



**TEKRARLAYAN TÜP BEBEK BAŞARISIZLIĞI
OLAN HASTALARDA, ALTERNATİF BİR YÖNTEM OLARAK,
MİKROAKIŞKAN SPERM AYIKLAMA
ÇİPLERİNİN KULLANIMI**

Koray YILDIZ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Şengül YÜKSEL**

Yüksek Lisans Tezi -2019

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TEKRARLAYAN TÜP BEBEK BAŞARISIZLIĞI
OLAN HASTALARDA, ALTERNATİF BİR YÖNTEM OLARAK,
MİKROAKIŞKAN SPERM AYIKLAMA
ÇİPLERİNİN KULLANIMI**

Koray YILDIZ

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Şengül YÜKSEL**


Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından 2016/147 Proje numarası ile desteklenmiştir.

**MALATYA
2019**

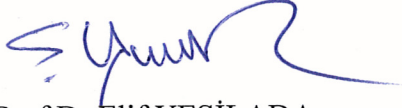
KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Koray YILDIZ'ın "Tekrarlayan Tüp Bebek Başarısızlığı olan Hastalarda, Alternatif Bir Yöntem Olarak, Mikroakışkan Sperm Ayıklama Çiplerinin Kullanımı "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

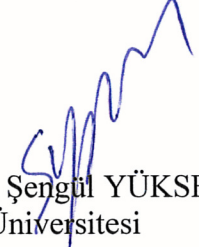
Tez Savunma Tarihi: 11/02/2019



Prof.Dr.Haydar BAĞIŞ
Adıyaman Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof.Dr.Elif YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Şengül YÜKSEL
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2019 tarih ve 2019/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. İnfertilite Tanımı.....	5
2.2. IVF Tarihçesi.....	5
2.2.1. Kısırlığı Etkileyen Faktörler.....	6
2.3. Erkek Üreme Sistemi ve Erkek İnfertilitesi.....	9
2.3.1. Erkek Üreme Sistemi.....	9
2.3.1.1. Gonadlar.....	9
2.3.1.2. Genital Kanal Sistemi.....	11
2.3.1.3. Aksesuar Genital Bezler.....	12
2.3.1.4. Penis ve Üretra.....	12
2.3.2. Spermatogenez.....	13
2.3.3. Spermin Yapısı.....	15
2.4. Erkek İnfertilitesi.....	16
2.4.1. Etyolojisi.....	16
2.5. Semen Analizi.....	17
2.5.1. DSÖ'ye göre sperm analizi terminolojileri.....	19

2.5.2. Semen Toplanması.....	20
2.5.2.1. Makroskopik Değerlendirme.....	20
2.5.2.2. Mikroskopik Değerlendirme.....	21
2.6. Spermin DNA yapısı.....	23
2.7. Sperm DNA hasarı mekanizmaları ve Etyolojileri.....	24
2.7.1. Etyolojik Faktörler.....	25
2.8. Sperm DNA Hasarını Belirleme ve DNA Fragmantasyonu Yöntemleri.....	27
2.9. Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	35
2.9.1. Swim-up Yöntemi.....	36
2.9.2. Yoğunluk Gradient Yöntemine Göre Sperm Hazırlanması.....	36
2.9.3. Mikro-akışkan Teknolojiler ve Mikro-akışkanlarla Sperm Hazırlanması.....	37
3. MATERYAL VE METOT.....	44
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	44
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	44
3.1.1.1. Toluidine Blue.....	44
3.1.1.2. 1 N-HCL.....	44
3.1.1.3. Di sodyum hidrojen fosfat (Na ₂ PO ₄).....	44
3.1.1.4. Sitrik Asit.....	44
3.1.1.5. Aseton.....	44
3.1.1.6. Etanol.....	44
3.1.1.7. Distile Su.....	44
3.1.2. Solüsyonlar ve Tampon Çözeltiler.....	45
3.1.2.1. Gradient Solüsyonu.....	45

3.1.2.2. Sperm Yıkama Solüsyonu.....	45
3.1.2.3. McIlvain Tamponu Hazırlanışı	45
3.1.2.4. Fiksatif Hazırlanışı.....	45
3.1.2.5. 0.1 N HCL Çözeltisi Hazırlanışı.....	45
3.1.3. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	45
3.1.3.1. Santrüfuj.....	45
3.1.3.2. Soğutucu Dolap.....	46
3.1.3.3. Hassas Terazî.....	46
3.1.3.4. Otomatik Pipetör.....	46
3.1.3.5. Mikroskop.....	46
3.1.3.6. Flow Kabin (Steril Kabin).....	46
3.1.3.7. İnkübatör.....	46
3.1.3.8. pH Metre.....	46
3.1.3.9. Şale.....	46
3.1.3.10. Serolojik Pipet.....	46
3.1.3.11. Analizör.....	46
3.1.3.12. Konik Tüp.....	47
3.1.3.13. Mikroakışkan Çip.....	47
3.2. Hasta Seçimi.....	47
3.2.1. Hasta Seçim Kriteri.....	47
3.3. Sperm Örneklerinin Hazırlanması.....	48
3.3.1. Gradient Yöntemine Göre Spermilerin Hazırlanması.....	48
3.3.2. Mikro-çip Yöntemine Göre Spermilerin Hazırlanması.....	48

3.4. Sperm DNA Fragmantasyonu İncelemesi.....	49
3.5. Spermilerin Morfolojik Açıdan Değerlendirilmesi.....	49
3.6. İstatistiksel Analiz.....	49
4. BULGULAR.....	50
4.1. Tüp Bebek Yönteminde Mikroenjeksiyon İçin Sperm Hazırlama Tekniğine Göre Elde Edilen Bulgular.....	50
4.2. Sperm Hazırlama Teknklerinin Morfoloji ve Sperm DNA Fragmantasyonu Üzerine Etkilerinin Bulguları.....	51
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR.....	61
EKLER.....	76
Ek 1 : Öz geçmiş.....	77
Ek 2 : Etik Kurul Kararı.....	78

TEŞEKKÜR

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana emeği geçen tez danışmanım Doç.Dr. Őengöl YÜKSEL'e, Anabilim dalı başkanımız Prof.Dr. Elif YEŞİLADA'ya, tecrübelerini esirgemeyen Prof.Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŐ'e, Doç.Dr. Hüseyin KAHRAMAN'a, eğitime katkıları olan saygıdeğer hocalarıma, bu imkanı veren patronlarıma ve iş arkadaşlarıma, bana sürekli destek olan, her alanda teşvik eden anlayışlı eşim Nesrin YILDIZ'a, yaşam kaynağım çocuklarım Kaan ve Elif'e, ayrıca beni bu günlere yetiőtiren anne ve babama, tüm aileme teşekkür ederim.

Saygılarımla,

Koray YILDIZ

ÖZET

Tekrarlayan Tüp Bebek Başarısızlığı Olan Hastalarda, Alternatif Bir Yöntem Olarak, Mikroakışkan Sperm Ayıklama Çiplerinin Kullanımı

Amaç: Tüp Bebek tedavilerinde sperm hazırlama tekniklerinin iyi kalitede spermi seçmeye yönelik olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, tekrarlayan başarısız tüp bebek denemesi olan hastalarda, sperm hazırlamada kullanılan yoğunluk gradient yöntemi ile mikro-akışkan çip yöntemini, döllenme ve gebelik oranları açısından kıyaslamak ve bu yöntemleri sperm morfolojisi ve sperm DNA fragmentasyon indeksi açısından değerlendirmektir.

Materyal ve Metot: Sebebi bilinmeyen infertilite ve tekrarlayan başarısız tüp bebek denemeleri olan 428 hasta çalışmaya dahil edildi. İlk defa tüp bebek tedavisi alan hastalar ve tekrarlayan denemesi olan hastalarda, yöntemlere göre döllenme ve gebelik oranları kıyaslandı. Grup içerisinde rastgele seçilen 30 erkekten alınan sperm örneklerinin morfoloji ve DNA fragmentasyon indeksi kıyaslaması Toluidine blue sitokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirildi.

Bulgular: İlk defa tüp bebek denemesinde bulunan hastalarda gradient ve çip yöntemlerine göre kıyaslama yapıldığında döllenme ve gebelik oranları arasında istatistiksel olarak fark görülmedi. İki deneme başarısız tüp bebek denemesi olan ve ilk defa mikroçip kullanılan hastalarda döllenme oranlarında anlamlı fark görülürken, gebelik oranları arasında istatistiksel olarak fark görülmedi. Grup içinden rastgele seçilen 30 kişide yapılan incelemede mikroçip yönteminin, yoğunluk gradient yöntemine göre sperm DNA fragmentasyon indeksini anlamlı olarak azalttığı görüldü. Her iki yöntemde kontrol grubuna göre iyi morfolojide sperm yüzdelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırırken kendi aralarında bulunmadı.

Sonuç: Tekrarlayan başarısız tüp bebek denemesi olan hastalarda mikroçip yöntemi önerilebilir. Tedavi öncesinde sperm DNA fragmentasyon testi yapılması uygun sperm yıkama yönteminin seçilmesinde yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Tüp Bebek, Sperm, Mikroakışkan, DNA fragmentasyonu, çip, Toluidine Mavisi

ABSTRACT

Microfluidic Sperm Sorting Chip usage as an alternative method in recurrent IVF failure patients

Aim: It is known that sperm preparation techniques in IVF treatments are intended to select the best quality sperm. The aim of this study was to compare the density gradient method and the microfluidic chip method in recurrent IVF failure patients in terms of fertilization and pregnancy rates and also to evaluate these methods according to sperm morphology and sperm DNA fragmentation index.

Material and Method: The study included 428 patients with unexplained infertility and recurrent IVF failure patients. Fertilization and pregnancy rates were compared in the the first time IVF trial patients and in the recurrent IVF failure patients according to the methods. Morphology and DNA fragmentation index comparison of sperm samples taken from 30 randomly selected men from the group were evaluated by Toluidine Blue cytochemical staining method.

Results: There was no statistically significant difference between fertilization and pregnancy rates when compared with gradient and chip methods in first time IVF tial patients. However in recurrent IVF failure patients there was a significant difference in fertilization rates but there was no statistically significant difference in pregnancy rates. In the study performed in 30 randomly selected patients from the group, the microchip method significantly decreased sperm DNA fragmentation index according to density gradient method. Both methods significantly increased the percentage of sperm with good morphology compared to the control group. There was no difference between the methods in terms of morphology.

Conclusion: Microchip method may be recommended in patients with recurrent unsuccessful in vitro trials. The sperm DNA fragmentation test prior to the treatment will be helpful in selecting the appropriate sperm washing method.

Key Words: IVF, Sperm, microfluidic, DNA fragmentation, chip, Toluidine Blue

SİMGELER VE KISATMALAR DİZİNİ

AO	: Akridin Oranj
AOT	: Akridin Oranj Testi
CFTR	: Kistik Fibröz Transmembran İletim Regülatörü
DFI	: DNA Fragmantasyon İndeksi
DNA	: Deoksiribo Nukleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
dUTP	: Deoksiribonükleotit
ET	: Embryo Transferi
Fertile-plus	: Çalışmada Kullanılan Mikro-Akışkan Çipin Modeli
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GIFT	: Fallop Tüpleri İçine Embryo Transferi
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu
ICSI	: Intra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IUI	: Intra Uterin İnseminasyon
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
KOMET	: Tek Hücre Jel Elektroforezi
LH	: Luteinizan Hormon
MSOME	: Hareketli Sperm Organel Morfolojisi İnceleme
p53	: Onkogen
PAP	: Prostatın Ürettiği Asit Fosfataz Enzimi

PAS	: Asit-Schiff Histolojik Boyama Çeşidi
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PROST	: Döllenen Zigotun Transferi
PSA	: Prostat Spesifik Antijeni
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
SCD	: Sperm Kromatin Dağılım Testi
SCSA	: Sperm Kromatin Yapı Testi
TB	: Toluidine Blue
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TET	: Tubalara Embryo Transferinin Yapılması
Topo II	: DNA Polimeraz II Enzimi
TUNEL	: Terminal Deoksिनükleotidil Transferaz dUTP Çentikleme ve Etiketleme İşleme
ZIFT	: Zigotun Fallop Tüpleri İçine Verilmesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Anne yaşına göre gebelik oranları.....	7
Şekil 2.2. Erkek üreme sistemi şeması.....	9
Şekil 2.3. Seminifer tübül ve hücreler.....	11
Şekil 2.4. Spermatogenez fazları.....	13
Şekil 2.5. Spermiyogenez aşamaları.....	15
Şekil 2.6. İnsan sperm hücresinin yapısı.....	15
Şekil 2.7. Aynı bireyin semen parametrelerinin zaman içindeki değişimini gösteren grafikler.....	18
Şekil 2.8. Sperm bozukluklarının değişik yapıları.....	22
Şekil 2.9. Boyanmış spermlerin çizimsel gösterimi.....	23
Şekil 2.10. Toluidine Blue yöntemi ile boyanmış sperm örneği.....	29
Şekil 2.11. Anilin Blue, Toluidine Blue ve Kronomisin A3 boyamaların birlikte gösterimi.....	30
Şekil 2.12. Komet assay ile ölçülmüş olan DNA hasarlarının mikrograf ile gösterimi.....	32
Şekil 2.13. Tek zincir kırıklarında Tunel işleminin şeması.....	33
Şekil 2.14. TUNEL ile sperm DNA fragmantasyon örneği.....	33
Şekil 2.15. Halo testi sonrası Diff-Quick boyası ile boyanmış olan Spermler.....	34
Şekil 2.16. Yoğunluk Gradient yöntemine göre spermlerin hazırlanması.....	37

Şekil 2.17. Geniş alan lens takılmış pasif mikro-akışkan düzeneği.....	39
Şekil 2.18. Pasif iletimin olduğu, santrüfüjlemenin olmadığı çip.....	40
Şekil 2.19. Sperm seçiminde kemoatraktan kullanma düzeneği.....	40
Şekil 2.20. Akışkan çip.....	41
Şekil 2.21. Dijital ısı kontrolü ile sperm seçilmesinin şeması.....	42
Şekil 2.22. Çalışmada kullanılan çip düzeneği.....	43
Şekil 4.1. TB Kontrol Grubu.....	53
Şekil 4.2. TB Gradient Grubu.....	53
Şekil 4.3. TB Çip Grubu.....	54

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Sperm üretimini bozan kimyasal ajanlar.....	8
Tablo 2.2. DSÖ 5. Baskıya göre semen referans değerleri.....	18
Tablo 2.3. Tüp Bebek uygulamalarında alternatif sperm yıkama yöntemleri.....	36
Tablo 2.4. Sperm seçiminde kullanılan Mikro-akışkan aparatlar.....	38
Tablo 4.1. Çalışmaya alınan hastaların yaş, tedavi süresi, kullanılan ilaç miktarı, yumurta sayısı, sperm sayısı ve motilite karşılaştırılması.....	50
Tablo 4.2. İlk tüp bebek denemesi olan hastalarda, gruplar arası döllenme ve gebelik oranlarının karşılaştırılması.....	51
Tablo 4.3. İki deneme ve daha fazla denemesi olan hastalar, gruplar arası döllenme ve gebelik oranlarının karşılaştırılması.....	51
Tablo 4.4. Grupların sperm morfolojisi açısından değerlendirilmesi.....	52
Tablo 4.5. Gruplar arası sperm DNA Fragmantasyonunun Karşılaştırılması.....	52

1. GİRİŞ

İnfertilite dünya genelinde doğurganlık çağındaki çiftlerin % 8-12'sini etkileyen önemli bir üreme sağlığı sorunudur (1). İnfertilite tedavisinin temel başarı göstergesi sağlıklı bir gebeliğin oluşması ve canlı doğumun komplikasyonsuz gerçekleşmesidir. Günümüzde tüp bebek tedavisi, IVF (In Vitro Fertilizasyon), aşılama (IUI=intra uterin inseminasyon) ve mikroenjeksiyon(ICSİ=intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) gibi yardımcı üreme teknikleriyle infertil çiftlere çocuk sahibi olma şansı vermektedir. Tüp Bebek tedavisinde iki veya daha fazla denemesi olupda gebe kalamama durumuna, tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı denir. Tedavinin başarılı olması, embriyo kalitesine ve rahmin gebeliği kabul etme potansiyeline bağlıdır. Tüp Bebek denemelerinin ortalama %30'u canlı doğumla sonuçlanmaktadır (2).

Tüp Bebek başarısızlığında erkek faktörü %30-50'lik etkiye sahiptir (3). Oligozoospermik veya azospermik erkeklerin baba olma şansı mikroenjeksiyon gibi yardımla üreme teknikleriyle artmıştır. Çünkü bu teknik ile baba adayından hiç sperm elde edilmese bile ameliyat ile testislerden sperm hücrelerine ulaşıp mikroenjeksiyon ile yumurta hücresi döllendirilmektedir (4). İnfertil çiftlere yapılan standart testlerde herşey normal çıkan bir grup vardır ki buna sebebi bilinmeyen infertilite grubu denir. Bu grup infertil çiftlerin yaklaşık %30 unu oluşturmaktadır (5).

Tüp Bebek tedavisinde hastanın gebe kalabilmesi için en başta oluşturulacak olan embriyonun morfolojik ve genetik açıdan normal olması gerekir. Bunun için embriyonun gelişim aşamasındaki yapısal özellikleriyle beraber genetik inceleme sonrası sağlıklı kromozomal yapıyı taşıyıp taşımadığı değerlendirilir. ICSİ özellikle erkek infertilitesi için dönüm noktası olmuştur. Sperm konsatrasyonu referans değerlerin altında olan hastalar da yeni bir yaklaşım olarak gündeme gelmiştir. ICSİ'de kullanılacak olan spermlerin seçimi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu konuda mikroenjeksiyon işlemi yapan embryologlar yaygın olarak DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü)'nün veya Kruger'in sıkı kurallarına göre normal morfolojideki spermleri seçmektedirler. Spermlerin yardımla üreme tekniklerinde kullanılabilmesi santrüfuj ve peletin süspansiyon haline getirilmesi işlemleriyle gerçekleştirilmektedir. Bu şekilde seminal plazma uzaklaştırılırken, ileri derecede hareketli spermlerin elde edilmesi, spermlerin peletten yüzeye yüzdürülmesiyle (swim-up) elde edilir. Bununla birlikte peletde birikebilen nötrofillerden, dejenere ve yaşlı spermlerden salınabilen oksijen

radikalleri istenen iyi kalitede hareketli spermere zarar verebilir. Özellikle çok sayıda bu tarz hücreleri ihtiva eden peletlerde yüzeye yüzdürme yöntemi kaçınılmaz olur. Bunu önlemek için hiç santrüfuj yapmadan spermeleri yüzeye yüzdürmek bir seçenek olabilir. Gradient yöntemi spermelerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan diğer bir yöntemdir. Fakat gradient yönteminde sıralı santrüfuj aşamalarının sperm ve semedeki lökositlerden anlamlı bir şekilde reaktif oksijen türlerinin (ROS) salındığı ve bu durumun sperm fonksiyon bozukluğuna ve sperm DNA bütünlüğüne zarar verdiği rapor edilmiştir (6). Diğer taraftan gradient ve swim-up yöntemlerinde düşük devir santrifügasyon yapıldığında minimum sperm fonksiyon bozukluğu ve iyi kalitede sperm elde edildiğini gösteren yayınlar da vardır (4, 6-8).

Son yıllarda mikro-akışkan tekniklerin yaygınlaşmaya başlamasıyla birlikte, tüp bebek alanında da kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle erkek infertilitesinde sperm seçimi konusunda kullanılmaya başlanan fakat henüz çok yeni olan bu yöntemlerin klinik çalışmaları yok denecek kadar azdır. Mikro-akışkan aparatları ya da diğer adıyla çipleri, laboratuarda bulunan biyolojik ve kimyasal analiz cihazlarını minyatürize etmek fikrinden köken almaktadırlar. Yardımcı üreme tekniklerinde de kullanılmaya başlanan mikro-akışkan sistemler örneklerin canlı olarak incelenebilmesi, işlenebilmesi için ihtiyaç duyulan bir araç haline gelmiştir. Embryo ve yumurtaların yükleme/boşaltma işlerinde, hücre kültürü aşamasında, kimyasal ve mekanik manipulasyon gibi işlevlerde kullanılmaya başlanmıştır (9).

Türkiye’de sperm hazırlanmasında kullanılan özel bir Türk firmasının üretip pazarladığı iki tip mikro-akışkan çip bulunmaktadır. Bir tanesi ICSI için üretilmiş olan yatay bir platformdaki kanaldan spermelerin karşı tarafa yüzdürülmeleri sonucunda kaliteli spermelerin elde edilmesini hedeflemektedir. Bu şekilde hareketi iyi ve doğrusal olan spermeler karşı tarafa geçebilirler. Bir diğer üretilmiş olan çip IUI içindir. Bunda ise spermeler aşağıdan yukarıya yüzdürülürlerken ortada bulunan bir membran filtreden geçerler. Bu membran filtre üzerinde sadece düzgün morfolojik kriterleri ihtiva eden spermelerin geçebileceği delikler bulunmaktadır. ICSI için olan çipde sperm konsantrasyonu az ise santrüfuj işlemiyle ön yıkama yapılır. Sonunda az sayıda ama yeterli miktarda sperm elde edilir. IUI için olan çipde santrüfuj kullanılmaz. Yükleme haznesi büyük olduğu için daha fazla hacimde yükleme yapılabilir. IUI’ya uygun olarak çok sayıda sperm elde edilir. Spermeler kendi hareketleriyle karşı tarafa geçerler. Kullanılacakları işlem için geçtikleri taraftan alınırlar.

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde yeni yöntemlerden bir tanesi sperm DNA fragmentasyon testidir. DNA fragmentasyonu, sperm DNA'sındaki hasarlar ve genomik kararsızlıklar sonucu oluşur. Sperm DNA fragmentasyonu testlerinde sınır değerleri yapılan çalışmalara göre %27-35 arasındadır (10). Bu testi yapmak için kullanılan yöntemler ve tercih edilme oranları sırasıyla TUNEL (%30.6), SCSA (%30.6), SCD (%20.4), KOMET (%6.1) ve Toluidine Blue boyama yönteminin de içerisinde olduğu diğer yöntemler (%12.2) şeklindedir (11). Sperm DNA fragmentasyon testi en çok tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı olan hastalar veya tedavi sonrası düşük yapan hastalar ile doğal yollarla gebe kalıpta ilk 3 ay içinde tekrarlayan düşüklere olan hastalarda teşhis amacıyla istenmektedir (11). Sperm DNA fragmentasyon oranı tedavi protokolünü doğrudan etkilemektedir. Bu test sonrasında yardımla üreme tekniklerinde kullanılacak olan spermin kaynağının ejakülat mı yoksa testis biopsisi mi olacağı, nasıl bir tedavi yönteminin seçileceği açısından karar verdiricidir. Klasik semen analizi testlerinde yapılan yeniliklere ve referans değerlerde yapılan düzenlemelere rağmen normal semen parametresi olan erkeklerin %30'u infertildir (12). Bu açıdan sperm DNA fragmentasyon testi klasik sperm incelemesinin önüne geçmiştir. Sperm DNA fragmentasyonu yüksek çıkan hastalarda tüp bebek tedavisinin başarı oranını artırmak adına DNA fragmentasyonunu düşürmek için cinsel perhiz süresini kısaltma, tekrarlayan ejakülasyon, farklı sperm hazırlama tekniklerinin kullanımı veya testiküler sperm biopsisi yöntemleri uygulanmaktadır (13-16). Testis biyopsisinden sperm elde etmeye yönelen sebep, spermin epididimden geçerken en çok DNA hasarına maruz kaldığı düşünüldüğünden DNA fragmentasyonunun en az testiste olduğu, dolayısıyla buradan elde edilen spermelerde DNA hasarının daha az olduğu öne sürülmektedir (17). Bu aşamada henüz çok yeni olan mikro-akışkan bir teknikle sperm hazırlanması DNA fragmentasyonunu azaltmak adına alternatif olabilir.

Bu çalışmanın amacı, sebebi bilinmeyen infertilite tanısı konan ve en az iki kez başarısız tüp bebek denemesi olan hastalarda, mikroenjeksiyon için sperm hazırlamak amacıyla kullanılan tekniklerden yoğunluk gradient yöntemi ile mikro-akışkan çip (Fertile-plus) yöntemlerini, sperm DNA fragmentasyon oranını etkileme yönünden karşılaştırmaktır. Bu amaçla 01.02.16-01.06.18 tarihleri arasında Malatya Özel Doğufertil Tüp Bebek Merkezine başvuran ve tüp bebek tedavisi gerektiren hastaların spermeleri, gradient yöntemine veya mikroçip yöntemine göre hazırlanarak ICSI sonrası embryo transferleri gerçekleştirilmiştir. Yumurta dölleme oranları ve gebelik oranları

karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu hastalar içinden rastgele seçilen 30 kişiden alınan sperm örnekleri ile ejakulat (kontrol) grubu, gradient ve çip grubu oluşturularak morfoloji ve DNA fragmantasyon oranları açısından değerlendirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite (Kısırlık) Tanımı

İnfertilite bir hastalıktır. Amerikan Üreme Sağlığı Uygulama Komitesi'nin tanımına göre; infertilite henüz tıbbi ya da fiziksel muayene bulgularına göre değerlendirme yapılmadan önce, en az 12 ay ve daha fazla süre boyunca gebe kalınamama durumudur.

