

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM
DALIHİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
BİLİMDALİ YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Turan KARACA

**İNTRA UTERİN İNSEMİNASYON (IUI)
HASTALARINDA, SPERM DNA STATÜSÜNÜN
GEBELİK SONUÇLARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Sibel IŞIK

Referans no: 10062223

EDİRNE – 2015

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Turan KARACA danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Sibel IŞIK tarafından tez başlığı “**İntra Uterin İnseminasyon (IUI) Hastalarında, Sperm DNA Statüsünün Gebelik Sonuçları ile Değerlendirilmesi**” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 13/01/2015 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.


JÜRİ BAŞKANI

Prof. Dr. Turan KARACA

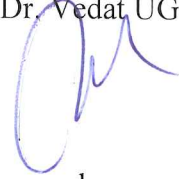
ÜYE

Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ



ÜYE

Yard. Doç. Dr. Vedat UĞUREL



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

Doç. Dr. Tammam SİPAHI
Enstitü Müdürü

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM
DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Turan KARACA

**İNTRA UTERİN İNSEMİNASYON (IUI)
HASTALARINDA, SPERM DNA STATÜSÜNÜN
GEBELİK SONUÇLARI İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

Sibel IŞIK

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2013/154

Tez No :

EDİRNE – 2015

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni yetiştiren, bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, çalışmam sırasında bilimsel katkıları ve yardımlarını esirgemeyen Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı başkanımız ve danışman hocam sayın Prof. Dr. Turan KARACA'ya, araştırmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Yrd. Doç Dr. Ayşe Sevinç EGE, Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ, Doç. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN ve Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADA ÇALIŞIR ile Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ-METİN'e, tezimin değişik aşamalarında birlikte çalıştığımız ve yardımlarını esirgemeyen Özge YAMAN'a, Tüp Bebek Bölümü çalışanlarına, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalındaki arkadaşlarıma, maddi destek için TÜBAP'a ve aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
İN FERTİLİTE	3
İN FERTİLİTE NEDENLERİ	5
YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ	10
İNTRAUTERİN İNSEMİNASYON (IUI)	12
DNA FRAGMENTASYONU	13
TUNEL METODU	15
GEREÇ VE YÖNTEMLER	17
BULGULAR	20
TARTIŞMA	29
SONUÇLAR	34
ÖZET	36
SUMMARY	38
KAYNAKLAR	40
RESİMLEMELER LİSTESİ	46
ÖZGEÇMİŞ	48
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AO	: Akridin oranj
CFTR	: Kistik fibroz transmembran regülatör
CMA3	: Chromomycin A3
COMET	: Cluster of motifs E-value tool
DBD-FISH	: DNA breakage detection-Floresan insitu Hibridizasyon
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
dUTP	: Deoksiuridine triphosphate
FSH	: Folikül stimulan hormon
GIFT	: Gamet intrafallopian tüp transfer
GnRH	: Gonadotropin releasing hormon
hCG	: Human koryonik gonadropin
HSG	: Histerosalpingografi
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IUD	: İntrauterin dilatasyon
IUI	: İntra uterin inseminasyon
IVF-ET	: İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transfer
LH	: Lüteinizan hormon
MESA	: Mikroskopikepididimal sperm aspirasyonu
ml	: Mililitre
N	: Normal
NOA	: Nonobstruktif azospermi

OA	: Obstruktif azospermi
PBS	: Phosphate buffered saline
PESA	: Perkütan epididimal sperm aspirasyonu
PFA	: Paraformaldehit
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PKOS	: Polikistik over sendromu
POD	: Horseradish peroxidase
rcf	: Rölatif santrifüj kuvveti
SCD	: Sperm kromatin dağılımı
SCSA	: Sperm kromatin strüktür analizi
SUZI	: Subzonal sperm enjeksiyonu
TdT	: Deoksinukleotidyl transferase
TESE	: Testikülerspermekstraksiyonu
TUNEL	: TdT-mediated-dUTP nick end labeling
USG	: Ultrasonografi
ÜYT	: Üremeye yardımcı teknikler
ZIFT	: Zigot Intrafallopian tüp transfer
µl	: Mikrolitre

GİRİŞ VE AMAÇ

Kısırlık (infertilite), reproduktif çağda olan bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır. İnfertilite reproduktif çağdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Korunmasız geçen 12 aylık süre sonunda çiftlerin %80'i ilk 6 ay içinde, geri kalanların ancak %10'u takip eden 6 ay içinde gebe kalabilmektedir. Tüm infertil çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü etkilidir. Çiftlerin %20-25'inde hem erkek hem de kadına ait patolojiler birlikte gözlenir. İnfertil çiftlerin %15'inde ise tüm tanısal tetkikler sonucunda bir infertilite nedeni tanımlanamaz (1).

Günümüzde, Üremeye Yardımcı Tekniklerin (ÜYT) uygulandığı infertilite merkezlerine başvuruda bulunan hastalara, erkek infertilitesi ve açıklanamayan infertiliteye bağlı olanlara uygulana ilk tedavi yöntemi İntra Uterin İnseminasyon (IUI)'dur. IUI prosedürü, eşin spermelerinin değişik yöntemlerle hazırlanarak, iyi ve hareketli olanlar seçilerek kateter vasıtasıyla uterus içine verilmesidir.

Spermelerin sayısı, hareketlilik ve morfoloji değerlendirilmesi Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından belirlenen standardizasyona göre yapılmaktadır. Fakat bu değerlendirme spermelerin fertilizasyon potansiyelini belirlemek için yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle son yapılan araştırmalar, spermelerin in vitro koşullardaki fertilizasyon potansiyelini öngörebilme amacına yöneliktir. İnsan sperminde deoksiribonükleik asit (DNA) yapısı fertilizasyonda önemli yer almaktadır. Yapılan çalışmalarda, DNA içeriği normal olan spermelerin fertilizasyon potansiyelinin daha fazla olduğu rapor edilmiştir.

DNA hasarını ölçmek için değişik yöntemler kullanılmasına rağmen, günümüzde yaygın olarak TdT-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL) boyama yöntemi kullanılmaktadır. TUNEL direkt olarak DNA kırıklarını ölçmektedir. Terminal deoksinukleotidyl transferase (TdT) enziminin kataliz ettiği bir reaksiyonla tek veya çift zincir DNA kırıklarına, işaretlenmiş deoksiuridine triphosphate (dUTP)'yi serbest 3'-hidroksil ucuna birleştirilir ve DNA kırıkları işaretlenir. İşaretlenen bu kırıklar ışık mikroskopisi, floresan mikroskopi ya da akım sitometrisi ile ölçülür.

Yapılan literatür taramalarında, DNA hasar oranının IUI uygulaması sonrası gebelik oluşması üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar yetersiz olduğu tespit edilmiştir. Planlanan bu çalışmada, IUI uygulanması kararı alınan infertil çiftlerden, erkek bireylerden elde edilen spermlerin yıkama işlemi sonrası TUNEL boyama ile DNA hasar oranı tespit edilip hamilelik oluşumu üzerine etkisi araştırıldı.

GENEL BİLGİLER

İNFERTİLİTE

Kısırlık (infertilite), reproduktif çağda olan bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır. İnfertilite reproduktif çağdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Korunmasız geçen 12 aylık süre sonunda çiftlerin %80'i ilk 6 ay içinde, geri kalanların ancak %10'u takip eden 6 ay içinde gebe kalabilmektedir. Tüm infertil çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü tespit edilir. Çiftlerin %20-25'inde çiftte hem erkek hem de kadına ait patolojiler birlikte gözlenir. İnfertil çiftlerin %15'inde ise tüm tanısal tetkikler sonucunda bir infertilite nedeni tanımlanamaz (açıklanamayan infertilite) (1).

Fertilite (doğurganlık) oranları 20-25 yaş arasında maksimuma ulaşır. Otuz-otuz iki yaşlar arasında rölatif bir azalma görülür ve 40 yaş sonrasında hızlı bir düşüşe geçer. Toplam fertilite oranları 25-29 yaşta %4-8 azalırken bu oran 30-34 yaş arasında %15-19, 35-39 yaşta %26-46 ve 40-45 yaşta %95 şeklinde azalma gösterir (1). Çiftlerin %85'i ilk bir yıl içinde gebe kalabildikleri için bu süre zarfında detaylı bir inceleme yapmak yalancı pozitif test sonuçlarının ve yararsız tedavi uygulamalarının artmasına yol açacağı ve spontan gebelik şansını kaçırabileceği için gereksizdir (2). Bu süreyi beklemeksizin araştırılmaya başlanacak çiftler şu kriterler ile sınırlandırılmıştır:

1. 35 yaş üstü kadınlar,
2. Oligoamenoreli kadınlar,
3. Bilinen ya da şüphelenilen uterin, tubal hastalığı ya da endometriozisi olan kadınlar,
4. Abdominal ve pelvik cerrahi geçiren kadınlar,
5. Bilinen ya da şüphelenilen semen anormalliği mevcut olan erkekler,

6. Geçirilmiş ürogenital cerrahi öyküsü, genital patolojik bulgusu olan erkekler,
7. Cinsel yolla bulaşan hastalık geçirmiş olan erkekler (1).

Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

İnfertil bir erkek değerlendirilirken ilk yapılacak işlem, 4-6 hafta ara ile en az 2 kez semen analizidir. Semen örneği 3-6 günlük cinsel perhiz sonrası alınmalı ve en geç 1 saat içinde değerlendirilmelidir. DSÖ, insan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi için Laboratuvar El Kitabı (2010 WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen) referans değerler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Dünya Sağlık Örgütü'nün insan semen örnekleri için referans değerleri (3)

Parametreler	En düşük referans değerleri
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (milyon)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (milyon/ ml)	15 (12-16)
Total motilite (ileri hareketli (PR)+yerinde hareketli (NP), %)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2

PR: Progresif, **NP:** Non Progresif, **pH:** Hidrojenin Gücü.

Semenin incelenmesinde, sperm sayısının ve morfolojisinin özelliklerine göre;

- Normozoospermi:** Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat,
- Oligozoospermi:** Referans değerlerden düşük sperm konsantrasyonu,
- Asthenozoospermi:** Hareketlilik için referans değerden daha düşük değer,
- Teratozoospermi:** Morfoloji için referans değerden daha düşük değer,
- Oligoasthenoteratozoospermi:** Her üç değişkende olan bozukluğa işaret eder,
- Azoospermi:** Ejakülatta hiç spermatozoa olmaması,
- Aspermi:** Hiç ejakülat elde edilememesi durumu.

Eğer değerler DSÖ kriterlerine göre normal ise, tek test yeterli kabul edilmelidir. Sadece, en az iki testin de anormal bulunması durumunda, ileri androlojik araştırma gerekir. Ürolojik değerlendirmeye detaylı anamnez ve fizik muayene ile başlanır. Pretestiküler, testiküler ve posttestiküler infertilite nedenleri araştırılmalı, gerektiğinde endokrinolojik, genetik, ultrasonografik tetkikler ve biyopsiye başvurulmalıdır. Böylece infertilitenin medikal

ya da cerrahi tedavi ile düzeltilemeyeceği durumlarda IUI ya da yardımcı üreme teknikleri kullanılacak hastaların tanımlanması ve olası gebelikte çocukları etkileyecek genetik anormalliklerin belirlenmesi mümkün olacaktır (1).

Kadın İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

İnfertil bir çiftte yaklaşımda, kadın faktörünün değerlendirilmesi tanı ve tedavide önemli bir unsurdur. İnfertilite nedeni her ne olursa olsun gebelik, kadının anatomi ve fizyolojisi ile yakından ilişkilidir. Fizik muayene, ultrasonografi (USG), ovulasyonun değerlendirilmesi, tubal ve pelvik patolojilerin değerlendirilmesi yapılır (1).

İNFERTİLİTE NEDENLERİ

Erkek İnfertilitesinin Nedenleri

Primer testiküler yetersizlik/nonobstrüktif azospermi: Hipotalamo-hipofizer hastalıklar dışında sperm yapımında değişikliğe neden olan tüm patolojiler bu grupta değerlendirilebilir. Primer testiküler yetersizlik çeşitli tablolarla ortaya çıkabilmekle birlikte klinik olarak en ağır formu nonobstrüktif azospermi (NOA) olarak gözlenir. Etyolojide rol oynayan faktörler Tablo 2'de özetlenmiştir (3).

Tablo 2. Primer testiküler yetersizlik nedenleri (3)

Anorşi
Konjenital faktörler (testiküler disgenezi)
Kazanılmış faktörler (travma, testis torsiyonu, tümör, cerrahi)
İnmemiş testis
Klinefelter sendromu
Kromozomal anomaliler
Germ hücre aplazisi
Komplet ya da fokal germ hücre aplazisi (Sertoli-cell only sendromu), konjenital ya da kazanılmış; inmemiş testis, radyasyon, sitostatik ilaçlar
Spermatogenik arrest
Post-inflamatuar (orşit)
Dış faktörler (ilaçlar, toksinler, radyasyon, sıcak)
Sistemik hastalıklar (siroz, böbrek yetmezliği)
Testis tümörü
Varikozel
Testis damarlanmasına zarar veren cerrahi işlemler
İdiopatik

Genetik Hastalıklar

İnfertil erkeklerde kromozomal anomali oranı %5,8'dir (3-5). Bu anomaliler sayısal (örn: trizomi) yada yapısal (örn: inversiyon, translokasyon) olabilmektedir. Seks kromozomlarında saptanan anomalilerden en sık karşılaşılanı ise Klinefelter sendromudur. Klinefelter sendromunda karyotip 47,XXY ya da 46,XY/47,XXY mozaizm olabilir. Erkek infertilitesinde karşılaşılan diğer bir kromozomal anomali ise Y kromozomunda saptanan ve AZFa-b-c olarak adlandırılan mikrolelesyonlardır. Genetik olarak incelenmesi gereken bir durum da hastada konjenital bilateral vaz deferens yokluğu saptanmasıdır. Bu hastalarda kistik fibroz transmembran regülatör (CFTR) geninde mutasyon en önemli etkidir (3).

