

T.C.

YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**IUI OLGULARINDA SPERM FONKSİYON TESTLERİNİN GEBELİĞİ ÖNGÖRMEDEKİ
DEĞERİ.**

ABDULLAH YİĞİT

DANIŞMAN

PROF. DR. TÜLAY İREZ

İSTANBUL-2015

T.C.
YENİ YÜZYIL üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Savunma Tarihi: .../.../2015

Prof. Dr. Tülay İrez

Biruni Üniversitesi

Danışman

Jüri Başkanı

Üye

Doç. Dr. Meriç Karacan

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

üye

Prof.Dr.İbrahim Çevik

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ABDULLAH YİĞİT

İTHAF

Benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen sevgili ve çok değerli hocam **Prof. Dr. TÜLAY İREZ**'e ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden itibaren benimle çok ilgilenen, tez çalışmamın yapılmasında bilgisini ve değerli görüşlerini paylaşan, değerli danışmanım ve hocam, sayın **Prof. Dr.TÜLAY İREZ'e**, , yüksek lisans eğitimimde beni yalnız bırakmayan ve yüksek lisans tezimi yazarken bana destek olan değerli arkadaşım **Emb.SEVİL ÜNAL'a**, teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez yazımındaki istatistik değerlendirmelerinde bana yardımcı olan sayın **Y.Doç. Dr. NURTEN DAYIOĞLU** hocam, yüksek lisans, eğitimime başladığım ilk günden beri bana her konuda yardımcı olan ve manevi gücü bana hissettiren çok kıymetli eşime ve ailem'e çok teşekkür ederim.

Tez yazım aşamasında manevi desteklerini hissettiren tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu alışma, Yeni Yüzyıl Üniversitesi Taksim Alman Hastanesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İ
BEYAN	İİ
İTHAF	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
BİLGİ.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	İX
GRAFİKLER VE ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X-Xİ
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ.....	Vİİ-Vİİİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT	Xİ
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	16
4. BULGULAR.....	20
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	24
6.ETİK KURUL RAPORU.....	
7. ÖZGEÇMİŞ.....	
8. BELGELER.....	

KISALTMALAR

IUI	:İntra uterin inseminasyon
IVF	: İnvitro fertilizasyon
ICSI	: İntra stoplazmik sperm injeksiyonu
SCD	: Sperm kromatin dispersiyon(dağılım)
AB	: Anilin Mavisi testi Kromatin kondansasyonu(yoğunluğu)
AAB	: Asidik anilin mavisi (Anilin blue)
ROC Eğrisi	: Receiver Operating Characteric.
HOS	:Hipoosmotik şişme testi
DNA	: Deoksiribonükleik asit.
PR	: Progresif
NP	: Non progresif
Vitalite	: Canlılık
Gradient	: Yoğunluk sıralayıcısı
Swim up	: Yüzdürme
HTF	: Human tubal fluid (insan tuba sıvısı)
HEPES	: 4-(2-hydroxyethyl)-piperazineethanesulfonic acid)
PVP	: Polyvinylpyrrolidon
Sperm Buffer mediumu.	: 5mg/ml HSA içeren HEPES ile tamponlanmış sperm kültür
Pure gradient	: Saf gradient
TPMSS	: Total progresif motil sperm sayısı
Rpm	: Santrifüj devri sayısı
g	: Santrifüj kuvveti
FISH	: Fluoresan in situ hibridizasyon
Tris	: Trishydroxymethylaminomethane

DTT	:Dithiothreitol
SDS	:Sodium dodecyl sulfate
EDTA	: Ethylenediamine-tetraacetic acid
DAPI	: (4',6-diamidino-2-phenylindole)
HSA	:Human Serum Albumin

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1: Semen Analiziinde standard değerler Dünya sağlık örgütü (WHO 2010)...sayfa 5

Tablo 2: Swim-up uygulayabilme kriterleri.....sayfa 8

Tablo 3. Çalışmada kullanılan malzemeler, firma adı ve alındığı ülkeler tabloda gösterilmiştir.....sayfa 19-20

Tablo 4. IUI olgularında gebelik pozitif ve negatif olgularda sperm fonksiyon Parametrelerinin karşılaştırılması.....sayfa 21

GRAFİKLER

Grafik 1 ; Gebelik kriterine göre anilin boyası ile tespit edilen kromatin kondansasyon değerlerinin gebe olan ve olmayan gruplardaki değeri.....sayfa 22

Grafik 2 ; Anilin mavisi boyaması ile tespit edilen sperm kromatin hasarının gebelik ile ilişkisinde ROC eğrisi ile tespit.....sayfa 22

Grafik 3. Hipoosmotik şişme skorlarının gebe olan ve olmayan gruplarda dağılımı.....

sayfa 23

Grafik 4. Sperm kromatin dekondansasyon skorlarının gebe olan ve olmayan gruplardaki dağılımı.....sayfa 24

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 : Neubauer kamerasında sayma alanları.....sayfa 2

Şekil 2 . Makler kamarasında sayım alanları.....sayfa 4

Şekil:3 Kruger kriterlerine göre sperm morfolojisinin değerlendirilmesi

Şekil 4. Sperm hazırlamada Gradient ve swim up yöntemi.....sayfa 9

Şekil 5.HOS skorları a,b,c,d,e,f,g.....sayfa 13

Resim 1 Anilin mavisi ile sperm kromatin kondansasyonunun gösterilmesi X100.....sayfa 17

Resim 2. Sperm kromatin dispersiyon testi değerlendirilmesi 1. Yıldızla işaretli fragmente sperm, 2. Hafif şişmiş sperm ,3. Şişmiş olan normal DNA'ya sahip sperm Kaynak, <http://orient-ivf.com/site/node/615>.....sayfa 18

ÖZET

Yiğit A. IUI olgularında sperm fonksiyon testlerinin gebeliği öngörmedeki değeri . Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji programı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2015.

Genel bilgiler ve Amaç

İntrauterin inseminasyon(İÜİ) infertilite tedavisinde in vitro fertilizasyon uygulaması öncesi geliştirilen bir yöntemdir. İÜİ uygulamalarında spermlerin hazırlanma şekli, motilitesi, total motil sperm sayısı'nın klinik gebelik oranlarını etkilemesi açısından yapılmış pek çok çalışma bulunmaktadır. Açıklanamayan infertilite olgularında gebelik şansının önceden belirlenebilmesi infertil çiftlere zaman kazandırması açısından çok büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada spermlerin fizyolojik özelliklerinin ve DNA, membran , kromatin bütünlüğünün İÜİ başarısında belirleyici bir rolü olup olmadığını araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntemler: Çalışmamızda Universal Alman hastanesi Tüp bebek merkezinde hafif erkek faktörlü ve açıklanamayan infertilite tanısı konan olgularda sperm fonksiyon testi olarak HOS, Sperm kromatin kondansasyonu (anilin mavisi testi) ve sperm kromatin decondansasyonu testi (SCD) uygulanan 262 olgunun retrospektif olarak semen analizi ve sperm fonksiyonlarının gebe olan ve olmayan gruplarda karşılaştırılması yapılmıştır. Polikistik over, endometriosis ve zayıf yanıt veren olgular çalışmaya alınmamıştır. Verilerin değerlendirilmesinde student's t-testi ve Anova testi uygulanmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda temel semen analiz parametrelerinin gebeliği öngörmede yetersiz olduğu, ancak kadın yaşı ve anilin mavisi ile uygulanan sperm kromatin kondansasyon testinin İÜİ olgularında gebeliği öngörmede başarılı olduğu ortaya çıkmıştır. Sperm membran bütünlüğü ve kromatin decondansasyon testinin ise bu konuda başarısız olduğu anlaşılmıştır.

Tartışma: Çalışmamızda açıklanamayan infertil olgular ile hafif erkek faktörlü olgularda semen analiz kriterlerinin gebeliği öngörmede yetersiz kaldığı, bu sonucun da çalışma grubunun özelliğine bağlı olabileceği, ancak sperm kromatin kondansasyon testinin özellikle açıklanamayan infertil olgularda İÜİ başarısını öngörmede önemli bir kriter olabileceği düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: IUI,HOS,Sperm Kromatin Dispersiyon testi(SCD) , Anilin mavisi testi(Kromatin kondansasyonu)

ABSTRACT:

Aim of the study: Intrauterine insemination had been developed prior to in vitro fertilization practice for infertility treatment. Intrauterine insemination had been developed prior to in vitro fertilization practice for infertility treatment. . In IUI practices, there are many studies dealing with effects of sperm preparation ways, motility and total sperm count on clinical pregnancy rates. In the cases with unexplained infertility, determine the chance of being pregnant is of importance in providing couples for time.

Purpose: In this study, it was aimed to investigate whether physiological features of sperms and as well as their DNA, membrane and chromatin integrity have certain roles in the success of IUI or not.

Material and Methods: In this study, comparing results of sperm analyzes and sperm functions tests in either pregnant or non-pregnant groups were carried out by analyzing sperm function test (HOS), sperm chromatin (aniline blue test) test and sperm chromatin decondensation (SCD) tests results of 262 cases, who were diagnosed as mild male factor and unexplained infertility in Universal German Hospital IVF center, retrospectively.

Patients with polycystic ovary syndrome, endometriosis and poor responder were excluded from study. Student t test and Anova test were used for evaluating data.

Results: This study deduced that in IUI applied patients, main sperm parameters were insufficient in predicting pregnancy, however, female age and aniline blue based sperm chromatin test were successful in this respect. Moreover, both sperm membrane integrity and chromatin decondensation tests were unsuccessful in this subject.

Discussion: In this study it was suggested that semen analysis criteria were incapable of predicting pregnancy for patients with mild male factor and unexplained infertility cases due to features of patient group, but sperm chromatin test would be important criteria for foreseeing success of IUI in unexplained infertile cases.

Key words: IUI,HOS,Sperm chromatin dispersion test (SCD),Aniline blue test(Chromatin Condensation)

GİRİŞ VE AMAÇ

Temel semen analizinin İÜİ başarısını öngörmeye yetersiz kaldığı olgular , hafif erkek faktörlü ve açıklanamayan infertilite olgularıdır.Bu tip hastalarda genellikle gebe kalan ya da kalmayan olgular incelendiğinde sperm motilitesi, morfolojisi, konsantrasyonu'nun anlamlı bir farklılık oluşturmadığı görülür (1,2,3) . Genel olarak İÜİ başarısını etkileyen faktörler incelendiğinde sperm morfolojisinin önemi Kruger ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (4).Yapılan meta analizlere göre İÜİ sonuçlarını en fazla etkileyen faktörler ovaryum stimülasyonu tedavisi, uygulama sayısı, sperm morfolojisi ve motilitesidir (5,6,7,8,9).Nedeni bilinmeyen infertil olgularda yapılan çalışmalar ile sperm DNA hasarlarının erkek infertilitesinde oldukça önemli bir yeri olduğu ortaya çıkmıştır (10,11,12). Memelilerde spermiyogenez sırasında nükleus histonları önce transisyon proteinleri daha sonra da protaminler ile yer değiştirmektedir (13).Daha sonra spermlerin epididimden geçişinde protamin moleküllerinin cysteine- thiol grupları oksidize olarak disülfid bağları geliştirir (14). Bu işlem kromatinin stabilizasyonu için gereklidir.Bu nedenle sperm hücreleri dış etkenlere karşı dayanıklı hale gelirler. Evenson ve Wixon hasarlı kromatine sahip spermlerin fertilizasyon problemleri taşıdığını ileri sürmüşlerdir (15). Buna ilaveten sperm kromatin kondansasyon kusurlarının sperm DNA hasarları ile yakın ilişkisi pek çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (16,17).Talebi ve arkadaşları spinal kord hasarlı erkeklerde sperm kromatin hasarları ile birlikte apoptotik spermlerin artış gösterdiğini ve protaminasyonun sağlıklı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşüş gösterdiğini açıkladılar(18).

