

T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK ANA BİLİM DALI

AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE HASTA GRUBUNDA
YAŞANAN
IVF UYGULAMA BAŞARISIZLIKLARINDA
SPERM DNA HASARI VE ANÖPLOİDİNİN ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ümmü Gülsüm Ercan

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Murat Öznur

ANKARA

2015

T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GENETİK ANA BİLİM DALI

AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE HASTA GRUBUNDA
YAŞANAN
IVF UYGULAMA BAŞARISIZLIKLARINDA
SPERM DNA HASARI VE ANÖPLOİDİNİN ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ümmü Gülsüm Ercan

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Murat Öznur

TÜBİTAK tarafından 3001 projesi olarak desteklenmiştir.

(Proje No: 114S169)

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

-Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

-Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

-Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili esere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,

-Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,

-Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,

-Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

Ümmü Gülsüm ERCAN

KABUL ve ONAYLAMA SAYFASI

ÜMMÜ GÜLSÜM ERCAN tarafından hazırlanan “Açıklanamayan İnfertilite Hasta Grubunda Yaşanan IVF Uygulama Başarısızlıklarında Sperm DNA Hasarı ve Anöplidinin Etkisi” başlıklı bu çalışma, 15/12/2015 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda (oybirliği/oyçokluğu) ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....

Yrd. Doç. Dr. Murat ÖZNUR

(Danışman)

.....

Doç. Dr. Zehra Candan İLTEMİR DUVAN

.....

Doç. Dr. Şerife Esra ÇETİNKAYA

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../2015 tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç. Dr. Hüsamettin ERDAMAR

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Açıklanamayan infertilite ve tekrarlanan gebelik kayıplarının etiolojisinde genetik faktörlerin rolünün ön planda olduğu düşünülmektedir. DNA hasarının embriyo gelişimi ve implantasyon üzerinde olumsuz etkisinin olup olmadığının araştırılması, böyle hastaların tedavisinde yeni bir alternatif oluşturabileceği ve gebelik sonuçlarını arttırabileceğini öngörmekteyiz. Benzeri çalışmalar daha fazla hasta sayısı ile yapılması durumunda üreme bozuklukları tedavisinde farklı açılımlar yapılabileceği ve ilerlemeler sağlanabileceği kanısındayız. Toplumsal bir soruna çözüm olur diye başladığımız çalışmamız; gelecekte bu konudaki tanı ve tedavi yöntemlerinin doğru yönlendirilmesini sağlayacağı için önemli olduğu fikrindeyiz.

Yüksek lisans eğitimim süresince teorik ve deneysel yönden altyapı oluşturmamı sağlayan, bu süreçte tecrübeleri ile destek olan, tez çalışmalarım için olanak sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Esra GÜNDÜZ, Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ, Yrd. Doç. Dr. Murat ÖZNUR, Yrd. Doç. Dr. Muradiye ACAR ve Dr. Eyüp ÜÇTEPE'ye sonsuz teşekkür ederim.

Yıllardır hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman en büyük destekçilerim olan annem Fatma ERCAN, babam Hasan Hüseyin ERCAN ve Abilerim MEHMET ERCAN ve Bahattin ERCAN'a bu dönemde bana her türlü destek veren Doç. Dr. Zehra Candan İLTEMİR DUVAN ve Embriyolog Aslıhan PEKEL'e ve Turgut Özal Üniversitesi Hastanesi tüp bebek ekibine teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımı yüksek lisansımın başından itibaren daha da keyifli kılan Turgut Özal Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda eğitimini sürdürmekte olan tüm bölüm arkadaşlarıma ve çalışanlarına en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Farklı yöntemler kullanarak yaptığım deneysel çalışmalar sonucu hazırladığım tezimin, daha ileri çalışmalar için de bir basamak oluşturmasını temenni ediyorum.

TÜBİTAK tarafından 3001 projesi olarak desteklenmiştir. (Proje No: 114S169)

ÖZET

İnfertilite, bir yıl süre ile herhangi bir korunma yöntemi uygulanmadan ve düzenli cinsel ilişkide bulunulmasına rağmen gebelik olmaması durumudur. İnfertilite nedeniyle başvuran bir çifte nedene yönelik klinik ve laboratuvar araştırması yapmak soruna yönelik tedaviye karar verilebilmesini sağlar. İnfertilitenin çiftlere oranı değerlendirildiğinde: %30-40 oranında erkek faktörünün, %40-%50 oranında kadın faktörünün ve %25 oranında ise her iki çifte bağlı faktörlerin sebep olduğu ortaya çıkmaktadır. Açıklanamayan infertilite ise tüm infertilite nedenlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. Açıklanamayan infertilite, temel infertilite araştırmaları sonucunda herhangi bir sebep bulunamayan çiftler için kullanılan bir terimdir. Tanıda normal sperm analizi, ovulatuvar siklusların varlığı, normal uterin kavite ve en azından bir tubanın açık olduğunun gösterilmesi gerekir. Tedaviye karar veren hastalarda ise üç siklus klomifen sitrat veya gonadotropinlerle ovülasyon indüksiyonu ve intrauterin inseminasyon sonrası başarısız olunursa ÜYT'ye geçilir.

İnfertil çiftin değerlendirilmesinde en önemli başlangıç testi spermiyogram analizidir. Hastanın gebe kalabilmesi için spermin sayısı, hareketliliği, morfolojisi ve DNA yapısı önemlidir. Bazı durumlarda spermin anöploidi gibi bir sayısal genetik dengesizliği olmamakta, bunun yerine DNA yapısı bozulmaktadır. Bu durumda spermiyogram analizinde anormal sonuç görülmeyebilir. Birçok test farklı özelliklerle sperm hücrelerinin DNA yapısını değerlendirmesine rağmen standart bir teknik veya saptanan durumların klinikle ilişkisinin ortaya konması noktasında ortak bir görüş yoktur. Bu konuda görüş birliğinin olmaması yapılan çalışmaların yetersiz kalmasından dolayıdır. Halbuki sperm kromatin ve DNA defektleri erkek fertilesini etkileyen faktörlerdir. Spermin genetik yapısının bütünlüğünün korunması normal fertilizasyon ve sağlıklı bir embriyoya hayat verme açısından önemlidir. İntra-Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) uygulaması sonucu spermde DNA fragmentasyonu var ise, yumurta ile birleştiğinde embriyonun kendini tamir edebilme yeteneği olmasına rağmen embriyonun gelişim hızı ve implantasyonu etkilenebilir. Bu durum klinik gebelik ve canlı doğum oranlarını düşürmektedir. ICSI

için kullanılan hasarlı sperm DNA'sının gelecekteki embriyoda oluşturabileceği etkiler henüz çalışma aşamasındadır ve ileri çalışmalar gerektirmektedir. Normal semen analizi olan erkeklerde yüksek derecede DNA hasarı olabileceken; çok kötü sperm kalitesi olan erkeklerde çok az DNA hasarı olabilir. Sperm DNA hasarı ve anöploidi çalışmaları, daha çok oligospermik ve şiddetli male faktör hastalarında yapılmış, açıklanamayan infertilite hasta gruplarında çalışmalar yetersiz kalmıştır. DNA hasarının İn vitro Fertilizasyon (IVF) ve ICSI sonuçlarına olan etkisi araştırılmakta olup hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle açıklanamayan infertilite hasta grubunda başarısız ICSI denemelerini en aza indirmek ve gebelik oranlarını artırmak için yeni verilerle yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Açıklanamayan infertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları ve DNA anomalileri gibi durumların sperm DNA fragmentasyonu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Özellikle tekrarlayan gebelik kayıplarında DNA fragmentasyonu gibi genetik faktörler ve yaşa da bağlı olabilecek yüksek anöploidi oranlarından söz edilmektedir. Literatürde anöploidi oranı yüksek olarak bildirilmiş olan kromozomlar için Floresan in situ Hibridizasyon (FISH) testi kullanılarak normalde her bir spermde birer tane bulunması gereken bu kromozomların yokluğu veya fazlalığı araştırılır. Biz bu çalışmamızda açıklanamayan infertilite tanısı alan ve ICSI uygulaması sonucu gebelik elde edilememiş hasta grubunun spermiyogram analizinde spermde anöploidi (sperm-FISH testi ile) ve sperm DNA fragmentasyonu incelenmesini amaçlamaktayız. Bunun için spermiyogram örnekleri sperm-FISH analizine alınacak sonrasında DNA kromatin ve fragmentasyonunu saptamak için Sperm Kromatin DNA Testi (SCD) çalışılacaktır.

Açıklanamayan infertilite hasta grubundaki IVF uygulama başarısızlıklarına; sperm DNA hasarının etkisinin olup olmadığı ile ilgili yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bunun için hem sperm hücresi DNA bütünlüğünün bozulmasını hem de bunun çiftlerin infertil durumuyla ilişkisini değerlendirecek çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuç olarak bu başarısız uygulamalara sperm DNA hasarının etkisi olup olmadığı ve saptanabilecek anöploidi oranlarının karşılaştırılmasıyla, açıklanamayan infertilitenin altında yatan genetik faktörlerin etkisinin açığa

ıkartılmasının Üremeye Yardımcı Tekniklerin uygulanmasında çiftlerin sağlıklı bebek sahibi olma başarısını artıracasını öngörmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Sperm DNA hasarı, açıklanamayan infertilite, sperm, DNA fragmentasyonu, erkek infertilitesi.

ABSTRACT

Infertility is a condition in which a woman is unable to become clinically pregnant after one year of regular unprotected sexual intercourse. Couples admitted to centers for infertility, laboratory research and clinical treatment are tested for the detection of the problem. In 30 to 40% of cases the male is found to be the cause of infertility, while in 40 to 50% of cases the cause of infertility lies with the female. In 25% of couples who experience infertility, the problem results from both the man and woman. Unexplained infertility constitutes approximately 15% of all infertility. Unexplained infertility is a term used for couples in which there is no identifiable reason for infertility. In routine diagnosis semen analysis, the presence of ovulatory cycles, a normal uterine cavity and at least one open fallopian tube should be seen. Patients who have decided to undergo treatment, 3 cycles of clomiphene citrate ovulation induction with gonadotropins and intrauterine insemination are assisted but if this fails other reproductive techniques are tried.

The most important first step in the evaluation of infertile couples is to run a sperm analysis. The number of sperm, their mobility, morphology and DNA integrity are all important factors for becoming pregnant. In some cases, there are no quantitative genetic imbalances/disruptions such as sperm aneuploidy; rather there are problems in terms of DNA structural integrity. A large number of tests are available to assess different aspects of sperm DNA integrity; but there is no consensus on the optimal technique or appropriate clinical cut-off levels. This lack of consensus is due in part to the fact that many studies have not yet been replicated as well as the fact that many studies thus far have been inadequate. Sperm chromatin and DNA defects determine male fertility. Maintenance of sperm structural integrity is important for normal fertilization and a healthy embryo. DNA fragmentation occurs in sperm as a result of Intra-Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI). Despite the fact that the embryo can repair itself after injection of the damaged sperm into the oocyte, embryonic development and implantation rates are affected. This reduces both clinical pregnancy and live birth rates. In ICSI procedures, the ability of sperm with DNA damage to bring about a successful pregnancy is still under investigation and

more advanced research is necessary. Men with normal semen analysis may have a high degree of DNA damage while men with very poor semen quality can have very little DNA damage. In studies of sperm DNA and aneuploidy, the majority of studies have focused on oligospermia and severe male factor infertility while unexplained infertility has been largely ignored. The effect of sperm DNA damage on In vitro Fertilisation (IVF) and ICSI outcomes is still not clearly known. Therefore, new studies are greatly needed to increase success rates in patients with unexplained infertility suffering from unsuccessful ICSI attempts. Abnormalities such as sperm DNA fragmentation have been associated with unexplained infertility and recurrent miscarriage. Especially in the case of recurrent miscarriage, genetic factors such as DNA fragmentation and high rates of aneuploidy may be to blame. For chromosomes that have been shown to have a high rate of aneuploidy, the FISH method will be used to examine sperm for absence or presence of extra copies. In this study, it is our aim to analyze both sperm aneuploidy and DNA fragmentation in patients with unexplained infertility for whom ICSI did not result in successful pregnancy. To this end, samples acquired from semen analysis will be assessed for aneuploidy by Multicolour fluorescent In Situ hybridization (sperm-FISH) and for chromatin fragmentation by the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test.

There is little data concerning the effect of sperm DNA damage on the success of IVF procedures in cases of infertility of unknown etiology. Thus there is a great need for research that can identify the mechanisms that cause sperm DNA damage and that affect clinical outcomes. We aim to elucidate the etiology of unexplained infertility after IVF treatment with concrete evidence and data obtained through the investigation of the effect of DNA damage and aneuploidy on sperm. In conclusion, we anticipate the existence of underlying genetic factors in unexplained infertility resulting from sperm DNA damage and aneuploidy, the discovery of which could increase the hope of infertile couples to bring a healthy baby into the world.

Keywords: Sperm DNA damage, unexplained infertility, sperm, DNA fragmentation, male infertility.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Bilimsel Etik Bildirim Sayfası	
Onay Sayfası	
Önsöz	i
Türkçe Özet Sayfası	ii
İngilizce Özet Sayfası	v
İçindekiler Dizini	vii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	x
Tablolar Dizini	xi
Şekiller Dizini	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. İnfertilite Nedenleri	5
2.1.1. Erkek İnfertilitesi	6
2.1.2. Polikistik Over Sendromu	8
2.1.3. Tubal Faktör	9
2.1.4. Endometriozis	10
2.1.5. Açıklanamayan İnfertilite	11
2.2. Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYT)	12
2.2.1. Invitro Fertilizasyon	13
2.2.2. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu	13
2.3. Spermatogenez	14
2.3.1. Spermatogonial Faz (Spermatositogenez)	15
2.3.2. Spermatosit Fazı (Mayoz)	15

2.3.3. Spermatid Fazı (Spermiogenez)	16
2.3.4. Spermatogenezin Genetik Özellikleri	17
2.3.5. Endokrin Faktörler	18
2.3.6. Diğer Faktörler	18
2.4. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi	19
2.4.1. Semen Analizi	22
2.4.2. Semen Toplanması	22
2.4.3. Semen Makroskopik Değerlendirilmesi	23
2.4.4. Semen Mikroskopik Değerlendirilmesi	24
2.4.5. Endokrin İnceleme	27
2.4.6. Sperm ve Semene Ait Spesifik Testler	28
2.5. Genetik Araştırma	29
2.5.1. Sperm Örneğinde Anöplidi Tayini	29
2.5.2. Sperm DNA Anomalileri	30
2.6. Sperm Örneğinde FISH Analizi	31
2.6.1. İnfertil Çiftlerde Sperm Örneğinde FISH Analizi	32
2.7. Sperm DNA Fragmantasyon Analizi	33
2.7.1. Sperm Kromatin DNA Testi	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Nitelikleri	36
3.2. Kullanılan Gereçler	38
3.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	39
3.4. Kullanılan Problar	40
3.5. Yöntemler	41
3.5.1. Örneklerin FISH Analizine Hazırlanması	41

3.5.2. FISH Tekniğinin Uygulanması	42
3.5.3. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	44
3.5.4. Örneklerin Sperm Kromatin DNA Analizine Hazırlanması	47
3.5.5. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi	47
3.6. Kullanılan İstatistiksel Analiz Yöntemleri	48
4. BULGULAR	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	63
6. KAYNAKLAR	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ÜYT	Üremeye Yardımcı Teknikler
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
ICSI	Mikroenjeksiyon uygulaması (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection)
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
SCD	Sperm Kromatin DNA Testi
FSH	Folikül Stimulan Hormon
LH	Lüteinizan Hormon
TRUSG	Transrektal Ultrasonografi
PKOS	Polikistik Over Sendromu
cm	Santimetre
cm ³	Santimetre küp
HSG	Hidrosalpingografi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
°C	Derece santigrat
ml	mililitre
μ	10 ⁻⁶
T	Testosteron hormonu
AZF	Azoospermia Factor bölgesi (Y kromozomu üzerinde)
DFI	DNA fragmantasyon indeksi
VKİ	Vücut Kütle indeksi
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
HCl	Hidrojen Klorür

TABLO DİZİSİ

	Sayfa
Tablo 1. İnfertil Erkeğin Sorgulanmasında Öykü	20
Tablo 2. İnfertil Erkeğin Sorgulanmasında Fizik Muayene	21
Tablo 3. Semen İncelemesinin Normal Değerleri (5)	23
Tablo 4. Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi	26
Tablo 5. Serum Hormonları ile Erkekte Klinik Bulgular Arasındaki İlişki	28
Tablo 6. Hasta ve Kontrol Grubu için Anket formu	37
Tablo 7. Hasta ve Kontrol Grubunun Özellikleri	38
Tablo 8. Sağlanan Materyaller (AneuVysion kit)	42
Tablo 9. Çalışma Reaktifi Çözeltilerinin Hazırlanması	46
Tablo 10. Açıklanamayan İnfertil Kontrol ve Hasta Grubu Yaş, Sperm/ml ve Motilite Karşılaştırılması	51
Tablo 11. Kontrol Grubu ile Hasta Grubu Arasında Erkek Yaş/SCD Değeri ve Sperm Sayısı/SCD Değerlerinin Korelasyon Değerlerine Göre Sperman Testi ile Karşılaştırma Tablosu	52
Tablo12. Hasta ve Kontrol Grubunun SCD % Değerlerinin Klinik Gebelik Sonuçları ile Karşılaştırılması	53
Tablo 13. Ki Kare Testi ile Yapılan Hasta Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Klinik Gebelik ve Sperm Başları Etrafında Halo Oluşturmasının Yüzelere Göre Dağılımı Tablosu	54
Tablo 14. Otozomal Kromozomal Anomalilerinin Kontrol ve Hasta Grubunda Dağılımı, Ortalama ve p Değerleri* ($p > 0.05$) (A. 13. Kromozomun, B. 18. Kromozomun ve C. 21. Kromozomun Cinsiyet Kromozomlarıyla Birlikteliği)	57
Tablo 15. Cinsiyet Kromozom Anomalilerinin Hasta ve Kontrol Gruplarında Dağılımı, Ortalama ve p Değerleri ($p > 0.05$)	58
Tablo 16. Hasta ve Kontrol Gruplarında Toplam Anomalilerin Dağılımı, Ortalama ve p Değerleri ($p > 0.05$) tablosu	59

ŞEKİLLER DİZİSİ

	Sayfa
Şekil 1. ICSI [1]	14
Şekil 2. Spermatogenez [2]	17
Şekil 3. Fertilizasyon DNA hasarı oranı LOPES 1998 [3]	34
Şekil 4. Sperm çekirdeğinde X kromozomu (yeşil floresan ışımaya) içeren normal sperm.	45
Şekil 5. Sperm çekirdeğinde Y kromozomu (kırmızı floresan ışımaya) içeren normal sperm	45
Şekil 6. Sperm çekirdeğinde 18. Kromozomu (mavi floresan ışımaya) içeren normal sperm	45
Şekil 7. %30 ve üstü DFO oranı: Sperm başı çevresinde halo oluşmayan ve yüksek oranda DNA fragmentasyonu içeren spermlerin görünümü.	54
Şekil 8. %30 üstü DFO oranı: Sperm başı etrafında halo oluşmadığı gözlenir.	55
Şekil 9. %15-30 DFO oranı: Sperm başı etrafında küçük bir halo oluştuğu gözlenir.	55
Şekil 10. %15-30 DFO oranı: Sperm başı etrafında küçük halo oluşumu gözlenir.	55
Şekil 11. DNA fragmentasyonu içermeyen sperm (%15 DFO) (sperm başı etrafında halo oluştuğu gözlenen) (sağda) ile DNA fragmentasyonu içeren sperm (%30 DFO) (sperm başı etrafında halo oluşmadığı gözlenen) (solda).	56
Şekil 12. %15 ve altı DFO oranında, sperm başı etrafında büyük halo oluştuğu (aşağıda) ve %15-%30 DFO oranına sahip, sperm başı etrafında orta büyüklükte halo oluştuğu (yukarıda) gözlenen spermler.	56
Şekil 13. %15 ve altı DFO oranı: Sperm başı etrafında büyük halo oluşumu ve DNA fragmentasyonu içermeyen sperm görüntüsü.	56
Şekil 14. Kromozom 13 (yeşil sinyal) için, normal (bir adet sinyal) ve dizomi (iki adet sinyal) görülen spermler	60
Şekil 15. Kromozom 18 (mavi sinyal) için, normal (bir adet sinyal) ve dizomi (iki adet sinyal) görülen spermler	60
Şekil 16. Kromozom 13 (yeşil) ve Kromozom 21 (kırmızı) için normal sperm (bireysel sinyal)	60
Şekil 17. Kromozom 21 (kırmızı sinyal) için, ok ile gösterilen spermde iki adet kırmızı sinyal görülmektedir (dizomi 21)	61
Şekil 18. Kromozom 18 (mavi) ve X kromozomu (yeşil) için normal sperm (bireysel sinyal)	61
Şekil 19. Kromozom 18 (mavi), Y kromozomu (kırmızı) için normal 18, Y (bireysel sinyal) sperm	61
Şekil 20. Kromozom 18 (mavi) ve Y kromozomu (kırmızı) için; normal 18, Y (bireysel sinyal) (yukarıda) ve normal Y (bir sinyal) ile 18 için dizomi (iki sinyal) (aşağıda) içeren spermler	62
Şekil 21. X kromozomu (yeşil) için, anomalili XX sperm (çift sinyal) (yukarıda) ve normal sperm (tek sinyal) (aşağıda)	62

1.GİRİŞ

İnfertilite, bir yıl süre ile herhangi bir korunma yöntemi uygulanmadan ve düzenli cinsel ilişkide bulunulmasına rağmen gebelik olmaması durumudur [1]. İnfertilite problemi üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10-15'ini etkileyen bir problemdir. İnfertilite problemi olmayan bir çiftin her ovulatuvar siklus başına gebe kalabilme şansı %25 civarındadır. Kontrasepsiyon uygulamayan normal çiftlerin %57'si ilk üç ayda, %72'si altı ay içinde, %85'i bir yıl içinde gebe kalabilmektedir [2]. İnfertil çiftlere sunulan tedavi alternatiflerinin arasında, yüksek başarı oranları ile Üremeye Yardımcı Teknikleri (ÜYT) önemli bir yer tutmaktadır. Genel olarak, İn vitro Fertilizasyon (IVF), kadın overlerinden oositlerin toplanması, laboratuvarında in vitro oositlerin fertilizasyonu ve uterusu embriyoların transferi aşamalarını içerir. Bazı IVF işlemleri spermin direkt oositin içine enjekte edilmesi ile gerçekleştirilir (Mikroenjeksiyon = ICSI). IVF/Mikroenjeksiyon uygulamasında, klinik gebelik başarısı, tanıya bağlı olarak, %30-%40 seviyelerinde düşük oranlar göstermektedir [3].

Sperm analizi, ejakülatın değerlendirilmesidir. Standart analizlerde hastalardan en az iki en çok yedi günlük cinsel perhiz süresine dikkat edilmesi beklenerek mastürbasyon ile steril bir kaba örnek vermesi istenmelidir. Örneğin laboratuvarında verilmesi, mümkün olmayan durumlarda 30 dakikayı geçmeyecek sürede getirmesi istenilmelidir. Makroskobik incelemeye alınan örnek miktar, likefaksiyon zamanı, pH'sı, viskozitesi ve genel görünümü olarak değerlendirilir. Hastanın ilk başvurusunda iki analiz yapılmalıdır. Bu iki analiz arasında geçen zaman yedi günden az, üç haftadan çok olmamalıdır. Sperm analizinin en önemli kısmını mikroskopik inceleme oluşturur. Mikroskopik incelemede sperm sayısı, hareketliliği, yuvarlak hücre sayısı, varsa aglütinasyonun derecelendirilmesi, morfoloji ve yuvarlak hücrelerin sınıflandırılması incelenir [4].

Anöploidi yani anormal kromozom sayısı riski ileri anne yaşı ile birlikte artmaktadır. Anöploidi oluşmasında anneye ait faktör olarak kromozomların ayrışmaması, babaya ait faktörler arasında ise gonadal mozaisizm, translokasyonlar

ve inversiyonlar gösterilebilir. Multicolour FISH testi sperm örneklerinde kromozomal anomali araştırılmasının yapılabildiği yöntemlerden biridir.

FISH testi kullanılarak yapılan araştırmalar, seks kromozomlarındaki artan anöplöidi frekanslarını ortaya koyar. Spermilerin FISH testi ile incelenmeleri, araştırma düzeyinde olmakla birlikte özellikle belirtilen androlojik durumlarda sahip olan erkeklerde çalışılabilir yöntemler arasındadır [5]. Spermier haploid yapıda oldukları için, normalde otozomal kromozomlar için tek sinyal, cinsiyet kromozomları için X veya Y'nin birine ait sinyal alınması gerekmektedir. Örneğın 18, X ve Y kromozomlarına ait ışımaya sinyali alınmasına yönelik prob kombinasyonu kullanıldığında, normalde bütün spermierden 18 nolu kromozom için tek ışımaya sinyali, cinsiyet kromozomları için ise sperm X ya da Y kromozomlarından hangisini taşıyorsa ona ait olan tek ışımaya sinyali alınacaktır. Yani sperm çekirdeğiy 18 ve X kromozomlarına ya da 18 ve Y kromozomlarına ait birer sinyal gösterecektir. Eğer sperm başı, bakılan kromozomlardan birisi için net iki sinyal gösterirken, diğery kromozom için net tek sinyal gösteriyorsa ve kuyruk taşıyorsa, sperm çekirdeğiy birinci kromozom için dizomik olarak değerylendirilir. Işımların net sinyal olarak değerylendirebilmesi için sinyallerin aynı büyüklükte, aynı renkte ve aynı yoğunlukta ve en az bir sinyal büyüklüğü kadar birbirinden ayrılmış olması gerekmektedir. Bakılan sinyalin görölmediğiy nullizomik spermierde beklenen değery, dizomiler ile eşit olacağı için [6-8] ve bu durumun ayrılamama mı yoksa teknik hatadan mı kaynaklandığı bilinemediğiynden değerylendirilmeye alınmaması uygundur [8].

Açıklanamayan infertilite; temel infertilite araştırmaları sonucunda herhangi bir sebep bulunamayan çiftler için kullanılan bir terimdir. İnfertilite polikliniklerine başvuran çiftlerin yaklaşık %30'unda bir neden bulunamaz. Ancak kadının yaşı 35 üzerinde ise açıklanamayan infertilite tanısı daha sıklıkla görölmektedir [9]. Açıklanamayan infertilite diyebilmek için çiftlerden erkekde sperm analizi ile sperm sayısı ve yapısının normal olduğı, kadında ise ovulatuvar siklusların varlığı, anatomik olarak normal uterin kavite ve en azından bir tubanın açık olduğunun gösterilmesi gerekir. Standart infertilite araştırmalarında saptanamayan bazı hastalıkların da azalmış doğurganlığa yol açtığı düşünölmektedir. Tedaviden

bağımsız olarak açıklanamayan infertilite hastalarında kadının yaşı ve infertilite süresi uzadıkça gebelik şansı azalmaktadır [10]. Erkek faktörlü infertilite ve açıklanamayan infertilite vakalarında başarıyla kullanılması açısından son 30 yılda ÜYT'deki en önemli gelişmelerden birisi de ICSI'dir.

ICSI, tek bir spermin oosit sitoplazmasına bırakılması esasına dayanır [11]. Spermin kaliteli morfolojik yapısı ve DNA hasarı olmaması ICSI için önemlidir. Sperm DNA hasarının genomu ne kadar etkilediğini bilmek imkânsızdır. Sperm yumurta ile birleştiğinde embriyonun kendini tamir etme şansı olsa da embriyonun gelişim hızı ve implantasyon tehlikesindedir [12].

İnfertilite değerlendirilmelerinde bu durumun spermin DNA yapısında meydana gelen defektlerle ilişkili olduğu görülmektedir. Yapılan çok sayıdaki in vivo ve in vitro çalışmalarla bu defektlerin infertilitedeki rolü ortaya konulmaktadır. DNA defektli spermatozoa oranları arttıkça gebe kalma şansı azalmakta ve ÜYT için başvurular artmaktadır [13]. ICSI uygulamasında bu verilerin önemi: Spermin hasarlı DNA yapısında olmasına rağmen fertilizasyonun gerçekleşebileceği ve neticede bu hasarlı genetik materyali taşıyan embriyoların oluşabilme ihtimalinin olmasıdır. Dolayısıyla DNA defektli spermatozoa oranları bilinirse hem başvuran çiftlerde fertilizasyon durumları hem de yapılacak ÜYT uygulamalarında embriyonun maruz kalabileceği riskler kısmen tahmin edilebilir [14].

İnfertil çiftlerde uygulanan ÜYT'de özellikle spermatozoon nükleer kalitesi kesin olarak belirlenememektedir. Yapılan çalışmalarda sperm analiz parametreleri (sperm konsantrasyonu, motilitesi, morfolojisi) ve sperm anöploid oranları arasındaki ilişki gösterilmiştir. Yüksek sperm anöploidisi oranı ÜYT'in başarısında negatif bir parametredir. Anöploid ve diploid sperm üretimine yatkınlık kromozomal olarak anormal konseptus riskini arttıracaktır. Sonuç olarak bu durum implantasyon başarısızlığı ve/veya gebelik kayıplarına yol açacaktır. Özellikle ÜYT'in ICSI'nin gelişmesi ile de novo kromozom anomalisi bulunan çocuk sahibi olma riskinin arttığı bildirilmektedir [15].

Bu çalışmada infertilite teşhisi konmuş, açıklanamayan infertilite tanısı alan ve ICSI uygulaması sonucu gebelik elde edilememiş hasta grubunun spermiyogram analizinde spermde anploidide (sperm-FISH testi ile) ve sperm DNA fragmantasyonu incelenmesini amaçlanmıştır. Bunun için spermiyogram örnekleri sperm-FISH analizine alınarak anploidide araştırılmıştır. Ayrıca DNA kromatin ve fragmantasyonunu saptamak için Sperm Kromatin DNA Testi (SCD) alışılmıştır. Her iki çalışma birbiriyle ve hastanın klinik bulgularıyla karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite Nedenleri

İnfertilite, bir yıl süre ile herhangi bir korunma yöntemi uygulanmadan ve düzenli cinsel ilişkide bulunulmasına rağmen gebelik olmaması durumudur [1]. İnfertilitenin çiftlere oranı değerlendirildiğinde: %30-40 oranında erkek faktörünün, %40-%50 oranında kadın faktörünün ve %25 oranında ise her iki çifte bağlı faktörlerin sebep olduğu ortaya çıkmaktadır. %10-15'inde ise tüm araştırmalara karşılık infertiliteyi açıklayabilecek bir neden bulunmamaktadır.

Kadındaki en önemli infertilite sebepleri yumurtlama bozuklukları, endometriozis ve tüplerin hasarlı veya tıkalı olmasıdır. Erkeklerde görülen infertilite nedenleri arasında ise sperm sayısının, hareketliliğinin yetersiz olması ve bazı durumlarda da sperm hücrelerinin yapısının anormal olmasıdır. Kadın fertilitesindeki yaşa bağlı azalmanın mekanizmaları büyük oranda hızlanmış foliküler atrezi ve yaşlanan oositlerde anöploidi insidansındaki artıştır. Fertilitiyi etkileyen diğer önemli faktörler arasında yaşam stili ve çevresel faktörler de sayılabilir. Bunlardan obezite, sigara içimi, aşırı alkol tüketimi, kafein tüketiminin fazla olması gibi durumlar fertilitiyi olumsuz etkileyebilmektedir. Bu yüzden gebelik isteyen çiftlerin bu zararlı çevresel faktörlerden uzaklaşması fertilitite şanslarını artıracaktır [16].

Normal bir çiftin bir ay içerisinde gebe kalma şansları %20-25, altı ay içerisinde %72 ve bir yıl içerisinde ise %85'dir. Gebeliklerin çoğu ovulasyon günü veya ovulasyondan önceki altı gün içerisinde bulunan cinsel ilişki neticesinde görülür. Sadece ovulasyonu takip eden günlerde bulunan cinsel ilişkilerin çok azı gebelikle sonuçlanır. Hem erkek hem de kadın için 24 yaşında fertilizasyon oranları en yüksektir. Fertilizasyon oranları bu yaştan sonra her iki cinste de azalmaya başlar [17].

2.1.1. Erkek İnfertilitesi

Çiftlerin yaklaşık %35'inde infertiliteye sebep olan faktör erkeğe bağlı nedenlerdir. Bu nedenle, infertile çiftin değerlendirilmesinde en önemli başlangıç testi semen analizidir. Sperm analizi, belli bir prosedüre uygun olarak alınan ejakülatın değerlendirilmesidir [18].

Erkek infertilitesi değerlendirilirken, hastanın öyküsü ayrıntılı olarak alınmalıdır. Hikayede gelişimsel bozukluklar, testiküler infeksiyonlar, travmalar, kullanılan ilaçlar, alışkanlıklar sorulmalıdır. Fizik muayenede ürogenital muayenenin yanında tiroid bezi ve jinekomasti açısından meme muayenesi de yapılmalıdır.

Cinsel perhiz süresince gün başına sperm sayısında %25 artış olur, sperm motilite ve morfolojisinde değişiklik olmaz. Bu süre bir haftayı geçerse motilitede azalma bildirilmiştir. Semen analiz sonucuna göre mililitredeki spermatozoa sayısı 15 milyondan az olursa oligozoospermi, motil sperm sayısı %40'dan az olursa astenozoospermi, normal morfolojiye sahip sperm oranı Kruger kriterlerine göre %4'ten düşüğe teratozoospermi olarak tanımlanır. Semen analizinde sperme rastlanamaması durumunda semen 3000 devirde 15 dakika santrifüj edilmeli, oluşan pellet mikroskop altında incelenerek sperm aranmalıdır. Bu incelemede sperm bulunamazsa azoospermi olarak tanımlanır [19], [20], [21].

Normal semen analizi olan kişilerde genelde hipotalamus-hipofiz-testis aksında bir bozukluk yoktur. Her erkeğe rutin endokrin değerlendirme gerekli değildir. Minimum hormonal değerlendirme için, serum FSH ve testosteron düzeylerinin ölçülmesi yeterlidir. Hormonal düzey ile altta yatan patolojiyi tahmin etmek mümkün olabilir. Sperm konsantrasyonu 5-10 milyon/mL'nin altında olan, bozulmuş cinsel fonksiyonu olan, özel endokrin bozukluğu düşündürülen bulgular saptanan erkeklerde endokrin değerlendirme yapılması gereklidir. Belirgin FSH yüksekliği ve 5 milyon/mL altında sperm sayısı varlığı testiküler yetmezliğin bir göstergesidir. FSH, LH ve testosteron düzeylerinde düşüklük olması kazanılmış hipogonadotropik hipogonadizmi düşündürür [22], [23].

Ejakulat volümü, 1 mL'nin altında veya hiç ejakulat yoksa retrograd ejakulasyon, ejakulatuvar kanal obstrüksiyonu, hipogonadizm veya bilateral konjenital vaz agenezisi ayırıcı tanıda düşünölmelidir.

Hipogonadizm ve bilateral konjenital vaz agenezisi tanısı ekarte ediliyorsa retrograd ejakulasyon tanısını koymak için postejakulatuvar idrar analizi yapılmalıdır. Postejakulatuvar idrar, 10 dakika 300rpm devirde santrifüje edildikten sonra alınan pellet mikroskopta 400X büyütmede incelenmelidir.

Postejakulatuvar idrar analizinde sperm görölmesi aspermili veya azospermili bir hastada retrograd ejakulasyon tanısını koydurur. Tanı için her sahada 5-10 sperm görölmesi yeterlidir. Postejakulatuvar idrar analizinde sperm görölmeven, serum testosteronu normal olan, fizik muayenesinde palpe edilebilen iki taraflı vaz deferensleri bulunan düşük ejakulat volumlü bir hastada transrektal ultrasonografi (TRUSG) yapılmalıdır.

Normal seminal keselerin ön arka çapları 1,5cm'den azdır. Seminal veziküllerde ve ejakulatuvar kanallarda dilatasyon komplet veya parsiyel obstrüksiyonu düşöndürür. Varikosel, spermatozel, vaz yokluğu, epididimal endurasyon ve testiküler kitle gibi çeşitli skrotal patolojiler palpasyon ile saptanabilir. Palpasyonun çok kesin bilgi vermediği testiküler kitle veya subklinik varikosel varlığını ortaya koymak için skrotal ultrasonografi yapılmalıdır [24].

Bu testlerin yanında immünolojik testlerden anti-sperm antikörlerinin değeriendirilmesi, sperm servikal mukus etkileşimi, bio-assaylerde kreatin kinaz değeriendirmesi, akrozomal enzim aktivitesi tayini, fonksiyon testlerinden hiposmotik şişme testi, sperm penetrasyon testi, hemizona testi de diğer sperm değeriendirme yöntemleri arasındadır.

Erkekke genetik problemler %5-15 arasında değışmektedir. Özellikle azospermi veya şiddetli oligoastenoteratospermisi olan erkeklerde anormal karyotip görölme olasılığı vardır. ÜYT ile IVF uygulamalarındaki güncel gelişmeler

sonucunda erkek faktörüne bağlı olarak çocuk sahibi olamayan infertil çiftlerde uygulanan mikroenjeksiyon teknikleri ile eskiden gebe kalması imkansız olarak tanımlanan hastalarda fertilizasyon ve ardından gebelik elde edilebilmektedir [22].

2.1.2. Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PKOS) doğurganlık çağındaki kadınlarda en sık görülen endokrin bozukluktur. Kronik anovulatuvar infertilitenin en sık nedeni olan PKOS, multisistemik reproduktif metabolik bir sendrom olarak; Tip 2 diyabet, dislipidemi, kardiyovasküler hastalık ve endometriyal karsinoma gibi uzun dönem sağlık riskleri taşır. Sendromun prevalansı yaklaşık %4-8 olarak bildirilmektedir [25, 26].

İlk kez 1935 yılında Stein Leventhal tarafından, yedi hastadan oluşan bir seride polikistik overler ve amenore birlikteliği şeklinde rapor edilmiştir [27]. PKOS'da teşhis, 2003 yılında European Society of Human Reproduction and Embryology ve American Society for Reproductive Medicine'nin polikistik over sendromu konsensus çalıştay grubu tarafından bildirilen Rotterdam kriterleri ile konulmaktadır. Buna göre teşhis için aşağıdaki üç kriterden en az ikisinin olması gerekmektedir;

- * Ultrasonda overlerde polikistik görünüm (12 veya daha fazla periferik yerleşimli 2-8 mm olan folikül ya da artmış over hacmi >10 cm³)
- * Oligo veya anovülasyon
- * Hiperandrojenizmin klinik veya biyokimyasal bulguları.

PKOS gelişimi adolesan çağda başlar, pubertede hızlı ve fazla kilo alımı ile devam eder. Genetik çalışmalar ve familial özellikleri ve genetik geçişi olduğu bildirilmiştir [28].

PKOS anovulatuvar infertilitenin en sık görülen nedenidir, fakat anovulasyon mekanizması net olarak bilinmemektedir. Polikistik overlerdeki multipl antral foliküllerin preovulatuvar faz öncesine gelişimi olamamaktadır. FSH'ı arttıran tedavilerle hastaların çoğunda ovulasyon sağlanabilir, fakat normal siklusun erken foliküler fazındakine göre serum FSH seviyesi hafif düşük olmasına rağmen PKOS'daki primer anormallik FSH eksikliği değildir [29].

Anovulasyon nedeniyle infertilite tedavisine başvuran kadınların yaklaşık %80-90'ında PKOS bulunur [30]. Normal ağırlıktaki PKOS kadınların %30-40 ve obez kadınların %80'inde görülen hiperinsülinemi anovulasyonla ilişkilidir [31]. PKOS kadınların %40'ında artmış LH konsantrasyonu olarak görülen anormal gonadotropin sekresyonu vardır. Anovulatuvar PKOS kadınlarda endojen FSH'da bir fonksiyonel yetmezlik görülmektedir [9]. Yüksek oranda spontan gebelik kaybına sahip oldukları ile ilgili belirtiler olmakla birlikte bunların mekanizmaları tam açık değildir. PKOS'da tekrarlayan gebelik kaybı prevalansını tayin etmek için ilave çalışmalar gerekmektedir.

2.1.3. Tubal Faktör

Tubal ve peritoneal faktörler kadın infertilitesinin %20-40'ını oluşturmaktadır. Tubal faktör nedeniyle yapılan IVF uygulamalarında kastedilen tubal obstrüksiyondur. Tubal pasajı değerlendirmede kullanılan en yaygın yöntem hidrosalpingografi (HSG) siklusun 6-10. günleri arasında yapılır. HSG'nin tubal tıkanıklığı saptamada sensitivitesi % 80'lerde iken, spesifitesi % 90'a yakındır. HSG'de bilateral tubal patoloji saptanmışsa ileri tetkik gerekmektedir. Tubal ve peritoneal patolojilerin tanısında altın standart tanısal laparoskopidir. Tubal faktörlerin tedavisi cerrahidir. ÜYT'deki başarı oranlarının giderek artmasıyla, tubal faktör infertilitesinde cerrahi yaklaşım endikasyonları giderek azalmaktadır.

Tubal infertiliteye sebep olabilecek patolojiler: pelvik adezyonlar, pelvik inflamatuvar hastalık, geçirilmiş pelvik operasyonlar, ekstragenital orijinli enfeksiyonlar, genital tüberküloz, endometriozis ve tubal nedenlerdir (tubal polipler ve hidrosalpenks) [32].

Mekanizması çok net olmasa da şu faktörler üzerinde durulmaktadır. Mekanik etki, embriyo ve gametotoksisite, endometrial reseptivitede değişiklikler ve endometrium üzerine doğrudan etki ile intrauterin sıvı birikimi [33].

Tubaların sıvı ile dolması anlamına gelen hidrosalpenks varlığında IVF sonuçları daha düşük olmaktadır. Hidrosalpenks özellikle ultrasonografi ile gözlemlendiğinde, IVF başarısını oldukça azaltmaktadır. Tubal onarım sonrası ise başarı hızları normale dönmektedir.

İnflamatuvar karakterdeki hidrosalpenks sıvısının uterin kaviteyle temasında endometrium ve embriyo üzerinde toksik etki yaptığı ve implantasyonu böylece engellediği düşünülmektedir. Hidrosalpenksi olan çoğu kadında endometrial integrin azalmış ve salpenjektomi sonrası normale dönmüştür [34].

Ana mekanizmanın over stimülasyonu sırasında daha da artan hidrosalpenks içi sıvının uterus kavitesine akışı olduğu düşünülmektedir. Bu sıvı endometrial ortamın implantasyon özelliğini azaltmaktadır. Hidrosalpenks olgularında gebelik oranı, implantasyon ve doğum oranları azalırken, gebeliklerin erken gebelik kaybı ile sonlanma olasılığı artmaktadır.

2.1.4. Endometriozis

Endometriozis endometrial dokunun, gland ve stroma olarak, uterus kavitesinin dışında yerleşmesidir. En sık implantasyon yerleri, pelvik organlar ve periton olmakla birlikte, farklı doku ve organlarda da gözlemlenir. Endometriozis

lokal ve sistemik inflamasyon ile karakterize, infertilite teşhisi koyulmuş üreme çağındaki kadınların %20-40'ında görülen bir hastalıktır [35].

Endometriozisli pek çok kadının fertilitesi korunmakta, gebe kalıp doğum yapabilmektedir. Bununla birlikte fertil kadınlarda ayda yaklaşık %20 olan doğurganlık oranının endometriozisli olgularda %2-10 [36], donor inseminasyon sikluslarında minimal endometriozisi olanlarda %36, olmayanlarda %12 olduğu [37], minimal ve hafif endometriozis olgularında doğurganlığın fertil kontrol olgularından farklı olmadığı değişik çalışmalarda gösterilmiştir [38, 39]

Bilinen geleneksel tedavi yöntemleriyle 35 yaş ve altı erken evre endometriozis olgularında 1 yıl, ileri evre endometriozis veya 35 yaş üstünde ise 6 ay gebelik denemesinden sonra ÜYT'in gündeme gelmesi gerekmektedir.

Endometriozisin yol açtığı inflamasyon, azalttığı over rezervi, oosit kalitesi ve implantasyon üzerine olumsuz etkisi, oosit toplanmasını zorlaştırması gibi nedenlerle IVF başarısını düşürdüğü ileri sürülmüştür [40]. Fertilizasyon, gebelik ve implantasyon hızlarını sırayla %81, %56, %86 oranlarında azaldığı [41], siklus iptallerinin %50 olduğu [42], ancak kümülatif gebelik oranlarının diğer infertilite nedenlerinden farklı olmayarak yüksek olduğu [43] rapor edilmiştir.

2.1.5. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan infertilite temel infertilite araştırmaları sonucunda herhangi bir sebep bulunamayan çiftler için kullanılan bir terimdir. İnfertilite polikliniklerine başvuran çiftlerin yaklaşık %30'unda bir neden bulunamaz. Ancak kadının yaşı 35 üzerinde ise açıklanamayan infertilite tanısı daha sıklıkla görülmektedir [9].

Açıklanamayan infertilite oranı, hangi testlerin yapıldığına bağlı olarak değişebilir. Tanıda normal sperm analizi, ovulatuvar siklusların varlığı, normal uterin

kavite ve en azından bir tubanın açık olduğunun gösterilmesi gerekir. Bu gruba giren hastaların normal dağılımlı bir üreme etkinliğinin alt sınırda olduğu kabul edilir. Bu hastalarda sperm ve oosit fonksiyonunda, fertilizasyon, implantasyon veya erken embriyo gelişiminde bozukluklar olduğu düşünülmektedir. Standart infertilite araştırmalarında saptanamayan bazı hastalıkların da azalmış doğurganlığa yol açtığı düşünülmektedir. Bu durumlar; minimal ve hafif endometriozis, subklinik azalmış over rezervi, tubal fonksiyon bozuklukları gibi durumlar olabilir. Tedaviden bağımsız olarak açıklanamayan infertilite hastalarında kadının yaşı ve infertilite süresi uzadıkça gebelik şansı azalmaktadır. Bu hastalarda aylık fekundite %2-4'dür ve normal çiftlerin (%20) oldukça altındadır [10]. Açıklanamayan infertilite hastalarının çoğu, kadının yaşı ve infertilite süresine bağlı olarak, kendiliğinden gebeliğe ulaşır. İyi prognozlu hastalarda spontan gebelik oranları daha yüksektir [44]. Genel olarak infertilite süresi kısa ve kadının yaşının genç olduğu durumlarda beklemek tercih edilmeli, diğer hastalarda konsepsiyonu hızlandırmak için tedavi başlanmalıdır. Tedaviye karar veren hastalarda ise 3 siklus klomifen sitrat veya gonadotropinlerle ovülasyon indüksiyonu ve intrauterin inseminasyon sonrası başarısız olunursa ÜYT'e geçilmelidir.

2.2. Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYT)

İnfertilite sebebiyle başvuran çiftlerin ilk arzusu fizyolojik yoldan çocuk sahibi olabilmektir. Erkeklerde tedaviyi takiben fizyolojik yoldan eşlerinde gebeliğin sağlanabileceği birçok düzeltilebilir faktör bulunmaktadır. Böyle durumlarda ÜYT kullanılması gerekmektedir. Buna rağmen olguların önemli bir kısmında fizyolojik yollardan gebelik sağlanamamaktadır. ÜYT'in kullanılması ile infertilite olgularında sorun büyük oranda çözümlenebilmektedir. Günümüzde iki çeşit ÜYT uygulaması yapılmaktadır: IVF ve ICSI.

2.2.1. Invitro Fertilizasyon (IVF)

Genel olarak, In vitro Fertilizasyon (IVF), kadın overlerinden oositlerin toplanması, laboratuvarında in vitro oositlerin fertilizasyonu ve uterusu embriyoların transferi aşamalarını içerir.

2.2.2. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

Bu yöntem, tek bir spermın oosit sitoplazmasına bırakılması esasına dayanır (Mikroenjeksiyon=ICSI) (Şekil-1). ICSI fertilizasyon sürecinde kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve hiperaktivasyon sperm yumurta füzyonu gibi birçok basamağı atlar. ICSI sonrası fertilizasyon başarısızlığı, sperm-yumurta füzyonundan sonra gelişen fertilizasyon basamaklarındaki aksaklıklardan kaynaklanır. Bu durumlar:

1. Oosit aktivasyonundan olmaması
2. Pronükleus apozisyon bozuklukları (%23)
3. Embriyonun ilk mitotik bölünmesinin metafaz bölümünde duraklama (%13)
4. Sperm veya oosit DNA'sında fragmantasyon (%50)
5. Sperm DNA'sının prematür kromozom kondensasyonu (%6)
6. Sperm başı dekonpensasyonunun oluşmaması (%11)
7. Spermın oosit atılması (% 23) [45, 46].

ÜYT'de kullanılmadan önce semenin hazırlanması gerekir. Bu yöntemlerin hepsinde de seminal plazma ortamdan uzaklaştırılırken, motilitesi bulunmayan sperm ve lökositler elimine edilerek motil sperm seçimi yapılır.

IVF/Mikroenjeksiyon tedavisinde, klinik gebelik başarısı, tanıya bağlı olarak, %30-%40 seviyesinde düşük başarı oranları göstermektedir [3]. Fakat günümüzde yeni teknikler, özellikle ICSI gibi girişimler önceden kabul edilen IVF

endikasyonlarının daha ötesine geçerek, klasik IVF'in çözüm üretemediği hasta grubunda da başarılı sonuçlar alınmasını sağlamıştır. Bu nedenle de klasik IVF uygulamaları geri planda kalmıştır.



Şekil 1. ICSI [45].

2.3. Spermatogenez

İnsan vücudundaki en karışık hücresel farklılaşma olaylardan birisi olan spermatogenez, spermatogoniumdan olgun spermiumun geliştiği bir süreçtir [47, 48]. İnsanlarda tüm spermatogenik süreç yaklaşık olarak 64 gün sürer [49]. Olgun spermatozoanın ejakülatta görülmesi ise 74 gün alır. Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerde meydana gelir. Bu bölgede, Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar olmak üzere iki tip hücre vardır. Vitellus kesesinin duvarında gelişen endodermal kökenli germ hücreleri, embriyonik hayatta testise göç ederek seminifer tübüllere yerleşir ve spermatogonium adını alırlar. Puberte öncesinde seminifer epitelin çok büyük bir kısmını Sertoli hücresi oluşturur. Spermatogoniumların gelişimi, hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle puberteden hemen önce başlar, yaşam boyu devam eder ve seminifer epitelyumdaki çoğunluğu ele geçirir [48, 49]. Spermatogoniumlar, Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan bazal kompartmanda yer alırken, primer ve sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiumlar ise adluminal kompartmanda yer alır. Spermatogenez; spermatogonial, spermatosit ve spermatid olmak üzere 3 ayrı fazda incelenir [50].

2.3.1. Spermatogonial Faz (Spermatositogenez)

Seminifer tübül bazal membranı üzerinde oturan spermatogoniumlar, kk diploid germ hücreleridir. Bu hücreler puberteye kadar bölünmezler [50]. Pubertede spermatositogenez başlar, spermatogoniumlar mitoz bölünmeyle çoğalarak, yerlerine yeni gelecek spermatogoniumları ve en nihayetinde primer spermatisitleri oluşturur [48, 50]. Spermatogoniumlar ışık mikroskobik incelemede nükleuslarının belirgin koyu görünümleriyle ayırt edilirler [47]. İnsan spermatogoniumları rutin histolojik preparatlardaki görünümleri temel alınarak  tipe ayrılmıştır:

1-Koyu Tip A spermatogoniumlar: Seminifer epitelin kök ya da rezerv hücreleri olarak değerlendirilirler. Düzensiz aralıklarla bölünerek, hem yeni koyu Tip A spermatogoniumları, hem de açık Tip A hücreleri meydana getirirler [48, 50, 51].

2-Açık Tip A spermatogoniumlar: Koyu Tip A hücrelerle aynı özelliklere sahiptirler. Testosteronun etkisiyle mitoz bölünmeyle çoğalırlar. Hem yeni açık Tip A hücreleri ve hem de Tip B hücreleri meydana getirirler [50].

3-Tip B spermatogoniumlar: Açık Tip A spermatogoniumlara benzerler. Mitozla bölünerek primer spermatisitleri meydana getirirler [50].

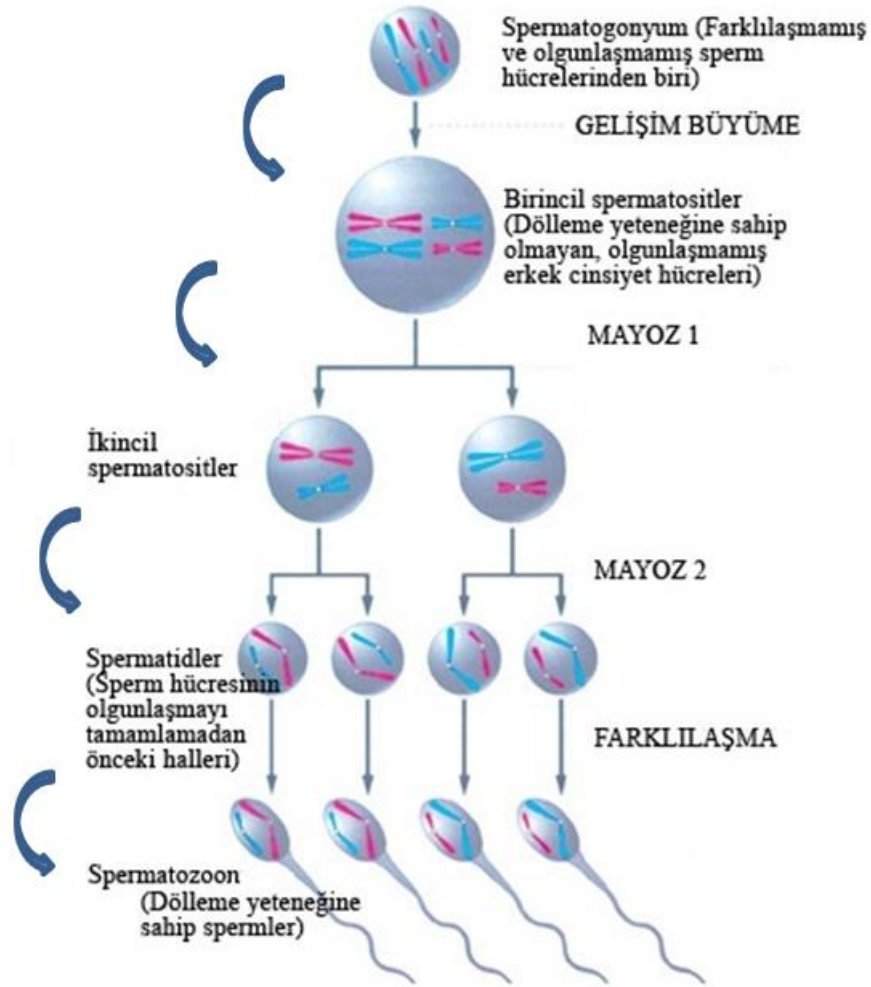
2.3.2. Spermatisit Fazı (Mayoz)

Primer spermatisitler oluştuktan kısa bir süre sonra (preleptoten aşamadında) bazal kompartmandan adlüminal kompartmana g ederler. Bu hücreler mayoz başlamadan önce DNA'larını replike ederler [50]. Böylece her bir primer spermatisit diploid kromozoma ve $2n$ miktarda DNA'ya sahip olur. Ardı ardına gelen iki mayoz bölünme, hem kromozom sayısında, hem de DNA miktarında azalma ile sonuçlanır. İkinici mayoz bölünme ile her bir sekonder spermatisitten, n (haploid) miktarda

DNA'ya ve aynı miktarda kromozoma sahip iki adet spermatid meydana gelir [48, 50].

2.3.3. Spermatid Fazı (Spermiogenez)

Spermatidler 8µ çapında, küçük yuvarlak haploid hücrelerdir. Tek bir açık Tip A spermatogoniumdan meydana gelen bütün spermatidler, hücreler arası köprülerle birbirlerine bağlıdır. Bir spermatid oluştuktan sonra, bir daha bölünme olmaz. Haploid spermatidler, olgun spermiumu meydana getirecek olan ve spermiogenez olarak adlandırılan bir farklılaşma sürecine girerler. Yoğun bir transformasyonun gerçekleştiği bu süreçte, nükleus karakteristik şeklini alır. Sonrasında artık sitoplazma elimine edilir, akrozom ve kuyruk gelişir. İnsanlarda bu aşama yaklaşık 16- 22 gün sürer [48, 50, 52, 53].



Şekil 2. Spermatogenez [4].

2.3.4. Spermatogenezin Genetik Özellikleri

Y kromozomunun uzun kolu (Yq) üzerinde spermatogenezden sorumlu üç adet bölge vardır: Azoospermia Factor (AZF) olarak adlandırılan AZFa, AZFb ve AZFc (DAZ) bölgeleri. Bu bölgelerde spermatogenez sağlayan çok sayıda gen yer alır. AZFa bölgesindeki genlerin kaybı Sertoli cell only sendromundan, AZFb matürasyon arrestinden, AZFc bölgesindeki genlerin kaybı ise değişik derecede oligo-azoospermiden sorumludur. Her ne kadar, genotip/fenotip arasında kesin bir ilişki kurulamamış olsa da, çoğu çalışmalar bu görüşü desteklemektedir. İdiopatik

infertilite olgularının yaklaşık %40'ının androjen yetersizliği sonucu oluşan azoospermi ya da oligozoospermiye bağlı olduğu gösterilmiştir [54].

2.3.5. Endokrin Faktörler

Hipofizden salgılanan gonadotropinler olan FSH ve LH spermatogenezin esas düzenleyicileridir [49, 51, 55, 56]. LH, Leydig hücrelerini testosteron sentezlemesi için uyarır [55]. Testosteronun testiste dolaşımdakinin en az 200 katı kadar bulunması, spermatogenik hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için gereklidir. FSH ve testosteron normal spermatogenez için yaşamsal önem taşır [48, 55]. Germ hücreleri FSH ve testosteron reseptörleri içermediklerinden, bunların esas etki alanı Sertoli hücreleridir [38, 39, 54]. FSH'un spermatogonial proliferasyonu uyarıcı etkisi sayesinde, Sertoli hücreleri spermatogenezde primer düzenleyici olarak rol oynarlar [38, 41]. Testosteron, Sertoli hücrelerinin spermatidlere yapışmasını, dolayısıyla spermiogenezi indükler. Ayrıca peritübüler hücreleri de etkiler. Hem FSH hem de testosteronun, germ hücre apoptozisini Sertoli hücreleri aracılığıyla indirekt olarak baskıladığı gösterilmiştir. Seminifer epitelin hormonal uyarıya yanıtı, lokal faktörlerin etkisiyle düzenlenir [48, 57].

2.3.6. Diğer Faktörler

Spermatogenezin kontrolünde, hücreler arası ilişkiler (Sertoli hücresi, Leydig hücresi, germ hücresi, peritübüler miyoid hücreler), sitokinler, büyüme faktörleri, enzimler, transport proteinleri ve adezyon molekülleri etkilidir. Kalsiyum, magnezyum, bakır ve çinkonun spermatogenez için önemli olduğu bilinmektedir. Çinko, spermium nükleusunun kromatin yoğunlaşmasında işlev görür.

Spermatogenik hücreler, özellikle spermatositler toksik ajanlara karşı çok duyarlıdır. Beslenme bozuklukları, sistemik hastalıklar, yaygın ya da lokal enfeksiyonlar, genetik bozukluklar, testiküler ısının yükselmesi, steroid hormonlar ve onlara benzer ilaçlar, kemoterapötik ilaçlar, antimetabolitler, kadmium tuzları, kurşun ve pestisitler gibi toksik ajanlar, mutajenler ve radyasyon spermatogenezi etkileyen faktörler arasında sayılabilir. Bu ajanlar, hem sperm üretimini azaltırlar hem de kromozomal ve morfolojik anomalilere yol açarlar [48, 51, 58].

2.4. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi

İnfertilite, bir yıl korunmasız cinsel birleşmeye rağmen gebeliğin oluşmaması olarak tanımlanır. İnfertilite olgularının yaklaşık %20'si tamamıyla bir erkek faktöründen kaynaklanmaktadır. %30-40'ında ise hem erkek hem de kadın faktörleri birlikte görülür. Dolayısıyla infertil çiftlerin yarısında en az bir erkek faktörü söz konusudur [17]. İnfertil erkeğin değerlendirilmesine ayrıntılı öykü alınması ile başlanır. İlk değerlendirme fizik muayene ve başlangıç laboratuvar incelemeleri ile tamamlanır. Öykü, fizik inceleme ve laboratuvar sonuçlarına göre ayırıcı tanı için ek özel testlere ihtiyaç duyulabilir (Tablo 1 ve Tablo 2).

Tablo 1. İnfertil Erkeğin Sorgulanmasında Öykü

İnfertilite Öyküsü: <ul style="list-style-type: none"> - Süresi - Önceki gebelikler - Önceki tedaviler - Eşin durumu ve aldığı tedaviler - Kontrasepsiyon (vazektomi) 	Cerrahi Öykü: <ul style="list-style-type: none"> - Orşiyektomi (testis kanseri, torsiyon) - Retroperitoneal yaralanma - Pelvik yaralanma - Pelvik, inguinal, skrotal cerrahi - Mesane boynu operasyonları - Prostatektomi 	
Seksüel Öykü: <ul style="list-style-type: none"> - Potans - Kayganlaştırıcılar - Seksüel ilişki zamanlaması - İlişki sıklığı - Mastürbasyon sıklığı 	Enfeksiyonlar: <ul style="list-style-type: none"> - Viral-Febril - Mumps orşiti - Veneral - Tüberküloz 	
Çocukluk Çağı: <ul style="list-style-type: none"> - Genitoüriner anomaliler - İnmemiş testis ve orşiopeksi - Herniorrafi - Mesane boynu Y-V plasti - Testiküler torsiyon - Testiküler travma - Puberte başlangıcı 	Gonadotoksinler: <ul style="list-style-type: none"> - Kimyasallar (Pestisitler) - İlaçlar - Termal - Radyasyon - Sigara - Keyif vericiler 	
Tıbbi Öykü: <ul style="list-style-type: none"> - Sistemik hastalıklar - Diyabet - Multiple skleroz - Hipo-Hipertiroid - Tedaviler 	Aile Öyküsü: <ul style="list-style-type: none"> - Kistik fibrozis - Androjen reseptör eksikliği - Birinci derece yakınlarda kısırlık 	Sistemlerin Gözden Geçirilmesi: <ul style="list-style-type: none"> - Solunum yolu enfeksiyonları - Anosmi - Galaktore - Görme alanı bozukluğu

Tablo 2. İnfertil Erkeğin Sorgulanmasında Fizik Muayene

Genel Vücut İncelemesi Vücut kıllarında azalma Jinekomasti Erukoid oranlar	Skrotum Testis hacmi Epididim Vaz Deferens Varikozel Hemi-spermatozel-hidrozel
Penis Peyroni Konjenital penil krvatür Hipospadias Epispadias Mikropeni	Parmakla Rektal İnceleme Prostat büyüklüğü Prostat/Seminal kese kitleleri ve endurasyonu Bulbokavernöz refleks

Erkeklerde infertiliteye yol açan durumları tespit etmek değerlendirmenin temel amacıdır. İnfertiliteye yol açan özel bir neden bulunursa tedavi ona yönlendirilerek sonuca gidilir. İnfertilitenin araştırılmasına genel üreme hikayesinin alınması ve bir ay arayla 2 semen analizi yapılarak başlanır.

Üreme hikayesinde;

- Cinsel ilişki sıklığı ve zamanlaması,
- İnfertilite süresi ve önceki fertilizasyon durumu,
- Çocukluk hastalıkları,
- Çocukluk ve puberte gelişimi,
- Sistemik hastalıklar ve geçirdiği ameliyatlara,
- Cinsel yaşam,
- Cinsel yolla geçen hastalıklar,
- Gonadal toksinlere maruz kalma sorgulanmalıdır [59].

2.4.1. Semen Analizi

Sperm analizi, ejakülatın değerlendirilmesidir. Fertilité potansiyeline tek bir sperm analizi ile karar verilmemelidir. Şekil 2’de incelendiği gibi spermatogenez 70 günlük bir süreç içinde olmaktadır. Bu nedenle 70 gün önceki herhangi bir zararlı etki sperm özelliklerini etkileyebilir. Bu süre epididimisteki sperm matürasyonu ve transportu için gereken 12-21 günlük süreyi de kapsamaktadır. Yakın geçmişte olan ateşli bir hastalık sperm kalitesinde 3 aya kadar süren bozukluğa neden olabilir [4].

Her hastanın iki ay aralıklarla yapılan, en az iki ya da üç semen analizi bulunmalıdır. İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde semen analizi çok önemli bir yer tutar. Azoospermi dışında semen analizi, hastaların steril ve fertil gruplar şeklinde kesin ayırımının yapılmasını sağlamaz. Semen parametrelerinin kalitesi azaldıkça istatistiksel olarak gebelik şansı da azalır ama sıfıra inmez. Buna rağmen doğru şekilde yapılmış bir semen analizi infertil erkeğin değerlendirilmesinde önemli bir kriterdir [60].

2.4.2. Semen Toplanması

Klasik semen analizi için incelenecek ejakülat en az 48 saatlik cinsel perhiz sonrasında, masturbasyon ile steril bir kaba alınmalı ve cinsel perhiz yedi günü geçmemelidir. Bu sürenin kısalması sayı ve volümü, uzaması ise hareketliliği olumsuz etkileyecektir. Örnek en geç 30 dakika içerisinde tetkik yapılacak laboratuvara getirilmiş olmalıdır. Ejakülatın makroskopik muayenesinde, görünümü, miktarı, likefaksiyon zamanı, viskozitesi ve pH’sı değerlendirilir. İlk değerlendirme için iki örnek alınmalıdır. İki örnek arasında geçen zaman yedi günden az, üç haftadan çok olmamalıdır. Semen analizinin en önemli kısmını mikroskopik inceleme oluşturur. Mikroskopik incelemede sperm sayısı, hareketliliği, yuvarlak hücre sayısı, varsa aglütinasyonun derecelendirilmesi, morfoloji ve yuvarlak hücrelerin sınıflandırılması incelenir. Bu konu, Dünya Sağlık Örgütü (WHO)

tarafından bir kitap halinde hazırlanmış ve dünyada en çok kullanılan referans kitap haline gelmiştir. WHO'nun 2009 yılında yayınladığı semen analizinin referans değerleri Tablo 3'de değerlendirilmiştir. Bu referans limitler kontrasepsiyonu bıraktıktan sonra 1 yıl içinde eşleri gebe kalan erkeklerin sperm parametreleri referans alınarak hesaplanmıştır [4].

Tablo 3. Semen İncelemesinin Normal Değerleri (5)

Parametre	Alt Referans Limiti
Semen Hacmi (ml)	≥1.5 (1.4-1.7)
pH	≥7.2
Sperm Konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	≥ 15 (12-16)
Toplam Sperm Sayısı (10 ⁶ / ejakülat)	≥39 (33-46)
Toplam motilite (PR + NP, %)	≥40 (38-42)
Progresif Motilite (PR, %)	≥32 (31-34)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	≥4 (3.0-4.0)
Peroksidaz-pozitif lökositler (10 ⁶ / ml)	<1.0
MAR testi (bağlı bulunan motil spermatozoa, %)	<50
Immunobead testi (bağlı bulunan motil spermatozoa, %)	<50
Seminal zinc (mol/ejakülat)	2.4
Seminal fructose (mol/ejakülat)	13
Seminal nötral glukozidaz (mU/ejakülat)	20

PR: progresif motilite; NP: non-progresif motilite
(WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen- 5. Baskıdan alınmıştır).

2.4.3. Semen Makroskopik Değerlendirilmesi

Örneğin verilmesinden itibaren ejakülatın 5-30 dakika içerisinde likefiye olması (sıvılaşması) gerekir. Semen koagüle olmasına neden olan faktörler seminal vezikül, likefiye olmasını sağlayan proteolitik enzimler ise prostat kaynaklıdır. Semen analizi sırasında örneğin viskozitesi daima likefaksiyon sonrası

değerlendirilmelidir. Likefaksiyonun sağlanması için kaptaki ejakülatın 37°C'da bekletilmesi likefaksiyon sürecini kolaylaştırır ve kısaltır. Ayrıca semenin renk, koku, viskozite gibi özellikleri de belirlenerek kaydedilmelidir [4, 60, 61].

2.4.4. Semen Mikroskopik Değerlendirilmesi

Sperm sayısı:

WHO'nun referanslarına göre olması gereken en az sperm sayısı 15 milyon/ml'dir. Bu değer altı oligospermi olarak adlandırılmaktadır. İzole oligospermi nadirdir. Çoğu zaman sebebi bilinmez ve bazen androjen eksikliğine bağlı olabilir. Sayı 10 milyon/ml'den az olursa testosteron ve FSH düzeylerinin bakılması önerilmektedir. Sadece FSH yüksekliği spermatogenezdeki sıkıntıyı gösterir ve tam bir endokrinolojik değerlendirmeye gerek yoktur. Oligospermiye neden olabilecek saptanabilir en sık neden varikoseldir. Bunda da seminal parametrelerde multipl defekt vardır. Ejakülatta spermatozoa hücrelerinin hiç görülmemesi azospermi olarak adlandırılır. Azospermi; yetersiz hormonal stimülasyon (hipogonadotropik hipogonadizm), spermatogenez anormallikleri ya da obstrüksiyon nedeniyle meydana gelebilir [5, 62].

Sperm Hareketliliği (sperm motilitesi):

Motilite kuyruk hareketi gösteren sperm yüzdesidir. Motilitenin değerlendirilmesi likefaksiyondan sonra bir saat içinde yapılmalıdır. Bu süre içerisinde semen oda sıcaklığında saklanmalıdır. Spermin ileri hareketinin kalitesi değerlendirilerek kaydedilmelidir. Hareketlilik; progresif hareketli sperm, hareketli sperm ve hareketsiz sperm olarak üç ana grupta değerlendirilmelidir. Tatmin edici bir sonuç verebilmek için kullanılan sayım kamarasının sayım yapılacak 10 sahası önceden laboratuvar protokolları ile belirlenmeli ve bu karelerdeki değerlendirmelerin sonucu bildirilmelidir. Sayının düşük olduğu durumlarda tüm

karelerdeki (100 kare) spermier kolaylıkla sayılarak kaydedilebilir. WHO tarafından yayınlanan ve semen analizini standardize etmeye yönelik laboratuvar kılavuzu sperm hareketliliğini a, b, c, d olmak üzere 4 kategoride değerlendirmektedir. ‘a’ ileri progresyon göstermeyen, tembel hareketi; ‘b’ yavaş, doğrusal olmayan, dolambaçlı ileri hareketi; ‘c’ oldukça doğrusal ama orta hızda hareket eden sperm; ‘d’ ise doğrusal ve hızlı hareketi belirtir [63]. Spermde en fazla görülen hareket kategorisi değerlendirmeye alınır. Bu sistemde, her bir kategoriye giren sperm yüzdesi değerlendirmeye alınır. WHO toplam motilitenin %40’ın, sadece progresif motilitenin ise %32’nin üzerinde olması gerektiğini belirtmiştir [5]. Sperm hareket bozukluğu (astenospermi) motilitede ya da ileri harekette veya her ikisinde birden azalmayı ifade eder.

Sperm morfolojisi:

Sperm morfolojisi değerlendirmesi, taze semende elektron mikroskop ile, taze semende faz kontrast mikroskop ile ve spermier çeşitli yöntemlerle boyayarak yapılabilir. Doğru bir morfolojik değerlendirme için spermier boyanması gereklidir. En çok kullanılan boyama yöntemi “Diff- Quick” yöntemidir.

Değerlendirmede birçok kriter kullanılmasına karşın en fazla kullanılanlar WHO kriterleri ve Kruger’in kesin kriterleridir [64]. Bir spermier normal kabul edilebilmesi için baş, boyun, orta kısım ve kuyruğun normal olması gereklidir. Normal sperm başı: oval yapıda, boyu 5-6 μ , eni 2.5-3.5 μ , boyunun genişliğine oranı 1.5- 1.75 olmalıdır. Baş bölgesinin %40-70’ini kapsayan akrozomal bölge olmalıdır. Orta kısım ince uzun ve genişliği <1 μ , boyu başın 1.5 katı ve başa aksiel olarak bağlanmış olmalıdır. Sitoplazmik artıklar normal baş alanının yarısından az olmalıdır. Kuyruk düz, orta kısımdan ince ve yaklaşık 45 μ uzunluğunda olmalıdır. WHO kriterlerine göre ara formlar normal, Kruger’in kesin kriterlerine göre anormal kabul edilir. (Tablo 4.)

Tablo 4. Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi

<p>Baş</p> <p>Uzunluk: 5-6 mikron</p> <p>Genişlik: 2.5-3.5 mikron</p>
<p>Akrozom</p> <p>Başın % 40-70'ini oluşturmali</p>
<p>Orta parça</p> <p>Genişlik 1 mikron</p> <p>Uzunluk 1.5 x baş uzunluğu</p>
<p>Kuyruk</p> <p>Boyu yaklaşık 45 mikron</p> <p>Uniform</p> <p>Orta parçadan daha ince</p> <p>Kıvrılmamış</p> <p>Kırık içermeyen</p>
<p>Sitoplazmik artık</p> <p>Baş alanının % 30-70'inden az</p> <p>Sadece orta parçada lokalize</p>

Spermde yaygın görülen defektler: Baş defektleri: Büyük, küçük, yassı filiform, yuvarlak, amorf, vakuollü, küçük akrozomlu, çift baş ve bunların kombinasyonları şeklinde olabilir. Boyun ve orta kısım defektleri: Bükük boyun, başa düzensiz bağlanma, kalın boyun, ince boyun ve bunların kombinasyonları şeklinde olabilir. Kuyruk defektleri: Kısa, birden fazla, ince, kırık, kıvrık, düzensiz genişlikte ve bunların kombinasyonları şeklinde olabilir. Ejekulatta normal morfolojiye sahip sperm oranı WHO'ya göre Kruger' in kesin kriterlerine göre ≥ 4 (3.0-4.0) olmalıdır [5].

Yuvarlak hücre sayısı:

Ejekulat içerisinde sperm hücrelerinin dışında yuvarlak hücreler olarak adlandırılan, ürogenital sisteme ait eptel hücreleri, prostata ait hücreler,

spermatogenetik seriye ait hücreler ve lökositler olmak üzere değişik hücreler de görülebilir. WHO tüm bu hücreler için üst limiti 5 milyon/ml olarak belirlemiştir.

Lökositler, çoğunlukla nötrofil olmak üzere semende sık rastlanmakla birlikte 1 milyon/ml nin üzerinde olduğunda (lökositospermi) enfeksiyon ve sperm kalitesindeki bozukluklara neden olmaktadır [65, 66]. Lökositosperminin ayırıcı tanısı için ejakülatından alınacak örneklerde intraselüler peroksidaz tayini yapılabileceği gibi, lökosit spesifik antijenler kullanılarak lökosit sayısı saptanabilir ve günümüzde bu tetkikler LeucoScreen gibi kullanıma hazır solüsyonlarla da yapılabilmektedir. Lökositospermi saptanan olgularda tam idrar tetkiki, idrar kültürü, semen kültürü gibi ileri testlere başvurulmalıdır [23].

Aglütinasyon:

Aglütinasyon hareketli sperm hücrelerinin baş, boyun ve kuyruklarının tek tek veya değişik kombinasyonlarda birbirine yapışması anlamına gelir. Agglütinasyon değerlendirilmesi sadece kameradaki sayım alanında değil, tüm sahalarda yapılmalıdır. Hareketsiz sperm hücrelerindeki kümelenmeler, sperm hücrelerinin semendeki döküntülere yapışması ya da tam likefiye olmamış örneklerdeki yapışıklıklar spesifik olmayan agregasyon olarak değerlendirilmelidir [67].

2.4.5. Endokrin İnceleme

Normal semen analizi olan kişilerde genelde hipotalamus-hipofiz-testis aksında bir bozukluk yoktur. Her erkeğe rutin endokrin değerlendirme gerekli değildir. Minimum hormonal değerlendirme için, serum FSH ve testosteron düzeylerinin ölçülmesi yeterlidir [22].

Erkeklerde istenecek temel hormonlar serum FSH, testosteron ve östradiol'dür [68]. Testosteron düşük bulunursa toplam ve serbest testosteron ölçümlerinin tekrarı

yanı sıra LH ve prolaktine de bakılmalıdır. Spermatogenezi bozuk olan erkeklerin çoğunda serum FSH değerleri normal bulunmakla birlikte, FSH aşırı yükselmiş ise büyük olasılıkla spermatogenez bozukluğuna işaret eder. Testosteron, FSH, LH ve prolaktin arasındaki ilişki klinik durum hakkında bilgi verir [59].

Tablo 5. Serum Hormonları ile Erkeklerde Klinik Bulgular Arasındaki İlişki

Klinik durum	FSH	LH	T	Prolaktin
Normal spermatogenez	Normal	Normal	Normal	Normal
Hipogonadotropik Hipogonadizm	Düşük	Düşük	Düşük	Normal
Spermatogenez Bozukluğu*	Yüksek/ Normal	Normal	Normal	Normal
Total testiküler yetmezlik / Hipergonadotropik hipogonadizm	Yüksek	Yüksek	Normal/ Düşük	Normal
Prolaktin salgılayan hipofiz tümörü	Normal/ Düşük	Normal/ Düşük	Düşük	Yüksek

* Spermatogenezi bozuk erkeklerin çoğunda serum FSH normal bulunmakla birlikte, FSH aşırı yükselmiş ise büyük olasılıkla spermatogenez bozukluğuna işaret eder.

2.4.6. Sperm ve Semene Ait Spesifik Testler

Erkek infertilitesinin standart araştırmasında sperme ait spesifik testlerin yapılması gerekmez. Ancak sperm analizi de her zaman erkeğin fertilité potansiyelini tam olarak yansıtmayabilir. Bu durumlarda tanı koyabilmek için diğer spesifik testlere gereksinim vardır. Açıklanamayan infertilite olgularında erkek faktörünün de eşlik edip etmediğini ortaya koymak için, ya da ÜYT ile tedavi seçimi yapılmasında sperm ve semene ait spesifik testler yararlı olabilir.

2.5. Genetik Araştırma

Genetik infertilite olgularında spermatogenik bozukluğun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılacak geniş tabanlı assosiasyon çalışmaları, testiküler ve spermatozoal ekspresyon çalışmaları, spermatogenezin moleküler mekanizmalarını aydınlatacak, gelecekte bu konudaki tanı ve tedavinin doğru yönlendirilmesini sağlayacaktır. Spermin genetik yapısındaki bozulma ile infertilite arasında kuvvetli bir birliktelik görülmektedir [69].

2.5.1. Sperm Örneğinde Anöplöidi Tayini

Anöplöidi; veya anormal kromozom sayısı riski ileri anne yaşı ile birlikte artmaktadır. Anöplöidi; anneye ait genlerin ayrışmaması, babaya ait gonadal mozaisizm, translokasyonlar ve inversiyonlardan dolayı meydana gelmektedir. Monozomiler genellikle letaldir. Bununla birlikte bazı trizomili fetüsler doğuma ve sonrasında belli yaşlara kadar yaşayabilmektedir. Translokasyonların %60'ı nonhomolog kromozomlar arasındaki değişimle meydana gelen resiprokal veya dengeli translokasyondur. Bütün genetik materyal korunmuştur. Fakat mayoz bölünme sırasında anormal kromozomlar germ hücrelerine doğru ayrılırken fetal anöplöidi oluşabilir. Translokasyonların %40'ı iki akrosentrik kromozomun birleştiği ve kısa kollarını kaybettiği robertsonian tipindedir. Robertsonian translokasyonlar her zaman fetal anöplöidi ile sonuçlanır.

Multicolour FISH testi spermelerde kromozomal anomali aranabilmesini sağlar. Spermde FISH analizini kromozom anomalilerinin orijinini etkileyen mekanizmaları anlamak için gamet hücrelerinin incelenmesi gerekir. Çünkü bölünme kusurlarının büyük bir bölümü mayoz sırasında oluşmaktadır. FISH testi kullanarak yapılan araştırmalar, özellikle seks kromozomlarındaki artan anöplöidi frekanslarını ortaya koyar. Spermelerin FISH testi ile incelenmeleri, araştırma düzeyinde olmakla

birlikte özellikle belirtilen androlojik durumlarda sahip olan erkeklerde desteklenmelidir [5].

Spermde anöploidi tayini; literatürde anöploidi oranı daha fazla bildirilmiş bazı kromozomlar seçilip, FISH testi kullanılarak normalde her bir spermde birer tane bulunması gereken bu kromozomların yokluğu veya fazlalığı araştırılır. Verilen semen numunesinde yüzlerce sperm değerlendirmeye alınır. Saptanan anormal sperm oranı eşik değerlerinin üzerindeyse rapor edilir.

2.5.2. Sperm DNA Anomolileri

Spermiyogonez sürecinde son aşamalarda kromatinin uzadığı ve kondanse olduğu gözlenir. Akrozom yapısındaki gelişmenin tamamlanmasıyla beraber sperm başı tipik yapısına ulaşmış olur. Kromatin yapısında gelişen kondansasyon sırasında histon yapısında değişiklikler gözlenir. Bu değişiklikler argininden zengin protaminleri içerir ve bu yapıyı stabilize etmek üzere disüfid bağları kurulur [70]. Protamin-DNA etkileşmesi sonucunda paketlenme tamamlanır ki bu sayede genetik yapının kapladığı alan azaltılmış olur. Bu sayede sperm daha az enerji kullanarak hareketliliğini sağlamış olur [71]. Ayrıca agregasyonun sağlanmasıyla fiziksel ve kimyasal etkilere karşı sperm korunması sağlanır. Ooplazma içinde gerçekleşebilen decondasyon sırasında öncelikle disüfid bağları kırılır. Bu sayede protamin kökenli histonların ovum kökenli olanlarla yer değiştirebilmesi sağlanmış olur [72]. Bu aşamada sperm kalitesini ve fertilizasyon yeterliliğini bozan en sıkıntılı durum protaminlerde meydana gelen hata, kusur ve eksiklik sebebiyle paket yapısının bozulmasıdır. Paket yapısının bozulması ve DNA kırıkları spermatogenez sırasında oluşan durumlardandır [73]. DNA'nın tek iplik yapısında olduğu durumlarda hem kromatin kondansasyonunun yetersizliği hem de kromozomal anomaliler daha sık izlenir [74]. Kromatin yapısında meydana gelebilecek değişiklikler DNA yapısında bozulmalara sebep olabileceği için fertilizasyon etkilenecektir. Bu durum

spermatogenezde gecikmelere sebep olabilecektir. Klinik olarak da embriyonik gelişimde sorunlar ve hatta embriyonik dönemde kayıplar gözlenebilir [75].

2.6. Sperm Örneğinde FISH Analizi

Multicolour FISH testi spermelerde kromozomal anomali aranabilmesini sağlar. Spermde FISH analizini kromozom anomalilerinin orijinini etkileyen mekanizmaları anlamak için gamet hücrelerinin incelenmesi gerekir. Bölünme kusurlarının büyük bir bölümü mayoz sırasında oluşmaktadır. FISH testi kullanarak yapılan araştırmalar, özellikle seks kromozomlarındaki artan anöploidi frekanslarını ortaya koyar. Spermelerin FISH testi ile incelenmeleri, araştırma düzeyinde olmakla birlikte özellikle belirtilen androlojik durumlarda sahip olan erkeklerde desteklenmelidir [5].

Spermde anöploidi tayini; literatürde anöploidi oranı daha fazla bildirilmiş bazı kromozomlar seçilip, FISH testi kullanılarak normalde her bir spermde birer tane bulunması gereken bu kromozomların yokluğu veya fazlalığı araştırılır.

Sperm FISH Testinden Fayda Görmesi Muhtemel Hastalar - Endikasyonlar

- Açıklanamayan İnfertilite
- Tekrarlayan Tüp bebek (IVF/ICSI) başarısızlığı
- Tekrarlayan düşük – gebelik kaybı
- Hormon taramalarında hipergonadotropik hipogonadizm
- Sperm anomalisi: Spermiyogramda özellikle oligoasthenoteratozoospermi ve ciddi teratozoospermia tespit edilen hastalar

Interfaz FISH tekniğinin kültüre edilmemiş hücrelerde DNA problemleri ile interfaz kromatininin incelenmesine imkan vermesi sperm çalışmalarına da yeni bir yaklaşım getirmiştir. Kromozom spesifik DNA problemleriyle FISH tekniği, insan interfaz spermelerinin anöploidi açısından taranması için hızlı, alternatif bir tekniktir.

FISH testi bir moleküler sitogenetik tekniktir. Genom üzerinde bir hedef bölgeye karşılık gelen komplementer baz dizilişine sahip floresan işaretli bir DNA dizisi (prob) bu hedef dizinin varlığı ve/veya yokluğu hücresel ortamda tesbit eder. Yöntemin avantajı hem metafaz kromozomlarına hem de interfaz nükleusuna uygulanabilir olmasıdır. Bunun yanında kısa sürede çok sayıda nükleusun değerlendirilebilir olması, özgünlüğünün ve duyarlılığının yüksek olması, mozaik yapıyı değerlendirebilmesi yöntemin diğer avantajlarıdır. Bu nedenle yöntem, intakt sperm nükleusunu değerlendirebilmek aynı zamanda çok sayıda sperm nükleusunda sonuç almak için son derece uygundur. Ayrıca bu yöntemle birbirinden farklı sperm nükleuslarının farklı anöplid yapıları ortaya konabilmekte ve sonuçlar bir oran şeklinde verilebilmektedir [76].

2.6.1. İnfertil Çiftlerde Sperm Örneğinde FISH Analizi

Birçok infertil çiftte problem, erkekte anormal karyotip nedeniyle yetersiz sperm üretimidir. Azoospermi ya da oligospermili %3-13 erkekte sayısal ya da yapısal gonozomal anomaliler (çoğunlukla XXY ve Y yeniden düzenlenmeleri) ve yapısal otozomal anomaliler (çoğunlukla resiprokal ve robertsonian translokasyonlar) görülür [13, 77, 78]. Nadir görülen anomaliler Y; otozom translokasyonları ve küçük izodisentrik 15 anomalileridir. Translokasyon taşıyıcıları klasik kromozom analizi ile belirlenmektedir. Y kromozomunun uzun kol mikrodelsyonları çeşitli moleküler genetik teknikler ile ortaya konmaktadır. İnfertil erkeklerde bu iki anomali grubu ayırt edildikten sonra normal karyotipe sahip ve Y kromozomunun AZF bölgesinde mikrodelsyonu olmayan bireyler kalmaktadır [77, 78]. Özellikle karyotipik olarak normal fakat sperm sayısı anormal azalmış olgularda sperm aneuploidi ve/veya diploidi oranında artış belirlenmiştir. Bu artış özellikle seks kromozomlarında dizomi eğilimi olarak kendini göstermiştir. Şiddetli oligospermisi olan 40 yaş ve üstü erkeklerde bu durum çok daha belirgindir. 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarından kaynaklanan sperm dizomi sıklığının sperm sayısı ve motilitesi ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Şiddetli oligoastenozoospermili erkeklerden yapılmış olan

testis biyopsilerindeki univalent veya oligokiyazmatik ve akiyazmatik bivalentlerin sıkça gözlenmesi bu açıklamayı doğrulamaktadır. Azoospermisi olan erkeklerde bazı otozom ve X/Y kromozom dizomilerinin daha da yükselmiş oranlarda saptandığı bildirilmiştir [13, 79, 80]. Sonuç olarak bu durum implantasyon başarısızlığı ve/veya gebelik kayıplarına yol açacaktır. Bu nedenle sperm anöploidi oranının belirlenmesi iki aşamalı bir test şeklinde önerilmektedir. Birincisi tüm infertil çiftlerde reproduktif uygulamalara geçmeden önce sperm anöploidi şeklini ortaya koyan bir prediktif test olarak, ikincisi de başarısız üç ICSI denemesinden sonra uygulanan bir tanı testi olarak kullanılması önerilmektedir [13, 81].

2.7. Sperm DNA Fragmantasyon Analizi

Sperm DNA fragmantasyonu zamanla değişen ve birçok vakada düzelme gösteren bir olaydır. Kabul görmüş standartlara göre; sayısal analizlerde hasarlı sperm oranının %15'in altında olması beklenmektedir. %15-30 arası ara kademe olup; %30'dan fazla anormal sperm içeren spermiyograma sahip erkekler fertilizasyon için risk altında kabul edilir.

Erkek faktör infertilitesinde sperm DNA hasarının arttığı düşünülür [82]. Spermiyogram analiz sonucu kötü olan ve IVF'de düşük fertilizasyon ve klivaj oranı gösteren spermelerde, artan oranlarda DNA fragmantasyonuna rastlanmıştır [83]. Bu gibi yüksek DNA fragmantasyonu olan sperm örnekleri ICSI için kullanıldığında başarısız fertilizasyon oranları görülmüştür (Şekil 3) [84].



Şekil 3. Fertilizasyon DNA hasarı oranı LOPES 1998 [84].

Sperm DNA Fragmantasyon Testi Yapılma Endikasyonları:

- Açıklanamayan infertilite
- Embriyo gelişiminde duraklama olan çiftler
- Anormal sperm analiz sonuçları
- İleri erkek yaşı (>50y)
- Reprodüktif toksik maddelere maruziyet
- ÜYT'in kullanımında anormal embriyo gelişimi
- Tekrarlayan Tüp bebek uygulamalarında (IVF/ICSI) başarısızlık
- Tekrarlayan Gebelik Kaybı

Sperm DNA hasarı sebepleri, erkek infertilitesi sebepleri ile aynıdır: Kimyasallar/toksin ve ısı maruziyeti, varikosel, enfeksiyon, ileri yaş, sigara, testis kanseri hastalıklar, diyet, ilaç kullanımı, yüksek ateş, hava kirliliği, radyasyon, spermde serbest radikallerin artışı vb. Günümüzde teknolojinin gelişmesi hayatımıza giren cep telefonu ve internetin bu sebeplere katkı sağladığı halen araştırma konusudur.

Embriyonun kalitesi ve fertilizasyon, yumurtanın DNA'sının kendini onarma kapasitesi ile sınırlıdır. Sperm heterojen yapısı dikkatle incelenmelidir. Kaliteli morfoloji ve DNA hasarı ICSI için önemlidir. Sperm DNA hasarının genomu ne kadar etkilediğini bilmek imkânsızdır. Sperm yumurta ile birleştiğinde embriyonun kendini tamir etme şansı olsa da embriyonun gelişim hızı ve implantasyon tehlikededir. DNA fragmentasyonu var ise kaliteli bir embriyo elde edilemeyebilir.

Başarısız IVF denemelerini en aza indirmek ve gebelik oranlarını artırmak için araştırmalar yapılmalıdır. Bu araştırmalar esnasında hasta için kromozom ve genetik kusurların erken embriyogenetik iletim riskini belirlemek esastır. Hasarın belirsizliği, doğurganlığın karmaşık yapısı, bizi belirsizliğe götürse de erkek faktörünün infertilite üzerindeki etkisi bakımından DNA fragmentasyon testleri klinik açıdan önemlidir [12]. Spermin genetik yapısındaki bozulma ile infertilite arasında kuvvetli bir birliktelik görölmektedir. Sperm DNA hasarlarının infertilitedeki önemi çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir. DNA hasarlı spermatozoa oranı arttıkça (>%30-40) doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır [12, 85].

2.7.1. Sperm Kromatin DNA Testi (SCD)

Sperm kromatin DNA testi (SCD) metodu en çok kullanılan testlerdendir. Bu testle DNA kromatin ve fragmentasyonunu saptanır. Bu testte DNA'yı, DNA zincir kırıklarından ayırmak için spermi düşük pH ile denatüre edilir. Akridin orange ile boyama sonrasında elde edilen görüntüde yeşil oranların native DNA, kırmızı oranların denature DNA olduğu bilgisine ulaşılr. SCD metodu ICSI uygulaması ile hastanın gebe kalabilme şansını artırır. Klinik gebelik sonrası düşük oranını azaltır ve tekrarlayan IVF uygulama başarısızlıklarının önüne geçilmesini sağlar [86, 87]. Buna göre DNA fragmentasyon indeksi (DFI), sperm örneğinde DNA fragmentasyonu olan spermlerin yüzdesi olarak tanımlanır. İstatistiki olarak, infertilite açısından bildirilen sınır >30 % DFI'dir. Bu sınırın üzerinde hiç normal fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi olmayacak diye bir şart yoktur. Yine de terme ulaşan gebelik oranı %50 - %100 oranında azalır. DFI %15'i aşarsa, duraklamış embriyo gelişimi nedeniyle transfer iptali artar. (18.2 % ICSI). Düşük oranları DFI % 15'ten fazla ise 4 katına çıkar (37.5 % ICSI) [88, 89]. DFI oranları ve fertilizasyon potansiyeli için genel kabul gören durumlar:

<% 15 DFI:	mükemmel fertil potansiyel
% 15- 30 DFI:	iyi-orta fertil potansiyel
>% 30 DFI:	kötü fertil potansiyel

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen (Proje No: 114S169) bu çalışmada; infertilite teşhisi konulmuş, açıklanamayan infertilite tanısı alan ve ICSI uygulaması sonucunda gebelik elde edilemeyen 20 hasta ile açıklanamayan infertilite tanısı alan ve ICSI uygulaması sonucunda gebelik elde edilen 20 hasta kontrol grubunu oluşturmuştur. Bu grupları oluşturan toplam 40 hastanın sperm örnekleri temin edilmiştir. Spermioyogram örneklerinde sperm-FISH analizi yapılarak sonrasında DNA kromatin ve fragmantasyonunu saptamak için Sperm Kromatin DNA Testi (SCD) çalışılmıştır.

Tüm hastalar ilk başvuruları sırasında çalışma hakkında bilgilendirilerek çalışmaya dahil edildiklerine dair yazılı bilgilendirilmiş onamları alınmıştır.

Bu proje çalışmamız Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından değerlendirilerek **“07.02.2014, Karar no: 99950669/141”** ile onaylanmıştır.

3.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Nitelikleri

Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Ünitesine başvuran IVF tedavisi uygulanacak 40 hasta çalışmaya dahil edildi.

Bizim bu çalışmamızda infertilite teşhisi konulmuş, açıklanamayan infertilite tanısı alan ve ICSI uygulaması sonucunda gebelik elde edilemeyen 20 hasta ile açıklanamayan infertilite tanısı alan ve ICSI uygulaması sonucunda gebelik elde edilen 20 hasta kontrol grubumuzu oluşturmuştur. Bu grupları oluşturan 40 hastanın sperm örnekleri cinsel perhiz süresi de dikkate alınarak, ICSI uygulaması öncesi toplanmıştır. Bu sperm örnekleri; WHO'nun belirlediği kriterlere göre; likefiye

olduktan sonra; makler sayım kamarası ile sayımları yapılmıştır. Son olarak da spermiyogram örnekleri sperm-FISH analizine alındı.

Hasta ve kontrol grubuna uygulanan anket formu Tablo 6’de belirtilmiştir. Hasta ve kontrol grubunun özellikleri Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 6. Hasta ve Kontrol Grubu için Anket formu

Adı-Soyadı:
Cinsiyet:
Yaş:
Boy:
Vücut Kütle indeksi (VKİ) (Kg/m ²):
Kan Grubu:
Meslek:
Evlilik süresi:
İnfertilite süresi (yıl):
İnfertilite nedeni:
Primer/Sekonder:
Akraba evliliği: Evet () Hayır ()
Alerji: Evet () Hayır ()
İlaç Kullanımı: Evet () Hayır ()
Tanısı konulmuş diğer hastalık/ hastalıklar:
Ameliyat:
Jinekolojik müdahale:
Soygeçmiş:
Alkol kullanımı: Evet () Hayır ()
Sigara kullanımı (içen veya bırakmış ise sigara adedi ve süresi)
İçmeyen () İçen () Bırakmış ()

Tablo 7. Hasta ve Kontrol Grubunun Özellikleri

Yaş Ortalaması (Yıl)				
Yaş				
İnfertilite Süresi				
Sigara içme alışkanlığı				
Alkol kullanma alışkanlığı				
İlaç kullanma alışkanlığı				

3.2.Kullanılan Gereçler

Distile su cihazı (Thermo scientific barnstead)

Otomatik Pipetler (Gilson pipettman)

Hassas terazi (Shimadzu AUWD unibloc)

Santrifüj (Hitachi)

Buzdolabı (Bosch)

Vorteks (VWR Galaxy ministar)

-20 Derece Dondurucu (Bosch)

Su banyosu (Nüve)

Otoklav (Nüve)

Floresan ataçmanlı mikroskop (Leica DM300)

Isıtcılı blok (Techne)

Etüv

Mikrosantrifüj (VWR Galaxy 14D)

pH Metre (Hanna)
Konik Tüp (15 ml)
Lam
Lamel
Sperm Kabı
Steril Cam Pipet
Ependorf (1.5 ml'lik)
Steril Pipet Ucu (20 mikrolitre)
Steril Pipet Ucu (200 mikrolitre)
Steril Pipet Ucu (1000 mikrolitre)
Beher (600ml) (Cam)
Beher (1000 ml) (Cam)
Erlenmayer (500 ml) (Cam)
Erlenmayer (1000 ml) (Cam)
Mezür (100 ml)
Yatay ve Dikey Şale
Lam Boyama Kabı (10 lamlık)
Kronometre
Enjektör (10 cc)
Termometre
Cam Kalemi
Parafilm

3.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Absolüt Alkol
DAPI/Antifade solüsyon
DAPI (5 mg)
DDT (25 mg)
HCl (1 Mol/L(1N))

İmmersiyon yağı

Ksilol

LIS

Metanol

Na₃C₆H₅O₇.2H₂O

NaCl

NaOH

Pepsin (100 gr)

Rubber Cement (50 gr)

Sitrik Asit

Tris

Tween 20

Aneuvysion prob seti

Prenatal Control slides for positives Control (5 slayt)

Prenatal Control Slides for Amniocyte;Male Control (5 slayt)

Halosperm; Sperm DNA Fragmantasyon Kiti

Diff-Quick Sperm Morfoloji Boyama Seti

3.4. Kullanılan Problar

Ticari olarak elde edilen probları sperm FISH çalışmalarında kullanmadan önce prob kombinasyonları yapılarak bu kombinasyonlar sağlıklı bireylerin metafaz ve interfaz hücrelerinde optimize edildi. Periferik kandan elde edilen metafaz ve interfaz hücrelerinde kombine problarda spesifik sinyaller aldıktan sonra sperm-FISH çalışmaları için optimizasyon yapıldı. 13, 18, 21, X ve Y kromozomlarının analizine yönelik uygulanan problar iki grup halinde kombine edildi. Birinci grupta kromozom 18 (yeşil), X (kırmızı) ve Y (aqua) olarak üç farklı renkli, ikinci grupta ise kromozom 13 (yeşil) ve 21 (kırmızı) olarak iki farklı renkli prob kombinasyonları kullanılarak analizler yapıldı.

FISH analizi için AneuVysion Prob Seti kullanılmıştır. Prob seti üç renkli olup iki vialden oluşmaktadır.

Vial1:

- * CEP18: D18Z1 Alpha Satellite DNA Probe (18p11.1-q11.1 Spectrum Aqua)
- * CEP X: DXZ1 Alpha Satellite DNA Probe (Xp11.1-q11.1 Spectrum Green)
- * CEP Y: DYZ3 Alpha Satellite DNA Probe (Yp11.1-q11.1 Spectrum Orange)

Vial 2:

- * LSI 13: RB1 Gene DNA Probe (13q14 Spectrum Green)
- * LSI 21: D21S259, D21S341, D21S342 DNA Probe (21q22.13-q22.2 Spectrum Orange)

Preparatlar Leica floresan mikroskopunda uygun filtrelerle incelendi. Her olgu için prob başına 2000 sperm nukleusu değerlendirildi. Floresan mikroskoba bağlı bilgisayar sistemi ile sinyaller analiz edilerek kamera aracılığıyla resimlendirilip arşivlendi. Analiz sonunda sayısal kromozom anomalilerinin (dizomi, nullizomi ve diploidi) oranı ortaya konuldu. Sonuçlar klinik bulgularla eşleştirilerek değerlendirildi.

3.5. Yöntemler

3.5.1. Örneklerin FISH Analizine Hazırlanması

Örneklerin Yıkanması: Alınan taze semen örneği, öncelikle bir konik tüpe koyuldu. İşlem görmeden santrifüj edildi. (5dk. 1000rpm) sonrasında üstündeki pelet atıldı. Kalan kısım %0,56 KCL ile muamele edildi. Bunun için KCL damla damla 8ml olana kadar eklendi. Peletin bulunduğu konik tüp 37 ± 1 °C'lik hazırlanmış sıcak su banyosunda 30 dakika süreyle inkübe edildi.

Prefiksasyon: 30 dakika sonunda damla damla önceden hazırlanmış -20 derecede 2 ml fiksatif (3/1 metanol asetik asit) hücrelere /hipotonik çözeltiye eklenerek yavaşça vorteks edildi. 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Üzerinde kalan kısım dibinde 1 ml kalana kadar atılır.

Fiksasyon: Kalan 1 ml pelet üzerine, işlemde yarım saat önce hazırlanarak -20 derecede buzdolabında bekletilen soğuk fiksatif (3/1 oranında hazırlanan metanol/asetik asit) 6 ml olacak şekilde damla damla eklenir. Sonrasında 1000rpm'de 5 dakika santrifüj edilir ve üst kısmı atılarak fikse edilir. Bu işlem 3-4 kez tekrarlanır. En sonunda cam slaytlara damlatana kadar üst kısım 1 ml kalacak şekilde atılır. Kalan pelet +4 derece de buzdolabına kaldırılır.

Cam slaytlar öncesinde %100'lük alkolle yıkanır. -20 derecede buzdolabında tutulur. Hazırlanan fikse edilmiş sperm süspansiyonu soğuk cam slaytlara 10ul iki hibridizasyon alanı olacak şekilde eşit halde damlatılır. İşlemlerin sonunda preparat oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.

3.3.2. FISH Tekniğinin Uygulanması

Tablo 8. Sağlanan Materyaller (AneuVysion kit)

LSI 13/21 DNA probu
Cep 18/X/Y DNA probu
DAPI 2 karşıt boya
Np-40
20X SSC

Kuruyan preparatları 2XSSC solüsyonunda 1 saat süreyle 37 +/- 1°C'de bekletildi. Slaytları 13 dakikalık süreyle 37°C'de, taze hazırlanmış pepsin çalışma

çözeltisine (50ml 0.01N HCl'ye 2.5 mg pepsin eklenerek elde edilen çözelti) yerleştirildi. Slaytları fosfat tamponlu salinde (PBS) oda sıcaklığında 5 dakika süreyle durulandı. Slaytlar işlemlerden sonra kurutuldu. Slaytlar oda sıcaklığında %70 etanole batırıldı. Slaytlar %70'lik etanolden çıkarıldı. Sırayla aynı işlem %85 ve %100'lük etanole uygulandı. Sonrasında denatürasyon işlemine kadar slayt kurumaya bırakıldı.

Prob Hazırlama: Problar oda sıcaklığına gelene kadar beklenildi. Bu sayede viskozite düştü ve doğru pipetleme yapmak mümkün hale geldi.

Denatürasyon ve Hibridizasyon: Kuruyan slaytların bir alanına 10ul cep 18/X/Y prob karışımı, diğer alanına 10ul LSI 13/21 prob karışımı uygulandı. Prob karışımı üzerine hemen 22mm*22mm lameli yerleştirildi ve çözelti lamel altında eşit bir şekilde dağılına kadar bekletildi. Kauçuk tutkalı ile lamelin sızdırmazlığını ayarlamak için: kauçuk tutkalını 5ml'lik şırıngaya çekip az miktarda tutkalı lamelin çevresine hem lameli hem de slaytı kapatacak şekilde kapatılarak etrafında bir mühür oluturuldu. Slayt önceden hazırlanmış 73°C slayt ısıtıcısı üzerine yerleştirildi. Problar ışıktan etkilenmesin diye üzeri kapatılarak 7 dakika denatüre edildi. İşlem tamamlandıktan sonra hibridizasyon aşaması için slayt nemlendirilmiş hibridizasyon bölmesine (kabin yan tarafına bantlanmış nemli bir kurutma kağıdı veya kağıt havlu parçasıyla birlikte hava geçirmez kap) konularak ışık görmeyecek şekilde kapağı kapatıldı. Bu şekilde 37°C'lık etüvde 24 saat inkübe edildi.

Hibridizasyon sonrası yıkamalar: Bir şalede 0,4 SSC/ %0,3 NP-40 hazırlandı. En az 30 dakika 73°C sıcaklıktaki su banyosunda bekletildi. 24 saat hibridize olan slaytın üzerindeki tutkal yavaşça kaldırılarak üzerindeki lamel yavaşça sıyrıldı. Slayt 73°C sıcak su banyosunda 2 dakika şalede bekletildi. Önceden hazırlanmış 2XSSC solüsyonuna 1 damla tween-20 eklenildi. Slayt bu solüsyonda 5-60 saniye yıkandı. Sonrasında slaytın karanlıkta kurumayı sağlandı. Slaytın her bir hedef alanına 10ul DAPI karşıt boya uygulandı. Üzeri cam lamel ile kapatıldı. Sinyal sayımından önce slaytları karanlıkta saklanmasına özen gösterildi.

Saklama: Hibridize edilmiş slaytlar (lamelleriyle birlikte) -20°C 'da karanlık ortam oluşturularak saklandı. Bu koşullar altında slaytlar, floresan sinyal yoğunluğunda belirgin bir kayıp olmadan 12 aya kadar saklanabilir. Uzun süreli saklama istenirse, kurumayı önlemek amacıyla lameller mühürlenebilir ve -20°C 'da saklanabilir.

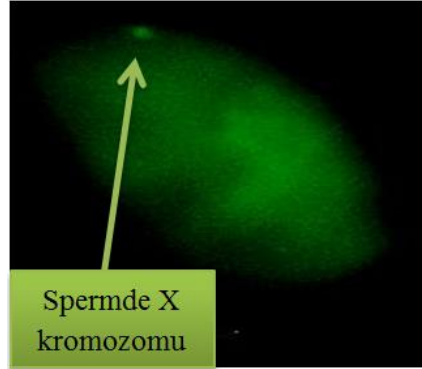
Sinyal Sayımı: Slayt yeterliliği aşağıdaki kriterlere göre değerlendirilir.

- **Prob sinyali yoğunluğu:** Sinyal parlak, belirgin ve kolayca değerlendirilebilir olmalıdır.
- **Arka plan:** Koyu ve siyah görünmeli ve floresan partiküller veya bulanıklık içermemelidir.
- **Çapraz hibridizasyon/ Hedef spesifikliği:** Prob, kromozom üzerinde yalnız ilgili hedef DNA ile hibridize etmeli ve onu aydınlatmalıdır.

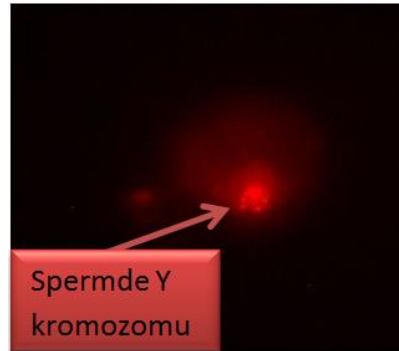
3.5.3. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Sayım taraması: Floresan mikroskobunda 40X objektif kullanılarak slayta immersiyon yağı damlatılıp seçilen alanın üst sol çeyreğinden analize başlanılır ve soldan sağa tarayarak, her değerlendirilebilir metafaz yayılımındaki veya her değerlendirilebilir interfaz hücresi nükleus sınırı içindeki sinyalleri sayılır. En az 200 sperm nükleusu sayılmalıdır. Sinyal sayımı için; X (yeşil), Y (kırmızı), 18 (aqua) probu ve 13 (yeşil), 21 (kırmızı) prob kullanıldı. Spermier haploid yapıda oldukları için, otozomal kromozomlar için her sperm hücresinde tek sinyal, cinsiyet kromozomları için ise spermin X veya Y kromozomu içerdiği göz önünde bulundurularak bir sinyal alınması normal olarak kabul edilmelidir. Örneğin 18, X ve Y kromozomlarına ait prob kombinasyonu kullanılarak yapılan analizde: normalde bütün spermier 18 nolu kromozom için tek sinyal, cinsiyet kromozomları için ise X ya da Y kromozomlarından hangisini taşıyorsa ona ait olan tek sinyali içermelidir (Şekil 4-6). Yani sperm çekirdeği ya 18 ve X kromozomlarına ya da 18 ve Y kromozomlarında ait birer sinyal gösterecektir (Şekil 18-19). Eğer sperm başı, bakılan kromozomlardan birisi için net iki sinyal gösterirken, diğer kromozom için net tek sinyal gösteriyorsa ve kuyruk taşıyorsa, sperm çekirdeği birinci kromozom

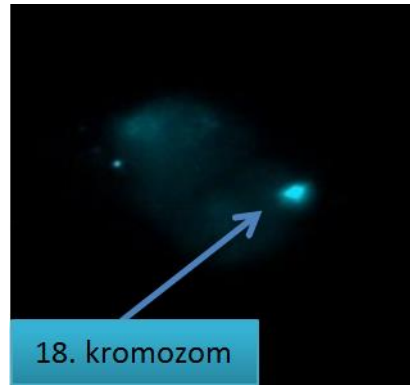
için dizomik olarak değerlendirildi. Net sinyal olarak analiz edebilmek için aynı büyüklükte, aynı renkte ve aynı yoğunlukta ve en az bir sinyal büyüklüğü kadar birbirinden ayrılmış olmasına dikkat edildi. Bu tür net sinyaller değerlendirilmeye alındı.



Şekil 4. Sperm çekirdeğinde X kromozomu (yeşil floresan ışımaya) içeren normal sperm.



Şekil 5. Sperm çekirdeğinde Y kromozomu (kırmızı floresan ışımaya) içeren normal sperm.



Şekil 6. Sperm çekirdeğinde 18. Kromozomu (mavi floresan ışımaya) içeren normal sperm.

İnterfaz sayımı:

- Çok yakın ve yaklaşık olarak aynı boyutta fakat görünür bir bağlantı ile bağlı olmayan iki sinyal, iki sinyal olarak sayıldı.
- Sinyalin dağılımı bitişik ve kabul edilebilir bir sınır içerisinde ise, dağınık bir sinayli bir sinyal olarak sayıldı.
- Görünür bir bağlantı ile bağlı iki küçük sinyal bir sinyal olarak sayıldı.
- CEP 18, LSI 13 ve LSI 21 için nükleus sayısını 0, 1, 2, 3, 4 veya >4 sinyal ile sayıldı. Yalnız herhangi bir renkte bir veya daha fazla FISH sinyali olan nükleusları sayıldı.
- CEP X/Y için, nükleus sayısını 0, 1, 2, 3, 4 veya >4 sinyal ile sayın (hem turuncu hem de yeşil sinyaller için) ardından nükleusların yüzdesini X,XY, XX, XXY, XYY, XXX ve diğerleri ile hesaplandı. Yalnız herhangi bir renkte bir veya daha fazla FISH sinyali olan nükleuslar sayıldı.
- Belirsiz sinyalleri olan nükleusları değerlendirmeye alınmadı.

Tablo 9. Çalışma Reaktif Çözeltilerinin Hazırlanması

20X SSC	0.4X SSC	0.4X SSC	Denatürasyon Çözeltisi
66gr 20X SSC	950ml saf su	100ml 20X SSC	49 ml Formamid
200ml saf su	20ml 20x SSC	849ml saf su	7 ml 20X SSC
250ml nihai hacim	3 ml NP-40	1ml NP-40	14 ml saf su
Ph: 5.3	1000ml nihai hacim	1000ml nihai hacim	70 ml nihai hacim

3.5.4. Örneklerin Sperm Kromatin DNA Analizine Hazırlanması

Sperm örneğini, konsantrasyonu 5-10 milyon olacak şekilde sperm yıkama solüsyonu ile sulandırıldı. Konsantre de edilebilir. Agaroz içeren eppendorf mikrodalga fırında akışkan hale gelene kadar yaklaşık 3-4 dakika çevrildi. Agarozdan 20 mikrolitre, semenden 15 mikrolitre alınarak iyice karıştırıldı.

14 mikrolitre karışımdan lam üzerine koyularak üzerine lam kapatıldı. Buzdolabında yaklaşık 5 dakika bekletildikten sonra lamel sıyrılarak yavaşça çıkartıldı.

Lizis solüsyonu oda sıcaklığında bekletildi. Asit denaturant solüsyonu hazırlandı (10 ml distile suyun içerisine 80 mikrolitre denaturant solüsyonu eklendi). Asit denaturant solüsyonu, inkübasyon yapılacak kabın içine döküldü. Lam yatay bir pozisyonda denaturant solüsyonu içerisinde 7 dakika bekletildi. 10 ml lizis solüsyonu farklı bir inkübasyon kabında 5 dakika bekletildi. Lam yatay bir pozisyonda lizis solüsyonu içerisinde 25 dakika bekletildi. Lizis solüsyonunu uzaklaştırmak için lam, yeterli miktarda distile su içeren bir inkübasyon kabında 5 dakika bekletildi. Lam yatay olarak önce % 70 etanol, % 90 etanol ve daha sonra %100 etanol içeren kaplarda 2'şer dakika tutuldu. Lam oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Boyama için, yatay tutulan lamın üzerine Eosin solüsyonu (kırmızı) damlatılarak 6 dakika bekletildi. Eosin solüsyonu lamın üzerinden dökülerek Azur B solüsyonu (mavi) damlatıldı ve 6 dakika bekletildi. Lam oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.5.5. Preparatların Mikroskopta İncelenmesi

Slayt kuruduktan sonra floresan mikroskobunda 500 spermatozoa sayıldı. DNA'sında fragmantasyon olmayan spermlerin halo oluşturduğu, fragmantasyon olan spermlerin halo oluşturmadığı görüldü. Bunlar sayılarak oranlama yapıldı.

SCD= Fragmantasyonlu sperm/ Spermlerin tamamı*100

Sonuca göre %15 fragmantasyon olanlar iyi; % 15-30 normal; % 30 üzeri olanlar anormal kabul edildi.

Bu analize göre spermier fragmantasyon oranlarına göre beş gruba ayrılır.

- a. Büyük halo:
- b. Orta büyüklükte halo:
- c. Küçük halo:
- d. Halo yok:
- e. Dejenere halo:

Hasarlı DNA içeren spermierin oranı (% DFO = DNA FRAGMENTASYON ORANI) aşağıdaki parametrelere göre değerlendirildi.

- a. % 15 DFO ve altı: Çok iyi derecede sperm DNA bütünlüğü
- b. % 15–30 DFO: İyi–kabul edilebilir sperm DNA bütünlüğü
- c. % 30 DFO ve üzeri: Orta–kötü derecede sperm DNA bütünlüğü

3.6. Kullanılan İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Kontrol ve olgu grubundan elde edilen semen parametreleri ile SCD testi ve sperm-FISH testi sonuçlarının birbirleri ile karşılaştırılması istatistiki olarak yapıldı. İstatistiksel analizler SPSS versiyon 21 yazılımını kullanılarak yapıldı. Normal dağılım gösteren iki grup arasındaki ortalamalar arası farklılık T testi ile incelendi. Normal dağılım göstermeyen iki grup arasındaki farklılık için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılım gösterdiği belirlendiğinden bu parametreler kadın yaşı, erkek yaşı, total motilitenin kontrol ve olgu grubu ile karşılaştırılması sırasında T testi (Independent Samples test) kullanıldı.

Açıklanamayan infertil hasta ve kontrol grupları arasında klinik gebelik sonuçlarına ile sperm sayısı yapılan karşılaştırmalarda normal dağılım göstermediğinden Mann-Whitney U testi uygulandı. XY kromozomlarının da sonuçları değerlendirilirken T testi kullanıldı. P değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi. Hasta grubu

ve kontrol grubumuzun SCD/yaş ve SCD/sperm sayısı karşılaştırmalarında normal dağılım göstermediğinden Sperman testi korelasyon analiz yöntemi kullanıldı. SCD testinde sperm başarı etrafında oluşan halonun hasta ve kontrol gruplarında klinik gebeliklere göre dağılımı için ki kare testi uygulandı. Çıkan sonuçların p değeri 0.01'den düşük olduğu için anlamlı kabul edildi.

Tanımlayıcı analizler normal dağılım göstermeyen değişkenlerde ise Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Kontrol ve olgu grubunun sperm sayısı ile karşılaştırılması ve sperm FISH testi sonuçlarının karşılaştırılmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. P değerinin 0,05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar şeklinde değerlendirildi. P değerinin 0,05'den yüksek olduğu durumlarda anlamlı kabul edilmedi.

4. BULGULAR:

Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD IVF Ünitesi'ne infertilite nedeniyle başvuran ve açıklanamayan infertil tanısı alan ICSI uygulaması sonucunda gebelik elde edilemeyen 20 hasta ile açıklanamayan infertilite tanısı alan ve ICSI uygulaması sonucunda gebelik elde edilen 20 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubunun kadın yaş ortalaması $31,15 \pm 5,2$ ve kontrol grubunun kadın yaş ortalaması $32,45 \pm 3,8$ olup aralarında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ($p = 0,37$) ($p>0.05$).

Hasta grubunun erkek yaş ortalaması $35,45 \pm 4,58$ ve kontrol grubunun erkek yaş ortalaması $35,7 \pm 4,10$ olup aralarında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ($p = 0,85$) ($p>0.05$).

Farklı sahalarda yapılan incelemede SCD testi ile değerlendirmeye alınırken 500 sperm hücresi, FISH testi ile 200 sperm hücresi sayımı yapıldı. Bu sonuçlara göre; hasta grubunda 18, X, Y probu ile analiz edilen spermlerin %52,3'ü X kromozomu, %47,7'si Y kromozomu taşıırken, kontrol grubunda 18, X, Y probu ile analiz edilen spermlerin %42,1'i X kromozomu, %57,9'u Y kromozomu taşıyordu. Hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda X/Y oranları arasında istatistikî olarak fark gözlenmedi ($p=0,053$) ($p>0.05$).

Hasta ve kontrol grubuna ilişkin yaş, motilite ve sperm sayıları ayrı ayrı Tablo 10'da gösterilmiştir. Hasta grubu ile kontrol grubuna ait spermiyogram sonuçları karşılaştırıldığında sperm sayısı bakımından hasta grubunun ortalama değeri 31,15 ve kontrol grubunun değeri 32,45 olarak bulundu. Normal dağılıma uymadığı için Mann-Whitney U testi yapıldı. İstatistik analizinde p değeri ($p=0,074$) olarak saptandı. Total motilite ortalama değeri hasta grubunda 55,4 ve kontrol grubunda 51,7 olarak bulundu. Normal dağılım gösterdiğinden T testi uygulandı. Değerler arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ($p= 0.267$).

Tablo 10. Açıklanamayan İnfertil Kontrol ve Hasta Grubu Yaş, Sperm/ml ve Motilite Karşılaştırılması

Gruplar	Olgu Yaşı	Sperm/ml (x106)	Motilite %
Hasta 1	45	84	50
Hasta 2	44	145	68
Hasta 3	32	75	60
Hasta 4	39	37	69
Hasta 5	31	47	43
Hasta 6	34	180	43
Hasta 7	35	43	54
Hasta 8	34	62	61
Hasta 9	41	60	50
Hasta 10	35	49	74
Hasta 11	36	100	35
Hasta 12	35	67	47
Hasta 13	32	72	58
Hasta 14	36	30	57
Hasta 15	41	25	64
Hasta 16	28	16	51
Hasta 17	32	68	50
Hasta 18	29	31	74
Hasta 19	34	18	65
Hasta 20	36	53	51
Kontrol 1	39	32	62
Kontrol 2	39	52	57
Kontrol 3	39	40	68
Kontrol 4	31	60	40
Kontrol 5	29	22	59
Kontrol 6	39	24	55
Kontrol 7	39	59	44
Kontrol 8	36	15	40
Kontrol 9	34	20	65
Kontrol 10	36	62	61
Kontrol 11	36	24	57
Kontrol 12	37	15	61
Kontrol 13	43	15	40
Kontrol 14	33	43	40
Kontrol 15	34	120	44
Kontrol 16	26	16	42
Kontrol 17	37	79	52
Kontrol 18	31	29	44
Kontrol 19	39	61	61
Kontrol 20	37	72	42

Kontrol ve hasta grubunun SCD testi sonuçlarının yaş ve sperm sayısı ile ilişkisi Tablo 11’de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile hasta grubu arasında yaş/SCD değeri ve sperm sayısı/SCD değeri normal dağılım göstermediğinden Sperman korelasyon analiz yöntemi kullanıldı. Elde edilen veriler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. P değerleri sırasıyla ($p= 0,08$, $p= 0,095$) ($p>0.05$) (Tablo 11.).

Tablo 11. Kontrol Grubu ile Hasta Grubu Arasında Erkek Yaş/SCD Değeri ve Sperm Sayısı/SCD Değerlerinin Korelasyon Değerlerine Göre Sperman Testi ile Karşılaştırma Tablosu

Sperman korelasyon test	Korelasyon katsayısı	p değeri	Korelasyon katsayısı değerlendirme	Anlamı
SCD / sperm sayısı	$r= 0,572$	$p= 0,08$	0.05-0.30	Düşük ve önemsiz korelasyon
SCD / erkek yaşı	$r= 0,383$	$p= 0,095$	0.30-0.40	Düşük orta derecede korelasyon

Kontrol grubu ile Hasta grubunun klinik gebelik değerleri ile SCD değerleri arasında ise anlamlı bir fark bulunmuştur ($p< 0,001$). Hasta grubu klinik gebelik değeri/ SCD ortalama değeri $19,8\pm 7,2$ ve kontrol grubu klinik gebelik değeri/ SCD ortalama değeri $11,7\pm 4,8$ olup p değerleri $p<0,001$ ’dir (Tablo 12).

Hasta ve kontrol gruplarının SCD testinin % sonuçlarına göre klinik gebelik oranları ile karşılaştırılması ve oluşturduğu haloya göre % dağılımı tablo 12. ve 13’de analiz edilmiştir. Çıkan sonuçlara göre klinik gebelik değerleri hasta ve kontrol gruplarında oluşturduğu haloya göre anlamlı bulunmuştur ($p= 0,002$). İstatistik analizinde $p<0,01$ saptanması sebebiyle bu durum önemli bir anlamlılık düzeyidir.

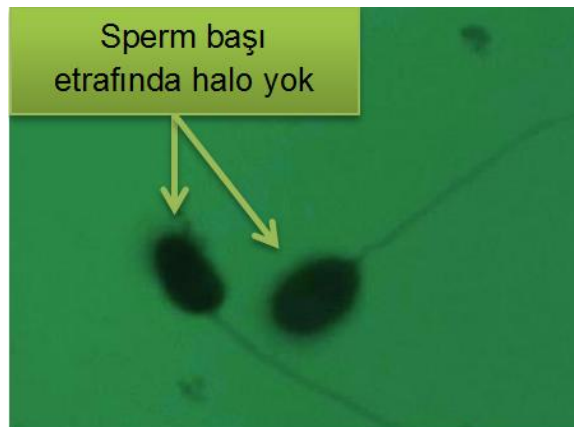
Tablo 12. Hasta ve Kontrol Grubunun SCD % Değerlerinin Klinik Gebelik Sonuçları ile Karşılaştırılması

Gruplar	SCD değeri (%)	Halo oluşumu (%)	Klinik gebelik
Hasta 1	24	15-30	Negatif
Hasta 2	21	15-30	Negatif
Hasta 3	7	<15	Negatif
Hasta 4	19	15-30	Negatif
Hasta 5	12	<15	Negatif
Hasta 6	24	5-30	Negatif
Hasta 7	21	15-30	Negatif
Hasta 8	26	15-30	Negatif
Hasta 9	16	15-30	Negatif
Hasta 10	27	15-30	Negatif
Hasta 11	8	<15	Negatif
Hasta 12	32	>30	Negatif
Hasta 13	11	<15	Negatif
Hasta 14	15	<15	Negatif
Hasta 15	27	15-30	Negatif
Hasta 16	21	15-30	Negatif
Hasta 17	12	<15	Negatif
Hasta 18	19	15-30	Negatif
Hasta 19	31	>30	Negatif
Hasta 20	23	15-30	Negatif
Kontrol 1	15	<15	Pozitif
Kontrol 2	22	15-30	Pozitif
Kontrol 3	10	<15	Pozitif
Kontrol 4	15	<15	Pozitif
Kontrol 5	6	<15	Pozitif
Kontrol 6	16	15-30	Pozitif
Kontrol 7	13	<15	Pozitif
Kontrol 8	11	<15	Pozitif
Kontrol 9	9	<15	Pozitif
Kontrol 10	8	<15	Pozitif
Kontrol 11	8	<15	Pozitif
Kontrol 12	5	<15	Pozitif
Kontrol 13	8	<15	Pozitif
Kontrol 14	6	<15	Pozitif
Kontrol 15	15	<15	Pozitif
Kontrol 16	7	<15	Pozitif
Kontrol 17	22	15-30	Pozitif
Kontrol 18	12	<15	Pozitif
Kontrol 19	14	<15	Pozitif
Kontrol 20	13	<15	Pozitif

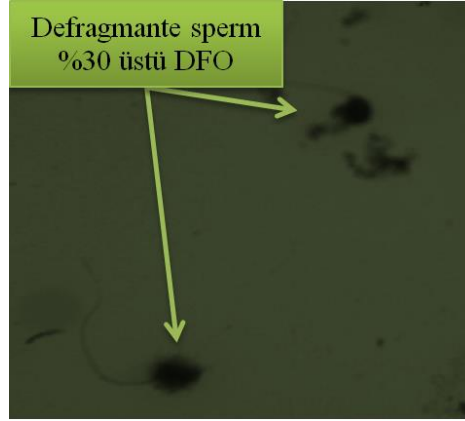
Tablo 13. Ki Kare Testi ile Yapılan Hasta Grubu ile Kontrol Grubu Arasında Klinik Gebelik ve Sperm Başları Etrafında Halo Oluşturmasının Yüzelere Göre Dağılımı Tablosu

	DNA FRAGMENTASYON ORANI (% DFO) (Halo)		
	<15	15-30	>30
Hasta grubu	n=6 %30	n=12 %60	n=2 %10
Kontrol grubu	n=17 %85	n=3 %15	n=0 %0
Toplam	n=23 %57,5	n=15 %37,5	n=2 %5

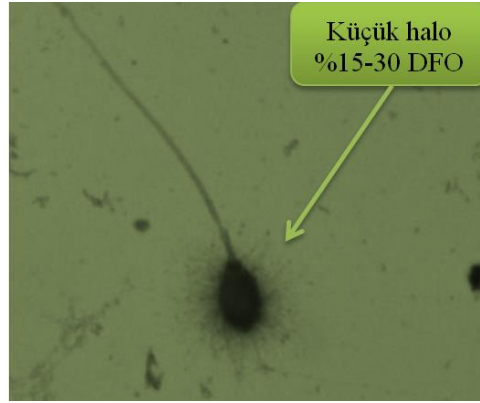
Sonuçları özetlersek: Hasta grubunda DNA fragmentasyonu arttıkça klinik gebelik gerçekleşmez. Sonuç negatif olur. Sperm başı etrafında halonun ya küçük olduğu ya da oluşmadığı gözlenir (% DFO >30 ve üstü) (Şekil 7-10). Kontrol grubunda DNA fragmentasyonu az olunca klinik gebelik elde edilir. Sonuç pozitif olur. Sperm başının etrafında büyük halo oluştuğu gözlenir (<15 ve %15-30) (Şekil 11-13). Her iki grupta da $p<0,01$ olması sebebiyle bu önemli bir anlamlılık düzeyidir ($p<0.001$).



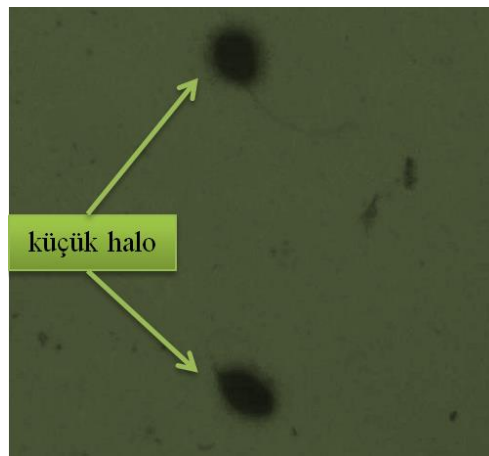
Şekil 7. %30 ve üstü DFO oranı: Sperm başı çevresinde halo oluşmayan ve yüksek oranda DNA fragmentasyonu içeren spermlerin görünümü.



Şekil 8. %30 üstü DFO oranı: Sperm başı etrafında halo oluşmadığı gözlenir.



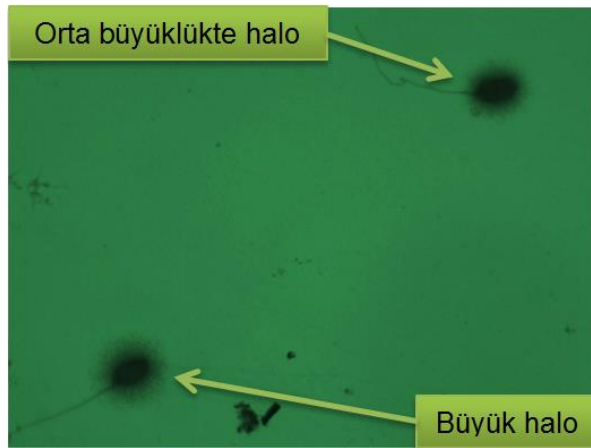
Şekil 9. %15-30 DFO oranı: Sperm başı etrafında küçük bir halo oluştuğu gözlenir.



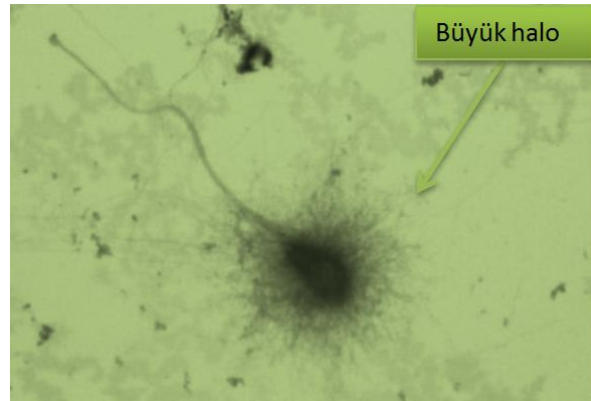
Şekil 10. %15-30 DFO oranı: Sperm başı etrafında küçük halo oluşumu gözlenir.



Şekil 11. DNA fragmentasyonu içermeyen sperm (%15 DFO) (sperm başı etrafında halo oluştuğu gözlenen) (sağda) ile DNA fragmentasyonu içeren sperm (%30 DFO) (sperm başı etrafında halo oluşmadığı gözlenen) (solda).



Şekil 12. %15 ve altı DFO oranında, sperm başı etrafında büyük halo oluştuğu (aşağıda) ve %15-%30 DFO oranına sahip, sperm başı etrafında orta büyüklükte halo oluştuğu (yukarıda) gözlenen spermeler.



Şekil 13. %15 ve altı DFO oranı: Sperm başı etrafında büyük halo oluşumu ve DNA fragmentasyonu içermeyen sperm görüntüsü.

Tablo 14. Otozomal Kromozomal Anomalilerinin Kontrol ve Hasta Grubunda Dağılımı, Ortalama ve p Değerleri* ($p > 0.05$) (A. 13. Kromozomun, B. 18. Kromozomun ve C. 21. Kromozomun Cinsiyet Kromozomlarıyla Birlikteliği)
Ns: İstatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

A. 13. Kromozom:

Otozomal	x,-13	x,+13	y,-13	y,+13
Hasta n=20	13	13	17	4
Ortalama	0,6	0,65	0,85	0,2
Kontrol n=20	11	3	10	2
Ortalama	0,6	0,15	0,5	0,1
p değeri	0,757	0,200	0,616	0,971

B. 18. Kromozom:

Otozomal	x,-18	x,+18	y,-18	y,+18
Hasta n=20	8	13	12	13
Ortalama	0,35	0,55	0,6	0,8
Kontrol n=20	6	11	9	15
Ortalama	0,35	0,65	0,45	0,6
p değeri	0,508	0,726	1,00	0,901

C. 21. Kromozom:

Otozomal	x,-21	x,+21	y,-21	y,+21
Hasta n=20	11	8	11	2
Ortalama	0,55	0,4	0,9	0,1
Kontrol n=20	3	10	18	14
Ortalama	0,15	0,5	0,95	0,7
p değeri	0,200	0,725	0,839	0,177

Hasta ve kontrol grubu kendi arasında taşıdığı otozomal kromozom anomalilerine göre grup olarak sınıflandırıldı (Tablo 14). Yapılan sperm sayımlarına ve alınan sinyal durumlarına göre spermelerin hangi kromozom eksikliği veya fazlalığı olduğu tabloda belirtildi. Ortalama ve p değerleri hesaplandı. Sperm üzerinde yapılan sperm FISH çalışmasında taşıdığı anomaliye ve monozomi (eksikliği) veya dizomi (fazlalığı) durumlarına göre hasta ve kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmediği tespit edildi ($p>0.05$). Çalışmamızda otozomal kromozomları (13, 18, 21) patolojik durumlarına göre değerlendirildiğinde incelediğimiz otozomal kromozomlar ve görülen anomaliler Şekil 14-20’de gösterilmiştir.

Hasta ve kontrol grubu kendi arasında taşıdığı cinsiyet kromozom anomalilerine göre grup olarak sınıflandırıldı (Tablo 15).

Tablo 15. Cinsiyet Kromozom Anomalilerinin Hasta ve Kontrol Gruplarında Dağılımı, Ortalama ve p Değerleri ($p>0.05$)

Cinsiyet	XXY	XYY	XY yokluğu
Hasta n=20	29	28	2
Ortalama	1,45	1,4	0,10
Kontrol n=20	30	19	0
Ortalama	1,5	0,95	0,00
p değeri	0,507	0,195	0,152

Ns: İstatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

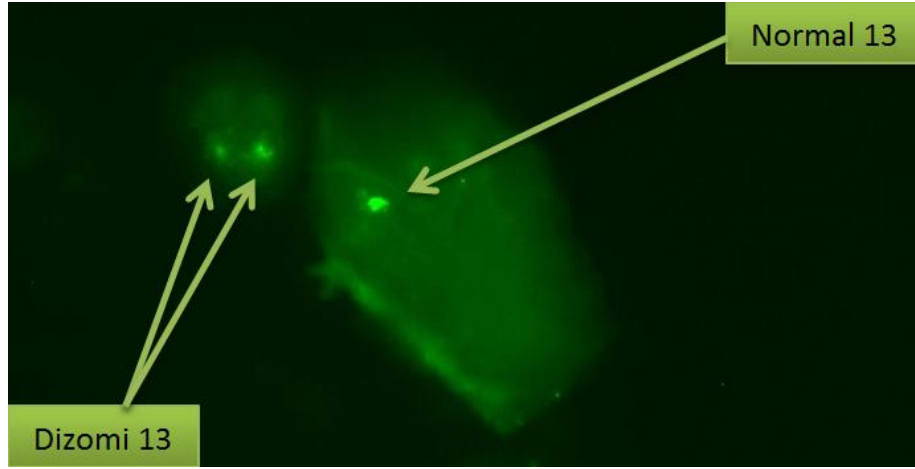
Ayrıca hasta ve kontrol gruplarında toplam anomalilerin dağılımı analiz edildi (Tablo 16). Yapılan sperm sayımlarında alınan sinyal durumlarına göre spermelerde hangi kromozom eksikliği veya fazlalığı saptandığı tabloda belirtildi. Ortalama ve p değerleri hesaplandı. Sperm üzerinde yapılan sperm FISH çalışmasında taşıdığı anomaliye göre hasta ve kontrol grupları karşılaştırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmediği saptandı ($p>0.05$). Çalışmamızda cinsiyet kromozomları (X, Y) patolojik durumlarına göre değerlendirildiğinde görülen anomaliler Şekil 18-21’de gösterilmiştir.

Tablo 16. Hasta ve Kontrol Gruplarında Toplam Anomalilerin Dağılımı, Ortalama ve p Değerleri ($p>0.05$)

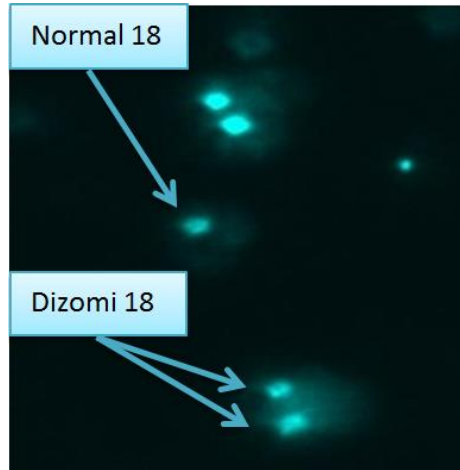
Gruplar	Toplam Otozomal anomalileri	Toplam cinsiyet anomalileri	Toplam anomali
Hasta n=20	105	59	164
Ortalama	7,05	2,95	10,1
Kontrol n=20	112	49	161
Ortalama	6,1	2,45	8,55
p değeri	0,77	0,546	0,439

Ns: İstatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır.

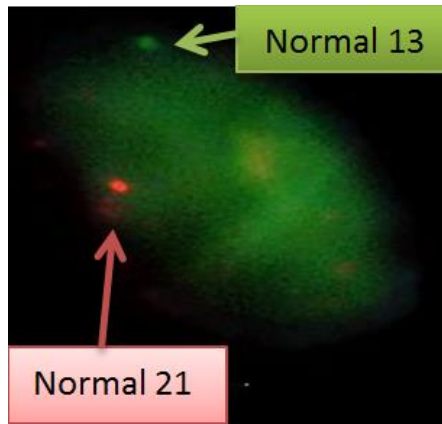
Toplam otozomal anomalileri hasta ve kontrol gruplarında otozomal kromozomlarında gözlemlenen anomalilerinin toplamı olarak ifade edildi. P değeri $p>0.05$ 'den büyük olduğundan anlamlı bir fark gözlenmedi ($p= 0,439$). Toplam cinsiyet anomalileri hasta ve kontrol gruplarında cinsiyet kromozomlarında gözlemlenen anomalilerinin toplamı olarak ifade edildi. P değeri $p>0.05$ 'den büyük olduğundan anlamlı bir fark gözlenmedi ($p= 0,77$). Toplam anomali terimi ise hasta ve kontrol grupları için ayrı ayrı incelenen kromozomlarda gözlenen cinsiyet ve otozomal anomalilerin toplam oranı olarak ifade edildi. P değeri $p>0.05$ 'den büyük saptandığı için anlamlı kabul edilmedi ($p= 0.546$).



Şekil 14. Kromozom 13 (yeşil sinyal) için, normal (bir adet sinyal) ve dizomi (iki adet sinyal) görülen spermeler.



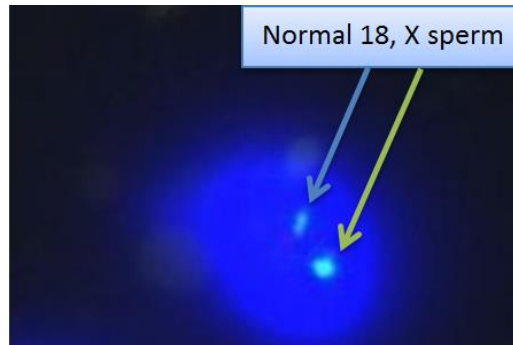
Şekil 15. Kromozom 18 (mavi sinyal) için, normal (bir adet sinyal) ve dizomi (iki adet sinyal) görülen spermeler.



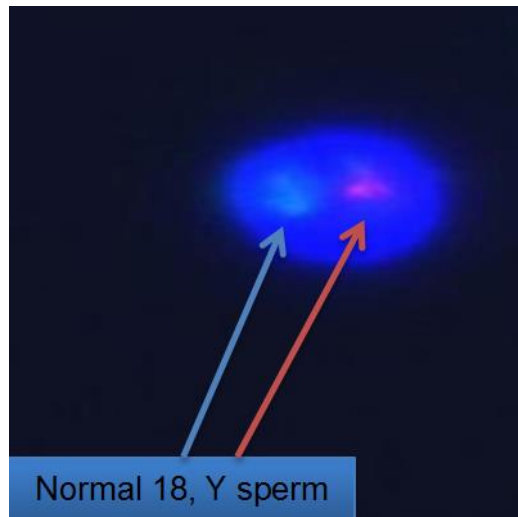
Şekil 16. Kromozom 13 (yeşil) ve Kromozom 21 (kırmızı) için normal sperm (birer sinyal).



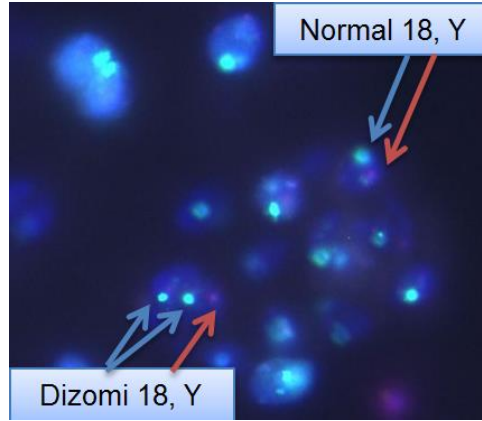
Şekil 17. Kromozom 21 (kırmızı sinyal) için, ok ile gösterilen spermde iki adet kırmızı sinyal görülmektedir (dizomi 21).



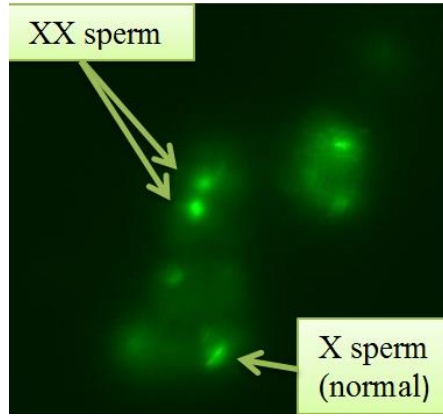
Şekil 18. Kromozom 18 (mavi) ve X kromozomu (yeşil) için normal sperm (bire sinyal).



Şekil 19. Kromozom 18 (mavi), Y kromozomu (kırmızı) için normal 18, Y (bire sinyal) sperm



Şekil 20. Kromozom 18 (mavi) ve Y kromozomu (kırmızı) için; normal 18, Y (birer sinyal) (yukarıda) ve normal Y (bir sinyal) ile 18 için dizomi (iki sinyal) (aşağıda) içeren spermler.



Şekil 21. X kromozomu (yeşil) için, anomalili XX sperm (çift sinyal) (yukarıda) ve normal sperm (tek sinyal) (aşağıda).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ:

İnfertilite, bir yıl süre ile herhangi bir korunma yöntemi uygulanmadan ve düzenli cinsel ilişkide bulunulmasına rağmen gebelik olmaması durumudur [1]. İnfertilite; %30-40 oranında erkeğe ait, %40-%50 oranında kadına ait nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Çiftlerin %25'inde erkek ve kadın faktörü birlikte bulunmaktadır. %10-15'inde ise tüm araştırmalara karşılık infertiliteyi açıklayabilecek bir neden bulunmamaktadır [4].

Açıklanamayan infertilite; temel infertilite araştırmaları sonucunda herhangi bir sebep bulunamayan çiftler için kullanılan bir terimdir. İnfertilite polikliniklerine başvuran çiftlerin yaklaşık %30'unda bir neden bulunamaz. Ancak kadının yaşı 35 üzerinde ise açıklanamayan infertilite tanısı daha sıklıkla görülmektedir [45]. Açıklanamayan infertilite oranı, hangi testlerin yapıldığına bağlı olarak değişebilir. Tanıda normal sperm analizi, ovulatuvar siklusların varlığı, normal uterin kavite ve en azından bir tubanın açık olduğunun gösterilmesi gerekir. Standart infertilite araştırmalarında saptanamayan bazı hastalıkların da azalmış doğurganlığa yol açtığı düşünülmektedir. Tedaviden bağımsız olarak açıklanamayan infertilite hastalarında kadının yaşı ve infertilite süresi uzadıkça gebelik şansı azalmaktadır [12]. Bu çalışmada Marchesi ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmadan farklı olarak kadın yaşı ile gebelik arasında anlamlı fark görülmedi ($p=0,379$). Bu durumun bu çalışmada grupları oluşturan hasta sayısının az olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Klinik olarak tespit edilmiş gebeliklerin %15'i spontan abortusla sonuçlanır. Bunların da yarısından fazlası konsepsiyondaki genetik defektlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Genel olarak gebelik kaybı, gebelik sürecinde ne kadar erken haftalarda oluşursa kromozomal kaynaklı olma olasılığının o kadar fazla olduğu düşünülmektedir [15].

Anöploidi; anneye ait genlerin ayrışmaması, babaya ait gonadal mozaisizm, translokasyonlar ve inversiyonlardan dolayı meydana gelmektedir. Spermde

anöplöidi tayini; literatürde anöplöidi oranı daha fazla bildirilmiş bazı kromozomlar seçilip, FISH yöntemi kullanılarak normalde her bir spermde birer tane bulunması gereken bu kromozomların yokluğu veya fazlalığı araştırılır [78, 90].

Bizim çalışmamızda Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, IVF Ünitesi'ne infertilite nedeniyle başvuran ve açıklanamayan infertilite tanısı alan, klinik gebelik elde edilmiş 20 kontrol ve gebelik elde edilemeyen 20 hasta çalışma grubunu oluşturmuştur. Çalışmamıza katılan grupların DNA fragmentasyonu ve sperm kromozom anomali frekansı sonuçları (sperm FISH testi ile) spermiyogram sonuçları ile tartışılacaktır.

FISH yöntemi 1990'lı yıllarda spermdeki kromozomal anomalilerin tespitinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır ve sperm nükleuslarında kromozomların spesifik olarak tanımlanmasına izin vermektedir. FISH tekniği hızlı, güvenilir olması ve teknik olarak çok sayıda spermatozoa incelenmesine izin vererek elde edilen istatistiksel verinin daha güvenilir olmasına olanak sağlamıştır.

Çalışmamızda son literatürlerde de kullanılmış olan üç renkli FISH yöntemi kullanılmıştır. İki prob seti halinde hazırlanan ticari kitlerle 18, X, Y ve 13, 21 kromozom analizleri yapılabilmektedir. Bu sayede aynı sperm içerisinde üç farklı kromozom sayısı aynı anda incelenebilmiştir. Yöntem diploid ve dizomik spermelerin kolayca ayrılmasına ve belirlenmesine olanak vermiştir. Bu nedenle dizomi 13, dizomi 18, dizomi 21, monozomi 18, monozomi 21, monozomi 13 otozomal kromozomlar ile XY, XX, YY cinsiyet anomalileri içeren sperm örneklerinin analizleri yapılarak elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Bu anomalilere sahip spermeler fertilizasyon sonrası toplumda en sık gözlenen ve yaşla bağdaşan Patau Sendromu (trizomi 13), Edwards Sendromu (trizomi 18), Down Sendromu (trizomi 21) ve cinsiyet kromozom anomalilerine neden olmaları bakımından önem taşımaktadırlar [77, 81].

Kromozom anomalilerini etkileyen mekanizmaları anlamak için gamet hücrelerinin incelenmesi gerekir. Çünkü bölünme kusurlarının büyük bir bölümü

mayoz sırasında oluşmaktadır. Spontan abortus ve intrauterin ölümlerin en önemli nedeni kromozom anöploidileridir [91, 92]

İnfertil erkeklerin spermleri kullanılarak gerçekleştirilen ICSI gibi ÜYT sonrası oluşan gebelik sonuçları, bu kromozom anomalilerinin büyük kısmının paternal kaynaklı olduğunu göstermiştir[93]. Sperm parametrelerindeki anormallikler sperm anöploidileri ile ilişkilendirilmektedir [90].

Calogero ve arkadaşlarının 2001 yılında 13 normospermi [sperm sayısı ≥ 15 (12-16 milyon/ml)] ve 18 oligospermi (sperm sayısı <15) arasında yaptıkları çalışmada ICSI ile gebelik elde edilmek istenen çiftlerin spermlerinin FISH testi ile incelenmesi sonucu sperm sayısı düşük olduğunda sperm anöploidi oranının artmış olduğu bildirilmektedir. ICSI ile gebelik sağlanan çiftlerde sperm sayısı normal literatür değerlerinde olan spermiyogramlar değerlendirildiğinde daha az sperm anöploidisi görülmüş ve daha anlamlı sonuçlar elde edilmiştir [94]. Bu çalışmada ise açıklanamayan infertil ve ICSI tanısı almış klinik gebelik elde edilen (kontrol) veya edilemeyen (hasta) iki grubun erkek yaşı ve total motilitesinin karşılaştırılmasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Sırasıyla p değerleri ($p=0,857$ ve $p= 0,267$). Her iki grup sperm sayıları bakımından incelendiğinde de çalışmaya katılan çiftlerin sperm sonuçları klinik gebelik oranlarında anlamlı bir bulguya rastlanmamıştır ($p>0,05$) ($p=0,074$).

Her iki grup da sperm sayısı ≥ 15 (12-16) olduğundan erkeğin spermleri FISH testi ile incelendiğinde sperm anöploidisi açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Her iki grupta klinik gebelik oranları otozomal ve gonozomal kromozomlarda sperm anöploidisi bakımından karşılaştırıldığında $p>0,05$ olduğundan anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Calogero ve arkadaşları çalışmalarında bulgularını klinik gebelik açısından karşılaştırmamıştır. Bizim çalışmamızın en büyük özelliği ve farklılığı ise klinik gebelik sonuçlarına göre sperm sayısı ve kromozom anomalilerinin karşılaştırılması ve ayrıca çalışılan hasta sayısının anlamlı bir oranda daha fazla olmasıdır.

Cooper ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada sperm parametreleri ve sperm kromozom anomalileri arasında anlamlı bir bağlantı olduğu ve düşük kalitede sperm parametreleri bulunan olgularda sperm kromozom anomali oranının, normal donörlerle karşılaştırıldığında 2 ila 10 kat yüksek olarak saptandığı rapor edilmiştir. Bu nedenle sperm sayısı normal kabul edilen olgularda daha az sperm kromozom anomalisi gözlenmiştir [4]. Bu çalışmada ise ICSI işlemi uygulanan açıklanamayan infertilite ön tanılı çiftlerden klinik gebelik elde edilen (n=20) ve edilmeyen (n=20) hasta gruplarından elde edilen sperm örneklerinde kromozom anomalisi oranlarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu durumun çalışma gruplarını oluşturan hastalardan elde edilen sperm örneklerinin analizinde, örneklerin normal sperm parametre aralığında olduğunun saptanmasıyla ilişkili olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmaya katılan hastaların spermleri FISH testi ile incelendiğinde hasta grubunda 18, X, Y probu ile analiz edilen spermlerin %52,3'ü X kromozomu, %47,7'si Y kromozomu taşıırken, kontrol grubunda 18, X, Y probu ile analiz edilen spermlerin %42,1'i X kromozomu, %57,9'u Y kromozomu taşıyordu. Hem hasta grubunda hem de kontrol grubunda X/Y oranları arasında istatistiki olarak fark saptanmadı. Benzer şekilde kontrol grubu ile hasta grubu arasında da fark gözlenmedi ($p = 0,053$) ($p > 0,05$).

Hasta ve kontrol grubu kendi arasında taşıdığı otozomal kromozom anomalilerine göre grup olarak sınıflandırıldı. Kromozom eksikliği veya fazlalığına göre gruplara ayrıldı. Buna göre sperm çekirdeğinde X veya Y kromozomu bulundurmasına ve taşıdığı anomaliye göre dizomi 13, dizomi 18, dizomi 21, monozomi 13, monozomi 21, monozomi 18 ve diploid kromozom kuruluşuna sahip sonuçlar değerlendirilmiştir. Çıkan sonuçlara göre anlamlı bir fark saptanmamıştır. Sırasıyla taşıdığı otozomal anomaliye göre p değerleri: [(x,-13 için $p = 0,757$); (x+13 için $p = 0,2$); (y-13 için $p = 0,616$); (y+13 için $p = 0,971$); (x-18 için $p = 0,508$); (x+18 için $p = 0,726$); (y-18 için $p = 1,00$); (y+18 için $p = 0,901$); (x-21 için $p = 0,2$); (x+21 için $p = 0,725$); (y-21 için $p = 0,839$); (y+21 için $p = 0,177$)].

Çalışmamızda açıklanamayan infertil kontrol ve hasta hasta grubumuzun spermleri FISH testi ile incelendiğinde, kendi arasında taşıdığı cinsiyet kromozomlarının azlığı veya fazlalığına göre değerlendirildi (XXY, XYY, XY yokluğu). Çıkan sonuçlara göre anlamlı bir fark bulunmadı. Sırasıyla taşıdığı cinsiyet anomalisine göre p değerleri; [(XXY için $p=0,507$); (XYY için $p= 0,195$); XY yokluğu için $p=0,152$].

Hasta ve kontrol grubunun toplam cinsiyet ve toplam otozomal anomalileri değerlendirildiğinde istatistik analizine göre anlamlı bir fark görülmedi. Toplam cinsiyet anomalisi için p değeri; $p=0,546$ ve toplam otozomal anomali için p değeri; $p=0,775$ bulundu. Toplam anomalilerin p değeri ise $p=0,439$ olarak saptandı.