2.2. IVF (In Vitro Fertilizasyon) Tarihçesi

IVF, yani laboratuvar şartlarında dölleme çalışmaları ilk olarak hayvan deneyleriyle başlamıştır. 1890 yılında Walter Heape bir tavşan türünün tüplerindeki embryoları yıkama yöntemiyle alıp başka bir tavşan türünün tüplerine transfer ederek tavşanların doğmasını sağlamıştır. 1890'lı yıllardan 1951'li yıllara kadar bu konulardaki bilimsel çalışmalar toplum ve çevre baskısı yüzünden sessiz kalmıştır. Tubal embryo transferi (TET), Pronuklear aşamada transfer (PROST), Gamet intrafallopian transfer (GIFT), Zigot intrafallopian transfer (ZIFT) uygulamaları tarihsel başlangıç olmuştur.

MC.Chang ve CR.Austin 1951 yılında yaptıkları çalışmalarda "Sperm kapasitasyon" özelliğini ortaya çıkarmışlardır. Spermin kapasitasyon özelliği sperm fonksiyonları ve dölleme açısından önemli bir gelişme olmuştur (18). 1959 yılında MC.Chang tavşanlarda yumurtanın in vitro şartlarda döllenebileceğini göstermiştir (19). Heape'nin transfer tekniği kullanılarak yapılan transfer (ET) sonrasında ilk tüp tavşan doğumu gerçekleştirilmiştir (20). 1960-1970 li yıllarda hayvan çiftliklerinde üstün genetik tür besi hayvanları yetiştirilmesinde morula yada blastokist evresindeki embryoların uterusdan "foley kateter" ile yıkanarak dış ortama alınması ve yeni anne adayına transfer edilmesiyle %100'e varan genetik üstün yavruların elde edilmesi sağlanmıştır. Bu uygulamalar ile doğan buzağı sayısı dünya genelinde 200-300 bin civarındadır. Bu yöntem ile hayvanlarda gebelik oranı %60 civarında olup doğum oranıda minimal kayıpla %50 civarındadır. 1970 sonrasında hayvanlarda görülen başarıdan sonra insanlarda tubal kısırlık olgularında bu tarz yöntemlerin kullanılması için baskılar artmıştır. O zamanlarda en büyük sorun olgun yumurtaların ovulasyondan önce laboratuvar ortamına alınamamasıydı. Bu zorluk jinekolog Patrick Steptoe ve hayvan fizyoloğu Robert Edwards'ın tavşanlardaki çalışmaları ile çözüme kavuştu.

Araştırmacılar tavşanlara dışarıdan verilen hCG hormonunun LH hormonunu artırarak yumurtayı olgunlaştırdığını gösterdiler (19).

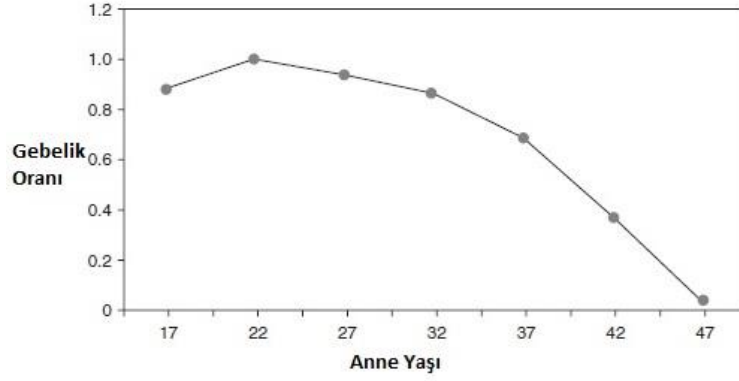
R. Edwards ve Barry Bavister Mart 1968 yılında ilk kez insan yumurtasını dış ortam koşullarında döllemeyi başaran araştırmacılar olmuşlardır. Sonrasında Steptoe ve Edwards'ın kurduğu ekiple 1978 yılında IVF tekniği ile dünyadaki ilk tüp bebek başarıyla doğmuştur. İlk tüp bebek olan Louise Brown İngiltere'nin Oldham kasabasında 25 Temmuz 1978 yılında doğmuştur. Doğumundan bu yana 40 yıl geçmiş olup bu zaman zarfında yardımla üreme teknikleri çok gelişmiştir. Araştırmacılar o dönemin pek çok etik sorununa rağmen çalışmalarını sabır ve başarı içinde sürdürdüler. 10 yıl içinde tüpleri tıkalı, tubal faktor kısırlığı olan hastalardan yaklaşık 1000 tüp bebek dünyaya geldi (20).

1992 yılında G.Palermo, H.Joris,P.Devroey ve A.Steirteghem'in tek bir sperm hücresini yumurta içerisine enjekte etmesi ile elde ettikleri gebelikleri yayınladılar. Böylelikle ciddi boyutdaki erkek kısırlığı tedavisine yeni bir boyut kazandırdılar (4). Bu yöntem son 25 yıla damgasını vurmuştur. İnsan genom projesinden sonra genetik teşhis yöntemlerinin de gelişmesiyle hastalıklı embriyolar anneye tutunmadan önce tespit edilebilmektedirler.

2.2.1. Kısırlığı Etkileyen Faktörler

İnsan reme sistemiyle ilgili sayısız faktörün olduğu bilinmektedir. Bu faktörlerde yapılan değişiklikler sonucu gebelik şansı artırılmaktadır. Bilinen önemli faktörler aşağıdaki gibidir;

Anne Yaşı: Gebelik oluşmasında en önemli faktörlerden biri anne yaşıdır. Bir kadının doğurganlığı 24 yaşından sonra azalmaya başlar. Bu azalma 37 yaşından sonra hızlanır (21) (şekil 2.1).



Şekil 2.1. Anne yaşına göre gebelik oranları (19).

Doğumda 2 milyon civarında olan primordial folikül sayısı adölesan döneme girene kadar 600.000-700.000 arasına düşer. Sonrasında menopoza kadar oosit oluşumu bu primordial foliküllerden gerçekleşir. Foliküller 37-38 yaş aralığında hızla atrofiye olmaya başlarlar. Bu yüzden bu yaşlardan sonra hastaların yumurta rezervleri azalır. Bununla birlikte mayoz esnasında gerçekleşen hatalardan ötürü genetik materyaldeki kromozomal bozukluk ihtimalleri de artar. Bunun sebebi de daha çok spindle bozukluğundan ötürüdür. Bu şekilde oluşan kromozomal dengesizlikler normal bir döllemeyi bozabileceği gibi embryo gelişimini de durdururlar. Kromozomal bozuklukların %70-80'i ilk trimesterde düşük yapar. Yapılan çalışmalar ileri yaş kadınlarda anöploidi oranlarının arttığını göstermektedir (22).

Baba Yaşı: Kadınlarda olduğu gibi erkeklerde de gonadal fonksiyonlarda yaşa bağlı azalma olmaktadır. Testesteron üretiminde azalma 40'lı yaşlardan sonra başlar. Yetmiş beş yaşında bir erkekte yirmi yaşındakine göre testesteron miktarında %50 azalma olduğu tespit edilmiştir (23). Semen hacmi, sperm hareketliliği ve sperm morfolojisi parametrelerin de de azalmalar olur. Erkeklerde yaşa bağlı anöploidi oranı sadece %2 dir ve erkeklerde yaşa bağlı düşüklüğü açıklayan bir bulgu yoktur (24). Sadece cinsiyet kromozomlarına ait kromozomların dizomisinde artış olduğunu gösteren çalışmalar vardır (25).

Kimyasal Faktörler: Genel sağlığı etkileyen ajanlardan özellikle üreme sağlığını etkileyenler mevcuttur. Bunlardan nitrik oksidin infertiliteye ve spontan düşüklere sebep olduğu gösterilmiştir (24). Kadınlarda kadmiyum, civa ve kuru temizlik malzemelerinin infertiliteye sebep olduğu gösterilmiştir. Erkekler anatomik olarak dış etkenlerden etkilenme konusunda daha hassastır. Dibromochloropropane (pestisit) üreten fabrikalarda çalışan erkeklerde infertilitede artış tespit edilmiştir (26, 27). Spermatogeneze toksik olan ajanlar Tablo 2.1 de sıralanmıştır.

Tablo 2.1. Sperm üretimini bozan kimyasal ajanlar (26).

Kurşun	Dibromokloropropan (DBCP)
Karbaril	Toluendiamin
Dinitrotoluen	Etilen dibromid
Welding	Etilen glikol monoetil eter
Perkloroetilen	Kepon
Bromin buharı	2,4-Diklorofenoksi asetik asit

Diyet: Kadınlarda aşırı şişmanlık overlerin fonksiyonunu bozup infertiliteye neden olabilir. Vücut kitle indeksi <19 olan ekstrem durumlardaki kadınlarda ise hipotalamusun fonksiyon bozukluğu riski artar yine vücut kitle indeksi çok yüksek olan kadınlarda polikistik over sendromu hastalığı (PCOS) gelişebilir ki bu durumda da yumurtlama bozuklukları oluşur. Genç kadınlarda görülen PCOS tıbbın tedavi edilebilen en yaygın infertilite hastalığıdır (28).

Sigara Kullanımı: Bütün faktörler içerisinde sigara en önemlisidir. Sigara kullanımının üreme tıbbi üzerine zararlı olduğu ispatlanmıştır. Yapılan birçok çalışmada sigara kullanımının infertiliteye sebep olduğu gösterilmiştir (25, 29).

Kafein: Gebelik öncesinde günlük 900 mg dan fazla kafein tüketimi spontan abortusları artırmaktadır (30).

Alkol: Gebelikte alkol kullanımının zararları iyi anlaşılmıştır. Doza bağlı olarak alkol tüketimindeki artış gebelik şansını azaltmaktadır (31, 32).

Stres: Bu konuyla ilgili çok tartışma yapılmaktadır. Görünen o ki tüm infertilite kliniklerine gelen hastalar streslidir. Çoğu ya gebelik istemenin stresi ya da gebe

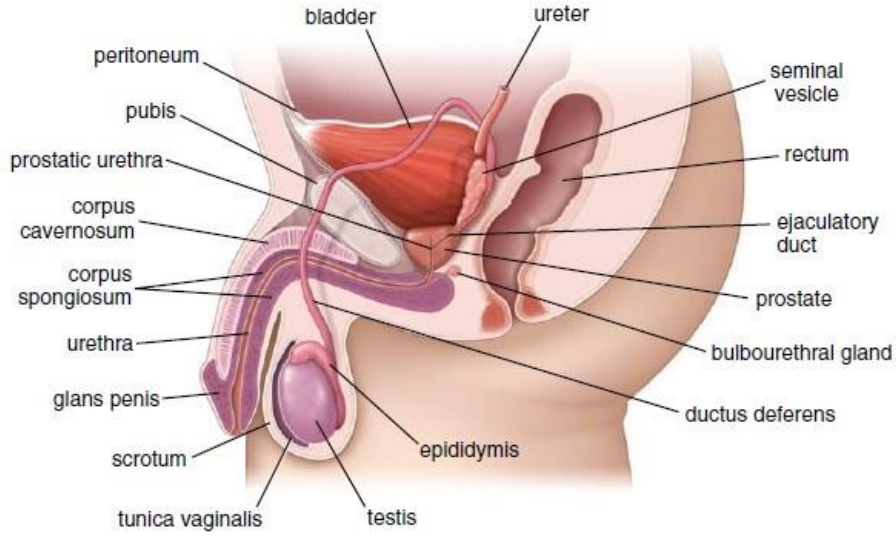
kalamamanın hayal kırıklıklarını yaşamaktadırlar. İnfertil kadınların %40'ın da anksiyete ve depresyon hakimdir (33).

2.3. Erkek Üreme Sistemi ve Erkek İnfertilitesi

2.3.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, spermin oluşumundan ve erkeklik hormonlarının sentezinden sorumludur. Dört bölümden oluşur (34, 35).

- Gonadlar
- Genital kanal sistemi (epididim, duktus deferens, ejakülatuar kanal ve üretra)
- Yardımcı üreme bezleri (seminal vezikül, prostat ve bulbo üretral bezler)
- Penis (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Erkek üreme sistemi şeması (36).

2.3.1.1. Gonadlar

a) Testis: Testisin ekzokrin ve endokrin salgılama özelliği vardır. Ekzokrin ürünü sperm hücreleridir. Endokrin ürünü testosteron'dur. 2 tane olan testisler, spermatogenezin olabilmesi için vücut ısısından 2-3 derece daha düşük ısıda olan, skrotumun iç yüzeyini kaplayan, çok kalın bir bağ dokusu olan, tunica albuginea

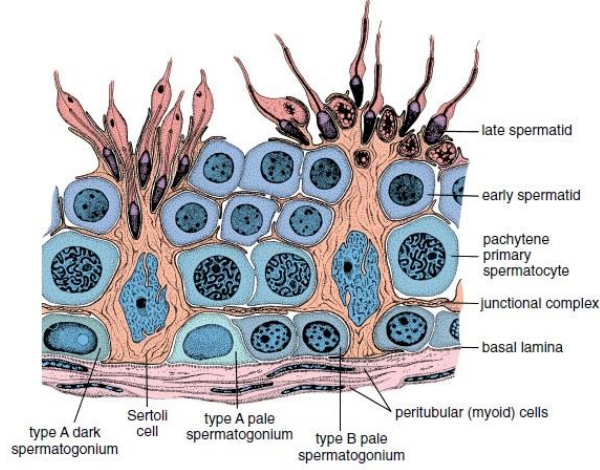
içerisinde sağ ve sol taraflara yerleşmişlerdir. Testisler yaklaşık olarak 4-5 cm x 2,5 cm x 3 cm boyutlarındadır. Her biri 10-15 gr ağırlığında olup, sağdaki %10 daha ağırdır (34). Folikül Stimulan Hormon (FSH), Lüteinizan Hormon (LH), prolaktin hormonu ve testis hacmi ile sperm sayısı arasında doğrudan ilişki vardır (37). Vücuttaki testesteronun neredeyse tamamı testislerde, %5 den az bir kısmı ise böbrek üstü bezlerinde üretilir.

b) Seminifer tübüller: Testisin salgılayıcı dokusudur. Aktif holokrin tipde salgılama yapar. Salgılama materyali spermium'dur. Her bir testiste yaklaşık 250 lobül vardır. Herbir lobülde yoğun bir şekilde katlanmış olarak seminifer tübüller mevcuttur. Seminifer tubullerin içerigini oluşturan spermier rete testis kanallarına boşaltılır (38, 39). Herbir lobülde 1 ila 4 seminifer tübül mevcuttur. Bu tübüllerin çapı 150-250 µm arasındadır. Herbir tübülün uzunluğu ortalama 50 cm dir. Bu tübüllerin epitelyum yapısı başlıca 3 tür hücreyi ihtiva eder.

- Sertoli Hücreleri
- Spermatogenik Hücreler
- Leydig Hücreleri

Sertoli hücreleri: Bazal lamina üzerinde, seminifer epitel boyunca uzanan piramidal hücrelerdir. Puberteden sonra çoğalmazlar. Sitoplazmasının apikal yüzünde spermiumların yerleşimine uygun girintiler içerir. Yan uzantılarla spermatogoniumlarve spermatositler arasına uzanıp mekanik destek olurlar. Spermiumların otoimmün reaksiyonlardan korunmasını ve beslenmesini sağlarlar. Ekstratübüler aralıktan lümene makromoleküllerin geçişini önleyen zonula okludensler sayesinde, germ hücrelerinin proteinlerine karşı antikor yapılması önlenmiş olur. Bu yapı, kan testis bariyeri olarak isimlendirilir (36).

Spermatogenik Hücreler: Düzenli olarak bölünüp olgun sperm hücrelerine farklılaşırlar. Sertoli hücrelerine komşudurlar. Olgunlaşmamış hücreler apikal kısmında bulunup, spermatogonia adını alırken, olgunlaşmış hücreler tübülün lümen sınırında bulunarak spermatid adını alır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Seminifer tübül ve hücreler (36).

Leydig hücreleri: Geniş, poligonal, eosinofilik hücrelerdir. Tipik olarak büyük yağ damlaları taşırlar. Kan kapillerleri çevresinde tek tek ya da gruplar halinde testise özgü 15-20 µm çapında hücrelerdir. Leydig hücreleri, fetal hayatta plasental kökenli gonadotropinlerin etkisiyle, 4.-5. aylarda tam gelişmiştir. Doğumdan sonra atrofiye olurlar ve pubertede LH uyarımıyla tekrar görülmeye başlarlar. Leydig ve Sertoli hücreleri şiddetli radyo dalgalarına karşı dayanıklıdır ancak germinal hücreler röntgen ışınlarına ileri derecede hassastır (34, 38). Leydig hücreleri günde ortalama 7 mg testosteron üretirler. Üretilen bu testosteron kan bariyeri ve lenfatik kapillerleri geçerek seminifer tübüllerine ulaşarak spermatogenezini uyarır. Testosteron seksüel gelişim ve sperm üretimi için gereklidir.

2.3.1.2. Genital Kanal Sistemi

Testis içindeki genital kanallar, tubuli rekti ve rete testis'dir. Testis dışındaki genital kanallar sırasıyla; duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus ve uretra'dır. Bu kanallar başlangıç yeri testislerden bitiş yeri olan penisin çıkışına dek uzanırlar (34, 39).

a) Epididim: Duktuli efferentes ve duktus epididimis'i içinde barındırır. Testislerin üst, arka yüzeyinde uzanır. Yaklaşık 7,5 cm uzunluğundadır. Epididimdeki kanallar oldukça katlanmış vaziyettedir. Tamamen açılırlarsa 4-6 metre uzunluğa ulaşır. Baş, boyun ve kuyruk olmak üzere 3 kısma ayrılmıştır. Duktuli efferentes baş kısmı, duktus epididimide orta ve kuyruk kısmını oluşturur. Testis de yeni oluşan sperm

duktuli efferentes sayesinde epididime gelirler ve buradaki kanallardan ilerledikçe hareket ve dölleme yeteneği kazanırlar. Bu olgunlaşma süreci androjene ihtiyaç duyar.

b) Duktus Deferens(Vas Deferens): Testis dışındaki genital kanallardan yaklaşık 45 cm uzunluğu ile en uzunudur. Epididimisin kuyruk kısmından duktus ejakulatoriusa uzanır. İnguinal kanaldan geçerek abdomene girer. Spermilerin iletiminde rol alır.

2.3.1.3. Aksesuar Genital Bezler

Seminal Veziküller: İdrar kesesinin arka duvarında, duktus deferensin ampullasına paralel olarak sağda ve solda birer tane olacak şekilde yerleşmiştir. Uzun ve oldukça katlanmış tubular salgı bezlerinden oluşur. Kısa salgılayıcı kanallarla ductus deferensin ampullası ile birleşerek ejakülatuar kanalı oluşturur. Seminal veziküllerin salgıladığı sıvıda basit şekerler, amino asitler, askorbik asit ve prostaglandinlerin yanında yoğun olarak sperm metabolizmasının temel substratı olan fruktoz bulunur.

Prostat: En büyük cinsiyet salgı bezidir. Morfolojik ve fonksiyon bakımından birçok bölüme ayrılmıştır. Büyüklüğü ve şekli bakımından ceviz benzetilir. Esas görevi seminal sıvının oluşumuna katkıda bulunan kısmen bazik (pH 7,29) berrak renkli sıvı salgılamaktır. Pelvisde mesanenin aşağısında, mesanenin prostatik kısmını çevreler. 30 ila 50 tubuloalveolar bezden oluşur. Fibromusküler bir kapsülü vardır. Prostatın arka kısmına ejakülatör kanallar açılır. Prostat sıvısı prostatik asit fosfataz (PAP), fibrinolizin, sitrik asit ve prostat spesifik antijen (PSA) ihtiva eder.

Bulbo-üretral bezler (Cowper Bezleri): Bezelye büyüklüğünde, prostatın altında, üretranın iki yanında bulunurlar. Semen gelmeden önceki sıvıyı salgırlar. Açık renkli mukusa benzer salgıladığı sıvının içerisinde önemli miktarda galaktoz, galaktozamin, galakturonik asit, sialik asit ve metil pentoz bulunur. Seksüel uyarı ile salgılanır. Seminal sıvı gelmeden önce penisdeki üretranın yağlanmasını sağlar.

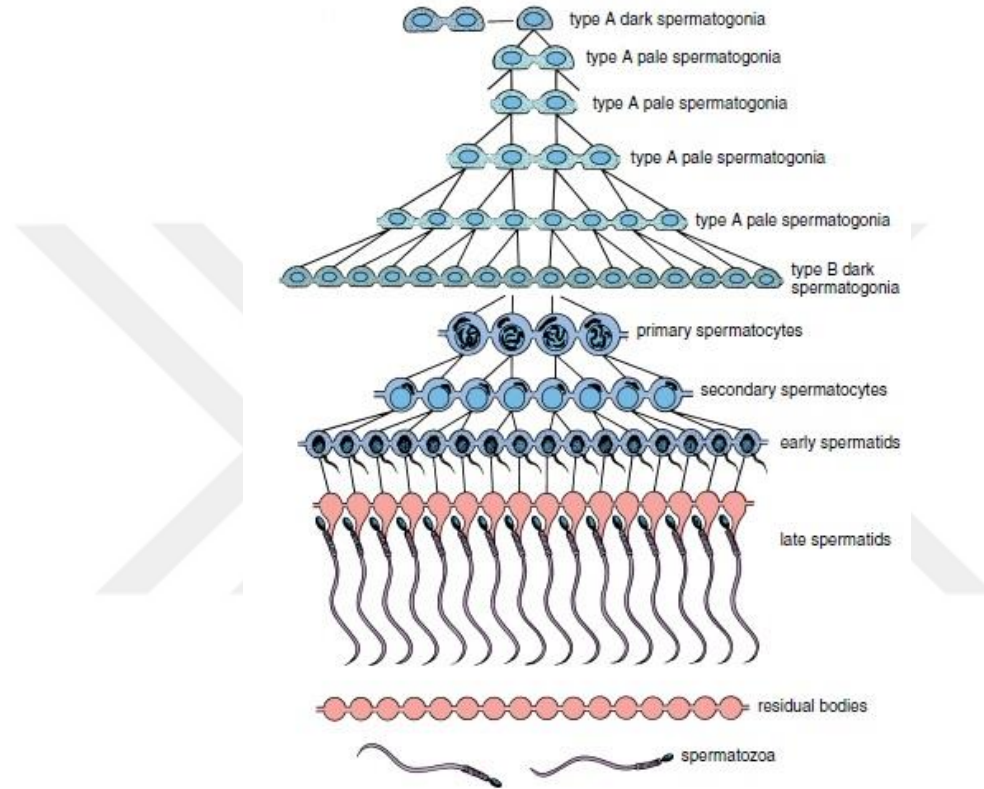
2.3.1.4. Penis ve Üretra

Penis korpuz spongioza, üretra, iki adet korpuz kavernozum, derin facia, albugenea, superficial facia ve derin dorsal damarlardan oluşur. Ereksiyon esnasında korpuz kavernozum ve korpuz spongiozanın damarlı alanları kanla dolar. Parasempatik ve sempatik sinir sistemine bağlıdır. Birçok sinir sonlanması penis dokusuna

yayılmıştır. Korpuz spongiozum içinden geçen üretra'nın çapı 8-9 mm' dir. Son halini almış olan semen buradan dışarı atılır.

1.3.2. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonidan sperm oluşuncaya kadar geçen evredir. Yaklaşık 74 gün sürer. Üç faza ayrılır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Spermatogenez fazları (36).

a) Spermatogonial faz: Bu fazda spermatogonial kök hücreleri mitozla bölünür ve çoğalırlar. 3 tip spermatogonia vardır. Tip A açık boyanan, tip A koyu boyanan ve tip B koyu boyanan. Bir çok bölünmeden sonra tip A spermatogonia tip B spermatogonia ya dönüşür.

b) Spermatisit fazı: Tip B spermatogonia ların mitotik bölünmesi primer spermatisitleri oluşturur. Primer spermatisitler mayoz bölünme ile kromozom sayılarını yarıya düşürerek DNA larını azaltırlar. İlk mayotik bölünme sonrası oluşan spermilere

sekonder spermatosit adı verilir. İkinci mayoz bölünmenin sonunda 2 haploid spermatid oluşur.

