



**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**NORMOZOOSPERMİK VE NON-NORMOZOOSPERMİK HASTA  
GRUPLARINDA  
DNA FRAGMENTASYON ORANININ  
SPERM ANÖPLOİDİLERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AYÇA DEMİREL**

**DANIŞMAN**

**Prof.Dr.Sevilhan ARTAN**

**2018**



**T.C.**

**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI**

**NORMOZOOSPERMİK VE NON-NORMOZOOSPERMİK HASTA  
GRUPLARINDA  
DNA FRAGMENTASYON ORANININ  
SPERM ANÖPLOİDİLERİNE ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AYÇA DEMİREL**

**DANIŞMAN**

**Prof.Dr.Sevilhan ARTAN**

**2018**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Ayça DEMİREL'in Yüksek Lisans olarak hazırladığı "NORMOZOOSPERMİK VE NON NORMOZOOSPERMİK SPERM ÖRNEKLERİNDE DNA FRAGMENTASYON ORANLARININ SPERM ANÖPLOİDİLERİNE ETKİSİ" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirerek "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 24.05.2018 tarih ve 2174/5783. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ  
Enstitü Müdürü



## ÖZET

### **Normozoospermik ve non-normozoospermik hasta gruplarında DNA fragmentasyon oranının sperm anöploidilerine etkisi**

İnfertilite, doğum kontrol yöntemi uygulamayan çiftlerde 1 yıllık sürede gebeliğin gerçekleşmemesidir. Çiftlerin yaklaşık %10-15'i infertilite problemi ile karşılaşmaktadır. Günümüzde erkek bireyin değerlendirilmesinde rutin olarak, spermiyogram analizi kullanılmaktadır. Bu analiz sayesinde erkek infertilitesinin yaklaşık % 40-60'ında altta yatan etken ortaya konulabilmekteyken yaklaşık % 50'lik bir kısmında sorunun ana kaynağı tam olarak anlaşılammakta ve idiyopatik infertilite olarak sınıflandırılmaktadır. Bu hasta grubu için de tanıyı koydurtabilecek ve tedaviye yön verecek yeni testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu anlamda son yıllarda en çok üzerinde durulan konulardan biride "Sperm DNA Hasarı" dır.

Çalışmamızda infertilite öyküsü olan ve spermiogram/sperm fonksiyon testlerinde non-normozoospermik tanısı alan 48 olgudan elde edilen semen örneklerinde DNA fragmentasyon oranları SCD(Sperm Chromatin Dispersion) testi ile incelenmiş ve örneklerin DNA fragmentasyon oranları, sağlıklı, fertil olduğu bilinen 50 normozoospermik birey örnekleriyle karşılaştırılmıştır. Sperm örneklerinde ayrıca kromozom 13, 18, 21, X, Y dizomileri ile diploidi oranları Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) analizi ile araştırma ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmış, fragmentasyon oranı ile kromozom anöploidi/poliploidi ilişkileri değerlendirilmiştir.

DNA fragmentasyon değerlendirmesinde küçük halo/halo yok olarak değerlendirilen spermatozoa sıklığı non-normozoospermik grupta %45 iken kontrol grubunda bu oran %24' tür.Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. ( $p < 0.001$ ).

Hasta ve kontrol grubunda saptanan toplam halo oranı ile dizomi 13 ve 18 arasında istatistiksel bir farklılık gözlenirken fragmente DNA belirteci olan küçük halo ile otozomal ve seks kromozomal anöploidiler arasında anlamlı düzeyde bir korelasyon saptanmamıştır. Yani kromozomal anöploidi ile fragmente DNA belirteci olan küçük halo ilişkisi bu çalışmada gözlenmemiştir. Ancak, poliploidi olarak ifade edebileceğimiz diploidik spermatozoa oranları arttıkça küçük halo oranının da anlamlı düzeyde arttığı dikkati çekmiştir.

İnfertilite nedeniyle klinik değerlendirmeye alınan olgularda rutin spermiogram ve morfolojik sperm analizlerinin yanısıra DNA fragmentasyonunun da değerlendirilmesi gerektiği, yardımcı üreme tekniklerinden yararlanacak DNA fragmentasyon indeksi (DFI) oranı yüksek olan olgularda, fragmentasyon-anöploidi korelasyonu nedeniyle

preimplantasyon genetik tarama yaklaşımlarının uygulanmasının başarıyı arttıracakı düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler : Sperm DNA fragmentasyonu, SCD (Sperm Chromatin Dispersion),sperm FISH, erkek infertilitesi, kromozom anöploidisi



## **SUMMARY**

### **The effect of DNA fragmentation rate on sperm aneuploidy in normozoospermic and non-normozoospermic patient groups**

Infertility is the failure of pregnancy in couples not using any contraceptive methods in 1-year period. Approximately 10-15% of couples encounter with infertility problems. Today, spermiogram analysis is used routinely for the evaluation of male individuals. By means of this analysis, while the underlying factor of male infertility can be revealed in approximately 40-60% of the patients, the main source of the problem is not fully understood in about 50% and is classified as idiopathic infertility. For this group of patients, new tests that can ensure to make diagnose and that will guide the treatment is needed. In this sense, one of the most discussed topics in recent years is "Sperm DNA Damage".

In our study, DNA fragment rates were examined using SCD (Sperm Chromatin Dispersion) test in samples obtained from 48 cases with a history of infertility who have been diagnosed with non-normozoospermia, and the DNA fragmentation rates of these samples were compared with 50 samples of normozoospermic individuals known to be fertile.

In the DNA fragmentation analysis by the SCD test, the frequency of spermatozoa assessed as having small halo/without halo was 45% in the non-normozoospermic group, whereas this rate was 24% in the control group. The difference between the groups was statistically significant ( $p < 0.001$ ).

In the sperm samples, the chromosomes 13, 18, 21, X and Y disomy frequencies and diploidy rates, detected by Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) technique were compared between the infertile and fertile groups, and then the correlation between the fragmentation rates and chromosome aneuploidy/polyploidy frequencies were evaluated.

While a statistically significant difference in the total halo rate was revealed between the patient and control groups with 13 and 18 disomies, no significant correlation was found between the the autosomal/sex chromosomal aneuploidies and small halo that is a fragmented DNA marker. However, it was noticed that as the diploid spermatozoa ratios that we can express as polyploidy increases, the small halo ratio also increases significantly.

We suggested that not only routine spermiogram and morphological sperm analysis in clinical evaluation of suspected-infertile males, but also DNA fragmentation rates should also be assessed. Besides, due to the fragmentation-aneuploidy correlation, preimplantation genetic screening approach in cases with high DNA Fragmentation Index (DFI) rates who will benefit from assisted reproductive techniques have a potential to increase the success rate of Technology for Assisted Reproductive Technology (ART)

Keywords: Sperm DNA fragmentation, SCD (Sperm Chromatin Dispersion), sperm FISH, male infertility, chromosome aneuploidy.



## Tablo Dizini

Tablo 2.1 Erkek infertilite nedenleri ve ilişkili faktörler	4
Tablo 2.2 İnsan semen özellikleri için WHO referans değerleri	6
Tablo 2.3 Semen analizinde saptanan anomaliler	8
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan genel ve amaca yönelik cihazlar	27
Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan genel ve amaca yönelik kimyasal Malzemeler	27
Tablo 4.1 Çalışma gruplarının sperm özellikleri	35
Tablo 4.2 Araştırma ve kontrol grubu spermatozoa örneklerinde kromozom anöploidisi sıklıkları	40
Tablo 4.3 Normozoospermik olmayan olguların spermatozoalarında saptanan anöploidilerin ve diploidinin hasta alt gruplarındaki dağılımları	41
Tablo 4.4. Araştırma ve kontrol grubu örneklerinin halo değerlendirmeleri	42
Tablo 4.5 Normozoospermik olmayan örneklerin alt gruplarında saptanan DNA fragmentasyon değerleri	43
Tablo 4.6 Araştırma ve kontrol gruplarında saptanan SCD testi ve FISH analizi verilerinin korelasyonları	46



## **Şekil Dizini**

Şekil 2.1 Gametogenezin Aşamaları	11
Şekil 2.2 A. Testis Yapısı B. Seminifer Tubül	12
Şekil 2.3 Germ hücrelerinin geçirdiği evreler	13
Şekil 2.4 İnsan seminifer tübül epiteli	15
Şekil 2.5 Akrozomun oluşumu	16
Şekil 2.6 Sperm kromatin yapısı	17
Şekil 2.7 Sperm kromatin yapısı için halka-ilmek modeli	17
Şekil 2.8 SCD testi ile DNA bütünlüğü analizi	25
Şekil 3.1 Normozoospermik ve non-normozoospermik semen örneklerinden yapılan DNA fragmantasyon analizi ve anöploidi analizi algoritması	29
Şekil 4.1 Poliploidi ve Anöploidi FISH görüntüleri	36
Şekil 4.2 Hasta Gruplarına ait ortalama small halo değerlerinin grafiksel gösterimi	43
Şekil 4.3 Hasta Gruplarına ait ortalama medium halo değerlerinin grafiksel gösterimi	44
Şekil 4.4 Hasta Gruplarına ait ortalama big halo değerlerinin grafiksel gösterimi.	44
Şekil 4.5 SCD testi ile değerlendirilen küçük/degrade halo görüntüleri	45
Şekil 4.6 SCD testi ile değerlendirilen orta ve büyük halolar	45

## **Simge ve Kısaltmalar Dizini**

SCD : Sperm Chromatin Dispersion

TUNEL : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling

AOT : Akridin Oranj Testi

SCSA : Sperm Kromatin Yapı Testi

COMET : Basit Hücre Jel Elektroforezi

CBVAD : Konjenital Bilateral Vas Deferans Yokluğu

NP:Non-Progresif motilite

PR:Progresif Motilite

ICSI : Intra-Cytoplasmic Sperm İnjeksiyonu

SRY : Cinsiyet Belirleyici Gen

AZF: Azoospermia factor

DFI: DNA Fragmantasyon indeksi

YÜT : Yardımcı Üreme Teknikleri

ART : Yardımcı Üreme Teknolojileri

IVF : In Vitro Fertilizasyon

TESE: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu

ISNT : In Situ Nick Translasyon

CAT (chloramphenicol acetyltransferase reporter)

FISH : Floresan In Situ Hibridizasyon

## **Simge ve Kısaltmalar Dizini (Devam Ediyor)**

dUTP : Deoksiüridin Trifosfat

PBS: Phosphate buffered saline

SSC : Saline-Sodium Citrate

DDT : Dithiothreitol

LIS : Diiodosalicylic acid lithium salt

USP9Y : Ubiquitin Specific Peptidase 9, Y-Linked

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

$\mu$ l : Mikrolitre

ml : Mililitre

## İçindekiler

KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
Özet	iii
Summary	v
Tablo Dizini	viii
Şekil Dizini	viii
Simge ve Kısaltmalar Dizini	ix
1- GİRİŞ VE AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilitenin tanımı	3
2.2. Epidemiyoloji	3
2.3. Semen Analizi (Spermiyogram)	5
2.3.1. Semen Makroskopik İncelenmesi	5
2.3.2. Semen Mikroskopik İncelemesi	6
2.4. Erkek İnfertilitesini Etkileyen Genetik Faktörler	8
2.4.1. Kromozom Anomalileri	8
2.4.2. Y kromozomu mikrolelesyonu	9
2.4.3. Tek gen anomalileri	10
2.5. Gametogenez	11
2.6. Spermatogenez	12
2.6.1. Anormal Spermatogenez	16
2.7. Spermatozoon DNA'sı	16
2.7.1. Spermde DNA hasarı	20

2.8. Sperm DNA Bütünlüğü Ve İnfertilite	20
2.8.1. Sperm DNA'sında çift dal kırık oluşumu	21
2.9. Spermatozon DNA Fragmentasyon Testleri	22
2.9.1 TUNEL	23
2.9.2 In situ Çentik Okuma Tayini (In Situ Nick Translation Assay) (NT)	
2.9.3 DNA breakage detection- FISH Yöntemi	23
2.9.4 Sperm Kromatin Dispersiyon (SCD) Testi	24
2.9.5 Basit hücre jel elektroforezi (COMET)	25
2.9.6 Sperm Kromatin Strüktür Analizi (SCSA)	25
2.9.7 Akridin Oranj Testi (Acridine Orange Test) (AOT)	26
2.10 Sperm DNA Fragmentasyonu ve Kromozom Anöploidileri İlişkisi	26
3- GEREÇ ve YÖNTEMLER	27
3.1. Kullanılan Cihazlar	27
3.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	27
3.3. Olguların Seçimi	28
3.4. Uygulanan yöntemler	29
3.4.1. Sperm FISH Analizi ile Anöploidi Tayini	29
3.4.1.1 Örneklerin FISH Analizine Hazırlanması	29
3.4.1.2 Sperm FISH Analizi Preperat Hazırlığı	30
3.4.1.3 Preperat/Prob Denaturasyonu	31
ve Hibridizasyon	
3.4.1.4 Hibridizasyon sonrası yıkamalar	31
3.4.1.5 Sperm FISH Mikroskop Analizi	31

3.4.2. Sperm Kromatin Ayrılma Testi (SDF, Halosperm Test)	32
3.4.2.1 Uygulanan test aşamaları	33
3.4.2.2 Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	33
3.5 İstatistik Analizler	34
4- BULGULAR	35
4.1. Çalışmaya Dahil Edilen Olguların Özellikleri	35
4.2. FISH Analizi ile Saptanan Sperm Kromozom Anöploidileri	35
4.3. Olguların SCD Test ile Değerlendirilen Fragmantasyon Oranları	42
5- TARTIŞMA	47
5.1. FISH analizi ile saptanan Sperm Kromozom Anöploidileriyle Literatür bilgilerinin karşılaştırılması	47
5.2. Olguların Belirlenen Fragmantasyon Oranlarıyla Literatür Bilgilerinin karşılaştırılması	49
5.3. DNA fragmentasyonu oranları ile sperm kromozom anöploidi/diploidi ilişkisinin Literatür Bilgileriyle Karşılaştırılması	52
6- SONUÇ VE ÖNERİLER	54
7-KAYNAKLAR	56

## 1- GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, reproduktif çağda olan bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır (Bungum, Bungum, & Giwercman, 2011). İnfertilite reproduktif çağdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir (World Health Organization, 2010). Tüm infertil çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü tespit edilmiştir. Hem erkek hem de kadına ait patolojiler birlikte gözlenirken %15 çiftte ise tüm tanısız tetkiklere rağmen bir infertilite nedeni tanımlanamamaktadır. Bu durum "açıklanmayan (idiyopatik) infertilite" olarak ifade edilmektedir (Bungum et al., 2011).

Açıklanamayan infertilitenin etiyolojisi net olarak bilinmemektedir. Ancak fertilitenin alt sınırındaki hastaları kapsadığı ya da rutin infertilite değerlendirilmesi ile saptanmayan fekditedeki bir sonuçtan olduğu düşünülmektedir. Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde kullanılan ilk ve temel test standart semen analizidir. Tüm infertil erkeklerin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Standart semen analizinde semen volümü ve Ph, sperm konsantrasyonu, hareketliliği, morfolojisi, sperm lökosit sayısı değerlendirilen parametrelerdir(Barratt, Mansell, Beaton, Tardif, & Oxenham, 2011).Standart semen analizi erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde rutin olarak kullanılmakla birlikte değerlendirilen parametreler fertil ve infertil erkeklerin kesin ayrımında yetersiz kalabilmektedir. Standart semen analizi çok önemli bilgiler vermesine rağmen gebelik elde etmeyi öngörmede bazı sınırlamaları vardır (Natali & Turek, 2011).

Erkek infertilitesi, etyolojisinde genetik faktörlerin de yer aldığı kompleks bir özelliktir. Erkek infertilitesi olgularının büyük oranda idiopatik olarak adlandırılması, spermatogenez ve sperm fonksiyonlarının temel mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesinin ve sürece etkilerinin net bilinmemesi sebebiyledir. Bu noktada son zamanlarda çalışmalar, spermatogenez süreci içinde DNA bütünlüğünün fertilitate üzerindeki etkisinin araştırılması üzerine odaklanmıştır. Sperm DNA içeriğinin, semen kalitesini ve fertilitate potansiyelini gösteren ek bir parametre olduğu düşünülmektedir.(R. J. Aitken & Henkel, 2011) . Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalarda infertil erkeklerdeki sperm kromatin defektinin ve DNA kırıklarının fertil hastalara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Kromatin ve DNA bütünlüğü embriyonik gelişimin desteklenmesini sağlamaktadır. DNA bütünlüğü sağlayan spermlerin hem doğal konsepsiyonda hem de yardımcı üreme teknikleri (YÜT)'n etkilerinin olduğunu gösteren fazla sayıda kanıt ortaya konulmuştur. (Luke Simon et al., 2010) .

Bir diğer nokta da spermatozoonun nükleer kalitesinin özellikle İnfertil çiftlerde uygulanan yardımcı üreme teknikleri başarılarında gözlenen olumlu ya da olumsuz etkileridir. Yapılan çalışmalarda semen parametreleri ve sperm anöploidi oranları arasındaki ilişki gösterilmiştir (Qinghua Shi & Martin, 2001). Yüksek sperm anöploidi oranı yardımcı

üreme teknikleri başarısında negatif bir parametredir. Anöploid ve diploid sperm üretimine yatkınlık kromozomal olarak anormal konseptus riskini arttıracaktır. Sonuç olarak bu durum implantasyon başarısızlığı ve/veya gebelik kayıplarına yol açacaktır. İnfertil erkeklerin spermleri kullanılarak gerçekleştirilen, yardımcı üreme tekniklerinden biri olan ICSI sonrası oluşan kromozom anomalilerinin büyük kısmının paternal kaynaklı olduğu bildirmiştir (Mehdi, Smatti, Saad, Guerin, & Benchaib, 2006; Spanò et al., 2000) .

Yüksek anöploidi düzeyleri, anormal semen parametreleri olan infertile olgularının fragmentli DNA içeren spermatozoalarında bildirilmiş (Brahem, Jellad, Ibala, Saad, & Mehdi, 2012) olmakla birlikte herhangi bir ilişki olmadığını ortaya koyan çalışmalar da bulunmaktadır (Tandara et al., 2014) . Tartışmalı olan bu konuya ilişkin yapılan bir çalışma da DNA fragmentasyon testi sonuçları ile başarılı/başarısız IVF gebeliklerde değerlendirilmiştir (Balasuriya, Speyer, Serhal, Doshi, & Harper, 2011).

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

Çalışmamızın bu kısmında Üniversitemiz Üreme Sağlığı Merkezinde tanımlanamayan infertilite tanısı alan olgulardan alınan semen materyalinde SCD (halo test) yöntemiyle saptanan DNA fragmentasyon oranları ile başarısız IVF/ICSI gebelik ürünlerinde sıklıkla gözlenen kromozom 13, 16, 18, 21, 22, X ve Y anöploidileri arasındaki ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2- GENEL BİLGİLER

### 2.1- İnfertilitenin tanımı

İnfertilite, kadın yaşı 35 yaş altında olduğunda bir yıllık korunmasız düzenli ilişkiye rağmen gebe kalınmaması olarak tanımlanırken; kadın yaşı 35 yaş üzerinde ise, bu süre 6 ay olarak belirtilmektedir(Jungwirth et al., 2012). Bir kadının hiç gebe kalamaması durumunda "primer infertilite", bir ya da daha fazla gebelik öyküsü varlığında "sekonder infertilite" ifadeleri kullanılmaktadır.

### 2.2- Epidemiyoloji

İnfertilite dünya çapında çiftlerin yaklaşık %15'inde görülen bir üreme sağlığı problemidir. Prevalans gelişmiş ülkelerde daha az, gelişmekte olan ülkelere ise daha siktir. Çiftlerin 1/8 kadarında hiç çocuk sahibi olamama, 1/6 kadarında ise ilk çocukta sonra gebelik oluşmaması öyküsü bulunmaktadır (Jungwirth et al., 2012). 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 faktörlerden etkilenmektedir (Jungwirth et al., 2012).

Olguların %30-40 kadarında yukarıda listelenen faktörler bulunmamasına rağmen erkek infertilitesinin olduğu gözlenmektedir ki bu grup "idiyopatik erkek infertilite" olarak ayrıca değerlendirilmektedir. Bu grupta yer alan olgularda, fertilitayı etkileyecek öykü bulunmamakta, fizik muayene, endokrin, genetik ve biyokimyasal laboratuvar bulguları normal olarak saptanmaktadır. Ancak semen analizinde patolojik verilere rastlanabilmektedir. Tablo2.1'de erkek-infertilitesi ile ilişkili faktörler ve sıklıkları listelenmiştir.

