

**T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NORMOZOOSPERMİK İNFERTİL HASTALARDAN FARKLI  
SEÇİM YÖNTEMLERİ İLE ELDE EDİLEN SPERMLERİN  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE ELEKTRON MİKROSKOBİK  
İNCELENMESİ**

**Sevilay ERİMŞAH**

**Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Doktora Programı İçin Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.**

**KOCAELİ  
2017**



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

Tez adı: Normozoospermile infertil hastalardan farklı seçim yöntemleri ile elde edilen spermelerin immünohistokimyasal ve elektron mikroskopla birtakım incelenmesi

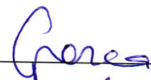
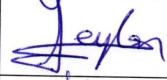
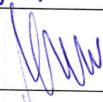
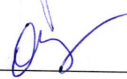
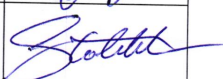
Tez yazarı: Sevilay SEMŞAL

Tez savunma tarihi: 11.01.2017

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sülheyra GONCA

2. Danışmanı: Prof. Dr. Aysel KÖKNER

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Üye Prof. Dr. Sülheyra GONCA	
Üye Prof. Dr. Sülheyra CEYLAN	
Üye Prof. Dr. Nelda Yodunaplı SILMAN	
Üye Prof. Dr. Aysel KÖKNER	
Üye Doç. Dr. Stel KÖKTÜRK	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.



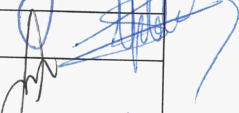





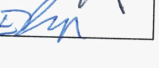
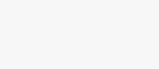
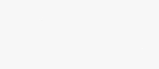
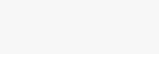
...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız  
Enstitü Müdürü

ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU ONAYI  
ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY CLINICAL RESEARCHES ETHICS COMMITTEE APPROVAL  
Sayı : 97  
Konu: Kararlar  
10.../8/2015

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Normozoospermik infertil hastalardan farklı seçim yöntemleri ile elde edilen spermelerin immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik incelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATER)	Prof. Dr. Aysel KÜKNER
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATERS)	Sevilay ERİMŞAH, Doç. Dr. Süheyla GONCA, Prof. Dr. Bülent DURAN
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	A.İ.B.Ü Tıp Fakültesi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2015/70	Tarih (Date): 02.07.2015
	Prof. Dr. Aysel KÜKNER'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Mehmet YAZICI (Başkan)	Kardiyoloji AD.	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU (Başkan Yardımcısı)	Mikrobiyoloji AD.	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Fatih DEMİRCİOĞLU (Raportör)	Çocuk Hastalıkları AD.	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Safiye GÜREL (Üye)	Radyoloji AD.	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Yaşar DAĞISTAN (Üye)	Beyin Cerrahi AD.	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Aysu KIYAN (Üye)	Halk Sağlığı AD.	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Akcan AKKAYA (Üye)	Anesteziyoloji AD.	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Recep BAYRAM (Üye)	Farmakoloji AD.	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Yrd. Doç. Dr. Erkan KILINÇ (Üye)	Fizyoloji AD.	AİBÜ Tıp Fakültesi	
Hatice Selen SÖYLEMEZ (Üye)	Özel	Eczacı	
Avukat. Erol ALTINDAŞ (Üye)	Altınçağ Hukuk Bürosu	Hukukçu	
Erkan AKMAN (Üye)	İzzet Baysal Anadolu Lisesi	Coğrafya Öğretmeni	

## ÖZET

### **Normozoospermik İnfertil Hastalardan Farklı Seçim Yöntemleri ile Elde Edilen Spermilerin İmmünohistokimyasal ve Elektron Mikroskopik İncelenmesi**

**Amaç:** Normozoospermik infertil hastalardan, swim up, density gradient ve mikro akışkan çip yıkama yöntemleri ile elde edilen spermelerin immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak incelemesi ve uygun yıkama yöntemin belirlenmesi amaçlandı.

**Yöntem:** 20 normozoospermik infertil hastaya ait semen parametreleri değerlendirildi. Semen örnekleri, density gradient, swim up ve mikro akışkan çip yöntemleri için 4 eşit hacime ayrılarak gruplandı. Gruplara ait spermelere kromatin kondensasyon defektlerinin belirlenmesi için anilin ve toluidin mavisi boyamaları, sperm DNA fragmentasyonunun (SDF) belirlenmesi için TUNEL boyaması uygulandı. Hücre içi ROS seviyeleri flow sitometri ile ince yapı değerlendirmesi ise elektron mikroskopik olarak yapıldı.

**Bulgular:** Konsantrasyon değerlendirmelerinde, swim up (45,65M/ml) ve mikro akışkan çip (46,90M/ml) yöntemleri ile benzer sayıda sperm elde edilirken, density gradient (55,55M/ml) yöntemi ile anlamlı olarak yüksek sayıda sperm elde edildi ( $P<0.0001$ ). Mikro akışkan çip ile normal morfolojili (%19,45) ve ileri hareketli sperm oranı (%83,55) diğer yöntemlere göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $P<0.0001$ ). Bununla beraber a sınıfı hareketteki artış da diğer yöntemlere göre mikro akışkan çip ile anlamlı olarak daha yüksek belirlendi ( $P<0.0001$ ). Sperm kromatin kondensasyon defekti ve SDF yüzde oranı mikro akışkan çip yönteminde anlamlı olarak düşük bulundu ( $P<0.0001$ ). Hücre içi ROS analizlerinde DCFH ile boyanan sperm sayısı mikro akışkan çip yönteminde anlamlı olarak en düşük (%7,45) hesaplandı ( $P<0.0001$ ). Elektron mikroskopik olarak tüm yıkama yöntemlerinde, granüler kromatinin ve apopitozun azaldığı ayrıca density gradient yönteminde akrozomal düzensizliklerin daha sık olduğu görüldü.

**Sonuç:** Bu çalışmanın sonuçları; aşılama tedavisinde mikro akışkan çip yönteminin, density gradient ve swim up yıkama yöntemlerine göre daha etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Sperm seçim yöntemleri, DNA fragmentasyonu, ROS, Elektron mikroskobu.

## ABSTRACT

### **Immunohistochemical and Electron Microscopic Analysis of The Normozoospermic Infertile Patients' Sperms Obtained By Different Selection Methods**

**Objective:** In normozoospermic infertile patients, we aimed to investigate immunohistochemical and electron microscopic examination of sperm obtained by swim up, density gradient and microfluidic chip methods as well as to determine the ideal method.