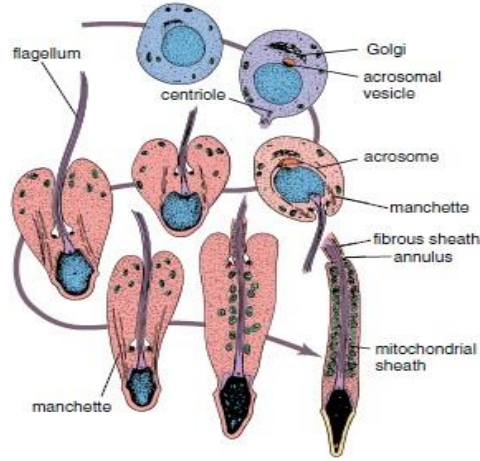
c) Spermatid fazı (Spermiogenesis): Bu fazda hücre tekrar Şekillenerek 4 aşamada olgun bir sperm hücresine dönüşür (Şekil 2.5).

Golgi Aşaması: Spermatidlerdeki çoklu golgi cisimciklerinde periodik asit-Schiff(PAS) pozitif cisimcikler birikir. Akrosomal vesiküller membrana yakındır. Veziküller genişler ve içeriğini arttırır. Akrozomal vesiküller spermin ön kutbunu belirlerler. Bu aşamada centrioller juxt nuklear kısımdan arka kutba göçerler. Burada sentrioller Kuyruk yapısında bulunan aksenomdaki 9 periferik ve 2 santral mikrotubulleri oluştururlar.

Kap Aşaması: Akrozomal vezikül çekirdeğin ön yarısına yayılır. Bu yeniden Şekillenmiş yapıya akrozomal kep denir. Nükleer zarfın, akrozomalkapağın altındaki kısmı gözeneklerini kaybeder ve kalınlaşır. Nükleer içerik de yoğunlaşır.

Akrozom aşaması: Spermatid kendine yeniden yön verir. Böylece baş kısmı sertoli hücresine derinlemesine gömülür ve hücre bazal laminayı işaret eder. Gelişmekte olan flagellum seminifer tübülün lümenine uzanır. Spermatid'in yoğunlaşmış çekirdeği yassılaşır ve uzar. Çekirdek ve üzerini kaplayan akrozom hemen ön plazma membranına bitişik bir pozisyona hareket eder. Akrozom gelişimi tamamlandığında golgi cismi çekirdeğin ön kutbundan sitoplazmanın bol olduğu bölgeye göç eder (40,41). Olgun bir spermden akrozom 2/3 lük ön kısmı kaplar. Hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfotaz ve akrozin denilen tripsin benzeri proteazları ihtiva eder. Dölleme esnasında enzimatik yapı serbest kalmaktadır (40).

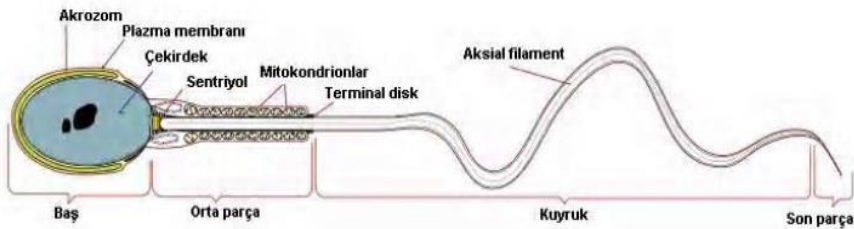
Olgunlaşma fazı: Spermatitlerin flagellumları etrafındaki fazla sitoplasma, sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek olgun spermatozoa'ya dönüştürülürler (41, 42). Sonraki aşamada sertoli hücreleri ile olan bağlantıları koparak serbestleşip lümene bırakılırlar. Olgunlaşan hücelere spermatozoa denir. Hareket ve dölleme kabiliyetlerini epididim de kazanmışlardır (41).



Şekil 2.5. Spermiyogenez aşamaları (36).

2.3.3. Spermin Yapısı

Spermiogenesis yapısal olarak eşsiz bir hücre olan sperm oluşumuyla son bulur. Olgun bir sperm yaklaşık olarak 60 μm uzunluğundadır. Sperm kafası yassılaştırmıştır ve 4,5 μm uzunluğunda, 3 μm eninde ve 1 μm kalınlığındadır. Akrozomda taşıdığı enzimler yumurta kabuğu olan zona pellucidayı geçmeye yarar (43, 44) (Şekil 2.6). Kuyruk 45–50 μm uzunlukta olup boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 4 kısma ayrılır (43). Flagellumun merkezinde bir çift, periferinde ise 9 çift, aksonem adını alan mikrotübül yapısı sayesinde sperm hareket kazanır. Orta kısım mitokondriden zengindir.



Şekil 2.6. İnsan sperm hücresinin yapısı (45).

2.4. Erkek İnfertilitesi

İnfertilitenin tek başına %20'sinden sorumludur. İnfertil çiftlerin yaklaşık %20-40'ında kalıtsaldır (46). Vakaların %90'ında infertilitenin sebebi sperm üretiminin bozulmasıdır (47).

2.4.1. Etyolojisi

Erkek infertilitesinin yaklaşık %40'ının sebebi bilinmemektedir. Bilinen sebeplerinde ancak %30'u tedavi edilebilmektedir (48). Erkek infertilitesi dört ana grupta incelenebilir (49).

1. Hipotalamo-hipofizer bozukluklar (Pre-testiküler nedenler) (%1-2)
2. Primer gonodal bozukluklar (Testiküler hastalıklar) (%30-40)
3. Sperm transport bozuklukları (Post-testiküler patolojiler) (%10-20)
4. İdyopatik(sebebi bilinmeyen) (%40-50)

1. Hipotalamo-hipofizer bozukluklar (Pre-testiküler nedenler)

- Sebebi bilinmeyen gonadotropin eksikliği
- Kallman sendromu
- Tek gen mutasyonları
- Hipotalamik veya hipofizer tümörler (kraniofarengioma, makroadenom)
- İnfiltratif hastalıklar (sarkoidoz, histiyositoz)
- Hiperprolaktinemi
- İlaçlar (GnRH analogları, glukokortikoidler)
- Kronik sistemik hastalıklar, kritik hastalıklar, yüksek ateş yapan enfeksiyonlar (menenjit, kabakulak)
- Obezite

2. Primer gonodal bozukluklar (Testiküler hastalıklar)

- Klinefelter Sendromu
- Y Kromozom delesyonları
- Tek gen mutasyonları ve polimorfizmleri
- Kriptorşidizm
- Varikosel

- Enfeksiyonlar (viral orşid, tüberküloz)
- İlaçlar (antiandrojen, alkali ajanlar)
- Radyasyon
- Çevresel faktörler (Isı, sigara, organik materyaller)

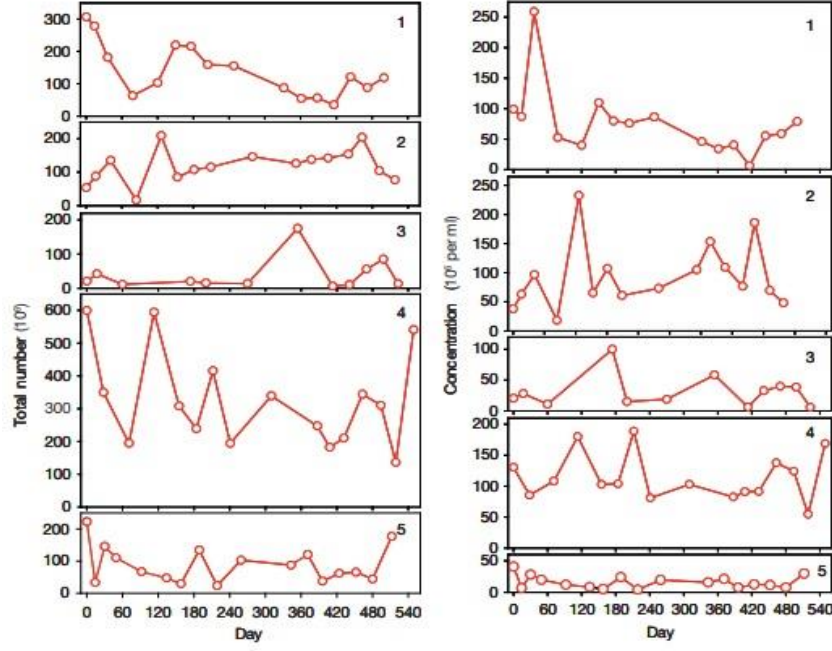
3. Sperm iletimi bozuklukları (Post-testiküler patolojiler)

- Epididimal tıkanıklık veya fonksiyon bozukluğu
- Doğuştan vaz deferens yokluğu (CFTR gen mutasyonları)
- Enfeksiyonlara bağlı vaz deferens tıkanıklığı (klamidy, tüberküloz)
- Vazektomi
- Kartagener sendromu (primer siliyer diskinezi)
- Young sendromu
- Ejakülatuvar (spinal kord hastalıkları, otonomik disfonksiyon)

2.5. Semen Analizi

Spermatozoanın özellikleri (konsantrasyon, motilite ve morfoloji) ve seminal sıvının analizinde değerlendirilen parametrelerdir.

Semen örneklerinin aynı standartta olabilmesi için 2-3 günlük cinsel perhiz yapılması önerilir. Bu işlemin 7 günü geçmemesine dikkat edilir. Aynı kişide semen örnekleri değişiklik gösterebilir. Bu yüzden 1 ay ara ile 2 semen örneğine bakmak daha sağlıklı olur (50,51). Sperm sayısı ve konsantrasyonu zaman içinde değişkenlik gösterir (43) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Aynı bireyin semen parametrelerinin zaman içindeki değişimini gösteren grafikler (43).

Dünya Sağlık Örgütü'nün yapmış olduğu son düzenlemeye göre semen parametreleri referans değerleri Tablo 2.2 de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. DSÖ 5. Baskıya göre semen referans değerleri (43).

Görünüm	Homojen, gri- opak
Volum (ml)	> 1, 5 (% 95 CI: 1, 4- 1, 7)
Ph	7, 2- 8, 0
Viskosite	< 3
Sperm sayısı (Spermatozoa / ml)	> 15 x 10 ⁶ (%95 CI: 12- 16)
Total sperm sayısı (Spermatozoa / ml)	> 39 x 10 ⁶ (% 95 CI: 33- 46)
Total Hareketlilik (progresif+ nonprogresif)	> % 40 (% 95 CI: 38- 42)
Progresif hareketlilik	% 32 (% 95 CI: 31- 34)
Progresif hareketli sperm sayısı (spermatozoa / ml)	> 3 x 10 ⁶
Morfoloji	>% 4 normal (% 95 CI: 3- 4)
Vitalite	> % 58 (% 95 CI: 55- 63)
Peroksidaz pozitif lökosit sayısı (x 10 ⁶ / ml)	< 1
İmmünobead test	< % 50 partikülle kaplı sperm
MAR testi	< % 50 partikülle kaplı sperm
Çinko (mmol/ ejakülât)	> 2, 4
Fruktoz (mmol/ ejakülât)	> 13
Alfa – glukozidaz (nötral) (mU/ ejakülât)	>20

2.5.1. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre sperm analizi terminolojileri

1. Aspermi: Dışarıya hiç meni gelmemesi durumudur. Retrograd ejakülasyon gibi doğuştan veya sonradan kanal problemi olanlarda olabileceği gibi, psikolojik açıdan sertleşme problemleri olanlarda görülebilir. Seminal sıvı haricinde prostat salgısı gelebilir.

2. Hipospermi: Semen volümünün 1,5 ml' den az olması demektir. Salgı bezlerinde bir enfeksiyon, travma(ameliyat) veya tümör kaynaklı olabilir

3. Polizoospermi: Sperm konsantrasyonunun 250 milyon/ml'den fazla olmasıdır. Enfeksiyona bağlı olabilir. Bu hastalarda akrozom aktivitesi düşüktür (52).

4. Ejekülatta likefaksiyon(çözünme) bozukluğu: Semen 20 dakika içerisinde 37 derecede çözünmemesi durumudur. Prostat ve bulbo- üretral bez patolojilerinde olur.

5. Azospermi: Ejakülatta hiç sperm olmamasıdır. Sebepleri arasında Y kromozomunun azf-b bölgesinde büyük delesyonların olması gibi genetik sebepler, hipogonadik hipogonadizm gibi hormonal hastalıklar veya mesleki hastalık(fırıncılık, şoförlük vb)'lar sonucunda oluşabilir.

6. Oligozoospermi: Sperm konsantrasyonunun 15 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

a) Hafif Oligozoospermi: Sperm konsantrasyonunun 5- 15 milyon/ ml'nin arasında olmasıdır. Bu tarz hastalar subfertil gruptadır.

b) Şiddetli Oligozoospermi: Sperm sayısının 5 milyon/ ml'nin altında olması durumudur. Bu tarz hastalarda tedavi şekli mikroenjeksiyondur.

7. Astenoospermi: Spermilerin toplam hareket yüzdesinin % 40'ın altında olması veya ileri hareketliliğin %32'nin altında olması durumudur. Enfeksiyon, ısı, ilaç etken olabilir.

8. Teratoospermi: Kruger kriterlerine göre morfolojik olarak normal sayılan spermilerin %4'ün altında olmasıdır. Genetik faktörler, toksik madde kaynaklı veya enfeksiyon kökenli olabileceğibir çok sebebi vardır. İnfertilite teşhisi koymakta önemli bir kriterdir. Sperm konsantrasyonu gibi zamana bağlı değişkenlik göstermez.

9. Oligoastenoteratozoospermi: Sayı, hareket ve morfolojik kriterler beraber değerlendirildiğinde yukarıda verilen referans değerlerin aşağıda olması durumudur.

10. Globozoospermi: Sperm kafalarının yuvarlak başlı olma durumudur. Akrozom neredeyse hiç yoktur. Sperm DNA paketlenmesinde rol alan protamin proteininde bozukluk görülür. Bu hastalarda mikroenjeksiyon yönteminde dahi çok az dölleme gerçekleşir.

11. Nekrozoospermi: Semende % 25'ten fazla nekrotik sperm hücresi içermesi anlamına gelir. Semende vitalite testleri Eosin Y boyama veya HOS testleri ile yapılır. Kesin sebebi tam olarak bilinmediği gibi, toksik maddeler etken olabilir.

12. Virtual Azospermi: Hastanın ejakülatında farklı zamanlarda sperm görülüp görülmemesi durumudur. Bu sebepten spermiogram testi yaparken 1 ay ara ile en az 2 test yapılması önerilir (43, 53).

2.5.2. Semen Toplanması

Semen örneği alınmadan önce en az 3 ila 5 günlük cinsel perhiz önerilmektedir. (54). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki infertil olmayan erkeklerde bir günlük cinsel perhiz sonunda ejakulat hacmi 0.4 ml, konsantrasyonu ise 10-15 milyon/ml artmaktadır. 1 haftayı geçen uzun perhizlerde de hareket azalmaktadır (55). Hasta semen örneğini izole steril bir odada masturbasyonla verir. Örnek almak için geniş ağızlı steril, toksik olmayan polikarbon kaplar kullanılır. Sonrasında ağzı kapalı bu kaplar 37 derecede muhafaza edilirler.

2.5.2.1. Makroskopik Değerlendirme

Semen öncelikle likefaksiyon, renk, koku, volüm, viskozite ve pH açısından değerlendirilir (43).

Renk: Semen rengi sarımsı beyazdır. Enfeksiyon ve kanlı durumlarda rengi değişir. Sperm konsantrasyonunda rengi etkilemektedir.

Likefaksiyon: Normal bir semen örneğinde 37°C'de çözünme işlemi 20 dakikayı geçmez. Bu olayda prostat salgısı etkendir (56). Sperm hareketini ve konsantrasyonunu etkilemektedir (51,56).

Hacim: Semen volümü 1,5 ml'nin üzerinde olmalıdır.

pH: Ejakülatın normal pH değeri 7,2 ile 8.0 arasındadır. Enfeksiyon durumlarında pH değışkenlik gösterir.

2.5.2.2. Mikroskopik Değerlendirme

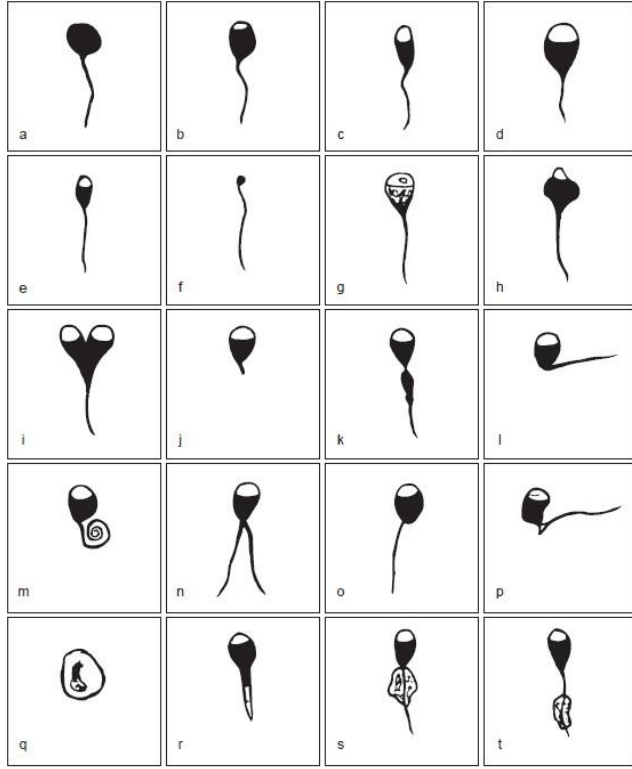
Mikroskopik değerlendirmede konsantrasyon, hareket ve morfoloji incelenir.

Konsantrasyon: Erkek infertilitesi ile sperm konsantrasyonu arasında direk bağlantı vardır. Fertilite için sperm sayısının olması gereken alt limiti 15 milyon/mL'dir (43). Mikroskopik incelemede sperm görülmediği zaman, semen santrüfüj edilip pelet incelemesi yapılmalıdır. Yıkama sonrasında sperm görülebilir (57). Total sperm sayısını bulmak için ejakülat hacmi konsantrasyon ile çarpılır. Konsantrasyon hesaplanırken, sulandırılmış semen örneği, x200 büyütme bir mikroskop altında Makler sayım kamerası ile yapılır. Alternatif olarak Neubauer sayım kamerası ve Horwell sayım kameraları da kullanılabilir (50).

Motilite (Sperm Hareketliliği): Hareket yüzde olarak hesaplanır. Bunun için toplam hareketli sperm konsantrasyonu, toplam konsantrasyona bölünür. Dünya Sağlık Örgütüne göre spermler hareketliliklerine göre 4 grupta ayrılır.

- a) İleri (progresif) hareketlilik
- b) İlerleri (progresif) olmayan hareketlilik
- c) Yerde hareketlilik
- d) Hareketsiz spermler

Spermin Morfolojik Değerlendirmesi: Sperm morfolojisi spermatogenezin kalitesini yansıtır, morfoloji anormallikleri (teratospermi) baş, boyun ve kuyruğa göre sınıflandırılır. Sperm morfolojisi bir çok şekilde değerlendirilebilir. En yaygın ve geçerli klasifikasyon sistemi DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü)'nün, Kruger'in katı kurallarını içeren 3. ve 4. DSÖ standartlarıdır (Şekil 2.8). DSÖ kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %30'un üzerinde olmalıdır. DSÖ 3.baskı standartları ya ıslak lam ya da fiske edilip boyanmış preparasyon gerektirmektedir. Islak inceleme yapılacaksa 10-20 µl lik semen damlası lama yerleştirilir. Üzeri lamelle kapatılarak 400 büyütmede faz kontrast mikroskopda bakılır. Alternatif olarak aynı hacimde fiksatifle fikse edilerek Papannicolaou veya Diff Quick gibi boyalarla boyanarak 1000 büyütmede incelenir.



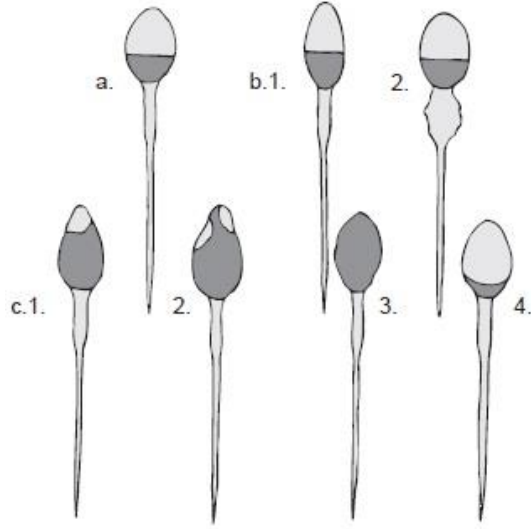
Şekil 2.8. Sperm bozukluklarının değişik yapıları (43). a) Yuvarlak kafa veya akrozomun olmaması, b) Küçük akrozom c) Uzamış Kafa d) Megalo kafa e) Küçük kafa f) Nokta kafa g) Vakuollü kafa h) Amorf kafa i) Bisefalik (çift kafa) j) Gevşek kafa k) Amorf kafa l) Kırık boyun m) Kıvrık kuyruk n) Çift kuyruk o) Anormal kuyruk bağlantısı p) çoklu defektler q) Olgunlaşmamış germ hücresi r) Uzamış spermatid s) Proksimal sitoplasmik droplet t) Distal sitoplasmik droplet

DSÖ kriterlerine göre normal formlar aşağıdaki gibidir (Şekil 2.9).

Kafa: Oval ve düzgün olanlar normaldir. Yuvarlak, piriform, nokta, çift ve amorf görünümde olanlar anormaldir. Kafa uzunluğu 5-6 μm dir. Eni 2,5-3,5 μm dir. Akrozom kafanın %40 ila %70 ini oluşturmaktadır.

Orta-Parça: Normali düz ve kuyruktan hafifce kalın olanıdır. Kalınlığı $>1\mu\text{m}$, uzunluğu kafanın 1,5 katıdır. Sitoplasmik droplet ihtiva etmez.

Kuyruk: Tek, kırık olmayan, düzgün yapıda olup, katlanma yada kangal görünümü olmayanlar normaldir. Yaklaşık 45 μm uzunluğundadır.



Şekil 2.9. Boyanmış spermelerin çizimsel gösterimi (43). a) Normal form b1) Hafif amorf kafa b2) Boyun defekti c1 ve c2) Anormal küçük akrozom yapıları c3) Akrozom olmaması c4) Akrozomun sperm kafasının %70 inden büyük olması.

Normal semen analizinde Kruger kriterlerine göre %4 'ün altı anormal kabul edilir. Sperm morfolojisinin direk olarak dölleme kapasitesiyle alakalı olduğu tespit edilmiştir. Bu anormal yapıdaki spermelerin normal genetik yapıyı yumurtanın sitoplasmasına iletememesinden kaynaklı olabilir. Video kayıtlarından kesin olarak tespit edildiği kadarıyla anormal spermelerde hareket bozulmuş, azalmış veya hiç olmamaktadır. Spermlerdeki bu azalmış veya anormal hareketlilik, kafa şekli nedeniyle hidrodinamik verimsizlik, kuyruk yapısındaki normal hareketi önleyen anormallikler ve/veya hareketlilik için gerekli enerji üretimindeki eksiklikler sonucunda olabilir (58, 59). Bozulmuş sperm hareketliliğinin yanında anormal spermeler, normal yapıdaki spermeler gibi yumurta kabuğunu oluşturan zona pellucidaya bağlanamazlar. Bu durum yarım zona bağlanma testleri ile gösterilmiştir (60). Yapılan birçok çalışma göstermiştir ki, Kruger'in katı morfoloji belirleme yöntemi klasik aşılama döllenme kapasitesi hakkındabilgi veren en tutarlı yöntemdir (61, 62).

