

T.C.  
Maltepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEKRARLAYAN YARDIMLA ÜREME TEDAVİSİ BAŞARISIZLIĞI  
OLAN VAKALARDA SPERM DNA HASARI ÖLÇÜMÜNÜN VE  
TESTİKÜLER SPERM KULLANIMININ  
PROGNOSTİK DEĞERİ

Mustafa EKİNCİ

Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL  
2017

T.C.  
Maltepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEKRARLAYAN YARDIMLA ÜREME TEDAVİSİ BAŞARISIZLIĞI  
OLAN VAKALARDA SPERM DNA HASARI ÖLÇÜMÜNÜN VE  
TESTİKÜLER SPERM KULLANIMININ  
PROGNOSTİK DEĞERİ

Mustafa EKİNCİ

Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Mehmet CİNCİK

İSTANBUL  
2017

T.C. Mektepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

22.02.2018 tarihinde tezinin savunmasını yapan Mustafa EKİNCİ'ye ait "Tekrarlayan Yardımla Üreme Tedavisi Başarısızlığı Olan Vakalarda Sperm DNA Hasarı Ölçümünün ve Testiküler Sperm Kullanımının Prognozistik Değeri" başlıklı çalışması, Jürimiz tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı, Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans Tezi Olarak ~~Oy Birliği/Oy Çoğunluğu~~ kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Mehmet CİNCİK  
(Başkan)  
(Danışman)



Prof. Dr. Özgür DUNDAR  
(Üye)



Prof. Dr. Cevat ÖZEKİCİ  
(Üye)

## YEMİN METNİ

01/11/2017

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "TEKRARLAYAN YARDIMLA ÜREME TEDAVİSİ BAŞARSIZLIĞI OLAN VAKALARDA SPERM DNA HASARI ÖLÇÜMÜNÜN VE TESTİKÜLER SPERM KULLANIMININ PROGNOSTİK DEĞERİ" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar olan bütün süreçlerinde bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın tarafımda yazıldığını ve yararlandığım bütün eserlerin "Kaynakça"da gösterilenlerden oluştuğunu, "Kaynakça"da yer alan bu eserlerden metin içinde atıf yaparak yararlanmış olduğumu belirtir ve onurumla doğrularım.

Öğrenci Numarası:151503203  
Adı-Soyadı:Mustafa EKİNCİ  
İmza:



## TEŞEKKÜR

Maltepe Üniversitesi Klinik Embriyoloji ABD’nda eğitimim süresince engin bilgi, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım, hiçbir zaman güler yüzünü, destek ve imkânlarını esirgemeyen bölüm başkanımız, danışmanım Prof. Dr. Mehmet CINCIK’a ve tüm öğretim elemanlarına, tezin istatistiksel çalışmalarına olan katkılarından dolayı, Doç. Dr. Zehra Sema ÖZKAN’a, benim iş kariyerime başlamamda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Sinan KURŞUN’a, her problemimde yanımda olan ve çalışmalarımdayardımlarını esirgemeyen Op.Dr. Mevlana Celalettin ÖRNEK ve Op.Dr. Abdullah Arman ÖZDEMİR’e, beni eğitim hayatımda motive eden ve sürekli destekleyen Doç.Dr. Levent ŞAHİN’e, hayatımda her zaman desteklerini hissettiğim, yanımda olan ailem ve arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa EKİNCİ

## ÖZET

### TEKRARLAYAN YARDIMLA ÜREME TEDAVİSİ BAŞARISIZLIĞI OLAN VAKALARDA SPERM DNA HASARI ÖLÇÜMÜNÜN VE TESTİKÜLER SPERM KULLANIMININ PROGNOSTİK DEĞERİ

Yardımla üreme tekniklerinde tedavi başarısızlığında %40 erkek infertilitesi neden olarak bildirilmektedir. Tedavide prognostik değer olarak kılavuzlara girmiş temel sperm parametreleri yetersiz kalmakta ve erkek faktörü açısından yeni parametreler araştırılmaktadır. Güncel aday prognostik ölçüt ve araştırma konularından biriside sperm DNA hasarı, fragmantasyonu testidir. Amaç spermatogenez sırasında ve üreme fizyolojisinde uğranan sperm hasarın yüzdesel olarak tesbiti ve tedavi prognozundaki yerinin belirlenmesidir.

Çalışmamızın amacı; subfertil erkekte sperm DNA hasarı oranına bakılarak, tedavi yönteminin bu bakış açısıyla değerlendirilmesi ve sperm faktörünün başarıya prognostik etkisinin gösterilmesidir.

Hikayesinde yardımcı üreme tedavi başarısızlığı olup, diğer prognostik faktörleri (yaş, over rezervi, üreme fizyolojisi normal) ve erkek subfertil (total progresif motil sperm sayısı 5 milyon ve Kruger morfoloji %4'ün üzerinde olan) vakalarda sperm DNA hasarı, fragmantasyon testi uyguladık. Sperm DNA hasar oranı %15'in üzerinde olan 18 vakanın ilk sikluslarında ejakülat spermi kullanılmıştı ve mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyonları normaldi. Ancak klinik gebelik negatif bu sikluslarını 1. grup olarak aldık ve ikinci grup olarak yeni sikluslarında ejakülat spermi yerine, testiküler spermatozoa kullandık. İki grup tedavi sürecini, fertilizasyon, klivaj olan embriyo oranı, embriyo morfoloji skoru ve implantasyon oranları, klinik gebelik ve canlı doğum oranına göre karşılaştırdık.

Çalışmamızda grup 1 olarak adlandırdığımız tedavilerle, grup 2 olarak adlandırılan tedavilerimizin mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon ve klivaj olan embriyo oranında istatistiksel bir farklılık gözlenmedi.

Fakat grup 2'de gelişen embriyo morfoloji skoru ve implantasyon oranı grup 1'e göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak farklı yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda önemle belirtmek istediğimiz durum; eve bebek götürme oranı %15 olarak gerçekleşen grup 2 tedavilerin, grup 1 tedavilere göre daha iyi embriyo gelişimi ve buna bağlı olarak implantasyon oranlarının anlamlı yüksek olduğunu vurgulamaktır.

**Anahtar Sözcükler:** Sperm DNA Fragmantasyonu, Erkek İnfertilitesi, Açıklanamayan İnfertilite, Yardımla Üreme Teknikleri, Testiküler Sperm



## **ABSTRACT**

### **PROGNOSTIC VALUE OF THE SPERM DNA INJURY MEASUREMENT AND USE OF TESTICULAR SPERM IN REPEATED IMPLANTATION FAILURE CASES**

Male factor infertility plays a role in approximately 40% of infertile couples. The baseline sperm parameters entered into the guidelines as prognostic value in therapy are inadequate and new parameters are investigated in terms of male factor. Current candidate prognostic criteria and research are sperm DNA damage, fragmentation test at one point.

The purpose of our work; sperm damage during spermatogenesis and reproductive physiology, and determine the location of the disease in the prognosis of treatment. For spermatozoon to be fertile, DNA integrity is essential and any form of sperm chromatin abnormalities or DNA damage may result in male infertility and subfertility but unsuccessful assisted reproduction attempts. Several methods are used to assess sperm chromatin DNA which is considered an independent measure of sperm quality that may yield better diagnostic and prognostic approaches than standard sperm parameters (concentration, motility any morphology).

We performed sperm DNA damage, fragmentation test in cases of assisted reproduction failure cases which paternal prognostic factors normal (age, over-reserve, normal reproductive physiology) and these males definitely subfertile (total progressive motile sperm count at least 5 million and Kruger morphology 4% and more). Ejaculate spermatozoa were used in the first cycles of 18 cases with sperm DNA damage greater than 15% and fertilization was normal after microinjection but negative pregnancy. We accepted these clinical cycles as the first group and as the second group we used testicular spermatozoa of the same couples instead of ejaculate spermatozoa in the new cycle. The two groups were compared according to treatment duration, fertilization, cleavage embryo ratio, embryo morphology score and implantation rates, clinical pregnancy and live birth rate.



As a results, there was no statistically significant difference between the treatments that we named group 1 and the group 2, about fertilization and cleavage embryo rates after microinjection.

However, embryo morphology score and implantation rate were statistically significantly higher group 2, fertilised embryos by testicular spermatozoa.

The situation we want to emphasize in our work to emphasize that group 2 treatments with a 15% rate of delivering a baby to the home have significantly higher embryo development and consequently implantation rates than group 1 treatments.

Therefore, screening for sperm DNA damage may provide useful information in cases of male idiopathic infertility and subfertility so in those men pursuing assisted reproduction. Treatment should include methods for prevention of sperm DNA damage and retrieval of less damaged spermatozoa.

**Key Words:** Sperm DNA fragmentation; male infertility; unexplained infertility; assisted reproductive techniques; testicular sperm.

## İNTİHAL RAPORU

### TEKRARLAYAN YARDIMLA ÜREME TEDAVİSİ BAŞARSIZLIĞI OLAN VAKALARDA SPERM DNA HASARI ÖLÇÜMÜNÜN VE TESTİKÜLER SPERM KULLANIMININ PROGNOSTİK DEĞERİ

ORIJINALLIK RAPORU

% <b>13</b> BENZERLİK ENDEKSİ	% <b>13</b> İNTERNET KAYNAKLARI	% <b>5</b> YAYINLAR	% <b>1</b> ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
----------------------------------	------------------------------------	------------------------	--------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://acikerisim.deu.edu.tr">acikerisim.deu.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>6</b>
<b>2</b>	<a href="http://www.fusabil.org">www.fusabil.org</a> İnternet Kaynağı	% <b>3</b>
<b>3</b>	<a href="http://www.korhek.org">www.korhek.org</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>4</b>	<a href="http://docplayer.biz.tr">docplayer.biz.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	<a href="http://library.cu.edu.tr">library.cu.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://acikerisim.dicle.edu.tr">acikerisim.dicle.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

Alıntılarını çıkart

Kapat

Eşleşmeleri çıkar

Kapat

Bibliyografyayı Çıkart

Kapat

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI .....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
YEMİN METNİ .....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
İNTİHAL RAPORU .....	ix
İÇİNDEKİLER .....	x
TABLolar LİSTESİ .....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ .....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Spermatogenezis .....	3
2.1.1. Spermatositogenez .....	4
2.1.2. Mayoz Bölünme .....	7
2.1.3. Spermiyogenez .....	9
2.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi .....	12
2.3. Sperm DNA Hasarı .....	15
2.3.1. Spermatozoon DNA'sı .....	15
2.3.2. Spermatozoon DNA'sındaki Hasar ve Önemi .....	15
2.4. Spermatozoon DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri .....	17
2.4.1. Asidik Anilin Mavisi Boyaması .....	17
2.4.2. Toluidine Mavisi Boyaması .....	17
2.4.3. Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi .....	17
2.4.4. DBD-FISH (DNA breakage detection-fish) Yöntemi .....	17
2.4.5. In Situ-Nick Translasyon (NT)Yöntemi .....	18
2.4.6. Akridin Oranj (AO) Boyaması .....	18
2.4.7. Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD)- HALOSPERM® .....	18
2.4.8. COMET (Cluster Of Motifs E-value Tool) yöntemi .....	19
2.4.9. TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) Yöntemi .....	19

2.4.10. SCSA (Sperm Kromatin Strüktür Analizi).....	19
2.4.11. Yüksek Performanslı Likit Kromotografi Yöntemi.....	20
2.5. Testiküler Sperm Elde Etme Yöntemleri.....	20
2.5.1. PESA (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration) - Perkütan Epididimal Sperm Aspirasyonu.....	20
2.5.2. MESA (Micro Epididymal Sperm Aspiration) - Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu.....	20
2.5.3. TESA (Testicular SpermAspiration) - Testiküler Sperm Aspirasyonu:.....	20
2.5.4. TESE (Testicular Sperm Extraction) - Testiküler Sperm Ekstraksiyonu .....	21
2.5.5. Mikro - TESE (Microdissection TESE) .....	22
2.6. Oosit Matürasyonu ve Fertilizasyon.....	23
2.6.1. Oosit Matürasyonu, Morfolojik Analiz .....	23
2.6.2. Normal fertilizasyon .....	32
2.6.3. OPU (yumurta toplama işlemi).....	32
2.7. Yardımcı Üreme Teknikleri.....	33
2.7.1. Klasik (konvansiyonel) IVF .....	34
2.7.2. ICSI (Intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu) .....	34
2.8. Embriyo Gelişimi ve Skorlanması.....	34
2.9. Embriyo Transfer İşlemi.....	41
2.10.Yardımla Zonanın İnceltilmesi (Assisted Hatching) .....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	43
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA .....	49
6. SONUÇ .....	52
KAYNAKLAR .....	53
ÖZGEÇMİŞ .....	62

## TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 4.1. Ejekülattaki sperm temel sperm parametreleri.....	45
Tablo 4.2. DNA fragmentasyon testinin oranları. ....	46
Tablo 4.3. Ejekülat ile yapılan ICSI oranları.....	46
Tablo 4.4. Testiküler sperm ile yapılan ICSI oranları. ....	47
Tablo 4.5. Ejekülat ve testiküler spermi ile yapılan mikroenjeksiyon sonuçlarının birbiriyle karşılaştırılması .....	48



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Spermatogenez de mitoz bölünme (Akkuş M).....	6
Şekil 2.2.	Spermiyogenez (Akkuş M).....	10
Şekil 2.3.	Tesa tekniği.....	21
Şekil 2.4.	Tese tekniği.....	22
Şekil 2.5.	Mikro TESE tekniği.....	23
Şekil 2.6.	Mikro TESE yöntemiyle doku alınması. ....	23
Şekil 2.7.	Polarize ışık mikroskobu kullanılarak gözlenen Metafaz II oosit (400×büyütme): mayotik spindle (kısa ok ile gösterilen) ve zona pellusida tabakası (uzun oklar ile gösterilen). ....	24
Şekil 2.8.	Oositin, kümülüs ooforus kompleksi (COC's) ile geçit bağlantı .....	25
Şekil 2.9.	Oosit ve kümülüs ooforus kompleksi (200×büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi). ....	25
Şekil 2.10.	Denüstasyon yapılmış Metafaz II oosit. Perivitellin boşluk ve birinci polar cisimcik net bir şekilde görülmektedir (400×büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi). ....	26
Şekil 2.11.	Soldaki normal büyüklükte olan oosit, sağdaki iri (giant) oosit (200× büyütmeye) .....	26
Şekil 2.12.	İki mayotik spindle bulunduran iri (giant) bir oosit. (400×büyütme) .....	27
Şekil 2.13.	Çekirdek (nukleus) ve birinci polar cisimcik bulundurmeyen denüstasyon yapılmış bir metafaz I oosit (400×büyütme). (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi). ....	27
Şekil 2.14.	Denüstasyon yapılmış GV oosit (400×büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi). ....	28
Şekil 2.15.	Ovoid MII oosit (200×büyütme) .....	28
Şekil 2.16.	Granüllü bir metafaz II oosit (400× büyütmeye). Zona pellusida kalınlığı anormal derecede farklılık göstermektedir. (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi) .....	29
Şekil 2.17.	Sitoplazmasında büyük bir refraktil cisimcik barındıran bir oosit (400× büyütmeye) .....	29

Şekil 2.18.	Sitoplazmasında merkezinde granüler bölge (organelle clustering) bulunduran bir Metafaz II oosit .....	30
Şekil 2.19.	Sitoplazma merkezinde düz endoplazmik retikulum (SER) diski içeren, fragmente polar cisimciğe sahip Metafaz II oosit (400× büyütme).....	30
Şekil 2.20.	Bol vakuollü bir oosit (200×büyütme) .....	31
Şekil 2.21.	Normal büyüklüğünden 5-6 kat daha büyük bir polar cisimciğe sahip metafaz II oosit.....	31
Şekil 2.22.	Perivitellin aralıkta büyük bir birinci polar cisimciğe ve büyük fragmente parçacıklar içeren Metafaz II oosit.....	31
Şekil 2.23.	Normal fertilizasyon. (400× büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).....	32
Şekil 2.24.	Overler de gelişen foliküllerin ultrason görünümü (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi). .....	33
Şekil 2.25.	İntra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu işlemi (ICSI) (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).....	34
Şekil 2.26.	Normal olarak döllenmiş bir oositin time - lapse kayıt sisteminde görüntülenmesi. ....	35
Şekil 2.27.	İki polar cisimciği (PB) ve iki pronukleusu (PN) net bir şekilde görülen döllenmiş oosit; pronukleusun (PN) içinde nükleolar prekürsör cisimcik (NPBs) dizilimi (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).....	36
Şekil 2.28.	Erken insan embriyo gelişimindeki iki hücreli embriyo. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi). ....	36
Şekil 2.29.	Erken insan embriyo gelişimindeki dört hücreli embriyo. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi). ....	37
Şekil 2.30.	Erken insan embriyo gelişimindeki sekiz hücreli embriyo. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi). ....	37
Şekil 2.31.	Erken insan embriyo gelişimindeki kompaktlaşmaya başlamış olan embriyo. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).....	38
Şekil 2.32.	Erken insan embriyo gelişimindeki kavitasyonu başlayan embriyo. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).....	38

Şekil 2.33. Erken insan embriyo gelişimindeki blastokist aşamasına gelmiş embriyo. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).....	39
Şekil 2.34. Erken insan embriyo gelişimindeki hatchingi başlamış blastokist. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).....	39
Şekil 2.35. 3. Gün embriyo skorlaması.....	40
Şekil 2.36. Lazer yardımıyla assisted hatching işlemi (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi). ....	42





## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ABP</b>	: Androjen bağlayıcı peptid
<b>AH</b>	: Assisted hatching
<b>AMH</b>	: Anti Müllerian Hormon
<b>AO</b>	: Akridin Oranj
<b>CCs</b>	: Oositle bağlantı içinde olan kümülüs hücreleri
<b>CMA3</b>	: Chromomycin A3
<b>COC's</b>	: Kümülüs oosit kompleksi
<b>COMET</b>	: Cluster Of Motifs E-value Tool
<b>DBD-FISH</b>	: DNA breakage detection-fish
<b>DFI</b>	: DNA fragmantasyon indeksi
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik Asit
<b>dUTP</b>	: Deoksiuridin trifosfatın
<b>EM</b>	: Elektron mikroskop
<b>FSH</b>	: Folikül stimülan hormon
<b>GIFT</b>	: Tubal oosit ve sperm transferi
<b>GV</b>	: Germinal Vezikül
<b>Hcg</b>	: İnsan koryonik gonadotropini
<b>ICSI</b>	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
<b>IM</b>	: Işık mikroskobu
<b>IUI</b>	: İntrauterin inseminasyon
<b>IVF</b>	: İn vitro fertilizasyon
<b>LH</b>	: Lüteanize edici hormon
<b>M I</b>	: Metafaz I oosit
<b>M II</b>	: Metafaz II
<b>MESA</b>	: Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu
<b>mg</b>	: Miligram
<b>Mikro-TESE</b>	: Mikrodiseksiyon TESE
<b>MS</b>	: Mayotik ağ
<b>NOA</b>	: Non Obstrüktif (Tıkanıklığa bağlı olmayan tip) Azospermi
<b>NPBs</b>	: Nükleolar prekürsör cisimcik

<b>NT</b>	: İn Situ-Nick Translasyon
<b>OA</b>	: Obstrüktif (Tıkalı tip) Azospermi
<b>OS</b>	: Oksidatif stres
<b>PB</b>	: Polar cisimciği
<b>PESA</b>	: Perkütan Epididimal Sperm Aspirasyonu
<b>PN</b>	: Pronukleus
<b>RNA</b>	: Reoksiribo Nükleik Asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen artıkları
<b>SCD</b>	: Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi
<b>SCSA</b>	: Sperm Kromatin Strüktür Analizi
<b>SER</b>	: Düz endoplazmik retikulum
<b>TESA</b>	: Testiküler Sperm Aspirasyonu
<b>TESE</b>	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
<b>TET</b>	: Tubal embriyo transferidir
<b>TPMSS</b>	: Total Progresif Motil Sperm Sayısı
<b>TUNEL</b>	: TdT-mediated-dUTP nick end labeling
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>YÜT</b>	: Yardımcı üreme teknikleri
<b>ZIFT</b>	: Zigot intrafallopian transfer
<b>(ds)</b>	: DNA'da doğal DNA
<b>(ss)</b>	: DNA'da denatüre DNA
<b>8-OHdG</b>	: 8-hidroksideoksi guanozin

## 1. GİRİŞ

Yardımla üreme tekniklerinde tedavi başarısızlığına yol açan nedenlerden yaklaşık olarak %40'ını erkek infertilitesi oluşturmaktadır. Günümüzde temel sperm parametrelerinin değerlendirilmesi yetersiz kalmakta ve yeni parametrelerin değerlendirilmesi kaçınılmaz olmuştur. Bu güncel yaklaşımlardan biriside sperm DNA fragmantasyonu testidir. Bu testte spermatozoon hücrelerinin spermatogenez sırasında uğramış olduğu hasarın yüzdesel olarak belirlenmesi esasına dayanır. Erkek infertilitesinin sperm DNA hasarı nedeniyle olduğunu bildiren pek çok çalışma yapılmıştır<sup>(1-9)</sup>. Sperm DNA hasarına neden olan patofizyolojik mekanizmalar henüz tümüyle anlaşılmamıştır ve tedavi konusundaki araştırmalarda devam etmektedir.

Hücredeki apoptozisin klasik hücre ölüm uyarı yolağının kaspaz (caspase) aktivasyonu ve sonrasında fosfotidilserinin hücre dışına atılmasıyla bu hücrenin işaretlendiği ve fagositoza uğrandığı bilinir. Germ hücrelerinin sertoli hücrelerine bağlı iken bu klasik yolağa bağlı apoptozisten etkilendiği bilinmektedir. Farklı ve ilginç olan ise hasarlı olan testis dokusundaki sertoli hücrelerinden serbestleşmiş germ hücrelerinin bu klasik yolaktan bağımsız olarak (kaspaz aktivasyonu ve fosfotidilserin salınması) germ hücrelerinde DNA hasarı, fragmantasyonunun görülmesidir. Dolayısıyla spermatid ve spermatozoanın sertoli hücrelerinden ayrıldıktan sonra klasik, bilinen hücre ölümü (apoptozis) uyarı yollarından bağımsız olarak DNA hasarının başlamasıdır<sup>(10-11)</sup>. Pek çok çalışma ile sperm DNA hasarının ortamdaki oksidatif stres ile başladığı bildirilmiştir<sup>(10, 12-15)</sup>, ve bu hasarın spermatozoa ve spermatidlerin sertoli hücrelerinden besin desteğinden ayrılmış, kurtulmuş testis dokusu seviyesinde başladığı ve sertoli hücrelerinin sonrasında hasarın intratübüler ortamda aksesuar seks bezelerinde devam ettiği hipotezi bildirilmiştir<sup>(12)</sup>. Ejakülattaki sperm DNA hasarı yüksek olan vaka gruplarının bir kısmından, testisten elde edilen spermiler ile yardımcı üreme yöntemi uygulandığında ve bu grup ejakülattan kullanılan spermatozoalar ile yapılan yardımcı üreme yöntemlerinin sonuçları ile (fertilizasyon

oranı, embriyo kalitesi, gebelik ve implantasyon oranı) karşılaştırıldığında farklı olması gerektiği beklenebilir, tezimin hipotez konusudur.

Erkek infertilitesi konuşulduğunda spermdeki oksidatif stres seviyesinin sperm DNA hasarının ve apoptozun iç içe geçtiğini görüyoruz. Literatürde bu patojenik mekanizmaların spermatogenez ve yardımcı üreme tedavileri başarısının üzerindeki etkisini incelemek üzerine gelişmektedir. Yeryüzündeki tüm aerobik hücreler normal yaşam koşullarında normal seviyelerde reaktif oksijen artıkları (ROS) ile yaşamaktadır. ROS seviyelerinin yükselmesiyle oksidatif stres (OS) artmakta ve hücre hasarı görülmektedir. Oksidatif stresin yükselmesi semende ROS seviyelerinin yükselmesi infertil erkeklerin büyük kısmındaki patolojik nedendir. ROS yükselmesiyle kromatin çapraz bağlarında hasar olur, kromozom delesyonları görülür, DNA sıralarında kırılmalar ve nükleotit bazlarında oksidasyon görülür. ROS seviyeleri sitokrom c, kaspase 9, kaspase 3 üzerinden apoptozisi uyararak tek sıralı ve çift sıralı DNA dizilerinde tek sıralı ve çift sıralı hasarlara sebep olarak patolojiye sebep olur<sup>(16)</sup>.

Çoğu klinik ve laboratuvar değerlendirilmesinde konvansiyonel sperm parametreleri ve sperm kalitesinden bağımsız olarak artan OS, patojenik ROS seviyelerini belirleyici testlerden yararlanmaktadır. Apoptoz, sperm DNA hasarı, sperm DNA kromatin yapısının düşmesi erkek subfertilitesinin belirteci olabilir<sup>(16, 17)</sup>.

Normozoospermik bir erkekte açıklanamayan infertilite durumunda oksidatif stres ve semendeki ROS seviyesi infertiliteye neden olabilir. İdiopatik infertil çiftlerin erkeklerinde semendeki ROS seviyeleri daha yüksek görülmektedir ve sağlıklı fertil çiftlere göre antioksidan özellikleri düşük bulunmaktadır<sup>(18)</sup>.

Somatik hücrelerde görülen programlı hücre ölümü (apoptozis) ile sperm DNA hasarının (fragmentasyon) benzerliği pek çok çalışmada incelenmiştir<sup>(4, 15, 19, 20)</sup>.

Çalışmamızın amacı; yardımcı üreme tekniklerinde temel sperm parametrelerinin normal görülen çiftlerin sperm DNA hasarına bakılarak, yüksek olanlarında tedavi yönteminin bu bakış açısıyla değerlendirilerek tedavilerinin planlanmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Spermatogenezis

Erkeklerde germ hücreleri olan spermatozoalar, spermatogenez adı verilen özel bir işlem sonucu oluşurlar. Bu sırada spermatogonik kök hücreleri genom miktarında azalma ile morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere uğrar ve diploid hücrelerden haploid hücrelere farklılaşırlar. Spermatozoa sadece gövde olarak en küçük (sperm baş uzunluğu: 4-5 µm) ve en polarize (sperm başı önde, flagellum arkada) hücre olmakla kalmayıp kadın üreme sistemi gibi başka bir vücut dışı ortamda dahi işlev görebilen tek hücredir. Bu nedenle spermatozoaların görevi, genetik bilginin erkekten dişiye, yani oosite hücrelerine taşınmasını sağlayan ileri derecede özelleşmiş olan hücrelerdir. Sperm hücrelerinin bu görevi yerine getirebilmeleri için spermatozoanın morfolojik ve fizyolojik birtakım gelişim basamaklarından geçtikten sonra olgunlaşması gerekmektedir. Ayrıca uygun bir kromozomal ve genetik yapılanmayı kazanması önemlidir, yani kromozom ve DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) bütünlüğü içermelidir.

Spermatogenez devam ederken spermatozoalar ileride normal sperm fonksiyonu için gerekli epididimal olgunlaşma sürecine katılacak olan morfolojik ve fizyolojik birtakım süreçten geçerler. Bundan dolayı spermatogenez basamaklarının herhangi bir aşamasında meydana gelen bir problem, kusurlu ve işlev görmeyen erkek germ hücreleriyle meydana gelmesini sağlayacaktır. Bundan dolayı üreme fizyolojisini iyi anlayabilmek için spermatogenez ile morfolojik ve genetik olayların iyi şekilde bilinmesi büyük önem taşımaktadır.

Yapısal olarak anormal ve genetik olarak kusurlu spermatozoa arasındaki ilişki önemli bir bilinmeyen olarak ortaya çıkmaktadır. Germ hücre farklılaşmasından olgun spermatozoa oluşumuna kadar süren spermatogenezdeki uzun olaylar zinciri hem yapısal hem de genetik hasarlara açık bir yolculuk halinde devam etmektedir <sup>(21)</sup>.

Spermatogenez spermatogonyadan spermatozoa oluşumu sırasındaki proliferatif ve hücresel değişiklikleri sonucu oluşur ve 3 fazda incelenir:

**1. Spermatositogenez:** Tip A spermatogonya arka arkaya bölünmeye uğrayarak sayıca çoğalır ve Tip B spermatogonyayı oluşturur. En son oluşan spermatogonyanın bölünmesiyle primer spermatositler oluşur.

**2. Mayoz bölünme:** Spermatositler iki olgunlaşma bölünmesine uğrayarak kromozom sayısını yarıya indirir ve spermatid kümelerini meydana getirirler.

**3. Spermiyogenez:** Spermatidler belirgin hücresel değişikliklerine uğrayarak spermatozoaya farklılaşırlar <sup>(22)</sup>.

### 2.1.1. Spermatositogenez

Puberte safhasına gelinilmeden önce testisin içerisinde çok miktarda Sertoli hücresi bulunmaktadır <sup>(23)</sup>.

Sertoli hücresinin işlevleri şu şekilde anlatılabilir:

1. Büyümekte olan üreme hücrelerini fiziksel olarak ve beslenme bakımından destek sağlamak.
2. Spermiyogenezde atılan sitoplâzmanın fagositozunu yerine getirmek.
3. Komşu Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı bölgeleri oluşturarak kan-testis bariyerini kurmak.
4. Androjen bağlayıcı peptid (ABP) sentezi ve salınımını gerçekleştirmek. ABP, Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronu bağlar ve onu tübüllümenine taşıyarak epididimise yönlendirilmesini sağlamak.
5. AMH (Anti Müllarian Hormon)'nun embriyogenez sırasında sentezi ve salınımını gerçekleştirmek.
6. İnhibin sentezlemek ve salgılamak.
7. Spermlerin üreme kanallarındaki geçişini ve beslenmesini sağlayan früktozdan zengin salgı yapmak.
8. Testiküler transferrini sentezlemek ve salgılamak. Testiküler transferrin de proteindir ve üreme hücrelerine demir ulaştırdığına inanılmaktadır. Kandaki demir taşıyan protein, serum transferrini, Sertoli hücresinin bazalindeki özel reseptörlere bağlanır ve sitoplâzmaya alınır. Burada demir serum transferriniden testiküler transferrine taşınılır, bu da demiri

seminifer epitelin adluminal kompartımanındaki gelişen üreme hücrelerine gönderir<sup>(22)</sup>.

Spermatogeneze ait süreç, gonadotropin hormonlarının serbest bırakılması ile hipotalamus-hipofiz eksenini sayesinde kontrol edilir. Sertoli hücrelerinden, hipofizden salgılanan FSH (Folikül stimulan hormon)'a yanıt olarak androjen bağlayıcı proteinler (ABP) salgılanır<sup>(24)</sup>.

ABP testesteron ve dihidrotestesteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesinde olan bir salgısal proteindir. Androjen-ABP kompleksi, daha fonksiyonu günümüzde bilinmemektedir, epididimisin proksimal kısımlarına taşınır.

Hem ABP hemde androjen reseptörü androjenler için bağlanma afinitesine sahip olsalarda bunların farklı proteinler olduğunu bilinmesi gerekir.

Sertoli hücreleri, inhibin ve aktivin altünitelerini salgırlar. İnhibin ( $\alpha\alpha$  heterodimeri) ön hipofizden ve hipotalamustan salgılanan FSH ve gonotropin salgılatıcı faktör üzerine negatif feedback (geri etki) bir etki gösterir. Aktivin ( $\alpha\alpha$  veya  $\beta\beta$  homodimer) FSH salınımı üzerine pozitif feedback bir etki gösterir.

Sertoli hücreleri puberte gelişiminin sonrasında postmitotiktir. Erişkin testisinde mitotik hücre bölünmesi görülmez<sup>(25)</sup>.

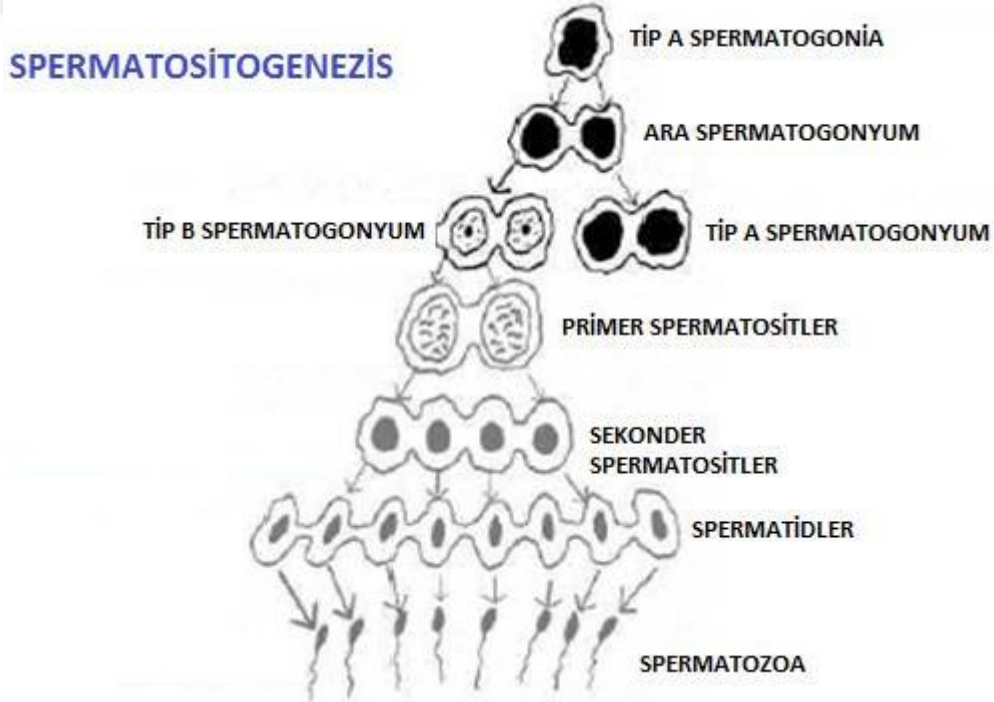
İnsan spermatogonium rutin histolojik preparatlar içinde çekirdeklerinin görünümüne göre üç tipe ayrılır.

**Koyu tip A spermatogonia;** yoğun bazofilik, ince granül kromatinli oval çekirdeği vardır. Bu spermatogonium seminifer epitelin kök hücreleri olduğu düşünülmektedir<sup>(26)</sup>. Bunlar rezerv hücrelerdir ve hücre siklusuna girmezler. Ancak mitoz yaparak koyu Tip A diğer jenerasyon hücreleri yaparlar ve sonuç olarak açık Tip A hücresi oluşur<sup>(22)</sup>.

**Açık Tip A spermatogonia;** ince granül kromatinli, soluk boyalı oval çekirdekleri barındırılır<sup>(26)</sup>. İki çekirdekçiği bulunur. Bu hücrelerin organelleri azdır ve testesteronla uyarılınca çoğalarak, mitozla yeni açık Tip A ve Tip B spermatogonyayı yapar.

**Tip B spermatogonia;** açık Tip A'ya benzer. Fakat daha yuvarlak ve merkezde yerleşen çekirdeği ve daha kaba heterokromatini ile birbirlerinden ayrılırlar.

Spermatogenezin ilk evresinde germinal epitelin bazal membranına komşu yerleşimli Tip A spermatogonyaya denenen ilkel spermatogonyaya 4 kez mitozla bölünerek 16 adet, daha farklılaşmış hücreler olan Tip B spermatogonyayı oluştururlar. Bu evrede spermatogonyaya Sertoli hücrelerine doğru ilerler. Sertoli hücreleri çok büyüktür ve membranları bazal ve yan yüzlerde birbirine sıkıca bağlantı yapmış olarak bulunurlar. Böylece bir bariyer meydana gelir. Ortalama 24 günlük bir süre sonra Sertoli hücre bariyerini geçen her spermatogonyum büyür ve primer spermatositi meydana getirir. Primer spermatositler daha büyük yuvarlak hücrelerdir (Şekil 2.1) <sup>(22)</sup>.