Obstrüktif Azoospermi

Proksimal ya da distal ejakülator kanallarda bilateral obstrüksiyon nedeniyle semende ve ejakülasyon sonrası idrar incelemesinde sperm ya da spermatogenik hücre bulunmaması obstrüktif azoospermiyi (OA) tanımlamaktadır. Azoospermik hastalarda, non-obstrüktif azoospermi daha sık görülmekle birlikte, OA oranı %15-20'dir. Obstrüktif azospermi intratestiküler, epididimal, vaz deferens ve ejakülator kanal obstrüksiyonuna bağlı olabilir (3).

Varikosel

Spermatik venlerin anormal dilatasyonu olarak tanımlanan varikosel normal popülasyonda %11.7 oranında saptanmasına rağmen, infertil erkeklerde bu oran %25.4'tür (3,5). Varikosel, ilerleyici testis hasarı ile seyreden testis gelişiminde gerilemeye ve spermatogenezi bozarak infertiliteye neden olabilir. Fertilité üzerindeki etkileri semen anomalileri (sperm sayısı, motilite ve morfolojide bozulma), testiküler volümde azalma ve Leydig hücre fonksiyonunda azalmayla kendini gösterir (6). Varikosel, artmış DNA fragmantasyonu ile de ilişkilendirilmiştir. Varikosektomi sonrası DNA fragmantasyonunun düzeldiği, yapılan araştırmalar sonucunda gösterilmiştir (5).

Hipogonadotropik Hipogonadizm

Hipogonadotropik hipogonadizm, hipofizer ya da hipotalamik hastalıklar sonucu ortaya çıkabilir ve konjenital ya da sonradan edinilmiş olabilir. Tablo 3'te hipogonadotropik hipogonadizmin sınıflaması gösterilmiştir (5). Folikül stimulan hormon (FSH) ve Luteinizan hormon (LH) salgılarındaki yetersizlik androjen sekresyonunun azalmasına ve spermatogenezin bozulmasına neden olur (3).

Tablo 3. Hipogonadotropik hipogonadizmin sınıflandırılması (5)

Konjenital form	Edinsel form
Kallmann sendromu İdiopatik hipogonadotropik hipogonadizm	Hipotalamus ve hipofiz bezi tümörleri Granümatöz hastalıklar Obezite Anabolik steroidler Yaş

Ejakülasyon Bozuklukları

Ejakülasyon bozuklukları erkek infertilitesinin az rastlanılan ancak önemli sebeplerindedir. Anejakülasyon, seminal emisyon yetersizliğinden dolayı semenin seminal vezikülden prostat ve ejakülatör kanallar aracılığı ile üretraya atılamamasının sonucu olarak antegrad ya da retrograd ejakülasyonun gözlenmemesidir. Retrograd ejakülasyon ise semenin bir kısmının ya da tamamının mesane içerisine kaçmasına bağlı olarak antegrad ejakülasyonun olmamasıdır (3).

Kadın İnfertilitesinin Nedenleri

Ovulatuvar Bozukluklar

Kadına bağlı infertilitenin %30-40'ını oluşturur. Ovulatuvar bozukluklar, anovulasyon, amenore ve adet düzensizlikleriyle kendini gösterir. İnfertil hastalarda ovulasyonun olup olmadığı mutlaka tesbit edilmelidir. Ovulasyon, hipotalamus, hipofiz ve over aksının düzenli çalışmasıyla sağlanır. Bu aksın herhangi bir aşamasındaki bozukluk sonucu anovulasyon oluşabilir. Anovulasyon tanısı konursa, ayırıcı tanıda hipotalamo-hipofizer bozukluklar, polikistik over sendromu (PKOS), anoreksiya nevroza, prematüre over yetmezliği, hipotiroidizm gibi hastalıklar düşünülmektedir (7).

Hipogonadotropik Hipogonadizm

Hipogonadotropik hipogonadizm'de hipotalamus yeterli miktarda gonadotropin releasing hormon (GnRH) sekrete edemez, yetersiz üretim veya yetersiz pitüiter gonadotropin salınımı ile beraber olan pitüiter bir bozukluk vardır. Hipogonadotropik hipogonadizm,

fizyolojik gecikme, Kallmann sendromu, santral sinir sistemi tümörleri ve hipotalamik/pitüiter disfonksiyon durumlarında görülebilir.

Fizyolojik gecikme: Fizyolojik ve konstitüsyonel puberte gecikmesi en sık izlenen formudur.

Kallmann sendromu: GnRH salgılanmasının izole eksikliğine neden olan otozomal dominant bir durumdur. Hipoozmi ve renk körlüğü ile birlikte görülür (8).

Hipergonadotropik Hipogonadizm

Hipergonadotropik hipogonadizm FSH seviyelerinin artması ile karakterizedir. Eğer gonadotropinler postmenopozal evredeki oranda artmışsa ovaryen yetmezlik görülmektedir. En yaygın sebebi gonadal gelişim bozukluğudur ki bu durum Turner sendromunda olduğu gibi kendini gösterir (9).

Polikistik Over Sendromu

PKOS, doğurganlık çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluktur (10). Anovulatuvar infertilitenin en yaygın nedenidir. Sadece USG (ultrasonografi) görüntüleri ile morfolojik olarak tanımlanabileceği gibi belirgin klinik, biyokimyasal, endokrin ve metabolik patolojilerle de karşımıza çıkabilir.

Klinik özellikleri; menstrüel düzensizlikler, hirsütismus, akne, alopesi, anovulatuvar infertilite ve tekrarlayan gebelik kayıplarıdır.

Endokrin özellikleri; artmış androjen, LH, östrojen ve prolaktin seviyeleridir.

Biyokimyasal özellikleri; insülin direnci, obezite, lipid anormallikleri, glukoz tolerans testinde bozulma ve artmış Tip 2 diabetes mellitus riski (11).

Tubal Faktörler

İnfertil çiftlerin yaklaşık %20'sinde tubal ya da peritoneal faktör sorumludur. Pelvik inflamatuvar hastalıklar, apendisit, septik abortus, önceki tubal cerrahi, pelvik enfeksiyona neden olan intrauterin dilatasyon (IUD) kullanımı, Chlamydia trachomatis ile subklinik pelvik enfeksiyonlar, tubal kaynaklı infertiliteye katkıda bulunurlar. Tubal durumu değerlendirmek için en çok kullanılan testler histerosalpingografi (HSG) ve laparoskopidir. HSG'nin avantajı uterin kavite ile ilgili bilgi sağlaması ve peritoneal ortamı değiştirmek suretiyle fekundabiliteyi arttırabilmesidir (12). Tubal faktörler arasında olan hidrosalpenks, Yunanca bir kelime olup tubaların sıvı ile dolması anlamına gelmektedir ve fimbrial ucun tıkanması sonucu distal kısmın sıvı ile distansiyonuna denmektedir. Fimbrial obstruksiyonun sebebi

sıklıkla pelvik inflamatuvar hastalık, apendiksın inflamasyonu veya endometriozistir (13). Hidrosalpenks varlığında IVF sonuçları daha düşük olmaktadır (14,15). Retrospektif sonuçların incelendiği bir meta-analizde gebelik oranlarının % 50 azaldığı, spontan düşük oranının ise 2 kat arttığı gösterilmiştir (14).

Servikal Faktörler

Normal servikste salgılanan mukus sperm geçişini kolaylaştıran özelliklere sahiptir. Konjenital malformasyon ve servikal travma normal mukus üretimini engeller. Servikal mukus yeterliliğini ve sperm-mukus etkileşimini değerlendirmek için postkoital test kullanılmaktadır. Mukusun incelenmesinde motil spermatozoa görüldüğünde postkoital test pozitif kabul edilmeli ve servikal faktör düşünülmemelidir (16).

Endometriozis

Klinik olarak progresif bir hastalık olan endometriozis, endometrial dokunun, bez ve stroma olarak, uterus kavitesinin dışında yerleşmesine denir. En sık implantasyon yerleri, pelvik organlar ve periton olmakla birlikte, farklı doku ve organlarda da gözlenebilir. Son yıllarda elde edilen bulgular göstermektedir ki, endometriozis ile ilişkili infertilitede esas olarak dört faktörün rolü vardır. Bunlar; bozulmuş folikülogenez, azalmış fertilizasyon, immünolojik faktörler ve implantasyon defektleridir (17).

Diğer Nedenler

İnfertilite ile ilişkili diğer nedenler şunlardır; konjenital uterin anomaliler, edinsel uterin anomaliler, endometrial fonksiyon bozuklukları ve luteal faz defektidir.

Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite; infertilite nedenleri için yapılan tetkikler sonucunda herhangi bir neden saptanamaması olarak tanımlanır. Yardımcı üreme teknikleri merkezleri ve farklı çalışmalar arasında değişkenlik olmakla beraber, başvuran çiftlerin ortalama % 15'i açıklanamayan infertilite tanısı almakta ve açıklanamayan infertilite insidansı merkezler arasında infertilite referanslarındaki farklılıklar ve çalışmalara dahil edilen grup farklılıkları nedeniyle % 0-% 37 arasında değişmektedir (18, 19). Açıklanamayan infertilite'de olası etyolojiler Tablo 4'te belirtilmiştir.

Tablo 4. İzah edilemeyen infertilite olası etyolojileri (20)

Antagonist servikal sekresyonlar
Erken embriyonel implantasyonda defektif endometrial reseptivite
Anormal tubal siliyal aktivite
Defektif ovum pick-up mekanizması
Luteinize unrüptüre follikül sendromu
Ek hormonal anormaliteleri, örnek. Luteal faz defekti
Bozulmuş oosit ve/veya sperm fertilizasyon kapasitesi
Minimal veya orta düzeyde endometriozis
İmmünolojik faktörler
Bozulmuş peritoneal makrofaj aktivitesi
Bozulmuş peritoneal sıvı antioksidan fonksiyonu

YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ

Yardımla üreme teknikleri (YÜT), infertilite sorununu çözmeye yönelik olarak geliştirilen birçok tekniği içerir. Hastanın yaşı, infertilitenin etyolojisi, süresi gibi birçok faktör göz önüne alınarak çifte çözüm olabilecek ve ekonomik olarak da çift ve uygulamayı yapacak olan ekip için en avantajlı tekniğin seçilerek uygulanması gerekir (9). Bunlar, Gamet İntrafallopian Transferi (GIFT), Zigot İntrafallopian Transferi (ZIFT), In Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi (IVF-ET) ve Intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) prosedürlerini içermektedir. Bu yöntemlerden ilk geliştirilen ve en yaygın olarak kullanılan IVF tekniğidir (9).

İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi (IVF-ET)

İn vitro fertilizasyon kadının yumurtalıklarından bir ya da daha çok sayıda olgun yumurta hücrenin alınarak, bunların kadının eşinden alınan sperm ile vücut dışında özel bir ortamda döllenmesidir. Embriyo transferi ise döllenmiş bu yumurtaların rahime veya fallop tüplerine yerleştirilmesidir (21).

Gamet İntrafallopian Tüp Transferi (GIFT)

1984 yılında ilk olarak Asch tarafından tanımlanan bu yöntem, başlangıçta tubal patolojinin olmadığı, açıklanamayan ve erkek infertilitesinde tercih edilmiştir. Bu yöntemde toplanan oositler ve sperm biraraya getirilip laparoskopik olarak tuba uterinanın ampuller bölgesine transfer edilir. Uygulama esnasında genel anestezi verilmesi, fertilizasyon ve

embriyo gelişiminin in vitro izlenmemesi ve ektopik gebelik riski fazla olmasından dolayı bu yöntem fazla kullanılmamıştır (22,23).

Zigot Intra Fallopian Tüp Transferi (ZIFT)

Chen tarafından 1986 yılında önerilmiş bir tekniktir. Bu teknikte in vitro olarak elde edilen zigot tuba uterinalara transfer edilir (23,24).

Subzonal Sperm İnjesiyonu (SUZI)

Bu yöntemde spermleri taşıyan mikropipet zona pellusidayı boydan boya aşarak spermleri perivitellin aralığa ulaştırır. Fertilizasyon sürecinde sperm-oosit ilişkisinin membranlar düzeyinde kurulması esasına dayanır. Perivitellin aralığa 5-25 adet sperm bırakılır. Bu yöntem şiddetli erkek infertilitesinde kullanılmıştır (25).

Intrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI)

Yöntem, tek bir spermin oosit sitoplazmasına bırakılması olarak tanımlanabilir (25). Günümüzde ICSI ciddi erkek infertilitesine sahip vakaların tedavisinde en iyi seçenektir. ICSI endikasyonu sadece bozuk morfolojiye sahip spermatozoon ile kısıtlanmamakta, aynı zamanda düşük sperm sayısına ve kötü kinetik kaliteye sahip sperm hücreleri için de kullanılmaktadır. ICSI işleminde, erkek üreme kanallarında herhangi bir obstrüksiyon varlığında, epididimis veya testisten elde edilen spermatozoa da kullanılabilir. Testiküler bozukluktan kaynaklanan azospermi olgularında, testiküler doku örneklerinde yeterince spermatozoon elde edilebildiğinde ICSI işlemi uygulanabilmektedir (25).

Sperm Elde Etme Teknikleri

MESA

Mikroskopik epididimal sperm aspirasyonu (MESA), OA'de, özellikle konjenital bilateral vaz deferens yokluğunda ve vazektomi sonrası sperm elde etmek için ideal bir yöntemdir. İşlem ameliyathane şartlarında yapılmalıdır ve operasyon mikroskopu gerektirir (26).

TESE

Testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE), NOA'de testiste sperm üretiminin heterojen dağılımı nedeni ile tek bir bölgeden parça almak yerine testisin farklı bölgelerinden parça alınır ve bir testiste sperm bulunmadığında diğer testise geçilerek benzer işlemler yapılır (26).

Mikroskopik TESE

Operasyon mikroskopu yardımı ile 6-8x büyütme altında yapılan TESE'dir (26).

PESA

Perkütan epididimal sperm aspirasyonu (PESA) epididimal kanallardaki tıkanıklığa bağlı olarak spermin dışarıya atılamadığı hastalarda, ciltten iğne ile epididime girilerek sperm alınmasıdır. MESA'ya alternatif olarak yapılan bu işlem çok daha basit olup, çok daha kısa bir süre içinde yapılabilmektedir (26).

Ovulasyon İndüksiyonu

Overlerin folliküler gelişimini sağlamak ya da arttırmak amacı ile çeşitli ovarian stimülasyon ajanları ile follikülogenez ve steroidogenezin uyarılmasıdır. Ovulatuvar problemi çözmek, ovulasyonun zamanlamasını kontrol edebilmek, hafif ve orta derecede erkek faktöründe ve servikal faktörde IUI başarısını arttırmak, açıklanamayan infertilitede ve endometriyoziste gebelik şansını arttırmak, IVF ve ICSI programlarında toplanan oosit sayısını arttırmak için over stimülasyonu yapılmaktadır (11).

İNTRAUTERİN İNSEMINASYON (IUI)

IUI prosedürü, eşin spermelerinin değişik yöntemlerle hazırlanarak, iyi ve hareketli olanlar seçilerek kateter vasıtasıyla uterus içine verilmesidir (27). Hastanın klomifen sitrat veya gonadotropinlerle stimüle edilerek (superovulasyon), siklusun ovulasyon dönemine kadar monitorizasyonu, ovulasyonun human koryonik gonadotropin (hCG) ile tetiklenmesinden sonra ovulasyon ile senkron olarak yıkanmış ve hazırlanmış sperm insemasyonu, IUI sikluslarında en sık uygulanan klinik ve laboratuvar teknikleridir. Semen hazırlama yöntemleri ile seminal plazma içindeki sitokinler, prostoglandinler, oksijen radikalleri, antijen ve enfeksiyon ajanları yanında kötü kalite spermatozoa, lökosit ve hücre artıkları ayrılmaktadır. Aynı zamanda bu işlemler sırasında spermatozoa'nın oositi

dölleyebilmesi için gerekli olan ve in vivo olarak servikal kanal ve uterus içinde kazanılan kapasitasyon yeteneğini sağlar (3). IUI diğer yardımcı üreme tekniklerine göre daha ucuz, daha basit ve daha az invazif olması özellikleriyle infertilite tedavisinde sıklıkla başvurulan yöntemlerin başında gelir. Hasta seçim kriterleri, çeşitli kadın infertilite faktörlerinin varlığı, ovulasyon indüksiyonu metodlarının ve monitorizasyonunun farklılığı, uygulanan siklus sayısı ve sperm parametrelerindeki farklılıklar, IUI başarısını etkileyen faktörler olarak dikkat çekmektedir. Sperm morfolojisi, sperm hazırlık yöntemleri, inseminasyon sırasındaki sperm sayısı ve motilitesi IUI ile gebelik oranlarını etkileyebilecek önemli parametrelerdir (28).

IUI Endikasyonları

a-Hem kadın hem erkek faktörü olan açıklanamayan infertilite olgularında IUI ilk tedavi seçeneğidir.

b-Kadın faktörlerinden servikal faktör, endometriozis ve ovulatuvar disfonksiyonda kullanılır.

c-Erkek faktörü (orta derecede oligoasthenoteratozoospermi).

d-İmmunolojik sebepler.

e-Çeşitli ejakulatuvar (impotans, spinal kord kesisi ve prematür ejakulasyon) ve koital (hipospadias, vajinismus) sorunlar için de tedavi yöntemidir (29,30).

DNA FRAGMENTASYONU

İnsan Sperm Kromatininin Yapısı

Sperm çekirdeğinin durumu spermiyogenez sırasında meydana gelen iki ana olayla belirlenir: çekirdeğin son şeklini elde etmesi ve kromatinin sıkıca paketlenmesine yol açan, somatik tip histonların protaminler ile (sperme özgü temel çekirdek proteinleri) yer değiştirmeleri gerekir. Sperm DNA'sı özel bir davranışla çekirdek içinde kromatini yoğun ve dengeli tutacak şekilde düzenlenmiştir. Mitotik kromozomlardan altı kat daha yoğundur. Hemen hemen tüm çekirdek hacmini işgal edecek şekildedir. Oysa somatik hücre DNA'sı sadece çekirdeğin bir kısmını işgal eder. Sperm kromatin paketlenmesinin organizasyonu dört farklı seviyede olur:

a-Kromozomun sıkıca bağlanması anlamına gelen DNA'nın nükleer annulusa bağlanması;

b-DNA'nın yeni eklenen çekirdek matriksine tutunurken DNA halka bölgelerinin meydana gelmesi;

c-Histonların protaminler ile yer değiştirmesi;

d-DNA'yı kalın cidarlı simit gibi yoğunlaştırıp kromozomların yerlerinin belirlenmesi.

Histonlar önce geçiş proteinleri tarafından yerlerinden çıkarılır. Bunlar ileri aşamalarda yoğunlaşan kromatinden çıkarılırlar ve protaminler ile yer değiştirirler. Epididimdeki sperm olgunlaşması son kromatin organizasyonu aşamasını içerir (31).

Sperm DNA Hasarı

Spermdeki DNA hasarlarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı konusu tam olarak izah edilebilmiş değildir. DNA hasarı geçiren sperm tamir olabilir, tamir kapasitesini aşmış ise hasarlı olarak çoğalmasına devam edebilir, spermatogenez bir seviyede duraklayabilir (maturasyon duraklaması) ya da hücre ölür (32).

Nükleer DNA Hasarı ve Kaynağı

Önceleri erkek germ hücre hattındaki DNA hasarının iki tipi tanımlanmıştır. İlki replikasyon hataları, ikincisi ise DNA tek ve çift zincir kırıklarını içeren DNA fragmantasyonudur (33). İnsan ejakulatındaki bu anomalilerin kaynağını açıklamada günümüzde farklı mekanizmalar tanımlanmıştır (34). İlk teori DNA hasarının, spermatozoon maturasyonu sırasında yanlış paketlenmesi ve ligasyonu nedeniyle olduğudur (35). İkinci teori, apoptozisin yol açtığı DNA fragmantasyonu (35,36); üçüncü teori ise oksidatif stresin DNA hasarına neden olduğudur (37,38).

Çevresel stres, gen mutasyonları ve kromozom anormallikleri spermiyogenez sırasında meydana gelen oldukça rafine biyokimyasal olayları aksatabilir. Bu durum, kromatini eninde sonunda verimlilik ile bağdaşmayacak anormal bir yapıya sahip olmaya iter. Sperm kromatin anormalliklerine katkısı olan etkenler arasında lökositospermia, sigara, ışın tedavisi, kemoterapi ve sperm hazırlama teknikleri sırasında tekrarlanan yüksek hız santrifüj işlemleri gösterilebilir (31).

Spermatozoon DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri

- Asidik anilin mavisi boyaması,
- Toluidine mavisi boyaması,
- Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi,

- DBD-FISH (DNA breakage detection-Floresan insitu Hibridizasyon) yöntemi,
- In Situ-Nick Translasyon (NT)yöntemi,
- Akridin Oranj (AO) boyaması,
- Sperm kromatin dağılım yöntemi (SCD),
- COMET (Cluster of Motifs E-value Tool) yöntemi,
- TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) yöntemi,
- SCSA (Sperm Kromatin Strüktür Analizi),
- Yüksek Performanslı Likit Kromatografi yöntemi.

TUNEL Metodu

TUNEL, DNA hasarını belirlemede en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. İlk olarak, programlanmış hücre ölümü yada apoptozis geçiren hücreleri boyama metodu olarak tanımlanmıştır. Fakat, daha sonra sadece apoptotik hücrelerin belirlenmesi ile sınırlı kalmadığı anlaşılmıştır. TUNEL aynı zamanda apoptozla ilişkili olmayan DNA hasarlarını belirlemek için de kullanılmaktadır. Örneğin; toksik bileşiklere ve diğer hasar verici etkenlere maruz kalma sonucu nekrotik hücre ölümü ve aktif DNA onarımı geçiren hücrelerin belirlenmesi gibi (39). Bu test, direkt olarak DNA kırıklarını ölçmektedir. Terminal deoksinukleotidyl transferase (TdT) enziminin kataliz ettiği bir reaksiyonla tek veya çift zincir DNA kırıklarına, işaretlenmiş deoksiuridine triphosphate (dUTP)'yi serbest 3'-hidroksil ucuna birleştirilir ve DNA kırıkları işaretlenir. İşaretlenen bu kırıklar ışık mikroskopisi, floresan mikroskopiya da akım sitometrisi ile ölçülür. TUNEL metodu benzer olarak sperm hücrelerinde var olan DNA hasarlarının gösterilmesinde de kullanılmaktadır (40).

Tüm sperm DNA hasarı testleri birbirinden farklıdır. Klinik olarak yararlı olmaları için, sperm DNA testleri, hamilelik oluşumu ile ilgili ciddi tahmin edici özellikte olmaları gerekir (41). Yardımla üreme tekniklerinin kullanımındaki artış ve sperm genom bütünlüğüne olan ilginin artması ile birlikte DNA hasarı testlerinin kullanımı büyük oranda teşvik edilmiştir. Birçok test DNA bütünlüğünü belirlediğini iddia etmesine rağmen, her testin gerçekten neyi ölçtüğünü anlamamız çok önemlidir. Bazı prosedürler, COMET ve TUNEL yöntemlerinde olduğu gibi DNA çift zincir kırıklarını belirlemektedir. Diğer yaklaşımlar DNA'nın denatürasyon hassaslığını ölçmektedir. Günümüzde uygulanan testler sınırlıdır, çünkü bazıları klinik olarak önemli DNA fragmentasyonlarını önemli olmayanlardan ayırt edemezler. Döllenme sonrası sperm hücresinin nükleusundaki tek zincirli DNA kırıkları oosit

tarafından onarılabılır ve klinik olarak bir negatif etkisi olmaz, oysa çift zincirli DNA kırıkları geri dönüşümü olmayan hasarlardır (42).

Sperm DNA hasarını ölçmede genellikle en çok kullanılan 2 test, TUNEL ve Sperm Kromatin Strüktür Analizi (SCSA)'dır. SCSA ile DNA'nın değerlendirilmesi yaygın olarak standardize edilmiştir ve tek ana referans laboratuvarlarda ya da bu laboratuvarların onayladığı merkezler tarafından gerçekleştirilmektedir. TUNEL ise bu boyutta standardize edilmemiş ve laboratuvarlar tarafından klinik tespit için kullanılabilir (43).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamıza 31.03.2014-18.09.2014 tarihlerinde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Bölümü polikliniğine başvuran ve IUI uygulaması kararı alınan 81 çift dahil edildi. Çalışmamız prospektif, randomize, kontrollü bir çalışma olarak planlandı. Çalışmamıza, hastanemizin Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 17.12.2013 tarih 2013/20 nolu onay verildi.

Çiftlere çalışma ile ilgili bilgi verilip izinleri alındıktan sonra semen örneği alındı. Semen örnekleri 3-5 günlük ideal cinsel perhiz sonrası mastürbasyon ile elde edildi. Örnek steril ve geniş ağızlı bir kaptan toplandı. 37°C, etüvde 15-60 dakika likefiye olması için beklendi ve daha sonra analizi yapıldı.

SEMEN ANALİZİ

Makroskopik Değerlendirme

Likefaksiyon: Elde edilen örneklerin oda ısısında 15-60 dakika sıvı hale gelmesi beklendi.

Görünüm: Likefaksiyondan sonra 1 saat içerisinde yapıldı. Normalde homojen, gri-opelasan görünümde olan semen örnekleri Normal (N) olarak değerlendirildi.

Volüm: Steril enjektör veya dereceli pipete çekilerek değerlendirildi.

Viskozite: Likefiye olduktan sonra semen 5 ml'lik bir pipete çekildi ve kendi ağırlığı ile pipetin ucundan damlaması sağlandı.

pH: Bunun için 6.1- 10.0 arasında indikatör kağıtlar kullanıldı. Bir damla semen örneği bu indikatör üzerine damlatıldı. Oluşan renk değişimi, skala ile karşılaştırılarak pH tayin edildi.

Mikroskopik Değerlendirme

Spermatozoon konsantrasyonu ve motil spermatozoon yüzdesinin belirlenmesi için Makler Sayım Kamerası kullanıldı.

Konsantrasyon: Makler Sayım Kamerasının ortasına 10 µl semen örneği konup üst kapak kapatılarak 20x büyütme altında yan yana 10 kare sayılarak mililitredeki spermatozoon sayısı tespit edildi.

Motilite: Spermatozoonlar hareketlerine göre sınıflandırılarak yüzdeleri hesaplandı.

- (a) Hızlı ileri (progresif) hareketli
- (b) Yavaş ileri (progresif) hareketli
- (c) Yerinde hareketli
- (d) Hareketsiz (immotil)

Morfoloji: Morfolojik değerlendirme için Spermac Stain seti kullanıldı. Kitin boyama prosedürüne uygulanarak boyama yapıldı. Örnekler Kruger'in mutlak değerlerine göre, ışık mikroskobunda 100x büyütmede immersiyon yağı ile değerlendirildi.

Sperm Örneklerinin IUI İçin Hazırlanması

Likefiye olan örnek, konik tabanlı tüpe sırası ile %90 ve %50'lik gradiyent üzerine 1:1 oranında konarak 1600 rcf'de 20 dk santrifüj edildi. Üstteki sıvı atılarak dibeye çöken spermler 5 ml sperm yıkama medyumunu ile 1600 rcf'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı. Yine üstteki sıvı atılarak kalan çökeltinin üzerine 1 ml sperm yıkama medyumunu koyarak 45 derece eğim ile 37 derecelik etüvde yüzdürmek için 45dk bekletildi. Sürenin sonunda insülin enjektörü ile üstteki sıvıdan 0.5-0.7 ml çekilerek yumuşak kateter yardımı ile hastaya uygulandı.

Sperm Örneklerinin TUNEL İçin Hazırlanması

IUI için hazırlanan örneklerden, uygulama sonrası kalan 0.5-0.3 ml'lik kısım 1790 rcf'de 30 dk santrifüj edilerek çökelti elde edildi. Üzerindeki tüm sıvı atılarak 1 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) eklendi ve vorteksle karıştırılarak tekrar 1790 rcf'de 20 dk santrifüj edildi. Üzerindeki sıvı atılarak ml'de 20 milyon sperm olacak şekilde PBS eklendi. Elde edilen örnek önceden hazırlanan %4'lük paraformaldehit (PFA) ile 1:1 oranında karıştırılarak

fiksasyonu yapıldı ve 1 saat oda ısısında inkübe edilerek +4 dereceye buzdolabına, en az 1 gece bekletilmek üzere kaldırıldı.

Sperm Örneklerine TUNEL Uygulanması

Buzdolabında bekletilen örnekler çıkartılarak oda ısısına gelmesi sağlandı. Silan kaplı lamalar üzerine 75µl örnek damlatılarak 30 derece etüvde kurutuldu. Daha sonra lamalar 2 kez 1 dk PBS'de bekletildi. %10'luk sodyum sitrat ve %0.1'lik triton X ile hazırlanan geçirgenlik solüsyonu içinde 4-5 dk buzdolabında bekletildi. 2 kez 5 dk PBS ile yıkanarak örneklerin üzerine 50µl TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, POD, USA) karışımından damlatıldı. 60 dk 37 derece etüvde, nemli ve karanlık ortamda bekletildi. Daha sonra 2 kez 5 dk olacak şekilde PBS ile yıkama yapıldı. Hazır olan örneklerle en son olarak 15µl horseradish peroxidase (POD) damlatılarak floresan mikroskopta (Leica DM 2500) immersiyon yağı damlatılarak, sayım yapıp gerekli yerlerin fotoğrafları çekildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılıma uygunluğu tek örneklem Kolmogorov Smirnov test ile incelendi. Gebelik gözlenen grup ile gebelik gözlenmeyen grubun semen örneklerinin analiz sonuçları ve TUNEL boyama sonuçlarının karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler T.Ü. Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalında SPSS 20.0 (Lisans No: 10240642) paket programı kullanılarak yapıldı.

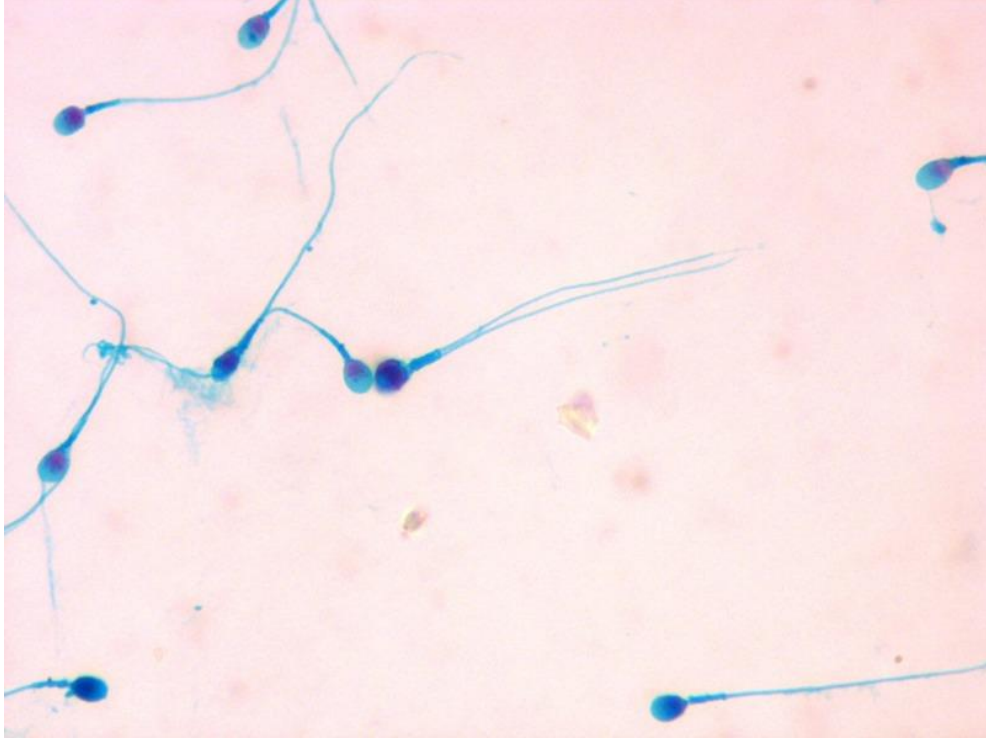
BULGULAR

31.03.2014-18.09.2014 tarihlerinde Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp Bebek Bölümü polikliniğine başvuran ve IUI uygulaması kararı alınan 81 çift çalışmamıza katıldı. Bu çiftlerden 18 tanesinde gebelik (+), 63 tanesinde ise gebelik (-) olarak tespit edildi. Siklus başına klinik gebelik oranı %22.22 olarak elde edildi. Deneye dahil edilen bireylerde yaş ortalaması 32.95, gebelik (+) olan grupta 34.5 ve gebelik (-) olan grupta da 32.5 olarak bulundu.

Hastalardan alınan semen örnekleri makroskopik ve mikroskopik olarak androloji laboratuvarında değerlendirildi. Yapılan hazırlıklardan sonra örnekler hem histolojik hem de immun floresan inceleme için boyandı. Histolojik görüntüleri histoloji laboratuvarında CX31 Olympus (Japan) marka ışık mikroskobu ile elde edildi. İmmunfloresan görüntüleri de genetik laboratuvarında Leica DM 2500 floresan mikroskobu ile elde edildi.

Işık Mikroskopik Sonuçlar

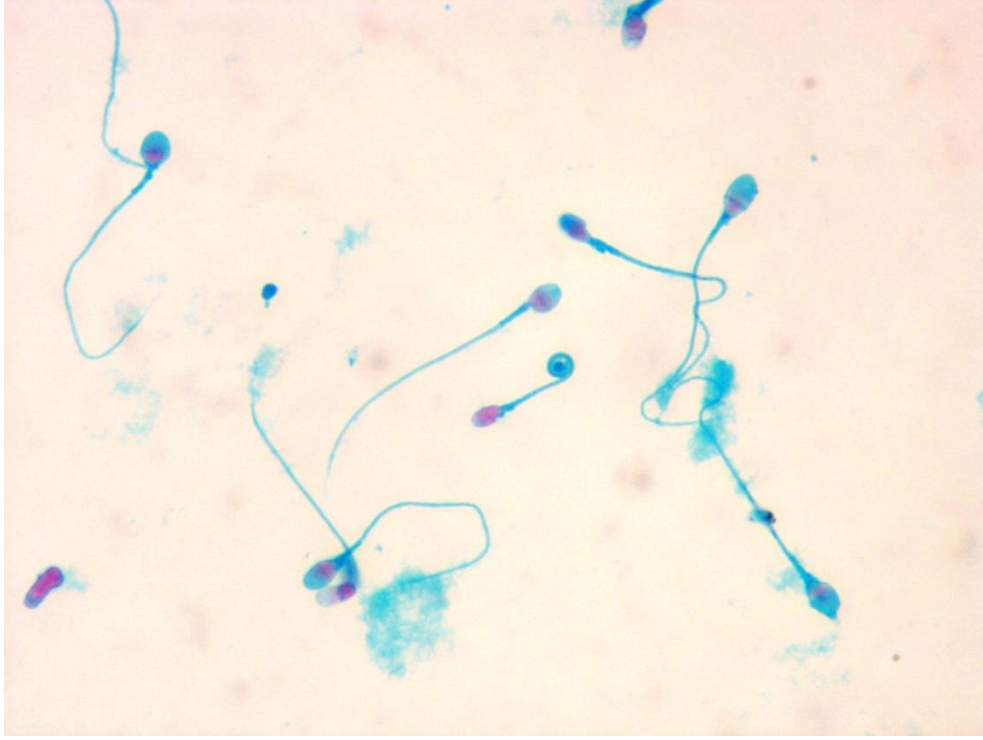
Yapılan Kruger boyaması sonuçlarında çift baş ve çift kuyrukluluk, kuyruk defekti (kıvrık), sitoplazmik droplet ve baş şekil bozuklukları gibi morfolojik bozukluklar tespit edildi (Şekil 1- 5).



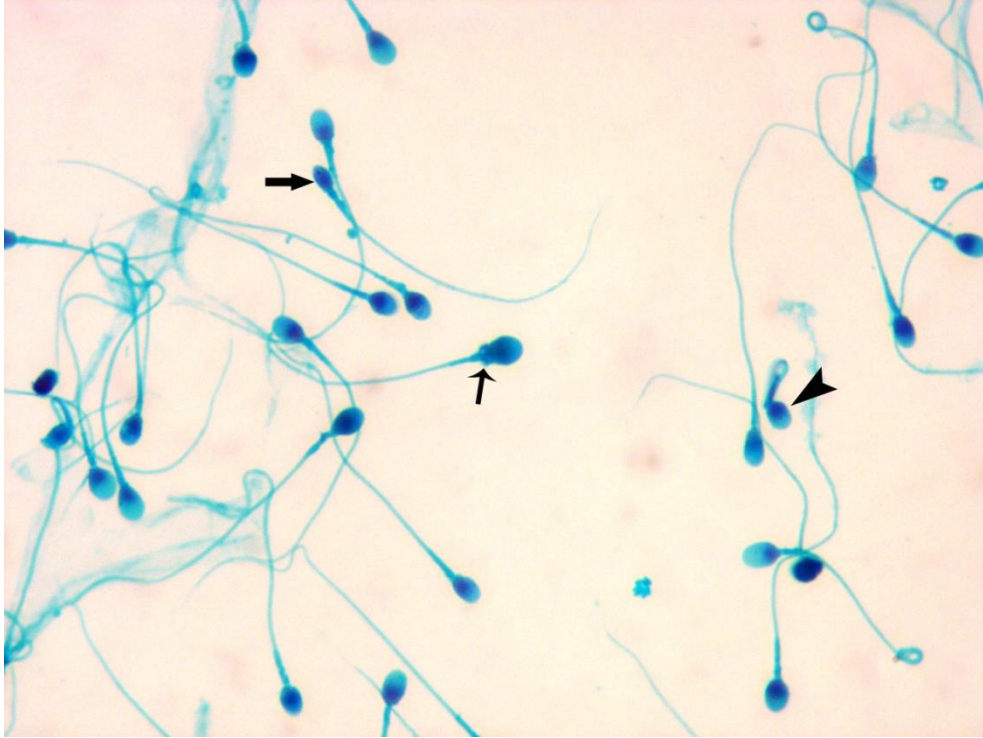
Şekil 1. Çift kuyruklu ve baş defektli sperm görüntüsü, gebelik (-) grup, Spermac Stain (1000X)



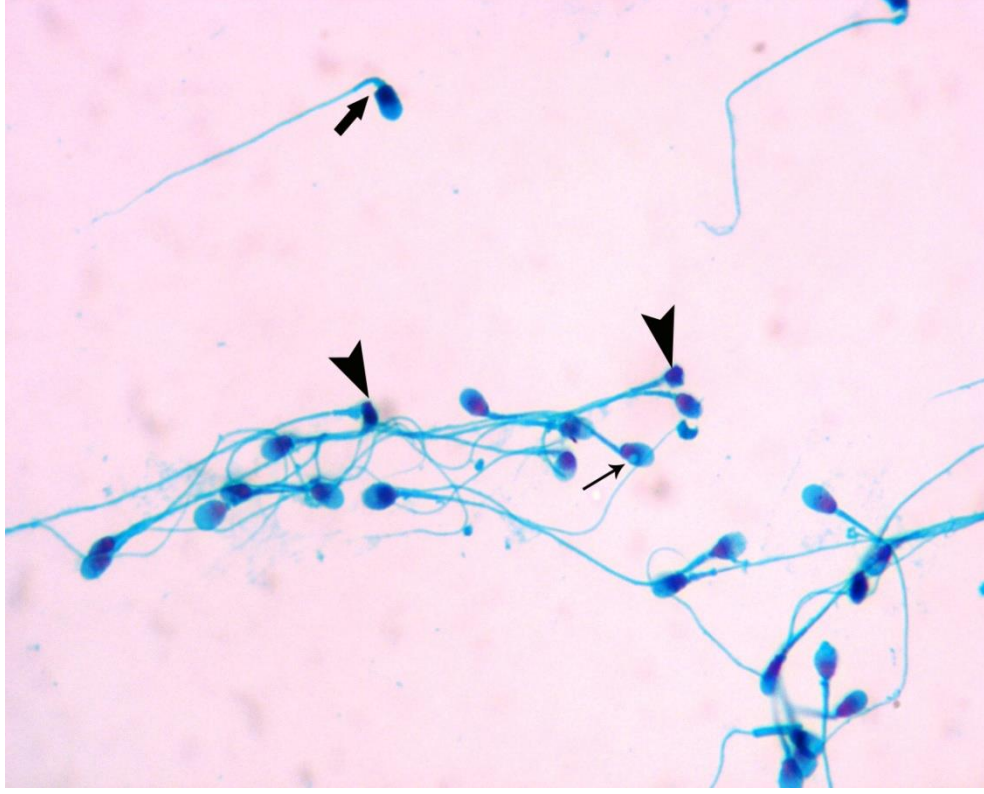
Şekil 2. Çift başlı sperm, gebelik (+) grup, Spermac Stain, (1000X)



Şekil 3. Kıvrık kuyruk, baş defektli ve sitoplazmik dropletli sperm görüntüleri, gebelik (-) grup, Spermac Stain (1000X)



Şekil 4. Küçük baş (kalın ok), sitoplazmik droplet ve büyük baş (ince ok) ve kuyruk ve baş defektli sperm (ok başı), gebelik (-) grup, Spermac Stain (1000X)



Şekil 5. Boyun (kalın ok), sitoplazmik vakuol (ince ok) ve baş defektli sperm görüntüsü (ok başı), gebelik (-) grup, Spermac Stain (1000X)

Semen Analiz Sonuçları

Gebelik gözlenen ve gebelik gözlenmeyen gruplara ait sperm hareketlilik yüzde sonuçları ile semen örneklerinin viskozite karşılaştırma sonuçları Tablo 5'te verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede, gebelik (+) ve gebelik (-) gruplar arasında sperm hareket yüzdelerinde istatistiksel anlamlılığının olmadığı görüldü. Gebelik (-) grupta 3 örnek, gebelik (+) grupta ise 1 semen örneği viskoz olarak tespit edildi.

Tablo 5. Gebelik gözlenen grup ile gebelik gözlenmeyen grup arasındaki spermilerin hareket yüzdeleri ile semen viskozitelerinin karşılaştırılması

	Hızlı İleri Hareket (%)		İleri Hareket (%)		Yerinde Hareketli (%)		Hareketsiz (%)		Viskozite
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	
Gebe (-)	16.48	±16.31	36.05	±15.70	7.56	±3.68	39.06	±20.21	n=18 3 viskoz
Gebe (+)	18.17	±24.15	33.72	±16.66	8.94	±4.93	39.17	±22.62	n=63 1 viskoz
	P=0.70		P=0.82		P=0.65		P=0.99		

Semene Ait Morfolojik Bulgular

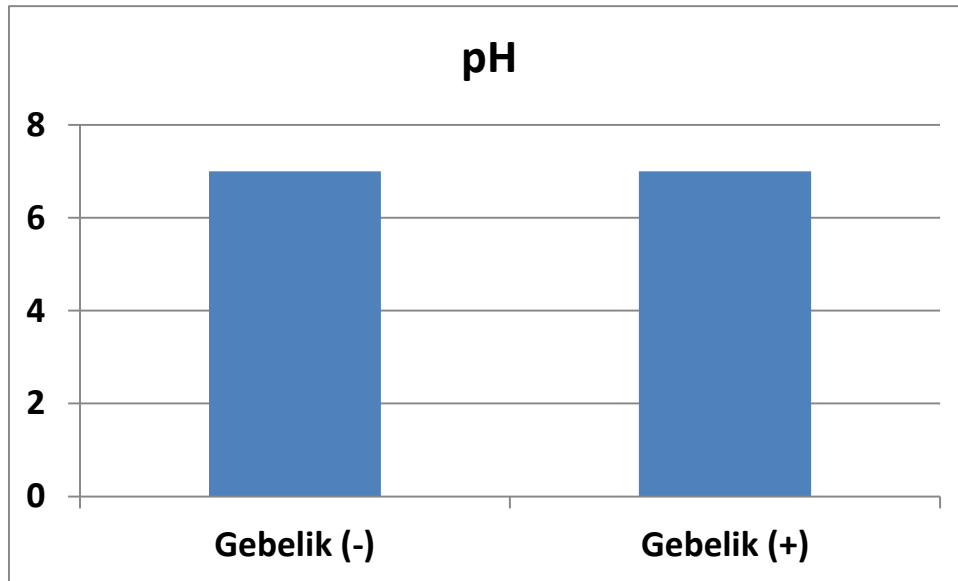
Gebelik pozitif ile gebelik negatif olan gruplara ait spermilerin morfolojik değerlendirmelerine ait sonuçları Tablo 6'da sunulmuştur. Gebelik (-) grupta morfoloji, boyun ve kuyruk defekti gebelik (+) gruptan yüksek olmasına karşın istatistiksel olarak önemli değildi ($p>0.05$). Bununla birlikte, baş defekti gebelik (+) grupta (84.06 ± 4.49) gebelik (-) gruba (82.29 ± 8.19) göre daha yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 6. Gebelik gözlenen grup ile gebelik gözlenmeyen grup arasındaki spermilerin morfolojik yüzdelerinin karşılaştırılması

	Morfoloji (%)		Baş (%)		Boyun (%)		Kuyruk (%)		Sit.Droplet (%)	
Gebe (-)	2.90±1.45	P=0.19	82.29±8.19	P=0.88	5.81±3.93	P=0.79	6.14±3.26	P=0.48	2.87±4.39	P=0.14
Gebe (+)	2.39±0.92		84.06±4.49		5.44±2.48		5.61±2.20		1.89±2.40	

Semene Ait pH Sonuçları

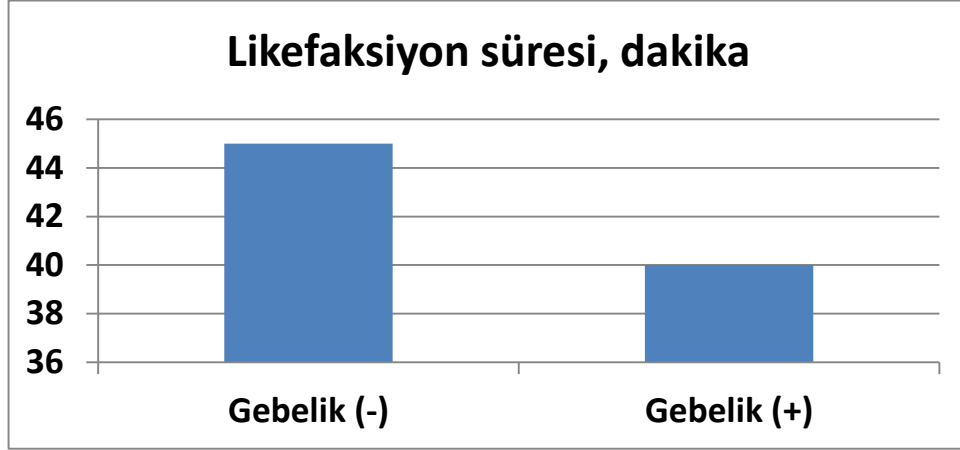
Çalışmamızda yer alan gebelik gözlenen ve gebelik gözlenmeyen gruplara ait semen pH değerleri karşılaştırıldığında negatif grupta 7.38 iken gebelik pozitiflerde 7.44 olarak tespit edildi. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde gruplar arasında anlamlılık saptanamadı ($P>0.05$; Şekil 6).



Şekil 6. Semen örneklerine ait pH değerleri

Likefaksiyon Süresi Sonuçları

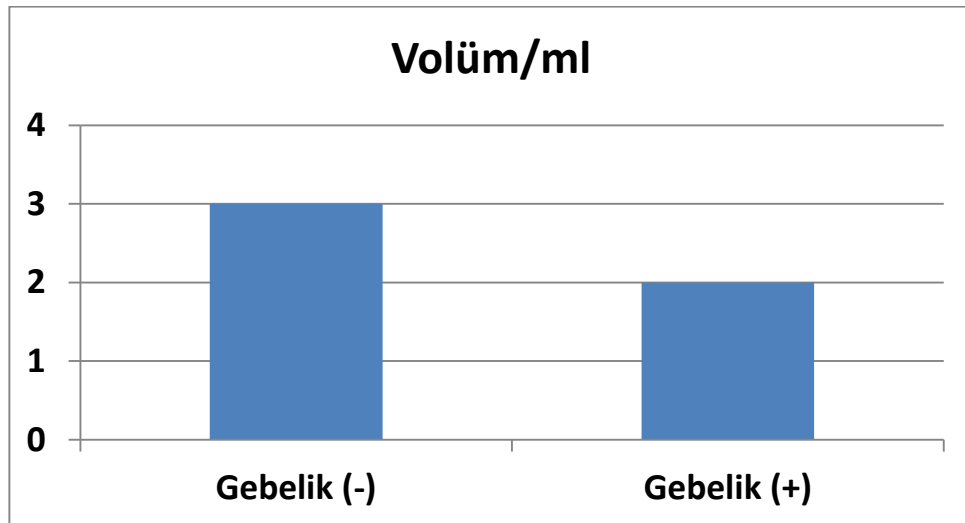
Semen örneklerinin likefaksiyon süreleri iki grubunkarşılaştırılmasında gebelik (-) grupta 44.95 dk olarak tespit edilirken, gebelik (+) grupta 39.17 dk olarak belirlendi (Şekil 7). Ama yapılan istatistiki değerlendirmelerde, gruplar arası önemli istatistiksel anlamlılığın olmadığı tespit edildi (P=0.16).



Şekil 7. Likefaksiyon süreleri

Semen Volüm Sonuçları

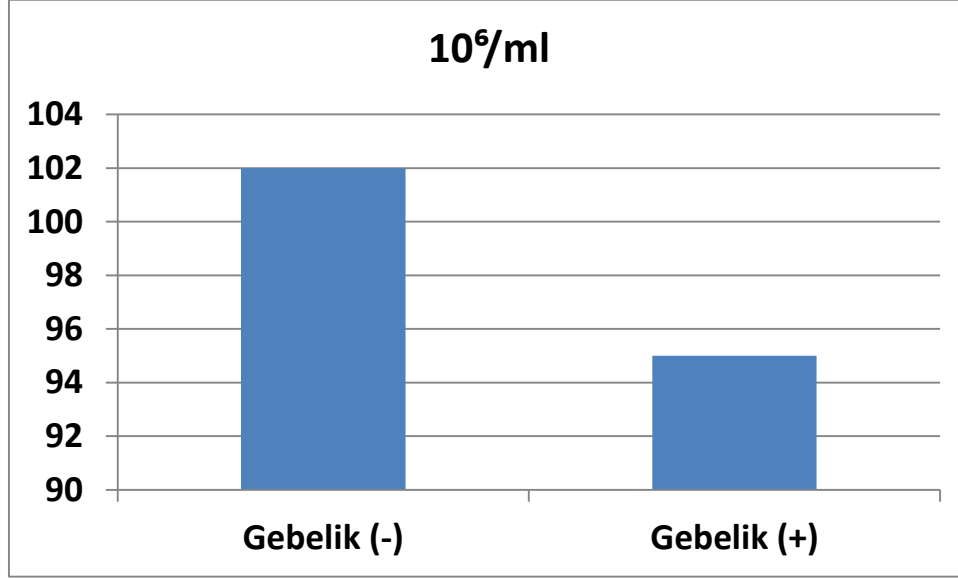
Semen örneklerinin ölçülen volümü, gebelik pozitif grupta en fazla 8ml, en az 0.3ml ve ortalama 2.61 ± 1.88 ml olarak belirlendi. Gebelik negatif grupta ise en fazla 8 ml, en az 1 ml ve ortalama 2.94 ± 1.59 ml olarak ölçüldü. Elde edilen bu sonuçlara göre, iki grubun volüm değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlılığın olmadığı tespit edildi ($P > 0.05$; Şekil 8).



Şekil 8. Semen volüm ölçümleri

Mililitredeki Sperm Sayım Sonuçları

Gebelik pozitif grupta, mililitredeki sperm sayısı en fazla $190 \times 10^6/\text{ml}$, en az $15 \times 10^6/\text{ml}$ ve ortalama $95.78 \pm 67.88 \times 10^6/\text{ml}$ olduğu tespit edildi. Gebelik negatif grupta ise sperm sayısı en fazla $230 \times 10^6/\text{ml}$, en az $8 \times 10^6/\text{ml}$ ve ortalama olarak $102.27 \pm 68.22 \times 10^6/\text{ml}$ tespit edildi. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlılık görülmedi ($P=0.585$; Şekil 9).



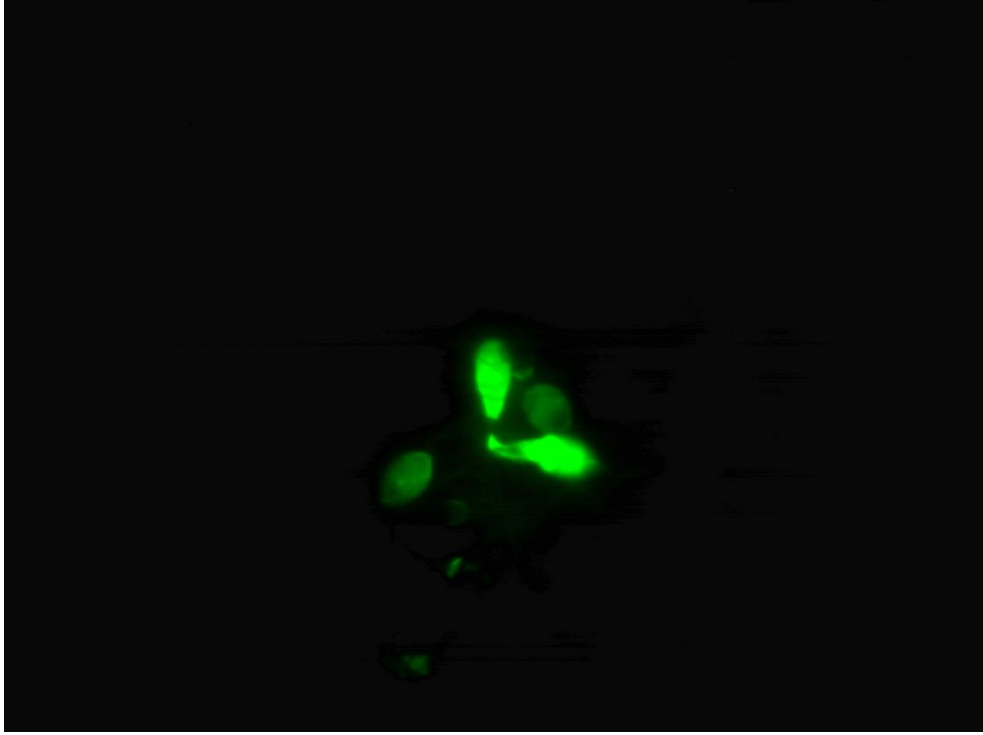
Şekil 9. Mililitre hacimdeki sperm sayısı

TUNEL Sonuçları

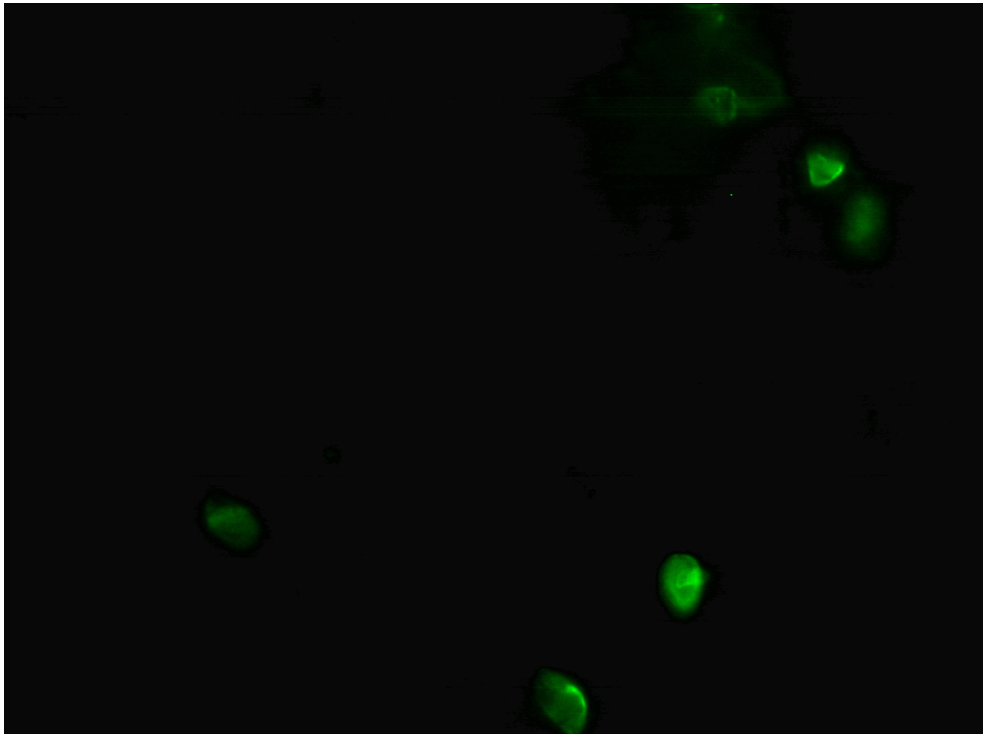
Yapılan TUNEL boyamasından elde edilen pozitif hücre yoğunluğu Tablo 7’de verildi. Yapılan TUNEL boyamasına ait immunfloresan görüntüler Şekil 10-13’de gösterildi. Yapılan TUNEL boyama sonuçlarında her ne kadargebelik (-) grupta TUNEL (+) sperm sayısı fazla (21.27 ± 9.39) olsa da, gebelik (+) gruptan (17.94 ± 7.97) istatistiksel olarak önemli farklılık göstermedi ($p > 0.05$).

Tablo 7. TUNEL boyama sonuçları

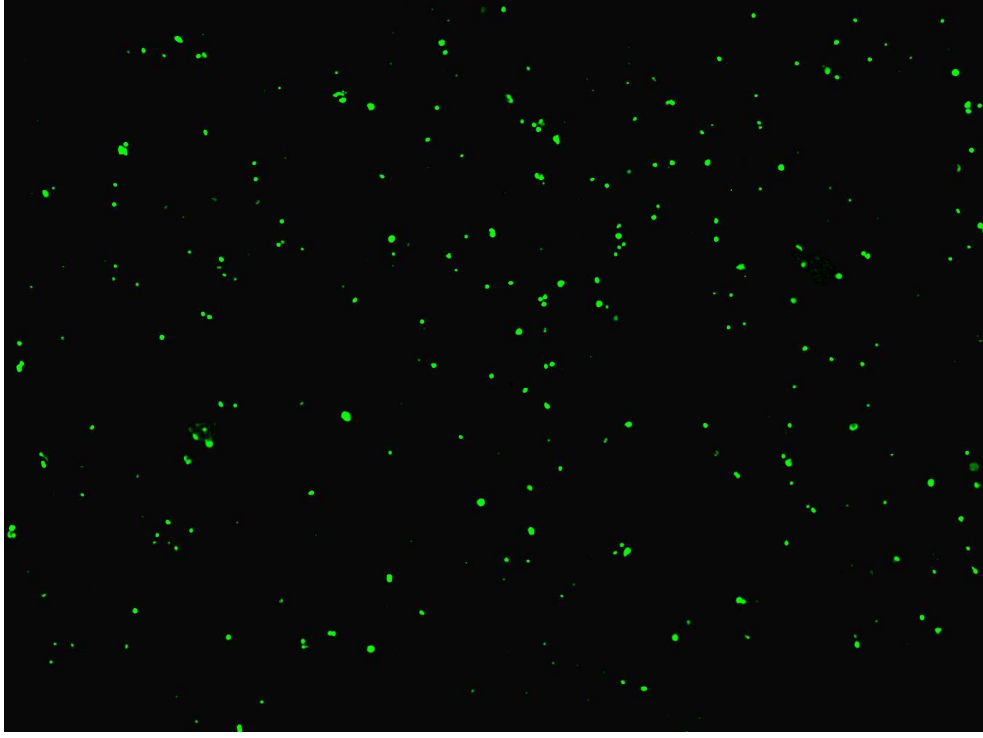
	TUNEL (+) hücre (%)	
Gebe(-)	21.27±9.39	P=0.23
Gebe(+)	17.94±7.97	



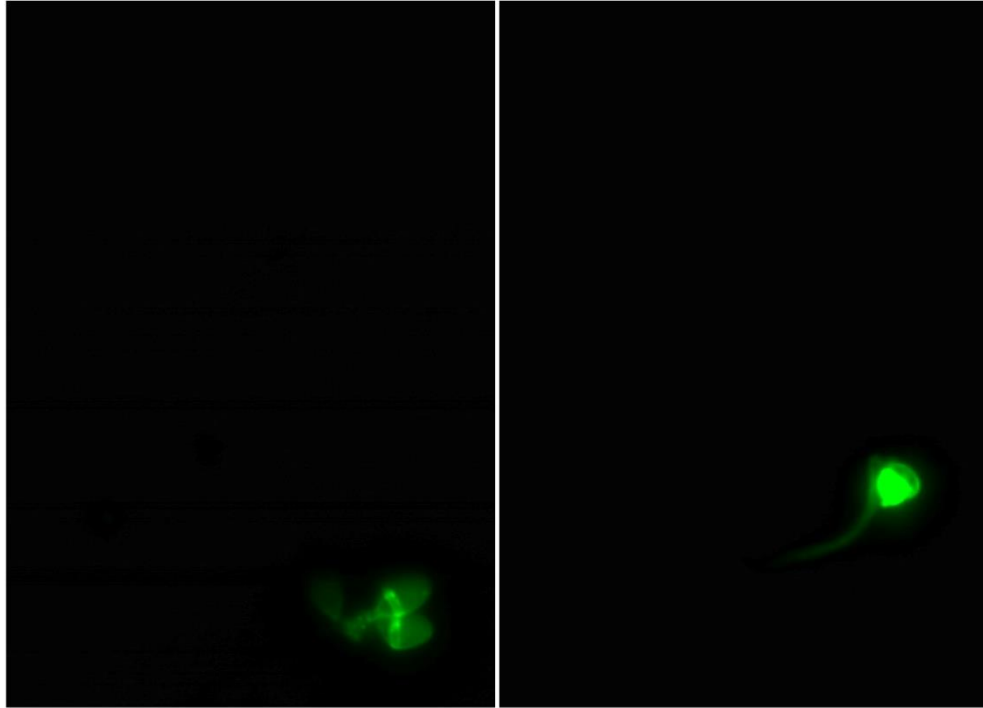
Şekil 10. TUNEL (+) spermiler, gebelik (+) grup, TUNEL (1000X)



Şekil 11. TUNEL (+) ve (-) spermiler, gebelik (+) grup, TUNEL (1000X)



Şekil 12. TUNEL (+) spermeler, gebelik (-) grup, TUNEL (100X)



Şekil 13. Çift baş ve boyun defektli TUNEL (+) spermeler, gebelik (-) grup, TUNEL (1000X)

TARTIŞMA

Polikliniğimize başvuran 81 infertil çifte birer siklus IUI uygulanmış ve 18 klinik gebelik elde edilmiştir. Siklus başına gebelik oranı %22.22 olarak tespit edilmiştir. Demirel ve ark. (2013) 172 infertil hasta üzerinde yaptıkları 279 sikluluk IUI denemesinde toplamda 57 ve klinik olarak ise 37 gebelik elde ettiklerini bildirmişlerdir (44).

Yaptığımız çalışmada spermilerin morfolojik değerlendirmeleri sonucu gebelik (+) grupta morfoloji ortalama %2.39 iken, gebelik (-) grupta ortalama %2.90 olup, istatistiksel olarak IUI ile gebelik elde etme arasında pozitif korelasyon olmadığı görüldü. Demirel ve ark. (2013)'nın yaptıkları araştırmada, morfolojisi ≥ 4 olan grupta gebelik daha yüksek olmasına rağmen, morfolojisi ≤ 4 olan grupla gebelik oranının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Benzer olarak, Leu ve ark. (1995) IUI uyguladıkları hastalarda strict kriterlerine göre normal morfolojiyi $< \%14$ ve $> \%14$ olarak gruplandırdıklarında gebelik oranları arasında istatistiksel olarak bir farkın olmadığını bildirmişler (45).

Yapılan bir araştırmada, strict kriterlerine göre normal morfoloji ≤ 4 , $\%5-14$ ve >14 olarak gruplandırılan hastalarda, gebelik oranları sırasıyla %30, %26 ve %20 elde edilmiş olup, bu araştırma sonucunda düşük morfoloji ile düşük gebelik oranının orantılı olmadığını ileri sürülmüştür (46). Yine yapılan başka bir araştırmada, Kruger kriterlerine göre <4 , $4-9$ ve $>9\%$ sınıflandırılan hastalardan <4 ve >9 olarak ayrılan gruplar arasında gebelik oranlarının istatistiksel olarak farklı olduğu bildirilmiştir (47). Hauser ve ark. (2001) yaptıkları benzer araştırmada, <4 , $4-14$ ve $> \%14$ olarak ayrılan bireylerde IUI sonucu elde edilen gebelik oranları, sırasıyla yüzde olarak 11.1, 36.1 ve 50 elde edilmiştir (48).

Utsuno ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada, anormal sperm baş morfolojisi DNA fragmentasyon oranlarının morfoloji bozukluğunun türüne göre değiştiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, eliptik baş morfolojili spermelerde DNA fragmentasyonu %6.1, açılal baş bozukluğu olan spermelerde %5.5 ve büyük nüklear vakuollü spermelerde %4.7 olarak belirlenmiştir (49).

Benchaib ve ark. (2003) yaptıkları bir araştırmada, DNA fragmentasyonu ile sperm konsantrasyonu arasında, DNA fragmentasyonu ve sperm motilitesi arasında ve yine fragmentasyon ile atipik şekilli sperm yüzdesi arasında negatif bir korelasyonun olduğu tespit edilmiştir (50). Birçok çalışmada, yine sperm motilitesi ile DNA fragmentasyonu arasında negatif ilişki bildirilmiştir (32, 51-53). Muratori ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, sperm örneklerini yüzdürme öncesi ve sonrası değerlendirdiklerinde, DNA fragmentasyonu ile ileri hareketli sperm oranı arasında negatif ilişki bildirmişlerdir. Bu değerlendirmeye dayanarak, sperm DNA fragmentasyon oranı ile immotil sperm oranı arasında pozitif ilişki; ileri hareketli olmayan sperm oranı ile ise bir ilişkinin olmadığı bildirilmiştir (54). Bununla birlikte, Ahmadi ve Ng (1999) yaptıkları çalışmada, yüksek sperm DNA fragmentasyonunun fertilizasyon oranının etkilenmediği ama blastokist formasyonunu azalttığı ileri sürülmüştür (55).

Benchaib ve ark. (2003) yaptıkları bir araştırmada, DNA fragmentasyonu ile embriyo kalitesi arasında doğru bir orantının olmadığı tespit edilmiştir. IVF uygulamasında DNA fragmentasyonu ile gebelik oranı arasında istatistiksel olarak bir anlamlılığın olmadığı saptanmıştır (50). Lopes ve ark. (1998) yaptıkları bir çalışmada, sperm DNA fragmentasyonu %40'dan büyük olduğu durumlarda fertilizasyon oranını etkilemediği ama %40'dan az olduğu durumlarda ise fertilizasyonu artırdığı belirlenmiştir (56).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sperm DNA fragmentasyon değerlendirmesi gebelik oranının belirlenmesinde önemli bir belirteç olarak kullanılmaktadır (57). Yapılan bir çalışmada, TUNEL ile belirlenen DNA fragmentasyon yüzdesi infertil erkeklerde fertil erkeklere göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla; %40.9, %13.1). Yine bu çalışmada, fertil erkekler ile infertil erkekleri ayırt etmek için TUNEL eşik değeri %20 olarak belirlenmiştir (58). Bir çok araştırmacı farklı kriterler kullanarak farklı eşik değerlere ulaşmışlardır (54,59-61). Pek çok çalışmanın sonucu, DNA fragmentasyonunun yüksek olduğu infertil hastalarda, anormal sperm parametrelerinin de gözlemlendiğini göstermektedir (57,62). Sperm DNA hasarlarının varlığı IUI uygulamalarında da gebelik oranını negatif olarak etkilediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır (63, 64).

Yapılan araştırmalar, sperm DNA fragmantasyonun yüzdesi ile ICSI sonucu elde edilen fertilizasyon arasında negatif bir ilişkinin olduğu bildirilmiştir (56). Aynı şekilde Huang ve ark. (2005) IVF ve ICSI sonucu elde edilen fertilizasyon oranları ile DNA fragmantasyon oranları arasında negatif ilişki bulmuşlar (65). Ama başka araştırma grupları, fertilizasyon oranını etkilemediğini ileri sürerken embriyo kalitesini (66) ve gebelik oranının (50) düşürdüğünü ileri sürmüşlerdir. Henkel ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, TUNEL pozitif spermilerin IVF uygulamasında gebelik oranlarını kaydadeğer oranda azalttığını göstermişlerdir (67). Bir başka çalışmada, TUNEL ile belirlenen DNA hasar oranı gebelik (-) (15.04 ± 1.1) grupta, gebelik (+) (8.79 ± 0.56) gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (68). Sunulan bu çalışmada da, TUNEL pozitif sperm sayısı gebelik (-) grupta yüksek olmakla beraber istatistiksel olarak anlamlılık ifade etmemektedir ($P>0.05$).

Kussler ve ark. (2014) yaptıkları bir araştırmada, farklı viskoziteye sahip sperm örneklerinde DNA fragmantasyonları arasında bir değişimin olmadığını göstermişlerdir. Sunulan bu çalışmada, gebelik (+) grupta 3 örnekte viskozite saptanırken, gebelik (-) grupta ise 1 örnekte viskoziteye rastlanıldı ve bu da farklı viskoziteye sahip örneklerden elde edilen spermilerle yapılan IUI uygulamasının gebelik oranı üzerine bir etkisinin olmadığını göstermektedir (69). Sunulan bu çalışmada, viskozitesi yüksek olan örneklerde likefaksiyon süresi normal rnelere göre daha uzun olarak tespit edildi ve bu da Adrade-Rocha (2005)'nin çalışması ile benzerlik göstermektedir (70).

Sperm motilitesi ile ilgili yapılan bir araştırmada, total hareketli sperm sayısı 5 milyon ile < 10 milyon olan grupta, total hareketli sperm sayısı <1 milyon, 1 milyon ile <5 milyon ve ≥ 10 milyon olan gruplara göre hamilelik oranı istatistiksel olarak yüksek bulunmuş (71). Yapılan bu çalışmada, gebelik (-) grupta total motilite yüzdesi 60.09 ± 35.69 olarak belirlenirken, gebelik (+) grupta 60.83 ± 45.75 olduğu tespit edildi. Terada ve ark. (1995) yaptıkları çalışmada, total motil sperm sayısı gebelik (-) grupta 79.4 ve gebelik (+) grupta ise 86.1 olarak bildirmişlerdir (72). Her iki çalışmada da gruplar arasında anlamlılığın bulunmaması bakımından bizim sonuçlarımız ile benzerlik görülmektedir. Benzer şekilde Tarlatzis ve ark. (1991) alışmasında da, 111 IUI siklusunda motilitenin gebelik oranı üzerine etkisinin olmadığını bildirilmiştir (73).

Duran ve ark. (2002) yaptıkları araştırmada, gebelik (+) grupta motilite yüzde olarak 66.6, gebelik (-) grupta ise 64.2 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, sperm konsantrasyonu gebelik (+) grupta 110 milyon/ml ve gebelik (-) lerde ise 130 milyon/ml olarak bildirilmiştir (64). Aynı şekilde başka bir çalışmada, gebelik (-) grubun sperm

konsantrasyonu gebelik (+) gruptan daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla; 104.53 milyon/ml ve 84.87 milyon/ml) (68). Sunulan bu çalışmada da, gebelik (+) grupta sperm konsantrasyonu 95.78 milyon/ml, gebelik (-) grupta ise 102.27 olarak tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlılık belirlenmemiştir. ($P>0.05$). Bu sonuçlar Duran ve ark. (2002) ve Simon ve ark.(2014) çalışmaları ile benzerlik göstermektedir (64). Sergerie ve ark. (2005) ise yaptıkları çalışmada, fertil erkeklerde sperm konsantrasyonu 102.4 milyon/ml, infertil erkeklerde de 62.9 milyon/ml olarak bildirmişlerdir (58).

Yapılan bir araştırmada, DNA fragmentasyonu ile semen hacmi ve pH değerleri arasında bir ilişkinin olmadığı belirlenmiştir (54). Sunulan bu çalışmada da, gebelik (+) ve gebelik (-) gruplara arasında, DNA fragmentasyonu ile semen hacmi ve pH değerleri arasında bir korelasyonun olmadığı belirlenmiştir.

SONUÇLAR

Yardımla üreme teknikleri, geleneksel tedavi yöntemlerinin başarısız olduğu, tüpleri hasarlı veya ileri derecede sperm problemi olan çiftlerde gebelik elde edebilmek için uygulanan tedavi yöntemlerinin tümünü kapsamaktadır. Bu yöntemlerin en basiti “aşılama” olarak da bilinen intrauterin inseminasyondur (IUI). Bu uygulama yumurtlama döneminde erkeğin spermelerinin canlı ve hareketli olanlarının seçilerek, ince bir tüp yardımı ile doğrudan rahim içine verilmesidir.

Çalışmamızda; intrauterin inseminasyon uygulanması kararı alınan çiftlerin semen örnekleri incelenerek, değişik parametrelerin gebelik üzerine etkileri araştırıldı. Elde edilen sonuçlar:

1. Spermelerin hareketlilik yüzdeleri gebelik (-) ve gebelik (+) gruplar karşılaştırıldığında hızlı ileri hareketli sperm yüzdesi gebelik (+) grupta 18.17, gebelik (-) grupta 16.48 (P=0.707), ileri hareketlilik oranı gebelik(+) grupta 33.72, gebelik (-) grupta 36.05(P=0.820), yerinde hareketlilik oranı gebelik (+) grupta 8.94, gebelik (-) grupta 7.56(P=0.651), hareketsiz sperm oranı da gebelik (+) grupta 39.17, gebelik (-) grupta 39.06(P=0.986) olarak tespit edildi.

2. İki grup arasında spermelerin morfolojik karşılaştırılması yapıldığında, gebelik (+) grupta normal morfoloji yüzde ortalaması 2.39, gebelik (-) grupta 2.90 olarak bulundu.

3. Semen örneklerinin volümü, gebelik (+) grupta ortalama 2.61±1.88 ml, gebelik (-) grupta ortalama 2.94±1.59 ml olarak ölçüldü (P=0.277)

4. Semene ait pH değerleri karşılaştırıldığında gebelik (-) grupta 7.38, gebelik (+) grupta 7.44 olarak tespit edildi (P=0.629)

5. Mililitredeki sperm sayı ortalaması gebelik (+) grupta ortalama $95.78 \pm 67.88 \times 10^6/\text{ml}$, gebelik (-) grupta $102.27 \pm 68.22 \times 10^6/\text{ml}$ olduğu tespit edildi (P=0.585).

6. Semen örneklerinin likefaksiyon süreleri gebelik (-) grupta 44.95 dk, gebelik (+) grupta 39.17 dk olarak belirlendi. Gebelik olmayan grubun süresi uzun olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P=0.160)

7.TUNEL boyama sonucunda elde edilen sperm DNA fragmantasyon yüzde oranı gebelik (-) grupta 21.27 ± 9.39 , gebelik (+) grupta 17.94 ± 7.97 olarak tespit edildi. Gebelik (-) grupta DNA fragmantasyon oranı yüksek olarak bulunurken istatistiksel olarak anlamsızdı (P=0.228).

ÖZET

Bu çalışmada, IUI uygulaması kararı alınan infertil çiftlerden, erkek bireylerden elde edilen spermelerin özel hazırlama yöntemleri sonrasında TUNEL boyama ile DNA hasar oranını tespit etmek ve hamilelik oluşumu üzerine etkisini araştırmak amaçlandı.

Çalışmamıza 81 çift dahil edildi. Çiftlerin semen örnekleri, öncelikle Androloji laboratuvarında makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi. Her örnek, likefiye olması için 5 dk aralarla kontrol edilerek en fazla 60 dk beklendi ve bu süreyi aşan örnekler visköz olarak kaydedildi. Enjektör yardımı ile volüm belirlendi, pH değeri de özel indikatör kağıt ile ölçüldü. Mililitredeki sperm sayısını ve hareketlilik yüzdesini bulmak için Makler sayım kamerası kullanıldı. Morfolojik değerlendirme, spermelerin Spermac Stain boya seti ile boyandıktan sonra Kruger'in mutlak değerlerine göre yapıldı.

Sperm, gradient ve yüzdürme yöntemleri kullanılarak IUI için hazırlandı. En iyi yüzen sperm toplenarak IUI uygulaması yapıldı ve geriye kalan sperm TUNEL boyama için hazırlandı. TUNEL boyama hazırlığı için örnekler PBS ile yıkanarak %4'lük PFA ile fiksasyonları yapıldı. Fiksasyon sonrasında örnekler en az bir gece +4 derece buzdolabında bekletildi. TUNEL boyama kitindeki prosedüre göre boyama işlemi yapıldı ve örneklerin sperm DNA hasar oranı fluoresan mikroskop ile tespit edildi.

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda gebelik elde edilen grup ile gebelik elde edilmeyen grup arasındaki semen örneklerinin likefaksiyon süresi, volümleri, pH değerleri, sperm konsantrasyonları, hareketlilikleri ve morfolojik özellikleri arasında anlamlı bir fark elde edilemedi. Yine iki grup arasında sperm DNA hasar oranları değerlendirildiğinde gebelik

(+) olan grupta gebelik (-) olan gruba göre TUNEL (+) olan sperm oranı düşük olmasına rağmen, aralarında istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır.

Sonuç olarak, semen örneklerinin özelliklerine ve spermilerin DNA hasar oranına bakılarak, IUI uygulaması sonrası gebelikle ilgili bir öngörüle bulunulamayacağı kanısına varıldı.

Anahtar kelime: IUI, DNA hasarı, sperm, TUNEL

THE EFFECT OF SPERM DNA FRAGMENTATION ON PREGNANCY RATES INTRAUTERINE INSEMINATION (IUI) CYCLES

SUMMARY

In this study, we aimed to detect the DNA damage ratio of the sperm samples of infertile couples scheduled to intrauterine insemination treatment with TUNEL test and observe its effect on the rate of pregnancy.

In our study, 81 men were included. Semen samples were examined macro- and microscopically in the andrology laboratory. Each sample was observed for liquefaction 5 minutes intervals for maximum 60 minutes. Time to liquefaction was noted. The samples liquefied after 60 minutes were accepted as viscous. The volume of each sample was measured by drawing into a syringe and the pH was read after the immersion of pH indicator paper into the sample. Sperm number and percentage of motility were estimated with Makler counting chamber. The morphological evaluation was done according to absolute values of Kruger's strict criteria after staining with Spermac Stain.

Gradient and swim-up sperm preparation techniques were used for intrauterine insemination (IUI). The most motile sperms in the supernatant after swim-up were used for intrauterine insemination and the sperms in the pellet were prepared for TUNEL staining. For TUNEL staining preparation, the samples were bathed with PBS and fixed with 4% PFA. After stabilization/fixation, the samples were kept overnight under + 4°C. The staining was done according to the TUNEL staining kit procedure and the ratios of defected DNA in the sperms were determined by fluorescent microscopy.

There was no statistical difference between the pregnancy and no pregnancy groups in terms of liquefaction time, volume, pH, sperm concentration, motility and morphology. Although DNA damage percentage measured by TUNEL test was less in the pregnancy achieved group compared to no pregnancy group, it did not reach statistically significant levels.

In conclusion, the characteristics of semen samples and the ratio of the sperm DNA damage can not be used to predict pregnancy rates in IUI cycles.

Key words: IUI, DNA damage, sperm, TUNEL

KAYNAKLAR

1. Yumru A, Öndeş B. Approach to the infertile couple and choice of the optimum patient for in vitro fertilization. JAREM 2011;1:57-60.
2. Van der Steeg JW, Steures P, Hompes PG, Eijkemans MJ, van der Veen F, Mol BW. Investigation of the infertile couple: a basic fertility work-up performed within 12 months of trying to conceive generates costs and complications for no particular benefit. Hum Reprod 2005;20:2672-4.
3. Çelik Ö. Yardımcı üreme teknikleri temel klinik ve embriyolojik uygulamalar. Adana: Nobel Kitabevi 2011.
4. Johnson D. Genetic risks of intracytoplasmic sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. Fertil Steril 1998;70:397-612.
5. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G at all. European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. Eur Urology 2012; 62:324-32.
6. World Health Organization: The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. Fertil Steril 1992;57:1289-93.
7. Miller JH, Weinberg RK, Canino NL, Klein NA, Soltes MR. The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age. Am J Obstet Gynecol 1999;181(4):952-7.
8. Berek JS. Infertilite (In), Berek JS: Infertilite, Adashi E. Y, Hillard P.A Novak Jinekoloji, Nobel Kitabevi İstanbul 1998;918-925.
9. Speroff L, Glass NH, Kase RG. Clinical gynaecologic endocrinology and infertility. USA: Lippincott Williams and Wilkins, 7nd edition. New York 2007:386

10. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2745-9.
11. Çiçek MN, Mollamahmutoğlu L. Yardımcı üreme teknikleri. Ankara: Palme Yayıncılık 2009.
12. Barbieri RL. Female infertility. In: Strauss FJ, Barbieri RL (eds), *Reproductive endocrinology*. Pennsylvania: Elsevier Inc., 5th ed, 2004: 633-68.
13. Mansour R, Aboulghar M, Serour GI. Controversies in the surgical management of hydrosalpinx. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000;12(4):297-301.
14. Zeyneloğlu HB, Arici A, Olive DL. Adverse effects of hydrosalpinx on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1998;70:492-9.
15. Camus E, Poncelet C, Goffinet F. Pregnancy rates after in-vitro fertilization in cases of tubal infertility with and without hydrosalpinx; a meta-analysis of published comparative studies. *Hum Reprod* 1999;14:1249.
16. Eimers JM, te Velde ER, Gerritse R, Van Kooy RJ, Kremer J, Habbema JD. The validity of the postcoital test for estimating the probability of conceiving. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:65-70.
17. The practice Committee of the American Society for reproductive medicine. Endometriosis and infertility. *Fertil Steril* 2004;82:40-5.
18. Templeton AA, Penney GC. The incidence, characteristics, and prognosis of patients whose infertility is unexplained. *Fertil Steril* 1982;37:175-82.
19. American Fertility Society. Investigations of the infertile couple. Birmingham, American Society for Reproductive Medicine 1992.
20. Tıraş MB, Aybar F. İnvitroFertilizasyon (IVF)-intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) endikasyonları. *Türkiye Klinikleri, J Surg Med Sci* 2006;2(5):37-41.
21. <http://www.hsklinik.com/sayfa.php?id=MzA=> (27.04.2014 tarihinde erişildi)
22. Testart J, Plachot M. World Collaborative report on IVF-ET and GIFT: 1989 results *Hum Reprod* 1992;72(2):362-7.
23. Kişnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T ve ark. Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. *Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi*. Ed. Ankara: Güneş, 1996:1119-29.
24. Van Steirtegham A, Lice J, Nagy Z. Use of assisted fertilization. *Hum Reprod* 1993;8: 1784-88.
25. Delilbaşı L. A'dan Z'ye tüp bebek laboratuvarı. İstanbul: Veri Medikal Yayıncılık 2008: 196-9.

26. Kadioğlu A, Cayan S, Semerci B. Erkek reproduktif sistem hastalıkları ve tedavisi, Bolum 4: Tedavi, Acar Matbaacılık, İstanbul 2004:379-599.
27. http://www.centerforhumanreprod.com/pdf/iui_training2.pdf (29.04.2014 tarihinde erişildi)
28. Kılıçdağ EB, Bağış T, Haydardedeoğlu B, Tarım E, Aslan E, Erkanlı S ve ark. Intrauterin İnseminasyon (IUI) Sikluslarında Gebelik Sonuçlarını Etkileyebilecek Prognostik Faktörler. Uzmanlık Sonrası Eğitim ve Güncel Geişmeler Dergisi 2005;2(3):223-8.
29. Duran EH, Morshedi M, Kruger T, Oehninger S. Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. Hum Reprod Update 2002;8(4):373-84.
30. The ESHRE Capri Workshop Group, Intrauterine insemination. Hum Reprod Update 2009;15(3):265-77.
31. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Yardımla üreme teknikleri temel kitabı. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul 2010:93-4.
32. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation inhuman sperm: correlation with fertilization in vitro. Biol Reprod 1997;56:602-7.
33. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Biol Reprod 2001;122:497-506.
34. Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance inassessing reproductive outcome Asian J Androl 2004;6:139-48.
35. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage inejaculated human spermatozoa. Rev Reprod 1999;4:31-7.
36. Sakkas D, Moffat O. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. Biol Reprod 2002;66:1061-7.
37. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: From research benchto clinical practice- Review. J Androl 2002;23(6):737-52.
38. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and dna damage in male infertility. Hum Reprod Update 2003;9:331-4.
39. Loo DT, TUNEL assay: An overview of technigues. Methods Mol Biol 2002;203:21-30.
40. Koyuncu H. Methods for the determination of sperm DNA damage, Turk Urol Sem 2011; 2:18-23.
41. Sharif K, Lewis EM. Sperm DNA fragmentation testing: To do or not to do? Middle East Fertil Soc J 2013;18:78-83.

42. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful?, *J Androl* 2009;30:219-29.
43. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility. *J Urology* 2010;76(6):1380-6.
44. Demirel E, Şevket O, Ateş S, Demirel F, Koç S, Sönmez S. İntrauterin inseminasyon uygulanan hastalara spermogram parametrelerinin etkisi. *JCEI*. 2013;4(4):472-6.
45. Leu GZ, Lee RKK, Su JT. Using sperm morphology with Kruger's criteria for indication of micromanipulation in IVF program. *J Reprod Infertil* 1995;4:42-7.
46. Check ML, Bollendorf, Check JH, Katsoff D. Revaluation of the evaluating sperm morphology using strict criteria. *Arch Androl* 2002;48(1):1-3.
47. Lee RKK, Hou JW, Ho HY, Hwu YM, Lin MH, Tsai YC et al. Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterin insemination. *Int J Androl* 2002;25:277-80.
48. Hauser R, Yogev L, Botchan A, Lessing JB, Paz G, Yavetz H. Intrauterine insemination in male factor subfertility: significance of sperm motility and morphology assessed by strict criteria. *Andrologia* 2001;33:13-7.
49. Ustuno H, Oka K, Yamamoto A, Shiozawa T. Evaluation of sperm head shape at high magnification revealed correlation of sperm DNA fragmentation with aberrant head ellipticity and angularity. *Fertil Steril* 2013;99(6):1573-80.
50. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003;18(5):1023-8.
51. Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003;79 Suppl 3:1597-605.
52. Ramos L, Wetzels AM. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the TUNEL assay. *Hum Reprod* 2001;16:1703-7.
53. Giwercman A, Richthoff J, Hjollund H, Bonde JP, Jepson K, Frohm B, et al. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. *Fertil Steril* 2003;80:1404-12.
54. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl* 2000;21:903-12.
55. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14:2279-85.

56. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69:528-32.
57. Henkel R. DNA fragmentation and its influence on fertilization and pregnancy outcome. In: Oehninger SC, Kruger TF, eds. *Male infertility: diagnosis and treatment*. London, UK: Informa Healthcare, 2007:277-90.
58. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Hum Reprod* 2005;12:3446-51.
59. Donnelly ET, Steele EK, McClure M, Liwis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001;16:1191-9.
60. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *J Androl* 2000;21:33-44.
61. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002;78:313-8.
62. Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2007;14:727-33.
63. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 2007;22:174-9.
64. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002;17:3122-8.
65. Huang CC, Lin DPC, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril* 2005;84:130-40.
66. Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ, et al. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006;85:371-83.
67. Henkel R, Kierspel E, Hajimohammad M, Stalf T, Hoogendijk C, Mehnert C, et al. DNA fragmentation of spermatozoa and assisted reproduction technology. *Reprod Biomed Online* 2003;7:477-84.
68. Simon L, Liu L, Murphy K, Ge S, Hotaling J, Aston KI, et al. Comparative analysis of three sperm DNA damage assays and sperm nuclear protein content in couples undergoing assisted reproduction treatment. *Hum Reprod* 2014;29(5):904-17.

69. Kussler APS, Pimentel AM, Alcoba DD, Liu IP, Brum IS, Capp E, et al. Mechanical processing of hyperviscous semen specimens can negatively affect sperm DNA fragmentation. *Int Urol Nephrol* 2014;46:737-42.
70. Andrade-Rocha FT. Physical analysis of ejaculate to evaluate the secretory activity of the seminal vesicles and prostate. *Clin Chem Lab Med* 2005;43(11):1203-10.
71. Nikbakht R, Saharkhiz N. The influence of sperm morphology, total motile sperm count of semen and the number of motile sperm inseminated in sperm samples on the success of intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2011;5(3):168-73..
72. Terada Y, Furaka T, Haraya H, Yajima A. Sperm motility characteristics and pregnancy outcome of artificial insemination with husband's semen for male infertility. *Tohoku J Exp Med* 1995;177:337-41.
73. Tarlatzis BC, Bontis J, Kolibianakis EM, Sanopoulou T, Papadimas T, et al. Evaluation of intrauterine insemination with washed spermatozoa from the husband in the treatment of infertility. *Hum Reprod* 1991;6:1241-6.

RESİMLEMELER LİSTESİ

TABLolar	Sayfa No
Tablo 1. DSÖ'nün insan semen örnekleri için referans değerleri	4
Tablo 2. Primer testiküler yetersizlik nedenleri	5
Tablo 3. Hipogonadotropik hipogonadizmin sınıflandırılması.....	7
Tablo 4. İzah edilemeyen infertilite olası etyolojileri	10
Tablo 5. Gebelik gözlenen grup ile gebelik gözlenmeyen grup arasındaki spermilerin hareket yüzdeleri ile semen viskozitelerinin karşılaştırılması.....	23
Tablo 6. Gebelik gözlenen grup ile gebelik gözlenmeyen grup arasındaki spermilerin morfolojik yüzdelerinin karşılaştırılması	24
Tablo 7. TUNEL boyama sonuçları.....	26

ŞEKİLLER	Sayfa No
Şekil 1. Çiftkuyruklu ve baş defektli sperm görüntüsü, gebelik (-) grup.....	21
Şekil 2. Çift başlı sperm, gebelik (+) grup	21
Şekil 3. Kıvrık kuyruk, baş defektli ve sitoplazmik dropletli sperm görüntüleri, gebelik (-) Grup	22
Şekil 4. Küçük baş (kalın ok), sitoplazmik droplet ve büyük baş ve kuyruk ve baş defektli sperm, gebelik (-) grup	22
Şekil 5. Boyun (kalın ok), sitoplazmik droplet ve baş defektli sperm görüntüsü, gebelik (-) Grup.....	23
Şekil 6. Semen örneklerine ait pH değerleri.....	24

Şekil 7. Likefaksiyon süreleri.....	25
Şekil 8. Semen volüm ölçümleri	25
Şekil 9. Mililitre hacimdeki sperm sayısı	26
Şekil 10. TUNEL (+) spermler, gebelik (+) grup.....	27
Şekil 11. TUNEL (+) ve (-) spermler, gebelik (+) grup	27
Şekil 12. TUNEL (+) spermler, gebelik (-) grup.....	28
Şekil 13. Çift baş ve boyun defektli TUNEL (+) spermler, gebelik (-) grup.....	28

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Bulgaristan'da doğdu. 1989 yılında Türkiye'ye göç ederek Ortaöğretimini İstanbul'da Süleyman Nazif Bey lisesinde tamamladı. 1995 yılında İstanbul Üniversitesi MYO hemşirelik bölümünden mezun oldu ve özel bir hastanede ameliyathane hemşiresi olarak göreve başladı. 1996-2000 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2002 yılına kadar İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Tüpbebek bölümünde çalıştı. 2012 yılına kadar da MN ilaç fabrikasında mikrobiyoloji laboratuvarında görev aldı. 2012 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine devam etmekte. Aynı zamanda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tüp bebek bölümünde görev yapmakta.

EKLER

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-GOKAEK 2013/159	
	PROTOKOL ADI	IUI Hastalarında, Sperm DNA Statüsünün; Gebelik Sonuçları ile Değerlendirilmesi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Yrd. Doç. Dr. Sevinç EGE	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 23/ 02	Tarih:30.10.2013	
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Sevinç EGE'nin sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Sibel IŞIK'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmemiş koşullarda gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-GOKAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıklar	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ Üye	İç Hastalıklar	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Burcu TOKUÇ Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Koray ELTER Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Recep YAĞIZ
Dekan a.
Dekan Yardımcısı