Sperm kromatin dispersiyon testi (SCD) spermlerin fertilizasyonu takiben çözülebilme (dekonpanse olma) yeteneğini ölçen bir test olarak geliştirilmiştir(19,20).Ayrıca bu yeteneğin erkek pronükleus oluşturmada önemi olduğu ileri sürülmüştür (21).En yaygın kullanılan sperm nükleus dekonpanseasyon testi %1 SDS ve 6 M EDTA karışımı solüsyonu ile elde edilmiştir (22).

Hans van der Ven ve arkadaşları 1986 da spermlerin hipoosmotik ortamda şişme (hipoosmotik şişme testi) yeteneğinin in vitro fertilizasyon sonuçları ile korelasyon gösterdiğini buldular (23). Ramu ve jeyendran hipo-osmotik şişme testinin sperm membran bütünlüğünü gösterdiğini açıklamışlardır (24).Sperm membranlarının fertilizasyon ve akrozom reaksiyonunda önemi çok büyüktür. Membran fonksiyonlarının iyi olması bu nedenle sperm fertilizasyon ve pronükleusların oluşmasında problem olmamasını gerektirir. Sperm membran geçirgenliğinin sperm oosit bağlanmasında, penetrasyon ve akrozom

reaksiyonunun gerçekleşmesinde önemi bilinmektedir, bu kapsamda Irez ve arkadaşları IVF uygulamalarında HOS test skorlarının normospermik hastalarda fertilizasyon ve iyi embriyo gelişiminde etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (25).

Literatür incelendiğinde açıklanamayan infertil olguların İUI başarısını öngörmeye mevcut yöntemlerin yetersiz kaldığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda hafif erkek faktörlü veya açıklanamayan infertil olgularda sperm fonksiyon testlerinin (kromatin kondansasyon-anilin mavisi testi, sperm kromatin dispersiyon –SCD, ve HOS) gebe olan ve olmayan hasta gruplarındaki değerlerinin retrospektif olarak incelenmesi , bu testlerin İUI uygulamalarında gebeliği öngörmedeki rolü'nün araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

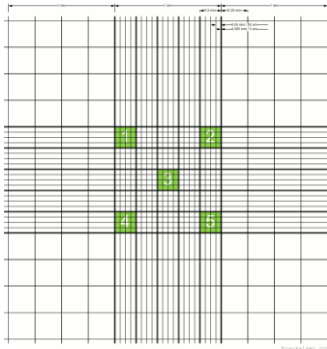
2.1. Semen analizi

Dünya Sağlık Örgütü'nün önerisine göre bir erkeğin semen profiline karar vermek için her biri arasında 7 günden az ve 3 haftadan uzun olmamak üzere en az 2 örnek incelenmelidir. Örnekler alınmadan önce erkek 48 saatten kısa ve 7 günden uzun olmamak üzere cinsel perhizli olmalıdır. Yapılan bu analizler sonuçlarına bakıldığında çok fazla fark olursa analizler tekrarlanmalıdır (21).

Sperm Dansitesi/konsantrasyonu ölçümü; Hemositometrik yöntem

10 µl semene 190 µl distile su veya metilen mavisi ile (%1-2) karıştırılmış %1 formalin

Şekil 1 : Neubauer kamerasında sayma alanları

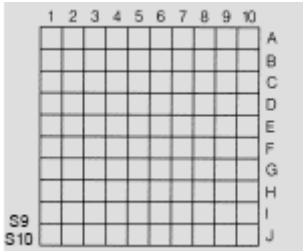


solüsyonu ilave edilir (X20 dilüsyon).Neubauer sayma kamarasına lamel kenarından 10 µl sızdırılarak koyulur. 2-3 dakika yerleşmesi beklenir ve merkezdeki karelerden 5 kare (4 köşe 1 merkez) sayılır. Sayılan hücre $\times 10^6$ = sperm konsantrasyonu/ml bulunur.WHO 2010 kriterlerine göre semende bulunan spermlerin konsantrasyonlarının ölçümünde hemositometrik yöntemin tercih edilmesi önerilmektedir (21).

Sperm konsantrasyonunun Makler sayma kamarası ile ölçümü

4 mikrolitre semen sıvısı Makler sperm sayma kamarasına alınır.Hava kabarcığı oluşturmadan üzeri cam kapak ile kapatılır.Işık mikroskobunda x20 objektif ile sağdan sola veya yukarıdan aşağıya 10 kare sayılır ve sonuç milyon olarak ifade edilir.Sperm sayısı çok düşükse tüm saha sayılır.Sırasıyla ileri doğru hızlı ve yavaş hareketli sperm sayılır,kaydedilir,daha sonra yerinde hareketli ve hareketsiz spermler sayılır ve kayıt edilir.Sayım ne kadar gecikirse kameranın periferinden o kadar çok sperm sayım sahasına yüzer ve yanlış sonuç verilir (26).

Şekil 2 . Makler kamarasında sayım alanları



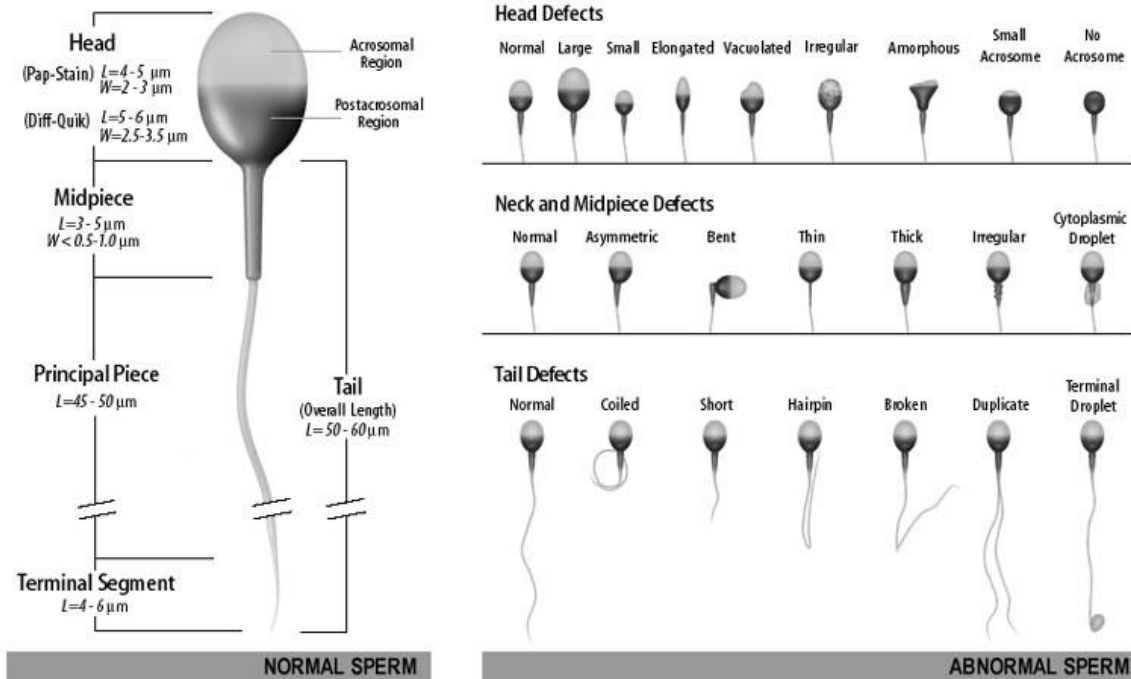
SPERM MORFOLOJİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Kruger kriterlerine dayalı morfolojik (şekilsel) değerlendirme (WHO,2010)

Normal ve normale yakın morfolojiye sahip sperm hücrelerinin seçilmesi, infertilite tedavisinde son derece önemlidir. Semen'in morfolojik değerlendirmesinde Kruger kriterleri göz önünde bulundurulmaktadır. Bu kriterler ile baş, akrozom, çekirdek, boyun, kuyruk ve

orta parça anormalikleri değerlendirilmektedir (27,28). Diff quick, hematoxylin veya Giemsa boyaları ile boyanan spermier immersion yağı ile 100x objektifde incelenir, akrozom ve nukleus anomalileri ile orta kısım ve kuyruk anomalileri sayılır, yaklaşık 200 sperm sayılarak normal morfoloji oranı elde edilir. 2010 dünya sağlık örgütü verilerine göre % 4 ve üzeri normal sperm taşıyan semen örnekleri morfolojik olarak normal kabul edilir.

Şekil:3 Kruger kriterlerine göre sperm morfolojisinin değerlendirilmesi Kaynak <http://www.jablonskidiagram.com/illust.html>



Spermier morfolojik olarak değerlendirmesinin Diff quick boya ile boyanma prosedürü.(WHO 2010)(21)

Semen örneği homojenize edildikten sonra 20 mikrolitresi lam'a ince bir film tabakası şeklinde yayılır ve oda ısısında kurumaya bırakılır.İyice kuruduktan sonra sırası ile ;

- 1.Fiksatif 15 saniye
2. Hızlı boyama çözeltisi 1 10 saniye
3. Hızlı boyama çözeltisi 2 5 saniye

4. Akan musluk suyunda fazla boyayı atmak için lam tersinden 10–15 kez yıkanır.

Her aşamada lamlar emici filtre kâğıdı üzerine dikilerek fazla çözelti akıtılır.En son aşamada'da musluk suyunda yıkandıktan sonrada emici filtre kağıdı üzerine dikilerek fazla suyun akması ve oda ısısında kuruması sağlanır.

Boya setinde bulunan Reaktifler

1. Diff-Quik hızlı boyama kiti içindekiler:

- a) Fiksatif reaktifi (metanol içinde çözünmüş triarilmetan boyası);
- b) Boyama çözeltisi 1 (eozinofilik ksanten)
- c) Boyama çözeltisi 2 (bazofilik tiazin).

2. Fiksatif: 1000 ml % 95'lik metanolde çözünmüş 1,8 mg tirarilmetan,(isteğe bağlı olarak ilave edilir).

Tablo 1: Semen Analiziinde standard değerler Dünya sağlık örgütü (WHO 2010)(21)

Parametre	En düşük Referans
Semen volumü (ml)	1.5
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	15
Total sperm sayısı (10 ⁶ /ejakülat)	39
Progressive motilite (PR, %)	32
Total motilite (PR +NP, %)	40
Vitalite (canlı sperm, %)	58
Sperm morfolojisi (NF, %)	>4
pH*	>/=7.2
Lökosit* (10 ⁶ /ml)	<1

2.2 İntra Uterin İnseminasyon (İUI)

Hazırlanmış semen örneğinin uterus içine verilmesidir.

Seminal plazma, spermelerin servikal mukusa penetrasyonuna yardımcı olmasına rağmen , intrauterin inseminasyon (IUI) veya in vitro fertilizasyon (IVF) gibi yardımcı üreme tekniklerinde doğal engeller atıldığı halde (semenin prostaglandinler, çinko gibi bileşenleri), gebeliğin gerçekleşmesini engellemektedir (29).