**Şekil 2.1. Spermatogenez de mitoz bölünme (Akkuş M).**

Tip A spermatogonyalar ara spermatogonyaya ve tip B spermatogonyumlara farklılaşır ki, bunlarda bölünerek spermatozoa oluşumuyla sonuçlanan farklılaşma yoluna giderler. Bu hücresel programlama olayı geri dönüşümsüz bir olay gibi gözükmektedir, çünkü bir kez farklılaşmaya girdiklerinde spermatogonyalar kök hücre oluşumuna neden olan yolağa tekrar girememektedir. Genetik olarak kusurlu



spermatogonyumlar tartışmasız önem taşımaktadır, çünkü kişinin hayatı boyunca spermatozoaların kökeni vazifesini görecek olan hücreler bunlardır.

Yüksek sayıda spermatogonya kök hücrelerin apoptoza uğraması sonucu 'kusurlu' kök hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlayan ileri düzenleyici mekanizmaların olduğunu düşündürmektedir. Bu dönemde somatik hücrelerde apoptoz mekanizmalarını açıklayan çalışmalar konusunda ciddi bir önem ve dinamizm bulunmaktadır. Araştırma gayretleri spesifik kök hücre gruplarının hangi mekanizmalarla hücre ölümü için hedef seçildiği konusunda derinleştirilmelidir. Özellikle testiste, (muhtemelen özgün monitörizasyon sistemleriyle) farklılaşan germ hücrelerinin hangi mekanizmalarla sürekli değerlendirildiğinin anlaşılması genetik olarak kusurlu germ hücre oluşumunun engellenmesinde büyük rol oynayacaktır <sup>(21)</sup>.

### **2.1.2. Mayoz Bölünme**

Tip B spermatogonyumların en son mitotik bölünmesinin ardından, ortaya çıkan yavru hücreler DNA sentezlerler (S fazı) ve 4C DNA içerikleri ile birinci mayoz bölünmeye başlatmasını sağlarlar.

Birinci mayoz bölünmenin profazı beş evreden oluşur. Bunlar sırasıyla; leptoten (iplik halinde), zigoten (eşleşmiş halde), pakiten (kalınlaşmış halde), diploten (çift gözükten halde) ve diyakinez (uzaklaşmaya devam eden) evreleridir <sup>(25)</sup>.

*Leptoten* evresinde homolog kromozomların boyları daha uzundur ve histolojik preparatlarda ayırım edilmesi zordur.

*Zigoten* evresinde homolog kromozomlar eşleşir, haploid sayıda sinaptik çift yaparlar ve bunlar rutin preparatlarda ayırt edilmesi kolaydır.

*Pakiten* evresinde kromozom çiftleri longitudinal olarak kasılır, kalınlaşır ve daha görünür hale gelir. Tetrat meydana gelir.

*Diploten* evresinde eşleşen kromozomların ilgili bölümleri karşılıklı değiş tokuş olurlar. Buna: 'krosing over' denir.

Birinci mayozun profazı oldukça uzundur, 22-24 güne kadar uzaması görülebilir. Bu nedenle epitelde profazın değişik safhalarındaki spermatositler görülebilir. Profazın sonunda çekirdek zarı ortadan kaybolur ve tetradlar metafaz ekvatoryal plağında sıralanırlar. Anafazda her homolog kromozom çiftinin üyesi ayrılır ve zıt kutba hareket eder. Böylece telofazda kromozom sayısı her yavru hücrede yarıya inmiş olur.

24 günün sonunda her primer spermatosit iki sekonder spermatositi oluşturmak üzere bölünme geçirir. Bu bölünme normal bir bölünme değildir. Buna birinci mayoz bölünmesi adı verilir. Bölünmenin başlangıcında 46 kromozamdaki tüm DNA replike olur. Bu olayda 46 kromozomun her biri iki kromatidlidir ve sentromerlerinden birbirine bağlantı içerir. Bu arada primer spermatosit 2 sekonder spermatosite bölünmüş durumdadır. Her kromozom çifti ayrılarak 23 kromozomdan oluşan iki grup meydana getirirler. Her bir kromozom hala 2 kromatidten oluşmaktadır ve böylece iki sekonder spermatosite giderler. Sekonder spermatositler interfazda çok kısa kalır, bu nedenle seminifer tübül kesitlerinde az görünürler. Sekonder spermatositin ömrü insanda yaklaşık olarak 6 saattir. İkinci mayozun profazı kısadır. 2-3 gün içerisinde ikinci mayoz bölünme oluşmaktadır. Metafazda kromozomlar sentromerlerinden bölünerek kromatidlerine ayrılır ve 23 kromozomdan 2 set meydana gelir. Anafazda bir set kardeş spermatide, diğer set diğer spermatide gider. Telefazda haploid sayıda kromozoma sahip 2 spermatid oluşur. Sonuçta her spermatid sadece 23 kromozom ve orijinal spermatogonyumdakinin yarısı kadar gen taşımaktadır <sup>(22)</sup>.

Mayoz bölünmeye, kromozom sayısı yarıya indiği için, redüksiyon bölünmesi ya da cins hücresinin olgunlaşmasını sağladığı içinde, olgunlaşma bölünmesi de denilmektedir <sup>(23)</sup>.

Mayoz bölünmenin üç önemli sonucu:

1. Sperm ve ovosit her bir homolog kromozom çiftinin sadece bir temsilcisini içerir.
2. Maternal ve paternal kromozomlar rastgele dağılırlar.
3. Crossing over genetik çeşitliliği artırır <sup>(25)</sup>.

Mayoz bölünmenin türlerin devamı için gerekli olmasından dolayı kromozomal DNA'nın eşleşmesi, kırılması ve tamiri için özelleşmiş bir dizi düzenleyici mekanizma ortaya çıkmıştır. Böylesi düzenleyici mekanizmaların varlığına rağmen mayotik bölünme sırasında translokasyonların ve anöploidinin sık şekilde gerçekleştiği bilinmesi gerken ayrı bir konudur.

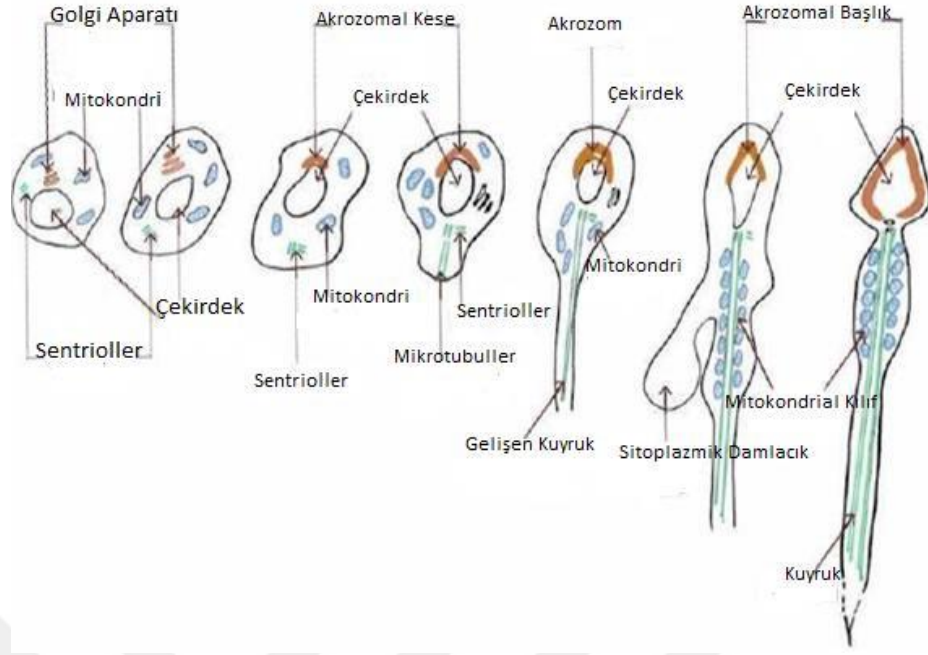
Bunun ötesinde büyük sayıdaki bir infertil erkek popülasyonunda germ hücre farklılaşması mayoz sırasında durmaktadır. Eşleşme ve kromozomal ayrılma anomalileri muhtemelen bu grup infertil hastalarda ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, mayoz için gerekli çok sayıdaki özgün moleküler aşama germ hücre oluşumunun durmasına neden olan genetik hasar ve yapısal defektlerin gelişmesine hedef oluşturmaktadır. Erkek ve kadında mayoz bölünme mekanizmalarıyla ilgili hızla artan bilgimiz erkek infertilitesinin sebeplerine yönelik önemli açılımlara olanak tanıyacaktır <sup>(21)</sup>.

### **2.1.3. Spermiyogenez**

Bu terim spermatidin spermatozoaya dönüştüğü mayoz sonrasındaki değişiklikler dizisini göstermektedir. Mayozdan sonraki birkaç haftada her spermatid kendisini çevreleyen Sertoli hücresi tarafından beslenir ve yeniden şekillendirilir. Böylece giderek spermatozoona dönüşür. Bu sırada sitoplazmasının bir kısmını kaybeder, çekirdek kromatini yeniden organize olur, kompakt bir baş meydana gelir ve kuyruk oluşur. Bu olayların çoğu IM (ışık mikroskobu) ile izlenebilir, ancak ince ayrıntıların çoğu EM (elektron mikroskop) ile tanımlanabilir. Spermiyogenezdeki olaylar şunlardır:

1. Çekirdek kondenzasyonu ve çekirdeğin hücrenin periferine ulaşması.
2. Modifiye bir lizozom olan akrozomun oluşması ve çekirdek yüzeyine tutunması.
3. Flagellum oluşumu, sentriyolden aksonem oluşması.
4. Artık cisimlerin atılması <sup>(22)</sup>.

Spermiyogenez, spermatogenezin son basamağıdır. Üç farklılaşma spermiyogenezi oluşturur (Şekil 2.2):



**Şekil 2.2. Spermiyogenez (Akkuş M).**

**1. Flagellumun (kamçı) gelişmesi:** Flagellum, distal sentriyodan oluşur. Keratin içeren dış yoğun lifler ve bir fibröz kılıf ile çevrili bir aksonem (eşmerkezli dizilimli, 9+2 mikrotübül çiftleri) bulundurur. Mitokondriyonlar kuyruğun proksimal bölümü (orta parça) çevresinde helikoidal/sarmalımsı bir kılıf içerirler.

**2. Akrozom gelişmesi:** Döllenme için gerekli olan hidrolitik enzimlerin bulundurulması ve devamlı olarak üretiminin yapıldığı akrozomal keseyi yapılarında bulundururlar. Akrozomun gelişmesi dört birbirini takip eden aşamaların sonunda oluşur:

- a) Golgi evresi,
- b) Kep/şapka evresi,
- c) Akrozomal evre,
- d) Olgunlaşma evresi.

**3. Nükleer yoğunlaşma:** Somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizin-zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nükleer yoğunlaşma gelişir.

Bu somatik histonların protaminlere dönüşümünden sonra, nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana

sıralanırlar. Spermiyogenezin olgunlaşma aşamasından sonra belirgin bir RNA sentezi yoktur <sup>(25)</sup>.

Yüksek derecedeki kromatin yoğunlaşması olgun spermi fiziksel ve kimyasal hasarlara karşı korur. Sperm oosit içine girince disülfid bağları kopar ve sperm kromatini dekondanse olur ve protaminler oositin histonlarıyla yer değiştirir. Kromatin kondenzasyonunu tamamlamamış spermatozoa çift iplikli DNA'dan çok tek iplikli DNA içerir veya kromozom anomalileri içerirler <sup>(22)</sup>. Dekondanse DNA'ya sahip spermde baş tamamen boyayı alarak lacivertimsi-siyah homojen renkte görüntü verir. İnflamasyon, apopitoz, sigara ve serbest oksijen türleri spermde kromatinin kondanse hale geçmesini engel olur. Kromatinde yeteri kadar kondansasyon gelişmez ise sperm DNA'sı da kırılmaya karşı hassaslaşır <sup>(27)</sup>. Sperm kromatini kalitesi fertilizasyonda, özellikle de oositi döllemesi için bir tek spermatozoonun seçildiği intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) olgularında kritik bir önem taşır <sup>(22)</sup>.

Spermiyumların Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine atılmaları olayına spermiyasyon adı verilir <sup>(23)</sup>.

Spermatozoonun salınması esnasında baş Sertoli hücresinden aktif olarak atılır ve flask şekilli artık sitoplazma parçası ayrılır, spermatozoon serbest hale gelir ve artık cisimcik Sertoli hücresine alınır. Spermiyasyondan sonra köprüler parçalanır ve artık cisimcikler Sertoli hücresi tarafından fagosite edilir ve lizozomal hidrolazlar ile sindirilir. Yeni salınan sperm seminifer tübülden ileri doğru Sertoli hücrelerinden salgılanan bir sıvı içerisinde ilerlemeye başlar. Bu ilerleme peritübüler myoid hücrelerin kasılmasıyla gerçekleşir. 5-6 m"lik epididimise geçtiğinde artık motil formda olmaktadır <sup>(22)</sup>.

Spermiyogenez sırasında meydana gelen yoğun değişiklikler dikkate alındığında spermiyogenez sırasında germ hücre blokajı olan durumların erkekte infertiliteye yol açması şaşırtıcı bir durum değildir. Orta kısım, aksonem, mitokondri veya kuyruk sentezi sırasında meydana gelebilecek kusurlar genellikle zayıf motiliteye sahip anormal spermatozoa gelişimine yol açacak, sperm çekirdeği veya baş kısmının yoğunlaşması için gerekli proteinlerin sentezinde oluşacak mutasyonlar anormal başlı spermlerin oluşmasını sağlayacaktır. Anormal görünümlü spermatozoonların

varlığının bilinmesine karşın morfolojik alterasyonlarla genetik aberasyonları eş tutmak için daha erken bir dönemdir. Daha öncesi kritik genlerde spermatozoon morfolojisini bozmayacak minör baz-çift yer değiştirmeleri genetik olarak kusurlu fakat görünüş olarak normal spermatozooların oluşmasına neden olacaktır <sup>(21)</sup>.

## 2.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Fertilite kelimesi, Latince: 'fertilis' kelimesinden türer ve bireyde üretken olma durumu için kullanılır. Erkek için sperm özelliklerinin yeterli, karşı cinsin hücrelerini dölleyebilecek kapasiteye sahip olduğunu bildirir. <sup>(28)</sup>.

İnfertilite durumu, çiftlerin bir yıl boyunca herhangi bir korunma yöntemi olmaksızın düzenli ilişki olmasına rağmen çocuk sahibi olamaması durumudur. Bu durum birçok nedene bağlıdır <sup>(29)</sup>.

Bir yıl içerisinde yaklaşık olarak %85 oranında çiftlerde gebelik elde edilir. Gebelik elde edilmeyen bu %15'lik kısım infertilite durumu ile karşı karşıya gelmiştir. İnfertilitenin erkekte kaynaklanan oranı %20 civarındadır. Her iki birey birlikte değerlendirildiğinde erkek faktörü yaklaşık %50 gibi bir orana yaklaşmaktadır.

Ergenliğe ulaşmış bir erkeğin sadece %6'sının çocuğu olmamaktadır. Bu kişilerin yaklaşık olarak %85-90'ında spermatogenez basamaklarının herhangi birinde oluşan hasara bağlı olduğu düşünülmektedir.

WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından 7000'den fazla çift üzerinde infertilite nedenine göre yapılan çalışmada %41 oranında kadın, %24 oranında erkek, %24 kadın ile erkek beraber ve %11'inde de herhangi bir sebep olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmaya bakacak olursak erkek kaynaklı neden %48 düzeyinde olacaktır <sup>(30)</sup>.

Birkaç defadır infertilitenin bir yıllık süre boyunca çiftlerin istemelerine rağmen çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmış olup bir yılın sonunda herhangi bir korunma yapmayıp bir yıl boyunca düzenli ilişki kurmalarına rağmen çocuk sahibi olamayanların incelenmesinin gerekli olduğu belirtilmiştir. Bu süreç, epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına göre ortaya konulmuş olup bir yılın sonunda çiftlerin yaklaşık %85'inde gebeliğin elde edildiği bildirilmiştir. Bu nedenle, bir yılın sonunda çiftlerin

yalnızca %15'i infertilite nedeniyle değerlendirilmesi için ihtiyaç duymaktadır. Bu kanıtın arkasında mantıklı bir neden olmasına rağmen infertil çiftlerin hikâyeleri ve son durumlarına göre yaklaşımlar değiştirilebilmektedir <sup>(21)</sup>.

Klinik araştırma yapılırken erkek detaylı olarak değerlendirilmelidir. Görüşülürken; anamnez, fizik muayene ve hastadan spermiogram testi istenilir. Hastanın önceden yapılan testleri tetkiklerine bakılır. İnfertilite süresi, cinsel yaşam öyküsü, çocukluk zamanında geçirilmiş hastalıkları, enfeksiyonlar, geçirilmiş ameliyatlar, üreme sisteminin toksinlere temasının varlığı veya yokluğu, sistemik hastalıklar, kullandığı herhangi bir ilaç varsa ve ailesi hakkında bilgiler toplanmalıdır. Erkek infertilitesi değerlendirilirken tıbbi ve üreme öyküsü, bir androlog ya da ürolog tarafından muayene edilmeli ve ik ay ara ile spermiogram testi istenerek değerlendirilmelidir. Sonuca göre infertilitenin nedeni göz öünde bulundurulur ve başka testlerde yaptırılabilir. Bu testleri; başka bir kez daha spermiogram, kan testleri, retrograd ejakülat için idrar analizi, ultrasonografi, semen ve spermin hasarını ölçebilen testler ve spermin genetik yapısını gösteren testler de istenebilir <sup>(31)</sup>.

İnfertilitede erkeğin değerlendirilmesi aşağıdaki amaçları içermelidir:

- Varsa, düzeltilebilir problemi ortaya çıkartmak,
- Düzeltilemeyecek problemin varlığında yardımcı üreme tekniklerinden yararlanıp yararlanamayacağını bildirmek,
- İnfertilite probleminin altında yatabilecek hayatı tehdit eden bir hastalığı varsa ortaya çıkarmak ve gerekli tedavileri uygulamak,
- Yardımcı üreme teknikleri kullanılacaksa, gelecek kuşaklara geçebilecek olası genetik anormallikleri saptamak.

