



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İNFERTİL ERKEKLERİN SPERM ÖRNEKLERİNDE DNA
FRAGMENTASYON ORANLARININ KROMOZOM ANÖPLOİDİLERİ
İLE İLİŞKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
EFSUN TOSUMOĞLU**

**DANIŞMAN
Prof.Dr.SEVİLHAN ARTAN**

2018



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**İNFERTİL ERKEKLERİN SPERM ÖRNEKLERİNDE DNA
FRAGMENTASYON ORANLARININ KROMOZOM ANÖPLOİDİLERİ
İLE İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EFSUN TOSUMOĞLU

**DANIŞMAN
Prof.Dr.Sevilhan ARTAN**

KABUL VE ONAY SAYFASI

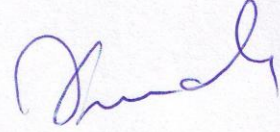
Efsun TOSUMOĞLU'nun Yüksek Lisans olarak hazırladığı "İNFERTİL ERKEKLERİN SPERM ÖRNEKLERİNDE DNA FRAGMENTASYON ORANLARININ KROMOZOM ANÖPLOİDİLERİ İLE İLİŞKİSİ" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

18.05.2018

Üye : Prof. Dr. Sevilhan ARTAN (Danışman)



Üye : Doç. Dr. Beyhan DURAK ARAS




Üye : Doç. Dr. Müjgan ÖZDEMİR ERDOĞAN



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21.05.2018 tarih ve 1174/5784 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Weysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü



Özet

İnfertil Erkeklerin Sperm Örneklerinde DNA Fragmentasyon Oranlarının Kromozom Anöplodileri ile İlişkisi

İnfertilite, doğum kontrolü olmaksızın çiftlerde 1 yıllık sürede gebeliğin gerçekleşmemesi durumudur ve çiftlerin yaklaşık %10-15'i infertilite problemi ile karşılaşmaktadır. Erkek infertilitesinin ilk değerlendirme basamaklarından olan sperm analizinin ardından her zaman spesifik testlerin yapılması gerekli değildir. Ancak, bireylerin %40-60 kadarında infertilite nedeni anlaşılabilen, dolayısıyla sperm analizi her zaman erkeğin fertilitate potansiyelini tam olarak yansıtmamaktadır. İnfertilite nedenini ortaya koyabilecek ve tedaviye yön verebilecek yeni yöntem arayışına paralel olarak son yıllarda, sperm DNA fragmentasyonunun sperm fonksiyonundaki önemi farkedilmiş olup günümüzde DNA fragmentasyonuna spesifik testlerden yararlanma eğilimi gündeme gelmiştir. Bu testlerden biri olan TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) testi, fragmentasyon analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Çalışmamızda infertilite öyküsü olan ve spermiogram/sperm fonksiyon testlerinde non-normozoospermik tanısı alan 48 olgudan elde edilen semen örneklerinde DNA fragmentasyon oranları, TUNEL testi ile incelenmiş ve örneklerin DNA fragmentasyon oranları, sağlıklı, fertil olduğu bilinen 50 normozoospermik birey örneklerinde elde edilen oranlarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca araştırma ve kontrol grupları sperm örnekleri, kromozom 13, 16, 18, 21, X ve Y dizomi ve diploidi oranları açısından Floresan *In Situ* Hibridizasyon (FISH) analizi ile karşılaştırılmış, fragmentasyon oranı ile kromozom anöplodi/poliploidi ilişkileri değerlendirilmiştir.

Analizlerin değerlendirilmesi sonucu; infertil öyküsü olan non-normozoospermik grupta TUNEL testi ile değerlendirilen DNA fragmentasyon oranının kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek olduğu gözlenmiştir. Anormal otozomal/seks kromozomal FISH oranlarının da fertil olan kontrol örneklerine göre infertil olan grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı ve bu artış ile DNA fragmentasyonu arasında anlamlı düzeyde korelasyonun olduğu gözlenmiştir ($p=0.001$).

İnfertilite nedeniyle klinik değerlendirmeye alınan olgularda rutin spermiogram ve morfolojik sperm analizlerinin yanısıra, özellikle yardımcı üreme tekniklerinden yararlanan olgularda, DNA fragmentasyon İndeksinin (DFI) de değerlendirilmesi gerektiği ve DFI değeri yüksek olan olgularda preimplantasyon genetik tarama yaklaşımının uygulanmasının başarıyı arttıracığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler : Sperm DNA fragmentasyonu, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling), erkek infertilitesi, kromozom anöploidisi



Summary

Correlation of Sperm DNA Fragmentation Rates With Chromosome Aneuploidies In Infertile Men Sperm Samples

Infertility is the failure to conceive after a year of unrestricted and unprotected intercourse. About 10 to 15% of the couples have experienced fertility problems. Following sperm analysis, which is the first evaluation step of male infertility, specific tests are not always required. However, sperm analysis is able to explain the reasons of infertility in only 40-60% of the infertile men, it does not fully reflect the fertility potential of the male. In recent years, sperm DNA fragmentation has been recognized as a potential for sperm function, and nowadays there is a tendency to use specific tests for DNA fragmentation. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) test is one of the DNA fragmentation assays and is often used for DNA fragmentation analysis.

In our study, the DNA fragmentation analysis was performed by TUNEL test in the semen samples from 50 infertile, non-normozoospermic cases and 50 fertility known normozoospermic individuals. Moreover, chromosomes 13, 16,18,21, X, Y disomies and diploid ratios of the sperm samples were analysed by Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) technique in both non-normozoospermic and normozoospermic samples and the autosomal/sex chromosomal aneuploidies and diploidy rate were compared between the groups and their relations with DNA fragmentation were evaluated.

The abnormal FISH ratio for all chromosomes was significantly higher in the infertile non-normozoospermic group than in the control group. The rate of DNA fragmentation detected by TUNEL test was significantly higher in the non-normozoospermic group compared to the control group . The associations between the TUNEL-detected DNA fragmentation frequency and the rates of all autosomal/sex chromosomal aneuploidies and diploidies were statistically significant ($p=0.000$).

In the case of clinical trials for infertility, besides the routine spermiogram and morphological sperm analyses, DNA fragmentation analyses should also be assessed and we suggest that the application of the preimplantation genetic screening approach will increase the success rate of assisted reproductive techniques in cases with high DFI (dispersion fragmentation index) rates because of the high DNA fragmentation-chromosome aneuploidy correlation.

Key Words: Sperm DNA fragmentation, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling), male infertility, chromosome aneuploidy



İçindekiler

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
Özet	iii
Summary	v
Tablo Dizini	x
Şekil Dizini	xi
Simge ve Kısaltmalar Dizini	xiii
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertiliteye Genel Bakış	3
2.1.1 İnfertilite Nedir?	3
2.1.2 İnfertilite Etiyolojisi	3
2.1.3 Erkek İnfertilitesi İle İlgili Genetik Faktörler	4
2.1.3.1 Kromozomal Değişiklikler	4
2.1.3.2 Y Kromozomu Mikrodelesyonları	6
2.1.3.3 Tek Gen Mutasyonları	6
2.2 Erkek Genital Sistemi	7
2.3 Sperm Yapısı	8
2.4 Semen Analizi	9
2.4.1 Makroskopik İnceleme	10
2.4.2 Mikroskopik İnceleme	10
2.5 Spermatogenez	12
2.5.1 Spermatogonyal Evre	13
2.5.2 Spermatozoid Fazı	14
2.5.3 Spermiyogenez	15
2.6. Sperm DNA'sı	15

2.6.1 Sperm DNA Hasarı	17
2.6.1.1 Mitokondriyal DNA Hasarı ve Kaynağı	17
2.6.1.2 Nükleer DNA hasarı ve kaynağı	17
2.6.2 Sperm DNA Hasarının Mekanizmaları	17
2.6.3 Erkek İnfertilitesinin Sperm DNA Hasarı ile İlişkisi	18
2.7. Sperm DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri	20
2.7.1 TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) Yöntemi	21
2.7.2 Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD) - HALOSPERM	22
2.7.3 SCSA (Sperm Kromatin Strüktür Analizi)	22
2.7.4 COMET testi (Basit Hücre Jel Elektroforezi)	22
2.7.5 İn Situ-Nick Translasyon (NT) Yöntemi	23
2.7.6 DBD-FISH(DNA breakage detection-fish)Yöntemi	23
2.7.7 Akridin Oranj (AO) Yöntemi	23
3- GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1 Gereç	24
3.1.1 Araştırma Grubu Bireyleri	24
3.1.2 Kullanılan Gereçler	25
3.1.3 Kullanılan Kimyasal Gereçler	26
3.2 Yöntem	26
3.2.1 Sperm FISH Analizi ile Anöploidi Tayini	26
3.2.1.1 Örneklerin FISH analizine hazırlanması	26
3.2.1.2 Sperm FISH analizi Preperat Hazırlığı	27
3.2.1.3 Preperat/Prob Denatürasyonu ve Hibridizasyon	28
3.2.1.4 Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	28
3.2.1.5 Sperm FISH Mikroskop Analizi	28
3.2.2 TUNEL Testi	29
3.2.2.1 Kullanılan Solusyonların Hazırlanması	30
3.2.2.2 TUNEL Test Aşamaları	30
3.2.2.3 Floresan Mikroskop Analizi	30

3.3 İstatistiksel Analiz	31
4-BULGULAR	32
4.1 Çalışmaya Dahil Edilen Olguların Özellikleri	32
4.2 FISH Analizi ile Saptanan Sperm Kromozom Anöploidileri	33
4.3 Olguların TUNEL testi ile Değerlendirilen Fragmentasyon Oranları	37
5- TARTIŞMA	42
5.1 FISH analizi ile saptanan Sperm Kromozom Anöploidileriyle Literatür bilgilerinin karşılaştırılması	42
5.2 Olguların TUNEL testi ile Değerlendirilen Fragmentasyon Oranları ile Literatür bilgilerinin karşılaştırılması	43
5.3 DNA Fragmentasyonu Oranları ile Sperm Kromozom Anöploidi/Diploidi İlişkisinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması	46
6- SONUÇ VE ÖNERİLER	48
7- KAYNAKLAR DİZİNİ	50
8- ÖZGEÇMİŞ	59

Tablo Dizini

Tablo 2.1 Erkek İnfertilitesinde Etyolojik Nedenler	4
Tablo 2.2 WHO 2010 Semen Analizi Referans Aralıkları	12
Tablo 2.3 Semen Analizi Verilerinin Değerlendirilmesinde Kullanılan Nomenklatü ve Anlamları	12
Tablo 3.1 Çalışmada Kullanılan Genel ve Amaca Yönelik Cihazlar	25
Tablo 3.2 Çalışmada Kullanılan Genel Ve Amaca Yönelik Kimyasal Malzemeler	26
Tablo 4.1 Çalışma gruplarının konsantrasyon, motilite , normal spermatozoa değerlerinin kıyası	32
Tablo 4.2 Araştırma ve Kontrol Grubu Örneklerinde Anöplöidi Sıklıkları	35
Tablo 4.3 Normozoospermik Olmayan Olguların Spermatozolarında Saptanan Anöplöidilerin ve Diploidinin Hasta Alt Gruplarındaki Dağılımı	36
Tablo 4.4 Normozoospermik ve Non-normozoospermik Gruplar Arasında Tünel (+)(Fragmente DNA'sı olan) Spermatozoa Sıklıkları	37
Tablo 4.5 TUNEL test ile Non-normozoospermik Örneklerin Kıyaslanması	38
Tablo 4.6 Araştırma ve Kontrol grubu örneklerinde TUNEL testi ile anöplöid/diploidi Sıklıklarının Karşılaştırılması	40
Tablo 4.7 Araştırma ve Kontrol Gruplarında Saptanan TUNEL testi ve FISH Analiz Verilerinin Korelasyonları	41

Şekil Dizini (Devam Ediyor)

Şekil 2.1 Testis ve Kanalları	7
Şekil 2.2 Erkek Üreme Sistemi	8
Şekil 2.3 Olgun sperm hücrelerinin şematik gösterimi	9
Şekil 2.4 Spermatogenezin ve Germ Hücrelerinin Yaklaşık Konumunun Görüntülenmesi	13
Şekil 2.5 Spermatogenez (74 gün)	14
Şekil 2.6 Sperm Kromatin Yapısı	16
Şekil 2.7 Artan Sperm DNA Hasarı ile İlişkili Etiyolojik Faktörler	19
Şekil 2.8 Sperm DNA'sının Boyanması ve Flow Sitometri Yöntemiyle Analizi	21
Şekil 3.1 Normozoospermik ve Non-normozoospermik Semen Örneklerinden Yapılan DNA Fragmentasyon Analizleri ve Anöploidi Analizi Algoritması	25
Şekil 4.1 Olgu 5'e ait diploid spermatozoa FISH görüntüsü	33
Şekil 4.2 Olgu 3'e ait XY dizomili spermatozoa FISH görüntüsü	33
Şekil 4.3 Olgu 6'ya ait kromozom 13 dizomisi ve normal 21'li spermatozoa FISH görüntüsü	34
Şekil 4.4 Olgu 8'e ait kromozom normal 18 ve X spermatozoa FISH görüntüsü	34
Şekil 4.5 Normozoospermik Olmayan Örneklerde Fragmente (ışına yapmış) olan Spermatozoa Görüntüsü	38
Şekil 4.6 Normozoospermik Olmayan Örneklerde Fragmente olmayan (ışına yapmamış) spermatozoa görüntüsü	38
Şekil 4.7 Araştırma ve Kontrol Gruplarında saptanan TUNEL testi ve FISH analiz verilerinin korelasyonları	41

Şekil 5.1 DNA Fragmentasyonu Kontrol Grubu Cut-off (%20) değerine göre dağılımı 44

Şekil 5.2 DNA Fragmentasyonu Hasta Grubu Cut-off (%20) değerine göre dağılımı 45



Simge ve Kısaltmalar Dizini

AOT : Akridin Oranj Testi

ART : Yardımcı Üreme Teknikleri

CBVAD : Konjenital Bilateral Vas Deferans Yokluğu

COMET : Basit Hücre Jel Elektroforezi

DAPI : 4',6'-diamino-2-fenilindol

dUTP : Deoksiüridin Trifosfat

FISH : Floresan In Situ Hibridizasyon

ICSI : İntra-Sitoplazmik Sperm İnjesiyonu

ISNT : İn Situ Çentik Translasyon

IVF : İn Vitro Fertilizasyon

ml : Mililitre

μ l : Mikrolitre

NP: Non-Progresif motilite

PBS: Fosfat buffer salin

PR: Progresif Motilite

SCSA : Sperm Kromatin Yapı Testi

SRY : Cinsiyet Belirleyici Gen

SSC : Salin-Sodyum Sitrat

ssDNA : Tek zincirli DNA

TUNEL : Terminal Deoksinukleotidil Transferaz dUTP Çentik Sonu Etiketleme

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Herhangi bir korunma yöntemi kullanılmamasına rağmen, en az bir yıl süreyle haftada 2-3 kez olan cinsel ilişki sonucu gebeliğin oluşmaması durumu "infertilite" olarak tanımlanmaktadır. İnfertil vakalarının %50 kadarını erkek infertil hastalar oluştururken, bu vakaların %30'u sadece erkek, %20'si ise hem kadın hem erkek faktörü içermektedir. Erkek fertilitasını etkileyen konjenital veya kazanılmış ürogenital anomaliler, ürogenital kanal enfeksiyonları, endokrin bozukluklar, genetik anomaliler, immünolojik faktörler veya malignansiler gibi faktörlerin bulunmamasına rağmen erkek orjinli infertilitenin olduğu durumlar "idiyopatik erkek infertilitesi" olarak gruplanmakta olup bu olgularda özellikle semen kalitesi ve sperm değerlendirilmesi süreci gerçekleşmektedir.

Sperm kromatini, spermiyogenez süreci içerisinde somatik hücrelerden farklı olarak kondanse olmaktadır. Bu olay, histonların protaminlerle yer değiştirmesi aracılığıyla gerçekleşmektedir. Sperm kromatinin oosit içerisine penetrasyonu ile beraber paternal pronukleus oluşumu için hızlı bir şekilde kromatin dekondezasyonu sürecinin gerçekleşmesi gerekmektedir. Bugüne kadar gerçekleştirilen çok sayıda deneysel çalışma, uygunsuz kromatin dekondezasyonunun, apoptozisin hatalı düzenlenmesinin ve erkek genital yolağından geçiş sürecindeki oksidatif stresin sperm DNA'sının harabiyete eğilimli olmasına neden olduğunu göstermiştir. Tamir edilebilir özellikte olan tek dal DNA kırıklarının aksine, çift-dal DNA kırıkları; DNA replikasyonunu ve dolayısıyla paternal pronukleus oluşumunu geciktirmektedir. Çift-dal kırıklarının ve buna bağlı tamir hatalarının şiddeti, spermatogenez yolağı hatalarına, oosit fertilizasyon yeteneğinin zayıflamasına ve/veya erken embriyonik gelişimin durmasına neden olabilmektedir. Intrazitoplazmik sperm Injection (ICSI) çalışmalarında, infertil erkeklerdeki yüksek DNA fragmentasyon prevelansının, düşük fertilizasyon oranı ve embriyo kalitesi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bunun aksini ortaya koyan çalışmalar da bulunmakla beraber bu farklılığın DNA fragmentasyon şiddeti ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Eskandari, Tavalae, Zohrabi, & Nasr-Esfahani, 2018; Küçük, 2018).

Semen kalitesi sıklıkla erkek infertilitesinin dolaylı bir ölçüsü olarak kullanılır. Tarihsel süreçte, erkek fertilitate potansiyeli göstergeleri olarak kullanılan parametreler; sperm sayısı, motilite ve morfolojiyi içermekte olup, bunların tümü fertilitate kliniklerinde rutin semen analizlerin bir parçası olarak değerlendirilmektedir. Son zamanlarda, başarısız yardımcı üreme tekniklerinden elde edilen verilere paralel olarak erkek

infertilitesinin bir belirteci olarak DNA bütünlüğünün değerlendirilmesine yönelik analizlerin kullanımına ilgi artmaktadır.

Özellikle sperm motilitesi ve morfoloji anomalileri gösteren erkeklerde, yüksek seviyede DNA fragmentasyon riski artmıştır. Subfertilite için klinik olarak başvuran erkeklerin \leq % 40 kadarında parçalanmış sperm DNA'sı gözlenmektedir. Özellikle, denatüre DNA gibi yüksek oranda hasarlı spermatozoa içeren semenin, doğal doğurganlık için çok düşük bir potansiyele sahip olduğu bildirilmektedir (Bronet et al., 2012).

Günümüzde sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmede çeşitli testler kullanılmaktadır. Bu testlerden biri olan ve temel olarak apoptoz sırasında meydana gelen DNA parçalanmasını ölçmek için tasarlanmış TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) testi, DNA fragmentasyonunun, harap olan bölgeye problemlerin inkorporasyonunu sağlayarak doğrudan ölçülmesine dayanan bir tekniktir. Problemlerden gelen floresan ışımalarla göre DNA dalı kırıkları kantitatif olarak belirlenmektedir. Diğer testlerin yanısıra, TUNEL testi de sperm DNA fragmentasyon değerlendirilmesinde uygulanmış ve etkinliği belirlenmiş bir yöntemdir (Henkel, Hoogendijk, Bouic, & Kruger, 2010).

Germ hücrelerinde kromozom analizlerinin gerçekleştirilme zorlukları, moleküler sitogenetik tekniklerin kullanımı ile aşılmıştır. Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği kullanılarak sperm kromozomlarının değerlendirilmesi, normal spermiyograma rağmen üreme problemleri olan bireylerde ve aynı zamanda anormal sperm parametrelerine sahip erkeklerde gerçekleştirilmiştir (Andreescu et al., 2016).

ESOGÜ BAP Proje No:2014-521 kararıyla desteklenen projemizde DNA fragmentasyon oranları aynı hasta gruplarında, iki ayrı yöntemle (TUNEL ve SCD(Halosperm) testleriyle) değerlendirilmiş, eş zamanlı olarak kromozom dizomi/diploidi sıklıklarının belirlenmesi amacıyla FISH analizleri yapılmıştır.

Bu çalışmada; infertilite öyküsü olan ve spermiogram/sperm fonksiyon testlerinde non-normozoospermik tanısı alan olguların semen örneklerinde DNA fragmentasyonunun TUNEL testi ile değerlendirilerek saptanan oranların, sağlıklı, fertil olduğu bilinen normozoospermik birey örnekleriyle karşılaştırılması, otozomal/seks kromozomal dizomi ve diploidi ile DNA fragmentasyon ilişkilerinin non-normozoospermik ve normozoospermik gruplar arasındaki ilişkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2- GENEL BİLGİLER

2.1- İNFERTİLİTEYE GENEL BAKIŞ

2.1.1. İnfertilite nedir?