2.6. Sperm DNA yapısı

Memeli sperm kromatin yapısının kendine has bir özelliği vardır. Oldukça organize, yoğun paketlenmiş kompakt yapıdadır. Bu şekilde erkek ve kadın genital organlarında transportu esnasında korunarak yumurtaya iyi bir durumda ulaşır. Memeli sperm DNA'sı eukaryotik DNA'lar içerisinde en kompakt olanıdır (63). Bu özelliği

somatik hücrelerden çok farklıdır. Somatik hücre nüklear DNA'sı histonlardan oluşan bir oktamerin etrafına sarılarak nukleozom şeklinde paketlenirler ve sonrasında solenoidleri oluştururlar (64). Bu paketleme şekline ilave olan histonlar kromatin hacmini artırırlar. Sperm çekirdeğinde bu tip paketlenme için yeterli hacim yoktur, farklı bir paketleme şekli mevcuttur (63). Spermiyogenez sırasında, sperm kromatini, histonların kaybolduğu ve bunun yerine geçiş proteinleri ve sonunda protaminlerin olduğu bir dizi tadilattan geçer (65, 66, 67). Protaminler histonların yaklaşık yarısı kadardır (68). DNA iplikçikleri, bu protaminler tarafından yoğunlaştırılır ve sperm kromatinin temel paketleme birimi olan toroid oluşturulur. Toroidler ayrıca, protamindeki sistein kalıntıları arasındaki inter ve intra moleküller arası disülfid çapraz bağları ile daha da sıkılaştırılır (69). Tüm bu sıkıştırma ve organizasyon işlemleri, erkek ve dişi üreme sistemi yoluyla taşınma sırasında sperm kromatininin korunmasına yardımcı olur ve aynı zamanda baba genomunun taşıdığı genetik bilgiyi doğru bir şekilde ifade etmesini sağlar (70). İnsan sperm kromatini bu kadar yüksek oranda organize ve kompakt yapıyı içermesine rağmen, histonların yaklaşık % 15'i insan sperm kromatininde tutulduğundan diğer memelilere göre daha az kompaktdır (71, 72). İnfertil erkeklerin sperm kromatinlerinde histone/protamin oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (73, 74). İnsan spermi P1 ve P2 olmak üzere iki tür protamin içerir. P2 protaminler daha az sistein grubu içerdiğinden daha az disülfid çapraz bağlantısı içerir (75). Bu durum teorik olarak DNA'yı hasarlara karşı daha duyarlı hale getirir. İnfertil erkeklerde P2 ekspresyonundaki değişikliklerin yaygın olduğu bildirilmiştir (76).

2.7. Sperm DNA hasarı mekanizmaları ve Etyolojileri

Spermin görevi babaya ait genetik materyali yumurtaya taşımaktır. Sperm DNA'sının bütünlüğü sonradan oluşacak olan embryonun sağlığı açısından oldukça önemlidir. Spermatozoadaki 23 adet kromozoma ait DNA'larda olası genetik hasarların nedenleri ve mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Sperm hücrelerinde DNA hasarı, morfolojik görünüm ve sperm mobilitesi ideal olmasına rağmen mümkündür.

Dikkate alınması gereken birkaç farklı sperm kromatin anomalisi vardır.

1. Tek zincir veya çift zincir kırıklıkları
2. Histonların protamine dönüşümünü etkileyerek DNA paketlenmesini bozacak olan nüklear protein defektleri

3. Tersiyer kromatin konfigürasyonunda değişikliğe neden olan kromatin yapısal anormallikleri.

Çevresel stres, gen mutasyonları ve kromozomal anormalliklerin tamamı, spermatogenez sırasındaki biyokimyasal olayları etkileyebilir, bu da sonuçta infertiliteye sebep olan anormal kromatin yapısına yol açabilir (77). Yumurta, sperm DNA hasarını belli bir dereceye kadar onarabilir (78). Bununla birlikte, sperm DNA hasarı yoğun olduğunda, yumurta normal gelişmeye izin verecek olan tamiri yeterince yapamayabilir.

2.7.1. Etiyolojik Faktörler

DNA fragmantasyonunun teknik olarak anlamı, apoptotik programlanmış hücre ölümü programının sonucu endonukleazlara bağlı çift zincir kırığından gelmektedir. Sperm DNA fragmantasyonu ve/veya bozulmuş kromatin bütünlüğü ile ilişkili çeşitli etiyolojik faktörler vardır. Bu nedenler çok geniştir. Sigara içiciliği (79), radyasyon (80) ve kemoterapi (81, 82) gibi çevresel koşullardan, lökospemi (83, 84) varikosel (85, 86) ve kanser gibi patofizyolojik koşullara kadar çeşitlilik gösterir(87). Spermin dondurulması (88, 89) gibi iyatrojenik sebepler bile sperm DNA hasarı ile ilişkilendirilmiştir. Bu koşulların sperm DNA hasarına ve/veya kromatin anormalliklerine yol açtığı moleküler mekanizmalar kesin olarak anlaşılmış olmasa bile 3 ana başlık altında toplanabilir. 1) kromatin paketleme anormallikleri, 2) reaktif oksijen türleri ve 3) apoptozis

Kromatin Paketleme Anormallikleri: Spermatogenez esnasında kromatin şekillendirilirken histonların protaminlerle yer değiştirdiği önemli bir aşama vardır. Kromatin histon hiperasetilasyonu ile gevşetilir ve süpersargılanmadan kaynaklanan burkulma stresini gidermek için sperm DNA'sında geçici çentikler üreten DNA topoizomeraz II (Topo II) işlev görür (90, 91, 92). Bu geçici çentikler spermiogenesis ve ejakülasyondan önce aynı enzim Topo II tarafından onarılır. Eğer bu çentikler tamir edilmezse, ejakülatta DNA'sı parçalanmış spermiler bulunabilir (93).

Reaktif Oksijen Türleri: Sperm DNA hasarı, yüksek seviyelerde reaktif oksijen türleriyle (ROS)'de ilişkilendirilmiştir (94). Düşük seviyelerde ROS, sperm olgunlaşmasında ve kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi fonksiyonlarda önemli bir rol oynar (95). Seminal plazma sperm DNA'sının korunmasına yardımcı olan

antioksidanlar içerir (96). Bununla birlikte, seminal plazmanın ve erkek üreme sisteminin antioksidan kapasitesinin ötesinde aşırı miktarda ROS üretildiğinde, patojenik sonuç genellikle hücresel hasar ve DNA hasarıdır (97). İnfertil erkeklerin yaklaşık% 25'inin spermde yüksek ROS seviyeleri bildirilmiştir (98). Ayrıca sperm DNA fragmentasyonu ve ROS arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (94). Semendeki başlıca ROS kaynakları lökositler ve sperm kendisidir, özellikle olgunlaşmamış, bozuk morfolojik kafa yapısı olan, sitoplasmik artıkları ihtiva eden spermler üretmektedir (99-101). Sperm hareketinin enerji ihtiyacı oldukça aktif mitokondrileri tarafından sağlanır ki bu durum ortamdaki ROS miktarını artırmaktadır. Spermde plasma membranındaki çoklu doymamış yağ asitleri ROS ataklarına oldukça duyarlıdır (102). Hücrelerin oksidatif strese maruz kalması DNA hasarının oluşması için yeterlidir, dolayısıyla bu spermlerden doğal yolla dölleme yapması beklenemez. ROS un kaynağı içsel veya dışsal nedenlerden ötürüdür. Esasen önemli miktarı içsel olarak metabolik olaylardan oluşur. Bunlar, Sperm mitokondrilerinde oksidatif fosforilasyon esnasında oluşan superoksid anyonları ve plasma membranında nitrik oksid sentetaz tarafından üretilen nitrik oksittir. Dışsal nedenleri sırasıyla semendeki lökositler (granülositler), bilinmeyen kimyasal/toksinler, çevre kirliliği, beslenme eksikliği, laboratuvar işlemleri, ileri yaş, fizyolojik ve fiziksel stres, sigara ve alkol kullanımı, kafein, kanser ve anti kanser ilaçları, hücrelerin enflamasyon durumları olarak sıralayabiliriz. İçsel sebepler dışsal sebeplere göre sperm DNA sına daha çok zarar verir. Dışsal ROS un içsel kadar etkili olabilmesi için 1000 kat daha fazla olması gerekir (103). Sperm DNA fragmentasyonunun lökositlerin oluşturduğu ROS'dan ziyade içsel ROS ile korelasyonu vardır (104).

Apoptozis: Sperm DNA hasarının olası başka bir yolu ise başarısız, tamamlanamamış apoptozdur. Apoptozis, vücuttaki birçok hücrede meydana gelen programlanmış hücre ölüm sürecidir. Testislerde apoptoz normal olarak germ hücrelerinin aşırı üretilmesini önlemek ve hasarlı germ hücrelerini seçerek yok etmek için ortaya çıkar (105). Sertoli hücreleri testiste yalnızca sınırlı sayıda germ hücrelerini destekleyebilir. Sertoli hücrelerinin destekleyebileceği miktarda germ hücresi popülasyonu ile sınırlandırmak için apoptozis gereklidir (106). Bu apoptotik yolun, Sertoli hücreleri tarafından salgılanan Fas ligantın (FasL) germ hücre yüzeyinde bulunan Fas proteini ile etkileşimi ile tetiklendiği öne sürülmüştür (107). Bununla birlikte, FasL olmayan farelerde hala germ hücre apoptozunun kanıtlarının görülmesi bu

yolakdan farklı başkalarında olduğunu göstermektedir (108). Seminal parametreleri zayıf olan erkeklerde, sıklıkla Fas ekspresyonunda artış sözkonusudur (70). Bu durum, spermlerin bazılarının DNA hasarının, Fas ekspresyonu ile başladığı ancak daha sonra apoptotik yoldan kaçtıkları “abortif apoptozis” (tamamlanamamış apoptozis) önerisine yol açmıştır (109). Son yapılan fonksiyon kaybı çalışmalarında spermatogenez sırasında DNA hasarı kontrol noktalarında, eksizyon onarım genlerinin, uyumsuzluk onarım genlerinin ve p53’ün rol aldığı gösterilmiştir (110).

2.8. Sperm DNA hasarı belirleme ve DNA fragmentasyonu yöntemleri

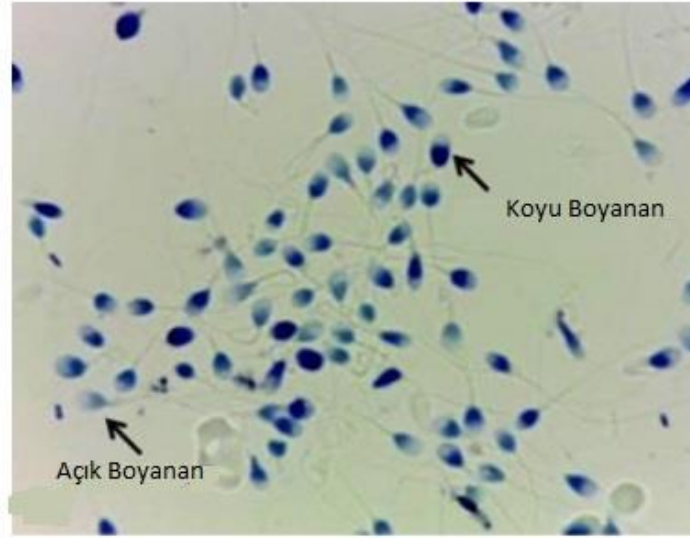
Yardımcı üreme tedavilerinde iyi kalitede spermi seçmede morfolojik özelliklerden yararlanılmaktadır. Fakat son zamanlarda morfolojik özelliklerin dölleme yeterliliği ve sağlıklı embryo gelişimi hakkında bilgi vermesi konusunda yetersiz kalması üzerine DNA fragmentasyonu’nu araştıran çalışmalar çoğalmıştır. Günümüzde kullanılan çok farklı sperm DNA hasarı belirleme yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemler basit boyama yöntemleri olabileceği gibi daha komplike yöntemler olabilmektedir. Sperm DNA fragmentasyon yöntemleriyle rutin incelemelerin yanında spermlerin DNA bütünlüğü hakkında incelemeler yapılmakta ve infertilitenin hangi boyutta olduğu belirlenmektedir. Sperm DNA fragmentasyonun belirlenmesinde çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunlar sırasıyla aşağıdaki gibidir;

- Anilin Blue
- Toluidine Blue
- Kromomisin A3
- FISH yöntemi
- In situ nick translation yöntemi
- Akridin orange yöntemi
- Komet yöntemi
- TUNEL yöntemi
- Sperm Kromatin yapı analizi (SCSA)
- Sperm Kromatin Dağılımı (SCD) (Halo yöntemi)

a) Anilin Mavi Boyaması: Anilin mavisi, sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan asidik bir boyadır. Fragmente DNA içeren spermler sıklıkla artık, kalıntı histonların varlığını gösterir. Bu kalıntı histonlar, daha düşük

kromatin paketlemesine yol açar, bu da nükleoprotein bazik gruplarının erişilebilirliğini artırır ve daha sonra anilin mavisi gibi asidik boyaların bağlanmasına afinite gösterir (111). Bu teknik lizinden zengin histonlar ile arginin sistein zengin protaminler arasında ayırım yapma prensibine dayanır ve ejakülattaki spermatozoanın temel nükleer protein bileşiminin farklılıklarını belirler. Histondan zengin immatür spermatozoa lizinden zengin olup mavi boyanırken, protaminden zengin matür spermatozoa ise arginin ve sisteinden zengindir ve boyanma göstermez (112). Anilin asidik boyama sonuçlarının anormal sperm kromatin yapısı ve erkek infertilitesini belirlemede başarılı olduğu gösterilmiştir. İn vitro fertilizasyon sonuçlarını tahmin etmede iyi bir göstergedir.

b) Toluidine Mavi Boyama: Toluidine Mavi Boyama yöntemi (TB) sperm kromatin bütünlüğündeki ve paketlenmesindeki bozuklukları tespit etmede kullanılan temel bir boyadır(113). Sperm kromatin anomalilerinin tespitinde kullanılmaktadır (114). Gevşek bir şekilde paketlenmiş kromatin ve/veya parçalanmış DNA içeren sperm çekirdeğindeki fosfat kalıntıları, TB gibi bazik boyalarla bağlanmaya karşı yüksek afinite gösterir (113). TB negatif yüklü fosfat kalıntılara bağlanan, katyonik bir boyadır. Bu sebeple hafifce veya ortokromatik boyanan hücrelerde çok az TB bağlanma bölgesi olduğunu, dolayısıyla DNA'nın bütün bir yapıda olduğunu göstermektedir. Bu durumun tam tersi koyu, diğer bir deyişle metakromatik boyanan hücrelerde çok fazla miktarda TB'nin bağlandığı fosfat bölgelerinin olduğu yani zayıf bir DNA bütünlüğünün olduğu, DNA kırıklıklarının mevcut olduğu (Şekil 2.10) gösterilir.

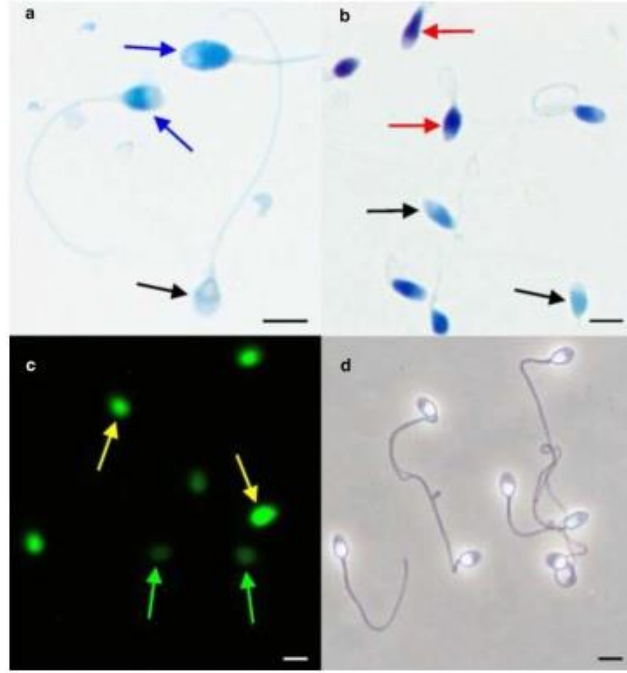


Şekil 2.10. Toluidine Blue yöntemi ile boyanmış sperm örneği. Koyu boyanan spermelerde DNA fragmentasyonu pozitif. Açık renkli boyananlarda DNA fragmentasyonu negatiftir (115).

Toluidin mavisi ile yapılan boyama sperm kromatini hakkında güvenilir bir metod olarak kabul edilir. Bu boyama yöntemi DNA yapısını ve paketlenmesini belirlemede hassastır (116). Döllenme oranlarını öngörmeye faydalı bir test olarak önerilmiştir. Döllenme oranı %50 nin altında olan vakalarda sperm DNA fragmentasyon indeksi dolayısıyla koyu boyanan sperm ortalaması yüksek çıkmıştır (117). TB testinin sonuçlarının, SCSA ve TUNEL testleriyle kıyaslandığı bir çalışmada sonuçlar arasında yüksek korelasyon olduğu, fark olmadığı gösterilmiştir (118). Sonuçlar ışık mikroskobu ile incelenebilmekte ve preparatların kalıcı olarak saklanabilme avantajı vardır.

c) Kromomisin A3 Yöntemi: Kromomisin A3 yöntemi, protaminden fakir DNA' nın indirek gözlenmesi yoluyla, zayıf paketlenmiş kromatin yapısını ortaya çıkarır. Guanin-sitozinden zengin bölgelere spesifiktir. Kromomisin A3 ve protaminler DNA içinde aynı yere bağlanmak için yarışır. Yüksek kromomisin A3 floresansı gösteren bölgelerin düşük protaminasyona sahip olduğu kabul edilir (119). Sakas ve arkadaşları ICSI olgularında, kromomisin A3 pozitifliğinin tümüyle fertilizasyon başarısızlığını göstermediğini, zayıf kromatin paketlenmesine işaret ederek dekonkansasyonu ve olası düşük fertilizasyon kapasitesini gösterdiğini bildirmişlerdir

(120). Erkek infertilitesinde kromomisin A3 pozitifliği sperm konsantrasyonu, motilitesi ve özellikle normal morfoloji ile negatif korelasyon göstermektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Anilin Blue, Toluidine Blue ve Kronomisin A3 boyamaların birlikte gösterimi a) Anilin Blue ile dfi si yüksek spermeler(okla gösterilenler) koyu mavi boyanmış. b) Toluidine Blue ile dfi si yüksek spermeler(okla gösterilenler) lacivert boyanmış c) Kromomycin A3 ile dfi yüksek olan spermeler parlak yeşil boyanmış. d) Boyanmamış spermeler (119).

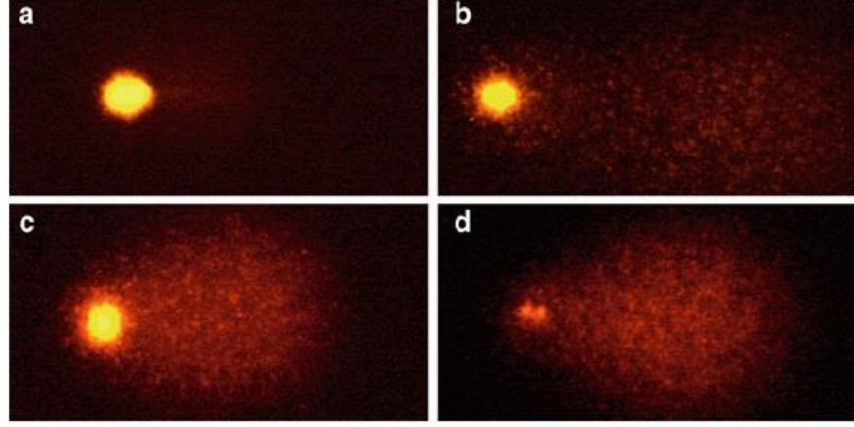
d) DNA Kırık Tespiti-Fluorescent İn Situ Hibridization (FISH): Agar matrikse gömülü hücreler alkali solüsyona maruz bırakılarak, DNA çift iplikçiklerinin tek sarmal DNA'ya dönüşmesi sağlanır. Deoksiribonükleik asit kırılması arttıkça tek sarmal DNA oluşum oranı artar. Bu yöntem in situ olarak DNA kırıklarının ve miktarının belirlenmesine olanak sağlar (120). Teknik kromatinin yapısal özelliklerini ortaya koyar ancak pahalıdır, zaman alıcı ve karmaşıktır. Bununla birlikte diğer yöntemlere üstünlüğünün olmaması kullanımını sınırlayıcı bir faktördür.

e) İn situ nick translasyon (NT Testi): Bu yöntem dUTP'nin DNA kopmalarına dahil edilmesini ölçmesi bakımından TUNEL yöntemine benzer. Bununla birlikte, hem tek iplikli hem de çift iplikli DNA kopmalarını tanımlayan TUNEL'in aksine, in situ NT testi sadece şablona bağlı enzim DNA polimeraz I tarafından katalize edilen bir

reaksiyonda, tek iplikli DNA kopmalarını tanımlar. Her ne kadar yapması basit bir test olsa da, diğer testlere kıyasla hassasiyetten yoksundur (96).

f) Akridin Orange: Akridin Orange testi (AOT), DNA denatürasyonunun derecesini belirlemek için AO'nun yeşilden kırmızıya metachromatik kaymasının kullanıldığı SCSA ile benzer prensiplere dayanmaktadır. AOT, flow sitometri gerektirmeyen, floresan mikroskop altında görsel yorumlama yapılabilen ve SCSA'dan çok daha basit ve daha ucuz bir yöntemdir (121). Bununla birlikte, belirsiz renkler, hızlı solma ve heterojen lekelenme sorunları görsel yorumlamada zorluklara neden olabilir (122). Asit uygulaması sonrası oluşan DNA denatürasyonunu ölçer. Akridin orange uygulaması ile yeşil renkte floresans veren normal yapıdaki DNA, asitle denatürasyon sonrası kırmızı floresans verir. Normal sperm ile varikosel gibi farklı androlojik patolojilere bağlı anormal sperm yapısını ayırt etmede daha hassastır (123). Akridin orange ile boyanan hücreler, boyanmayanlara göre daha fazla yapısal anormallik (vakuollü nükleus gibi) taşırlar. Tek sarmallı DNA değerlendirmesinde akridin orange analizi ve diğer tekniklerin (Terminal Transferaz Analizi gibi) güçlü ilişkileri vardır (122).

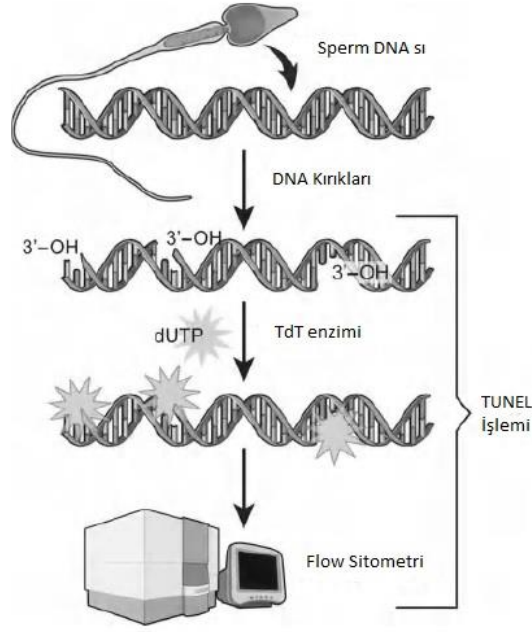
g) Komet (Tek Hücre Elektroforez) Yöntemi: Komet işlemi, diğer adıyla tek hücre elektroforezi, sperm DNA kırılmalarının doğrudan değerlendirildiği, erkek kısırlığının incelenmesinde hassas bir yöntemdir(124). İşlem sırasında yoğunlaştırılmış sperm hücreleri agaroz solüsyonunun içinde ince bir tabaka olarak yayılıp deterjan ve yüksek tuz konsantrasyonlarında eritilirler. Böylelikle DNA'nın super katlanmış halkaları, protaminler ve histonlar uzaklaştırılır. Alkali pH ortamı çift zincir DNA'nın katlanmasını engeller. Sonrasında bir elektroforetik işleme tabi tutulur. Elektroforezde kırık olan parçalar anoda doğru hareket ettirilir. Floresan DNA bağlayıcı boya ile boyanır ve daha sonra görüntüleme yazılımıyla görüntülenir. Hem tek iplikli hem de çift iplikli DNA kırıklıkları, karakteristik olarak elektroforez işleminden sonra kuyruklu yıldız görünümü oluşturur (125). Görünüm floresan mikroskop altında kuyruklu yıldız benzediği için yöntem komet ismini almıştır (126). DNA'nın yüksek moleküler ağırlıklı bozulmamış kısımları göçmeyecek ve kuyruklu yıldızın başında kalacaktır. Görüntüleme yazılımı kuyruğun uzunluğunu ve yüksek miktarda DNA iplik kopmasıyla spermde artan kuyruk floresan yoğunluğunu ölçmek için kullanılır (127). Baş ve kuyrukteki DNA miktarına göre DNA hasarının seviyesi tespit edilir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Komet assay ile ölçülmüş olan DNA hasarlarının mikrograf ile gösterimi. (a) % 0 veya hiç hasar yok (b) % 12 hasarlı hücre (c)% 45 hasarlı hücre ve (d) % 95 hasarlı hücre (127).