Erkek düzeltilebilir bir problem saptandığında, hemen yardımcı üreme tekniklerine yönelmek yerine, öncelikle erkek faktörünün tedavi edilmesi gereken yaklaşım olmalıdır. Sonuçta bu yaklaşım, hem daha ekonomik hem de kadın eşi içermediğinden daha kolay bir yöntemdir <sup>(22)</sup>.

İnfertilitenin iki türü bulunmaktadır, bunlar primer ve sekonder infertilitedir. Primer infertilite, herhangi korunma yöntemlerinden hiçbiri kullanılmaksızın ilişki boyunca hiç gebelik oluşmamış olan durumdur. Sekonder infertilite ise, birliktelik

boyunca en az bir kez gebe kalınılmış ancak, bu durumdan bir yıl geçtikten sonra herhangi bir korunma yöntemi olmaksızın gebelik elde edilemediği durumları kapsar (29).

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar çok sayıda çevresel etkenin erkek üreme fonksiyonunu etkileyebileceğini ortaya koymakla beraber, insanlardaki farklılıklar bu etkenlerden ancak bir kısmının erkek üreme sistemini etkileyebileceğini ortaya koymaktadır.

Normal şartlar altında bütün erkeklerde semen miktarı ve niteliği büyük ölçüde farklılık gösterir. Buna ek olarak aynı kişiden farklı zamanlarda alınan örneklerde dahi birbirinden farklı olarak sperm sayısı, hareketlilik gibi parametrelerin değişkenlik gösterebileceği bilinmektedir.

Hastalık, kişisel alışkanlıklar, mevsim değişiklikleri ve diyet semenin özelliklerini değiştirebilir. Sperm nitelikleri viral veya bakteriyel enfeksiyonlardan etkilenebilir. Aşırı alkol tüketimi gibi birtakım alışkanlıklarda ve skrotumdaki ısı artışına bağlantılı olan ateşli hastalıklar sperm üretimini etkiler.

Mevsim değişikliklerinin sperm veriminde etkili olduğu bilinmektedir. Sperm sayısı, örnekler alınmadan önceki gün ve haftalarda ejakülasyon sıklığına göre değişir.

Semen örneklerini inceleme, hatalı olanlarını bir araya getirme ve sperm türünü hemen analiz etmekteki başarısızlık, semen analizlerinin sonuçlarında büyük değişikliklere neden olur (32).

Erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden biri de sperm DNA yapısındaki birtakım hataları oluşmasıdır. Kötü kalitedeki spermatozoa DNA'sı fertilizasyonun bozulmasına neden olur. İn vitro fertilizasyon (IVF) yapılan hastalarda hasarlı genetik yapıya sahip spermatozoada fertilizasyon oranları azalmaktadır. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda (ICSI) ise hasarlı DNA'dan fertilizasyon oluşmuşsa embriyoların genetik yapısında bozulma olacaktır. Bunun sonucunda, ejakülatta hasarlı DNA'ya sahip spermatozoa oranının bilinmesi fertilizasyon başarısında ve sağlıklı embriyonunun elde edilebilmesi için büyük önem taşır (27).



### 2.3. Sperm DNA Hasarı

Bilgi taşıyıcısı olarak görev yapan DNA, RNA'ya göre daha önemli ve geniş ölçüde dikkati çekmektedir. Organizmalarda ve fajların çoğunda DNA karakteristik bir molekül bulundurulur. Kalıtımda aktif olarak rol alan DNA her zaman çekirdeğin içinde ve bazen de hücrenin diğer bölümlerinde bulunmakta olup, gelişmiş canlılarda kalıtsal materyalin temelini meydana getirir <sup>(33)</sup>.

#### 2.3.1. Spermatozoon DNA'sı

Somatik hücrede DNA her döngüsünde 6 adet nükleosom içeren bobin spiralleri (selonit) halinde kısıtlanmış olup 60.000 baz çifti aralığında nükleer matrikse yapışık halde bulunur. Aktif genler nükleer matriks ile ilgili olmaya meyillidir. Spermatozoon nükleusunda protaminler DNA'ya bağlıdır, onun negatif yükünü nötralize eder ve sıkı halkalar şeklinde bulunurlar. Memelilerde sperm nükleusu nükleer halka denilen tek tip bir yapı içerir. Spermatozoon çekirdeğinin DNA'sı bu halkaya demirlenmiş bir durumda bulunur. DNA spermatogenezis sırasında spermatozoona özel protaminler ile nükleer histonların bir araya gelmesiyle sıkı bir yapı haline gelir. Sıkılaşmış DNA, protaminler üzerinde bulunan sülfidril gruplarının oksidasyonu ile şekillenen disülfid bağları sayesinde bir arada tutulan kangallaşmış, ortası delikli çörek benzeri olan kromatin, bir spiral halindedir. Bu spiraller normal somatik hücrenin tipik bobin benzeri spiral DNA'sından çok daha dar bir yapı içerirler <sup>(33)</sup>.

#### 2.3.2. Spermatozoon DNA'sındaki Hasar ve Önemi

Çeşitli iç ve dış nedenlerden dolayı DNA'da farklı düzeyde hasarların oluştuğu bilinmektedir. Spermatozoon DNA'sı hasarına insan ve fare, at, domuz, balık gibi pek çok hayvan türünde rastlanmaktadır. DNA'da oluşan bu hasarların başlıcaları; kromatin yapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonunun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi, kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA- protein çaprazlaşmaları, DNA da mutasyonlar gibi çeşitli yapısal bozulmalardır <sup>(33)</sup>.

Aynı zamanda bir hipoteze göre spermiyogenezin kritik aşamasındaki defektif kromatin paketlemesinin insan spermatozoasında DNA hasarı olarak görülebilir. Kromatin yapısındaki defektler ya da topoisomeraaz sisteminin kendi aktivitesi yüksek düzeylerde DNA fragmantasyonu gösteren gametlerin oluşmasına yol açabilir.

Gerçekten bu hipotezi destekleyen diğer bir gözlemden, kromatin paketleme hataları çoğunlukla germ çizgisindeki DNA hasarı ile ilişkilidir. Diğer bir hipoteze göre, defektif sperm fonksiyonu ve erkekteki DNA hasarı her ikisi birlikte yüksek düzeyde oksidatif strese bağlı olarak meydana gelir. Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) yoğun bir biçimde üretimi ya da maruz kalınması istatistiksel olarak bağımsız çalışmalarda sperm fonksiyonlarında defekt ya da DNA hasarı yaptığı bildirilmiştir<sup>(21)</sup>.

Spermdeki DNA hasarı doğal konsepsiyon sonrası ve farklı yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) kullanımı fertilizasyonun ve gebeliğin belirleyicisidir. Bu yardımcı üreme teknikleri için oldukça önemli bir anlamı vardır çünkü ne kadar invaziv bir teknik kullanılırsa oosite transfer edilen ve oositi invitro fertilize eden erkek genomunun genetik hasarlanma ihtimali de o kadar fazla olacaktır.

Semen kalitesi düşük olan hastalarda DNA kırık oranı anlamlı olarak yüksektir ve DNA hasarı ICSI için enjekte edilecek spermatozoa seçiminde belirlenemez, ICSI'de defektif spermatozoa kullanım ihtimali yüksek olur, bu da hasarlı DNA'nın oosit ile işlem yapılma oranını arttırmaktadır<sup>(21,34)</sup>.

Yine sigara içen baba adaylarının spermatozoonlarındaki DNA hasarına bağlı olarak çocuklarında doğumsal anomaliler, kusurlar ve çocukluk çağında kansere yakalanma oranı artmaktadır<sup>(21)</sup>.

Sperm DNA fragmantasyonunun derecesi gametin genetik materyalinin bütünlüğünü yansıtır. Sperm DNA hasarını belirlemek için en sıklıkla kullanılan teknikler TUNEL, Comet ve sperm kromatin yapısı (SCSA) testleridir<sup>(35)</sup>.

## **2.4. Spermatozoon DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri**

### **2.4.1. Asidik Anilin Mavisi Boyaması**

Lizinden zengin histonlarla, arjinin/sistein zengini protaminlerin ayırt edilebilmesi için kullanılan bir karışımdır. Olgun olmayan spermatozoonun bol miktarda lizin içeren histon barındıran nükleusu işlem bitiminde mavi renge dönecektir. Olgun spermatozoonun arjinin-sistein zengini protaminli nükleusu az miktarda lizin ihtiva ettiği için anilin mavisiyle renk almayacaktır <sup>(36)</sup>.

### **2.4.2. Toluidine Mavisi Boyaması**

Kromatinin metakromatik olarak renklenmesi için uygulanır. Çok büyük miktardaki hasarlı yoğun kromatinde yumak olmuş halde bulunur. Bu karışımda DNA paketlenmesine karşı hassasiyet gösterir. Az miktarda spermatozoon bütünlüğünü ve büyük orandaki DNA hasarını belirler <sup>(10)</sup>. Erenpreiss 2004'te yaptığı araştırmada bu karışımın spermatozoon DNA fragmentasyonu ya da anormal kromatin yapısının belirlenmesinde farklı yöntemlerle kabul edilebilir sonuçlar verdiğini göstermiştir <sup>(37)</sup>.

### **2.4.3. Chromomycin A3 (CMA3) Yöntemi**

Spermatozoonda az miktarda paketlenen kromatinde, farklı yollarla protaminden eksik DNA'nın boyanmasında kullanılan guanin-sitozin özel bir karışımdır. CMA3 ve protaminler DNA'da aynı bölgeye bağlanır. Bundan dolayı şiddetli CMA3 floresanı, spermatozoonun az miktardaki protaminasyonunun göstericisidir. CMA3 metodu, spermatozoon kromatin değerlendirilmesinde farklı yöntemlerle büyük oranda benzer sonuçlar vermektedir <sup>(38)</sup>.

### **2.4.4. DBD-FISH (DNA breakage detection-fish) Yöntemi**

Floresan in situ hibridizasyon çok sayıda mikrolezyon gibi kromozom anomalilerini bulabilmek için uygulanan bir yöntemdir. Hücreler bir agaroz matriksle bir slayta maruz kaldığında bir alkali çözücü (denatüre) karışımla parçalanır. ssDNA motifleri DNA zincir kırıklarına farklılaşır. Nötralize edildikten sonra protein

uzaklaştırılır, ssDNA, bütün genom ya da spesifik DNA problemleriyle melezlendirilerek floresan ışık altında frekanslarına göre değerlendirilir. Pahalı, zor uygulanır olması ve klinik açıdan çok anlamlı sonuçlar vermediği için çok kullanılan bir yöntem değildir (36, 39).

#### **2.4.5. In Situ-Nick Translasyon (NT)Yöntemi**

NT yöntemi biyotinlenen deoksiuridin trifosfatın (dUTP) ssDNA kırıklarında kalıp bağımlı DNA polimeraz I enzimi tarafından katalizlendiği tepkimede kaynaşması prensibi ile çalışmaktadır. Özel olarak endojen DNA hasarını belirler ve değişken seviyelerini barındıran spermatozoonu boyar. NT yöntemi spermatozoonunda, nükleer DNA'nın yeniden şekillenmesi aşamasında ortaya çıkan anomalileri saptar (36).

#### **2.4.6. Akridin Oranj (AO) Boyaması**

Spermatozoon nükleer DNA'sının asit eklenmesiyle denatürasyon duyarlılığına in situ (yerinde) olarak belirlenmesi esasına dayanır. Metakromatik AO karışımı çift zincir (ds) DNA'da (doğal DNA, yeşil) monomer olarak bulunurken, tek zincir (ss) DNA'da (denatüre DNA, kırmızı) agregat şekilde bağ yapar. ssDNA değerlendirmesinde uygulanan farklı metodlara uygun sonuçlar vermektedir. Bu yöntemde eğer floresan mikroskopundan yararlanılırsa araştırmacının özellikleri netice açısından farklı sonuçlar veriebilir (40-42).

#### **2.4.7. Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD)- HALOSPERM®**

Sperm Kromatin Dağılım Yöntemi (SCD)- HALOSPERM® yönteminde analizin yapılması esası; spermatozoonun, parçalayıcı çözültiden önce asit karışımına maruz kaldığında fragmante olmayan DNA'lı spermatozoonunda nükleer protein bertaraf edildikten sonra DNA dağılım haloları (fragmante DNA'lı spermatozoonunda bu halolar ya hiç yoktur ya da minimaldir) meydana gelir. Hasara uğramış spermatozoonunda bu halo oluşmayabilir veya çok az miktarda gözükülebilir. DNA kırıklarının görülmesi nükleoitteki halonun büyümesiyle artar. Floresan lamba kullanımı olmadan görülebilir olması kullanım avantajı açısından çok tercih edilmektedir. Yöntemin kolay uygulanır olması, az bir zamanda sonuç vermesi ve

SCSA (sperm kromatin strüktür analizi) ile karşılaştırılabilir olması kullanım açısından en büyük avantajlarındanır <sup>(39, 42-47)</sup>.

#### **2.4.8. COMET (Cluster Of Motifs E-value Tool) yöntemi**

Bu metod DNA hasarı analizinde tek hücre jel elektroforezi kullanımı gerektirir. Hasara uğramış hücrede dsDNA zincir göçü şeklinde tespit edilir. DNA kırıkları COMET'in baş kısmında yoğun halde bulunurken, çift ve tek DNA zincirindeki kırıklar COMET'in kuyruğuna doğru yönelir. Spermatozoon DNA fragmentasyonunun tespiti alkali ortamda, nötral ortama göre hem tek hem de çift zincir kırıklarını gösterebildiği için kullanımı daha avantajlı bir metoddur. Floresan mikroskobundan yararlanır. Sonuçların iyi ve düzgün bir şekilde verilebilmesi için yetişmiş insanlara ihtiyaç duyulmaktadır <sup>(36,48)</sup>.

#### **2.4.9. TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick end labeling) Yöntemi**

Kalıp bağımsız TdT (Terminal Deoksinukleotidil Transferaz) enziminin katalizlediği tepkimede tek ve çift zincirli DNA'da dUTP'nin (deoksiuridin trifosfatın) katılımı prensibi ile çalışır. Bu enzim biyotinlenen dUTP'nin DNA kırığının olduğu kısımlarda DNA 3'-OH'da sinyal verir. Normal DNA'lı spermatozoonda yalnızca arkadaki bölüm floresan ışıktaki görülür, fragmente DNA (çoklu kromatin 3'-OH uçları) açık floresan ışıktaki görülür. Sonuçlar daha güvenilir olmasına karşın, zor uygulanması ve pahalı olması dezavantajdır. Floresan TUNEL güvenilir metodlara bakıldığında yakın sonuçlar vermektedir <sup>(42,49-52)</sup>.

#### **2.4.10. SCSA (Sperm Kromatin Strüktür Analizi)**

Anormal kromatinli spermatozoon in situ kısmi DNA denatürasyonuna karşı çok duyarlıdır. Isı ya da asite maruz kaldığında DNA denatürasyonu metakromatik olarak farklılaşan akrinin oranj boyaması ile flow sitometrik saptanması prensibi ile çalışır. SCSA asit yönteminden yararlanması pratiktir. SCSA'da saptanan DNA hasarı DFI (DNA fragmentasyon indeksi) oranlarına göre yorumlanır. DFI alt limiti infertillerdebüyük oranda %30'dur. Flow sitometrik bir teknik olduğu için hem pahalı

hem de gözlemcinin tecrübesi gerekli olduğundan pek tercih edilmeyen bir yöntemdir (42, 43, 53-55).

#### **2.4.11. Yüksek Performanslı Likit Kromotografi Yöntemi**

Spermatozoonda oksidatif DNA hasarı yan ürünü olarak ortaya çıkan 8-OHdG (8-hidroksideoksi guanozin) miktarının ölçülmesi prensibi ile çalışır. Bu en çok kullanılan ilerlemiş oksidatif DNA hasarı biyo işaretleyicisidir. Çeşitli oksidatif DNA eklentileri arasında 8-OHdG, oksidatif DNA hasarınının saptanmasındaki hassasiyeti, mutajenik potansiyeli ve DNA'da bulunan karmaşık durumun rölatif fazlalığıyla yaygın olarak kullanılır <sup>(36)</sup>.

### **2.5. Testiküler Sperm Elde Etme Yöntemleri**

#### **2.5.1. PESA (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration) - Perkütan Epididimal Sperm Aspirasyonu**

Epididim içine ince bir iğne ile girilerek sperm elde edilmesi yöntemidir. Obstrüktif (Tıkalı tip) Azospermide uygulanır.

#### **2.5.2. MESA (Micro Epididymal Sperm Aspiration) - Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu**

Epididime cerrahi olarak girişimsel olarak yapılan işlemler sonucu doku alınabilmesi ve sperm elde edilmesi yöntemidir.

#### **2.5.3. TESA (Testicular Sperm Aspiration) - Testiküler Sperm Aspirasyonu:**

Genellikle spermatazoa üretimi olan fakat herhangi bir nedenle spermi dışarı yani ejakülat ile dışarı çıkamayan kişilerde kullanılan sperm elde etme yöntemidir (Şekil 2.3). Tıkanıklığa bağlı olan azospermili erkeklerde sperm bulunma oranı yüksektir. Aspirasyonun yapılacağı yerler belirlendikten sonra, dokular alınır <sup>(56)</sup>.



**Şekil 2.3. Tesa tekniği.**

#### **2.5.4. TESE (Testicular Sperm Extraction) - Testiküler Sperm Ekstraksiyonu**

Bu üç yöntemle sperm bulunamayan vakalarda TESE yöntemi uygulanır. Testisten doku örnekleri alınarak sperm elde edilmesi yöntemidir (Şekil 2.4). Genel ya da bölgesel uyuşturma yapılarak cerrahi olarak testise ulaşılır ve buradan dokular alınarak embriyologlara gönderilir. Embriyologlar örneği inceler, eğer sperm hücresi bulunursa üroloji uzmanına haber verilir ve ameliyat sonlandırılır. Çok şiddetli spermatogenez bozukluğu olan, testiküler yetmezlikli olgularda, NOA'li vakalarda da bu yöntemle sperm hücreleri bulunabilmektedir. Azoospermili bireylerde ise %50 - 60'ında, fokal spermatogenez görülebilmektedir. Bu tip olgularda sperm hücresi bulabilme şansı %50-60 tır <sup>(57)</sup>. Tıkanıklığa bağlı olan azospermide ise sperm hücrei bulabilme şansı %100'dür <sup>(58)</sup>.

