

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMİ OLARAK “SWİM-UP VE
GRADİENT” TEKNİKLERİNİN DNA FRAGMENTASYONUNA
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI
PROSPEKTİF ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Yüksel OĞUZ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ahmet ERDEM

ANKARA
KASIM 2013

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMİ OLARAK “SWİM-UP VE
GRADİENT” TEKNİKLERİNİN DNA FRAGMENTASYONUNA
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI
PROSPEKTİF ÇALIŞMA**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Yüksel OĞUZ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ahmet ERDEM

ANKARA
KASIM 2013

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim süresince bana emeği geçen tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Ahmet Erdem'e, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. M. Anıl Onan'a, tezimin hazırlanmasındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Mehmet Erdem'e, çok değerli tecrübelerini hiçbir zaman esirgemeyen, mesleki eğitimime büyük katkıları olan tüm saygı değer hocalarıma, hayatımın her anında yanımda olan ve her konuda bana destek ve yardımcı olan eşim Dr. Yeşim Gedik Oğuz'a, sevgili aileme, değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Saygılarımla

Dr. Yüksel Oğuz

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar.....	viii

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İnfertilite Tanımı, İnsidansı ve Etiyolojisi	4
2.1.1. Tanım ve İnsidans	4
2.1.2. Etiyoloji	4
2.2. Erkek İnfertilitesi.....	5
2.2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	5
2.2.2. Spermatogenez	8
2.2.3. Spermiumun Yapısı.....	12
2.2.4. Erkek İnfertilitesi.....	13
2.2.5. Sperm DNA Hasarı	26
2.3. Açıklanamayan İnfertilite.....	39
2.3.1. Açıklanamayan subfertilite tanısı için önerilen testler	40
2.3.2. Açıklanamayan subfertilitenin tedavisi	41
2.4.Sperm Yıkama Yöntemleri.....	42
2.4.1. Swim-up (yukarı yüzdürme) yöntemi	45
2.4.2. Gradient Yöntemi	45
3. MATERYAL VE METOD	49
3.1.Hasta Seçimi.....	49
3.1.1. Çalışmaya dahil olma kriterleri:	49
3.1.2. Bu çalışmada dahil edilmeme kriterleri ise şunlardır	50
3.2. Sperm Hazırlama Yöntemi Seçimi.....	51

3.3. Çalışmamızda Kullanılan Yöntemler	51
3.4. Swim-Up	52
3.5. Gradient Yöntemi	52
3.6. Sperm Dna Fragmentasyonunun Değerlendirilmesi	53
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	54
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA.....	68
6. SONUÇLAR	80
7. KAYNAKLAR.....	86
8. ÖZET.....	104
9. SUMMARY	106
10. EKLER	108
11. ÖZGEÇMİŞ.....	110

KISALTMALAR

CASA	: Computer Aided Sperm Analyzer
DFI	: DNA fragmentation index
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	: Double-Stranded Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
dUTP	: Deoksiuridin Trifosfat
ESHRE	: European Society of Human Reproduction and Embriology
FISH	: Flouresan İn Situ Hibridizasyon
FSH	: Foliküler Stimulan Hormon
HSG	: Histerosalpingografi
HSP	: Heat-Shock Proteins
IBT	: İmmunobead Test
İCSI	: İntracytoplasmic Sperm İnjection
İUI	: İntrauterin İnseminasyon
İVF	: İn Vitro Fertilizasyon
KT	: Kemoterapi
LH	: Lüteinizan Hormon
L/S	: Laparoskopi
MAR	: Mixed Antiglobulin Reaction
8-OhdG	: 8-Hidroksideoksiguanosine
RT	: Radyoterapi
SCD	:Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	:Sperm Chromatin Structure Assay
TUNEL	:Terminal Uridine Nick- End Labeling
TdT	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TSH	: Tiroid Stimulan Hormon
WHO	: World Health Organization
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri

ŞEKİLLER

Şekil 1. Spermiyogenez. Gartner LP, Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W.B.Saunders Company, 1997	11
Şekil 2. Spermatozoanın şematik gösterimi	13
Şekil 3. Sperm kromatin hasarının Halosperm® yöntemi ile gösterilmesi	37
Şekil 4. Halosperm® DNA fragmantasyon kiti kullanım klavuzu.....	54

TABLÖLAR

Tablo 1.	Erkek infertilitesi nedenleri	13
Tablo 2.	Erkek infertilitesine neden olan “Konjenital” ve Akkiz” nedenler ve etki mekanizmaları	14
Tablo 3.	Semen analizi normal referans değerleri (WHO, 5. Baskı, 2010).	17
Tablo 4.	Sperm Kromatin Hasarını Belirleme Yöntemleri	32
Tablo 5.	Sperm Hazırlama Teknikleri	43
Tablo 6.	Dansite gradient ve swim-up yöntemlerinin özellikleri.....	44
Tablo 7.	Gradient Miktarı Seçim Kriterleri	47
Tablo 8.	Hastaların demografik özellikleri ve bazal sperm değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	57
Tablo 9.	Yıkama sonrası sperm parametrelerinin infertilite grupları arasında karşılaştırılması.....	58
Tablo 10.	İnfertilite nedeni göz önüne alınmadan yıkama öncesi ve yıkama sonrası DNA fragmentasyon yüzdelerinin karşılaştırılması.	59
Tablo 11.	Açıklanamayan grupta sperm hazırlama yöntemleri ile sperm parametrelerinin karşılaştırılması.....	60
Tablo 12.	Açıklanamayan grupta sperm hazırlama yöntemleri ile DNA fragmentasyon oranındaki değişimlerin karşılaştırılması.....	61
Tablo 13.	Erkek faktörü grubunda sperm hazırlama yöntemleri ile sperm parametrelerinin karşılaştırılması.	62
Tablo 14.	Erkek faktörü grubunda sperm hazırlama yöntemleri ile DNA fragmentasyon oranındaki değişimlerin karşılaştırılması.....	63
Tablo 15.	IUI sonrası gebelik oranlarının yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm verilerinin etkilerinin karşılaştırılması.....	64
Tablo 16.	Açıklanamayan infertil grupta IUI sonrası gebelik oranlarının yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm verilerinin etkilerinin karşılaştırılması.	65
Tablo 17.	Erkek faktörü grubunda IUI sonrası gebelik oranlarının yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm verilerinin etkilerinin karşılaştırılması.	66
Tablo 18.	Tüm gruplarda erkek yaşının yıkama öncesi ve yıkama yöntemleri sonrası sperm parametreleri ve DNA fragmentasyon yüzdelerine etkisinin karşılaştırılması.....	67

1. GİRİŞ

Fertilite, Latince “fertilis” kelimesinden köken alır ve üretken olma halini ifade eder. Aynı zamanda sperm kalitesinin dölleyebilir özellikte olduğunu da gösterir (1).

İnfertilite ise çiftlerin en az bir yıl süreyle, hiçbir kontrasepsiyon yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkide bulunmalarına rağmen, gebelik elde edilememesi durumudur. Üreme çağındaki çiftlerin % 10-15’inde infertiliteye rastlanır. İnfertilitenin sıklığı ve nedenleri bir toplumdan diğerine farklılık gösterebilir. Çiftlerin % 30-40’ında erkek, % 40-50’sinde ise kadın infertiliteden sorumludur. Çiftlerin %10-15’inde ise günümüzdeki mevcut standart tanısal testler ile açıklanamayan infertilite mevcuttur (2,3).

Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT), infertilite sorununu çözmeye yönelik olarak geliştirilen birçok tekniği içerir. Bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılanları in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrauterin inseminasyon (IUI) uygulamalarıdır (4). Hastanın yaşı, infertilite etyolojisi, süresi gibi birçok faktör göz önüne alınarak çifte çözüm olabilecek ve ekonomik olarak da çift ve uygulamayı yapacak olan ekip için en avantajlı tekniğin seçilerek uygulanmasında yarar vardır. Her iki YÜT’nde de en önemli basamaklardan biri sperm hazırlama işlemidir. Bu işlem, YÜT’nin başarısında çok önemli noktalardan birini oluşturmaktadır (5).

İnfertil bir çifti ve özellikle erkek infertilitesini değerlendirmede en önemli basamak sperm analizidir. Yukarıda bahsedildiği gibi sperm analizi sonrasında hastaya uygulanacak YÜT’nin etkinliğini artırmak ve işlem öncesi

yüksek kalitede sperm elde etmek için spermin hazırlanması gerekir. Semen sıvısı plazma, sperm, lökosit, hücresel artıklar ve kontamine olmuş ise bakterilerden oluşmaktadır. Morfolojisi veya motilitesi bozuk olan spermlerle birlikte bakteriler, hücresel kalıntılar ve seminal sıvı servikal mukus tarafından tutularak, serviksten yukarıya ilerlemelerine izin verilmemektedir. Cinsel ilişki ile vajene bırakılan milyonlarca sperm için servikal mukus doğal bir bariyer olarak motiliteyi artırıcı, hiperaktivasyonu sağlayıcı etkilerinin yanında morfolojik olarak normal spermilerin seçiminde çok önemli rol oynar. YÜT'lerinde spermilerin hazırlanması için kullanılan laboratuvar yöntemlerinde de servikal mukusun yaptığı bu fonksiyon taklit edilerek fertilizasyon olasılığı yüksek spermilerin ayrılması amaçlanmaktadır. Semen YÜT'lerinde kullanıma hazır hale getirmek için uygulanan işlemlere '**sperm hazırlama (sperm yıkama) yöntemleri**' adı verilmektedir. Sperm hazırlama teknikleriyle seminal plazma uzaklaştırılır, semen kontaminasyona neden olabilecek hücre ve döküntülerden kurtarılır, semendeki yabancı maddelerin istenmeyen etkileri ortadan kaldırılır, reaktif oksijen radikalleri uzaklaştırılır, homojen fertil sperm popülasyonu elde edilirken öte yandan spermilerin kapasitasyon ve akrozom reaksiyonları başlatılmış olur. Bu amaçlara uygun olarak birçok sperm yıkama yöntemi geliştirilmiştir (6). Bunlar arasında en yaygın kullanılan ve etkinliği bilinen yöntemler "Swim-up ve "Dansite Gradient" dir.

Son 10 yılda, sperm deoksiribonükleik asit (DNA) fragmentasyonunun değerlendirilmesi, semen kalitesinin belirlenmesinde önemli bir faktör olmuştur. Sperm DNA fragmentasyonu ile YÜT'lerinin başarısı arasında negatif

korelasyon bildiren yayınlar mevcuttur (7-10). DNA fragmentasyonunun, progresif motilite gibi diğer sperm özelliklerine göre YÜT'lerinin başarısını öngörmede daha önemli bir faktör olduğu düşünülmektedir (11).

Bu çalışmanın amacı sperm yıkamada en sık kullanılan yöntemler olan swim-up ve dansite gradient yöntemlerinin sperm DNA fragmentasyonuna etkisini basit, ucuz ve kolay uygulanabilen bir test olan Halosperm® kiti kullanılarak araştırmaktır. Bu amaçla Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran daha önce YÜT tedavisi almamış infertil olgulardan açıklanamayan infertilitesi olan 34 olgu ve erkek faktörü olan 31 olgunun sperm örnekleri swim-up ve dansite gradient yöntemleri ile hazırlanarak DNA fragmentasyonu açısından karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite Tanımı, İnsidansı ve Etiyolojisi

2.1.1. Tanım ve İnsidans

İnfertilite, bir yıl süreyle, hiçbir kontrasepsiyon yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesidir. İnfertilite, üretken çağıdaki çiftlerin %10-15'inde görülen bir sağlık problemidir (2). Çiftlerin % 30-40'ında erkek, % 40-50'sinde ise kadın infertiliteden sorumludur. Çiftlerin %10-15'inde ise günümüzdeki mevcut standart tanısal testler ile açıklanamayan infertilite mevcuttur (2,3).

Fekundabilite, bir siklusun gebelikle sonuçlanma olasılığıdır. Normal çiftlerde % 20- 25 olarak bildirilmiştir. Fekundabilite infertilite tedavisinin başarı oranlarını yorumlamada kullanılır.

Fekundite, bir siklusun canlı doğumla sonuçlanma olasılığıdır. Yedi menstrüel siklus sonunda fekundite % 10' un altına düşer ve çiftlerin sadece % 3'ü 12 siklus sonunda gebe kalabilir (4).

2.1.2. Etiyoloji

Son otuz yılda infertilite insidansı değişmeden kalmıştır. Ancak infertilite değerlendirme ve tedavisinde bu süre içinde önemli ilerlemeler olmuştur. Başlıca infertilite nedenleri erkek faktör (%35), tubal ve pelvik faktör (%35), ovulatuvar

disfonksiyon (%15) ve açıklanamayan subfertilite (%15) olarak bildirilmiştir (12).

2.2. Erkek İnfertilitesi

2.2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi; germ hücresi olan spermin devamlı üretimi ve erkek seks hormonları olan androjenlerin sentezi ve salınımından sorumludur. Gonadlar (testis), genital kanal sistemi (epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorius ve erkek üretrasının bir kısmı), yardımcı üreme bezleri (vesikula seminalis, prostat ve bulbo üretral bezler) ve penis olmak üzere 4 bölümden oluşur (13,14).

2.2.1.1. Gonadlar (Testis)

a) Testis: Testisler erkek cinsiyetindeki primer üreme organıdır, skrotum içerisinde sağda ve solda yerleşmiş biçimde, funikulus spermaticus asılı olarak bulunmaktadır. Testisler yaklaşık olarak 4- 5 cm uzunlukta, 2. 5 cm genişlikte, 3 cm kalınlıkta ve 10-15 gr ağırlığındadır (13). Testiküler hacim ile sperm konsantrasyonu, Folikül Stimulan Hormon (FSH), Lüteinizan Hormon (LH) ve prolaktin düzeyleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu gösterilmiştir (15).

b) Seminifer tübüller: Testisin glandüler dokusu, seminifer t b llerdir. Salgılama biçimi aktif holokrin olup, salgılama materyali canlı hücre spermium'dur. Tek bir insan testisinde seminifer tübüllerin toplam uzunluğu 250 metreyi bulur. Seminifer tubullerin i erigi rete testis kanallarına boşaltılır (16,17).

c) Sertoli hücreleri: Bazal lamina üzerine yerleşmiş, seminifer epitel boyunca uzanan piramidal hücrelerdir. Sitoplazmasının apikal yüzünde spermiumların yerleşimine uygun girintiler içerir; yan uzantılarla ise spermatogonium ve spermatositler arasına uzanır ve onlara mekanik destek olarak otoimmün reaksiyonlardan korunmasını ve beslenmesini sağlarlar. Ekstrat b ler aralıktan lümene makromoleküllerin geçişini önleyen zonula okludensler sayesinde, germ hücrelerinin proteinlerine karşı antikör yapılması  nlenmiş olur. Bu yapı, kan testis bariyeri olarak isimlendirilir.

d) Leydig hücreleri: Kan kapillerleri çevresinde tek tek ya da gruplar halinde testise özgü 15-20  m çapında hücrelerdir. Leydig hücreleri, f tal hayatta plasental kökenli gonadotropinlerin etkisiyle, 4-5. aylarda tam gelişmiştir. Doğumdan sonra atrofiye olurlar ve pubertede LH uyarımıyla tekrar görülmeye ba larlar. Leydig ve Sertoli hücreleri radyorezistandır ancak germinal hücreler röntgen ışınlarına ileri derecede hassastır (13, 14, 16, 17).

2.2.1.2. Genital Kanal Sistemi

Tubuli rekti (düz tubuller), rete testis ve duktuli efferentesler intratestiküler boşaltıcı kanallardır. Aksesuar kanallar içinde duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorius ve üretra bulunur. Bu kanallar testislerden penise dek uzanır (13, 14, 16, 17).

a) Epididim: Testislerin posterolateralinde bulunur. Yaklaşık 6 metrelik duktus epididimislerin biraraya gelerek oluşturdukları yapıdır. Daha geniş baş kısmı çaput epididimis adını alır ve testisten çıkan duktuli eferentesler çaput epididimise girerler. Burada duktus epididimise açılırlar. Spermatogenez sonrası oluşan spermatozoanın olgunlaşarak ejakulasyon öncesi depolandığı major bölümdür.

b) Duktus deferens: Muskuler yapıda yaklaşık 45 cm uzunluğunda boru şeklinde bir yapıdır. Epididimisin kuyruk kısmından başlar, ductus ejakulatoriusa spermelerin taşınmasında görev alır.

2.2.1.3. Aksesuar Genital Bezler

a) Seminal vezikül: Rektum ile mesane arka yüzü arasında bulunurlar. Sağda ve solda birer adet olup uzunluğu 5 cm, genişliği 2.5 cm'dir. Hafif alkali, spermiumların spermiumların enerji ihtiyacını karşılayan früktoz, askorbik asit, fibrinojen ve pıhtılaşma enzimi vezikulaz içeren bir sıvı salgılar.

b) Prostat: Mesane boynundan başlayan ve arka üretrayı çepeçevre saran, 4x 3x 2 cm boyutunda bir bezdir. Fibromusküler bir kapsülü vardır. Prostatın arka kısmına ejakülatör kanallar açılır. Prostat bezi günlük salgısı 0.5- 2 ml kadardır. Ejakulatın %20-30'unu oluşturur. Bazik prostat salgısı vajinanın asit ortamını nötralize ederek spermiumların vajina içerisinde yaşamasını sağlar. Prostat sekresyonu parasempatik stimülasyon ile artar. Sekresyonun içinde asit fosfataz, prostatik antibakteriyel faktör, sitrik asit, spermin, lipid, fruktoz, çinko, proteolitik enzimler, immunglobulinler, sodyum, klor ve bikarbonat bulunmaktadır.

c) Cowper bezleri (bulboüretal bezler): Prostatın altında, üretranın 2 yanında bulunan 1 cm çapında sarı renkli bir çift bezdir. Cinsel uyarılma ile birlikte üretra içine berrak, koyu ve mukus benzeri alkali bir sıvı salgılamaya başlarlar. Bu sayede idrarın asiditesini nötralize eder.

2.2.1.4. Penis ve Üretra

Penis korpus spongioza, üretra ve 2 adet korpus kavernozumdan oluşur. Üretra çapı 8-9 mm' dir.

2.2.2. Spermatogenez

Spermatogenez; primitif erkek germ hücrelerinin (46 kromozumlu spermatogonia), 23 kromozumlu spermatozoaya dönüşme sürecidir. Germ hücreleri bazalden lümeneye doğru farklılaşmanın ve olgunlaşmanın değişik

evrelerini göstererek sıralanırlar. Bu sıra; spermatogonium, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon şeklindedir (18).

Primer Spermatosit

Spermatogonium'lara komşu olup lümene daha yakındırlar. Primer spermatositler oluşur oluşmaz 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girer. Profaz evresi 22 gün sürer. Bu nedenle sayıca en çok görülen hücre tipi primer spermatosit' dir. 46 (diploid) kromozom taşır (19).

Sekonder Spermatosit

Primer spermatosit 1. mayozu tamamlayınca, 2 tane haploid yapıda sekonder spermatosit oluşur. Oluşan sekonder spermatositler 2. mayoza girerek, 23 haploid kromozom içeren **spermatid'** leri meydana getirir. Bu evreye kadar olan değişim sürecine "**Spermatogenez**" denir. İki mayoz bölünme sonunda, 1 primer spermatositten, haploid kromozomlu 4 adet spermatid oluşur. Bu aşamalar için gerekli süre 64- 74 gün arasındadır. Bunların ikisi 22+ X, diğer ikisi de 22+ Y kromozom düzenine sahiptirler (19). Takiben her bir spermatitten, karmaşık bir farklılaşma süreciyle 4 adet spermatozoa oluşumuna spermiyogenez denir.

2.2.2.1. Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatidlerden spermatozoonların biçimlenmesi olayıdır (metamorfoz). 4 faza ayrılır (**Şekil 1**).

a) Golgi fazı: Bu faz boyunca proakrozomal granüller golgi aygıtında birikir, sonra bu granüller tek bir zarla çevrilir. Nükleus yakınındaki sentriol posterior pole hareket eder ve 9+2 mikrotübül yapısının oluşumu başlatır (19,20).

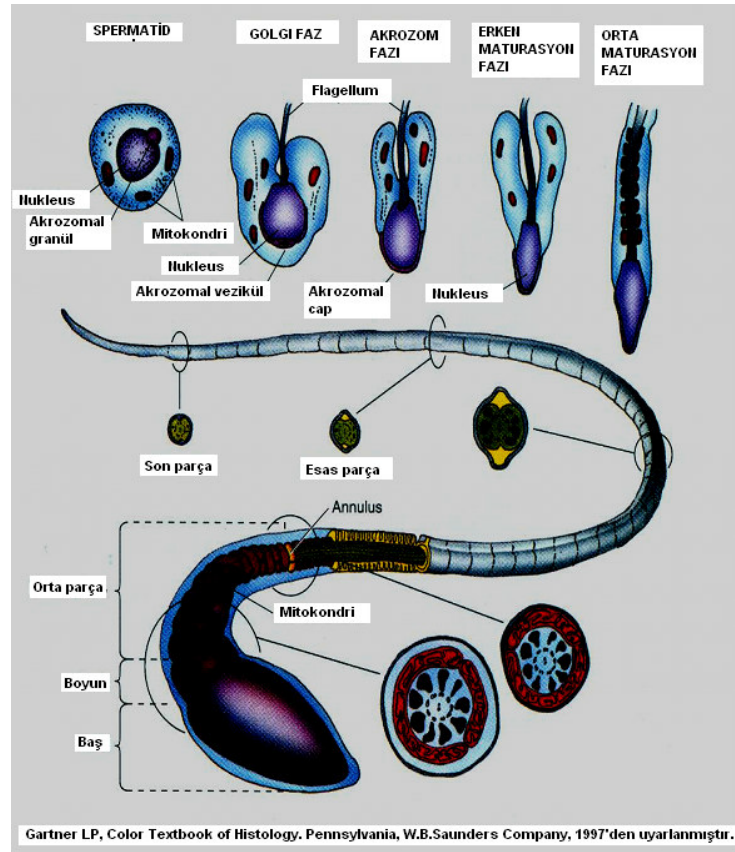
b) Kap fazı: Akrozomal vezikül nükleusun ön kısmını kaplar ve akrozomal başlık adını alır. Ayrıca nükleer içerik yoğunlaşarak koyu bir görünüm alır (19,20).

c) Akrozomal faz: Çekirdeğin akrozom bölgesi plazma zarına yaklaşır, çekirdek progresif olarak yassılaşır ve uzar. Bu sırada kromatin granülleri genişler, boyları eşitlenir bazı boşluklar dışında homojen bir biçimde dağılır. Golgi kompleksi, akrozom büyümesini tamamladığında çekirdeğin ön kutbundan sitoplazmanın bol olduğu bölgeye göç eder (20,21). **Akrozom**, fertilizasyon için gerekli hyaluronidaz ve proakrozin gibi hidrolitik enzimler içermektedir. Ovumun fertilizasyonu sırasında, akrozomal membranın oosit plazma membranı ile birleşmesi sonucunda akrozom reaksiyonu oluşmakta ve enzimatik yapı serbestleşmektedir (20).

d) Olgunlaşma fazı: Sertoli hücresi ile bağlantı bozulur ve spermatozoonlar serbestleşerek lümene verilir ve bu arada spermatozoon oluşumu sırasında artan sitoplazma fazlalıkları sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir (18-20).

Spermiogenezi tamamlayan hücelere “**spermatozoa**” denir. Bunlar morfolojik olarak matür; ancak fonksiyonel olarak immatürdürler. Spermiler motilitelerini epididimde kazanırlar. Epididim fonksiyonu için gerekli olan

hormon dihidrotestosterondur. Epididime ait patolojiler ejakülattaki spermilerin karakter ve işlevinde değişikliklere yol açarlar. Deneysel olarak, epididim başından alınan spermier ovumu fertilize edemezken; epididim kuyruk bölümünden alınan spermier edebilmektedir. Bu da spermilerin fertilizasyon yeteneklerini epididimde kazandıklarını göstermektedir (21). Spermilerin epididimden geçiş süresi yaklaşık olarak 2 gündür. Daha sonra rete testis sıvısıyla duktus deferense gelirler.



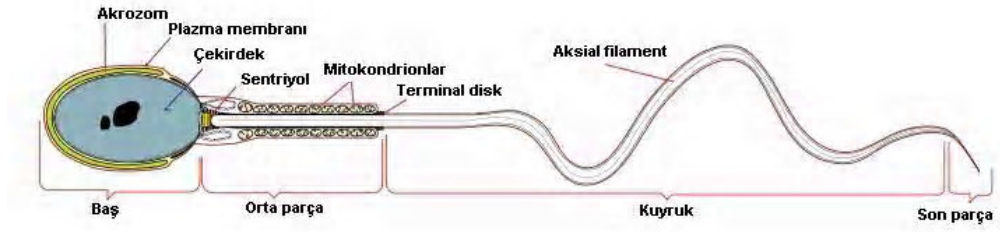
Şekil 1. Spermiyogenez. Gartner LP, Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W.B.Saunders Company, 1997 (21).

2.2.3. *Spermiumun Yapısı*

Baş ve kuyruk olmak üzere 2 bölümden oluşur. Uzunluğu yaklaşık 60 µm kadar olan spermatozoon baş kısmının boyu 3-5 µm, eni 2-3 µm' dir. Başın esas görevi; DNA materyalini taşımak ve korumaktır (**Şekil 2**).

a) Baş bölgesi: Nükleus, nükleer membran ve akrozomdan oluşur. Lizozomal organelin bulunduğu akrozom çekirdeğin 2/3'ünü kaplar; glikoprotein yapısındadır ve hidrolitik enzimler içerir (hyaluronidaz, aril ülfataz, akrosin, asit fosfataz, nöroaminidaz v.b). Akrozin tripsin benzeri bir proteazdır. Akrozomun döllenme sürecinde oosit zona pellusidasının eritilmesinde çok önemli işlevi vardır (22,23).

b) Kuyruk bölgesi: Yaklaşık 45–50 µm uzunlukta olup boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 4 kısma ayrılır (14, 22). Kuyruğun merkezinde bir çift, periferinde ise 9 çift, aksonem adını alan mikrotübül yapısı bulunur. Bu yapı 9 adet kalın fibriller ile çevrilmiştir. Bu yoğun dış fibriller kuyruğa diklik, aksonem ise hareketlilik sağlar. Spermatozoa hareketini flagellum (kuyruk) ile sağlar. Sonuç olarak sperm hücresi oosit hücrelerini fertilize edip, genetik materyalini oosite aktarmak için özelleşmiştir (14,18,20,22).



Şekil 2. Spermatozoanın şematik gösterimi

2.2.4. Erkek İnfertilitesi

Üreme çağındaki erkeklerin yaklaşık %8'i infertilite nedeniyle tıbbi destek almaktadır (24). İnfertil çiftlerin ise % 30-40' ından erkek sorumludur (2). Erkek infertilitesinde dikkatli öykü ile etyoloji büyük ölçüde ortaya konabilir. Bu nedenle erkek hastanın değerlendirilmesinde öykü çok önemlidir. Erkek infertilitesinin en sık nedenleri aşağıda gösterilmektedir (**Tablo 1**).

Tablo 1. Erkek infertilitesi nedenleri (25, 26)

1. Seksüel nedenler (% 1.7)
2. Ürogenital enfeksiyon (% 6.6)
3. Konjenital anomaliler (% 2.1)
4. Kazanılmış faktörler (% 2.6)
5. Varikosel (% 12.3)
6. Endokrin patolojiler (% 0.6)
7. İmmünolojik faktörler (% 3.1)
8. Diğer nedenler (% 3)
9. İdyopatik anormal semen (oligo-asteno-teratozoospermi sendromu) ya da kanıtlanamayan nedenler (%75.1)

Erkek infertilitesi nedenleri konjenital olabileceği gibi sonradan kazanılmış da olabilir. **Tablo 2'** de akkiz ve konjenital erkek infertilitesi nedenleri ve mekanizmaları sınıflandırılmıştır.

Tablo 2. Erkek infertilitesine neden olan “Konjenital” ve Akkiz” nedenler ve etki mekanizmaları (25-30)

Hastalık	İnfertilite Mekanizması
Konjenital (Genetik) Hastalıklar	
Kartagener Sendromu	İmmotil sperm
Kistik Fibrozis	İmmotil sperm, bilateral konjenital vaz deferens yokluğu
Androjen Reseptör Eksikliği	Genital malformasyon
Çöliak Hastalığı	Testiküler hasar
İnmemiş Testis	Testiküler hasar
Enfeksiyon	
Kabakulak	Testiküler atrofi ve sperm üretim defektleri
Tüberküloz, Gonore	Obstrüksiyon ve orşit
Klamidya	Obstrüksiyon
Tifo, İnfluenza, Brusella, Sifiliz	Orşit
Endokrin Hastalıklar	
Tirotoksikoz	Hormonal disfonksiyon
Diabetes Mellitus	Testiküler yetm.ve erektile disfonksiyon
Sistemik Hastalıklar	
Hepatik yetmezlik	Hormonal disfonksiyon
Renal yetmezlik	Testiküler yetmezlik ve libido kaybı
Sekonder Testiküler Yetmezlik	
Kromofob adenom	Hipofizer yetmez.+androjen eksikliği
Astrositom+ teratom+ sarkoidoz	Hipofizer yetmez.+androjen eksikliği
Solunum Yolu Hastalıkları	
Bronşiektazi, Kronik bronşit	İmmotil sperm
Nörolojik Hastalıklar	
Parapleji	Erektile disfonksiyon
Tıbbi Tedavi	
KT/RT	Alkilleyici ajanlar ve RT geri dönüşümsüz testis harabiyeti yapar.
Simetidin	Reseptör düzeyinde androjen etkisinin inhibisyonu
Sülfazalin	Direkt toksisite
Spironolakton	Androjen antagonizasyonu
Nitrofurantoin	Direkt toksisite
Niridazol	Spermatogenezin inhibisyonu
Kolşisin	Spermatojenik toksisite
Antihipertansif ilaçlar/ Trankilizanlar	Erektile disfonksiyon

2.2.4.1. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

İnfertilitenin değerlendirilmesinde öncelikle detaylı bir tıbbi öykü alınmalı ve fizik muayene yapılmalıdır; sonrasında ise semen analizi ve hormon profili (FSH, LH, Prolaktin, Testesteron, TSH) incelenmelidir. Gerekirse ileri değerlendirme için ek incelemeler (endokrinolojik, ultrasonografik ve genetik incelemeler) yapılmalıdır.

Anamnez (25,27)

Öncelikle ayrıntılı öykü alınmalı ve aşağıdaki faktörler sorgulanmalıdır.

- Daha önceki fertilitate öyküsü, kullanılan kontraseptif yöntem, daha önceki tedaviler, parterin yaşı ve fertilitate durumu (yapılan testler, önceki gebelikler vb.)
- Çocuklukta ve pubertede geçirilen hastalıklar (viral orşit veya ateşli hastalıklar gibi), kriptoorşitizm, herni, testiküler travma, seksüel maturasyon, puberte yaşı
- Pelvik ve inguinal bölgeyi ilgilendiren geçirilmiş cerrahi
- Sistemik hastalıklar (diabetes mellitus, siroz, sistemik hipertansiyon, cinsel yolla bulaşan hastalıklar)
- Gonadotoksin maruziyeti:
 - Pestisit, alkol, kokain, mariuhana
 - Kemoterapi, simetidin sülfasalazine, nitrofurantain, allopurinol, kolşisin, tiazid, alfa-beta blokörler, kalsiyum kanal blokörleri, finasterid, anabolik steroidler

■ Organik çözücüler, ağır metaller

■ Yüksek ısı, elektromanyetik alan, radyasyon maruziyeti

- Aile öyküsü: Kistik fibrozis, ailede infertilite, endokrin hastalıklar
- Mevcut sağlık durumu: Anosmi, galaktore, görme bozuklukları,

obezite

Fizik Muayene (4,5,27)

1) Penis muayenesi, üretral meatusun yeri: hipopadias, cinsel yolla bulaşan hastalıklar

2) Testislerin palpasyonu ve büyüklükleri

3) Vazların ve epididimlerin varlığı ve yapısı

4) Varikosel, hidrosel varlığı

5) Seksüel gelişimin değerlendirilmesi: Vücut kıllarının ve saçların dağılımı, jinekomasti, unikoid görünümü

6) Dijital rektal muayene

Semen Analizi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), daha önce çeşitli senelerde revize ettiği sperm analizi değerlendirme kılavuzunu, son olarak 2010 yılında yeniden düzenlemiştir (**Tablo 3**) (22, 31, 32).

Semen analizinde sonuçların standardize edilebilmesi için en az 72 saatlik cinsel perhiz önerilir. Bu sürenin 48 saatten az ya da 7 günden uzun olmamasına dikkat edilmelidir. Semen parametreleri fertil erkeklerde bile zaman içinde bazı

değişiklikler gösterebilir, bu nedenle en az 2 hafta aralıklarla en az 2 sperm örneği incelenmelidir (33-38).

Tablo 3. Semen analizi normal referans değerleri (WHO, 5. Baskı, 2010) (22).

Görünüm	Homojen, gri- opak
Volüm (ml)	> 1, 5 (% 95 CI: 1, 4- 1, 7)
Ph	7, 2- 8. 0
Viskosite	< 3
Sperm sayısı (Spermatozoa / ml)	> 15 x 10 ⁶ (%95 CI: 12- 16)
Total sperm sayısı (Spermatozoa / ml)	> 39 x 10 ⁶ (% 95 CI: 33- 46)
Total Hareketlilik (progresif+ nonprogresif)	> % 40 (% 95 CI: 38- 42)
Progresif hareketlilik	% 32 (% 95 CI: 31- 34)
Progresif hareketli sperm sayısı (spermatozoa / ml)	> 3 x 10 ⁶
Morfoloji	>% 4 normal (% 95 CI: 3- 4)
Vitalite	> % 58 (% 95 CI: 55- 63)
Peroksidaz pozitif lökosit sayısı (x 10 ⁶ / ml)	< 1
İmmünobead test	< % 50 partikülle kaplı sperm
MAR testi	< % 50 partikülle kaplı sperm
Çinko (mmol/ ejakülat)	> 2, 4
Fruktoz (mmol/ ejakülat)	> 13
Alfa – glukozidaz (nötral) (mU/ ejakülat)	>20

WHO parametrelerine göre sperm analizi terminolojilerinin tanımları ve nedenleri (31,39):

1. Aspermi: Ejakulat yokluğu demektir. Aspermi yapan nedenler arasında retrograd ejakülasyon, vasküler nedenler, hormonal nedenler ve ereksiyon bozuklukları bulunmaktadır.

2. Hipospermi: Ejakulatin 1,5 ml' den az olması demektir. Hipospermi yapan nedenler arasında prostat, seminal vezikül ve vas deferensin enfeksiyonu, travma ve tümörlerinin yanı sıra; androjen eksikliği, ejakülatör kanalların tıkanıklıkları ve retrograd ejakülasyon da bulunmaktadır.

3. Hiperspermi/ polizoospermi: Sperm konsantrasyonunun sürekli olarak 250 milyon/ml'den fazla olmasıdır. Prostat ve seminal veziküllerin enfeksiyonunda veya cinsel ilişkinin seyrek olması durumunda görülür. Polizoospermik hastalarda akrozin aktivitesinin düşük olduğu ve akrozom reaksiyonunun gerçekleşemediği gösterilmiştir (105).

4. Ejakulatta koagülasyon bozukluğu: Ejakulatin koagüle olmaması durumudur. Seminal vezikül patolojilerinde görülür.

5. Ejekülatta likefaksiyon bozukluğu: Ejakulatin likefiye olmaması durumudur. Prostat ve bulbo- üretral bezin patolojilerinde görülür.

6. Azospermi: Ejakulatta sperm yokluğu demektir. Azospermi yapan nedenler arasında genetik bozukluklar, hormonal değişiklikler, germinal aplazi, bilateral vas deferens yokluğu ve ejakülatör kanallarda tıkanıklıklar sayılabilir.

7. Oligozoospermi: Sperm sayısının 15 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

a. **Hafif Oligozoospermi:** Sperm sayısının 5- 15 milyon/ ml' nin arasında olmasıdır.

b. **Şiddetli Oligozoospermi:** Sperm sayısının 5 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

Oligozoospermi idiyopatik olabildiği gibi; sistemik ve genital enfeksiyonlar, kromozomal bozukluklar, inmemiş testis, ilaçlar, kronik sistemik hastalıklar ve koit sıklığına bağlı olarak da gelişebilir.

8. Astenozoospermi: İleri hareketli spermatozoa' nın < % 40 olması ya da ileri hızlı hareketli olanların < % 32 olması anlamına gelir. Pek çok konjenital (Kartegener Sendromu) ve akkiz nedenlerle (enfeksiyon, ilaç, ısı) oluşabilir.

9. Teratozoospermi: Normal spermatozoa morfolojisinin belirli bir oranının altında (< %4) olması demektir. Teratozoospermi yapan nedenler arasında kromozomal bozukluklar, toksik maddeler, seminal kanallarda deformasyon ve epididim enfeksiyonu bulunmaktadır.

10. Astenoteratozoospermi: Spermilerin motilite ve morfolojik incelemesinin her ikisinde normal sınırların altında olmasıdır.

11. Oligoastenoteratozoospermi: Spermilerin sayı, motilite ve morfolojik incelemesinde üçünün birden normal sınırların altında olmasıdır.

12. Nekrozoospermi: Numunenin % 25' ten fazla ölü sperm hücresi içermesi anlamına gelir. İdiyopatik olabildiği gibi; toksik maddelerle temas, Kartagener Sendromu ve cinsel ilişki sıklığında azalma nedeniyle de oluşabilir.

Semen Toplanması

Genellikle 3-5 günlük cinsel perhiz döneminden sonra semen örneği alınması tavsiye edilmektedir (40). Normal erkeklerde her bir günlük cinsel perhizde semen volümü 0.4 ml, semen konsantrasyonu 10-15 milyon/ml artar ki bu artış 5 güne kadar devam eder. Sperm motilite ve morfolojisi 5-7 günlük cinsel perhizde etkilenmez. Bir haftadan sonra ise motilitede bozulma meydana gelir (41). En uygun semen örneği laboratuvarında mastürbasyonla alınandır. Bu şekilde semenin genel muayenesi, bilhassa koagülasyon ve likefaksiyon olaylarının gözlenmesi ve motilitenin doğru bir şekilde değerlendirilmesi mümkün olur. Semen örneği laboratuvarında özel olarak hazırlanmış odalarda alınmalıdır. Burada gerekli tüm temizlik imkanları, uygun ısı ve ses ortamı sağlanmalıdır. Örnek almak için geniş ağızlı ve kilitlenebilen cam kavanoz, petri kutusu veya poliprolen, polietilen kaplar kullanılabilir. Bu kaplar kesinlikle deterjan ve diğer zararlı maddeler içermemeli, vücut ısısında olmalıdır.

Makroskopik inceleme

Semen koagülasyon, likefaksiyon, görünüm, hacim, viskozite ve pH açısından değerlendirilir (22).

Renk: Semen rengi mat beyazdır. Cinsel perhiz süresi fazla olduğunda renk sarımsı veya gri-krem renkte olabilmektedir.

Koagülasyon: Ejakulasyondan hemen sonra semen sıvı haldeyken hızla koagülum haline gelir. Bu geçiş çok kısa zamanda olur.

Likefaksiyon: Normal bir semen örneğinde 37°C’de likefaksiyon yaklaşık 10-20 dakika içinde gerçekleşir. Bu olay prostattan salgılanan fibrinolizin, fibrinokinaz ve aminopeptidaz adlı enzimlere bağlıdır (43). Likefaksiyon, normal prostat fonksiyonunun bir göstergesidir. Likefaksiyon sonrası, semen yapı ve renk olarak homojen görünümündedir. Eğer likefaksiyon hiç olmuyorsa ya da 30 dakikadan uzun sürüyorsa, bu muhtemel geçirilmiş prostatite bağlı prostatın normal işlev görmediğinin bir belirtisidir. Likefaksiyon süresi spermatozoonun hareketlik kazanması açısından önemlidir.

Hacim: Semen hacmi 1,5 ml ve üstünde olmalıdır.

Viskozite: Viskozite semen akışkanlığına karşı oluşan direnç veya yapışkanlık demektir. Likefaksiyonu başlatan proteolitik enzimler prostatta bulunur ve seminal veziküllerden salgılanan maddeler semeni koagüle eder. Yetersiz likefaksiyon hipervisköz semene yol açar. Yüksek viskozite spermi olumsuz etkilemektedir. Özellikle motiliteyi, konsantrasyonu ve spermin antikorla kaplanmasını etkileyebilmektedir (31, 43, 44).

pH: Normal ejakülatın pH değeri 7,2 ile 8.0 arasında değişir. Akut prostat, vezikula seminalis, epididim enfeksiyonlarında pH 8.0'in üzerinde

saptanabilir. Bu organların kronik enfeksiyonlarında ise pH 7,2 altında saptanabilir. Semen analizinin en önemli kısmını ise mikroskopik inceleme oluşturmaktadır (22).

Mikroskopik İnceleme

Konsatrasyon:

Sperm konsantrasyonu ile erkek fertilitesi arasında bağlantı olduğu eskiden beri bilinmektedir. Fertilité için sperm sayısının olması gereken alt limiti 15 milyon/mL'dir (22). Bunun altındaki değerler oligozoospermik olarak sınıflandırılırlar, 5 milyon/mL' nin altında ise ciddi oligospermi söz konusudur.

Azoospermi tanısı konulurken dikkatli olunmalıdır. Semen 15 dakika süreyle 3000g santrifüj edilip pelet incelemesi yapılmadan azoospermi tanısı konulmamalıdır. Azospermi tanısı alan erkelerin bu şekilde ayrıntılı incelenmeleri sonucu sperme rastlanabilir (45).

Total sperm sayısı basitçe sperm hacmi ile sperm konsantrasyonun çarpımı ile elde edilir.

Konsantrasyon hesaplanırken, sulandırılmış semen örneği, x400 büyütmeli bir mikroskop altında Neubauer sayım kamarasıyla (hemositometre) incelenebildiği gibi, sperm sayımı için özel üretilmiş olan ve sulandırılmadan sayıma olanak veren Horwell veya Makler sayım kamaraları da kullanılabilir. Bu özel kamaralar aynı anda motilite ve morfolojinin de saptanmasına izin verdiğinden sıklıkla tercih edilirler (33).

Motilite:

Sperm motilitesi total sperm popölasyonunda hareketli olan spermilerin yüzdesidir. Dünya Sağlık Örgütü hareketliliği 3 sınıfta değerlendirmektedir (22):

- a) İlerleyici (progresif) hareket
- b) İlerleyici (progresif) olmayan hareket
- c) Hareketsiz

DSÖ kriterlerine göre motilitenin (a+b) <%40 ve/veya ileri doğru hareketin (a) <32% olduğu erkekler astenozoospermik olarak sınıflandırılırlar.

Morfoloji:

Sperm morfolojisi spermatogenezin kalitesini yansıtır, morfoloji anormallikleri (teratospermi) baş, boyun ve kuyruğa göre sınıflandırılır. DSÖ kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %30'un üzerinde olmalıdır. DSÖ'nün önerdiği morfolojik değerlendirme özelliklerini aynı alan ancak sınırda kabul edilen spermatozoayı da anormal gruba sokan daha kesin ölçütlerin kullanıldığı değerlendirme sistemi **Kruger'in kesin ölçütleri** olarak bilinir (46). Baş, düz oval yapıda olmalı, başın eni uzunluğunun 3/5 -2/3'ü arasında değişmeli ve uzunluk 5-7 µm, en 2,5-3,5 µm arasında olmalıdır. Akrozom basın ön kısmının %40-70'ini oluşturmaktadır. Sınırdaki normal baş şekilleri ve/veya oval şekle yakın ise beraberinde bir şekil bozukluğu olmasa da bu anormal kabul edilmelidir. Boyun; implantasyon basın uzun eksenine boyunca ve intakt olmalıdır. Orta kısım; silindirik şekilli ve basın uzun eksenine doğrultusunda bağlanmış olmalıdır. Eni yaklaşık 1 µm, boyu ise başın uzunluğunun 1,5 katı

olmalıdır. Başın büyüklüğünün ½' sini geçen sitoplazmik artıklar ya da sayıca 3 adet üzerinde olanlar anormal kabul edilmelidir. Kuyruk; düzgün yapıda ve orta kısmından biraz daha ince olmalı, kıvrım ve bükülme olmamalıdır. Uzunluğu 45 µm olmalıdır. Bu değerlendirmeye göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi %14'ün üzerinde olmalıdır. %14 ve altındaki değerler anormal kabul edilir (Teratozoospermi).

Prognoza göre 2'ye ayrılır:

İyi prognoz (G pattern): Normal morfolojili sperm oranı %5-14 arası

Kötü prognoz (P patern): Oran %4'den azdır.

Kruger kesin kriterlerinde belirtilen normal morfoloji sınırı WHO'nun son sınıflamasında %4 olarak kabul edilmiştir.