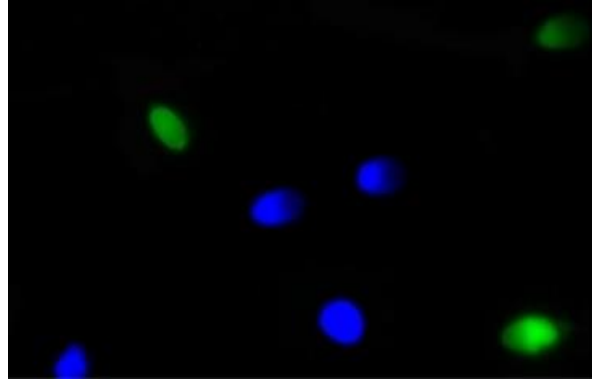
Komet yöntemi ile çeşitli hücre tiplerinde UV radyasyon, karsinojenler, toksik maddeler ve radyoterapinin etkileri incelenebilmektedir (128). DNA hasarı olan hücreler floresan mikroskop altında hasarın şiddetine göre kuyruklu yıldız şeklinde görülürler. Parçalanmamış, hasar almamış genetik materyal çekirdek içinde kalırlar. Komet assay işlemi nötral ya da alkali ortamda yapılabilir. Nötral tamponlarda sadece çift zincir kırıklar tespit edilirken, alkali tampon kullanıldığında tek veya çift zincir kırıkları tespit edilebilir (129).

h) Terminal Uridine Nick- End Labeling (TUNEL) Yöntemi: TUNEL yönteminde kalıba ihtiyaç duymayan Terminal Deoxynucleotidyl Transferaz(TdT)adı verilen DNA polimeraz enziminden faydalanılır. Bu enzim tek veya çift zincir DNA'nın 3'-hidroksil grubuna rastgele deoksiribonükleotitler (dUTP) ekler (130) (Şekil 2.13). Kopan yerlere bağlanan dUTP daha sonra etiketlenir ve flow sitometri ile veya floresan mikroskop kullanılarak ölçülür. Bununla birlikte çift zincir kırıklarında 3'OH grubu her zaman olmayabilir. Bu durumda bunları tespit edemez.



Şekil 2.13. Tek zincir kırıklarında TUNEL işleminin şeması (131).

Testin sonunda sperm TUNEL pozitif veya negatif olarak sınıflandırılır ve popülasyondaki toplam sperm yüzdesi olarak ifade edilir (Şekil 2.14).

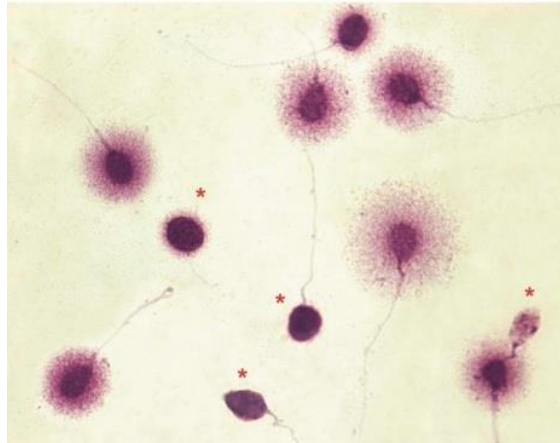


Şekil 2.14. TUNEL ile sperm DNA fragmentasyon örneği. Mavi görünenler DNAsı normal olanlar, yeşil ile boyananlar DNAsı fragmente olanlar.

i) Sperm Kromatin Yapı Analizi (Sperm Chromatin Structure Assay) (SCSA): Bu yöntem anormal kromatin yapılı spermdeki DNA'nın asit veya ısı denatürasyonuna daha yatkın olduğu fikrine dayanır (61). İki yöntem aynı sonuçları vermekle birlikte asitle sperm kromatin yapı analizi daha kolay uygulanabilmektedir (132). Akridin Orange boyasının (AO) metakromatik özelliklerini kullanan SCSA,

sperm DNA'sının in situ asit ya da ısı kaynaklı denatürasyona duyarlılığını ölçer. Flow sitometrisi kullanılarak asit veya ısı muamelesinden sonra AO'nun bu metakromatik kaymasının yeşilden kırmızıya doğru ölçülmesiyle, DNA denatürasyonunun derecesi belirlenir (61). Spermelerde DNA kırıkları yanında histonların protaminlere oranlarında bir anormallik varsa onuda gösterir. Sonuçları oldukça kesin ve tekrarlanabilir. Bu yöntemde DNA fragmantasyon indeksi (DFI) sınırı %30 olarak belirlenmiştir (77). Sperm DFI oranı % 30 un üzerinde olan hastalarda doğal yollardan gebe kalma şansı çok uzamaktadır, düşük oranları artmaktadır veya gebelik oluşmamaktadır. Yaşam tarzını değiştirmek % DFI oranını azaltabilmektedir. DFI indeksi >%30 olan hastalarda ICSI tedavi önerilmektedir. Hatta >50% üzerinde testikülersperm ekstraksiyonu (TESE) ile birlikte ICSI önerilmektedir.

j) Halo Sperm Yöntemi-Sperm Chromatin Dispersion (SCD): Sperm kromatin dispersiyon (SCD) testi, sperm DNA kırıklıklarını direk tespit eden bir testdir (133). Sperm örneği, lam üzerinde bir agaroz matrikse daldırılır, denatüre etmek için bir asit çözeltisi ile muamele edilir ve daha sonra bir lizis tamponu ile membran ve proteinler uzaklaştırılır. Sonunda preparat boyanarak boyama tipine göre ışık mikroskobu yada floresan mikroskopda incelenir. Merkezde çekirdek olacak şekilde DNA bütünlüğü olan spermelerde büyük bir hale görüntüsü vardır. DNA kırıklıkları olanlarda halo formu oluşmaz ya da çok az oluşur (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Halo testi sonrası Diff-Quick boyası ile boyanmış olan spermeler. Yıldızlılar DNA fragmantasyonu olan spermeler. Etrafında hale görülenler (yıldızsız olanlar) DNA kırığı olmayan spermeler (134).

Sperm DNA Fragmantasyon testleri aşağıda listelenen kişilere önerilebilir:

1. Açıklanamayan İnfertilitesi olanlar
2. Embriyo gelişiminde duraklama yaşayan iftler
3. Yardımcı reme yöntemi kullanımında anormal embriyo gelişimi olanlar
4. Tekrarlayan Tüp bebek (IVF/ICSI) başarısızlığı olanlar
5. Tekrarlayan Gebelik Kaybı olanlar

2.9. Sperm Hazırlama (Yıkama) Yöntemleri

Spermin yumurtayı döllemeye hazır hale gelmesine kapasitasyon denir. İn vivo Şartlarda servikal mukus, sperm hücrelerinin mikro-çevresini oluşturan ve kapasitasyonu engelleyen seminal plazmadan kaçmasını sağlayarak kapasitasyon başarısını artırır. Aşılama, IVF işlemleri veya deneysel çalışmalarda invitro Şartlarda kapasitasyonu gerçekleştirmek için sperm hücrelerini kapasitasyonu bloke eden epitelyal hücreler, immün hücreler, debrisi ve bakterilerden uzaklaştırmak gerekir. Bu nedenle IVF çalışmalarında semen yıkama işlemi sperm hücresini seminal plazmadan ayırmak amacıyla yapılmaktadır. Uzun süre seminal plasma içerisinde bekleyen spermlerin de dölleme kapasiteleri, akrozomal reaksiyonları gibi fonksiyonları kötü etkilenmektedir (135). Sperm hazırlama yöntemi ileri hareketli spermleri, morfolojisi düzgün olanları ve ayrıca DNA hasarı olmayan spermleri seçmek zorundadır.

Tüp Bebek uygulamalarının erken safhalarında semen örnekleri basit bir yıkama yöntemi olarak kültür sıvısı ile karıştırılarak, hücrelerin santrfjle ayrışması sağlanırdı. Bu teknik, spermin serbest oksijen radikalleri tarafından oksidatif hasarına neden olabileceği için eleştirilmiştir (136). Tüp bebek uygulamaları ilerledikçe sperm hazırlama teknikleri de gelişti. Bunlardan en yaygın olanları, 1980li yıllarda tanımlanmış olan, swim-up(yüzdürme) ve yoğunluk gradient santrifugasyon yöntemleridir. Bunlardan başka rutin uygulamalarda çok kullanılmayan başka yıkama yöntemleride mevcuttur (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Tüp Bebek uygulamalarında alternatif sperm yıkama yöntemleri

Swim up
Yoğunluk Gradient Yöntemi
Glass-wool kolon filtrasyonu
Zeta Yöntemi
Elektroforez
MACS yöntemi
Mikro-akışkanlar

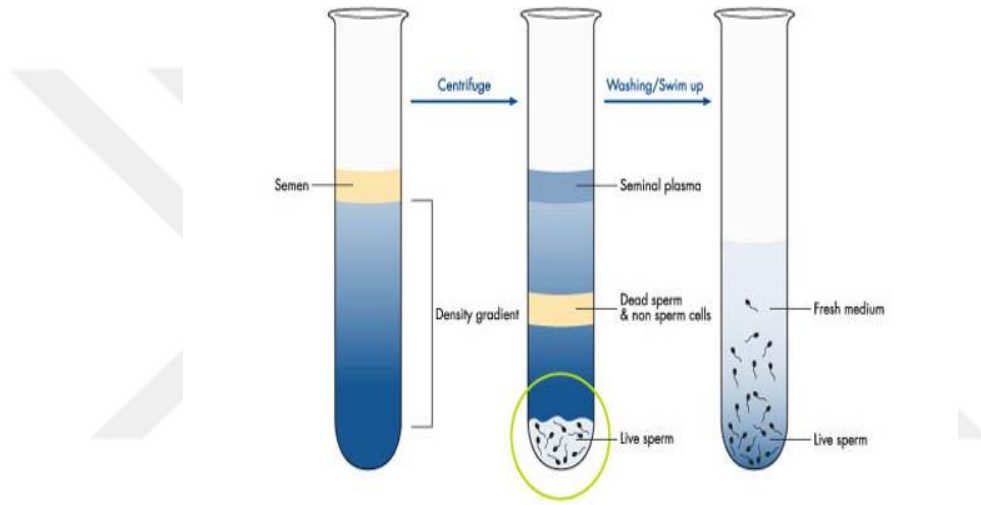
2.9.1. Swim-up Yöntemi

Swim-up yönteminin çeşitli varyasyonları mümkündür. Seminal plazma doğrudan kültür sıvısıyla kaplanabilir ve sperm seminal plazmadan kültür ortamına yüzmeye bırakılabilir. Bunu takiben, sperm süspansiyonunun seminal plazma bileşenlerinden yeterli şekilde ayrılabilmesi için yıkanmalıdır. Alternatif olarak semen örneği seyreltilip santrüfjü edildikten sonra pellet gevşetilip üzeri kültür solüsyonuyla kaplanır yada seyreltme yapılmadan santrüfjü yapılır. Sonrasında pellet gevşetilerek üzerine kültür sıvısı eklenip spermlerin yukarı yüzmesi sağlanabilir. Bu son teknik daha ziyade sperm konsantrasyonu az olan oligozoospermik hastalarda yapılmaktadır. Eğer dondurulup çözülmüş sperm kullanılacaksa dilüsyon sıvısı çok yavaş eklenmelidir. Üzerine kültür sıvısı eklendiğinde 37 derecede inkübatörde 45-60 dakika bekletilip spermlerin yukarı yüzmesi sağlanır. Kullanılacak olan spermler yüzeyden toplanır. Swim-up yöntemi daha çok sperm sayısı ve hareketliliği iyi olan semen materyallerinde kullanılır.

2.9.2. Yoğunluk Gradient Yöntemine Göre Sperm Hazırlanması

Sperm hazırlama yöntemi ileri hareketli spermleri, morfolojisi düzgünolanları ve ayrıca DNA hasarı olmayan spermleri seçmek zorundadır. Yoğunluk gradient yöntemi spermleri yoğunluklarına göre ayırmaktadır. Sonuçta yoğunluğuna göre ayrılan spermler solüsyon içerisinde belli bir lokasyonda toplanmaktadırlar. Olgun, morfolojik olarak normal kabul edilen spermlerin yoğunluğu $>1,12$ g/ml'dir. Diğer taraftan olgunlaşmamış ve anormal yapıdaki spermlerin yoğunluğu 1,06-1,09 g/ml arasındadır (137).

Yoğunluk gradient yöntemi 1980 lerin başlarında ticari bir ürün olan Percoll'ün kullanılmaya başlanmasıyla popüler hale gelmiştir. Percoll'ün açılımı polyvinylpyrrolidone ile kaplı kolloidal silika parçaları demektir (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). %80lik percoll(v/v) spesifik olarak 1.10 g/ml yoğunluktadır. Bu şekilde sadece en olgun sperm bu yoğunluğun altına geçebilirler (Şekil 2.16). Ancak, Percoll'ün endotoksik olmasından ötürü, yardımcı üreme teknikleri'nde kullanımı yasaklanmıştır. Sonrasında endotoksik olmayan silane kaplı silika parçaları geliştirilmiştir. Isolate, Puresperm, Spermgrad, Suprasperm, pureception, Sil-Select ve Sidney IVF gibi markaların gradient solüsyonları klinik kullanıma girmiştir (138, 139).



Şekil 2.16. Yoğunluk Gradient yöntemine göre spermelerin hazırlanması (140).

2.9.3. Mikro-akışkan Teknolojiler ve Mikro-akışkanlarla Sperm Hazırlanması

Mikro-akışkanlar, biyolojik ve kimyasal analizlerde, immunodiagnostik testlerde, klinik ve adli analizlerde, moleküler ve tıbbi tanılarda kullanılmaktadır (141-144). Sperm seçiminde kullanılan mevcut mikro-akışkan teknolojiler aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.4).

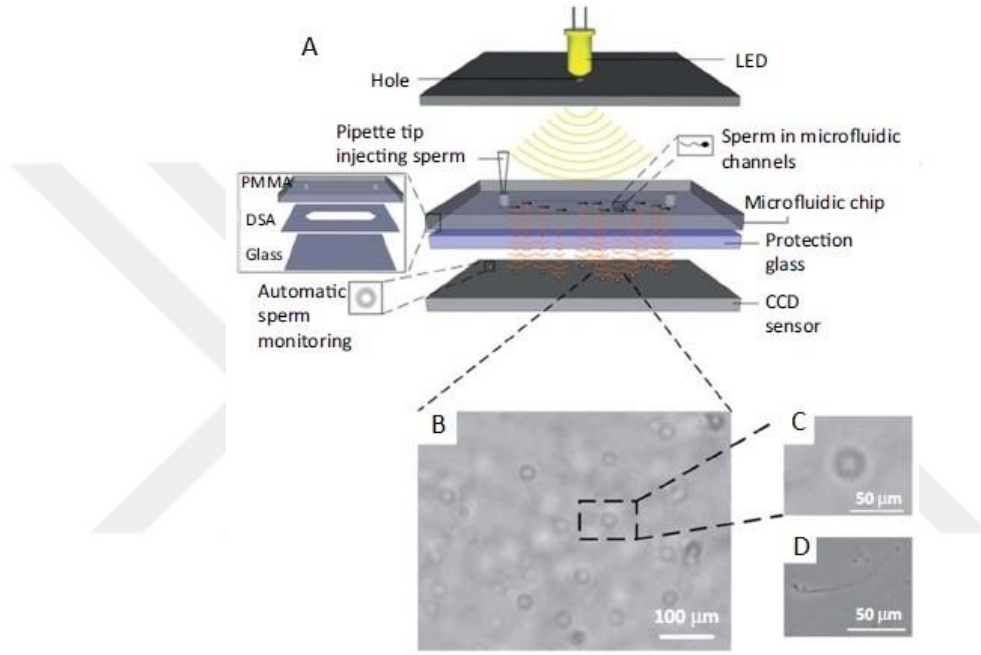
Şimdiye kadar mikro-akışkan teknoloji ile sperm seçiminde kemoatraktifler, sıvı akışı ve termotaktik güçlerden faydalanılmıştır. Pasif mikro-akışkan teknolojiye ise bunların hiç biri yoktur. Kullanılan güç sadece sperm kendi hareketliliğidir. Pasif mikro-akışkan teknolojiye amaç, en hareketli sperm isantrüfüj olmadan mikro-akışkan

kanalların çıkışından optimum bir sürede toplarken, daha az hareketli veya hareketsiz spermeleri mikrokanallarda geride bırakmaktadır.

Tablo 2.4. Sperm seçiminde kullanılan mikro-akışkan aparatlar.

Prencip	Malzeme	Solüsyon	Sperm Kaynağı	Örnek miktarı	Görüntüleme	Referans
Pasif	PMMA-DSA-Cam	HTF	Fare	1 µl	Lenssiz şarj bağlantılı cihaz(CCD)	145
Pasif	PMMA-DSA-Cam	BSA'lı HTF	İnsan, Fare	1 µl	CCD bağlantılı inverted mikroskop	146
Pasif	PMMA-DSA-Cam	%1 BSA lı HTF	insan	560 µl	CCD bağlantılı inverted mikroskop	147
Pasif	PDMS-Cam	HTF	İnsan,boğa	1 ml	CCD bağlantılı inverted mikroskop	148
Kemoatraktan (Cumulus, asetilkolin)	Silikon-cam	Hepes tamponlu HTF	İnsan	< 2 µl	Kaset kayıt edici tabanlı B&W TV kamerası ve mikroskop	149
Kemoatraktan (Kumulus hücreleri)	PDMS-Cam	HTF	Fare	Yaklaşık 25,000 sperm	CCD bağlantılı inverted mikroskop	150
Kemoatraktan (yumurta)	PDMS-Cam	HTF	Fare	Yaklaşık 25000 sperm	CCD bağlantılı inverted mikroskop	151
Kemoatraktan (asetil kolin)	PDMS-Cam	HTF	Fare	1 µl	CCD bağlantılı inverted mikroskop	152
Sıvı Akışı	PDMS	%0,2 BSA' lü HTF	İnsan	50 µl	CCD bağlantılı inverted mikroskop	153
Sıvı Akışı	PDMS	DPBS	Boğa, fare, insan	20 µl	Mikroskop ve dijital kamera	154
Sıvı Akışı	PDMS-Cam	RPMI, seminal plasma	insan	200 µl	Elektrik dirençli darbe bulma	155
Sıvı Akışı	PDMS-Cam	RPMI, %0,1 polyvinyl alcohol, %3 BSA	insan	2,3 µl	Mikroskop ve dijital kamera	156
Termotaksis	PDMS	HTF	insan	0,5 µl	CCD bağlantılı inverted mikroskop	157
Basınç ve Kemoatraktan	PDMS-Cam	%1PBS,%1 BSA (w/v)	Fare	Belirtilmemiş	CCD bağlantılı inverted mikroskop	158

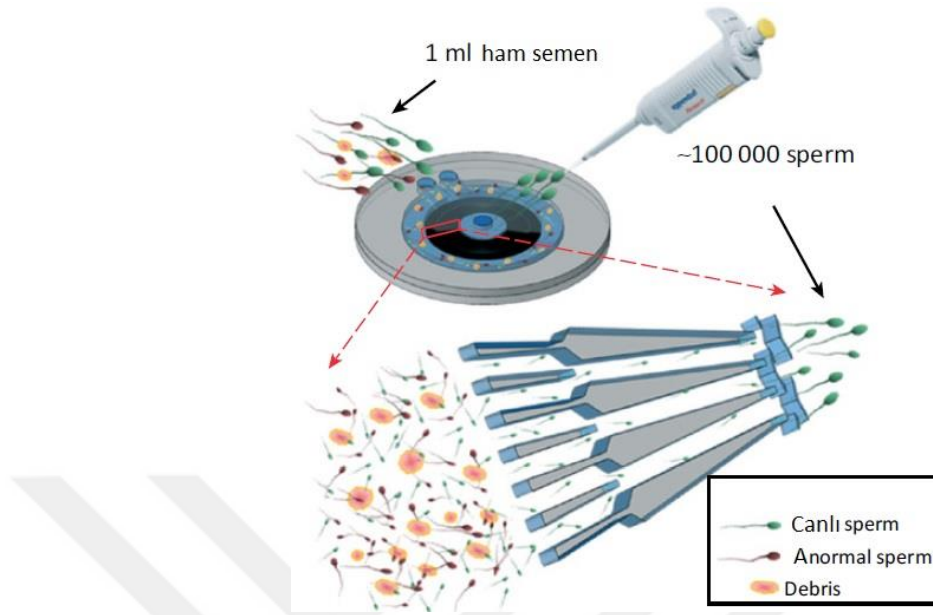
Teknolojik gelişmelere bağlı olarak zamanla çok sayıda spermi aynı anda gözlemleyebilmek ve klasik mikroskobideki dar/kısıtlı alanda inceleme yöntemini aşmak için mikro-akışkan çiplere kamera merceği yerleştirildi (145). Bu mikro-akışkan platform sayesinde spermlerin geçtiği yerlerin, iz düşümlerinin incelenmesi yapıldı. Mikrokanallar ve spermlerin hareketi geniş bir alanda hem yatay hem dikey düzlemlerde incelendi (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Geniş alan lens takılmış pasif mikro-akışkan düzeneği(A) CCD kamera tarafından spermlerin iz düşümleri alınıyor. (B) Büyütülmüş görüntü(C) 50 mmlik düzlemde klasik 10 X objektifli mikroskop görüntüsü ve (D) aynı alanın mikroçipdeki geniş alan görüntüsü.

Bu platform sayesinde, mikro-akışkan çipin çıkışında daha yüksek bir hareketlilik, girişte ise daha düşük bir hareketlilik tespit edilebildi. Bundan yola çıkarak geliştirilen, ham spermin işlenmesi konusundaki pasif mikro-akışkanların tasarımlarında, tek bir kanal ve bir polikarbonat membran filtresi olabileceği gibi yatay düzlemde çoklu kanallardan oluşan düzenekler geliştirildi. Örneğin yatay düzlemde 500 kanalın 400 μm aralıkla yanyana yerleştirildiği bir mikroçiple yapılan bir çalışmada, klasik sperm hazırlama yöntemleri ile kıyaslandığında 20 dakikadan az bir sürede, boğa

spermlerinde %89'dan fazla, insan spermlerinde ise %80 inde DNA bütünlüğü olan canlı spermler elde edilmiştir (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Pasif iletimin olduğu, santrüfjlemenin olmadığı çip. 1ml semen kullanılarak, 20 dakikada kanallar sonunda en iyi hareketi olan spermlerin ayıklanması (148).

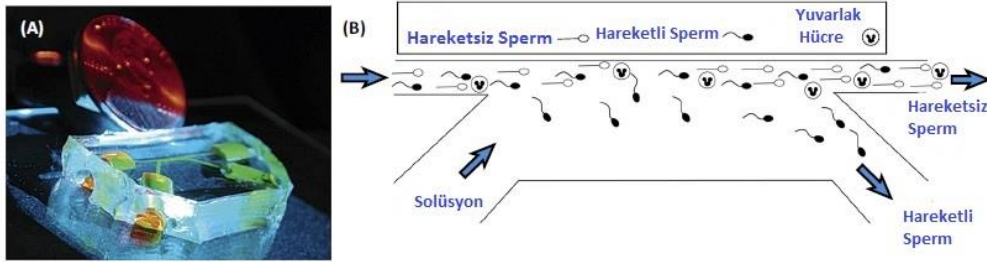
Mikro-akışkan çiplerde, en iyi spermin seçilebilmesi için kemoatraktanlar da kullanılmıştır. In vivo olarak, yumurtadan salınan sitokinler, yumurta kanalı içerisinde, spermleri, yumurtaya doğru çeken, kademeli bir biyoaktif kalıntı oluşturur. Doğal olarak oluşan bu fenomenden etkilenerek, mikro-akışkan kanallara spermlerin kimyasal etkileşimi de eklenerek en çok etkileşime giren spermin uygun zaman aralığında toplanmasını sağlayan düzenekler geliştirilmiştir. 1993 yılında, mikrokanallarda, ya hyaluronik asit ya da servikal mukus ile doldurulmuş mikro bölmeler kullanılarak, sperm seçimine kemoatraktan kullanımı gerçekleştirildi (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Sperm seçiminde kemoatraktan kullanma düzeneği (149).