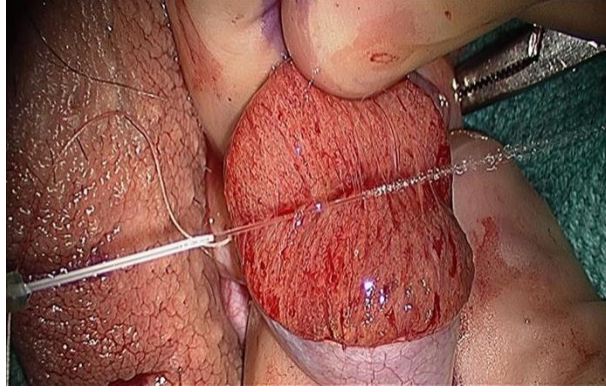


**Şekil 2.4. Tese tekniği.**

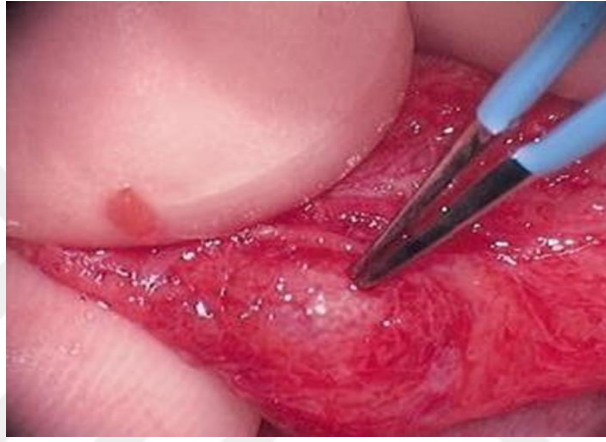
#### **2.5.5. Mikro - TESE (Microdissection TESE)**

Schlegel ve arkadaşları, bu yöntemi yaklaşık 20 yıl önce uygulamışlardır. Ameliyat mikroskobu ile 1-5 mg ağırlığındaki testis dokusu çıkarılır <sup>(59)</sup>. (Şekil 2.5), (Şekil 2.6). Bu yöntemin diğer konvansiyonel yöntem olan TESE ameliyatına göre bir takım avantajları bulunmaktadır. Bu yöntemle daha az doku alınmaktadır. Bu da hastanın ameliyat sonrası daha az problemle karşılaşmasına neden olacaktır. Olumsuz yönü ise, ameliyat mikroskobunun gerekli olması ve bu girişimin süresinin uzun olmasıdır. Bu süre içerisinde testise fazla zarar vermeden ve çok sayıda sperm elde edebilmek amaçlanmıştır. Bu yöntem ile sperm hücresi elde edilebilme şansı artmış ve testis daha az zarara maruz kaldığı için daha sonra bu ameliyat tekrar yapılabilmektedir. Mikro - TESE yöntemi ile tıkanıklığa bağlı olmayan vakalarda sperm hücresi bulma oranı yaklaşık %60 civarındadır. Kanallarında tıkanıklık olan bir hastada sperm bulma şansı, hormonal veya genetik problemi olan hastalara göre daha yüksektir <sup>(60)</sup>. TESE endikasyonu olan her hastaya yan etkilerinin düşük ve başarısının yüksek olması nedenleri ile Mikro-TESE yapılması daha uygundur.





**Şekil 2.5. Mikro TESE tekniği.**



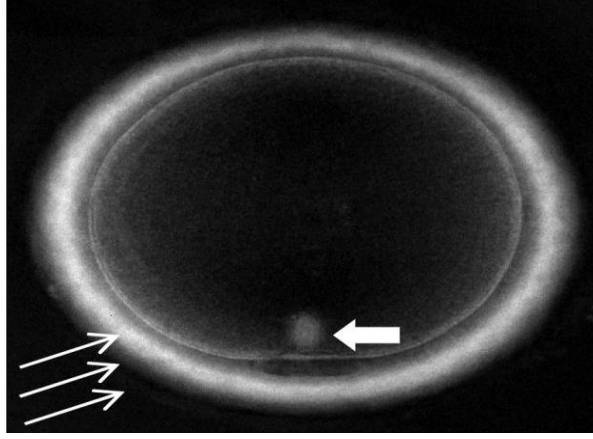
**Şekil 2.6. Mikro TESE yöntemiyle doku alınması.**

## **2.6. Oosit Matürasyonu ve Fertilizasyon**

### **2.6.1. Oosit Matürasyonu, Morfolojik Analiz**

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu yapabilmek için, oositi çevreleyen kümülüs-korona hücrelerini hücrenin etrafından koparmak; nükleer maturasyon durumunu ve sitoplazma morfolojisi ve sitoplazma dışı yapıları gözlemlemek için kolaylık sağlamaktadır. Birinci kutup cismi (polar body) varlığı oositin çekirdek maturasyonunun bir göstergesi olarak kabul edilir. Buna rağmen, son yapılan çalışmalarda polarize ışık mikroskobu yardımıyla oosit kutup cisimciğine sahip olsa dahi immatür durumda olabilir <sup>(61)</sup>.

Sadece mayotik ağ (MS) varlığı gözlenen yumurtalar metafaz II aşamasında yumurta olarak kabul edilir. MS' nin pozisyonu ve durumu yumurtanın gelişiminin tamamlanması ile ilişkilendirilmiştir.

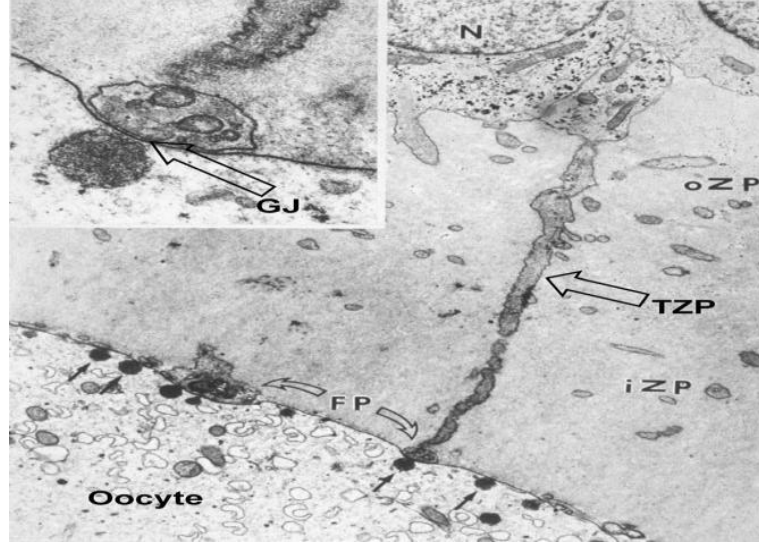


**Şekil 2.7. Polarize ışık mikroskobu kullanılarak gözlenen Metafaz II oosit (400×büyütme): mayotik spindle (kısa ok ile gösterilen) ve zona pellusida tabakası (uzun oklar ile gösterilen) <sup>(62)</sup>.**

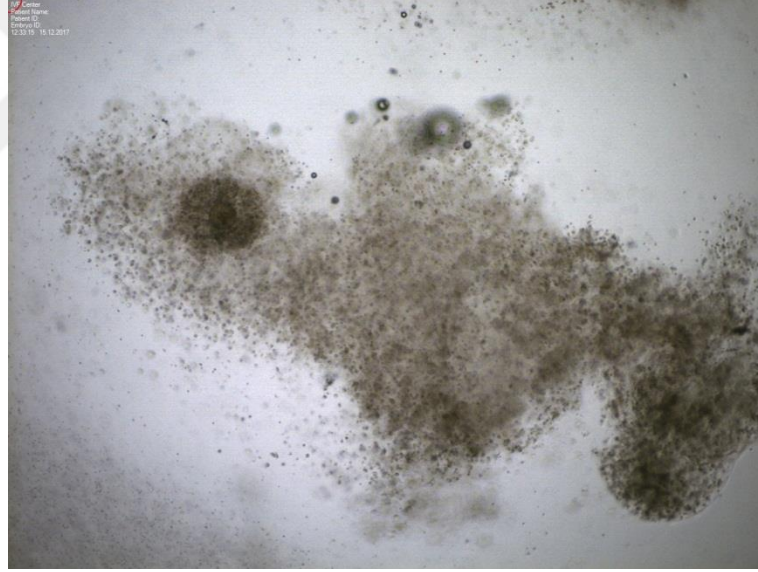
Son zamanlarda yapılan analizlerde, MII oosit ile mayotik ağ (spindle) blastokist aşamasına kadar döllenme ve embriyo kalitesi arasında ilişki kurulmasına rağmen implantasyon oranı ve gebelik için herhangi bir ilişki kurulamamıştır <sup>(63)</sup>.

Nükleus maturasyonu tek başına, yumurta kalitesini belirlemek için belirleyici değildir. Nükleus ve sitoplazmik maturasyon, fertilizasyon için gereken tüm koşulları sağlamak üzere koordineli bir şekilde birbirini tamamlaması gerekmektedir. En ideal olgun insan yumurtası, morfolojik açıdan normal görünümlü, tek polar cisimciği olan, uygun kalınlıkta zona pellusida ve uygun perivitellin aralığı içeren hücrelerdir <sup>(64)</sup>.

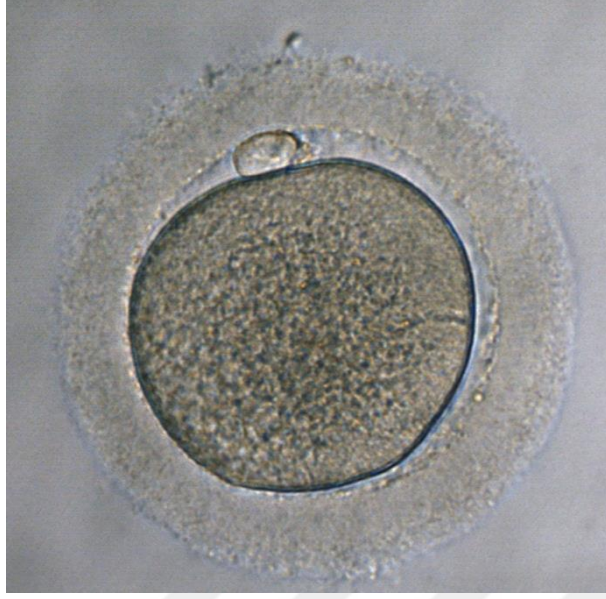
Foliküler antrum oluşumunda, granüloza hücreleri mural granüloza hücrelerine farklılaşarak foliküler duvar yapısını ve korona hücreleri adını alarak oositin etrafını sarmıştır. Kümüls kütlesinin içerisinde, oositle bağlantı içinde olan kümülüs hücreleri (CCs) zona pellusida boyunca uzanarak oosit sitoplazması ile geçit bağlantısı olarak bulunmaktadır. (Şekil 2.8) Bu yapı kümülüs oosit kompleksi (COC's) olarak adlandırılır <sup>(65)</sup>. (Şekil 2.9)



Şekil 2.8. Oositin, kümülüs ooforus kompleksi (COC's) ile geçit bağlantı <sup>(66)</sup>.

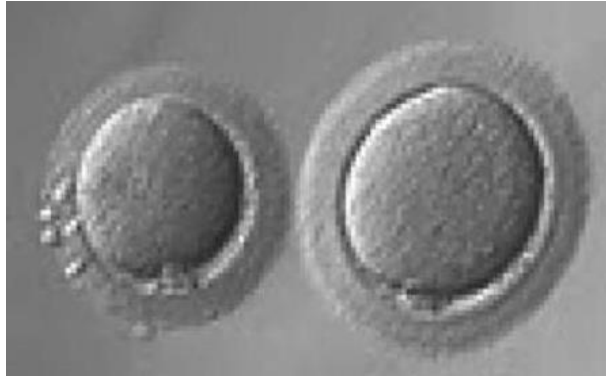


Şekil 2.9. Oosit ve kümülüs ooforus kompleksi (200×büyütme)  
(Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).

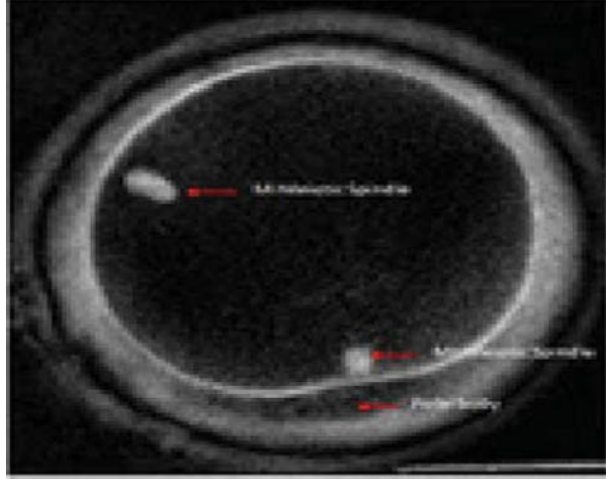


**Şekil 2.10. Denüstasyon yapılmış Metafaz II oosit. Perivitellin boşluk ve birinci polar cisimcik net bir şekilde görülmektedir (400×büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**

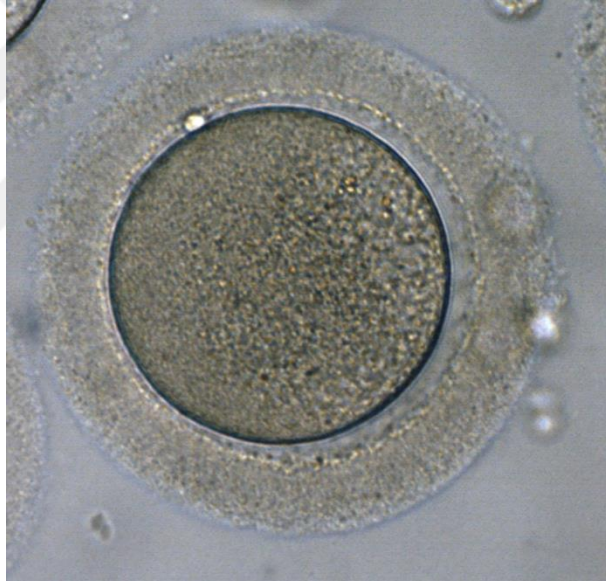
Morfoloji, döllenme ve gelişim açısından yorum yapmak için yeterli değildir<sup>(62)</sup>. Oosit morfolojisi genetik anomalileri düşündürülebilir. Bu duruma ilave olarak, bir kromozom dizisi daha içeren iri (giant) oosit içinde geçerlidir. Bu oositler, polarize ışık mikroskopunda incelendiğinde iki ayrı mayotik ağ (MS) içermektedirler. Bu hücrelerin kullanımı IVF veya ICSI yöntemi için tehlikelidir.



**Şekil 2.11. Soldaki normal büyüklükte olan oosit, sağdaki iri (giant) oosit (200× büyütmeye) (67).**



**Şekil 2.12. İki mayotik spindile bulunduran iri (giant) bir oosit. (400×büyütme) <sup>(67)</sup>.**



**Şekil 2.13. Çekirdek (nukleus) ve birinci polar cisimcik bulundurmayan denüstasyon yapılmış bir metafaz I oosit (400×büyütme)<sup>(68)</sup>. (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**



**Şekil 2.14. Denüstasyon yapılmış GV oosit (400×büyütme)  
(Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**

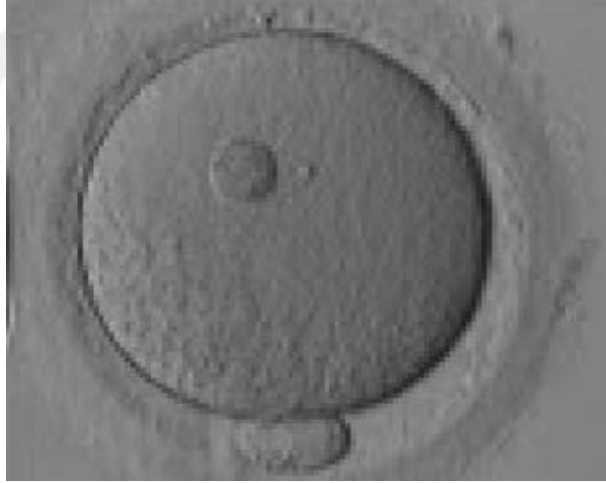
Laboratuvar bulgularına göre; MI ve GV oositler IVF ve ICSI yapılabilmesi için uygun oositler değildir. Ancak gerekli koşullarda gerekli zaman diliminde CO<sub>2</sub>' li inkübatörlerde tutulduklarında mayoz bölünme aşamalarını tamamlayıp MII dediğimiz olgun oosit haline gelebilirler.



**Şekil 2.15. Ovoid MII oosit (200×büyütme) <sup>(69)</sup>.**



**Şekil 2.16. Granüllü bir metafaz II oosit (400× büyütme). Zona pellusida kalınlığı anormal derecede farklılık göstermektedir <sup>(70)</sup>.  
(Bakü Medical Plaza IVF Merkezi)**



**Şekil 2.17. Sitoplazmasında büyük bir refraktil cisimcik barındıran bir oosit (400× büyütme) <sup>(70)</sup>.**



**Şekil 2.18. Sitoplazmasında merkezinde granüler bölge (organelle clustering) bulunduran bir Metafaz II oosit <sup>(71)</sup>.**



**Şekil 2.19. Sitoplazma merkezinde düz endoplazmik retikulum (SER) diski içeren, fragmente polar cisimciğe sahip Metafaz II oosit (400× büyütme) <sup>(72)</sup>.**

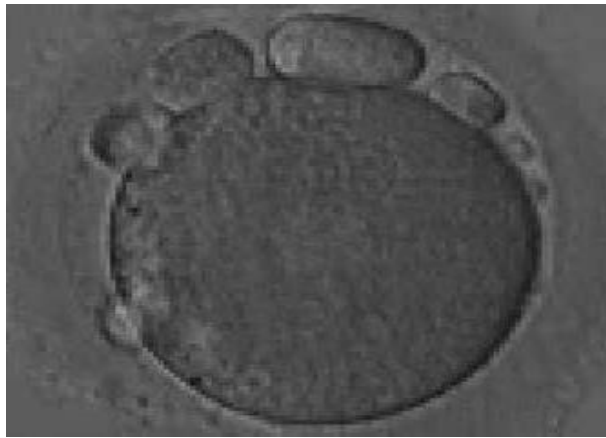




**Şekil 2.20. Bol vakuollü bir oosit (200×büyütme) <sup>(71)</sup>.**



**Şekil 2.21. Normal büyüklüğünden 5-6 kat daha büyük bir polar cisimciğe sahip metafaz II oosit <sup>(73)</sup>.**



**Şekil 2.22. Perivitellin aralıkta büyük bir birinci polar cisimciğe ve büyük fragmente parçacıklar içeren Metafaz II oosit <sup>(74)</sup>.**

### 2.6.2. Normal fertilizasyon

Ovülasyonu takiben yumurta fallop tüplerinden birine taşınır. Fertilizasyon, tuba uterinanın ampulla bölgesinde olduğu için spermier vajina ve servikal mukus ile birlikte servikal kanaldan geçerek uterusu son olarak spermin oosit ile birleşeceği fallop tüplerine doğru yüzebilmelidir.

Fertilize olmuş matür oosit, bölünerek (cleavage) fallop tüplerinden gelişimine devam edeceği uterusu doğru gidebilmesi gerekmektedir.



Şekil 2.23. Normal fertilizasyon <sup>(75)</sup>. (400× büyütme)  
(Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).

### 2.6.3. OPU (yumurta toplama işlemi)

ICSI (intrasisitoplazmik sperm enjeksiyon) genellikle kötü sperm kalitesi ve daha önce IVF (in-vitro fertilizasyon) başarısızlığı olan hastalar için yapılmaktadır.

Oosit toplama işlemi (OPU), genellikle hCG enjeksiyonundan 34-36 sonra uygulanmaktadır.

Oosit toplama işlemi, tek kullanımlık ovum aspirasyon iğnesi ile vajinal ultrason altında gelişen foliküllerin, ısıtılmış 15 ml falkon tüp içerisine aspire

edilmesiyle gerçekleşir. Prosedür, lokal anestezi, intravenöz sedasyon ve hafif genel anestezi verilerek yapılabilir.

IVF siklusun da zamanlama oldukça önemlidir. Vajinal ultrasonografi bakılarak foliküllerin gelişimine göre, overler değerlendirilir.



**Şekil 2.24. Overler de gelişen foliküllerin ultrason görünümü (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**

Ultrason ve kan testleri yardımıyla foliküllerin durumu jinekologlar tarafından değerlendirilerek, oosit toplama işleminin ne zaman olacağı belirlenilir. Genellikle 8-14 gün stimülasyon gerekir. Foliküller hazır olduğunda, hCG ya da eşdeğeri olan diğer ilaçlar verilir.

hCG, LH dalgalanmasını değiştirerek yumurtayı son hali olan matür (metafaz II) formda fertilize olabilmesi için sabit tutmaktadır.

## **2.7. Yardımcı Üreme Teknikleri**

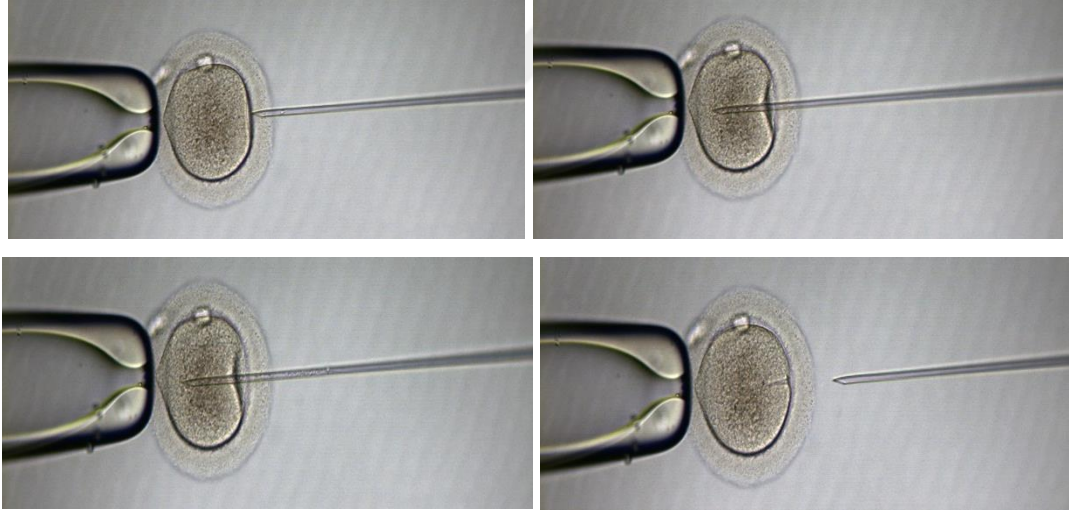
Overlerden oosit alımını takiben yapılan işlemlerin tümü yardımcı üreme teknikleri (YÜT) diye adlandırılır. Bu tekniklerden günümüzde en yaygın kullanılanları; Klasik (konvensiyonel) IVF ve ICSI' dir. Diğer yöntemler ise; laparoskopi ile yapılan tubal oosit ve sperm transferi (GIFT), zigot intrafallopian transfer (ZIFT) ve tubal embriyo transferidir (TET). Geçmiş yıllarda bu invaziv teknikler bazı infertil hastalarda kullanılırken, son yıllarda tercih edilmemektedir<sup>(76)</sup>.

### 2.7.1. Klasik (konvansiyonel) IVF

IVF, erkeğe ait spermlele kadına ait oositlerin laboratuvar ortamında kültür kapları (dish) içerisinde biraraya getirilerek fertilizasyonun sağlanması için kullanılan bir yardımcı üreme tekniğidir. Döllenen oositlerden oluşan embriyolar transfer edildiğinde implantasyon gerçekleşebilir. İyi kalitedeki embriyolar gelecekte kullanılmak üzere dondurulabilirler. Başlangıçta, IVF fallop tüpleri zarar görmüş, tıkalı veya eksik olan kadınlara, uygulanırdı. Bugünler de ise, endometriozis ve açıklanmayan infertilite gibi durumlarda IVF tedavisi uygulanmaktadır.

### 2.7.2. ICSI (İntra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu)

Klasik IVF' da hareketli spermleler oosite birlikte fertilizasyonunun gerçekleşmesi için bir gece inkübatörlerde tutulurken ICSI'de ise; tek bir sperm hücresi her bir matür oosite enjekte edilir ve inkübe edilir.

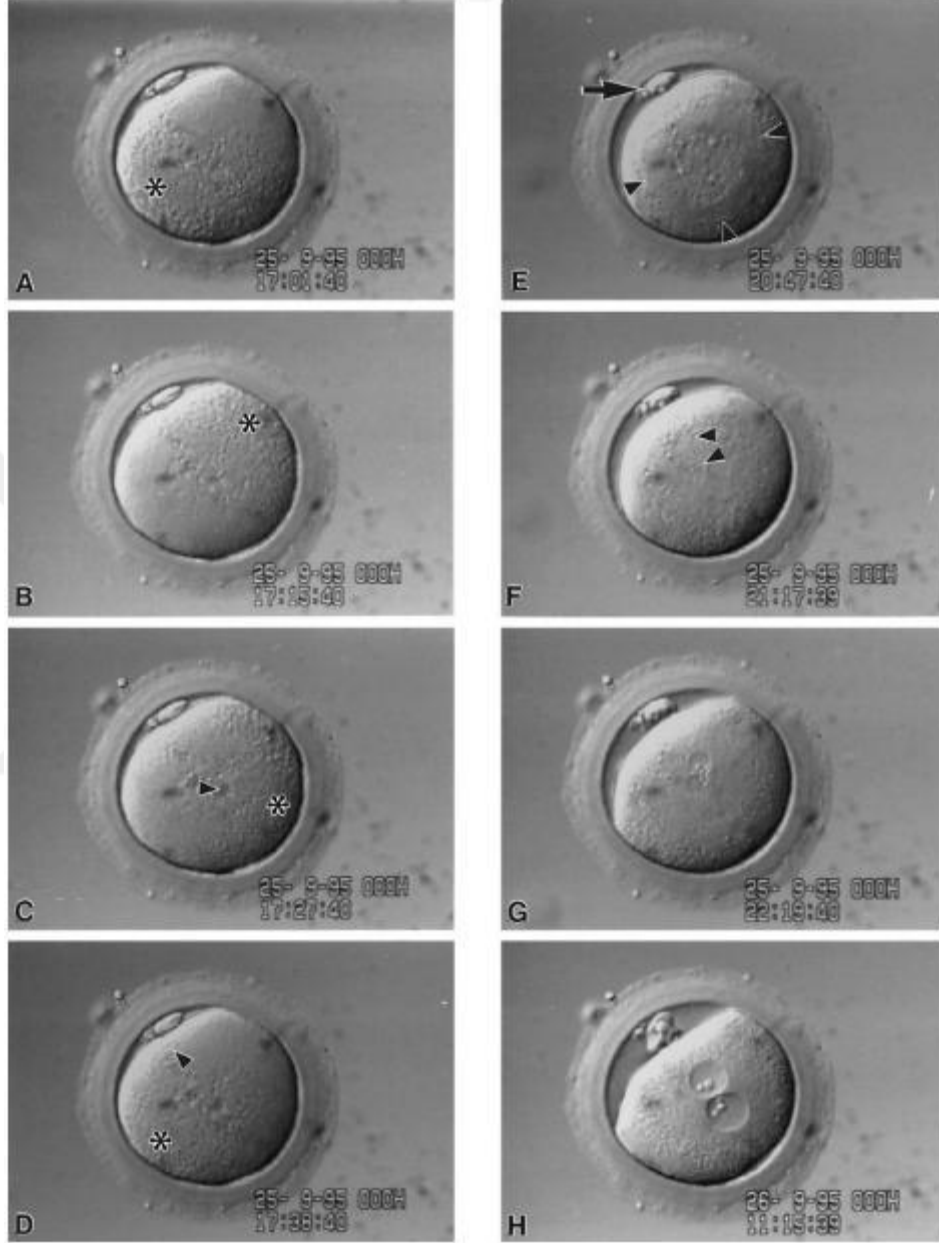


Şekil 2.25. İntra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu işlemi (ICSI) (200x büyütme)  
(Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).

### 2.8. Embriyo Gelişimi ve Skorlanması

Sperm–oosit etkileşimi ile dinamik ve kompleks olaylar dizisi sırasıyla fertilizasyon ve zigot oluşumunu sağlamaktadır. Bu süreç sperm penetrasyonu, sperm oosit füzyonu ve oosit aktivasyonu, erkek ve dişi pronukleusların (PN) gelişimi ve pronukleus çiftinin kademeli bir şekilde oosit merkezine göçüyle devam etmektedir.

İnsanlar da sperm sentrioller, pronukleusların (PNs) sitoplazma içerisinde göçünü ve rotasyonunu sağlayan mikrotübüllerin oluşumunda öncü bir rol üstlenirler.



**Şekil 2.26. Normal olarak döllenmiş bir oositin time - lapse kayıt sisteminde görüntülenmesi.**

A ve D’de granüllü sitoplazma bölgesi yıldız ile işaretlenmiştir. C’de de kondense sperm başı ok işaretiyle gösterilmiştir. D’de metafaz plağı ok ile belirtilmiştir. E’ de sitoplazmik parlamalar ve A ve D’de gösterilmiş birinci polar cisimciğin (PB) üstünde uzanan ok ile işaretlenmiş ikinci polar cisimcik. F’ de erkek

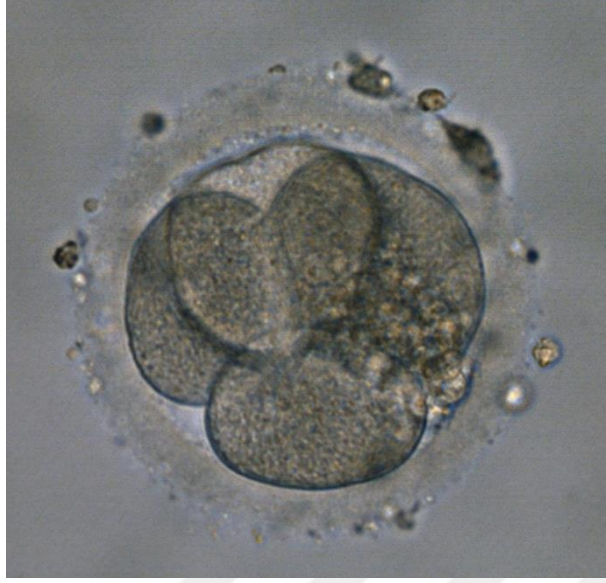
ve dişi pronukleusun (PN) ok ile gösterimi ve G ve H' de ise ponükleer kaynaşmanın açık bir şekilde gösterimi <sup>(77)</sup>.



**şekil 2.27. İki polar cisimciği (PB) ve iki pronukleusu (PN) net bir şekilde görölen döllenmiş oosit; pronukleusun (PN) içinde nükleolar prekürsör cisimcik (NPBs) dizilimi <sup>(78)</sup> (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**



**şekil 2.28. Erken insan embriyo gelişimindeki iki hücreli embriyo <sup>(76,79)</sup>. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**



**Şekil 2.29. Erken insan embriyo gelişimindeki dört hücreli embriyo <sup>(76,79)</sup>.  
(200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**



**Şekil 2.30. Erken insan embriyo gelişimindeki sekiz hücreli embriyo <sup>(76,79)</sup>.  
(200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**



**Şekil 2.31. Erken insan embriyo gelişimindeki kompaktlaşmaya başlamış olan embriyo <sup>(76,79)</sup>. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**



**Şekil 2.32. Erken insan embriyo gelişimindeki kavitasyonu başlayan embriyo <sup>(76,79)</sup>. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**





**Şekil 2.33. Erken insan embriyo gelişimindeki blastokist aşamasına gelmiş embriyo <sup>(76,79)</sup>. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**



**Şekil 2.34. Erken insan embriyo gelişimindeki hatchingi başlamış blastokist <sup>(76,79)</sup>. (200x büyütme) (Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**

## Embriyo Skorlama Sistemi

İlk sembol hücre sayısı ile ilişkili

İkinci sembol blastomerlerin yapısıyla ilişkili

A) Blastomerlerde simetri

B) Blastomerler arasında belirgin asimetri

C) C- Sitoplazma defekti








Üçüncü sembol fragmentasyona değinmektedir;

1-Fragmentasyon yok

2-Fragmentasyon %20' den az

3-Fragmentasyon %20-50 arasında

4-Fragmentasyon %50' den fazla

<b>A</b> <i>equal size blastomeres</i> 	<b>B</b> <i>unequal size blastomeres</i> 	<b>C</b> <i>defects of cytoplasm</i> 	
<b>1</b> <i>no fragmentation</i> 	<b>2</b> <i>fragmentation &lt;30%</i> 	<b>3</b> <i>fragmentation 30% – 50%</i> 	<b>4</b> <i>fragmentation &gt;50%</i> 

Şekil 2.35. 3. Gün embriyo skorlaması <sup>(80)</sup>.

İyi kalite embriyo çok sayıda blastomer bulundurur ve fragmentasyon yoktur. Optimal blastomer sayısı ikinci gün 4-6, üçüncü gün 8-12 arasındadır. Örnek verecek olursak; ikinci gün kültüründe 4A1, üçüncü gün kültüründe ise 8A1 diye tanımlanır <sup>(80)</sup>.

Lucinda Veeck' e göre embriyo sınıflandırması şu şekildedir:

**Kalite1:** Eşit büyüklükte blastomerlerden meydana gelen embriyo, sitoplazmik fragmentasyon bulunmama durumu;

**Kalite 2:** Eşit büyüklükte blastomerlerden meydana gelen embriyo, az miktarda ya da kabarcık şeklinde fragmentasyon olma durumu;

**Kalite 3:** Eşit olmayan blastomerlerden meydana gelen embriyo, hiç ya da çok az fragmentasyon olma durumu;

**Kalite 4:** Eşit ya da eşit olmayan blastomerlerden meydana gelen embriyo, anlamlı oranda fragmentasyon olma durumu;

**Kalite 5:** Çok az ya da hiç blastomer bulundurmeyen embriyo, komple fragmentasyon olma durumu <sup>(81)</sup>.

## 2.9. Embriyo Transfer İşlemi

Embriyo transferi işlemi sırasında, bazı kadınlara hafif bir sakinleştirici yapılmasına rağmen anesteziye gerek yoktur. Jinekolog, vajinal spekulum kullanarak serviksi temizler ve gerekli hazırlıkları yapar. Ardından bir ya da iki embriyo enjektör yardımıyla medyum içerisinden ince uzun kateterin içine çekilir. En son olarak hekim yavaş bir hamleyle kateteri uterusu dikkatli bir şekilde embriyoları bırakıp aynı hassasiyetle kateteri çıkarır.

## 2.10. Yardımla Zonanın İnceltilmesi (Assisted Hatching)

Assisted hatching (AH), embriyo transfer öncesinde embriyonun zona pellucida tabakasından daha kolay çıkıp implante olabilmesi için zonanın lazer aparatı yardımıyla en dıştan içe doğru inceltme işlemidir.



**Şekil 2.36. Lazer yardımıyla assisted hatching işlemi (200x büyütme)  
(Bakü Medical Plaza IVF Merkezi).**

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Bakü Medikal Plaza hastanesi üremeye yardımcı tedaviler merkezine Aralık 2014-Ocak 2016 ayları arasında başvuran; demografik ve üreme fizyolojisi parametreleri normal, açıklanamayan infertilite kriterlerine uyan vakalar ile yapıldı.