**Method:** Semen parameters of 20 normozoospermic infertile patients were evaluated. Each patient's semen was grouped into four equal volume, for density gradient, swim up and microfluidic chip method. Aniline and toluidine blue staining were used to identify chromatin condensation defects and TUNEL staining was used for sperm DNA fragmentation (SDF). ROS levels were determined by flow cytometry and fine structure evaluation by electron microscopy.

**Results:** Evaluation of concentration, swim up (45.65M/ml) and micro fluid chip (46,90 M/mL) was achieved with a small number of similar and sperm density gradient (55,55M/mL) significantly higher number of sperm was obtained ( $P<0.0001$ ). Microfluidic chip method was found to be significantly higher in normal morphology and motion evaluations ( $P<0.0001$ ). However, the rate of increase of class a movement was significantly higher after microfluidic chip method ( $P<0.0001$ ). Sperm chromatin condensation defect and SDF were found to be significantly lower in the microfluidic chip method ( $P<0.0001$ ). In ROS analysis, the number of sperm stained with DCFH was calculated to be the lowest (7.45%) in the microfluidic chip method ( $P <0.0001$ ). When the methods were examined by electron microscopy, it was seen that granular chromatin and apoptosis decreased and acrosomal irregularities were more frequent in the density gradient method.

**Conclusions:** The results of this study show that sperm obtained by microfluidic chip method may be more effective at insemination treatment than density gradient and swim up methods.

**Keywords:** Sperm selection methods, DNA fragmentation, ROS, Electron microscopy.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalıŐmam boyunca bana emek veren, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Sũheyla GONCA'ya, tanıdığım için bũyũk mutluluk duyduğum, tez çalıŐmam sũresince emeğini hiç esirgemeyen sevgili hocam ve danıŐmanım Sayın Prof. Dr. Aysel KũKNER'e ve doktora eğitimim boyunca her zaman desteğini hissettiğim değerli hocam ve Anabilim Dalı BaŐkanımız Sayın Prof. Dr. Sũreyya CEYLAN'a,

Eğitimime yapmıŐ oldukları katkılarından dolayı tũm değerli hocalarıma, tezin flow sitometri çalıŐmaları boyunca gũler yũzle bũyũk bir ȳzveri gȳsteren yũksek lisans ȳđrencisi Gũlay ERMAN'a,

Sevgi ve desteği ile yanımnda olan eŐim M. Emre ERİMŞAH'a, huzur ve mutluluk kaynaklarım Mehmet ve Ahmet'e bu zorlu sũrete bana gȳstermiŐ oldukları anlayıŐ ve desteklerinden dolayı sonsuz teŐekkũrler...

Sevilay ERİMŞAH

## Turnitin Originality Report

Doktora tez by Sevilay Erimşah

From doktora tez (SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ)

- Processed on 13-Dec-2016 13:45 EET
- ID: 752468574
- Word Count: 13765

Similarity Index 4%

Similarity by Source

Internet Sources: 2%

Publications: 2%

Student Papers: 1%



## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
TEŞEKKÜR	vii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ÇİZİMLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
1.1.Spermatogenez	1
1.1.1.Spermatogonyal Faz	1
1.1.2.Spermatosit Fazı (Mayoz)	1
1.1.3.Spermatid Fazı (Spermiyogenez)	2
1.2.Epididimal Olgunlaşma	5
1.2.1.Sperm Kromatin Kondensasyonu	5
1.2.2.Sperm DNA Hasarı Mekanizması	8
1.2.3.Sperm DNA Bütünlüğünü Belirleyen Testler	10
1.3.Sperm Yapısı	12
1.4. Erkek İnfertilitesi	14
1.5.Sperm Seçim Yöntemleri	16
1.5.1. Swim up	18
1.5.2. Density Gradient	19
1.5.3.Mikro Akışkan Çip	19
1.5.4.Migrasyon Sedimentasyon	20
1.5.5.Glass Wool Filtrasyon	20
1.5.6.Elektroforetik Filtrasyon	21
2.AMAÇ	22
3.YÖNTEM	23
3.1. Hasta Grubu ve Deneysel Düzen	23
3.2. Semen Örneklerinin Değerlendirilmesi	24
3.2.1. Konsantrasyon	24
3.2.2. Hareketlilik	25

3.2.3. Sperm Morfoloji Değerlendirmesi	26
3.3. Sperm Seçim Yöntemlerinin Uygulanması	28
3.3.1. Density Gradient Yöntemi	28
3.3.2. Swim up Yöntemi	29
3.3.3. Mikro Akışkan Çip Yöntemi	29
3.4. Işıık Mikroskopik Boyaların Hazırlanışı ve Boyama Yöntemleri	30
3.4.1. Asidik Anilin Mavisi	30
3.4.2. Toluidin Mavisi	31
3.4.3 Sperm Kromatin Kondensasyonunun Değerlendirilmesi	31
3.5. TUNEL Yöntemi ile DNA Fragmantasyonunun Değerlendirilmesi	31
3.6. Reaktif Oksijen Türevi (ROS) Değerlendirilmesi	32
3.6.1. DCFH-DA/PI ile Flow sitometrik Boyama	33
3.6.2. Flow Sitometrik Analiz	33
3.7. TEM Takibi	33
4.BULGULAR	35
5.TARTIŞMA	67
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	75
KAYNAK DİZİNİ	78
ÖZGEÇMİŞ	87

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AB: Anilin Mavisi  
AOT: Acridine Orange Test  
COMET: Tek Hücreli Jel Elektroforezi  
DAB: Diamino Benzidine  
DCFH-DA: 2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat  
DFI: DNA fragmantasyon indeksi  
DNA: Deoksiribonükleik Asit  
ICSI: İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu  
IUI: İntra Uterin İnseminasyon  
IVF: In Vitro Fertilizasyon  
NT: In Situ Nick Translation Assay  
P1: Protamin 1  
P2: Protamin 2  
PAS: Periyodik-Asit Schiff  
PBS:Fosfat Tampon Solüsyonu  
pH: Power of Hydrogen  
PI: Propidyum Üyodür  
ROS: Reaktif Oksijen Türleri  
SCD: Sperm Kromatin Dağılımı  
SCSA: Sperm Kromatin Yapı Analizi  
SD: Standart Deviation  
SDF: Sperm DNA Fragmantasyonu  
TB: Toluidin Mavisi  
TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu  
TH1: Testise spesifik histon 1  
TH2B: Testise spesifik histon 2B  
Topo 2: DNA Topo İzomeraz 2  
TP1: Tranzisyonel Protein 1  
TP2 : Tranzisyonel Protein 2  
TUNEL: TdT-mediated dUTP Nick End Labeling  
WHO: Dünya Sağlık Örgütü  
YÜT: Yardımla Üreme Teknikleri

## ÇİZİMLER DİZİNİ

<b>Çizim 1.1.</b> Spermatozit Fazı (mayoz).....	2
<b>Çizim.1.2.</b> Spermatojeneze ait şematik çizim.....	4
<b>Çizim 1.3.</b> Kromatinin yeniden paketlenmesi.....	7
<b>Çizim 1.4.</b> Sperm yapısı.....	13
<b>Çizim 3.1.</b> Hasta grubu ve deneysel düzen .....	24
<b>Çizim 3.2.</b> Makler sayma kamarasına ait makroskopik ve mikroskopik görüntüler .....	25
<b>Çizim 3.3.</b> Asidik anilin mavisi ile boyanan sperm morfolojileri.....	27
<b>Çizim 3.4.</b> Density gradient yöntemine ait fotoğraflar.....	28
<b>Çizim 3.5.</b> Swim up yöntemine ait fotoğraflar.....	29
<b>Çizim 3.6.</b> Fertile® Plus mikro akışkan sperm çip sistemine ait görüntü.....	30
<b>Çizim 3.7.</b> ROS varlığında DCFH-DA'nın floresan özelliğe sahip DCF'ye dönüşümü...32	
<b>Çizim 4.1.</b> Semendeki sperm konsantrasyonu ile density gradient (G2), swim up (G3) ve mikro akışkan çip yöntemleri yıkama sonrası sperm konsantrasyonları arasındaki ilişki grafiği (örnek sayısı=20).....	36
<b>Çizim 4.2.</b> Gruplara ait a sınıfı hareketli sperm yüzde dağılımını gösteren grafik.....	38
<b>Çizim 4.3.</b> Gruplara ait b sınıfı hareketli sperm yüzde dağılımını gösteren grafik.....	39
<b>Çizim 4.4.</b> Gruplara ait a+b sınıfı hareketli sperm yüzde dağılımını gösteren grafik.....	40
<b>Çizim 4.5.</b> Gruplara ait normal morfolojili sperm yüzde dağılımını gösteren grafik.....	41
<b>Çizim 4.6.</b> Asidik Anilin Mavisi ile boyanma sonucu anormal kromatin kondensasyonuna sahip (siyah ok) sperm başları koyu mavi, normal kromatin kondensasyonuna sahip (kırmızı ok) sperm başları ise açık mavi görülmektedir. Semen (a), density gradient (b), swim up (c) ve mikro akışkan çip (d) yöntemlerine ait fotoğraflar.....	43
<b>Çizim 4.7.</b> Toluidin Mavisi ile boyanma sonucu anormal kromatin kondensasyonuna sahip (siyah ok) sperm başları koyu mavi ve mor, normal kromatin kondensasyonuna sahip (kırmızı ok) sperm başları ise açık mavi ve yeşil görülmektedir. Semen (a), density gradient (b), swim up (c) ve mikro akışkan çip (d) yöntemlerine ait fotoğraflar.....	44
<b>Çizim 4.8.</b> TUNEL yöntemi ile boyanan DNA fragmentasyonuna sahip (apoptotik)(siyah ok) sperm başları kahverengi, DNA fragmentasyonu (apoptotik) olmayan (kırmızı ok) sperm başları yeşil görülmektedir. Semen (a), density gradient (b), swim up (c) ve mikro akışkan çip (d) yöntemlerine ait fotoğraflar.....	45

<b>Çizim 4.9.</b> Gruplar ve normal morfolojili sperm yüzde ortalamaları±standart sapma arasındaki ilişki.....	46
<b>Çizim 4.10.</b> Gruplar ve toluidin mavisi ile + boyanan kromatin kondensasyon defektli sperm yüzde ortalamaları ± standart sapma arasındaki ilişki.....	46
<b>Çizim 4.11.</b> Gruplar ve asidik anilin mavisi ile + boyanan kromatin kondensasyon defektli sperm yüzde ortalamaları ± standart sapma arasındaki ilişki.....	47
<b>Çizim 4.12.</b> Gruplar ve TUNEL + boyanan DNA fragmentasyonuna sahip sperm yüzde ortalamaları ± standart sapma arasındaki ilişki.....	47
<b>Çizim 4.13.</b> Gruplara ait DCFH ve propidium iyodid ile boyanan spermelerde flow sitometrik ROS ölçüm değerleri.....	49
<b>Çizim 4.14.</b> Gruplar ve DCFH + boyanan hücre içi ROS yüksek olan sperm yüzde ortalamaları ± standart sapma arasındaki ilişki.....	50
<b>Çizim 4.15.</b> Semen grubuna ait elektron mikroskopik görüntü; kromatin içerisinde farklı derecelerde vakuolizasyon, amorf (kırmızı ok) ve yuvarlak (sarı ok) baş, akrozomal defektler (siyah ok), ayrıca orta parçada ve boyunda (yeşil ok) anormallikler (x5000).....	52
<b>Çizim 4.16.</b> Semen grubuna ait elektron mikroskopik görüntü; başta granüler kromatin (GK) ve vakuol (V) yapısı ve kuyrukta 9+2 mikrotübül yapısında eksiklik (mavi ok)(x5000).....	53
<b>Çizim 4.17.</b> Density gradient grubuna ait elektron mikroskopik görüntü; akrozomal (irregülasyon) düzensizlik ve kuyrukta 9+2 mikrotübül yapısında eksiklik(mavi ok)(x5000).....	54
<b>Çizim 4.18.</b> Kromatin kondensasyonu anormal, granüler kromatinli (GK) başa sahip, akrozomal düzensizliği ve genişlemeleri (ok) bulunan spermatozoon (x20000).....	55
<b>Çizim 4.19.</b> Granüler kromatin (GK) ve akrozomal düzensizliğe (ok) sahip spermatozoa (x20000).....	56
<b>Çizim 4.20.</b> Granüler kromatinli (GK), akrozomda düzensizlik ve yoğunluk azalmasına (mavi ok) sahip, stoplazmik dropletli (siyah ok) amorf başlı spermatozoon (x15000).....	57
<b>Çizim 4.21.</b> Apoptotik spermatozoon görüntüleri (x15000).....	58
<b>Çizim 4.22.</b> Swim up grubuna ait elektron mikroskopik görüntü; normal kromatin kondensasyonu ve akrozoma (kırmızı ok) sahip spermatozoa (x5000).....	59