Klinik uygulamada; hücre döküntüleri, germ dışı hücreler ve ölü spermelerden arınmış yüksek oranda morfolojik olarak normal ve hareketli hücreler elde etme amacıyla, insan spermeleri seminal plazmadan ayrıştırılır.

IUI için normozoospermik numuneler elde etme amacıyla, semeni kültür solüsyonu ile seyreltmek ve santrifüjleme halen kullanılan yöntemlerdir (5).

Semen parametrelerinin biri veya birkaçı anormal olan numunelerde, genellikle dansite gradient (yoğunluk sıralayıcısı) metodu ve doğrudan yüzdürme (swim-up) metodu tercih edilmektedir (30)

2.3. SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

Ejakulat'tan sperm hazırlaması veya yıkaması en önemli işlemlerden biridir. Doğru yapılmış ejakulat hazırlaması veya yıkaması IUI 'da ve ICSI'de başarı şansını oldukça artırır (31)..Ejakulatın yıkanıp hazırlanması için değişik yöntemler bulunmaktadır, bu yöntemlerden hangisinin tercih edileceği ise ejakulatta yapılan ilk inceleme belirgin olur, bu ilk incelemeye bazal değerlendirme denir. Kullanılacak yöntem hastalara göre değişebileceği gibi aynı hastanın farklı zamanlarda alınan örneklerindedeki bu yöntemler değişebilir hangi yöntemin seçileceği' de hastaya uygulanacak tedavi yöntemi belirgin rol oynar. örnek vermek gerekirse ;daha önce yapılmış olan sperm analizinde , hacmi ve konsantrasyonu yüksek bulunan bir ejakulatın IUI işlemi için tamamı kullanılırken İCSI işlemi için küçük bir kısmı kullanılabilir.

Sperm hazırlama işleminde iki yöntem vardır ; Yıkama ve doğrudan yüzdürme yada yoğunluk sıralayıcısı (gradient) yöntemleri. Ejakulatın yıkanmasında farklı kültür solüsyonları kullanılabilir. HTF (human tubular fluid) solüsyonu bu amaçla kullanılmaktadır .IUI uygulamasında her iki yöntem de kullanılabilir.

Yıkama ve doğrudan yüzdürme metodu

Semen 1,5 -2 kat volüm içerecek şekilde HTF solüsyonu ile karıştırılır. 1500 rpm de santrifüjlenir . Üstte kalan supernatan atılır ve işlem bir kez daha tekrarlanır. Supernatan üzerine 45 derecelik eğimle yavaşça HTF solüsyonu eklenir, 30-45 dakika sonra üst faza

yüzen spermier alınarak kullanılır. İUI için 4 adet etiketlenmiş konik tüpe örnek paylaşılır.10 dakika 300 g' de santrifüj edilir.Supernatant steril pastör pipeti ile aspire edilir ve atılır. Pellet üzerine 2ml sperm buffer (AllGrad Wash) eklenir ve pastör pipeti ile örnek iyice homojenize edilir. Örnekler 10 dakika 300g' de santrifüj edilir.Santrifuj sonrası steril pastör pipeti ile supernatant aspire edilir ve atılır.Örnekler, tüp sporlarına 45° açı ile yerleştirilir ve üzerlerine 1ml'lik (Falcon 7521) steril plastik pipet ile 0.25ml Sperm Buffer (AllGrad Wash) eklenir.pelletin tüpün dibinden hareket ettirilmemesi esastır. Bu nedenle, pipet ile tüpün iç yan yüzeyine dokunarak mediumun tüpün dibine yavaşça süzülmesi sağlanır. Örnek tüpleri 45 derecelik açıyla 37°C sıcaklıkta kapağı tam kapalı şekilde 10-60 dak gazsız inkübatör'de inkübasyona-yüzdürülmeye bırakılır. Tüpü bu açıyla koymaktaki amaç yüzey alanını arttırarak yüzen sperm sayısını arttırmaktır. Sperm Buffer Hapes içerdiği için tüpün kapağı kapatılmalıdır, aksi takdirde pH'ı değişerek asitleşmeye başlar.Örnekte total progresif (+4 ve +3) sperm sayısı arttıkça inkübasyon(yüzdürme) süresi azalır. İnkübasyon-yüzdürme esnasında spermatozoalar yüzeye doğru yüzdükçe berrak olan sperm buffer bulanıklaşmaya başlar.

Yüzdürme sonrası, ucuna 1 ml'lik falcon steril serolojik pipet takılmış puar yardımı ile(toplam volüm IVF için 0,4ml IUI için 0,8ml ve ICSI için 0,2 ml olacak şekilde) süpernatantın en üst tarafından yüzeye yüzmüş progresif spermatozoalar çekilir ve 5 ml (Falcon 2003) tüp içerisine alınır.5 µl alınarak makler sayma kamarasına yerleştirilir ve hazırlık sonrası hareketlilik, sayı ve TPMS(total progressif motil sperm) değerlendirilerek, hazırlık sonrası değerlendirmeler olarak kayıt edilir. ICSI uygulanacaksa, ICSI işlemine kadar örnek tüpün ağızı kapalı şekilde inkübatörde tutulur. IVF uygulaması için ise örnek, işleme kadar oda sıcaklığında tutulur. İUI uygulaması için ise, örnek 1 ml insülin enjektörüne çekilir ve inseminasyonu gerçekleştirecek doktora ulaştırılır.

Prosedür: Hastanın örneğinin hazırlanmasında kullanılan tüm tüpler en az iki belirtecin olduğu etiketler ile etiketlenmelidir (örn: Hasta protokol numarası, hastanın adı-soyadı)

Swim up uygulamasında progressif motiliteye sahip spermatozoaların yıkanmış peletten ayrılıp, taze kültür mediumuna yüzmesi sağlanır. Swim-up yönteminin uygulanabilmesi için kesinlikle aşağıdaki Tablo daki kriterler baz alınmalıdır.

Tablo 2: Swim-up uygulayabilme kriterleri

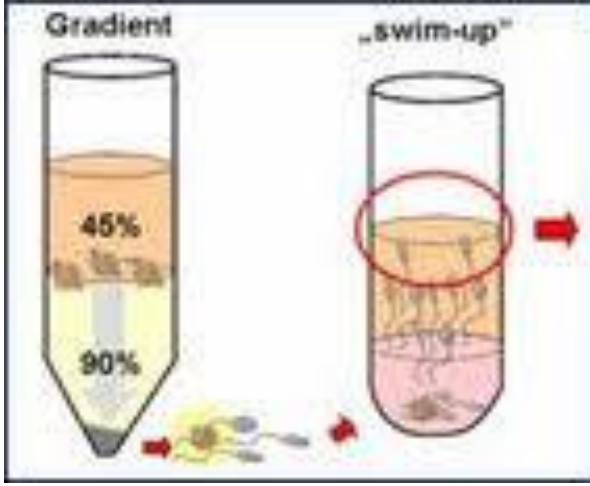
İşlem	TPMSS	Morfoloji
ICSI	0.3 × 10 ⁶ sperm/ml	Kuyruk anomalisi < %15, Baş anomalisi < %10, Boyun anomalisi < %15
IVF-IUI	1.5 × 10 ⁶ sperm/ml	Kuyruk anomalisi < %15, Baş anomalisi < %10, Boyun anomalisi < %15

Yoğunluk sıralayıcısı (Gradient) Yöntemi (32)

Anormal spermiler ile ölü hücrelerin ara fazlarda kalabilmesi ve normal hareketli spermilerin dibe çökmesi prensipine dayanır.Gradient PVP ve silika partikülleri içeren sperm için fizyolojik sayılabilecek bir solüsyonda hazırlanmış değişik yoğunluktaki preparatlardır.Tabakalar hazırlanırken en yoğun olan her zaman en allta olacağından normal spermde santrifüj sırasında bu en yoğun tabakaya göç eder ve sediment oluşturur.Semende bulunan diğer bileşenler ve anormal spermiler yoğunluk farkından dolayı üstte kalır ve böylece sağlıklı sperm ejakulattan ayrılmış olur. Gradient yöntemi semende hareketli sperm/toplam sayı oranının düşük olduğu ,sperm dışı hücre sayısının yüksek olduğu durumlarda ,ve teratozoospermi olgularında özellikle kullanılmaktadır.Rutin kullanımda iki tabakalı gradient kullanımı yeterli olmaktadır.Gradient yöntemi mutlaka konik tabanlı tüp kullanarak yapılmalıdır.Gradientten süzülen spermin konik tüpün tabanında oluşturacağı çökelti böylece gözlenir.

Hastadan alınan örnek 60 dakika kadar oda ısısında sıvılaşmaya bırakılır.Semenin bulunduğu kabın ağzı açık olmamalıdır.Bu süre zarfında arada sırada kap çalkalanıp ışığa tutularak sıvılaşmış sıvılaşmadığı gözlenmelidir.Ejakulat tamamen sıvı hale gelmelidir ve içersinde lifimsi partüküller izlenmemelidir.Eğer 60 dakika süresinde sıvılaşma olmadıysa dereceli pipet ile ejakulat yavaşça çekilip bırakılarak sıvılaşmasına yardımcı olunabilir.Ejakulat bu işlemlere rağmen sıvılaşmadıysa inkübatörde biraz bekletmek sıvılaşmayı kolaylaştırabilir.Bazen eğer ejakulat çok viskoz ise sıvılaşmayabilir.Böyle durumlarda ise ejakulat kabına bir miktar HEPES yada bikarbonat tamponlu medium eklenerek büyük hacimli pipetle pipetleme işlemi tekrardan yapılabilir.Ejekulat'tan 2-3 ml gradyen

katmanlarının üzerine yavaşça konur ve 1500-2000 rpm de 10-15 dakika santrifüjlenir. Üst faz ve ara faz atılır, dipte kalan çökelti bırakılır. Çökelti üzerine 2 ml HTF solüsyonu koyularak santrifüjleme işlemi tekrarlanır. Bu işlem iki kez yapılır. Yıkamış spermlerin üzerine 0.5 ml HTF solüsyonu koyularak sperm süspansiyonu elde edilir.



Şekil 4. Sperm hazırlamada Gradient ve swim up yöntemi

Kullanılan Mediumlar: Dansite gradient yönteminde genellikle iki tabakalı gradient tekniği uygulanır. %45'lik ve %90'lık dan oluşan 1 ml'lik iki tabakalı sistem (her biri 0.5ml hacimli) hazırlanır. Üst tabakayı %45'lik, alt tabakayı ise %90'lık saf gradient oluşturur.

Gradientler uygulama günü hazırlanır . %100'lük saf gradientten dilüsyonlar hazırlanmadan önce +4°C'den çıkarılır, kullanılacak miktarda alınarak, steril falcon konik (Falcon 2095) tüplere bölünür ve oda sıcaklığına avuç içine alınarak gelmesi sağlanır. Oda sıcaklığına gelen puregradient 0.22µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilir. Dilüsyonlar Sperm Buffer (AllGrad Wash) kullanılarak yapılır.

Sperm Buffer: 5mg/ml HSA içeren Hepes ile tamponlanmış kültür mediumu. Albumin spermatazoayı reaktif oksijen türevlerinden korurken, Hepes atmosferik ortamda pH'yı işlem için uygun değerde tutmaya yarar. AllGrad Wash (LifeGlobal) bu işlem için kullanılmaktadır.

Saf gradient (Pure Gradient): %100'lük stok AllGrad (LifeGlobal) kullanılmaktadır.

Gradient'in Hazırlanması: Dilüsyon miktarları günlük olarak hasta sayısına ve yapılan işleme göre hesaplanmaktadır. Genellikle ejakülat örnekleri iki tüpe eşit bölünerek işleme alınır. Bu nedenle hasta başına en az 2ml'lik dilüsyonların yapılması gerekir.

Üst Tabaka: %45 'lik tabaka, 4ml'lik %100'lük stok PureGradient ile 6ml Sperm Buffer (AllGrad Wash) karıştırılır.

Alt Tabaka: %90 'lik tabaka, 9ml'lik %100'lük stok PureGradient ile 1ml Sperm Buffer (AllGrad Wash) karıştırılır.

Uygulama: Hastanın örneğinin hazırlanmasında kullanılan tüm tüpler en az iki belirtecin olduğu etiketler ile etiketlenmelidir (örn: Hasta protokol numarası, hastanın adı-soyadı)

Hasta örneği iki tüpe konur ,her tüp üzerine 1er ml yıkama solüsyonu konularak homojen hale getirilir. Bu süspansiyon, daha önce 5 ml (Falcon 2003) tüplerde 0,5'er ml olarak hazırlanmış iki katmanlı Pure Sperm gradienti üzerine yavaş yavaş bir tabaka oluşturacak şekilde yerleştirilir. Spermatozoanın kaç gradient PureSperm'e maruz bırakılacağına şu kriterlere göre karar verilir:

Tekli Gradient (%90): Total sperm sayısı $<1 \times 10^6$

İkili Gradient (Aşağıdan yukarıya %90 , %50): Total sperm sayısı $1-5 \times 10^6$ arasında ise.

Üçlü Gradient (Aşağıdan yukarıya %90, %70, %50) : Total sperm sayısı $>5 \times 10^6$ veya çok fazla debri içeriyorsa.2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.Bir pastör pipeti kullanılarak en aşağıda bulunan %90'lik PureSperm tabakasına ulaşılır. Bu tabakaya pipet ile girildiği anda bir hava kabarcığı verilir. Böylece %90'lık Percoll tabakasının seçtiği kısma, üst tabakalardan herhangi bir karışma olması engellenmiş olur. Tüpün zemininden pellet ve gradient (%90) birlikte 0.2-0.4 ml kadar aspire edilir, 4 ml sperm yıkama mediumu içeren (Falcon 2095) tüpe aktarılır. Aynı işlem diğer tüp için de yapılır. 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilir. Supernatant (Falcon 2001) tüp içine ayrılır, bu tüp atılır.Her iki tüpe 4'er ml sperm yıkama mediumu eklenir. 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilir. Supernatant (Falcon 2001) tüp içine alınır, bu tüp atılır.Pellet 500 µl sperm yıkama mediumu ile resüspanse edilir.30 dakikalık inkübasyondan sonra intra uterin inseminasyon için kullanılır.

Yıkama solüsyonlarının hazırlanması: Likefaksiyon sonrası örnek Semen Buffer ile karıştırılarak homojenize edilir. Sperm Buffer +2-8 °C 'de buzdolabında tutulur ve işlemden bir gün evvel vaka başına yaklaşık 10ml olacak şekilde 25 cm² flasklara (Falcon 353014) konur ve 37 °C'ye ısınması için ağzı kapalı şekilde inkübatöre kaldırılır.

Sperm Buffer: 5mg/ml HSA içeren HEPES ile tamponlanmış kültür mediumu. Albumin spermatazooyu reaktif oksijen türevlerinden korurken, HEPES atmosferik ortamda pH' ı işlem için uygun değerde tutmaya yarar. AllGrad Wash (LifeGlobal) bu işlem için kullanılmaktadır.

Kalibrasyon: Santrifüjler kalibre edilmelidir. “g” değerini rpm' ya çevirmek için aşağıdaki denklem kullanılır.

$$g = 0,0000112 \times r \times N^2$$

g = santrifuj kuvveti

r = tüpün dibinden santrifüjün rotoruna olan uzaklık (cm cinsinden)

N = dakikadaki dönme sayısı, (RPM, revolutions per minute)

2.4 SPERM FONKSİYON TESTLERİ

1-HOS testi (23,24)

Hipoozmotik şişme testiyle vitalite

Hücre membranının ozmotik strese dayanıklılığı esasına dayanan bir testtir.

Boya dışlama tekniğine bir alternatif olarak, vitaliteyi değerlendirmek için hipoozmotik

şişme testi (HOS) kullanılabilir (23,24) . Spermilerin canlı olarak işlem görmesi gerektiği

durumlarda, örneğin ICSI için sperm seçerken, HOS yararlı bir testtir. Sağlam

membranlı spermier hipoozmotik ortamda 5 dakikada şişer ve kamçısız (flagellar)

şekillerin tümü 30 dakika içinde stabilize olur (33).

Bu durumda;

- rutin tanısal işlemler için 30 dakika inkübasyon,
- ancak tedavi amaçlı kullanım için spermle çalışılacaksa, beş dakika süreyle inkübasyon

yeterlidir.

Reaktiflerin hazırlanması

Tanısal amaçlar için hipoozmotik çözeltinin hazırlanması:

100 ml saf su içinde 0,735 g sodyum sitrat dihidrat ve 1,351 g D-fruktozu çözündürülür. Bu çözelti 1 ml'lik oranlarda steril tüpler içinde –20 derecede saklanabilir.

Tedavi amaçlı kullanımı: kullanılacak sperm yıkama solüsyonu 1+1 (1:2) steril saf suyla seyreltilir.

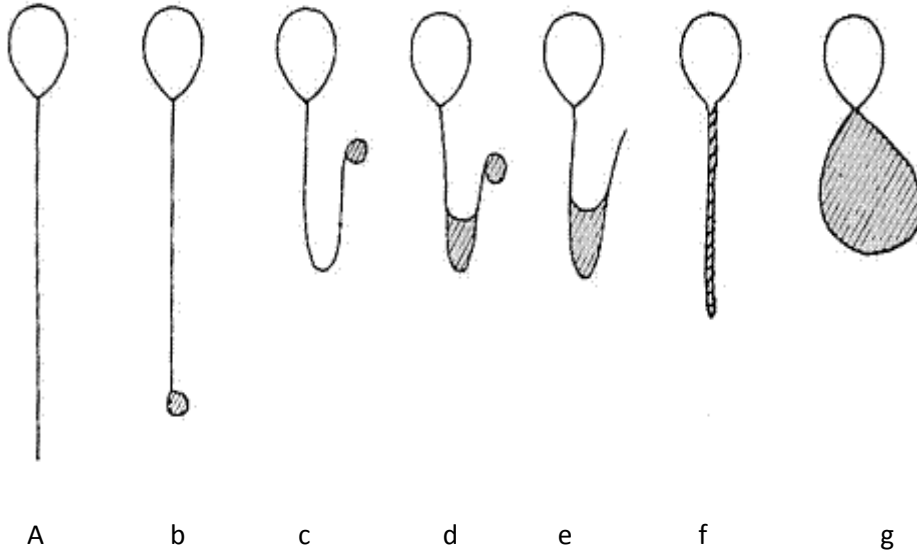
Prosedür :

1. Donmuş hipoozmotik çözelti 37 C'de çözülür ve kullanmadan önce iyice karıştırılır.
2. Hipoozmotik çözeltinin 1 ml'si veya 1+1 (1:2) oranında seyreltilmiş medyumun 1 ml'sini kapalı bir mikrosantrifüj tüpünde 37°C'de 5 dakika ısıtılır.
2. Semen numunesi homojen hale getirilir.
3. Semenden 100 µl'lik bir miktar alınıp ve hipoozmotik çözeltiye eklenir. Pipete çekip bırakarak yavaşça karıştırılır.
4. Tam olarak 5 dakika veya 30 dakika 37°C'de inkübe edilir ve daha sonra 10 µl'lik bir kısmı temiz bir lam üzerine koyulur ve 22 mm x 22 mm lamelle kapatılır.
5. Hazırlanan lam faz kontrast mikroskobunda x200 veya x400 büyütmede incelenir.
6. Şişmemiş (ölü) ve şişmiş (canlı) hücreler sayılır.
7. Hata payını en aza indirebilmek için, 200'er sperm iki eş bölüntüde değerlendirilir .
8. Farklılık çok yüksekse, aynı numuneden iki taze preparat hazırlanarak değerlendirme tekrarlanır.
9. Canlı(kuyrukları şişmiş) spermilerin ortalaması rapor edilir.

Hipoozmotik strese maruz bırakılmış insan spermatozoasındaki morfolojik değişikliklerin şekilsel görünümü şekil 5 de gösterilmiştir.

(a) değişiklik yok. (b)-(g) kuyruklarda oluşan değişikliklerin çeşitli tipleri. Kuyruklarda şişme gri alanla gösterilmiştir.Çalışmamızda a tipi HOS 1, b tipi şişme HOS 2, c,d,e,f tipi şişmeler

HOS 3 ile ve g tipi şişme HOS 4 ile kategorize edilmiştir (İrez ve ark,2014).(25)



Şekil 5.HOS skorları a,b,c,d,e,f,g

kaynak Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. (1984)

(34) Journal of Reproduction and Fertility, 70: 219–228. © Society for Reproduction and Fertility (1984). İzin alınmıştır.

Bu şekilde;

a) rutin tanısal işlemler için 30 dakika inkübasyon,

b) ancak tedavi amaçlı kullanım için spermle çalışılacaksa, beş dakika süreyle inkübasyon yeterlidir.

Skorlama :

1. Şişmiş spermatozoa, kuyruğun sarmal hale gelmesi gibi hücrenin şeklinde olan değişikliklerle fark edilir .

2. Canlı hücreler, sperm kuyruğunda şişme bulgularıyla ayırt edilirler. Şişmiş kuyrukların tümü canlı sperm olarak sayılırlar.

Ölü spermelerde yetersiz osmoz nedeni ile plazma membranı patlar ve bu nedenle kuyruklar aşırı şişme gösterir, ancak bu spermlerdeki görünüm kuyruğun sopa görünümünde olmasıdır.

HOS test değerleri eozin testi sonuçlarına çok yakındır (35). Vitalitenin referans alt sınırı (membranı sağlam spermatozoa) % 58'dir, kuyrukların kıvrılması %50'nin altında ise negatif sonuç olarak değerlendirilir.

2-Asidik anilin mavisi (Anilin blue)(AAB)

İmmatür sperm nükleusları lizin aminoasidi yönünden zengin histonlar içermeleri nedeniyle Asidik Anilin Blue boyaması ile ortaya çıkarılabilirler. Bu boyama tekniği lizin için özel olan pozitif reaksiyon ihtiyacını karşılar ve menideki spermin temel protein bileşiminin farklılıklarını ortaya koyar. Olgunlaşmamış, Histondan zengin sperm nüveleri lizin yönünden zengindir. Sonuçta Asidik Anilin Blue boyası ile boyanırlar. Yüksek oranda lizin içeren proteinlerin oranı kromatin kondensasyonunda defektlere neden olabilir. Spermiogenez sırasında, histonlar ara dönem nükleoproteinlerle yer değiştirirler. Daha sonra bu grup arginin ve sistin yönünden zengin protaaminlerle tekrar yer değiştirir. Yapılan araştırmalar AAB boyaması sonucu saptanan nüklear maturasyon sonuçlarının sperm FISH sonuçlarında gözlenen dizomi oranları sonuçları ile korelasyon içinde bulunduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalar ayrıca AAB ile boyalı başa sahip spermelerin aynı zamanda anormal sperm kromatini ile erkek infertilitesi arasında belirgin bir ilişki olduğunu göstermiştir (36). Bu sperm'lerin morfolojik açıdan anormal oldukları bildirilmiştir. Ancak normal olarak kabul edilen spermelerin %20'sinin de AAB ile başları tamamen veya kısmen boyanmaktadır. Ayrıca infertil hastalarda morfoloji yönünden normal olarak tanımlanan spermelerin % 23-78'nin AAB ile boyanması sonucunda immatür nükleusa sahip olduklarını göstermiştir (37).

Asidik anilin mavisi (Aniline blue) boyama protokolü;

1. Hazırlık sonrası lamlara yayılan örnekler (her hasta için en az iki slayt olacak şekilde) oda sıcaklığında kuruduktan sonra 30 dakika süreyle %3'lük fosfat tamponlu tuz çözeltisindeki glutaraldehit ile fikse edilir.

2. Fikse edilen preparatlar oda ısısında havada kurutulur.

3. Fikse edilen örnekler 5-7 dakika boyunca %5'lik anilin mavisi solüsyonun'da (pH:3,5) boyanır.

4. İmmatür kromatin yapısı taşıdığı varsayılan sperm başları koyu mavi renge boyanır. Matür olanlar daha açık renk mavidirler yada hiç boya almazlar.

Anilin mavisi ile boyanan spermlerin değerlendirilmesi en az 200 sperm saymak suretiyle 100x büyütmede ışık mikroskobunda yapılır. Boyanmayan spermlerin yüzdesi bulunur. Boyanmayan spermlerin yüzdesi yüzde olarak kromatin kondansasyonunu verir. Başka bir deyişle bu sonuç normal maturasyonlu sperm yüzdesi demektir.

3-Sperm Kromatin Dispersiyon testi(SCD)(38)

Eğer parçalanmamış DNA'ya sahip sperm hücreler'i agar matriks içerisine gömülür ve direkt eritici solüsyonlara tabi tutacak olursak, ortaya çıkan depolarize nükleotidleri floresan mikroskobu ile incelediğimizde DNA dağılımını'nı genişlemiş haleler şeklinde görürüz. Kırık DNA varlığı nükleotid halesinin küçük kalmasına sebep olmaktadır.

Sperm kromatin dağılım testinin esası spermlerin eritici tampon öncesinde asidik bir solüsyona maruz bırakıldıklarında nüve proteinlerinin çıkarılmasından sonra parçalanmamış DNA'ya sahip sperm nüvelerinde görülen DNA dağılım haleleri, parçalanmış DNA'ya sahip sperm nüvelerinde ya çok az yada hiç üretilmedikleri prensibine dayanmaktadır.

Hazırlanış Tekniği:

Hazırlanmış meni örnekleri 5-10 milyon/ml yoğunlukta olacak şekilde hazırlanır. Süspansiyonlar %1 düşük erime noktasına sahip sulu agar ile 37°C ısıda karıştırılır (Sonuçta %0.7'lik agar solüsyonu elde edilir). Karışımın 50 µl damlaları önceden %0.65 standart agar ile kaplanmış ve 80°C ısıda kurutulmuş cam lam üzerine pipetle damlatılır. Lamel ile kapatılır. Sertleşmesi için 4°C sıcaklıkta 4 dakika kadar bekletilir, sonra lameller dikkatli bir şekilde kaldırılır. Lamalar hızlı bir şekilde yatay olarak taze hazırlanmış 22°C sıcaklıkta ve karanlıkta tutulan asit denaturasyon solüsyonu (0.08N HCL) şalesinde 7 dakika kadar bekletilir. Burada kırık DNA' dan tek sarmal'lı DNA motifleri oluşturulur. Daha sonra denatürasyon durdurulur.

1) Lamaları oda ısındaki birinci etkisizleştirme ve eritme solüsyonunu (0,4mol/l Tris, 0,8mol/l DTT , %1 SDS ve 50 mmol/l EDTA , Ph 7,5) şalesine aktrılarak 10 dakika bekletilir ve proteinler ortadan kaldırılır.

2) Lamalar daha sonra oda ısıda ikinci olarak bir diğer etkisizleştirme ve eritme solüsyonu (0,4 mol/l TRİS, 2 mol/l NaCl ve %1 SDS, Ph 7,5) içerisinde 5 dak. inkübe edilir. Lamalar iyice

Tris-borat-EDTA tamponu (0,09 mol/l Tris-borat ve 0,002 mol/l EDTA , Ph 7,5) ile 2 dakika bekleterek yıkanır.

3) Lam'lar %70 , % 90 ve % 100'lük etanol serisi banyolarında 2'şer dakika tutularak suyu giderilir.

4) Preparatlar daha sonra havada oda ısısının'da kurumaya bırakılır.Hücreler DAPI (4',6-diamidino-2 penilindol) (2µg/ml) ile floresan mikroskop için veya Diff Quick ile ışık mikroskobu için boyanır.

Bu testin en önemli üstünlüğü renk veya floresan yoğunluğunun belirlenmesini gerektirmez.

Çıplak gözle veya mikroskopla kolay ve güvenilir bir şekilde çok küçük veya hiç oluşmamış haleler veya dağılmamış nüvelerinin yüzdesi tayin edilir.Ayrıca basittir,hızlıdır ve güvenilir olarak tekrarlanabilir bir testtir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

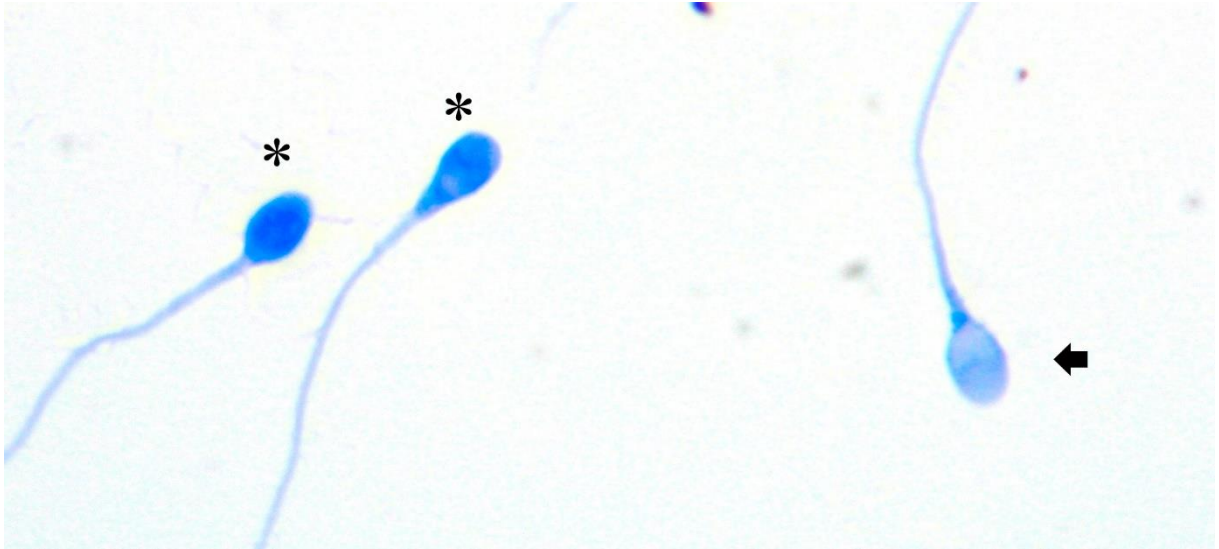
Bu çalışmada Universal Alman Hastanesine başvuran ve 2013-2014 yıllarında İntra Uterin inseminasyon uygulanan 262 hafif erkek faktörlü veya açıklanamayan erkek infertilite tanılı çiftin semen analizi ve sperm fonksiyon test ve gebelik sonuçları retrospektif olarak incelenmiştir.Çalışma Yeni yüzyıl Üniversitesi Etik kurulu tarafından kabul edilmiştir.

Çalışmada semen analizleri WHO 2010 kriterlerine göre uygulanmıştır (21). Semen örneklerinin hazırlanması sırasında 20 µl lik yaymalar yapılarak bir preparat Alkolde , diğer preparat ise glutaraldehitte fikse edilmiş, alkolde fikse edilmiş preparat Diff Quick boyası ile glutaraldehit'te fikse edilmiş örnek ise asidik anilin mavisi ile boyanmıştır.Diff quick sonuçları WHO 2010 kriterlerine göre , ve Kruger kesin kriterlerine göre değerlendirilmiştir (WHO Laboratory Manual for semen analysis). Asidik anilin mavisi boyası ile spermler 7 dakika boyanmış ve fosfat tampon ile yıkanarak kurutulmuş, immersiyon objektifinde (X100) incelenerek 200 spermdeki boyanmamış spermleri sayarak yüzde kromatin kondansasyon değeri elde edilmiştir. 20 µl'lik diğer 2 örnek ise HOS ve SCD testi için kullanılmıştır. HOS solüsyonu HTF kültür solüsyonunun 1:1 oranında steril distile su ile karıştırılması ile hazırlanmış ,30 dakikalık inkübasyon sonrası şişmeyen, kuyruk ucu şişen , hafif kıvrılan ve tamamen kıvrılan spermlerin yüzdesi 200 sperm sayılarak saptanmıştır.Buna göre HOS skorları 1,2,3,4 şekline tanımlanmıştır (İrez ve ark 2014,25).(Sperm Kromatin dispersiyon testi SDS ,EDTA ile uygulanmış kromatin dispersiyonu sağlanarak, hiç şişmemiş spermler

SCD 1, hafif şişmiş spermler SCD 2 ve çok şişmiş olanlar SCD 3 şeklinde tanımlanmışlardır (Fernandez ,2003)(39). IUI uygulaması yapılmış olan kadın hastalarda Klomifen sitrat ile ovulasyon indüksiyonu gerçekleştirilmiş, HCG enjeksiyonu ile en az 1 folikül 18 mm üzerine çıktığında ovulasyon amacı ile uygulanmıştır.HCG uygulamasını takiben 36 saat sonra intrauterin inseminasyon gerçekleştirilmiştir.

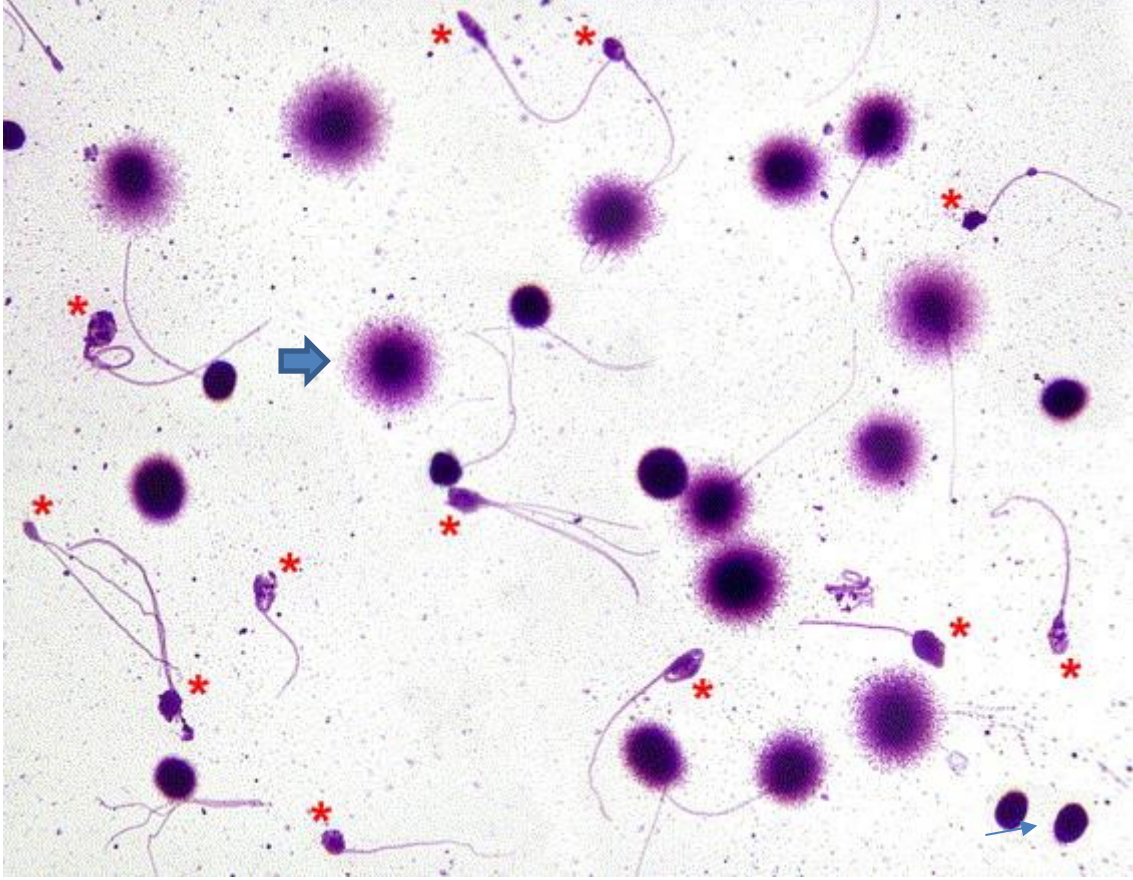
Sperm hazırlama yoğunluk gradyen tekniğine göre yapılmış, 2 ml semen 2 ml HTF solüsyonu (Irvine Sci,USA) karıştırılarak % 45 ve % 80 gradyen (sil select,) üzerine yayılmış, 2000 rpm de 10 dakika santrifüjlenerek dipte kalan çökelti dışında kalan tabakalar atılmış, ve çökelti üzerine iki kez HTF solüsyonu konularak 1500 rpm de iki kez yıkanmıştır.Gradyen yöntemi ile ayrılan spermier üzerine 1 ml HTF (%10 serum ilave edilerek hazırlanmış) eklenmiş ve 30-45 dakika 37 C de CO2 inkübatöründe tutulmuş ve inseminasyona hazırlanmıştır.İnseminasyon sonrası 14. Gün BHCG testi yapılarak kimyasal gebelik, 12. Hafta ise ultrasonda fetal kalp atımı tespiti ile klinik gebelik saptanmıştır.Çalışma sonuçları klinik gebelik pozitifliğine göre değerlendirilmiştir.

Verilerin değerlendirilmesinde student's -t testi,Anova kullanılmış SPSS20 istatistik programı yardımı ile sonuçlar elde edilmiştir.



Resim 1. Anilin mavisi ile sperm kromatin kondansasyonunun gösterilmesi X100

Okla işaretli kromatin kondansasyonu normal, yıldız işaretli anormal kromatin paketlenmesi



Resim 2.Sperm kromatin dispersiyon testi değerlendirilmesi 1. Yıldızla işaretli fragmente sperm, 2. Hafif şişmiş sperm (ok),3. Şişmiş olan normal DNA'ya sahip sperm(kalın ok) Kaynak, <http://orient-ivf.com/site/node/615>

4. Kullanılan malzemeler:

1	Falcon grubu tamamı pipetler tüpler	B.D.Bionsciences	USA
2	Single step medium	Life Global	USA
3	SSS	Life Global	USA
4	Nunc (150270-4wel)	ThermoScientific	DENİMARKA
5	Hamilton enjektör	Hamilton Company	USA
6			
7	Ependorflar	EppendorfGmbh	ALMANYA
8	Laminar flow		
9	Laminar flow içindeki mikroskop	Carl ZeissGmbh	ALMANYA
10	Mikromaniplator	NarishigeScientificInt.Lab.	JAPONYA
11			
12	incubabator marka model vs o2 kontrollu	IKSInternational	HOLLANDA
13	Santrifuge	LaboGene APS	DENİMARKA
14	opu toplama seti	SarstedGmbh	ALMANYA
15	pastör pipetler	HeinzHerenzMedi.Gmbh	ALMANYA
16	sperm washırvine	IrvineScientific	USA
17	pure sperm nidakon	NidaconInernational	İSVEÇ
18	200 likpipetor	EppendorfGmbh	ALMANYA
19	10 mikrolitrelikpipetör	EppendorfGmbh	ALMANYA
20	Streril sperm toplama kabı	Fırat Med	TURKİYE
21	Opu toplarken kullanılan pipet puarı.	IsolabLab. Gmbh	ALMANYA
22	Mini inkubatorlaboteclaminar	LabotectLab.Tec. Gmbh	ALMANYA
23	Makler kamerası	SefiMedical	İSRAİL
24	sperm sayımında kullanılan mikroskob	Carl ZeissGmbh	ALMANYA
25	hyalürinidase	Irvine Scientific	USA
26	Pvp	IrvineScientific	USA
27	Oil	IrvineScientific	USA
28	150 likdenudasyon(ayıklama pipeti)	GyneticsMed. Produc	BELÇİKA
29	M HTF IRVINE	IrvineScientific	USA
30	transfer kateterleri	Smith Medical	MEXICO
31	steril eldiven	Beybi Plastik	TURKİYE

Tablo. 3 Çalışmada kullanılan malzemeler, firma adı ve alındığı ülkeler tabloda gösterilmiştir.

5.BULGULAR

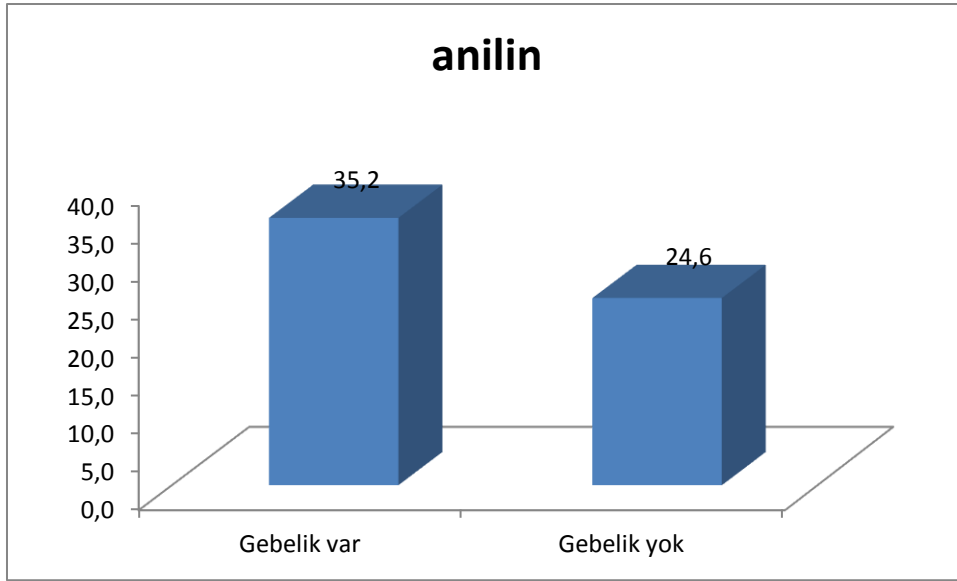
Çalışmamızda 262 olguda yapılan istatistiki değerlendirme sonucunda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir (Tablo 4)

- Kadın yaşının ve anilin negatif sperm oranının (% kromatin kondansasyonu) intrauterin inseminasyon sonucunda gebeliği öngörmesi açısından istatistiki anlamda önemi ortaya çıkmıştır (p= 0.020 ve p=0.029)(Tablo 4 Grafik 1).
- ROC analizinde anilin testinin Grafikte görüldüğü gibi gebelik ile ilgili Cut off değeri %20 üzeridir. Testin Sensitivitesi: 82,35 , Spesivitesi : 50,38 bulunmuştur.(grafik 2)
- Sperm hipoosmotik şişme parametrelerinin ve sperm kromatin dekonkansasyon değerlerinin IUI olgularında gebeliği öngörmede yetersiz olduğu saptanmıştır. (Tablo 4 grafikler 3,4)

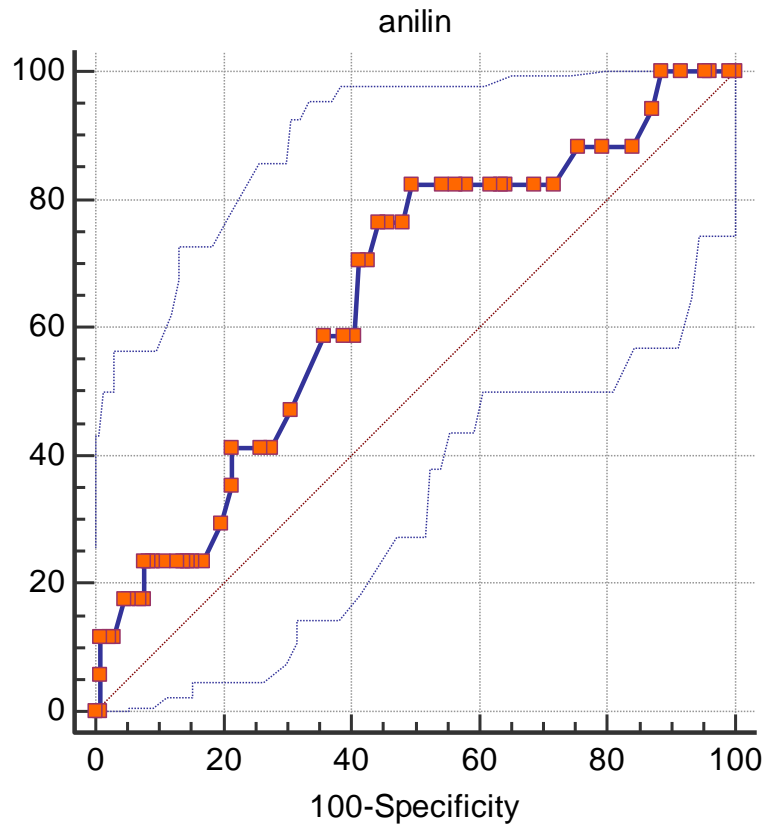
	gebelik	n	Ortalama± SD	t	p
Kadın yaşı	var	22	27,5± 5,6	2,342	0,020
	yok	240	30,2± 5,1		
Erkek yaşı	Var	22	32,2±5,6	0,304	0,761
	yok	240	32,5±5,0		
Sperm kons	var	22	49,0±38,7	0,122	0,903
	yok	240	47,9±37,6		
Tot motilite	var	20	28,9±18,7	0,751	0,453
	yok	240	26,4±14,7		
Normal morf	var	22	4,6±3,2	1,335	0,183
	yok	240	3,7±3,3		
HOS1	var	22	57,0±27,6	0,381	0,703
	yok	240	59,2±25,5		
HOS2	var	22	22,5±18,3	0,459	0,647
	yok	240	20,5±18,6		
HOS3	var	22	8,7±7,3	0,616	0,539
	yok	240	10,0±9,2		
HOS4	var	22	11,9±9,6	0,920	0,359
	yok	240	10,0±8,5		
SCD1	Var	22	30,8±15,2	1,176	0,241
	yok	240	36,5±19,6		
SCD2	var	22	35,6±12,9	0,382	0,703
	yok	240	34,1±16,5		
SCD3	var	22	32,9±21,0	0,644	0,520
	yok	240	29,8±18,9		
Anilin(-)	var	22	35,2±20,8	2,208	0,029
	yok	240	24,6±18,2		

Tablo 4. IUI olgularında gebelik pozitif ve negatif olgularda sperm fonksiyon

Parametrelerinin karşılaştırılması



Grafik 1 ; Gebelik kriterine göre anilin boyası ile tespit edilen kromatin kondansasyon değerlerinin gebe olan ve olmayan gruplardaki değeri.



Area under the ROC curve (AUC)=0,653

95% Confidence interval:0,571 to 0,729

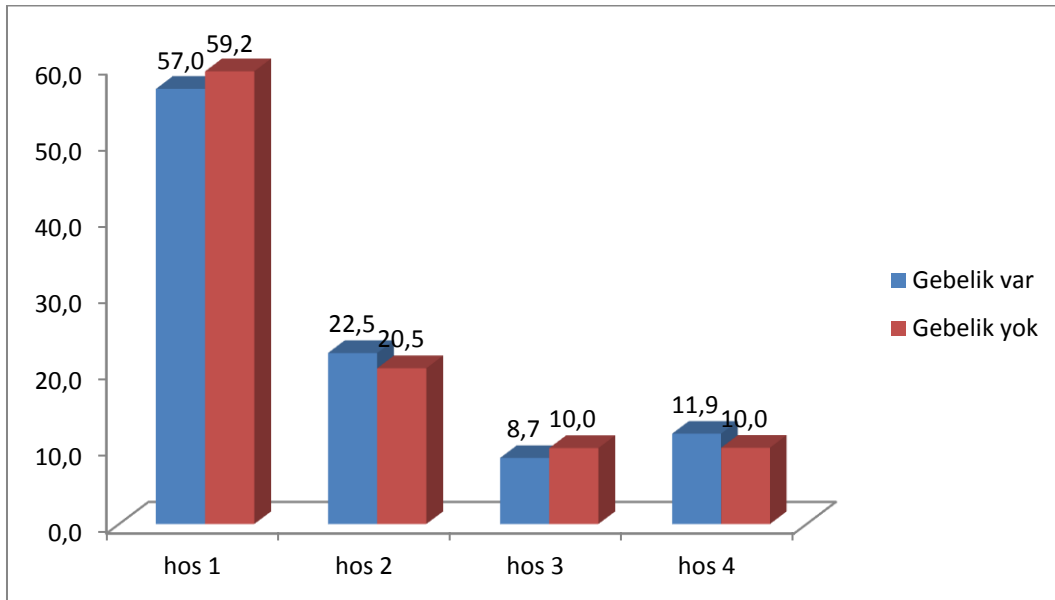
Significance level P (Area=0.5)= 0,0267

Associated criterion:>20

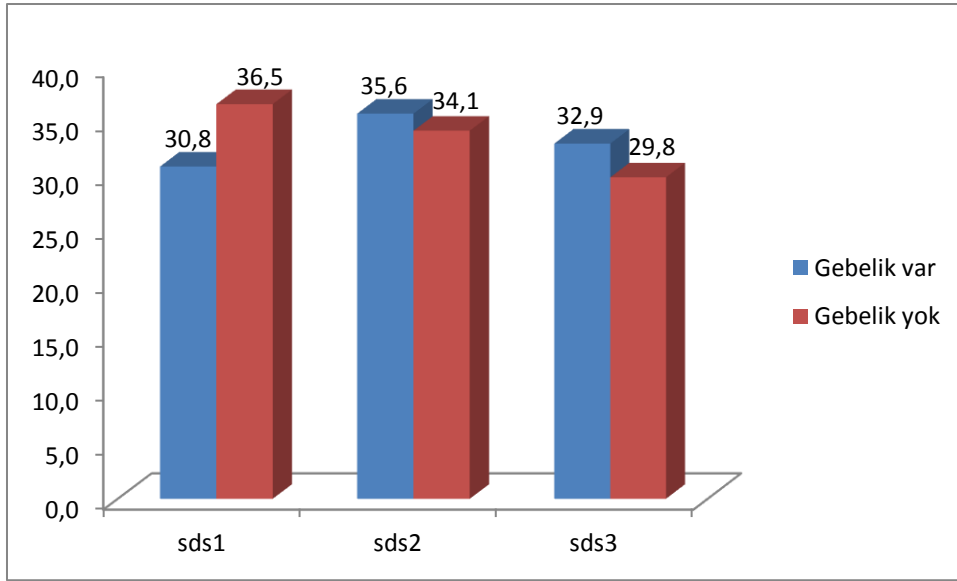
Grafik 2 ; Anilin mavisi boyaması ile tespit edilen sperm kromatin hasarının gebelik ile ilişkisinde ROC eğrisi ile tespit.(Area under the ROC curve (AUC)=0,653

95% Confidence interval:0,571 to 0,729 Significance level P (Area=0.5)=0,0267

Associated criterion:>20)



Grafik 3. Hipoosmotik şişme skorlarının gebe olan ve olmayan gruplarda dağılımı



Grafik 4. Sperm kromatin decondansasyon skorlarının gebe olan ve olmayan gruplardaki dağılımı

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada sperm fonksiyon testlerinin intrauterin inseminasyon sonuçlarını belirlemede rolü olup olmadığı, Asidik anilin mavisi (AB test) , sperm kromatin decondansasyon testi (SCD test) ve sperm membran permeabilitesini ölçen hipoosmotik şişme testi (HOS) ile araştırılmıştır.

Bulgular İÜİ olgularında kadın yaşının ve sperm kromatin bütünlüğünün sonuçları belirlemede etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.Anilin mavisi ile yapılan sperm kromatin kondansasyon testinin duyarlılığının(sensitivite) % 82,5 ve özgünlüğünün(spesivite) %50,38 olduğu görülmüştür.

Erkek infertilitesinin tanısı semen analizi ile yapılmaktadır. Semen analizinde sperm morfolojisi,motilitesi ve konsantrasyonu gibi bazal değerler ile üretim açısından tanı koyulabilmektedir. Ancak açıklanamayan infertil olgularda bu yöntem çoğunlukla yardımcı olmamaktadır (40).(Bu nedenle açıklanamayan infertilite olgularında semen analizine ek olarak yeni testlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.Bu testler sperm DNA bütünlüğünü ilgilendiren DNA hasar testleri ve kromatine ait protein yapısını içeren kromatin kondansasyon testleri olarak özetlenebilir(41).Ayrıca sperm membran geçirgenliğinin

hipoosmotik ortamda şişme parametreleri ile gösteren Hipoosmotik şişme testi (HOS) bu gruba girebilir(25).

Anilin mavisi(AB) ile yapılan kromatin kondansasyon testinde Histon taşıyan immatür spermier anilin mavisi ile boyanmaktadır (42). Sperm kromatininin organizasyonunun spermiogenesis sırasında gerçekleştiği ve anormal paketlenmenin infertil bireylerde daha yüksek olduğu gösterilmiştir (43).Sperm baş anomalilerinin Anilin mavisi pozitif spermierin artışına neden olduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir (44).Kazerooni ve arkadaşları yüksek oranda Anilin mavisi pozitif olguların sperm morfolojik anomalileri ile korelasyon gösterdiğini buldular (45).Ayrıca Armand Zini ve arkadaşları teratozoospermik bireylerde yüksek oranda AB pozitif sperm saptadılar (46). Buna Karşılık N.Hoffman ve B.Hilscher Normospermik fertil ve infertil bireylerde kromatin kondansasyon düzeylerine anilin mavisi ile baktılar ve infertil normospermik kişilerde % 23 ile %62 oranında kondansasyon bozukluğu saptadılar, iki grup kıyaslandığında infertil normospermik bireylerin istatistiki olarak anlamlı kromatin defekti taşıdığını gösterdiler (47).Sellami ve arkadaşları %20'nin üzerinde ve altında bulunan maturasyon defektlerinin karşılaştırılmasında sperm motilite konsantrasyon ve morfoloji anomali oranlarının farklı olmadığını gösterdiler (48). Bizim çalışmamızda da normospermik ve hafif erkek faktörlü olgularda sperm morfoloji, motilite ve konsantrasyonu'nun gebe olan ve olmayan bireylerde farklı olmadığını gördük. Ancak kromatin kondansasyon oranlarının istatistiki olarak farklı bulunduğunu saptadık. Bu sonuçlar özellikle normospermik veya hafif erkek faktörlü olgularda kromatin kondansasyon testinin IUI gebeliklerinin öngörülmesinde önemi olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda özellikle %20 üzerindeki kondansasyon defektinin belirleyici olduğunu ve bu olguların IVF'e yönlendirilmesi yönünde önemi olduğunu ileri sürebiliriz.Sonuçlarımız İrez ve arkadaşlarının IUI ve ICSI olgularında yaptığı çalışmada oligospermik ve teratozoospermik olgularda olduğu gibi Anilin mavisi ile yapılan kromatin kondansasyon testinin açıklanamayan infertil olgularda da belirleyici olduğunu gördük (42).

Hipoosmotik şişme testi(HOS test) WHO 2010 kriterlerine göre sperm membran bütünlüğünü ölçen , alt sınırı %58 olan bir test özelliği taşımaktadır (21). İrez ve arkadaşları düşük HOS4 skorlarının IVF uygulamalarında fertilizasyon problemi olan hastalar ile ilişkili olabileceğini ileri sürdüler (25). HOS test değerlerinin diagnostik değeri ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır.Ancak sınırlarının araştırmacılara göre farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır (33,34,35).

Tüm araştırıcıların ortak dūřüncesi sperm canlılığının HOS test ile korelasyon gösterdiği şeklinde özetlenebilir (35). Bu alışmada HOS test skorlarının açıklanamayan infertil olgularında ve hafif erkek faktörlü olgularda IUI gebeliğini etkilemediği anlaşılmıştır.HOS testi ile ilgili testin uygulanış süresi ve skorların kesin olarak belirlenmesi ve en etkili skorun hangisi olabileceği konusunda halen aydınlatılması gereken noktalar olduğu açıktır.

Bu alışmada Sperm kromatin dispersiyonunun gebe olan IUI olgularında daha fazla olduğu ancak bu oranın istatistiki anlamlılığının bulunmadığı gösterilmiştir (Tablo 4,grafik 4). Sperm DNA hasarlarının gebelik ile ilişkisi konusunda pek çok çalışma bulunmaktadır (36, 37,38,49,50). Ribas Mayneau ve ark (2013) yaptıkları çalışmada sperm DNA hasarlarını göstermede pek çok testle birlikte SCD testinin de yararlı olduğunu ileri sürdüler (51). Bizim alışmamızda açıklanamayan infertilitede IUI sonucu gebe olan ya da olmayan olgularda SCD değerlerinin farklı olmadığını gördük , ancak kromatin kondansasyonu farklılıkları, histon pozitif spermlerin fertilizasyon, implantasyon ve gebeliğin devamında önemi olduğunu ve bunun üzerinde daha ileri araştırmalar yapılması gerektiği konusunda fikir vermesi açısından ,DNA hasarlarının dışında araştırılması gerektiğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Brasch JG, Rawlins R, Tarchala S, Radwanska E. The relationship

between total motile sperm count and the success of intrauterine insemination.

Fertil Steril 1994;62:150–4.