Nonoksinol-9 ve C13G gibi farklı spermisitlerin ve spermisit konsantrasyonlarının multipleks değerlendirmesi yapıldı. Numuneler ayrıca insan anti-IgG antikor kaplı boncukları kullanarak sperm spesifik antikorların varlığı için değerlendirildi. Bu tarz çoklu parametrelerle sperm seçiminin toplama haznesindeki sperm sayısını %96' ya kadar çıkardığı görüldü. Embryo kültürünün mikro-akışkan platformda yapılması ve blastokist gelişim oranlarının düz petri kapları ile kıyaslanması sonucunda fark bulunmadı. Bu sonuçlar, tek bir ünite de sperm ve oosit manipülasyon tekniklerini birleştiren mikro-akışkan platformlar için büyük umut vaat etti. Yakın zamanda başka bir PDMS-cam mikro-akışkan tasarımı kemoatraktan olarak asetilkolin kullanarak hareketsiz spermelerden ileri hareketli spermeleri ayırmak için geliştirildi (152). Bu düzenekte spermeler asetil koline iyi cevap verdiler ve sonuçta elde edilen spermelerin neredeyse %100'ü hareketli oldu.

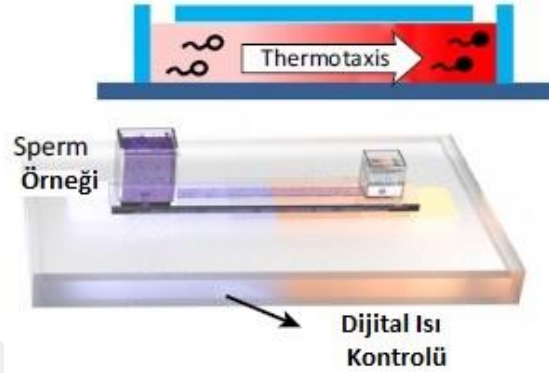
Başka bir tip mikro akışkan düzenekte sıvı akımı kullanılmıştır. Spermelerin hem hareket hem de belli bir sıvı akışından kurtulma özelliklerinden faydalanarak sperm seçebilmek için bu yöntem geliştirilmiştir (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Akışkan Çip A) Akışkan düzenek görüntüsü B) Düzenek çalışma sistemi (152).

Sıvı akımı, harici bir güç kaynağı olmadan, kılcal kuvvetler ve yerçekimi tarafından sabit bir hidrolik basınçla pasif bir şekilde oluşturulur. Düzenek hareketli spermeleri hareketsiz spermelerden ve diğer hücre debrislerinden ayırabilmek için sperm hareketinden ve sıvı hareketinden dışarı yüzebilmek becerisinden faydalanmaktadır. Bu şekilde neredeyse %100 hareketli sperm elde edilmesini sağlanmıştır. Ayrıca morfolojik olarak çok daha iyi spermeler elde edilmiştir.

Bir başka tip mikro-akışkan düzenekte ise termotaksis kullanılmıştır (Şekil 2.21). Sperm kalitesinin değerlendirmesinde termotaksinin önemli bir faktör olduğu gösterilmiştir (157). Buna göre ileri hızlı hareketli spermelerin ısıya yöneldiği düzenekler yapılmış ve ona göre sperm eldesi yapılmıştır.



Şekil 2.21. Dijital ısı kontrolü ile sperm seçilmesinin şeması (157).

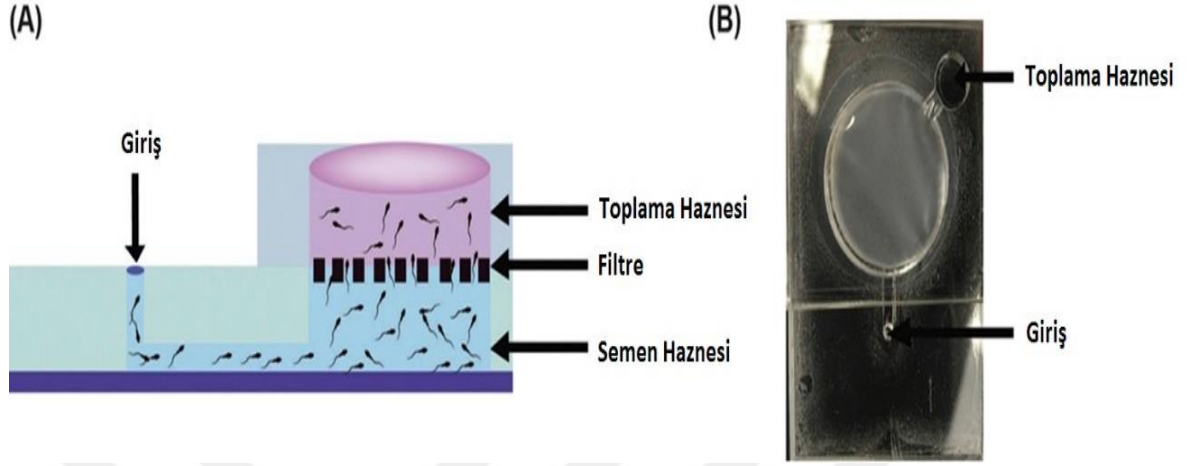
Özetle, son zamanlarda spermelerin uzun süre inkübe edilmesi ve santrifügasyona muamele edilmeleri neticesinde, spermelerde kromatin hasarına yol açabilen reaktif oksijen türevlerinin (ROS) arttığı görülmüştür (159). Sperm DNA hasarı da infertilite ve tüp bebek başarı oranlarını etkileyen bir faktör olduğundan, ROS miktarını arttırmayacak yeni yöntem arayışlarına girilmiştir. Bunun için son on yılda non-invaziv MSOME (motile sperm organelle morphology), sperm yüzey elektriksel yükü, Zona pellusida bağlanma kapasitesi, apoptik olmayan sperm seçimi ve mikro-akışkan araçların kullanılması gibi yöntemler geliştirilmiştir.

Mikro akışkanlar, sıvıların mikro ölçekte mekaniğini çalışan ve çok küçük miktardaki sıvılara ve/veya hücrelere müdahale edebilmek için cihazların veya montaj malzemelerin mühendisliğinden faydalanan bir bilim dalıdır (160).

Tüp Bebek alanında mikro akışkanların kullanılmaya başlaması ilk olarak sperm seçimi için önerilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan mikroçipin 2 haznesi vardır. Ortada polikarbonat filtre mevcuttur. Bu filtrenin üzerinde 8 um, 14um ve 20 um çaplarında delikler mevcuttur. İşlem görmemiş semen örneği alt hazneye bırakılır. Üst hazneye %5 lik insan serum

albumini taşıyan, insan tubal sıvısı bırakılır. Şekil 2.22 de mikro-akışkan sperm ayıklama aparatı gösterilmiştir.



Şekil 2.22. Çalışmada kullanılan çip düzenegi A) Mikroçip işlevinin şematize edilmiş hali B) Mikroçipin üstten fotoğrafı

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Toluidine Blue

Metakromatik bir boyadır DNA boyanmasında kullanıldı. % 50 McIlvain tamponu içerisinde pH 3,5 olacak şekilde %0,01 olarak hazırlandı (SIGMA 89640).

3.1.1.2. N-HCL

DNA fragmentasyon testinde fixasyon sonrasında kullanıldı (Merck HC73096157).

3.1.1.3. Di sodyum hidrojen fosfat (Na₂PO₄)

Toluidine boyaması için gerekli olan McIlvain tamponu hazırlanmasında kullanıldı (Merck K49142680722).

3.1.1.4. Sitrik Asit

McIlvain tampon hazırlanmasında kullanıldı (Merck K48283044724).

3.1.1.5. Aseton

Fiksasyon aşamasında kullanıldı (Merck K49117214723).

3.1.1.6. Etanol

% 100 lük etanol fiksasyonda kullanıldı (Merck K49215483728).

3.1.1.7. Distile Su

DNA fragmentasyon testinde solüsyonların hazırlanması ve prosedürü esnasında kullanıldı (Eczacıbaşı).

3.1.2. Solüsyonlar ve Tampon Çözeltiler

3.1.2.1. Gradient Solüsyonu

Sperm hazırlanması esnasında kullanıldı. Hazır olarak alınan %100 stok solüsyonundan %40 ve %80'lik solüsyonlar hazırlandı (Isolate Irvine scientific 99306).

Hazırlanışı: %100'lük stok solüsyonu, son hacim 10 ml olacak şekilde 15 ml'lik konik tüplerde, sperm yıkama solüsyonu ile %80 ve %40 'lık konsantrasyonlarda hazırlandı. %80'lik için 8 ml gradient solüsyonu 2 ml sperm yıkama solüsyonu ile karıştırıldı. %40'lık için 4 ml gradient solüsyonu 6 ml sperm yıkama solüsyonu ile karıştırıldı.

3.1.2.2. Sperm Yıkama Solüsyonu

Sperm hazırlama işlemlerinde kullanıldı. Hazır olarak alındı. (Irvine Scientific 9983).

3.1.2.3. McIlvain Tamponu Hazırlanışı

3,56 gr di sodyum hidrojen fosfat ile 2,1 gr sitrik asit 100 ml de eritilerek pH 3,5 e ayarlandı. Toluidine Blue boya tamponu olarak kullanıldı.

3.1.2.4. Fiksatif Hazırlanışı

Hücreleri sabitlemek için kullanılan fiksatif için son hacim 60 ml olacak şekilde, 28,8 ml etanol, 1,2 ml distile su ve 30 ml aseton şalenin içinde hazırlandı. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlandı ve buzdolabında saklandı. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanıldı.

3.1.2.5. 0.1 N HCL Çözeltisi Hazırlanışı

Son hacim 50 ml olacak şekilde 45 ml distile su 5 ml 1 N HCL ile karıştırıldı.

3.1.3. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.3.1. Santrüfuj

Rotor çapı 30 cm olan ve 4000 rpm e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dakikalık zaman ayarlayıcı ve 28 tüp kapasiteli santrüfuj kullanıldı (Nüve nv 800).

3.1.3.2. Soğutucu Dolap

+4 derecede sabit ısı verebilen buzdolabı kullanıldı (Arçelik).

3.1.3.3. Hassas Terazı

Kimyasalların tartılmasında 0,001 gr hassasiyetindeki terazi (Precisa) kullanıldı.

3.1.3.4. Otomatik pipetör

200,1000 µl kapasiteli otomatik pipetörler kullanıldı (Eppendorf).

3.1.3.5. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan binoküler ışık mikroskobu (ISOLAB) preparat incelemesi sırasında kullanıldı.

3.1.3.6. Flow kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine hücre ekiminin yapılması, test solüsyonlarının hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, %99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, UV ve floresan ışığı olan flow kabin (Holten IVF Tech) kullanıldı.

3.1.3.7. İnkübatör

Hücrelerin 37 derece de inkübe edilmesi için kullanıldı (Sanyo MCA -5AC).

3.1.3.8. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için pH metre (Hanna Phep) kullanıldı.

3.1.3.9. Şale

3.1.3.10. Serolojik pipet

3.1.3.11. Analizör

Sperm analiz işlemleri ışık mikroskobundan görüntüyü alıp işleyip analiz etmeye yarayan bir bilgisayar programı ile yapıldı (ISOLAB).

3.1.3.12. Konik Tüp

15 ml lik mavi vidalı kapaklı (Falcon) tüpler kullanıldı.

3.1.3.13. Mikro akışkan çip

Sperm hazırlanması esnasında kullanıldı (KOEK FERTİLE PLUS).

3.2. Hasta Seçimi

Bu prospektif randomize çalışma açıklanamayan infertilite ve tekrarlayan başarısız tüp bebek denemeleri olan, infertil tanısı konan ve Şubat 2016-Haziran 2018 tarihleri arasında “Malatya Özel Doğu Fertil Tüp Bebek Merkezi’ne” çocuk istemi ile başvuran, toplam 428 hastada uygulandı. Çalışma önce “Malatya Klinik Araştırmalar Etik Kurulu”na sunuldu ve etik kurul onayı alındı (Protokol no:2017-34).

Çalışmaya katılan hastalardan alınan semen örneklerinden gradient ve çip yöntemleri kullanılarak spermier hazırlandı. Gradient sperm ayıklama tekniği uygulanan 312 hasta ile mikro-çip sperm ayıklama tekniği uygulanan 116 hastanın dölllenme ve gebelik başarı oranları takip edilerek karşılaştırıldı.

Ayrıca, tedaviye katılan ve her iki gruba ait 30 hastadan ileriye dönük olarak sperm örnekleri alındı. Çalışmaya kadın yaşı, tedavi süresi, kullanılan ilaç miktarı, toplanan yumurta sayısı, sperm sayısı, sperm hareketliliği açısından benzer hastalar dahil edildi. Semen örnekleri kontrol grubu, gradient grubu ve çip grubu olmak üzere üç alt gruba ayrıldı. Toluidine Blue ile boyanan sperm hücreleri DNA fragmantasyonu ve morfolojisi açısından karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.2.1. Hasta Seçim Kriterleri

- En az 1 yıl istemesine rağmen gebe kalamamış olmak.
- Sigara içmemek.
- Sperm çip yöntemi 5 milyon/ml den fazla sayıdaki sperm örnekleri ile çalıştığından, sperm konsantrasyonu 5 milyon/ml den fazla olan hastalar çalışmaya dahil edildi.
- Kadına bağlı sebeplerde yumurtalık rezervi en önemli genel faktörlerden biri olduğu için tüp bebek işleminde toplanan yumurta sayısı 5 den fazla

olan hastalar çalışmaya dahil edilerek zayıf yanıtli hastalar çalışmadan çıkarıldı.

- İlk defa tüp bebek(mikroenjeksiyon) denemesi yapılan hastalar ile 2 den fazla denemesi olan hastalar çalışmaya dahil edildi.
- Önceki tüp bebek denemelerinde spermleri mikro-çip ile hazırlanan hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.3. Sperm Örneklerinin Hazırlanması

3.3.1. Gradient Yöntemine Göre Spermlerin Hazırlanması

Tüp bebek hastalarından yumurta toplama günü özel bir odada steril kaplara sperm örneği alındı. Alınan örnek 37 derecede 20 dakika inkübe edilerek çözünmesi sağlandı. Mikroskopda 20x büyütmede sperm konsantrasyonu hesaplandı. 1 ml %80 lik gradient solüsyonu 15 ml lik konik tüpe kondu. Üzerine 1 ml %40 lık gradient solüsyonu eklendi. En üste 2 ml likefiye olan sperm örneği eklendi. 20 dakika 1290 rpm de çevrildi. Sonrasında pelletin üstü atıldı. 2 ml sperm yıkama solüsyonu eklendi. 1670 rpm de 10 dakika çevrildi. Supernatant atıldı. 0,1 ml sperm yıkama solüsyonu eklenerek 37 derece de inkübatör içerisinde 45 derece açılı ile mikroenjeksiyon saatine kadar en fazla 2 saat inkübe edildi. Sonrasında spermlerin bir kısmı mikroenjeksiyon işleminde kullanıldı. Bir kısmı ise sperm DNA fragmentasyon incelemesi ve sperm morfoloji incelemesi için lamlara yayıldı.

3.3.2. Mikro-çip Yöntemine Göre Spermlerin Hazırlanması

Tüp Bebek uygulaması yapılacak olan hastalardan yumurta toplama günü sperm örnekleri steril kaplara alındı. Alınan örnek 37 derecede 20 dakika bekletilerek çözüldü. Mikroskopda 20x büyütmede sperm konsantrasyonu hesaplandı. Sonrasında 800 µl sperm pipet vasıtasıyla mikro çipin yükleme haznesine dikkatlice yüklendi. Membran filtrenin üzerine 37 derecede 1 ml sperm yıkama solüsyonu eklendi. 30 dakika 37 derece de inkübe edildi. Sonrasında toplama haznesinden sperm örnekleri alınarak bir kısmı mikroenjeksiyon işleminde kullanıldı. Bir kısmı ise sperm DNA fragmentasyonu ve sperm morfoloji incelemesi için lamlara yayıldı.

3.4. Sperm DNA Fragmantasyonu İncelemesi

Lama yayılan sperm örnekleri 1 gün boyunca oda ısısında kurumaya bırakıldı. Lamlar 1:1 aseton ve %98'lik etil alkolden oluşan solüsyonunda +4 C°de 30 dakika bekletilerek fiksasyona tabi tutuldu. 5 dakika +4 derecede HCL çözeltisinde bekletildi. 2 dakika süreyle 3 kez oda ısısında distile su içerisinde bekletilerek yıkama yapıldı. Preparatlar 5 dakika süre ile %50 mcIIvain solüsyonu içinde hazırlanmış % 0,01'lik Toluidine Blue boyası ile boyandı. Sonrasında distile suya daldırılıp çıkarılarak oda ısısında kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar 100x büyütmede immersiyon yağında analiz programı yardımıyla incelendi. Koyu lacivert boyananlar DNA fragmantasyonu pozitif olarak açık mavi olanlarda negatif olarak değerlendirildi. Her grupta ortalama 300 sperm sayıldı. DNA fragmantasyonu toplam sayıya bölünerek oranlandırıldı.

3.5. Spermilerin Morfolojik Açıdan Değerlendirilmesi

Toluidine mavisi ile boyaması yapılan sperm örnekleri x100 büyütmede immersion yağı ile mikroskopik analizleri yapıldı. Sperm morfoloji değerlendirmesinde baş, boyun, kuyruk analizlerinde Kruger Kriterleri dikkate alındı.

3.6. İstatistiksel Analiz

Gradient yöntemi ve mikro-çip yöntemi ile spermeleri hazırlanmış olan hastalarda grupların yaş ortalamaları, ortalama tedavi süreleri, kullanılan ortalama ilaç miktarları, toplanan ortalama yumurta sayıları, ortalama sperm sayıları ve ortalama sperm hareketlilikleri, örneklem sayısı >50 olduğundan Kolmogorov-Smirnov normallik testi ile değişkenlerin dağılımına bakıldı. Normal dağılım göstermedikleri için grup ortalamaları Mann-Whitney U testi ile kıyaslandı. Gruplar arası döllenme ve gebelik oranları, gruplar bağımsız ve non-parametrik şartlardan dolayı Ki-kare testi ile değerlendirildi. DNA fragmantasyonu ve morfoloji kıyaslamaları için çalışmanın başında power analizi yapılarak en az 30 hasta olmasına karar verildi. Çalışmaya katılan hastalar içinden rastgele alınan 30 sperm örneği kontrol, gradient, mikro-çip grupları olarak 3'e ayrıldı. Bağımlı çoklu grup olduğu için kıyaslanması için Friedman ve Wilcoxon testleri kullanıldı. İstatistiksel olarak $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Tüp Bebek Yönteminde Mikroenjeksiyon İçin Sperm Hazırlama Tekniğine Göre Elde Edilen Bulgular:

Çalışmamıza dahil olan, 428 hastanın spermi gradient yöntemine göre hazırlanan hastalar “Gradient grubu” (n=312), spermi çip ile hazırlanan hastalar “Çip grubu” (n=116) olarak gösterildi. Gruplarda örneklem sayısı (n) 50 den fazla olduğu için Kolmogorov-Smirnov testi ile normallik testi yapıldı ve normal dağılım olmadığı saptandı. Grup ortalamaları Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Uygulama grupları kıyaslandığında gruplar arasında bakılan parametreler açısından fark bulunmadı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışmaya alınan hastaların yaş, tedavi süresi, kullanılan ilaç miktarı, yumurta sayısı, sperm sayısı ve motilite karşılaştırılması

	Gradient Grubu X ± SD	Çip Grubu X ± SD	P değeri
Kadın yaşı	31.49±0.5	31.07±0.3	0.39
Tüp bebek tedavi süresi (gün)	9.4±0.05	9.3±0.08	0.26
Tedavide kullanılan ilaç miktarı (ünite)	1828±35	1721±60	0.15
Toplanan oosit sayısı	13.6±0.39	13.06±0.56	0.9
Sperm sayısı (milyon/ml)	53.5±1.5	49.5±3	0.19
Sperm hareketliliği (%)	54.1±0.85	52.3±1.5	0.15

Tüp bebek uygulamalarının başarılı olup olmadığının belirlenmesi için gruplar arası döllenme oranları ve gebelik oranları ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı (Tablo 4.2). Döllenme oranları, döllenmiş yumurta sayısı ICSI yapılan yumurta sayısına bölünerek hesaplandı. Gebelik oranları ise transfer tarihinden 12 gün sonra kandan bakılan beta-HCG testi (gebelik testi) sonucu >100 IU olanlar gebe kabul edildi. Biyokimyasal gebelikler çalışmaya dahil edilmedi. Çalışmamıza katılan hastalardan ilk defa tüp bebek tedavisi alan hastalarda (n=336) ki-kare sonucuna göre gruplar arasında döllenme oranları ve gebelik oranları açısından fark görülmedi.

Tablo 4.2. İlk tüp bebek denemesi olan hastalarda, gruplar arası döllenme ve gebelik oranlarının karşılaştırılması

	Gradient Grubu (n=256)		Çip Grubu(n=80)		P değeri
	Oran	%	Oran	%	
Döllenme oranları	1950/2776	70.20	563/811	69.40	0.65
Gebelik oranları	130/256	50.70	43/80	53.75	0.64

Çalışmamıza katılan hastalardan önceden en az 2 tüp bebek denemesi olup da gebe kalamamış 92 hastada gradient ve çip yöntemlerine göre döllenme ve gebelik oranları kıyaslanması Tablo 4.3 de gösterilmiştir. Gruplar arasında gebelik oranlarında fark görülmedi. Döllenme oranlarında anlamlı fark görüldü $p<0.05$.

Tablo 4.3. İki denemesi olan hastalar, gruplar arası döllenme ve gebelik oranlarının karşılaştırılması

	Gradient Grubu (n=56)		Çip Grubu (n=36)		P değeri
	Oran	%	Oran	%	
Döllenme oranları	272/432	62.9	271/369	73.4	0.002
Gebelik oranları	23/56	50	19/36	52	0.9

4.2 Sperm hazırlama tekniklerinin morfoloji ve sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkileri

Çalışmaya katılan hastalardan prospektif olarak rastgele seçilen 30 erkekte sperm örnekleri alındı. Alınan örnekler, hiçbir işlem uygulanmamış ve ejakulat spermlerinden oluşan kontrol grubu, gradient grubu ve çip grubu olarak 3 gruba ayrıldı. Sperm hücreleri, morfolojik olarak ve DNA fragmentasyonu bakımından değerlendirildi. Her grup için 300 hücre analiz edildi. Morfolojisi düzgün spermler (%) olarak hesaplandı. Toluidine blue ile koyu boyananlar DNA fragmentasyonu pozitif hücreler (%) olarak hesaplandı. Non-parametrik koşulların geçerli olduğu bağımlı

gruplar arasında Friedman testi ile değerlendirme yapıldı. Fark olan gruplarda grup içi Wilcoxon testi yapıldı. $P < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

Gradient ve çip sperm yıkama yöntemlerinin kontrol grubuna kıyasla morfolojik olarak iyi morfolojide sperm ortalamasını artırdığı ve bu artışın Wilcoxon testi sonrası istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu (Tablo 4.4). Gradient ve çip sperm yıkama teknikleri arasında morfoloji bakımından fark bulunmadı.

Tablo 4.4. Grupların sperm morfolojisi açısından değerlendirilmesi

Gruplar	Kruger Morfolojik Değerlendirmesi (%) (n=30)	Standart sapma (max-min)	P değeri
Kontrol Grubu	4.5	2.1 (2-10)	
Gradient Grubu	6.4*	2.9 (3-12)	P<0.05
Çip Grubu	5.8*	3.0 (2-12)	

*Kontrole göre anlamlı farklı

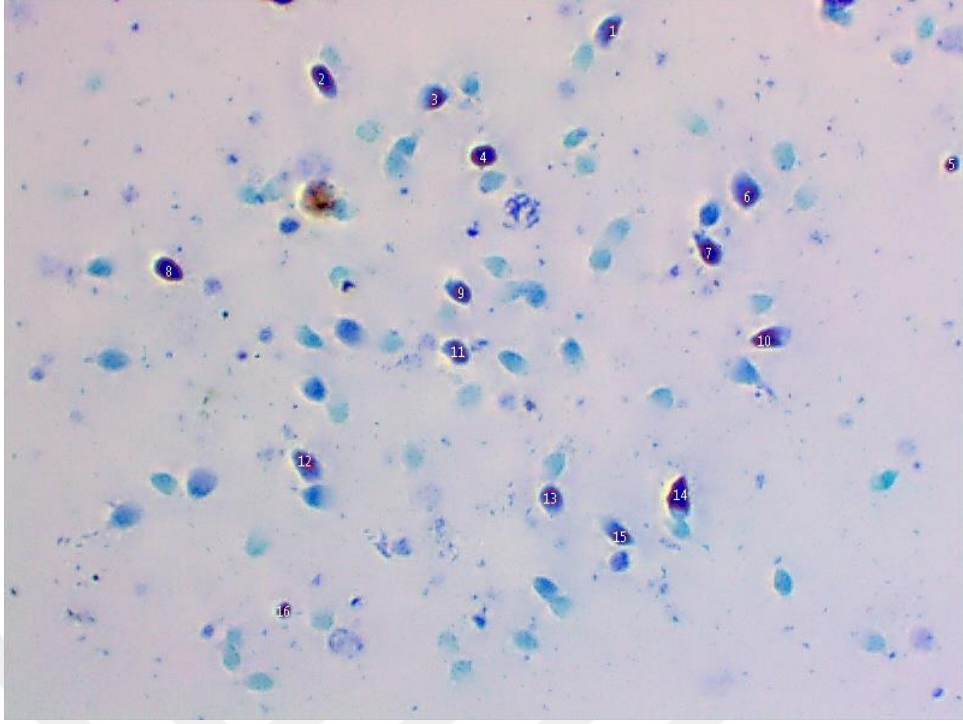
Sperm DNA fragmentasyonu bakımından uygulama ve kontrol gruplarının karşılaştırılması Tablo 4.5 de gösterilmektedir. Friedman testi sonrası gradient ve çip gruplarında DNA fragmentasyonu oranları kontrol grubu oranlarından farklı bulunmadı. Gradient ve çip gruplarının kendi aralarında yapılan değerlendirmede ise gradient grubunda DNA fragmentasyonu oranı çip grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.01$).