Ek testler: Tüm semen parametrelerinin fertilizasyon üzerine etkisi olmakla birlikte; spermin konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi anormal olduğunda spermin ovuma yapışıp yapışmayacağı ve fertilize etme yeteneği tam olarak belirlenemez. Bunları belirlemek için de bazı özel testlere ihtiyaç duyulur (4,47).

a) Antisperm antikorlarının değerlendirilmesi: Kan testis bariyeri spermleri immün yanıtı korur. Bu bariyer bozulduğunda antijenik cevap gelişir. Risk faktörleri; duktus obstrüksiyonu, genital enfeksiyon, testiküler travma, torsiyondur (47,48). Serumdaki antisperm antikorlarının klinik önemi olmamakla beraber sperme bağlı antikorların sperm motilitesini etkilediği ve fertilizasyonu etkilediği bilinmektedir (49-52).

i. MAR testi (Mixed Antiglobulin Reaction Test)

ii. IBT (Immunobead Test)

b) **Sperm penetrasyon testi:** Kobaylardan toplanan oositlerin, yıkanmış insan spermi ile inkübe edilmesi ve bu spermler tarafından penetre edilen oosit oranlarının fertilitesi bilinen kişilerden alınan spermlerle karşılaştırılması ile yapılır (53).

c) **İnsan zonasına bağlanma testi:** Overdeki zona dokusu kullanılarak, vakalardaki bağlanma ile fertil kontrol spermi karşılaştırılarak yapılır (54).

d) **Sperm sayı ve motilite analizinde bilgisayar yardımlı sperm çözümleyicileri (CASA, Computer- Aided Sperm Analyser):** Kesin, otomatize, objektif sperm konsantrasyonu ve hareket karakteristikleri değerlendirmesini sağlar (55).

e) **Akrozom reaksiyonu:** İnfertil erkeklerde spontan akrozom reaksiyonu kaybında artış görülmüştür (56).

f) **Semenin biyokimyasal analizi:** Semende kreatin fosfokinaz ve rekatif oksijen radikallerinin ölçümünü içerir (57).

g) **Spermin kromatin yapısı ve DNA:** İnfertil erkeklerin büyük çoğunluğunda artmış DNA hasarı vardır ve son zamanlardaki tüm semen parametreleri normal olsa dahi bulgular bu durumun erkek infertilitesini kötü yönde etkilediğini göstermektedir (58-65). Anormal semen parametreleri olan olgularda DNA fragmantasyon indeksi yüksek oranda saptanır (58,62-65).

h) Sperm-servikal mukus etkileşimini değerlendiren testler: İn-vivo test (postkoital test: Sims-Huhner Testi) veya invitro test (modifiye Miller-Kurzrok testi).

i) Ejekülasyon sonrası idrar örneğinin mikroskopik incelemesi: Ejekulat hacmi 1 ml'nin altında olduğunda, retrograd ejakülasyonu değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir.

j) Genetik tarama: Karyotiplendirme ve Y kromozomu PCR analizi.

2.2.5. Sperm DNA Hasarı

Spermatozoadaki DNA hasarının nedenleri ve mekanizması hakkında günümüzde yeterli bilgi birikimi bulunmamaktadır. Yüksek DNA hasarı içeren semen örnekleri IVF ve ICSI uygulamalarında düşük fertilizasyon hızları ve embriyo bölünmesi ile ilişkilidir ve erken embriyo kaybı ile ilişkili olabilir (70). Bu yöntemlerde en iyi morfolojik görünüme sahip, hareketli spermier seçilmesine rağmen DNA hasarı olasılığı her zaman mevcuttur. YÜT'lerinin dezavantajı spermier oosite penetrasyonundaki doğal seçim aşamalarının atlanmasıdır. Böylece anormal genetik materyal içeren sperm oosite minimal efor (IVF) ile yada hiç efor sarfetmeksizin (ICSI) ulaşabilir (70). ICSI uygulamaları sonrası düşük oranlarının yüksek olması da anormal genoma sahip spermierin kullanılması sonucu embriyoda onarılamaz hasarın göstergesi olarak düşünülebilir (71-72).

2.2.5.1. Sperm DNA Hasarı Mekanizmaları

Erkek germ hücre proliferasyon ve maturasyon süreci olan spermatogenez kompleks bir olaydır. Sperm DNA hasarı veya kromatin yapısındaki değişiklikler spermatogenezin her aşamasında meydana gelebilir (73). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda insan spermatozoasındaki DNA hasarını açıklamak için 3 teori ortaya atılmıştır.

a) **Anormal ya da düzensiz kromatin paketlenmesi:** Sperm kromatin yapısı DNA ve sperm nükleer proteinleri arasındaki eşsiz ilişkiyi sağlamak için sıkı bir şekilde paketlenmiştir. Bu nükleer proteinler ağırlıklı olarak yüksek bazik özellik gösteren protaminlerden oluşmaktadır. Sperm DNA iplikleri sıkı ve düzenli ilmekleri oluşturmak üzere protaminler etrafında sıkıca sarmalanmıştır. Sıkıştırma ve stabilizasyon işlemleri sisteinden zengin inter ve intramoleküler disülfid çapraz bağları ile sağlanmaktadır. Spermatozoa kromatin yapısının büyük kısmı protaminlerle sıkıca paketlenmişken, yalnızca %15' lik bir kısmı histonlarla daha gevşek olarak paketlenmiştir. İnfertil erkeklerin fertil erkeklere oranla artmış histon/protamin oranına sahip oldukları gösterilmiştir. Bu durum anormal kromatin paketlenmesi olarak adlandırılır ve spermin dış strese karşı duyarlılığının artmasına neden olduğu düşünülmektedir. İnfertil erkeklerin %5-15'inde protamin eksikliği olduğu gösterilmiştir (74). Yeni çalışmalarda da protamin eksikliğine bağlı sperm DNA hasarı ve düşük fertilizasyon kapasitesi arasındaki ilişki gösterilmiştir (75).

Spermatozoanın mitokondrial DNA'sı küçük, dairesel yapıdadır ve herhangi bir özel protein ile paketlenmemiştir. Bu nedenle mitokondrial DNA'nın sadece yardımcı sadece esas tamir mekanizmalarına sahip olduğuna inanılır. Daha önceki çalışmalarda sperm motilitesinin spermin orta kısmındaki mitokondrial DNA volümü ile doğru orantılı olduğu gösterilmiştir. Mitokondrial sperm DNA'sı fazla sayıda mutasyon ve delesyonlar göstermekte ve azalmış sperm motilitesine neden olmaktadır. Mitokondrial DNA'nın kalıtımı %99 oranında maternaldir, olguların sadece %1'inde mitokondrial DNA mutasyonlarının paternal geçişi söz konusudur (76, 77).

b) Apoptozis: Apoptozis spermatogenezde 2 olası rolü bulunmaktadır: Bunlardan ilki germ hücre popülasyonunu sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıya indirmek ve ikincisi anormal spermatozoaların seçilerek yok edilmesidir (78). Yaşam boyu apoptozis ile yaşlanmış, enfekte, hasarlı yada mutasyona uğramış hücreler seçilerek yok edilmektedir. Normal koşullarda erkek potansiyel germ hücrelerinin yaklaşık yarısı spermatogonya ve spermatosit aşamasında kaybedilmektedir (79).

Apoptozis sırasında hücreler küçülür, hücre zarı parçalanır, hücre iskeleti tekrar düzenlenir, nükleer yoğunlaşma ve intranükleosomal DNA fragmentasyonu oluşur. DNA hasarı ve parçalanması apoptotik hücre ölümünü yansıtan en iyi biyokimyasal markerdir ve tanı amaçlı kullanılmaktadır (80). Apoptozis normalde fizyolojik bir süreçtir, ancak aşırıya kaçması durumunda sperm sayısında azalma ve infertiliteye neden olabilmektedir. Bu durum toksik

kimyasallara ya da radyasyona maruziyet sonucunda da ortaya çıkabilmektedir (82).

Caspas (cysteiny l aspartate-specifi c proteinases) olarak adlandırılan bazı spesifik proteinazlar apopitoz regölasyonunda önemli role sahiptir. İnsan seminifer tüböl epitelinde inaktif proenzimler olarak eksprese edilen ve proapopitotik sinyallerle aktive olan birçok proteinazın varlığı bildirilmiştir. Bunlardan caspas-3 en önemlisidir (82, 83). Caspaslar tarafından aktive edilen DNAaz'lar DNA fragmantasyonundan sorumludur (80). Bcl-2 ailesi proteinleri (bcl-x, bcl-w, bax, bak, bid, bad), tümör süpresör p 53 proteini, nükleer faktör kappa B ve ısı şok proteinlerinin (HSP) apopitozu düzenlemede görevli oldukları gösterilmiştir (84-87). Son çalışmalar antiapopitotik fonksiyon sergileyen ve spermatozoon matürite işareti olarak kabul edilen HSPA2 adlı protein ve erkek fertilitesi üzerinde yoğunlaşmıştır. HSPA2 bir spermatozoon matürite işareti HSP70 şaperon protein ailesinin üyesi olan testis spesifik proteindir. HSP70 bloke edilen farelerde mayoz duraksamasına ek olarak karakteristik apopitotik DNA patern bozulmasıyla germ hücre apopitozisi artışı görülür. Yapılan çalışmalarda HSPA2 gen ekspresyonu oligozoospermik grupta normozoospermik gruba göre daha düşük bulunmuştur (88). HSP70'in apopitoziste çalışma mekanizması, apopitotik enzimler olan Caspas-3 ve-9'un salınmasıyla gerçekleşir. Böylece HSPA2, apopitotik sürecin olası inhibitörüdür (89).

Anormal sperm parametrelerine sahip erkeklerde semende yüksek oranda apopitotik markerlar (bclx, p53, annexin V) saptanmıştır (90,91). Sakkas ve arkadaşları bu olgularda özellikle Fas + spermatozoaların oranının %50'lere

ulaştığını bildirmişlerdir (81). Anormal semen parametreleri olan erkeklerde apoptotik markerlara (örn. Fas+ veya DNA hasarı) sahip spermatozoaların çok miktarda bulunduğu ve uygun olmayan apoptozise neden oldukları da gösterilmiştir (81). Uygun olamayan apoptozis sonuçta anormal apoptotik marker seviyeleri, düşük protaminli anormal kromatin paketlenmesi ve DNA iplik hasarına neden olmakta ve oksidatif hasar/çevresel faktörlere daha duyarlı sperm üretimi gerçekleşmektedir (92).

c) **Oksidatif stres:** Serbest radikal bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektronu bulunan atom ya da molekül olarak tanımlanmıştır. Reaktif oksijen radikalleri (ROS) yüksek derecede reaktif oksijenlenmiş ajanlara sahip serbest radikaller sınıfıdır (93). İleri derecede reaktiftirler. DNA, proteinler ve doymamış yağlarda ciddi kimyasal değişikliklere neden olurlar. ROS reperfüzyon hasarı, kanser, inflamatuvar hastalıklar ve yaşlanma gibi çok sayıda patolojiden sorumlu tutulmuşlardır (94). ROS sperm plasma membranında lipid peroksidasyonuna neden olarak sperm fonksiyonu ve fertilizasyonda görevli bazı protein aktivitelerinin değişmesine, tek/çift iplik DNA hasarına neden olurlar (95,96). Süperoksit (O_2^-) ve hidroksil radikallerinin mutajenik oldukları, kromozom delesyonlarına ve kardeş kromatin değişikliklerine neden oldukları bilinmektedir (97,98).

Fertil erkeklerde semen sıvısındaki antioksidanlar spermi ROS hasarından korumaktadır. Antioksidanların koruma kapasitesini aşan düzeyde ROS üretimi olan olgularda ise reproduktif kapasite azalmaktadır (99). Ancak bu olgularda daha çok kabul gören mekanizma azalmış antioksidan üretimidir (100).

Semendeki yüksek ROS'un ana kaynağı morfolojik olarak anormal spermatozoalar ve lökositlerdir (99). Aktive lökositler, aktive olmayanlara göre 100 kat fazla ROS üretme kapasitesine sahiptir (101). Anormal semen parametrelerine sahip erkelerin sperm DNA' ları, lökosit aracılı ROS hasarına daha duyarlıdır. Eğer semende lökosit konsantrasyonu 3 milyon/ml'yi geçerse fertilizasyonda anlamlı bozulma gözlenir (22).

ROS'un ikinci kaynağı spermatozoonun kendisidir. İnsan spermatozoonu endojen ROS'un az bir kısmını kontrollü bir şekilde oluşturma yeteneğine sahiptir (83,101). Aslında spermatozoon kapasitasyonu için sinyal iletim mekanizması sırasında faydalanılmak üzere az miktarda süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit üretmektedir (102). Spermatozoonun H₂O₂'nin düşük konsantrasyonu ile inkübe edildiğinde kapasitasyonu (97), hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyon yeteneği kazanması ile fertilizasyon yeteneğinin stimüle edilebildiği gösterilmiştir (103). Erken evre spermatositler, yuvarlak ve uzamış spermatidler hepsi aynı düzeyde ROS yaparlar. Epididimisteki henüz maturasyonunu tamamlamamış spermatozoon bunlardan daha fazla ROS üretmektedirler (97,81). Matürasyonu bozulan spermatozoon spermiyogenezin son evresinde fazla sitoplazma artığını atamaz. Sonuçta spermatozoon normalden daha fazla ROS yapar ve oksidatif stres belirtileri verir (97).

2.2.5.2. Sperm DNA Hasarı Belirleme Yöntemleri

Günümüzde kullanılan çok farklı sperm DNA hasarı belirleme yöntemleri mevcuttur. Bu yöntemler basit boyama yöntemleri olabileceği gibi daha komplike yöntemler olabilmektedir (**Tablo 4**).

Tablo 4. Sperm Kromatin Hasarını Belirleme Yöntemleri

Yöntem	Parametre	Analiz metodu
Asidik Anilin Mavisi	Nükleer maturite/ DNA protein yapısı	Işık Mikroskop
Toluidine Mavisi	Nükleer maturite/ DNA protein yapısı	Işık Mikroskop
Kromomisin A3	Nükleer maturite/ DNA protein yapısı	Floresan Mikroskop
Speerm kromatin dağılımı analizi (SCD)	DNA parçalanması (tek sarmal)	Floresan Mikroskop
İn situ nick translation	DNA parçalanması (tek sarmal)	Floresan Mikroskop Flow sitometre
Akridin oranj	DNA çift iplik sarmalının birnirinden ayrılması	Floresan Mikroskop Flow sitometre
Terminal transferaz analizi (TUNEL)	DNA parçalanması	Işık/Floresan mikroskopu Flow sitometre
Comet yöntemi	DNA parçalanması (dsDNA)	Floresan mikroskopu
Sperm kromatin yapısı analizi-(SCSA)	DNA çift iplik sarmalının birnirinden ayrılması (asit/ısı)	Flow sitometre
Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	8-OhdG	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

a) Asidik Anilin Mavi Boyaması: Bu teknik lizinden zengin histonlar ile arginin sistein zengin protaminler arasında ayırım yapma prensibine dayanır ve ejakülattaki spermatozoanın temel nükleer protein bileşiminin farklılıklarını belirler. Histondan zengin immatür spermatozoa lizinden zengin olup mavi

boyanırken, protaminden zengin matür spermatozoa ise arginin ve sisteinden zengindir ve boyanma göstermez (104). Anilin asidik boyama sonuçlarının anormal sperm kromatin yapısı ve erkek infertilitesini belirlemede başarılı olduğu gösterilmiştir. İn vitro fertilizasyon sonuçlarını tahmin etmede iyi bir gösterge olmakla birlikte fertilizasyon/bölünme potansiyelini ve ICSI sonrası gebelik hızlarını öngörmeye yetersizdir (105).

b) Toluidine Mavi Boyama: Toluidine mavisi bazik bir nükleer boyadır ve kromatinin metakromatik ve ortokromatik boyanmasını sağlar. Bu boyama yöntemi DNA yapısını ve paketlenmesini belirlemede hassastır (106). Zayıf sperm bütünlüğünü gösteren metakromatik boyama sadece ağır DNA hasarını gösterir. Bununla birlikte toluidin mavisi ile yapılan boyama sperm kromatini hakkında güvenilir bir metod olarak kabul edilir. Akridin oranj ile ortaya çıkan kırmızı portakal rengi sperm başı sayımlarının anormal nükleus sayımları ile ilişkisi gösterilmiştir (107). Asidik anilin mavisi ve toluidin mavisi metodları basit ve ucuzdur. Geleneksel mikroskoplarda incelenmek üzere kalıcı preparatların hazırlanması gibi bir üstünlüğe sahiptir. Toluidin mavisi ek olarak hücrelerin morfolojik yapısını belirlemede kullanılabilir. Ancak her 2 metodun tekrarlanabilme yetneği sınırlıdır ve az sayıda hücrenin değerlendirilmesinde yardımcıdırlar.

c) Kromomycin A₃ Yöntemi: Kromomisin A₃ yöntemi, protaminden fakir DNA' nın indirek gözlenmesi yoluyla zayıf paketlenmiş kromatin yapısını ortaya çıkarır. Guanin-sitozinden zengin bölgelere spesifiktir. Kromomisin A₃ ve

protaminler DNA içinde aynı yere bağlanmak için yarışır. Yüksek kromomisin A₃ floresansı gösteren bölgelerin düşük protaminasyona sahip olduğu kabul edilir (108). Sakkas ve arkadaşları ICSI olgularında, kromomisin A₃ pozitifliğinin tümüyle fertilizasyon başarısızlığını göstermediğini, zayıf kromatin paketlenmesine işaret ederek dekondansasyonu ve olası düşük fertilizasyon kapasitesini gösterdiğini bildirmişlerdir (109). Erkek infertilitesinde kromomisin A₃ pozitifliği sperm konsantrasyonu, motilitesi ve özellikle normal morfoloji ile negatif korelasyon göstermektedir (108).

d) DNA Kırık Tespiti-Fluorescent İn Situ Hibridization (FISH): Agar matrikse gömülü hücreler alkali solüsyona maruz bırakılarak, DNA çift iplikçiklerinin tek sarmal DNA'ya dönüşmesi sağlanır. Deoksiribonükleik asit kırılması arttıkça tek sarmal DNA oluşum oranı artar. Bu yöntem in situ olarak DNA kırıklarının ve miktarının belirlenmesine olanak sağlar (109). Teknik kromatinin yapısal özelliklerini ortaya koyar ancak pahalıdır, zaman alıcı ve karmaşıktır. Bununla birlikte diğer yöntemlere üstünlüğünün olmaması kullanımını sınırlayıcı bir faktördür.

e) İn situ nick translation: Bu yöntem DNA polimeraz I kalıp bağımlı enzim ile katalize edilen reaksiyon aracılığı ile tek DNA iplik kırılmalarının biyotinize edilmiş deoksiuridin trifosfat (dUTP) ile birleşme miktarını tayin eder. Spermatozoadaki nükleer DNA'nın yeniden yapılanması sırasında açığa çıkan anormallikleri belirler. Bu sayede morfoloji ile belirlenemeyen ısı maruziyetine veya lökositlerin ürettiği serbest radikal maruziyetine bağlı sperm hasarını

belirlemede daha hassastır (110). İn situ nick translation ile belirlenen sperm nukleus bütünlüğü sperm motilitesi ve yapısı arasındaki açık ilişkiyi göstermektedir (92,99).

f) Akridin Orange: Bu yöntem floresan ışık ya da flow sitometre için kullanılabilir. Asit uygulaması sonrası oluşan DNA denatürasyonunu ölçer. Akridin orange uygulaması ile yeşil renkte floresans veren normal yapıdaki DNA, asitle denatürasyon sonrası kırmızı floresans verir. Normal sperm ile varikozel gibi farklı androlojik patolojilere bağlı anormal sperm yapısını ayırt etmede daha hassastır (111). Akridin orange ile boyanan hücreler, boyanmayanlara göre daha fazla yapısal anormallik (vakuollü nükleus gibi) taşırlar. Bu analiz sperm kalitesini belirleyen dengeli bir ölçümdür. Tek sarmallı DNA değerlendirmesinde akridin oranj analizi ve diğer teknikler (terminal transferaz analizi gibi) güçlü ilişkiler vardır (62).

g) Comet Assay: Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinir. Nötral elektroforez tamponları süper helezonlaşmış nükleus ile kuyruğu düz olan hasar görmüş hücreden çift sarmallı DNA spirallerinin göçünü göstermek için kullanılır. Bu görünüm floresan mikroskop altında kuyruklu yıldıza benzediği için yöntem comet ismini almıştır (112). Kryopreservasyon sonrası DNA hasarını belirlemede özellikle başarılıdır. Ayrıca açıklanamayan infertilite olgularında embriyo gelişimini tahmin etmede kullanılabilir (61).

h) Terminal Uridine Nick- End Labeling (TUNEL) Assay: Bu yöntem çift sarmal DNA kırıklarında birleşen dUTP' lerin deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi ile katalize edilen bir reaksiyonla belirlenmesi esasına dayanır.

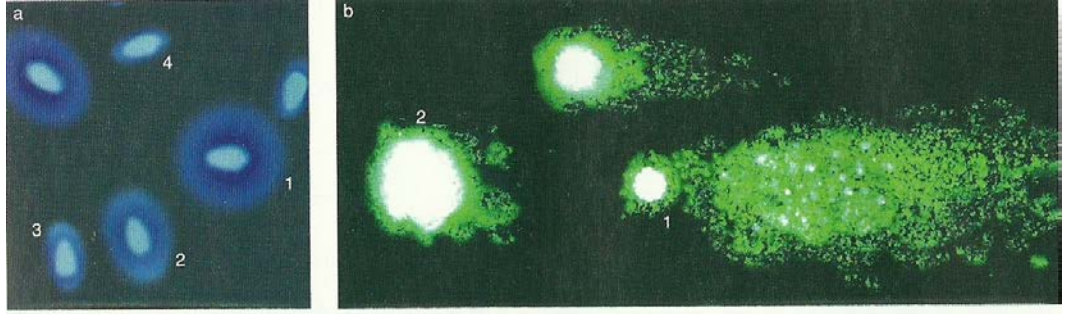
Sperm Kromatin/DNA anormalliklerine bağlı erkek infertilitesinde bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. Sperm motilitesi, DNA fragmentasyon yüzdesi ve ejakülattaki sperm konsantrasyonu ile terminal transferaz analizi sonuçları arasında negatif korelasyon gösterilmiştir ve IUI gebelik hızlarını, IVF embriyo bölünme hızlarını ve ICSI fertilizasyon hızlarını tahmin etmede kullanılabilir olduğu düşünülmektedir. Ayrıca tekrarlayan gebelik kayıplarında da etyoloji saptamada yararlı olabilmektedir. Ancak diğer yöntemlere göre daha pahalı ve emek isteyen bir yöntemdir (61,63).

i) Sperm Kromatin Yapı Analizi-Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA): Bu yöntem asit kullanılarak oluşturulan heliks sarmal yapısının akridin oranj kullanılarak belirlenmesine dayanır. Bu protokol ısı veya asit kullanılarak farklı 2 şekilde yapılabilir. İki yöntem aynı sonuçları vermekle birlikte asit sperm kromatin yapı analizi daha kolay uygulanabilmektedir (113). DSÖ'nün semen parametrelerinde kullanıldığı için erkek infertilitesi ile ilgili epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Fertil ve infertil erkeklerin semen örneklerinde %30 DNA parçalanma indeks eşiği değeri kullanılarak DNA hasarını doğru şekilde tahmin edebilen bir yöntemdir (114). Fakat pahalı cihazlar (flow sitometre) ve yüksek tecrübeli personel gerektirmektedir. Terminal transferaz analizi yöntemi ile gerçek DNA hasarı ölçülürken sperm kromatin yapı analizi yöntemi DNA denaturasyonuna yatkınlığı yani DNA kırılgenliğini ölçmektedir (60).

j) **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi:** Oksidatif DNA hasarı olan ürünü olan 8-OHdG seviyesinin ölçümünü yapar (115).

k) Halo Sperm Yöntemi-Sperm Chromatin Dispersion (SCD)

Prensip: Fragmente olmayan DNA agaroz matriks ortamına bırakıldıktan sonra parçalayıcı solüsyonlara maruz bırakılırsa nükleoidlerde geniş haleler oluşur. DNA kırıkları mevcut ise bu haleler çok daha geniş boyutlara ulaşır. **Şekil 3** (116).



Şekil 3. Sperm kromatin hasarının Halosperm® yöntemi ile gösterilmesi

**Textbook of assisted reproductive techniques: laboratory perspectives/ David K. Gardner, Ariel Weissman, Colin M. Howles, Zeev Shoham.*

(a) Floresan ile boyanmış spermlerdeki DNA dağılımının farklı kalıplar halinde gösterilmesi:

1: büyük boy halo, 2: orta boy halo, 3: küçük boy halo, 4: halo yok

(b) 1: Hasara uğramış sperm, 2: Hasara uğramamış sperm

Teknik (117)

- 1) Öncelikle ham veya yıkanmış sperm örnekleri 5-10 milyon/mL konsantrasyon aralığında olacak şekilde ayarlanır.
- 2) Süspansiyon 37 C' de %1' lik düşük erime noktasına sahip agaroz ile karıştırılır.
- 3) Bu solüsyondan 50 mL alınarak yüzeyi 80 C' de kurutulmuş %0.65' lik standart agaroz ile kaplı cam lama alınır. Üzerine lamel kapatılarak 4 C' de 4 dakika sabitleşmesi için beklenir.
- 4) Lamel dikkatli bir şekilde alındıktan sonra lam taze hazırlanmış asid solüsyonuna (0.08 N HCL) bırakılır, karanlıkta 22 C' de 7 dakika beklenir. Denatürasyon oluşturulur.
- 5) Proteinleri uzaklaştırmak için lam nötralize edici ve parçalayıcı solüsyonlardan ilkinde (0.4 mol/L Tris, 0.8 mol/L DTT, %1 SDS, 50 mmol/LEDTA ph 7.5) bırakılır, oda ısısında 10 dakika beklenir.
- 6) Daha sonra lam nötralize edici ve parçalayıcı özellikteki ikinci solüsyona (0,4 mol/L Tris, 2 mol/L NaCl, %1 SDS, ph 7.5) bırakılarak 5 dakika oda ısısında beklenir.
- 7) Lam 2 dakika boyunca Tris-Borat EDTA solüsyonu ile yıkanır. Sırasıyla ikişer dakika süreyle %70, %90 ve %100 ethanol banyosu ile dehidrate edildikten sonra 2 dakika havada kurutulur.
- 8) Hücreler DAPI (2µg/ml) ile boyanarak floresan miroskop ile incelenir.

Avantaj ve Limitasyonlar: Yöntemin en önemli avantajı renk belirlemesi yada floresan yoğunluğu belirlenmesine gerek olmamasıdır. Küçük haloya sahip olan ya da olmayan spermatozoalar ile büyük haloya sahip spermatozoaların yüzdesini belirlemek önemlidir. Ayrıca test hızlı, basit ve tekrar edilebilir özelliktedir. Sonuçları sperm kromatin yapı analizi (118) ve terminal transferaz analizi (119) ile benzerdir. Klinik çalışmalarda sperm DNA hasarı belirlemede başarı ile kullanılmaktadır. Gerektiğinde anoploid sperm sayısını belirlemek için FISH ile kombine edilebilir (120). Oksidatif DNA hasarı da 8-oxoguanin DNA probu kullanılarak bu yöntem ile belirlenebilir (121). Ticari olarak sunulan Halosperm® kiti (Halosperm® DNA SL, Madrid, Spain; Conception Technologies, San Diego, USA) son yıllarda geliştirilmiştir ve sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmalar SCD yöntemi ile belirlenen sperm DNA fragmentasyonunun YÜT'lerinde fertilizasyon hızı, embriyo kalitesi ile negatif korelasyon gösterdiğini ancak klinik gebelik hızları ve doğum ile ilişkili olmadığını göstermektedir (122,123).

2.3. Açıklanamayan İnfertilite

Açıklanamayan subfertilite bir yıllık korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamayan çiftlerde yapılan tanısal testler sonucu herhangi bir nedeninin bulunamaması durumudur (12,124). Açıklanamayan subfertilitenin ortalama insidansı %15 olarak bildirilmektedir (12,124,125). Açıklanamayan subfertilitenin insidansının kullanılan tanısal kriterlerin farklı olmasına bağlı olarak %10-30 arasında değiştiği bildirilmiştir (12,124-126). Açıklanamayan subfertilite tanısı

konabilmesi için tam bir infertilite araştırılması yapılmalıdır. Tanı için çeşitli çalışmalarda farklı tanısal işlemler önerilmesine rağmen hangi testlerin daha önemli ve gerekli olduğuna dair bir görüş oluşmamıştır.

2.3.1. Açıklanamayan subfertilite tanısı için önerilen testler

İnfertilite tanısı için öneriler tanısal testlerin uygulanmasında bugün için kabul edilen genel görüş pahalı ve gereksiz testler ve tedavilerden sakınılmasına özen gösterilmesi olarak bildirilmektedir (127-131). 1992’de European Society of Human Reproduction and Embriology’nin (ESHRE) açıklanamayan subfertilite çalışmasının sonuçlarına göre gebelik hızı ile korelasyonuna dayalı olarak infertilite çalışmalarının 3 kategori içinde değerlendirilmesi önerilmiştir (127).

1. Kategori: Semen analizi, HSG ve L/S ile tubal açıklığın değerlendirilmesi ve midluteal progesteron ile ovulasyonun tespiti gibi gebelikle korelasyonu olan testler;
2. Kategori: Zona free hamster egg penetration test, postkoital test ve antisperm test ve antisperm antikor ölçümü gibi gebelikle uyumlu korelasyonu olmayan testler
3. Kategori: Endometrial günlendirme, varikosel araştırılması ve klamidya testleri gibi gebelikle korelasyonu olmadığı düşünülen testler.

Daha sonra bu sınıflama 1996 ve 2000 yıllarında Capri’de yapılan Workshop’larda ESHRE tarafından güncelleştirilmiştir (128,129). 1996 “ESHRE

Capri workshop’’unda tedavi almayanlar ile karşılaştırıldığında; bu neden tedavi edildiğinde fekundabilite sağlanıyorsa sözkonusu nedeni gösteren anormal test infertiliteyle ilişkili olarak kabul edilmiştir (129,130). 2000 ESHRE Capri Workshop’unda ise ovulasyonu doğrulamada en iyi testin progesteron ölçümü olduğu, uterus ve tüplerin yapısının primer araştırılmasının HSG ile yapılması gerektiği; ultrasonun özellikle basit kontrast madde ile önemli bilgi verebileceği; laparoskopinin ise endoskopik cerrahide yada daha ileri tanısal işlemler için saklanması gerektiği bildirilmiştir (129,130).

2.3.2. Açıklanamayan subfertilitenin tedavisi

Açıklanamayan subfertilitenin belirli bir etyolojik faktörü olmadığı için tedavisinde de standart bir yöntem yoktur. Tedavide genellikle fekunditenin artırılmasına yönelik ampirik metotlar uygulanmaktadır.

Açıklanamayan subfertilite tedavisinde kullanılan ampirik uygulamalar:

- i. Oral veya enjektabl medikasyonlarla superovulasyon
- ii. İntrauterin inseminasyon
- iii. İntrauterin inseminasyon + süperovulasyon
- iv. Yardımcı üreme teknikleri

Yukarıda sayılan tedavi yöntemlerinin sonuçlarının değerlendirilmesi hastalarda bazal bir spontan gebelik oranının varlığı nedeniyle oldukça zordur. Açıklanamayan subfertilitesi olan ve tedavi edilmeyen kadınlarda gözlenen ortalama siklus fekunditesi yaklaşık %2-4’tür. Bu değerler ortalama siklus

fekunditesi %20-25 olan normal fertil çiftlerden yaklaşık %80-90 oranında düşüktür (132). Tedaviden bağımsız gebelik olasılığının infertilite süresi ve kadının yaşı ile ters orantılı olduğu ve progresif olarak azaldığı gösterilmiştir (133,134).

2.4.Sperm Yıkama Yöntemleri

Semen örneği; seminal sıvı, spermatozoa, epitelyal hücreler, immün hücreler, debris ve bakterilerden oluşmaktadır. Bu komponentlerin hepsinin spermin kalitesi üzerinde olumsuz etkileri vardır, insan spermi seminal plazma ile 30 dakikadan daha uzun süreli temas ettiğinde spermier fertilizasyon özelliğini kaybeder (6). Bu nedenle YÜT'lerinde semen yıkama işlemi sperm hücresini seminal plazmadan ayırmak amacıyla yapılmaktadır. Seminal plazma spermin kapasitasyonu engelleyen çeşitli faktörler içerdği için sperm hücresi semen sıvısı içindeyken dölleme yeteneği yoktur (6,93).

İn vivo olarak koitusta fornikse boşalan semen içindeki spermier hızla servikal kanala geçerek seminal plazmanın olumsuz etkilerinden kurtulurlar. Aynı koşulu sağlamak amacıyla in vitro yöntemlerin kullanılacağı durumlarda sperm yıkama işlemi uygulanır. Semen yıkama işlemiyle taklit edilen şey aslında sperm hücrelerinin serviksten geçerken içinde bulundukları plazmadan uzaklaşması işlemidir. Çeşitli yöntemler ile sperm örneği laboratuar ortamında birçok aşamadan geçirilerek motilite ve morfoloji gibi sperm fonksiyonlarında düzelme ve spermierin zararlı olabilecek çevresel etkenlerden uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Bu yöntemler ile seminal plazma, ölü veya zarar görmüş anormal

spermatazoa, immatür germ hücreleri, bakteri, hücresel artıklar, beyaz küreler ve prostaglandinleri uzaklaştırılır. Günümüzde birçok farklı sperm hazırlama tekniği mevcuttur (**Tablo 5**) (6, 93, 135).

Tablo 5.Sperm Hazırlama Teknikleri

■	<i>Yıkama ve santrifüj</i>
■	Yıkama ve swim-up
■	Temiz sperm ile swim-up (tabakalandırma)
■	Self migrasyon sedimentasyon
■	Glass-wool column filtrasyonu
■	Glass-bead separasyonu
■	Albumin sütunlarına doğru swim-down
■	Percoll, saf sperm veya isolate gradient
■	Mini-percoll gradient
■	Nycodenz gradient
■	Ficoll ile sperm seçimi
■	Parafin altında sedimentasyon
■	Transmembran migrasyon
■	Nikel mesh karşısında migrasyon
■	Sephadex sütunları

Bunların arasında en sık kullanılan yöntemler:

■ Klasik swim-up, migrasyon sedimentasyon, dansite gradient, glass wool filtrasyon yöntemleridir (135).

Çalışmamızda kullanılan iki yıkama yöntemi swim-up ve gradient yöntemleridir.

■ Swim-up yönteminde sperm kendi hareketliliği ile semenden ayrılır. Ejakulattaki hareketli sperm sayısının tüm sayıya oranı yüksek ve sperm dışı hücre sayısı düşük ise bu yöntem tercih edilir.

■ Gradient yöntemi normal sperm ile anormal olanların yoğunluğunun farklı olması prensibine dayanır. Tabakalar hazırlanırken en yoğun olan her zaman en altta olacağından normal sperm de santrifüj sırasında bu en yoğun tabakaya göç eder ve çökelti oluşturur. Semende bulunan diğer bileşenler ve anormal sperm de diğer tabakalar göç eder ve böylece sağlıklı sperm semenden ayrıştırılmış olur (135).

Kaliteli sperm seçme potansiyeli yüksek olan gradient ve swim-up yöntemlerinin özellikleri karşılaştırmalı olarak **Tablo 6**'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Dansite gradient ve swim-up yöntemlerinin özellikleri

Özellik	Dansite gradient	Swim-up
■ Motil spermleri diğer hücrelerden ayırır (68,136,138,147-152)	+	+
■ İmmatür, yaşlı ve ölen spermleri ortadan kaldırır (137-139)	+	+
■ Anormal morfolojide spermleri ortadan kaldırır (68,137-139)	+	+
■ Kromatini hasarlı olan spermleri ortadan kaldırır (137,139,147,157-163)	+	+
■ Bakteri ve virüsleri ortadan kaldırır (140,141)	+	+
■ Reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırır (93,136,150)	+	+

2.4.1. Swim-up (yukarı yüzdürme) yöntemi (136)

Swim-up yönteminde spermin geniş yüzeye yayılması hareket edebilecek sperm sayısını arttırır. Bu nedenle yuvarlak tabanlı tüpler kullanılmalıdır. Bu tüpler konik tabanlı tüplerin tersine tabanda daha geniş bir yüzey sağlarlar.

Yıkama sonrasında elde edilen 0,5 ml'lik örnek yavaşça pipete edilerek homojen bir karışım elde edilir. 1 ml kültür sıvısı bu karışımın üzerine yavaşça bırakılarak 2 ayrı katman oluşumu sağlanmalıdır. Tekniğin başarılı olabilmesi için alt ve üst katmanların birbirine karıştırılmaması gerekir. Spermli yüzebilecekleri maksimum yüzey sağlamak için konik dipli tüpe 45 derece eğim verilerek % 5 CO₂ inkübatöre yerleştirilir ve 1 saat 37°C'de inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında üst kısımdaki sıvının ¾ ü (yaklaşık 0,75 ml) dikkatli bir şekilde pipete edilerek steril bir tüp içerisine alınıp bu örnekten sayım yapılır.

2.4.2. Gradient Yöntemi

Gradient tekniği Percoll, albümin, Nycodenz, Ficoll ve sükröz polimerleri gibi malzemelerle gradientler oluşturup sperm hücrelerinin santrifüj yardımı ile bu sıvı kolonlardan süzdürülmesidir (142). Polivinilpirolidon (Polyvinylpirolidone, PVP) ile kaplı koloidal silika partikülleri içeren Percoll solüsyonu bu yöntemde kullanılan ilk materyaldir. Günümüzde kültür ortamları üreticileri değişik isimlerle gradientler üretirler ve tümündeki ortak özellik, koloidal silika partikülleri içermeleridir. Percoll, geçmişte yaygın kullanım alanı bulmuş olmasına rağmen endotoksin kontaminasyonu olasılığı nedeniyle günümüzde Nycodenz içeren solüsyonlar tercih edilmektedir.

Gradient uygulamalarında 2 katman kullanılır, gradient konsantrasyonları azaldıkça elde edilen sperm sayısı daha fazla olmasına rağmen, normal ve dolayısı ile fonksiyonel olan spermeler daha yoğun olduğundan alt katmanın konsantrasyonu yüksek tutulmalıdır. Yapılan çalışmalarda alt katman konsantrasyonları % 72 ile % 95 arasında denenmiş % 80 eşik değer olarak kabul edilmiş ve alt tabakada en az % 80 konsantrasyonun kullanılması önerilmiştir (143). Uygulamalarda genellikle % 90 gradiyent konsantrasyonu tercih edilir.

Santrifüj hızı 300g olarak uygulanmalıdır. Çalışmalarda santrifüj süresi ile ilgili sürenin uzaması ve santrifüj hızının yükselmesine bağlı olarak spermin hasar görme ihtimalinin arttığı gözlemlenmiştir (144). Bu nedenle uygulamalarda g gücü, sperm değerleri göz önüne alınarak santrifüj uygulama protokolü belirlenmelidir (**Tablo 7**).

Steril konik dipli 14 ml hacimli tüpe % 90 konsantrasyonda 1 ml solüsyon konulur. Üzerine 1 ml % 50'lik konsantrasyonundaki solüsyon tüp kenarından yavaşça akıtılarak eklenir ve tabakalar oluşturulur. Bu tabakaların üzerine en fazla 2 ml semen eklenerek 20 dakika santrifüj edilir. Rutin olarak gradient işlemlerinde 18 dakika 600 g uygulanmaktadır. Santrifüj sonrası dipte kalan 0,5 ml dışındaki kısım tüp dışına alınarak dipte kalan kısmın üzerine 3 ml kültür sıvısı eklenerek yıkama işlemi uygulanır, bol miktarda kültür sıvısı ile yıkamadaki amaç silika partiküllerin uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Supernatan uzaklaştırılırken pelete dokunmamaya ve pipetleme sırasında anafor oluşturmamaya özen gösterilmelidir. Bu amaçla bu işlem için otomatik pipetörlerin kullanılması uygundur.

Tablo 7. Gradient Miktarı Seçim Kriterleri

Gradient miktarı	Endikasyon
1 ml Yıkama yapmadan semen gradientler üzerine yerleştirilir Santrifüj süresi 10-20 dakika	Normal sperm Total Motil Sperm 15 milyon/ml Volüm >0,5 ml Sayı ≥ 20 milyon/ml ≥ 30 motil ≥ 5 normal morfoloji +3, +4 progresyon
0,5 ml Volüm 1,5 ml'den fazla ise katmanlandırma yapmadan önce yıkama yapılmalıdır Santrifüj süresi 10-30 dakika	Hafif erkek faktörü Total Motil Sperm 5-15 milyon/ml Volüm $\leq 0,5$ ml Sayı 6-19 milyon/ml < %30 motil < % 5 normal morfoloji + 1 progresyon
0,3 ml Yıkama Yapılmalıdır Santrifüj süresi 15-45 dakika	Ciddi erkek faktörü a. Total Motil Sperm <5 milyon/ml b. Total Motil Sperm 6-8 milyon/ml <%5 normal morfoloji

Yöntemin erkek infertilitesi olgularında yaygın kullanımı suboptimal sperm örneklerinde modifikasyonlar yapılmasını gerektirmiştir. Özellikle oligoastenoteratozoospermik olgularda ve testis biyopsisiyle elde edilen örneklerde 0,3 ml gradient kullanılarak uygulanan mini-percoll tekniği gerek fertilizasyon oranları gerekse gebelik oranlarında artışa yol açmıştır (145, 146).

Bu yöntemin kullanılması ile gradient volümlerinin azaltılması hem katmanlar arasında sperm migrasyonunu artırmakta hem de miktarın az olmasına rağmen seminal plazmanın ayrıştırılarak temiz bir preparat edilebilmesini sağlamaktadır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu prospektif randomize çalışmada sperm yıkama yöntemi olarak “**swim-up**” (sperm yüzdürme) ve “**gradient**” (farklı yoğunluk ayırma) teknikleri açıklanamayan infertilite ve erkek faktörü infertilite tanısı alan ve çalışma kriterlerine uyan 65 hastada sperm DNA fragmantasyon oranları karşılaştırıldı. Çalışma Ocak 2009-Nisan 2012 tarihleri arasında “Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezine” çocuk istemi ile başvuran, hastalarda uygulandı. Çalışma önce “Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulun’a” sunuldu ve etik kurul onayı alındı. Çalışmaya primer infertil daha önce YÜT uygulanmamış olan hastalar dahil edildi.

3.1.Hasta Seçimi

3.1.1. Çalışmaya dahil olma kriterleri:

-En az 1 yıl düzenli cinsel ilişki ve korunmamaya rağmen gebe kalamamış olmak

-İnfertilite incelemesinde:

1. Düzenli menstrüel siklülara sahip olması.
2. Ovulasyonun bazal vücut ısısı (bifazik, midlüteal progesteron, serum progesteron ölçümü > 3 ng/dl) ölçümleri veya ultrasonografik olarak ovulasyonun gösterilmesi ile teyit edilmiş olması.
3. Histerosalpingografide her 2 tuba uterinanın açık olması.

4. Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre normal olması (açıklamayan subfertilite) veya yıkama işlemi öncesi sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml az olması (erkek infertilitesi)
5. Daha önce herhangi bir YÜT ile tedavi almamış olmak.

Bu kriterlere uyan hastalarda açıklanamayan/erkek infertilite sorunu olduğu kabul edilip çalışmaya alınmıştır. Çalışmanın sonunda açıklanamayan ve erkek faktörü infertil çiftlere ait sonuçlar ayrı olarak değerlendirilmiştir.

3.1.2. Bu çalışmada dahil edilmeme kriterleri ise şunlardır

1. İnfertil çiftten kadının yaşı <20 ve >40 yaş olması
2. Endokrinolojik bozukluklar göstermesi (polikistik over sendromu, tedavi edilmemiş hipotiroidi veya hipertiroidi, diabet, hiperprolaktinemi, hipogonadotropik hipogonadizm).
3. Diğer sistemik problemlerinin olması, (tedavi sonrası gebe kalması durumunda gebeliğin devamının kadının yaşamını tehlikeye sokacağı sistemik hastalıklarının (kalp hastalıkları, regüle olmamış diabet, böbrek hastalıkları vs.) olması.
4. Tek over olması.
5. Over rezervinin hormonal olarak bozuk olması (bazal FSH >15 IU/ml)
6. Daha önce hormon tedavisi alan hastalarda, bu ilaçlara karşı herhangi bir yan etki gelişmesi.

7. Sperm işleme yöntemi olarak araştırmada kullanılan gradient veya swim-up yöntemlerinin ile işlem yapmaya uygun olamayacak düzeyde şiddetli oligoastenospermisi olan hastalar (işlem öncesi sperm sayısı <1 milyon/mL). (“Kruger kriterlerine” göre sperm morfolojisi hasta seçiminde göz önüne alınmadı).

3.2. Sperm Hazırlama Yöntemi Seçimi

İnseminasyon için tüm semen örnekleri “Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Merkezi Androloji Laboratuvar’ında” hazırlandı. Hastanın eşinden 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası, işlem günü laboratuvarda semen örneği alındı. Sperm yıkama yöntemi olarak tüm hastaların çalışma kapsamında alınan sperm örneklerine “Swim-up” ve “Gradient” yöntemlerinin ikisinde uygulandı. İşlem sonrası hazırlanan sperm solusyonları tedavi amacıyla (IUI veya IVF/ICSI) kullanılmadı.

3.3. Çalışmamızda Kullanılan Yöntemler

İnseminasyon için semen örneği, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Merkezi Androloji Laboratuvarı’nda hazırlandı. Hastanın eşinden 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası, işlem günü laboratuvarda semen örneği alındı.

3.4. Swim-Up

20 dakika kadar etüvde bekletilerek likefiye olması sağlanan semen örnekleri, daha sonra sperm hazırlama işlemine alındı. Bazal semen örneğinden sperm sayımı için 5 µL. alındı ve işlem öncesi sayı ve motiliteye bakıldı. Semen yapılan mikroskopik incelemesinin ardından semen swim-up yöntemi ile yıkandı. Progresif motiliteye sahip spermilerin medyum içerisinde yüzdürülmesi yöntemi olan swim-up işlemine, semen örneği falcon konik tüpe konularak başlandı. Üzerine 1/1 oranında medyum (Sperm Rinse Solusyonu, Vitro Life, İsveç) eklendi. Pipetleme işlemi sonrası örnek 900 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pipet yardımıyla alındı. Tüp spora 45 derece açı ile yerleştirilip, pelet üzerine 0,25 ml medyum (Sperm Rinse Solusyonu, Vitro Life, İsveç) eklendi. Açı bozulmadan 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Supernatan’dan bir miktar alınarak, sperm sayı ve motilitesi tekrar incelendi ve kaydedildi. Son olarak, tüpün açısı bozulmadan pipet yardımı ile toplam 0,3-0,5 ml olacak şekilde tüp yüzeyinden sperm solusyonu çekilerek inseminasyon için kullanılmak üzere falcon 5 ml tüpe aktarıldı.

3.5. Gradient Yöntemi

Gradient solüsyonu olarak bicarbonate ve hepes-tamponlanmış silane kaplı colloid silica solusyonu (Sperm Grad-125, Vitrolife) kullanıldı. Solusyon önce G-IVF plus (Vitrolife, İsveç) kullanılarak % 40 ve % 90’lık iki farklı konsantrasyonda hazırlandı. Falcon konik tüpün dibine % 90’lık, onun üzerine dikkatlice, birbirine hiç karıştırmayacak şekilde % 40’lık gradiyent solüsyonu

konuldu. 37°C derecede 10-15 dakika bekletilip, üzerine pipet yardımıyla yavaş yavaş semen ilave edildi. 1400 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Üst kısmı pipet yardımıyla dikkatlice alınıp ve atıldı. En altta kalan pellet falkon 4 ml'lik tüpe aktarıldı. Üzerine ortalama 3 ml sperm yıkama solüsyonu (G-İVF plus, Vitrolife, İsveç) eklenerek santrifujda tekrar 1400 devirde 10 dakika çevrildi. Üstte kalan süpernatant alınıp, dipte kalan 0,3-0,5 ml sperm solusyonu İÜİ için kullanılmak üzere pipet yardımıyla alınarak falcon tüpe konuldu.

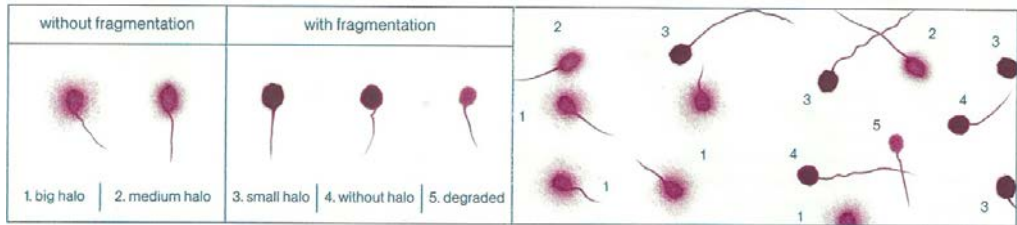
3.6. Sperm Dna Fragmentasyonunun Değerlendirilmesi

Sperm DNA fragmentasyonu değerlendirilmesi için Halosperm® kit DNA fragmentasyon değerlendirme tekniği kullanıldı ve aşağıdaki basamaklar izlendi.

- 1- Agarozun eritilmesi için eppendorf tüpleri mikrodalgada veya 100°C su banyosunda 5 dakika süreyle ısıtıldı
- 2- Tüpler 37 °C ısıda tutulan su banyosunda 5 dakika tutuldu
- 3- 25 µL semen örneği eklenerek karıştırıldı
- 4- 15 µL karışım kitin slaytı üstüne alındı ve üstü kapatıldı
- 5- Slayt soğuk bir yüzeye alındı ve agarozun katılaşması için 5 dakika süreyle buzdolabında tutuldu
- 6- Denature edici solusyonun 80 µL'si 10 ml distile su ile karıştırıldı
- 7- Buzdolabından çıkartılan slaytın üst coverı çıkartıldı
- 8- Slayt denatüre edici solusyonda 7 dakika inkübe edildi

- 9- Denatüre edici solusyondan çıkartılan slayt lysis solusyonunda 25 dakika inkübe edildi
- 10- Lysis solusyonundan çıkartılan slayt distile su içinde 5 dakika inkübe edildi
- 11- Slayt % 70'lik etanolde 2 dakika inkübe edildi
- 12- Slayt % 90'lik etanolde 2 dakika inkübe edildi
- 13- Slayt % 100'lik etanolde 2 dakika inkübe edildi
- 14- Oda ısısında kuruması beklendi
- 15- Diffquick ile boyandı

Daha sonrasında mikroskop altında spermilerin halolarının büyüklüklerine, halosuz ve degrede olmalarına göre yüzdeleri hesaplandı (**Şekil 4**).



Şekil 3. Halosperm® DNA fragmentasyon kiti kullanım klavuzu

3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler toplanarak bilgisayar ortamında SPSS istatistik veri tabanına (Statistical Package for Social Science, Version 11.5 for Windows) aktarıldı. Hasta bilgileri ve siklusa ait bilgiler iki ayrı SPSS dosyası içinde toplandı. Sonuçlardan herhangi bir etkilenme olmaması için tüm karşılaştırmalar çalışma

tamamlandıktan sonra yapıldı. Demografik değerlerin karşılaştırılmasında’’Mann-Whitney U’’ kullanıldı. Hasta gruplarına ait yıkama öncesi ve yıkama işlemleri sonrası; ikili grupların karşılaştırması için ’’Wilcoxon İşaretili Sıralar testi’’, üçlü ve daha üzeri grupların karşılaştırılmasında ’’Kruskal Wallis’’ testi kullanıldı. Hastaların sonuçlarını değerlendirirken 0.05’den küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu prospektif çalışmada, Eylül 2011 ve Eylül 2012 tarihleri arasında “Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Merkezine” çocuk istemi ile başvuran, çalışma kriterlerine uyan ve açıklanamayan subfertilite (n:34, %52,3) veya erkek infertilitesi (n:31, %42,7) tanısı alan 65 hastada 2 farklı sperm hazırlama yöntemi olan swim-up ve dansite gradiyent yöntemlerinin DNA fragmentasyonu üzerine etkileri araştırıldı. Altmışbeş hastanın yıkama öncesi sperm verileri ve DNA fragmentasyon yüzdeleri hesaplandı sonrasında tüm spermelere swim-up ve dansite gradient yöntemleri ayrı ayrı uygulandı ve her hasta için her iki yöntem ile yıkama sonrası sperm verileri ve DNA fragmentasyon yüzdeleri hesaplanarak yıkama öncesi bazal verilerle karşılaştırıldı.

Hastaların demografik özellikleri ve bazal sperm değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında açıklanamayan infertilite ile erkek faktörü arasında erkek yaşı, kadın yaşı ve infertilite süreleri açısından fark bulunmamaktadır. ($p>0,05$). Bu bulgular aynı zamanda gruplardaki hastaların homojen olarak dağıldığını göstermekte ve infertilitede en önemli prognostik faktör olan kadın yaşı ve infertilite sürelerinin sonuçlara etkisini minimuma indirmektedir. Erkek yaşları açısından iki grup arasında fark olmaması sperm sayısının erkek yaşından çok etkilenmediğini göstermektedir. Beklenildiği üzere açıklanamayan subfertilite ve erkek infertilitesi grupları arasında yıkama öncesi sperm sayısı, progresif hareketli sperm yüzdesi ve morfolojileri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla, $p=0,0001$, $p=0,005$, $p=0,009$). Yine yıkama öncesi DNA fragmentasyon yüzdeleri karşılaştırıldığında erkek faktörü grubunda

fragmentasyon oranları daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,313$) (**Tablo 8**).

Tablo 8. Hastaların demografik özellikleri ve bazal sperm değerlerinin gruplar arasında karşılaştırılması

Değişkenler	Açıklanamayan İnfertil Ort ($\pm$ SS)	Erkek Faktörü Ort ($\pm$ SS)	p Değeri
Erkek yaşı	30,08 $\pm$ 3,2	31,7 $\pm$ 6,2	0,670
Kadın Yaşı	28 $\pm$ 4.92	29,6 $\pm$ 6	0,300
İnfertilite süresi (ay)	35,1 $\pm$ 24,0	51,19 $\pm$ 51,09	0,710
Yıkama öncesi sperm sayısı	38.8 $\pm$ 19.9	8,8 $\pm$ 3,9	0,0001*
Yıkama öncesi progresif hareketli sperm %	48,7 $\pm$ 15.4	39,41 $\pm$ 15,86	0,005*
Yıkama öncesi fragmentasyon yüzdesi	41,85 $\pm$ 22,04	46,6 $\pm$ 19,3	0,313
Yıkama öncesi morfoloji	1,156 $\pm$ 1,1	0,48 $\pm$ 0,77	0,009*

* *Mann-Whitney U Testi.*

Sperm sayılarının yıkama yöntemine göre değişimi incelendiğinde, hem swim-up hem de gradient sonrasında sperm sayımlarının yıkama öncesi bazal değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu görüldü. Bu farkın hem açıklanamayan subfertilite hem de erkek faktörü gruplarında mevcut olduğu saptanmıştır (her 2 grupta $p<0,0001$). Ayrıca, erkek faktörü grubunun bazal sperm sayısının açıklanamayan subfertilite grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$).

Yine aynı şekilde, yıkama sonrası progresif hareketli sperm yüzdelерinin yıkama öncesi bazal değерlere göre her iki infertilite grubunda da arttığı bulunmuştur (swim-up $p=0,002$, dansite gradient $p<0,0001$). Ayrıca, her iki infertilite grubu arasında sperm sayılarında olduğu gibi yıkama öncesi progresif hareketli sperm yüzdeleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü, erkek faktörü grubunda yıkama öncesi progresif motil sperm yüzdesi açıklanamayan subfertil gruba göre daha düşük olduğu görülmüştür ($p=0,005$) (**Tablo 8 ve 9**).

Tablo 9. Yıkama sonrası sperm parametrelerinin infertilite grupları arasında karşılaştırılması

Değişkenler	Açıklanamayan İnfertil Grup Ort ($\pm$ SS)	Erkek Faktörü Ort ($\pm$ SS)	p Değeri
Swim-up sonrası sperm sayısı	22,3 $\pm$ 17.89	5,10 $\pm$ 3,32	0,0001*
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm sayısı	73,91 $\pm$ 17,62	59,5 $\pm$ 19,3	0,002*
Gradient sonrası sperm sayısı	26,44 $\pm$ 22,9	6,42 $\pm$ 4,55	0,0001*
Gradient sonrası progresif hareketli sperm sayısı	72,2 $\pm$ 14,2	55,16 $\pm$ 18,8	0,0001*
Swim-up sonrası fragmentasyon yüzdesi	28,5 $\pm$ 21,9	30,32 $\pm$ 18,2	0,374
Gradient sonrası fragmentasyon yüzdesi	38,7 $\pm$ 22,3	44,03 $\pm$ 20,87	0,245

* Mann-Whitney U Testi.

İnfertilite nedeni göz önüne alınmadan toplam 65 hastanın yıkama öncesi DNA fragmentasyon yüzdeleri, swim-up ve gradient sonrası değerleri ile karşılaştırıldı. Buna göre, swim-up yöntemiyle yıkama sonrası fragmente DNA yüzdesinde yıkama öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p=0,0001$). Gradient yöntemi yıkama öncesine göre fragmente DNA yüzdesini azaltsada ($44,1\pm20,79$ vs $41,2\pm21,62$), aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,129$), (**Tablo 10**).

Tablo 10. İnfertilite nedeni göz önüne alınmadan yıkama öncesi ve yıkama sonrası DNA fragmentasyon yüzdelerinin karşılaştırılması.

DNA Fragmentasyon Yüzdeleri	Ort ($\pm$ SS)	p Değeri
Yıkama öncesi fragmentasyon yüzdesi	44,1 $\pm$ 20,79	0,0001*
Swim-up sonrası fragmentasyon yüzdesi	29 $\pm$ 20,10	
Yıkama öncesi fragmentasyon yüzdesi	44,1 $\pm$ 20,79	0,129
Gradient sonrası fragmentasyon yüzdesi	41,2 $\pm$ 21,62	
Swim-up sonrası fragmentasyon yüzdesi	29 $\pm$ 20,10	0,0001*
Gradient sonrası fragmentasyon yüzdesi	41,2 $\pm$ 21,62	

* Wilcoxon Signed Rank Test.

Yıkama öncesi ve her iki yıkama yöntemi sonrası elde edilen sperm parametreleri her iki infertilite grubu için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Açıklanamayan subfertilite grubunda sperm sayısı ve progresif hareketli sperm yüzdeleri yıkama öncesi, swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrası sonuçları karşılaştırıldığında, her iki yöntem ile yıkama işlemi sonrasında sperm

sayılarının yıkama öncesine göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Swim-up için $p<0,0001$ ve gradient için $p<0,001$). Swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrası elde edilen sperm sayıları kendi arasında karşılaştırıldığında, swim-up yönteminde yıkama sonrası elde edilen sperm sayıları daha düşük olmakla birlikte, iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,195$). Açıklanamayan subfertilite grubunda progresif hareketli sperm yüzdeleri karşılaştırıldığında ise, swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrasında yıkama öncesine göre progresif hareketli sperm yüzdeleri önemli ölçüde artışı görülmüştür (swim-up için $p<0,0001$, gradient için $p=0,001$). Swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrası elde edilen progresif hareketli sperm oranları yıkama yöntemleri arasında karşılaştırıldığında ise, her iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($73,91\pm17,62$ vs $72,20\pm14,28$, $p=0,293$), (**Tablo 11**).

Tablo 11. Açıklanamayan grupta sperm hazırlama yöntemleri ile sperm parametrelerinin karşılaştırılması.

Açıklanamayan İnfertil Grup	Ort ($\pm$ SS)	p değeri
Yıkama öncesi sperm sayısı	38,82 $\pm$ 19,92	0,0001*
Swim-up sonrası sperm sayısı	22,32 $\pm$ 17,8	
Yıkama öncesi sperm sayısı	38,82 $\pm$ 19,92	0,001*
Gradient sonrası sperm sayısı	26,44 $\pm$ 22,92	
Swim-up sonrası sperm sayısı	22,32 $\pm$ 17,8	0,195
Gradient sonrası sperm sayısı	26,44 $\pm$ 22,92	
Yıkama öncesi progresif hareketli sperm sayısı	48,48 $\pm$ 15,44	0,0001*
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm sayısı	73,91 $\pm$ 17,62	
Yıkama öncesi progresif hareketli sperm sayısı	48,48 $\pm$ 15,44	0,0001*
Gradient sonrası progresif hareketli sperm sayısı	72,20 $\pm$ 14,28	
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm sayısı	73,91 $\pm$ 17,62	0,293
Gradient sonrası progresif hareketli sperm sayısı	72,20 $\pm$ 14,28	

* Wilcoxon Signed Rank Test.

Açıklanamayan subfertil hasta grubunda yıkama öncesi ile swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrasında sperm DNA fragmentasyon yüzdelerindeki değişimler karşılaştırıldığında; swim-up yönteminin yıkama öncesi bazal değerlere göre fragmente DNA yüzdesini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Gradient yöntemi yıkama öncesine göre fragmente DNA yüzdesini azaltsada ($41,85\pm22,04$ vs $38,79\pm22,30$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0,160$). Her iki yöntemle yıkama sonrası fragmente DNA yüzdelerinin karşılaştırılması sonucunda swim –up yöntemi ile fragmente DNA oranının gradient yöntemine göre belirgin olarak daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$), (**Tablo 12**).

Tablo 12. Açıklanamayan grupta sperm hazırlama yöntemleri ile DNA fragmentasyon oranındaki değişimlerin karşılaştırılması.

Açıklanamayan İnfertil Grup	Ort ($\pm$ SS)	p değeri
Yıkama öncesi DNA fragmentasyon %	41,85 $\pm$ 22,04	0,0001*
Swim-up sonrası DNA fragmentasyon %	28,58 $\pm$ 21,93	
Yıkama öncesi DNA fragmentasyon %	41,85 $\pm$ 22,04	0,160
Gradient sonrası DNA fragmentasyon %	38,79 $\pm$ 22,30	
Swim-up sonrası DNA fragmentasyon %	28,58 $\pm$ 21,93	0,0001*
Gradient sonrası DNA fragmentasyon %	38,79 $\pm$ 22,30	

* Wilcoxon Signed Rank Test.

Erkek faktörü grubunda sperm sayısı ve progresif hareketli sperm yüzdeleri yıkama öncesi sonuçları ile, swim-up ve gradient uygulamaları sonrası sonuçları karşılaştırıldığında her iki yıkama yönteminde de yıkama öncesine göre

sperm sayılarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (swim-up için $p<0,0001$, gradient için $p<0,001$). Bu grupta, swim-up ve gradient yöntemleri sonrası sperm sayılarındaki azalma yönünden karşılaştırma yapıldığında swim-up yönteminde daha fazla sayı azalması saptanmıştır ($p=0,002$). Progresif hareketli sperm yüzdeleri karşılaştırıldığında, swim-up ve gradient yöntemleri sonrasında yıkama öncesine göre progresif hareketli sperm yüzdelерinin önemli ölçüde artığı görülmüştür (swim-up için $p<0,0001$, gradient için $p<0,0001$). Yine erkek faktörü grubunda açıklanamayan infertil gruptan farklı olarak swim-up ve gradient yöntemleri kendi arasında karşılaştırıldığında swim-up sonrası progresif hareketli sperm yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla olduğu görülmüştür ($59,5\pm19,35$ vs $55,16\pm18,87$, $p=0,027$) (**Tablo 13**).

Tablo 13. Erkek faktörü grubunda sperm hazırlama yöntemleri ile sperm parametrelerinin karşılaştırılması.

Erkek faktörü	Ort ($\pm$ SS)	p değeri
Yıkama öncesi sperm sayısı	8,83 $\pm$ 3,9	0,0001*
Swim-up sonrası sperm sayısı	5,10 $\pm$ 3,32	
Yıkama öncesi sperm sayısı	8,83 $\pm$ 3,9	0,001*
Gradient sonrası sperm sayısı	6,42 $\pm$ 4,55	
Swim-up sonrası sperm sayısı	5,10 $\pm$ 3,32	0,002*
Gradient sonrası sperm sayısı	6,42 $\pm$ 4,55	
Yıkama öncesi progresif hareketli sperm sayısı	39,41 $\pm$ 15,86	0,0001*
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm sayısı	59,5 $\pm$ 19,35	
Yıkama öncesi progresif hareketli sperm sayısı	39,41 $\pm$ 15,86	0,0001*
Gradient sonrası progresif hareketli sperm sayısı	55,16 $\pm$ 18,87	
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm sayısı	59,5 $\pm$ 19,35	0,027*
Gradient sonrası progresif hareketli sperm sayısı	55,16 $\pm$ 18,87	

* Wilcoxon Signed Rank Test.

Erkek faktörü grubunda yıkama öncesi, swim-up ve gradient yöntemleri sonrasında sperm DNA fragmentasyon yüzdelerindeki değişimler karşılaştırıldığında; açıklanamayan infertilite grubuna benzer şekilde swim-up yönteminin yıkama öncesine ($p<0,0001$) göre fragmente DNA yüzdesini önemli ölçüde azalttığı bulunurken; gradient yönteminde ise yıkama öncesine göre fragmente DNA yüzdesini azaltsa da ($46,61\pm19,38$ vs $44,03\pm20,87$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,470$). Her iki yöntemle yıkama sonrası fragmente DNA yüzdelerinin karşılaştırılması sonucunda swim –up yöntemi ile fragmente DNA oranının gradient yöntemine göre belirgin olarak daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$), (**Tablo 14**).

Tablo 14. Erkek faktörü grubunda sperm hazırlama yöntemleri ile DNA fragmentasyon oranındaki değişimlerin karşılaştırılması.

Erkek Faktörü	Ort ($\pm$ SS)	p Değeri
Yıkama öncesi DNA fragmentasyon yüzdesi	46,61 $\pm$ 19,38	0,0001*
Swim-up sonrası DNA fragmentasyon yüzdesi	30,32 $\pm$ 18,20	
Yıkama öncesi DNA fragmentasyon yüzdesi	46,61 $\pm$ 19,38	0,470
Gradient sonrası DNA fragmentasyon yüzdesi	44,03 $\pm$ 20,87	
Swim-up sonrası DNA fragmentasyon yüzdesi	30,32 $\pm$ 18,20	0,0001*
Gradient sonrası DNA fragmentasyon yüzdesi	44,03 $\pm$ 20,87	

* Wilcoxon Signed Rank Test.

Çalışma grubuna alınan hastalar çalışma öncesinde herhangi YÜT ile tedavi edilmemiş hastalardan seçilmiştir. Çalışma bitiminde hastaların hepsine en az bir kez (65 hasta) IUI tedavisi uygulanmıştır. IUI sonrası gebelik olan ve olmayan hasta grupları yıkama öncesi bazal ve swim-up ve gradiyent yöntemleri sonrasında progresif hareketli sperm yüzdesi ve DNA fragmentasyon yüzdelerinin gebeliğe etkileri yönünden değerlendirilmiştir. Buna göre gerek yıkama öncesi bazal gerekse de yıkama sonrası progresif hareketli sperm ve DNA fragmentasyon yüzdeleri açısından gebe kalan ve kalmayan hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$), Yine gebelik olan ve olmayan grupların yıkama öncesi morfolojileri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$), **(Tablo 15)**.

Tablo 15. IUI sonrası gebelik oranlarının yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm verilerinin etkilerinin karşılaştırılması.

IUI Sonrası	Gebelik Yok N (55)	Gebelik var N (10)	p Değeri
Yıkama öncesi progresif hareketli sperm % Ort ($\pm$ SS)	44,81 $\pm$ 15,24	41,40 $\pm$ 21,54	0,477
Yıkama öncesi DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	43,78 $\pm$ 20,83	46,00 $\pm$ 21,57	0,776
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm %	67,54 $\pm$ 20,56	64,30 $\pm$ 14,61	0,466
Swim-up sonrası DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	29,03 $\pm$ 20,97	31,50 $\pm$ 15,10	0,398
Gradient sonrası progresif hareketli sperm % Ort ($\pm$ SS)	63,60 $\pm$ 19,05	66,70 $\pm$ 16,47	0,906
Gradient sonrası DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	39,89 $\pm$ 21,60	49,00 $\pm$ 21,18	0,235
Yıkama öncesi morfoloji Ort ($\pm$ SS)	0,87 $\pm$ 1,02	0,77 $\pm$ 1,09	0,680

Mann-whitney U Test.

Aynı parametreler açıklanamayan ve erkek faktörü subfertil hasta gruplarında ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Buna göre hem açıklanamayan hem de erkek faktörü subfertil hasta gruplarında gebe kalan ve kalmayan hastalar arasında bazal, yıkama sonrası progresif motilite, DNA fragmentasyon yüzdeleri ve yıkama öncesi morfolojileri yönünden karşılaştırıldığında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (**Tablo 16 ve Tablo 17**).

Tablo 16. Açıklanamayan infertil grupta IUI sonrası gebelik oranlarının yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm verilerinin etkilerinin karşılaştırılması.

Açıklanamayan İnfertil Grupta IUI Sonrası	Gebelik Yok	Gebelik Var	p Değeri
Yıkama öncesi progresif hareketli sperm % Ort ($\pm$ SS)	50,03 $\pm$ 13,72	43,71 $\pm$ 21,40	0,258
Yıkama öncesi DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	42,33 $\pm$ 22,74	40,00 $\pm$ 20,61	0,881
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm %	75,88 $\pm$ 17,71	66,28 $\pm$ 16,21	0,129
Swim-up sonrası DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	28,77 $\pm$ 23,47	27,85 $\pm$ 16,03	0,764
Gradient sonrası progresif hareketli sperm % Ort ($\pm$ SS)	72,66 $\pm$ 14,09	70,42 $\pm$ 15,99	0,564
Gradient sonrası DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	38,29 $\pm$ 23,34	40,71 $\pm$ 19,24	0,748
Yıkama öncesi morfoloji Ort ($\pm$ SS)	1,15 $\pm$ 1,12	1,16 $\pm$ 1,16	0,959

Mann-whitney U Test.

Tablo 17. Erkek faktörü grubunda IUI sonrası gebelik oranlarının yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm verilerinin etkilerinin karşılaştırılması.

Erkek Faktörü Grubunda IUI Sonrası	Gebelik Yok	Gebelik Var	p Değeri
Yıkama öncesi progresif hareketli sperm % Ort ($\pm$ SS)	39,78 $\pm$ 15,16	36 $\pm$ 25,53	0,546
Yıkama öncesi DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	45,17 $\pm$ 19,12	60 $\pm$ 20	0,184
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm %	59,50 $\pm$ 20,16	59,66 $\pm$ 11,23	0,947
Swim-up sonrası DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	29,28 $\pm$ 18,69	40 $\pm$ 10	0,124
Gradient sonrası progresif hareketli sperm % Ort ($\pm$ SS)	54,85 $\pm$ 19,32	58 $\pm$ 17,08	0,840
Gradient sonrası DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	41,42 $\pm$ 20,08	68,33 $\pm$ 10,40	0,029*
Yıkama öncesi morfoloji Ort ($\pm$ SS)	0,54 $\pm$ 0,8	0	0,182

*Mann-whitney U Test

İnfertilite nedenine bakılmaksızın erkek yaşının sperm parametreleri ve DNA fragmentasyon yüzdelerine etkilerine bakıldığında yıkama öncesi sperm sayısı ve progresif hareketli sperm yüzdelerinin yaşla birlikte (özellikle 40 yaş üstü grupta) azaldığı görülürken fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0,05$), Yıkama öncesi DNA fragmentasyon yüzdelerinde yaş grupları arasında fark bulunmamıştır. ($p>0,05$). Swim-up ve gradient yöntemleri sonrası sperm sayısı ve progresif hareketli sperm yüzdelerinin yaşla azaldığı görülürken istatistiksel olarak yaş grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. ($p>0,05$). Swim-up yöntemi sonrası DNA fragmentasyon yüzdelerinin yaştan etkilenmediği görülmüştür ($p>0,05$), Gradient yöntemi sonrası sperm DNA fragmentasyon

yüzdelere bakıldığında ise yaşla birlikte fragmentasyon oranları artsa da fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$), (**Tablo 18**).

Tablo 18. Tüm gruplarda erkek yaşının yıkama öncesi ve yıkama yöntemleri sonrası sperm parametreleri ve DNA fragmentasyon yüzdelere etkisinin karşılaştırılması.

	20-29 Yaş	30-39 Yaş	40 Yaş Üstü	P Değeri
Yıkama öncesi sperm sayısı Ort ($\pm$ SS)	25,13 $\pm$ 21,53	26,09 $\pm$ 21,18	7,75 $\pm$ 2,98	0,101
Yıkama öncesi progresif hareketli sperm % Ort ($\pm$ SS)	43,83 $\pm$ 15,29	45,77 $\pm$ 17,31	36,25 $\pm$ 15,50	0,572
Yıkama öncesi DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	40,93 $\pm$ 21,73	47,25 $\pm$ 19,57	43,75 $\pm$ 24,95	0,419
Swim-up sonrası sperm sayısı Ort ($\pm$ SS)	15,90 $\pm$ 17,52	13,74 $\pm$ 14,42	3,50 $\pm$ 1,91	0,065
Swim-up sonrası progresif hareketli sperm % Ort ($\pm$ SS)	69,06 $\pm$ 21,86	66,48 $\pm$ 18,26	56,25 $\pm$ 11,08	0,223
Swim-up sonrası DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	27,40 $\pm$ 21,68	31,61 $\pm$ 19,38	27,50 $\pm$ 15	0,482
Gradient sonrası sperm sayısı Ort ($\pm$ SS)	20,03 $\pm$ 22,79	15,48 $\pm$ 16,71	4,25 $\pm$ 2,36	0,084
Gradient sonrası progresif hareketli sperm % Ort ($\pm$ SS)	64,73 $\pm$ 19,82	65,74 $\pm$ 16,82	46,25 $\pm$ 17,01	0,110
Gradient sonrası DNA fragmentasyon % Ort ($\pm$ SS)	39,30 $\pm$ 24,25	42,41 $\pm$ 17,74	47,50 $\pm$ 32,27	0,623

Kruskal Wallis Test

5. TARTIŞMA

Yardımcı üreme tekniklerinin uygulamaya girmesi infertilite tedavisinde devrim yaratmıştır. Yıllar içerisinde kadına ait faktörler yanında, erkeğe ait faktörlerin de infertilite etyolojisinde önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle, YÜT ile tedavi edilen hastalarda kullanılacak spermilerin kullanılmadan önce hazırlanması amacıyla semen içerisindeki immotil, kötü morfolojiye sahip ya da fertilizasyon kapasitesi az olan spermilerin normal spermilerden ayrılması için değişik sperm hazırlama (yıkama) yöntemleri geliştirilmiştir (2,22,58-65,135). Koitus sonrası vajinaya bırakılan semen içerisindeki sperm hücreleri servikal mukus tarafından süzülür ve fertilizasyon potansiyeli en yüksek olan spermiler fertilizasyonun gerçekleşeceği fallop tüplerine ulaşır. İn vitro koşullarda ise bu süreç sperm yıkama protokolleri ile gerçekleştirilir. Sperm yıkama teknikleri klinikte IUI veya İVF/ICSI öncesi sperm hazırlama amacıyla kullanılmaktadır. Bu amaçla yıllar içerisinde birçok sperm hazırlama yöntemi denenmiştir. Tüm yöntemlerin ortak amacı seminal plazma ve içerisindeki sperm dışı hücreler ve biyokimyasal ajanları uzaklaştırıp, fertilizasyon kapasitesi en yüksek olan spermilerin ayrıştırılmasıdır (6,135). İdeal sperm hazırlama yöntemi sperme en az zarar veren ve yüksek sayıda fonksiyonel sperm elde etme olanağı sağlayan yöntemler olmalıdır (135). Androloji laboratuvarlarında YÜT'lerinde kullanılacak sperm solüsyonunun ayrıştırılması için pek çok yıkama yöntemi tanımlanmıştır. Bunlardan etkinliği en çok bilinenleri gradient ve swim-up yöntemleridir (6,139,144,153,154).

Günümüzde YÜT'leri için sperm kalitesini belirlemek amacıyla morfolojik özellikler sıklıkla kullanılmaktadır (22,31). Yeni bilgiler göstermektedir ki morfolojik özellikler fertilizasyon kapasitesini belirlemede yetersiz kalmaktadır. Sperm morfolojik özellikleri ile sperm sayısı, kromatin kondansasyonu ve sperm parametreleri arasında ilişki olmadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (153-155). Bu bilgiler ışığında, son 10 yılda, sperm DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi, semen kalitesinin belirlenmesinde önemli bir faktör olmuştur. Bu nedenle son yıllarda sperm hazırlama yöntemlerinin DNA fragmentasyonu üzerine etkilerini araştıran çalışmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Percoll dansite gradient yöntemini takiben yüksek motiliteye sahip, morfolojik olarak normal spermier yüksek dansite tabakasında ayrıştırılırken, swim-up yönteminde ise yine yüksek motiliteli ve normal morfolojiye sahip spermier üstte yüzen tampon tabakada ayrıştırılır (137-139). Bu prospektif çalışmada swim-up ve dansite gradient yöntemlerinin sperm DNA fragmentasyonuna etkileri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar en sık kullanılan iki sperm yıkama yönteminden swim-up'un gradient yöntemine göre DNA fragmentasyonu olmayan spermier daha iyi ayrıştırdığını göstermiştir. Bu etkinin açıklanamayan ve erkek faktörü subfertil hasta gruplarında da ayrı ayrı mevcut olduğu da gösterilmiştir.

Sperm yıkama yöntemlerinin sperm kromatin yapısına etkisini gösteren geçmişte yapılan çalışmalar hem kullanılan sperm yıkama yöntemleri hem de sperm kromatin hasarını saptama yöntemleri açısından farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmalardan bir kısmında sadece swim-up (156,157) bir kısmında sadece

gradient ve diğerlerinde de swim-up ve/veya gradient ile değişik yıkama yöntemleri (68,147,148,150,152,165) karşılaştırılmıştır. Literatürde sadece swim-up yönteminin sperm DNA yapısına etkisinin araştırıldığı iki çalışma mevcuttur. Bunlardan 1999 yılında Spano ve arkadaşları tarafından yapılan ilk çalışmanın sonuçları swim-up yönteminin sperm kromatin yapı bozukluğu olmayan spermlerin seçimini sağladığı yönündedir (158). Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak hasta popülasyonu olarak infertilite problemi olmayan 19 sağlıklı gönüllü kullanılmış ve DNA fragmentasyonunu SCSA yöntemi ile değerlendirmişlerdir. 2001 yılında yapılan diğer bir çalışmada ise Youglai ve arkadaşları swim-up yönteminin ve yıkama işlemi sırasında yapılan santrifüj işleminin DNA fragmentasyonunu arttırabileceği hipotezi üzerinden klasik swim-up ve santrifüjsüz doğrudan swim-up yöntemlerini karşılaştırmıştır (159). DNA fragmentasyonunun TUNEL yöntemi ile değerlendirildiği bu çalışmanın sonuçlarına yıkama öncesi bazal değerlere göre klasik swim-up (santrifüj ile) ile yıkama sonrasında sperm DNA hasarlı sperm oranında düşme görülürken, ilginç olarak sperm hasarına yol açma potansiyeli olan santrifüj işleminin kullanılmadığı doğrudan swim-up yöntemi ile yıkanan spermlerde bazal değerlere göre DNA hasarlı sperm oranındaki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızla bu iki çalışmanın verileri birlikte değerlendirildiğinde, her üç çalışmada kullanılan sperm DNA hasarı belirleme yöntemleri farklı olmakla birlikte swim-up yöntemi ile sperm yıkama işleminin sperm DNA hasarı olmayan spermleri ayırtmada etkili olduğunu göstermektedir.

Literatürde dansite gradient yönteminin sperm kromatin yapısını etkisinin tek başına değerlendirildiği birkaç çalışma mevcuttur. Dansite gradient yönteminin DNA fragmentasyon oranına etkisini gösteren ve 1999 yılında yapılan ilk çalışmada, Larson ve arkadaşları gradient yöntemi ile yıkamanın DNA fragmentasyon oranını azalttığını göstermişlerdir (165). Bu çalışmaya 26 infertil erkek dahil edilmiş ve DNA fragmentasyonu SCSA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Tomlinson ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yapılan 140 infertil erkeğin dahil edildiği bir çalışmada da yukarıdaki çalışmanın verilerine benzer olarak bazal değerlere göre dansite gradient sonrasında DNA fragmentasyonunun anlamlı şekilde azaldığı rapor edilmiştir (68). Bu çalışmada ayrıca DNA fragmentasyonun değerlendirilmesi için in situ nick translation ve kromomisin A3 yöntemleri karşılaştırılmış ve 2 yöntemin birbirinden farklı olmadığı bildirilmiştir. Bu iki çalışmanın verileri bizim sonuçlarımızla farklılık göstermektedir. Bizim çalışmamızda dansite gradient yönteminin her 2 hasta subgrubunda yıkama sonrası DNA fragmentasyonunu yıkama öncesi bazal değerlere göre belirgin değiştirmedeği görülmektedir. Zini ve arkadaşları'nın 2000 yılında yaptıkları bir başka çalışmanın sonuçları da kısmen bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir (148). Bu çalışmada dansite gradient yöntemi ile yıkama sonrası DNA fragmentasyon oranlarının infertil erkeklerde arttığı, fertil erkeklerde ise değişmediği bildirilmiş ve çalışmanın sonuçları dansite gradient yönteminin DNA fragmentasyonuna etkisinin başlangıç semen kalitesine bağlı olduğu şeklinde yorumlanmıştır (148). Ancak bizim çalışmamızda fertil erkek grubu olmadığı için tam karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Sonuç olarak,

sadece dansite gradient yöntemi kullanılarak sperm DNA hasarına etkisinin değerlendirildiği geçmiş çalışmaların sonuçlarına göre bu yöntemin DNA fragmentasyonu olan spermelerin ayıklanmasındaki etkinliği konusunda net bir fikir ortaya koymak mümkün değildir.

Günümüzde sperm DNA fragmentasyon oranının yüksek olmasının fertilité ve embriyo gelişiminde kısıtlayıcı faktör olduğu düşünülmektedir (59,66, 114,60,61). Sperm DNA fragmentasyonu ile YÜT'lerinin başarısı arasında negatif korelasyon bildiren yayınlar yanında, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu uygulamalarında açıklanamayan başarısızlık nedeninin paternal etki yani sperm DNA kalitesinde bozukluk olabileceği görüşünü destekleyen yayınlar mevcuttur (7-10, 74). Sperm hazırlama yöntemlerinden en sık kullanılan dansite gradient ve swim-up yöntemlerinin sperm fragmente DNA yüzdesini azaltmada ayrı ayrı etkinliklerini değerlendiren pek çok çalışma yayınlanmış olmasına rağmen hangisinin daha üstün olduğu konusu tartışmalıdır. Bizim çalışmamızda elde edilen verilere göre, açıklanamayan infertilite ve erkek faktörü gruplarının her ikisinde de swim-up yöntemi ile yıkama sonrası DNA fragmentasyon oranlarının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düştüğü, dansite gradient yöntemi ile yıkama yönteminin ise DNA fragmentasyon oranlarına etki göstermediği görülmektedir. Sonuç olarak çalışmamızda swim-up yöntemi dansite gradient yöntemine göre sperm fragmente DNA yüzdesini düşürmede daha etkili bulunmuştur. Literatürde swim-up ve dansite gradient yöntemlerinin DNA fragmentasyonuna etkisinin karşılaştırıldığı Zini ve arkadaşları tarafından 2000 yılında yapılan, non-azospermik olup infertilite nedeniyle başvuran 22 erkeği dahil ettikleri ilk

çalışmada bizim sonuçlarımıza benzer şekilde swim-up yönteminin fragmente DNA oranını azaltmada daha üstün olduğu gösterilmiştir (147). Bu çalışmada DNA fragmentasyonunu saptamada akridine orange yöntemi kullanılmıştır. 2010 yılında Marchesi ve arkadaşları tarafından yapılan 32 hastayı dahil ettikleri çalışmada modifiye swim-up (santrifüjsüz) ve dansite gradient yöntemlerinin DNA integritesi üzerine etkileri toluidine mavisi yöntemiyle karşılaştırılmıştır (152). Bu çalışmada her 2 yönteminde DNA kalitesini artırdığı ve fragmente DNA oranını azalttığı saptanırken, modifiye swim-up yönteminin daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (152). Dansite gradyent yöntemi öncesinde de rutin olarak santrifügasyon uygulandığı için biz çalışmamızda santrifügasyonu içeren konvansiyonel swim-up yöntemini kullandık. Dolayısıyla, yukarıdaki çalışmada ayrı bir grup olarak konvansiyonel swim-up yönteminin kullanılmaması çalışmamızla karşılaştırma yapma açısından kısıtlayıcı bir faktör olmuştur. Santrifügasyonun DNA fragmentasyonunu indükleyip indüklediğini araştırmak amacıyla Ghaleno ve ark tarafından yapılan sağlıklı gönüllü 28 erkeğin dahil edildiği bir çalışmada, konvansiyonel swim-up, dansite gradient ve direk (modifiye) swim-up yöntemleri DNA fragmentasyonu açısından karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre yıkama sonrası en yüksek DNA fragmentasyon oranı dansite gradient yöntemi ile hazırlanan örneklerde saptanırken, konvansiyonel swim-up ve modifiye swim-up yöntemleri arasında ise fark bulmamışlardır (150). Bu ve Youglais ve ark tarafından yukarıda sonuçları verilen iki çalışmanın birlikte değerlendirilmesi sonucunda santrifügasyonun DNA hasarını indüklediği söylenebilir (150,159).

İnfertil erkek popülasyonunda swim-up ve dansite gradient yönteminin karşılaştırıldığı Sakkas ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, bizim çalışmamızdan farklı olarak dansite gradient metodu sonrası kromomisin A3 yöntemini kullanarak saptanan DNA hasarlı sperm yüzdesinin azaldığını, swim-up yöntemi sonrası ise DNA fragmentasyon oranlarında azalma saptanmadığı bildirilmiştir (139). Amiri ve arkadaşları da sağlıklı gönüllülerde comet yöntemi ile DNA hasarı belirledikleri çalışmalarında Sakkas ve arkadaşları ile benzer şekilde DNA fragmentasyonunun dansite gradient yöntemi sonrası çok daha az olduğunu bildirmişlerdir (151). Jarayaman ve arkadaşları ise TUNEL yöntemini kullandıkları çalışmalarında normozoospermik, teratozoospermik ve oligozoospermik örneklerden oluşan 3 grupta dansite gradient ve swim-up yöntemlerinin DNA fragmentasyonu üzerinde pozitif etkiye sahip olduğunu ancak bizim çalışmamızdan farklı olarak 2 yöntemden birinin üstün olmadığını bildirmişlerdir (164). Bu çalışmada en olumlu yanıtlar oligozoospermik grupta elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da infertil erkek grubu oligospermik olgulardan oluşmaktaydı ancak biz swim-up yöntemini fragmente DNA yüzdesini azaltmada çok daha etkili bulduk. Görüldüğü gibi literatürdeki sonuçlar çelişkilidir. Bu konuda yapılan araştırmaların DNA fragmentasyonu açısından daha standardize metodlarla, daha geniş olgu serilerinde yapılması faydalı olabilir düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda swim-up ve dansite gradient yöntemleri sonrası progresif motil sperm sayısı, erkek faktörü ve açıklanamayan infertilite gruplarının her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır; iki yöntem

karşılaştırıldığında ise açıklanamayan infertilite grubunda motilite artışı açısından fark yokken, erkek faktörü grubunda swim-up yöntemi daha etkili bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda her iki yöntemin de yüksek progresif motiliteli ve normal morfolojili spermli ayırmada etkili olduğu gösterilmiştir (68,138,152). Swim-up ve dansite gradient yöntemleri motil ve normal morfolojili spermli ayırma başarısı açısından karşılaştırıldığında ise pek çok çalışmada dansite gradient yöntemi daha etkili bulunmuştur. Ricci ve arkadaşları (149) erkek faktörüne bağlı infertilitesi olan 62 olguyu dahil ettikleri çalışmalarında total ve progresif motilite, canlı sperm sayısı açısından dansite gradient yöntemini daha başarılı bulmuşlardır. Yine Amiri (151) ve arkadaşları total motilite ve normal morfoloji saptamada dansite gradient yöntemini daha etkili bulmuşlardır. Marcesci ve arkadaşları (152) ise santrifügasyon kullanılmayan modifiye swim-up yöntemi ile yıkanan spermli, dansite gradient yöntemi ile yıkananlarla karşılaştırıldığında daha fazla motilite ve sayı içerdiklerini rapor etmişlerdir. Swim-up yönteminin üstün bulunması santrifügasyon basamağının atlanmasına bağlı olabilir, ancak çalışmada klasik swim-up yöntemi ile karşılaştırma yapılmadığı için bu konuda yorum yapmak güçtür. Ghaleno ve arkadaşları (150) ise 2012 yılında yaptıkları çalışmada konvansiyonel swim-up, direk (modifiye) swim-up ve dansite gradient yöntemlerini motilite, normal morfoloji saptama ve reaktif oksijen radikali oluşumu açısından karşılaştırmışlar ve normal morfolojiye sahip sperm sayısı ve motilitenin konvansiyonel swim-up ve dansite gradient yöntemlerinde direk swim-up yöntemine göre daha iyi olduğunu bildirmişlerdir (150). Ayrıca, intrasellüler hidrojen peroksit oluşumu konvansiyonel swim-up ve

dansite gradient yöntemleri ile artarken hücre içi süperoksit radikalleri ise direk swim-up yönteminde artmış olarak bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları ile Marchesi ve arkadaşlarının bildirdikleri sonuçlar uyumlu değildir. Bu nedenle, direk swim-up yöntemi ile konvansiyonel swim-up yönteminin karşılaştıran farklı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Paternal yaştan YÜT'lerinin sonuçları ve embriyo kalitesi üzerine etkileri ile ilgili yapılmış çalışmalardan çıkan genel görüş ileri paternal yaştan azalmış reproduktif sonuçlar ile ilgili olduğu yönündedir (45,74,75,155). 2006 yılında yayınlanan bir çalışmada, paternal yaş ile sperm morfolojik özellikleri ve sperm sayısı arasında negatif ilişki saptanmazken, ileri paternal yaştan sperm DNA fragmentasyonunda artışa neden olduğu ileri sürülmüştür (156). Bizim çalışmamızda yaştan sperm parametreleri üzerine olan etkisini araştırmak için erkek hastaların yaşlarına göre (20-29 yaş, 30-39 yaş, 40 yaş üzeri) çalışma popülasyonu 3 gruba ayrılarak değerlendirme yapılmıştır. Buna göre, swim-up ve dansite gradient uygulaması öncesi ve sonrasında sperm progresif motilite hızları, sperm sayıları ve DNA fragmentasyon oranları 3 ayrı grupta (20-29 yaş, 30-39 yaş, 40 yaş üzeri) karşılaştırılmış ve anlamlı fark bulunmamıştır.

Biz çalışmamızda DNA hasarını saptamak için Halosperm® yöntemini kullandık. Literatürdeki çalışmalarda DNA hasarı saptamada pek çok farklı yöntem kullanılmıştır. Çalışmalar arasındaki bu farklı sonuçlar DNA hasarını saptamada standart bir yöntemin kullanılmamasından kaynaklanıyor olabilir. Feijo ve arkadaşları 2013 yılında yayınlanan bir çalışmada 20 açıklanamayan infertilite olgusunda DNA fragmentasyonu belirlemedeki başarıyı değerlendirmek için,

SCD (Halosperm®) ve TUNEL yöntemlerini karşılaştırmışlar, bizim çalışmamızda da kullandığımız SCD yönteminin DNA fragmentasyonu saptamada daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (166). Zhang ve arkadaşları benzer şekilde 20 sağlıklı gözüllü, 32 infertil erkekte swim-up yöntemi ile hazırlanan sperm örneklerinde DNA fragmentasyonu belirleme açısından SCD ve TUNEL yöntemlerini karşılaştırmışlar ve SCD yönteminin DNA fragmentasyonu belirlemede daha güvenilir olduğunu rapor etmişlerdir (167). DNA fragmentasyon belirleme yöntemlerinin dayandığı prensipleri birbirlerinden oldukça farklıdır. Bu da DNA hasarı belirlemedeki yeteneklerinin birbirinden farklı olmasına neden olur (168). Bu da, çalışmaların sonuçları arasındaki farklılıkları kısmen izah edebilir. Ancak bizim çalışmamızda kullandığımız SCD (Halosperm®) yöntemi diğer yöntemlere göre uygulaması kolay, klinik androloji laboratuvarlarında rahatlıkla kullanılan diğer yöntemlere göre nispeten ucuz bir yöntem olarak öne çıkmaktadır.