Normal bir kadın partner varlığında normal sıklıkta ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen 12 ay boyunca gebeliğe ulaşamaması durumuna "infertilite" denir (Jungwirth et al., 2012). İnfertilitenin klasik tanımında 12 ay beklenmesi gerektiği söylene de; bilateral inmemiş testis gibi risk faktörlerinin bilindiği, ileri yaş olarak kabul edilen 35 yaş üstü gibi kadına ait risk faktörlerinden şüphelenilmesi, erkeğin kendi fertilite potansiyelini öğrenmek istemesi gibi durumlarda infertilite değerlendirilmesi 6 aydan sonra da yapılabilmektedir (Matzuk & Lamb, 2002).

2.1.2. İnfertilite etyolojisi

İnfertilite dünya çapında çiftlerin yaklaşık % 15'inde görülen bir üreme sağlığı problemidir. Prevalans, gelişmiş ülkelerde daha az, gelişmekte olan ülkelerde ise daha sıktır. Çiftlerin 1/8 kadarında hiç çocuk sahibi olamama (primer infertilite), 1/6 kadarında ise ilk çocuktan sonra gebelik oluşmaması (sekonder infertilite) öyküsü bulunmaktadır. Vakaların yaklaşık %50'sini erkek infertil hastalar oluştururken bu vakaların %30'u sadece erkek, %20'si ise hem kadın hem erkek faktörü içermektedir.

Erkek fertilitesi

- konjenital veya kazanılmış ürogenital anomaliler
- ürogenital kanal enfeksiyonları
- artmış skrotal ısı (örnek: varikozel kaynaklı)
- endokrin bozukluklar
- Malignansiler
- genetik anomaliler
- immünolojik faktörler kaynaklı etkilenmektedir.

Olguların %30-60 kadarında yukarıda listelenen faktörler bulunmamasına rağmen erkek infertilitesinin olduğu gözlenmektedir ki bu grup "idiyopatik erkek infertilitesi" olarak ayrıca değerlendirilmektedir. Bu grupta yer alan olgularda fertilitiyi etkileyecek öykü bulunmamakta, fizik muayene, endokrin, genetik ve biyokimyasal laboratuvar bulguları normal olarak saptanmaktadır. Ancak semen analizinde patolojik verilere

rastlanabilmektedir. Erkek infertilitesi pre-testiküler, testiküler ve testiküler sonrası olmak üzere üç ana etiyolojik kategoriye ayrılmıştır (Bieniek, Drabovich, & Lo, 2016) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 Erkek infertilitesinde etiyolojik nedenler (Katz, Teloken, & Shoshany, 2017)

Pre-testiküler	Testiküler		Post-Testiküler
-Hipogonadotropik hipogonadizm	- Varikozel	- Genetik azospermi veya oligospermi	- CBAVD
- Hiperprolektinemia	- Kriptorşidizm	-Y kromozom mikrolelesyonları	- Retrograd ejakülasyon
- Farmakolojik	- Testiküler Kanser	- Klinefelter Sendromu	- Sinir hasarı
	- Kemoterapi	- Çevresel	- Omurilik yaralanması
	- SCOS (Sertoli Cell Only Sendrom)	- İncinme yada Travma	-Sistemik hastalık

2.1.3. Erkek infertilitesi ile ilgili genetik faktörler

Genetik defektlerin, erkek infertilitesinin önde gelen nedenlerinden biri olduğu bilinmektedir. Erkek infertilitesine yol açan genetik anormallikler vakaların %15-30' undan sorumludur. Bu genetik defektler, gelişim sırasında erkek gonadların veya ürogenital sistemin gelişimini engeller, germ hücre üretiminin durmasına neden olabilir veya fonksiyonel olmayan spermatozoa üretilebilir (Traven, Ogrinc, & Kunej, 2017). İnfertil erkeklerde yaygın olarak görülen genetik değişiklikler, karyotip anomalileri, gen kopya sayısı varyasyonları (CNV), tek gen mutasyonları/polimorfizmleri ve Y kromozomunun uzun kolundaki delesyonlardır (Yq mikrolelesyonları) (Colaco & Modi, 2018).

2.1.3.1 Kromozomal Değişiklikler

Özellikle anöploidi olmak üzere, infertil erkekler spermatogenezin bozukluğunun şiddetine bağlı olarak %2-15 arasında değişen insidansı olan kromozomal değişikliklere sahiptirler (Ramasamy et al., 2015). Mayoz sırasında kromozomal rekombinasyon sadece evrim için değil, aynı zamanda spermatogenez sırasında kromozomların doğru ayrılması için de çok önemlidir. Böylece rekombinasyon başarısızlığı sperm anöploidileri ile bağlantılıdır. Klasik semen analizi parametreleri normal olsa bile, infertil erkeklerde rekombinasyon başarısızlığı ve sperm anöploidi oranının daha yüksek olduğu görülmüştür (Gosálvez, Lopez-Fernandez, Fernandez, Esteves, & Johnston, 2015).

Otozomal inversiyonlar, genetik materyal kaybına yol açmayan yapısal kromozomal düzensizliklerdir. Kromozom varyantı olarak tanımlanan kromozom 9 inversiyonları, normal populasyonla birlikte infertil erkeklerin de % 3-5'inde saptanmıştır. Bu yapısal anomalinin erkek infertilitesi ile ilişkili olabileceği önceki yıllarda yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Mierla & Stoian, 2012; Mozdarani, Meybodi, & Karimi, 2007). Kromozom 9 inversiyonlarının erkek taşıyıcılarında azospermi, oligospermi, astenozoospermi veya normozoospermi saptanmış, ayrıca bu inversiyona sahip bireylerin sperm anöploidi insidansının daha yüksek (Collodel et al., 2006) olduğu bildirilmiştir.

Klinefelter sendromu, erkek infertilitesinin en sık görülen genetik nedeni olup, tüm erkeklerin 1/600'ünde, %0,6'si ağır derecede oligospermik erkeklerde ve nonobstrüktif azospermili erkeklerin %11'inde bulunur (Groth, Skakkebak, Høst, Gravholt, & Bojesen, 2013; Stahl & Schlegel, 2012). Vakaların %60'ında paternal kaynaklı olduğunu gösteren mayoz 1 sırasında ayrılmama, fazladan X kromozomu kökenlidir (Iitsuka et al., 2001).

Canlı doğumların 1/1000'inde bulunan ve seks kromozomlarında ikinci en sık görülen anöploidi çeşidi 47,XYY karyotipe sahip olan bireylerdir. Ekstra olan Y kromozomu mayoz 2 bölünmesi sırasında ayrılmama sonucu ortaya çıkmaktadır (Abramsky & Chapple, 1997). 47,XYY sendromlu, özellikle cinsiyet kromozomu trizomiler olan erkeklerde kromozomal olarak anormal spermlerin görülme sıklığı artmaktadır (Gonzalez-Merino, Hans, Abramowicz, Englert, & Emiliani, 2007).

Ortalama %0,9 azospermik erkek, nadir rastlanan 46,XX karyotipine sahip bireylerdir (Mau-Holzmann, 2005). Bu durumun iki çeşidi vardır: Olguların % 80-90'ından sorumlu olan ilki, Yp11.2'de lokalize olan ve cinsiyet belirleyici bölge olarak ifade edilen SRY geninin translokasyonundan kaynaklanmaktadır (SRY+XX erkekler). Bu mutasyona sahip olan tüm erkekler azospermiktir, ancak genellikle normal erkek fenotipine sahip bireylerdir. İkinci mutasyon ise, SRY'nin hiçbir kopyasının bulunmadığı SRY-XX erkekleridir. Bu olgularda, erkek fenotipi, SRY'nin yerini alan SOX9 ve DAX1 genleri gibi cinsiyet belirlemede rol alabilen otozomal veya X'e bağlı genlerdeki mutasyonlara bağlıdır (Hyon et al., 2015; Li et al., 2014).

Robertsonian translokasyonlar, 1/1000 yenidoğanda ve infertil erkeklerin %0,9'unda bulunan en yaygın yapısal anomalilerdir. Etkilenen erkeklerde sperm anöploidi insidansı daha yüksektir ve translokasyonun sonraki jenerasyona geçme riski bulunmaktadır (Keymolen, Van Berkel, Vosselmans, Staessen, & Liebaers, 2011). Bu nedenle sperm kromozom kompozisyonları analiz edilmeli; çiftlere uygun genetik danışma verilmeli ve bu olgulara preimplantasyon genetik tanı olasılığı sunulmalıdır (Godo et al., 2015).

2.1.3.2. Y Kromozomu mikrolelesyonları

Erkek infertilitesinin en iyi bilinen genetik nedenlerinden biri Y kromozomu mikrolelesyonlarıdır. Şiddetli oligozoospermi veya nonobstrüktif azoospermiden etkilenen seçilmiş erkeklerde Y kromozom mikrolelesyonlarının sıklığı %15'den %20'lere kadar yükselebilir (Foresta, Ferlin, Gianaroli, & Dallapiccola, 2002). Bu bölgede Azoospermi Faktörü (AZF) geni lokalizedir ki bu genin spermatogenezde rol oynadığı bilinmektedir. AZF bölgesinde AZFa, AZFb ve AZFc alt bölgeleri bulunmaktadır. Bu bölgelerde premayotik germ hücre gelişiminde rol oynayan DBY ve USP9Y (AZFa bölgesi), RBMY1 (testis-spesifik splicing faktör), apoptozis mekanizmasında rol oynayan PRY (AZFb bölgesi) ve spermatogenik süreçte görev alan DAZ (AZFc) bölgesi genleri lokalizedir. Delesyon bölgelerine göre Sertoli-cell Only Sendromu (SCOS), olgunlaşma arresti, hipospermatogenez, şiddetli oligozoospermi ve azospermi dahil olmak üzere spermatogenez bozuklukları kaynaklı farklı fenotipler gözlenmektedir (Visser & Repping, 2010; Ghorbian, 2012). AZFa ve AZFb bölge delesyonları nadir gözlenmektedir. AZFc bölgesi delesyonları ise, azospermik olguların %13, oligozoospermik olguların ise %6 kadarında gözlenmektedir. AZFa ve/veya AZFb bölgelerinin delesyonu durumunda spermatozoa bulunmadığı için bu delesyonlara sahip olgularda TESE uygulaması uygun olmadığı düşünülmektedir (Song, Chiba, Ramasamy, & Lamb, 2016).

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun (ICSI) gelişimi, şiddetli oligozoospermili hastaların çocuk sahibi olmasını sağlamıştır. Bununla birlikte, Y kromozomu AZF mikrolelesyonlarının babadan çocuğa ICSI yoluyla kalıtımı ise önemli bir dezavantajdır (Dohle et al., 2002).

2.1.3.3. Tek Gen Mutasyonları

Konjenital Bilateral Vas Deferans Yokluğu (CBAVD), infertil erkeklerin yaklaşık %1'inde ve obstrüktif azoospermili erkeklerin %25'inde bulunur. Yapılan bir meta analizde (Yu, Chen, Ni, & Li, 2011), CBAVD'li erkeklerin %78'inin en az bir CFTR mutasyonuna sahip olduğunu göstermiştir. CBAVD'li erkekler, epididimden veya ICSI ile eşleştirilmiş testislerden sperm elde etmek için iyi adaylardır (Giuliani et al., 2010).

Erkek infertilite nedenlerinden biri olan İkincil Hipogonadizm (Hipogonadotropik Hipogonadizm) Kallmann sendromu ile ilişkili olup 10.000 canlı doğumun birinde görülen X'e bağlı bir bozukluktur. KAL1 geni başta olmak üzere 5 gen daha bu sendromla ilişkilidir (Mittal et al., 2017).

2.2- Erkek Genital Sistemi

Erkek üreme sistemi;

1) Haploid erkek gametin (spermatozoa veya sperm) sürekli üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanması;

2) Erkek seks hormonlarının (androjenler) sentezi ve sekresyonu görevlerini üstlenmiştir.

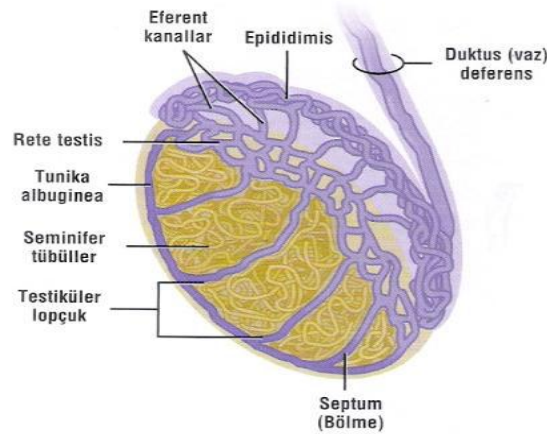
Erkek üreme sistemi dış ve iç organları içeren dört birimden oluşmaktadır;

1) Hormon ve sperm (spermatozoa) üreten testisler,

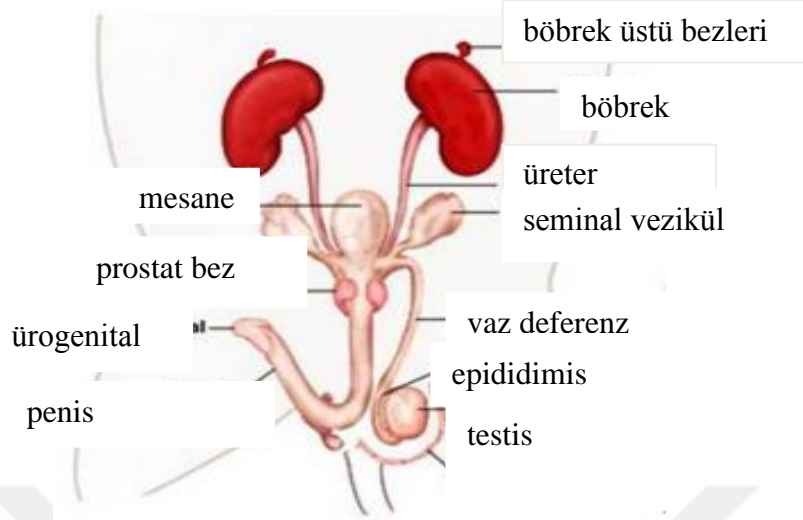
2) Dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, vaz deferens, ejakülatuar kanal ve erkek uretrasının bir kısmı (Şekil 2.1),

3) Salgıları sayesinde semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoaya besinler sağlayan aksesuar bezler, seminal vezikül, prostat bezi ve bulbo üretral bezler (Şekil2.2),

4) Cinsel ilişki esnasında kadın vajinasına girerek spermi kadın vücuduna iletmek için gereken, silindirik yapıda, erektil dokudan oluşan penis (Palme Yayıncılık, 2006).



Şekil 2.1. Testis ve Kanalları (Histoloji Atlası, Palme Yayıncılık 2001)



Şekil 2.2. Erkek Üreme Sistemi (Chang, Lee, Wang, Yeh, & Chang, 2013)

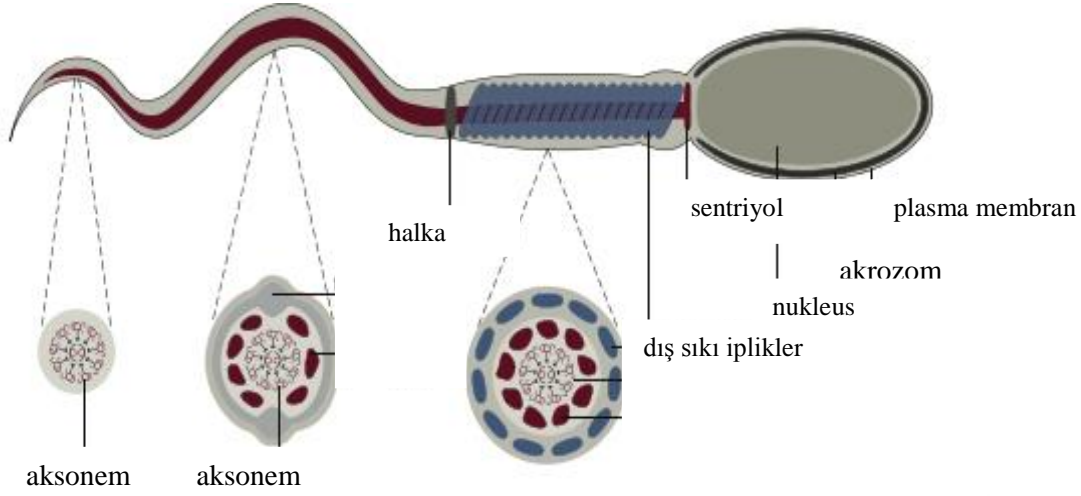
2.3- Sperm Yapısı

Yaklaşık 60 µm uzunluğunda olan olgun sperm hücresinin yapısına bakıldığında; sperm başı, boyun, orta parça ve kuyruk olmak üzere 4 kısımdan oluştuğu görülmektedir. Sperm büyük parçası olan sperm başında 2 önemli organel vardır: nukleus ve akrozom kesesi. Sperm başının büyük kısmını oluşturan nukleusta, paternal orjinli genetik materyali oluşturan genomik DNA yer alır ve nukleozomları yoktur. Bu yapıları saran akrozom kesesi ise içerisinde yumurta zarını delmek için gereken hidrolitik enzimler (hiyaluronidaz, akrozin, proteazlar, asit fosfatazlar) bulunmaktadır (Vanha-Perttula, 1978). Ovumun fertilizasyonu aşamasında akrozomal membranın bir çok noktadan oosit plazma membranına bağlanması ile akrozomal reaksiyon başlamakta ve hidrolitik enzimler aktifleşmektedirler. Akrozom kesesinin bulunmadığı örneğin globozoospermi olgularında doğal yolla gebelik de görülmemektedir.

Sperm boynunda sentrozom denilen organel bulunur. Sentrozom, sperm kuyruğunun başlangıç kısmıdır. Sentrozomun asıl görevi, yumurtanın bölünerek çoğalması ve embriyo gelişim sürecinin başlatılmasıdır. Sperm tarafından oosit fertilizasyonu sırasında, yumurtanın sentrozomu eridiği için sadece sperm sentrozomu hücre bölünmesindeki görevleri üstlenmektedir. Sperm boyun bozukluğunda sperm hareketi de etkilenmekle birlikte, hücre bölünmesi gerçekleşemediği için embriyo gelişimi de olmamaktadır. Sperm orta parçasında sperm enerjisini üreten mitokondriler sarmal şeklinde konumlanmışlardır (Sutovsky & Manandhar, 2006).

Sperm doğal yolla yumurtaya ulaşması için hareketini sağlayan kuyruk kısmı, ince ve tek parçadan oluşmalıdır. Aksonem adı verilen ve mikrotübüler ikililerden oluşan, sperm kuyruk hareketini sağlayan temel

yapıdır. Mikrotübüller, dinein olarak bilinen yapısal bir proteinden oluşmaktadır. Kuyruğun ana parçası yedi dış kalın lifle sarılı (orta parçada dokuz lif vardır) merkezi bir aksonem ve fibröz kılıftan oluşmaktadır. Hem fibröz kılıf hem de dış kalın lifler sperm hareketi sırasında kıvrılma ve mikrotübüler kayma için iskelet oluşturan keratin proteinini barındırmaktadır. Kuyruğun çok kısa bir parçadan oluşan son kısmında ise sadece aksonemi bulunmaktadır (Bracke, Peeters et al. 2017) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Olgun sperm hücrenin şematik gösterimi (Bracke, Peeters, Punjabi, Hoogewijs, & Dewilde, 2017)

2.4- Semen Analizi

Semen sıvısı, spermün testis ve epididimis salgısının, ejakülasyon sırasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerin salgılarının birleşmesiyle oluşur. Sonuç olarak oluşan ve viskozitesi yüksek olan bu sıvı "semen" adını alır. Bu salgıda sperm, semen sıvısının %5'ini oluşturur. Normal semen miktarı kişiden kişiye farklılık göstermekle birlikte 2-6 ml. arasındadır (Erdemir, Fırat, & Gençten, 2011).

Konvansiyonel sperm analizi, erkek kaynaklı infertilitenin laboratuvar değerlendirmesinde ilk adımdır (Sánchez, Wistuba, & Mallidis, 2013). Belli kriterlere göre yapılmadığında klinisyenin yanlış yönlendirilmesine ve sonuçta hastaya yanlış uygulamaların yapılmasına neden olabilmektedir. Erkek infertilitesinin belirlenebilmesi için semen analizinin rutin olarak yapılması ilk olarak 1902'de Edward Martin tarafından önerilmiş ve 1956'da MacLeaod, sperm sayısı yanında motilite ve morfolojisinin de önemine dikkat çekmiştir.

Klasik semen analizinden sağlıklı sonuç alınabilmesi için cinsel perhiz süresinin en az iki, en fazla sekiz gün olması gerekmektedir. Bu sürenin kısalması sayı ve volümü; uzaması ise sperm hareketliliğini olumsuz yönde

etkileyecektir. Semen analizinin makroskopik ve mikroskopik değerlendirilmesinde semenin bazı özellikleri incelenmektedir (Delilbaşı, 2008).

2.4.1. Makroskopik İnceleme

Likefaksiyon Süresi: Dehidratasyon veya ısı değişikliğinin semen kalitesini olumsuz etkilemesinden kaçınmak için, örneğin verilmesinden itibaren ejakülatın 5-30 dakika içinde likefiye olması gerekmekte olup bu süre 60 dk.ya kadar da uzayabilmektedir. Likefaksiyon, prostat tarafından salgılanan fibronolizin tarafından kolaylaştırılmaktadır.

Semen Hacmi: Hacim doğrudan veya içine toplandığı kapla birlikte tartılmasıyla ölçülür. Semen hacmi için en düşük referans değeri 1,5 ml' dir.

Görünüm: Sıvılaşmadan sonra semen, homojen gri-opak bir görünümde olur. Üretral kanaması olanlarda semen pembe olabilir.

Semen Ph'sı: Semen Ph'sı özellikle prostat ve seminal veziküllerin sekresyonları tarafından belirlenir. Alt eşik değeri 7,2 olarak kabul edilmektedir (Delilbaşı, 2008).

2.4.2. Mikroskopik İnceleme

Sperm sayımı (Derişim): Ejakülatta bulunan sperm sayısı likefaksiyonunu tamamlamış örnekte iki yöntemle değerlendirilebilir; 1) spermlerin hepsi immobilize edilerek sayım yapılır, 2) hareketli ve hareketsiz spermler birlikte değerlendirilir. WHO'nun referanslarına göre olması gereken en az sperm sayısı 15 milyon/ml'dir. Bu değer altı, oligospermi olarak adlandırılmaktadır. Oligosperminin en sık gözlenen nedeni varikoseldir ki bu durumda seminal parametrelerde de multipl defektler gözlenmektedir. Ejakülatta spermatozoa hücresinin hiç görülmemesi "azoospermi" olarak ifade edilir. Azoospermi nedenleri arasında; azospermiye spesifik AZF gen delesyonları, Y kromozomu anomalileri, yetersiz hormonal stimülasyon (hipogonadotropik hipogonadizm) ve spermatogenez anomalileri sayılabilir.

Sperm Motilitesi: Spermlerin hareketleri orta parça ve kuyruğun anatomik ve fonksiyonel bütünlüğü ile enerji üreten sistemin yeterliliğine bağlıdır. Isı ve süre, spermlerin motilitesi üzerine direk etki eden iki parametredir. Sperm motilitesi, mikroskopik olarak değerlendirilir ve progresif motil, nonprogresif motil ve immotil olarak sınıflandırılır (Delilbaşı, 2008).

İleri motilite(PR): Sperm hızından bağımsız olarak doğrusal veya geniş bir çevrede aktif hareket eden sperm hareketi,

Progresif olmayan motilite (NP): İlerlemenin yokluğunda motilitenin diğer tüm modellerini barındırır; baş kısmını zorla hareket ettiren güçlü kamçı hareketi ya da yalnızca kamçı hareketi vuruşu veya küçük daireler şeklinde yüzme sayılabilir.

Hareketsizlik (İmmotil) (IM): Hareket yoktur(Delilbaşı, 2008).

Progresif motilite ve non-progresif motilite birlikte toplam motilite olarak adlandırılır. Sperm motilitesi bildirilirken, toplam hareketliliğin (PR+NP) veya ileri hareketliliğin (PR) tanımlanması tavsiye edilmektedir. Toplam motilite için alt sınır %50'dir. Progresif motilite sınırı ise %32 olarak belirlenmiştir (Franken & Oehninger, 2012).

Sperm Morfolojisi:

Baş: Oval şekilli ve düzgün kenarlı olmalıdır. Akrozom, başın 1/3' ten fazlasını kaplamalıdır. Normal baş ölçümleri; 2-3 µm genişlikte ve 4-5 µm uzunlukta olmalı ve vakuol içermemelidir. Yuvarlak, armut, iğne şeklinde, çift başlı veya şekilsiz başlar daima anormal olarak kabul edilmektedir.

Boyun: 4-5 µm uzunluğunda ve düzgün olmalı, başın alt kısmına, aksiller konumda bağlanmalıdır. Boyun bölgesinde bulunabilen sitoplazmik droplet başın yarısından daha büyük olmamalıdır.

Kuyruk: 50-55 µm uzunlukta, düzgün kıvrımlı, boyun kısmından daha ince olmalı ve son kısma doğru giderek incelmelidir.

Tablo 2.2'de WHO 2010 semen analizi referans aralıkları, Tablo 2.3'de ise sperm hücre sayısı, motilitesi, morfolojisi ve miktarına göre yapılan sınıflandırma ve kullanılan nomenklatur özetlenmiştir (Satar & Gençdal, 2013).

Tablo 2.2 WHO 2010 Semen Analizi Referans Aralıkları (Organization, 2010)

PARAMETRE ARALIĞI	DÜŞÜK REFERANS
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Toplam Sperm Sayısı (10 ⁶ /ejakülat)	39(33-46)
Sperm Konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	20(12-16)
Toplam Motilite,PR+NP(%)	40(38-42)
Progresif Motilite,PR(%)	32(31-34)
Vitalite	58(55-63)
Sperm Morfoloji,normal form(%)	4(3.0-4.0)

Tablo 2.3. Semen Analizi verilerinin değerlendirilmesinde kullanılan nomenklatur ve anlamları (Satar & Gençdal, 2013).

Aspermi	Seminal plazma üretiminin olmamasıdır Hiç ejakülat yok
Lökositospermi	Ejakülatta >1 milyon/ml. beyaz küre olması
Hemospermi	Ejakülatta kan olması
Hipospermi	Semen hacminin <1 ml. olması
Hiperspermi	Semen hacminin >6 ml. olması
Nekrospermi	Sperm hücrelerinin ölü olması
Azoospermi	Tüm ejakülatta hiç sperm hücrelerinin bulunmaması
Normozoospermi	sperm sayısının >20 milyon/ ml. olması
Polizoospermi	sperm sayısının >250 x 10 ⁶ sperm /ml olması
Oligozoospermi	sperm sayısının <15 x 10 ⁶ sperm/ml olması
Astenozoospermi	Motilitenin <%30 olması
Teratozoospermi	Morfolojik olarak anormal spermlerin çoğunlukta olması
Globozoospermi	Sperm hücrelerinde akrozom bulunmaması
Nükleer Anomali	Sperm başının toplu iğne şeklinde olması (pinhead)

2.5- SPERMATOGENEZ

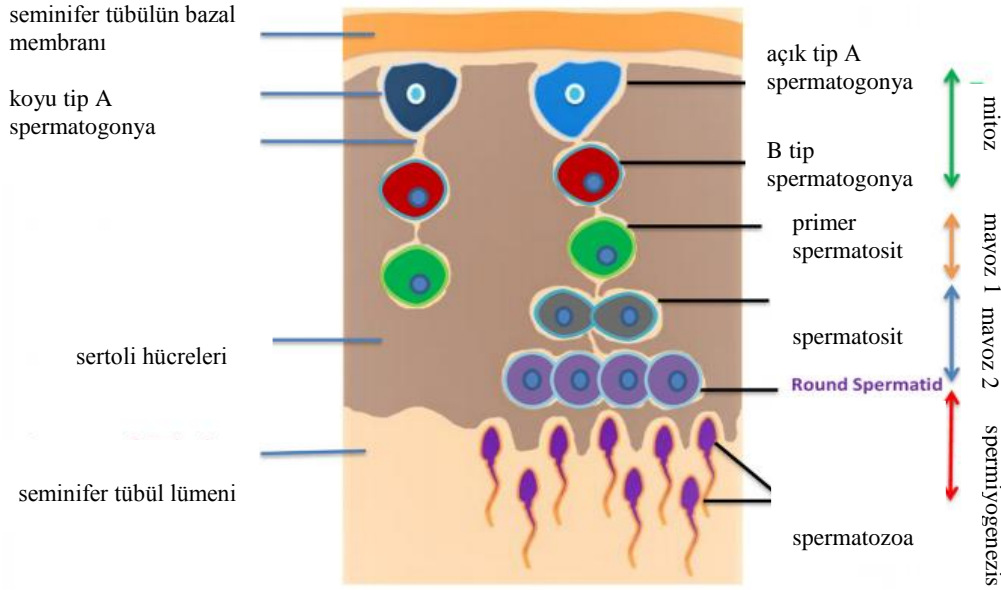
Spermatogonyumdan spermatozoo gelişimi sürecidir. Spermlerin üretildiği süreç olan spermatogenezde, kompleks ve eşsiz olaylar serisi gerçekleşmektedir. Spermatogenez 3 farklı evreye ayrılmaktadır (Şekil 2.4):

1. Spermatogonyal evrede; spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri oluştururken, sonuçta primer spermatositlere farklılaşacak olan spermatogonyum popülasyonunu da

oluşturmaktadırlar.

2. Spermatozot fazında (mayoz); primer spermatozotlar iki mayotik bölünmeye uğrayarak kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını yarıya indirirler ve spermatid denilen haploid hücreleri oluştururlar.

3. Spermatid fazında (spermiyogenez); spermatidler matür sperm hücrelerine farklılaşırlar ve daha sonra Sertoli hücrelerinden seminifer tübülün lümenine saliverilirler.



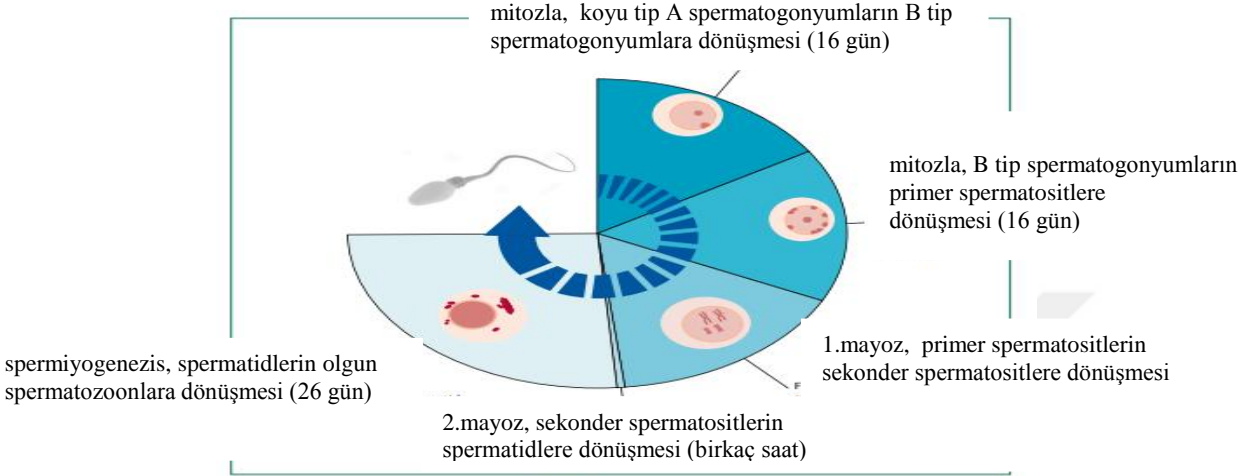
Şekil 2.4. Spermatogenezin ve germ hücrelerinin yaklaşık konumunun görüntülenmesi (Ibtisham et al., 2017).

2.5.1. Spermatogonyal Evre

Spermatogonyal fazda; kök hücreler bölünerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri ve spermatogonyum popülasyonunu oluştururlar. Spermatogonyumlar, rutin histolojik preparatlarındaki nükleusların görünümü temel alınarak 3 tip olarak sınıflandırılmaktadır:

Tip A koyu spermatogonyumlar; seminifer tübüllerdeki kök hücreler olarak bilinirler. Düzensiz aralıklarda bölünerek ya kök (rezerv) hücre olarak kalan bir çift tip A koyu spermatogonyum ya da bir çift tip A açık spermatogonyum oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar, spermin oluşumu ve farklılaşma evresinde rol oynamaktadırlar. Ardışık birkaç mitotik bölünme geçirip sayılarını arttırarak spermatogonyum B hücrelerine farklılaşırlar.

Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatozoidleri meydana getirmek üzere mitozla bölünürler ve mayoz bölünme geçirecek olan primer spermatozoidlere farklılaşırlar (Şekil 2.5)(Baykal,2014). Bu şekilde spermatozoidogenezis tamamlanmış olur ve mayoz bölünme evresi başlar.



Şekil 2.5. Spermatojenik Döngü (74 gün) (Tournaye, Krausz, & Oates, 2017).

2.5.2. Spermatozoid fazı (Mayoz)

Spermatozoid fazında (Mayoz); primer spermatozoidler mayozla uğrayarak hem kromozom sayısını hem de DNA miktarlarını azaltırlar. Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesi primer spermatozoidleri üretir. Oluştuktan kısa süre sonra ve mayoz başlamadan önce DNA'larını replike ederler. Böylece, her primer spermatozoid normal sayıda kromozom ($2n$) ve iki katı miktarda DNA ($4d$) içermektedir. İnsan primer spermatozoidlerinde 22 gün kadar süren 1. mayotik bölünmenin profazında kromatin, görülebilen kromozomları oluşturabilecek şekilde yoğunlaşır. Daha sonra, "tetrad" denilen homolog kromozom çiftleri crossing over gerçekleştirirken, dört kromatid yeniden düzenlenerek "sinaptonemal kompleks" olarak adlandırılan üç parçalı bir yapı oluşturur. Crossing over tamamlandıktan sonra, homolog kromozomlar ayrılır ve mayoz mekiğinin zıt kutuplarına çekilirler. Böylece crossing over ile modifiye edilen tetradlar ayrılır ve tekrar diadları oluştururlar. Birinci mayotik bölünme ile oluşan hücreler, sekonder spermatozoidler olarak adlandırılmaktadırlar. Bu hücreler hemen ikinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Her sekonder spermatozoidin kromozom sayısı yarıya inmiş, haploid kromozom sayısı oluşmuştur (n). Haploid olan sekonder spermatozoidlerin DNA miktarı $2d$ 'dir. İkinci mayotik bölünme tamamlandığında ve nuklear membranlar yeniden oluştuğunda, her bir sekonder spermatozoidten her biri 23 tek iplikli kromozom ve $1d$ miktarında DNA içeren iki haploid spermatozoid oluşmaktadır (Baykal ,2014).

2.5.3. Spermiyogenez

Spermatidlerin spermatozoalara olgunlaşma sürecidir. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır. Bu süreç dört aşamada gerçekleşmektedir;

a. Golgi Fazı: Hidrolitik enzimler Golgi aygıtından akrozomal veziküle aktarılırlar. İleride sperm hareketini sağlayacak olan flagellum bu aşamada oluşmaya başlar.

b. Kep Fazı: Bu fazda akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısının üzerinde yayılmaktadır. Bu, yeniden şekillenmiş yapıya "akrozomal kep" denmektedir. Akrozomal kepin altındaki nüklear zarf parçası, porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Nüklear içerik de yoğunlaşmıştır.

c. Akrozomal Faz: Oluşan akrozomal granül, nükleusu kaplayacak şekilde yayılarak akrozomu meydana getirmektedir. Distal sentriyol, mikrotübül çiftlerinden oluşan flagellumu meydana getirir. Sperm hareketi için gerekli olan mitokondriler, oluşan flagellumun proksimal kısmında toplanırlar ve sperm orta kısmını meydana getirirler.

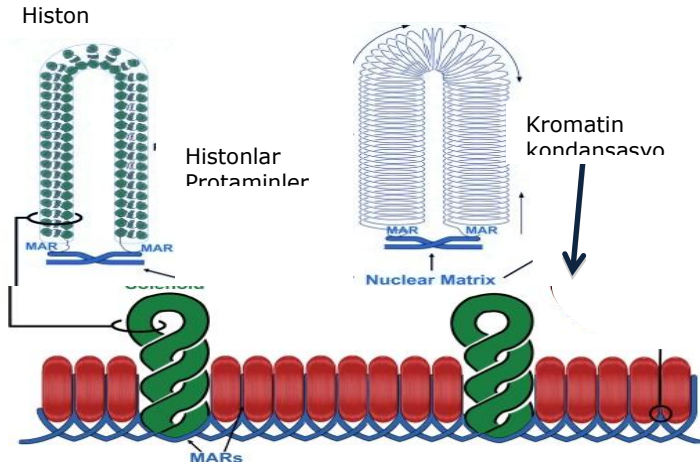
d. Olgunlaşma Fazı: Tüm organellerin belirli bir düzen almasından sonra geriye kalan artık cisimcikler, spermleşme aşamasında bırakılır ve sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler. Olgunlaşmış spermiler seminifer tübül lümeni boyunca salınırlar (Baykal ,2014).

2.6- Sperm DNA'sı

Memeli sperm DNA'sı, somatik hücrelerin sıkıca paketlenmiş mitotik kromozomlarından altı kat daha sıkı bir şekilde paketlenen, yoğunlukla bildiğimiz kompakt ökaryotik DNA'dır. Memelilerde sperm DNA'sı, "nüklear annulus" olarak isimlendirilen tek bir yapıya bağlı olarak yerleşmiş olup, sperm DNA'sının organizasyonunda önemli olduğuna inanılmaktadır (Küçük, 2018). Spermatogenezde kromatin yeniden düzenlenmesi, histonun geçiş proteinleri ve devamında da spermatidlerdeki protaminler ile yer değiştirmesi sürecinde gerçekleşmektedir. Spermiyogenezde nüklear elongasyon süreci, kromatinin nükleozom temelli yapıdan protamin temelli yapıya değişmesi ile birlikte olur. Ancak insanda, sperm DNA'sının %15 kadarı histonlarla paketlenmiş olarak kalmaktadır ki bu da fertilizasyon sonrası spesifik gen ekspresyonunu göstermektedir. Kromatin kondensasyonu süresince histonlar, geçiş proteinleriyle tekrar yapılandırıldıktan sonra sperm DNA bağlanma proteinleri olan protaminler sayesinde tekrar son hallerini almak üzere düzenlenirler (Rathke, Baarends, Awe, & Renkawitz-Pohl, 2014). Sperm DNA'sında değişmeden kalan histonlar; kromozomlarda, özellikle sentromerler ve telomerler olmak üzere rastgele olmayan bir yayılma göstermektedirler. Nükleozom temelli kromatin yapısının bu spesifik kromozomal bölgelerde kalması; global kromozom fonksiyonu için önemli

olabilir ve kromozomların sentromerik/telomerik bölgelerinin zigotda hemen farkedilip uygun olarak organize olmalarında da yardımcı olabilir. Bunlara ek olarak, son zamanlarda, nükleozomların; genlerin promoterleri ile embriyo gelişimini düzenleyen lokuslarda özellikle bırakılmış olabileceğini ortaya koyan veriler bulunmaktadır. Bu paternal orjinli nükleozom-temelli bölgelerin normal embriyogenez için önemli oldukları hipotezi ortaya atılmıştır. Geri kalan histonların çoğunda post-translasyonel modifikasyonlar (asetilasyon) gerçekleşmekte olup bunlar erken dönem zigota aktarılarak erken embriyo gelişiminde kalıcı olmaktadır (Şekil 2.6).

Kromozomal paketlenme, farklı H2B içeriğine sahip spermatozoalarda farklılık göstermektedir ve bu kromozom paketlenmedeki farklılık, fertilizasyon ve erken embriyonik gelişimde etkili olabilmektedir. Histonlar ilk olarak geçiş protein1 ve 2 (TNP1 ve TNP2) ile karşılıklı değiş-tokuş yaptıktan sonra Protamin P1 ve P2 ile yer değiştirirler. Bu süreç sırasında DNA çift-dal kırıkları oluşmaktadır ve tamir mekanizmaları aracılığıyla tamir edilmektedir. Spermatid aşamasında, histon 4'ün hiperasetilasyonu aracılığıyla, P1 ve P2 tarafından histon içeriğinin %80'inin değişmesi toroid denilen süpersarmal yapıların oluşması, DNA paketlenmesinin artırılması ve korunması için gereklidir (Conwell, Vilfan, & Hud, 2003). P1/P2 oranı da doğurganlığı etkiler. Fertil erkekler genellikle eşit oranda P1 ve P2'ye (Jodar & Oliva, 2014) sahipken, infertil erkek spermatozoalarında, fertil kontrollerine göre histon/protamin oranı daha yüksektir. Hatalı histon-protamin değişiminden kaynaklanan artmış DNA kırıkları, embriyonik morfolojinin bozulmasına neden olurken uygun olmayan P1/P2 oranı; artmış DNA fragmentasyonuna, azalmış sperm fonksiyonuna, gebelik oranlarının düşmesine ve erkek infertilitesine neden olabilmektedir (Hamad, Shelko, Kartarius, Montenarh, & Hammadeh, 2014).



Şekil 2.6. Sperm Kromatin Yapısı. Spermatidlerde DNA histonlar tarafından paketlenir, fakat spermiyogenez sırasında, çoğu protaminlerle yer değiştirirken, total DNA'nın %15 kadarı histonlarla paketlenmiş olarak aralara dağılmış olarak kalır (Ward, 2009).

2.6.1. Sperm DNA Hasarı

Sperm DNA'sının hasarlanması, farklı nedenlerle ve değişik seviyelerde gerçekleşebilir.

2.6.1.1. Mitokondrial DNA Hasarı Ve Kaynağı

Spermatozoon gelişiminin farklı aşamalarında bilinen muhtemel delesyonlar; nokta mutasyonları ve polimorfizm gibi mitokondrial DNA anomalilerini kapsar. Bu anomaliler semen kalitesi, motilite ve erkek infertilitesiyle ilişkidir. Mitokondrial DNA (mt DNA)'nın yardımcı histonlardan yoksun olduğundan sadece esas tamir mekanizmalarına sahip olduğü düşünölmektedir (R. J. Aitken & Krausz, 2001).

2.6.2.2. Nökleer DNA Hasarı Ve Kaynağı

Önceleri erkek germ hücre hattındaki DNA hasarının iki tipi tanımlanmıştır. İlki replikasyon hataları diğeri ise DNA tek ve çift zincir kırıklarını içeren DNA fragmentasyonudur (R. J. Aitken & Krausz, 2001). İnsan ejakulatındaki bu anomalilerin kaynağını açıklamada günümüzde farklı mekanizmalar tanımlanmıştır (RK Sharma, Said, & Agarwal, 2004).

2.6.2. Sperm DNA Hasarının Mekanizmaları

DNA 'nın sperm başlığı içinde paketlenmesi kromatin yeniden yapılanmasını ve yoğunlaşmasını içeren karışık bir süreç gerektirir. DNA'nın histon proteinleriyle paketlenip nükleozom adını aldığı somatik hücrelerin aksine, sperm hücrelerindeki DNA, nükleozomal yapıdan sökülür ve somatik nükleozomal histonlar, spermiyogenez sırasında protaminler adı verilen küçük temel proteinlerle yer değiştirir (R. J. Aitken, De Iuliis, & McLachlan, 2009). Aitken'in varsayımına göre, tam olarak protaminlenmiş sperm DNA'sı son derece stabil ve hasara karşı dirençli iken protaminasyondaki eksiklikler, DNA'nın kompakt halde kalmasına ve hasar görme eğiliminin daha da artmasına neden olur (R. Aitken, Bronson, Smith, & De Iuliis, 2013). Kromatin paketleme işlemi sırasında, tek dal ve çift dal kırıkları, nükleozomal yapının çözölmesi ve yine süper sarmal yapının oluşmasını önlemek için uyarılır. Bununla birlikte, bu zincir kırıklarının olgun sperm hücrelerinde DNA hasarının devam etmesini önlemek için onarıldığı düşünölmektedir. DNA kompaksiyonu ve paketlenmesi sırasında DNA onarımını etkileyen hatalar da sperm DNA hasarına katkıda bulunabilir.

Tamamlanmamış apoptozun, sperm DNA hasarı için bir başka potansiyel etiyoloji olduğü düşünölmektedir. Somatik hücrelerde olduğü gibi, anormal sperm de apoptozise girmek üzere programlanmıştır. Sperm yapımı

sırasında, bozuk sperm hücrelerinin ortadan kaldırılmasını kolaylaştıran apoptoza bağlı hasarlanma normal süreçtir. Apoptotik sürecin başlatılması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) salınmasına ve sperm DNA hasarının indüklenmesine neden olur ve daha sonra DNA hasar düzeyi artmış sperm salınımı gerçekleşir (R. Aitken & De Iuliis, 2009).

Post-testiküler ortam, potansiyel olarak ROS'un etkisi ile sperm DNA hasarında rol oynayabilir (R. Aitken et al., 2013). Çalışmalar cinsel perhizde olan erkeklerin sperm DNA hasarının seviyelerinin yüksek olduğunu tespit ederken, diğer çalışmalar, testiküler sperm ile karşılaştırıldığında boşalmış spermde daha yüksek seviyelerde sperm DNA hasarı tespit etmişlerdir (Greco et al., 2005).

Ayrıca; endojen kaspazlar ve endonukleazlar tarafından indüklenen DNA fragmentasyonu, radyoterapi ve kemoterapiden kaynaklanan DNA hasarı, çevresel toksik maddeler tarafından indüklenen DNA hasarı da faktörler arasında gösterilebilir. Görüldüğü gibi sperm DNA hasarı, normal sperm üretimi sırasında da vücudun fizyolojik bir fonksiyonu olarak açığa çıkmaktadır (Vandekerckhove, De Croo, Gerris, Vanden Abbeel, & De Sutter, 2016).

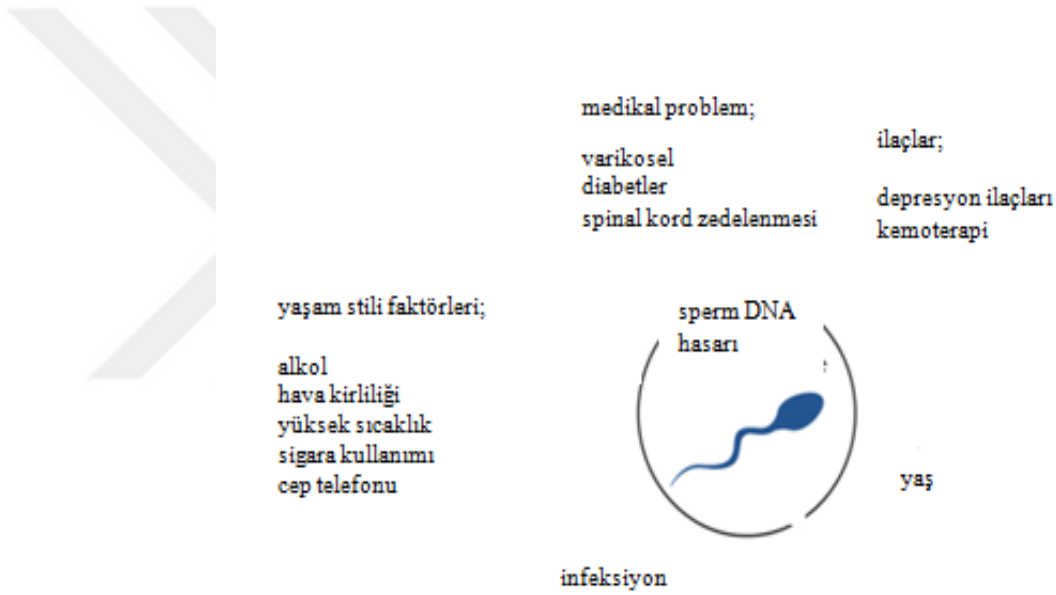
2.6.3. Erkek İnfertilitesinin Sperm DNA Hasarı ile İlişkisi

Apoptoz; gonadal farklılaşmanın erken evrelerinden döllenme anına kadar bu hücrelerin üretimini ve işlevini düzenleyen, erkek germ hücre gelişiminin önemli bir özelliğidir (Palermo, Neri, Cozzubbo, & Rosenwaks, 2014). Germ hücrelerinin apoptozisi hasarlı hücrelerinin eliminasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının dengeli ve düzenli bir şekilde gerçekleşmesinde önemli bir olaydır. Testiküler gelişimin kritik döneminde, apoptozun inhibisyonu spermatogonia olgunlaşmasını etkiler, ancak artmış apoptoz testiküler spermatogenik işlevin bozukluğu ve infertiliteye yol açabilir (Baccetti, Collodel, & Piomboni, 1996).

Genetik bilginin gelecek kuşağa aktarılması, sperm DNA bütünlüğüne bağlıdır (Ahmad, Moinard, Esquerré-Lamare, Mieusset, & Bujan, 2012); (Brahem, Mehdi, Elghezal, & Saad, 2011b). Yüksek sperm DNA hasarında düşük doğurganlık oranları bildirilmiştir (Rakesh Sharma, Ahmad, Esteves, & Agarwal, 2016). Sperm DNA bütünlüğünün bozulmasında çeşitli etiyolojik faktörler sorumludur (Schulte, Ohl, Sigman, & Smith, 2010). Bu faktörlerin arasında (Şekil 2.7);

- sigara içimi, (Mahfouz et al., 2010)
- kemoterapi, (Said et al., 2005)

- lökositospermi, (Esteves et al., 2015)
- kanser, (Esteves et al., 2015)
- varikosel, (Mahfouz et al., 2010)
- obezite (Alshahrani et al., 2014)
- ileri yaş (Alshahrani et al., 2014) bulunmaktadır ve bunların sperm DNA kalitesini tehlikeye attığı gösterilmiştir. (Alshahrani et al., 2014)



Şekil 2.7 : Artan Sperm DNA Hasarı ile İlişkili Etiyolojik Faktörler (Pourmasumi et al., 2017).

Çalışmalar sperm DNA hasarının kendiliğinden gebelik kaybıyla ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Binbeşyüz kırk dokuz tedavi döngüsü (ICSI ve IVF) içeren 11 çalışmanın meta-analizinde sperm DNA hasarı ile birleştirilmiş gebelik kaybı ile istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bildirilmiştir. Bu meta-analizden elde edilen veriler, DNA hasarı derecesinin belirli bir eşiğinin klinik kullanımını doğrulamaktadır. Gebelik kayıplarının eşik değeri ise %10-37 arasında değişmektedir.

2.7. Spermatozoon DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri

Yaklaşık olarak infertil erkeklerin %15'i semen analizi parametrelerinin referans aralıkları içindedir. Bu nedenle, gözle görünen anomallileri ortaya çıkarmak her zaman mümkün olmamaktadır (Agarwal, Allamaneni, Nallella, George, & Mascha, 2005). Ayrıca, sayım, motilite ve morfoloji gibi klasik sperm parametreleri başarılı bir implantasyon ve gebelik için en iyi öngörücüler olmayabilmektedir (Zini, Bielecki, Phang, & Zenzes, 2001).

Sperm kromatin bütünlüğünün değerlendirilmesi, erkek infertilitesi için önemli bir belirteç olarak ortaya çıkmıştır (Spanò et al., 2000). Sperm DNA hasarı, açıklanamayan infertilite, idiyopatik infertilite, tekrarlanan intrauterin ve IVF başarısızlığı, tekrarlayan düşükler de dahil olmak üzere birçok infertilite fenotipiyle ilişkilendirilmiştir (Saleh et al., 2003) Fertil olanlara kıyasla infertil erkeklerin ejakülatındaki sperm DNA hasarı oranı yüksek olduğundan, spermdeki DNA hasarını tespit etmek için farklı testler geliştirilmiştir (Saleh et al., 2002). Bu testler, temellerindeki mekanizmalara bağlı olarak iki alt grupta toplanabilirler:

1. DNA fragmentasyonunun, harap olan bölgeye problemlerin inkorporasyonunu sağlayarak doğrudan ölçülmesine dayanan tekniklerdir. Problemlerden gelen floresan ışımalarla göre DNA dalı kırıkları kantitatif olarak belirlenmektedir. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) ve ISNT (in situ nick translation) teknikleri bu grup içerisindedirler.

2. Belirli koşullar altında fragmente olmuş DNA'nın kolaylıkla denatüre olma özelliğine göre ölçümlerin yapıldığı tekniklerdir. Çift dal DNAya göre, çentik açılmış DNA daha kolaylıkla denature olacağı için bu gruptaki teknikler DNA'nın denaturasyona yatkınlığını ölçmektedirler. Bu grup içerisinde DBD-FISH (DNA Breakage Detection-Fluorescent In Situ Hybridization), SCD (Sperm chromatin dispersion test), SCGE (Single cell gel electrophoresis) veya basit hücre jel elektroforezi olan COMET analizi, SCSA (Sperm chromatin structure assay), akrinin oran boyama teknikleri sayılabilir.

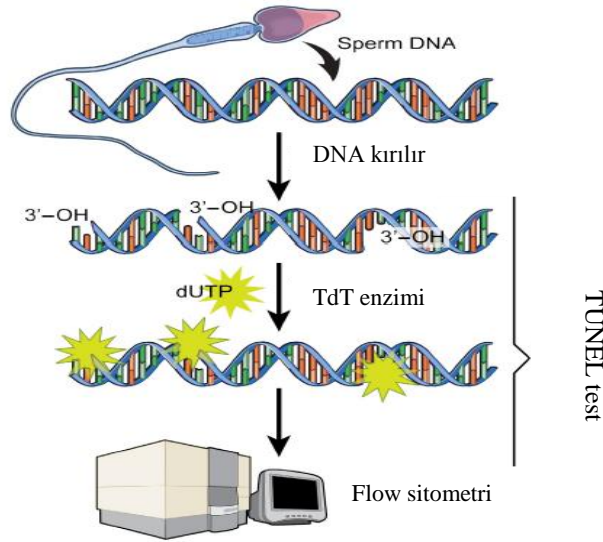
Testlerin her biri, sperm DNA hasarını değerlendirirken, DNA hasarının farklı yönlerini tespit etmektedirler. Sperm DNA hasarı için SCD ve SCSA yöntemleri indirekt testler iken COMET ve TUNEL direkt testlerdir (Bach & Schlegel, 2016).

Bu testler arasında terminal uridine nick-end labeling (TUNEL) testi ve sperm kromatin yapı testi (SCSA)(Bungum, Bungum, & Giwercman, 2011), klinik olarak anlamlı sperm DNA hasarının belirlenmesi için altın standart olmaya devam etmektedir (Sakkas & Alvarez, 2010). Aşağıda, bu testlerden kısaca bahsedilirken çalışmamızda kullanılan TUNEL testi detaylandırılacaktır.

2.7.1. TUNEL(TdT-mediated-dUTP nick end labeling) Test

Temel olarak apoptoz sırasında meydana gelen DNA parçalanmasını ölçmek için tasarlanmış bir yöntemdir. Normal spermatogenezin gelişimi ve kontrolü için programlanmış hücre ölümü gereklidir. Ancak ağır testiküler germ hücre apoptozu, yardımcı üreme tekniklerinden elde edilecek başarıyı düşürmektedir. TUNEL tekniği apoptotik olduğuna inanılan semendeki sperm popülasyonunun tanımlanması için ilk defa Gorczya ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır. Bu yöntemde DNA kırıklarının 3'OH ucuna, terminal deoksinükleotidiltransferaz (TdT) enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, biyotinlenmiş uridin trifosfat (dUTP) bağlanır. Biyotinlenmiş DNA streptavidin ile birleşerek suda çözünmeyen renkli bir ürün ortaya çıkarır. Hasar gören bölgede (5'-3' uç) modifiye edilmiş nükleotidlerin birleşmesini katalize ettiği için DNA hasarını direkt ölçen bir yöntemdir (Shamsi, Imam, & Dada, 2011).

TUNEL yöntemi ile sperm sayısı, motilitesi ve normal morfoloji yüzdesi arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu konudaki verilere göre, TUNEL sonuçlarının prediktif etkinliğinin yüksek olabileceği, IUI'daki gebelik oranı, IVF'deki embriyo kalitesi, ICSI'deki fertilizasyon oranı hakkında fikir verebileceği ve tekrarlayan gebelik kayıplarına bir açıklama getirebileceği düşünülmektedir (Henkel et al., 2010; Huerta, Goulet, Huerta-Yepeç, & Livingston, 2007).



Şekil 2.8. TUNEL Test ile Sperm DNA'sının boyanması ve flow sitometri yöntemiyle analizi (Selvam & Agarwal, 2018).

2.7.2. Sperm Kromatin Ayrılması (SCD,Halo Test)

Kromatin proteinlerinden yoksun olan intakt DNA'nın sperm nukleus çevresinde ilmek oluşturabilme becerisi prensibine dayanmaktadır. Bozulmamış DNA'ya sahip olanlar çekirdeğin etrafına dağıldığı için spermlerin çevresinde büyükçe bir halo gözlenirken, halonun bulunmaması veya çapının çok küçük olması fragmente olmuş DNA'yı göstermektedir (Fernández et al., 2005).

2.7.3. Sperm Kromatin Strüktür Analizi (SCSA)

Agarwal ve ark.SCSA testinin fragmente olmuş DNA'nın denatürasyona hassasiyetini ölçtüğünü belirtmişlerdir(Agarwal et al., 2016). Ayrıca, başka bir inceleme SCSA'nın bir asit denatürasyon basamağıyla başladığı ve anormal DNA'nın bozulmamış olanına oranla asit denatürasyonu ile daha fazla parçalanmaya yatkın olduğu ilkesine bağlı olduğunu belirtmiştir. SCSA testi aynı anda iki sperm nükleer parametresini ölçer: sperm DNA zincir fragmente indeksi (% DFI) ve kondanse olmamış kromatin (DNA boyanabilirliği)(Evenson, Jost, Corzett, & Balhorn, 2000). SCSA, fragmente olmamış DNA'larla karşılaştırıldığında fragmente olmuş DNA'lı spermleri ayırt etmek için akridin oranj ışması değişikliğine dayanır. Akridin oranj , çift DNA'ya (dsDNA) bağlandığında yeşil renkte floresanlanır, ancak tek zincirli (ssDNA) DNA'ya bağlandığında kırmızıya dönüşür. Sonuçta da flow sitometri, spermlerin yeşil ile kırmızı renkte floresan ışma arasındaki oranı ve parçalanmış DNA'lı sperm yüzdesini belirler (Evenson, 2013).

2.7.4. COMET testi (Basit Hücre Jel Elektroforezi)

COMET testi, tek bir sperm hücresi içindeki DNA hasar miktarını ölçmek için jel elektroforezine dayanır. Birincisi, sperm membranı lizise uğrar ve DNA, DNA ile ilişkili proteinlerinden ayrılmak için disülfür köprülerini parçalamaya yardımcı olan yüksek konsantrasyonlu bir tuz ortamında dekonpanse olur. Bir alkaline elektroforetik alanda, yüklü kırık DNA iplikçikleri katoda göç eder ve yüklenmemiş, kesintisiz DNA iplikçikleri geride bırakır. Oluşan görüntü kuyruklu yıldız andırır (Olive & Banáth, 2006). COMET'in baş kısmına DNA fragmentleri yoğunlaşırken, çift ve tek DNA zincirindeki kırıklar COMET'in kuyruğuna doğru uzama yapar. Spermatozoon DNA fragmentasyonunun tespiti alkali koşullarda, hem tek hem de çift zincir kırıklarını tespit edebildiğinden nötral koşullara göre daha üstündür. DNA'ya bağlanan floresan bir boya, floresan mikroskopu ile tahlilin görselleştirilmesini sağlamak için slaytlara uygulanır. COMET testi hem tek hem de çift sarmal DNA kopmalarını ve bozulmuş bazları algılayabilir ayrıca protamin ve histon ile ilişkili kromatin kopuşlarını da tespit edebilir. COMET testi bir bireyin DNA hasarının miktarını ölçtüğü için, COMET testi sonuçları, bireysel spermlere ait grupların ortalama hasarını temsil eder, güvenilir ve

tekrarlanabilir bir sonuç elde etmek için sadece 50 spermatozoaya gereksinim duyulur. Diğer testlerle karşılaştırıldığında, Comet testi basit ve gerçekleştirilmesi ucuzdur, ancak yorumu floresan mikroskopisine bağlıdır (Collins, 2004).

2.7.5. In Situ-Nick Translasyon (NT)Yöntemi

Yalnızca tek zincir kırıklarını tespit etmektedir. Biotinlenen deoksiuridin trifosfatın (dUTP), tek dal DNA kırıklarında yoğunlaşması prensibine dayanır.

2.7.6. DBD-FISH (DNA breakage detection-FISH) Yöntemi

Floresan in situ hibridizasyon, çoklu mikrodelesyon gibi kromozom anomalilerini saptamak için kullanılan bir metottur. Hücreler agaroz matrisle bir slayta gömüldüğünde denatüre edici bir alkali çözücü solusyonla parçalanır, tek zincirli DNA motifleri DNA zincir kırıklarına dönüşür. Nötralize edilir ve protein uzaklaştırılır, tek zincirli DNA, bütün genom ya da spesifik DNA problemleriyle hibridlenerek floresan ortamda incelenir (Fernandez et al., 2003)

2.7.7. Akridin Oranj (AO) Boyaması

Genel olarak Akridin oranj testi, SCSA'ya benzerdir, ancak DNA hasarlı ve sağlam sperm, Akridin oranj testinde floresan mikroskopunda subjektif olarak sınıflandırılır. Bozulmamış sperm yeşil floresan yaydığına, DNA hasarlı sperm kırmızı floresan yayar (Tejada, Mitchell, Norman, Marik, & Friedman, 1984). Spermatozoanın renklerine göre değerlendirilmesinden sonra, DNA hasarlı sperm oranı tespit edilir. AOT, SCSA'ya göre daha basit ve ucuz bir testtir. Ancak, sınırlı sayıda spermatozoanın değerlendirilmesi, floresan mikroskopu altında floresan emisyonlarının hızlı kaybı ve çıplak gözle yeşil ile kırmızı arasındaki floresan emisyonlarının sınırlı sınıflandırılması AOT'nin dezavantajlarıdır (Duran et al., 1998).

3- GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 - Gereç

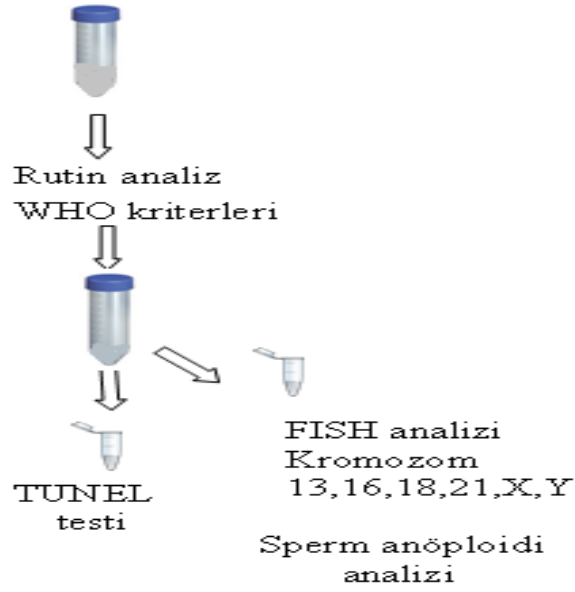
3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri

Bu araştırmaya, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na infertilite nedeni ile başvuran, Üroloji Anabilim Dalı'nda fizik muayenede varikosel, kriptorşidizm gibi infertiliteye neden olduğu bilinen klinik özellikleri olmayan, normal serum hormonal profile sahip olan, Üreme Sağlığı Merkezi Androloji Laboratuvarında yapılan semen analizleri sonrası non-normozoospermi tanısı alan 48 olgu ile klinik öykülerinde fertil olduğu bilinen normozoospermili 50 birey dahil edilmiştir. Çalışma, 27 Kasım 2014 günü ve 04 sayılı karar ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan "Etik Kurul Onayı" almıştır. Tüm olgular çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve düzenlenmiş olan onam formu taraflarınca imzalanmıştır.

Tüm olguların en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrası, mastürbasyon yöntemiyle ejakülat örnekleri, steril petri kapları içerisine alınmış ve rutin semen analizleri WHO (2010) kriterlerine göre Üniversitemiz Üreme Sağlığı Merkezi Androloji Laboratuvarında yapılmıştır. İnfertil grup ile kontrol grubunu oluşturan fertil bireyler; semen parametrelerine göre normozoospermili ve non- normozoospermili olarak iki gruba ayrılmışlardır.

Örnekler, 37 °C etüvde çözünme (likefaksiyon) sürecini tamamlaması için bırakılmışlar, süre sonunda en az 2 ml spermatozoid örneği hemen tüp içerisinde Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na iletilmişlerdir.

Alınan ejakülatlar sperm konsantrasyonlarına göre yıkama işlemlerine tabi tutulmuş, ardından DNA fragmentasyon testlerinden biri olan TUNEL testi ile sperm anöploidi oranını tespit etmek amacıyla uygulanan FISH analizleri için her bireye ilişkin örnek üç ayrı tüpe porsiyonlanmıştır. Fragmentasyon analizi sonuçlarının güvenilirliği ve sonuçları etkilememesi adına çalışma esnasında taze sperm örnekleri ile çalışılmış, likefaksiyon sonrası ortalama bir saat içinde örnekler deney aşamasına hazır hale getirilmişlerdir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Normozoospermik ve non-normozoospermik semen örneklerinden yapılan DNA fragmentasyon analizi ve anöploidi analizi algoritması

3.1.2. Kullanılan Gereçler

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan genel ve amaca yönelik cihazlar

Genel Lab Cihazları	TUNEL & FISH analizlerinde kullanılan cihazlar
Mikrosantrifüj	HyChrome (Euroclone) hibridizasyon cihazı
Vortex	Floresan mikroskop(Olympus BX-61)
Ph metre	FISH görüntüleme & analiz sistemi (Applied Imaging)
Mikrodalga fırın	
Elektronik terazi	
Etüv (37 ⁰ C)	
Su banyosu	
Buzdolabı (+4 ⁰ C)	
Derin dondurucu (-20 ⁰ C)	

3.1.3.Kullanılan kimyasal malzemeler

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan genel ve amaca yönelik kimyasal malzemeler

Kimyasallar	FISH problemleri/kimyasallar	TUNEL testi
Absolu alkol (Merck)	AneuVysion Multicolor DNA Probe Kit - CEP 18(18p11.1-q11.1)/CEPX (Xp11.1 q11.1)/ Y (Yp11.1-q11.1)	<i>In situ</i> cell death detection kit (Roche)
Metanol (Merck)	- LSI 13(13q14)/LSI 21(21q22.13-q22.2) (Vysis- Abbott Molecular) - CEP 16 (16q11.2 Satellite II DNA) (Vysis- Abbott Molecular)	DNAs
Asetik asit (Merck)	NP40	
DAPI (Sigma)	Vectashield Mounting Medium (Vector)	
DTT (dithiothreitol -Sigma)	Rubber Cement (Marabu Fixo Gum)	
HCl (Merck)		
LIS (Sigma)		
Sitrik asit (Sigma)		
Tris (Merck)		
NaCl (Merck)		
İmmersiyon yağı (Merck)		

3.2 - Yöntem

3.2.1. Sperm FISH Analizi ile Anöploidi Tayini

3.2.1.1. Örneklerin FISH analizine hazırlanması:

1. Elde edilen spermler 15 ml lik Falcon tüplere alınmış, 10 cc fosfat buffer solüsyon ile yıkanarak 1100 rpm de 10 dakika santrifüj edilmişlerdir.
2. Süpernatant, pastör pipetleri yardımıyla uzaklaştırılmıştır.
3. Pellet üzerine 10 cc 0.75 M KCl çözeltisi (hipotonik) eklenmiş ve 37 °C lik etüvde 20 dakika bekletilmişlerdir.
4. Süre sonunda örnekler 1100 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır.

5. Pellet üzerine taze hazırlanmış 10 cc Carnoy fiksatif (3:1 metanol/asetik asit, Merck) damla damla eklenerek tüpler 30 dak. süre ile +4 °C de buzdolabında bekletilmişlerdir.

6. Süre sonunda 1100 rpm de 10 dakika santrifüj edilen tüplerden süpernatant uzaklaştırılmış, pellet üzerine 10 cc taze fiksatif eklenerek yıkama işlemi tekrarlanmıştır.

7. Fiksatif muamelesi bir kez daha tekrarlanmış ve süpernatant alınması sonrası taze fiksatif solusyonu eklenerek örnekler çalışması yapılacak zamana kadar -18 °C de bekletilmişlerdir.

3.2.1.2. Sperm FISH analizi preparat hazırlığı :

1. Fiksatifte bekleyen spermatozoidler 1100 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atılarak, pellet taze hazırlanmış fiksatif ile yıkanmışlardır.

2. Süre sonunda örnekler 1100 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve pelletler homojenize edilmişlerdir.

3. Önceden temizlenmiş ve – 18 °C de bekletilen lamlar üzerine birer damla sperm süspansiyonu damlatılmıştır. Spermatozoid yoğunluğu ve lam üzerindeki dağılımı yöntem için önemli olması nedeniyle faz-kontrast mikroskopunda yayma kalitesi kontrol edilmiştir.

4. Lamlar kurutulduktan sonra 37 °C de, 2xSSC solüsyonunda 30 dakika bekletilmişlerdir.

5. Süre sonunda 2xSSC solüsyonundan çıkan preparatlar distile su ile yıkanmışlardır.

6. Preparatlar, sperm kromatinin açılması için 25 mmol/L dithiothreitol (DTT) içeren 1 mol/L Tris-HCl (pH9,5) çözeltisi ve ardından 20mM LIS (3,5 diiodosalicylic acid lithium salt) içeren buffer solusyonunda içinde 5 dakika bekletilmişlerdir. DTT, spermatozoid nükleusunda kompakt halde olan protamine zengin kromatin yapısındaki disülfid bağların kırılması ve kromatinin açılması, dolayısıyla FISH analizinin gerçekleştirilebilmesi için çok önemli bir aşamadır (Sarrate & Anton, 2009).

7. Süre sonunda lamlar 2xSSC de 5 dakika bekletilmişler, ardından % 70, % 85 ve % 100 lük alkol serilerinden üçer dakikalık sürelerle geçirilerek oda ısısında kurumaya bırakılmışlardır.

3.2.1.3. Preperat/Prob denatürasyonu ve hibridizasyon ;

1. Kuruyan lamlar üç bölgeye bölünmüşlerdir. Çalışmamızda Aneuvysion (Vysis) prob seti ve kromozom 16 satelit probu kullanılmıştır. Prob setinde kromozom 13& 21 spesifik problemler farklı florokromlarla işaretli olarak birlikte, kromozom 18, X ve Y de yine farklı florokromlarla işaretli olarak (Sp. Green, Sp.Red ve Sp.Aqua) birlikte bulunmaktadır. Her prob karışımından 8 µl işaretlenen preperat bölgesine damlatılarak lameller kapatılmış ve yalıtılmışlardır.

2. Preperatlar, Hybrite cihazına yerleştirilerek, 73 °C 5 dakika süreyle sperm DNA/prob denatürasyonu yapılmış ve tüm gece boyunca 37 °C de nemli ortamda hibridizasyon aşaması gerçekleştirilmiştir.

3. Ertesi gün lameller, preperat üzerinden uzaklaştırılarak hibridizasyon sonrası yıkama aşamaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.1.4. Hibridizasyon sonrası yıkamalar;

1. İlk olarak preperatlar; 73 °C' de %0,3 lük NP40 içeren 0,4xSSC çözeltisinde 5 dakika süreyle yıkanmışlardır.

2. Süre sonunda preperatlar oda sıcaklığında olan % 0,1 ' lik NP40 deterjan içeren 2xSSC çözeltisi içinde 30 dakika yıkanmışlar, distile sudan geçirilerek karanlık ortamda kurumaya bırakılmışlardır.

3. Kuruyan preperatlar DAPI solusyonunda boyanmışlar ve Vectashield (mounting medium) damlatılarak üzerlerine lamel kapatılarak mikroskopta analiz aşamasına kadar -20°C de saklanmışlardır.

3.2.1.5. Sperm FISH mikroskop analizi

Preperatlar Olympus BX61 Floresan mikroskopunda, kullanılan problemlerin işaretli oldukları florokromlara spesifik filtreler kullanılarak analiz edilmişlerdir.

Her olgu için prob başına 500 sperm nükleusu değerlendirilmiştir. Floresan mikroskoba bağlı FISH görüntüleme & analiz sistemi (Applied Imaging) aracılığıyla sinyaller analiz edilmiş ve görüntülenmişlerdir. Genel hibridizasyon etkinliği >%99'du. Sperm nükleuslarında intakt, birbirleriyle üst üste gelmeyen, sperm başı içerisinde olan prob spesifik sinyaller değerlendirmeye alınmışlardır.

Spermatozoada her proba spesifik birer floresan spot görüntülenmesi normal spermatozoa olarak değerlendirilmiştir. Spermatozoada aynı renkte iki floresan spot var ve boyut, sinyal şiddeti ve şekil açısından birbirleriyle aynı ise dizomik olarak sayılmışlardır. Her analiz edilen kromozom için 2 sinyali olan spermatozoalar ise diploid olarak yorumlanmışlardır.

3.2.2. TUNEL Testi

Bu çalışmada TUNEL teknolojisine yanı hücre bazında DNA dalı kırıklarının işaretlenmesine dayanan test için *in situ* hücre ölümü deteksiyon kiti (Roche) kullanılmıştır. Üretici firmanın önerdiği ve laboratuvarında modifiye edilen protokol aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir:

3.2.2.1. Kullanılan solusyonların hazırlanması

1. Yıkama Solusyonu (Fosfat tampon solusyonu =PBS)

1 lt PBS hazırlamak için (10×PBS PH=7.4);

- 55 gr Na_2HPO_4

- 13.5 gr NaH_2P

- 117 gr NaCl 800 ml distile suda çözdürülmüş, pH:7.4 için

NaOH/HCl ile çözelti 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

2. Fiksatif Solusyonu (PBS içinde % 4'lük paraformaldehit çözeltisi)

- 2 gr Paraformaldehit (PFA)

- 40 ml PBS

- 100 ml 5N NaOH karıştırılıp 56° ' lik su banyosu içerisinde PFA

tümüyle eriyinceye, karışımın rengi berraklaşınca kadar karıştırılmıştır.

pH:7.4 5N HCl aracılığıyla ayarlanmış ve çözelti PBS eklenerek 50 ml'ye

tamamlanmıştır.

3. Geçirgenlik (Permeabilize) Solusyonu:

- %0.1 sodyum sitrat içinde %0.1 Triton X-100 hazırlamak için

- 9.9 gr sodyum sitrat, 99 ml PBS içinde çözdürülmüş ve 1 ml

Triton X-100 eklenmiştir (pH=7.4).

3.2.2.2. TUNEL test aşamaları

1. En fazla 1 saat etüvde bekletilmiş olan ejakülat içindeki spermatozoidlerden 1 ml alınarak 15 cc 'lik tüpe aktarılmış, üzerine 10 cc PBS eklenmiştir.
2. Tüpler 1100 rpm de 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.
3. 1 ve 2 nolu işlemler tekrarlanmıştır.
4. Tüp dibinde bulunan pellet 0,5 cc PBS ile dilüye edilmiş ve v- biçimli 96 kuyucuklu mikrotabakaya 100 µl karışım aktarılmıştır.
5. Pelletten pastör pipeti yardımıyla birer damla hücre süspansiyonu alınıp polilizin kaplı lam üzerine yayılmış ve lamlar cam şale içerisinde bulunan fiksatif solusyonunda +4 °C 'de 25 dk. bekletilmişlerdir.
6. Süre sonunda preparatlar PBS içinde 5 dk. yıkanmışlardır.
7. Daha sonra, preparatlar hücrelerin geçirgenliğini sağlayan solusyon ile 5 dk. muamele edilmişlerdir.
8. Preparatlar PBS içinde 5'er dakika süreyle iki kez yıkanmışlar ve oda ısısında kurumaya bırakılmışlardır.
9. TUNEL kiti içerisinde bulunan enzim solüsyonundan 5 µl ve etiketleme solüsyonundan 45 µl ile hazırlanan karışımdan her preparata 25µl damlatılıp üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde lamel kapatılmış, karanlık ortamda 37 °C'de 1 saat inkübe edilmişlerdir.
10. Süre sonunda preparat üzerindeki lameller kaldırılıp preparatlar PBS ile yıkanmışlardır.
11. Daha sonra nükleusların görünmesi amacıyla preparatlar 5 dk.süreyle DAPI nükleus boyası ile boyanmış ve üzerlerine lamel kapatılarak mikroskopta analize hazır hale getirilmişlerdir.

3.2.2.3. Floresan mikroskop analizi

Mikroskopun x100'lük objektifinde her örnekten en az 300 spermatozoa 2'şer kez tekrar sayılarak DNA fragmentasyonu (açık yeşil renkte) olan hücreler 'TUNEL pozitif' olarak kaydedilmiş ve fotoğraflanmıştır. Her preparatta, fragmente DNA indeksi (DFI) oranı hesaplanmıştır.

3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi IBM SPSS 21 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile araştırılmıştır. Değişkenlere ait özet istatistikler nicel verilerde ortalama \pm standart sapma ya da medyan (Q1-Q3) olarak, nitel değişkenlerde ise frekans ve yüzde olarak gösterilmiştir. Normal dağılıma uymayan iki bağımsız grup karşılaştırması için Mannn Whitney U testi kullanılmıştır. İki'den fazla bağımsız grup karşılaştırmalarında normal dağılıma uygunluk gösterenler tek yönlü varyans analizi (ANOVA), göstermeyenler ise Kruskal Wallis H testi ile değerlendirilmiştir. Anlamli fark bulunan Varyans analizi sonuçlarında homojen varyanslı gruplar Tukey, homojen varyanslı olmayan gruplar ise Games Howel ikili karşılaştırma testi ile incelenmiştir. Anlamli fark bulunan Kruskal Wallis karşılaştırma sonucunda Dunn's testi ile ikili olarak gruplar karşılaştırılmıştır. Değişkenler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile incelenmiştir. Hasta kontrol ayırımını sağlayan markerlerin değerlendirilmesi ise ROC analizi ile yapılmıştır. $p < 0.05$ olarak bulunan sonuçlar anlamli kabul edilmiştir.

4- BULGULAR

Bu çalışmaya, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na infertilite nedeni ile başvuran ve Üniversitemiz Üreme Sağlığı Merkezi Androloji Laboratuvarında yapılan semen analizleri sonrası non-normozoospermi tanısı alan 48 olgu ile klinik öykülerinde fertil olduğu bilinen normozoospermik 50 birey dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen olgu/kontrol grubu bireylerin sperm analiz verileri ile spermatozoa anöploidi ve DNA fragmentasyon analiz verileri aşağıda ayrı ayrı verilmiştir.

4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Olguların Özellikleri

Bu çalışmaya 50 normozoospermik, fertil (kontrol) ve 48 non-normozoospermik, infertil (araştırma) bireyler dahil edilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan normozoospermik bireylerin ortalama yaşı 32.42 ± 6.0 , infertil olan araştırma grubu olgularının ise 33.72 ± 5.7 olarak saptanmıştır.