Tablo 4.5. Gruplar arası sperm DNA Fragmentasyonunun karşılaştırılması

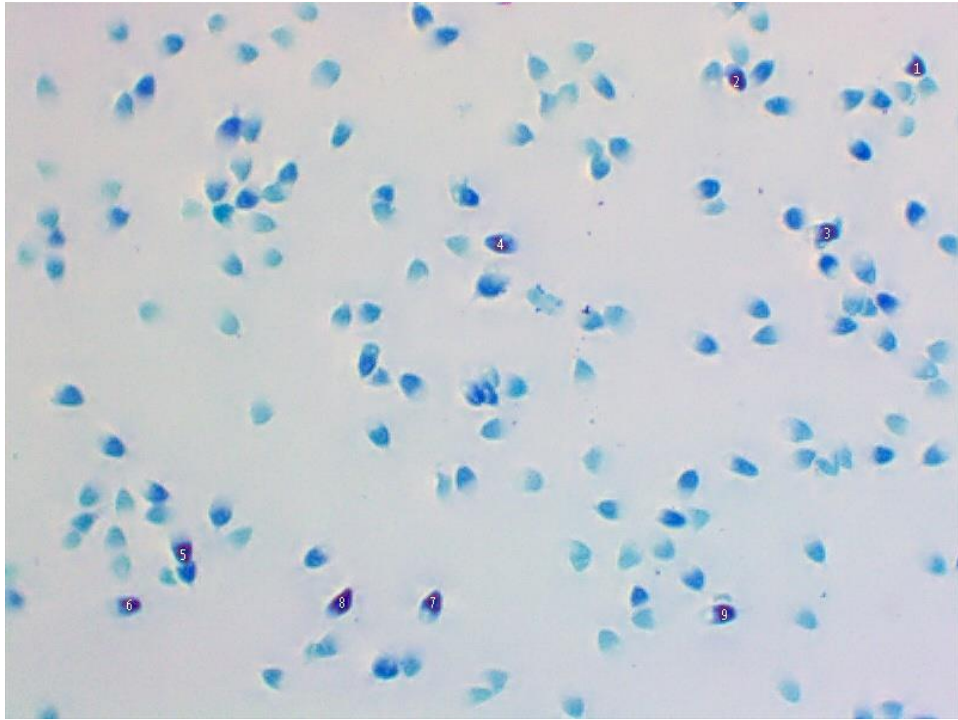
Gruplar	Sperm DNA Fragmentasyonu (%)	Standart sapma (max-min)	P değeri
Kontrol Grubu	24.1	11.8 (6-52)	
Gradient Grubu	29.5*	21.9 (5- 85)	0,01
Çip Grubu	22.3 *	13.9 (2-54)	

* Gruplar arası anlamlı farklı

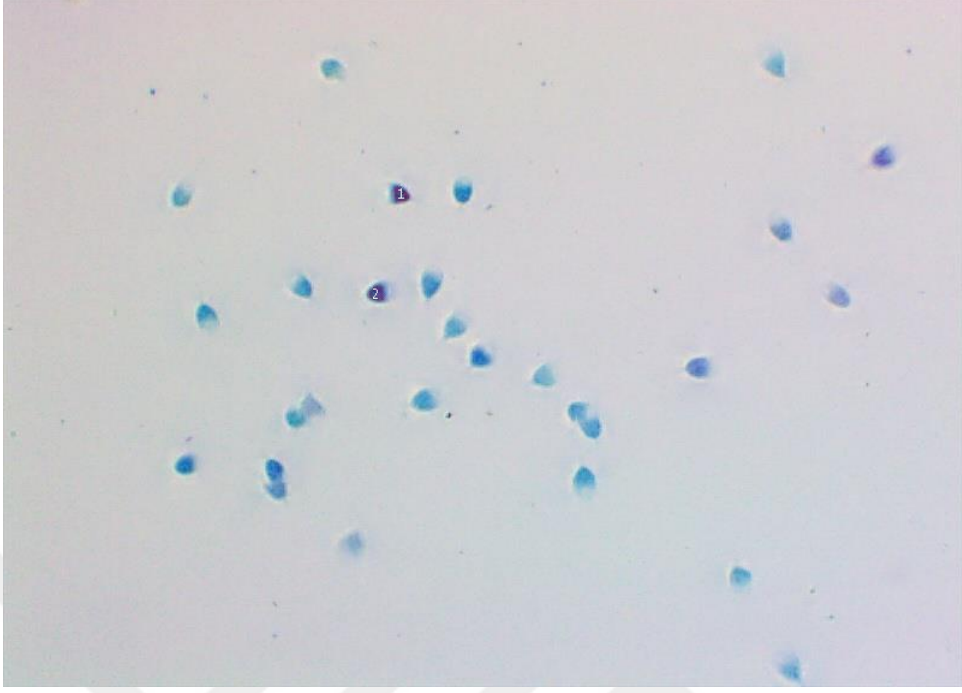
DNA fragmentasyonunu analiz etmek için toluidine blue boyanan sperm hücrelerinin mikroskopik görünüşleri Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4.1. TB Kontrol Grubu. Kontrol grubunda (Ejakülattaki spermler) DFİ yüksek hücreler (koyu boyanan numaralandırılmış) (1000x)



Şekil 4.2. TB Gradient grubu. Gradient yöntemi sonrası DNA fragmentasyonu olan hücreler (koyu boyanan numaralandırılmış) (1000x)



Şekil 4.3. TB Çip Grubu.Çip yöntemi sonrası DNA fragmentasyonu olan hücreler (koyu boyanan numaralandırılmış) (1000x)

5. TARTIŞMA

Korunmasız cinsel yaşama rağmen bir yılda gebeliğin olmamasında erkek faktörü oldukça önemlidir. Semen analizi erkek infertilitesinin tam olarak anlaşılmasında ve tüp bebek tedavisinin başarısında ilk ve temel standarttır. Embryo gelişimine direk etkisi olan spermin kalitesini teşhis etmekte kullanılan, DNA bütünlüğünü tespit eden yöntemler sayesinde erkek infertilitesi biraz daha aydınlatılmıştır (161-163). Ancak geleneksel semen analizleri teşhis etmede ve gerekli tedavinin uygulanmasında yetersiz kalabilmektedir. Örneğin her ne kadar sperm morfolojisi ile DNA bütünlüğü arasında bir korelasyon olsa da (164), morfolojik olarak normal görünen spermelerde DNA fragmantasyonu olabilmektedir (165).

Sperm hazırlanmasında kullanılan mikroçiplerin ortaya çıkış amacı hızlı, daha nazik, doğal şartları taklit ederek spermere zarar vermeden uygun olanını seçmektir. En iyi sperm hücrelerini seçmeye yönelik geliştirilen sperm ayıklama yöntemlerinden gradient ve swim-up yöntemleri yaygın kullanılan gelenekselleşmiş tekniklerdir (166,167). Her iki yöntemin sperm kalitesi açısından sınırlılıkları ve olumsuz yönleri vardır. Swim-up yönteminde hareketli spermeler hareketsiz olanlardan üzerlerine konan yüzdürme solüsyonuna konarak uzaklaştırılırlar. Ancak bu yöntemde az sayıda hareketli sperm eldesi sağlanır. Gradient yönteminde ise spermeler yoğunluklarına göre ayrıştırılırlar. Santrifugasyon gerektiren bu işlemin sperm canlılığına negatif etkisi olabildiği ve sperm DNA kırıklıklarına yol açabildiği bildirilmiştir (168). Bu tekniklerle in vivo şartlardaki sperm ayıklamaya yönelik doğal bariyerler atlanır ayrıca uygulama sırasında deneysel işlemler spermelerde DNA hasarı yaratılabilir (163,169,170). Sonuç olarak fertilizasyon başarısı, gebeliğin devamlılığı ve embryo sağlığı açısından uzun vadede bir takım olumsuz etkiler ortaya çıkarabilirler (171).

Yaptığımız çalışmada kullandığımız mikro-akışkan çipler aşılama yöntemi için üretilmişlerdir. Bizim bunu mikroenjeksiyonda kullanmamızın sebebi hem swim-up yöntemi gibi spermin kendi hareket gücü ile ortamdan sıyrılmasından faydalanmak, hem de gradient yöntemi gibi morfolojik olarak iyi morfolojideki spermeleri seçmektir. Bunun için çipde bulunan membran filtreden faydalanılır. Aynı zamanda santrifugasyon gerektirmeyen bu yöntem klasik sperm hazırlama tekniklerinin avantajlı yönlerini almış olacaktır. Yaptığımız bu çalışmada gradient ve fertile-plus çip teknikleri arasında spermin morfolojik ve genomik bütünlük bakımından en iyisinin seçilmesinde ve

gebelik başarısında fark olup olmadığı araştırıldı. Literatüre baktığımızda her iki yöntem ile hazırlanan spermlele elde edilen gebeliklerin kıyaslandığı ilk çalışma olduğunu düşünüyöruz.

Bildiğimiz kadarıyla bizim kullandığımız çipi üreten firmaya ait başka bir çip modeliyle (fertilite-çip) yapılan son çalışma Başkent Üniversitesine aittir (172). 2018 yılında yayınlanan bu çalışmada sebebi bilinmeyen tüp bebek hastalarında swim-up ve mikroçip yöntemleri kıyaslanmaktadır. Bu araştırmaya göre gebelik oranları ve döllenme oranları arasında fark bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda ise swim-up yöntemi yerine gradient yöntemi kullandığ ve benzer şekilde döllenme ve gebelik oranlarında yöntemler arasında fark bulunmadı. Bu durum literatür bilgilerini desteklemekte ve benzer çalışmalarla uygunluk göstermektedir. Ancak çalışmamızda ikiden fazla denemesi olan sebebi bilinmeyen infertilite hastalarında çip kullanılması gebelik oranlarında fark yaratmasa da döllenme oranlarında anlamlı fark yaratmıştır. Dolayısıyla tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı olan hastalarda döllenme oranlarını artırmak için mikro-akışkan çip kullanımı bir alternatif olabilir.

Günümüzde yardımcı üreme tedavilerinde sperm hazırlama yöntemlerinin amacı öncelikle seminal sıvıda bulunan istenmeyen biyokimyasal ajanlar ve sperm dışı yuvarlak hücrelerin uzaklaştırılıp döllenme kapasitesi olan en iyi spermlele elde etmektir (173). İyi kalitede spermlele seçmede morfolojik özellikler, sayı ve hareketliliğın yanında artık sperm DNA fragmentasyon testlerinden de faydalanılmaktadır.

Çalışmamızda hem gradient hem de çip yıkama yöntemlerinin iyi morfolojideki sperm konsantrasyonunu anlamlı bir şekilde artırdığını belirledik. P.Van Der Zwahlen'in 1991 yılında gradient yöntemini swim-up yöntemine göre kıyasladığı çalışmada gradient yönteminin iyi morfolojideki spermlele seçmede anlamlı olarak çok daha iyi olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada devam eden gebelik oranlarının gradient yönteminde çok daha iyi olduğu belirtilmiştir (174). Pranav ve ark. 1995 yılında yapmış oldukları çalışmada gradient yöntemi ile swim yöntemi karşılaştırılmış gradient yönteminin iyi morfolojideki spermlele seçmede çok üstün olduğu belirtilmiştir (175). Biz de yapmış olduğumuz çalışmamızda gradient ve çip yöntemlerinin kontrol grubu ile kıyasladığımızda anlamlı olarak çok daha iyi morfolojideki sperm ortalamasını artırdığını gördük. Gradient ve çip gruplarının ikili kıyaslamasında fark çıkmadı. Her iki yöntemde iyi morfolojideki spermlele seçme açısından başarılı bulundu.

Diğer taraftan sperm DNA fragmentasyonu değerlendirmesinde, çip tekniği ile elde edilen spermelerde DNA fragmentasyon oranının gradient yöntemine göre daha az olduğu görüldü. Muratori ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, gradient yönteminden sonra sperm örneklerinde, DNA fragmentasyonları açısından %50'ye yakın oranda artış olduğunu bildirmişlerdir (176). Yaptıkları önermede gradient yönteminin bazı hastalar için güvenli olamayacağı, bu tarz hastalarda farklı sperm hazırlama yöntemlerinin kullanılmasının daha sağlıklı olacağını söylemişlerdir. Yaptığımız çalışmada da gradient grubunda 30 örnekten 13'ünde kontrol grubuna göre DNA fragmentasyonunda artış tespit ettik. Mikroçip grubunda ise 30 örnekten 7'sinde DNA fragmentasyonunda artış tespit ettik.

Ghaleno ve arkadaşlarının 28 erkekte yaptıkları santrüfjlemenin olduğu gradient yöntemi, swim up yöntemi ve santrüfjlemenin olmadığı modifiye direk swim up yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada DNA fragmentasyonunun en fazla gradient yönteminde olduğu swim-up ve santrüfjüzsüz swim up yöntemleri arasında DNA fragmentasyonu açısından fark bulunmadığı rapor edilmiştir (177). Bizim çalışmamızda gradient yönteminde ortalama üst sınırdaki yüksek çıkışa da istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($p=0.06$). Biz iki tabaka gradient solüsyonu kullandık. Ghaleno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise üç tabaka gradient solüsyonu kullanılmış olması ve fiziki kuvvet olarak santrüfjüj 'g' değerlerinin bizimkilerden yüksek olması DNA fragmentasyon oranını anlamlı derecede yükseltmiş olmasında etken olabilir. Bizim çalışmamızda da swim-up yöntemine benzer santrüfjlemenin olmadığı mikroçip yönteminin kontrol grubu ile kıyaslamasında DNA fragmentasyonunu azaltma yönünde olduğu fakat anlamlı fark bulunmadığı görülmüştür. Diğer taraftan çalışmaya katılan hasta sayısını artırmak yöntemin güvenilirliğini sorgulamak adına faydalı olabilir. Esasen gradient ve çip yöntemleri birbiri ile kıyaslandıklarında aradaki fark açıklanarak anlamlı fark oluşturmaktadır. Gradient yönteminde DNA fragmentasyon oranı artmış, çip yönteminde ise anlamlı ölçüde azalmıştır.

Zini ve ark 2000 yılında 22 semen örneğinde yapmış oldukları bir çalışmada (178) gradient yönteminin DNA fragmentasyon oranı ortalamasını çok az arttığını ama istatistiksel olarak fark olmadığını en iyi DNA bütünlüğünün swim-up yönteminde elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Biz de gradient yöntemi sonrası tamamen benzer sonuçlar bulduk. Biz çalışmamızda swim-up yöntemi yerine çip yöntemi kullandık. Yine Zini ve

ark. 2000 yılında yapmış oldukları 44 infertil, 9 fertil olan 53 erkeğin katıldığı bir başka çalışmada ise gradient yöntemi sonrası fertil erkeklerde DNA fragmentasyonu açısından bir fark çıkmazken, infertil hasta grubunda gradient yöntemi sonrası DNA fragmentasyonunda artış bildirilmiştir (179). Buna göre yoğunluk gradient yönteminin acil olarak sperm DNA hasarını minimize edecek şekilde yeniden revize edilmesi önerilmiştir. Wang ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada gradient yönteminin şiddetli oligozoospermik hastalar hariç DNA fragmentasyonunu azalttığı belirtilmiştir (180).

Diğer taraftan gradient yönteminin DNA fragmentasyonunu azalttığına dair çalışmalar mevcuttur (181-185). Gradient yöntemi sonucu DNA fragmentasyonunun artması veya azalmasına ilişkin farklı sonuçların elde edilmesinin nedeni başlangıçtaki hücrel DNA fragmentasyon oranlarındaki farklılıklar veya santrifugasyon metotları olabilir.

Mikroçiple ilgili 2018 yılında Quinn ve ark. tarafından yayınlanmış olan çip üreticisinin de içinde bulunduğu çalışmada gradient ve mikroçip yöntemlerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmaya göre mikroçip yönteminde DNA fragmentasyon oranının gradient yöntemine kıyasla neredeyse %0 olacak kadar azaldığını bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada tüp bebek tedavisinde esas sonuç olan gebelik oranları ile ilgili bir değerlendirme yapılmamıştır (186).

Sperm DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesinde çoğunlukla SCSA, SCD, TUNEL, KOMET, Anilin Blue ve Toluidine Blue gibi yöntemler kullanılmaktadır. Yapılan meta-analizlerde bu testlerin sperm DNA fragmentasyonunu tespit etmede farklılık göstermedikleri ortaya konmuştur (187,188). Özellikle SCSA, TUNEL ve Alkali KOMET işlemleri zahmetli ve maliyetli yöntemlerdir (188). Erenpreis ve arkadaşlarının 2004'de TUNEL işlemi ve SCSA ile toluidine blue yöntemini spermelerde kıyasladıkları çalışmada toluidine blue pozitif DNA fragmentasyon indeksinin birebir bu testlerle örtüştüğünü, sperm DNA bütünlüğünün ve/veya anormal kromatin yapısının değerlendirmesinde rutin uygulamada kullanılacak bir test olabileceğini önermişlerdir (118). Hatta fertil kişilerde DNA fragmentasyon oranının bu yöntem ile %35'i geçmediği belirtilerek bir cut-off değeri verilmiştir. Bu yüzden hızlı ve efektif bir yöntem olan toluidine blue yöntemi çeşitli türlerin spermelerinde başarılı bir şekilde standardize edilmiştir (188). Biz de çalışmamızda etkili pratik ve güvenilir sonuç

vermesi nedeniyle DNA fragmentasyon görüntülemesinde toluden blue boyama tekniğini tercih ettik. Çalışma sonuçlarımıza baktığımızda DNA fragmentasyon indeksi çip grubunda daha düşük (%22.3) ve gradient grubunda daha yüksek (%29.5) olduğu ve çip uygulamasının DNA hasarlı hücreleri seçmede daha başarılı olduğu anlaşıldı.

Yapılan bir çalışmada sperm DNA fragmentasyon indeksi %27-30 arasında olan kişilerin çocuk sahibi olabilmesi için gereken süre ortalamanın çok üzerinde bulunmuş (189). Bir başka çalışmada ise sperm DFI >%30 olduğu vakalarda mikroenjeksiyon yönteminin gebelik elde edilmesinde daha başarılı olduğu bildirilmiştir (190). Bizim çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak tedavi öncesinde sperm DNA fragmentasyon oranı dikkate alınmadı. Bu sperm hücreleri ile yapılan tüp bebek tedavisi sonrası klinik değerlendirmelerde de, gebelik oranları bakımından uygulamalar arasında anlamlı bir fark oluşmadığı tespit edildi.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Malatya Özel Doğu Fertil Tüp Bebek Merkezine çocuk istemi ile başvuran, çalışma kriterlerine uyan 30 hastada iki farklı sperm hazırlama yöntemi olan yoğunluk gradient yöntemi ile mikro-akışkan çip yöntemi uygulanarak, sperm morfolojisi ve DNA fragmentasyonu üzerine etkileri araştırıldı. Bu çalışma bildiğimiz kadarıyla sperm gradient ve mikro-akışkan çip yıkama tekniklerinin klinik sonuçları ile birlikte değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Çalışmamızda gradient ve çip yöntemleri Kruger Kriterlerine göre iyi morfolojide sperm konsantrasyonunu artırmada başarılı bulundu. DNA fragmentasyonu açısından çip yönteminde daha iyi kalitede DNA'sı olan spermeler elde edildi. Bu sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde, sperm DNA'sını etkilediği düşünülen santrüfüjlemenin olmadığı ve iyi morfolojide spermelerin geçmesine izin veren membran filtresi sayesinde fertile-plus mikroçip yıkama yöntemi ICSI prosedürüne sperm hazırlamada yoğunluk gradient yöntemine alternatif olarak önerilebilir. Diğer taraftan mikroçip yönteminin ilk IVF denemesi yapılan hastalarda klinik sonuçlar üzerinde beklenen etkisi olmamıştır. Ancak tekrarlayan IVF denemesi olan hastalarda döllenme oranlarında anlamlı artış görüldü. Dolayısıyla çok denemesi olan hastaların sperm DNA larının daha hassas olabileceği düşünülerek, tedavi öncesi yıkama tekniği belirlemek döllenme oranlarını artırmak için faydalı olacaktır. Literatüre baktığımızda gradient ve mikro-akışkan çip yöntemi ile hazırlanan spermelerle tekli veya çoklu IVF denemesi olan hastalarda fertilizasyon ve gebelik başarılarının takip edilip kıyaslandığı ilk çalışma olduğunu düşünüyoruz.

Çalışmamızdaki denek sayısı sınırlayıcı faktör olmuştur. Çalışma verilerimizin uzun vadedeki sonuçlarını ortaya koyabilmek için denek sayısının artırılması ve hastaların uzun süreli takibi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update* 2015; 21: 411-26.
2. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional and global trends in infertility prevalence since 1990: A systematic analysis of 277 health surveys. *Plos Med* 2012; 9(12): e1001356
3. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod* 2007; 22: 1506-12.
4. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
5. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril* 2006; 86: 111-4
6. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9: 367-76.
7. Tumpaichitr N, Agulnik A, Seibel M, Taymor M. Comparison of the in vitro fertilization rate by human sperm capacitated by multiple-tube swim-up and percoll gradient centrifugation. *J In Vitro Fert Embryo Trans* 1988; 5: 119-22.
8. Morales P, Vantman D, Barros C, Vigil P. Human spermatozoa selected by percoll gradient or swim-up are equally capable of binding to the human zona pellucida and undergoing the acrosome reaction. *Hum Reprod* 1991; 6: 401-4.
9. Kricka LJ. Miniaturization of analytical systems. *Clin Chem* 1998; 44: 2008-14.
10. Cho CL, Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC. A single cut-off value of sperm dna fragmentation testing does not fit all. *Transl Androl Urol* 2017; 6: 501-3.
11. Majzoub A, Agarwal A, Cho CL, Esteves S. Sperm dna fragmentation testing: a cross-sectional survey on current practices of fertility specialists. *Trans Androl Urol* 2017; 6: 710-9.
12. Gelbaya TA, Potdar N, Jevic YB, Nardo LG. Definition and epidemiology of unexplained infertility. *Obstet Gynecol Surv* 2014; 69: 109-15.

13. Gosalvez J, Gonzalez-Martinez M, Lopez-Fernandez C, Fernandez JL, Sanchez-Martin P. Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil Steril* 2011; 96: 1083-6.
14. Agarwal A, Gupta S, DuPlessis S, Sharma R, Esteves SC, Círenza C, Eliwa J, Al-Najjar W, Kumaresan D, Haroun N, Philby S, Sabanegh E. Abstinence time and its impact on basic and advanced semen parameters. *Urology* 2016; 94: 102-10.
15. Xue X, Wang WS, Shi JZ, Zhang SL, Zhao WQ, Shi WH, Guo BZ, Qin Z. Efficacy of swim-up versus density gradient centrifugation in improving sperm deformity rate and DNA fragmentation index in semen samples from teratozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31: 1161-6.
16. Bradley CK, McArthur SJ, Gee AJ, Weiss KA, Schmidt U, Toogood L. Intervention improve assisted conception intracytoplasmic sperm injection outcomes for patients with high levels of sperm dna fragmentation: a retrospective analysis. *Andrology* 2016; 4: 903-10.
17. Alvarez JG. DNA fragmentation in human spermatozoa: significance in the diagnosis and treatment of infertility. *Minerva Ginecol* 2003; 55: 233-9.
18. Trounson AO, Gardner DK. Handbook of in vitro fertilization. 2nd edition, Boca Raton, CRC press 2000: 1-14.
19. Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature* 1959; 4684: 466-7.
20. Silber SJ, Nagy ZP, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Conventional IVF versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994; 9: 705-9.
21. Coale AJ, Trussell TJ. Model fertility schedules: variations in the age structure of childbearing in human populations. *Popul Index* 1974; 40: 185-258.
22. 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: 382-91.
23. Goemaere S, Van Pottelbergh I, Zmierzak H, Toye K, Daems M, Demuyck R, Myny H, De Bacquer D, Kaufman JM. Inverse association between bone turnover rate and bone mineral density in community-dwelling men >70 years of age: no major role of sex steroid status. *Bone* 2001; 29: 286-91.
24. De Mouzon J, Spira A, Schwartz D. A prospective study of the relation between smoking and fertility. *Int J Epidemiol* 1988; 17: 378-84.