Yüksek sperm kromozom anöploidisi oranı ÜYT'in başarısında negatif bir parametredir. ÜYT'e en çok yönlendirilen olgu grubu oligozoospermik erkeklerdir [93]. Yapılan çalışmaların çoğunlukla oligospermik erkeklere yönelik olduğu gözlenmektedir. Bu çalışmada ise ÜYT uygulamalarında sık karşılaşılan, farklı bir infertilite nedeni olarak henüz bilimsel olarak açıklanamayan infertilite hasta grubu seçilerek diğer çalışmalara göre sperm anomalisi sonuçlarının klinik gebelik açısından değerlendirmesi yapılmıştır.

Bu bulgular ışığında çalışma yapılan gruplardaki örnek sayısının az olması ve bunun yanında henüz çok güncel olan bu konuda ve infertilite konusunda yeni yeni tanımlanan açıklanamayan infertilite ön tanılı hastalarda yapılan çalışma sayısının da az olması nedeniyle tartışmayı yönlendirecek yeterli veriye ulaşılamamaktadır. Bu nedenle elde edilen bu verilerin bir başlangıç olarak yapılacak diğer çalışmalarla karşılaştırılması ve sonuçların değerlendirilmesi gerektiği kanısındayız.

Özellikle ÜYT uygulamalarında sperm DNA'sının değerlendirilmesinin, fertilizasyon kapasitesini ölçmede daha kıymetli olduğu ve öncelikli kullanılması gerektiği düşüncesindeyiz. Bizim de yapılmasını önerdiğimiz sperm DNA yapısı analizinin halen rutin uygulamalarında yer alan sperm morfolojisinin, konsantrasyonun ve motilitesinin analizlerinin yapıldığı klasik sperm değerlendirme

yöntemine göre de daha fazla ve öncelikli tanısal önemi olduğu düşünülmektedir. Rutin semen analizi her zaman sperm DNA'sının kalitesini göstermez. Aslında analiz sırasında sperm DNA'sı hasarlı olsa da bu rutin analizde fark edilemeyen değerlendirilemeyebilir [95].

Sperm DNA hasarı ve meydana gelen DNA fragmentasyonunu belirlemek için sperme uygulanan SCD testi sonucu merkezi bir çekirdek çevresinde DNA'ların ayrılması sonucu periferik bir halo (hale) oluşur. Normal DNA'ya sahip olan spermiler geniş bir halo oluştururken, hasarlı DNA içeren spermiler çok küçük halo verir ya da hiç halo vermez [96].

Son on yıllık süreçte, erkek infertilitesinde sperm nükleer DNA bütünlüğünün rolünü araştıran çalışmalar artmıştır. Bu çalışmalarda erkek infertilitesini öngörmede sperm DNA bütünlüğünün rutin semen analizine göre daha iyi bir belirteç olabileceği hipotezi savunulmuştur. Sperm DNA hasarının infertil erkeklerde fertil erkeklerle oranla daha fazla görüldüğü ve sperm DNA hasarının bu hastalarda fertilitite potansiyelini olumsuz etkilediği gösterilmiştir [85] Sperm DNA hasarı infertil erkeklerde daha sık görülmektedir ve DNA fragmentasyon oranı (DFO) arttıkça fertilitite bozulmaktadır [97, 98]. Sperm DNA hasarı erkek infertilitesinin önemli bir sebebidir ve IVF uygulamalarının sonuçlarını belirgin olarak etkiler.

Bu konuda Zini ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada anlamlı sonuçlara ulaşıldığı rapor edilmiştir. Günümüzde çalışmalar infertil erkeklerde yoğunlaşmıştır. Sperm sayısı normalden düşük olan hastalarda gebelik oranı düşerken DNA fragmentasyon oranının arttığına dair çalışmalar dikkat çekmektedir. Bu nedenle sperm sayısı normal ve infertilite nedeni belli olmayan çiftlerde de DNA fragmentasyon oranlarına bakılması doğru bir yaklaşım olacaktır. DNA fragmentasyon oranının düşük veya yüksek olduğu hastalarda klinik gebelik elde edilip edilmemesi bizi doğru sonuçlara götürecektir.

Yapılan ilk çalışmalarda IVF ve ICSI sonuçları ile sperm DNA bütünlüğü arasında bir ilişkinin varlığı tam olarak gösterilememiştir. Birçok klinik çalışmada

sperm DNA hasarı ile fertilizasyon oranları arasında anlamlı korelasyon bulunamamıştır [99]. Bunların üstüne yapılan çalışmalarda ise hasta sayısı arttıkça istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Bizim çalışmamızda sperm DNA hasarının %30 ve üstü DFO oranlarda olduğunda fertilizasyon ve gebelik oranlarını etkilediği saptanmıştır.

Sperm DNA hasarının üreme üzerine etkilerini değerlendirmek için en önemli parametrelerden biri klinik gebelik sonuçlarıdır. Ancak bu konu tartışmalı olup çok farklı görüşler rapor edilmiştir. İlk çalışmalar yüksek sperm DNA hasarı olan hastaların IVF ve ICSI ile düşük gebelik oranlarına sahip olduğunu göstermektedir [100]. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise yüksek sperm kromatin hasarı olan hastalarda da başarılı gebelik oranları bildirilmiştir [101-103]

Zini ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı çalışmada semen analizi normal olan erkeklerin %8'inde DNA hasarı olduğunu göstermişlerdir [104]. Evenson ve arkadaşları sperm DNA'sındaki hasar %30'dan fazla olduğunda doğal gebeliğin mümkün olmadığını bildirmişlerdir [105]. Bu veriler de çalışmamızı destekler niteliktedir.

Sonuç:

Açıklanamayan infertil hastalarda sağlıklı klinik gebelik elde edilmesi, düşüklerin önüne geçilmesi ve anomalili eve bebek riskini ortadan kaldırmak için ICSI uygulama başarısızlıklarında sperm DNA hasarı testi ve sperm FISH testinin hastalara önerilmesi gereken yardımcı testler olduğu düşüncesindeyiz Tüm bu veriler beraber değerlendirildiğinde elde edilecek bulgular ile klinik olarak riskli çiftler için sağlıklı bir bebeğe sahip olma şansı hakkında kişisel bir risk belirleme ön görülebilecektir. Hastalara gerekli durumlarda genetik danışmanlık verilmeli preimplantasyon tanı ve prenatal tanıya yönlendirilmelidirler.

Ayrıca daha çok sayıda hasta popülasyonu ile yapılacak yeni çalışmaların bu konuya açıklık getireceği düşüncesindeyiz. Çalışmalar daha fazla hasta popülasyonu ile yapılırsa üreme bozuklukları tedavisinde ilerleme kat edilmesini sağlayabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Benyamini, Y., M. Gozlan, and E. Kokia, *Variability in the difficulties experienced by women undergoing infertility treatments*. Fertil Steril, 2005. **83**(2): p. 275-83.
2. Medicine, T.P.C.o.t.A.S.o.R., *Optimal evaluation of the infertile female*. Fertil Steril, 2004. **82**: p. 169-172.
3. Speroff L., G.R., Kase NG, , *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 1999: p. 643-724.
4. Cooper, T.G., et al., *World Health Organization reference values for human semen characteristics*. Hum Reprod Update, 2010. **16**(3): p. 231-45.
5. Gülekli B., *Üreme Endokrinolojisi Teknikleri ve Cerrahisi*. 2008: p. 542.
6. Amiel, A., et al., *Interchromosomal effect leading to an increase in aneuploidy in sperm nuclei in a man heterozygous for pericentric inversion (inv 9) and C-heterochromatin*. J Hum Genet, 2001. **46**(5): p. 245-50.
7. Blanco, J., J. Egozcue, and F. Vidal, *Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization*. Hum Reprod, 1996. **11**(4): p. 722-6.
8. Blanco, J., et al., *FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13)*. Cytogenet Cell Genet, 1998. **83**(3-4): p. 275-80.
9. Maheshwari, A., M. Hamilton, and S. Bhattacharya, *Effect of female age on the diagnostic categories of infertility*. Hum Reprod, 2008. **23**(3): p. 538-42.
10. Guzick, D.S., et al., *Efficacy of treatment for unexplained infertility*. Fertil Steril, 1998. **70**(2): p. 207-13.
11. Sousa M., T.J., *Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection*. Human Reprod 1. **1994**(9): p. 2374-80.
12. Marchesi, D.E., H.L. Feng, and A. Hershlag, *Current assessment of sperm DNA integrity*. Arch Androl, 2007. **53**(5): p. 239-47.
13. Kirkpatrick, G., et al., *A comparison of sperm aneuploidy rates between infertile men with normal and abnormal karyotypes*. Hum Reprod, 2008. **23**(7): p. 1679-83.
14. Cebesoy, F.B., K. Aydos, and C. Unlu, *Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI*. Arch Androl, 2006. **52**(5): p. 397-402.
15. Martin, R.H., et al., *A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia*. Biol Reprod, 2003. **69**(2): p. 535-9.
16. Kupka, M.S., et al., *Impact of reproductive history on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome: evidence from the German IVF Registry*. Fertil Steril, 2003. **80**(3): p. 508-16.
17. Kaygılı Ö., *Erkek infertilitesinde tanı yöntemleri*. TÜYK Ders Notları Kitabı,, 2006: p. 253-261.
18. Whitman-Elia, G.F. and E.G. Baxley, *A primary care approach to the infertile couple*. J Am Board Fam Pract, 2001. **14**(1): p. 33-45.
19. Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological, A. and M. Practice Committee of the American Society for Reproductive, *Report on optimal evaluation of the infertile male*. Fertil Steril, 2006. **86**(5 Suppl 1): p. S202-9.

20. Dohle G.R., J.A., Kopa Z., Giwercman A., Diemer T., Hargreave T.B., , *EAU Guidelines on male infertility*. 2009.
21. Emir L., *Erkek infertilitesinde tanı yöntemleri*. TUYK Ders Notları Kitabı, 2008: p. 291-298.
22. Sigman, M. and J.P. Jarow, *Endocrine evaluation of infertile men*. Urology, 1997. **50**(5): p. 659-64.
23. Kandıralı E., İ.K.A., Çayan S., Semerci B., Orhan İ., Aşçı R., Yaman Ö., Usta MF., Kendrici M., *Semen analizi ve sperm morfolojisi; Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. Türk Androloji Derneği, 2004: p. 317-323.
24. Practice Committee of American Society for Reproductive, M., *Report on varicocele and infertility*. Fertil Steril, 2008. **90**(5 Suppl): p. S247-9.
25. Knochenhauer, E.S., et al., *Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(9): p. 3078-82.
26. Michelmore, K.F., et al., *Polycystic ovaries and associated clinical and biochemical features in young women*. Clin Endocrinol (Oxf), 1999. **51**(6): p. 779-86.
27. Stein IF, L.N., *Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries*. Am J Obstet Gynecol,, 1935. **29**: p. 181-191.
28. Urbaneek, M., et al., *Searching for the polycystic ovary syndrome genes*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2000. **13 Suppl 5**: p. 1311-3.
29. Franks, S., H. Mason, and D. Willis, *Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **163**(1-2): p. 49-52.
30. Aziz R, W.K., Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yıldız BO., *The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population*. J Clin Endocrinol Metab,, 2004. **89**: p. 2745-2749.
31. Dunaif, A., et al., *Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome*. Diabetes, 1989. **38**(9): p. 1165-74.
32. Pauerstein, C.J. and C.A. Eddy, *The role of the oviduct in reproduction; our knowledge and our ignorance*. J Reprod Fertil, 1979. **55**(1): p. 223-9.
33. Ozmen, B., K. Diedrich, and S. Al-Hasani, *Hydrosalpinx and IVF: assessment of treatments implemented prior to IVF*. Reprod Biomed Online, 2007. **14**(2): p. 235-41.
34. Meyer, W.R., et al., *Hydrosalpinges adversely affect markers of endometrial receptivity*. Hum Reprod, 1997. **12**(7): p. 1393-8.
35. Hughes EG, F.D., Collins JA. , *A quantitative overview of controlled trials in endometriosis associated infertility*. Fertil Steril, 1993. **59**: p. 963-970.
36. Rodriguez –Escudero FJ, N.J., Corcostegui B, et al., *Does minimal endometriosis reduce fecundity?* Fertil Steril, 1998. **50**: p. 522-524.
37. Al-Fadhi R, K.S., Tulandi T, et al., *Effects of different stages of endometriosis on the outcome of in vitro fertilization*. J Obstet Gynaecol., 2006. **28**(10): p. 888-891.
38. Barnhart K, D.-S.R., Coutifaris C., *Effect of endometriosis on in vitro fertization*. Fertil Steril, 2002. **77**: p. 1148-55.
39. Kuivasaari P, H.M., Anttila M, et al., *Effect of endometriosis on IVF/ICSI outcome: stage III/IV endometriosis worsens cumulative pregnancy and liveborn rates*. Hum Reprod., 2005. **20**(11): p. 3130-5.
40. Dechaud H, D.C., Brunet C, et al., *Endometriosis and in vitro fertilization: a review*. Gynecol Endocrinol, 2009. **25**(11): p. 717-721.
41. F., Ö., *Apoptoz*. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2002. **9**(2): p. 143-148.

42. CB., T., *Apoptosis*, in *Fundamental Immunology*. 1999: Lippincott-Raven Publishers.
43. Wyllie AH, D.E.C.d.I.M.J.D., Issacson PG, Wright N., in *Oxford Textbook of Pathology*. 1992: USA, Oxford University. p. 142-147.
44. Brandes, M., et al., *Unexplained infertility: overall ongoing pregnancy rate and mode of conception*. Hum Reprod, 2011. **26**(2): p. 360-8.
45. Sousa M., T.J., *Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection*. Human Reprod 1994(9): p. 2374-80.
46. Gearon C., T.A., Forman R.,, *Factors affecting activation and fertilization of human oocytes following intracytoplasmic injection*. Hum. Reprod, 1995. **10**: p. 896-902.
47. Leggat, P.A., et al., *Linking yellow fever vaccination centre registration and training in travel medicine*. Travel Med Infect Dis, 2003. **1**(1): p. 17-8.
48. Parks, J.E., et al., *Prospects for spermatogenesis in vitro*. Theriogenology, 2003. **59**(1): p. 73-86.
49. Clermont, Y., *Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal*. Physiol Rev, 1972. **52**(1): p. 198-236.
50. Gartner, L.P., A.Y. Saad, and J.L. Hiatt, *Effects of nicotine on tongue development in the CD-1 mouse*. Eur J Morphol, 1997. **35**(5): p. 337-43.
51. Syed, V. and N.B. Hecht, *Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **186**(2): p. 155-7.
52. Krongrad, A., et al., *Predictors of general quality of life in patients with benign prostate hyperplasia or prostate cancer*. J Urol, 1997. **157**(2): p. 534-8.
53. Adler, I.D., *Spermatogenesis and mutagenicity of environmental hazards: extrapolation of genetic risk from mouse to man*. Andrologia, 2000. **32**(4-5): p. 233-7.
54. K., A., *Erkek infertilitesi*. Temel Üroloji, 2007. **3**: p. 967-969.
55. Sairam, M.R. and H. Krishnamurthy, *The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models*. Arch Med Res, 2001. **32**(6): p. 601-8.
56. Hedger, M.P. and A. Meinhardt, *Cytokines and the immune-testicular axis*. J Reprod Immunol, 2003. **58**(1): p. 1-26.
57. Georgiades, P., et al., *VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages*. Genesis, 2002. **34**(4): p. 251-6.
58. Meistrich, M.L., et al., *Dibromochloropropane inhibits spermatogonial development in rats*. Reprod Toxicol, 2003. **17**(3): p. 263-71.
59. Aydos K, *Subfertil erkeğin değerlendirilmesi*. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği, 2004: p. 161-74.
60. Sigman M., *Erkek infertilitesi*. Campbell Üroloji, 2005: p. 1475-1531.
61. Dube, J.Y., D. Gaudreault, and R.R. Tremblay, *The concentration of immunoreactive prostate specific antigen is not decreased in viscous semen samples*. Andrologia, 1989. **21**(2): p. 136-9.
62. Emir L, *Erkek infertilitesinde tanı yöntemleri*. TUYK Ders Notları Kitabı, 2008: p. 291-298.
63. Amelar, R.D., L. Dubin, and C. Schoenfeld, *Semen analysis. An office technique*. Urology, 1973. **2**(6): p. 605-11.
64. Ombelet, W., et al., *Results of a questionnaire on sperm morphology assessment*. Hum Reprod, 1997. **12**(5): p. 1015-20.

65. Tomlinson, M.J., C.L. Barratt, and I.D. Cooke, *Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility*. Fertil Steril, 1993. **60**(6): p. 1069-75.
66. Wolff, H., et al., *Leukocytospermia is associated with poor semen quality*. Fertil Steril, 1990. **53**(3): p. 528-36.
67. Kremer, J. and S. Jager, *Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon with special regard to immunoglobulin class and antigen-reactive sites*. Int J Androl, 1980. **3**(2): p. 143-52.
68. Pavlovich, C.P., et al., *Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men*. J Urol, 2001. **165**(3): p. 837-41.
69. Aydos S, *Erkek infertilitesi ve genetik*. Türkiye Klinikleri Üroloji Özel Erkek İnfertilitesi Özel Sayısı, 2008. **1**(1): p. 34-40.
70. Zamboni L., *The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality*. Fertil Steril, 1987. **48**(5): p. 711-34.
71. Ward, W.S. and D.S. Coffey, *DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells*. Biol Reprod, 1991. **44**(4): p. 569-74.
72. Longo, F.J., *Fine structure of the mammalian egg cortex*. Am J Anat, 1985. **174**(3): p. 303-15.
73. Sailer, B.L., L.K. Jost, and D.P. Evenson, *Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay*. J Androl, 1995. **16**(1): p. 80-7.
74. Pedersen, H., *Ultrastructure of spermatozoa with abnormal morphology and predominantly single-stranded DNA*. Arch Androl, 1987. **19**(2): p. 97-105.
75. Hamamah, S., A. Fignon, and J. Lansac, *The effect of male factors in repeated spontaneous abortion: lesson from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod Update, 1997. **3**(4): p. 393-400.
76. Durak B, *Normal ve Translokasyon Taşıyıcısı Erkeklerin Spermiumlarında FISH ile Kromozom Analizi*. Tıbbi Genetik Bilim Dalı Doktora Tezi. Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,, 1998.
77. Gardner RJM., S.G., *Reproductive Failure. In: Chromosome abnormalities and genetic counselling*. New York:Oxford University Press, 2004: p. 339-349.
78. Martin, R.H., *Cytogenetic determinants of male fertility*. Hum Reprod Update, 2008. **14**(4): p. 379-90.
79. Pang, M.G., et al., *Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod, 1999. **14**(5): p. 1266-73.
80. Shi, Q. and R.H. Martin, *Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men*. Reproduction, 2001. **121**(5): p. 655-66.
81. Vegetti, W., et al., *Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men*. Hum Reprod, 2000. **15**(2): p. 351-65.
82. Balasuriya, A., et al., *Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa*. Reprod Biomed Online, 2011. **22**(5): p. 428-36.

83. Sun J-G., J.A., *Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization invitro*. Biol.Reprod, 1997. **56**: p. 602-607.
84. Lopes, S., et al., *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): p. 528-32.
85. Spano, M., et al., *Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team*. Fertil Steril, 2000. **73**(1): p. 43-50.
86. Gorczyca, W., J. Gong, and Z. Darzynkiewicz, *Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays*. Cancer Res, 1993. **53**(8): p. 1945-51.
87. Caglar, G.S., et al., *Semen DNA fragmentation index, evaluated with both TUNEL and Comet assay, and the ICSI outcome*. In Vivo, 2007. **21**(6): p. 1075-80.
88. Sergerie, M., et al., *Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility*. Hum Reprod, 2005. **20**(12): p. 3446-51.
89. Velez de la Calle, J.F., et al., *Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology programs: results of a large prospective multicenter study*. Fertil Steril, 2008. **90**(5): p. 1792-9.
90. Tempest, H.G., et al., *The association between male infertility and sperm disomy: evidence for variation in disomy levels among individuals and a correlation between particular semen parameters and disomy of specific chromosome pairs*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 82.
91. Asada H, S.K., Hashiba T, Kuroshima M, Kobayashi N, Yoshimura Y. , *The effects of age and abnormal sperm count on the nondisjunction of spermatozoa*. J Asist Reprod Genet, 2000. **17**: p. 51-9.
92. Schmid, T.E., et al., *Detection of structural and numerical chromosomal abnormalities by ACM-FISH analysis in sperm of oligozoospermic infertility patients*. Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1395-400.
93. Mehdi, M., et al., *Analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) of the relationship between gonosomal aneuploidy and the results of assisted reproduction in men with severe oligozoospermia*. Andrologia, 2006. **38**(4): p. 137-41.
94. Calogero, A.E., et al., *High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome*. Hum Reprod, 2001. **16**(7): p. 1433-9.
95. Agarwal, A. and T.M. Said, *Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility*. Hum Reprod Update, 2003. **9**(4): p. 331-45.
96. Fernandez, J.L., et al., *Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test*. Fertil Steril, 2005. **84**(4): p. 833-42.
97. Guzick, D.S., et al., *Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1388-93.
98. Zini, A., et al., *Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men*. Urology, 2001. **58**(2): p. 258-61.
99. Gandini, L., et al., *Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage*. Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1409-17.
100. Tomlinson, M.J., et al., *Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception*. Hum Reprod, 2001. **16**(10): p. 2160-5.

101. Check, J.H., et al., *Effect of an abnormal sperm chromatin structural assay (SCSA) on pregnancy outcome following (IVF) with ICSI in previous IVF failures.* Arch Androl, 2005. **51**(2): p. 121-4.
102. Bungum, M., et al., *The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI.* Hum Reprod, 2004. **19**(6): p. 1401-8.
103. Bungum, M., et al., *Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome.* Hum Reprod, 2007. **22**(1): p. 174-9.
104. Zini, A., et al., *Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men.* Fertil Steril, 2001. **75**(4): p. 674-7.
105. Evenson, D.P., K.L. Larson, and L.K. Jost, *Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques.* J Androl, 2002. **23**(1): p. 25-43.