<b>Çizim 4.23.</b> Akrozomal düzensizliğe ve normal kromatin kondensasyonuna sahip spermatozoon (x25000).....	60
<b>Çizim 4.24.</b> Akrozomda inklüzyon (ok) ve granüler kromatine (GK) sahip vakuollü (V) baş yapıları (x15000).....	61
<b>Çizim 4.25.</b> Normal kromatin kondensasyonu, normal boyun ve kuyruğa (kırmızı ok), aynı zamanda akrozomal düzensizliğe (siyah ok) sahip spermatozoon (x10000)..	62
<b>Çizim 4.26.</b> Mikro akışkan çip grubuna ait normal kromatin kondensasyonuna ve normal akrozoma sahip spermatozoon (x15000).....	63
<b>Çizim 4.27.</b> Akrozomal düzensizlik (ok) ve büyük vakuole (V) sahip spermatozoa (x15000).....	64
<b>Çizim 4.28.</b> Granüler kromatin(GK) ve vakuole sahip spermle birlikte 9+2 mikrotübül yapısında eksiklik (ok) (x15000).....	65

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.1.</b> WHO'e ait semen parametreleri ve referans değerler (2010).....	14
<b>Çizelge 1.2.</b> Farklı sperm seçim yöntemlerine ait avantaj ve dezavantajlar.....	18
<b>Çizelge 3.1.</b> 1980'den 2010'a WHO'e ait normozoosperm semen parametrelerindeki değişiklikler.....	26
<b>Çizelge 4.1.</b> Hastalara ait semen parametreleri ve değerleri.....	35
<b>Çizelge 4.2.</b> Tüm grupların konsantrasyona ait istatistiksel değerleri. ....	36
<b>Çizelge 4.3.</b> Tüm grupların hareketlilik yüzdelerine ait istatistiksel değerleri.....	37
<b>Çizelge 4.4.</b> Tüm grupların normal morfolojili sperm yüzdelerine ait istatistiksel değerleri.....	41
<b>Çizelge 4.5.</b> Tüm grupların Asidik Anilin Mavisini + boyanma yüzdelerine ait istatistiksel değerleri.....	42
<b>Çizelge 4.6.</b> Tüm grupların Toluidine Mavisini ile + boyanma yüzdelerine ait istatistiksel değerleri.....	43
<b>Çizelge 4.7.</b> Tüm grupların TUNEL ile + boyanma yüzdelerine ait istatistiksel değerleri.....	45
<b>Çizelge 4.8.</b> Tüm grupların DCFH ile pozitif boyanma yüzdelerine ait istatistiksel değerleri.....	48

## Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program,yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalandı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiğı gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiğı şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiğı şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiğı gibi verildi.

.../.../ 2015

Danışman

İmza



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumdan sperm üretim ve gelişim sürecidir. Spermlerin üretildiği bu süreçte kompleks bir seri olay gerçekleşmektedir. Puberteden kısa bir süre önce, hipofizer gonodotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisi ile başlar ve yaşam boyu devam eder. Spermatogenez üç ayrı faza ayrılmaktadır; spermatogonyal faz, spermatosit fazı (mayoz) ve spermatid fazı (spermiyogenez) (Ross 2014).

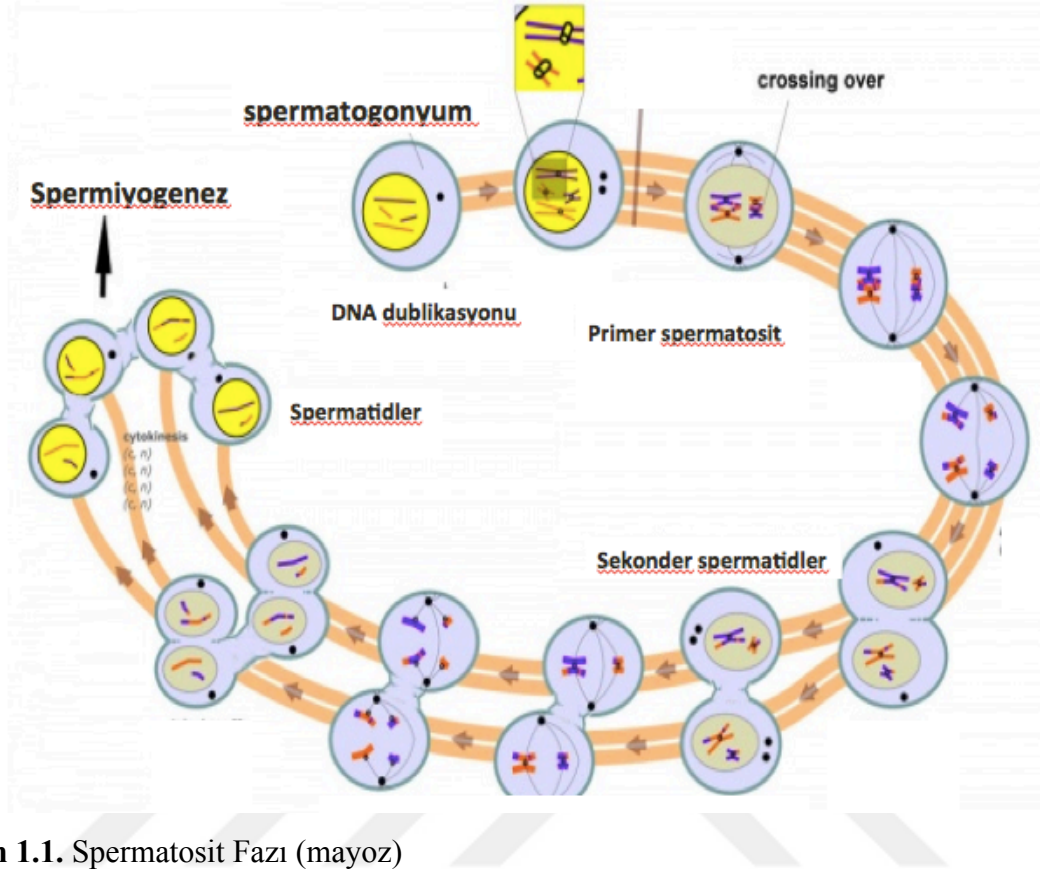
### 1.1.1. Spermatogonyal Faz

Spermatogonyum, testis dokusunda bazal lamina üzerinde yer alan, yaklaşık 12  $\mu$  çapındaki kök hücrelerdir. Bu hücreler mitoz ile bölünerek kendi yerlerine geçecek olan hücrelere ve primer spermatositlere farklılaşacak olan spermatogonyum topluluğunu oluştururlar (Ross 2014).

Seminifer tübül epitelinde yer alan sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bulunduğu bazal kompartmanda yerleşik 2 tip hücre mevcuttur; spermatogonyum A ve spermatogonyum B (Abraham 2006). Kök hücrelere kaynak oluşturacak şekilde çoğalan A tipi (koyu) spermatogonyumların bir kısmı, kök hücre topluluğunu terk ederek her biri daha iyi farklılaşmış A tipi (açık) spermatogonyum dizilerine kaynak oluştururlar. Bu A tipi (açık) spermatogonyumlarında son bölünmesinden sonra B tipi spermatogonyumlar meydana gelir. B tipi spermatogonyumların daha sonra mitoz bölünme geçirmeleri ile primer spermatosit meydana gelir. Primer spermatositler, spermatogenezin, mayoz fazının başlangıcını oluştururlar (Çizim 1.2) (Ross 2014).

### 1.1.2. Spermatosit Fazı (Mayoz):

B tipi spermatogonyumların mitotik bölünme geçirerek primer spermatositleri meydana getirirler. Primer spermatositlerin oluşumundan kısa bir süre sonra DNA replikasyonu gerçekleşir; böylece her spermatosit iki katı DNA (4c) ve normal sayıda kromozom (2n) içerir. Yaklaşık 22 gün süren Mayoz I ile DNA miktarı ve kromozom sayısı yarıya düşer. Birinci mayoz bölünme ile oluşan sekonder spermatosit haploid kromozom (n) ve 2c miktarda DNA içerir. Birinci mayozun profazında paternal ve maternal DNA'nın homolog kısımları birbiriyle karşı karşıya gelir ve kardeş olmayan kromatidler arasında krossing over başlar. Böylece genetik çeşitlilik sağlanmış olur (Abraham 2006). Sekonder spermatosit DNA sentezi olmadan ikinci mayotik bölünmenin profazına geçer. Metafazda kardeş kromatidler ayrılır ve bölünme tamamlandığında 1n kromozom ve 1c miktarda DNA içeren iki haploid spermatid oluşur (Çizim1.1)(Ross 2014).



**Çizim 1.1.** Spermatozoid Fazı (mayoz)

### 1.1.3. Spermatozoid Fazı (Spermiyogenez):

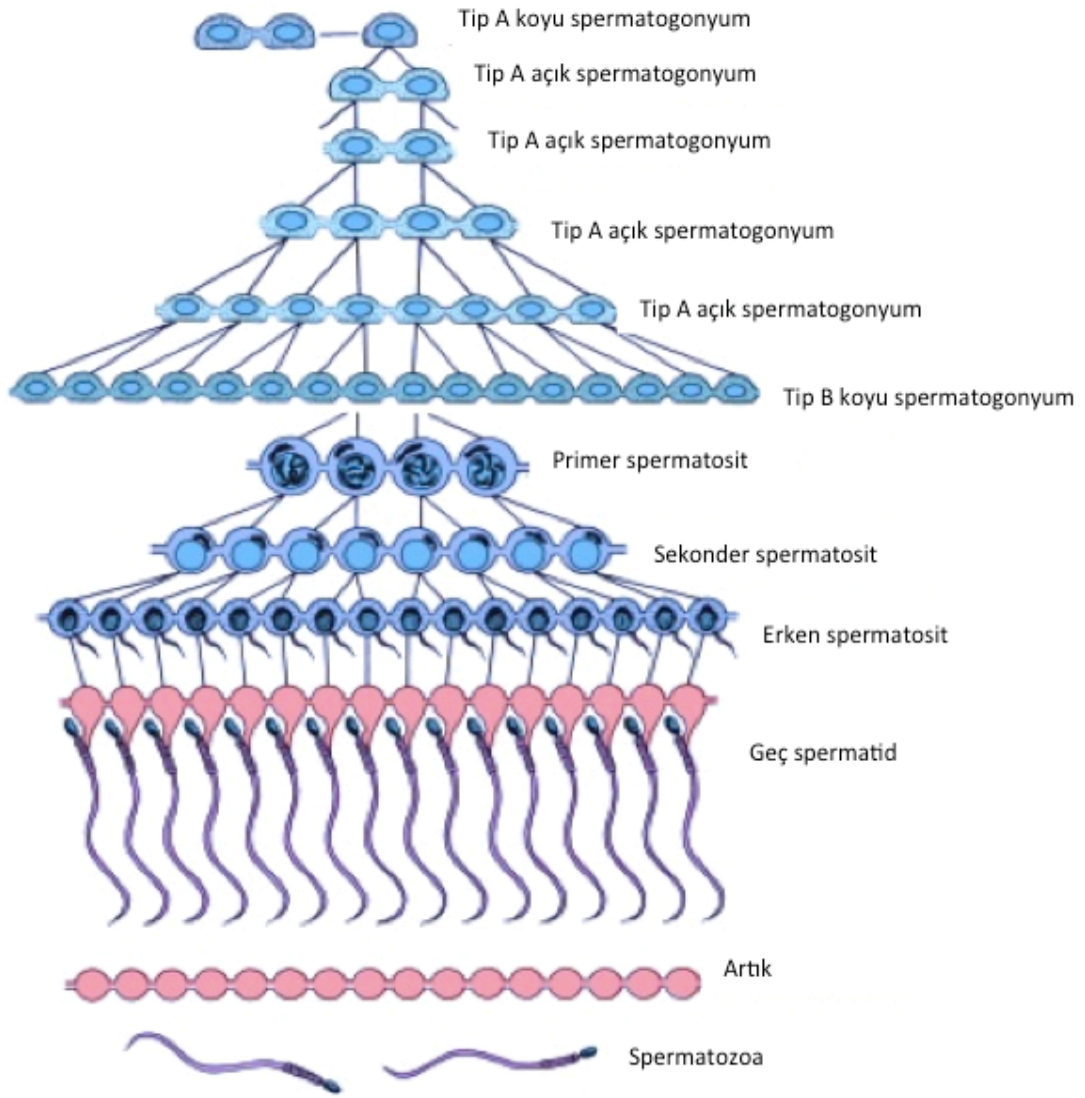
Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır. Spermatozoidler erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoaya dönüşmektedir. Bu aşamada hücre bölünmesi gerçekleşmez, yuvarlak spermatozoidler morfolojik değişime uğrar ve boyutları yaklaşık 7-8  $\mu$  çapında spermiumlara olgunlaşırlar (Menscher 2015) ve seminifer tübülüsün lümenine salgılanırlar. Spermiyogenezde ayrıca spermelerde kromatin yoğunlaşması gerçekleşir ve spermelerde yer alan somatik histonlar sperme özgü olan protamin proteinleri ile yer değiştirirler (Oko 1991). Spermiyogenez üç faza ayrılır:

**A. Golgi Fazı:** Spermatozoidlerin sitoplazmasında belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriyonlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve endoplazmik retikulum bulunur. Golgi kompleksinden gelişen küçük PAS+ proakrozomal granüller veziküller içinde birikir ve spermatozoidin çekirdeğinin önünde gelişen tek bir akrozomal vezikülü ve akrozomal kepi oluştururlar.

**B. Akrozom Fazı:** Akrozom fazında spermatozoidin kondanse olan (yoğunlaşan) nükleusu yassılaştır ve uzar. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarından

spermatidin arka kutbuna doğru uzanan silindirik bir kılıf olan manşeti oluştururlar. Flagellumun gelişimini önceden başlatmış olan sentriyoller, çekirdeğin arka yüzeyine taşınırlar. Daha sonra sentriyoller spermin boyun kısmını oluşturmak üzere modifiye olurlar. Çekirdeğe tutunan sentriyollerden 9 fibril yapısı gelişir ve kuyruğun içine doğru dış yoğun fibrilleri oluştururlar. Çekirdeğin flagellumla birleştiği proksimal ve distal sentriyolden oluşan bu bölgeye bağlantı parçası denmektedir (Ross 2014). Mitokondriyonlar da flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluştururlar. Bu bölge spermiyumların hareket etmesi için gerekli olan enerjinin bulunduğu yerdir (Oko 1991). Akrozom; hyalunoridaz, nöraminidaz, asit fosfotaz ve proteaz gibi hidrolitik enzimleri barındıran özelleşmiş bir lizozom gibi işlev görür. Spermatozoonlar bir oositle karşılaştığında akrozom dış zarı birçok bölgede plazma zarı ile kaynaşır ve akrozom enzimleri hücre dışına salınır. Bu olay akrozom reaksiyonu olarak bilinir ve döllenmenin ilk basamağıdır (Abraham 2006).

**C. Olgunlaşma Fazı:** Protaminler, spermatogenezin geç haploid fazında DNA'yı paketlenen histonlar ile yer değiştiren küçük, lizin ve arjininden zengin, çekirdek proteinleridir. Somatik histonlar protaminlerle yer değiştirdiğinde çekirdek kromatinlerinde yoğunlaşma gerçekleşir. Bu da spermin genomik DNA'sını sabitleyebilir ve korur. Somatik histonların protaminlerle yer değiştirmesinin ardından, nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilirler. Çekirdek uzar ve yoğunlaşır, manşet kaudal yönde göç eder. Olgunlaşma, çekirdek yoğunlaşır, manşet dağılmaya başladığında ve dış yoğun lifler tamamen organize olduğunda tamamlanır (Abraham 2006).



**Çizim 1.2.** Spermatogeneze ait şematik çizim, spermatogenik hücrelerin klonal doğasını göstermektedir (Dym M, Fawcett DW. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. Biol Reprod 1971; 4:195-215).

## 1.2. Epididimal Olgunlaşma

Kaput, korpus ve kauda kısımlarına ayrılan epididimis boyunca sperm olgunlaşması ve transportu gerçekleşmektedir.

Spermin korpustan kaudaya transportunun, epididimis duvarında yer alan düz kasların kontraksiyonuyla meydana gelen spontan dalgaların bir sonucu olduğu düşünülmektedir (Harper 1982). Epididimal transport boyunca, spermelerin protein kazanımı ve kompleks membran şekillenmesi gibi fonksiyonunun yeniden şekillendiği, düzenli olarak değişen bir çevreye maruziyeti söz konusudur (Cooper ve Yeung 2006). Epididim epitelinden bazı moleküller salgılanmakta ve bu moleküller sperm yüzeyinden absorbe edilmektedir, aynı zamanda yüzeyden absorbe edilmiş proteinlerin konumları değişmekte yada maskelenmektedir. Benzer özellikler edinilen olgunlaşma boyunca sperm ilerleyici hareket, yumurtayı fertilize etme ve yumurtaya bağlanma kabiliyeti kazanmaktadır (Bjorndahl ve diğ. 2005).

İnsanda bu süreç kemirgenlerle (10-31 gün) kıyaslandığında (2-6 gün) hızlı gerçekleşmektedir (Cornwall 2009).