Çalışmamızda hikayesinde yardımcı üreme tedavi başarısızlığı olup, diğer prognostik faktörleri (yaş, over rezervi, üreme fizyolojisi normal) ve erkek subfertil, total progresif motil sperm sayısı 5 milyon üzerinde ve Kruger morfoloji %4'ün üzerinde olan vakalar değerlendirmeye alınmıştır. Açıklanamayan infertilite nedeniyle en az bir defa başarısız yardımcı üreme tedavisi başarısızlığı olan intra stoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılmış, ejakülattaki sperm örneğinden %15'ten fazla DNA hasarı olan 18 vaka tespit edildi. Erkeklerin yaş aralığı 26-51 idi. Kadınların yaş aralığı 23-42 idi. Vakaların hiçbirinde ICSI öncesinde sperm kalitesini etkileyecek spesifik ya da ampirik öncül tedavi yapılmadı. Tüm vakaların en az bir siklusları ejakülattaki spermatazoa ile yapılmıştı. Bu vakaların yeni siklusları aynı yıl içerisinde testiküler yoldan elde edilen sperm örneği ile ICSI yapıldı. Fertilizasyon oranı, embriyo morfoloji skoru, gebelik ve implantasyon oranı gibi parametrelere bakıldı.

Sperm DNA hasarı sperm kromatin dağılım yöntemi olan halosperm kiti ile değerlendirildi. Literatürde tarif edilen şekilde sperm DNA hasarları kayıt altına alındı (39,42-47).

Ejakülattaki spermatazoa 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası klinikteki sperm verme odasında alındı. ICSI için gamete 20 medyumu ile 1/10 dilüe edildi. Santrifüj (200g,10 dakika) sonrasında gamete 20 medyumu üzerine yüzen (swim up) pellet spermatazoası kullanıldı. Bu yöntemle elde edilen spermatazoanın DNA sağlamlığının gradient yöntemi ile elde edilen pelletten daha iyi olduğu bildirilmektedir (20). Temel sperm parametreleri (konsantrasyon, hareketlilik, morfoloji) WHO 2010 kriterlerine göre kaydedildi.

Testisten sperm eldesi ince iğne aspirasyonu TESA ya da açık testis biyopsisi ile yapıldı (20). İnversiyon mikroskop altında x200 ya da x400 altında spermatazoa

görüldü. Sperm mikropipet (humagen) ile ICSI için spermatazoa seçildi, artan örnekler gelecekte kullanım için kriyoprezervasyon yapıldı. (kitazato)

Rekombinant Folikül Stimulan Hormon (recFSH 1800-3500 IU) follitropin alfa gnrh antagonist sonrasında 18 mm'nin üzerinde en az 3 folikül görülüp hcg (10.000 IU) ile ovülasyon uyarıldı. 36 saat sonra oositler transvajinal ultrason eşliğinde foliküller aspire edilerek toplandı. Kontrollü ovaryan uyarı, oosit toplanması, ICSI literatürde tarif edildiği gibi yapıldı <sup>(21)</sup>. Zigot ve embriyolar ICSI sonrası birinci, ikinci, üçüncü günde daha önce tariflenmiş olan skorlama sistemi ile değerlendirildi <sup>(22-24)</sup>. ICSI sonrası 3.günde embriyo skoru en iyi 1-4 embriyo transferi yapıldı.

Embriyo transfer işleminden 12 gün sonra çiftler hastaneye çağırılarak bayanlardan alınan kanda beta hcg testi bakılarak sonuçlar daha sonra istatistik açıdan değerlendirme için kaydedildi. Klinik gebelik takibi ve eve bebek götürme oranı dosya takipleri ile yapıldı.

#### 4. BULGULAR

Ejekülattaki temel sperm parametreleri (konsantrasyon, hareketlilik, morfoloji) yardımcı üreme tedavilerinde ICSI mikroenjeksiyon ile fertilizasyon için prognostik olarak olumlu ancak vakalar arasında farklılıklar göstermektedir. (Tablo 4.1)

**Tablo 4.1. Ejekülattaki sperm temel sperm parametreleri.**

HASTA NO	KONSANTRASYON MİLYON/ML (40 milyon üzeri normal değer)	MOTİLİTE (a+b) % (%32 üzeri normal değer)	MORFOLOJİ KRUGER % (%4 ve üzeri normal)
1	312	36	5
2	47	41	4
3	195	39	4
4	168	44	5
5	53	46	5
6	58	52	4
7	86	36	6
8	50	35	6
9	46	38	5
10	72	42	4
11	356	44	5
12	82	48	6
13	84	36	4
14	70	34	5
15	50	32	8
16	124	38	5
17	48	43	4
18	64	37	4

Çalışmaya dahil olan 18 erkekte ilk sikluslarında kullanılan sperm örneklerinde %20 üzerinde DNA hasarı bulunmaktadır. (Tablo 4.2)

**Tablo 4.2. Dna fragmentasyon testinin oranları.**

Hasta no	Sperm dna hasarı
1	53
2	62
3	54
4	42
5	22
6	27
7	38
8	26
9	39
10	58
11	46
12	38
13	41
14	48
15	30
16	44
17	49
18	34

Bu vakaların ikinci sikluslarında testiküler sperm kullanılmıştır. Tüm vakaların her iki over sitümülasyon protokolü aynı gerçekleşmiş ejakülat spermi ile yapılan mikronjeksiyon işlemindeki oosit kaliteleri, sayıları, fertilizasyon oranları, klivaj oranları, embriyo morfoloji skoru, transfer edilen embriyo sayısı ve implantasyon oranları tabloda gösterilmiştir. (Tablo 4.3)

**Tablo 4.3. Ejekülat ile yapılan ICSI oranları.**

hasta no	oosit sayısı	normal fertilizasyon oranı	klivaj olan embriyo	klivaj oranı	embriyo morfolojisi	transfer edilen embriyo sayısı	klirik gebelik	kese sayısı	implantasyon oranı	canlı doğum
1	12	8	61.53	6	75	3	3	0	0	0
2	7	4	57.14	3	75	4	3	0	0	0
3	11	6	54.54	4	66.66	3	4	0	0	0
4	6	4	66.66	4	100	2	4	0	0	0
5	14	11	78.57	9	64.28	3	3	0	0	0
5	13	10	76.92	9	90	4	3	0	0	0
7	15	9	60	7	77.77	3	3	0	0	0
8	9	7	77.77	5	71.42	4	3	0	0	0
9	10	7	70	6	85.71	4	3	0	0	0
10	10	6	60	4	66.66	4	4	0	0	0
11	12	8	66.66	5	62.5	4	4	0	0	0
12	10	6	60	3	50	4	3	0	0	0
13	11	7	63.63	4	57.14	3	4	0	0	0
14	13	5	38.46	2	40	4	2	0	0	0
15	9	2	22.22	2	100	3	2	0	0	0
16	14	8	57.14	6	75	4	3	0	0	0
17	16	11	68.75	7	63.63	4	4	0	0	0
18	13	9	69.23	5	55.55	3	3	0	0	0



Ejekülat spermiyle yapılan mikroenjeksiyon sonucu hiç gebelik oluşmamıştır.

Yeni sikluslarında testiküler olarak elde edilen spermlerle yapılan mikroenjeksiyon işleminde kullanılan oosit kaliteleri, sayıları, fertilizasyon oranları, klivaj oranları, embriyo morfoloji skoru, transfer edilen embriyo sayısı ve implantasyon oranları tabloda gösterilmiştir. (Tablo 4.4)

**Tablo 4.4. Testiküler sperm ile yapılan ICSI oranları.**

hasta no	oosit sayısı	normal zigot	fertilizasyon oranı	klivaj olan embriyo	klivaj oranı	embriyo morfolojisi	transfer edilen embriyo sayısı	kllinik gebelik	kesesaya yısı	canlı doğum
1	13	10	76.92	8	80	2	3	1	1	1
2	3	2	66.66	2	100	2	3	1	1	1
3	8	4	50	4	100	1	3	1	2	2
4	3	3	100	3	100	3	3	0	0	0
5	7	5	71.42	4	80	2	4	0	0	0
6	20	12	60	8	66.66	2	3	1	0	0
7	11	3	27.27	3	100	1	3	0	0	0
8	18	8	44.44	6	75	2	3	0	0	0
9	7	5	71.42	2	40	2	3	1	0	0
10	11	7	63.63	5	71.42	2	3	1	1	1
11	10	7	70	6	85.71	2	2	0	0	0
12	14	2	14.28	2	100	3	3	0	0	0
13	9	9	100	5	55.55	2	3	1	0	0
14	12	4	33.33	2	50	2	2	0	0	0
15	16	10	62.5	7	70	1	2	1	1	1
16	9	8	88.88	5	62.5	3	4	0	0	0
17	11	4	36.36	4	100	1	2	1	1	1
18	12	9	75	6	66.66	2	3	1	0	0

Testiküler sperm ile yapılan 18 vakada 6 çiftte klinik gebelik oluşmuştur. Kardiyak aktivite fk pozitif gözüken 7 adet gestasyonel kese ölçülmüştür. Bunlardan 5 tanesi tekil 1 tanesi ikizdir. Toplam 7 tane sağlıklı bebek doğumu gerçekleşmiştir.

Ejekülat spermi ile testiküler sperm ile yapılan tedavilerin karşılaştırılması tablo 5'te gösterilmiştir. (Tablo 4.5)

**Tablo 4.5. Ejekülat ve testiküler sperm ile yapılan mikroenjeksiyon sonuçlarının birbiriyle karşılaştırılması**

İncelenen parametreler	Ejekülat sperm ile %	Testiküler sperm ile%	p değeri
Matür Oosit sayısı	11,3±2,6	10,7±4,5	0,3
(2pn) zigot sayısı	7,1±2,4	6,2±3	0,2
Fertilizasyon oranı (%)	62±14	62±24	0,9
Klivaj embriyo sayısı	5±2	4,5±2	0,4
Klivaj oranı (%)	72±16	77±19	0,2
Embriyo morfoloji skoru	3,5±,6	1,9±,6	<0.01
Transfer edilen embriyo sayısı	3,2±0,6	2,9±0,5	0,1
İmplantasyon oranı (%)	0	15±5	0,03

Çalışmanın Wilcoxon signed rank testi kullanılarak istatistiksel açıdan karşılaştırılmıştır.

Ejekülat sperm ve testiküler sperm ile yapılan mikroenjeksiyon işleminde matür oosit sayısı, zigot sayısı, fertilizasyon oranı, klivaj embriyo sayısı, klivaj oranı, transfer edilen embriyo sayısı açısından farklılık olmadığı benzer sonuçların olduğu ortaya konmuştur. Lakin ejekülat sperminde oluşan embriyo kalitesi değerlendirildiğinde embriyo morfoloji skoru 3,5±,6 bulunmuştur. Buna karşılık testiküler olarak elde edilen spermle yapılan tedavilerde gelişen embriyo morfoloji skoru 1,9±,6 'dur. İstatiksel olarak baktığımızda testiküler olarak elde edilen spermle yapılan tedavilerde p değeri <0.01 çıkmıştır. Bu da anlamlı olarak iyi embriyo gelişimi sağlandığını göstermektedir. Ayrıca ejekülat sperm ile yapılan tedavilerde implantasyon oranı %0 iken testiküler olarak elde edilen spermle tedavi edilen grupta %15±5 bulunmuştur, p değeri ise 0,03 bulunmuştur. Bu da testiküler spermle yapılan tedavinin ejekülat sperm ile olan tedavilere göre anlamlı olarak daha iyi gebelik oranlarını elde edildiğini göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA

İnfertilite nedenlerine bakılacak olursa bu durumun %20'sinin erkek nedenli çocuk sahibi olunamadığını göstermektedir. İnfertilite durumundaki çiftler birlikte incelendiğinde erkeğin burdaki rolü yaklaşık %40'ı bulmaktadır<sup>(82)</sup>. %20 infertilitede ise bütün bilinen ön tanı yöntemleri ve prognostik belirteçlere rağmen teşhis ve tedavi konusunda belirsizlikler bulunmaktadır. Sebebi bilinmeyen infertilite tanısı kullanılmaktadır. Erkek infertilitesi ve subfertilitesi için literatürde: sigara ile bozulmuş üreme fonksiyonu arasında nedensellik ilişkisinden şüphe edilmektedir<sup>(83)</sup>. Ancak, erkek infertilitesi üzerine tütünün gerçek etkisi halen tartışmalıdır. Spermatogenezin bozulduğu, sperm ultrastrüktürel yapısal anomalilerin indüksiyonu ve apoptoz gibi çok sayıda mekanizma öne sürülmüştür<sup>(84)</sup>.

Çalışmamızda ejakülat örneğinde sperm DNA hasarı yüksek olan infertil erkeklerin yardımcı üreme yöntemleri ile tedavisinde testisten sperm kullanılarak uygulamalarının daha başarılı olduklarını işaret etmektedir. Testis içinde spermatazoanın erken gelişim fazlarında da DNA hasarları olduğu bilinmektedir. Lakin bu klinik gözlemdeki sonucumuz sperm DNA hasarının çoğunun testis sonrasında olduğunu göstermektedir. Sperm DNA hasarı ölçümünü prognostik bir değer olarak aldığımızda çalışma grubumuzdaki kriterlere uyan hastalarda ejakülat örneği ile yardımcı üreme tedavileri yapmak yerine daha az DNA hasarı olan testiküler sperm hücreleriyle tedavi yapılması olumludur. Testiküler sperm ile ejakülat spermi fertilizasyon oranları açısından aynı olmakla birlikte embriyo kalitesi, implantasyon oranları ve klinik gebelik sonuçları testiküler sperm ile yüksek olmaktadır. Henüz kontrollü ve karşılaştırılmalı çalışmalar ile bu klinik yaklaşımın sperm DNA hasarına göre tedavi kararı ve yöntemi seçimini kılavuzlara standart sperm parametreleri ölçüsünde girmediğini belirtmekle birlikte tekrarlayan başarısız yardımcı üreme tedavileri ile karşılaşılan açıklanamayan infertilite vakalarında sperm DNA hasar oranını prognostik bir ölçüt olarak aldığımızda klinik gebelik sonuçları açısından testiküler sperm daha başarılı olabileceğini söylemeliyiz. Daha önceki çalışmaların işaret ettiği gibi spermatazoa DNA hasarlı olsada oosit fertilize etmesi ve iyi morfolojili embriyo gelişimi olmaktadır. Fakat bu embriyoların implantasyonu düşüktür ve implantasyondan kısa bir süre sonra abort olmaktadır<sup>(3, 4, 7, 8, 85-87)</sup>.

Tam tersine birkaç çalışmada ise DNA fragmentasyonu ve fertilizasyon oranları arasında negatif korelasyon bildirilmiştir <sup>(2, 20, 88)</sup>. Sperm DNA hasarı olmadan ama yinede konvansiyonel sperm parametresindeki bozukluklar nedeniyle görülen zayıf embriyo kalitesi durumuna literatür 'erken paternal etki' terimini kullanmaktadır. DNA hasarlı spermatazoa ile elde edilen embriyoların erken embriyo klivajında belirgin negatif bir durum olmamasına rağmen gözlenen gelişimsel dezavantaja 'geç paternal etki' terimi kullanılmaktadır <sup>(1, 10)</sup>.

Bununla birlikte testisten sperm eldesi invaziv bir işlemdir ve faydası her vaka ile tartışılmalıdır. Sperm DNA hasarının yardımcı üreme yöntemlerinde prediktif bir değer olma konusunda araştırmalar devam etmektedir. DNA hasarı ölçümü arasındaki farklılıklar ve hangi hasar yüzdesinin daha patolojik olduğu konusundaki klinik yaklaşım farklılıkları araştırma konusudur. DNA hasarını akridin orange çalışmasıyla belirten bir çalışma gebelik oranlarının %50'nin altında kaldığını bildirmiştir <sup>(89)</sup>. SCSA (sperm chromatin structure assay) metodu ile %30 üzerinde DNA hasarı bulunduğu durumda yardımcı üreme tedavisi (ICSI, IVF, IUI) ile klinik gebeliklerin doğuma ulaşmadığı bildirilmiştir <sup>(6, 90-94)</sup>. Bununla birlikte SCSA parametresi ile ICSI ya da IVF sonuçlarının değişmediğini bildiren çalışmalarda olmuştur <sup>(95)</sup>. SCSA sperm DNA'sının fragmentasyona olan yatkınlığını göstermekteyken TUNEL assay metodu sperm DNA'sındaki hasarları direk göstermektedir. TUNEL metodu ile %20'nin üzerinde DNA hasarı bulunduğu 54 ICSI girişiminin hiçbirinde gebelik bildirilmemiştir <sup>(2)</sup>. Literatürde bundan sonra yapılan pek çok çalışma ile %15-20 arasında bildirilen DNA hasarlı spermelerin yardımla üreme tekniklerinde negatif prediktif değer olacağı söylenmektedir. Lakin tam kesin değer için çalışmalar devam etmektedir.

Akla gelen başka bir soru ise %20-40 oranlarında sperm DNA hasarlı hücre bulunsada hala yarıdan fazla spermatazoada DNA hasarı olduğu bilinmesine rağmen bu spermlele yardımla üreme yöntemlerinde klinik gebeliğin neden tamamlanmadığı söz konusudur. Testiküler sperm ile klinik gebeliklerin daha başarılı olması ölçülebilir DNA hasarının ve yöntemlerinin buzdağının sadece görünen uç kısmı olabileceğidir. Negatif TUNEL reaksiyonu içinde henüz bilinmeyen yöntemler çıkacağı düşünülmektedir. Alternatif olarak sperm DNA hasarı bulunan vakalarda bazı sperm

sitoplazmik faktörlerinde sorunlu olabileceği söylenmektedir. ICSI sonrası oosit aktivasyonu ve erken embriyo gelişiminin 'oocyte-activating substance' ya da sentriol ile olduğu bilinmektedir. Bu süreçte de hasar olabileceği düşünülmektedir.

Antioksidan tedavilerin erkek subfertilitesinde yardımcı üreme tedavilerinin başarısını arttırdığı bilinmektedir <sup>(96)</sup>. Bu klinik faydasında sperm DNA hasarının azalması ile olduğu bildirilmektedir. Testiküler sperm eldesi öncesinde antioksidan tedavi kullanımında faydası metaanalizleriyle sperm DNA hasarının sağaltılması ve tedavi başarısının artması konusunda yaygın klinik kullanılmaktadır. Sperm DNA hasarı bulunan örnekler ile yardımcı üreme tedavileri sonuçlarında yenidoğanda artmış genetik hastalık tespiti ve ayrıca yine sperm DNA hasarı ile korele artan çocuk kanserleri arasında ilişki bulunduğu ve bu klinik vakaların ışığında sperm DNA hasarı yüksek durumda yardımcı üreme tedavisinde testiküler sperm ile klinik gebeliğin genetik hastalıklar ve onkolojik açıdan koruyucu, önleyici olabileceği bildirilmiştir <sup>(14, 97)</sup>.