Erkek faktörlü infertilite çoğunlukla sperm olmaması veya düşük sperm sayısı ya da motilite azlığı gibi semen analizi anomalileri ile karakterize edilmektedir. Ancak günümüzde rutin olarak kullanılabilen erkeğe ilişkin markerlerin tanı becerisi sınırlı kalmakta, infertil çiftlerde erkek faktörünün gerçek prevalansı beklenenin altında tahmin edilmektedir (Bieniek, Drabovich, & Lo, 2016).

Tablo 2.1 Erkek infertilite nedenleri ve ilişkili faktörler

Tanı	Sıklık % (n=12,945 olgu)	Azospermik olgu % (n=1446)
Tümü	100	11.2
Nedeni bilinen infertilite	42.6	42.6
İnmemiş testis	8.4	17.2
Varikosel	14.8	10.9
Sperm antikorları	3.9	-
Testiküler tümör	1.2	2.8
Diğerleri	5	1.2
İdiyopatik infertilite	30	13.3
Hipogonadizm	10.1	16.4
Klinefelter's syndrome (47, XXY)	2.6	13.7
XX male	0.1	0.6
Nedeni bilinmeyen primer hipogonadizm	2.3	0.8
Sekonder hipogonadizm (hipogonadotropik)	1.6	1.9
Kallmann sendromu	0.3	0.5
İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm	0.4	0.4
Diğerleri	0.8	0.8
Geç dönemde gelişen hipogonadizm	2.2	-
Gecikmiş puberte	1.4	-
Genel/sistemik hastalık	2.2	0.5
Malign hastalık	7.8	12.5
Testiküler tümör	5.0	4.3
Lenfoma	1.5	4.6
Lösemi	0.7	2.2
Sarkom	0.6	0.9
Ejakulat bozuklukları	2.4	-
Obstruksiyon	2.2	10.3
Vazektomi	0.9	5.3
Kistik Fibrozis	0.5	3.1
Diğerleri	0.8	1.9

Erkek fertilitte problemlerinin katkı oranının yüksek olması nedeniyle çiftlerin değerlendirilmesinde öncelikle erkeğin değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir. Amerikan Üroloji Derneği tarafından medikal öykü ve fiziksel muayene ile iki farklı dönemde yapılan semen analizi önerilmektedir(Jarow et al., 2010).

## **2.3- Semen analizi (Spermiyogram)**

Normal koşullar altında semen (meni); hipotalamo-pitüiter testiküler aks dahilinde testislerin işlevi ve posttestiküler boşaltma kanallarıyla aksesuar bezlerin salgılarından oluşan bir son üründür.

İnfertil çiftin değerlendirilmesinde erkek faktörünü saptamak amacıyla kullanılan ilk basamak test semen analizidir. Semen analizi, standardize edilmesi oldukça güç bir tetkiktir. Çünkü kişiden kişiye olduğu kadar, aynı kişide bile cinsel perhiz süresi, ısı farklılığı, günün farklı saatleri, mevsimler, semen örneğinin verildiği yer, çalışma koşulları ve emosyonel duruma göre farklılık göstermektedir. Sayılan nedenlerden dolayı oldukça değişik sonuçlar verebilen semen analizi aynı kişide 3-4 hafta arayla iki kez yapılmakta ve parametreler arasındaki farklılık %20 den fazla ise üçüncü kez yinelenmektedir(Olmedo,2017).

Semen analizi makroskopik ve mikroskopik incelemelerden oluşmaktadır. Makroskopik incelemede semen, likefaksiyon, görünüm, volüm ve pH özellikleri yönünden değerlendirilirken morfoloji ve motilite açısından değerlendirilmesi mikroskopik olarak gerçekleştirilmektedir. (Tablo 2.2)(World Health Organization, 2010).

### **2.3.1. Semen makroskopik incelenmesi**

#### **2.3.1.1. Semen analizinin fiziksel parametreleri**

**Koagülasyon:** Ejakülasyon sonrası semenin sıvı halden semisolid hale geçmesidir. Koagülasyon olmadığında seminal vezikül ve vas deferensin yokluğundan şüphelenilir.

**Likefaksiyon:** Koagüle olan semen 5-20 dakika içinde likefiye olur bu süre oda sıcaklığında 60 dakikaya kadar uzayabilir.

**Viskosite:** Sperm örneğinin yoğunluğu olarak da ifade edilir. 20 mm'ye kadar normal, 20-40 mm arası hafifçe artmış, 40-80 mm arası oldukça artmış ve 80 mm üstü ise çok artmıştır.

**Volüm:** 3-5 günlük cinsel yoksunluk sonrası 2-6 ml'dir. Semen ana hacmi seminal veziküller ve prostat bezi salgılarından gelir.

**Görünüm:** Normal örnek 1 saat içinde görünüm açısından değerlendirilmelidir. Normalde gri-opalesan görünümde ancak cinsel yoksunluk süresi artarsa sarımsı renge dönüşür. Ayrıca, renk değişikliği muhtemel üriner sistem patolojileri ile ilişkili olabilir. Semende eritrositlerin bulunması halinde ise renk, kırmızı-kahverengidir (Olmedo,2017).

pH: Ejakülasyondan sonra 1 saat içinde ölçülmelidir. Normal pH 7.2'nin üzerindedir.

Tablo 2.2 İnsan semen özellikleri için WHO referans değerleri(Luke Simon et al., 2010)

Hacim	≥ 2ml
Ph	7.0-8.0
Sperm konsantrasyonu	≥20 milyon/ml
Total spermatozoa sayısı	≥40 milyon/ejakulat
Motilite (Hareketlilik)	Ejakulasyonu takiben 1 saat içinde spermlerin ≥ %50 ileri progresyon ( hareket) göstermesi (a + b kategorisinde); veya ≥ %25 hızlı (a kategorisinde) progresyon göstermesi
Morfoloji	≥ %14 normal şekil ve formda (Kruger &Menkfeld kriterleri) ≥ % 30 sperm normal morfolojide
Vitalite (Canlılık)	≥ %75 canlı sperm
Lökosit	< 1 milyon/ml
Immunobead testi	< %50 partikül bağlı spermatozoa
MAR (Mixed antiglobulin rxn) testi	< %50 partikül bağlı spermatozoa

### 2.3.2. Semen mikroskopik incelemesi

**Sperm sayımı (Derişim):** Ejakülatta bulunan sperm sayısı likefaksiyonunu tamamlamış örnekte iki yöntemle değerlendirilebilir:

1) Spermlerin hepsi immobilize edilerek sayım yapılır ya da

2) Hareketli ve hareketsiz spermler birlikte değerlendirilir.

Sperm sayımı için yaygın olarak makler sayım kamarası kullanılmaktadır.

**Sperm Hareketliliği (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.

- Progresif Motilite (PR): Hızına bakılmaksızın spermatozoa aktif hareket etmektedir. Bu hareket lineer ya da büyük daireler şeklinde olabilir.
- Non-progresif motilite (NP): Progresyon dışındaki diğer tüm hareket örneklerini kapsar. Örnek olarak küçük daireler

halinde yüzme, baş kısmını zorla hareket ettiren flagella hareketler, sadece flagella atımlar sayılabilir.

- İmmotil: Hareket yoktur.

Progresif motilite ve non-progresif motilite birlikte toplam motilite olarak adlandırılır. Toplam motilite için alt sınır %50 dir. Progresif motilite sınırı %32 olarak belirlenmiştir (Delilbaşı, 2008).

### **Sperm Morfolojisi:**

**Baş:** 2-3 µm genişlikte ve 4-5 µm uzunlukta, konturları düzgün, oval, akrozom başın %40-70'ini kaplayacak şekilde olmalı ve vakuol içermemelidir .

**Boyun:** 4-5 µm uzunluğunda, düzgün olmalı ve 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.

Spermatozoa dışında diğer hücreler: Bunlara topluca yuvarlak hücreler denir. Bunlar genitoüriner sistemin epitel hücreleri, prostat hücreleri, spermatojenik hücreler ve lökositlerdir. Normal bir ejakülatta  $5 \times 10^6$ /ml'den fazla yuvarlak hücre olmamalıdır. Lökosit sayısı  $1 \times 10^6$  /ml' yi geçmemelidir.(Delilbaşı, 2008)

Semen analizlerinde normal değerlerden sapmalarda kullanılan nomenklatur Tablo 2.3'te özetlenmiştir. (Delilbaşı, 2008)

Tablo 2.3. Semen analizinde saptanan anomaliler

<b>Anomali</b>	<b>Tanımı</b>
<b>Aspermia</b>	Ejakülatın olmaması
<b>Hematospermia</b>	Ejakülatta kan olması
<b>Lökositospermia</b>	Ejakülatta beyaz küre olması
<b>Hipospermia</b>	Ejakülat volümünün <1 ml olması
<b>Hiperspermia</b>	Ejakülat volümü >6 ml.
<b>Azoospermia</b>	Ejakülatta sperm olmaması
<b>Oligozoospermia</b>	<15 x 10 <sup>6</sup> sperm /ml olması
<b>Polizoospermia</b>	>250 x 10 <sup>6</sup> sperm /ml olması
<b>Asthenozoospermia</b>	Zayıf motilite ve/veya ileri doğru hareketlilik olması
<b>Teratozoospermia</b>	Normal şekilli sperm yüzdesinin azalmış olması (<%14 Kruger)
<b>Globozoospermia</b>	Yuvarlak başlı akrozomsuz sperm olması
<b>Nekrozoospermia</b>	Supravital boyama ile tüm spermlerin ölü olması

## 2.4-Erkek infertilitesini etkileyen genetik faktörler

Yaklaşık 3 ay süren insan spermatogenezi; mayozun başarılı şekilde tamamlanmasında binlerce testis-spesifik genin birbirleriyle koordineli ekspresyonları ile gerçekleşmektedir. Hataya açık olan çok hassas ve kompleks olaylar zincirinin bir aşamasındaki hata, takip eden tüm spermatogenik süreci etkileyebilmekte ve oligozoospermiden azospermiye kadar değişen hatalı spermatogeneze neden olabilmektedir. Erkek infertilitesinde genetik etyoloji çok iyi bilinmektedir(Sarrate et al., 2005).

### 2.4.1. Kromozom anomalileri

Kromozom anomali sıklığı, sperm üretimi ile ters orantılıdır. Normal sperm konsantrasyonuna sahip erkeklerin <%1 kadarında kromozom anomalisi saptanırken şiddetli oligospermisi olan olguların %5'inde ve azospermisi olan olguların ise %10-15 kadarında kromozom anomalisi bulunmaktadır (Flannigan & Schlegel, 2017; Gonzalez-Merino, Hans, Abramowicz, Englert, & Emiliani, 2007). Önceki çalışmalarda da (Durak Aras et al., 2012)oligozoospermik olgularda anöploidi oranının normozoospermik olgulara göre anlamlı oranda arttığı saptanmıştır. Bu nedenle özellikle sperm sayısı anomalileri olan olgularda, tekrarlayan gebelik kaybı ve/veya yardımcı üreme teknikleri ile başarısızlığın gözlemlendiği erkeklerde kromozom analizi yapılması önerilmektedir (Piomboni, Stendardi, & Gambera, 2014). Spermatogenez anomalileri olan olguların değerlendirilmesinde öncelikle kromozom analizi endikedir.

Kromozom anomalileri arasında otozomal ve cinsiyet kromozomlarına özgü anöploidiler sıklıkla gözlenmektedir. Anöploidiler mayoz I veya mayoz II'deki kromozom ayrılamaması (nondisjunction) ya da anafazda geri kalma (anaphase lagging) gibi bölünme hatalarına bağlı olarak ortaya çıkmaktadırlar. Nonobstruktif şiddetli oligozoospermisi veya azospermisi olan erkeklerde özellikle cinsiyet kromozomu anöploidi oranı çok yükselmektedir(Sarrate et al., 2005).

Klinefelter sendromu (KS), paternal veya maternal mayotik bölünme (I. mayoz) hatası sonucu ekstra X kromozomu varlığında ortaya çıkan, sıklığı 1:500 olan bir sendromdur. Mozaik olmayan: 47,XXY veya mozaik (47,XXY/46,XY) formu bulunmaktadır. Bir çalışmada bazı KS olgularında az sayıda matür spermatozoanın bulunabileceği ve IVF/ICSI amaçlı kullanılabilmesi belirtilmiştir(Fullerton, Hamilton, & Maheshwari, 2010).

XYY kromozom kuruluşu, 1:1000 canlı erkek doğumda gözlenen diğer bir anomalidir. Mayoz II'deki kromozom ayrılamaması sonucu ekstra Y kromozomunun varlığı ile karakterizedir. XYY kromozom kuruluşuna sahip erkeklerin çoğunluğu fenotipik olarak normaldir, sperm sayısı açısından normal değerlerden azospermiye kadar değişen bir tablo çizmektedir. Fertilité değişken olmakla birlikte olguların semen örneklerinde anormal kromozom kuruluşuna sahip spermatozoa oranının yüksek olduğu bildirilmektedir (Abdel-Razic, Abdel-Hamid, & ElSobky, 2012).

46,XX testiküler anomali (46,XX erkek sendromu), yaklaşık 1:20.000 erkek yenidoğanda gözlenen bir anomalidir. Olguların %90 kadarında SRY geni (Yp11.2) mayotik hataya bağlı olarak X kromozomuna veya bir otozoma transloke olmuş halde bulunmaktadır. SRY negatif 46,XX erkekler, fenotipik anomalilerle birlikte azospermiktirler ve testis biyopsisinde Sertoli cell-only özelliği bulunmaktadır. Bu nedenle bu vakalarda TESE (testicular sperm extraction) uygulanmamalıdır.

Resiprokal veya Robertson tipi translokasyonlar, normal erkeklere göre infertil erkeklerde 4-10 kat daha yüksek sıklıkta gözlenmektedir (Song, Chiba, Ramasamy, & Lamb, 2016). Önceki çalışmalar, dengeli kromozom translokasyonunun, erkeklerde spermatogenez sırasında mayotik hata oranının artmasına ve aşırı veya yetersiz genetik materyale sahip sperm üretimine neden olduğunu göstermiştir. (Sarrate et al., 2005)

#### **2.4.2. Y kromozomu mikrolelesyonu**

Y kromozomu mikrolelesyonları, erkek infertilitesinin en iyi bilinen genetik nedenleri arasındadır. Nonobstruktif azospermi veya şiddetli oligospermi olgularının %10-15 kadarında Y kromozomu mikrolelesyonları gözlenmektedir. İlk olarak 1976'da Tiepolo ve Zuffardi tarafından azospermik olgularda Yq11 delesyonu olarak rapor edilmiştir

(Tiepolo & Zuffardi, 1976). Bu bölgede Azoospermi Faktörü (AZF) geni lokalizedir ki spermatogenezde rol oynayan bir gendir. AZF bölgesinde AZFa, AZFb ve AZFc alt bölgeleri bulunur ki AZFc bölgesi delesyonları, azospermik olguların %13, oligozoospermik olguların %6 kadarında gözlenmektedir. AZFa ve AZFb bölge delesyonları daha nadir saptanmaktadır. Bu bölgelerde premeiotic germ hücre gelişiminde rol oynayan USP9Y ve DBY (AZFa bölgesi), RBMY1 (testis-spesifik splicing faktör) ve PRY (apoptozis mekanizmasında rol oynar) (AZFb bölgesi) ve DAZ (spermatogenik süreçte görev alır) (AZFc) bölgesi genleri lokalizedir. AZFa ve/veya AZFb bölgelerinin delesyonu durumunda spermatozoa bulunmadığı için bu delesyonlara sahip olgularda TESE uygulaması uygun değildir (Song et al., 2016).

### **2.4.3. Tek gen anomalileri**

Hipogonadotropik hipogonadizm (HH), erkek infertilitesine neden olan diğer bir etkidir. Testiküler yetmezlik ile ilişkilidir. Kallmann Sendromu bir idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm sendromudur. Xp'de lokalize KAL1 geni ve kromozom 8' de lokalize FGFR1 geni delesyonu sorumlu tutulmaktadır (Bhagavath & Layman, 2007).

Konjenital hipopituitarizm de HH ile ilişkili testiküler yetmezliğe neden olan bir etkidir. HESX1, LHX3, LHX4, PROP1, POU1F1 ve son dönemlerde saptanan SOX3 ve SOX2 gen mutasyonları rol oynamaktadır (Wu & Chan, 1999). Leydig hücre hipoplazisi de nadir görülen testiküler yetmezlik nedenleri arasındadır (J. Yu, Chen, Ni, & Li, 2011).

Vas deferensin konjenital bilateral agenesisi (CBAVD) infertil erkeklerin %1 kadarında gözlenir ve obstrüktif azospermi olgularında yüksek sıklıkta gözlenen bir durumdur. Bu grup içerisinde bir tek gen düzensizliği olan Kistik fibrozis de dahil edilebilir. CBAVD olgularında spermatogenez genellikle normaldir ve sperm, epididimis veya testisten IVF/ICSI uygulamaları için alınabilir (D. Evenson, Darzynkiewicz, & Melamed, 1980).

## **2.5- Gametogenez**

Gametogenez veya gamet formasyonu, kadın üreme hücresi ile erkek üreme hücresi spermatozoon'un oluşum (sırasıyla oogenez ve spermatogenez) ve maturasyon süreçlerini içerir.

Germ hücrelerinin;

- Ortaya çıkışları
- Göçleri
- Farklanmaları

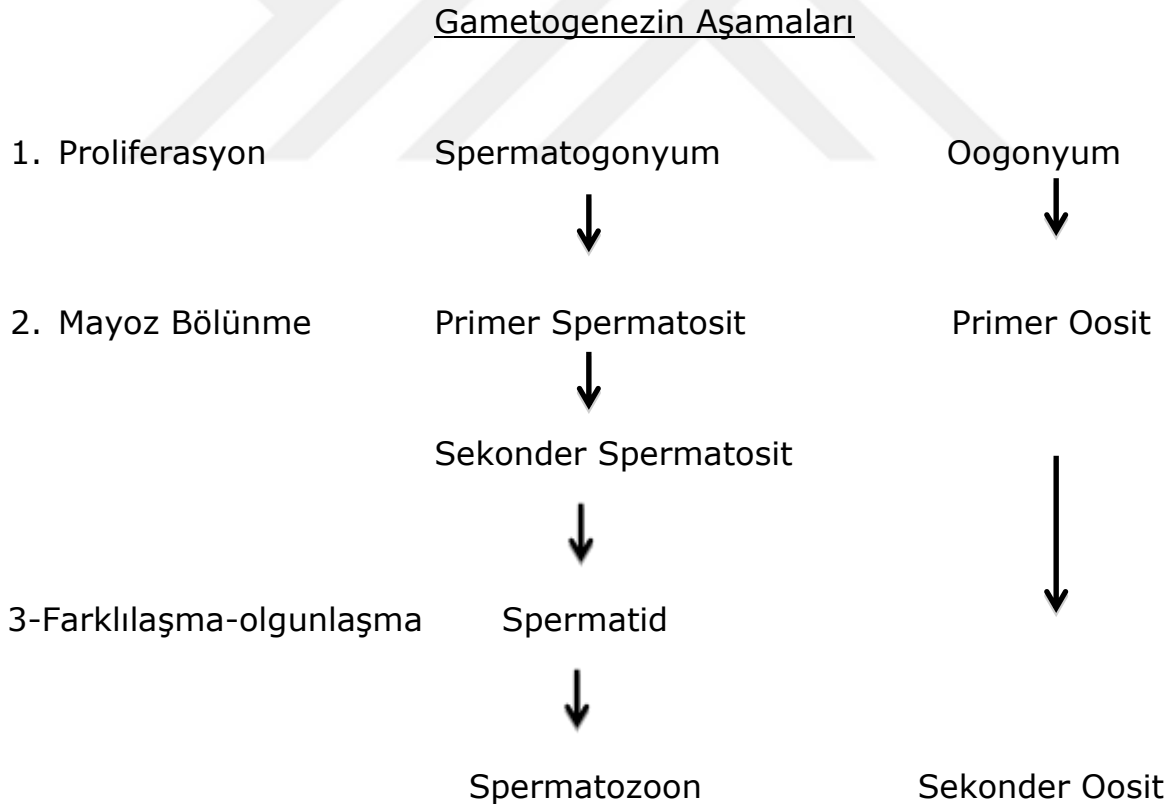


- Çoğalmaları (mitoz ve mayoz)
- Olgunlaşmaları
- Atılma
- Dölllenme (Fertilizasyon)
- Embriyo oluşumu

aşamaları şeklinde gerçekleşir.