25. Bolumar F, Olsen J, Boldsen J. Smoking reduces fecundity: a European multi center study on infertility and subfecundity. European Study Group on Infertility Subfecundity. *Am J Epidemiol* 1996; 143: 578–87.
26. Cohen EN, Gift HC, Brown BW, Greenfield W, Wu ML, Jones TW, Whitcher CE, Driscoll EJ, Brodsky JB. Occupational disease in dentistry and chronic exposure to trace anesthetic gases. *J Am Dent Assoc* 1980; 101: 21–31.
27. Cohen EN, Bellville JW, Brown BW Jr. Anesthesia, pregnancy and miscarriage: a study of operating room nurses and anesthetists. *Anesthesiology* 1971; 35: 343–7.
28. Brassard M, Ainmelk Y, Baillargeon JP. Basic infertility including polycystic ovary syndrome. *Med Clin North Am* 2008; 92: 1163-92.
29. De Mouzon J, Spira A, Schwartz D. A prospective study of the relation between smoking and fertility. *Int J Epidemiol* 1988; 17: 378–84.
30. Tolstrup JS, Kjaer SK, Munk C. Does caffeine and alcohol intake before pregnancy predict the occurrence of spontaneous abortion? *Hum Reprod* 2003; 18: 2704–10.
31. Jensen TK, Hjollund NHI, Henriksen TB, Scheike T, Kolstad H, Giwercman A, Ernst E, Bonde JP, Shakkebaek N, Olsen J. Does moderate alcohol consumption affect fertility? Follow up study among couples planning first pregnancy. *Br Med J* 1998; 317: 505–10.
32. Hakim RB, GrayRH, Zacur H. Alcohol and caffeine consumption and decreased fertility. *Fertil Steril* 1998;70: 632–7.
33. Chen TH, Chang SP, Tsai CF, Juang KD. Prevalence of depressive and anxiety disorders in an assisted reproductive technique clinic. *HumReprod* 2004; 19: 2313–8.
34. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*, 4. Baskı, Ankara, Güneş Kitapevi, 2006.
35. Ross HM, Kaye G, Pawlina W. *Histology, a text and atlas*, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Philedelphia 2003; 689-696.
36. Ross MH, Pawlina W. *Histology a text and atlas with correlated cell and molecular biology*.6th edition, Lippincott Williams & Wilkins Philedelphia 2011;784-828.
37. Jensen C.E, Wiswedel K, McLoughlin J, Van der Spuy Z. Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. *Fertil Steril* 1995; 64: 1189-96.
38. Chung KW. *Gross Anatomy*, 5. Baskı, London, Lippincott Williams &Wilkins, 2005.
39. Ganong WF. *Review of medical physiology*. 16th edition, California, Appletioa and Lange, 1993; 387-408

40. Gartner LP, Hiatt JL: *Color Textbook of Histology*. Pennsylvania, W.B.Saunders Company, 1997; 493-98.
41. Bostofte E, Bagger P, Michael A, Stakemann G. Fertility prognosis for infertile men: results of follow-up study of semen analysis in infertile men from two different populations evaluated by the cox regression model. *Fertil Steril* 1990; 54: 1100-6.
42. Abraham L, Kierszenbaum. *Histology and Cell Biology*, 2th edition. Mosby. 2002; 529-50.
43. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. *World Health Organization*, 5th. Edition. Cambridge, Cambridge University Press, 2010.
44. Mack S, Bhattacharyya AK, Joyce C, van der Ven H, Zaneveld LJ. Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol Reprod*. 1983; 28: 1032-42.
45. Oğuz Y. Sperm hazırlama yöntemi olarak “swim-up ve gradient” tekniklerinin DNA fragmantasyonuna etkilerinin karşılaştırılması prospektif çalışma. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2013.
46. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population(1,850,000) of three French regions(1988-1989). *Hum Reprod* 1991; 6: 811-6.
47. Forti G, Krausz C. Clinical review 100. Evaluation and treatment of the infertile couple. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 4177-88.
48. Irvine DS, Epidemiology and aetiology of male infertility. *Hum Reprod* 1998; 13: 33-44.
49. Fritz, M.A, Speroff L. Clinical gynecologic endocrinology and infertility. 8th ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2010.
50. Poland ML, Moghissi KS, Giblin PT, Ager JW, Olson JM. Variation of semen measures within normal men. *Fertil Steril*. 1985; 44: 396-400.
51. Tielemans E., Heederik D., Burdorf A., Loomis D., Habbema D.F. Intraindividual variability and redundancy of semen parameters. *Epidemiology*. 1997; 8: 99-103

52. Rienzi L, Ubaldi F, Anniballo R, Cerulo G, Greco E. Preincubation of human oocytes may improve fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13:1014-19.
53. Yaman S., Müftüoğlu Y.Z., Anafarta K, Bedük Y. Erkek İnfertilitesi. *Üroloji*, Ankara, Güneş Kitabevi, 1990: 483-508.
54. Taşçı Aİ. Samastı M. *İnfertilitede laboratuvar ve uygulamalar*. Hayat Sağlık ve Sosyal Hizmetler Vakfı Yayınları. İstanbul, 1997.
55. McClure RD, Tanagho EA, McAninch JV. Male infertility. *In: Smith's General Urology*. Appleton-Lange Meed. San Fransisko, 1992.
56. Amelar R.D. Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. *J Urol* 1962; 87: 187-190.
57. Olshan AF, Ananth CV, Savitz DA. Intrauterine growth retardation as an endpoint in mutation epidemiology: an evaluation based on paternal age. *Mutat Res* 1995; 344: 89.
58. Kovo M, Schillace RV, Galiani D, Josefsberg LB, Carr DW, Dekel N. Expression and modification of PKA and AKAPs during meiosis in rat oocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 192: 105-13.
59. Hemmings BA. Regulation of cAMP-dependent protein kinase in cultured cells. *Curr Topic Cell Regul* 1985, 27: 117-32.
60. Franken DR, Oehninger S, Burkman LJ, Coddington CC, Kruger TF, Rosenwaks Z, Acosta AA, Hodgen GD. The hemizona assay (HZA): a prediction of human sperm fertilizing potential in in vitro fertilization (IVF) treatment. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1989; 6: 44-50.
61. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-49.
62. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon - - a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115: 1-7.
63. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*. 1991; 44: 569-74.
64. McGhee JD, Felsenfeld G, Eisenberg H. Nucleosome structure and conformational changes. *Biophys J*. 1980; 32: 261-70.
65. Dadoune JP. The nuclear status of human sperm cells. *Micron*. 1995; 26: 323-45.

66. Kierszenbaum AL. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired dna breaks not allowed. *Mol Reprod Dev.* 2001; 58: 357-8.
67. Lee CH, Cho YH. Aspects of mammalian spermatogenesis: electrophoretical analysis of protamines in mammalian species. *Mol Cells.* 1999; 9: 556-9.
68. Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A. Sperm chromatin. *Arch Androl* 2000; 45: 215-25.
69. Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992; 13: 342-8.
70. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of dna damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 1999; 4: 31-7.
71. Bench GS, Friz AM, Corzett MH, Morse DH, Balhorn R. DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry* 1996; 23: 263-71.
72. Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Bradbury EM, Schmid CW. Sequence-specific packaging of dna in human sperm chromatin. *Science* 1987; 236: 962-4.
73. Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 417-35.
74. Steger K, Pauls K, Klonisch T, Franke FE, Bergmann M. Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 219-25.
75. Corzett M, Mazrimas J, Balhorn R. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 519-27.
76. Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl* 2001; 22: 604-10.
77. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.
78. Genesca A, Caballín MR, Miro R, Benet J, Germa JR, Egozcue J. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Hum Genet* 1992; 89: 181-6.
79. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999; 423: 103-11.
80. Arnon J, Meirow D, Lewis-Roness H, Ornoy A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 394-403.

81. Chatterjee R, Haines GA, Perera DM, Goldstone A, Morris ID. Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Hum Reprod* 2000; 15: 762-6.
82. Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl* 2002; 25: 255-61.
83. Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M, Saleh RA, Lopez MC, Thomas AJ Jr, Evenson DP, Agarwal A. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002; 78: 319-29.
84. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 2002; 23: 717-23.
85. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79: 1597-605.
86. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003; 80: 1431-6.
87. Kobayashi H, Larson K, Sharma RK, Nelson DR, Evenson DP, Toma H, Thomas AJ, Agarwal A. DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2001; 75: 469-75.
88. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1191-9.
89. Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maise G. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Mol Reprod Dev* 2001; 60: 397-404.
90. Laberge RM, Boissonneault G. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol Reprod* 2005; 73: 289-96.
91. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod* 2004; 70: 910-8.

92. McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993; 37: 109-28.
93. Muratori M, Marchiani S, Maggi M, Forti G, Baldi E. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci* 2006; 11: 1491-9.
94. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 15: 1338-44.
95. Lamirande E, Gagnon C. The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function. In: Gagnon C, editor. *The male gamete: from basic science to clinical applications*. IL: Cache River Press 1999; 455–467.
96. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 439-45.
97. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Hum Reprod* 2001; 122: 497-506.
98. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16: 183-8.
99. Aitken RJ, Bowie H, Buckingham D, Harkiss D, Richardson DW, West KM. Sperm penetration into a hyaluronic acid polymer as a means of monitoring functional competence. *J Androl* 1992; 13: 44-54.
100. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 1996; 17: 276-87.
101. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ Jr, Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001; 16: 1912-21.
102. Agarwal A, Virk G, Ong C, Plessis S. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health* 2014; 32: 1–17.

103. Sheryl T, Vessey HW, Miranda A, Riyait T, Agarwal A. Reactive Oxygen Species (ROS) in human semen: determination of a reference range. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32: 757–64.
104. Lobascio AM, Felici D, Anibaldi M, Greco P, Minasi MG, Greco E. Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa. *Andrology* 2015; 3: 265–70.
105. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; 4: 38-47.
106. Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 1997; 16: 2262-70.
107. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 1997; 138: 2081-8.
108. Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM, Vera Y, Rodriguez S, Yen PH, Soeng K, Wang C, Swerdloff RS. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology* 2003; 144: 3167-75.
109. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 428-32.
110. Paul C, Povey JE, Lawrence NJ, Selfridge J, Melton DW, Saunders PT. Deletion of genes implicated in protecting the integrity of male germ cells has differential effects on the incidence of DNA breaks and germ cell loss. *PLoS One* 2007; 2: 1371-10
111. Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 1990; 13: 452-62.
112. Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P, Georg T, Schmidt W, Strehler E. Predictive value of sperm chromatin condensation (aniline blue staining) in the assesment of male infertility. *Arch Androl* 2001; 46: 99-104.
113. Mello ML. Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry* 1982; 74: 387–92.

114. Rahiminia T, Hosseini A, Anvari M, Ghasemi-Esmailabad S, Talebi AR. Modern human sperm freezing: Effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2017; 56: 472-76.
115. Ajina T, Ammar O, Haouas Z, Sallem A, Ezzi L, Grissa I, Sakly W, Jlali A, Mehdi M. Assessment of human sperm DNA integrity using two cytochemical tests: Acridine orange test and toluidine blue assay. *Andrologia* 2017; 49:e12765.
116. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl* 2001; 22: 45-53.
117. Gill K, Rosiak A, Gaczarzewicz D, Jakubik J, Kurzawa R, Kazienko A, Rymaszewska A, Laszczynska M, Grochans E, Piasecka M. The effect of human sperm chromatin maturity on ICSI outcomes. *Human Cell* 2018; 31: 220-31.
118. Erenpreiss J, Jepson K, Giwerzman A, Tsarev I, Erenpreisa J, Spano M. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flowcytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. *Hum Reprod* 2004; 19: 2277-82.
119. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship of chromomycine A3 accessibility. *Biol Reprod* 1995; 52: 864-7.
120. Gorczyza W, Gong J, Drazynkiewicks Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 1993; 53: 1945-51.
121. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984; 42: 87-91.
122. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 2006; 27: 53-9.
123. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996; 66: 634-9.
124. Haines G, Marples B, Daniel P, Morris I. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv Exp Med Biol* 1998; 444: 79-91.

125. Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res.* 1996; 363: 89-96.
126. Singh NP, Danner DB, Tice RR, McCoy MT, Collins GD, Schneider EL. Abundant alkali sensitive sites in DNA of human and Mouse sperm. *Exp Cell Res* 1989; 175: 184-91.
127. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 613-9.
128. SinghNP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of dna damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175: 184–191.
129. Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A. Clinical relevance of sperm dna damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 746–757.
130. Robbins DJ, Coleman MS. Initiatorrole of double stranded dna in terminal transferase catalyzed polymerization reactions. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 2943–57.
131. MB, Imam SN, Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28: 1073–85.
132. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, Melamed MR. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 1975; 90: 411-28.
133. Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, Santos MJ. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006; 85: 371–83.
134. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005; 84: 833–42.
135. Mortimer D. Sperm preparation methods. *J Androl* 2000; 21: 357–366.
136. Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1991; 6: 173–6.
137. Oshio S, Kaneko S, Iizuka R, Mohri H. Effects of gradient centrifugation on human sperm. *Arch Androl* 1987; 17: 85–93.

138. Ng FL, Liu DY, Baker HW. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod* 1992; 7: 261–6.
139. Ord T, Patrizio P, Marello E. Mini-Percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum Reprod* 1990; 5: 987–9.
140. Björndahl L, Mortimer D, Barratt CLR, Castilla JA, Menkveld R, Kvist U, Alvarez JG, Haugen TB. *A bpractical guide to basic laboratory andrology*. Cambridge University Press, Cambridge, 2010.
141. Whitesides, G.M. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 2006; 442: 368–73.
142. Gervais, L. et al. Microfluidic çips for point-of-care immunodiagnostics. *Advanced Materials* 2011; 23: 151–76.
143. Verpoorte E. Microfluidic çips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis* 2002; 23: 677–712.
144. Chovan, T. and Guttman, A. Microfabricated devices in biotechnology and biochemical processing. *Trends Biotechnol* 2002; 20: 116–122.
145. Zhang, X. Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting. *Lab Chip* 2011;11: 2535–40.
146. Tasoglu, S.Exhaustion of racing sperm in nature-mimicking microfluidic channels during sorting. *Small* 2013; 9: 3374–84.
147. Asghar, W. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Adv Health Mater* 2014; 3: 1671–79.
148. Nosrati, R. Rapid selection of sperm with high DNA integrity. *Lab Chip* 2014; 14: 1142–50.
149. Kricka, L.J. Applications of a microfabricated device for evaluating sperm function. *Clin Chem* 1993; 39: 1944–47.
150. Xie, L. Integration of sperm motility and chemotaxis screening with a microchannel-based device. *Clin Chem* 2010; 56: 1270–78.
151. Ma, R. In vitro fertilization on a single-oocyte positioning system integrated with motile sperm selection and early embryo development. *Anal Chem* 2011; 83: 2964–70.
152. Ko, Y-J. Separation of progressive motile sperm from mouse semen using on-çip chemotaxis. *Anal Sci* 2012; 28: 27–32.

153. Cho, B.S. Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm. *Anal Chem* 2003; 75: 1671–75.
154. Seo, D-B. Development of sorting, aligning, and orienting motile sperm using microfluidic device operated by hydrostatic pressure. *Microfluid Nanofluid* 2007; 3: 561–70.
155. Chen, Y-A. Analysis of sperm concentration and motility in a microfluidic device. *Microfluid Nanofluid* 2010; 10: 59–67.
156. Chen, C-Y. Sperm quality assessment via separation and sedimentation in a microfluidic device. *Analyst* 2013;138: 4967-74.
157. Li, Z. The construction of an interfacial valve-based microfluidic chip for chemotaxis evaluation of human sperm. *Biomicrofluidics* 2014; 8: 024102.
158. Koyama, S. Chemotaxis assays of mouse sperm on microfluidic devices. *Anal Chem* 2006; 78: 3354–59.
159. Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta EL, Serafini PC, Smith GD. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2010; 94: 2626–30.
160. Nguyen NT, Wereley ST, Ebrary I. *Fundamentals and applications of microfluidics*. Boston, MA: Artech House; 2006
161. Schieve LA. Live-Birth Rates and Multiple-Birth Risk Using In Vitro Fertilization. *JAMA*, 1999; 282: 1832-8.
162. Boulet SL, Kirby RS, Reefhuis J, et al. Assisted Reproductive Technology and Birth Defects Among Liveborn Infants in Florida, Massachusetts, and Michigan, 2000-2010. *JAMA Pediatr* 2016; 170: e154934.
163. Belva F, Bonduelle M, Roelants M.. Semen quality of young adult ICSI offspring: the first results. *Hum Reprod* 2016;31: 2811-20.
164. 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: 2160-5.
165. Avendaño C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 2010; 94: 549–55.

166. Boomsma, C.M, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farguhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst* 2007; 17: CD004507
167. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art–physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl* 2012; 14: 260–9
168. Zini, A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm dna integrity. *Urology* 2000; 56: 1081–4.
169. Schultz RM, Williams CJ. The Science of ART. *Science* 2002; 296: 2188-90.
170. Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL, Asghar W. Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnol Adv* 2016; 34: 578-87.
171. Smith GD, Takayama S. Application of microfluidic technologies to human assisted reproduction. *Mol Hum Reprod* 2017; 23: 257-68.
172. Yetkinel S, Kilicdag EB, Aytac PC, Haydardedeoglu B, Simsek E, Cok T. Effects of the microfluidic chip technique in sperm selection for intracytoplasmic sperm injection for unexplained infertility: a prospective, randomized controlled trial. *J Assist Reprod Genet* 2018; 18: 1375-2.
173. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 108-129.
174. P. Van Der Zwalm G. Bertin-Segal L. Geerts C. Debauche R. Schoysman. Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Human Reproduction* 1991; 6: 581–8.
175. Prakash P, Leykin L, Chen Z, Toth T, Sayegh R, Schiff I, Isaacson K. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertil Steril* 1998; 69: 722-6.
176. Muratori M, Tarozzi N, Cambi M, Boni L, Iorio AL, Passaro C, Luppino B, Nadalini M, Marchiani S, Tamburrino L, Forti G, Maggi M, Baldi E, Borini A. Variation of DNA Fragmentation Levels During Density Gradient Sperm Selection for Assisted Reproduction Techniques: A Possible New Male Predictive Parameter of Pregnancy? *Medicine (Baltimore)* 2016; 95: e3624.
177. Ghaleno LR, Valojerdi MR, Janzamin E, Chehrazi M, Sharbatoghli M, Yazdi RS. Evaluation of conventional semen parameters, intracellular reactive oxygen species, DNA fragmentation and dysfunction of mitochondrial membrane potential after

- semen preparation techniques: a flow cytometric study. *Arch Gynecol Obstet* 2014; 289: 173-80.
178. Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* 2000; 56: 1081-4.
179. Zini A, Nam RK, Mak V, Phang D, Jarvi K. Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing. *Fertil Steril* 2000; 74: 824-7.
180. Wang M, Sun J, Wang L, Gao X, Lu X, Wu Z, Wang Y, Liu K, Tao J, Wu Y. Assessment of density gradient centrifugation (DGC) and sperm chromatin dispersion (SCD) measurements in couples with male factor infertility undergoing ICSI. *J Assist Reprod Genet* 2014; 31: 1655-63.
181. Jackson RE, Bormann CL, Hassun PA, Rocha AM, Motta EL, Serafini PC. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2010; 94: 2626–30.
182. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15: 1717–22.
183. 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: 2160–5.
184. Bungum M, Spano M, Humaidan P, Eleuteri P, Rescia M, Giwercman A. Sperm chromatin structure assay parameters measured after density gradient centrifugation are not predictive for the outcome of ART. *Hum reprod* 2008; 23: 4–10.
185. Jayaraman V, Upadhya D, Narayan PK, Adiga SK. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 557–63.
186. Quinn MM, Jalalian L, Ribeiro S, Ona K, Demirci U, Cedars MI, Rosen MP. Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum Reprod* 2018; 33: 1388-93.
187. Cissen M, Wely MV, Scholten I, Mansell S, Bruin JP, Mol BW, Braat D, Repping S, Hamer G. Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of

- Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11: e0165125.
188. Rui BR, Angrimani D, Bicudo LC, Losano J, Nichi M, Pereira R. A fast, low-cost and efficient method for the diagnosis of sperm DNA fragmentation in several species. *Reprod Domest Anim* 2018; 53: 171-5.
189. Donald P, Evenson DP, Wixon R. Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology* 2006; 65: 979-91.
190. Zini A, Jamal W, Cowan L and Al-Hathal N. Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28: 391-7.



EKLER

EK 1. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı soyadı: KORAY YILDIZ
Doğum tarihi: 23.10.1975
Yabancı dil bilgisi: İngilizce
Görev yeri: Doğufertil Tüp Bebek Merkezi
Laboratuvar Sorumlusu MALATYA
E-posta adresi: koray88@yahoo.com
Telefon: 0505 240 54 23



EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans Mezuniyet Bilgileri : İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü
Lisans Mezuniyet tarihi :1998

Yüksek Lisans Mezuniyet Bilgileri: İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü

Yüksek Lisans Mezuniyet tarihi : 2002

Akademik ünvanı: M.Sc. Embryolog

İŞ TECRÜBESİNE AİT BİLGİLER

Florence Nightingale Hastanesi Tüp Bebek Bölümü İstanbul

Kalamış Tüp Bebek Merkezi İstanbul

Centrum Klinik Tüp Bebek Merkezi Ankara

Merkezi Klinika Tüp Bebek Bölümü Baku

CHR Tüp Bebek Merkezi Manhattan / New York

Doğufertil Tüp Bebek Merkezi Malatya

EK 2: Etik Kurul Kararı

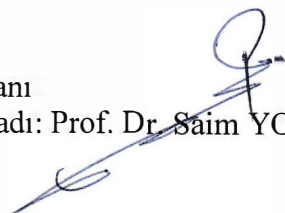
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı olan hastalarda, alternatif bir yöntem olarak, mikro akışkan sperm ayıklama çiplerinin kullanımı
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2017/34

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İnönü Üniversitesi Merkez Kampüsü, 44280, Malatya, Türkiye
	TELEFON	+90 422 341 06 60 / 1219
	FAKS	+90 422 341 00 36
	E-POSTA	inu.dhek@inonu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç.Dr. Şengül YÜKSEL				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MALATYA				
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI					
	DESTEKLEYİCİ					
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)					
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>			
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>			
FAZ 4		<input type="checkbox"/>				
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>				
Tıbbi cihaz klinik araştırması	<input type="checkbox"/>					
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	<input type="checkbox"/>					
İlaç dışı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>					
Diğer ise belirtiniz						
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>		

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU
İmza:



Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı olan hastalarda, alternatif bir yöntem olarak, mikro akışkan sperm ayıklama çiplerinin kullanımı
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2017/34

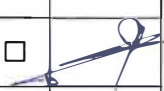

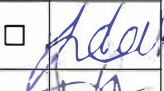



DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>	
	İLAN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
	DİĞER:	<input type="checkbox"/>	

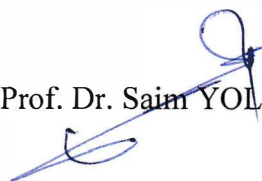
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/34	Tarih:22.03.2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Saim YOLOĞLU

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Saim YOLOĞLU	Biyoistatistik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin GENÇ	Halk Sağlığı	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İbrahim ŞAHİN	İç Hastalıkları	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Sedat YILDIZ	Fizyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Barış OTLU	Mikrobiyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mehmet GÜL	Histoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Cemalettin AYDIN	Genel Cerrahi	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU
İmza:



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tekrarlayan tüp bebek başarısızlığı olan hastalarda, alternatif bir yöntem olarak, mikro akışkan sperm ayıklama çiplerinin kullanımı								
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2017/34								
Prof. Dr. Hakan HARPUTLUOĞLU	Onkoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Seda TAŞDEMİR	Tıbbi Farmakoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARATAŞ	Tıp Tarihi ve Etik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Sedat AKBAŞ	Anesteziyoloji ve Rea.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Necla DENİZ	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Abdullah DEMİREL	Hukuk	Serbest Avukat	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hasan KONAN	Sivil Üye	MSD Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Saim YOLOĞLU

İmza:

