta grade 3'te %51,2'dir. Sperm DNA fragmentasyon oranının %30 ve üzeri olduğu grupta embriyolar grade 3'de diğer bütün gruplara oranla daha fazla gelişim göstermiştir. Bu bakımdan üçüncü günde izole teratozoospermik grupta sperm DNA fragmentasyon oranı arttıkça gelişen embriyo kalitesi düşmüştür, arrest oranı artmıştır.

Tablo 5'e göre üçüncü günde normozoospermik grupta yer alan çiftlerin embriyo gelişim kaliteleri ile sperm DNA fragmentasyon oranları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde ( $P \leq 0,05$ ) bir ilişki vardır. Bu ilişki sperm DNA fragmentasyon oranı %0-10 arasında olan grupta grade 1'de %72,2'dir. Sperm DNA fragmentasyon oranının en düşük olduğu bu aralıkta iyi kalitede embriyo gelişmesi beklenen bir durumdur. Sperm DNA fragmentasyon oranı %11-20 olduğu aralıkta grade 1'de %52 iken grade 2'de %40'tır. Sperm DNA fragmentasyon oranının %11-20 olduğu bu aralıkta embriyolar grade 1'de daha fazla gelişim göstermiştir. Sperm DNA fragmentasyon oranı %21-30 olduğu aralıkta grade 2'de %59,4 iken grade 1'de %15,6'dir. Sperm DNA fragmentasyon oranının %21-30 olduğu bu aralıkta embriyolar grade 2'de daha fazla gelişim göstermiştir. Sperm DNA fragmentasyon oranı %21-30 olduğu aralıkta grade 3 oranında beklenen değer üstünde çıkmıştır ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlıdır. Sperm DNA fragmentasyon oranı %30 ve üzeri olduğu grupta grade 2'de %61,5'tir ve istatistiksel açıdan anlamlıdır. Bu bakımdan üçüncü günde normozoospermik grupta sperm DNA fragmentasyon oranı arttıkça grade 1 aşamasına ulaşan embriyo oranı düşmüştür. Arrest oranları birbirlerine yakın değerlerdedir.

Tablo 6: İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının sperm DNA fragmantasyon oranlarına göre 5.günde gelişen embriyo skorlaması. (Grade 1: Expanded blastosist ve üzerinde gelişim gösteren embriyolar, Grade 2: Full blastosist, Grade 3: Early blastosist, Grade 4: Kavitasyon embriyo, Grade 5: Kompaktlaşma aşamasındaki embriyo)

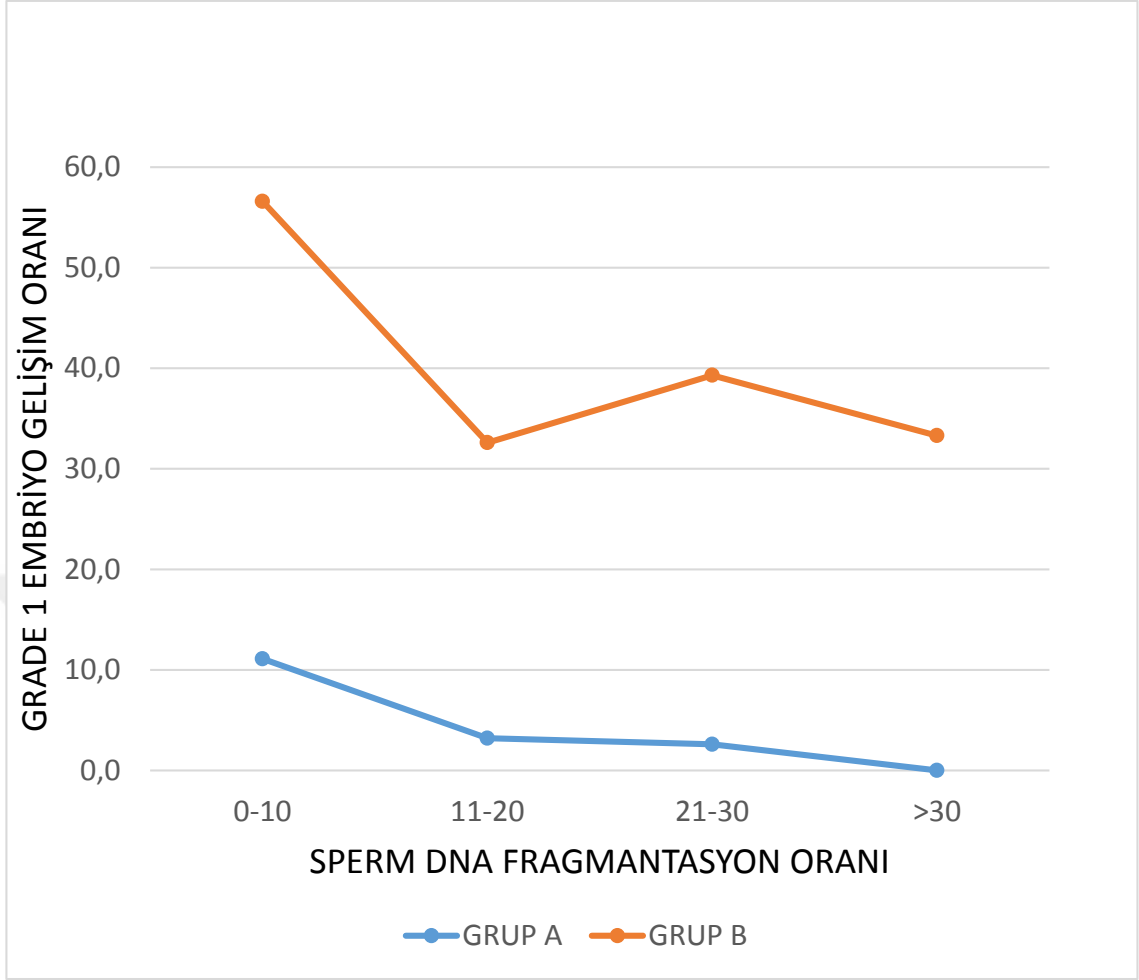
	SDF O (%)	5.Gün Embriyo Gelişimleri											
		Grade 1		Grade 2		Grade 3		Grade 4		Grade 5		Arrest	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
GRUP A	0-10	2/18	11,1	4/18	22,2	2/18	11,1	7/18	38,9	2/18	11,1	1/18	5,6
	11-20	1/31	3,2	13/31	41,9	10/31	32,3	3/31	9,7	3/31	9,7	1/31	3,2
	21-30	1/39	2,6	7/39	17,9	14/39	35,9	10/39	25,6	5/39	12,8	2/39	5,1
	30>	0	0	4/38	10,5	18/38	47,4	4/38	10,5	8/38	21,1	4/38	10,5
GRUP B	0-10	73/129	56,6	33/129	25,6	7/129	5,4	12/129	9,3	3/129	2,3	1/129	0,8
	11-20	14/43	32,6	22/43	51,2	0	0	3/43	7	2/43	4,7	2/43	4,7
	21-30	11/28	39,3	7/28	25	3/28	10,7	2/28	7,1	3/28	10,7	2/28	7,1
	30>	5/15	33,3	4/15	26,7	3/15	20	0	0	1/15	6,7	2/15	13,3