### 2.5.1. Primordiyal germ (eşey, cinsiyet) hücreleri (PGH)

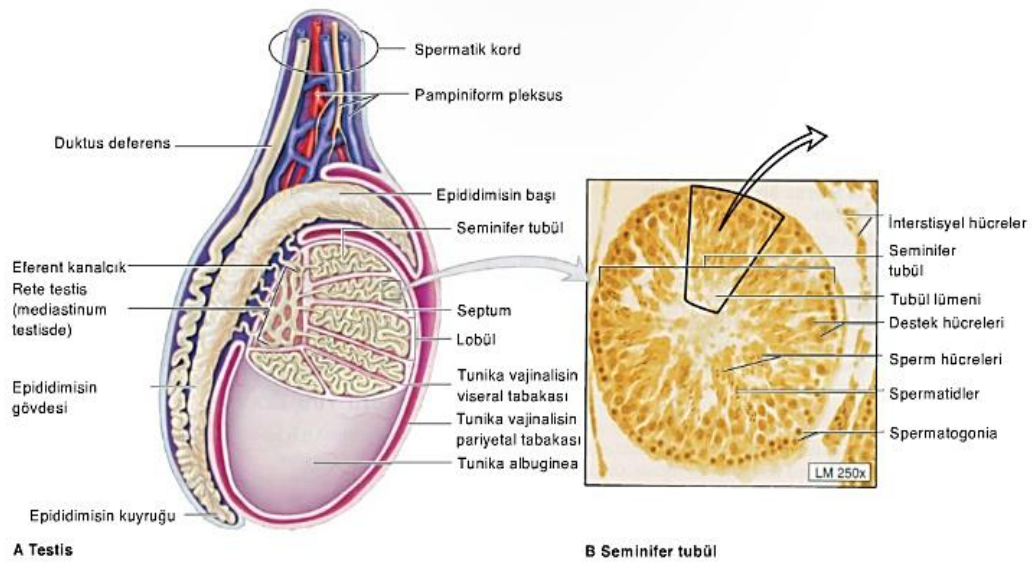
Kadında ve erkekte gametleri oluşturmak üzere, gelişimin 2.haftasında epiblast tabakasından köken alan, ilk kez 4.haftada vitellüs kesesi duvarında ortaya çıkan ve 5.haftanın sonuna kadar gonadlara göç eden, bu göçleri sırasında ve sonrasında mitozla çoğalan hücrelerdir. Genetik olarak dişi gonadlarda (over) oogoniyalara, erkek gonadlarda ise spermatogoniyalara dönüşürler. Primordial germ hücrelerinin, olgun eşey hücresine farklılaşması, erkekte spermatogenezis; dişi de oogenezis olarak bilinir (Sadler, 1996).



Şekil 2.1.Gametogenezin Aşamaları

## 2.6. Spermatogonez

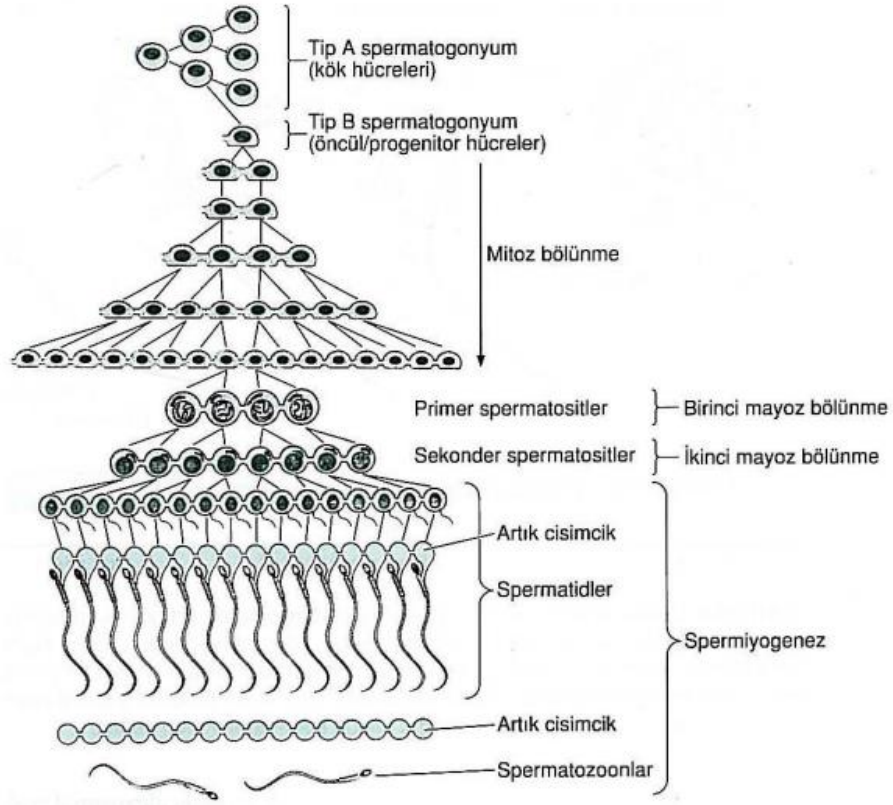
Spermatogonez, spermatogoniumların spermatozoa haline dönüşmesini sağlayan olayların tümünü kapsayan süreçtir. Primordial üreme hücrelerinin farklanması erkeklerde pubertede başlarken, dişide gelişimin 3. ayında intrauterin dönemde başlar. Erkek üreme hücreleri doğumda, testisin seks kordonları içinde destek hücreleri tarafından çevrelenmiş büyük ve soluk hücreler şeklinde farkedilebilir (Şekil 2.1). Destek hücreleri, tıpkı folliküler hücreler gibi, testisin yüzey epitelinden kaynaklanan sustentaküler veya sertoli hücreleri olarak bilinen hücrelerdir (Sadler, 1996).



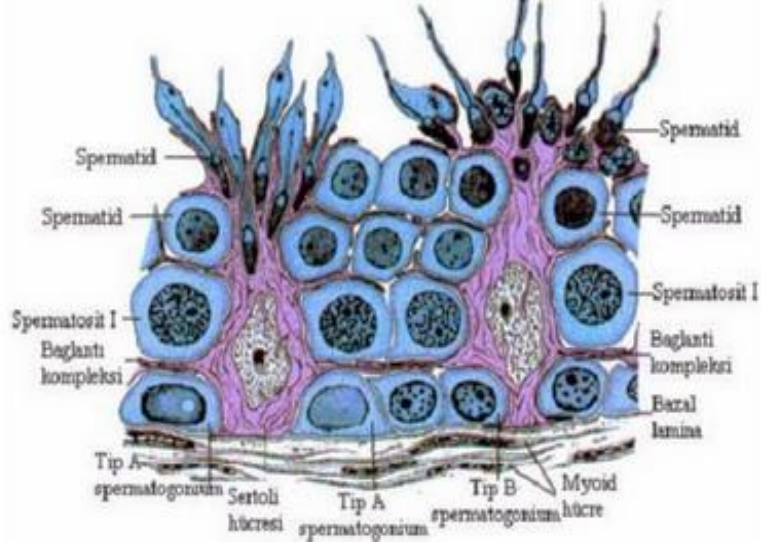
Şekil 2.2. A. Testis Yapısı B. Seminifer Tubül (Mescher, 2013)

Puberteden hemen önce, seks kordonları içinde lümen oluşur ve seminifer tübüller haline gelirler. Eş zamanlı olarak primordial üreme hücreleri de spermatogoniumlara farklılaşırlar. Oluşan spermatogoniumlar iki tiptir: mitoz ile bölünerek, sürekli bir kök hücre kaynağı oluşturan tip A spermatogoniumlar ve primer spermatozoidleri oluşturan tip B spermatogoniumlar. Kök hücrelere kaynak oluşturacak şekilde çoğalan A tipi spermatogoniumların bir kısmı, kök hücre topluluğunu terkederek her biri bir öncekinden daha iyi farklılaşmış spermatogonium generasyonlarına da kaynak oluştururlar (Şekil 2.2). Bu hücrelerin en son bölünmelerinin sonucunda tip B spermatogoniumlar meydana gelir. Tip B spermatozoidler ve bu hücrelerin de daha sonra mitoz bölünme geçirmeleri ile primer spermatozoidler oluşur. Primer spermatozoidler oldukça uzun süren bir profaz safhasına (22 gün) girerler. Bunu hızlı bir şekilde tamamlanan 1.mayoz bölünme ve sekonder spermatozoidlerin oluşumu izler. Sekonder spermatozoidler, derhal 2.mayoz bölünmeye girer ve 23 haploid kromozom içeren spermatidleri meydana getirirler. A tipi hücrelerin kök hücre topluluğundan ayrılmasından, spermatidlerin oluşumuna kadar geçen çoğalma ve farklılaşma süreci boyunca

sitokinezis tamamlanmamış olduğundan, hücreler sitoplazmik köprülerle birbirine bağlanmış durumdadırlar (Şekil 2.2). Böylece tek bir spermatogonium A'dan üreyen hücreler, çoğalıp farklanmaları sırasında birbiriyle ilişkilerini koruyan bir germ hücre topluluğu meydana getirmiş olurlar (Şekil 2.2). Ayrıca farklanma süreci boyunca spermatogonium ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarındaki girintilere gömülü olarak kalırlar (Şekil 2.3). Böylece Sertoli hücreleri, üreme hücrelerini destekler, korur, beslenmelerinde rol alır ve olgun hale gelmiş spermatozoon'un, spermatid sitoplazmasından ayrılıp serbest hale gelmesine yardımcı olurlar (Sadler, 1996; Vicdan & Isık, 1999) (Şekil 2.4).



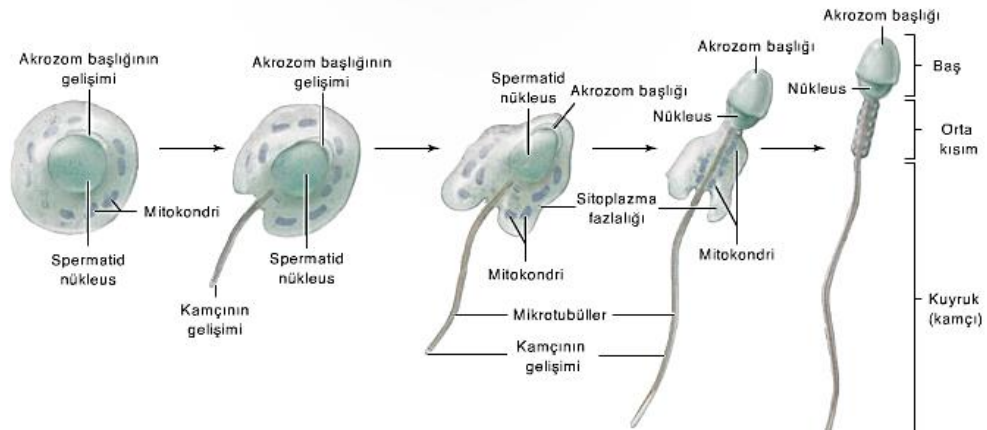
Şekil 2.3. Germ hücrelerinin geçirdiği evreler (Mescher, 2013)



Şekil 2.4. İnsan seminifer tübül epiteli(Ross & Pawlina, 2006)

Spermatidin spermatozoon' a dönüşmesi için geçirdiği değişimlerin tümü "spermiogenez" olarak bilinir. Bu değişimler çekirdeğin yarım yüzü boyunca uzanan ve döllenme sırasında spermiumun oositi çevreleyen tabakaları aşmasını sağlayan enzimleri içeren akrozomun oluşumu (Şekil 2.5); (B)çekirdeğin yoğunlaşması; (C) boyun, orta parça ve kuyruğun gelişimi ve (D)sitoplazmanın büyük bir kısmının dışarı atılmasını içerir (Şekil 2.5).Bir insanda spermatogoniumun olgun spermatozoon haline gelmesi yaklaşık 64 günde tamamlanır (Kierszenbaum & Demir, 2006).

Tam olarak olgunlaşmış spermatozoon, seminifer tübüllerin lümenine girer (Şekil 2.4). Buradan, seminifer tübül duvarındaki kontraktil elemanlarla epididime doğru itilir. Başlangıçta çok az hareket edebilen spermiumların motilitesi, epididimde maksimuma ulaşır (Delilbaşı, 2008; Sadler, 1996; Vicdan & Isık, 1999) .



Şekil 2.5. Olgun spermatozoon oluşumu (Delilbaşı, 2008)

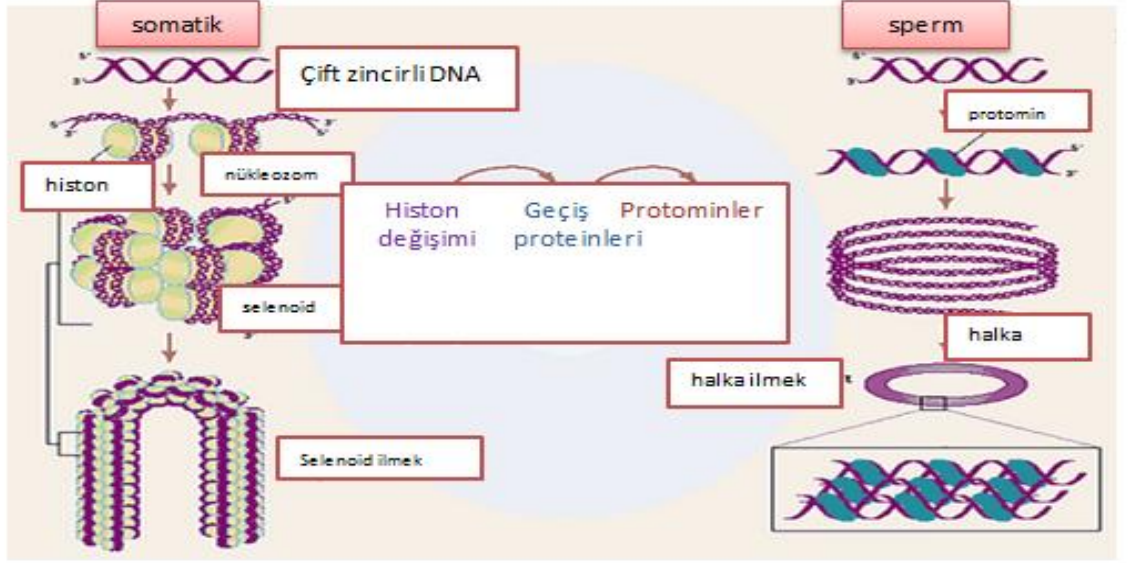
### **2.6.1. Anormal spermatogenez**

- Kriptoorşitizm (inmemiş testis),
- Varikosel,
- Sperm kanallarında tıkanıklık,
- Sperm motilite ve fonksiyon bozukluğu,
- Sperm morfoloji defekti,
- Maturasyon defektleri yol açabilir.

Reprodüktif yaştaki erkeklerin % 6'sında infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Bu olguların yaklaşık % 90'ında da bozulmuş spermatogenez vardır. Normal bir fertil erkekte günde 120 milyon adet sperm yapılmaktadır(Jegou, Pineau, & Toppari, 2002) .

### **2.7- Spermatozoon DNA'sı**

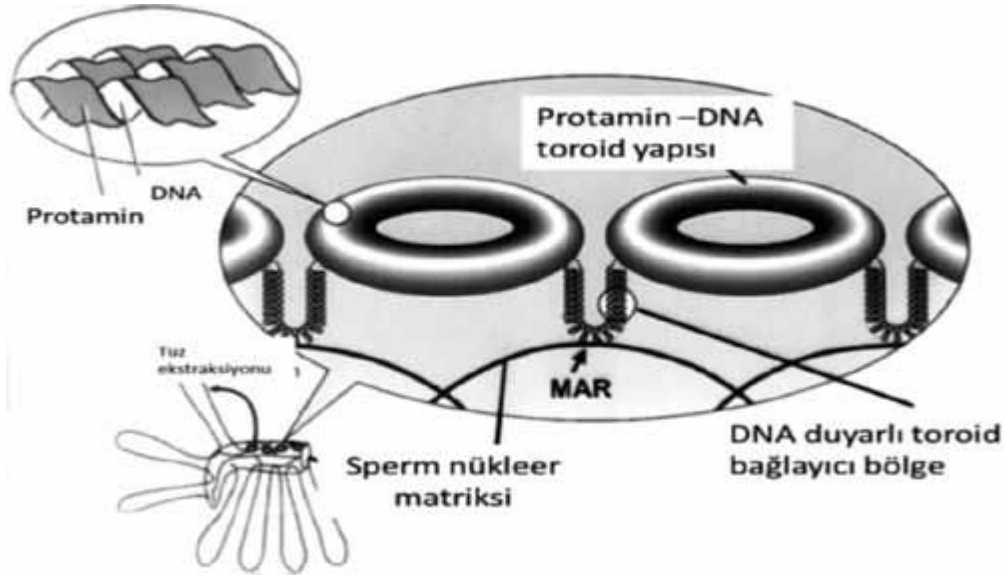
Erkek gametinde nükleus kondensasyonu farklı bir öneme sahiptir. Bunun sebebi; spermatogenik seri hücrelerinin kromatin yapısında diğer somatik hücrelerden farklı bazı olayların geliştiğinin ultrastrüktürel düzeyde ortaya konmuş olmasıdır (Kierszenbaum, 2001).Somatik hücrelerdeki gevşek kromatin yapısının aksine sperm hücrelerinin kromatini oldukça kompakt bir yapıya sahiptir. Spermiyogenez sırasında spermatid nükleusu yeniden düzenlenir ve nükleer yoğunlaşma meydana gelir. Bu süreçte somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) ilk önce geçiş proteinleri ile daha sonrada arjinin, lizin ve sisteince zengin protaminlerle ( protamin 1 ve protamin 2 ) yer değiştirir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Sperm Kromotin Yapısı(Ordueri & Çelik-Özenci)

Protaminler, spermatogenezin geç haploid fazında DNA'yı paketleyen histonlar ile yer değiştiren küçük, arjininden zengin, çekirdek proteinleridir. Sperm kromatinin kondenzasyonu ve DNA stabilizasyonu için çok önemli oldukları düşünülmektedir. DNA'ya bağlanırlar ve spermatid genomunu genetik olarak inaktif hale yoğunlaştırırlar. İnsanlarda ve bazı primatlarda, sperm genomunun %10-15'i histonlar tarafından paketlenir ve bu da embriyonun erken gelişimi için önemlidir (Balhorn, 2007). Sperm DNA'sı protaminler tarafından paketlenirken yaklaşık 50kb büyüklüğündeki toroidler şeklinde paketlenerek düzenlenir. Her bir protamin toroid, bir DNA ilmek domeyni olarak düşünülmektedir.

Spermlerin son hallerini almak üzere düzenlenmeleri sürecinde yani kromatin kondensasyonu reaksiyonlarında, histonlar öncelikle geçiş proteinleri ile tekrar yapılandırılmakta ve takibinde DNA bağlanma proteinleri olan protaminler ile son rötuşlar yapılmaktadır(Rathke, Baarends et al. 2014). Ancak sperm genomunun %15 kadarlık bir kısmı nükleozom temelli histonlarla paketlenmiş halde kalmaktadırlar ki bu stabil kalan paketlenmenin genomda rastgele bir dağılım göstermediği, özellikle kromozomların sentromerik ve telomerik bölgelerinde yoğunlaştıkları saptanmıştır. Bu spesifik yapının bu bölgelerde kalmasının, zigotta bu bölgelerin farkedilip kısa süre içerisinde kromozomların organize olabilmesi açısından önemli olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca son çalışmalarda, embriyonel gelişimde önemli görevler üstlenen genlerin promoter bölgelerinde bu stabil yapının kaldığını ifade eden verilere de ulaşılmıştır.



Şekil 2.7: Sperm kromatin yapısı için halka-ilmek modeli. Bu model bağlanan her bir toroidin sperm kromatininin sperm nüklear matriksine tutunan DNaz-hassas bölgesi olduğu öngörülmektedir. (MAR= Matriks tutunma bölgeleri) (Ordueri & Çelik-Özenci)

Boğa, kedi, yaban domuzu ve koç spermatozoasında yalnızca protamin 1 (P1) bulunurken insan ve fare spermatozoası ikinci bir form olan protamin 2 (P2)'yide içermektedir. Disülfid köprüsü oluşturma potansiyeli ve dolayısıyla kompaktlaşmadaki etkisi P2'deki sistein içeriğinden dolayı daha azdır. Sperm DNA'sı P1 içeriği fazla olan türler daha stabilken, değişmiş P1/P2 oranı ya da P2 yokluğu erkek infertilitesi ile ilişkilidir. Nüklear yoğunlaşmanın, sperm genomunu oksidasyon ve ısı artışı gibi dış etkenlere karşı korumada gerekli olduğu düşünülmektedir (Miller, Brinkworth, & Iles, 2010).

Spermiyogenezin başlangıcında haploid spermatidler tipik bir nukleozomal kromatin yapısı gösterirler. Bu evredeyken bol miktarda nonribozomal RNA transkripsiyon aktiviteleri vardır. Ancak, spermiyogenez ilerledikçe boncuk dizilimi şeklinde görünüm veren (klasik nukleozom yapısı nedeniyle) kromatin yapısı yerini düz kromatin liflerine bırakır. Bunlar artık transkripsiyon yapmazlar ve yan yana iplikçikler tarzında toplanırlar (Miller et al., 2010). Spermatogenez ve spermiyogenez sırasında kromozomal proteinler üzerinde yapılan çalışmalar, spermatosit ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde somatik histonların ve testise spesifik TH1 ve TH2B histonların bulunduğunu, oysa ileri evre spermatidlerde TP1 ve TP2 geçiş (transition) proteinlerinin, daha ileride ise artık protamin P1 ve P2 proteinlerinin yer aldığını göstermiştir. Ratarla yapılan çalışmalarda spermatogenezin 12. ve 16. basamakları arasında nukleusta TP1 ve TP2 proteinleri bulunurken, 16. basamaktan sonra P1 ve P2 proteinleri ortaya çıkmaktadır (Kierszenbaum, 2001).

Spermde, somatik hücrelerde bulunan histonların daha dayanıklı protaminlerle yer değiştirmeden önce, yukarıda tanımlanan testise spesifik

histonlar ve geçiş proteinleri TP1 ve TP2'ye neden ihtiyaç duyulduğu henüz tam izah edilmiş değildir. Yapılan deneysel çalışmalarda TH1 gen ekspresyonu nlendiğinde fertilitenin devam ettiği gösterilmiştir (Fantz, Hatfield, Horvath, Kistler, & Kistler, 2001).Ancak her ne kadar TP1 gen delesyonu varlığında komplet spermatogenez tamamlanabilmekteyse de, TP2 ve P2 prekürsörlerinin ortamdaki miktarları artmakta ve matür P2 gelişmeyecek kromatin kondensasyonu olamamaktadır(Y. E. Yu et al., 2000). TP1 eksikliğinde sperm motilitesi bozulur ve fertilizasyon kapasiteleri azalır. Bu sonuçlar da ortaya koymaktadır ki; TH1 ve TP1 proteinlerinin kromatin kondensasyonunda ve genin inaktivasyonunda rolleri kısıtlıdır. Aslında geçiş proteinlerinin spermiyogenezde önemleri büyüktür. Yapılan alışmalar TP1 ve TP2 geçiş proteinlerinin DNA'nın btnlğn koruyarak, protaminlerin kromatin üzerinde daha sağlam yerleşmelerini sağladığını ortaya çıkarmıştır. TP2 geninin regülatör bölümü spermatidlerde CAT (chloramphenicol acetyltransferase reporter) genini etkileyerek mRNA translasyonunu geçici olarak 6 gün geciktirir (Nayernia, Böhm, Topaloglu, Schlüter, & Engel, 2001). Bu süreç içerisinde konfigürasyonundaki değişiklikler nedeniyle kromatinin dış faktörlere hassasiyeti artar. Oysatranskripsiyondaki bu duraklama sayesinde, DNA'da meydana gelebilecek hasarlara da izin verilmemiş olmaktadır.

Öte yandan TP1'in de DNA kırıklarında tamir edici rolü bulunduğu gösterilmiştir(Caron, Veilleux, & Boissonneault, 2001). Normal spermiyogenezde spermatidlerde histonların uzaklaştırılması sırasında, bir endonukleaz olan topoizomeraz-II, DNA iplikiklerinden birini keserek aradan bir parçayı çıkarır. Bu araya giren TP1, DNA'nın fosfat gruplarıyla etkileşerek açıklığı doldurur. Bu sırada bir DNA ligaz enzimi de TP1'in iki ucunun orijinal DNA iplikiğine bağlanmasını sağlar. Daha sonra ortama gelen protaminlerde TP1 zerine tutunurlar. Yan yana gelen kromatinler üzerindeki protaminler arasında disülfid bağları oluşarak, kromatin iplikçiklerinin birbirlerine yaklaşmasını ve neticede kondensasyonu gerçekleştirirler. İşte bu mekanizma, TP1 eksikliğinde neden kromatin kondensasyonunun bozulduğunu izah etmektedir. Bütün bu gözlemler, geçiş proteinlerinden TP1'in DNA tamirinde esas rolü bulunduğuna işaret etmektedir (Shao-Qin, Jian-Zhong, & Xiao-Jing, 2011).

Somatik hücrelerin aksine, spermde histonların %85'i protamin proteinleri ile yer değiştirmiştir. Düşük seviyede protamin içeren sperm, yüksek oranda histon proteini içereceğinden DNA hasarına daha duyarlı hale gelecektir. Protamin eksikliği ve protamin paketlenme yetersizliği infertil erkeklerde gözlenmiştir, defektif spermatogenezis bu erkeklerdeki histon-protamin oranının değişmesi sebebiyle olabilir. Ek olarak bazı çalışmalar, anormal sperm protaminizasyonu ile DNA hasarı arasında yakın ilişki olduğunu da göstermiştir(L Simon et al., 2014). İnfertil erkeklerde, fertil erkekler ile karşılaştırıldığında histon/protamin oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Zini & Sigman, 2009).



### **2.7.1. Spermde DNA hasarı**

Spermde DNA hasarı 6 ana mekanizma ile indüklenmektedir:

- 1) spermatogenez sırasında apoptoz
- 2) spermiyogenezde kromatinremodellingi sırasında kol kırıkları
- 3) erkek reproduktif kanalında ilerlerkenserbst oksijen radikalleri ile indüklenen post-testiküler DNA fragmantasyonu
- 4) endojen endonükleazların indüklemesi
- 5) radyoterapi yada kemoterapi ileindüklenme
- 6) sigara içimi yada hava kirliliği gibi çevresel faktörler yolu ileoluşan DNA hasarı (Robinson et al., 2012).

Anormal kromatin paketlenmesi, reaktif oksijen ürünleri ve apoptozis DNA bütünlüğünü bozan en önemli etyolojik faktörlerdir. Testiste apoptozis, aşırı gamet oluşumunu önlemekte ve proliferasyon düzeylerinin kontrolünü sağlamakta, hasarlı DNA'ya sahip germ hücre proliferasyonunu engellemektedir. Oksidatif stres, sperm kromatin bütünlüğünü etkilemekte, tek yada çift zincir kırıkları, baz modifikasyonu, delesyon, çerçeve kayması, çarpaz bağlanma ve yeniden kromozomal düzenleme ile sonuçlanmaktadır . DNA hasarı, tek yada her iki DNA iplik kırığı ile nükleotidlerinin modifikasyonunun bozulması şeklinde tanımlanır. Spermatogonial germ hücrelerinden ejakulattaki sperme kadar transformasyonun herhangi bir basamağında gelişebilmesi nedeniyle, testiküler spermde, epididimal spermde ve ejakulattaki spermde DNA hasarı görülebilir. Kromatin paketlenmesinde oluşan hata, sperm DNA'sının hasara daha yatkın olmasına sebep olur. Epididimiste sperm depolanması ve geçişi sırasında yada ejakulasyon sonrası gelişen DNA hasarında, spermiyogenez sonrası transkripsiyon ve translasyonun öneminin olmaması nedeniyle tamiri yapılamamaktadır (Shamsi, Imam, & Dada, 2011).

Gerek yukarıda açıklandığı şekilde fizyolojik şartlarda ortaya çıkan DNA kırıklarının tamir mekanizmasındaki yetersizlik durumlarında, gerekse patolojik durumlarda meydana gelen DNA hasarlarındaki artış fertilizasyon üzerinde anlamlı derecede olumsuz bir etkiye sahiptir. (L Simon et al., 2014)

### **2.8-Sperm DNA bütünlüğü ve infertilite**

Erkek infertilitesinin ilk değerlendirme basamaklarından olan sperm analizi ardından her zaman spesifik testlerin yapılması gerekli değildir. Ancak sperm analizi de her zaman erkeğin fertilite potansiyelini tam olarak yansıtmamaktadır. Bu durumlarda tanı koyabilmek için diğer spesifik testlere gereksinim vardır. Açıklanamayan infertilite olgularında erkek faktörünün de eşlik edip etmediğini ortaya koymak için ya da yardımcı üreme teknikleri ile tedavi seçimi yapılmasında sperm ve semene ait spesifik testler yararlı olabilir. Bu testler arasında önceki yıllarda

antisperm antikör tayini, sperm vitalite testleri, sperm-servikal mukus etkileşim testleri, sperm penetrasyon testi, akrozom reaksiyonu, hemizona testi, sperm kreatin kinaz ölçümü, sperm yüzeyinde mannoz reseptör tayini gibi testlerden yararlanılmaktaydı. Halen çok özel durumlarda da bu testlerden yararlanılmaktadır. Ancak son yıllarda, sperm DNA fragmentasyonunun sperm fonksiyonundaki önemi farkedilmiş olup günümüzde DNA fragmentasyonuna spesifik testlerden yararlanma eğilimi bulunmaktadır.

Sperm DNA'sının bütünlüğü, başarılı bir üreme ve sağlıklı bir zigot oluşumu için gereklidir. Sperm kalitesi aynı zamanda infertilite prognozunun değerlendirilmesinde ve yardımcı üreme tekniklerinin başarıyla uygulanabilmesinde de önemli bir parametre olarak değerlendirilmektedir. Fertil erkeklerdeki ortalama sperm parametreleri, infertil erkeklerde saptanan oranlara göre daha yüksek olmasına rağmen, fertil ve infertil erkekler arasında anlamlı oranda bir örtüşme dikkati çekmektedir(Gunalp, Onculoglu, Gurgan, Kruger, & Lombard, 2001).

İnfertil erkeklerin %15 kadarında normal spermiogram değerleri gözlenmektedir. Bu nedenle, rutin semen analizi testis ve sperm fonksiyonuna ilişkin kısıtlı bilgi verebilmekte, DNA bütünlüğüne ve dolayısıyla fonksiyonel sperm ayırımı hakkında yetersiz kalmaktadır. Evenson ve ark'nın erkek infertilitesinde DNA bütünlüğünün bağımsız bir faktör olabileceğini bildirmesinden sonra erkek infertilitede DNA fragmentasyonunun etkisi geniş kapsamlı incelenmeye başlamış ve halen devam etmektedir (D. Evenson et al., 1980).

DNA fragmentasyonunun hem naturel hem de yardımcı üreme teknikleriyle olan konsepsiyonlarda reproduktif yeteneğinin düşmesi ile ilişkisi olabilir (Gat et al., 2017). Bungum ve ark, sperm DNA fragmentasyon indeksi (DFI) >%30 olan infertil çiftler arasındaki doğum oranının, DFI <%30 olan çiftlerdekine göre anlamlı oranda azaldığını, yüksek DFI oranına sahip olan çiftlerdeki IVF-ICSI ile oluşturulan gebelik oranının azaldığı (Bungum et al., 2006; Dar et al., 2013; Jungwirth et al., 2012; Luke Simon, Zini, Dyachenko, Ciampi, & Carrell, 2017), buna karşılık gebelik kaybı oranının arttığı (Bareh, Jacoby, Binkley, Schenken, & Robinson, 2016; Robinson et al., 2012; Zhao, Zhang, Wang, & Li, 2014)farklı çalışmalarla ortaya konmuştur. Diğer taraftan oligoasthenoteratozoospermik olgularda sperm DNA fragmentasyonunun anlamlı düzeyde arttığı, infertil normozoospermik olgularda da sperm DNA fragmentasyon oranının fertil gruba göre daha yüksek oranda olduğu önceki çalışmalarda ortaya konmuştur . Bu nedenle sperm DNA fragmentasyonunun saptanması fertilite çalışmalarında klinik olarak önemlidir(Bieniek et al., 2016).

### **2.8.1. Sperm DNA'sında çift dal kırık oluşumu**

DNA çift dal kırıkları, normal koşullarda spermatogenez süreci içerisinde endojen etkilere bağlı olarak oluşmaktadır. Birincisi mayoz

bölünme sırasında, mayotik krosing over sırasında çift dal kırıkları oluşmaktadır. İkincisi ise spermiogenez sırasında haploid spermatid kromatini, histonlar ve protaminler arasındaki değişim sırasında kompakt hale gelir. Ayrıca sperm, harap olmuş ve fragmente hale gelmiş DNA'yı maturasyon sürecinde biriktirebilir ve epididimiste depolanabilir. Sperm DNA fragmentasyonunun artması ile ilgili diğer faktörler arasında defektif apoptozis, aşırı reaktif oksijen radikalleri üretimi (ROS birikmesi), seminal antioksidan azalması ile birlikte ilaçların, sigara kullanımının, kirliliğin toksik etkileri, xenobiotikler, yüksek testiküler ısı (ateş, varikosel) ve ileri yaş sayılabilir(R. Aitken & De Iuliis, 2009).

## **2.9- Spermatozon DNA fragmentasyon testleri**

Gebelik şansını ortaya koyabilecek yeni test arayışı son yıllarda yoğunlaşmıştır. Erkek reproduktif kabiliyetine ilişkin sperm DNA fragmentasyonu yeni bir yaklaşım olarak bazı merkezlerde değerlendirilmektedir (Bieniek et al., 2016; Tavukçuoğlu et al., 2012).

İnsan genomunun bütünlüğü endojen metabolik yan ürünler ve ekzojen faktörler tarafından sürekli tehdit altındadır. Hücre tipine, hücre siklusu aşamasına ve DNA harabiyet tipine göre DNA tamiri ve hatalı DNA tamirinin sonuçları değişkenlik göstermektedir. Somatik hücrelerdeki hatalı tamirler hücre ölümü veya hastalık gelişmesi ile sonuçlanabilirken sonraki kuşağa genomun sağlıklı bir şekilde aktarılabilmesi için germ hücre dizilerinde DNA bütünlüğünün belirli düzeyde korunması gerekir.

Günümüzde sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmede çeşitli testler kullanılmaktadır. Bu teknikler geniş anlamda iki ana grupta incelenebilirler

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 içerisinde yer alırlar.

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), akridin oranj boyama teknikleri sayılabilir(Shamsi et al., 2011).

Bu yöntemler kısaca aşağıda özetlenmiştir:

### **2.9.1 Tunel**

Temelolarak apoptoz sırasında meydana gelen DNA parçalanmasını ölçmek için tasarlanmıştır. 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.

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, Hoogendijk, Bouic, & Kruger, 2010; Huerta, Goulet, Huerta-Yepe, & Livingston, 2007).

### **2.9.2 In situ çentik okuma tayini (In Situ Nick Translation Assay) (NT)**

NT, TUNEL testine benzer bir mekanizma olan dUTP'in DNA kırıkları ile birleşmesi esasına dayanarak sperm DNA hasarını tespit eden bir yöntemdir. Ancak, TUNEL testi hem tek hem de çift zincir DNA kırıklarını tespit ederken, NT sadece tek zincir DNA kırıklarını tespit etmektedir. NT testinde bu kırıkların tespitinde DNA polimeraz I'in katalize ettiği bir enzimatik reaksiyon kullanılmaktadır. Rölatif olarak basit uygulanabilir test olsa da diğer testlere göre sensitivitesi düşüktür (Henkel et al., 2010).

### **2.9.3 DNA breakage detection- FISH (DBD-FISH) Yöntemi**

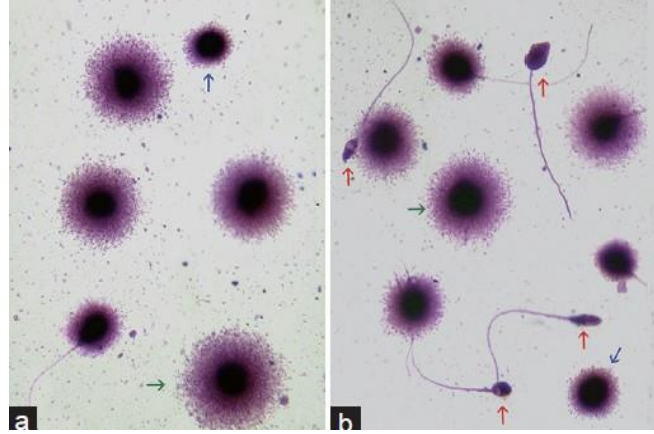
Hücreler agaroz matrisine gömülüp, alkali solüsyona maruz bırakılarak DNA iplikçığının açılmasına izin verilir. Böylece tek zincirli DNA motifleri elde edilir. Nötralizasyon ve proteinlerin uzaklaştırılmasından sonra tüm genomu ait ya da yalnızca analizlenmek istenen kromatin bölgesine spesifik DNA problemleri kullanılarak hibridizasyon gerçekleştirilir. Eğer DNA'daki kırık miktarı fazla ise fazla miktarda tek zincirli DNA oluşur ve daha fazla prob ile hibridleşerek floresans yoğunluğunu ve FISH sinyal alanını artırır. Sperm hücrelerindeki anormal kromatin paketlenmesi DNA'yı alkali denatürasyonuna karşı daha duyarlı hale getirip floresans yoğunluğunu artırır. Bu nedenle DBD-FISH, DNA kırıklarının in situ olarak tespit edilmesine ve miktarının ölçülmesine imkan verirken sperm kromatininin yapısal özelliklerini ortaya çıkarır. Kromatinin yapısal özelliklerini açıklamasına karşın pahalı, zaman alıcı ve karmaşık bir

prosedür içerdiği için ve sonuçlarının da diğer yöntemlerden farklı olmaması nedeniyle klinik önemi azdır (J. Fernández et al., 2000; J. L. Fernández & Gosálvez, 2002).

#### **2.9.4 Sperm Kromatin Dispersiyon (SCD) Testi:**

Halosperm test olarak da ifade edilen bu yöntemin prensibi; kromatin proteinlerinden yoksun olan intakt DNA'nın sperm nukleus çevresindeilmek oluşturabilme becerisine dayanmaktadır. Bu yöntemde, agaroz gömülen spermler denature edici asit veya alkali solusyonu ile muamele edilerek nükleer proteinlerden temizlenir, fragmentasyon nedeniyle oluşan tek dal DNA lar elde edilir. Takip edilen aşamalarda, sperm örnekleri lizise uğratılırlar. Normal DNA'ya sahip spermlerin çevresinde büyükçe bir halo gözlenirken, halonun bulunmaması veya çapının çok küçük olması fragmente olmuş DNA'yı göstermektedir. Spermde tek dal kırıkları olan DNA'nın, asit ile denaturasyon sonrası yayılma becerisi bulunmadığı için sperm çevresinde halo oluşumu gözlenmemektedir (Şekil 2.1). Şekil 2.1 de, sperm 1-3 intakt DNA'ya sahiptir, denaturasyon solusyonu muamelesi sonrasında da uzun fragmente olmayan DNAlar nukleustaki nükleer protein kalıntıları ile sarmallar oluşturarak "halo" oluşumunu sağlamışlardır. Sperm 4&5 te ise nükleer proteinden yoksun olan küçük DNA fragmentleri dağılmadıklarından, kısa oldukları için sarmal oluşturamadıklarından ötürü nukleus çevresinde "halo" oluşumu olmamış veya çok düşük oranda gerçekleşmiştir.

Fernandez ve arkadaşlarının 20 infertil ve 10 fertil erkeğin spermleri ile yaptıkları çalışmada, DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesinde SCD yönteminin sonuçları DBD-FISH yöntemi ile doğrulanmıştır. SCD değerleri, infertil grupta fertil donör gruba göre daha yüksek bulunmuştur (Fernandez et al., 2003)



Şekil 2.8. SCD testi ile DNA bütünlüğü analizi (Majzoub, Esteves, Gosálvez, & Agarwal, 2016)

### **2.9.5 Basit hücre jel elektroforezi (COMET):**

Hücrelerdeki DNA hasarını hücre bazında saptayabilen duyarlı, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir. Basit hücre jel elektroforezyöntemi ya da kısa adıyla Comet olarak bilinen DNA hasarını ölçmede kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Bu yöntem pekçok çalışmada kullanılan görsel floresan bir tekniktir. Bu ölçüm yönteminde yapılan işlemler laboratuardan laboratuara farklılık göstermekle beraber prensip olarak; spermasüspansiyonunun hazırlanması, jel yerleştirilmesi, hücre lizisi, DNA sarmalının çözülmesi, elektroforez, nötralizasyon, DNA boyama ve Comet şekil analizi şeklinde tanımlanabilir (Ribas-Maynou et al., 2013).

### **2.9.6 Sperm kromatin strüktür analizi (SCSA):**

Bu test ilk olarak 27 yıl önce tarif edilmiştir (D. Evenson et al., 1980). SCSA, in situ olarak DNA'nın ısı ya da asit indüklü denaturasyona olan hassasiyetini ölçen flowsitometrik bir yöntemdir. Her iki yöntem ile de aynı sonuçlar elde edilmesine rağmen protokol SCSA asit ve SCSA ısı olmak üzere ikiye ayrılır. Isı veya asit muamelesi sonucunda denatüre olan DNA metakromatik bir boya olan akridin oranj ile boyanır. Hasarlı DNA (tek zincirli DNA) kırmızı renkte floresan verirken hasarlanmamış DNA (çift zincirli DNA) yeşil renkte floresan verir. SCSA asit protokolü daha kolay ve kullanışlıdır. DNA hasarı, DNA fragmentasyon indeksi (DFI) ile ifade edilir. SCSA, sperm DNA hasarını doğru bir şekilde ölçen, fertil ve infertil bireyleri birbirinden ayıran sınır değeri hesaplanmış, pahalı bir yöntemdir. Fertilizasyon ve implantasyon oranı gibi üremeye yardımcı tekniklerin sonuçlarını yorumlamada bugüne kadar bildiğimiz yöntemler içerisinde en başarılısı SCSA'dır. İnfertil erkeklerde semen analizini desteklemek amaçlı SCSA testinin de rutin olarak yapılması önerilmektedir. Elde edilen en son verilere göre DFI %30'dan büyük ise aşılama ile gebe kalma olasılığı neredeyse sıfıra yaklaştığından çözüm olarak ICSI yöntemi seçilmelidir.

### **2.9.7 Akridin oranj testi (Acridine Orange Test) (AOT):**

Akridin oranj testi de SCSA ile benzer prensiplere dayanmaktadır. Akridin turuncusunun asitli ortamda yeşilden kırmızıya dönüşmesi ile DNA denatürasyon genişliğini floresan mikroskopta değerlendirmesi esasına dayanır. SCSA testine göre daha basit, ucuz ve SCSA'da olduğu gibi eğitilmiş bir teknisyen gerektirmemektedir. Ancak, bulanık renkler, hızlı renk kaybolması ve heterojen boyanmaların çıplak gözle yorumlanmasındaki zorluklar bu testin negatif yönlerini oluşturmaktadır(Koyuncu).

### **2.10- Sperm DNA fragmentasyonu ve kromozom anöploidileri ilişkisi**

Erkek infertilitesinde kromozom anöploidisinin rolü önceki bölümlerde açıklanmıştır. Muriel ve ark. anöploidinin aynı zamanda DNA fragmentasyonunu da tetikleyebileceğini ortaya atmışlardır. (Muriel et al., 2007). Bu verilerle birlikte düşük kalitedeki sperm örneklerinde anöploidi oranının yüksek olmasına, diğer taraftan kromozom anomalili embriyo ile implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıpları arasındaki bilinen bağlantıya dayanarak yüksek DFI oranı ve anöploidi ilişkisinin de değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. (Ramasamy et al., 2015; Vegetti et al., 2000)

### 3- GEREÇ ve YÖNTEMLER

#### 3.1- Kullanılan cihazlar

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan genel ve amaca yönelik cihazlar

<b>Genel Lab Cihazları</b>	<b>FISH analizlerinde kullanılan cihazlar</b>
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 <sup>0</sup> C)	
Su banyosu	
Buzdolabı (+4 <sup>0</sup> C)	
Derin dondurucu (-20 <sup>0</sup> C)	

#### 3.2- Kullanılan kimyasal malzemeler

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan genel ve amaca yönelik kimyasal malzemeler

<b>Kimyasallar</b>	<b>FISH problemleri/kimyasallar</b>
Absolu alkol (Merck)	Kromozom X,Y,18 (Vysis)
Metanol (Merck)	Kromozom 13,21 (Vysis)
Asetik asit (Merck)	Kromozom 16 (Vysis)
DAPI (Sigma)	NP40
DTT (dithiothreitol - Sigma)	Vectashield Mounting Medium (Vector)
HCl (Merck)	Rubber Cement (Marabu Fixo Gum)
LIS (Sigma)	NaCl (Merck)
Sitrik asit (Sigma)	Immersion yağı (Merck)
Tris (Merck)	



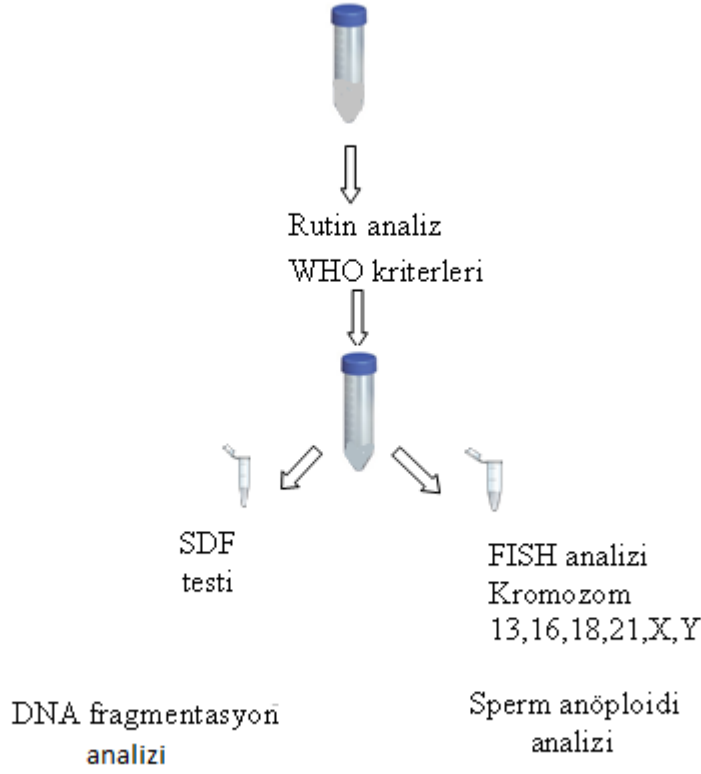
### 3.3- Olguların seçimi

Bu çalışmaya, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'na infertilite nedeni ile başvuran, 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 ve Fakültemiz Üroloji Anabilim Dalında yapılan fizik muayenesi sonrası non-normozoospermi tanısı alan 48 olgu ile klinik öykülerinde fertil olduğu bilinen normozoospermili 50 birey dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalar aynı zamanda ESOGÜ BAP Proje No: 2014-521 kararıyla desteklenen projemizde eş zamanlı çalışmaları yürütülen hastalardır. Çalışma, 27 Kasım 2014 gün 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 konstrasyonlarına göre yıkama işlemlerine tabi tutulmuş, ardından DNA fragmentasyon analizinde kullanılacak SCD test ile sperm anöploidi oranını değerlendirmek amacıyla uygulanan FISH analizleri için her bireye ilişkin örnek 2 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 (Tablo 3.1).



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

### 3.4- Uygulanan yöntemler

#### 3.4.1. Sperm FISH analizi ile anöploidi tayini

##### 3.4.1.1 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.

#### 3.4.1.2 Sperm FISH analizi preperat hazırlığı :

Bu çalışmada kromozom 13, 16, 18, 21, X ve Y için sayısal kromozom anomalilerin oranlarının saptanması planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda:

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 preperatlar distile su ile yıkanmışlardır.
6. Preperatlar, 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 solüsyonunda içinde 5 dakika bekletilmişlerdir. DTT, spermatozoa nükleusunda kompakt halde olan protamince zengin kromatin yapısındaki disülfid bağların kırılması ve kromatinin açılması, dolayısıyla FISH analizinin gerçekleştirilebilmesi için çok önemli bir aşamadır
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.(Sarrate & Anton, 2009)

### 3.4.1.3 Preperat/Prob denaturasyonu ve hibridizasyon

1. Kuruyan lamlar üç bölgeye bölünmüşlerdir. Çalışmamızda Aneuvysion (Vysis) prob seti ve kromozom 16 satelit probu kullanılmışlardır. 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.

### 3.4.1.4 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°Cde saklanmışlardır.

*FISH tekniğinde Rieder ve arkadaşları tarafından geliştirilen protokol modifiye edilerek uygulanmıştır (Rieder, 1998).*

### 3.4.1.5 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 idi. 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.

### **3.4.2. Sperm kromatin ayrılma testi (SCD, Halosperm Test)**

Kullanım amacı ve yöntemin esasları;

- Sperm kromatin ayrılma testi sperm DNA fragmentasyonu ile direkt ilişkili uyarılmış kondensasyon (yoğunlaştırma) prensibine dayanmaktadır.
- Belli miktarda seyreltilen sperm (25 ml de-1 × 10<sup>7</sup> spermatozoa) agaroz matris jele yerleştirilir ve denatüre olması için asit solüsyon eklenir.
- Sonra sperm membranı ve proteinlerinin uzaklaştırılması için litik bir tampon solüsyonu eklenir.
- Bu solüsyonun eklenmesi ile nükleoidin oluşturduğu santral bir kor etrafında ayrılmış DNA halkalarına bağlı periferel bir halo görüntüsü oluşur.
- Normal DNA'ya sahip spermler geniş halolar oluşturacak şekilde DNA'larını salarlar. Çok küçük halo veren ya da hiç halo oluşturmayan spermler fragmente DNA içeren spermlerdir.
- Halo görüntüsünü değerlendirmek için yapılan boyamada eozin yada Azure B kullanılmış ise direkt ışık mikroskopunun kullanılması yeterli görülmektedir.
- Biz çalışmamızda floresan boyalar kullanarak floresan mikroskopu ile analizleri gerçekleştirdik. Yapılan son çalışmalarda floresan analizlerin, güvenilirlik ve hata payını aza indirdiği yönündeki sonuçlarından ötürü tercih sebebi olmuştur.
- Çalışmalar likefaksiyon sonrası 1-2 saat içerisinde taze örneklerle yapılmıştır. (Bu sürenin uzaması durumunda fragmentasyon oranı üzerinde yanıltıcı sonuçlar alınabileceği göz ardı edilmemiştir.)

### 3.4.2.1 Uygulanan test aşamaları:

Çalışmamızda Halosperm kiti (Halotech, Madrid) kullanılmıştır. Kit içerisinde içerisinde agaroz bulunan ependorf tüpleri, denaturasyon ve lizis solüsyonları, kullanıma hazır kaplanmış preparatlar bulunmaktadır. Üretici firmanın önerdiği ve laboratuvarımızda modifiye edilen aşamalar aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir:

1. Semen örneği konsantrasyonu 5-10 ml/10<sup>6</sup> olacak şekilde sperm yıkama solüsyonu ile sulandırılmıştır.
2. Kit içerisinde bulunan denaturasyon ve Lizis solüsyonları oda ısısına bırakılmışlardır.
3. Kit içerisinde bulunan ve her bir çalışma için ayrı hazırlanmış agaroz içeren ependorf tüpler mikrodalga fırın içerisinde akışkan hale getirilmiş (ort. 1.5-2 dk. ), ardından tekrar jel haline gelmemesi için tüpler 37°C su banyosunda 5 dk inkübe edilmişlerdir.
4. Her 20 µl semen örneğinden 15 µl alınarak tüpe eklenmiş, karıştırılmıştır.
5. Karışımdan 14 µl alınarak kit içerisinde bulunan işaretli lam üzerine damlatılmış ve lamel kapatılarak buzdolabında 5 dakika bekletilmişlerdir.
6. Bu aşamada asit denatürasyon solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için 10 ml distile su içerisine 80 µl asit denatürasyon solüsyonu eklenmiştir. Hazırlanan karışım şale içerisine konmuş, preparatlar yatay pozisyonda bu karışım içerisinde 7 dak oda ısısında denature edilmişlerdir.
7. Süre sonunda, oda ısısında şale içerisinde bekletilen lizis solüsyonuna aktarılan preparatlar yatay pozisyonda 25 dk. inkübe edilmişlerdir.
8. Süre sonunda, preparatlar içerisinde distile su bulunan şale içerisine alınmış ve 5 dak. süre ile yıkanmışlardır.
9. Preparatlar yine yatay pozisyonda her birinde 2 dk olmak üzere sırasıyla %70, %90 ve %100 alkol serisinden geçirilmişler ve oda ısısında kurumaya bırakılmışlardır.
10. Kuruyan preparatlar, floresan mikroskopta incelemek üzere DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) (2 mg/mL) ile 10 dk. süre ile boyanmışlar, distile sudan geçirilerek kurutulmuşlar ve lamel ile kapatılarak analiz edilinceye kadar karanlık ortamda saklanmışlardır.

### 3.4.2.2 Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Mikroskobun x100lük objektifinde her örnekten en az 300 spermatozoa analiz edilmiştir. Analiz sırasında :

1. Çok küçük harelili, haresiz veya degrade görüntüdeki spermatozoalar: fragmante DNA içeren spermatozoa
2. Nükleus çevresinde geniş veya orta düzeyde halo içeren spermatozoalar:

fragmente olmamış DNA içeren spermatozoa olarak değerlendirilmişlerdir.

Her bir hasta için fragmentasyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ SDF} = \frac{\text{Fragmente DNA içeren hücre sayısı (küçük halo+halo yok+ degrade nukleus)}}{\text{Toplam sayılan hücre sayısı}} \times 100$$

%SDF değeri eşik değerleri

<% 15 fragmente değil

%15-30 orta derecede fragmente

> %30 fragmente olarak belirlenmiştir.

### 3.5- İstatistik analizler

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. Anlamlı fark bulunan Varyans analizi sonuçlarında homojen varyanslı gruplar Tukey, homojen varyanslı olmayan gruplar ise Games Howel ikili karşılaştırma testi ile incelenmiştir. Anlamlı 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 anlamlı 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 normozoospermili 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 50 non-normozoospermik, infertil (araştırma) bireyler dahil edilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan normozoospermik bireylerin ortalama yaşı  $32.42 \pm 6.0$ , infertil olan araştırma grubu olgularının ise  $33.72 \pm 5.7$  olarak saptanmıştır.

Çalışmanın araştırma grubunu oluşturan non-normozoospermik olgulardan 13 tanesi teratozoospermi, 11 tanesi oligoteratozoospermi, 8 tanesi oligozoospermi, 11 tanesi oligoastenozoospermi 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 (Çizelge 3.1).

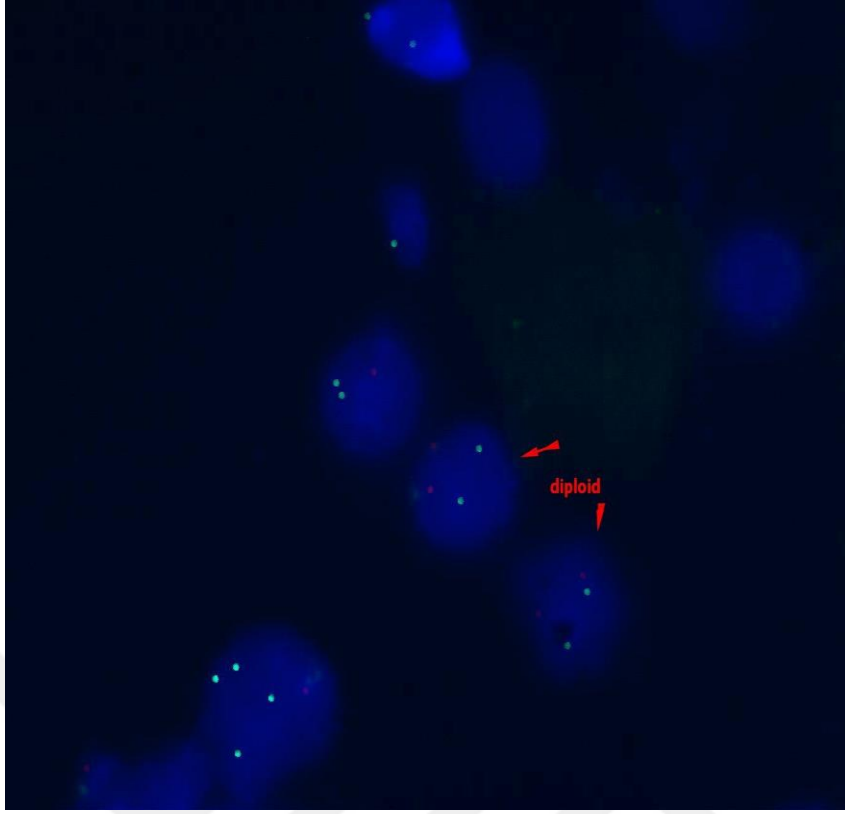
Tablo 4.1. Çalışma gruplarının sperm özellikleri

Özellikler	Kontrol (N=50)	Hasta (N=50)	P
Yaş (ort±SD)	32.42±6.0	33.72± 5.7	
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±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

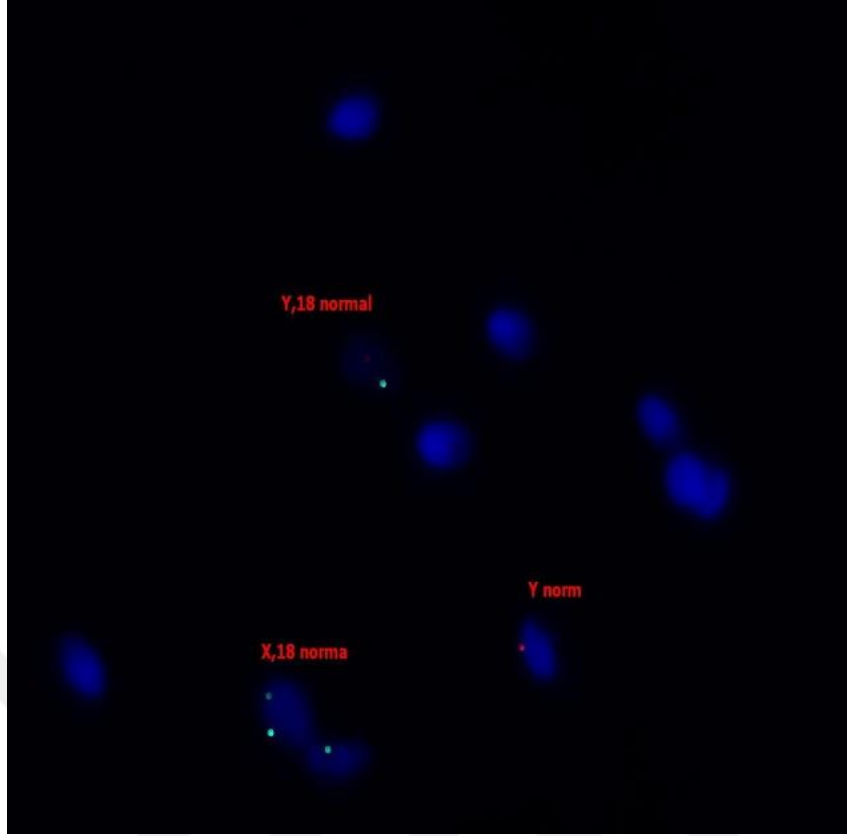
### 4.2- FISH analizi ile saptanan sperm kromozom anöploidileri

Çalışmamızda, kromozom 13, 16, 18, 21, X ve Y'ye spesifik problemler araştırma ve kontrol grubu sperm nükleuslarına uygulanmış ve spermatozoalardaki floresan fenotipler; normal oositlerin fertilizasyonunda canlı konsepsiyonların oluşmasında anahtar rol oynayan anöploidik ve/veya poliploidik özellikler açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.1. A,B,C,D).

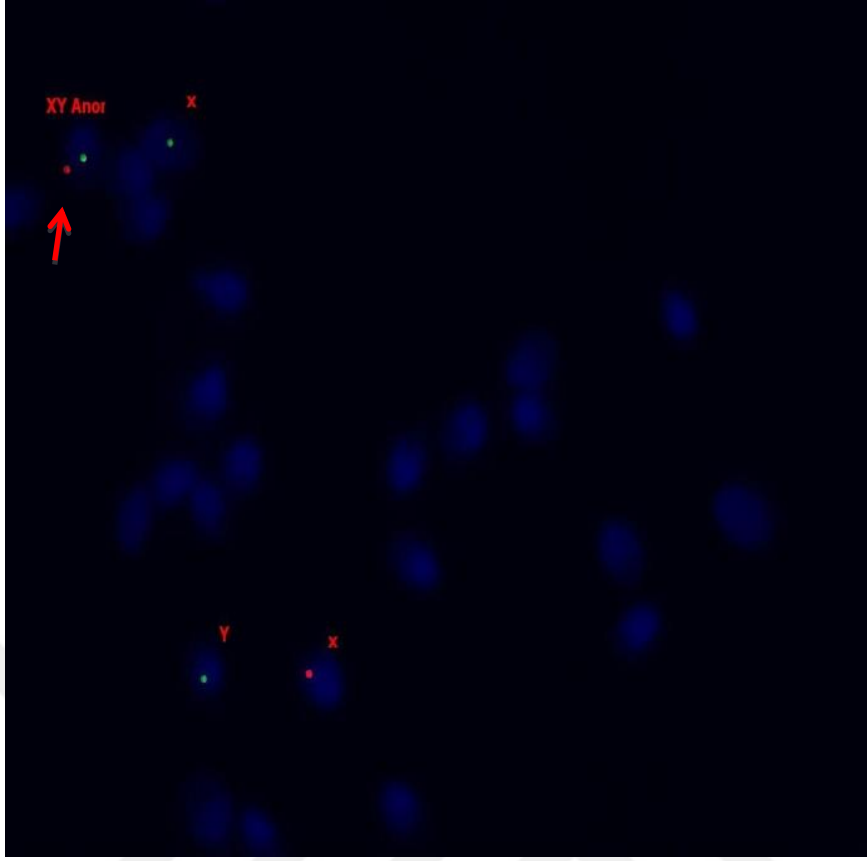




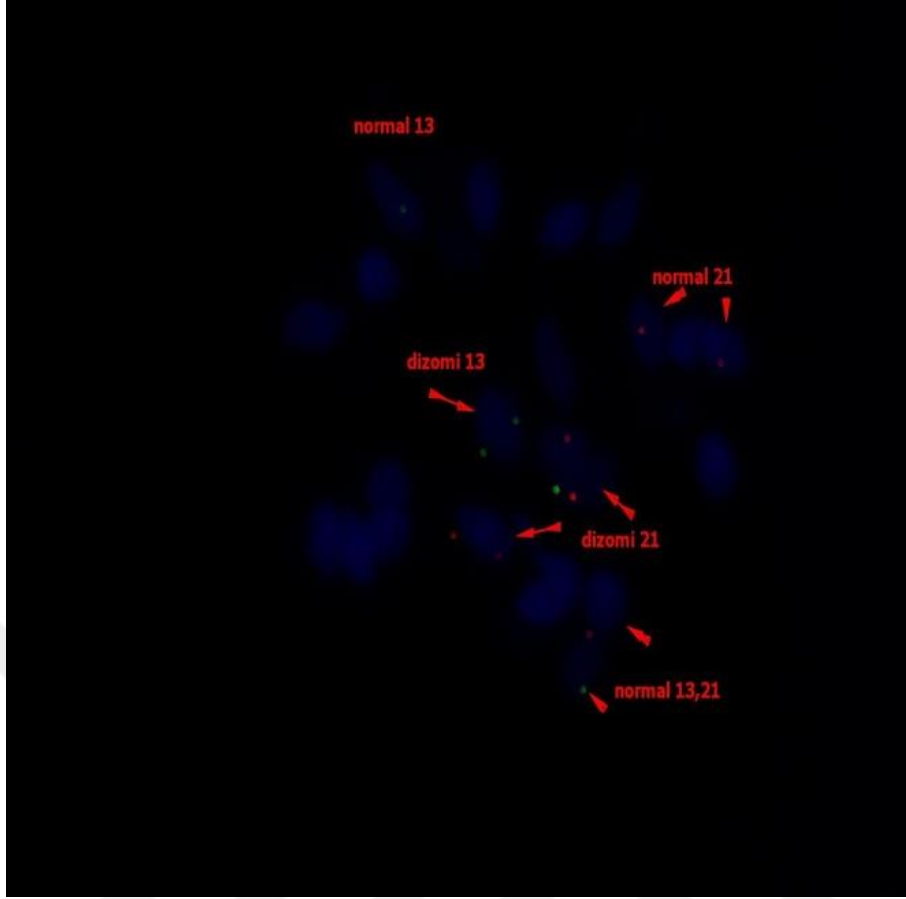
Şekil 4.1-A Kromozom 13 (yeşil) ve Kromozom 21(kırmızı) için Diploid Spermler (Vysis LSI 13 (13q14) SpectrumGreen / LSI 21 (21q22.13-q22.2) Spectrum Orange, AneuVysion Vysis)



Şekil 4.1-B Normal X,Y,18 kromozomları; Y (kırmızı), Kromozom X (yeşil) ve Kromozom 18(mavi) (CEP X: DXZ1 Alpha Satellite DNA Probe , Xp11.1-q11.1 Spectrum Green, DYZ3 Alpha Satellite DNA Probe Yp11.1-q11.1 Spectrum Orange, CEP 18 DNA Probe (18p11.1-q11.1) Spectrum Aqua, AneuVysion Vysis.



Şekil 4.1-C Altta, Kromozom X (Yeşil) için Normal Sperm (CEP X: DXZ1 Alpha Satellite DNA Probe , Xp11.1-q11.1 Spectrum Green, AneuVysion Vysis) Kromozom Y (kırmızı) için Normal Sperm (DYZ3 Alpha Satellite DNA Probe Yp11.1-q11.1 Spectrum Orange, AneuVysion Vysis)  
Üstte, XY Abnormal Sperm Kromozom Y (kırmızı), Kromozom X (yeşil) Alpha Satellite DNA Probe Xp11.1-q11.1 Spectrum Green, DYZ3 Alpha Satellite DNA Probe Yp11.1-q11.1 Spectrum Orange, AneuVysion Vysis)



Şekil 4.1-D Kromozom 13 (yeşil) ve Kromozom 21(kırmızı) için normal sperm ve dizomik spermler (Vysis LSI 13 (13q14) SpectrumGreen DNA Probe LSI 21 (21q22.13-q22.2) Spectrum Orange, AneuVysion Vysis)

Normozoospermik ve non-normozoospermik sperm nukleuslarında saptanan kromozom anöplöidi frekansları Tablo4.2. de özetlenmiştir. Tablo4.2. 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 anöplidi sıklıkları

Anomaliler	Gruplar	Medyan (%25-75)	TEST SONUÇLARI(p)
Dizomi 13	Non-normozoospermi	5,0 (3,0-9,0)	0,000
	Normozoospermi	2,0 (0-3,0)	
Dizomi 16	Non-normozoospermi	4,0 (2,0-8,25)	0,000
	Normozoospermi	0(0-2,0)	
Dizomi 18	Non-normozoospermi	4,0 (1,5-8,5)	0,000
	Normozoospermi	1,0 (0-3,0)	
Dizomi 21	Non-normozoospermi	4,0 (1,75-9,0)	0,000
	Normozoospermi	2,0 (0-2,0)	
XY	Non-normozoospermi	4,0 (0-8,0)	0,002
	Normozoospermi	1,5 (0-2,25)	
XX	Non-normozoospermi	2,0 (0-8,0)	0,006
	Normozoospermi	0 (0-2,0)	
YY	Non-normozoospermi	0 (0-2,0)	0,040
	Normozoospermi	0 (0-1,0)	
Diploidi	Non-normozoospermi	2,0 (0-4,25)	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 SCD test ile değerlendirilen fragmantasyon oranları

Çalışmamızda iki DNA fragmentasyon testinden biri olan SCD testlerinden, her örnekte en az 300 nukleus sayılarak çok küçük harel, haresiz veya degrade görüntüdeki spermatozoalar fragmente DNA içeren spermatozoa, nukleus çevresinde geniş veya orta düzeyde halo içeren spermatozoalar ise fragmente olmamış DNA içeren spermatozoalar olarak değerlendirilmişler ve her örnek için fragmantasyon yüzdesi hesaplanmıştır.

Tablo 4.4'de de görüldüğü gibi küçük halo/halo yok olarak değerlendirilen spermatozoa sıklığı non-normozoospermik grupta %45 iken kontrol grubunda bu oran %24' tür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. ( $p < 0.001$ ). Orta düzeyde halo, araştırma grubu olgularında %60, kontrol grubu bireylerinde ise %67 oranında gözlenmiş olup gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Buna karşılık, intakt DNA'ya sahip yani nukleus çevresinde büyük haloya sahip nukleus sıklığı kontrol grubunda %96 iken araştırma grubunda %70 olarak saptanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel farklılık dikkati çekmektedir ( $p < 0.001$ ). Hasta ve kontrol gruplarında saptanan halo oranları Şekil 4.2-4.4 'de grafik halinde verilmiştir. Ayrıca farklı haloların mikroskopik görüntüleri Şekil 4.5 de görülmektedir.

Tablo 4.4. Araştırma ve kontrol grubu örneklerinin halo değerlendirmeleri

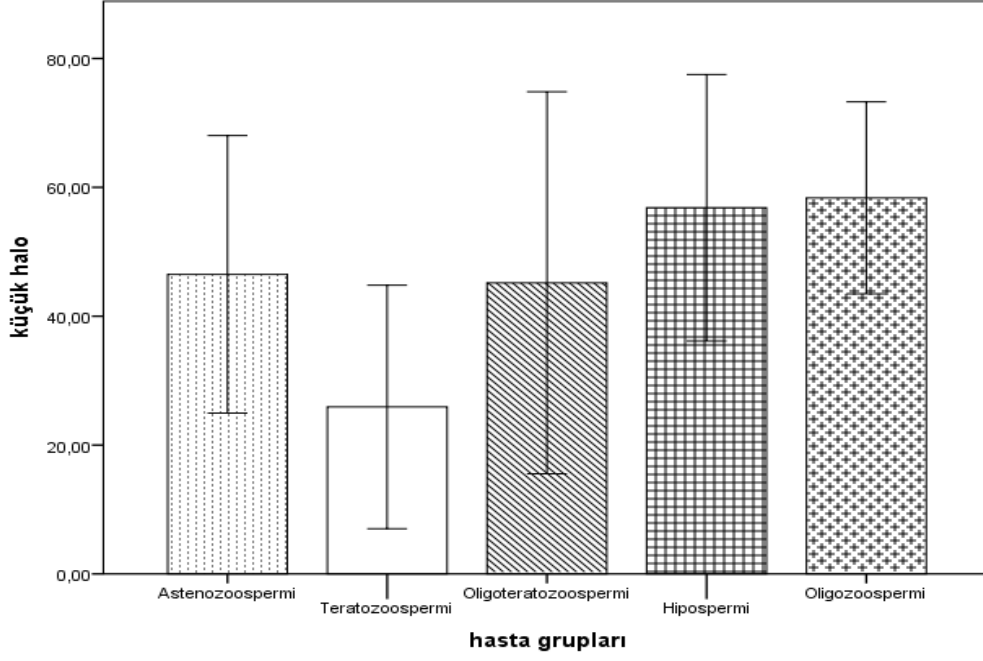
Halo Sınıflandırması	Gruplar	Mean(Ortalama Değerler)	P -değeri*
Küçük Halo	Non-normozoospermi	45,00(26,50-65,25)	0.001
	Normozoospermi	24,00(16,50-36,50)	
Orta Halo	Non-normozoospermi	60,00(42,25-78,50)	0.209
	Normozoospermi	67,00(46,00-92,00)	
Büyük Halo	Non-normozoospermi	70,00(45,00-110,50)	0.029
	Normozoospermi	96,00(70,00-125,00)	

Non-normozoospermik grubundaki alt grupları küçük/orta ve büyük halo özellikleriyle karşılaştırdığımızda anlamlı farklılık yalnızca küçük halo açısından saptanmıştır. Teratozoospermi ile oligozoospermi grupları arasında küçük halo görülme sıklığı anlamlı düzeyde farklılık göstermiştir ( $p = 0.017 < 0.05$ ) (Tablo 4.5). Bu veri, DNA fragmentasyonunun özellikle oligozoospermik örneklerde gözlendiğini ortaya koymuştur.

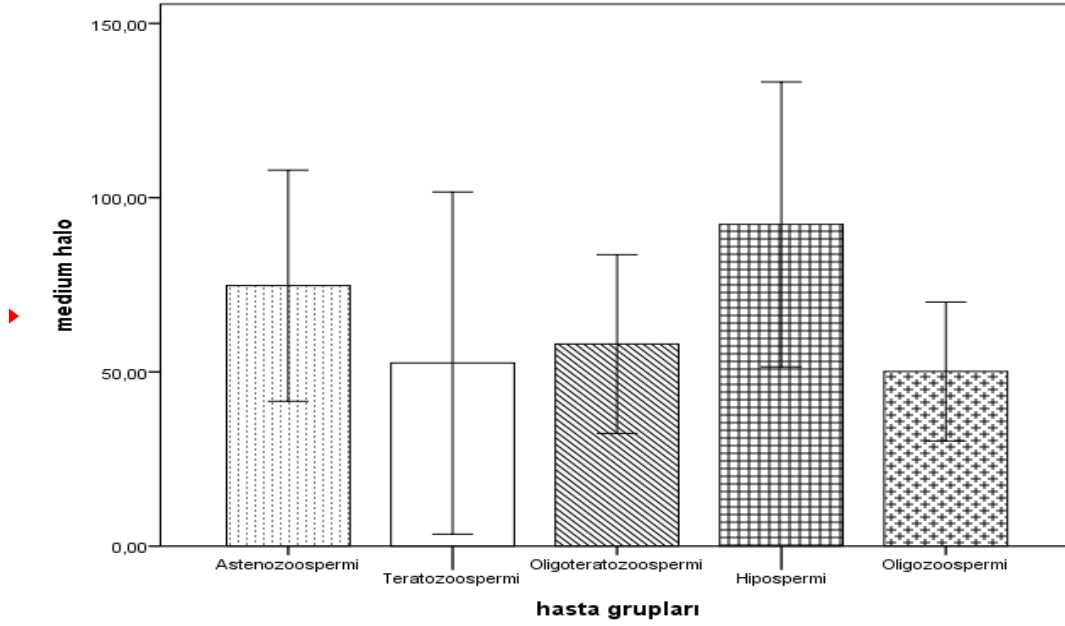
Tablo 4.5. Normozoospermik olmayan örneklerin alt gruplarında saptanan DNA fragmentasyon değerleri

	HASTA ALT GRUPLARI	Medyan değerleri(25-75)	Kruskal-Wallis test (p değerleri)
Büyük halo	Astenozoospermi	86,5(46-105,25)	0,399
	Teratozoospermi	44(31,5-118)	
	Oligoteratozoospermi	60(42-105)	
	Hipospermi	104,5(78-133,5)	
	Oligozoospermi	52,5(45-94,25)	
Orta halo	Astenozoospermi	70(55,5-85,25)	0,058
	Teratozoospermi	36(21-79)	
	Oligoteratozoospermi	50(39-73)	
	Hipospermi	74,5(61,75-144)	
	Oligozoospermi	52,5(28,75-68)	
Küçük halo	Teratozoospermi	25,9231	0,013
	Oligoteratozoosperm	45,1818	
	Oligozoospermi	58,3750	
	Hipospermi	56,8333	
	Astenozoospermi	46,500	

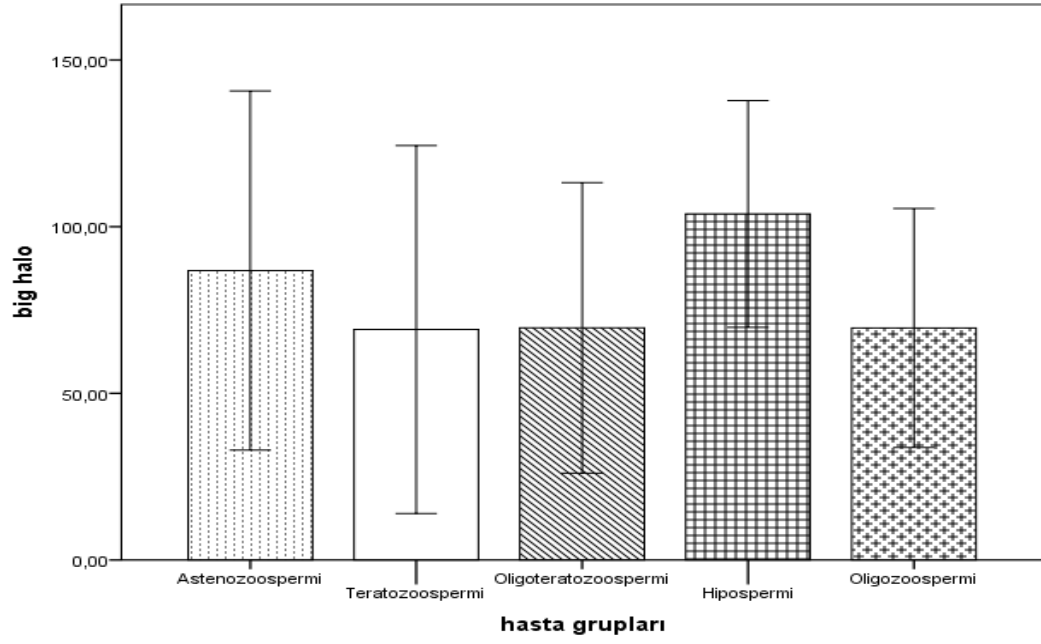




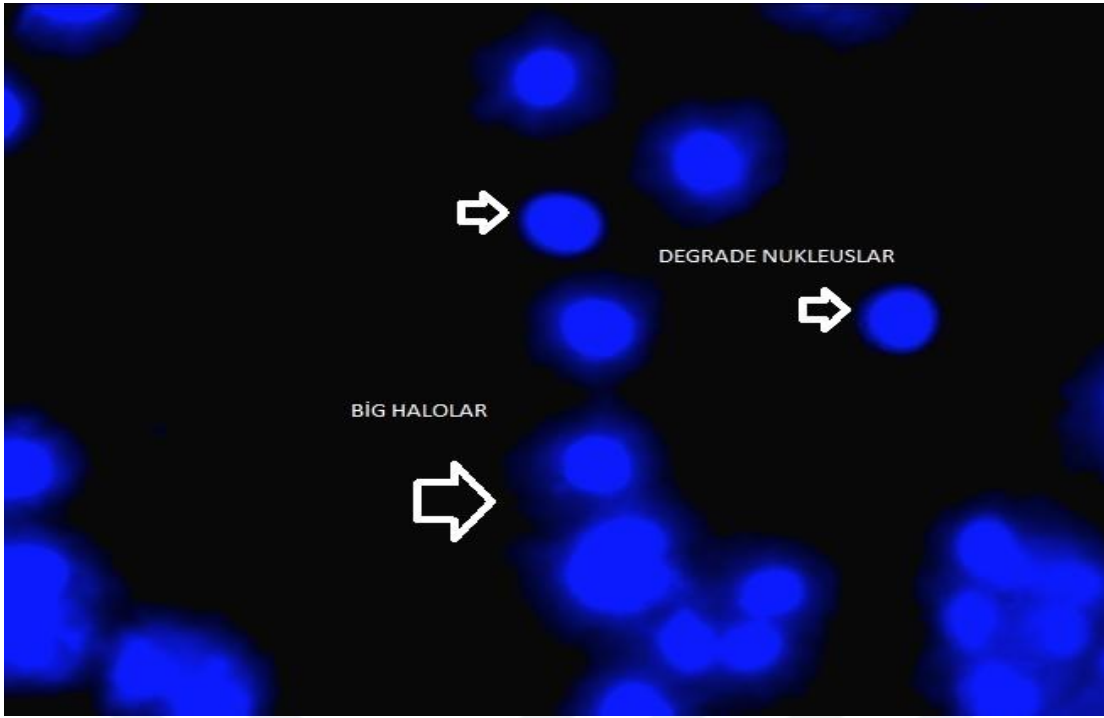
Şekil 4.2: Hasta Gruplarına ait ortalama small halo değerlerinin grafiksel gösterimi.



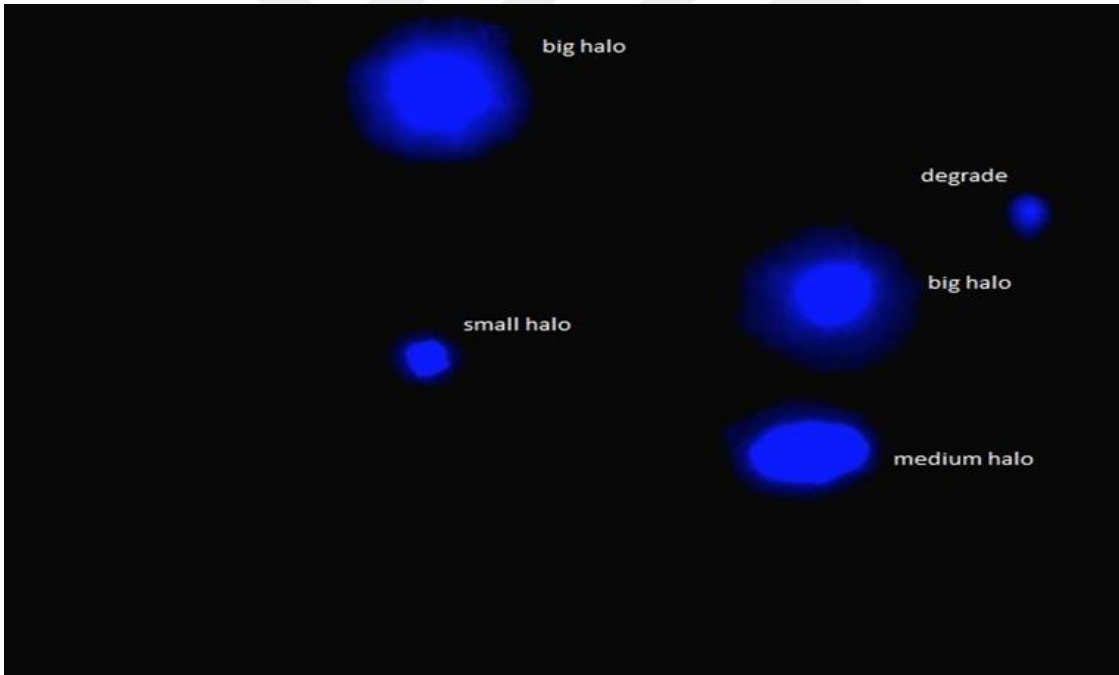
Şekil 4.3: Hasta Gruplarına ait ortalama medium halo değerlerinin grafiksel gösterimi.