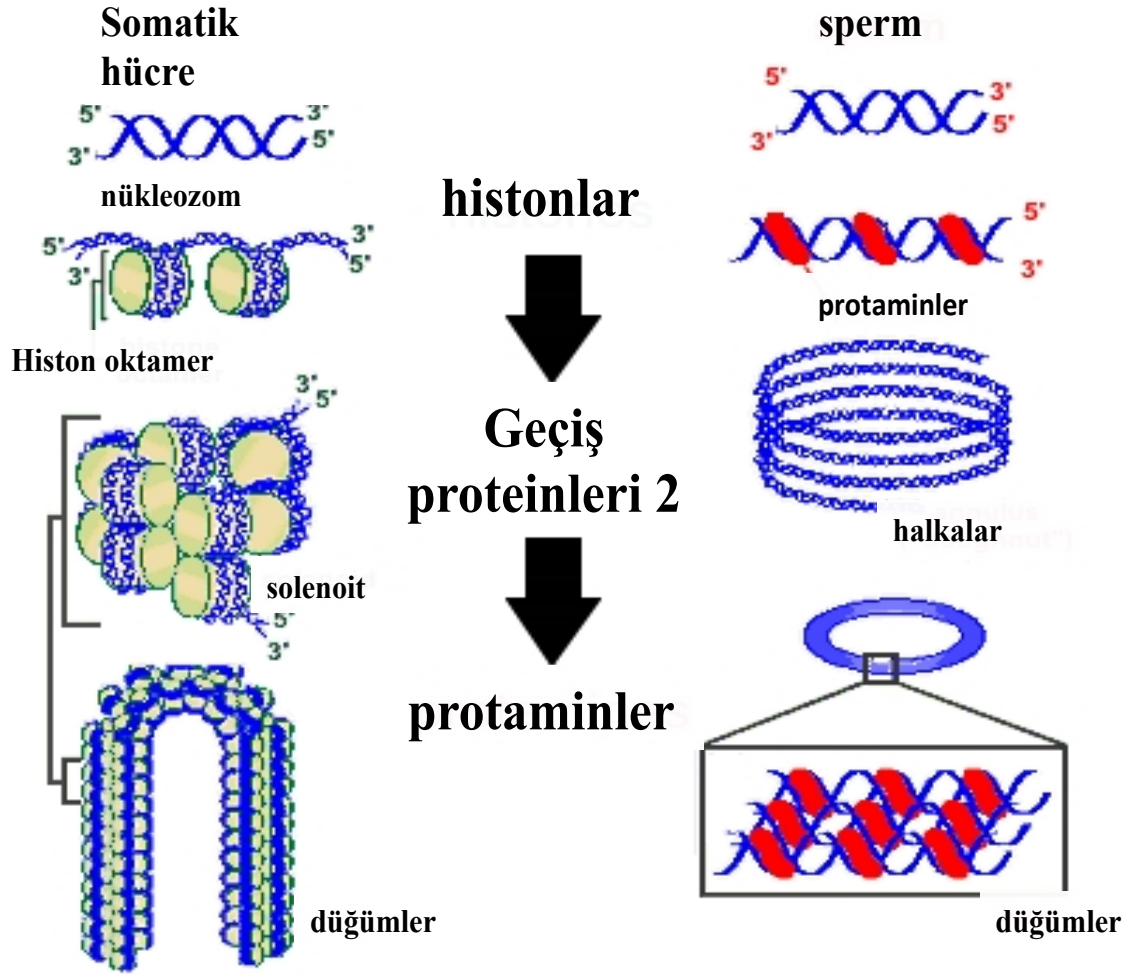
Çoğu memelide kauda kısmı ejakülasyona kadar spermin depolandığı bir bölüm olarak bulunmaktadır. Uzun süreli depolanması boyunca lokal sekretuar ürünlerle ilişkili ve düşük sıcaklığın bulunduğu androjen bağımlı çevrede bir takım faktörler spermi etkilemektedir (Bjorndahl ve diğ. 2005). Bütün bu değişikliklerde spermin fertilizasyon kapasitesinin bir göstergesidir.

### 1.2.1. Sperm Kromatin Kondensasyonu

Spermiyogenezde, histonların büyük bir bölümü protaminlerle düzenli bir şekilde yer değiştirmektedir. Protaminler, spermatogenezin geç haploid fazında DNA'yı paketleyen histonlar ile yer değiştiren küçük, arjininden zengin, çekirdek proteinleridir. Pozitif yüklü protaminler ile negatif yüklü DNA iskeleti arası kuvvetli etkileşim bağlanmayı kolaylaştırarak kromatin yoğunlaşmasına sebep olmaktadır (Çizim1.3) (Sakkas ve diğ. 1999). Spermiyogenez başlangıcında haploid spermatidler tipik bir nükleozomal kromatin yapısı gösterirler. Bu evrede bol miktarda nonribozomal RNA transkripsiyon aktiviteleri vardır. Ancak spermiyogenezin ileri ki safhalarında klasik nükleozom yapısı nedeniyle var olan boncuk dizilimi şeklindeki kromatin yapısı yerini düz kromatin liflerine bırakır. Bu yapı yan yana iplikcikler tarzında toplanır ve artık transkripsiyon yapmazlar (Torok 1985). Spermatogenez sırasında kromozomal proteinler üzerinde yapılan çalışmalar spermatosit ve erken evre spermatid kromatinlerinin somatik histonlar ve testise spesifik histon 1 (TH1) ve testise spesifik histon 2B (TH2B) ile sarılı olduğunu ancak ileri evre

spermatidlerde geçiş proteini 1 (TP1) ve geçiş protein 2 (TP2) geçiş proteinlerinin, daha ileri evrede ise P1 ve P2 (protaminler) proteinlerinin yer aldığını göstermiştir (O'Donovan ve diğ. 1993). Sonuç olarak protaminlerin ilavesi ile oldukça yoğun, çözünmeyen ve stabil kromatin serileri oluşmaktadır. Kondensasyonu tamamlanmış sperm kromatini, erkek ve dişi üreme sistemleri arasında babaya ait genomun taşınması sırasında genetik bütünlüğü korumaktadır (Agarwal ve diğ. 2003).

Başarılı bir fertilizasyon için sperm hücresinde yer alan histon proteinlerinin protaminlerle yer değıştirmesi ve ileri derecede paketlenmesi gerekmektedir. Ayrıca bu olay spermin progresif (ilerleyici) hareketi için gereken çekirdek şekillenmesini kolaylaştırırken, sperm genomunu oksitlenmekten ve dişi üreme sistemi içerisindeki zararlı moleküllerden de korumaktadır (Yamauchi ve diğ. 2011). Ayrıca spermin yapısındaki protaminler oositin mayozu tamamlaması ve başarılı bir fertilizasyon için gereklidir. Fertilizasyon sırasında, olgun sperm genomuna ait protaminler ile metafaz II'de baskılanmış oosit genomundaki histonlar yer değıştirirler. Böylece oosit metafaz II'yi tamamlar ve polar body atılır (Oliva 2006, Santos ve diğ. 2002). Protamin seviyesindeki herhangi bir anormallik sperm DNA'sında hasara ve fertilizasyonun etkilenmesine neden olabilir (Ollero ve diğ. 2001).



**Çizim 1.3. Kromatinin yeniden paketlenmesi:** somatik hücrelerde ki solenoit döngüden (solda), spermde görülen halka döngüye doğru kromatinin yeniden paketlenme modeli (Nat Gen 28: 10-12'den modifiye edilmiştir ).

### 1.2.2. Sperm DNA Hasarı Mekanizması

Spermlerde farklı kromatin anomalileri bulunmaktadır;

1) Tek sarmal yada çift sarmal DNA formundaki sperm DNA'sının fiziksel bütünlüğündeki zedelenmeleri.

2) Histon protamin değişimine ve DNA yoğunlaşmasına etki edebilecek çekirdek protein bozuklukları.

3) Değişmiş kromatin yapılanmasına sebep olan yapısal kromatin anomalileri.