Sperm DNA fragmentasyonu testlerinin sadece yıkama yöntemlerinin etkinliğini değerlendirmede değil YÜT tedavilerinin sonuçlarını öngörmede de kullanılabileceği uzun süredir üzerinde durulan bir konudur. Bu bağlamda, literatürde IUI, IVF veya ICSI prognozu için DNA fragmentasyon testlerinin kullanıldığı az sayıda çalışma bulunmaktadır. Biz çalışmamızda daha önce YÜT tedavisi almamış hastaları kullandığımız için bu çalışma popülasyonunu daha sonra öncelikle IUI tedavisine aldık. Dolayısıyla, çalışma sonucunda IUI tedavisine alınan hastaların tedavi prognozu ile DNA fragmentasyon sonuçlarını karşılaştırma şansımız oldu. Bizim sonuçlarımıza göre, IUI sonrası gebelik olan

ve olmayan gruplar DNA fragmentasyon oranı ve progresif hareketli sperm yüzdesi açısından karşılaştırıldığında gebe kalan ve kalmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$). Literatürdeki çalışmalar SCD yöntemi ile belirlenen sperm DNA fragmentasyonunun YÜT'lerinde fertilizasyon hızı ve embriyo kalitesi ile negatif korelasyon gösterdiğini ancak klinik gebelik hızları ve doğum ile ilişkili olmadığını göstermektedir (122,123,169,170,171). 2004 yılında Bungum ve arkadaşları 131 IUI, 109 IVF ve 66 ICSI olgusunda SCSA yöntemi ile DNA frakmantasyon indeksi (DFI) belirlemişler. IUI için, $DFI \leq 27$ olan olgularda gebelik şansının $DFI > 27$ olan olgulara göre anlamlı şekilde yüksek olduğunu saptamışlardır. ICSI ve IVF için $DFI > 27$ ise ICSI yönteminin kullanılmasının gebelik elde etme açısından daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir (OR %95 güven aralığında: 20 (2.3±117)) (169). Yine Bungum ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir başka çalışmada benzer şekilde; 387 IUI, 388 IVF ve 223 ICSI olgusunda SCSA yöntemi ile DFI belirlemişler. IUI uygulamalarında $DFI > 30$ grupta klinik, biyokimyasal ve canlı doğum oranları $DFI \leq 30$ olan gruba göre belirgin olarak düşük olduğunu bulmuşlardır. ICSI ve IVF uygulananlarda $DFI \leq 30$ olan grupta gebelik oranları her iki yöntemde de $DFI > 30$ olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekken, $DFI > 30$ olan olgularda seçilmesi gereken yöntemin ICSI olduğunu bildirmişlerdir (170). Son olarak Yang XY ve arkadaşları ise 2013 yılında 482 IUI uygulanan olguda SCSA ile $DFI \leq 25$ olan olgularda gebelik oluşma hızının, $DFI > 25$ olan olgulara göre anlamlı şekilde yüksek olduğunu bildirmişlerdir (171). Bizim çalışmanın sonuçları ile yukarıda belirtilen çalışmanın sonuçları

farklılık göstermektedir. Bu durum çalışmaya alınan popülasyonundaki hasta sayısının az olmasından ve/veya DNA fragmentasyonunu saptamada kullanılan yöntemin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Sonuç olarak; çalışmamızda YÜT için sperm hazırlama yöntemlerinden en sık kullanılan ikisi olan swim-up ve gradient yöntemlerinin DNA fragmentasyonunu azaltmadaki etkileri açısından karşılaştırılması sonucu swim-up yönteminin gradient yöntemine göre fragmente DNA oranını azaltmada daha başarılı olduğu görülmektedir.

6. SONUÇLAR

Bu prospektif çalışmada “Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Merkezi’ne” çocuk istemi ile başvuran, çalışma kriterlerine uyan ve açıklanamayan subfertilite (n:34, %52,3) veya erkek infertilitesi (n:31, %42,7) tanısı alan 65 hastada 2 farklı sperm hazırlama yöntemi olan swim-up ve dansite gradiyent yöntemlerinin DNA fragmantasyonu üzerine etkileri araştırıldı. Altmışbeş hastanın yıkama öncesi sperm verileri ve DNA fragmantasyon yüzdeleri hesaplandıktan sonra tüm sperm örneklerine swim-up ve dansite gradient yöntemleri ayrı ayrı uygulandı ve aşağıda belirtilen sonuçlar bulundu.

1. Hastaların demografik özellikleri ve bazal sperm değerleri gruplar arasında karşılaştırıldığında açıklanamayan infertilite ile erkek faktörü arasında erkek yaşı, kadın yaşı ve infertilite süreleri açısından fark yoktu ($p>0,05$). Bu bulgular aynı zamanda gruplardaki hastaların homojen olarak dağıldığını göstermekte ve infertilitede en önemli prognostik faktör olan kadın yaşı ve infertilite sürelerinin sonuçlara etkisini minimuma indirmektedir. Erkek yaşları açısından iki grup arasında fark olmaması sperm sayısının erkek yaşından çok etkilenmediğini göstermektedir. Beklenildiği üzere açıklanamayan subfertilite ve erkek infertilitesi grupları arasında yıkama öncesi sperm sayısı, progresif hareketli sperm yüzdesi ve morfolojileri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.(sırasıyla, $p=0,0001$, $p=0,005$, $p=0,009$). Yine yıkama öncesi DNA fragmantasyon yüzdeleri karşılaştırıldığında erkek

faktörü grubunda fragmentasyon oranları daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. ($p=0,313$)

2. Sperm sayılarının yıkama yöntemine göre değişimi incelendiğinde, hem swim-up hem de gradient yöntemi sonrasında sperm sayılarının yıkama öncesi bazal değerlere göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür. Bu farkın hem açıklanamayan subfertilite hem de erkek faktörü gruplarında mevcut olduğu saptanmamıştır (her 2 grupta $p<0,0001$). Ayrıca, erkek faktörü grubunun bazal sperm sayısının açıklanamayan subfertilite grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$).
3. Yine aynı şekilde, yıkama sonrası progresif hareketli sperm yüzdelerinin yıkama öncesi bazal değerlere göre her iki infertilite grubunda da arttığı bulunmuştur. (swim-up $p=0.002$, dansite gradient $p<0.0001$). Ayrıca, her iki infertilite grubu arasında sperm sayılarında olduğu gibi yıkama öncesi progresif hareketli sperm yüzdeleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü, erkek faktörü grubunda yıkama öncesi progresif motil sperm yüzdesi açıklanamayan subfertil gruba göre daha düşük bulunmuştur. ($p=0,005$).
4. İnfertilite nedeni göz önüne alınmadan toplam 65 hastanın yıkama öncesi DNA fragmentasyon yüzdeleri, swim-up ve gradient sonrası değerleri ile karşılaştırıldı. Buna göre, swim-up yönteminde yıkama sonrası fragmente DNA yüzdesinde yıkama öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p=0,0001$). Gradient yöntemi yıkama öncesine göre

fragmente DNA yüzdesini azaltsada ($44,1 \pm 20,79$ vs $41,2 \pm 21,62$), aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,129$).

5. Yıkama öncesi ve her iki yıkama yöntemi sonrası elde edilen sperm parametreleri her iki infertilite grubu için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Açıklanamayan subfertilite grubunda sperm sayısı ve progresif hareketli sperm yüzdeleri yıkama öncesi, swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrası sonuçları karşılaştırıldığında, her iki yöntem ile yıkama işlemi sonrasında da sperm sayılarının yıkama öncesine göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Swim-up için $p < 0,0001$ ve gradient için $p < 0,001$). Swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrası elde edilen sperm sayıları kendi arasında karşılaştırıldığında, swim-up yönteminde yıkama sonrası elde edilen sperm sayıları daha düşük olmakla birlikte, iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,195$). Açıklanamayan subfertilite grubunda progresif hareketli sperm yüzdeleri karşılaştırıldığında ise, swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrasında yıkama öncesine göre progresif hareketli sperm yüzdeleri önemli ölçüde artığı görülmüştür (swim-up için $p < 0,0001$, gradient için $p=0,001$). Swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrası elde edilen progresif hareketli sperm oranları yıkama yöntemleri arasında karşılaştırıldığında ise, her iki yöntem arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($73,91 \pm 17,62$ vs $72,20 \pm 14,28$, $p=0,293$).
6. Açıklanamayan subfertil hasta grubunda yıkama öncesi ile swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama sonrasında sperm DNA fragmentasyon

yüzdelerindeki değişimler karşılaştırıldığında; swim-up yönteminin yıkama öncesi bazal değerlere göre fragmente DNA yüzdesini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Gradient yöntemi yıkama öncesine göre fragmente DNA yüzdesini azaltsada ($41,85\pm22,04$ vs $38,79\pm22,30$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p=0,160$). Her iki yöntemle yıkama sonrası fragmente DNA yüzdelерinin karşılaştırılması sonucunda swim-up yöntemi ile fragmente DNA oranının gradient yöntemine göre belirgin olarak daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$).

7. Erkek faktörü grubunda sperm sayısı ve progresif hareketli sperm yüzdeleri yıkama öncesi sonuçları ile, swim-up ve gradient uygulamaları sonrası sonuçları karşılaştırıldığında her iki yıkama yönteminde de yıkama öncesine göre sperm sayılarının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (swim-up için $p<0,0001$, gradient için $p<0,001$). Bu grupta swim-up ve gradient yöntemleri sonrası sperm sayılarındaki azalma yönünden karşılaştırma yapıldığında swim-up yönteminde daha fazla sayı azalması saptanmıştır ($p=0,002$). Progresif hareketli sperm yüzdeleri karşılaştırıldığında, swim-up ve gradient yöntemleri sonrasında yıkama öncesine göre progresif hareketli sperm yüzdelерinin önemli ölçüde arttığı görülmüştür (swim-up için $p<0,0001$, gradient için $p<0,0001$). Yine erkek faktörü grubunda açıklanamayan infertil gruptan farklı olarak swim-up ve gradient yöntemleri kendi arasında karşılaştırıldığında swim-up sonrası progresif hareketli sperm yüzdesinin istatistiksel olarak

anlamli şekilde fazla olduğu görülmüştür ($59,5 \pm 19,35$ vs $55,16 \pm 18,87$, $p=0,027$).

8. Erkek faktörü grubunda yıkama öncesi, swim-up ve gradient yöntemleri sonrasında sperm DNA fragmentasyon y zdelindeki değişimler karşılaştırıldığında; açıklanamayan infertilite grubuna benzer şekilde swim-up yönteminin yıkama öncesine ($p<0,0001$) göre fragmente DNA yüzdesini önemli ölçüde azalttığı bulunurken; gradient yönteminde ise yıkama öncesine göre fragmente DNA yüzdesini azaltsa da ($46,61 \pm 19,38$ vs $44,03 \pm 20,87$) istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p=0,470$). Her iki yöntemle yıkama sonrası fragmente DNA y zdelерinin karşılaştırılması sonucunda swim-up yöntemi ile fragmente DNA oranının gradient yöntemine göre belirgin olarak daha düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$).
9. IUI sonrası gebelik olan ve olmayan hasta grupları yıkama öncesi bazal, swim-up ve gradiyent yöntemleri sonrasında progresif hareketli sperm yüzdesi ve DNA fragmentasyon y zdelерinin gebeliğe etkileri yönünden değerlendirilmiştir. Buna göre gerek yıkama öncesi bazal gerekse de yıkama sonrası progresif hareketli sperm yüzdesi ve DNA fragmentasyon yüzdeleri açısından gebe kalan ve kalmayan hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır ($p>0,05$). Yine gebelik olan ve olmayan grupların yıkama öncesi morfolojileri karşılaştırıldığında istastiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Aynı parametreler açıklanamayan ve erkek faktörü subfertil hasta

gruplarında ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Buna göre hem açıklanamayan hem de erkek faktörü subfertil hasta gruplarında gebe kalan ve kalmayan hastalar arasında bazal, yıkama sonrası progresif motilite, DNA fragmentasyon yüzdeleri ve yıkama öncesi morfolojileri yönünden karşılaştırıldığında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

10. İnfertilite nedenine bakılmaksızın erkek yaşının sperm parametreleri ve DNA fragmentasyon yüzdelerine etkilerine bakıldığında yıkama öncesi sperm sayısı ve progresif hareketli sperm yüzdelerinin yaşla birlikte (özellikle 40 yaş üstü grupta) azaldığı görülürken fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Yıkama öncesi DNA fragmentasyon yüzdelerinde yaş grupları arasında fark bulunmamıştır. ($p>0,05$). Swim-up ve gradient yöntemleri sonrası sperm sayısı ve progresif hareketli sperm yüzdelerinin yaşla azaldığı görülürken istatistiksel olarak yaş grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. ($p>0,05$). Swim-up yöntemi sonrası DNA fragmentasyon yüzdelerinin yaştan etkilenmediği görülmüştür ($p>0,05$), Gradient yöntemi sonrası sperm DNA fragmentasyon yüzdelerine bakıldığında ise yaşla birlikte fragmentasyon oranları artsa da fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

7. KAYNAKLAR

1. Günalp İ. , Fertilite ve Sterilite, Modern Üroloji Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
2. Kişnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Öneroğlu LS. Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ed. Ankara: Güneş, 1996.s 1119-1129,1287.
3. Shoham Z, Di Carlo C, Patel A, Conway GS, Jacobs HS. Is it possible to run a succesful ovulation induction program based solely on ultrasound monitoring? The importance of endometrial of endometrial measurements. Fertil Steril 1991;56:836-841.
4. Speroff L, Fritz MA. Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility. 8nd edition. 2011.
5. Sigman M, Howards SS. Male infertility; in Cambell's Urology. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED Jr., Wein AJ. (Eds). Saunders Comp.,1998; 7th edition, vol 2, chapter 43:1287-1330.
6. Mortimer D. Sperm preparation methods. J Androl. 2000; 21:357-366.
7. Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. Syst Biol Reprod Med 2008;54:111–25.
8. Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, Joshi R, Delhanty JDA, Serhal P. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. Hum Reprod 2010;25:1609–18.
9. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. Hum Reprod 2010;25:1594–608.
10. Steger K, Cavalcanti MC, Schuppe HC. Prognostic markers for competent human spermatozoa: fertilizing capacity and contribution to the embryo. Int J Androl 2011;34:513–27.

11. Simon L, Lewis SE. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? Syst Biol Reprod Med 2011;57:133–8.
12. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. Fertil Steril.1991; 56(2):192-193.
13. Arıncı K, Elhan A. Anatomi, 4. Baskı, Ankara, Güneş Kitapevi, 2006.
14. Ross HM, Kaye G, Pawlina W, Histology, a text and atlas, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Philedelphia, 2003; 689-696.
15. Jensen C.E, Wiswedel K, et al. Prospective study of hormonal and semen profiles in marathon runners. Fertil Steril 1995;64(6): 1189-1197.
16. Chung, KW. Gross Anatomy, 5. Baskı, London, Lippincott Williams &Wilkins, 2005.
17. Ganong WF. Review of medical physiology. 16th edition. Appletioa and Lange, California, p: 387-408. 1993.
18. Özdamar S, Çetin N Sorkun H. Genel Embriyoloji, E.Ü.T.F Yayınları Kayseri 2002:4-15.
19. Abraham L, Kierszenbaum Histology and Cell Biology, 2th edition. Mosby. 2002; 529-550.
20. Gartner LP, Hiatt JL: Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W.B.Saunders Company, 1997; 493-98.
21. Bostofte E., Bagger P., Michael A. Fertility prognosis for infertile men: results of follow-up study of semen analysis in infertile men from two different populations evaluated by the cox regression model. Fertil Steril 1990; 54(6): 1100-6.
22. World Health Organization. WHO Laboratory Manual fort he Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 5th. Edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.

23. Mack S, Bhattacharyya AK, Joyce C, van der Ven H, ve ark. Acrosomal enzymes of human spermatozoa before and after in vitro capacitation. *Biol Reprod.* 1983;28(5):1032-42.
24. Vital and Health Statistics, series 23, no. 26, CDC. Available from: <http://www.cdc.gov>.
25. Dohle G.R., Diemer T., Giwercman A., Jungwirth A., Kopa Z., Krausz C., Guidelines on male infertility. European Association of Urology, 2010.p.7
26. World Health Organization. WHO Manual for the Standardised Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
27. Esteves CS, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics* 2011;66(4):691-700.
28. Colpi G.M., Casella E., Zanollo A., Ballerini G., Balerna M., Campana A., Lange A. (1987). Functional voiding disturbances of ampullo-vesicular seminal tract: a cause of male infertility. *Acta Eur. Fertil.*, 18: 165-179.
29. Sexton W.J., Jarow J.P. (1997). Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology.* 49:5-8-513.
30. Günalp S. , Orhon E. , Özgür K. ,Seçkin B. , Tarcan T. ,Türk Androloji Rehberi, 2004:4-5
31. WHO: World Health Organization Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Sperm-Cervical Mucus Intraction. 4th Ed. New York: Cambridge University Press: Cambridge.1999.
32. World Health Organiation. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction, 3rd Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992, p. 107.
33. Poland M.L., Moghissi K.S., Giblin P.T., Ager J.W., Olson J.M. Variation of semen measures within normal men. *Fertil Steril.* 1985; 44:396-340

34. Tielemans E., Heederik D., Burdorf A., Loomis D., Habbema D.F. Intraindividual variability and redundancy of semen parameters. *Epidemiology*. 1999; 8:99-103
35. Chen Z., Toth T., Godfrey-Bailey L., Mercedat N., Schiff I., Hauser R. Seasonal variation and age-related changes in human semen parameters. *J Androl*. 2003; 24:226-231
36. Guzick D.S., Overstreet J.W., Factor-Litvak P., Brazil C.K., Nakajima S.T., Coutifaris C., Carson S.A., Cisneros P., Steinkampf M.P., Hill J.A., Xu D., Vogel D.L. Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men, *New Engl J Med*. 2001; 345: 1388-1393
37. Cooper T.G., Noonan E., Von Eckardstein S., et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update* 2010; 16:231
38. Andolz P, Bielsa M.A, Andolz A. Circannual variation in human semen parameters. *Int J Androl*. 2001; 24:226-231.
39. Yaman S., Müftüoğlu Y.Z., Anafarta K, Bedük Y, Erkek İnfertilitesi. *Üroloji*, Ankara, Güneş Kitabevi, 1990:483-508.
40. Taşçı Aİ., Samastı M. İnfertilitede laboratuvar ve uygulamalar. Hayat Sağlık ve Sosyal Hizmetler Vakfı Yayınları. İstanbul, 1997.
41. McClure RD. Male infertility. In:Smith's General Urology. Tanagho EA, McAninch JV(Ed). Appleton-Lange Meed. San Fransisko, 681,1992.
42. Vicdan K, Isık AZ. In Vitro Fertilizasyon ve Mikromanipülasyon Uygulamalarında Laboratuvar. Birinci baskı. Ankara: Çağdas Medikal Kitabevi; 1999:79, 82-99.
43. Amelar R.D. Coagulation, liquefaction and viscosity of human semen. *J Urol* 1962, 87: 187-190.

44. WHO Laboratuvar El Kitabı _nsan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi degerlendirilmesi, çev. ed. Günalp S. Dördüncü baskı. Ankara: Tıp Teknik Kitabevi; 2002: 4–33, 76.
45. Olshan AF, Ananth CV, Savitz DA, Intrauterine growth retardation as an endpoint in mutation epidemiology: an evaluation based on paternal age, *Mutat Res* 344:89, 1995.
46. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, et al: Predictive value of abnormal sperm morphology in in-vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988;49:112-7.
47. ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) Andrology Special Interest Group, Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques., *Hum Reprod* 11:1463, 1996.
48. Turek PJ, Infections, immunology, and male infertility., *Infertil Reprod Med Clin North Am* 10:435, 1999.
49. Eggert-Kruse W, Christmann M, Gerhard I, Pohl S, Klinga K, Runnebaum B, Circulating antisperm antibodies and fertility prognosis: a prospective study, *Hum Reprod* 4:513, 1989.
50. Collins JA, Burrows EA, Yeo J, Younglai EV, Frequency and predictive value of antisperm antibodies among infertile couples, *Hum Reprod* 8:592, 1993.
51. Haas GG, Jr., The inhibitory effect of sperm-associated immunoglobulins on cervical mucus penetration, *Fertil Steril* 46:334, 1986.
52. Mahony MC, Blackmore PF, Bronson RA, Alexander NJ, Inhibition of human sperm-zona pellucida tight binding in the presence of antisperm antibody positive polyclonal patient sera, *J Reprodmmunol* 19:287, 1991.
53. Smith RG, Johnson A, Lamb D, Lipshultz LI, Functional tests of spermatozoa. Sperm penetration assay, *Urol Clin North Am* 14:451,1987.
54. Burkman LJ, Coddington CC, Franken DR, Kruger TF, Rosenwaks Z, Hodgen GD, 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* 49:688, 1988.

55. Davis RO, Rothmann SA, Overstreet JW, Accuracy and precision of computer-aided sperm analysis in multicenter studies, *Fertil Steril* 57:648, 1992.
56. Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL, Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization, *Fertil Steril* 55:994, 1991.
57. Rolf C, Behre HM, Cooper TG, Koppers B, Nieschlag E, Creatine kinase activity in human spermatozoa and seminal plasma lacks predictive value for male fertility in in vitro fertilization, *Fertil Steril* 69:727, 1998.
58. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ, DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality, *J Androl* 21:33, 20
59. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP, Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic, *Hum Reprod* 14:1039, 1999.
60. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP, Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques, *Hum Reprod* 15:1717, 2000.
61. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR, The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development, *Hum Reprod* 17:990, 2002.
62. Zini A, Fischer MA, Sharir S, Shayegan B, Phang D, Jarvi K, Prevalence of abnormal sperm DNA denaturation in fertile and infertile men, *Urology* 60:1069, 2002.

63. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S, Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study, *Hum Reprod* 17:3122, 2002
64. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team, *Fertil Steril* 73:43, 2000.
65. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, El-Tonsy MH, Alvarez JG, Thomas AJ, Jr., Sharma RK, Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study, *Fertil Steril* 78:313, 2002.
66. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF, Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection, *Fertil Steril* 69:528, 1998.
67. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT, Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men, *Fertil Steril* 75:674, 2001.
68. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D, Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation implications for assisted conception. *Hum Reprod* 16:2160, 2001.
69. Chandley AC, Hargreave TB 1996 Genetic anomaly and ICSI. *Human Reproduction* 11, 930–932.
70. Carrell D, Wilcox A, Lowy L et al. 2003 Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with açıklanamayan recurrent pregnancy loss. *Obstetrics and Gynecology* 101, 1229–1235.
71. Agarwal A, Said T 2005 Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *British Journal of Urology International* 95, 503–507.

72. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J 2006 Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology* 8, 11–29.
73. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S et al. 2005 Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* 11, 198–205.
74. Tesarik J, Mendoza C, Greco E 2002 Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction* 17, 184–189.
75. Schwartz M, Vissing J 2002 Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine* 347, 576–580.
76. Sharma R.K., Said T., Agarwal A. Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome *Asian J Androl.* 2004;6:139-48.
77. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D et al. 2003 Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reproductive BioMedicine Online* 7, 428–432.
78. Dunkel L, Hirvonen V, Erkila K 1997 Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death Differentiation* 4, 171–179.
79. Kaufmann SH, Hengartner MO 2001 Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends in Cellular Biology* 11, 526–534.
80. Nagata S 2000 Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental Cell Research* 256, 12–18.
81. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G et al. 1999 Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction* 4, 31–37.

82. Paasch U, Grunewald S, Agarwal A, Glandera HJ 2004a Activation pattern of caspases in human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 81 (suppl. 1), 802–809.
83. Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A 2004 Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction Update* 10, 39–51.
84. Barkett M, Gilmore TD 1999 Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 18, 6910–6924.
85. Antonson B, Martinou JC 2000 The Bcl-2 protein family. *Experimental Cell Research* 256, 50–57.
86. Hengartner MO 2000 The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407,770–776.
87. Gupta S 2001 Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sciences* 69, 2957–2964.
88. Cedenho A.P.,Lima S.B.,Cenedeze M.A.,Spaine D.M., ve ark. Oligozoospermia and heat-shock protein expression in ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod.*2006(21)7:1791–94.
89. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L .Putative creatine kinase Misoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* .2000;63:925-32.
90. Barroso G, Morshedi M, Oehninger S 2000 Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction* 15, 1338–1344.
91. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi G et al. 2002 Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction* 66, 1061–1067.
92. Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D 2003 Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive BioMedicine Online* 7, 65–70.

93. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl.* 1988;9(6):367-76.
94. Lenzi A, Gandini L, Picardo M. A rationale for glutathione therapy. *Hum Reprod.* 1998 Jun;13(6):1419-22.
95. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertility and Sterility* 2000;**74**, 715–720.
96. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ 1998a Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 13,1864–1871.
97. Aitken RJ, Krausz C 2001 Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 122, 497–506.
98. Mahfouz R, Sharma R, Thiyagarajan A, Kale V, Gupta S, Sabanegh E, Agarwal A. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. *Fertil Steril.* 2010 Nov;94(6):2141-6
99. Aitken RJ, Buckingham D, West K et al. 1992 Differential Contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *Journal of Reproductive Fertility* **94**,451-462.
100. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C 1993 Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology* **16**,183–188.
101. Plante M, de Lamirande E, Gagnon C 1994 Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are

- sufficient to affect normal sperm motility. *Fertility and Sterility* **62**, 387–393.
102. De Lamirande E, Gagnon C. A Positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human Spermatozoa. *Inter J Androl*. 1993;16(1):21-5.
 103. Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:67.
 104. Hammadeh ME, Zeginiadov T, Rosenbaum P et al. Predictive value of sperm chromatine condensation (aniline blue staining) in the assesment of male infertility. *Arch Androl*;46:99-104.
 105. Rienzi L, Ubaldi F, Anniballo R, Cerulo G, Greco E. Preincubation of human oocytes may improve fertilization andd embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:1014-19.
 106. Erenpreis J, Bars J, Lipatnikova V et al. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatine integrity. *J Androl* 2001;24:2429-38.
 107. Yanagida K, Yazawa H, Katayose H, Suzuki K, Hoshi K, Sato A. Influence of preincubation time on fertilization after intrasitoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:2223-6.
 108. Manicardi G, Bianchi P, Pantano S et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship of chromomycine A₃ acessibility. *Biol Reprod* 1995; 52:864-7.
 109. Gorczyza W, Gong J, Drazynkiewicks Z. Detection of DNA strand breaks in individual apopitotic cells by the in situ terminal deoxinucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*. 1993;53:19embryo45-51.
 110. Setchell B, Ekpe G, Zupp J et al. Transient in embryo growth in normal female mice made pregant by males whose testes had been heated. *Hum reprod* 2001;16:2160-5.

111. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K et al. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996; 66:634-9.
112. Singh N, Danner D, Tice R et al. Abundant alkali sensitive sites in DNA of human and Mouse sperm. *Exp Cell Res*. 1989;175:184-91.
113. Drazynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T et al. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res* 1975;90:411-28.
114. Evenson D, Larson K, Jost L. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for selecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
115. Ankem M, Mayer E, Ward W et al. Novel assay for determining DNA organization in human spermatozoa: implication for male factor infertility. *Urology* 2002;59:575-8.
116. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000;28:529-36.
117. Fernandez J, Muriel L, Rivero M et al. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 2003;24:59-66.
118. Muriel L, Meseguer M, Fernandez JL et al. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Hum Reprod* 2006;21:738-44.
119. Zhang LH, Qui Y, Wang KH et al. Measurement of sperm DNA fragmentation using bright field microscopy: comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick end labeling assay. *Fertil Steril* 2010;94:1027-32.

120. Balasuriya A, Speyer B, Serhal P, Doshi A, Harper JC. Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2011 ; 22: 428-436.
121. Santiso R, Tamayo M, Gosalvez J, et al. Simultaneous determination in situ of DNA fragmentation and 8-oxoguanine in human sperm. *Fertil Steril* 2010; 93: 314-18.
122. Fernandez JL, Cjigal D, Lopez-Fernandez C, Gosalvez J. Assessing sperm DNA fragmentation with the sperm chromatin dispersion test. *Methods Mol Biol* 2011; 682: 291-301.
123. Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, et al. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technique programs: results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril* 2008; 90: 1792-9.
124. Female infertility. In Leon Speroff and Marc A. Fritz.(Eds') *Clinical Gynecological Endocrinology and Infertility*. Seventh Edition, LWW. 2008:1114-1133.
125. Abulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Al-Inany HG. Diagnosis and management of açıklanamayan infertility: an update. *Arch Gynecol Obstet*. 2003 Feb; 267(4): 177-188. Epub 2002 May 4.
126. Temleton AA, Penney GC. The incidence, characteristics, and prognosis of patients whose infertility is açıklanamayan. *Fertil Steril*. 1982; 37(2):175-182.
127. Grosignani PG, Collins J, Cooke ID, Diczfalusy E, Rubin B. Recommendation of the ESHRE workshop on “Aıklanamayan Infertility”. *Anacapri*, August 28-9, 1992. *Hum Reprod*. 1993; 8:977-980.

128. ESHRE Capri Workshop Group Guidelines to the prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility. *Hum. Reprod.* 1996; 11:1775-1807.
129. Crosignani PG, Rubin BL. Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. The ESHRE Capri Workshop Group. *Hum. Reprod.* 2000; 15:723-32.
130. The ESHRE Capri Workshop, European Society for Human Reproduction and Embryology Optimal use of infertility diagnostic tests and treatments. *Hum Reprod.* 2000; 3:723-732.
131. Collins JA, Rowe TC. Age of the female partner is a prognostic factor in prolonged açıklanamayan infertility: a multicenter study. *Fertil Steril.* 1989;52(1);15-20.
132. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, Steinkampf MP. Efficacy of treatment for açıklanamayan infertility. *Fertil Steril.* 1998; 70:207-213.
133. Jaffe SB, Jewelewicz R. The basic infertility investigation. *Fertil Steril. Review.* 1991; 56(4):599-613.
134. Collins JA, Burrows EA, Wilan AR. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil Steril.* 1995;64(1):22-28.
135. Henkel RR, Schill WB. Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;1:108-129.
136. Agarwal A, Ranganathan P. Higher rates of recovery with PureSperm density gradient compared to Isolate. *Hum Reprod.* 2001; 16: p-053.
137. Morell JM, Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Holmes PV. Reduced senescence and retained integrity in human sperm prepared by density gradient centrifugation. *J Androl Suppl Abst.* 2001.P5/6-034.
138. Morell JM, Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Holmes PV. Reduced senescence and retained nuclear DNA integrity in human

spermatazoa prepared by density gradient centrifugation . J Assist Reprod Gen. 2004; 21:217-222.

139. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandreoli M, Bizzaro D, Bianci PC, Bianchi U. The use of two gradient density centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatazoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Hum Reprod 2000; 15:1112-1116.
140. Nicholson CM, Abramsson L, Holm SE, Bjurulf E. Bacterial contamination and sperm recovery after semen preparation by density gradient centrifugation using silane coated silica particles at different *g* forces. Hum Reprod. 2000; 15:662-666.
141. Englert Y, Lesage B, Van Vooren JP, Liesnard C, Place I, Vannin AS, Emiliani S, Delbaere A: Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral disease. Hum Reprod Update 2004; 10:149-162.
142. Baker HWG, Ng FLH, Liu DY. Preparation and analysis of semen for ivf/gift. In Trounson A, Gardner DK (eds'). Handbook of in Vitro Fertilization, CRS Press 1993,USA, pp. 33-56.
143. Enginsu ME, Pieters MH, Dumolin JC, Evers JL, Geraedts JP. Male factor as determinant of in vitro fertilization outcome. Hum Reprod. 1992; 7:1136-1140.
144. Mortimer D. Sperm recovery techniques to maximize fertilizing capacity. Reprod Fertil Def. 1994; 6:25-31.
145. Teri Ord: Sperm Processing. In "Infertility in the male" Larry Lipschultz, Stuart Howards (eds') Third Edition. Mosby Publishing..1997; p. 494-567.
146. Ord T, Patrizio P, Marcello E, Balmaceda JP, Asch RH. MiniPercoll: a new method for semen preparation for IVF in severe male infertility. Hum Reprod. 1990; 5:987-989.

147. Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology*. 2000 Dec 20;56(6):1081-4.
148. Zini A, Nam RK, Mak V, Phang D, Jarvi K. Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing. *Fertil Steril*. 2000 Oct;74(4):824-7.
149. Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):632-8.
150. Ghaleno LR, Valojerdi MR, Janzamin E, Chehrazi M, Sharbatoghli M, Yazdi RS. Evaluation of conventional semen parameters, intracellular reactive oxygen species, DNA fragmentation and dysfunction of mitochondrial membrane potential after semen preparation techniques: a flow cytometric study. *Arch Gynecol Obstet*. 2013 Jul 12. [Epub ahead of print].
151. Amiri I, Ghorbani M, Heshmati S. Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim-up Methods. *J Clin Diagn Res*. 2012 Nov;6(9):1451-3.
152. Marchesi DE, Biederman H, Ferrara S, Hershlag A, Feng HL. The effect of semen processing on sperm DNA integrity: comparison of two techniques using the novel Toluidine Blue Assay. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2010 Aug;151(2):176-80.
153. Bartoov B, Berkovits A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;23:1–8.
154. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, et al. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic sperm injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 2005;20:185–90.

155. Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J. High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 2006;12:19–25.
156. Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JB. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril*. 2006 Feb;85(2):496-9.
157. Henkel RR, Franken DR, Lombard CJ, Schill WB. The selective capacity of glass-wool filtration for the separation of human spermatozoa with condensed chromatin: a possible therapeutic modality for male-factor cases. *J Assist Reprod Genet* 1994; 11: 395-400.
158. Spano M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Nuclear chromatin variations in the human spermatozoa which underwent swim-up and cryopreservation, which were evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Mol Hum Reprod* 1999; 5 : 29-37.
159. Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1950-53.
160. Donnelly ET, ‘Connell MO, McClure N, Lewis SE. The differences in the nuclear DNA fragmentation and the mitochondrial integrity of semen and the prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000; 1.: 1552-61.
161. Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. A study on the mitochondrial membrane potential, the reactive oxygen species, the DNA fragmentation and the cell viability which was done by using flow cytometry on human sperm. *Hum Reprod* 2002;17: 1257-65.
162. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, et al. The functional and the ultrastructural features of DNA-fragmented human sperms. *J Androl* 2000; 21 : 903-12.
163. Zini A, Mak V, Phang D, Jarvi K. The potential adverse effects of semen processing on the human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril* 1999; 72: 496-99.

164. Jayaraman V, Upadhya D, Narayan PK, Adiga SK, The sperm processing by swim-up and density gradient is effective in the elimination of the sperm with DNA damage. *J Assist Reprod Genet.* 2012 Jun;29(6):557-63.
165. Larson KL, Brannian JD, Timm BK, Jost LK, Evenson DP. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove spermatozoa with damaged chromatin structure. *Hum Reprod.* 1999 Aug;14(8):2015-9.
166. Feijó CM, Esteves SC. Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Fertil Steril.* 2013 Oct 17. pii: S0015-0282(13)03052-5.
167. Zhang LH, Qiu Y, Wang KH, Li J, Zhang MX, Liu J, Jia YF, Wu AH, Zhang AD, Wang LG. Measurement of sperm DNA integrity by sperm chromatin dispersion test and TdT-mediated dUTP nick end labeling assay. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2009 Apr 14;89(14):970-2.
168. Gosalves J, Lopez-Fernandez c, Fernandez JL. Sperm chromatin dispersion (SCD) test: technical aspects and clinical applications. In: Zini A, Agarwal A editors. *Sperm DNA damage: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction.* 1st ed. New York Springer US;2011:151-70.
169. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. *Hum Reprod.* 2004 Jun;19(6):1401-8.
170. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, Giwercman A. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod.* 2007 Jan;22(1):174-9.
171. Yang XY, Zhang Y, Sun XP, Cui YG, Qian XQ, Mao YD, Liu JY. Sperm chromatin structure assay predicts the outcome of intrauterine insemination. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2011 Nov;17(11):977-83.

8. ÖZET

SPERM HAZIRLAMA YÖNTEMİ OLARAK “SWİM-UP VE GRADİENT” TEKNİKLERİNİN DNA FRAGMENTASYONUNA ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Bu prospektif çalışmada açıklanamayan ve erkek infertilite tanısı konan çiftlerde sperm hazırlanmasında kullanılan iki sperm yıkama yönteminin DNA fragmentasyonuna etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla, tüp bebek merkezine başvuran açıklanamayan infertil 34 hasta ve erkek infertilitesi tanısı alan 31 hastanın yıkama öncesi, gradient ve swim-up yöntemleri sonrası fragmente DNA oranlarındaki değişimler karşılaştırılmıştır.

İnfertilite nedeni göz önüne alınmadan toplam 65 hastanın yıkama öncesine göre fragmente DNA yüzdelerinin, swim-up yöntemi sonrası istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür ($p=0,0001$). Gradient yöntemi yıkama öncesine göre fragmente DNA yüzdesini azaltsa da farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlenmiştir ($p=0,129$).

Açıklanamayan subfertilite ve erkek infertilitesi gruplarında swim-up ve gradient yöntemleri ile yıkama öncesi ve yıkama sonrası sperm DNA fragmentasyonu değerlerine bakıldığında; her iki infertilite grubunda da swim-up yönteminin yıkama öncesi bazal değerlere göre fragmente DNA yüzdesini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Gradient yöntemi her iki infertilite grubunda yıkama öncesine göre fragmente DNA yüzdesini azaltsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (açıklanamayan infertilite: $p=0,160$ ve erkek infertilitesi: $p=0,470$). İki grupta da her iki yöntemle yıkama

sonrası fragmente DNA yüzdelerinin karşılaştırılması sonucunda swim-up yöntemi sonrası fragmente DNA oranının gradient yöntemine göre düşük olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$).

IUI sonrası gebelik olan ve olmayan grupların sonuçlarına bakıldığında; gerek yıkama öncesi gerekse de yıkama sonrası progresif hareketli sperm yüzdesi ve DNA fragmentasyon yüzdeleri açısından gebe kalan ve kalmayan hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Bu çalışmanın sonucunda swim-up yöntemi gradient yöntemine göre sperm fragmente DNA yüzdesini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Ayrıca, DNA fragmentasyonunun IUI prognozu üzerine etkisini belirlemek için, geniş serilerle yapılacak daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Swim-up, gradient, DNA fragmentasyonu, halosperm, SCD.

9. SUMMARY

THE EFFECT OF SWIM-UP AND GRADIENT SPERM PREPARATION TECHNIQUES ON DEOXYRIBONUCLEIC ACID (DNA) FRAGMENTATION

In this prospective study, we evaluated the impact of the two sperm washing techniques (swim-up and density gradient) on DNA fragmentation in couples who diagnosed with unexplained and mild male factor infertility. 34 unexplained infertility and 31 mild male factor infertility subjects were included in the study.

There was a significant decrease in the percentage of DNA fragmentations before and after washing with swim-up method in the total study group ($p=0,0001$). Although the gradient technique decreased the DNA fragmentation rate ($44,1\pm 20,79$ vs. $41,2\pm 21,62$) in the total group, the difference was not significant between before and after washing ($p=0,129$).

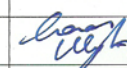
In both of the infertility groups, there was a statistically significant decrease in the DNA fragmentation rates before and after washing with swim up technique ($p<0,0001$). Although the gradient technique decreased the DNA fragmentation in both groups, the difference was not significant between before and after washing (unexplained infertility: $p=0.160$ and male factor infertility $p=0.470$). When we compared the fragmented DNA percentages of the two techniques before and after washing, sperm percentage with fragmented DNA after swim-up technique was significantly lower than the gradient technique ($p<0,0001$).

When we looked at the results of the patients with and without pregnancy after IUI, there was no statistically significant relationship between the percentages of progressive motil sperm and DNA fragmentation before and after washing.

In conclusion, swim up technique seems to lower the DNA fragmentation more than gradient technique. Further studies in larger series would be useful to improve our understanding of the prognostic value of sperm DNA integrity to IUI outcome.

Key words: Swim-up, gradient, DNA fragmentation, halosperm, SCD

10. EKLER

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU DEĞERLENDİRME FORMU				
DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara			
TELEFON	0312 202 69 58			
FAKS	0312 202 46 73			
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr			
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Yardımcı üreme tekniklerinde sperm yıkama yöntemi olarak kullanılan swim-up ve dansite gradiyent yöntemlerinin DNA fragmantasyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Ahmet ERDEM		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☒	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
		DİĞER ☐	İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL: (B.3) Genetik materyalle yapılacak araştırmalar ☒ İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN ☐	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	SİGORTA	☐		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 200 Toplantı tarihi: 15.06.2011			
	Üniversitemiz Tıp Fakültesinde Prof.Dr.Ahmet Erdem'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, Genetik klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve "bütçesi dışında" uygun olduğuna G.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir. Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP) tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.			
ÇALIŞMA ESASI	ETİK KURUL BİLGİLERİ			
	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu			
ETİK KURUL BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU				
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E ☐ H ☒
Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Allerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E ☐ H ☒
			Katılım **	İmza
			E ☒ H ☐	
			E ☐ H ☒	Katılmadı

Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>guc</i>
Prof.Dr.Fusun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F Anest.ve Rea. A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Bozkirli</i>
Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Türköz</i>
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F (Ecz.Mes.Bil.) Farmasötik Kimya	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Ersan</i>
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Aycan</i>
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Kavutcu</i>
Prof.Dr.Öznur L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Guz</i>
Prof.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Poyraz</i>
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Demirel</i>
Doç.Dr.Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun-Boğaz Hast. A.D	E	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Huk.Müş.Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Gelir</i>
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	<i>Şeker</i>

* :Araştırma ile İlişki
** :Tartışılabilir Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Yüksel

Soyadı : OĞUZ

Doğum Yeri ve Tarihi : Gazipaşa /ANTALYA-08.08.1980

Eğitimi :

2008- ... : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum
Anabilim Dalı / Ankara

2000-2007 : Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıp Doktorluğu İzmir

1998-1999 : Hacettepe Fizik Öğretmenliği /Ankara

1994-1997 : Gazipaşa Lisesi/ Antalya

1993-1994 : Akalan İlköğretim Okulu/ Antalya

1991-1993 : Gazipaşa Lisesi Ortaokulu/ Antalya

1986-1991 : Cumhuriyet İlköğretim Okulu/Antalya

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar :

TJOD (Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği)

TSRM (Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite)

Bilimsel Etkinlikler ve Sempozyumlar :

1. 6.Ulusal Üreme Sağlığı ve Aile Planlaması Kongresi (2009)
2. Maternal Fetal Tıp ve Perinatoloji Sempozyumu (2009)
3. Türkiye Maternal Fetal Tıp ve Perinatoloji Derneği Ultrasonografi Kursu (2011)

4. Jinekolojik Endoskopi Derneği Workshop (2012)
5. Her Yönüyle PCOS Kurs ve Sempozyumu (2013)
6. 11.Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi (2013)
7. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu (2013)

Bildiri Özetleri:

1. Klomifen Sitrat ile Ovulasyon İndüksiyonu Sonrası Oluşan Sinüs Ven Trombozu. Erhan Demirdağ, Cahit Cenksoy, Yüksel Oğuz, Mehmet Erdem, Ahmet Erdem. V. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi (2011)- Poster Sunum.
2. Transfer Edilen Embriyo Sayısını Zorunlu Olarak Kısıtlayan 2010 Mart Yönetmelik Değişikliğinin ART Sonuçlarına Etkileri: Bir Üniversite Kliniğinin Deneyimleri. Seyhan Gümüşlü, Onur Karabacak, Esra Karabay, Cengiz Karakaya, Yüksel Oğuz, Nuray Bozkurt, Mesut Öktem, Mehmet Erdem, Ahmet Erdem. 10.Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi (2012)-Sözlü Sunum.
3. İVF ile Elde Edilen Embriyolarda Dondurma Tekniği Olarak Slow Freezing ve Vitrifikasyon Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Seyhan Gümüşlü, Deniz Ercan, Yüksel Oğuz, Erhan Demirdağ, M.Seçkin Özışık, Mesut Öktem, Nuray Bozkurt, Onur Karabacak, Mehmet Erdem, Ahmet Erdem. 10.Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi (2012)-Sözlü Sunum.
4. Viabilite Sınırında Preterm Prematür Membran Rüptürü Tanısı Alan İki Olgunun Başarılı Yönetimi. K.Aslan, M.Öztürk, Y. Oğuz, M.F. Akdulum Cevher, M. Erdem, A.Erdem. 11.Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi (2013)- Poster Sunum
5. Hipotiroidisi olan gebelerde gestasyonel diyabet insidansı. M.F. Akdulum Cevher, Y.Oğuz, Ş.Yıldız, K.Aslan, M.Öztürk, M. Erdem,

A.Erdem. 11.Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi (2013)-Sözlü Sunum. Antalya-Türkiye

6. A Case of Early Onset of Cholestasis of Pregnancy Associated with in Vitro Fertilization (IVF) and Moderate Ovarian Hyperstimulation Syndrome (OHSS). M. Erdem, A.Erdem, K. Aslan, Y. Oguz. 69th ASRM Annual Meeting- Poster Presentation. Boston, Massachusetts, USA.
7. Outcome of Microdose and Antagonist Protocols in Poor Responder Patients: Comparison with Long Protocol Cycles with Incidentally Had Low Number of Oocyte in IVF. M. Erdem, A. Erdem, Y. Oguz, K. Aslan, M Oktem, N Bozkurt . 69th ASRM Annual Meeting- Poster Presentation. Boston, Massachusetts, USA