2. Dimarzo SJ, Kennedy JF, Young PE, Herbert SA, Rosenburg DC,

Villaneuva B. Effect of controlled ovarian hyperstimulation on pregnancy

rates in intrauterine insemination. Am J Obstet Gynecol 1992;

166:1607–13.

- 3. Emmett F. Branigan, , M. Antoinette Estes , and Charles H. Muller ;** Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success .Ferti Steril 1999, 71,3,547-551
- 4. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S**
Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization
Fertility and Sterility [1988, 49(1):112-117]
- 5. Boomsma, C.M., Heineman, M.J., Cohlen, B.J., and Farquhar, C.** Semen preparation techniques for intrauterine insemination. Cochrane Database Syst. Rev. 2007; 17: CD004507
- 6. Berker, B., Şükür, Y.E., Kahraman, K., Atabekoğlu, C.S., Sönmezer, M., Özmen, B., and Ateş, C.** Absence of rapid and linear progressive motile spermatozoa ‘grade A’ in semen specimens: does it change intrauterine insemination outcomes?. Urology. 2012; 80: 1262–1266
- 7. Campana, A., Sakkas, D., Stalberg, A., Bianchi, P.G., Comte, I., Pache, T., and Walker, D.** Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman’s age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. Hum. Reprod. 1996; 11: 732–736
- 8. Cantineau, A.E., Cohlen, B.J., and Heineman, M.J.** Ovarian stimulation protocols (anti-oestrogens, gonadotrophins with and without GnRH agonists/antagonists) for intrauterine insemination (IUI) in women with subfertility. Cochrane Database Syst. Rev. 2007; : CD005356
- 9. Branigan, E.F., Estes, M.A., and Muller, C.H.** Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. Fertil. Steril. 1999; 71: 547–551
- 10. A.Agarwal and Tamer M.Said** Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility Human Reproduction Update, Vol.9, No.4 pp. 331±345, 2003
- 11.Castilla, J.A., Zamora, S., Gonzalvo, M.C., Luna Del Castillo, J.D., Roldan-Nofuentes, J.A., Clavero, A., Björndahl, L., and Martínez, L.** Sperm chromatin structure assay and classical semen parameters: systematic review. Reprod. Biomed. Online. 2010; 20: 114–124

12. Evenson D1, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online*. 2006 Apr;12(4):466-72.

13. Talebi AR. Sperm nuclear maturation. New York: Nova Science; 2011. Chapter 3, Factors affecting sperm chromatin and DNA structure; p 35–44

14. Hou JW, Chen D, Jeyendran RS. Sperm nuclear maturity in spinal cord-injured men: evaluation by acidic aniline blue stain. *Arch Phys Med Rehabil* 1995;76(5):444–5

15. Chapman JC, Michael SD. Proposed mechanism for sperm chromatin condensation/decondensation in the male rat. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;11:1–20

16. Agarwal A, Said T. (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility.

Human Reprod Update; 9:331-345.

17. Klaus Steger, Jochen Wilhelm, Lutz Konrad, Thomas Stalf, Robert Greb, Thorsten Diemer, Sabine Kliesch, Martin Bergmann, and Wolfgang Weidner

Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men

Hum. Reprod. (2008) 23 (1): 11-16

18. Ali Reza Talebi, Mohammad Ali Khalili, Serajodin Vahidi, Jalal Ghasemzadeh, and Nasim Tabibnejad J Sperm chromatin condensation, DNA integrity, and apoptosis in men with spinal cord injury

Spinal Cord Med. 2013 Mar; 36(2): 140–146. doi: 10.1179/2045772312Y.0000000055
PMCID: PMC3595962

19. H. Rodriguez , C. Ohanian and E. Bustos-Obregon Nuclear chromatin decondensation of spermatozoa in vitro: a method for evaluating the fertilizing ability of ovine semen *International Journal of Andrology* Volume 8, Issue 2, pages 147–158, April 1985 DOI: 10.1111/j.1365-2605.1985.tb00828.x

20. Gopalkrishnan K, Hinduja IN, Anandkumar TC. In vitro decondensation of nuclear chromatin of human spermatozoa assessing fertilizing potential.

Arch Androl 1991;28:43-50.

21. World Health Organization. 5th ed. Geneva: World Health Organization;

2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of

Human Semen.

22. Shrikant Ashok Shete, Sandip Meghnad Hulke, Avinash Thakare, Prashant Patil.

Study of reduced glutathione in seminal plasma and spermatozoa nuclear

chromatin decondensation test (NCDT) in human subjects with different fertility

potential. Int J Biol Med Res. 2012; 3(2): 1636-1639

23. Hans van der Ven , Rajasingam S. ,Jeyendran D.V.M., Safaa al-Hasani, Mariano Perez-Pelaez, Klaus Diedrich and Lourens J. D. Zaneveld

Correlation Between Human Sperm Swelling in Hypoosmotic Medium (Hypoosmotic Swelling Test) and In Vitro Fertilization, Journal of Andrology 1986, Volume 7, Issue 3, pages 190–196

24. Ramu S. And jeyendran R.S The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. Mol Biol. 2013;927:21-5.

25. Irez T1, Usta TA, Zebitay G, Oral E, Senol H, Sahmay S. Evaluation of subgroups of the human sperm hypoosmotic swelling test in normozoospermic male cases with recurrent fertilization failure: a prospective case-controlled study. Arch Gynecol Obstet. 2013 Apr;287(4):797-801. doi: 10.1007/s00404-012-2634-6. Epub 2012 Nov 18.

26. Imade GE, Towobola OA, Sagay AS, Otubu JA. Makler

Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler, and Horwells counting chambers.

Arch Androl. 1993 Jul-Aug;31(1):17-22.

27. Kruger TF, DuToit TC, Franken DR, Acosta AA, Oehninger SC, Menkveld R, Lombard CJ.

A new computerized method of reading sperm morphology (strict criteria) is as efficient as technician reading.

Fertil Steril. 1993 Jan;59(1):202-9

28. Ombelet W, Fourie FL, Vandeput H, Bosmans E, Cox A, Janssen M, Kruger T.

Teratozoospermia and in-vitro fertilization: a randomized prospective study.

Hum Reprod. 1994 Aug;9(8):1479-84

29. Overstreet JW, Gould JE, Katz DF, Hanson FW

In vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus.

Fertil Steril. 1980 Dec;34(6):604-6.

30. Morshedi M, Duran HE, Taylor S, Oehninger S.

Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study.

Fertil Steril. 2003 Jun;79 Suppl 3:1625-32

31. Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D.

Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa.

Hum Reprod. 1998 Aug;13(8):2139-46.

32. Jayaraman V, Upadhya D, Narayan PK, Adiga SK.

Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage.

J Assist Reprod Genet. 2012 Jun;29(6):557-63. doi: 10.1007/s10815-012-9742-x. Epub 2012 Mar 13.

33. Hossain AM, Rizk B, Barik S, Huff C, Thorneycroft IH.

Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes.

Hum Reprod. 1998 Jun;13(6):1578-83.

34. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. (1984)

Journal of Reproduction and Fertility, 70: 219–228

35. Carreras A, Ramirez JP, Mendoza C.

Sperm plasma membrane integrity measurement: a combined method.

Andrologia. 1992 Nov-Dec;24(6):335-40.

36. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D.

Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. Hum Reprod 2001;16:2160-2165

37. Tomlinson MJ, Kessopoulou E, Barratt CL. The diagnostic and prognostic value of traditional semen parameters. J Androl 1999;20:588-593.

38. Lourdes Muriel , Marcos Meseguer, Jose Luis Fernández, Juan Alvarez, José Remohí, Antonio Pellicer and Nicolás Garrido

Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study Human Reproduction 2005,() p.1-7

39. Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG.

The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation.

J Androl. 2003 Jan-Feb;24(1):59-66

40. Hamilton JA, Cissen M, Brandes M, Smeenk JM, de Bruin JP, Kremer JA, Nelen WL, Hamilton CJ.

Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system.

Hum Reprod. 2015 May;30(5):1110-21. doi: 10.1093/humrep/dev058. Epub 2015 Mar 18

41. Mohamed EE , Mohamed MA

Effect of sperm chromatin condensation on the outcome of intrauterine insemination in patients with male factor infertility.

J Reprod Med. 2012 Sep-Oct;57(9-10):421-6.

42. Irez T, Sahmay S, Ocal P, Goymen A, Senol H, Erol N, Kaleli S, Guralp O

Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques.

Andrologia. 2015 May;47(4):438-47. doi: 10.1111/and.12286. Epub 2014 Apr 27.

43. Check JH, Tubman A, Wilson C.

Intracytoplasmic sperm injection allows normal pregnancy rates for males 40 with low hypoosmotic swelling test scores even when complicated by very low motility percentage.

Clin Exp Obstet Gynecol. 2013;40(1):18-9

44. Bollendorf A, Check JH, Kramer D.

The majority of males with subnormal hypoosmotic test scores have normal vitality.

Clin Exp Obstet Gynecol. 2012;39(1):25-6.

45. Kazerooni T, Asadi N, Jadid L, Kazerooni M, Ghanadi A, Ghaffarpasand F, Kazerooni Y, Zolghadr J.

Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion.

J Assist Reprod Genet. 2009 Nov-Dec;26(11-12):591-6. doi: 10.1007/s10815-009-9361-3. Epub 2009

46. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A.

Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. Human Reproduction. 2008;23(12):2663–2668.

47. Abu DA, Franken DR, Hoffman B, Henkel R.

Sequential analysis of sperm functional aspects involved in fertilisation: a pilot study.

Andrologia. 2012 May;44 Suppl 1:175-81. doi: 10.1111/j.1439-0272.2010.01156.x. Epub 2011 Jul 6

48. Sellami A, Chakroun N, Ben Zarrouk S, Sellami H, Kebaili S, Rebai T, Keskes L.

Assessment of chromatin maturity in human spermatozoa: useful aniline blue assay for routine diagnosis of male infertility.

Adv Urol. 2013;2013:578631. doi: 10.1155/2013/578631. Epub 2013

49. Mangoli V, Mangoli R, Dandekar S, Suri K, Desai S.

Selection of viable spermatozoa from testicular biopsies: a comparative study between pentoxifylline and hypoosmotic swelling test.

Fertil Steril. 2011 Feb;95(2):631-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.10.007. Epub 2010 Nov 12.

50. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. Fertility and Sterility. 2013;99:673–677.

51. Ribas-Maynou J, García-Peiró A, Fernández-Encinas A, et al. Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. Andrology. 2013;1(5):715–722

ETİK KURUL KARARI

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	ABDULLAH	Soyadı	Yiğit
Doğ.Yeri	Merzifon	Doğ.Tarihi	21.08.1975
Uyruğu	TC	TC Kim.No	38117180100
Email	Abdullah_yiit@yahoo.com	Tel	05425325834

Eğitim Düzeyi

	Mezun olduğu kurumun adı	Mez.Yılı
Lisans	Samsun 19Mayıs Üniv.Fen Edebiyat Fak.Biyoloji Bölümü.	1998
Lise	Konya Gazi Lisesi	1993

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sırala)

Görevi	Kurum	Yılı
Biyolog	Maslak Acıbadem Hast. IVF Lab.	2015-Halen Çalışmakta
Biyolog	Alman Hastanesi	2010-2014
Biyolog	Beylikdüzü Medicana Hast. IVF Lab.	2010-2011

Yabancı dilleri	Anlama	Konuşma	Yazma		
İngilizce	iyi	İyi	iyi		

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
Ales Puanı(2012)	60,316	57,90126	54,24454