## 6. SONUÇ

Bu çalışmada bulgularımız açıklanamayan infertil vaka grubunda tekrarlayan tedavi başarısızlığında sperm DNA hasarı ölçütünün kullanımı ile prognostik olarak ejakülat spermi yerine daha az DNA hasarı bulunan testiküler sperm kullanıldığında yardımcı üreme tedavisinin klinik sonuçlarının daha başarılı olduğu yönündedir. Örneklem gruplarımızın küçüklüğü çalışmanın sınırlılıklarıdır. Ancak, daha güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için; aynı gruplarda ve genel popülasyonda yapılacak büyük ölçekli karşılaştırılmalı, kontrollü çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. Yardımcı üreme tedavi başarısızlığı olan vakalarda, yeniden yapılacak olan tedavilerin öncesinde sperm DNA hasarı testini de bir prognostik ölçüt olarak alıp patoloji tespit edilen vakalarda standart semen parametleri normal ve yeterli olmasına rağmen testiküler olarak elde edilecek spermatazoa ile yapılacak olan mikroenjeksiyon işlemi başarılı klinik sonuçlar getirebilecektir.

## KAYNAKLAR

- (1) Ahmadi, A. and Ng, S.C. (1999a) Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 14, 2279-2285.
- (2) Aitken, R.J. and Krausz, C. (2001) Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122, 497-506.
- (3) Aitken, R.J., Buckingham, D., Brindle, J., Gomez, E., Baker, G. and Irvine, S. (1995) Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress
- (4) Arnon, J., Meirow, D., Lewis-Roness, H. and Ornoy, A. (2001) Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum. Reprod. Update*, 7, 394-403.
- (5) Barroso, G., Morshedi, M. and Oehringer, S. (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 15, 1338-1344.
- (6) Bucci, L.R. and Meistrich, M.L. (1987) Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat. Res.*, 176, 259-268.
- (7) Chapman, R.M., Sutcliffe, S.B., Rees, L.H., Edwards, C.R. and Malpas, J.S. (1979) Cyclical combination chemotherapy and gonadal function. Retrospective study in males. *Lancet*, 1, 285-289.
- (8) Drazynkiewicz, Z. and Kapuscinski, J. (1990) Acridine orange: a versatile probe of nucleic acids and other cell constituents. In Melamed, M.R., Lindmo, T. and Mendelsohn, M.L. (eds), *Flow Cytometry and Sorting*. 2nd edition, Wiley-Liss, New York, pp. 291-314.
- (9) Duran, E.H., Gurgan, T., Gunalp, S., Enginsu, M.E., Yarali, H. and Ayhan, A. (1998) A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilization in vitro. *Hum. Reprod.*, 13, 1235-1239.
- (10) Agarwal, A. and Newton, R.A. (1991) The effect of cancer on semen quality after cryopreservation of sperm. *Andrologia*, 23, 329-332.
- (11) Drazynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. and Melamed, M.R. (1975) Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp. Cell Res.*, 90, 411-428.
- (12) Ahmadi, A. and Ng, S.C. (1999b) Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J. Exp. Zool.*, 284, 696-704.

- (13) Aitken, R.J. (1999) The Amoroso lecture. The human spermatozoa  $\pm$  a cell in crisis. *J. Reprod. Fertil.*, 115, 1-7.
- (14) Alvarez, J.G., Sharma, R.K., Ollero, M., Saleh, R., Lopez, M., Thomas, A. J., Jr, Evenson, D.P. and Agarwal, A. (2002) Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil. Steril.*, 78, 319-329.
- (15) Chatterjee, R., Haines, G.A., Perera, D.M., Goldstone, A. and Morris, I.D. (2000) Testicular and sperm DNA damage after treatment with  $\bar{u}$ darabine for chronic lymphocytic leukemia. *Hum. Reprod.*, 15, 762-766.
- (16) Said T, Paasch U, Glander H, Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 39–51
- (17) Agarwal A, Said T. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331–45
- (18) Pasqualotto F, Sharma R, Kobayashi H, Nelson D, Thomas A Jr, Agarwal A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *J Androl* 2001; 73: 459–64
- (19) Cohen, P.E. and Pollard, J.W. (1995) Cytokines and growth factors in reproduction. In Bronson, R. (ed.), *Reproductive Immunology*. Blackwell Science, Cambridge, MA.
- (20) Boissonneault, G. (2002) Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS*, 514, 111-114.
- (21) Oehninger SC, Kruger TF. Erkek İnfertilitesi Teşhis ve Tedavi. Çeviri Editörü: Doç. Dr. Mete Kilciler. İstanbul; Habitat Matbaası ISBN: 978-975-00515-9-3, 2009;1-240.
- (22) Hassa H. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuar Uygulamaları. 1. Baskı. Eskişehir, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları; 2003:127-165.
- (23) Karaöz E. Özel Histoloji. Isparta, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları No:29,2002.
- (24) Elder K, Dale B. In Vitro Fertilization. Cambridge University Press, second edition. 2000:27–151.
- (25) Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Çeviri Editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006;531-564.



- (26) Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas: with Correlated Cell and Molecular Biology. Lippincott Williams & Wilkins; 6th edition: 2011, ISBN-13: 978-1451101508:788-802.
- (27) Aksoy E, Aktan TM, Duman S, Dursunoğlu D, Cüce G. Farklı semen parametrelerinde ışık mikroskobu düzeyinde spermatozoa morfolojisi ve nükleer kondansasyon değerlendirmesi. Zeynep Kamil Tıp Bülteni, 2009;40: 111-117.
- (28) Kahraman S. Erkeklerde kan ve seminal plazmada kurşun ve kadmiyum düzeylerini parametreleri üzerine etkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir 2008.
- (29) Terzioğlu F, Yücel Ç, Karatay G. Sigara ve İnfertilite. Ankara; Klasmat Matbaacılık, Sağlık Bakanlığı. Yayın No: 731, 2008, ISBN: 978-975-590-247-0.
- (30) Kılınç R.A. Çukurova Üniversitesine başvuran infertil çiftlerde in vitro fertilizasyon endikasyonları. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Adana, 2007.
- (31) Satar DA, Gençdal D. Sperm değerlendirmesi. Arch Med RevJ. 2013; 22(4): 532-542.
- (32) Tekbaş ÖF. Kimyasallar ve üreme sağlığı. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni. 2006; 5(1): 50-59.
- (33) Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. FÜ SBTD. 2006;20(1): 85-95.
- (34) Ramos L, Wetzels AMM. Low rates of DNA fragmentation in selected motile human spermatozoa assessed by the tunel assay. Hum Reprod. 2001;16(8): 1703-1707.
- (35) Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonnette F, Bleau G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. Hum Reprod. 2005;20 (12): 3446-3451.
- (36) Agarwal A., Said T.M., Gardner D.K Textbook of assisted reproductive techniques: 2004
- (37) Erenpreiss J., Jepson K, Giwercman A., Tsarev I. ve ark. Toluidine blue cytometry test for sperm DNA conformation: comparison with the flow cytometric sperm chromatin structure and TUNEL assays. Hum Reprod. 2004;19(10):2277-82.

- (38) Sakkas D, Manicardi GC. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear dna anomalies. *Hum Reprod.* 2000; 15: 1112–16.
- (39) Fernández J.L., Muriel L, Rivero M.T. Goyanes C.V. ve ark. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm dna fragmentation. *J Androl.* 2003 ;24 :1.
- (40) Cebesoy F.B., Ünlü C., Aydos K., Baltacı V. The Relationship Between Sperm Morphology-Acridine Orange Staining Andfertilization Rate-Embryo Quality in Icsi. *J Turkish-German Gynecol Assoc.* 2006; 7(2):110-14.
- (41) Khalili M.A., Maybodi F.A., Anvari, M., Taleb A.R. Sperm nuclear dna in ejaculates of fertile and infertile men correlation with semen parameters. *J Urol.* 2006; 3(3):154-59.
- (42) Kazım R. Chohan, Jeanine T. Griffin, Marie Lafromboise. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006;(1):27.
- (43) Fernández J.L., Muriel L, Goyanes V., Segrelles E., ve ark. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.*2005;(84):4
- (44) Evenson DP, Wixon R. Comparison of the Halosperm test kit with the sperm chromatin structure assay(SCSA) infertility tes in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril.* 2005;84(4):846-9.
- (45) Enciso M., Muriel L, Fernández J.L., Goyanes V. ve ark. Infertile Men With Varicocele Show A High Relative Proportion Of Sperm Cells With Intense Nuclear Damage Level, Evidenced By The Sperm Chromatin Dispersion Test. *J Androl.* 2006;(27):1
- (46) Muriel L, Garrido N, Fernández JL, Remohí J, ve ark. Value of the sperm DNA fragmentation level, measured by the sperm chromatin dispersion (SCD) test, in the IVF and ICSI outcome. *Fertil Steril.* 2006; 85: 371– 83.
- (47) Muriel L, Meseguer M, Fernández JL, Alvarez J, ve ark. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination (IUI): a double- blind prospective study. *Hum Reprod.* 2006; 21:738–44.

- (48) Morris I.D., Ilott S., Dixon L., Brison D.R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.* 2002;(17) 4:990-98.
- (49) 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(3):528-32.
- (50) Younglai EV, Holt D, et Al.(2001): Sperm Swim-Up Techniques and DNA Fragmentation. *Hum Reprod.*2001;16(9):1950–53.
- (51) Benchaib M., Braun V., Lornage J., Hadj S. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* 2003;(18) 5:1023-28.
- (52) Huang C.C, Lin D.P.C, Tsao H.M, Cheng T.C ve ark. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril.* 2005; 84,1:130-40.
- (53) Virro M.R., Larson -Cook K.L., Evenson D.P. Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril.* 2004;(81), 5:1289-95.
- (54) Saleh RA, Agarwal A, 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: 3
- (55) Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.* 2004;(19) 6:1409-17.
- (56) Esteves SC, Verza S Jr. PESA/TESA/TESE sperm processing. In: Nagy ZP, Varghese AC, Agarwal A, editors. *Practical Manual of In Vitro Fertilization.* New York: Springer; 2012. p. 207–20.
- (57) Verza S Jr, Esteves SC. Microsurgical versus conventional single – Biopsy testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermia: a prospective controlled study. *Fertil Steril* 2011; 96 Suppl: S53.

- (58) Esteves SC, Lee W, Benjamin DJ, Seol B, Verza Jr A, et al. Reproductive potential including neonatal outcomes of men with obstructive azoospermia undergoing percutaneous sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection according to the cause of obstruction. *J Urol* 2013; 189: 232–7.
- (59) Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999; 14: 131–5.
- (60) Esteves SC. Microdissection testicular sperm extraction (micro-TESE) as a sperm acquisition method for men with nonobstructive azoospermia seeking fertility: operative and laboratory aspects. *Int Braz J Urol* 2013; 39: 440.
- (61) Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Greco E. Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 192–198.
- (62) Rienzi L, Vajta G and Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Human Reprod Update* 2011; 17(1): 34-45.
- (63) Petersen CG, Oliveira JBA, Mauri AL, Massaro FC, Baruffi RLR, Pontes A, Franco JG Jr. Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2009; 18: 235 – 243.
- (64) Swain JE, Pool TB. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. *Hum Reprod Update* 2008;14: 431 –446.
- (65) Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001; 121: 647–653.
- (66) Gilchrist RB. The meiotic and developmental potential of marmoset monkey oocytes in vitro. PhD Thesis, The German Primate Centre, University of Gottingen, 1996.
- (67) Machtinger R, Politch JA, Hornstein MD, Ginsburg ES, Racowsky C. A giant oocyte in a cohort of retrieved oocytes: does it have any effect on the in vitro fertilization cycle outcome? *Fertil Steril* 2011;95: 573– 576.

- (68) Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Litwicka K, Greco E. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 2008; 90: 1692– 1700.
- (69) Ebner T, Shebl O, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Developmental fate of ovoid oocytes. *Hum Reprod* 2008;23: 62 – 66.
- (70) Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. *J Assist Reprod Genet* 2007;24: 263– 270.
- (71) The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology*. 2011; *Hum. Reprod.* (2011) 26 (6): 1270-1283.doi: 10. 1093/humrep/der037
- (72) Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006;12: 608 – 615.
- (73) Fancsovits P, Tothne Z, Murber A, Takacs FZ, Papp Z, Urbancsek J. Correlation between first polar body morphology and further embryo development. *Acta Biol Hung* 2006;57: 331– 338.
- (74) Rienzi L, Balaban B, Ebner T and Mandelbaum J. The oocyte. 2012; *Human Reproduction*, Vol.27, No. S1 pp. i 2–i21. doi:10. 1093/ humrep/ des200.
- (75) American society for reproductive medicine, *Assisted Reproductive Technology; A Guide for Patients*, 2015.
- (76) Schultz RM. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*. 2002; Vol.8, No.4 pp.323-331.
- (77) Payne D, Flaherty SP, Barry MF and Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum. Reprod.* 1997; 12 (3): 532 541.doi: 10. 1093/humrep/12.3.532
- (78) K. Elder ve B. Dale. *In-Vitro Fertilization* Third edition. 2011; Cambridge University Press The Edinburgh Building, Cambridge CB2 8RU, UK.page 19-23.

- (79) Wiekowski M, Miranda M, De Pamphilis ML. Regulation of gene expression in preimplantation mouse embryos: Effects of the zygotic clock and the first mitosis on promoter and enhancer activities. *Developmental Biology*. 1991; Volume 147, Issue 2 , Pages 403-414.
- (80) Baczkowski T, Kurzawa R, Głabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reproductive biology* 2003; Vol.4, No.1.
- (81) Veeck L. An atlas of human gametes and conceptus. Global fertility academy; Pathenon NY.1999.
- (82) Koyuncu H. Methods for the determination of sperm DNA damage. *Turk Urol Sem*. 2011; 2: 18-23.
- (83) Collodel G, Capitani S, Pammolli A, Giannerini V, Geminiani M, Moretti E. Semen quality of male idiopathic infertile smokers and nonsmokers: an ultrastructural study. *J Androl*. 2010; 31: 108–13.
- (84) Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicol*. 2006;223(1-2):54-60.
- (85) Duran, E.H., Morshedi, M., Taylor, S. and Oehninger, S. (2002) Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum. Reprod.*, 12, 3122-3128.
- (86) Agarwal, A., Shekarriz, M., Sidhu, R.K. and Thomas, A.J., Jr (1996) Value of clinical diagnosis in predicting the quality of cryopreserved sperm from cancer patients. *J. Urol.*, 155, 934-938.
- (87) Drazynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T. and Melamed, M.R. (1976) Lymphocyte stimulation: a rapid multiparameter analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 73, 2881-2884.
- (88) Caron, N., Veilleux, S. and Biossonneault, G. (2002) Stimulation of DNA repair by the spermatozoal TP1 protein. *Mol. Reprod. Dev.*, 58, 437-443.
- (89) Barone, J.G., De Lara, J., Cummings, K.B. and Ward, W.S. (1994) DNA organization in human spermatozoa. *J. Androl.*, 15, 139±144.
- (90) Aitken, R.J., Gordon, E. and Harkiss, D. (1998) Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 59, 1037-1046.

- (91) Allen, N.C., Herbert, C.M., III, Maxson, W.S, Rogers, B.J., Diamond, M.P. and Wentz, A.C. (1985) Intrauterine insemination: a critical review. *Fertil. Steril.*, 44, 569-580.
- (92) Comhaire, F.H., Mahmoud, A.M., Depuydt, C.E., Zalata, A.A. and Christofe, A.B. (1999) Mechanism and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's view point. *Hum. Reprod. Update*, 5, 393-398.
- (93) Cai, L., Hales, B.F. and Robaire, B. (1997) Induction of apoptosis on the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol. Reprod.*, 56, 1490-1497.
- (94) Colleu, D., Lescoat, D. and Gouranton, J. (1996) Nuclear maturity of human spermatozoa selected by swim-up or Percoll gradient centrifugation procedures. *Fertil. Steril.*, 65, 160-164.
- (95) Amann, R.P. (1989) Can fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *J. Androl.*, 16, 89-98.
- (96) Antioxidant vitamins and minerals for male subfertility (cochrane report 15 December 2014)
- (97) Berensztein, E.B., Sciara, M.I., Rivarola, M.A. and Belgorosky, A. (2002) Apoptosis and proliferation of human testicular somatic and germ cells during prepuberty: high rate of testicular growth in newborns mediated by decreased apoptosis. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 5113-5118.

## ÖZGEÇMİŞ

1986 yılı Beyoğlu İstanbul doğumludur. İlk, orta ve lise eğitimlerini İstanbul'da bitirmiştir. Lise eğitimini Kadırga Teknik Lisesi 'Kimya' bölümünde tamamlamıştır. 2005 yılından itibaren 'Tüp bebek laboratuvarlarında laboratuvar teknisyeni' olarak çalışmaya başlamıştır. Özel Antalya Anadolu Hastanesi Tüp Bebek ünitesinde 2005-2011 yılları arasında çalışmıştır. 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi 'Çevre Kirlenmesi ve Kontrolü' önlisans programını bitirmiştir. 2010 yılında Akdeniz Üniversitesi 'Biyoloji' bölümünü kazanmıştır. 2011 yılından Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesine bağlı Tüp Bebek ünitesinde çalışmıştır. Aynı zaman diliminde Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne yatay geçiş yaparak 2014 yılında 'Biyoloji' eğitimini tamamlamıştır. 2015 yılında Maltepe Üniversitesi Klinik Embriyoloji bölümünü kazanmıştır. Halen Azerbaycan'ın başkenti olan Bakü'de 'Bakü Medikal Plaza' hastanesi tüp bebek laboratuvarında biyolog olarak çalışmaktadır. Bekardır.