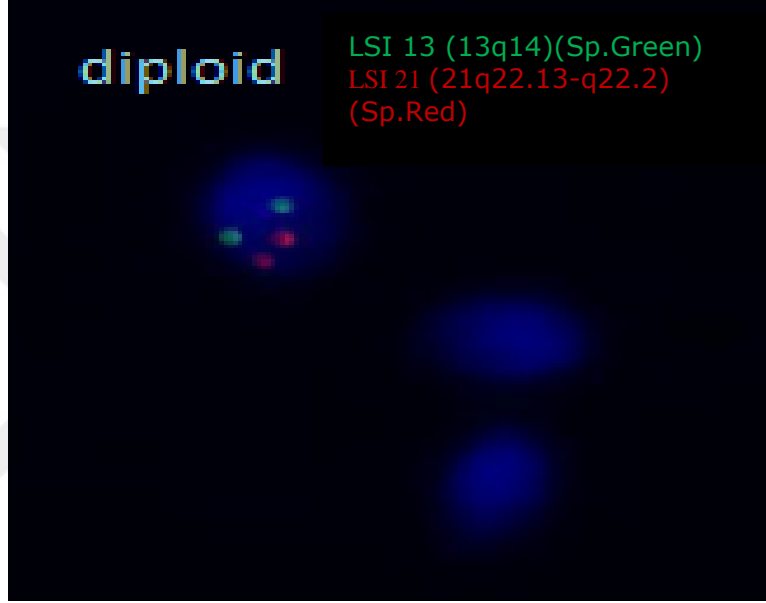
Çalışmanın araştırma grubunu oluşturan non-normozoospermik olgulardan 12 tanesi teratozoospermi, 10 tanesi oligoteratozoospermi, 8 tanesi oligozoospermi, 11 tanesi astenozoospermi ve 7 tanesi de hipospermi idi. Sperm konsantrasyonu, genel sperm motilite ve normal spermatozoa görünüm yüzdeleri kontrol grubu bireylerinin değerleri ile karşılaştırıldığında araştırma grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışma gruplarının konsantrasyon, motilite , normal spermatozoa değerlerinin karşılaştırılması

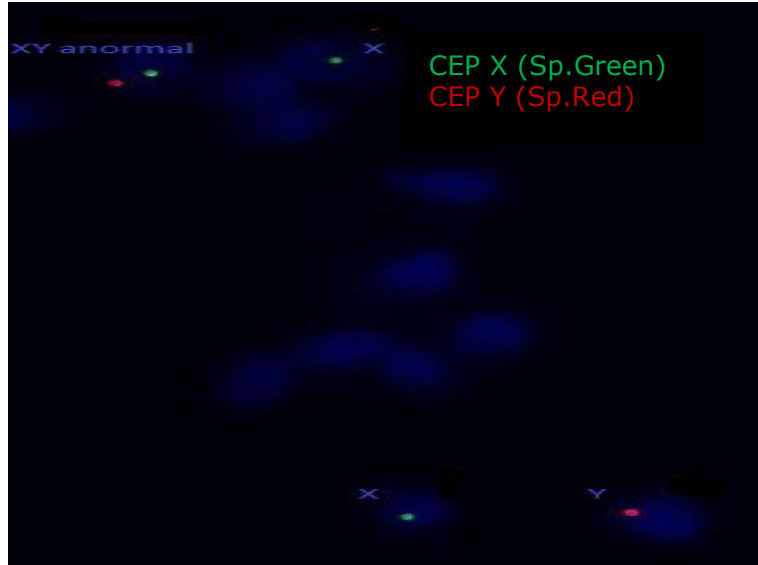
Özellikler	Kontrol (N=50)	Hasta (N=48)	P
Sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$ spermatozoa/ml, median, range)	59.5(38.5-79.75)	11.5(6-58)	$p < 0.001$
Genel, sperm motilite (% , ort \pm SD)	77(67-85.25)	57.5(50-75.75)	$p < 0.001$
Normal spermatozoa (% , median, range)	68.5(58.75-75.5)	53(33-71)	$p = 0.001$

4.2. FISH Analizi ile Saptanan Sperm Kromozom Anöploidileri

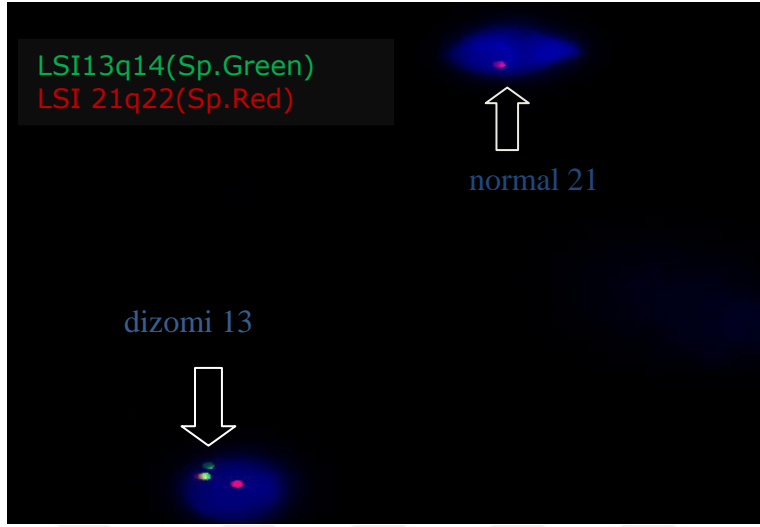
Çalışmamızda, kromozom 13, 16, 18, 21, X ve Y'ye spesifik problar araştırma ve kontrol grubu sperm nukleuslarına uygulanmış ve spermatozoalardaki floresan fenotipler; normal oositlerin fertilizasyonunda canlı konsepsiyonların oluşmasında anahtar rol oynayan anöploidik ve/veya poliploidik özellikler açısından şekil 1 , şekil 2, şekil 3 ve şekil 4'te olduğu gibi değerlendirilmiştir.



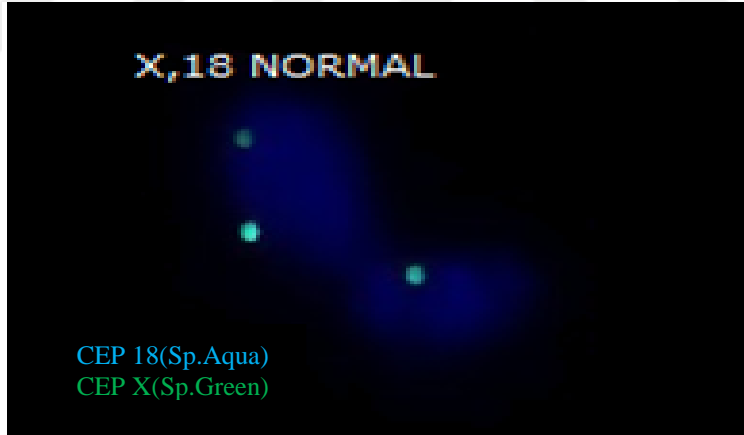
Şekil 4.1. Olgu 5'e ait diploid spermatozoa FISH görüntüsü (LSI 13 yeşil sinyal, LSI 21 kırmızı sinyal)(Vysis,Abbott Molecular)



Şekil 4.2. Olgu 3'e ait XY dizomili spermatozoa FISH görüntüsü (CEP X yeşil sinyal, CEP Y kırmızı sinyal)(Vysis,Abbott Molecular)



Şekil 4.3. Olgu 6'ya ait kromozom 13 dizomisi ve normal 21'li spermatozoa FISH görüntüsü (LSI 13 yeşil sinyal, LSI 21 kırmızı sinyal)(Vysis,Abbott Molecular)



Şekil 4.4. Olgu 8'e ait kromozom normal 18 ve X spermatozoa FISH görüntüsü (CEP 18 mavi sinyal, CEP X yeşil sinyal) (Vysis, Abbott Molecular)

Normozoospermik ve non-normozoospermik sperm nukleuslarında saptanan kromozom anöploidi frekansları Tablo 4.2. de özetlenmiştir. Çizelge 4.2.de de görüldüğü üzere tüm kromozomlar için anormal FISH oranı, kontrol grubuna göre infertil olan non-normozoospermik grupta anlamlı oranda yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.2. Araştırma ve kontrol grubu spermatozoa örneklerinde kromozom anöploidi sıklıkları

Anomaliler	Gruplar	Medyan (%25-75)	TEST SONUÇLARI(p)
Dizomi 13	Non-normozoospermi	5.0 (3.0-9.0)	p<0.001
	Normozoospermi	2.0 (0-3.0)	
Dizomi 16	Non-normozoospermi	4.0 (2.0-8.25)	p<0.001
	Normozoospermi	0(0-2.0)	
Dizomi 18	Non-normozoospermi	4,0 (1.5-8.5)	p<0.001
	Normozoospermi	1.0 (0-30)	
Dizomi 21	Non-normozoospermi	4.0 (1.75-9.0)	p<0.001
	Normozoospermi	2.0 (0-2.0)	
XY	Non-normozoospermi	4.0 (0-8.0)	p=0.002
	Normozoospermi	1.5 (0-2.25)	
XX	Non-normozoospermi	2.0 (0-8.0)	p=0.006
	Normozoospermi	0 (0-2.0)	
YY	Non-normozoospermi	0 (0-2.0)	p=0.040
	Normozoospermi	0 (0-1.0)	
Diploidi	Non-normozoospermi	2.0 (0-4.25)	p=0.000
	Normozoospermi	0 (0-1.0)	

Non-normozoospermik olguların alt gruplarında saptanan FISH anomalileri birbirleriyle karşılaştırıldığında dizomi 13'ün astenozoospermi ve teratozoospermi grupları arasında anlamlı farklılık gösterdiği, teratozoospermi grubunda dizomi 13 sıklığının daha yüksek olduğu (p<0.05) saptanmıştır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Normozoospermik olmayan olguların spermatozoalarında saptanan anöploidilerin ve diploidinin hasta alt gruplarındaki dağılımları

	Hasta alt grupları	Medyan (25-75)	p değerleri
dizomi13	Astenozoospermi	3(2-4.75)	0.012
	Teratozoospermi	8(5-13.5)	
	Oligoteratozoospermi	6(4-9)	
	Hipospermi	4(1.5-7.25)	
	Oligozoospermi	7.5(5-10.75)	
dizomi18	Astenozoospermi	2(0-4)	0.468
	Teratozoospermi	6(2-9)	
	Oligoteratozoospermi	5(0-8)	
	Hipospermi	3(1.5-6)	
	Oligozoospermi	4.5(3-7)	
dizomi21	Astenozoospermi	2(2-5.25)	0.213
	Teratozoospermi	5(1.5-14)	
	Oligoteratozoospermi	4(0-8)	
	Hipospermi	3(0.75-4.25)	
	Oligozoospermi	8(2.25-12.5)	
dizomi16	Astenozoospermi	5(3-5.5)	0.282
	Teratozoospermi	5(2-15)	
	Oligoteratozoospermi	4(3-8)	
	Hipospermi	2(0-4.25)	
	Oligozoospermi	8.5(2.25-13.25)	
XY	Astenozoospermi	2(0-7)	0.067
	Teratozoospermi	6(3-10.5)	
	Oligoteratozoospermi	4(2-8)	
	Hipospermi	0(0-4.25)	
	Oligozoospermi	4(0-8.5)	
YY	Astenozoospermi	0(0-2)	0.299
	Teratozoospermi	1(0-2)	
	Oligoteratozoospermi	2(0-3)	
	Hipospermi	0(0-2.75)	
	Oligozoospermi	0(0-0)	
Diploidi	Astenozoospermi	2(0.25-4)	0.799
	Teratozoospermi	0(0-11)	
	Oligoteratozoospermi	0(0-5)	
	Hipospermi	3.5(1.75-4.25)	
	Oligozoospermi	2.5(0-3)	

4.3.Olguların TUNEL testi ile Değerlendirilen Fragmentasyon Oranları

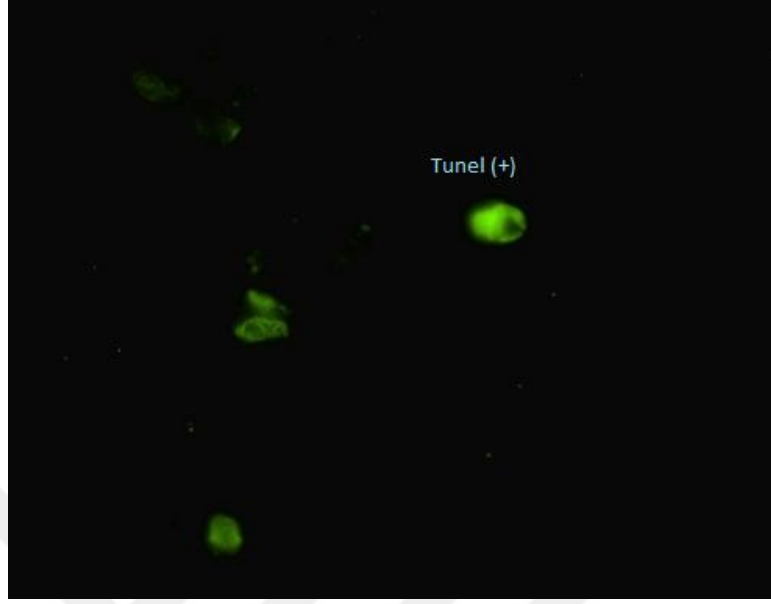
Çalışmamızda değerlendirdiğimiz TUNEL DNA fragmentasyon testinde, her örnekte en az 300 nukleus sayılarak floresan ışına veren parlak nukleuslar DNA fragmentasyonu pozitif, parlak ışına vermeyen, normal boya alan nukleusla ise DNA fragmentasyonu olmayan spermatozoalar olarak yorumlanmıştır (Şekil 4.5, Şekil 4.6). Her örnek için fragmentasyon yüzdesi hesaplanmıştır (Tablo 4.4).

TUNEL testi pozitif spermatozoa medyan değerlerinde, non-normozoospermik olgu grubunda istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde farklılık saptanmıştır. İnfertil olan grupta DNA fragmentasyonu pozitif nukleus oranı anlamlı düzeyde artmaktadır.

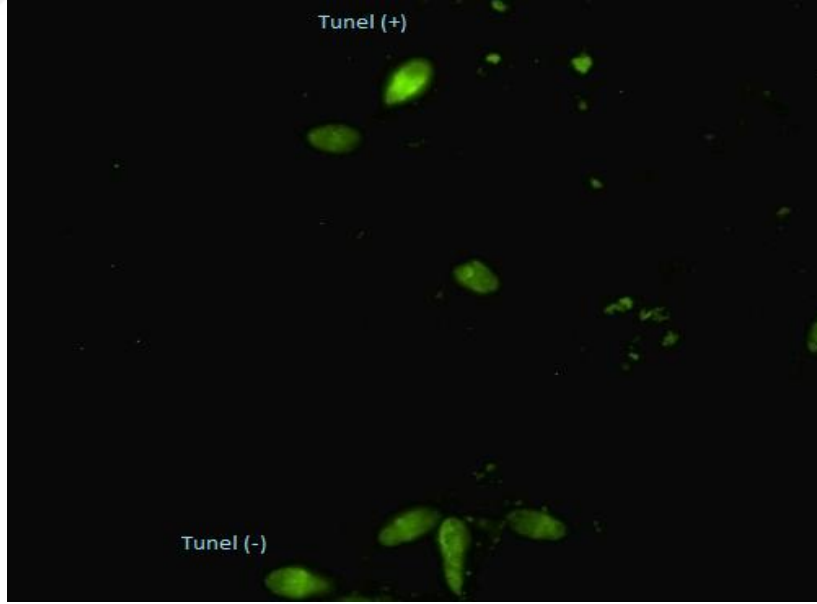
Araştırma grubu örnekleri, kendi içlerinde alt gruplara göre ayrıca değerlendirildiğinde (Tablo 4.5) istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiş olup özellikle oligoteratozoospermik ($p=0,035$) ve hipospermik ($p=0,035$) gruplarda anlamlı derecede farklılık gözlenmiştir.

Tablo 4.4. Normozoospermik ve non-normozoospermik gruplar arasında TUNEL pozitif (Fragmente DNA'sı olan) spermatozoa sıklıkları

	Gruplar	Mean (Ortalama Değerler)	P -değeri*
TUNEL	Non-normozoospermi	28.65 (22.4-39.47)	P<0.001
	Normozoospermi	14.85 (10.13-22.13)	



Şekil 4.5. Normozoospermik olmayan örneklerde fragmente (ışına yapmış) olan spermatozoa görüntüsü



Şekil 4.6. Normozoospermik olmayan örneklerde fragmente olmayan (ışına yapmamış) spermatozoa görüntüsü

Tablo 4.5. TUNEL test ile non-normozoospermik örneklerin kıyaslanması

	Hasta grupları	N	Mean(Ortalama Değerler)	Standart sapma	P-değeri
TUNEL TEST	Teratozoospermi	13	37.7	3.98	p=0.004
	Oligoteratozoospermi	11	40.06	3.98	
	Oligozoospermi	8	25.7	2.92	
	Hipospermi	6	25.1	1.96	
	Astenozoospermi	12	26.06	2.17	

Tablo 4.6'de araştırma ve kontrol gruplarında TUNEL testi ile saptanan DNA fragmentasyon oranı ile otozomal/seks kromozomal anöplidiler ile diploidi sıklığı arasındaki ilişki verilmiştir. Görüldüğü gibi, otozomal/X ve Y dizomileri ile DNA fragmentasyonu arasında istatistiksel olarak orta düzeyde ilişki saptanmıştır.

Tablo 4.7'da ise her iki grupta saptanan TUNEL pozitif nukleus ile otozomal/seks kromozomal anöplid ve nukleus diploidi değerleri arasındaki korelasyon katsayıları verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi, TUNEL testi ile otozomal anöplidiler arasında bir bağlantı dikkati çekmektedir. Her ne kadar dizomi 21'e ilişkin anlamlı düzeyde bağlantı gözlenmemiş olsa dahi kromozom 13, 16 ve 18 dizomileri ile TUNEL korelasyon katsayıları istatistiksel olarak orta düzeyde ilişkilidir. Bu bulgular, DNA fragmentasyonu ile otozomal anöplid ilişkisini destekler niteliktedir.

Tablo 4.6. Araştırma ve kontrol grubu örneklerinde TUNEL testi ile anöploidi/diploidi sıklıklarının karşılaştırılması

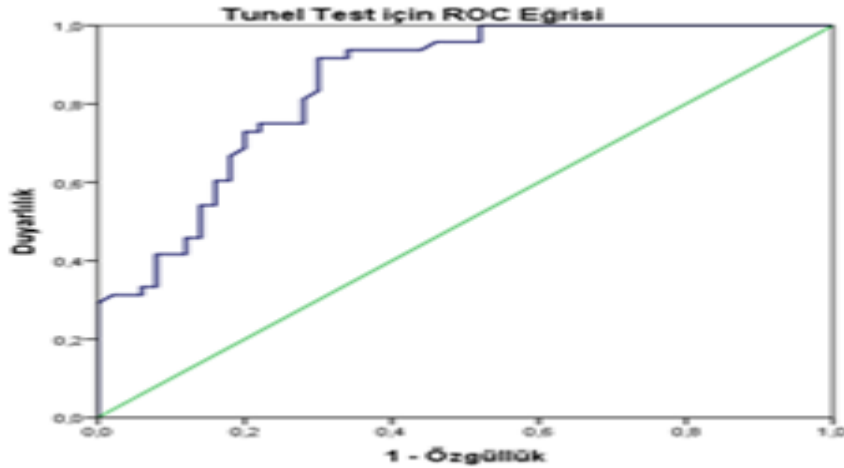
Anomaliler	Gruplar	Medyan (%25-75)	P değerleri
Dizomi 13	Non-normozoospermi	5.0 (3.0-9.0)	p<0.001
	Normozoospermi	2.0 (0-3.0)	
Dizomi 16	Non-normozoospermi	4.0 (2.0-8.25)	p<0.001
	Normozoospermi	0(0-2.0)	
Dizomi 18	Non-normozoospermi	1.0 (0-3.0)	p<0.001
	Normozoospermi	4.0 (1.5-8.5)	
Dizomi 21	Non-normozoospermi	4.0 (1.75-9.0)	p<0.001
	Normozoospermi	2.0 (0-2.0)	
XY	Non-normozoospermi	4.0 (0-8.0)	p=0.002
	Normozoospermi	1.5 (0-2.25)	
XX	Non-normozoospermi	2.0 (0-8.0)	p=0.006
	Normozoospermi	0 (0-2.0)	
YY	Non-normozoospermi	0 (0-2.0)	p=0.040
	Normozoospermi	0 (0-1.0)	
Diploidi	Non-normozoospermi	2.0 (0-4.25)	p<0.001
	Normozoospermi	0 (0-1.0)	
Tunel	Non-normozoospermi	28.65(22.4-39.47)	p<0.001
	Normozoospermi	14.85(10.13-22.13)	

Tablo 4.7. Araştırma ve kontrol gruplarında saptanan TUNEL testi ve FISH analizi verilerinin korelasyonları

	dizomi 13	dizomi 18	dizomi 21	dizomi 16	XY	XX	YY	diploidi	TUNEL
dizomi 13	1.000	0.442**	0.543**	0.484**	0.266**	0.410**	196	0.426**	0.372**
dizomi 18	0.442**	1.000	0.353**	0.422**	0.436**	0.354**	0.242*	0.262**	0.336**
dizomi 21	0.543**	0.353**	1.000	0.379**	0.336**	0.429**	113	0.332**	163
dizomi 16	0.484**	0.422**	0.379**	1.000	0.448**	0.493**	0.418**	194	0.375**
XY	0.266**	0.436**	0.336**	0.448**	1.000	0.565**	0.329**	147	0.259*
XX	0.410**	0.354**	0.429**	0.493**	0.565**	1.000	0.459**	0.236*	157
YY	196	0.242*	113	0.418**	0.329**	0.459**	1,000	0.204*	128
DİPLOİDİ	0.426**	0.262**	0.332**	194	147	0.236*	0.204*	1.000	0.369**
TUNEL	0.372**	0.336**	163	0.375**	0.259*	157	128	0.369**	1.000

* $r = 0.2-0.4$ arasında ise korelasyon zayıf , ** $0.41-0.6$ arasında ise orta derecede korelasyon

TUNEL testinin hastaları belirlemedeki duyarlılığı %91,67 olup (Şekil 4.7.) ROC eğrisi %70 oranında kontrol grubuna ait bireyleri gösterebilmiştir. Verilere bağlı olarak TUNEL testi DNA fragmentasyon değerlendirmesinde kullanılabilir bir testtir.



Şekil 4.7. DNA fragmentasyon değerlendirmesi için kullanılan TUNEL testine ilişkin ROC Eğrisi analizi

5- TARTIŞMA

Bu çalışmada, non-normozoospermik infertil tanısı alan olgulardan alınan semen örneklerinden elde edilen spermatozoalarda otozomal/cinsiyet kromozomları anöploidileri ile diploidi durumları kromozomlara spesifik FISH problemleri aracılığıyla incelenmiş, kontrol grubunu oluşturan fertil olgu örneklerindeki oranlarla karşılaştırılmıştır. Ayrıca infertilite ve DNA fragmentasyon arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi için TUNEL testi değerleri duyarlılık açısından değerlendirilmiş, araştırma ve kontrol grupları arasında fragmente DNA içeren spermatozoaların kromozom anöploidileri ile korelasyonları da değerlendirilmiştir. Tüm veriler, Bulgular bölümünde belirtilen sıra doğrultusunda tartışılmıştır.