$P \leq 0,05$

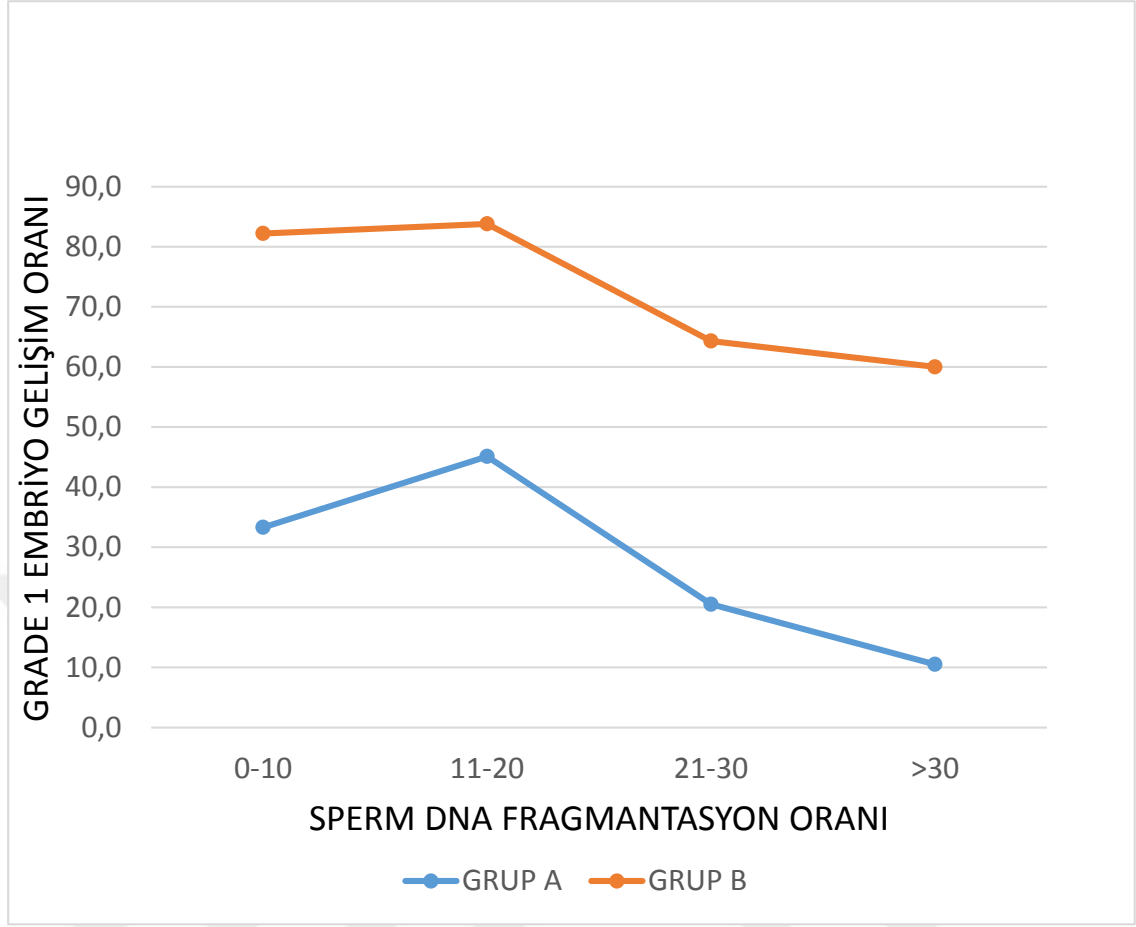
Tablo 6'ya göre beşinci günde izole teratozoospermik grupta yer alan çiftlerin embriyo gelişim kaliteleri ile sperm DNA fragmantasyon oranları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde ( $P \leq 0,05$ ) bir ilişki vardır. Bu ilişki sperm DNA fragmantasyon oranı %0-10 arasında ve embriyo gelişim kalitesi grade 1'de olan hastalarda %11,1'dir ve bu oran diğer bütün gruplarda grade 1 embriyo kalitesi açısından en yüksektir. Sperm DNA fragmantasyonunun en düşük olduğu bu grupta grade 1 embriyo geliştirme oranı en yüksek olması beklenen

bir durumdur. Aynı zamanda grade 4'te %38,9'luk bir değerle istatistiksel açıdan anlamlıdır bu grade 4'te embriyoların gelişimlerini yavaşlatmıştır. Sperm DNA fragmentasyon oranı %11-20 olduğu aralıkta grade 2'de %41,9 iken grade 1'de %3,2'dir. Sperm DNA fragmentasyon oranının %11-20 olduğu bu aralıkta grade 2 embriyo gelişim kalitesi diğer bütün gruplardan daha yüksektir. Sperm DNA fragmentasyon oranı %21-30 olduğu aralıkta grade 3'de %35,9'dur ve istatistiksel açıdan anlamlıdır. Sperm DNA fragmentasyon oranı %30 ve üzeri olduğu grupta grade 1 embriyo gelişimi gözlemlenmemiştir, grade 3 embriyo gelişim oranı %47,4'tür ve bu değer diğer bütün gruplardan daha yüksektir ve grade 5 embriyo gelişim oranı diğer bütün gruplardan yüksektir, değerler istatistiksel açıdan anlamlıdır ve gelişim yavaşlamıştır. Bu bakımdan beşinci günde izole teratozoospermik grupta sperm DNA fragmentasyon oranı arttıkça gelişen embriyolar grade 2, grade 3'de embriyo gelişimleri yavaşlamıştır. Embriyo arrest oranları ise sperm dna fragmentasyon oranı arttıkça artmıştır.

Tablo 6'ya göre beşinci günde normozoospermik grupta yer alan çiftlerin embriyo gelişim kaliteleri ile sperm DNA fragmentasyon oranları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde ( $P \leq 0,05$ ) bir ilişki vardır. Bu ilişki sperm DNA fragmentasyon oranı %0-10 arasında ve grade 1 embriyo gelişim kalitesine sahip olan hastalarda %56,6'dır. Sperm DNA fragmentasyonunun en düşük olduğu bu grupta grade 1 embriyo geliştirme oranı en yüksek olması beklenen bir durumdur. Sperm DNA fragmentasyon oranı %11-20 olduğu aralıkta grade 2'de %51,2'dir. Sperm DNA fragmentasyon oranının %11-20 olduğu bu aralıkta grade 2 embriyo gelişim kalitesi diğer bütün gruplardan gözlenen ve beklenen değerler göz önünde bulundurulduğunda en yüksektir. Sperm DNA fragmentasyon oranı %21-30 olduğu aralıkta grade 5'te %10,7 oranında gelişim göstermiştir. Grade 5 evresindeki beşinci gün embriyolarında gözlenen ve beklenen değerler göz önünde bulundurulduğunda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık ortaya koymuştur ve bu evrede embriyolar yavaşlamaya başlamıştır. Sperm DNA fragmentasyon oranı %30 ve üzeri olduğu grupta değerler birbirine çok yakındır, gözlenen değerler beklenen değerleri geçememiştir.



Grafik 1: 5.gün Grade 1 embriyo gelişim oranlarının izole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarında sperm DNA fragmentasyon oranlarındaki değişime göre karşılaştırılması



Grafik 2: 5.gün Grade 1 ve Grade 2 embriyo gelişim oranları toplamının izole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarında sperm DNA fragmentasyon oranlarındaki değişime göre karşılaştırılması



Tablo 7: İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının 5.günde gelişen embriyo skorlaması. (Grade 1: Expanded blastosist ve üzerinde gelişim gösteren embriyolar, Grade 2: Full blastosist, Grade 3: Early blastosist, Grade 4: Kaviteasyon embriyo, Grade 5: Kompaktlaşma aşamasındaki embriyo)

5.Gün Embriyo Gelişimleri												
	Grade 1		Grade 2		Grade 3		Grade 4		Grade 5		Arrest	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>GRUP A</b>	4/126	3,2	28/126	22,2	44/126	34,9	24/126	19	18/126	14,3	8/126	6,3
<b>GRUP B</b>	103/215	47,9	66/215	30,7	13/215	6	17/215	7,9	9/215	4,2	7/215	3,3

$P \leq 0,05$

Tablo 7'ye göre Grup A ve grup B yer alan çiftlerin sperm morfolojileri ile embriyo gelişim kaliteleri arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde ( $P \leq 0,05$ ) bir ilişki vardır. İzole teratozoospermik grupta yer alan çiftlerin grade 3, grade 4, grade 5 embriyo oranları sırasıyla %34,9, %19 ve %14,3'tür, arrest oranı ise %6,3 tür, bu değerler gözlenen beklenen değer açısından istatistiksel açıdan anlamlıdır.

Tablo 7'ye göre normozoospermik grupta ise grade 1 ve grade 2 embriyo gelişimi sırasıyla %47,9 ve %30,7'dir ve gözlenen beklenen değer açısından istatistiksel açıdan anlamlıdır.

Normozoospermik grup grade 1 embriyo geliştirme açısından daha başarılıdır.

Tablo 8: İzole teratozoospermi (Grup A) ve normozoospermi (Grup B) gruplarının sperm DNA fragmentasyon oranlarına göre gebelik oranlarının karşılaştırılması

		GEBELİK			
		POZİTİF		NEGATİF	
		n	%	n	%
GRUP A	0-20	7/15	46,7	8/15	53,3
	21>	2/19	10,5	17/19	89,5
GRUP B	0-20	14/23	60,9	9/23	39,1
	21>	2/6	33,3	4/6	66,7

Grup A:  $p \leq 0,05$

Grup B:  $p > 0,05$

Tablo 8' e göre izole teratozoospermik grupta yer alan çiftlerin sperm DNA fragmentasyon oranları ile gebelik oranları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde ( $p \leq 0,05$ ) bir ilişki vardır. Buna göre izole teratozoospermik grupta sperm DNA fragmentasyon oranı %0-20 aralığındaki gebelik oranı, %21 ve üzeri sperm DNA fragmentasyon istatistiksel anlamda daha yüksektir.

Tablo 8' e göre normozoospermik grupta yer alan çiftlerin sperm DNA fragmentasyon oranları ile gebelik oranları arasında 0,05 anlamlılık düzeyinde ( $p > 0,05$ ) bir ilişki yoktur. Buna göre normozoospermik grupta sperm DNA fragmentasyon oranı %0-20 aralığındaki gebelik oranı, %21 ve üzeri sperm DNA fragmentasyon oranından daha yüksektir ancak bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir.

Tablo 9: Sperm morfolojisi ve sperm DNA fragmentasyon oranlarının korelasyonunun incelenmesi

	Sperm DNA Fragmentasyon	
	r	p
Sperm Morfolojisi	-0,418193	0,000648

P<0,01

Tablo 9'a göre sperm morfolojisi ile sperm DNA fragmentasyonu 0,01 anlamlılık düzeyinde korelasyon katsayısı -0,418193 bulunmuştur. P<0,01 olduğundan sperm morfolojisi normal sperm oranı azalırken, sperm DNA fragmentasyon oranının arttığını bize göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA

Şiddetli teratozoospermi olan hasta gruplarında ICSI işlemi sonrası fertilizasyon, gebelik oranı ve embriyo kalitesi sonuçlarını değerlendiren bir çalışmada; sperm morfolojisi %0 ve %4 arası her değerdeki çıktılarını değerlendirmiş, kontrol grubunda %5-7 arası ile %7 ve yukarısı gibi iki kategoriye ayırıp, bu değişiklikleri kontrol grubuyla karşılaştırmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde her grup için fertilizasyon oranları %74-77 aralığında dağılmıştır ve istatistiki açıdan anlamlı sonuç bulunamamıştır. Benzer şekilde %50-60 aralığında dağılmış gebelik oranları gözlemlenmiştir ve istatistiki açıdan anlamlı değildir. Blastokist embriyo kalitesi %0 normal grupta, %5 ve üzeri olan grupla kıyaslandığında yüksek çıkmış ve bu değer istatistiki açıdan anlamlıdır (37% vs. 28%;  $P < .005$ ). Ancak bu değeri daha iyi anlamak için hasta gruplarını daha ayrıntılı incelemişler ve %0 normal morfolojili hasta grubu eşlerinde primer infertilite sebebi erkek faktörü olarak saptanmış, %7 ve yukarısında ovulatuvar disfonksiyon, tubal faktör ve endometriosis gibi kadın faktörleri, çiftlerin %45'inde primer tanı olarak saptanmıştır. Buna karşılık %7 ve yukarısında motilite, sperm sayısı gibi erkek faktörleri %14 oranında saptanmıştır. Çalışma ICSI ile Kruger kriterlerine göre morfolojik inceleme yapılmış spermle fertilizasyon oranları, klinik gebelik oranları ve blastokist embriyo kalitesi arasında bir ilişki bulunamamıştır (56).

Sperm morfolojisini Kruger kriterlerine göre değerlendirip normal sperm oranını %4 ve altını kötü, %4-14 arasını iyi, %14'ten büyük olanları çok iyi olmak üzere üç grup altında inceleyen bir başka çalışmada fertilizasyon, gebelik ve implantasyon oranları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (57).

Konvensiyonel IVF ve ICSI ile yapılan olguların morfoloji gruplandırmalarında Kruger kriterleri kullanılıp grupları normal sperm oranı %5 altındakiler, %5-9 arasındakiler ve %10'dan büyük morfolojili olmak üzere üç grup altında inceleyen bir başka çalışmada konvensiyonel IVF sonuçlarında normal sperm morfolojisi %10'dan büyük olan grupta olan grupta %68 fertilizasyon, %10'dan küçük olan grupta ise %54 fertilizasyon gözlemlenmiş, bu farklılık istatistiksel

açından anlamlı bulunmuştur ( $P=0.00002$ ). Normal morfolojili sperm oranı %5 altında olan grupta fertilizasyon oranı %35 bulunmuş ve iyi prognoz gösteren gruptan istatistiksel açıdan önemli ölçüde düşük değerde anlamlı sonuç verdiğini göstermiştir ( $p=0.016$ ). Gebelik oranları bütün gruplarda beklenen değerde çıkmış ve farklılık gruplar arasında gözlemlenmemiştir. ICSI tedavisi uygulanmış grupta fertilizasyon ve gebelik oranları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu çalışma literatürde %14 olan normal morfoloji sınırının %10'a çekilmesinin ve yeni cut-off değeri olabileceğinin altını çizmiştir (58).

Sperm DNA fragmantasyonu ile sperm morfolojisini karşılaştıran bir çalışmada 19 hasta üzerinde yapılan klinik araştırma sonucunda fertil grupta, sperm DNA fragmantasyonu ile normal morfolojili sperm ilişkisi göstermemiştir. Ancak infertil grupta normal morfolojili spermle (%4 ve üzeri) ilişki göstermiştir (59). Bunun yanında sperm DNA fragmantasyonu ile sperm morfolojisi arasında negatif korelasyonun olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur (60-71).

Simon ve arkadaşları infertil hastalarda sperm DNA fragmantasyon oranının embriyonik gelişime etkisini inceleyen bir çalışmada IVF ve ICSI tedavisi sonrasında gelişen embriyoları ikinci, üçüncü ve beşinci gün gözlemlemişler ve gelişim kalitelerini iyi orta ve kötü olarak gruplandırıp sperm dna fragmantasyonu oranını %30 ve altı düşük, %31 ve %70 arası orta, %70 ve yukarısını yüksek sperm gruplarından nasıl etkilendiklerini incelemişlerdir. ICSI sonrası, iyi kaliteli embriyoların yüzdesinde ve sperm DNA fragmantasyon oranı arttıkça düşük kaliteli embriyoların yüzdesinde bir artış gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, klasik IVF sonrası böyle bir korelasyon gözlenmemiştir. Embriyo gelişiminin ilerlemesi, 2. günden 3. güne kadar olan DNA hasar grupları arasında istatistiksel olarak farklı değildir ( $P>0,05$ ). Ancak embriyo gelişimi 3. günden 5. güne analiz edildiğinde DNA hasar grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmüştür ( $P\leq 0,05$ ). Klinik gebelik oranları düşük DNA hasar grubunda %69,7, orta DNA hasar grubunda %68,6 ve yüksek DNA hasar grubunda %44,8 idi ve bu fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur (72).

Bizim yaptığımız çalışmada embriyonel gelişimin sperm DNA fragmentasyonu ile ilişkisi sonuçlarında en çok benzeyen çalışma Simon ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadır. Biz, beşinci günde geriden gelen embriyo ve arrest oranını da takip ettik, raporladık. Beşinci günde blast gelişimini geç expanded blast ve daha iyi gelişim kalitelerini bir grup olacak şekilde, full blast ve erken expanded blast arası gelişimi bir grup, early blast ve full blast arası gelişimi bir grup altında inceledik. Gelişen embriyo sayılarının düşük olmasından dolayı istatistiksel açıdan bir inceleme yapabilmek için bu tarz bir gruplandırma yapılması gerekmektedir. Benzer şekilde sperm DNA fragmentasyon oranı %50 ve yukarısında olan hasta sayısı az olduğundan ve embriyonel gelişimlerin takibinin bu grupta yapılmasının anlam ifade etmeyeceğinden dolayı %30 ve yukarı sperm DNA fragmentasyon oranı altına dahil ettik. Ayrıca sperm morfolojisinin iki grup altına alınıp izole teratozoospermik grupta ve normozoospermik grupta ayrı ayrı incelenmesi, her bir grup için embriyonel gelişimin sperm DNA'sından etkilenme derecesini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda ilk kez izole teratozoospermi ve normozoospermi hasta gruplarının sperm DNA fragmentasyon oranlarıyla embriyonel gelişimin büyük ölçüde etkilendiğini gözlemledik ve bu etkilenme izole teratozoospermi hasta grubunda daha şiddetli ortaya çıkmaktadır. Bu sonucun izole teratozoospermi morfolojik bozukluk sebebiyle kromatin modellemesindeki değişiklikler hep aynı ve hatalı düzeyde gerçekleşmiş olabilmesinden kaynaklanabilir. Daha önce klivaj embriyolarının evreleri ve gelişim hızlarının blastokist embriyolara dönüşmesi arasındaki ilişki gözlemlenmiştir (73-75). Bu ilişkinin iyi gelişim gösteren daha hızlı gelişen embriyolarda daha yüksek gebelik oranları sağladığını göstermiştir(76). Sperm DNA fragmentasyon oranının, embriyonik gelişim ile doğrudan ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Sperm DNA fragmentasyonunun, tamir mekanizmaları, transkripsiyon ve hücre döngüsündeki kontrol mekanizmasını etkileyebileceğini göstermiştir(77). Buna göre paternal sperm DNA'sının embriyonik bölünmeleri etkilediğini gösteren çalışmalarda mevcuttur(7).

## 6. SONUÇ

Çalışmamızda infertil 63 hastada sperm DNA fragmentasyonunun, izole teratozoospermik grupta normozoospermik gruba göre daha yüksek sperm DNA fragmentasyon oranı saptanmıştır.

Sperm DNA fragmentasyon oranı izole teratozoospermik grupta, normozoospermik gruba göre daha düşük oranda Expanded blastosist ve üstü kalitede embriyo gelişimiyle sonuçlanmıştır. İzole teratozoospermik grupta early blastosist ve full blastosist gelişim kalitesinde yavaşlama gözlenmiştir. Embriyo arrest oranları ise sperm DNA fragmentasyon oranı arttıkça artmaktadır.

İzole teratozoospermik grupta sperm DNA fragmentasyon oranı arttıkça expanded blastosist ve üstü kalitede embriyo gelişimi azalmaktadır. Normozoospermik grupta benzer şekilde sperm DNA fragmentasyon oranı arttıkça gelişen expanded blastosist ve üstü kalitede embriyo oranı azalmaktadır. İzole teratozoospermi grubunda %30 ve üzerinde hiç expanded blastosist ve üstü kalitede embriyo gelişmemiştir. Bu sonuç 5.gün embriyo gelişim kalitesinin sperm DNA fragmentasyonundan izole teratozoospermik grubun, normozoospermik gruba göre daha negatif bir biçimde etkilendiği, bu negatif etkinin izole teratozoospermik grupta çok daha şiddetli ve normal olmayan embriyo gelişimleri, yavaşlamaları ve arrest oranları ile ortaya çıktığı gözükmemektedir. Bu sonucu takiben izole teratozoospermik grupta, normozoospermik gruba göre çok daha düşük fertilizasyon oranları, çok daha düşük gebelik oranları ve çok daha düşük implantasyon oranları gözlenmektedir. Sperm DNA fragmentasyonundaki bu artış izole teratozoospermik grupta yardımcı üreme teknikleri yönteminin kesinlikle değiştirilmesi gerektiğine vurgu yapmakta veya yardımcı üreme tekniklerinde uygulanacak yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir.

IMSI yöntemi spermin baş bölgesindeki vakuolizasyonlar, akrozom, postakrozomal lamina, boyun, mitokondri, kuyruk ana parçası ya da flagellum ve nükleus kısımlarının morfolojik olarak ICSI'da saptanamayan defektlerin saptanması açısından önemlidir. Spermdeki vakuoller sperm DNA fragmentasyonula ilişkili olduğu bilinmekte, blastokist embriyo gelişiminde

negatif yönde etkilemektedir. Sperm morfolojisi ile sperm DNA fragmentasyonu arasında negatif korelasyonun olduğu bilinmekte, bu yüzden, akrozom, postakrozomal lamina, boyun, mitokondri, kuyruk ana parçası ya da flagellum ve nükleus kısımlarının altı bin altı yüz kat (6600x) büyütmede daha ayrıntılı incelenmesi ve herhangi bir defektin kaçırılmasının önüne geçmektedir. İzole teratozoospermik ve normozoospermik grupta morfolojik bozuklukların fazlalığı sebebiyle hem normal spermin seçilebilmesine (seçilen normal spermin ICSI'da görüntülenemeyen defektlerin önüne geçmesi sebebiyle), seçilen normal morfolojili sperm ile daha düşük sperm DNA fragmentasyon oranına sahip olabileceği ve daha iyi kalitede embriyolar geliştirebileceğinden IMSI, ICSI yöntemine göre avantaj sağlayacaktır.

Standart olarak kullanılan swim-up ve dansite gradyent yöntemlerinin birlikte uygulanmasının tekli sperm yıkama işlemine göre sperm DNA fragmentasyon oranını düşürmede daha etkili olduğu bilinmektedir. İzole teratozoospermik ve normozoospermik grupta sperm DNA fragmentasyonunu düşürebilmek için swim-up ve dansite gradyent kombinasyonlu sperm hazırlama tekniği kullanılması önerilir.

Dansite gradyent ve zeta yönteminin her ikisinde de işlem sonrası daha az sperm DNA fragmentasyonu saptanmış ancak zeta yöntemi, dansite gradyent yöntemine göre daha da az sperm DNA fragmentasyon oranı çıktısı vermiş ve daha fazla sayıda sperm elde edilmiştir. Sonuç olarak izole teratozoospermik ve normozoospermik grupta standart dansite gradyent yöntemine göre zeta yöntemi tercihi yapılmalıdır.

Microfluidics (Mikroakışkanlar) sistemi ve swim-up yöntemleri karşılaştırmasında, her iki yöntemde de işlem sonrası sperm DNA fragmentasyon oranını azalmış ve morfolojik açıdan normal sperm oranı artmıştır ancak Microfluidics cihazlar, swim-up yöntemine göre çok daha yüksek oranda normal morfolojili sperm elde etmekte etkili ve bu spermilerin DNA fragmentasyon oranlarının çok daha düşük çıkmasını sağlamaktadır. Sonuç olarak izole teratozoospermik ve normozoospermik grupta standart swim-up yöntemine göre Microfluidics yöntemi tercihi yapılması önerilmektedir.



## 7. KAYNAKLAR

1. Durán-Pastén ML, Fiordeliso T. GnRH-Induced Ca(2+) Signaling Patterns and Gonadotropin Secretion in Pituitary Gonadotrophs. Functional Adaptations to Both Ordinary and Extraordinary Physiological Demands. *Frontiers in Endocrinology*. 2013;4:127.
2. Muciaccia B, Boitani C, Berloco BP, Nudo F, Spadetta G, Stefanini M, et al. Novel Stage Classification of Human Spermatogenesis Based on Acrosome Development<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 2013;89(3):60, 1-10-60, 1-10.
3. Hafez ESE, Hafez SD. *Atlas of Clinical Andrology*. Taylor & Francis; 2005. p. 16, 30.
4. Buffone MG, Wertheimer EV, Visconti PE, Krapf D. Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1842(0):2610-20.
5. Filatov MV, Semenova EV, Vorob'eva OA, Leont'eva OA, Drobchenko EA. Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 1999;5(9):825-30.
6. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and Sterility*. 2003;79:1616-24.
7. Bordignon V, Smith LC. Ultraviolet-Irradiated Spermatozoa Activate Oocytes but Arrest Preimplantation Development After Fertilization and Nuclear Transplantation in Cattle<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 1999;61(6):1513-20.
8. Yamauchi Y, Shaman JA, Boaz SM, Ward WS. Paternal Pronuclear DNA Degradation Is Functionally Linked to DNA Replication in Mouse Oocytes<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. 2007;77(3):407-15.
9. Schulte RT, Ohi DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(1):3-12.
10. Amiri I, Ghorbani M, Heshmati S. Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim up Methods. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2012;6(9):1451-3.
11. Mohammed EE, Mosad E, Zahran AM, Hameed DA, Taha EA, Mohamed MA. Acridine Orange and Flow Cytometry: Which Is Better to Measure the Effect of Varicocele on Sperm DNA Integrity? *Adv Urol*. 2015;2015:814150.
12. Goldstein DJ. An Approach to the Thermodynamics of Histological Dyeing, Illustrated by Experiments with Azure A. *Quarterly Journal of Microscopical Science*. 1963;s3-104(68):413.
13. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative Study of Cytochemical Tests for Sperm Chromatin Integrity. *Journal of Andrology*. 2013;22(1):45-53.
14. Erenpreiss J, Jepson K, Giwerzman 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):2277-82.
15. Kim HS, Kang MJ, Kim SA, Oh SK, Kim H, Ku SY, et al. The utility of sperm DNA damage assay using toluidine blue and aniline blue staining in

routine semen analysis. *Clinical and experimental reproductive medicine*. 2013;40(1):23-8.

16. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod*. 2001;16(10):2160-5.
17. Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2001;16(9):1950-3.
18. Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*. 2000;56(6):1081-4.
19. Ghumman S, Adiga SK, Upadhyaya D, Kalthur G, Jayaraman V, Rao SB, et al. Combination of swim-up and density gradient separation methods effectively eliminate DNA damaged sperm. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 2011;12(3):148-52.
20. Piomboni P, Bruni E, Capitani S, Gambera L, Moretti E, La Marca A, et al. Ultrastructural and DNA fragmentation analyses in swim-up selected human sperm. *Archives of andrology*. 2006;52(1):51-9.
21. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, et al. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod*. 2000;15(5):1112-6.
22. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalaei M, Deemeh MR, Mardani M, Moshtaghian J, et al. Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2009;24(10):2409-16.
23. Zahedi A, Tavalaei M, Deemeh MR, Azadi L, Fazilati M, Nasr-Esfahani MH. Zeta potential vs apoptotic marker: which is more suitable for ICSI sperm selection? *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(9):1181-6.
24. Ainsworth C, Nixon B, Aitken RJ. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2005;20(8):2261-70.
25. Garolla A, Fortini D, Menegazzo M, De Toni L, Nicoletti V, Moretti A, et al. High-power microscopy for selecting spermatozoa for ICSI by physiological status. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(5):610-6.
26. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosovsky A, Yagoda A, Lederman H, et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril*. 2003;80(6):1413-9.
27. Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril*. 2008;90(1):104-12.
28. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Crippa A, Lappi M, Capitani S, et al. Birefringence characteristics in sperm heads allow for the selection of reacted spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2010;93(3):807-13.
29. Petersen CG, Vagnini LD, Mauri AL, Massaro FC, Cavagna M, Baruffi RL, et al. Relationship between DNA damage and sperm head birefringence. *Reprod Biomed Online*. 2011;22(6):583-9.

30. Wang W, Liang GT, Peng YY, Liu DY, Zhou XM. [Effects of a microfluidic sperm sorter on sperm routine parameters and DNA integrity]. *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology*. 2011;17(4):301-4.
31. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(5):617-27.
32. Setti AS, Braga DP, Figueira RC, Iaconelli A, Jr., Borges E. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection results in improved clinical outcomes in couples with previous ICSI failures or male factor infertility: a meta-analysis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2014;183:96-103.
33. Lo Monte G, Murisier F, Piva I, Germond M, Marci R. Focus on intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI): a mini-review. *Asian journal of andrology*. 2013;15(5):608-15.
34. BARTOOV B, BERKOVITZ A, ELTES F, KOGOSOWSKI A, MENEZO Y, BARAK Y. Real-Time Fine Morphology of Motile Human Sperm Cells is Associated With IVF-ICSI Outcome. *Journal of andrology*. 2002;23(1):1-8.
35. Sathananthan AH. *Visual Atlas of Human Sperm Structure and Function for Assisted Reproductive Technology*: A.H.Sathananthan : National University of Singapore; 1996.
36. Organization WH. *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. World Health Organization; 2010. p. 224,5.
37. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertility and Sterility*. 1999;71(5):836-42.
38. Erenus M, Zouves C, Rajamahendran P, Leung S, Fluker M, Gomel V. The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 1991;56(4):707-10.
39. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 1997;12(7):1545-9.
40. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril*. 1995;64(2):382-91.
41. Marquez C, Sandalinas M, Bahce M, Alikani M, Munne S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online*. 2000;1(1):17-26.
42. Munne S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(2):234-53.
43. Fisch JD, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod*. 2001;16(9):1970-5.
44. Isiklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. A simple, effective indicator of implantation and pregnancy in intracytoplasmic sperm injection. *The Journal of reproductive medicine*. 2002;47(7):540-4.

45. Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril*. 2001;76(6):1150-6.
46. Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*. 2001;16(12):2652-7.
47. Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2001;16(12):2658-61.
48. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod*. 2000;15(10):2190-6.
49. Shapiro BS, Harris DC, Richter KS. Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil Steril*. 2000;73(3):582-6.
50. Terriou P, Sapin C, Giorgetti C, Hans E, Spach JL, Roulier R. Embryo score is a better predictor of pregnancy than the number of transferred embryos or female age. *Fertil Steril*. 2001;75(3):525-31.
51. Baczkowski T, Kurzawa R, Glabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reproductive biology*. 2004;4(1):5-22.
52. Hsu MI, Mayer J, Aronshon M, Lanzendorf S, Muasher S, Kolm P, et al. Embryo implantation in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred. *Fertil Steril*. 1999;72(4):679-85.
53. Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertility and Sterility*. 2004;81(3):551-5.
54. 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):1041-52.
55. CEBESOY FB, ÜNLÜ C, AYDOS K, BALTACI V. Sperm Morfolojisi Ve Acridine Orange Boyamanın ICSI'deki Fertilizasyon Oranları Ve Embriyo Kalitesi İle İlişkisi. *Turkish-German Gynecol Assoc*. 2006;7(2):110-4.
56. French DB, Sabanegh ES, Jr., Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertility and Sterility*. 2010;93(4):1097-103.
57. Svalander P, Jakobsson A-H, Forsberg A-S, Bengtsson A-C, Wikland M. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology. *Human Reproduction*. 1996;11(5):1019-22.
58. Lundin K, Söderlund B, Hamberger L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Human Reproduction*. 1997;12(12):2676-81.

59. Avendano C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril*. 2009;91(4):1077-84.
60. Spanò M, Kolstad AH, Larsen SB, Cordelli E, Leter G, Giwercman A, et al. The applicability of the flow cytometric sperm chromatin structure assay in epidemiological studies. *Asclepius. Human Reproduction*. 1998;13(9):2495-505.
61. Spanò M, Bonde JP, Hjöllund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility &#x2021. *Fertility and Sterility*. 2000;73(1):43-50.
62. Apedaile AE, Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Johnston SA, Baker HWG. Flow cytometry and microscopic acridine orange test: relationship with standard semen analysis. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004;8(4):398-407.
63. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (scca®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*. 2004;81(5):1289-95.
64. Spanò M, Inuendo, Toft G, Inuendo, Hagmar L, Inuendo, et al. Exposure to PCB and p, p'-DDE in European and Inuit populations: impact on human sperm chromatin integrity. *Human Reproduction*. 2005;20(12):3488-99.
65. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JBM. Sperm DNA Damage: Correlation to Severity of Semen Abnormalities. *Urology*. 2009;74(4):789-93.
66. Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Weber RFA, Dohle GR. Sperm chromatin structure is associated with the quality of spermatogenesis in infertile patients. *Fertility and Sterility*. 2010;94(5):1748-52.
67. Moskovtsev SI, Mullen JBM, Lecker I, Jarvi K, White J, Roberts M, et al. Frequency and severity of sperm DNA damage in patients with confirmed cases of male infertility of different aetiologies. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010;20(6):759-63.
68. Benchaib M, Lornage J, Mazoyer C, Lejeune H, Salle B, François Guerin J. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as a prognostic indicator of assisted reproductive technology outcome. *Fertility and Sterility*. 2007;87(1):93-100.
69. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reproductive BioMedicine Online*. 2003;7(4):477-84.
70. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, et al. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Human Reproduction*. 2014;29(5):904-17.
71. Trisini AT, Singh NP, Duty SM, Hauser R. Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertility and Sterility*. 2004;82(6):1623-32.
72. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*. 2014;29(11):2402-12.
73. McKiernan SH, Bavister BD. Fertilization and early embryology: Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Human Reproduction*. 1994;9(11):2123-9.

74. Lee M-J, Lee RK-K, Lin M-H, Hwu Y-M. Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2012;29(8):745-50.
75. Knez K, Tomazevic T, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I. Developmental dynamics of IMSI-derived embryos: a time-lapse prospective study. *Reproductive BioMedicine Online*. 2013;27(2):161-71.
76. Van Montfoort APA, Dumoulin JCM, Kester ADM, Evers JLH. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers\*. *Human Reproduction*. 2004;19(9):2103-8.
77. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Onat UĞURLU  
DOĞUM TARİHİ / YERİ : 22.12.1991 / ANKARA

### Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

### İş Deneyimi

Çalıştığı Kurumlar : Centrum Klinik Kadın Sağlığı Ve Tüp Bebek Merkezi

### İletişim

E-Posta Adresi : onatugurlu@gmail.com

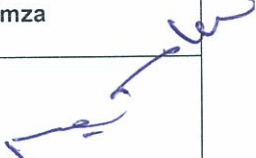
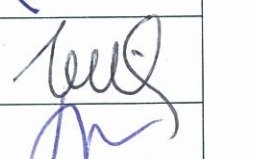
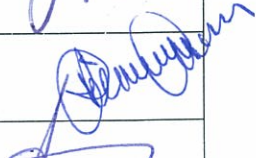
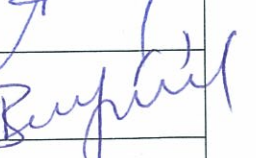
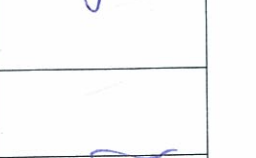
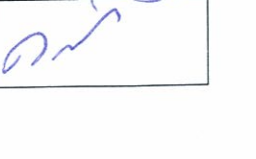

Tarih : 01.06.2018

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROJE BAŞVURU TARİH /SAYI▶	26052017-9
	ARAŞTIRMANIN ADI	İzoletatozoospermia Grubu Hastalarda Sperm DNA Fragmentasyonu ve Maturasyonu Sonuçlarının Sperm Morfoloji Sonucu Normal Olan Hasta Grubu ile Embriyo Gelişim ve Gebelik Oranlarının Karşılaştırılması
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI	Prof. Dr. Recai PABUÇCU
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMANIN YERİ	X
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	X
	GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU	X
	OLGU RAPOR FORMU	
	ARAŞTIRMANIN BÜTÇESİ	
KARAR BİLGİLERİ	Değerlendirme amacıyla Ufuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nden gönderilen Fakültemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Recai PABUÇCU'nun sorumluluğunda Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans öğrencisi Onat UĞURLU'nun 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 checked="" type="checkbox"/> E <input 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



