



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE
EMBRİYOLOJİ ANABİLİM
DALI



**NEDENİ AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE
OLGULARINDA SPERM DNA BÜTÜNLÜĞÜNÜN
FERTİLİZASYON BAŞARISI VE ERKEN EMBRİYONER
GELİŞİME ETKİSİ**

ELÇİN TEZCAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA-2017





**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE
EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**NEDENİ AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE OLGULARINDA
SPERM DNA BÜTÜNLÜĞÜNÜN FERTİLİZASYON BAŞARISI
VE ERKEN EMBRİYONER GELİŞİME ETKİSİ**

Elçin TEZCAN

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç. Dr. Berrin AVCI

BURSA-2017

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum

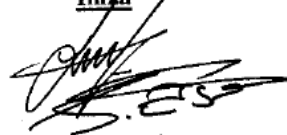
“Nedeni Açıklanamayan İnfertilite Olgularında Sperm DNA Bütünlüğünün Fertilizasyon Başarısı ve Erken Embriyoner Gelişime Etkisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Elçin TEZCAN



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Elçin TEZCAN tarafından hazırlanan 'Nedeni Açıklanamayan İnfertilite Olgularında Sperm DNA Bütünlüğünün Fertilizasyon Başarısı Ve Erken Embriyoner Gelişime Etkisi' konulu Yüksek Lisans 17/11/2017 günü, 12.00-14.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Sovadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Doç.Dr.Berrin AVCI	
Üye	Prof. Dr. Semiha ERSOY	
Üye	Prof. Dr. Meltem KURUŞ	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ali Aydoğdu
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

..01/11/2017

Adı Soyadı: Elçin TEZCAN**Anabilim Dalı:** Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**Tez Konusu:** Nedeni Açıklanamayan İnfertilite Olgularında Sperm DNA Bütünlüğünün Fertilizasyon Başarısı Ve Erken Embriyoner Gelişime Etkisi**ÖZELLİKLER****UYGUNDUR****UYGUN DEĞİLDİR**

Tezin Boyutları



Dış Kapak Sayfası



İç Kapak Sayfası



Kabul Onay Sayfası



Sayfa Düzeni



İçindekiler Sayfası



Yazı Karakteri



Satır Aralıkları



Başlıklar



Sayfa Numaraları



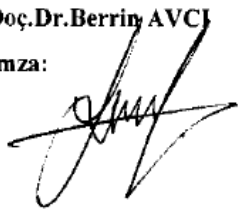
Eklerin Yerleştirilmesi



Tabloların Yerleştirilmesi



Kaynaklar

**DANIŞMAN ONAYI****Doç.Dr.Berrin AVCI****İmza:**

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET.....	VIII
İNGİLİZCE ÖZET.....	X
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İnfertilite Nedir?.....	3
2.2. İnfertilitede Erkek Faktörü.....	4
2.2.1. Erkek Faktörünün Sınıflandırılması.....	5
2.2.1.1. İdiyopatik İnfertilite	5
2.2.1.2. Obstrüktif (Ektra-testiküler) İnfertilite.....	5
2.2.1.3. Primer (Testiküler) İnfertilite.....	6
2.2.1.4. Sekonder (Pre-testiküler) İnfertilite.....	6
2.2.2. İnfertilitede Erkek Faktörünün Belirlenmesi.....	6
2.2.2.1. Rutin Semen Analizi.....	7
2.2.2.1.1. Sperm Konsantrasyonu	7
2.2.2.1.2. Sperm Hareketliliği	7
2.2.2.1.3. Sperm Morfolojisi	8
2.2.2.1.4. Semen Analizinde Değerlendirilen Diğer Parametreler.....	10
2.2.2.1.5. Sperm Fonksiyon Testleri.....	11
2.2.2.1.5.1. İnsan Sperm-Oosit Etkileşim Testleri.....	12
2.2.2.1.5.2. İnsan Zona Pellusidasına Bağlanma Testleri.....	12
2.2.2.1.5.3. Akrozom Reaksiyonunun Değerlendirilmesi.....	13
2.2.2.1.5.4. Zonasız-Hamster Oosit Penetrasyon Testi.....	13
2.2.2.2. Sperm Kromatin ve DNA Yapısının Değerlendirilmesi.....	13

2.3. Nedeni Açıklanamayan İnfertilite.....	18
2.4. Üremeye Yardımcı Tedavi Teknikleri	19
2.4.1. İntrauterin İnseminasyon (IUI).....	19
2.4.2. İn-vitro Fertilizasyon (IVF).....	20
2.4.3. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI).....	22
2.5. Sperm Kalitesinin Arttırılması.....	25
2.5.1. Klasik Sperm Seçim Yöntemleri.....	25
2.5.1.1. Swim-up	25
2.5.1.2. Dansite Gradient Santrifüjü (DGS).....	25
2.5.2. Gelişmiş Sperm Seçim Yöntemleri.....	27
2.5.2.1. Hyaluronik Asit Bağlanma Yöntemi.....	27
2.5.2.2. Elektroforetik Yöntemler.....	28
2.5.2.3. Sperm Ultramorfolojisine Dayalı Ayırım.....	28
2.5.2.4. Spermin Apoptotik Aktivitesine Dayalı Ayırım.....	29
2.5.2.5. DNA Bütünlüğüne Dayalı Ayırım.....	31
2.6. Açıklanamayan İnfertilite Olgularında ÜYT Uygulamaları.....	31
2.7. Çalışmamızın Amacı.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Hasta Populasyonu.....	34
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Mikroenjeksiyon İçin Spermilerin Hazırlanması.....	34
3.2.1. Dansite Gradient Yöntemi ile Sperm Eldesi.....	35
3.2.2. Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) Yöntemi ile Sperm Eldesi.....	36
3.3. Mikroenjeksiyon İçin Oositlerin Hazırlanması.....	37
3.4. Embriyo Morfolojik Değerlendirmesi.....	39
3.5. Sperm Kalitesinin Tayini.....	41
3.5.1. Hematoksilen-Eosin Boyaması.....	40
3.5.2. TUNEL Analizi.....	42
3.6. Değerlendirme ve İstatiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Hasta karakteristik özellikleri.....	46
4.2. Semen Parametreleri.....	47

4.3. Sperm histolojik bulguları.....	48
4.3.1. DG ve MACS-DG yöntemlerinin sperm morfolojisi üzerine etkisi.....	48
4.3.2. TUNEL Boyaması Sonuçları.....	53
4.4. Fertilizasyon Başarısı ve Embriyo Kültürü Sonuçları.....	56
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	57
6.KAYNAKLAR.....	65
7.SİMGELER ve KISALTMALAR.....	91
8.EKLER.....	92
8.1.Şekil Listesi.....	92
8.2.Tablo Listesi.....	93
9.TEŞEKKÜR.....	95
10.ÖZGEÇMİŞ.....	96

TÜRKÇE ÖZET

İnfertilite olgularının yaklaşık %15'inde infertilite sebebi olabilecek bir patoloji saptanmayıp, açıklanamayan başka faktörlerden dolayı konvansiyonel gebelik gerçekleşmemektedir. Araştırmalar, sperm DNA hasarının üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYT) sonucunu olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur. Son yıllarda, çekirdek bütünlüğü korunmuş olan spermleri seçmeye yönelik invaziv olmayan yöntemler geliştirilmeye başlanmış olmakla birlikte, bu yöntemlerin açıklanamayan infertilite olgularında ÜYT başarısı üzerindeki etkisi henüz tartışmalıdır.

Bu çalışmada; rutin sperm hazırlama tekniği olan dansite gradient santrifüjü (DGS) yönteminin tek başına ve DNA'sı hasarlı spermlerin elenmesine yönelik olarak geliştirilen invaziv olmayan yöntemlerden olan manyetik aktivasyonla hücre ayırma (MACS) yöntemiyle birlikte kullanımı sonucu elde edilen spermlerin İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)'nin başarısı üzerindeki etkisi karşılaştırılarak en uygun semen hazırlama yönteminin saptanması hedeflendi. Açıklanamayan infertilite tanısıyla ÜYT programına alınan çiftlerde, DGS yönteminin tek başına ve MACS yöntemiyle birlikte kullanımının, kaliteli sperm elde etmedeki başarısı, her iki yıkama metoduyla elde edilmiş spermlerde TUNEL yöntemi ile DNA bütünlüğü açısından ve Hematoksilen Eosin boyamasıyla morfolojik açıdan değerlendirildi. Klinik parametrelere etkisine değerlendirmek amacıyla, her iki yıkama yöntemiyle elde edilen spermlerin ICSI sonrası fertilizasyon ve embriyo gelişimsel potansiyeline bakıldı.

MACS+DGS yöntemiyle yıkanan sperm örneklerinde sperm DNA fragmentasyon oranının ve vakuol (+) sperm oranının DGS yöntemiyle elde edilen spermlere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü. DGS veya MACS+DGS ile yıkanan spermlerle mikroenjeksiyonu gerçekleştirilen oositler arasında fertilizasyon ve embriyo gelişimsel potansiyelinde bir farklılık oluşmaması intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulamalarında spermin doğal seçiliminin söz konusu olmamasının bir sonucu olduğu düşünülerek, MACS tekniğinin ICSI protokollerinde gerekli olmadığı, spermin doğal seçiliminin gerçekleştiği. İntrauterin İnseminasyon (IUI) ve IVF uygulamalarında daha etkin olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Sperm DNA Hasarı, MACS, DGS, TUNEL, Hematoksilen Eozin



ABSTRACT

Effect of Sperm DNA Integrity on Fertilization Success and Early Embryonic Development in Unexplained Infertility Cases

In almost 15% of infertility cases although any pathology cannot be defined that may cause infertility, due to other unexplained factors conventional pregnancy does not occur. Investigations have evidenced that sperm DNA damage adversely affects the outcome of assisted reproduction techniques (ART). In recent years, non-invasive methods have begun to be developed to eliminate sperms, whose DNA has been damaged and to select ones, whose nucleus integrity is protected. However; the effect of these methods on unexplained infertility cases is still controversial.

In this study, determining the most suitable sperm preparing method was aimed through comparing the effects of sperms on the success of ICSI which are obtained using density gradient centrifugation (DGC) method, a routine sperm preparation technique, alone and in combination with magnetic activating cell sorting (MACS), a non-invasive method developed for eliminating of sperms with DNA damage. The success of using DGC method alone and in combination with MACS method on achieving high quality sperm were analyzed by TUNEL method in terms of DNA integrity and by Hematoxylin Eosin staining with morphological aspects in couples who were admitted to ART program with the diagnosis of unexplained infertility. In order to evaluate the effect on the clinical parameters, sperm obtained by both techniques were followed up for their fertilization and embryo development potential after ICSI. In the sperm samples washed with MACS + DGS method, the sperm DNA fragmentation ratio and vacuole (+) sperm ratio were decreased in statistical significance in compare to sperm obtained by DGS method.

Suggesting, as a result of lack of natural sperm selection in intracytoplasmic sperm injection, there was no difference in fertilization and embryo development potential between oocytes microinjected with sperm washed with DGS or MACS+DGS. Thus, it is concluded that MACS technique is not necessary in ICSI

protocols and may be more effective in IUI and IVF applications which are based on natural sperm selection.

Key Words: Sperm DNA Damage, MACS, DGC, TUNEL, Hematoxylin Eosin



1. GİRİŞ

Erkek infertilitesinin tanısında sıklıkla yararlanılan test rutin semen analizidir. Bu analiz ile World Health Organization (WHO)'nun belirlediği kriterler esas alınarak sperm hücrelerinin konsantrasyonu, motilite oranı ve morfolojisi değerlendirilmektedir. Bu olguların büyük bir çoğunluğunda, rutin semen analizi bulguları ile fertilizasyon başarısı arasında bir korelasyon vardır (Nallella ve ark., 2006; Zinaman ve ark., 2000). Ancak, infertilite olguların bir bölümünü WHO'nun referans olarak belirlediği semen parametrelerinin normal sınırlarda olduğu açıklanamayan infertilite olguları oluşturmaktadır (Cinthia ve ark., 2014 Nunez-Calonge ve ark., 2012).

Spermilerin başarılı bir fertilizasyon ve normal bir embriyoner gelişimin gerçekleştirebilmesi için sekonder oosite hasarsız bir çekirdek sunması gereklidir (Aitken, 2006). Bu nedenle, açıklanamayan infertilite olgularında kromozomal anomalilerin saptanmasının yanı sıra sperm DNA bütünlüğünün saptanmasını ve embriyo gelişimi ve gebelik üzerindeki etkisinin incelenmesini hedefleyen çeşitli fonksiyonel analizler geliştirilmiştir (Chohan ve ark., 2006; Delbes ve ark., 2010). Bu yöntemlerden en bilinenleri; sperm kromatin yapısının incelenmesi yoluyla DNA tek ve çift iplik kırıklarının saptanması ve spermdeki protamin miktarı saptanarak kromatin paketlenme hatalarının tespit edilmesidir (Lin ve ark., 2008; Virro ve ark., 2004). Bahsi geçen yöntemlerin açıklanamayan infertilite olgularında hasarının üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYT) başarısı üzerindeki etkisi tartışmalı olmasına rağmen sperm DNA hasarının ÜYT'yi olumsuz etkilediği konusunda fikir birliği sağlanmıştır. Bu nedenle, son dönemde araştırmalar, klinik kullanıma uygun, DNA'sı hasarlı olan spermeleri eleyerek çekirdek bütünlüğü korunmuş olan spermeleri seçmeye yönelik invaziv olmayan yöntemler geliştirilmek üzerine yoğunlaşmıştır (Henkel, 2012).

Anneksin V ile konjuge manyetik aktiflenme ile hücre ayırma (MACS–Anneksin V), ejakulattan DNA hasarı bulunmayan sperm hücrelerinin ayrılması amacıyla geliştirilen en umut verici yöntemdir (Almeida ve ark., 2009; Grunewald ve ark., 2013). DNA fragmentasyonu ejakulattaki normal veya abortif

apoptotik spermilerin karakteristik bir özelliğidir (Kasai ve ark., 2002; Taylor ve ark., 2004; Weng ve ark., 2002). Normalde sperm plazma zarının iç yaprağında yer alan fosfolipid fosfatidilserinin (PS) apoptotik hücrelerde yer değiştirerek plazma zarının dış yaprağına taşınmaktadır (Oosterhuis ve ark., 2000; Vermes ve ark., 1995). Plazma zarının dış yaprağına taşınan PS'nin, sperm membranından geçme kabiliyetine sahip olmayan bir fosfolipid bağlayıcı protein olan Anneksin V ile işaretlenerek belirlenmesi mümkündür (Van Heerde ve ark., 1995). MACS–Anneksin V yönteminde, Anneksin V proteini magnetik boncuklar ile konjuge edilerek apoptotik sperm hücrelerinin Anneksin V proteini ile işaretlenmesi ve manyetik boncuklar sayesinde bir magnete tutulu kalması sağlanmaktadır. Böylece magnete tutunmayan Anneksin V ile işaretlenmemiş sperm hücrelerinin ayrılarak kullanılması hedeflenmiştir (Glander ve ark., 2002; Grunewald ve ark., 2001). Bu teknik, klasik in-vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında sperm hazırlamada kullanılan DGS ve yüzdürme yöntemlerine ek olarak uygulanmış olup kaliteli spermilerin seçiliminde ve implantasyon ve gebelik oranlarında artış olduğu ifade edilmiştir (Lukaszuk ve ark., 2015; Simopoulou ve ark., 2016).

Bu çalışmada, açıklanamayan infertilite tanısı ile ÜYT programına alınan çiftlerde, DGS yönteminin tek başına ve MACS yöntemi ile birlikte kullanımının DNA bütünlüğü korunmuş, kaliteli sperm elde etmedeki başarısını ve DNA bütünlüğü korunmuş spermiler ile yapılan ICSI olgularının fertilizasyon ve erken embriyoner gelişim sürecine etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite Nedir?

International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) ve World Health Organization (WHO)'nun 2009 yılında birlikte hazırladığı üremeye yardımcı tekniklerin terminolojisi sözlüğüne göre; 12 ay veya daha uzun bir süre boyunca, düzenli sıklıkta korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi durumu infertilite olarak tanımlanır (Zegers-Hochschild ve ark., 2009). İnfertilite primer ve sekonder infertilite olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Çiftlerin en az bir yıl süreyle korunmamasına rağmen hiç gebelik oluşmaması durumu primer infertilite olarak değerlendirilirken, en az bir gebelik gerçekleşmesinden sonra en az bir yıl süreyle korunmamaya rağmen gebelik oluşmaması durumu sekonder infertilite olarak tanımlanmaktadır. WHO'nun 2004 yılındaki gelişmekte olan ülkelerdeki infertilite raporuna göre, dünyada üreme çağındaki çiftlerde primer infertilite oranı farklı coğrafik bölgelere bağlı olarak yaklaşık %3,9 ile %16,8 arasında değişmektedir. Bahsi geçen raporda Türkiye'de 25-49 yaş arası kadınlarda primer infertilite insidansının %8,5 olduğu bildirilmiştir (ORC Macro ve ark., 2004).

İnfertilite oluşumunda kadın ve erkek kaynaklı faktörlerin görülme sıklığı benzer oranlardadır (Sadock ve ark., 2003). WHO'nun 1982-1985 yılları arasında çok merkezli olarak gerçekleştirdiği bir araştırma sonucunda, infertilite olgularının %20'sinin erkek faktöründen, %38'inin kadın faktöründen ve %27'sinin her iki faktörden kaynaklandığı görülmüştür. Bunun yanı sıra, olguların %15'inin ise kadın ve erkekte infertilite nedeni olabilecek bir patolojinin saptanmadığı, nedeni açıklanamayan faktörlerden kaynaklandığı saptanmaktadır. (World Health Organization, 1987). Kadın ve erkek faktörlerine bağlı infertilite nedenleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo1. Kadın ve erkek infertilite sebepleri (Çolgar, 2006).

Kadın faktörlü infertilite sebepleri		
Ovulatuvar Faktörler	Santral defektler	Kronik hiperandrojenik anovulasyon Hiperprolaktinemi Hipotalamik yetmezlik
	Pitüiter yetmezlik (Travma, tümör, konjenital)	
	Periferik defektler	Gonadal disgenezis Prematür ovaryan yetmezlik Ovaryan tümör Ovaryan rezistans
	Metabolik hastalıklar	Tiroid hastalığı Karaciğer hastalığı Böbrek hastalığı Obezite Androjen fazlalığı
Pelvik Faktörler	Enfeksiyon	Appendisit Pelvik enflamatuvar hastalık Uterin adezyonlar (Asherman sendromu)
	Endometriozis	
Yapısal Anomaliler	Dietilstilbestrol (DES)'e maruz kalma Reproduktif sistemin anormal füzyonu Myom	
Servikal faktörler	Konjenital	DES' e maruz kalma Müllerian kanal anomalileri
	Akkız	Cerrahi tedavi Enfeksiyon
Erkek Faktörlü infertilite sebepleri		
Endokrin hastalıklar	Hipotalamik disfonksiyon (Kallman sendromu) Pitüiter yetmezlik (Tümör, radyasyon, cerrahi) Hiperprolaktinemi (ilaç, tümör) Eksojen androjenler Tiroid hastalıkları Adrenal hiperplazi	
	Konjenital vasa deferens yokluğu Vasa deferens tıkanıklığı Ejakulatuvar sistemin konjenital anomalileri	
	Kromozomal bozukluklar Kabakulak orşiti Kriptorşidizm Kimyasal maddelere ve radyasyona maruz kalma	
	Sillia yokluğu (Kartagener sendromu) Varikosel Antikor yapımı	
	Retrograd ejakulasyon İmpotans Libido azalması	

2.2.İnfertilitede Erkek Faktörü

Erkek faktörüne bağlı infertilite, fertil bir kadınla 12 ay veya daha uzun süre boyunca korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi durumudur (World Health Organization, 1999). Periyodik aralıklarla (1 hafta) toplanmış semen örneklerinden gerçekleştirilen sperm analizlerinde WHO'nun belirlediği normal semen parametrelerinin altında değerlere sahip erkekler infertil olarak tanımlanmaktadır (Plachot ve ark., 2002). Erkek infertilitesine yol açan nedenler 4

grupta incelenmektedir. Bunlar idiyopatik, obstrüktif (ektra-testiküler), primer (testiküler) ve sekonder (pre-testiküler) nedenlerdir (Bhasin ve ark., 2004; Cocuzza ve ark., 2013; Plachot ve ark., 2002; Winters ve ark., 2014).

2.2.1. Erkek Faktörünün Sınıflandırılması

2.2.1.1. İdiyopatik İnfertilite

İdiyopatik infertilite, olguların %10-50'sinde gözlenmektedir. Bu olgularda gebe kalamama tek bir faktöre bağlanamaz. Hastalarda testesteron (T), follikül stimülan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) düzeyleri normal seviyelerde görülmekte, ancak sperm sayısı ve/veya morfolojisi ve/veya hareketliliğinde anormallikler saptanmaktadır. Buna rağmen hastaların fiziksel muayenelerinde herhangi bir patoloji ortaya konamamaktadır. Bu tür infertilitenin depresyon, çeşitli cinsel bozukluklar, cinsel tatmin eksikliği ve buna eşlik eden duygusal rahatsızlıklarla ilişkili olabileceğini ifade eden görüşler olmakla birlikte, literatürde L-carnitine, L-acetylcarnitine ve Coenzyme Q-10 gibi mikroelementlerin eksikliğinin de bu tip infertilitenin oluşmasında önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (Balercia ve ark., 2004; Barazani ve ark., 2014; Sheweita ve ark., 2005).

2.2.1.2. Obstrüktif (Ektra-testiküler) İnfertilite

Ektra-testiküler infertilite hatalı sperm transportu, cinsel ilişkinin gerçekleşmemesi veya ejakulasyon bozuklukları ile ilişkilidir. Etiyolojik açıdan bakıldığında, bazı ilaçların yan etkileri, post-operatif komplikasyonlar veya zührevi hastalıklar ile ilişkili olarak ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca, kistik fibroz gibi bazı sistemik hastalıklar ve Vas deferens'in konjenital bilateral aplazisi olarak tanımlanan spermatik kanalların tıkanıklığı bu tür infertiliteye sebep olmaktadır (Bhasin ve ark., 2007; Cocuzza ve ark., 2013; Winters ve ark., 2014).

2.2.1.3. Primer (Testiküler) İnfertilite

Testiküler infertilite hücresel düzeyde, Sertoli veya Leydig hücrelerinde görülen bir bozukluktur. Erkek infertilitesinin başlıca nedenidir. Kromozomal bozukluklar, Klinefelter sendromu gibi konjenital defektler, varikosel, omurilik yaralanmaları, testis kanseri, enfeksiyon vb. hastalıkların yanısıra kemoterapi, radyoterapi, alkol, kokain, nitrofurantoin, sulfasalazin, kolşisin gibi bazı ilaçların kullanımından kaynaklanmaktadır (Aksglaede ve ark., 2013; Tournaye ve ark., 2012).

2.2.1.4 Sekonder (Pre-testiküler) İnfertilite

Pre-testiküler infertilite hipotalamo-hipofizer aksın bozukluklarından kaynaklanmaktadır. Bu tip infertilite çoğunlukla tümörler, enfeksiyonlar, travma ve merkezi sinir sistemindeki vasküler değişimler tarafından tetiklenmektedir. Ayrıca, endokrin, sistemik veya genetik hastalıkların (Kallmann sendromu) bir semptomu olarak gözlenebilmektedir. Hipotalamo-hipofizer sistemin fonksiyonları androjenler (T, anabolik steroidler), yüksek doz kortikosteroidler, siproteron veya spironolaktone gibi bazı ilaçların yüksek dozda kullanımı sonucu bozulabilmektedir. Pre-testiküler infertilite erkek infertilitesinin %2'sini oluşturan hipogonadotropik hipogonadizmi (HH) tetiklemektedir. HH, FSH ve LH salınımının bozulmasına yol açarak testislerin yetersiz stimülasyonuna sebep olmaktadır (King ve ark., 2012; Silveira ve ark., 2013).

2.2.2. İnfertilitede Erkek Faktörünün Belirlenmesi

İnfertilitenin erkek kaynaklı olup olmadığının belirlenebilmesi için rutin incelemede en yaygın olarak araştırılan parametreler; rutin semen analizi ile belirlenen sperm konsantrasyonu, sperm morfolojisi ve sperm hareketliliğidir (Çolgar, 2006; Silveira ve ark., 2013). Rutin semen analizi spermin canlılık derecesi hakkında fikir versede, ejakulattaki progressif motil sperm oranı %40'ın altında olduğu durumlarda sperm vitalitesini belirlemede eozin boyama, eozin-nigrozine boyama veya hipoozmotik şişme (HOS) testi gibi hücre membran bütünlüğünün değerlendirildiği analizler uygulanmaktadır.

2.2.2.1.Rutin Semen Analizi

2.2.2.1.1. Sperm Konsantrasyonu

Sağlıklı erkeklerde 2-3 günlük cinsel perhizden sonra mastürbasyon yoluyla elde edilen ejakulat hacmi referans değerleri 1,4 ml ile 1,7 ml arasında değişmektedir (Trevor ve ark. 2010). WHO 2010 kriterlerine göre sağlıklı erkeklerde olması beklenen sperm sayısı her ejakulatta 39 (33-46) milyon olup toplam sperm konsantrasyonu 15 (12-16) milyon/ ml'dir. 15 milyon/ml'den az sperm sayısı "oligozoospermi" olarak tarif edilmektedir (World Health Organization, 2010). Oligozoospermia geçici veya kalıcı bir durum olabilmektedir. Oligozoospermia 3 farklı seviyede tanımlanır (Padubidri, 2011).

1. Hafif oligozoospermia: 10-15 milyon sperm/ml
2. Orta oligozoospermia: 5-10 milyon sperm/ml
3. Ağır oligozoospermia: <5 milyon sperm/ml

Oligozoospermianın yanısıra, sperm konsantrasyonunda gözlenebilen diğer değişiklikler aşağıda belirtilen terimlerle ifade edilmektedir;

- Azospermia: Ejakulatta hiç sperm olmaması
- Aspermia: Seminal plazma üretiminin olmaması
- Nekrospermia: Spermilerin ölü olması
- Lökospermia: Semende lökositlerin 1milyon/ ml'den fazla olması

2.2.2.1.2.Sperm Hareketliliği

Spermin hareket kabiliyeti fertilizasyon ve gebeliğin gerçekleşmesi için en önemli koşullardan biridir. Spermin dışı genital sistemde vajen, serviks ve uterus kavitesini geçip, sekonder oositin bulunduğu tuba uterinanın ampulla bölgesine ulaşabilmesi için çok büyük mesafe kat etmesi gerekmektedir. Spermin oositi saran follikül hücrelerini, zona pellusidayı ve oosit hücre membranını geçebilmesi için mutlaka yeterli miktarda hareket gücüne sahip olması gerekmektedir. WHO 2010 kriterlerine göre sperm motilitesi ileri progresif hareketli, hareketli ve hareketsiz olarak derecelendirilmektedir. 37°C'de > 25µm/ sn hızla hareket eden spermeler hızlı hareketli, < 25µm/sn hızla hareket eden spermeler ise yavaş hareketli olarak tanımlanmaktadır. Ejakulattaki toplam sperm sayısı ile toplam ileri hareketli sperm

sayısı ayrı ayrı ele alınmaktadır. Toplam hareketli sperm sayısının %40 (38-42)'nin altında olması ve toplam ileri hareketli sperm sayısının %32 (31-34)'nin altında olması anormal sperm hareketliliği (astenozoospermia) olarak adlandırılmaktadır.

Spermin hareketi;

0: hareket yok

1: hareketli ancak ileri hareket yok

2: dengesiz hareketler ile yavaş ve ileri hareket

3: orta hızda ileri hareket

4: hızlı ileri hareket olarak derecelendirilmektedir (Alexander, 1982).

2.2.2.1.3. Sperm Morfolojisi

WHO'nun 2010 ve Kruger'in 1986 kriterlerine göre sağlıklı sperm morfolojisi aşağıdaki gibidir (Coetzee ve ark., 1998; Kruger ve ark., 1986, Menkveld ve ark., 1990, World Health Organization, 2010).

Baş:

- Düzgün, oval biçimli
- Uzunluk; 5-6 µm
- Çap; 2,5-3,5 µm
- Akrozom: sperm başının % 40-70'ini oluşturmali.

Orta parça:

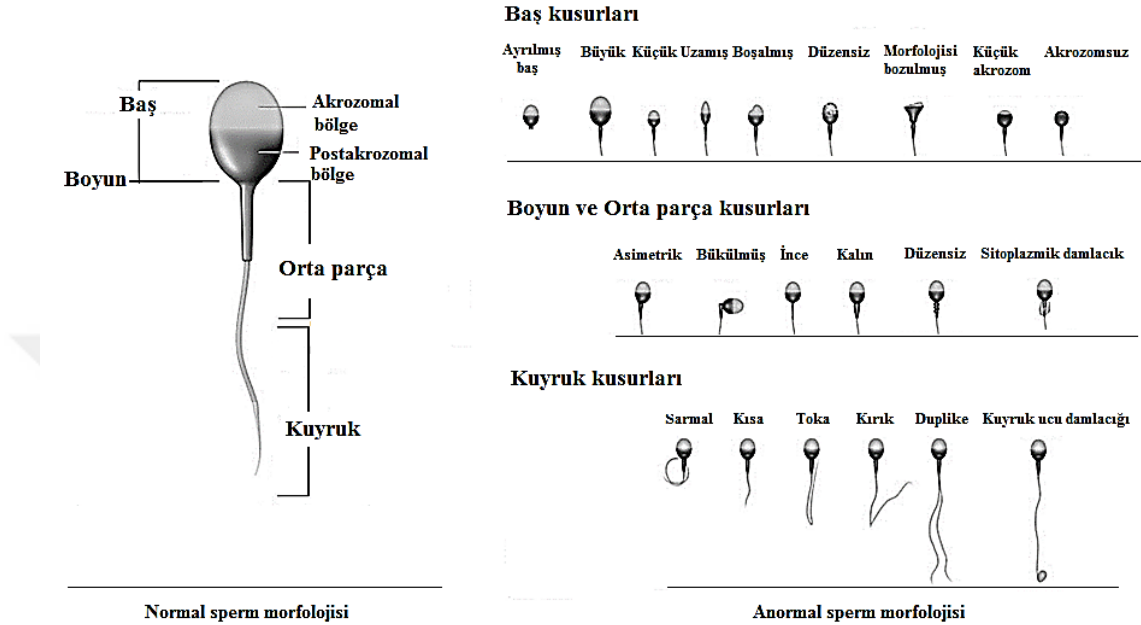
- İnce ve güzel hatlı, eksensel olarak bağlı
- 1 µm genişliğinde ve yaklaşık olarak baş uzunluğunun 1,5 katı
- Sperm başının yarısından büyük sitoplazmik damlacığın olmaması

Kuyruk:

- Tek, kırılmamış, düzgün, 45 µm uzunluğunda olmalı, bükülme veya halka formasyonu olmamalı.

Normal sperm morfolojisi fertilizasyon başarısı ile doğrudan ilişkilidir. Anormal morfolojiye sahip olan spermiler genetik materyali oosit sitoplazmasına taşıyamazlar. Normal morfolojili sperm sayısı %15 ve üzerinde ise hasta sperm morfolojisi açısından normal kabul edilmektedir. %4-14 arası normal morfolojili sperm sayısı sınır olarak kabul edilmekte ve normal sperm sayısı %4'ün altında ise

teratozoospermi olarak değerlendirilmektedir. (Coetzee ve ark., 1998; Kruger ve ark., 1986; Menkveld ve ark., 1990; World Health Organization, 2010). Farklı morfolojilerdeki sperm bozuklukları Şekil 1’de gösterilmektedir.



Şekil 1. Normal ve anormal sperm morfolojileri

(<http://fertilitysolutions.com.au/so-your-sperm-morphology-is-low-should-you-be-worried/>).

Rutin semen analizi erkek üreme organlarının ve hücrelerinin yapısal ve fonksiyonel kapasitesinin öngörülmesine olanak sağlar. Ancak, yapılan çalışmalar semen parametrelerinin infertil ve fertil erkeklerde benzer özellikte olabildiğini göstermiştir (Hamada ve ark., 2011; Jarow, 2007; Lewis, 2007). Semen parametreleri, aynı bireyden birkaç gün arayla alınan semen örneklerinde dahi değişkenlik gösterebilmektedir (Jarow, 2007). Bu nedenle semen analizi sperm fonksiyonundaki olası bozuklukları belirlemek konusunda yetersiz kalmaktadır. Spermilerin sekonder oosite taşınımı, servikal mukus ile sperm etkileşimi ve oosit ile sperm etkileşimi gibi fertilizasyon sürecinin birçok önemli aşaması konvansiyonel semen analizi ile değerlendirilemez (Hamada ve ark., 2011). Bu nedenle rutin semen analizi ile spermin fertilizasyon potansiyeli hakkında elde edilen bilgi sınırlıdır (Lewis, 2007). Spermin fertilizasyon potansiyeli hakkında daha güvenilir veriler elde edilebilmesi için rutin diğer semen parametrelerinin değerlendirilmesi ve semen analizine sperm fonksiyon analizleri eklenmelidir (Hamada ve ark., 2011).

2.2.2.1.4. Semen Analizinde Değerlendirilen Diğer Parametreler

Fertil erkeklerde 1 ml ejakulatta $0,5 \times 10^6 - 1,0 \times 10^6$ polimorfonükleer (PMN) lökosit ve $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$ toplam lökosit bulunmaktadır (Wolff, 1995). Ejakülatta çok fazla sayıda lökosit bulunması (lökospermi, piyospermi) enfeksiyon varlığının veya kötü sperm kalitesinin bir belirtisidir. Lökositler oksidatif saldırı yoluyla sperm motilitesi ve DNA bütünlüğünü bozabilirler (Aitken ve Baker, 1995; Rossi ve Aitken, 1997; Tomlinson ve ark., 2005). Semende önde gelen lökosit formu peroksidaz pozitif granülositlerdir. Bu nedenle, ejakulattaki lökositlerin belirlenebilmesi için ilk olarak peroksidaz aktivitesi analiz edilir (Johanisson ve ark., 2000; Wolff, 1995). Ejakülattaki toplam peroksidaz pozitif hücre sayısı lökositlerin yol açtığı inflamasyon derecesini yansıtır (Wolff 1995). Peroksidaz aktivitesi analizinin yanısıra, ejakulattaki lökosit sayısının belirlenmesinde sperm hücreleri ile lökosit hücrelerinin nükleusları arasındaki boyanma ve büyüklük farkından da yararlanılabilmektedir. Papanicolaou prosedürüyle boyanmış yayma preparatlarda; lökosit nükleusları pembe gözlenen sperm nükleusuna kıyasla daha mavimsi bir renkle boyanırlar (Johanisson ve ark., 2000). Hücre çekirdeğinin büyüklüğü de tanımlamaya yardımcı olabilir. Monositlerin çekirdekleri çok farklı boyutlar sergiler. Lenfosit çekirdekleri yaklaşık 7 μm , makrofajların ise 15 μm 'nin üzerinde olabilir. Dejenerasyon ve bölünmeler hücre çekirdeğinin büyüklüğünü olumsuz etkilediğinden, bu büyüklükler yalnızca bir kılavuz işlevi görür.

İmmatür germ hücreleri; spermatidler, spermatositler ve nadiren spermatogoniaları içermektedir. Lökositler, çok çekirdekli spermatidlerle morfolojik açıdan benzerlik gösterse de Papanicolaou prosedürüyle boyanmış yayma preparatlarda, spermatidler pembemsi renge, PMN lökositler ise mavimsi bir renkle boyanır ve kolaylıkla ayırtedilebilirler (Johanisson ve ark., 2000). Bununla birlikte, ejakulatta bulunan immatür sperm hücreleri gelişen akrozom (Couture ve ark., 1976), lektinler veya spesifik antikorlara özgü boyalarla (Ezeh ve ark., 1998; Homyk ve ark., 1990) tanınabilirler.

Semen analizinde değerlendirilmesi gereken parametrelerden biri de, sperm otoimmünitesine yol açarak sperm fonksiyonlarını ciddi derecede etkileyen anti-sperm antikorların (ASA) varlığıdır. Spermiler aglütinasyon gösterirse (hareketli

sperm birbirlere başbaşa, kuyruk-kuyruğa veya karışık şekilde yapışırlar), bunun nedeni ASA olabilir. Ancak, sperm aglütinasyonu olmaksızın da ortamda ASA mevcut olabilir. Semendeki ASA'ların büyük çoğunluğu IgA ve IgG immünoglobülin antikor sınıflarına dahildir. IgM antikorları daha büyük boyutlu olduklarından semende nadir bulunurlar (Jager ve Kremer, 1980). Sperm üzerinde ASA varlığının değerlendirilmesi için direkt yöntemler olan karma antiglobülin reaksiyonu (mikst antiglobülin reaksiyonu, MAR) testi ve immunobead (IB) testi kullanılır (Bronson ve ark., 1982; Clarke ve ark., 1982, 1985). Seminal plazma, kan serumu ve çözündürülmüş servikal mukus gibi sperm içermeyen sıvılarda ise ASA varlığı indirekt olarak değerlendirilir. Seyreltilmiş, ısıyla inaktive edilmiş, ASA içerdiğinden kuşkulanan sıvı, seminal plazmadan yıkanarak arındırılmış antikorsuz verici spermle inkübe edilir. Şüpheli sıvıda var olan herhangi bir ASA, spesifik olarak vericinin spermine bağlanır. Daha sonra, MAR veya IB gibi direkt testler uygulanarak ASA varlığı değerlendirilir.

2.2.2.1.5. Sperm Fonksiyon Testleri

İnsan spermalarının fertilizasyon için gerekli temel süreçleri (zona pellusidaya bağlanma, akrozomal ekzositoz, oositin vitellin membranıyla kaynaşma vb.) yerine getirme yetisinin değerlendirilebilmesi amacıyla sperm fonksiyon testleri geliştirilmiştir. Sperm fonksiyonunu düzenleyen moleküler sinyal ileti yolları hakkındaki bilgilerimiz arttıkça, infertil erkeklerin spermalarında kusurlu süreçlerin kesin doğasına ilişkin ayrıntılı bilgileri oluşturabilen tanısal testler geliştirilebilecektir (Aitken ve Krausz, 2001; Virro ve ark., 2004).

2.2.2.1.5.1. İnsan Sperm-Oosit Etkileşim Testleri

Spermin zona pellusidaya bağlanması akrozom reaksiyonunu başlatır, litik akrozomal bileşenleri serbestleştirip bağlı olanları açığa çıkartır ve aşırı aktifleşmiş sperm kuyruklarının ileriye doğru kamçısal hareketleriyle spermilerin itilerek zona matriksine girmesine olanak tanır. Sperm-ZP bağlanma kapasitesini değerlendirmek için otopilerden alınan cansız, fertilizasyon yetisine sahip olmayan insan oositleri, cerrahi yolla alınan ovaryumlar veya başarısız invitro fertilizasyon sonrası döllenmeyen oositler kullanılabilir. Bu testler genellikle insan oositlerinin bulunmasındaki zorluklar nedeniyle kısıtlı olarak uygulanabilmektedir (Kruger ve ark., 1991; Liu ve Baker, 1992; Liu ve ark., 2004; Yanagimachi ve ark., 1979)

2.2.2.1.5.2. İnsan Zona Pellusidasına Bağlanma Testleri

Erkek faktörüne bağlı infertilitede fertilizasyon oranını önceden tahmin etmeye yönelik testlerden biri de hemizona testidir. Bu yöntemde spermin zona pellusidaya bağlanma oranı ölçülür. Bir oosite ait zona pellusida mikrodiseksiyon ile iki yarım küreye ayrılır. Yarım kürelerden biri kontrol spermeleri ile, diğeri özdeş konsantrasyonda hasta spermeleri ile inkübe edilir. Pipetaj sonrası zona pellusidaya bağlanan spermeler mikroskop yardımıyla sayılır. Aşağıdaki formüle göre Hemi zona indeksi (HZİ) hesaplanarak $HZİ \leq \%30$ olan spermeler fertilizasyon oranı düşük olarak, $> \%30$ olan spermeler fertilizasyon oranı yüksek olarak değerlendirilir (Burkman ve ark.,1988).

$\% HZİ = \frac{\text{Zona pellusidaya penetre olan hasta sperm sayısı}}{\text{zona pellusidaya penetre olan kontrol sperm sayısı}} \times 100$

Farklı bir sperm- zona bağlanma testinde, hasta ve kontrol spermeleri farklı renklere floresans veren boyalar (örn: fluorescein ve rodamin) ile işaretlenir ve aynı zona pellusida ile özdeş konsantrasyonda inkübe edilirler. Pipetaj sonrası zona pellusidaya bağlanan hasta ve kontrol spermeleri mikroskopla sayılarak bir oran bildirilir. Zona pellusidaya bağlanma oranının kontrol spermine kıyasla hasta sperminde daha düşük olması veya hiç bağlanmaması genellikle bir sperm defektine işaret eder (Liu ve ark., 1989).

2.2.2.1.5.3. Akrozom Reaksiyonunun Değerlendirilmesi

Akrozom reaksiyonu, spermin zona pellusidaya bağlanması sonrası oluşan bir süreçtir. Zona pellusida proteinlerine maruz bırakılmış spermle akrozom reaksiyonu değerlendirilebilmektedir (Franken ve ark., 2000; Liu ve Baker, 1994; Liu ve Baker 1996). Fakat insan zona pellusidasının elde edilmesindeki kısıtlılık bu testlerin yapılmasını sınırlandırmaktadır. Floresan veren maddeyle işaretlenmiş lektinler veya bir akrozom antijeni olan CD46'ya karşı oluşan monoklonal antikorlarla akrozom reaksiyonu tetiklenerek, mikroskopi veya akım sitometri yöntemi ile akrozin aktivitesi değerlendirilebilmekte ve akrozomun durumu belirlenebilmektedir (Cooper ve Yeung, 1998; Fenichel ve ark., 1989). Normal akrozom reaksiyonu oosit içine kalsiyum girişi ile başlar. Bu nedenle iyonofor yükleme (ARIC) yöntemi ile oosit içine kalsiyum girişi tetiklenerek, kapasitasyona sahip spermatozoanın akrozom reaksiyonu oluşturma yetisi test edilebilir (Aitken ve ark., 1993).

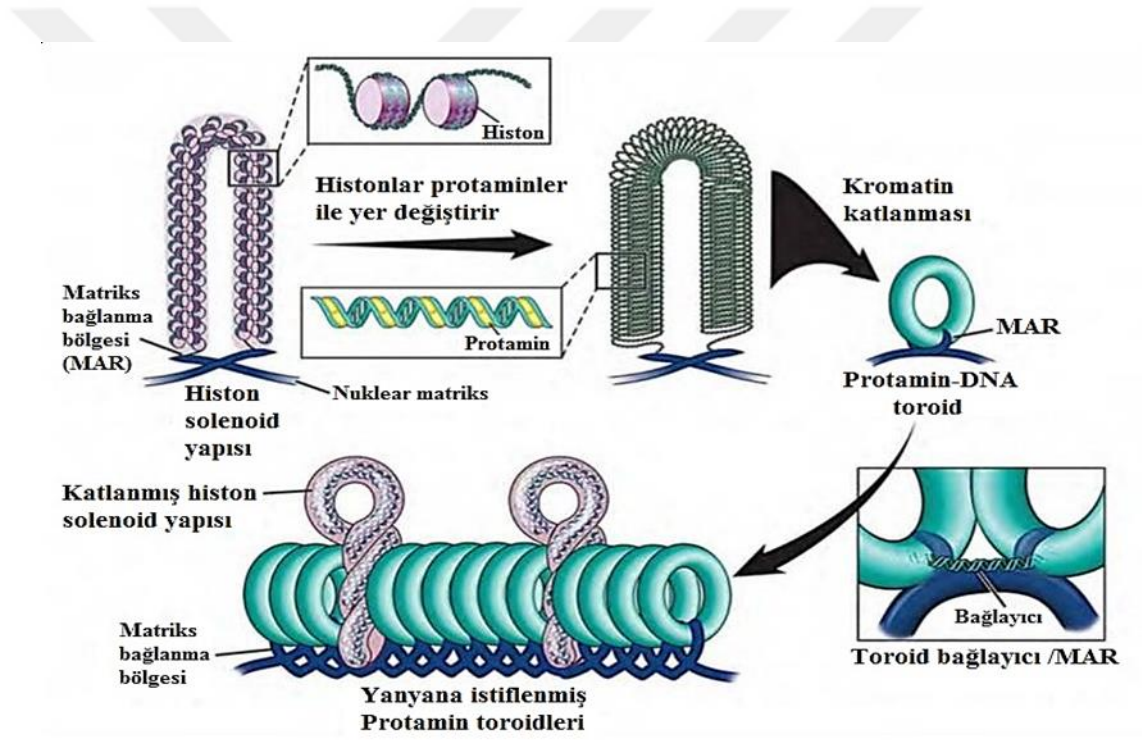
2.2.2.1.5.4. Zonasız-Hamster Oosit Penetrasyon Testi

Zonasız-hamster oosit penetrasyon testinde fertilizasyon kapasitesine sahip spermin gerçekleşmesi için spermin geçirdiği fizyolojik olayların değerlendirilebilmesi amaçlanır. Hamster oosit penetrasyon testinde insan spermeleri zona pellusidasız hamster oositi ile insemine edilir. Bu yöntem ile kapasitasyona sahip sperm başı membranlarının füzyon yetisine ilişkin bilgi elde edinilebilmekle birlikte, sık sık yalancı negatif sonuçlar (hamster oosit testinde başarısız olmalarına rağmen in-vitro ve in-vivo ortamda insan oositlerini başarıyla fertilize eden spermle sahip hastalar) bildirilmiştir (WHO, 1986).

2.2.2.2. Sperm Kromatin ve DNA Yapısının Değerlendirilmesi

Fertilizasyon ve embriyo gelişiminin kısmen sperm DNA bütünlüğü ile ilişkili olduğu anlaşıldığından, son 10 yıldan bu yana açıklanamayan infertilite olgularında erkek faktörünün değerlendirildiği çalışmalar spermin moleküler mekanizması üzerine yoğunlaşmıştır (Agarwal ve ark., 2003; Lewis ve ark., 2013). Sperm DNA'sında histonların yaklaşık %85' inin yerini protaminler alır ve içi

kromatinler ile sıkıca sarılı olan toroid adı verilen yapıları oluşturur. Epididimis içinde, protaminler disülfid çapraz bağlı olarak bulunurlar (Agarwal ve ark., 2003; Esteves, 2014; Şekil 2) ve sperm DNA'sının oosite taşınması sırasında oluşabilecek hasarlara karşı koruyucu görev üstlenirler (Erenpreiss ve ark., 2006). Protaminler ile paketlenme tamamlanamaz ise sperm DNA'sı hasarlanmaya açık hale gelir. Sperm DNA bütünlüğünün bozulması ile sperm DNA fragmentasyonu oluşur. Sperm DNA'sındaki tek zincir kırıkları hasarları oositin sitoplazmasında tamir edilebilmektedir. Ancak bu mekanizma DNA'nın çift zincirinde oluşan hasarlarda etkin değildir. DNA hasarı sitoplazma onarım eşiğini aştığında infertilite sebebi olabilir (Evenson ve ark., 1999).

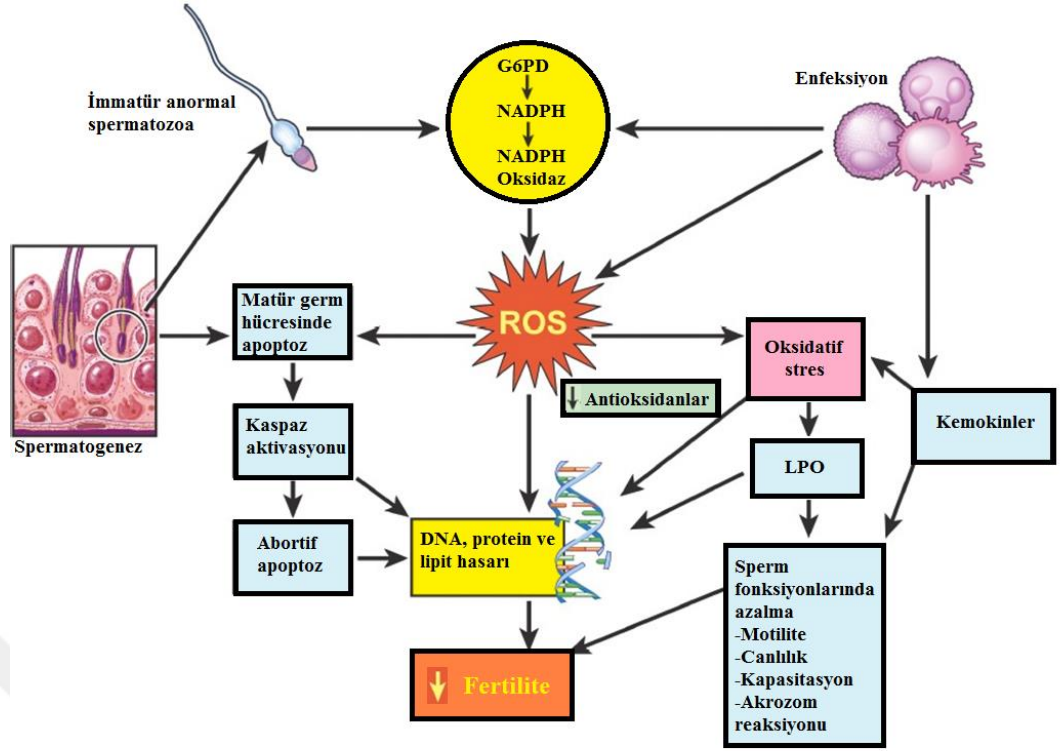


Şekil 2. Sperm DNA yapılanması (Esteves, 2014).

Sperm DNA fragmentasyonunun etiyolojisi çok faktörlüdür. Spermatogenez sırasında anormal kromatin paketlenmesi ve/veya yeniden düzenlenmesi, aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve/veya seminal antioksidanların azalması sperm DNA'sında hasarlara yol açmaktadır (Gosálvez ve ark., 2015; Moustafa ve ark., 2004; Sakkas ve ark., 2002; Shamsi ve ark., 2008; Shamsi ve ark., 2010; Venkatesh ve ark., 2009;). Hücreler süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksit radikalleri

ve nitrik oksit gibi ROS'lara karşı enzimatik ve non-enzimatik savunma mekanizmalarına sahiptir. Ancak ROS miktarının artması membran ve sperm kromatin bütünlüğünü etkileyerek DNA zincir kopmalarına ve spermatid aşamasında eksik protaminasyona neden olur (Cocuzza ve ark., 2007; Venkatesh ve ark., 2009, Şekil 3).

Sperm DNA hasarlarının ikinci nedeni, ejakulattaki spermilerin apoptotik aktivasyonudur. Apoptoz, germ hücre sayısını spermatogenezde rol oynayan Sertoli hücrelerinin kapasitesi ile dengede tutan programlı bir hücre ölümüdür (Sinha Hikim ve ark., 1999). Bu nedenle, apoptoz programlanmasında bozukluk oluşması semende anormal spermatozoa varlığına yol açar (Barroso ve ark., 2000; Sakkas ve ark., 1999; Sakkas ve ark., 2002). Somatik ve testiküler germ hücrelerinin aksine, ejakulattaki sperm hücrelerinde apoptozun oluşum nedeni tartışmalıdır (Oehninger ve ark., 2003). Ejakulatta bulunan spermier incelendiğinde, gözlenen apoptotik aktivasyon somatik hücrelerde görülen programlı hücre ölümü gibi sağlıklı bir süreç olabileceği gibi, spermatogenez sırasında gelişen anormal spermierin ortadan kaldırılabilmesi için gerçekleşen abortif apoptoz sürecinin yetersizliğinin bir sonucu olabilir (Sakkas ve ark., 1999; Sakkas ve ark., 2002; Taylor ve ark., 2004). Ayrıca çevresel toksinler, ilaçlar, kemoterapi, radyoterapi ve sigara dumanına mazur kalma, ateşli hastalıklar ve varikosel gibi hastalıklar ve ileri yaş sperm DNA fragmentasyonu oranını arttıran diğer faktörlerdir (Rubes ve ark., 2005; Sharma ve ark., 2013; Sharma ve ark., 2016) (Şekil 3).



Şekil 3. Sperm DNA hasarına yol açan etmenler (Agarwal ve ark., 2011)

American Urological Association (AUA) ve European Association of Urology (EAU)'nın son kılavuzlarında sperm DNA fragmentasyonunun erkek infertilitesi ile ilişkisine yer verilmiş olup, son yıllarda erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde sıklıkla göz önünde bulundurulmaktadır (Dohle ve ark., 2012; Jarow ve ark., 2011). Sperm DNA fragmentasyonunun belirlenmesine yönelik, histon (anilin blue) veya nükleik aside bağlanan boyaların (akridin orange, kromomisin) kullanıldığı histolojik veya akım sitometrik yöntemler, terminal TdT-aracılı dUTP-terminal uç işaretlemesi (TUNEL), kuyruk analizleri (COMET) veya spermde kromatin dağılımı (SCD) testi gibi rutin kullanıma uygun çok sayıda test mevcuttur (Tablo 2). Bu testlerin farklı klinik olgulardaki spesifik faydası ile ilgili bilgilerimiz henüz yetersiz olmakla birlikte, DNA fragmentasyon testi için özel endikasyonları tanımlayan araştırmalar devam etmektedir (Esteves ve ark., 2015a ve 2015b; Zidi-Jrah ve ark., 2016).

Tablo 2. Sperm DNA Fragmentasyonunu belirlemede kullanılan testler (Agarwal ve ark., 2016).

Testin adı	Prensibi	Avantajları	Dezavantajları
Acridine orange (AO) test	AO, nükleik asitlere seçici olarak bağlanan bir boyadır. DNA tek iplik ya da çift iplik kırıklarının floresan mikroskobunda görüntülenmesini sağlar. AO çift ipliğe bağlandığında eksitasyon: 502 nm ve emisyon: 525 nm'de ışımaya yaparak yeşil renk görüntü verir. Tek ipliğe bağlandığında ise eksitasyon: 460 nm ve emisyon: 650 nm'de ışımaya yaparak kırmızı renk görüntü verir. Böylece DNA'da oluşan kırıkların tipi belirlenebilir.	Hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir.	Mikroskopta değerlendiren kişiye göre verilerde farklılık olabilir. Bu nedenle birbirinden bağımsız birden fazla kişinin değerlendirme yapması güvenilirliği artırır.
Aniline blue (AB) boyaması	AB olgunlaşmamış spermelerde lizince zengin histonlara yüksek hassasiyetle bağlanan asidik bir boyadır. Olgun spermatozoanın yüksek oranda protamin içeren nükleusu ise arjinin ve sistein içerir ve AB ile boyanmaz. Spermde AB boyamasının yüksek olması kromatinin düzgün şekilde paketlenmediğini gösterir.	Hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir.	Mikroskopta değerlendiren kişiye göre verilerde farklılık olabilir. Bu nedenle birbirinden bağımsız birden fazla kişinin değerlendirme yapması güvenilirliği artırır.
Chromomycin A3 (CMA3) boyaması	CMA3 guanin-sitozin spesifik bir floresan boyadır ve DNA'da protaminler ile aynı bölgelere bağlanır. Bu nedenle CMA3 boyaması yüksek oranda pozitif olduğunda DNA'ya protamin bağlanma oranının düşük olduğunu, dolayısıyla sperm kromatinin düzgün şekilde paketlenmediğini ifade eder.	Diğer yöntemlerle korelasyon gösteren güvenilir veriler elde edilir.	Mikroskopta değerlendiren kişiye göre verilerde farklılık olabilir. Bu nedenle birbirinden bağımsız birden fazla kişinin değerlendirme yapması güvenilirliği artırır.
Toluidine blue (TB) boyama	TB thiazin metakromatik bir boyadır ve sperm DNA'sındaki fosfat rezidüvlerine bağlanır. TB boyası hasarlı kromatin yapısı içerisine yoğun şekilde yerleşir ve ışık mikroskobunda menekşe mavisi bir görüntü oluşturur.	Hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir.	Mikroskopta değerlendiren kişiye göre verilerde farklılık olabilir. Bu nedenle birbirinden bağımsız birden fazla kişinin değerlendirme yapması güvenilirliği artırır.
Terminal deoxynucleotidyl transferase (dUTP) nick end labeling (TUNEL) analizi	dUTP'nin enzimatik olarak kırık DNA'nın serbest 3'OH uçlarına bağlanarak görüntülenmesini sağlar. Bu yöntem hem ışık hem de floresan mikroskobunda değerlendirme yapmaya elverişlidir. Ayrıca DNA kırıklarına dUTP bağlanması sonucu elde edilen ışımaya akım sitometri cihazında kantitatif olarak belirlenebilmektedir.	Hassas ve güvenilir bir yöntemdir. Değerlendiren kişiye göre farklı veri elde etme oranı oldukça düşüktür. Analiz az sayıda sperm örneği ile de gerçekleştirilebilir.	Güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için laboratuvarlar arasında standardizasyon yapılması gereklidir.
SCSA	Sperm DNA'sının ısı veya asidik ortama maruz kaldığında denatürasyona uğrama oranını kantitatif olarak ölçer. AO testinin akım sitometrik versiyonudur.	Sperm DNA hasarı yüzdesi ile ilgili güvenilir veri elde edilir.	Pahalı bir cihaz olan akım sitometri cihazına ve bu cihazın kullanımı konusunda deneyimli teknisyenlere gereksinim vardır.
SCD veya HALO testi	Parçalanmış DNA'lı spermde, asit denatürasyonundan ve nükleer proteinlerin uzaklaştırılmasından sonra, parçalanmamış DNA'lı spermde gözlemlenen dağınık DNA döngülerinin karakteristik bir özelliği olan halkasal görüntü oluşmaz. Denatürasyon sonucu	Basit bir testtir.	Mikroskopta değerlendiren kişiye göre verilerde farklılık olabilir. Bu nedenle birbirinden bağımsız birden fazla kişinin değerlendirme yapması güvenilirliği artırır.

	oluşan DNA fragmanları ışık ve floresan mikroskobunda görüntülenerek değerlendirilir.		arttırır.
SCGE veya COMET analizi	Parçalanmış DNA fragmanlarının elektroforez ile değerlendirilmesine dayanır. Kuyruk şeklinde oluşan DNA fragmanları floresan mikroskobunda görüntülenir.	Hassas ve güvenilir bir yöntemdir. Analiz az sayıda sperm örneği ile de gerçekleştirilebilir.	Mikroskopta değerlendiren kişiye göre verilerde farklılık olabilir. Bu nedenle birbirinden bağımsız birden fazla kişinin değerlendirme yapması güvenilirliği arttırır.

2.3.Nedeni Açıklanamayan İnfertilite

Kasım 2011’de yayınlanan Türkiye Sağlık Uygulama Tebliği’nde hem erkek hem de kadının tetkiklerinin normal olmasına ve gonadotropinlerle en az iki kez ovulasyon indüksiyonu ve intrauterin inseminasyon (OI+IUI) uygulanmasına rağmen, evlilik tarihinden itibaren 3 yıl veya daha uzun süreli gebe kalamama hali açıklanamayan infertilite olarak tanımlanmaktadır (www.sgk.gov.tr). İnfertilite olgularının yaklaşık %15’i kadın ve erkeğe ait infertilite sebebi olabilecek bir patoloji saptanmamasına rağmen, açıklanamayan başka faktörlerden dolayı konvansiyonel gebeliğin gerçekleşmediği hastalardan oluşmaktadır (Hamada ve ark., 2011).

Nedeni açıklanamayan erkek infertilitesinin antisperm antikorlarının varlığı, sperm DNA hasarı, ROS ve sperm disfonksiyonu gibi faktörlerin varlığı sonucu olabileceğine dair görüşler mevcuttur (Hamada ve ark., 2012). Ayrıca cinsel ilişkinin uygun olmayan zamanlaması, erektil disfonksiyon veya anejakulasyon gibi koital faktörlerin de açıklanamayan erkek infertilitesine yol açan etmenler arasında olabileceği düşünülmektedir. Bu olgularda infertilite sebebinin anlaşılabilmesi için; ayrıntılı bir cinsel öykü alınarak jinekolojik muayenenin yapılması gerekmektedir. Ayrıca otoimmün infertilite ve sperm kusurlarını test eden ileri tetkikler gerçekleştirilerek kapsamlı bir başlangıç değerlendirmesinin yapılması önem taşımaktadır (Hamada ve ark., 2012).

2.4. Üremeye Yardımcı Tedavi Teknikleri

ÜYT ovaryan foliküllerden aspire edilen oositler ile ejakulattan veya cerrahi yollar ile elde edilen spermilerin laboratuvar ortamında bir araya getirilmesi, fertilizasyonu ve in vitro kültür şartlarında gelişimini takiben, embriyoların intrauterin kaviteye transferinin gerçekleştirildiği bir tedavi sürecidir. Günümüzde ÜYT teknolojisi tubal ve peritoneal kusurlar, endometriyozis, over yetmezliği, erkek faktörlü infertilite ve açıklanamayan infertilite gibi pek çok olgunun tedavisinde uygulanmaktadır.

Günümüzde sıklıkla uygulanan ÜYT uygulamaları; IUI, IVF ve ICSI'dir.

2.4.1. İntrauterin İnseminasyon (IUI)

Spermin internal servikal os hizasından daha yukarıya enjekte edilmesi işlemine IUI adı verilmektedir. Bu yöntem ile vajinal asidite ve servikal mukus bariyeri gibi faktörlerin ortadan kaldırılması, hareketli ve normal morfolojiye sahip spermilerin oosite yakın mesafeye yerleştirilmesi hedeflenmektedir.

IUI, infertilite tedavisinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Erkek faktörü, servikal faktör, ovulatuvar disfonksiyon, endometriyozis, immünolojik nedenler ve açıklanamayan infertilite olgularında ve çeşitli ejakulatuvar ve koital sorunların tedavisinde IUI uygulanabilmektedir (Duran ve ark., 2002; Lambalk ve ark., 2006; Zikopoulos ve ark., 2005). Kasım 2011'de yayınlanan Türkiye Sağlık Uygulama Tebliği'ne göre açıklanamayan infertilite olgularında öncelikle gonadotropinlerle "OI+IUI" tedavisi uygulanmaktadır. En az iki deneme gonadotropinlerle "OI+IUI" tedavisi sonrası gebelik elde edilemediği durumda IVF tedavisi gerçekleştirilmektedir (www.sgk.gov.tr).

IUI gibi ÜYT protokollerinde infertiliteye yol açan doğal engeller atlandığı halde, seminal plazmada bulunan prostaglandinler, antijenik proteinler ve çinko gibi bileşenler uterus aktivitesini arttırarak ve enfeksiyon riski oluşturarak gebeliğin gerçekleşmesini engelleyebilmektedir. Bu nedenle IUI'da ejakulattaki spermatozoidler seminal sıvıdan ayrılarak, hücre döküntüleri, germ hücresi dışındaki hücreler ve ölü spermilerden arınmış, morfolojik olarak normal ve hareketli hücreler

elde etmek hedeflenmektedir. Bu amaçla 3 farklı yöntemle sperm hazırlığı yapılabilmektedir (Alexander ve ark., 1982; Cohlen ve ark., 2005; Loy ve ark., 1990; Sarıdoğan 1991).

1. Taze ejakulat: Taze semen likefaksiyon sonrası 2 saat içinde kullanılır.
2. Split ejakulat: Ejakulasyonun ilk gelen birkaç damlasına split ejakulat adı verilmektedir. Split ejakulat kullanımı ile semen konsantre edilmiş ve kısmen de seminal plazmadan arındırılmış olmaktadır. Split ejakulat hastaların % 95'inde tüm ejakulattaki spermatozoidlerin %80'ini ihtiva eder ve ayrıca prostoglandin miktarı da daha azdır. Ancak hastaların %5'inde tam tersi de gözlenebilmektedir. Bu nedenle sperm hastaya verilmeden önce mikroskop altında incelenmelidir. Ejakulasyon hacmi 3mL'den fazla ise split ejakulat kullanılabilir.
3. Hazırlanmış semen: IUI için normozoospermik numuneler elde etme amacıyla semeni kültür medyumuyla seyreltmek ve santrifüjleme yöntemleri kullanılmaktadır (Boomsma ve ark., 2004). Semen parametrelerinin biri veya birkaçı anormal olan numunelerde dansite gradient santrifüjlemesi ve doğrudan yüzdürme (swim-up) yöntemi tercih edilmektedir (Morshedi ve ark., 2003).

2.4.4. İn-vitro Fertilizasyon (IVF)

IVF, fertilizasyon işleminin invitro şartlarda laboratuvar ortamında, özel kültür ortamında gerçekleşmesi işlemidir. Bu tedavi yönteminde, kontrollü ovaryan stimülasyon ile foliküllerin olgunlaşması sağlanır. Foliküllerde olgunlaşan oositler cerrahi yöntemle toplanır ve invitro ortamda fertilizasyon gerçekleştirilir. Fertilizasyon sonucu gelişen embriyo uterusu transfer edilir. Transferin başarısı gebelik testi ile analiz edilir.

- Kontrollü ovaryan stimülasyon: Foliküllerin gelişimini başlatmak için Klomifen sitrat, gonadotropinler veya aromataz inhibitörleri gibi ilaçlar kullanılarak kontrollü hiperstimülasyon uygulanmaktadır. Bu uygulama ile çok sayıda follikülün gelişmesi ve iyi kalitede matür oosit elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Ovaryan stimölasyonda hangi yöntemin kullanılacağına kadının bireysel özellikleri, yaşı ve gonadotropin (GnRH) düzeyi gibi endokrinolojik özelliklerine bakılarak karar verilmektedir (Speroff ve ark., 2005). Foliküllerin gelişimi serum östradiol (E2) düzeyinin analizi ve ultrasonografik görüntüleme ile takip edilmektedir. Normal ovaryan döngüde siklus ortasında serum E2 düzeyi 200–400 pg/ ml olarak kabul edilmektedir. Ancak, ovulasyon ve gebelik şansının arttırılabilmesi için indüksiyon tedavisi ile serum E2 düzeyi 500-1000 pg/mL seviyesine yükseltilmektedir (Collins, 1991). Yapılan araştırmalar uyarılmış sikluslarda folikül gelişimi ile serum E2 düzeyi arasında doğrusal bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Hull ve ark., 1986; Tulandi ve ark., 1987).

- Oositlerin toplanması: Ovaryan stimölasyon sonrası, en büyüğü 18-19 mm olmak üzere en az üç tane 16-18 mm büyüklüğünde folikül geliştiğinde ovulasyonu tetiklemek amacıyla kadına Korionik Gonadotropin (hCG) enjekte edilir. hCG foliküldeki oositin normal gelişimini destekleyen ve ovulasyon sırasında oositin salınmasını uyarıcı bir hormondur. hCG enjeksiyonunu takiben, 34-36 saat sonra folikül aspirasyonu (oocyte pick-up; OPU) gerçekleştirilmektedir. Folikül sıvısı ve içindeki kumulus-oosit-korona kompleksi ultrasonografi eşliğinde, anestezi altında, transvajinal yolla toplanmaktadır (Van Os ve ark., 1992).
- Oosit kültürü ve invitro fertilizasyon: Oosit toplama işlemi esnasında kadının partnerinden mastürbasyon yoluyla ejakulat toplanır. Rutin semen analizi yapılarak toplanan spermilerin sayısı, motilitesi ve morfolojisi değerlendirilir. Semen parametreleri dikkate alınarak ejakulat uygun metotla yıkanır ve inseminasyon için hazırlanır. Fertilizasyon için, I. mayoz bölünmesini tamamlamış, metafaz II aşamasındaki sekonder oositler ile, oosit başına 20.000 progressif hareketli sperm denk gelecek şekilde, kültür ortamında inseminasyon yapılır. Embriyo kültürü 37°C’de, %98 nemli ortamda, %5 CO₂ ve %5 O₂’li ortamda gerçekleştirilir. İnkübasyondan 16-18 saat sonra mikroskopik değerlendirme yapılır. Erkek ve dişi pronukleusların varlığı fertilizasyonun kanıtıdır. Erkek faktörü varlığında ya da nedeni açıklanamayan infertilite

olgularında IVF yerine ICSI tercih edilmektedir (Karamahmutoglu ve ark; 2014, Cissen ve ark. 2016).

- Embriyo kültürü ve transferi: Fertilizasyon gerçekleşikten sonra embriyo kültürü uygulanır. Pronüklear aşamadan blastosist aşamasına kadar embriyo kültürü yapılır. Embriyoner gelişimin 3. (klivaj aşaması) veya 5. günü (blastosist aşaması) embriyo transferi gerçekleştirilir. Transfer için morfolojik değerlendirme sonucunda en iyi kalitede embriyo seçilir.

2.4.3. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)

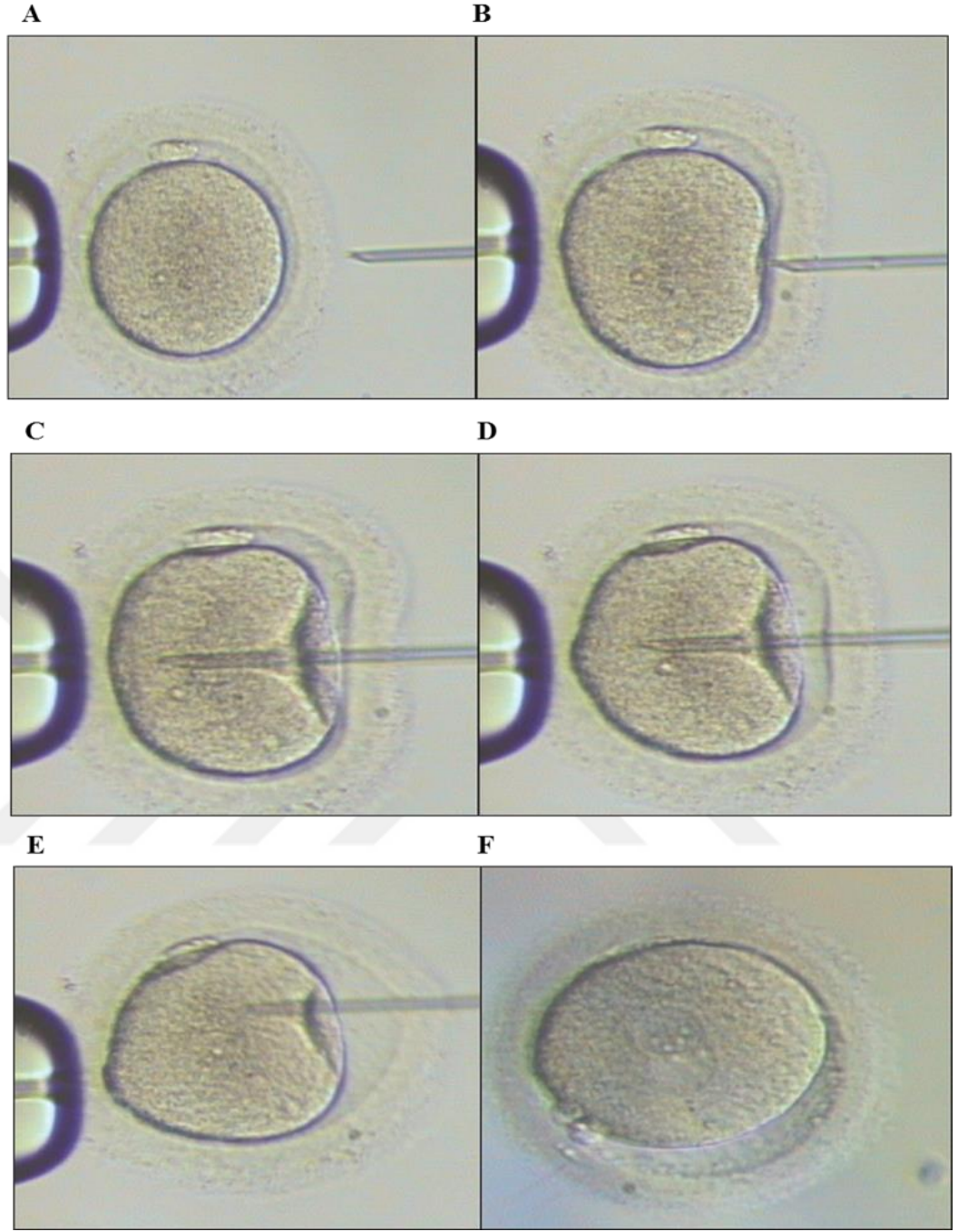
Sperm parametreleri düşük olan olgularda, motilitenin yetersizliği, anormal kapasitasyon ve/veya akrozom reaksiyonunun bir sonucu olarak spermin zona pellucidaya penetrasyonu gerçekleşmediğinden fertilizasyon başarısızlıkla sonuçlanır. Özellikle oligoasthenoteratozoospermi (OAT) olgularında IVF uygulamaları sırasında zona pellucida fertilizasyona engel oluşturduğundan, olgular bu yöntemden yeterince yarar sağlayamamaktadır. Bu nedenle erkek faktörüne bağlı infertilite olgularında ve/veya zona pellucida ve oolemma seviyesindeki gamet etkileşimi bozukluklarının gözlemlendiği olgularda ICSI yöntemi kullanılarak, tek bir spermin zona bariyerini aşarak oosit içine mekanik olarak enjekte edilmesi fertilizasyon başarısını önemli oranda arttırmaktadır (Palermo ve ark., 2009).

ICSI uygulanan olgularda, IVF prosedürü ile benzer şekilde follikül stimülasyonu uygulanır ve folliküllerin büyümesinin ardından oositler toplanır (Palermo ve ark., 2009). Oosit toplama işlemi sırasında erkekten ejakulat alınır ve rutin semen analizi ile sperm sayısı, morfolojisi ve hareketliliği değerlendirilir. Semen parametrelerine göre, seçilen ejakulata yıkama prosedürü uygulanır (Palermo ve ark., 2009). Rutin semen analizine göre sperm sayısının yetersiz olduğu ya da semende canlı sperm belirlenemeyen olgularda perkütan epididimal sperm aspirasyonu (PESA) ile epididimisten, testis sperm aspirasyonu (TESA) veya mikrocerrahi yöntemiyle testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile testisten sperm toplanır (Alrabeeh ve ark., 2014; Ketabchi, 2016; Park ve ark., 2015).

IVF yönteminde oosite yakın yerleştirilen 20.000 progressif hareketli spermden birisi doğal seleksiyon ile oositi döllerken, ICSI yönteminde spermin doğal seçim süreci atlanır ve sperm embriyolog tarafından seçilerek ooplazma içine

mekanik olarak yerleştirilir (Çolgar, 2006; Palermo ve ark., 2009). Mikroenjeksiyon I. mayoz bölünmesini tamamlamış, metafaz II aşamasındaki sekonder oositlere uygulanır.

ICSI işlemi, mikromanipülatör ve inverted mikroskop kullanımı ile gerçekleştirilir. Oosit cam tutucu mikropipetle sabit tutulur. Spermi taşıyan cam enjeksiyon mikropipetin, oosit içindeki mitoz mekiğine zarar vermesini önlemek amacıyla, oositin kutup cisimciği saat 12 veya 6 hizasında konumlandırılır (Şekil 4A). Cam enjeksiyon mikropipeti yardımıyla morfolojisi ve motilitesi dikkate alınarak seçilen spermin kuyruğu kırılır. Bu işlem kuyruk üzerine mekanik basınç uygulamasıyla gerçekleştirilir. Sperm kuyruğu, ooplazma içine enjekte edildiğinde hareket etmesini engellemek ve ooplazmik aktivasyonu gerçekleştirmek amacıyla kırılır. Bu aşamanın ardından mikroenjeksiyon pipeti içine çekilen sperm ooplazma içine enjekte edilir (Şekil 4B-4E). Fertilizasyon işlemi tamamlandıktan sonra oosit hücre kültür solüsyonuna alınarak 37°C'de %5 CO₂'li etüve alınır. 12-17 saat inkübasyon süresi sonunda erkek ve dişi pronükleus varlığına bakılarak fertilizasyon kontrol edilir (Gardner ve ark., 2004) (Şekil 4E).



Şekil 4. ICSI. A. Oosit tutucu pipeti (solda) ve sperm enjeksiyon pipetinin (sağda) ICSI için hazırlanması. **B–D.** Spermin ooplazmaya enjeksiyonu **E.** Sperm enjeksiyon pipetinin oositten geri çekilmesi. **F.** Fertilizasyon işleminden 12–17 saat sonra gözlenen 2 pronükleuslu ve 2 kutup cisimcikli zigot (Merchant ve ark., 2011).

2.5. Sperm Kalitesinin Arttırılması

Yaklaşık 20 infertilite olgusundan birinde erkek infertilitesi gözlenir ve erkek infertilitesinden etkilenen olguların ancak yarısında ÜYT'den yarar sağlanabilmektedir (McLachlan, 2013). Açıklanamayan infertilite olgularında ÜYT başarısının arttırılabilmesinde sperm kalitesinin arttırılması önemli rol oynamaktadır (Zinaman ve ark., 2000). Yapılan araştırmalar sperm DNA hasarlarının erkek faktörlü infertilitedeki olumsuz etkilerini ortaya koymuştur. Bu nedenle, açıklanamayan infertilite olgularında sağlıklı bir fertilizasyon ve embriyo gelişimi için ÜYT'de kullanılacak spermlerden DNA hasarı taşıyanların uzaklaştırılması ve fertilizasyonun genomik açıdan sağlıklı olan spermeler seçilerek gerçekleştirilmesi önem taşımaktadır (Bucar ve ark., 2015; Chi ve ark., 2016). Sağlıklı bir fertilizasyon ve embriyo gelişimi için sperm DNA fragmentasyon indeksi (DFİ) nin $\leq$ %22 olması gereklidir (Bungum ve ark., 2007). Bu değerden daha yüksek olan DFİ'nin gebelik ve canlı doğum oranları ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Bungum ve ark., 2007). Bu amaçla çeşitli sperm hazırlama teknikleri geliştirilmiştir.

2.5.1. Klasik Sperm Seçim Yöntemleri

En yaygın kullanılanları standart sperm yıkama teknikleri, swim-up ve DGS'dür. Standart sperm yıkama yöntemlerinde santrifüj ile semen örneğinden seminal plazma uzaklaştırılır. Ancak bu yöntemler DNA hasarı taşıyan spermelerin uzaklaştırılmasında yetersiz kalmaktadır (Kishi ve ark., 2015).

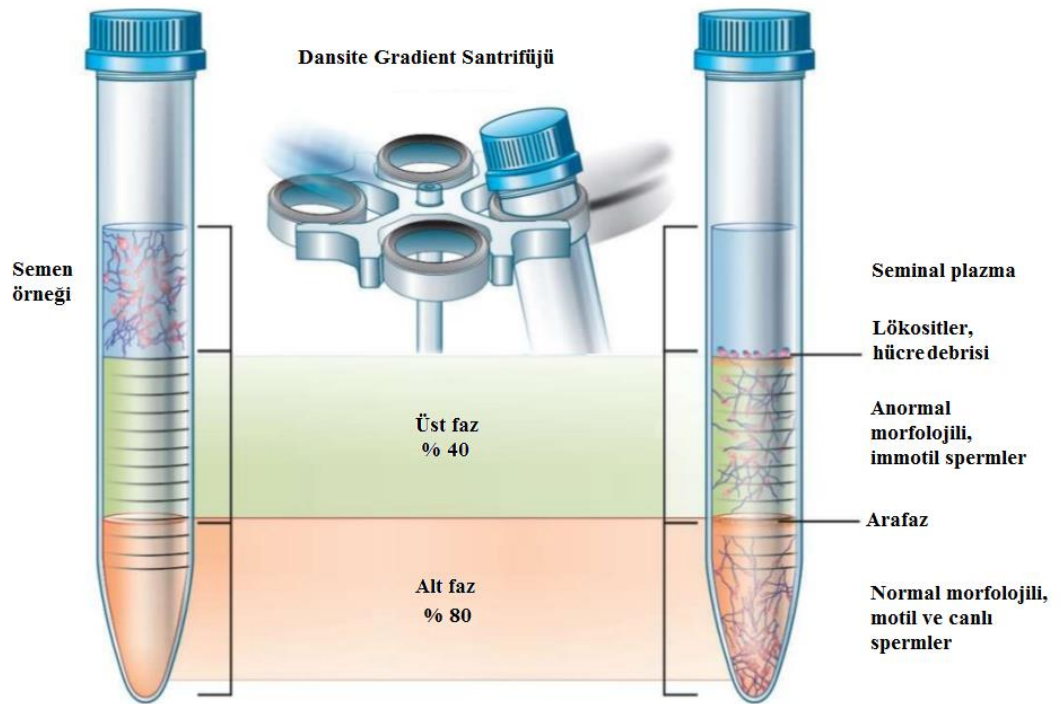
2.5.1.1. Swim-up

Swim-up tekniğinde motil spermeler medyumun altından üstüne doğru hareket ederek motil olmayan spermelerden ve semen debrisinden ayrılırlar. Ejakulatta motil sperm sayısı $>50-60$ milyon ve/veya örnek visköz değilse swim-up yöntemi uygulanmaktadır.

2.5.1.2. Dansite Gradient Santrifüjü

DGS ile sperm hazırlama yönteminde sperm hücreleri yoğunluk santrifüjleme esasına dayalı olarak dansitelerine göre ayrılır. Morfolojik olarak normal ve anormal olan spermelerin dansiteleri birbirinden farklıdır. Normal morfolojiye sahip matür bir

spermin dansitesi $\geq 1,10$ g/mL iken, normal morfolojiye sahip olmayan ve immatür spermin dansitesi 1,06 g/mL ile 1,09 g/mL arasındadır. Oligozoospermi, teratozoospermi, astenozoospermi vakalarında sperm hazırlama yöntemi olarak DGS tercih edilmektedir (Karamahmutoğlu ve ark., 2014; Ricci ve ark., 2009). DGS işlemi için ejakulat örneği silan kaplı, kolloidal silika parçacıkları içeren bikarbonat ve HEPES tamponlu medyum ile yıkanır. Solüsyon santrifüj tüpüne doldurulur ve örnek tüplerinin dikey pozisyonunda kaldığı dikey rotora sahip bir ultrasantrifüjde döndürülür. Santrifüj işlemi sırasında ejakulatta bulunan her sperm hücresi kendi dansitesine uygun gradient düzeyine yerleşir. DGS tamamlandığında, normal morfolojiye sahip, motil ve canlı sperm hücreleri %80'lik alt fazda, anormal morfolojili, düşük motiliteli ve immotil sperm hücreleri %40'lık üst fazda yer alır. %40'lık üst faz ile seminal plazma arasında kalan ara faz ise lökositleri ve hücre debrisini içerir (Allamaneni ve ark., 2005; Beydola ve ark., 2013; Elkreem, 2016; Temizkan ve ark., 2012) (Şekil 5). DGS ile sperm eldesinin avantajları ve dezavantajları Tablo 3'te gösterilmektedir.



Şekil 5. Semen örneğinden kaliteli spermlerin DGS ile toplanması (Abd-Elkreem, 2016)

Tablo 3. DGS yöntemi ile sperm elde etmenin avantaj ve dezavantajları

Avantajlar	Dezavantajlar
Çok sayıda temiz motil sperm elde edilir. Sperm konsantrasyonu düşük örneklerden de sperm eldesi sağlanır. Yüksek verimlilikle sperm elde edilir. Ejakulattaki sperm dışı debris ve hücreler elimine edilir. Reaktif oksijen radikalleri azalır. Standardizasyonu kolaydır. Kronik viral hastalıklarda diğer yöntemlerden daha etkindir. DNA fragmentasyonuna sahip sperm oranını azaltır.	Pahalı bir yöntemdir. Endotoksinler risk oluşturur. Uzun ve zahmetli bir yöntemdir.

Bazı olgularda, daha yüksek kaliteli sperm elde edebilmek için swim-up ve DGS yönteminin birlikte kullanılması tercih edilmektedir (Semprini ve ark., 1992). Swim-up ve DGS'nin birlikte kullanımı sayesinde, spermin morfoloji ve motilite özelliklerine göre ayırım sağlanabildiği, bunun yanında bu kullanımın DNA hasarı olan spermlerin uzaklaştırılmasında etkin bir yöntem olduğu rapor edilmiştir. (Ghumman ve ark., 2011; Jayaraman ve ark., 2012). Swim-up ve DGS'nin birlikte kullanımının, yalnız DGS uygulamasına kıyasla sperm DNA kalitesi açısından bir üstünlük göstermediğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. (Kim ve ark., 2015; Luppi ve ark., 2015).

2.5.2. Gelişmiş Sperm Seçim Yöntemleri

Son yıllarda, sağlıklı sperm seçiminde swim-up ve DGS yönteminin yetersiz kaldığı olgularda, spermin membran maturitesinin, yüzey yükünün, ultramorfolojisinin, apoptotik özelliklerinin ve DNA bütünlüğünün temel alındığı sperm ayırım yöntemleri geliştirilmiştir.

2.5.2.1. Hyaluronik Asit Bağlanma Yöntemi

Sperm membran maturitesi temel alınarak gerçekleştirilen ayırım yönteminde sperm plazma membranında hyaluronik asit (HA) bağlanma bölgesinin varlığından yararlanılır (Huszar ve ark., 1997). Bu yöntemde "PICSI dish" adı verilen kapta yer alan HA'nın sabitlendiği 4 işaretli kuyucuğun kenarına birer damla sperm örneği damlatılır ve HA'ye bağlanan sperm enjeksiyon pipeti ile toplanarak ayrılır (Jakab ve ark., 2005). Bu yöntem yüksek spesifikiteye sahip olsa da sperm bağlanmasından

önce hazırlık aşamalarında fazla zamana ihtiyaç duyulabilmekte ve elde edilen sperm sayısı mikroenjeksiyon yapılacak oosit sayısı fazla olduğunda yetersiz olabilmektedir (Huszar ve ark., 2003).

2.5.2.2. Elektroforetik Yöntemler

Elektroforetik yöntemler sperm yüzey yükünün temel alındığı yöntemlerdir. Normal farklılaşmış spermelerde bulunan CD52 antijeni sperm yüzeyinde bir elektronegatif yüzey yükü oluşturmaktadır. Bu sayede normal spermeler, yüzey yüküne bağlı olarak elektroforetik yöntemlerle ayrılabilir (Schröter ve ark., 1999). Sperm hazırlamada kullanılan elektroforetik yöntemler;

Mikrofluidik yöntem: Bu yöntem ile sperm hücrelerinin elektronegatif yüzey yüküne dayalı olarak yüksek kaliteli spermelerin ayırımı sağlanabilmektedir (Schröter ve ark., 1999). Mikrofluidik yöntem lökositlerin de uzaklaştırılmasını sağladığından spermelerin izole bir şekilde elde edilebilmesini sağlar (Giuliani ve ark., 2014).

Zeta (elektrokinetik) potansiyeline dayalı ayırım: Zeta potansiyeli matür bir sperm için -16 ila -20 mV olup, kapasitasyon ile birlikte azalmaktadır (Della Giovampaola ve ark., 2001; Ishijima ve ark., 1991). Yıkanmış sperm örnekleri pozitif yüklü santrifüj tüpüne alınarak, santrifüj tüpünün yüzeyine tutunmayan hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sonucu zeta potansiyeline dayalı sperm ayırımı gerçekleştirilebilmektedir.

Sperm seçiminde kullanılan elektroforetik yöntemlerde santrifüj basamağı bulunmadığından, sonrasında ROS oluşumu gözlenirse de bu yöntemler sperm motilitesini olumsuz yönde etkilemektedir (Aitken ve ark., 1988, Chan ve ark., 2006).

2.5.2.3. Sperm Ultramorfolojisine Dayalı Ayırım

Sperm ultramorfolojisine dayalı olarak gerçekleştirilen ayırım yönteminde X 630 büyütme altında gerçek-zamanlı olarak motil spermelerde, 6 sperm organelinin (akrozom, postakrozomal lamina, boyun, kuyruk, mitokondriler ve nukleus) morfolojisinin incelenmesi (MSOME) ile normal spermin seçilmesi sağlanmaktadır (Bartoov ve ark., 2002).

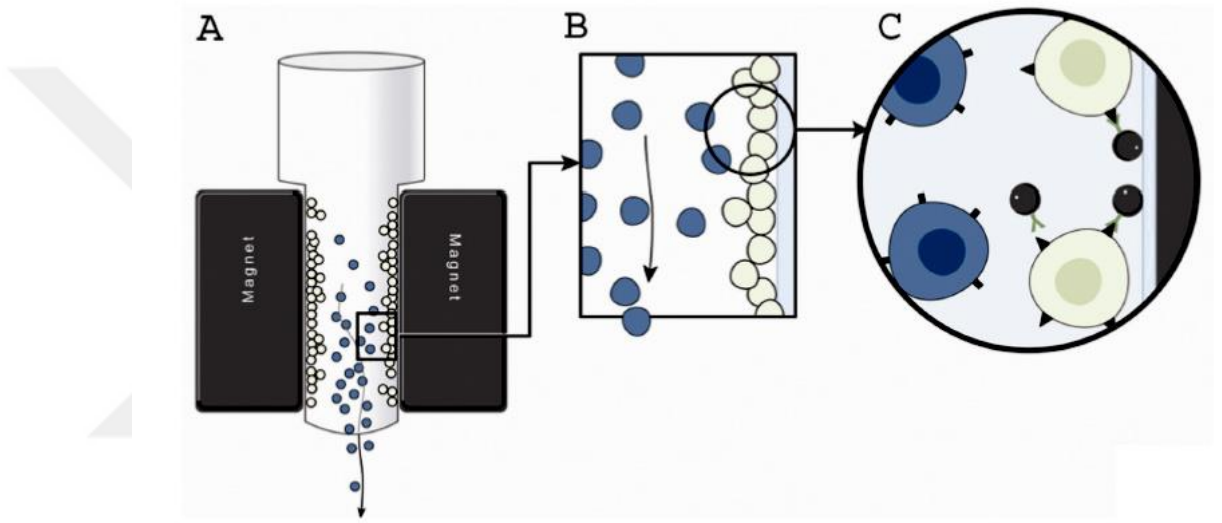
2.5.2.4. Spermin Apoptotik Aktivitesine Dayalı Ayırım

Spermin apoptotik aktivitesinin temel alındığı manyetik aktivasyon ile hücre ayırma (MACS) yöntemi Sağlık Bakanlığının onayı ile ÜYT programlarında kullanılan, hızlı, güvenilir ve invaziv olmayan bir hücre ayırım yöntemidir. Bu yöntem, immünespesifik reaktifler kullanılarak hassas bir şekilde hücre ayırımına olanak sağlar. Ayrılmak istenilen hücrelere spesifik proteinler veya antikörlara konjuge edilmiş magnetik boncuklar kullanılarak, ilgili hücrelerin magnetik olarak işaretlenmesi esasına dayanmaktadır (McCloskey ve ark., 2003).

Erkek faktörüne bağlı infertilite olgularında uygulanan ICSI işleminde fertilizasyon başarısını etkileyen faktörlerden biri hücre DNA bütünlüğü bozulmamış olan sperm hücresinin seçimidir. MACS yöntemi ile yüksek DFİ'ye sahip olan sperm hücreleri yıkanmış semen içinden uzaklaştırılarak DNA kalitesi yüksek sperm elde etmek hedeflenir (Chi ve ark., 2016; Said ve ark., 2006). Hücrenin apoptotik aktivasyonu sürecinde, normalde sperm hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfolipidler arasında olan PS'in yer değiştirerek hücre membranının dış yüzeyine taşınır (Oosterhuis ve ark., 2000; Vermees ve ark., 1995). Annexin V, PS'ye karşı yüksek afiniteye sahip olan, fakat sağlam bir sperm membranından geçme kabiliyetine sahip olmayan bir fosfolipid bağlayıcı proteindir (Van Heerde ve ark., 1995). Annexin V'in sperm membran yüzeyine bağlanması, PS'nin sperm plazma membranının dış yüzeyinde yer aldığı ve hücrenin apoptozise gitmekte olduğunu bir göstergesidir (Glander ve ark., 1999). MACS yöntemi ile Anneksin V kullanılarak apoptotik sperm hücrelerini tanımak (Annexin V- pozitif) ve bu sperm hücrelerinin diğer spermlerden ayrılmasını sağlamak mümkündür.

MACS–Anneksin V yönteminde, apoptotik olan spermatozoa membranının dış yüzeyinde yer alan PS'nin, paramanyetik mikrobilyelerle konjuge edilmiş Annexin V'e bağlanması sağlanır. Böylece Annexin V mikrobilyeleri içeren MACS ile yalnızca apoptoz sinyali veren veya hücre zarı hasarlanmış olan hücreler ayrılır (Glander ve ark., 2002; Grunewald ve ark., 2001 Şekil 6). MACS–Anneksin V yöntemi, sperm dansitesi ve hareketliliğine dayanan rutin sperm değerlendirme parametrelerinden farklı olarak moleküler düzeyde bir ayırım sağlar. IVF uygulamalarında DNA fragmentasyonu içermeyen sperm hücrelerinin ayırt edilmesinde annexin V mikrobilyeleri içeren MACS sisteminin kullanılmasının

kaliteli spermilerin seçilimini arttırdığı ve bu sayede implantasyon ve gebelik oranlarının arttığı çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Lukaszuk ve ark., 2015; Simopoulou ve ark., 2016). MACS yönteminin DGS ile birlikte kullanımının, yalnız DGS uygulamasına kıyasla, spermeleri morfolojik özelliklerinin yanı sıra apoptotik özelliklerine göre de ayrılmasını sağladığından, sperm DNA kalitesi açısından daha etkin bir yöntem olabileceği ifade edilmektedir (Bucar ve ark., 2014; Chi ve ark.,2016)



Şekil 6. MACS–Annexin V yönteminin şematik diagramı. A. Kolonda yer alan semen örneğinde yer alan, dış zarında PS içeren hücreler Annexin V ile konjuge manyetik boncuklarla işaretlenirler. Bu hücreler manyetik boncukların mıknatıs etkisi ile magnete bağlanmaları sayesinde kolonun çeperinde tutunurlar. B. Annexin V (+) hücrelerin kolon çeperinde tutulmasının büyütülmüş bir görüntüsü C. Annexin V ile işaretlenmemiş hücreler kolon çeperinde tutulmadıklarından, kolondan serbestçe akarlar. Böylece apoptotik olmayan sperm hücreleri elde edilmiş olur (Said ve ark; 2008).

IVF sonrası düşük fertilizasyon başarısı gösteren açıklanamayan infertilite olgularında MACS sisteminin sperm preparasyonunda etkinliğini değerlendiren literatürdeki tek çalışma da dansite gradient + MACS uygulamasının apoptotik sperm sayısını anlamlı düzeyde azalttığı rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2010). Adı geçen çalışmada MACS sisteminin ÜYT uygulaması sonrası embriyoloji laboratuvarı sonuçlarına ve klinik sonuçlara etkisi değerlendirilmiştir. Sperm DFİ’ndeki azalmanın ÜYT uygulamalarında ve klinik uygulamalarda faydalı olabileceği yorumunda bulunulmuştur. (Chi ve ark., 2016; Lee ve ark., 2010).

2.5.2.5. DNA Bütünlüğüne Dayalı Ayırım

DNA bütünlüğünün temel alındığı bir sperm ayırım yöntemi olan Mikroçip yönteminde, semende bulunan en hareketli ve sağlıklı spermilerin herhangi bir kimyasal madde kullanmadan ve sperme zarar vermeden ayırımı sağlanır. Mikroçip yöntemi bir giriş ve çıkışı olan, spermin intrauterin ortam, servikal ve vajinal kanal mikroçevresine benzeyen bir mikrokanalın gömülü olduğu, spermin bir gölge görüntüsünü elde edebilen lenssiz ve ışığa duyarlı bir dijital yüzeye yerleştirilmiş bir sistemdir. Bu yöntemde, tüm spermilerin mikrokanal boyunca yüzmesi beklenir ve sperm hareketliliği gerçek zamanlı olarak kayıt altına alınır. Mikroçip kanalı boyunca yüzen en hareketli spermilerin ayrılması sağlanır (Zhang ve ark., 2011). Mikroçip yöntemi sağlıklı, hareketli ve morfolojik olarak normal sperm eldesi için santrifüj temelli yöntemlere alternatif bir tekniktir. Bu teknikle elde edilen sperm örnekleri swim-up yöntemi ile elde edilen sperm örnekleri ile karşılaştırıldığında, mikroçip yöntemi ile elde edilen spermelerde ROS ve DNA fragmentasyon oranının anlamlı ölçüde düşük olduğu gösterilmiştir (Asghar ve ark., 2014).

2.6. Açıklanamayan İnfertilite Olgularında ÜYT Uygulamaları

Açıklanamayan infertilite olgularında semen analizi, tubal açıklık, ovulasyonun laboratuvarında tayini verileri normal olarak değerlendirildiğinden dolayı, bu olgular infertilitenin sebebi açısından heterojen bir grup oluşturmaktadırlar. Bu olgularda ampirik olarak uygulanan bromokriptin, tiroid hormonları, danazol ve antibiyotik tedavilerinden başarılı sonuçlar elde edilememiş olmakla birlikte, kontrollü ovaryan hiperstimülasyonu ile kadın gamet sayısının artırılmasının gebelik potansiyelini arttırabileceğine dair görüşler mevcuttur. Ancak bu olgularda semen parametrelerine yansımaya sahip erkek faktörü de olabileceğinden dolayı, yapılan randomize çalışmalar kontrollü ovaryan hiperstimülasyonunun veya tek başına IUI'nin etkisinin olmadığı ya da sınırdan yarar sağladığını göstermiştir (Çolgar, 2006).

IVF yönteminde fertilizasyonun başarıyla gerçekleşip sağlıklı embriyo gelişebilmesi için oosit başına 20.000 progressif hareketli sperm hazırlanarak laboratuvar ortamında inseminasyon yapılmaktadır. Nedeni açıklanamayan infertilite olgularında bu kadar yüksek miktarda DNA hasarı olmayan sperm elde etmek

oldukça zordur. Yapılan çalışmalarda bu olgularda IVF yönteminden yeterince başarı elde edilememektedir. (Hamada ve ark., 2012; Palermo ve ark., 2009).

Araştırmalar, spermatozoa'daki yüksek DFİ oranlarının IUI ve IVF'de döllemede başarısızlığa yol açtığını ve DFİ yüzdesi yüksek olan açıklanamayan infertilite olgularında en yüksek gebelik başarısının, spermin embriyolog tarafından seçilerek oosite mekanik olarak yerleştirildiği ICSI yönteminden sağlandığını göstermektedir (Hamada ve ark., 2012; Palermo ve ark., 2009).

Açıklanamayan infertilite olgularında ÜYT'nin başarı ile sonuçlanabilmesi için doğru ÜYT protokolünün belirlenmesinin yanısıra, doğru sperm hazırlama tekniğinin uygulanması da önem taşımaktadır. Günümüze kadar çok sayıda sperm hazırlama tekniği geliştirilmiştir. Bu tekniklerin temel amacı; fertilizasyon için zararlı faktörlerin ve uterus kaslarının kasılmasına yol açabilecek prostaglandinlerin uzaklaştırılmasını sağlamak ve sperm konsantrasyonu ve motilitesinin arttırarak sperm kapasitesini yükseltmektir (Mortimer, 1994).

2.7. Çalışmamızın Amacı

Literatürde açıklanamayan infertilite tanısıyla ÜYT uygulamasına alınan hastalarda, aynı hastanın oositlerinin randomizasyonu ile tek başına DG ile MACS+ DG yıkama sonucu elde edilen spermle mikroyenjeksiyonun fertilizasyon, embriyo gelişimi ve implantasyon başarısına etkisini karşılaştıran bir çalışma yoktur.

‘Açıklanamayan infertilite olgularında semen parametreleri normal olan ejakulatta, muhtemel infertilite nedeni olduğu öngörülen DNA fragmentasyonuna sahip spermle MACS sistemi ile eliminasyonu ICSI uygulamalarında fertilizasyon, embriyo gelişimi ve klinik başarı oranını arttırır.’ hipotezinden yola çıkarak bu çalışma planlanmıştır.

Çalışmanın birinci amacı açıklanamayan infertilite ÜYT programına alınan çiftlerde, DGS yönteminin tek başına ve MACS yöntemi ile birlikte kullanımının DNA bütünlüğü korunmuş, kaliteli sperm elde etmedeki başarısının karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir. Böylece, bu olgularda yüksek kaliteli sperm elde etmek için en uygun olan yöntemin belirlenebilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmanın ikinci amacı, IUI ve IVF ile başarı elde edilememiş açıklanamayan infertilite olgularında uygulanan ICSI yönteminde, sperm seçiminin

doğrudan motilite ve morfolojisi değerlendirilerek uygulandığından, morfoloji ile DFİ korelasyonu ve bu spermilerin MACS sistemi ile eliminasyonu sonuçları değerlendirilecektir.

Çalışmanın üçüncü amacı, DGS yönteminin tek başına ve MACS yöntemi ile birlikte kullanımı ile düşük kaliteli spermilerin eliminasyonu sonucu elde edilen DNA bütünlüğü korunmuş spermilerin ICSI yöntemi kullanılarak ooplazma içine enjeksiyonu sonrası laboratuvar perspektifinde fertilizasyon ve embriyo gelişimsel potansiyeline etkisinin ve klinik perspektifle implantasyon başarısındaki rolünün değerlendirmesidir. Böylece tek başına DGS uygulaması ve DGS'nin MACS ile birlikte uygulanması sonucu elde edilen spermilerin ICSI'nin başarısı üzerindeki etkisi karşılaştırılarak en uygun semen hazırlama yöntemin saptanması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hasta Populasyonu

Tez çalışmasına, kadın ve erkek partnerde infertilite sebebi olabilecek herhangi bir patoloji saptanmamış, sperm konsantrasyonu en az 15×10^6 , motilitesi en az %40 ve normal sperm morfolojisi %1 ile %12 arasında olan 17 açıklanamayan infertilite olgusu dahil edildi. Olguların tamamı mevcut projenin kapsamı ile ilgili açıklamaları içeren gönüllü olur formu ile bilgilendirilerek onayları alındı (Olguların projeye dahil edilebilmesi için gerekli olan etik kurul onayı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 06.02.2017 tarihli ve 2017-17/02 nolu kararı ile alınmıştır). Tezin gerçekleştirileceği olgulardan, masturbasyon yolu ile steril plastik kaplar içerisine ejakulat örneği alındı. Semen örnekleri likefaksiyonun gerçekleşmesi için 37°C 'deki inkübatör içinde 30 dk bekletildi. Semen örneklerinin likefaksiyon süresi, inkübasyon sonrası görünümü ve rengi değerlendirilerek kaydedildi. Ayrıca "Makler sayım kamarası" kullanılarak sperm konsantrasyonu ve motilitesinin mikroskopik değerlendirmesi yapıldı.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Mikroenjeksiyon İçin Spermilerin Hazırlanması

Mikroenjeksiyonda kullanılacak semen materyalinin hazırlanması sürecinde, hastadan alınan ejakulat örneğinin sperm konsantrasyonu, motilitesi değerlendirilerek kaydedildi. Ejakulat örneği iki kısma ayrıldı.

1. kısım; çalışmada Grup 1'i oluşturan oositlerin mikroenjeksiyonunda kullanılan, sadece DGS yöntemi ile yıkanan sperm materyali
2. kısım; çalışmada Grup 2'yi oluşturan oositlerin mikroenjeksiyonunda kullanılan, MACS+ DGS yöntemi ile yıkanan sperm materyali

3.2.1. Dansite Gradient Yöntemi ile Sperm Eldesi

Ejakulattan DGS yöntemi ile sperm eldesi için "ISolate density gradient sperm separation solutions" (gradient solüsyonu) kullanıldı.

Protokol:

- Tüm solüsyonlar, pH dengesinin sağlanması için, yıkama işleminden bir gün önce 37°C’de, %98 nem, %5 O₂ ve %7 CO₂ içeren inkübatöre konarak gece boyunca gazlanmaları için bekletildi.
- Tek kullanımlık 15 ml’lik steril konik santrifüj tüpü içerisine, 5 cc’lik steril enjektör yardımı ile 0,5 ml %80 konsantrasyondaki “Alt faz gradient solüsyonu”ndan kondu.
- “Alt faz gradient solüsyonu” nun üzerine, yeni bir 5 cc’lik steril enjektör yardımı ile santrifüj tüpünün kenarından sızdırarak, 0,5 ml %40 konsantrasyondaki “Üst faz gradient solüsyonu”ndan kondu. Üst faz solüsyonunun alt faz solüsyonu ile karışmamasına özen gösterildi.
- “Üst faz gradient solüsyonu” nun üzerine, steril bir pastör pipeti kullanılarak, benzer şekilde santrifüj tüpünün kenarından sızdırarak, 0,5 ml ejakulat örneği kondu. Ejakulat örneğinin üst faz solüsyonu ile karışmamasına özen gösterildi.
- Santrifüj tüpü 500 xg’de 15 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası, tüpün dibinde 1 ml pellet kalacak şekilde süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine 2 ml G-IVF yıkama solüsyonu eklendi.
- Santrifüj tüpü 300 xg’de 10 dk santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası, tüpün dibinde 1 ml pellet kalacak şekilde süpernatant atıldı.
- 2. kez pelletin üzerine 2 ml yıkama solüsyonu G-IVF eklendi.
- Santrifüj sonrası, tüpün dibinde 1 ml pellet kalacak şekilde süpernatant atıldı.
- Mikroenjeksiyonda kullanılacak olan spermleri içeren pellet steril cam tüpe alınarak, ICSI işlemine kadar 37°C’de, %98 nem, %5 O₂ ve %7 CO₂ içeren inkübatörde muhafaza edildi.

3.2.2. Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) Yöntemi ile Sperm Eldesi

Ejakulatin likefaksiyonunun ardından numune gradient solüsyonu ile

yıkanmadan önce, $1-5 \times 10^7$ konsantrasyonundaki sperm örneği MACS® ART Annexin V System kullanılarak, spermier apoptotik aktivasyonuna göre ön filtrasyondan geçirildi (Şekil 7).

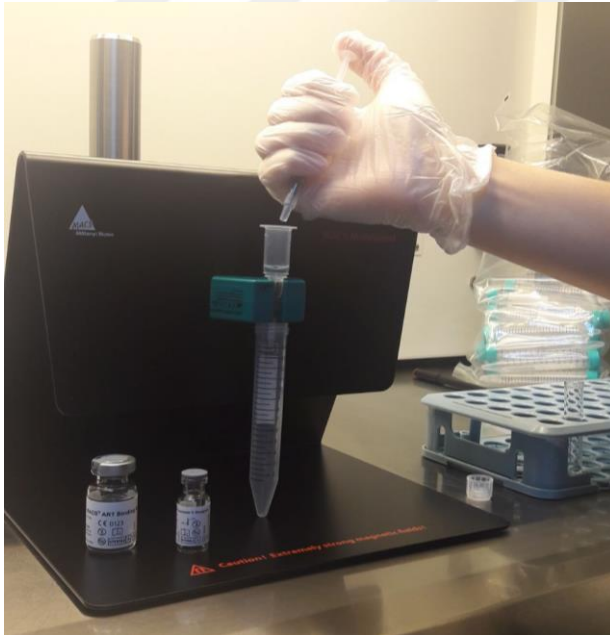
Protokol:

Manyetik işaretleme:

- 100 µl sperm numunesi, tek kullanımlık 15ml’lik steril konik santrifüj tüpü içerisinde, 200 µl “BindingBuffer” ile seyreltildi.
- Santrifüj tüpü 300 xg’de 4 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.
- Sperm pelletinin üzerine 10 µl “Annexin V Reagent” eklendi.
- Toplam hacim “Bindingbuffer” kullanılarak 50 µl’ye tamamlandı ve pipetajlanarak homojenize edildi.
- Oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi ve dış membranında PS içeren sperm hücrelerinin manyetik olarak işaretlenmeleri sağlandı.

Manyetik ayırma:

Manyetik ayırımı gerçekleştirmek için kolon olarak MACS ART Column, ayırma ünitesi olarak MACS ART Separation Unit (Miltenyi Biotec) kullanıldı (Şekil 7).



Şekil 7. MACS® ART Annexin V Sistemi (Miltenyi Biotec) ile sperm eldesi

Kolon kullanılmadan önce 100 µl “Binding buffer” ile durulandı.

- Manyetik olarak işaretlenmiş olan sperm numunesi kolondan geçirildi.

- Magnetik olarak işaretlenmiş spermier magneti tutunurken, işaretlenmemiş olan geçiş fraksiyonu toplandı.
- Magnette asılı kalan işaretlenmemiş geçiş fraksiyonunun toplanabilmesi için kolon 50 µl “Binding buffer” ile yıkandı.

MACS işleminden sonra, apoptotik olmayan sperm hücre süspansiyonu 3.2.1’de belirtildiği şekilde DGS işlemine tabii tutuldu.

3.3. Mikroenjeksiyon İçin Oositlerin Hazırlanması

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi ÜYT Merkezinde kontrollü ovaryan stimölasyon programına alınan 17 hastaya, hasta özelliklerine uygun olarak rekombinant veya üriner FSH veya LH kombinasyonu uygulandı. Hasta özelliklerine göre luteal baskılama hastaların çoğunda GnRH antagonistleriyle belli oranlarda da agonistleriyle yapıldı. Follikölometri 2- 3 günlük aralıklarla ve transvajinal ultrasonografi ile gerçekleştirildi. Folliköl çapı en az 3 follikölde 16-18 mm’ye ulaştığında oosit matürasyonu için rekombinant hCG uygulandı. Ovaryan hiperstimölasyon sendromu (OHSS) gelişme olasılığı olan olgularda son matürasyon için GnRH agonist uygulaması yapıldı. Son matürasyonun tetiklemesini takiben 34-36 saat sonra genel anestezi altında 18 gauge iğne ile folliköl aspirasyonu (OPU) gerçekleştirildi. Folliköl aspirasyonu 110-120 mm Hg basınç ile gerçekleştirildi ve 14 ml’lik steril cam tüplere alınan folliköl sıvısı embriyoloji laboratuvarında stereomikroskop altında değerlendirildi. Folliköl sıvısını ve oosit-kumulus kompleksini (OCC) içeren aspirattan OCC pipetle ayrıldı. OCC, üzeri parafin yağ (Ovoil-VİTROLİFE) ile kaplı dış ortam medyumuna içine alınarak (G-MOPs medium-VİTROLİFE) yıkanması gerçekleştirildi. OPU işlemi tamamlandıktan sonra toplanan OCC’leri üzeri parafin yağ ile kaplı önceden gazlanarak pH dengesi sağlanmış fertilizasyon medyumuna (G-IVF medium-VİTROLİFE) içeren kültür kaplarına taşınarak, 2-4 saat 37°C’de, %98 nem, %5 O₂ ve %7 CO₂ içeren inkübatör ortamında bekletildi. İnkübasyonun ardından kumulus ve korona radiata hücrelerinin oositten uzaklaştırılması amacıyla enzimatik ve mekanik denudasyon işlemi gerçekleştirildi. Enzimatik denudasyon OCC komplekslerinin %2 hyaluronik asit içeren dış ortam medyumunda yıkanması ile, mekanik denudasyon ise farklı çaplarda denudasyon pipetleriyle pipetaj uygulayarak gerçekleştirildi. Denüdasyon sonrasında tüm

oositlerin inverted mikroskop altında nüklear matürasyon aşamaları tayini yapıldı. Oositlerin nüklear matürasyonu değerlendirilirken; germinal vezikülün silinmesinin gerçekleşip, 1. kutup cisimciğinin atıldığı oositler sekonder oosit (metafaz II) olarak kaydedildi ve ICSI uygulamasına alındı.

Çalışma kapsamına alınan hastaların seçiminde; metafaz II oosit sayısı en az 6 oosit olan ve oosit morfolojilerinin normal olduğu hastalar çalışmaya dahil edildi. ICSI  ncesi aynı hastadan toplanan normal morfolojili metafaz II oositler randomize edilerek 2 gruba ayrıldı.

Grup 1; DGS ile yıkanmış semen örneklerinden seçilen motil ve normal morfolojili spermlerle mikroenjeksiyonunun gerçekleştirildiği sekonder oositlerden oluştu.

Grup 2; MACS + DGS yöntemi ile yıkanmış semen örneklerinden seçilen motil ve normal morfolojili spermlerle mikroenjeksiyonunun gerçekleştirildiği sekonder oositlerden oluştu.

ICSI sonrası oositler, içerisinde 1 gün önceden hazırlanmış üzeri parafın yağ ile kaplı erken dönem (klivaj) embriyo kültür medyumunu (G1- V TROL FE) bulunan kültür kapları içerisinde %98 nem, %5 O₂ ve %7 CO₂ içeren inkübatör ortamında 18 saat inkübe edildi. Ink basyonun ardından oositler inverted mikroskop altında değerlendirilerek fertilizasyon değerlendirmesi yapıldı. Erkek ve dişi pron kleus gelişimi görülmesi fertilizasyon pozitif olarak kaydedildi ve embriyo kültür sürecine devam edildi. Embriyo kültürü blastosit gelişim sürecine kadar gerçekleştirildi (5+2 gün). ICSI sonrası 1. (pron kleus formasyonu), 2. (klivaj aşamasında embriyo), 3. (klivaj aşamasında embriyo) ve 5. gün (blastosist aşamasında embriyo) embriyo gelişimi ve kalitesi inverted mikroskop altında değerlendirildi ve kaydedildi. OPU sonrası 5. gün matürasyon ve morfolojisine göre en iyi kalitede olan 1 veya 2 embriyonun transferi gerçekleştirildi. Gelişimin 5. günü blastosist aşamasına ulaşamayan embriyoların kültür süresi 2 gün daha uzatılarak, blastosist formasyonu gerçekleşen embriyoların kriyoprezervasyonu gerçekleştirildi.

3.4. Embriyo Morfolojik Değerlendirmesi

ICSI sonrası 16-18. saatte pronukleusların sayısı, lokalizasyonu, büyüklüğü,

birbirine göre pozisyonları, nükleolar prekürsör cisimlerin (NPB, çekirdek öncülleri) sayısı, yerleşimi ve çevresindeki ooplazmanın morfolojik özellikleri değerlendirildi. Erkek ve dişi pronukleusun görülmesi başarılı fertilizasyon olarak kabul edildi (Week ve ark; 1999).

Erken embriyoner gelişimin 2. ve 3. gününde erken bölünme hızı, blastomer büyüklüğü, blastomerlerin nüklear özellikleri, fragmentasyon derecesi ve erken kompaktlaşma parametreleri göz önünde bulundurularak değerlendirildi. Embriyoların grade'lenmesinde blastomer sayısı, ve blastomer yapısını+ fragmentasyon derecesini belirten derecelendirme yapıldı (Örn. 6 blastomerli Grade 1 veya 2 olarak). Blastomerler şu şekilde değerlendirildi:

A. Simetrik Blastomerler

B. Asimetrik Blastomerler

Fragmentasyonlar ise şu şekilde değerlendirildi:

1. Fragmentasyon yok
2. %20 ve %20'den az fragmentasyon
3. %20'nin üzerinde fragmentasyon

o Blastomerler eşit büyüklükte, fragmentasyon yok ve sitoplazma homojen ise embriyolar Grade 1 olarak kabul edildi.

o Blastomerler eşit büyüklükte, fragmentasyon oranı %20 ve %20'den az ise embriyolar Grade 2 olarak kabul edildi.

o Blastomerler eşit büyüklükte ya da değil ve fragmentasyon oranı %20'den daha büyük ise embriyolar Grade 3 olarak kabul edildi.

5. gün embriyo morfolojik değerlendirmesinde; kavitasyon ilerledikçe, kompaktlaşma sırasında blastomerlerin kutuplaşması ile 2 farklı hücre grubu meydana geldi:

a. Ekstra embriyonik dokuyu oluşturacak Trofoektoderm

b. Embriyo gelişimini sürdürecekt iç hücre kitlesi (inner cell mass-ICM)

Embriyo değerlendirilmesi yapılırken, blastosöl kavitesinin gelişimi başlamış olan embriyolar değerlendirmeye alındı. Blastosöl kavitesinin ekspansiyon oranı, ICM-TE morfolojisi, zona pellusidanın incelik-kalınlık durumu ve hatching'in başlaması dikkate alındı (Gardner DK ve Schoolcraft W., 1999).

Zona pellusidanın incelik-kalınlık durumuna göre blastosist değerlendirme kriterleri şu şekilde değerlendirildi:

1) Erken Blastosist:

Blastosöl embriyo hacminin yarısından daha küçük olmalı.

Embriyo büyüklüğünde henüz bir artış olmamalı.

Zona Pellusida incelmeye başlamalı

Blastosöl tam olarak sıvıyla dolmalı

Blastosistin çapı büyümeli

Trofoblastik hücreler belirginleşmeli.

2-3) Blastosist:

Blastosöl embriyo hacminin yarıdan fazlasını ya da tamamını doldurmalı.

Embriyo büyüklüğünde gözlenebilen bir artış olmalı

İncelmiş zona pellusida olmalı

4) Expanded Blastosist:

Blastosöl embriyoyu tamamen doldurmalı

Embriyo büyüklüğü tamamen artmış olmalı

Çok incelmiş zona pellusida olmalı

5) Zona pellusidanın kırıldığı ve embriyonun zona dışına çıkmaya başladığı (Hatching) Blastosist:

Trofoektodermiler zona pellusida dışına çıkmaya başlamış olmalı

6) Tamamen zona pellusidadan çıkmış (Hatching tamamlanmış) Blastosist:

Zona pellusidadan ayrılmış blastosist

(Gardner DK ve Schoolcraft W 1999).

- İç hücre kütlesi (ICM) durumu
 - o Sıkıca paketlenmiş çok sayıda hücre bulunur (A).
 - o Gevşek bir şekilde gruplaşmış, çok sayıda hücre vardır (B).
 - o Az sayıda hücre vardır (C).
- Trofoektoderm (TE) durumu
 - o Blastosisti çevreleyen hücreler birbirine sıkıca tutunarak sıralanmışlardır (A).
 - o Az sayıda hücre vardır gevşek bir şekilde gruplaşmışlardır (B).
 - o Az sayıda hücre vardır (C)

(Gardner DK ve Schoolcraft W, 1999).

Tüm blastosöl ekspansiyon seviyelerinde (1-6) ICM ve TE morfolojisine göre AA, AB, BA ve BB olan blastosistler Grade 1 olarak kabul edildi. ICM ve TE morfolojisi BC, CB, CC olan blastosistler Grade 2 olarak kabul edildi.

3.5. Sperm Kalitesinin Tayini

Mikroenjeksiyon işlemleri sonrasında Grup 1 ve Grup 2'ye ait artan sperm örneklerinden ayrı ayrı 2 yayma preparat hazırlanarak, hematoksilin-eosin (H&E) boyaması yapılan preparatlar detaylı morfolojik analiz için TUNEL boyaması yapılan preparatlar apoptotik sperm sayısı (%DFİ)'nin belirlenmesi amacıyla değerlendirildi.

3.5.1. Hematoksilin-Eosin Boyaması

- DGS ve MACS&DGS uygulamaları sonrasında elde edilen sperm örneklerinden 40 µl alınarak lam üzerine yayma preparat hazırlandı ve 1 saat oda sıcaklığında açık havada kurutuldu.
- Kuruyan preparatlar %4 paraformaldehit içerisinde 1 saat fikse edildi.
- Fiksatiften alınan preparatlar oda sıcaklığında kurutuldu ve +4°C'de boyama işlemi uygulanana kadar saklandı.
- Boyama günü buzdolabında bekletilen kesitler 3 dk %100'luk alkolde, 3 dk %90'lık alkolde ve 3 dk %70'lik alkolde bekletildi.
- Alkolden alınan preparatlar akan musluk suyunda 3 dk bekletildi.
- Ardından preparatlar Harris hematoksileni içinde 1,5 dk bekletildi.
- Kesitler mavileşinceye kadar akan musluk suyunda 5 dk süreyle yıkandı.
- Amonyaklı suya 7 kez batırılıp çıkarıldı.
- Akan musluk suyunda 2-3 dk durulandı.
- Eosin içinde 3,5 dk bekletildi.
- Preparatlar akan musluk suyunda su berraklaşmaya kadar yıkandı.
- %70, %90 ve %100 alkol içerisine sırasıyla 10 kez batırılıp çıkarıldı.
- Ardından ksilol içerisinde 20 dk bekletildi.
- Entellan ile kapatıldı.

3.5.2. TUNEL Analizi

TUNEL analizi "ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit

(EMD, Millipore, USA)” kullanılarak gerçekleştirildi.

Solüsyonların hazırlanması:

Fiksasyon solüsyonu, Proteinaz K solüsyonu, Endojen Peroksit solüsyonu, Stop/Wash Buffer solüsyonu ve DAB solüsyonu aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

Fiksasyon solüsyonu:

Fiksasyon işlemi %4 paraformaldehit (fosfat buffer saline- PBS içinde, pH: 7.4) ile gerçekleştirildi.

- 10 gr paraformaldehit 62,5 ml dH₂O içerisinde 58°C’de magnetik ısıtıcılı blok üzerinde çözüldü.
- Çözelti rengi berraklaşana kadar NaOH ilave edildi.
- Hazırlanan çözeltinin homojen olması sağlandı.
- Çözelti hacmi PBS ile 250 ml’ye tamamlandı.
- Hazırlanan çözelti magnetik ısıtıcıda karıştırıldı.
- HCl ve NaOH kullanılarak pH: 7,4’e ayarlandı.

Proteinaz K solüsyonu:

- 30 µl proteinaz K, 70 µl PBS ile dilue edildi.

Endojen Peroksit solüsyonu:

- 5 ml %3’lük H₂O₂, 45 ml PBS dilue edilerek %0,3’lük H₂O₂ solüsyonu hazırlandı.

TdT Enzimi:

- 77 µl reaction buffer (RB) üzerine 33 µl TdT enzim ilave edildi.

Stop/Wash Buffer Uygulaması:

Cam şale içerisinde 2 ml stop wash buffer 68 ml dH₂O ile dilue edildi.

DAB Solüsyonu:

3 µl DAB 147 µl dilution buffer ile dilue edildi.

Protokol:

Ön Uygulama:

- DGS ve MACS&DGS uygulamaları sonrasında elde edilen sperm örneklerinden 40 µl alınarak lam üzerine yayma preparat hazırlandı.
- Preparatlar, taze hazırlanmış fiksasyon solüsyonu ile 1 saat süre ile oda sıcaklığında fikse edildi.

- Hazırlanan preparatlar TUNEL analizi gerçekleştirilinceye kadar +4°C’de muhafaza edildi. TUNEL boyama öncesi preparatlarda değerlendirilmesi planlanan alanın sınırları Pappen ile işaretlendi.

1. Proteinaz K ile Muamele:

- Taze sulandırılmış proteinaz K, pappenle çizili alana 20 µl gelecek şekilde uygulandı.
- Preparatlar 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Ardından örnekler cam şale içerisinde distile suda 2x2 dk bekletildi.

2. Endojen Peroksit ile Muamele:

- Preparatlar hazırlanmış %0,3’lük hidrojen peroksit içerisinde 5 dk kadar bekletildi.
- Ardından preparatlar 2x5 dk cam şale içerisinde PBS ile yıkandı.

3. Equilibration Buffer (EB) ile Muamele:

- Preparatlarda işaretli alanın çevresindeki fazla PBS kurutma kağıdı ile alındı.
- Her bir kesit üzerine 65 µl EB uygulandı.
- Oda sıcaklığında 10 sn inkübe edildi.

4. Stop/Wash Buffer Uygulaması:

- Preparatlar Stop/Wash solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi.

5. Anti-digoxigenin Uygulaması:

- Preparatlar 3x1 dk PBS ile yıkandı.
- Kesitin çevresindeki PBS kurutma kağıdı ile alındı ve kesit üzerine 65 µl anti-digoxigenin uygulandı.
- Nemli ortamda oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.

6. PBS’de Yıkama:

- Preparatlar 4x2 dk PBS ile yıkandı.

7. Peroxidan Substrat ile Boyama:

- Kesit çevresindeki PBS kurutma kağıdı ile alındı ve kesit üzerine 75 µl peroxidan substrat uygulandı.

8. DAB İle Muamele:

- Kesit üzerine 6 dk süre ile DAB kromojen uygulanarak boyama gerçekleştirildi.
- Optimal boyanma zamanını kontrol etmek için kesit mikroskop altında kontrol edildi.

9. Yıkama:

- Preparatlar 3x1 dk ve 1x5 dk dH₂O ile yıkandı.
- 3x2 dk ksilen içinde bekletildi.
- Kesitler entellan ile kapatıldı.
- Hazırlanan preparatlar immersiyon objektifi kullanılarak ışık mikroskopunda görüntülendi.
- Çekirdeği kahverengi boyanan hücreler DNA fragmentasyonu pozitif, apoptotik aktivasyon gösteren hücreler olarak değerlendirildi.
- Pappenle sınırlı alan içinde kalan sperm hücrelerinin sayısı belirlendi. Tüm değerlendirme ve sayımlar aynı kişi tarafından tekrar edildi. Elde edilen kantitatif sonuçlar ile %DFİ değeri aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi.

$$\% DFİ = \text{Pozitif boyanan sperm sayısı} \times 100 / (\text{Toplam sperm hücre sayısı})$$

3.6. Değerlendirme ve İstatistiksel Analiz

Tüm istatistik analizler SPSS ver.20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tek başına DGC veya MACS& DGC uygulaması sonucu elde edilen sperm örneklerinin DFİ değerleri arasındaki fark, bağımsız T testi ile araştırıldı. Her iki grup içinde sperm DFİ değeri ve semen morfoloji parametreleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile saptandı. ICSI uygulaması sonunda, DGC veya MACS &DGC ile elde edilen sperm örneklerinin oositleri fertilize etme başarısı bağımsız T testi ile karşılaştırıldı. Tüm analizlerden elde edilen sayısal değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. %95 güven aralığında, <0,05 olduğu belirlenen p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hasta karakteristik özellikleri

Çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'ne başvuran ve açıklanamayan infertilite tanısı ile kontrollü ovaryan stimülasyon ve ICSI uygulamasına alınan 17 çift dahil edildi. Çiftlerin ortalama infertilite süreleri $6,23 \pm 0,72$ yıl ve ortalama siklus sayıları $1,47 \pm 0,17$ idi.

Kadın partnerlerin yaş ortalamasının, vücut kitle indeksinin ve kadın partnerlerin menstrual döngünün 3. günü E2 değerlerinin, kontrollü ovaryan stimülasyon protokolünde uygulanan ortalama gonadotropin dozunun ve kontrollü ovaryan stimülasyon sonrası toplanan toplam oosit sayılarının istatistiksel olarak parametrik bir dağılım gösterdiği belirlendi. Kadın partnerlerin yaş ortalaması $32,17 \pm 4,30$ ve vücut kitle indeksi ortalaması $25,49 \pm 3,35$ olarak hesaplandı. Stimülasyon öncesi bilateral antral follikül sayılarının, ovulasyon indüksiyon günü E2 değerlerinin ve follikül aspirasyonu sonrası elde edilen matür oosit sayılarının, biyokimyasal veri olarak serum AMH, FSH ve LH değerlerinin istatistiksel olarak parametrik dağılım göstermediği görüldü. Kadın partnerlerin biyokimyasal verileri değerlendirildiğinde, serum AMH düzeyi ortalaması 2,04 (1-7,2) ng/dl, FSH değeri ortalaması 4,97 (3-8) mIU/ml; LH değeri ortalaması 4,1 (1,43-10,7) mIU/ml; menstrual döngünün 3. günü E2 değeri ortalaması $41,32 \pm 12,38$ ng/ml olarak belirlendi. Kontrollü ovaryan stimülasyon protokolünde ortalama $230,41 \pm 81,08$ U gonadotropin dozu uygulandı. Stimülasyon öncesi bilateral antral follikül sayılarının ortalaması 11 (6-24), ovulasyon indüksiyonunun yapıldığı gün E2 düzeyi ortalaması 2453,12 (712-7416) ng/ml olarak belirlendi. Kontrollü ovaryan stimülasyon sonrası toplanan toplam oosit sayısı ortalaması $12,23 \pm 4,94$ ve matür (metafaz II) oosit sayısı 12 (6-20) idi.

Erkek partnerlerin yaşı, vücut kitle indeksi, semen volümü ve biyokimyasal verilerinde; serum FSH, prolaktin ve testosteron değerlerinin istatistiksel olarak

parametrik dağılım gösterdiği belirlendi. Erkek partnerlerin yaş ortalaması $34,94 \pm 4,65$ ve vücut kitle indeksi ortalaması $27,48 \pm 4,24$ olarak hesaplandı. Sperm konsantrasyon ve motilitesinde istatistiksel olarak parametrik bir dağılım olmadığı görüldü. Biyokimyasal veriler değerlendirildiğinde, serum FSH değeri ortalaması $3,46 \pm 1,73$ mIU/ml, prolaktin değeri ortalaması $7 \pm 2,8$ mIU/ml, testosteron değeri ortalaması $4,31 \pm 1,66$ mIU/ml olarak belirlendi (Tablo 4).

4.2. Semen Parametreleri

Çalışma kapsamına alınan 17 erkek hastanın mastürbasyon yöntemi ile alınan ejakulatlarının likefaksiyonu gerçekleştikten sonra ortalama volümü $2,74 \pm 0,89$ olarak belirlendi. Sperm konsantrasyonları ortalama $52,82 \pm 22,19 \times 10^6$ ($16-96$), sperm motilitesi ortalaması yüzde olarak $71,18$ ($41-83$), 500 μ l'de toplam progressif motil sperm sayısı ortalama $17,82 \pm 6,44 \times 10^6$ ve normal morfolojili sperm oranı $3 \pm 2,62$ olarak hesaplandı (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışmaya dahil olan kadın ve erkek hastaların demografik bilgileri

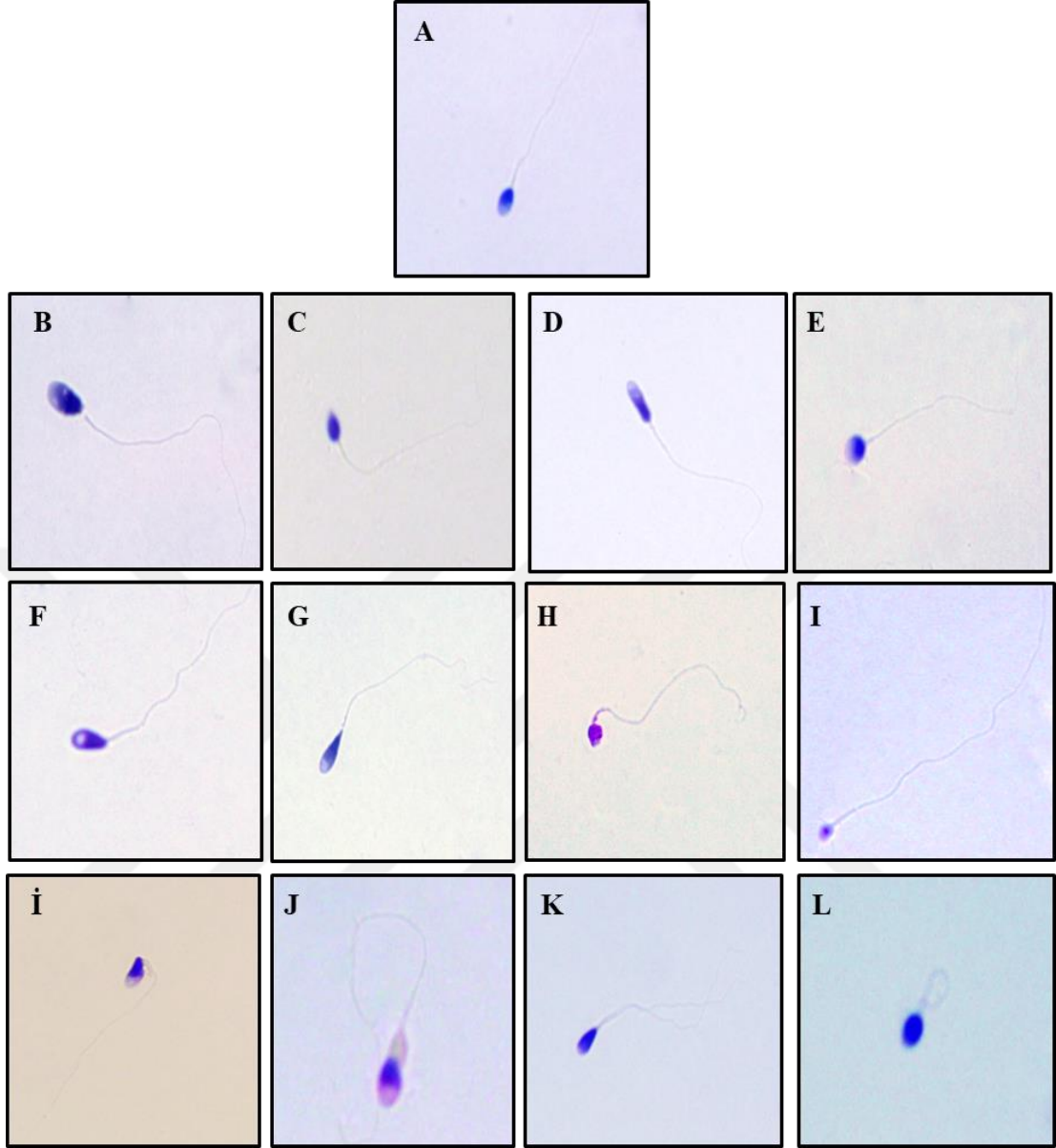
Kadın hasta karakteristik özellikleri	Değer (min-max)	Standart sapma	Erkek hasta karakteristik özellikleri	Değer (min-max)	Standart sapma
Yaş	32,17 (24-38)	4,30	Yaş	34,94 (27-44)	4,65
BMI	25,49 (19-31,3)	3,35	BMI	27,48 (22-36)	4,24
AMH (ng/dl)	2,04 (1-7,20)	1,62	FSH	3,46 (0,55-5,88)	1,73
Antral follikül sayısı	11 (6-24)	4,27	Prolaktin	7,00 (2,95-10,30)	2,80
FSH (mIU/ml)	4,97 (3-8,01)	1,26	Testosteron	4,31 (2,43-7,33)	1,66
LH (mIU/ml)	4,1 (1,43-10,7)	2,86	Semen volümü	2,74 (1,50-4,50)	0,89
E2 (ng/ml)	41,32 (18-62,35)	12,38	Sperm sayısı/1ml ejakulat (10^6)	52,82 (16,00-96,00)	22,19
Ovulasyon İndüksiyon Günü E2(ng/ml)	2453,12 (712-7416)	1981,93	Motilite(%)	71,18 (41-83)	11,89
Gonadotrophin Dozu (Unite)	230,41 (120-360)	81,08	TPMMS (10^6) (500 μ l)	17,82 (5-27)	6,44
Toplanan oosit sayısı (OS)	12,23 (6-22)	4,94	Normal Sperm Morfolojisi Sayısı	3 (1-12)	2,62
Toplam matür oosit sayısı (MOS)	12 (6-20)	4,40			
İnfertilite süresi (yıl)	6,23 (1-12)	0,72			
Siklus sayısı	1,47 (1-3)	0,17			

4.3. Sperm histolojik bulguları

Mikroenjeksiyon işlemleri sonrasında DG ve MACS-DG gruplarından artan sperm örneklerinden yayma preparat hazırlanarak morfolojik anomalilerin belirlenebilmesi amacıyla uygulanan Hematoksilen&Eosin boyaması sonuçları ve DFI'nin (%) belirlenebilmesi amacıyla uygulanan TUNEL boyama sonuçları değerlendirildi.

4.3.1. DG ve MACS-DG yöntemlerinin sperm morfolojisi üzerine etkisi

Hematoksilen&Eosin boyamasına göre; DG ve MACS-DG ile elde edilen spermelerin morfolojik görüntüleri Şekil 8'de, baş, boyun, kuyruk, sitoplazmik droplet, kırık boyun ve vakuol oranları Tablo 5' te gösterilmiştir.



Şekil 8. Hematoksilen&Eosin boyaması sonucu gözlenen sperm morfolojileri (X100). **A:** Normal sperm morfolojisi, **B–I:** Baş anomalileri (**B:** Büyük baş, **C:** Küçük baş, **D:** Uzun baş, **E:** Yuvarlak baş, **F:** Vakuol, **G:** Priform baş, **H:** Amorf baş, **I:** Pinhead), **İ, J:** Boyun anomalileri (**İ:** Kırık boyun, **J:** Sitoplazmik droplet), **K, L:** Kuyruk anomalileri (**K:** Çift kuyruk, **L:** Kıvrık kuyruk).

Tablo 5. Yıkama öncesi, DG ve MACS-DG uygulamasından sonra norma morfolojili sperm oranları ve yıkama sonrası saptanan baş, boyun, kuyruk anomalili ve sitoplazmik dropletli, kırık boyunlu ve vakuollü sperm oranları

Olgu no		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Normal sperm morfolojisi (%)		YÖ	2	3	12	3	2	6	1	4	4	2	1	1	2	5	4	3	3
		DG	3	6	7	4	4	6	3	4	5	3	3	4	3	4	4	6	5
		MACS-DG	4	4	6	6	5	7	3	3	5	4	3	4	6	8	6	5	4
* Anormal sperm morfolojisi (%)	Baş anomalisi (%)	DG	61	98	100	100	98	97	99	95	99	95	97	91	97	98	92	97	99
		MACS-DG	95	93	95	99	100	99	98	94	99	100	94	81	86	77	97	96	100
	Boyun anomalisi (%)	DG	36	0	0	0	1	3	1	5	1	2	3	9	3	1	7	2	1
		MACS-DG	0	4	5	0	0	0	0	3	1	0	6	19	12	20	2	3	0
	Kuyruk anomalisi (%)	DG	3	2	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	1	1	1	0
		MACS-DG	5	3	0	1	0	1	2	3	0	0	0	0	2	3	1	1	0
Sitoplazmik droplet (%)**		DG	0	2	0	0	1	2	10	2	0	0	0	4	2	4	0	30	5
		MACS-DG	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	9	12	24	0	10	0
Kırık boyun (%)***		DG	0	0	0	0	0	0	2	10	4	2	0	13	0	0	0	2	0
		MACS-DG	40	0	0	0	0	0	0	2	8	0	0	6	12	0	4	0	12
Vakuol (%)****		DG	0	0	6	7	10	8	6	4	0	11	9	0	0	1	0	6	0
		MACS-DG	0	0	2	0	5	2	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

YÖ=yıkama öncesi, DG=dansite gradient grubu, MACS-DG=MACS+dansite gradient grubu

* Baş anomalisi, boyun anomalisi ve kuyruk anomalisi kendi aralarında anormal sperm morfolojisi temel alınarak değerlendirildi.

** Sitoplazmik droplet anomali yüzdesi, boyun anomalileri içerisinde değerlendirildi.

*** Kırık boyun anomali yüzdesi, boyun anomalileri içerisinde değerlendirildi.

**** Vakuol anomali yüzdesi, baş anomalileri içerisinde değerlendirildi.

Gerçekleştirilen Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk Test'lerine göre bulgularımızın %95 güven aralığındaki dağılımı homojen olmadığından, DG ve MACS-DG yöntemlerinin sperm morfolojisi ve sperm parametreleri üzerine etkisi Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi (Tablo 6). DG yöntemi ile yıkanan sperm örnekleri, yıkama öncesi ile karşılaştırıldığında motilitesinin, toplam progresif motil sperm sayısı ve normal morfolojili sperm sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü. (sırasıyla; $p=0,03$, $p<0,01$, $p=0,02$ Tablo 6). MACS-DG yöntemi ile yıkanan sperm örnekleri, yıkama öncesi ile karşılaştırıldığında sperm konsantrasyonunun azaldığı, normal morfolojili sperm sayısının ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0,01$ Tablo 6). MACS-DG yöntemi ile yıkanan sperm örneklerinde DG yöntemine göre sperm konsantrasyonunun ve toplam progresif motil sperm sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü (sırasıyla; $p<0,01$, $p<0,01$ Tablo 6). Anormal morfolojili sperm oranları açısından bulguları MACS-DG yöntemi ve DG yöntemi karşılaştırıldığında; bir veya birden fazla, toplamda sperm çekirdeğinin yaklaşık 1/3'ü büyüklüğünde vakuol (+) sperm oranının MACS+DG yöntemiyle yıkanan sperm örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü ($p=0,03$). DG ve MACS-DG yöntemleri ile hazırlanan spermelerde motilite, baş, boyun, kuyruk anomalileri, sitoplazmik droplet

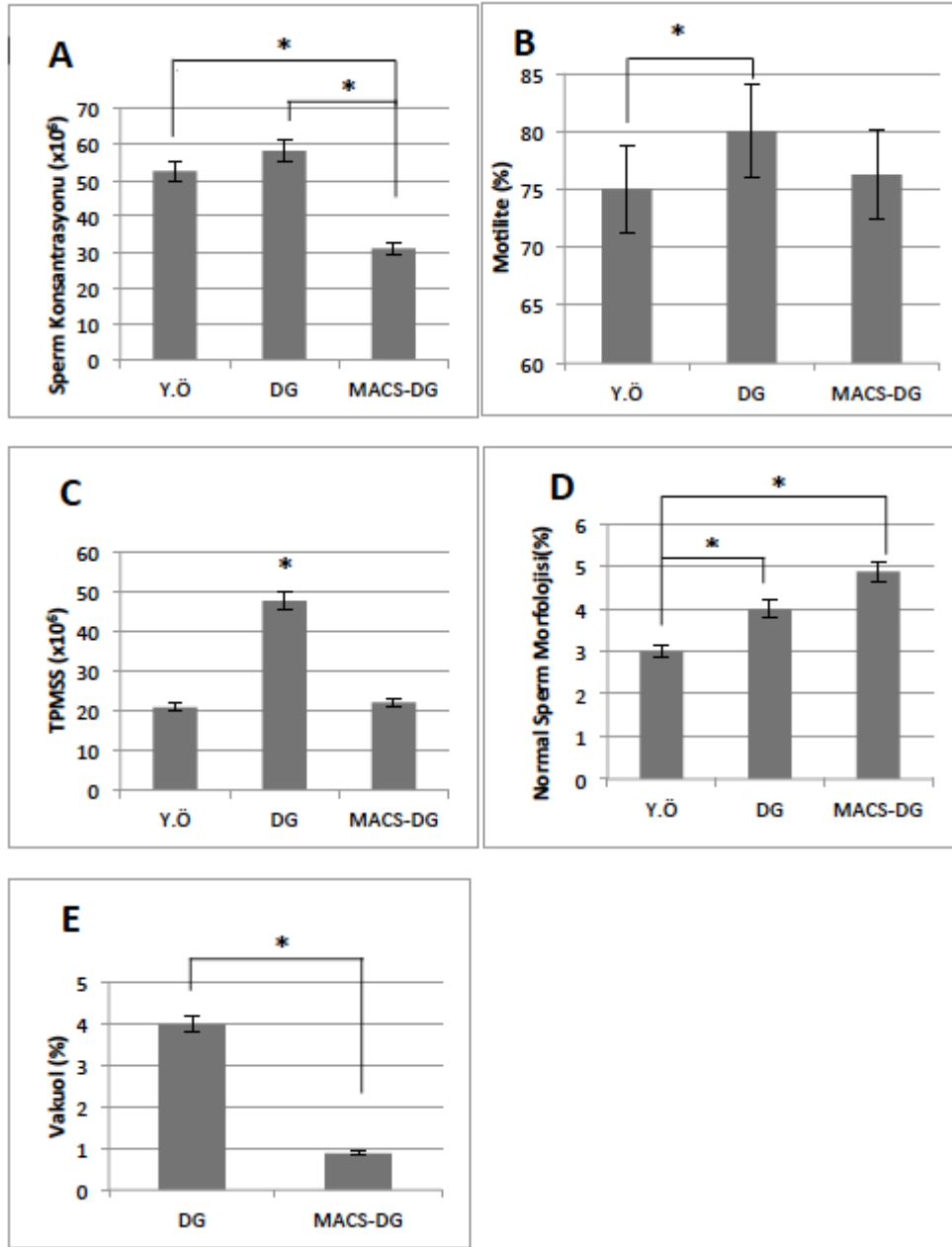
ve kırık boyun gözlenme oranlarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (tüm parametrelerde $p > 0,05$).

Tablo 6. DG ve MACS-DG'nin sperm parametrelerine ve sperm morfolojisine etkisi (n=17).

Semen parametresi		Ortalama (min-max)	Standart Sapma	İkili karşılaştırma	
				p değeri*	
Sperm/ml ($\times 10^6$)	YÖ	52,58 (16-113)	29,15	YÖ-DG	0,95
	DG	58,11 (21-100)	25,50	YÖ-(MACS-DG)	<0,01
	MACS-DG	30,88 (10-60)	15,83	DG-(MACS-DG)	<0,01
Motilite (%)	YÖ	75 (41-83)	11,89	YÖ-DG	0,03
	DG	80 (45-96)	14,29	Y.Ö-(MACS-DG)	0,18
	MACS-DG	76,23 (33-100)	16,40	DG-(MACS-DG)	0,41
TPMSS(10^6)	YÖ	20,76 (7-42)	10,18	YÖ-DG	<0,01
	DG	47,58 (16-80)	22,96	Y.Ö-(MACS-DG)	0,38
	MACS-DG	22 (5-83)	18,70	DG-(MACS-DG)	<0,01
Normal sperm morfolojisi (%)	YÖ	3(1-12)	2,62	YÖ-DG	0,02
	DG	4 (3-7)	1,27	Y.Ö-(MACS-DG)	<0,01
	MACS-DG	4,88(3-8)	1,45	DG-(MACS-DG)	0,31
Baş anomalisi (%)	DG	94,88(92-100)	2,20	0,66	
	MACS-DG	94,29(96-100)	1,64		
Boyun anomalisi (%)	DG	4,41(0-36)	2,06	0,79	
	MACS-DG	4,41(0-20)	1,57		
Kuyruk anomalisi (%)	DG	0,71(0-3)	0,25	0,27	
	MACS-DG	1,29(0-5)	0,36		
Sitoplazmik droplet (%)	DG	3,65 (0-30)	1,76	0,56	
	MACS-DG	3,59 (0-24)	1,59		
Kırık boyun (%)	DG	1,94 (0-13)	0,92	0,59	
	MACS-DG	4,94 (0-40)	2,42		
Vakuol (%)	DG	4,00 (0-11)	0,99	0,03	
	MACS-DG	0,88(0-5)	0,41		

*p değerleri Mann–Whitney U testi kullanılarak belirlendi. $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edildi.

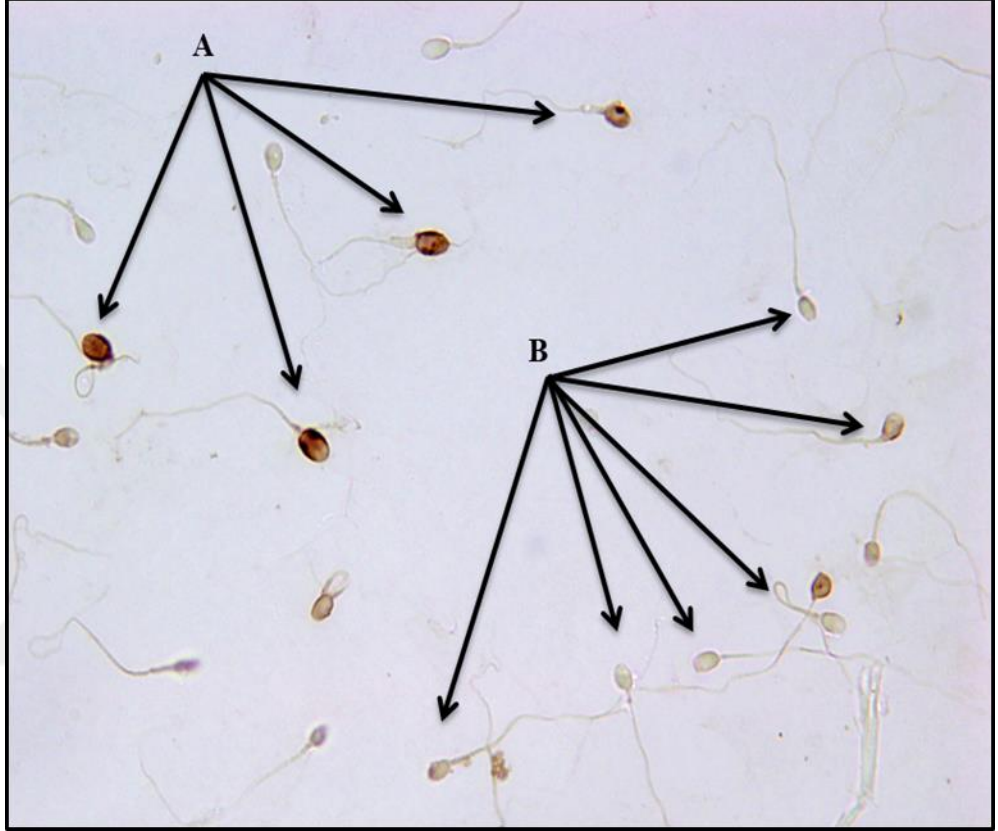
YÖ=Yıkama öncesi, DG=dansite gradient grubu, MACS-DG=MACS+dansite gradient grubu



Şekil 9. Yıkama öncesi, DG ve MACS-DG yöntemleri ile yıkama sonrası sperm konsantrasyonu, motilitesi, total progressif motil sperm sayısı (TPMSS) oranları, normal sperm morfolojisi (Grafik 1-4). DG- ve MACS+DG yöntemleri ile yıkanan sperm örneklerinde vakuol içeren sperm oranı (Grafik 5).

4.3.2. TUNEL Boyaması Sonuçları

TUNEL analizine göre; DG ve MACS-DG ile elde edilen TUNEL (+) ve TUNEL (-) spermelere ait görüntüler Şekil 10'da ve her bir olgu için saptanan sperm DFİ oranları Tablo 7'de gösterilmektedir.



Şekil 10. TUNEL analizi sonucu (+) ve (-) olarak değerlendirilen sperm görüntüleri (X100). A: TUNEL (+), B: TUNEL (-).

Tablo 7. DG ve MACS-DG uygulamasından sonra TUNEL analizi ile spermelerde saptanan DFİ oranları (%)

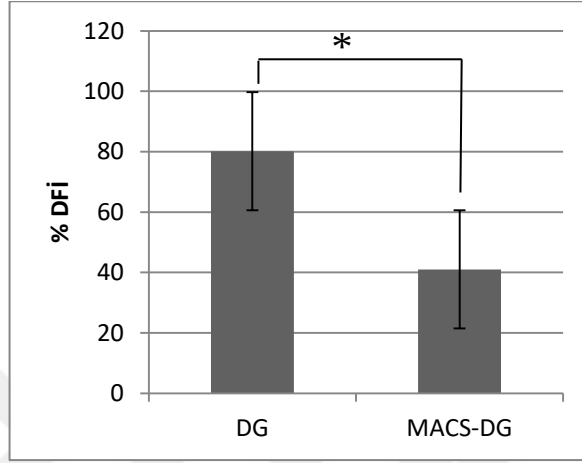
Olgu no		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
DFİ (%)	DG	70	95	95	90	80	78	96	86	85	70	70	88	60	50	95	60	94
	MACS-DG	30	35	27	28	10	35	24	54	33	35	60	22	78	60	72	50	44

Gerçekleştirilen Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk Test'lerine göre bulgularımızın %95 güven aralığındaki dağılımı homojen olduğundan DG ve MACS-DG yöntemlerinin (%) DFİ üzerindeki etkisi Bağımsız T Testi ile değerlendirildi. Sperm DNA fragmentasyon oranının ejakulatın MACS-DG yöntemi ile hazırlanması sonrası anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür ($p < 0,01$; Tablo 8, Şekil 11).

Tablo 8. DG (Grup 1) ve MACS-DG (Grup 2) yıkama sonrası sperm DFİ oranları

	N	Ortalama DFİ (%) (min-max)	Standart sapma	p değeri*
Grup 1	17	80,12(50-96)	14,48	< 0,01
Grup 2	17	41,00(10-78)	18,67	

*p değerleri Bağımsız T Testi kullanılarak değerlendirildi. $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edildi.



Şekil 11. DG (Grup 1) ve MACS-DG (Grup 2) yöntemlerinin sperm (%) DFİ oranına etkisi

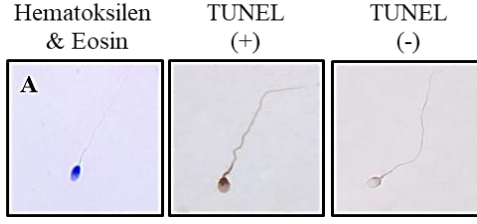
DG ve MACS-DG yöntemlerine bağlı olarak belirlenen (%) DFİ oranlarının sperm morfoloji anomalileri ile korelasyonu Spearman's rho testi ile değerlendirildi. DG ve MACS-DG uygulamaları sonrasında saptanan (%) DFİ oranları ile anormal sperm morfoloji arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görüldü ($p > 0,05$; Tablo 9). Şekil 12'de benzer morfolojilere sahip spermelerin DNA fragmentasyonu varlığında TUNEL (+), DNA bütünlüğünü koruyan spermelerde TUNEL (-) görünümüne ait örnekler gösterilmiştir.

Tablo 9. DG ve MACS-DG uygulamaları sonrasında saptanan (%) DFİ oranları ile sperm morfoloji anomalileri arasındaki ilişki

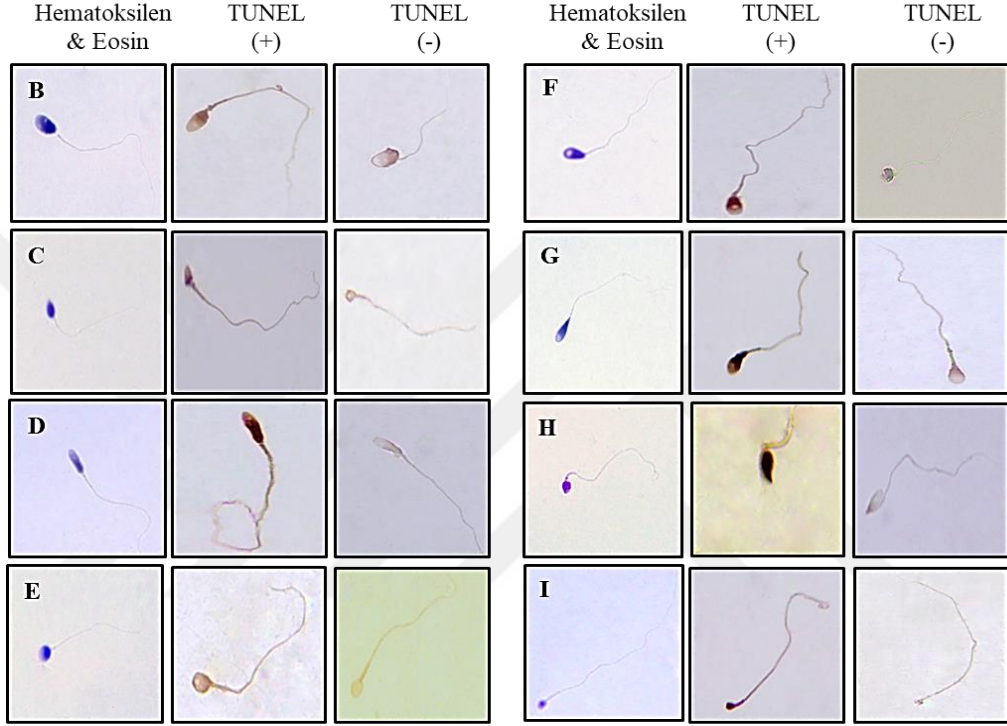
Yöntem	(%) DFİ	Genel morfolojik değerlendirme			Ayrıntılı morfolojik değerlendirme		
		Baş anomalisi (%)	Boyun anomalisi (%)	Kuyruk anomalisi (%)	Sitoplazmik droplet (%)	Kırık boyun (%)	Vakuol (%)
DG (n=17)	Korelasyon katsayısı (r)	0,32	-0,34	-0,12	-0,08	-0,09	-0,16
	p değeri*	0,21	0,18	0,64	0,77	0,75	0,54
MACS-DG (n=17)	Korelasyon katsayısı (r)	0,253	-0,309	-0,239	-0,061	-0,13	0,41
	p değeri*	0,327	0,228	0,355	0,817	0,63	0,11

* p değerleri Spearman's rho testi kullanılarak değerlendirildi. $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edildi.

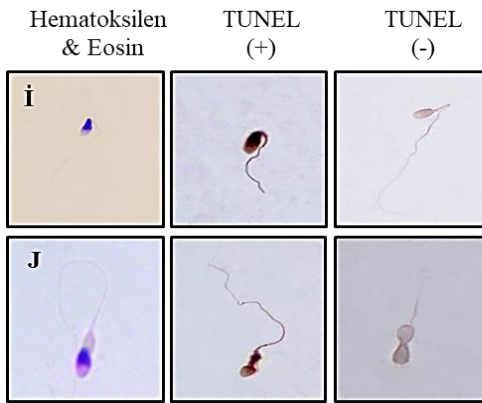
Normal sperm morfolojisi



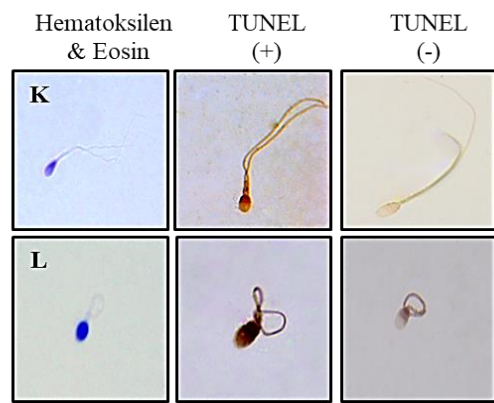
Baş anomalili sperm morfolojileri



Boyun anomalili sperm morfolojileri



Kuyruk anomalili sperm morfolojileri



Şekil 12. Hematoksilen&Eosin boyamasına göre benzer morfolojik anomaliye sahip spermelerin DNA fragmentasyonu varlığına göre TUNEL (+) ve TUNEL (-) görüntüleri (X100). **A:** Normal sperm morfolojisi, **B–I:** Baş anomalileri (**B:** Büyük baş, **C:** Küçük baş, **D:** Uzun baş, **E:** Yuvarlak baş, **F:** Vakuol, **G:** Piriform baş, **H:** Amorf baş, **I:** Pinhead), **İ, J:** Boyun anomalileri (**İ:** Kırık boyun, **J:** Sitoplazmik droplet), **K, L:** Kuyruk anomalileri (**K:** Çift kuyruk, **L:** Kıvrık kuyruk).

4.4 Fertilizasyon Başarısı ve Embriyo Kültürü Sonuçları

Gerçekleştirilen Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk Test'lerine göre bulgularımızın %95 güven aralığındaki dağılımı homojen olmadığından DG ve MACS-DG yöntemlerinin fertilizasyon, 2. ve 3. gün Grade 1 ve Grade 2 embriyoları ve blastosist oranları üzerine etkisi Mann–Whitney U testi ile değerlendirildi. Aynı hastanın DG ile yıkanan spermle mikroenjeksiyonu gerçekleştirilen oositleri (Grup 1) ile MACS+DG ile yıkanan spermle mikroenjeksiyonunun gerçekleştirildiği oositlerin (Grup 2) fertilizasyon ($p=0,54$), 2. gün Grade 1 ve 2 embriyo oranı (sırasıyla $p=0,97$, $p=0,19$), 3. gün Grade 1 ve 2 embriyo sayısı (sırasıyla $p=0,76$, $p=0,27$) ve 1. ve 2. kalite blastosist gelişim oranı (sırasıyla $p=0,59$, $p=0,76$) arasında anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 10).

Tablo 10. DG ve MACS yöntemlerinin mikroenjeksiyon başarısına etkisi.

	Grup 1 (n=17)		Grup 2 (n=17)		P değeri
	Ortalama (min-max)	Standart sapma	Ortalama (min-max)	Standart sapma	
Fertilizasyon (%)	73.07(0-100)	4.49	63.82 (33-100)	1.16	0.54
2. gün Grade 1 embriyo (%)	5.07 (0-33)	2.8	5.47 (0-33)	3.1	0.97
2. gün Grade 2 embriyo (%)	66.11(0-83)	6.33	56.58(0-100)	6.48	0.19
3. gün Grade 1 embriyo (%)	9.47 (0-40)	4.95	6.64(0-67)	3.6	0.76
3. gün Grade 2 embriyo (%)	62.00 (0-100)	7.31	51.47 (0-100)	7.46	0.27
Blastosist Grade 1	26.23(0-33)	4.66	21.11 (0-67)	3.76	0.59
Blastosist Grade 2	3.88(0-25)	2.65	1.47 (0-33)	1.47	0.76

*p değerleri Mann–Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edildi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada açıklanamayan infertilite tanısı ile ÜYT merkezinde ICSI programına alınan olgularda, semen materyalini dansite gradient yöntemi ile yıkamanın tek başına ve MACS yöntemi ile birlikte kullanımının fertilizasyon hızı ve kaliteli embriyo gelişimi üzerindeki etkisi ve iki yıkama metodunun DNA bütünlüğü korunmuş, kaliteli sperm elde etmedeki başarısı karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bu kapsamda, çalışmaya dahil edilen tüm olgularda erkek partnerden alınan semen materyali iki kısma ayrıldı ve iki farklı yıkama metodu (DG ve MACS-DG) ile yıkandı. Kadın partnerden toplanan kardeş (sibling) oositler iki gruba ayrıldı ve DG ve MACS-DG yöntemleri ile elde edilen spermiler ile mikroyenjeksiyonları gerçekleştirildi. Oositlerin fertilizasyon sonuçları takip edilerek, MACS-DG yönteminin fertilizasyon başarısını artırıcı etkisi değerlendirildi. Embriyo kültür sürecinde; embriyoların morfolojik kaliteleri takip edildi ve MACS-DG yönteminin embriyo kalitesi ve blastosist gelişim potansiyeli üzerine etkisi değerlendirildi. DG ve MACS-DG yöntemlerinin kaliteli sperm elde etmedeki etkinlikleri detaylı morfolojik değerlendirme yapılarak, apoptotik aktivasyon gösteren sperm eliminasyonunda etkinliği ise TUNEL yöntemi ile boyama sonrası DNA fragmentasyon oranı belirlenerek karşılaştırıldı.

Spermatogenez sürecinde kromatinin yeniden düzenlenmesi sürecinde gerçekleşen hatalar sperm DNA fragmentasyonuna ve ejakulatta immatür spermilerin görülmesine yol açmaktadır (Sakkas ve Alvarez, 2010). Sağlıklı bireylerde, spermatogenez sürecinde apoptoz yoluyla anormal germ hücreleri elimine edilir ve ejakulatta sperm DNA fragmentasyon oranı düşüktür. Bazı infertilite olgularında spermatogenez sırasında anormal sperm hücrelerinde yetersiz apoptoz nedeniyle ejakulatta DNA fragmentasyonuna sahip, abortif apoptozun gözlemlendiği spermilere rastlanabilmektedir (Sakkas ve ark., 1999). Açıklanamayan infertilite olgularında, semen parametreleri (konsantrasyon, motilite, total progressif motil sperm sayısı) normal sınırlarda olan erkek hastalarda sperm DNA fragmentasyon oranının normal

sınırların üzerinde olduğu rapor edilmiştir (Cinthia ve ark., 2014 Nunez-Calonge ve ark., 2012). Literatüre bakıldığında, IVF ve ICSI uygulamalarında klinik başarı üzerine etkinliği açısından sperm DNA fragmentasyon oranı olarak %9 ile %82 arasında oldukça geniş aralıkta değerler verilmiştir (Cissen ve ark., 2016). Bu çalışmada açıklanamayan infertilite olgularında semenin rutinde kullanılan dansite-gradient yöntemi ile yıkanması sonrasında $80,12 \pm 14,48$ oranında DNA fragmentasyon oranı görülmüştür. Yapılan araştırmalar ejakulatta gözlenen yüksek sperm DNA hasarı ve abortif apoptoz oranının fertilizasyon başarısızlığı, embriyo gelişimsel potansiyelinde azalma, düşük oranlarında ve konjenital malformasyonlarda artış gibi çeşitli olumsuz sonuçlarla korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Aitken ve Koppers, 2011; Beshay ve Bukulmez, 2012; Shamsi ve ark., 2011). Bu nedenle, açıklanamayan infertilite olgularında ÜYT uygulamaları sonrası başarıda kaliteli spermelerin seçilmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle bu çalışmada açıklanamayan infertilite olgularında MACS yönteminin semen kalitesini artırıcı etkisi değerlendirilmiştir.

ÜYT uygulamalarında semen, sperm motilite ve kapasitasyon oranını arttırmak, normal morfolojili, ileri progressif hareketli spermeleri elde etmek ve ejakulatta sperm DNA bütünlüğünün bozulmasındaki temel nedenlerden biri olan serbest oksijen radikallerini uzaklaştırmak için yıkanmaktadır. Dansite-gradient yöntemi, her ne kadar pahalı ve zahmetli bir yöntem olmasına, semen konsantrasyonu, progressif sperm sayısını azaltmasına rağmen, total motiliteyi, progressif motilite oranını, normal morfolojili ve viabl hücre sayısını arttırdığı ve apoptotik-nekrotik sperm sayısını azalttığı için öncelikli tercih edilen bir yıkama tekniğidir (Facio 2016; Ricci 2009; Karamahmutoğlu 2014). Bu çalışma kapsamına alınan olgular dansite-gradient yöntemi yıkanan semen materyali ile 2 siklus IUI başarısızlığı sonrası ICSI programına alınan olgulardır. Spermatozoa çekirdeği DNA fragmentasyonu oranının yüksekliği IUI başarısızlığı ile direkt ilişkilidir (Aziz ve Agarwal 2008; Duran 2001). Literatürde IUI başarısı için sperm DNA fragmentasyon indeksi %11,5-30 arasında verilmiştir (Oleszczuk ve ark., 2012; Thomson 2011; Vandekerckhove ve ark. 2016). Bu çalışmada dansite-gradient yöntemi ile yıkama sonrası DFİ oranı %50-96 arasında saptanmıştır. Bu oran literatürde belirtilen oranın

çok üzerindedir, bu çalışma kapsamına alınan olgulardaki IUI başarısızlığını açıklamaktadır.

Rutin sperm hazırlama teknikleri sedimantasyon ya da migrasyon temeline dayanarak ayrıştırılmakta ve sperm kalitesine motilite ve morfoloji özelliklerine göre karar verilmektedir (Akerlof ve ark., 1987; Le Lannou ve ark., 1988). Spermin DNA bütünlüğü göz önüne alındığında, bu yöntemler hasarlı hücrelerin eliminasyonunda yeterli görülmediği için, hücrelerin yüzeysel özelliklerine göre ayırımını sağlayan elektroforetik bir yöntem olan zeta potansiyel testi, membran maturasyona göre ayırım sağlayan hyaluronik asit bağlama kapasitesi analizi ve apoptotik aktivitesine göre ayırım sağlayan MACS gibi çeşitli sperm ayırma yöntemleri geliştirilmiştir (Mcdowell ve ark., 2014; Nasr-Esfahani ve ark., 2012; Said ve ark., 2006; Said and Land, 2011; Sakkas, 2013; Rappa ve ark., 2016). Zeta potansiyel testi ucuz ve yapılması kolay bir yöntem olmakla birlikte, oligozoospermik örneklerdeki başarısı sınırlıdır (Chan ve ark., 2006) ve spermelerde motilite kaybına yol açtığı gözlenmiştir (Chan ve ark., 2006; Kam ve ark., 2007; Kheirollahi-Kouhestani ve ark., 2009; Razavi ve ark., 2010). İnsan oositleri matür spermeleri doğal olarak bağlama yeteneğinde olan hyaluronik asit ile çevrilidir (Nijs et al., 2009; Tarozzi et al., 2009; Razavi et al., 2010). Hyaluronik asit tarafından bağlanan spermeler normal morfolojiye ve düşük DNA fragmentasyonuna sahiptir (Huszar et al., 2007; Jakab et al., 2005; Mokánszki et al., 2012; Mongkolchaipak and Vutyavanich, 2013). Ancak bu yöntemin fertilizasyon oranına, embriyo kalitesine ve gebelik oranlarına etkisi tartışmalıdır (Kovacs et al., 2011; Nijs et al., 2009; Parmegiani ve ark., 2010; Pregl Breznik et al., 2013; Tarozzi et al., 2009; Ye et al., 2006). Yedi farklı çalışmanın değerlendirildiği, 1437 ICSI döngüsü sonuçlarını irdeleyen bir metaanalizde hyaluronik asit bağlayıcı sperm seçim tekniğinin fertilizasyon ve gebelik oranlarında iyileşme sağlamadığı rapor edilmiştir (Beck-Fruchter ve ark., 2016). Hücrelerde normal koşullarda plazma membranının iç yaprağında bulunan fosfotidilserin apoptozun erken evrelerinde plazmanın dış yaprağına transloke olur (Martin ve ark., 1995). Fosfotidilserin translokasyonu, apoptotik sperm hücrelerinin tanınmasını ve fagositoz yoluyla uzaklaştırılmalarını sağlamaktadır (Makker ve ark., 2008). Bu bilgiye dayandırılarak geliştirilen MACS yönteminde, fosfotidilserine yüksek afinite ile bağlanabilme yeteneğine sahip olan Annexin V manyetik mikroküreler ile

birleştirilir ve bir manyetik alana maruz bırakılır. Böylece apoptotik (Annexin V (+) fraksiyon) ve apoptotik olmayan (Annexin V (-) fraksiyon) sperm, canlılığından ödün vermeksizin elektroforetik olarak ayrılabilir (Ainsworth ve ark., 2005). MACS yönteminin literatürde belirtilen avantajları dikkate alınarak, bu çalışma kapsamında DNA hasarlı spermelerin eliminasyonunda etkinliği değerlendirilmiştir.

Araştırılan sperm hazırlama yöntemlerinin ise yararlığı hakkında farklı görüşlerin ortaya çıkmasında %DFİ oranı saptanırken kullanılan testlerin hassasiyetinin farklı olmasının da etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Cissen ve ark., IVF ve ICSI uygulaması sonucunda oluşacak gebelik şansını saptayabilmek amacıyla gerçekleştirdikleri sistematik inceleme ve meta-analiz de olguların sperm % DFİ oranlarının saptanmasında TUNEL, Comet, SCSA ve SCD testlerinin etkinliğini karşılaştırmışlar ve TUNEL ve Comet analizlerinin DNA kırıklarının saptanmasında SCSA ve SCD testlerine göre daha yüksek spesifiteye sahip olduklarını ifade etmişlerdir (Cissen ve ark., 2016). Bu nedenle bu çalışmada DG ve MACS-DG yöntemleri ile elde edilen sperm TUNEL analizi ile değerlendirilerek her bir olguya ait % DFİ'i hesaplandı.

Sağlık Bakanlığının öngördüğü şekilde, total ileri progressif motil sperm sayısının 5 milyon ve üzerinde olduğu infertil çiftlerde 2 siklus IUI uygulamasının başarısız olması durumunda ÜYT uygulamalarına geçilmektedir (www.sgk.gov.tr). Günümüzde, açıklanamayan infertilite olgularında IVF-ICSI uygulamalarının karşılaştırıldığı çalışmalarda ICSI başarısının daha ön planda olması dikkate alınarak (Cissen ve ark. 2016; Karamahmutoglu ve ark.; 2014), çoğu merkezde ÜYT yöntemi olarak ICSI protokolü tercih edilmektedir. Literatüre bakıldığında ağırlıklı olarak IUI olguları olmakla birlikte (Khalid ve Qureski 2011b; Romany ve ark. 2010), ICSI uygulamalarında MACS yönteminin etkinliğini laboratuvar ve klinik parametreler açısından değerlendiren çalışmalar mevcuttur. Tek başına veya MACS yöntemi ile kombine yıkama yöntemlerinin laboratuvar parametrelerine etkisini değerlendiren bir çalışmada MACS yöntemi ile sperm hazırlamanın, DG yöntemine kıyasla normal morfolojili sperm sayısında artışa yol açtığını, bununla birlikte DG işlemini takiben uygulanan MACS ve DG+swim-up tekniği birbiriyle karşılaştırıldığında ise sperm DNA fragmentasyonu, motilite ve morfoloji üzerindeki etkisi açısından DG-Swim-up uygulamasının daha etkin olduğunu rapor etmişlerdir (Nadalini ve ark., 2014)

MACS ardından DG daha etkili yapılan çalışmalarda sperm yıkama yöntemi olarak tek başına MACS yöntemi (Alvarez Sedo ve ark., 2010; Dirican ve ark., 2008; Gil ve ark., 2013; Troya ve Zorrilla, 2015; Van Thillo ve ark., 2011) MACS sonrası swim-up (Nadalini ve ark., 2014; Romany ve ark., 2010) veya DG sonrası MACS (Khalid ve Qureshi, 2011a,b; Rawe ve ark., 2010;) yöntemleri kullanılmıştır. Ancak, literatürde MACS'ın standart yöntemlerle kombine edildiği sperm hazırlama yöntemlerinin %DFİ üzerindeki etkinliğini araştıran birkaç çalışma bulunmaktadır (Berteli ve ark., 2017; Bucar ve ark., 2015; Dirican ve ark. 2008; Nadalini ve ark., 2014; Tavalae ve ark., 2012). Bu makaleler MACS yönteminin tek başına ya da diğer yıkama metodlarıyla kombine kullanımının semen parametrelerine etkinliği ile ilgili ortak bir görüş oluşturmamaktadır. Dirican ve arkadaşları ile Tavalae ve arkadaşlarının sonuçlarını destekler nitelikte, bu çalışmada da DG yöntemi ile yıkamanın sperm konsantrasyonu, total progressif sperm sayısı ve normal morfolojili sperm oranı açısından MACS-DG yöntemine göre daha etkin olduğu görülmüştür. DNA bütünlüğü bozulmuş spermelerin eliminasyonunda MACS-DG yönteminin (%) DFİ oranını %39,12 oranında azalttığı görülmüştür ($p<0,01$). Ayrıca vakuol içeren sperm oranının azalması ICSI'de DNA bütünlüğünü koruyan, normal morfolojili sperm sayısını ve seçilme şansını arttırmıştır.

Literatürde morfoloji ile DNA fragmentasyon indeksinin korelasyonunun değerlendirildiği çalışmalarda sperm nükleusunda görülen vakuol sayısının ve büyüklüğünün DNA fragmentasyon oranı ile korele olduğunu vurgulayan çalışmalar mevcuttur (Hammoud 2015, Pastuszek 2017). Sperm DNA bütünlüğünün ve nüklear vakuollerin korelasyonunun değerlendirildiği farklı bir çalışmada normal baş morfolojisine sahip spermelerde vakuol varlığının sperm DNA fragmentasyonu açısından anlamlı olduğu, ağır teratozoospermik olgularda vakuol varlığının DNA bütünlüğünü koruyan spermi ayırdetmek açısından anlamlı olmadığı rapor edilmiştir (Lavalpe 2015). Bu çalışmada Kruger kriterlerine göre (Kruger ve ark., 1986) yıkama öncesi ortalama normal morfolojili sperm oranı %1 ve 12 arasında olan semen örnekleri çalışıldı. MACS uygulamasının vakuol içeren sperm konsantrasyonunu azaltması ve buna paralel olarak sperm DNA fragmentasyon oranının da %40'a yakın oranda azalmış olması literatürdeki nüklear vakuol-DNA

fragmentasyonu korelasyonunu destekler niteliktedir. MACS+DG yöntemi her iki parametreyi de olumlu yönde değiştirmiştir.

Literatürde MACS yönteminin laboratuvar ve klinik parametrelere etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalara bakıldığında; bir hayvan çalışmasında, semen materyalleri DG yöntemi ile yıkanan erkek farelerin spermleri matür ve immatür fraksiyonlarına ayrılmış ve matür fraksiyonları işlem uygulamadan, immatür fraksiyonu ise MACS işlemi sonrası artifisyal inseminasyonda kullanılmıştır. MACS grubunda matür sperm kullanılan gruba kıyasla gebelik oranında ve implantasyon sayısında anlamlı artış rapor etmişlerdir (Khalid ve Qureshi, 2011a). Aynı ekip, IUI uygulanacak açıklanamayan infertilite olgularında 3 döngü boyunca alınan semen örnekleri yalnız DG veya kombine DG-MACS yöntemini karşılaştırmışlardır. Açıklanamayan infertilite olgularında özellikle IUI'nın 1. döngüsünde, MACS yönteminin DG yöntemine göre gebelik ve doğum oranını arttırabileceğini belirtmişlerdir (Khalid ve Qureshi, 2011b). IUI sikluslarında MACS etkinliğini değerlendiren farklı bir çalışmada swim-up ve swim-up-MACS yönteminin sperm seçimindeki başarısı karşılaştırılmış ve iki yöntemin gebelik oranına etkisi arasında anlamlı bir farklılık olmadığını rapor etmişlerdir (Romany ve ark. 2010). IUI uygulamalarında oositi fertilize eden spermin testiküler ve epididimal matürasyonunu tamamlamış olması, dişi genital sisteme girişi ile birlikte kapasitasyonunun gerçekleşmesi gerekmektedir (Çolgar, 2006). Ancak bu matürasyon süreçlerini başarıyla tamamlayan sperm oositi fertilize etme potansiyelini kazanacaktır ve dolayısıyla, ICSI'den farklı olarak, IUI'da spermin doğal seçilimi söz konusudur. Bu nedenle hasarlı spermin MACS ile eliminasyonu fertilizasyon ve gebelik oranını arttırmaktadır. Benzer etkinlik IVF uygulamalarında da görülmektedir (Gil ve ark; 2013). ICSI uygulamalarında MACS yönteminin fertilizasyon başarısını (Van Thillo ve ark. 2011), implantasyon ve gebelik oranını arttırdığını (Alvarez Sedo ve ark., 2010; Dirican ve ark. 2018; Rawe ve ark., 2010; Troya ve Zorrilla 2015; Van Thillo ve ark. 2011), ektopik gebelik ve abortus oranını azalttığını (Van Thillo ve ark. 2011) rapor eden çalışmalar mevcuttur. ICSI protokolü uygulanan 499 olgunun değerlendirildiği bir meta-analizin sonucunda MACS yönteminin DG ve swim-up yöntemlerine göre gebelik oranlarını anlamlı şekilde arttırdığı rapor edilmiştir (Gil ve ark. 2013). Bunun yanında embriyo kalitesini

etkilemediğini (Nadalini ve ark., 2014; Troya ve Zorrilla, 2015), fertilizasyon başarısına etkisinin olmadığını ve abortus insidansını etkilemediğini vurgulayan çalışmalar da mevcuttur (Alvarez Sedo ve ark., 2010). Bu çalışmalarda MACS tekniği farklı semen yıkama protolları ile birlikte ya da tek başına uygulanmış ve pratik uygulamada kullanımı ile ilgili ortak bir görüş oluşmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmalarda infertilite etyolojisi açısından bir standardizasyon yapılmamış ve oosit faktörü ekarte edilmemiştir.

Bu çalışmada konsantrasyon ve motilite açısından normal değerlerde, fakat normal morfoloji oranı normal değerlerin altında örneklerde tercih edilen yıkama metodu olan dansite-gardient yöntemi ile MACS+DG yöntemi karşılaştırılarak, rutin yaklaşımların yeterliliği değerlendirilmek istenmiştir. İnfertilite sebebi olarak yalnızca açıklanamayan infertilite grubunun çalışmaya katılması ve fertilizasyon ve embriyo kalitesine etkisi açısından oosit faktörünün etkisini ortadan kaldırmak amacıyla kardeş (sibling) oositlerin sonuçlarının karşılaştırılması bu çalışmanın olumlu yönüdür. Bu çalışmada DG ve MACS-DG yıkama yöntemlerinin ICSI sikluslarında fertilizasyon başarısı ve embriyo kalitesine etkisinde bir fark oluşturmaması, normal şartlarda ICSI uygulamalarında sperm seçiminde ilk kriterin sperm motilite ve morfolojisine göre olması ve fertilizasyonu gerçekleştirecek olan spermin doğal seçiliminin ekarte edilmesi şeklinde açıklanabilir.

ÜYT uygulamalarında sperm DNA fragmantasyonu fertilizasyon başarısızlığı, embriyo gelişim arresti, implantasyon ve gebelik oranlarının düşük olmasının sebepleri arasında görülmektedir (Frydman ve ark., 2008; Lewis ve ark., 2005; Seli ve ark., 2004; Smith ve ark., 2006; Simon ve ark., 2010; Virant-Klun ve ark., 2002; Speyer ve ark., 2010). DNA hasarına sahip bir sperm hücresi ile oositin fertilizasyonu gerçekleşebilse de embriyolar gelişim süreçleri sağlıklı şekilde gerçekleşmez (Avendano ve ark., 2010; Sakkas ve ark., 2010). Özellikle 4-8 blastomerli aşamada embriyonik genomik aktivasyonun başlaması ile birlikte embriyolar gelişimsel süreçte duraksamalar ve arrestler görülür (Artley, PR. Braude., 1992; Braude ve ark., 1988; Baran ve ark. 1995; Chandolia ve ark., 1999; Christians ve ark., 1994; Memili ve ark., 1999; Taylor ve ark., 1997). Sperm % DFİ oranının nükseden gebelik kayıpları ve düşük yapma oranı ile pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur (Agarwal ve Said, 2003; Zidi-Jrah ve ark., 2016).

Fertilize oositin embriyonik gelişim süreçlerini sağlıklı şekilde ilerletebilmesi için sperm %DFİ' nin < %30 olması gerekliliği (Trisini ve ark., 2004; Bungum ve ark., 2007) vurgulansa da, halen sperm DNA fragmentasyon indeksinin kabul edilmiş bir cut-off değeri yoktur (Cissen ve ark. 2016).

Rutin uygulamada sperm DNA bütünlüğünü değerlendiren testlerin kullanımı için data yetersizdir. Yapılan çalışmalar tedavi sonuçlarını belirleyici nitelikte değildir. Bu dataların belirsizliğinin nedeni; çalışmaların çoğunun level 2 seviyesinde olması, örnek sayılarının kısıtlı olması, değişken hasta popülasyonunun değerlendirilmiş olması, kadın faktörünün kontrolünün eksik olması, metodların farklılığı ve zayıf istatistiksel metodolojilerdir (Hornstein, 2016). Bu çalışmada, her ne kadar klinik sonuçlar değerlendirme kapsamına alınmasa da, rutin klinik uygulamalarda sperm DNA bütünlüğünün değerlendirilmediği açıklanayan infertilite olgularında kullanılan yıkama yönteminin semen parametrelerine, fertilizasyon başarısına ve embriyo kalitesine etkisi değerlendirildi. Örnek sayısı kısıtlı olmakla birlikte, aynı infertilite alt grubuna ait hastaların oosit ve semen örneklerin sonuçlarının karşılaştırılmış olması, oosit kalitesinin standardize edilmesi ve iki yıkama metodunun sibling oositlere uygulanması sayesinde olası kadın faktörünün sonuca olumsuz etkisinin ekarte edilmesi çalışmanın olumlu yönleridir. DG yöntemiyle yıkama sonrası %50-96 aralığında olan sperm DFİ'nin, MACS yönteminin yıkama protokolüne eklenmesiyle %39,12 oranında azaldığı görüldü.

Sonuç olarak MACS yöntemi dansite-gradient yöntemi ile kombine edildiğinde sperm DNA fragmentasyon oranını ve DNA fragmentasyonu ile korelasyon gösteren nüklear vakuol içeren sperm oranını azaltmaktadır. Bu yöntemin fertilizasyon, implantasyon ve klinik gebelik başarısına etkisi fertilizasyonu gerçekleştirecek spermin doğal seçiliminin sözkonusu olduğu IUI ve IVF uygulamalarında daha etkin olacağı, ICSI sikluslarında DNA bütünlüğü bozulmuş spermlerin eliminasyonunun fertilizasyon başarısını ve embriyo kalitesini etkilemediği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Abd-Elkreem YM (2016) Sperm preparation techniques. Health & Medicine
<http://www.slideshare.net/Yasminmagdi/sperm-preparation-techniques>

Agarwal A, Majzoub A, Esteves SC et al (2016) Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. Transl Androl Urol 5: 935-950.

Agarwal A, Said TM (2003) Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod Update 9: 331-345.

Agarwal A, Sekhon LH (2011) Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: Is it justified? Indian J Urol 27: 74-85.

Ainsworth C, Nixon B & Aitken RJ (2005) Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. Hum Reprod 20: 2261-2270.

Aitken RJ & Koppers AJ (2011) Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. Asian J Androl 13: 36-42.

Aitken RJ, Baker HW (1995) Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans? Human Reproduction 10: 1736-1739.

Aitken RJ, Clarkson JS (1988) Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J. Androl 9: 367-376.

Aitken RJ, Krausz C (2001) Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122(4): 497-506.

Aitken RJ1, Buckingham DW, Fang HG et al (1993) Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J Androl* 14(2): 132-141

Akerlof E, Fredricson B, Gustafsson O et al (1987) Comparison between a swim-up and a Percoll gradient technique for the separation of human spermatozoa. *Int J Androl* 10: 663-669.

Aksglaede L, Juul A (2013) Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol* 168: R67–76.

Alexander NJ (1982) Male evaluation and semen analysis. *Clin Obstet Gynecol* 25: 463–82.

Allamaneni SS, Agarwal A, Rama S et al (2005) Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatazoa. *Asian J Androl* 7: 86–92.

Almeida C, Sousa M, Barros A. (2009) Phosphatidylserine translocation in human spermatozoa from impaired spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 19(6): 770–777.

Alrabeeah K, Yafi F, Flageole C et al (2014) Testicular sperm aspiration for nonazoospermic men: sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Urology* 6: 1342-1346.

Alvarez Sedo C, Uriondo H, Lavolpe M et al (2010) Clinical outcome using non-apoptotic sperm selection for ICSI procedures: report of 1 year experience. *Fertil Steril* s: 232. DOI:10.1016/j.fertnstert.2010.07.902.

Artley JK, Braude PR, & Johnson MH (1992) Gene activity and cleavage arrest in human pre-embryos. *Hum Reprod* 7: 1014-1021.

Asghar W, Velasco V, Kingsley JL et al (2014) Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Adv Healthc Mater* 3: 1671-1679.

Avendano C, Franchi A, Duran H et al (2010) DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertil Steril* 94: 549-557.

Aziz N, Agarwal A (2008) Evaluation of sperm damage: beyond the World Health Organization criteria. *Fertil Steril* 90: 484-485.

Balercia G, Mosca F, Mantero F et al (2004) Coenzyme Q(10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertil Steril* 81: 93-98.

Baran V, J. Vesela, P. Rehak et al (1995) Localization of fibrillarin and nucleolin in nucleoli of mouse preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 40: 305-310.

Barazani Y, Katz BF, Nagler HM et al (2014) Lifestyle, environment, and male reproductive health. *Urol Clin North Am* 41: 55-66.

Barroso G, Morshedi M, Oehninger S (2000) Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15: 1338-1344.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F et al (2002) Realtime fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 23: 1-8.

Beck-Fruchter R, Shalev E, Weiss A (2016) Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 32: 286-98.

Berteli TS, Da Broi MG, Martins WP et al (2017) Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa. *Andrology* 5: 776-782.

Beshay VE & Bukulmez O (2012) Sperm DNA damage: how relevant is it clinically? *Curr Opin Obstet Gynecol* 24: 172-179.

Beydola T, Sharma RK, Lee W et al (2013) Sperm preparation and selection techniques. In *Male Infertility Practice* 244-251.

Bhasin S (2007) Approach to the infertile man. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1995-2004.

Boomsma CM, Boomsma CM, Heineman MJ et al (2004) Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3: CD004507.

Braude P, V. Bolton, & S. Moore (1988) Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332: 459-461

Bronson (1982) Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Archives of Andrology* 9: 61.

Bucar S, Gonçalves A, Rocha E et al (2015) Sá R. DNA fragmentation in human sperm after magnetic-activated cell sorting. *J Assist Reprod Genet* 1: 147-154.

Bungum M, Humaidan P, Axmon A et al (2007) Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod* 22: 174-179.

Burkman LJ¹, Coddington CC, Franken DR (1988) The hemizona assay (HZA): development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to the human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertil Steril* 1988 49: 688-697.

Chan PJ, Jacobson JD, Corselli JU et al (2006) A simple zeta method for sperm selection based on membrane charge. *Fertil Steril* 85: 481-486.

Chandolia RK, M. R. Peltier, W. Tian, & P. J. Hansen (1999) Transcriptional control of development, protein synthesis, and heat-induced heat shock protein 70 synthesis in 2-cell bovine embryos. *Biol Reprod* 61: 1644-1648

Chi HJ, Kwak SJ, Kim SG et al (2016) Efficient isolation of sperm with high DNA integrity and stable chromatin packaging by a combination of density-gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting. *Clin Exp Reprod Med* 43(4): 199-206.

Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M et al (2006) Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* 27 :53-59.

Christians E, V. H. Rao, & J. P. Renard (1994) Sequential acquisition of transcriptional control during early embryonic development in the rabbit. *Dev Biol* 164: 160-172

Cinthia M Feijio, Sandro C (2014) Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *ANDROFERT, Andrology and Human Reproduction Clinic, Referral Center for Male Reproduction, Campinas, São Paulo, Brazil* DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.09.002.

Cissen M, Wely MV, Scholten I et al (2016) Measuring Sperm DNA Fragmentation and Clinical Outcomes of Medically Assisted Reproduction: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One. 11: e 0165125.

Clarke GN (1982) Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. In: Bratanov K, ed. Immunology of reproduction. Sofia, Bulgarian Academy of Sciences Press: 482-485.

Clarke GN, Elliott PJ, Smaila C. (1985) Detection of sperm antibodies in semen using the Immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology 7: 118-123.

Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R (2013) The epidemiology and etiology of azoospermia. Clinics (Sao Paulo) 1:15-26.

Cocuzza, M, Sikka, SC., Athayde, KS. et al (2007) Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. Int. Braz. J. Urol 33: 603-621.

Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ (1998) Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. Human Reproduction Update 4: 73-82.

Cohlen B, Cantineau A, D'Hooghe T et al (2005) Multiple pregnancy after assisted reproduction. Lancet 366 : 452-453; author reply 453-454.

Collins RL (1991) Recent progress in Gonadotrophin Therapy, (in) Ovulation Induction, Springer-Verlag, New York, Berlin, London p: 74

Cooper TG, Yeung CH (1998) A flow cytometric technique using peanut agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa. J Androl 19: 542-550.

Couture M, Ulstein M, Leonard J (1976) Improved staining method for differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid. *Andrologia* 8: 61-66.

Çolgar U (2006) *Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite*. 1. Baskı, İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul, Türkiye s: 167.

Delbes G, Hales BF, Robaire B. (2010) Toxicants and human sperm chromatin integrity. *Mol Hum Reprod* 16: 14–22.

Della Giovampaola C, Flori F, Sabatini L et al (2001) Surface of human sperm bears three differently charged CD52 forms, two of which remain stably bound to sperm after capacitation. *Mol Reprod Dev* 60: 89–96.

Dirican EK, Ozgun OD, Akarsu S et al (2008) Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J Assist Reprod Genet* 25: 375-381.

Dohle GR, Diemer T, Kopa Z et al (2012) European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on vasectomy. *Eur Urol* 61(1): 159-163

Duran HE, Morshedi M, Kruger T et al (2002) Intrauterine insemination: a systematic review on determinants of success. *Hum Reprod Update* 8: 373-384.

Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J et al (2006) Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian J Androl* 8: 11-29.

Esteves SC (2014) Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility. *Androfert, Referral Male Centre for Reproduction. Health & Medicine*

Esteves SC, Gosálvez J, López-Fernández C et al (2015) Diagnostic accuracy of sperm DNA degradation index (DDSi) as a potential noninvasive biomarker to identify men with varicocele-associated infertility. *Int Urol Nephrol* 47: 1471-1477.

Esteves SC, Sánchez-Martín F, Sánchez-Martín P et al (2015) Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertil Steril* 104: 1398-1405.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D et al (1999) Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 14: 1039-1049.

Ezeh UI, Martin M, Cooke ID et al (1998) Correlation of testicular pathology and sperm extraction in azoospermic men with ejaculated spermatids detected by immunofluorescent localization. *Human Reproduction* 13: 3061-3065.

Fácio CL, Previato LF, Machado-Paula LA et al (2016) Comparison of two sperm processing techniques for low complexity assisted fertilization: sperm washing followed by swim-up and discontinuous density gradient centrifugation. *JBRA Assist Reprod* 20: 206-211

Fénichel P , Hsi BL , Farahifar D et al (1989) Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. *J Reprod Fertil* 2: 699-706.

Franken DR, Bastiaan HS, Oehninger SC (2000) Physiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *J Assist Reprod Genetic* 17: 374-378.

Frydman N, Prisant N, Hesters L et al (2008) Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 89: 92-97.

Ghumman S, Adiga SK, Upadhya D et al (2011) Combination of swim-up and density gradient separation methods effectively eliminate DNA damaged sperm J *Turk Ger Gynecol Assoc* 12: 148-152.

Gil M, Sar-Shalom V, Melendez Sivira Y et al (2013) Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 30: 479-485.

Giuliani V, Pandolfi C, Santucci R et al (2004) Expression of gp20, a human sperm antigen of epididymal origin, is reduced in spermatozoa from subfertile men. *Mol Reprod Dev* 69: 235-240.

Glander HJ, Schaller J (1999) Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod* 5: 109-115.

Glander HJ, Schiller J, Suss R et al (2002) Deterioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lyso-phosphatidylcholines. *Andrologia* 34: 360-366.

Gosálvez J, López-Fernández C, Fernández JL et al (2015) Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: Ten frequently asked questions. *Journal of Reproductive Biotechnology and Fertility* 4: 1-16.

Grunewald S, Paasch U (2013) Sperm selection for ICSI using annexin V. *Methods Mol Biol* 927: 257-262.

Grunewald S, Paasch U, Glander HJ (2001) Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. Cell Tissue Bank 2: 127-133.

Hamada A, Esteves SC, Agarwal A (2011) Unexplained male infertility potential causes and management. Human Andrology 1: 2-16.

Hamada A, Esteves SC, Nizza M et al (2012) Unexplained male infertility: diagnosis and management. Int Braz J Urol 38: 576-594.

Henkel R (2012) Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. Asian J Androl 14(2): 260-269.

Homyk M, Anderson DJ, Wolff H (1990) Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. Fertility and Sterility 53: 323-330.

Hornstein MD (2016) State of the ART: Assisted Reproductive Technologies in the United States. Reprod Sci. 23: 1630-1633.

<http://fertilitysolutions.com.au/so-your-sperm-morphology-is-low-should-you-be-worried/> (15.04.2017)

Hull ME, Moghissi KS, Magyar DM et al (1986) Correlation of serum estradiol levels and ultrasound monitoring to assess follicular maturation. Fertil Steril 46: 42-45.

Huszar G, Ozenci CC, Cayli S et al (2003) Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. Fertil Steril 3: 1616-1624.

Huszar G, Sbarcia M, Vigue L et al (1997) Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. Biol Reprod 56: 1020-1024.

Huszar, G, Jakab A, Sakkas D et al (2007) Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. Reprod Biomed 14: 650-663.

Ishijima SA, Okuno M, Mohri H (1991) Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. Int J Androl 14: 340-347

Jakab A, Sakkas D, Delpiano E et al (2005) Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. Fertil Steril 84: 1665-1673.

Jarow J, Sigman M, Kolettis PN et al (2011) The optimal evaluation of the infertile male: best practice statement reviewed and validity confirmed Available online: <https://www.auanet.org/education/guidelines/maleinfertility-d.cfm> (15.04.2017)

Jarow JP (2007) Diagnostic approach to the infertile male patient. Endocrinol Metab Clin North Am 36: 297-311.

Jayaraman V, Upadhy D, Narayan PK et al (2012) Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. J Assist Reprod Genet 29: 557-563.

Johanisson E, Campana A, Luthi R et al (2000) Evaluation of “round cells” in semen analysis: a comparative study. Human Reproduction Update 6: 404-412.

Kam TL, Jacobson JD, Patton WC et al (2007) Retention of membrane charge attributes by cryopreserved-thawed sperm and zeta selection. *J Assist Reprod Genet* 24: 429-434.

Karamahmutoğlu H, Erdem A, Erdem M et al (2014) The gradient technique improves success rates in intrauterine insemination cycles of unexplained subfertile couples when compared to swim up technique; a prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 2014 31: 1139-1145.

Kasai T, Ogawa K, Mizuno K et al (2002) Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential. *Asian J Androl* 4: 97-103.

Ketabchi AA (2016) Intracytoplasmic Sperm Injection Outcomes with Freshly Ejaculated Sperms and Testicular or Epididymal Sperm Extraction in Patients with Idiopathic Cryptozoospermia. *Nephrourol* 8: 41375.

Khalid S & Qureshi I (2011) Effect of magnetic selected sperm on fertilization and embryo development: an animal model study. *Fertil Steril* 96: S169.

Khalid S & Qureshi I (2011) Pregnancy rate improves in couples with unexplained infertility following intrauterine insemination (IUI) with magnetically selected non-apoptotic sperms. *Fertil Steril* 96: S25.

Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalae M et al (2009) Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. *Hum Reprod* 24: 2409-2416.

Kim EK, Kim EH, Kim EA et al (2015) Comparison of the effect of different media on the clinical outcomes of the density-gradient centrifugation/swim-up and swim-up methods. *Clin Exp Reprod Med* 42: 22-29.

King TFJ, Hayes FJ (2012) Long-term outcome of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19: 204–210.

Kishi K, Ogata H, Ogata S (2015) Frequency of Sperm DNA Fragmentation According to Selection Method: Comparison and Relevance of a Microfluidic Device and a Swim-up Procedure. *J Clin Diagn Res* 9(11): QC14-QC16.

Kovacs P, Kovats T, Sajgo A et al (2011) The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J. Assist. Reprod Genet* 28: 49-54.

Kremer J, Jager S (1980) Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon, with special regard to immunoglobulin class and antigenreactive sites. *International Journal of Andrology* 3: 143-152.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FS et al (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 46: 1118-1123.

Lambalk CB, Leader A, Olivennes F et al (2006) Treatment with the GnRH antagonist ganirelix prevents premature LH rises and luteinization in stimulated intrauterine insemination: results of a double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Hum Reprod* 21: 632-639.

Le Lannou D, Blanchard Y (1988) Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 84: 551-556.

Lee TH, Liu CH, Shih YT (2010) Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod.* 25(4): 839-846.

Lewis SE (2007) Is sperm evaluation useful in predicting human fertility? *Reproduction* 134: 31-40.

Lewis SE, Aitken RJ (2005) DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res* 322: 33-41.

Lewis SE, John Aitken R, Conner SJ et al (2013) The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. *Reprod Biomed* 27: 325-337.

Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH et al (2008) Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 90: 352-359.

Liu DY, Baker HW (1994) Acrosome status and morphology of human spermatozoa bound to the zona pellucida and oolemma determined using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Hum Reprod* 9: 673-679.

Liu DY, Baker HW (1996) A simple method for assessment of the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction. *Hum Reprod*. 11: 551-557.

Liu DY1, Baker HW (1992) Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril* 58: 1178-1184.

Liu DY1, Clarke GN, Lopata A et al (1989) A sperm-zona pellucida binding test and in vitro fertilization. *Fertil Steril* 52: 281-287

Lukaszuk K, Wcislo M, Liss J et al (2015) First Pregnancy, Somatic and Psychological Status of a 4-Year-Old Child Born following Annexin V TESA Sperm Separation. *AJP Rep* 5: 105-108.

Luppi S, Martinelli M, Giacomini E et al (2015) Comparative proteomic analysis of spermatozoa isolated by swim-up or density gradient centrifugation. *Reprod Biol Endocrinol* DOI: 10.1186/s12958-015-0027-y.

Makker K, Agarwal A & Sharma RK (2008) Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction. *Indian J Exp Biol* 46: 491-497.

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ et al (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182: 1545-1556.

McCloskey KE, Chalmers JJ, Zborowski M (2003) Magnetic cell separation: characterization of magnetophoretic mobility. *Anal Chem* 75: 6868-6874.

McDowell S, Kroon B, Ford E et al (2014) Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction. CD010461, <https://doi.org/10.1002/14651858.cd010461> (29.01.2017)

McLachlan RI (2013) Approach to the patient with oligozoospermia. *J Clin Endocrinol Metab* 98(3): 873-880.

Memili E, & N. L. First (1999) Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biol Reprod* 61: 1198-1207

Memili E, Dominko T, & NL (1998) First: Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 51: 36-41

Menkveld R, Kruger TF (1990) Basic semen analysis. Human spermatozoa in assisted reproduction. Baltimore, Williams & Wilkins: 68-84.

Merchant R, Gandhi G, Allahbadia GN (2011) In vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection for male infertility. Indian J Urol 27: 121–132.

Mokánszki A, Molnár Z, Ujfalusi A et al (2012) Correlation study between sperm concentration, hyaluronic acid-binding capacity and sperm aneuploidy in Hungarian patients. Reprod Biomed Online 25: 620-626. DOI: 10.1016/j.rbmo.2012.08.003.

Mongkolchaipak, S, Vutyavanich T (2013) No difference in highmagnification morphology and hyaluronic acid binding in the selection of euploid spermatozoa with intact DNA. Asian J Androl 15: 421-424.

Morshedi M, Duran HE, Taylor S et al. (2003) Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study. Fertility and Sterility 79: 1625-1632.

Mortimer D (1994) Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. Reprod Fertil Dev 6: 25-31.

Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J et al (2004) Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. Hum Reprod 19: 129-138.

Nadalini M, Tarozzi N, Di Santo M & Borini A (2014) Annexin V magnetic activated cell sorting versus swim-up for the selection of human sperm in ART: is the new approach better then the traditional one? J Assist Reprod Genet 31: 1045-1051.

Nallella KP, Sharma RK, Aziz N et al (2006) Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. Fertil Steril 85: 629-634.

Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR & Tavalae M (2012) New era in sperm selection for ICSI. *Int J Androl* 35: 475-484.

Nijs M, Creemers E, Cox A (2009) Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay as predictors for assisted reproductive outcome. *Reprod. Biomed Online* 19: 671-684. DOI: 10.1016/j.rbmo.2009.07.002.

Nuñez-Calonge R, Caballero P, López-Fernández C et al (2012) An improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod Sci* 19: 1163-1168

Oehninger S, Morshedi M, Weng SL et al (2003) Presence and significance of somatic cell apoptosis markers in human ejaculated spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 7: 469-476.

Oleszczuk K, Augustinsson L, Bayat N (2012) Prevalence of high DNA fragmentation index in male partners of unexplained infertile couples. *Andrology* 1(3): 357-360

Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E et al (2000) Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril* 74: 245–250.

ORC Macro and the World Health Organization (2004) World Health Organization. Infecundity, Infertility, and Childlessness in Developing Countries. Calverton, Maryland, USA

Padubidri D (2011) Shaw's Textbook of Gynaecology. 15e. ISBN 9788131225486 p. 204.

Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T et al (2009) ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med* 27: 191-201.

Park YS, Lee SH, Lim CK et al (2015) Effect of testicular spermatozoa on embryo quality and pregnancy in patients with non-obstructive azoospermia. *Syst Biol Reprod Med* 61: 300-306.

Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S et al (2010) Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertil Steril* 93(2): 598-604.

Pastuszek E, Kiewisz J, Skowronska P et al (2017) An investigation of the potential effect of sperm nuclear vacuoles in human spermatozoa on DNA fragmentation using a neutral and alkaline Comet assay. *Andrology* 5: 392-398

Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM et al (2002) Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod* 17: 362-369.

Preg Breznik B, Kovac'ic' B, Vlaisavljevic' V (2013) Are sperm DNA fragmentation, hyperactivation, and hyaluronan-binding ability predictive for fertilization and embryo development in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection? *Fertil. Steril.* 99: 1233-1241.

Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC et al (2016) Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today?. *Biotechnol Adv* 34: 578-587.

Rawe VY, Boudri HU, Alvarez Sedo C et al (2010) Healthy baby born after reduction of sperm DNA fragmentation using cell sorting before ICSI. *Reprod Biomed Online* 20: 320-323.

Razavi SH, Nasr-Esfahani MH, Deemeh MR et al (2010) Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. *Andrologia* 42: 13-19.

Ricci G, Perticarari S, Boscolo R (2009) Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril* 91(2): 632-638.

Romany L, Meseguer M, Garcia-Herrero S et al (2010) Magentic activated sorting selection (MACS) of nonapoptotic sperm (NAS) improves pregnancy rates in homologous intrauterine insemination (IUI). *Fertil Steril* 94: S14. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.07.391>

Rossi AG, Aitken RJ (1997) Interactions between leukocytes and the male reproductive system. The unanswered questions. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 424: 245- 252.

Rubes J, Selevan SG, Evenson DP et al (2005) Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 20: 2776-2783.

Sadock BJ, Sadock VA (2003) Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; Kaplans and Sadocks *Symptoms of Psychiatry Behavioral Sciences Clinical Psychiatry*; 9th ed. pp. 872–874. DOI: 10.4103/0972-6748.57858.

Said T, Agarwal A, Grunewald S et al (2006) Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod* 74: 530–537.

Said TM, Agarwal A, Grunewald S et al (2006) Evaluation of sperm recovery following annexin V magnetic-activated cell sorting separation. *Reprod Biomed Online* 13: 336-339.

Said TM, Agarwal A, Zborowski M et al (2008) Utility of magnetic cell separation as a molecular sperm preparation technique. *J Androl* 29: 134-142.

Said TM, Land JA (2011) Effects of advanced selection methods on sperm quality and ART outcome: a systematic review. *Hum. Reprod* 17: 719-733.

Sakkas D (2013) Novel technologies for selecting the best sperm for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 99: 1023-1029.

Sakkas D, Alvarez JG (2010) Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93: 1027-1036.

Sakkas D, Mariethoz E, St John JC (1999) Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 251: 350-355.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC et al (2002) Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod* 66: 1061-1067.

Schröter S, Derr P, Conradt HS et al (1999) Male-specific modification of human CD52. *J Biol Chem* 274: 29862-29873

Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB et al (2004) Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 82: 378-383.

Semprini AE, Levi-Setti, P, Bozzo M et al (1992) Insemination of HIV-negative women with processed semen of HIV-positive partners Lancet 340: 1317-1319.

Shamsi MB, Imam SN & Dada R (2011) Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. J Assist Reprod Genet 28: 1073-1085.

Shamsi MB, Kumar R, Dada R. (2008) Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. Indian J Med Res 127: 115-123.

Shamsi MB, Venkatesh S, Kumar R et al (2010) Antioxidant levels in blood and seminal plasma and their impact on sperm parameters in infertile men. Indian J Biochem Biophys 47: 38-43.

Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM et al (2013) Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. Reprod Biol Endocrinol 11: 66. DOI: 10.1186/1477-7827-11-66.

Sharma R, Harlev A, Agarwal A et al (2016) Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization Laboratory Methods for the Examination of Human Semen Eur Urol 70: 635-645.

Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H (2005) Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. Curr Drug Metab 6: 495–501.

Silveira LFG, Latronico AC (2013) Approach to the patient with hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 8: 1781–1788.

Simon L, Brunborg G, Stevenson M et al (2010) Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. Hum Reprod 25: 1594-1608.

Simopoulou M, Gkoles L, Bakas P et al (2016) Improving ICSI: A review from the spermatozoon perspective. *Syst Biol Reprod Med* 20: 1-13.

Sinha Hikim AP, Swerdloff RS (1999) Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 4: 38–47.

Smith R, Kaune H, Parodi D et al. (2006) Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 21: 986-993.

Speroff L, Fritz MA (2005) Induction of Ovulation (in) *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Boston, New York, pp: 1177- 2005.

Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M et al (2010) Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum Reprod* 25: 1609-1618.

Tarozzi, N, Nadalini M, Bizzaro D et al (2009) Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod. Biomed.* doi:10.1016/S1472-6483(10)60282-9.

Tavalaee M, Deemeh MR, Arbabian M & Nasr-Esfahani MH (2012) Density gradient centrifugation before or after magnetic-activated cell sorting: which technique is more useful for clinical sperm selection? *J Assist Reprod Genet* 29: 31-38.

Taylor DM, P. F. Ray, A. Ao, R. M. (1997) Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three- to four-cell stage. *Mol Repr Dev* 48: 442-448

Taylor SL, Weng SL, Fox P et al (2004) Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Mol Hum Reprod* 10: 825-834.

Temizkan G, Arda N (2012) Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, ISBN: 9789754205831

Thomson LK, Zieschang JA, Clark AM Oxidative deoxyribonucleic acid damage in sperm has a negative impact on clinical pregnancy rate in intrauterine insemination but not intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril. 96: 843-847.

Tomlinson M (2005) Managing risk associated with cryopreservation. Human Reproduction 20: 1751-1756.

Tournaye H (2012) Male factor infertility and ART. Asian J Androl 14: 103-108.

Trisini AT, Singh NP, Duty SM et al (2004) Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. Fertil Steril 82: 1623-1632.

Troya J & Zorrilla I (2015) Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. JBRA Assist Reprod 19: 66-69.

Tulandi T, Hamilton EF, Arronet GH et al (1987) Ovulation induction by human menopausal gonadotropin with ultrasonic monitoring of the ovarian follicles. Int J Fertil 32: 312-315.

Van Heerde WL, de Groot PG, Reutelingsperger CP (1995) The complexity of the phospholipid binding protein Annexin V. Thromb Haemost 73: 172-179.

Van Os HC, Roozenburg BJ, Janssen-Caspers HA et al (1992) Vaginal disinfection with povidon iodine and the outcome of in-vitro fertilization. Hum Reprod 7(3): 349-350.

Van Thillo G, Guidobono M, Young E et al (2011) Biological safety and live births after selection of non-apoptotic spermatozoa during ICSI. *Fertil Steril* 96: 160-161.

Vandekerckhove FW, De Croo I, Gerris J (2016) Sperm Chromatin Dispersion Test before Sperm Preparation Is Predictive of Clinical Pregnancy in Cases of Unexplained Infertility Treated with Intrauterine Insemination and Induction with Clomiphene Citrate. *Front Med (Lausanne)* 23: 3-63

Venkatesh S, Riyaz AM, Shamsi MB, et al (2009) Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile Indian men. *Andrologia* 41: 251-256.

Venkatesh, S, Deecaraman M, Kumar R et al (2009) Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian J. Med. Res.* 129: 127–137.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H et al (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51.

Virant-Klun I, Tomazevic T, Meden-Vrtovec H (2002) Sperm singlestranded DNA, detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Genet* 19: 319-328.

Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 81(5): 1289-1295.

Weng SL, Taylor SL, Morshedi M (2002) Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*;8: 984-991.

WHO (1986) Laboratory manual for the examination of semen and sperm-cervical mucus interaction. Second edition, Cambridge, Cambridge University. pp: 1-100

WHO (1987) Laboratory manual for the examination of semen and sperm-cervical mucus interaction. Second edition, Cambridge, Cambridge University pp: 1-100

WHO (2010) laboratory manual for the Examination and processing of human semen. World Health Organization, Fifth Edition, Cambridge, Cambridge University pp: 1-86.

Winters BR, Walsh TJ (2014) The epidemiology of male infertility. Urol Clin North Am. 41: 195–204.

Wolff H (1995) The biologic significance of white blood cells in semen. Fertility and Sterility, 63: 1143-1157.

www.sgk.gov.tr (17.09.2017)

Yanagimachi R, Lopata A, Odom CB et al (1979) Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt-stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. Fertil Steril 31(5): 562-574.

Ye H, Huang GN, Gao Y (2006) Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. Hum Reprod 21: 1545-1550

Ye H, Huang GN, Gao Y et al (2006) Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. Hum. Reprod. 21: 1545-1550.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J et al. (2009) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology

(ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. Fertil Steril 92: 1520-1524.

Zhang X, Khimji I, Gurkan UA et al (2011) Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting. Lab Chip. 2011 11: 2535-2540.

Zidi-Jrah I, Hajlaoui A, Mougou-Zerelli S et al (2016) Relationship between sperm aneuploidy, sperm DNA integrity, chromatin packaging, traditional semen parameters, and recurrent pregnancy loss. Fertil Steril 105: 58-64.

Zikopoulos K, Kaponis A, Adonakis G et al (2005) A prospective randomized study comparing gonadotropin releasing hormone agonists or gonadotropin-releasing hormone antagonists in couples with unexplained infertility and/or mild oligozoospermia. Fertil Steril 83: 1354-1362.

Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG et al (2000) Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. J Androl 21: 145-153.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

µm	: Mikrometre
AB	: Aniline blue
AO	: Acridine orange
ASRM	: American Society for Reproductive Medicine Practice Committee
AUA	: American Urological Association
CMA3	: Chromomycin A3
DFİ	: DNA fragmentasyon indeksi
DGS	: Dansite Gradient Santrifüjü
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dUTP	: Terminal deoxynucleotidyl transferase
E2	: Östradiol
EAU	: European Association of Urology
FSH	: Follikül Stimülasyon Hormon
hCG	: Korionik Gonadotropin
HH	: Hipogonadotropik Hipogonadizmi
ICSI	: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IUI	: İntrauterin İnseminasyon
IVF	: in-vitro fertilizasyon
KOH	: Kontrollü Over Hiperstimülasyonu
LH	: Luteinizan Hormon
MACS	: Manyetik Aktivasyon İle Hücre Ayırma
OAT	: Oligoasthenoteratozoospermi
OPU	: Oocyte Pick-Up
PESA	: Perkütan Epididimal Sperm Aspirasyonu
PS	: Fosfatidilserin
ROS	: Reaktif Oksijen Seviyesi
T	: Testesteron
TB	: Toluidine blue
TESA	: Testis Sperm Aspirasyonu
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TUNEL	: dUTP nick end labeling
ÜYT	: Üremeye Yardımcı Teknikler
WHO	: World Health Organisation

8. EKLER

8.1. Şekil Listesi

Şekil 1. Normal ve anormal sperm morfolojileri (<http://fertilitysolutions.com.au/so-your-sperm-morphology-is-low-should-you-be-worried/>).

Şekil 2. Sperm DNA yapılanması (Esteves, 2014).

Şekil 3. Sperm DNA hasarına yol açan etmenler (Agarwal ve ark., 2011).

Şekil 4. ICSI. **A.** Olgun oositi tutma pipeti (solda) ve sperm enjeksiyon pipetinin (sağda) ICSI için hazırlanması. **B–D.** Spermin oosite enjeksiyonu **E.** Sperm enjeksiyon pipetinin oositten geri çekilmesi. **F.** Fertilizasyondan 12–17 saat sonra gözlenen 2 pronükleuslu ve 2 kutup cisimcikli oosit (Merchant ve ark., 2011).

Şekil 5. Semen örneğinden kaliteli spermlerin DGS ile toplanması (Abd-Elkreem, 2016).

Şekil 6. MACS–Anneksin V yönteminin şematik diagramı. **A.** Kolonda yer alan semen örneğinde yer alan, dış zarında PS içeren hücreler manyetik boncuklarla ile konjuge Anneksin V ile işaretlenirler ve bu hücreler manyetik boncukların mıknatıs etkisi ile magnete bağlanmaları sayesinde kolonun çeperinde tutunurlar. **B.** Anneksin V (+) hücrelerin kolon çeperinde tutulmasının büyütülmüş bir görüntüsü **C.** Anneksin V ile işaretlenmemiş hücreler kolon çeperinde tutulmadıklarından, kolondan serbestçe akarlar. Böylece apoptotik olmayan sperm hücreleri elde edilmiş olur (Said ve ark; 2008).

Şekil 7. MACS® ART Annexin V Sistemi (Miltenyi Biotec) ile sperm eldesi

Şekil 8. Hematoksilen&Eosin boyaması sonucu gözlenen sperm morfolojileri (X100). **A:** Normal sperm morfolojisi, **B–I:** Baş anomalileri (**B:** Büyük baş, **C:** Küçük baş, **D:** Uzun baş, **E:** Yuvarlak baş, **F:** Vakuol, **G:** Priform baş, **H:** Amorf baş, **I:** Pinhead), **İ, J:** Boyun anomalileri (**İ:** Kırık boyun, **J:** Sitoplazmik droplet), **K, L:** Kuyruk anomalileri (**K:** Çift kuyruk, **L:** Kıvrık kuyruk).

Şekil 9. Yıkama öncesi, DG ve MACS-DG yöntemleri ile yıkama sonrası sperm konsantrasyonu, motilitesi, total progressif motil sperm sayısı (TPMSS) oranları (Grafik 1-4). DG- ve MACS+DG yöntemleri ile yıkanan sperm örneklerinde vakuol içeren sperm oranı (Grafik 5).

Şekil 10. TUNEL analizi sonucu (+) ve (-) olarak değerlendirilen sperm görüntüleri (X100). **A:** TUNEL (+), **B:** TUNEL (-).

Şekil 11. DG (Grup 1) ve MACS-DG (Grup 2) yöntemlerinin sperm (%) DFİ oranına etkisi

Şekil 12. Hematoksilen&Eosin boyamasına göre benzer morfolojik anomaliye sahip spermilerin DNA fragmentasyonu varlığına göre TUNEL (+) ve TUNEL (-) görüntüleri (X100). **A:** Normal sperm morfolojisi, **B–I:** Baş anomalileri (**B:** Büyük baş, **C:** Küçük baş, **D:** Uzun baş, **E:** Yuvarlak baş, **F:** Vakuol, **G:** Piriform baş, **H:** Amorf baş, **I:** Pinhead), **İ, J:** Boyun anomalileri (**İ:** Kırık boyun, **J:** Sitoplazmik droplet), **K, L:** Kuyruk anomalileri (**K:** Çift kuyruk, **L:** Kıvrık kuyruk).

8.2. Tablo Listesi

Tablo 1. Kadın ve erkek infertilite sebepleri (Çolgar ve ark., 2006).

Tablo 2. Sperm DNA Fragmentasyonunu belirlemede kullanılan testler (Agarwal ve ark., 2016).

Tablo 3. DGS yöntemi ile sperm elde etmenin avantaj ve dezavantajları

Tablo 4. Çalışmaya dahil olan kadın ve erkek hastaların demografik bilgileri

Tablo 5. Yıkama öncesi, DG ve MACS-DG uygulamasından sonra normal morfolojili sperm oranları ve yıkama sonrası saptanan baş, boyun, kuyruk anomalili ve sitoplazmik dropletli, kırık boyunlu ve vakuollü sperm oranları

Tablo 6. DG ve MACS-DG'nin sperm parametrelerine ve sperm morfolojisine etkisi (n=17)

Tablo 7. DG ve MACS-DG uygulamasından sonra TUNEL analizi ile spermelerde saptanan DFİ oranları (%)

Tablo 8. DG (Grup 1) ve MACS-DG (Grup 2) yıkama sonrası sperm DFİ oranları

Tablo 9. DG ve MACS-DG uygulamaları sonrasında saptanan (%) DFİ oranları ile sperm morfoloji anomalileri arasındaki ilişki

Tablo 10. DG ve MACS yöntemlerinin mikroenjeksiyon başarısına etkisi.

9.TEŞEKKÜR

Tezim boyunca yaptığı katkılardan dolayı danışman hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Berrin AVCI'ya ve Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkez Sorumlusu Prof. Dr. Gürkan UNCÜ ve Uzm. Dr. Işıl KASAPOĞLU'na;

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Semiha ERSOY ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU'na, Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ'ye, Prof. Dr. Zehra MİNBAY'a ve Prof. Dr. Özhan EYİGÖR'e;

Tez projesinin her aşmasında gösterdikleri manevi destekten dolayı, tüm asistan arkadaşlarıma, yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Göktan Kuşpınar'a ve diğer Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Merkez Embriyoloji laboratuvarı çalışanlarına,

Tüm eğitim hayatım boyunca sabır ve emeğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

ELÇİN TEZCAN

10.ÖZGEÇMİŞ

24 Ekim 1989 yılında Bursa’da doğdu. İlk ve orta okul eğitimini Setbaşı İlk Öğretim okulunda 2002 yılında, lise eğitimini Bursa Cumhuriyet Lisesi’nde 2007 yılında tamamladı. 2008 - 2013 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji lisans eğitimini takiben 2014 yılından itibaren Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Üreme Biyolojisi ve Klinik Embriyoloji Bölümü’nde yüksek lisans yapmaktadır.