5.1. FISH analizi ile saptanan Sperm Kromozom Anöploidileriyle Literatür bilgilerinin karşılaştırılması

Anöploidiler bir kromozomun eksikliği veya fazlalığı ile ortaya çıkan sayısal kromozom anomali çeşididir. Ağır klinik özellikli bireylere sahip durumların oluşması veya ölüdoğum oluşumundan, spontan abortustan sorumludurlar. Anöploid zigotlar sıklıkla sırasıyla 13,18 ve 21.kromozomlara ait otozomal anöploidiler yada cinsiyet kromozomu anomalilerinden oluşurlar. Normal somatik kromozom kuruluşuna sahip erkeklerin spermatozoalarında %1 ile %17 aralığında dizominin olduğu yardımcı üreme tekniklerinin belirlediği verilerle ortaya koyulmuştur (Abruzzo & Hassold, 1995; Shi & Martin, 2000). Cinsiyet kromozomu anöploidilerinin %80 kadarı paternal orjinli olurken, otozomal anöploidilerin büyük bir kısmı maternal orjinlidir (Nagaoka, Hassold, & Hunt, 2012). Her ne kadar sağlıklı ve fertil erkeklerde anöploid spermatozoa gözleniyor olsa da, infertil erkeklerin spermatozoalarında fertil bireylere göre anöploidi oranı çok daha yüksektir (You et al., 2014). Petousis ve ark. da (Petousis et al., 2018) infertil non-normozoospermik hasta grubu spermatozoalarında kromozom anöploidi oranının, kontrol grubuna göre anlamlı oranda artış gösterdiğini bildirmişlerdir. Bir çalışmada sperm anöploidi riski en yüksek olan erkekler, dengeli yapısal kromozom anomalisi taşıyıcısı olanlar ile şiddetli anormal sperm morfolojisi ve non-obstrüktif azoospermi olan kişilerin olduğu bildirilmiştir (Medicine, 2015). Çalışmamızda da aynı şekilde fertil, normozoospermik gruba göre infertil olan araştırma grubunda tüm anöploidi oranlarının anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ki bu bulgumuz literatür ile uyumluluk göstermektedir.

Oligozoospermik ve normozoospermik gruplar arasında cinsiyet kromozomlarının (XY, XX ve YY) dizomi frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptandığı ve yine orta ve şiddetli oligozoospermikli hasta grubunda 13,18,21 dizomilerinin normozoospermik gruba göre anlamlı derecede daha yüksek frekanslara sahip olduğu önceki çalışmamızda tespit edilmiştir. (Durak Aras et al., 2012). Diğer taraftan, yayınlanan son

çalışmada; astenozoospermi, oligozoospermi ve teratozoosperminin anormal FISH bulguları ile ilişkisi bildirilmiştir (Petousis et al., 2018). Çalışmamızda, non-normozoospermik örnekler, spermogram özelliklerine göre 5 alt grupta FISH anomalileri açısından birbirleriyle karşılaştırılmışlardır. Özellikle dizomi 13'ün astenozoospermi ve teratozoospermi grupları arasında anlamlı farklılık gösterdiği, teratozoospermi grubunda dizomi 13 sıklığının daha yüksek olduğu dikkati çekmiştir. Diğer kromozom anöploidilerin alt gruplara göre dağılımlarında anlamlı bir birikmenin saptanamaması hasta gruplarının sınırlı oluşuna bağlanabilir.

5.2. Olguların TUNEL testi ile Değerlendirilen Fragmentasyon Oranları ile Literatür bilgilerinin karşılaştırılması

Çalışmamızda DNA fragmentasyonunun incelendiği TUNEL testinde DFI değerleri; araştırma grubunda 28.65, kontrol grubunda ise 14.85 olarak belirlenmiştir. Görüldüğü üzere araştırma grubu olgularında anlamlı düzeyde yüksek DNA fragmentasyonu saptanmıştır. Bu veri, literatür ile de uyumludur. Ancak, hasta grubu olgularının alt grupları arasında yapılan karşılaştırmalarda, sırasıyla oligoteratozoospermi ve teratozoospermi gruplarında TUNEL pozitif oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu farklılığın sınırlı olgu sayılarının yöntemlerin duyarlılıklarına etkisi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Son yıllarda, Ribas-Maynou ve ark. tarafından 50 fertil/190 infertil olguda gerçekleştirilen DNA fragmentasyon testlerinin (TUNEL, SCSA, SCD, alkalın ve nötral COMET assay) duyarlılıkları açısından birbirleriyle karşılaştırıldıkları kapsamlı çalışmada; duyarlılık ve özgüllük açısından alkalın COMET assayin en duyarlı yöntem olduğu, bunu TUNEL, SCD ve SCSA yöntemlerinin takip ettiği bildirilmiştir (Ribas-Maynou et al., 2013).

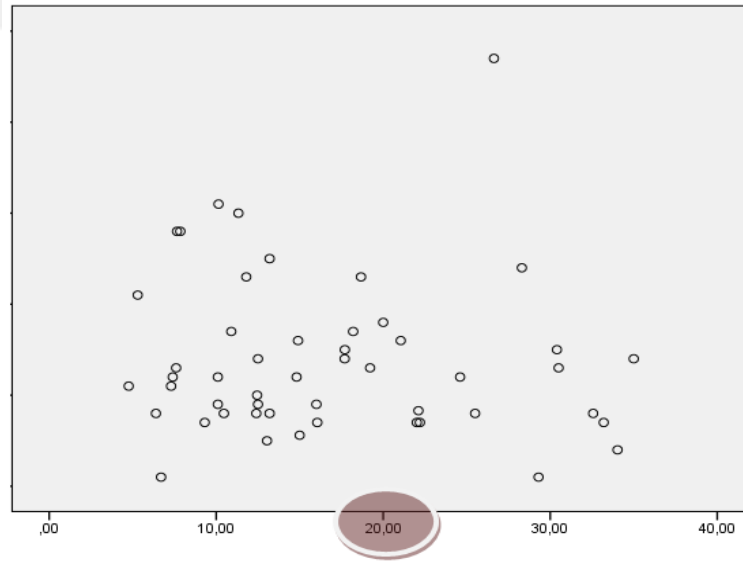
Yine literatürde bulunan 100 infertil hasta ve 50 fertil birey incelenerek yapılan bir çalışmada; sperm DFI'nın, Asteno ve oligozoospermik hastalarda normozoospermiklere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (Atig, Kerkeni, Saad, & Ajina, 2017). ve ark. sperm DNA fragmentasyonunu TUNEL testi kullanarak sperm parametreleri ile korelasyonu açısından değerlendirmişler ve sperm fonksiyon bozukluğu olan hastalarda normal sperm kriterlerine göre anlamlı düzeyde yüksek DNA fragmentasyonu olduğunu belirtmişlerdir(Liu et al., 2004).

Simon ve ark., YÜT'nden yararlanan infertil erkeklerdeki DNA harabiyetini Comet analizi ile incelemişler ve DNA harabiyet oranlarına göre örnekleri; düşük (%0-30), orta (%31-70) ve yüksek (%71-100) harabiyet olarak gruplandırmışlardır. Ayrıca her embriyoyu, blastomer sayısı ve derecesine göre "iyi", "orta" ve "kötü" olarak gruplandırmışlardır. İmplantasyon sonrası toplam 215 erkeği değerlendirmişler ve yüksek DNA

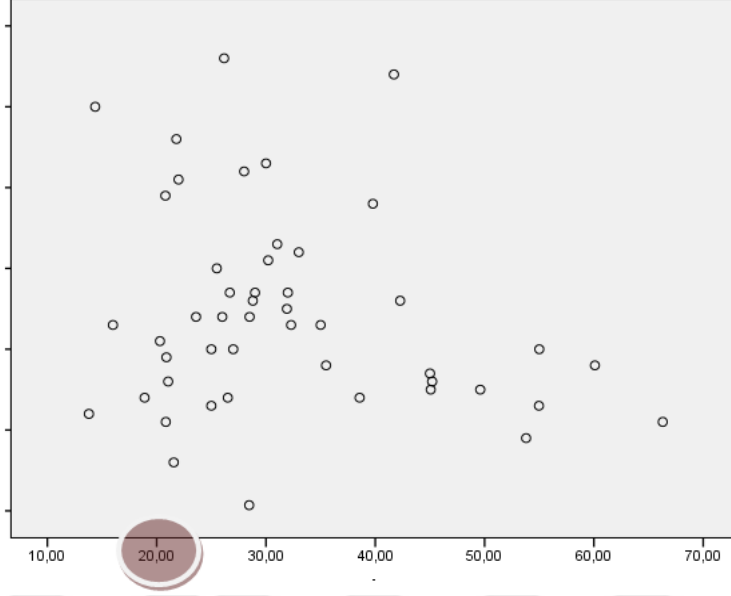
hasarı grubuna kıyasla, düşük DNA hasarı grubunda ($p=0.05$) yüksek kaliteli embriyo yüzdesinin daha fazla ve dolayısıyla kalitesi düşük embriyo oranının anlamlı düzeyde azaldığını gözlemlemişlerdir yani implantasyon başarısı ile DFI düzeyinin ters orantılı olduğu sonucuna varmışlardır ($p = 0.001$)(Simon, Murphy, et al., 2014).

Wdowiak ve ark. da DFI dinamiği, embriyo gelişimi ve gebelik oranı arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. ICSI uygulanan 148 çiftte, DFI oranına, mikroenjeksiyon gününde ve 3, 6 ile 12 saatlik inkübasyondan sonra bakılmış, DFI düzeyinin, embriyo büyümesi ve sağlıklı gebeliğin devam etmesi ile bağlantılı olduğu görülmüştür (Wdowiak & Bojar, 2016).

Çalışmamızda, sperm DNA fragmentasyonunda Şekil 5.1.'de olduğu gibi kontrol gruplarının cut off üstü değeri baz alındığında en üst limiti %35'lere dayanırken, Şekil 5.2'de olduğu gibi hasta gruplarında ise bu değer %65 'lere kadar çıktığı görülmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada (Rakesh Sharma et al., 2016) da cut off değeri kontrol grubunda %16.8-%19.6 iken hasta grubunda üst limit %68.9'lara kadar ulaşmıştır. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde çalışma verilerimizin literatürle uyumlu olduğu saptanmıştır.



Şekil 5.1 Kontrol grubunda DNA fragmentasyonunun cut-off (%20) değerine göre dağılımı



Şekil 5.2 İnfertil grupta DNA fragmentasyonunun cut-off (%20) değerine göre dağılımı

Bulgular bölümünde de belirtildiği üzere çalışmamızda, hastalığın gerçekten var olduğu bilinen kişilerden yüzde kaçının önerilen yeni yöntemle tanınabildiğini gösteren duyarlılık değeri 91,67 (%91,67), sağlam olanların yüzde kaçının önerilen yöntemle tanınabildiğini gösteren sensivite değeri de 0,70 (%70) olarak tespit edilmiştir. Analiz sonunda AUC olarak belirtilen değer 'Eğri Altında Kalan Alanı (EAA)' temsil eder ve 1'e yaklaştıkça tanı değeri yükselir. Bizim çalışmamızda da bu değer 0,85'tir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada ROC Curve ile tespit edilen cut-off değeri %26, sensivite değeri %85 , spesivitesi %89, AUC değeri ise 0,91 olarak bulunmuştur (Chenlo et al., 2014). Bu sonuçlar; çalışmamızda gerçekleştirilen TUNEL analizinin güvenilir ve uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

Genel bilgilerde de açıklandığı gibi, histon ve protamin değişimi sırasında gerçekleşen çift dal kırıklarından kaynaklanan hatalar ile protamin eksikliği ile spermde protamin paketlenmesinin yetersizliğinin infertil erkeklerde gözlenmesi, bu erkeklerde defektif spermatogenezin histon/protamin oranının değişmesine yol açabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalarda anormal sperm protaminasyonu ile sperm DNA harabiyeti arasında yakın bir ilişki olduğunun gösterilmesi kromatin yeniden paketlenmesindeki düzensizliklerin sperm DNA harabiyetinin major nedeni olduğunu desteklemektedir. Bu nedenle , infertile erkeklerde DNA harabiyetinin değerlendirilmesinin öneminin yanısıra, kullanılacak DNA harabiyet testinin de çok önemli olduğu literatürde ifade edilmektedir.

Örneğin, yapılan bir çalışmada COMET, TUNEL ve FCCE (flow sitometrik kromatin değerlendirme) testlerinin duyarlılıkları karşılaştırılmıştır. Direkt analiz yöntemlerinden olan Comet ve TUNEL testlerinin infertil ve fertil ayırımındaki duyarlılıklarının, indirekt analiz yöntemi olan FCCE analizine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu çalışmadaki ROC curve sonuçları da; sperm DNA hasarının YÜT sonucunu tahmin etmede Comet ve TUNEL verilerinin etkili bir belirteç olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar, Comet ve TUNEL analizlerinin, spermin DNA hasarının değerlendirilerek YÜT başarısını en iyi şekilde tahmin edilebilmesi için gereken duyarlılık ve özgüllüğü sağladıklarını bildirmişlerdir (Simon, Liu, et al., 2014).

5.3. DNA Fragmentasyonu Oranları ile Sperm Kromozom Anöploid/Diploid İlişkisinin Literatür Bilgileriyle karşılaştırılması

Pek çok çalışmada asteno, oligo ve teratozoospermik sperm örneklerinde sperm anöploidisi sıklığının arttığı gösterilmiştir (Enciso, Alfarawati, & Wells, 2013). Ancak, DNA fragmentasyonu ile sperm anöploidisi arasındaki bağlantıya yönelik çalışmalar çelişkilidir. Erkek infertilitesinde kromozom anomalilerinin, DNA harabiyetinin veya her ikisinin birlikte etkili olabileceği bugün bilinen bir gerçektir. Bazı çalışmalar tekrarlayan gebelik kaybı öyküsü bulunan çiftlerde (Carrell et al., 2003), globozoospermik (Brahem, Mehdi, Elghezal, & Saad, 2011a), teratozoospermik ve oligozoospermik (Durak Aras et al., 2012; Liu et al., 2004) tanısı alan infertil hastalar ile yapısal kromozom anomali taşıyıcısı olan olgularda (Perrin et al., 2011) DNA hasarı oranının sperm anöploidisi ile birlikte arttığını ve paternal kaynaklı olduğunu bildirmişlerdir.

Yardımcı üreme tekniklerinden IVF veya ICSI'nin uygulandığı olgularda DNA fragmentasyon testleri ile otozomal anöploidisi sıklığının karşılaştırıldığı bir çalışmada; otozomal dizomi ile DNA fragmentasyon oranlarının anlamlı düzeyde ilişkili olduğu bildirilmiştir (Carrell et al., 2003). Kromozom 18, X ve Y anöploidilerinin farklı semen özellikleri olan non-normozoospermik infertil erkeklerde incelendiği diğer bir çalışmada da fragmente DNA içeren örneklerde anöploidisi sıklığının 4 kat arttığı bildirilmiştir (Muriel et al., 2007). Buna karşılık 2011 yılında yapılan bir çalışmada (Harper) DNA fragmentasyonu ve anöploidisi arasında bir korelasyon olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda TUNEL testi ile otozomal anöploidisi korelasyonu değerlendirilmiştir. TUNEL testi ile anöploidisi ilişkisine bakıldığında; kromozom 21 dışında tüm incelenen otozomal kromozom anöploidileri ve XY arasında anlamlı bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Dolayısıyla çalışma verilerimiz literatürle uyumludur.

Diploidi ve DNA fragmentasyonu korelasyonunda ise diploidi ve DNA fragmentasyonu korelasyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İnsan sperminde, seks kromozom dizomileri daha sık gözlenmektedir ve fertilizasyon sonrasında da yaşama bağdaşmakta, otozomal anöploidilere göre daha ılımlı bir fenotipe yol açmaktadır. Ayrıca, yüksek oranda maternal orjinli olan otozomal anöploidilerin aksine, cinsiyet kromozomu anöploidileri daha çok spermatogenez sırasındaki segregasyon hatalarından kaynaklanmaktadır. Çalışma verileri değerlendirildiğinde, TUNEL testinin cinsiyet kromozomu dizomilerinden XY ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korelasyonu dikkati çekmiştir. Bu ilişki diğer (XX,YY) seks kromozom dizomileri ile gözlenmemiştir. Aynı şekilde, 2014 yılında yapılan 341 örneğin değerlendirildiği bir çalışmada sadece XY dizomisi ile DNA fragmentasyon korelasyonunun istatistiksel olarak anlamlı derecede bağlantılı olduğu bildirilmiştir (McAuliffe et al., 2014). Çalışmamızda saptanan XY dizomisi ve DNA fragmentasyon ilişkisi literatürü desteklemektedir.



6- SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, semen analizleri sonrası non-normozoospermi tanısı alan 48 olgu ile klinik öykülerinde fertil olduğu bilinen normozoospermili 50 olguda sık gözlenen sperm kromozom anöploidilerinin ortaya konulması amacıyla FISH analizleri, DNA fragmentasyon oranlarını saptamak amacıyla da TUNEL test analizleri yapılmıştır.

- Normozoospermik bireyler ile non-normozoospermik olguların yaş ortalamaları karşılaştırılmış olup gruplar arasında fark olmadığı gözlenmiştir. Buna karşılık, sperm konsantrasyonu, genel sperm motilite ve normal spermatozoa görünüm yüzdelerinin istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdiği saptanmıştır.
- Genetik analizler sonucunda, infertil non-normozoospermi ile fertil, normozoospermi gruplarındaki sperm anöploidi oranları arasındaki farklılığın ileri derecede anlamlı olduğu gözlenmiştir. Otozomal (kromozom 13,16,18,21) ve seks kromozomal dizomileri ile diploidinin infertil grupta ileri derecede arttığı saptanmıştır.
- Çalışmamızın en büyük eksikliği, non-normozoospermik infertil grubun alt gruplarındaki olgu sayılarının sınırlı olmasıdır. Sözkonusu alt gruplarda saptanan FISH anomalileri birbirleriyle karşılaştırıldığında; dizomi 13'ün astenozoospermi ve teratozoospermi grupları arasında anlamlı farklılık gösterdiği, teratozoospermi grubunda da dizomi 13 sıklığının daha yüksek olduğu ($p < 0.05$) saptanmıştır. Diğer kromozom anöploidilerin alt gruplara göre dağılımlarında anlamlı bir birikmenin saptanamaması hasta gruplarının sınırlı oluşuna bağlanabilir.
- DNA fragmentasyon analizinin TUNEL testi ile yapılması sonucu fertil, normozoospermi grubunda DNA fragmentasyon İndeksi (DFI) 14.85 (10.13-22.13) iken, non-normozoospermi grubunun DFI değeri 28.65 (22.4-39.47) olarak saptanmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde farklılık olduğu saptanmıştır. İnfertil grupta saptanan DFI aralığı, literatürde bildirilen değerler arasında gözlenmiştir. Ayrıca, oligoteratozoospermik ve hipospermik gruplarda DFI değeri anlamlı derecede farklılık göstermiştir.
- TUNEL testi, literatürde de DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesinde güvenilir bir test olarak belirtilmektedir. Çalışmamızda TUNEL testinin hastaları belirlemedeki duyarlılığı %91,67, kontrol grubu bireylerini belirlemedeki özgüllüğü de %70 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, çalışmamızda kullandığımız TUNEL testinin güvenilirliğini göstermesi açısından önemlidir.