Şekil 4.4: Hasta Gruplarına ait ortalama big halo değerlerinin grafiksel gösterimi.



Şekil 4.5. SCD testi ile değerlendirilen küçük/degrade halolar



Şekil 4.6 SCD testi ile değerlendirilen orta ve büyük halolar

Tablo 4.6. Araştırma ve kontrol gruplarında saptanan SCD testi ve FISH analizi verilerinin korelasyonları

	T.H	K.H	M.H	B.H	dizomi 13	dizomi 18	dizomi 21	dizomi 16	XY	XX	YY	diploidi
T.H	1.00 0	,752 **	-135	- ,514 **	,229 *	,225 *	114	195	17 3	40	-12	,246*
K.H	,752 **	1.00 0	,404 **	-12	160	138	126	112	41	-51	- 11 9	,347**
M.H	-135	,404 **	1.00 0	,471 **	-64	-71	18	-81	- 14 8	-48	-19	,213*
B.H	- ,514 **	-12	,471 **	1.00 0	-95	-118	-1	-161	- 16 9	- 13 3	-77	49
dizomi 13	,229 *	160	-64	-95	1.00 0	,442 **	,543* *	,484* *	,2 66 **	,41 0* *	19 6	,426**
dizomi 18	,225 *	138	-71	-118	,442 **	1.00 0	,353* *	,422* *	,4 36 **	,35 4* *	,24 2*	,262**
dizomi 21	114	126	18	-1	,543 **	,353 **	1.000	,379* *	,3 36 **	,42 9* *	11 3	,332**
dizomi 16	195	112	-81	-161	,484 **	,422 **	,379* *	1.000	,4 48 **	,49 3* *	,41 8* *	194
XY	173	,212 *	-148	-169	,266 **	,436 **	,336* *	,448* *	1. 00 0	,56 5* *	,32 9* *	147
XX	40	-51	-48	-133	,410 **	,354 **	,429* *	,493* *	,5 65 **	1.0 00	,45 9* *	,236*
YY	-12	-119	-19	-77	196	,242 *	113	,418* *	,3 29 **	,45 9* *	1,0 00	,204*
diploidi	,246 *	,347 **	,213 *	49	,426 **	,262 **	,332* *	194	14 7	,23 6*	,20 4*	1.000

\*r= 0.2-0.4 arasında ise korelasyon zayıf, \*\*0.4-0.6 arasında ise orta şiddette korelasyon

(T.H :Toplam halo, K.H:Küçük halo, M.H:Medium halo, B.H:Büyük halo)

Araştırma ve kontrol gruplarında, saptanan FISH anomalileri ile DNA fragmentasyon değerleri arasındaki korelasyon Spearman korelasyon testi ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.6). Çizelgede da görüldüğü üzere, hasta ve kontrol grubunda saptanan toplam halo oranı ile dizomi 13 ve 18 arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmiştir. Ancak fragmente DNA belirteci olan küçük halo ile otozomal ve seks kromozomal anploidiiler arasında anlamlı düzeyde bir korelasyon saptanmamıştır. Yani kromozomal anöploidi ile küçük halo ilişkisi bu çalışmada gözlenmemiştir. Ancak, poliploidi olarak ifade edebileceğimiz diploidik spermatozoa oranları arttıkça küçük halo oranının da anlamlı düzeyde arttığı dikkati çekmiştir.



## 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 SCD test çalışması yapılarak beraberinde 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

Bir kromozomun eksikliği veya fazlalığı ile karakterize olan anöploidi, sayısal kromozom anomalisidir ve spontan abortus, ölüdoğum ve ağır klinik özelliklere sahip anöploid doğumlarla sonuçlanmaktadır. Anöploid zigotlar ya cinsiyet kromozomu anomalileri ya da özellikle kromozom 13,18 ve 21'e ait otozomal anöploidilerdir. Yardımcı üreme teknolojisi verileri normal somatik kromozom kuruluşuna sahip erkeklerin %1-17 spermatozoasında dizominin oluştuğunu göstermektedir (Abruzzo & Hassold, 1995; Q Shi & Martin, 2000).

Semen parametrelerinden, sperm morfolojisinin anormal görünümde olması fertilizasyonu etkileyen unsurların başında gelmektedir. Yapılan çalışmalarda sperm morfolojisi ve sperm kromozom içeriği arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Büyük baş sperm defekti görülen erkeklerde yüksek oranda anöploidi ve poliploidili çekirdekler tespit edilmiş ve bu durumun mayoz bölünme esnasında meydana gelen kusurlardan kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Prisant et al., 2007). Viville ve arkadaşları tarafından sperm baş, kuyruk ve akrozom anomalileri bulunduran hastalar seçilerek yapılan çalışmada; en yüksek anöploidi oranını gösteren hasta %64 oranında makrosefalik sperm içerdiği bildirilmiştir. Bu hastada yalnızca %10 oranında normal haploid sperm yapısına rastlanmıştır. Bizim çalışmamızda teratozoospermi grubunda dizomi 13 sıklığının diğer gruplara daha yüksek olduğu ( $p < 0.05$ ) saptanmıştır.

Prisant ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada varikozel tanımlanmış hastalarda uzamış baş defektine sahip spermlerde kromatin kompaksiyonlarında bozulma ve kromozom anöploidilerinde kısmi artışlar bulunmuştur. Çalışmaya dahil edilen erkek hastalarda normal kromozom kuruluşu ve Y kromozom mikrodelsyonları açısından problem görülmezken, hastalarda özellikle kromozom 18'in anöploidi oranları anlamlı olarak artış göstermiştir (Prisant et al., 2007).

Kohn ve arkadaşları, 5 farklı grubun oluşturduğu 402 erkek hastayla yaptıkları çalışmanın bir bölümünde sperm anöploidilerinin erkek infertilitesi ve genel sağlık durumlarına etkilerini incelemişlerdir. Bu heterojen grup içerisinde; sperm FISH sonuçlarına göre anormal tanımlananlar (%5,4) , normal (haploid) tanımlananlar (%0), idiopatik infertilite tanısı alanlar (%5,9),genetik anomalileri olanlar (%0), varikozel hastaları (%1,2) ve fertil olduğu bilinen hastalar (%1,2) oranında anöploidi göstermektedir. Yapılan FISH analizleri sonucu ortaya konulan anöploidi oranları erkek infertilitesi ve genel sağlık durumuyla genetik nedenler arasındaki ilişkiyi desteklemektedir(Kohn et al., 2017).

Otozomal anöploidilerin büyük bölümü maternal orjinli iken cinsiyet kromozomu anöploidilerinin %80 kadarı paternal orjinlidir (Nagaoka, Hassold, & Hunt, 2012). Her ne kadar sağlıklı ve fertil erkeklerde anöploid spermatozoa gözlenmekle birlikte, infertil erkeklerin spermatozoalarında fertil bireylere göre anöploidi oranı çok daha yüksektir (You et al., 2014). Petousis ve ark. infertil non-normozoospermik hasta grubu spermatozoalarında kromozom anöploidi oranının kontrol grubuna göre anlamlı oranda artış gösterdiğini bildirmişlerdir. 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. (Tang, Gao, Zhao, & Ma, 2010).

Sperm anöploidinin artışıyla paralellik gösteren IVF / ICSI başarısızlığı ve fetal anöploidilere ek olarak, nonobstrüktif azoospermi erkeklerden alınan testiküler sperm örnekleriyle yapılan IVF ve ICSI blastomerlerinde yüksek oranda anöploidi görüntülenmiştir(Gianaroli et al., 2005). Palermo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada nonobstrüktif azoospermi hastalarından alınan testiküller sperm örneklerindeki anöploidi oranı obstrüktif azoospermi erkeklerden alınan epididimal spermlerdeki anöploidi oranından yüksektir(Palermo, Colombero, Hariprashad, Schlegel, & Rosenwaks, 2002).Teloken ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada oligosperminin anöploidi üzerindeki olası etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmış, oligo ve normospermik hastalarla yapılan IVF sonucu elde edilen embriyolardaki anöploidi oranları karşılaştırılmıştır. İnfertilite tanısı almış oligo grupta %26,2 anaploidi görülürken, fertil olduğu bilinen normozoospermik hasta grubunda oran %25,9 olarak bulunmuştur. Bu çalışma düşük seminal konsantrasyon ve anöploid embriyo arasında korelasyon olmadığını göstermektedir. Araştırmacıların görüşü, In vitro fertilizasyonda artan anöploidi oranları tartışılırken elde edilen bu birincil sonuçların yeni çalışmalarla desteklenmesi ve doğrulanması gerektiği yönündedir.

Normozoospermik ve farklı şiddetteki oligozoospermik örnekleri kromozom anöploidileri ile karşılaştırdığımız önceki çalışmamızda oligozoospermi şiddeti arttıkça kromozom anöploidi oranının arttığı

gözlenmiştir (Durak et al., 2012). Diğer taraftan, yayınlanan son çalışmada astenozoospermi, oligozoospermi ve teratozoosperminin anormal FISH bulguları ile ilişkisi bildirilmiştir (Tang et al., 2010). 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 belirlenen fragmentasyon oranlarıyla literatür bilgilerinin karşılaştırılması**

Son on yıllık süreç içerisinde, DNA fragmentasyonu ile konvansiyonel sperm parametreleri arasındaki korelasyon araştırılmaktadır. Bazı çalışmalar sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi gibi genel sperm kalitesi ile sperm DNA fragmentasyonu arasında ters ilişki olduğunu ifade ederken (Evgeni, Charalabopoulos, & Asimakopoulos, 2014; Giwercman et al., 2003; Oleszczuk, Augustinsson, Bayat, Giwercman, & Bungum, 2013), bazı çalışmalarda anlamlı bir ilişki olmadığı bildirilmiştir (Saleh et al., 2003).

Sperm DNA fragmentasyonunun klinik faydalarını araştırmak üzere 2017 yılında 18 ülkeden 38 katılımcının yer aldığı bir çalışmada, klinisyenlerin %81,6 lık kısmı infertilite tedavisinde SDF testi kullanma yoluna gittiğini belirtirken, %7 lik kısmı tamamen değerlendirme dışı bıraktığını belirtmiştir. TUNEL ve SCSA testleri en yaygın testler olarak kullanılırken (%31) ardından sperm kromatin dispersiyonu (Halosperm) test (Spanò et al., 2000; Zhao et al., 2014) ve diğer yöntemler (Barratt et al., 2011; Bhagavath & Layman, 2007) gelmektedir. Sınır kabul edilen fragmentasyon aralıkları ise %10- %30 arası değişkenlik göstermektedir.

Bizim çalışmamızda son yıllarda çalışmaların güvenilirliği ve hassasiyetinden ötürü tercih edilen Halosperm test yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem, fragmente olmayan DNA içeren spermi, karakteristik halo görüntüsü ile ayırma prensibine dayanmaktadır.

Spermin en önemli işlevi paternal genomu oosit içerisine aktarmak olduğundan kromatin yapının bütünlüğü sadece fertilizasyon aşamasında değil, sperm kalitesinde de önemli rol oynamaktadır. Oosit ve zigot paternal genomdaki hasarı bir dereceye kadar onarabilme yeteneğine sahip olmakla birlikte DNA çift zincir kırıklarının onarımı güçleşmekte ve bu durum embriyo gelişimini etkilemektedir (Tamburrino et al., 2012; Zheng et al., 2018). Bu nedenle fertilize olabilen ancak implantasyon başarısızlığı veya erken dönem düşüklerinin görüldüğü durumlarda sperm DNA'sı önem taşımaktadır. Açıklanamayan infertilitede yüksek fragmentasyon indeksinin saptanması normal semen parametreleri arasında önemli bir veridir.



Oleszczuk ve ark. açıklanamayan infertilitesi olan 119 erkekte saptanan SDF indeksini, 95 fertil erkekteki indeks ile karşılaştırdıklarında, infertil grupta (%17.7), fertil gruba göre (%10.5) anlamlı düzeyde artış olduğunu ortaya koymuşlardır(Oleszczuk et al., 2013). Aynı şekilde Saleh ve ark.nın çalışmasında da infertil erkeklerde fragmentasyon indeks sıklığının fertil kontrollere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir(Saleh et al., 2003).

Agarwal ve arkadaşları DNA fragmentasyonu üzerine yapılan farklı protokol esaslarına dayanan bir çok çalışmayı değerlendirmiş yapılan meta-analizlerin belirsiz ve şüpheli sonuçlar ortaya koyduğuna değinmişlerdir. Son yıllarda çalışmalarda kullanılan, rafine prokoller olarak adlandırdıkları SCSA, TUNEL, SCD ve COMET testleriyle yaptıkları çalışmalarında DFI oranlarının etkilerini incelemişlerdir. DFI <% 30 ve DFI>% 30 olarak yardımcı üreme tekniklerindeki etkileri değerlendirilmiştir. IUI için %20-25 aralığının başarıyı zorladığı, %30 üzeri DFI'nin, ICSI gerektirdiği, %40 ve üzerinde ise canlı doğum oranlarının çok düşük olduğu ve gebelik kayıplarının görülebileceği bildirilmiştir (D. P. Evenson, 2017).

2017 yılında yapılan bir başka çalışmada risk DNA fragmentasyonu oranlarına göre farklı renkte bölgelerle adlandırmışlardır. DFI<% 20 oranıyla görünür bir problemin olmadığı yeşil bölge olarak adlandırılabilir; % 20 <DFI<% 25 ideal değerlerin dışında kabul edilerek, gri bölge olarak adlandırılabilir ve kadın faktöründe mutlaka değerlendirilmesi gerektiği belirtilmiştir. Kırmızı bölge olarak ifade edilen sınırlarda, ise DFI>% 25 üzerindedir ve gerçek bir problemin ipucu olabileceği, çevresel koşullar, diğer genetik testler (MTHFR) gibi daha fazla olasığın değerlendirmesi gerektiğini önermişlerdir (Menezo, Clement, & Amar, 2017).

Olmedo ve arkadaşlarının 2017 yılında 1562 örnekle yaptıkları çalışmada; ortalama fragmentasyon oranı için belirlenen normal referans değeri %20 kabul edilmiştir. Sperm parametrelerine göre ayrılan gruplar içerisinde en yüksek fragmentasyon oranına sahip hastaların oligoastenoteratozoospermi (%53,7) grubu içinde yer aldığı, normozspermi hastalarda ise bu oranın %22,4 olduğu gözlenmiştir(Olmedo, Molina, Tissera, Malizia, & Dellavedova, 2017). Bizim çalışmamızda da DNA fragmentasyonunun özellikle oligozoospermik örneklerde gözlenmiş olması literatür verileri ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan bir diğer çalışma azospermili hastalardan alınan testiküler sperm örneklerinde sperm DNA fragmentasyonunu raporlayan ilk çalışma niteliğindedir. Nonobstrüktif azospermili hastaların testiküler spermlerinde SDF (%46.9) anlamlı olarak obstrüktif azospermili hastalardan yüksek olarak bildirilmiştir (35.96%). Mevcut veriler sonucu, azospermili infertil erkeklerde testiküler sperm popülasyonunda hasarın testislere göre çok daha düşük olduğu, sperm üretiminin ise normal ve aktif devam ettiği

belirtilmiştir. Bu sonuç spermatogenez yetmezliğinin sperm DNA bütünlüğüyle ciddi bir şekilde ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmanın bir diğer bölümünde değerlendirilen testiküler SDF'nin gebelik sonuçlarıyla anlamlı bir ilişkisinin olmadığı (olasılık oranı  $\frac{1}{4}$  1.015) DNA hasarı bulunan spermatozoanın oositi dölleme yeteneğinin tamamen yok olmasa da, bu olasılığın başarısız embriyo gelişimine ve hatta kayıplarına yol açma riskinin arttırdığını bildirmişlerdir (Meseguer et al., 2009).

Defekte sahip baş morfolojisi, spermdeki DNA hasarının bir göstergesidir. Yapılan bir çalışmada DNA fragmentasyonu %20'den büyük olan spermelerde büyük, küçük, uzamış, amorf baş ve nükleer defektler oldukça yüksek görülmüştür (Dariš, Goropevšek, Hojnik, & Vlajsavljević, 2010). Bizim çalışmamızda da teratozoospermi olarak adlandırılan bozuk morfolojinin yüksek oranda görüldüğü grup ile diğer gruplar arasında DNA fragmentasyon oranları anlamlı düzeyde farklılık göstermiştir.

Bir başka çalışma ise Cebesoy ve ark. tarafından yürütülmüştür. Bu çalışmada sperm morfolojisi ile DNA hasarı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (Cebesoy et al., 2006). ICSI'de sperm morfolojisinin fertilizasyon oranlarını etkilediği belirtilmiş ancak De Vos ve ark.'nın aksine sperm morfolojisi ile embriyo kalitesi ilişkisinin anlamlı olmadığı vurgulanmıştır. De Vos ve ark. 'ları ise normal sperm morfolojisi olanlarda (% 36.7 ve % 18.7) anormal sperm morfolojisi olanlara göre (% 20.2 ve % 9.6) daha yüksek gebelik ve implantasyon oranları elde edildiğini ortaya koymuşlardır (De Vos et al., 2003).

Araştırma ve kontrol grubu örneklerinde yapılan SCD testinde, normozoospermik olmayan infertil grupta DNA fragmentasyonu olduğunu gösteren küçük halo/halo yok olarak değerlendirilen spermatozoa sıklığı %45, kontrol grubunda ise %24 olarak saptanmıştır ve anlamlı düzeyde farklılık bulunmaktadır. Bu duruma paralel olarak DNA fragmentasyonunun minimal düzeyde olmasını beklediğimiz, intakt DNaya sahip yani nükleus çevresinde büyük haloya sahip nükleus sıklığı kontrol grubunda %96, araştırma grubunda ise %70 olarak saptanmıştır ( $p < 0.001$ ). Verilerimiz literatür ile uyumludur. Araştırma grubu olgularının sperm kalite değerlendirmesine göre ayrılan beş grup içerisinde küçük/orta ve büyük halo özellikleriyle karşılaştırdığımızda anlamlı farklılık yalnızca küçük halo açısından saptanmıştır. DNA fragmentasyonu özellikle oligozoospermik örneklerde yüksek oranda gözlenmiştir.

### **5.3- DNA fragmentasyonu oranları ile sperm kromozom anöploidi/diploidi ilişkisinin literatür bilgileriyle karşılaştırılması**

Oligozoospermi, astenozoospermi ve teratozoospermi gibi semen parametreleri anormal olan bireylerde sperm anöploidi sıklığının arttığı yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir (Brahem, Mehdi, Elghezal, & Saad, 2011). 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 infertil olgularda hem DNA harabiyetinin hem de anöploidi artışının gebelik kayıplarında etkisi olduğunu bildirirken (Perrin et al., 2011), bazı çalışmalar da bu artışların globozoospermik hastalarda daha sık kendini gösterdiği yönündedir (Brahem et al., 2011). Durak ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da teratozoospermik ve oligozoospermik olguların diğer infertil bireylere göre yüksek oranlarda yapısal kromozom anomalisi taşıdıkları ortaya konmuştur (Durak Aras et al., 2012). Kombine DNA fragmentasyonu ve otozomal anöploidi (kromozom 13,18,21 ve 22) testlerinin IVF/ICSI'ye giden olgularda uygulandığı bir çalışmada kromozom anomalisi olan spermatozoalarda DNA fragmentasyon oranının arttığı bildirilmiştir (Carrell et al., 2003). Kromozom 18,X ve Y anöploidilerinin farklı semen özellikleri olan non-normozoospermik infertil erkeklerde incelendiği diğer bir çalışmada da (Muriel et al., 2007) fragmente DNA içeren örneklerde anöploidi sıklığının 4 kat arttığı bildirilmiştir. Buna karşılık Balasuriye ve ark DNA fragmentasyonu ve anöploidi arasında bir korelasyon olmadığını bildirmişlerdir (Balasuriya et al., 2011). Çalışmamızda, SCD testi ile saptanan toplam DNA fragmentasyonu ile kromozom 13 ve kromozom 18 anöploidileri arasında bir bağlantı dikkati çekmiş olsa bile özellikle DNA fragmentasyon belirteci olan küçük halo oranı dikkate alındığında istatistiksel farklılık saptanmamıştır.