- Ayrıca, otozomal/seks kromozomal dizomi ile TUNEL testi korelasyonunda da genel olarak korelasyonun olduğu gözlenmiştir ki bu da TUNEL testinin informatifliğini destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, çalışmamızda non-normozoospermik sperm örneklerinde DNA fragmentasyonunun arttığı, bu nedenle infertilite nedeniyle klinik değerlendirmeye alınan olgularda rutin spermiogram ve morfolojik sperm analizlerinin yanısıra DNA fragmentasyonunun da değerlendirilmesi gerektiği, yardımcı üreme tekniklerinden yararlanacak DFI oranı yüksek olan olgularda, fragmentasyon-anöploidi korelasyonu nedeniyle preimplantasyon genetik tarama yaklaşımının uygulanmasının başarıyı arttıracığı düşüncesindeyiz.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abramsky, L., & Chapple, J. (1997). 47, XXY (Klinefelter syndrome) and 47, XYY: estimated rates of and indication for postnatal diagnosis with implications for prenatal counselling. *Prenatal diagnosis*, 17(4), 363-368.
- Abruzzo, M. A., & Hassold, T. J. (1995). Etiology of nondisjunction in humans. *Environmental and molecular mutagenesis*, 25(S2), 38-47.
- Agarwal, A., Allamaneni, S. S., Nallella, K. P., George, A. T., & Mascha, E. (2005). Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis. *Fertility and sterility*, 84(1), 228-231.
- Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S. C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Translational andrology and urology*, 5(6), 935.
- Ahmad, G., Moinard, N., Esquerré-Lamare, C., Mieusset, R., & Bujan, L. (2012). Mild induced testicular and epididymal hyperthermia alters sperm chromatin integrity in men. *Fertility and sterility*, 97(3), 546-553.
- Aitken, R., Bronson, R., Smith, T., & De Iuliis, G. (2013). The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 19(8), 475-485.
- Aitken, R., & De Iuliis, G. (2009). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 16(1), 3-13.
- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., & McLachlan, R. I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International journal of andrology*, 32(1), 46-56.
- Aitken, R. J., & Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122(4), 497-506.
- Alshahrani, S., Agarwal, A., Assidi, M., Abuzenadah, A. M., Durairajanayagam, D., Ayaz, A., . . . Sabanegh, E. (2014). Infertile

men older than 40 years are at higher risk of sperm DNA damage. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 103.

- Andreescu, N. I., Cosma, M., FARCAȘ, S. S., Stoian, M., Amzăr, D.-G., & Puiu, M. (2016). Assessment of chromosomal aneuploidies in sperm of infertile males by using FISH technique. *Rom J Morphol Embryol*, 57(1), 173-178.
- Atig, F., Kerkeni, A., Saad, A., & Ajina, M. (2017). Effects of reduced seminal enzymatic antioxidants on sperm DNA fragmentation and semen quality of Tunisian infertile men. *Journal of assisted Reproduction and Genetics*, 34(3), 373-381.
- Baccetti, B., Collodel, G., & Piomboni, P. (1996). Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *Journal of submicroscopic cytology and pathology*, 28(4), 587-596.
- Bach, P. V., & Schlegel, P. N. (2016). Sperm DNA damage and its role in IVF and ICSI. *Basic and clinical andrology*, 26(1), 15.
- Bieniek, J. M., Drabovich, A. P., & Lo, K. C. (2016). Seminal biomarkers for the evaluation of male infertility. *Asian journal of andrology*, 18(3), 426.
- Bracke, A., Peeters, K., Punjabi, U., Hoogewijs, D., & Dewilde, S. (2017). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive biomedicine online*.
- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., & Saad, A. (2011a). Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes. *Urology*, 77(6), 1343-1348.
- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., & Saad, A. (2011b). The effects of male aging on semen quality, sperm DNA fragmentation and chromosomal abnormalities in an infertile population. *Journal of assisted Reproduction and Genetics*, 28(5), 425-432.
- Bronet, F., Martínez, E., Gaytán, M., Liñán, A., Cernuda, D., Ariza, M., . . . Garcia-Velasco, J. (2012). Sperm DNA fragmentation index does not correlate with the sperm or embryo aneuploidy rate in recurrent miscarriage or implantation failure patients. *Human Reproduction*, 27(7), 1922-1929.

- Bungum, M., Bungum, L., & Giwercman, A. (2011). Sperm chromatin structure assay (SCSA): a tool in diagnosis and treatment of infertility. *Asian journal of andrology*, 13(1), 69.
- Carrell, D. T., Wilcox, A. L., Lowy, L., Peterson, C. M., Jones, K. P., Erickson, L., . . . Hatasaka, H. H. (2003). Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstetrics & Gynecology*, 101(6), 1229-1235.
- Chang, C., Lee, S. O., Wang, R.-S., Yeh, S., & Chang, T.-M. (2013). Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems: lessons learned from AR-knockout mice lacking AR in selective cells. *Biology of reproduction*, 89(1).
- Chenlo, P., Curi, S., Pugliese, M., Ariagno, J., Sardi-Segovia, M., Furlan, M., . . . Mendeluk, G. (2014). Fragmentation of sperm DNA using the TUNEL method. *Actas Urológicas Españolas (English Edition)*, 38(9), 608-612.
- Colaco, S., & Modi, D. (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 14.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249.
- Collodel, G., Moretti, E., Capitani, S., Piomboni, P., Anichini, C., Estenoz, M., & Baccetti, B. (2006). TEM, FISH and molecular studies in infertile men with pericentric inversion of chromosome 9. *Andrologia*, 38(4), 122-127.
- Conwell, C. C., Vilfan, I. D., & Hud, N. V. (2003). Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9296-9301.
- Delilbaşı, L. (2008). In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni uygulamalar ve güncel yaklaşımlar). *Ankara: Güneş Kitabevleri*, 61-83.
- Dohle, G., Halley, D., Van Hemel, J., Van Den Ouwel, A., Pieters, M., Weber, R., & Govaerts, L. (2002). Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human Reproduction*, 17(1), 13-16.

- Durak Aras, B., Aras, I., Can, C., Toprak, C., Dikoglu, E., Bademci, G., . . . Artan, S. (2012). Exploring the relationship between the severity of oligozoospermia and the frequencies of sperm chromosome aneuploidies. *Andrologia*, 44(6), 416-422.
- Duran, E. H., Gürgan, T., Günalp, S., Enginsu, M., Yarali, H., & Ayhan, A. (1998). A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(5), 1235-1239.
- Enciso, M., Alfarawati, S., & Wells, D. (2013). Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Human Reproduction*, 28(6), 1707-1715.
- Erdemir, F., Firat, F., & Gençten, Y. (2011). Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Turk Urol Sem*, 2, 11-17.
- Eskandari, N., Tavalaei, M., Zohrabi, D., & Nasr-Esfahani, M. (2018). Association between total globozoospermia and sperm chromatin defects. *Andrologia*, 50(2).
- Esteves, S. C., Gosálvez, J., López-Fernández, C., Núñez-Calonge, R., Caballero, P., Agarwal, A., & Fernández, J. L. (2015). Diagnostic accuracy of sperm DNA degradation index (DDSi) as a potential noninvasive biomarker to identify men with varicocele-associated infertility. *International urology and nephrology*, 47(9), 1471-1477.
- Evenson, D. P. (2013). Sperm chromatin structure assay (SCSA®). In *Spermatogenesis* (pp. 147-164): Springer.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Corzett, M., & Balhorn, R. (2000). Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *Journal of andrology*, 21(5), 739-746.
- Fernández, J. L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., . . . De Jonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and sterility*, 84(4), 833-842.
- Fernandez, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, 24(1), 59-66.

- Foresta, C., Ferlin, A., Gianaroli, L., & Dallapiccola, B. (2002). Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *European Journal of Human Genetics*, 10(5), 303.
- Franken, D. R., & Oehninger, S. (2012). Semen analysis and sperm function testing. *Asian journal of andrology*, 14(1), 6.
- Ghorbian, S. (2012). Routine diagnostic testing of Y chromosome deletions in male infertile and subfertile. *Gene*, 503(1), 160-164.
- Giuliani, R., Antonucci, I., Torrente, I., Grammatico, P., Palka, G., & Stuppia, L. (2010). Identification of the second CFTR mutation in patients with congenital bilateral absence of vas deferens undergoing ART protocols. *Asian journal of andrology*, 12(6), 819.
- Godo, A., Blanco, J., Vidal, F., Sandalinas, M., Garcia-Guixé, E., & Anton, E. (2015). Altered segregation pattern and numerical chromosome abnormalities interrelate in spermatozoa from Robertsonian translocation carriers. *Reproductive biomedicine online*, 31(1), 79-88.
- Gonzalez-Merino, E., Hans, C., Abramowicz, M., Englert, Y., & Emiliani, S. (2007). Aneuploidy study in sperm and preimplantation embryos from nonmosaic 47, XYY men. *Fertility and sterility*, 88(3), 600-606.
- Gosálvez, J., Lopez-Fernandez, C., Fernandez, J., Esteves, S., & Johnston, S. (2015). Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: ten frequently asked questions. *Journal of Reproductive Biotechnology and Fertility*, 4, 2058915815594454.
- Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., . . . Tesarik, J. (2005). Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Human Reproduction*, 20(1), 226-230.
- Groth, K. A., Skakkebaek, A., Høst, C., Gravholt, C. H., & Bojesen, A. (2013). Klinefelter syndrome—a clinical update. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(1), 20-30.
- Hamad, M., Shelko, N., Kartarius, S., Montenarh, M., & Hammadeh, M. (2014). Impact of cigarette smoking on histone (H2B) to protamine ratio in human spermatozoa and its relation to sperm parameters. *Andrology*, 2(5), 666-677.

- Harper, J. Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa.
- Henkel, R., Hoogendijk, C., Bouic, P., & Kruger, T. (2010). TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. *Andrologia*, 42(5), 305-313.
- Huerta, S., Goulet, E. J., Huerta-Yeppez, S., & Livingston, E. H. (2007). Screening and detection of apoptosis. *Journal of Surgical Research*, 139(1), 143-156.
- Hyon, C., Chantot-Bastarud, S., Harbuz, R., Bhourri, R., Perrot, N., Peycelon, M., . . . Bilan, F. (2015). Refining the regulatory region upstream of SOX9 associated with 46, XX testicular disorders of Sex Development (DSD). *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(8), 1851-1858.
- Ibtisham, F., Wu, J., Xiao, M., An, L., Banker, Z., Nawab, A., . . . Li, G. (2017). Progress and future prospect of in vitro spermatogenesis. *Oncotarget*, 8(39), 66709.
- Iitsuka, Y., Bock, A., Nguyen, D. D., Samango-Sprouse, C. A., Simpson, J. L., & Bischoff, F. Z. (2001). Evidence of skewed X-chromosome inactivation in 47, XXY and 48, XXYY Klinefelter patients. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 98(1), 25-31.
- Jodar, M., & Oliva, R. (2014). Protamine alterations in human spermatozoa. In *Genetic Damage in Human Spermatozoa* (pp. 83-102): Springer.
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., & Krausz, C. (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*, 62(2), 324-332.
- Katz, D. J., Teloken, P., & Shoshany, O. (2017). Male infertility-The other side of the equation. *Australian family physician*, 46(9), 641.
- Keymolen, K., Van Berkel, K., Vorrsselmans, A., Staessen, C., & Liebaers, I. (2011). Pregnancy outcome in carriers of Robertsonian translocations. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 155(10), 2381-2385.
- Küçük, N. (2018). Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm. *Turkish journal of urology*, 44(1), 1.

- Li, T.-F., Wu, Q.-Y., Zhang, C., Li, W.-W., Zhou, Q., Jiang, W.-J., . . . Shi, Y.-C. (2014). 46, XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. *BMC urology*, *14*(1), 104.
- Liu, C.-H., Tsao, H.-M., Cheng, T.-C., Wu, H.-M., Huang, C.-C., Chen, C.-I., . . . Lee, M.-S. (2004). DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. *Journal of assisted Reproduction and Genetics*, *21*(4), 119-126.
- Mahfouz, R., Sharma, R., Thiyagarajan, A., Kale, V., Gupta, S., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2010). Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertility and sterility*, *94*(6), 2141-2146.
- Matzuk, M. M., & Lamb, D. J. (2002). Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nature Medicine*, *8*(10s), S33.
- Mau-Holzmann, U. (2005). Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenetic and Genome Research*, *111*(3-4), 317-336.
- McAuliffe, M., Williams, P., Korrick, S., Dadd, R., Marchetti, F., Martenies, S. E., & Perry, M. J. (2014). Human sperm sex chromosome disomy and sperm DNA damage assessed by the neutral comet assay. *Human Reproduction*, *29*(10), 2148-2155.
- Medicine, P. C. o. t. A. S. f. R. (2015). Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and sterility*, *103*(3), e18-e25.
- Mierla, D., & Stoian, V. (2012). Association of pericentric inversion of chromosome 9 and infertility in romanian population. *Maedica*, *7*(1), 25.
- Mittal, P. K., Little, B., Harri, P. A., Miller, F. H., Alexander, L. F., Kalb, B., . . . Moreno, C. C. (2017). Role of imaging in the evaluation of male infertility. *RadioGraphics*, *37*(3), 837-854.
- Mozdarani, H., Meybodi, A. M., & Karimi, H. (2007). Impact of pericentric inversion of Chromosome 9 [inv (9)(p11q12)] on infertility. *Indian journal of human genetics*, *13*(1), 26.

- Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Alvarez, J. G., & Fernández, J. L. (2007). Increased aneuploidy rate in sperm with fragmented DNA as determined by the sperm chromatin dispersion (SCD) test and FISH analysis. *Journal of andrology*, 28(1), 38-49.
- Nagaoka, S. I., Hassold, T. J., & Hunt, P. A. (2012). Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 493.
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, 1(1), 23.
- Organization, W. H. WHO (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. *World Health Organization, Geneva*.
- Palermo, G. D., Neri, Q. V., Cozzubbo, T., & Rosenwaks, Z. (2014). Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. *Fertility and sterility*, 102(6), 1508-1517.
- Perrin, A., Basinko, A., Douet-Guilbert, N., Gueganic, N., Le Bris, M.-J., Amice, V., . . . Morel, F. (2011). Aneuploidy and DNA fragmentation in sperm of carriers of a constitutional chromosomal abnormality. *Cytogenetic and Genome Research*, 133(2-4), 100-106.
- Petousis, S., Prapas, Y., Papatheodorou, A., Margioulas-Siarkou, C., Papatzikas, G., Panagiotidis, Y., . . . Prapas, N. (2018). Fluorescence in situ hybridisation sperm examination is significantly impaired in all categories of male infertility. *Andrologia*, 50(2).
- Pourmasumi, S., Sabeti, P., Rahiminia, T., Mangoli, E., Tabibnejad, N., & Talebi, A. R. (2017). The etiologies of DNA abnormalities in male infertility: An assessment and review. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 15(6), 331.
- Ramasamy, R., Scovell, J. M., Kovac, J. R., Cook, P. J., Lamb, D. J., & Lipshultz, L. I. (2015). Fluorescence in situ hybridization detects increased sperm aneuploidy in men with recurrent pregnancy loss. *Fertility and sterility*, 103(4), 906-909. e901.
- Rathke, C., Baarends, W. M., Awe, S., & Renkawitz-Pohl, R. (2014). Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(3), 155-168.

- Ribas-Maynou, J., Garcia-Peiro, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M., Prada, E., . . . Benet, J. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, 1(5), 715-722.
- Said, T. M., Aziz, N., Sharma, R. K., Lewis-Jones, I., Thomas, A. J., & Agarwal, A. (2005). Novel association between sperm deformity index and oxidative stress-induced DNA damage in infertile male patients. *Asian journal of andrology*, 7(2), 121-126.
- Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility*, 93(4), 1027-1036.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Sharma, R. K., Meyer, A., . . . Thomas, A. J. (2003). Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertility and sterility*, 79, 1597-1605.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nelson, D. R., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Alvarez, J. G., . . . Sharma, R. K. (2002). Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and sterility*, 78(2), 313-318.
- Sánchez, V., Wistuba, J., & Mallidis, C. (2013). Semen analysis: update on clinical value, current needs and future perspectives. *Reproduction*, 146(6), R249-R258.
- Sarrate, Z., & Anton, E. (2009). Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *Journal of visualized experiments: JoVE*(31).
- Satar, D. A., & Gençdal, S. (2013). Sperm değerlendirilmesi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(4).
- Schulte, R. T., Ohl, D. A., Sigman, M., & Smith, G. D. (2010). Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *Journal of assisted Reproduction and Genetics*, 27(1), 3-12.
- Selvam, M. K. P., & Agarwal, A. (2018). A systemic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. *Arab Journal of Urology*.

- Shamsi, M. B., Imam, S. N., & Dada, R. (2011). Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *Journal of assisted Reproduction and Genetics*, 28(11), 1073-1085.
- Sharma, R., Ahmad, G., Esteves, S. C., & Agarwal, A. (2016). Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control. *Journal of assisted Reproduction and Genetics*, 33(2), 291-300.
- Sharma, R., Said, T., & Agarwal, A. (2004). Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian journal of andrology*, 6(2), 139-148.
- Shi, Q., & Martin, R. (2000). Spontaneous frequencies of aneuploid and diploid sperm in 10 normal Chinese men: assessed by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Cytogenetic and Genome Research*, 90(1-2), 79-83.
- Simon, L., Liu, L., Murphy, K., Ge, S., Hotaling, J., Aston, K., . . . Carrell, D. (2014). Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Human Reproduction*, 29(5), 904-917.
- Simon, L., Murphy, K., Shamsi, M., Liu, L., Emery, B., Aston, K., . . . Carrell, D. (2014). Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*, 29(11), 2402-2412.
- Song, S.-H., Chiba, K., Ramasamy, R., & Lamb, D. J. (2016). Recent advances in the genetics of testicular failure. *Asian journal of andrology*, 18(3), 350.
- Spanò, M., Bonde, J. P., Hjøllund, H. I., Kolstad, H. A., Cordelli, E., & Leter, G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertility and sterility*, 73(1), 43-50.
- Stahl, P. J., & Schlegel, P. N. (2012). Genetic evaluation of the azoospermic or severely oligozoospermic male. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 24(4), 221-228.

- Sutovsky, P., & Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, 1-30.
- Tejada, R. I., Mitchell, J. C., Norman, A., Marik, J. J., & Friedman, S. (1984). A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertility and sterility*, 42(1), 87-91.
- Tournaye, H., Krausz, C., & Oates, R. D. (2017). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 5(7), 544-553.
- Traven, E., Ogrinc, A., & Kunej, T. (2017). Initiative for standardization of reporting genetics of male infertility. *Systems biology in reproductive medicine*, 63(1), 58-66.
- Vandekerckhove, F. W., De Croo, I., Gerris, J., Vanden Abbeel, E., & De Sutter, P. (2016). Sperm chromatin dispersion test before sperm preparation is predictive of clinical pregnancy in cases of unexplained infertility treated with intrauterine insemination and induction with clomiphene citrate. *Frontiers in medicine*, 3, 63.
- Vanha-Perttula, T. (1978). *Spermatogenesis and hydrolytic enzymes—A review*. Paper presented at the Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique.
- Visser, L., & Repping, S. (2010). Unravelling the genetics of spermatogenic failure. *Reproduction*, 139(2), 303-307.
- Ward, W. S. (2009). Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 16(1), 30-36.
- Wdowiak, A., & Bojar, I. (2016). Relationship between pregnancy, embryo development, and sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics. *Saudi journal of biological sciences*, 23(5), 598-606.
- You, Y.-A., Park, Y.-J., Kwon, W.-S., Yoon, S.-J., Ryu, B.-Y., Kim, Y. J., & Pang, M.-G. (2014). Increased frequency of aneuploidy in long-lived spermatozoa. *PloS one*, 9(12), e114600.
- Yu, J., Chen, Z., Ni, Y., & Li, Z. (2011). CFTR mutations in men with congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD): a systemic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 27(1), 25-35.

Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., & Zenzes, M. T. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and sterility*, 75(4), 674-677.



Özgeçmiş

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : EFSUN TOSUMOĞLU
Doğum tarihi ve yeri : ARTVİN-HOPA
Uyruğu : T.C.
Medeni durumu : BEKAR
İletişim adresleri : BÜYÜKDERE MAH.ATAKUL SOK.

Eğitim Durumu

(Tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru ilköğretim, lise, üniversite, yabancı dil / diller) :

Yabancı Dil: İyi

1999-2002 : Özel Atafen Koleji
2002-2005 : Neşet Yalçın Lisesi
2006-2011 : Karadeniz Teknik Üniversitesi, BİYOLOJİ, Örgün (1 yıl hazırlık sınıfı)
2013-2018 : Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Genetik Bölümü Yüksek Lisans Programı

Mesleki Deneyim : 2016. Biyolog, ESOĞÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

Yayımlar:

Aras, B. D., Tanriverdi, A., Tosumoglu, E., Ure, I., Ozdemir, M., Cilingir, O., & Artan, S. (2017, June). Sperm DNA fragmentation and chromosomal aneuploidy in men with unexplained infertility. In *MOLECULAR CYTOGENETICS* (Vol. 10). 236 GRAYS INN RD, FLOOR 6, LONDON WC1X 8HL, ENGLAND: BIOMED CENTRAL LTD.

Erzurumluoglu, E., Ozdemir, M., Kocagil, S., Cilingir, O., Tosumoglu, E., Aras, B. D., & Artan, S. (2017, June). De novo 7q31 deletion involving FOXP2 gene associated with speech disability. In *MOLECULAR CYTOGENETICS* (Vol. 10). 236 GRAYS INN RD, FLOOR 6, LONDON WC1X 8HL, ENGLAND: BIOMED CENTRAL LTD.

(Makale, Sözlü Bildiri, Poster Bildiri, Kitap, Kitap Bölümü vd.)