Diploidi ve DNA fragmentasyonu korelasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Özellikle duyarlılığı daha sınırlı olan SCD testinde küçük/orta halo ile diploidi korelasyonunun gözlenmesi, diploidi ve DNA fragmentasyonu ilişkisinin ileri düzeyde olabileceğini düşündürmüştür. Bu verimiz literatürle uyumludur (Brahem et al., 2011).

2007 yılında SCD test yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada fragmentasyon ve anöploidi oranları eş zamanlı testlerle aynı spermotazolar üzerinde çalışılmıştır. Yüksek oranda DNA fragmentasyonu içeren sperm hücrelerinin hem birinci hem de ikinci mayotik bölünmelerden kaynaklanan seks kromozom anöploidileri içerdiği belirtilmiştir. Fragmente DNA içeren sperm içindeki anöploidi oranındaki gözlenen artış, sperm maturasyonu sırasında anöploidi oluşumunun sperm DNA fragmentasyonunun bir parçası olarak ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Çalışmada genel olarak, diploidiler ve disomiler içeren sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonunun arttığı ve en yüksek

oranların seks kromozomlarında görüldüğü yönündedir (Muriel et al., 2007). İnsan sperminde, seks kromozom dizomileri daha sık gözlenmektedir ve fertilizasyon sonrasında da yaşarla 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, halo test sonuçlarının cinsiyet kromozomu dizomilerinden XY ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korelasyon dikkati çekmiştir. Bu ilişki diğer (XX,YY) seks kromozom dizomileri ile gözlenmemiştir. McAuliffe ve ark ; sadece cinsiyet kromozomu dizomileri ile DNA fragmentasyonu arasında bağlantı olup olmadığını sorguladıkları çalışmalarında da 341 örnekte sadece XY dizomisi ile DNA fragmentasyon ilişkisinin istatistiksel anlamlılık gösterdiğini bildirmişlerdir(McAuliffe et al., 2014). Çalışmamızda saptanan XY dizomisi ve DNA fragmentasyon ilişkisi literatürü desteklemektedir.

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.

## 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 SCD test analizleri yapılmıştır. Çalışmamızın bir diğer amacı kromozom anöploidileri ile DNA fragmentasyonu arasındaki ilişkinin saptanmasıdır. Tüm bu sonuçların infertil hastalar üzerindeki tanı ve tedavi sürecindeki kullanılabilirliği araştırılmıştır. Elde edilen veriler literatür ile karşılaştırılıp tartışılmıştır.

1) Öncelikle hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerden alınan eş zamanlı örneklerin semen analizi sonuçlarına göre yapılan karşılaştırmada; sperm konsantrasyonu, genel sperm motilite ve normal spermatozoa görünüm yüzdeleri arasında anlamlı farklılıkların olduğu gözlenmiştir. Her iki grup bireylerinin yaşları arasında bir farklılık bulunmamaktaydı.

2) Çalışmamızda fertil, normozoospermik gruba göre infertil olan araştırma grubunda tüm anöploidi oranlarının anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir. Otozomal ve seks kromozomal dizomileri ile diploidinin infertil grupta ileri derecede arttığı saptanmıştır.

3) 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.

4) Diğer kromozom anöploidilerin dağılımlarında anlamlı bir birikmenin saptanamaması non-normozoospermik infertil grubun alt gruplarındaki olgu sayılarının sınırlı oluşuna bağlanabilir.

5) DNA fragmentasyon değerlendirmesinde küçük halo/halo yok olarak değerlendirilen spermatozoa sıklığı non-normozoospermik grupta %45 iken kontrol grubunda bu oran %24 tür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. ( $p = < 0.001$ ).

6) Orta düzeyde halo, araştırma grubu olgularında %60, kontrol grubu bireylerinde ise %67 oranında gözlenmiş olup gruplar arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Buna karşılık, intakt DNA'ya sahip yani nükleus çevresinde büyük haloya sahip nükleus sıklığı kontrol grubunda %96 iken araştırma grubunda %70 olarak saptanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel farklılık dikkati çekmektedir ( $p = < 0.001$ ).

7) Non-normozoospermik grubundaki alt grupları küçük/orta ve büyük halo özellikleriyle karşılaştırdığımızda anlamlı farklılık yalnızca küçük halo açısından saptanmıştır.

8) Teratozoospermi ile oligozoospermi grupları arasında küçük halo görülme sıklığı anlamlı düzeyde farklılık göstermiştir ( $p=0.017<0.05$ ). Bu veri, DNA fragmentasyonunun özellikle oligozoospermik örneklerde gözleendiğini ortaya koymuştur.

9) Hasta ve kontrol grubunda saptanan toplam halo oranı ile dizomi 13 ve 18 arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmiştir.

10) Fragmente DNA belirteci olan küçük halo ile otozomal ve seks kromozomal anöploidiler arasında anlamlı düzeyde bir korelasyon saptanmamıştır. Yani kromozomal anöploidi ile küçük halo ilişkisi bu çalışmada gözlenmemiştir.

11) Poliploidi olarak ifade edebileceğimiz diploidik spermatozoa oranları arttıkça küçük halo oranının da anlamlı düzeyde arttığı dikkati çekmiştir.

Yapılan çalışmalarda yüksek sperm anöploidisi ve yüksek DFI oranları fertilité değerlendirilmesinde negatif birer parametredir. Sonuç olarak bu durum implantasyon başarısızlığı, gebelik kayıplarına ve/veya kromozomal anomalili fetus ve çocukların doğma olasılığının artmasına yol açacaktır. Özellikle yardımcı üreme tekniklerine yönlendirilen olgu gruplarındaki erkeklerde rutin spermiogram ve morfolojik sperm analizlerinin yanısıra sperm anöploidi oranı ve DNA fragmentasyon oranlarının belirlenmesinin, reproduktif uygulamalara geçmeden önce yardımcı birer test olarak önerilebileceği görüşündeyiz. Bu sonuca göre hastalara genetik danışma verilmeli, gerekli durumlarda preimplantasyon tanı ve prenatal tanıya yönlendirilmelidirler.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Razic, M., Abdel-Hamid, I., & ElSobky, E. (2012). Nonmosaic 47, XYY syndrome presenting with male infertility: case series. *Andrologia*, 44(3), 200-204.
- Abruzzo, M. A., & Hassold, T. J. (1995). Etiology of nondisjunction in humans. *Environmental and molecular mutagenesis*, 25(S2), 38-47.
- Aitken, R., & De Iullis, 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., & Henkel, R. R. (2011). Sperm cell biology: current perspectives and future prospects. *Asian journal of andrology*, 13(1), 3.
- Balasuriya, A., Speyer, B., Serhal, P., Doshi, A., & Harper, J. (2011). Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(5), 428-436.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome biology*, 8(9), 227.
- Bareh, G. M., Jacoby, E., Binkley, P., Schenken, R. S., & Robinson, R. D. (2016). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation assessment in normozoospermic male partners of couples with unexplained recurrent pregnancy loss: a prospective study. *Fertility and sterility*, 105(2), 329-336. e321.
- Barratt, C. L., Mansell, S., Beaton, C., Tardif, S., & Oxenham, S. K. (2011). Diagnostic tools in male infertility—the question of sperm dysfunction. *Asian journal of andrology*, 13(1), 53.
- Bhagavath, B., & Layman, L. C. (2007). *The genetics of hypogonadotropic hypogonadism*. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine.
- 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.
- Brahem, S., Jellad, S., Ibala, S., Saad, A., & Mehdi, M. (2012). DNA fragmentation status in patients with necrozoospermia. *Systems biology in reproductive medicine*, 58(6), 319-323.

- Brahem, S., Mehdi, M., Elghezal, H., & Saad, A. (2011). Analysis of sperm aneuploidies and DNA fragmentation in patients with globozoospermia or with abnormal acrosomes. *Urology*, 77(6), 1343-1348.
- 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.
- Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J., & Giwercman, A. (2006). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Human Reproduction*, 22(1), 174-179.
- Caron, N., Veilleux, S., & Boissonneault, G. (2001). Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Molecular reproduction and development*, 58(4), 437-443.
- 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.
- Cebesoy FB, Ünlü C, Aydos K, Baltacı V. Sperm morfolojisi ve acridine orange boyamanın ICSI'deki fertilizasyon oranları ve embriyo kalitesi ile ilişkisi. *J Turkish-German Gynecol Assoc.* 2006;(2):110-114.
- Dar, S., Grover, S. A., Moskovtsev, S. I., Swanson, S., Baratz, A., & Librach, C. L. (2013). In vitro fertilization–intracytoplasmic sperm injection outcome in patients with a markedly high DNA fragmentation index (> 50%). *Fertility and sterility*, 100(1), 75-80.
- Dariš, B., Goropevšek, A., Hojnik, N., & Vlaisavljević, V. (2010). Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Archives of gynecology and obstetrics*, 281(2), 363-367.
- De Vos, A., Van De Velde, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. (2003). Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, 79(1), 42-48.
- Delilbaşı, L. (2008). In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni uygulamalar ve güncel yaklaşımlar). *Ankara: Güneş Kitabevleri*, 61-83.
- 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.
- Evenson, D., Darzynkiewicz, Z., & Melamed, M. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210(4474), 1131-1133.
- Evenson, D. P. (2017). Evaluation of sperm chromatin structure and DNA strand breaks is an important part of clinical male fertility assessment. *Translational andrology and urology*, 6(Suppl 4), S495.
- Evgeni, E., Charalabopoulos, K., & Asimakopoulos, B. (2014). Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *Journal of reproduction & infertility*, 15(1), 2.
- Fantz, D. A., Hatfield, W. R., Horvath, G., Kistler, M. K., & Kistler, W. S. (2001). Mice with a targeted disruption of the H1t gene are fertile and undergo normal changes in structural chromosomal proteins during spermiogenesis. *Biology of reproduction*, 64(2), 425-431.
- Fernández, J., Vázquez-Gundín, F., Delgado, A., Goyanes, V., Ramiro-Díaz, J., De la Torre, J., & Gosálvez, J. (2000). DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 453(1), 77-82.
- Fernández, J. L., & Gosálvez, J. (2002). Application of FISH to detect DNA damage. In *In Situ Detection of DNA Damage* (pp. 203-216): Springer.
- 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.
- Flannigan, R., & Schlegel, P. N. (2017). Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*.
- Fullerton, G., Hamilton, M., & Maheshwari, A. (2010). Should non-mosaic Klinefelter syndrome men be labelled as infertile in 2009? *Human Reproduction*, 25(3), 588-597.
- Gat, I., Tang, K., Quach, K., Kuznyetsov, V., Antes, R., Filice, M., . . . Librach, C. (2017). Sperm DNA fragmentation index does not correlate with blastocyst aneuploidy or morphological grading. *PloS one*, 12(6), e0179002.

- Gianaroli, L., Magli, M. C., Ferraretti, A. P., Tabanelli, C., Trengia, V., Farfalli, V., & Cavallini, G. (2005). The beneficial effects of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy support extensive clinical application. *Reproductive BioMedicine Online*, 10(5), 633-640.
- Giwercman, A., Richthoff, J., Hjøllund, H., Bonde, J. P., Jepson, K., Frohm, B., & Spano, M. (2003). Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertility and sterility*, 80(6), 1404-1412.
- 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.
- Gunalp, S., Onculoglu, C., Gurgan, T., Kruger, T. F., & Lombard, C. J. (2001). A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Human Reproduction*, 16(1), 110-114.
- 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.
- Jarow, J., Sigman, M., Kolettis, P., Lipshultz, L., McClure, R., Nangia, A., . . . Schlegel, P. (2010). *The evaluation of the azoospermic male: AUA best practice statement*. Paper presented at the American Urological Association.
- Jegou, B., Pineau, C., & Toppari, J. (2002). Spermatogenesis in vitro in mammals. *Assisted Reproductive Technology: Accomplishments and New Horizons, De Jonge, 1st ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK*, 3-6.
- 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.
- Kierszenbaum, A. L. (2001). Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Molecular reproduction and development*, 58(4), 357-358.

- Kierszenbaum, A. L., & Demir, R. (2006). *Histoloji Ve Hücrebiyolojisi: Patolojiye Giriş*: Palme Yayıncılık.
- Kohn, T. P., Pastuszak, A. W., Rodriguez, K. M., Solomon, Z. J., Cherches, M. F., Lamb, D. J., & Lipshultz, L. I. (2017). MP35-09 SPERM ANEUPLOIDY IS ASSOCIATED WITH WORSE GENERAL HEALTH IN INFERTILE MEN. *The Journal of Urology*, 197(4), e460-e461.
- Koyuncu, H. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri.
- Majzoub, A., Esteves, S. C., Gosálvez, J., & Agarwal, A. (2016). Specialized sperm function tests in varicocele and the future of andrology laboratory. *Asian journal of andrology*, 18(2), 205.
- 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.
- Mehdi, M., Smatti, B., Saad, A., Guerin, J., & Benchaib, M. (2006). Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomic aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia. *Andrologia*, 38(4), 137-141.
- Menezo, Y., Clement, P., & Amar, E. (2017). Evaluation of sperm DNA structure, fragmentation and decondensation: an essential tool in the assessment of male infertility. *Translational andrology and urology*, 6(Suppl 4), S553.
- Mescher, A. L. (2013). *Junqueira's basic histology: text and atlas*: Mcgraw-hill.
- Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., Gil-Salom, M., Remohí, J., & Fernandez, J. L. (2009). Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertility and sterility*, 92(5), 1638-1645.
- Miller, D., Brinkworth, M., & Iles, D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*, 139(2), 287-301.
- 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.
- Natali, A., & Turek, P. J. (2011). An assessment of new sperm tests for male infertility. *Urology*, *77*(5), 1027-1034.
- Nayernia, K., Böhm, D., Topaloglu, Ö., Schlüter, G., & Engel, W. (2001). Rat transition nuclear protein 2 regulatory region directs haploid expression of reporter gene in male germ cells of transgenic mice. *Molecular reproduction and development*, *58*(4), 368-375.
- Oleszczuk, K., Augustinsson, L., Bayat, N., Giwercman, A., & Bungum, M. (2013). Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology*, *1*(3), 357-360.
- Olmedo, J., Molina, R., Tissera, A., Malizia, E., & Dellavedova, T. (2017). MP35-10 RELATIONSHIP BETWEEN SEMINAL PARAMETERS AND SPERMAL DNA FRAGMENTATION. *The Journal of Urology*, *197*(4), e461.
- Ordueri, A. G. E., & Çelik-Özenci, Ç. genomu taşıyan kargodan daha fazlası.
- Organization, W. H. (2010). Examination and processing human semen. *Geneva: World Health Organization*, 1-287.
- Palermo, G. D., Colombero, L. T., Hariprashad, J. J., Schlegel, P. N., & Rosenwaks, Z. (2002). Chromosome analysis of epididymal and testicular sperm in azoospermic patients undergoing ICSI. *Human Reproduction*, *17*(3), 570-575.
- 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.
- Piomboni, P., Stendardi, A., & Gambera, L. (2014). Chromosomal aberrations and aneuploidies of spermatozoa. In *Genetic Damage in Human Spermatozoa* (pp. 27-52): Springer.
- Prisant, N., Escalier, D., Soufir, J., Morillon, M., Schoevaert, D., Misrahi, M., & Tachdjian, G. (2007). Ultrastructural nuclear defects and increased chromosome aneuploidies in spermatozoa with elongated heads. *Human Reproduction*, *22*(4), 1052-1059.
- 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.

Rieder, H., Bonwetsch, C., Janssen, LAJ., Maurer, J., Janssen, IWG., Schwartz, S., Ludwig, WD., Gassmann, W., Bartram, CR., Thiel, E., Löffler, H., Gökbuget, N., Hoelzer, D., Fonatsch, C., 1998, High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using BCR and ABL probes in adult acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia*, 12:1473-1481

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.

Robinson, L., Gallos, I. D., Conner, S. J., Rajkhowa, M., Miller, D., Lewis, S., . . . Coomarasamy, A. (2012). The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 27(10), 2908-2917.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*: Lippincott Williams & Wilkins.

Sadler, T. (1996). Langman' S Medikal Embriyoloji (7. Baskı). C. *Başaklar*, K. SÖNMEZ, Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık.

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.

Sarrate, Z., & Anton, E. (2009). Fluorescence in situ hybridization (FISH) protocol in human sperm. *Journal of visualized experiments: JoVE*(31).

Sarrate, Z., Blanco, J., Anton, E., Egozcue, S., Egozcue, J., & Vidal, F. (2005). This web only provides the extract of this article. If you want to read the figures and tables, please reference the PDF full text on Blackwell Synergy. Thank you. *Asian J Androl*, 7(3), 227-236.

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.
- Shao-Qin, G., Jian-Zhong, L., & Xiao-Jing, Z. (2011). Methylation and acetylation of histones during spermatogenesis. *Hereditas (Beijing)*, 33(9), 939-946.
- 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.
- Shi, Q., & Martin, R. H. (2001). Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reproduction*, 121(5), 655-666.
- Simon, L., Brunborg, G., Stevenson, M., Lutton, D., McManus, J., & Lewis, S. E. (2010). Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Human Reproduction*, 25(7), 1594-1608.
- 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., Zini, A., Dyachenko, A., Ciampi, A., & Carrell, D. T. (2017). A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian journal of andrology*, 19(1), 80.
- 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.
- Tamburrino, L., Marchiani, S., Montoya, M., Marino, F. E., Natali, I., Cambi, M., . . . Muratori, M. (2012). Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian journal of andrology*, 14(1), 24.
- Tandara, M., Bajić, A., Tandara, L., Bilić-Zulle, L., Šunj, M., Kozina, V., . . . Jukić, M. (2014). Sperm DNA integrity testing: big halo is a good

- predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. *Andrology*, 2(5), 678-686.
- Tang, S., Gao, H., Zhao, Y., & Ma, S. (2010). Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *International journal of andrology*, 33(1).
- Tavukçuoğlu, İ. Ş., Al-Azawi, T., Khaki, A. A., Khaki, A., Khalil, A., & Al-Hasani, S. (2012). Clinical value of DNA fragmentation evaluation tests under ART treatments. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 13(4), 270.
- Tiepolo, L., & Zuffardi, O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human genetics*, 34(2), 119-124.
- Vegetti, W., Van Assche, E., Frias, A., Verheyen, G., Bianchi, M. M., Bonduelle, M., . . . Van Steirteghem, A. (2000). Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Human Reproduction*, 15(2), 351-365.
- Vicdan, K., & Isık, A. (1999). Ğn Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar. *Ankara, Çağdas Medikal Kitapevi*.
- Wu, S.-M., & Chan, W.-Y. (1999). Male pseudohermaphroditism due to inactivating luteinizing hormone receptor mutations. *Archives of medical research*, 30(6), 495-500.
- 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.
- Yu, Y. E., Zhang, Y., Unni, E., Shirley, C. R., Deng, J. M., Russell, L. D., . . . Meistrich, M. L. (2000). Abnormal spermatogenesis and reduced fertility in transition nuclear protein 1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), 4683-4688.
- Zhao, J., Zhang, Q., Wang, Y., & Li, Y. (2014). Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*, 102(4), 998-1005. e1008.

Zheng, W.-W., Song, G., Wang, Q.-L., Liu, S.-W., Zhu, X.-L., Deng, S.-M., . . . Tan, Y. (2018). Sperm DNA damage has a negative effect on early embryonic development following in vitro fertilization. *Asian journal of andrology*, 20(1), 75.

Zini, A., & Sigman, M. (2009). Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of andrology*, 30(3), 219-229.





## Özgeçmiş

### Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Ayça DEMİREL  
Doğum tarihi ve yeri : 18.06.1988-ANKARA  
Uyruğu : T.C  
Medeni durumu : Evli  
İletişim adresleri : İlbahar mah. Galip Erdem cad.  
Güneypark konutları F/42 Oran/ANKARA

### Eğitim Durumu

1994-2001: İlköğretim, Yalçın Eskiyan İlköğretim Okulu  
2002-2005: Lise, Özel Türk Yurdu Lisesi  
2007-2011: Lisans, ESOGÜ Fen-Edebiyat Fak.Biyoloji Bölümü  
2012-2018: Y.Lisans, ESOGÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik A.D  
yabancı dil / diller) :

**Mesleki Deneyim** :

### Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar:

**Yayınlar** :

Sperm DNA fragmentation and chromosomal aneuploidy in men with unexplained infertility Beyhan Durak Aras, Ayca Tanriverdi, Efsun Tosumoglu, Iyimser Ure, Muhsin Ozdemir, Oguz Cilingir, Sevilhan Artan, Molecular Cytogenetics 2017, 10(Suppl 1):20,p:31

### Bilimsel Etkinlikler

Burslar :  
Ödüller: *Pinus nigra* kozalakları üzerinde immobilize edilen *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri ile boyarmadde biyosorpsiyonu ,2010, Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoteknoloji Bahar Okulu Poster Sunumu Birincilik Ödülü  
Projeler :  
Sözlü Konferans veya Seminerler :  
Kurslar ve Eğitim Programları :