Çevresel etkenler, gen mutasyonları ve kromozom anomalileri, spermatogenez boyunca meydana gelen fertilité ile ilgili anormal kromatine yol açabilen tüm biyokimyasal olayları etkileyebilmektedir (Evenson ve diğ. 2002). Sperm DNA hasarı önemli ölçüde oosit tarafından tamir edilebilse de (Genesca ve diğ. 1992) bu hasar büyük olduğunda, oosit normal gelişimi sağlamak için yeterli tamir kapasitesine sahip olmayabilir.

Sperm DNA parçalanması ve/veya bozulmuş kromatin bütünlüğü ile ilişkili bulunmuş çok çeşitli çevresel faktör vardır. Bu nedenler arasında; sigara içme (Potts ve diğ. 1999), ışın (Arnon ve diğ. 2001), kemoterapi (Chatterjee ve diğ. 2000, Morris 2002) lökositospermi (Alvarez ve diğ. 2002, Erenpreiss ve diğ. 2002, Saleh ve diğ. 2003) varikozel ve kanser (Kobayashi ve diğ. 2001) bulunmaktadır. Sperm dondurma tekniği gibi uygulamadan kaynaklanan sebepler bile sperm DNA hasarı ile ilişkilendirilmiştir (Donnelly ve diğ. 2001, Larson-Cook ve diğ. 2003). Bu gibi durumların yol açtığı sperm DNA hasarlarının veya kromatin anomalilerinin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Günümüzde 3 ana sebepten dolayı olduğu düşünülmektedir;

1-Kromatin paketlenmesinde oluşan anomaliler

2- Reaktif oksijen türleri

3- Apoptoz

#### 1. *Kromatin Paketlenmesinde Oluşan Anomaliler:*

Daha önce bahsedildiği gibi spermatogenez boyunca sperm kromatinleri, histonların protaminlerle yer değiştirdiği ve oldukça önemli bir basamak olan yeniden şekillenmeye girerler. Kromatinin yeniden şekillenmesi DNA topoizomeraz 2 enzimi (topo 2) ile ve histon hiperasetilasyonu sonucu kromatinin gevşeyip açılmasıyla koordinasyonlu bir şekilde gerçekleşmektedir. Sperm DNA'sında ortaya çıkan döngüsel stresi azaltmak için kromatinin gevşeyip açılması ile geçici DNA kırıkları oluşmaktadır (McPherson ve diğ. 1993). Normalde oluşan DNA kırıkları spermatogenez ve ejakülasyon tamamlanmadan topo 2 tarafından tamir edilmektedir. Ancak kırıklar tamir edilmezse



ejakülattaki spermelerde DNA fragmentasyonları görülebilmektedir (Muratori ve diğ. 2006).

## **2. Reaktif Oksijen Türleri :**

Yüksek seviyedeki reaktif oksijen türleri (ROS) sperm DNA hasarı ile ilişkilendirilmektedir (Barroso ve diğ. 2000). Düşük seviyelerdeki ROS, sperm olgunlaşması, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu gibi fonksiyonların gerçekleşmesinde önemli bir yere sahiptir (Lamirande ve diğ. 1999). Seminal plazma sperm DNA'sını korumada yardımcı olan antioksidanları içermektedir (Twiggg ve diğ. 1998). Ancak seminal plazmada ve erkek üreme sisteminde antioksidan kapasiteyi aşan miktarda ROS ürettiğinde, hücre ve DNA hasarı ortaya çıkmaktadır (Aitken ve diğ. 2001, Lamirande ve diğ. 1999, Alvarez ve diğ. 2002, Erenpreiss ve diğ. 2002, Fischer ve diğ. 2003). DNA fragmentasyonu ile ROS arasında pozitif bir korelasyon olduğu söylenmektedir (Barosso ve diğ. 2000). İnfertil erkeklerin semenleri incelendiğinde, bu bireylerin yaklaşık %25'inde yüksek seviyelerde ROS tespit edilmektedir (Zini ve diğ. 1993). Semendeki ROS'un kaynağı lökositler, immatür ve anormal başlı spermelerdir (Ollero ve diğ. 2001, Aitken ve diğ. 1992).

## **3. Apoptoz:**

Apoptozun yeterli olmaması sonucunda sperm DNA hasarı ortaya çıkabilmektedir. Apoptoz tüm vücutta görülen programlı hücre ölümü sürecidir. Apoptoz testislerde germ hücrelerinin fazla üretimini engellemek ve zarar görmüş germ hücrelerini ortadan kaldırmak için gerçekleşen normal bir süreçtir (Sinha ve diğ. 1999). Sertoli hücreleri sınırlı bir sayıda germ hücrelerini destekleyebilmektedir. Bu nedenle germ hücrelerini sınırlı bir sayıya indirgemek gerekmektedir (Rodriguez ve diğ. 1997). Bu apoptotik yolağın sertoli hücreleri tarafından salgılanan Fas ligand (FasL) ile germ hücrelerinin yüzeyinde bulunan Fas proteininin etkileşimi ile başladığı öne sürülmektedir (Lee ve diğ. 1997). Ancak, son zamanlarda yapılan çalışmalarda FasL defekti olan farelerin germ hücrelerinde de apoptoz görülmesi durumunun her zaman böyle olmadığını göstermektedir (Hikim ve diğ. 2003). Kötü seminal parametreleri olan hastalarda, sıklıkla semendeki spermelerin Fas ekspresyonunun yüksek yüzdelerde olduğu gösterilmiştir (Sakkas ve diğ. 1999). Bu durum DNA hasarı olan ve Fas ekspresyonu gösteren spermelerin apoptoz başladığı halde apoptotik yolağın tamamlanmadığı için 'başarısız apoptoz' geçirdikleri fikrinin oluşmasına yol açmıştır (Sakkas ve diğ. 2003). Bazı çalışmalar DNA hasarı, Fas ekspresyonu ve apoptozun diğer belirteçleri arasında bir ilişki olmadığını gösterdiğinden bu teori tartışmalıdır (McVicar ve diğ. 2004, Oliva ve diğ. 2006). İlginç bir şekilde, son zamanlarda

fonksiyonel kayıpların araştırıldığı çalışmalar, DNA hasarının spermatogenez boyunca kontrol edildiğini, bu kontrol mekanizmasının mismatch tamir genleri ve p53 geni ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Paul ve diğ. 2007).

### **1.2.3.Sperm DNA Bütünlüğünü Belirleyen Testler**

Sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmek için giderek artan sayıda bir çok test geliştirilmiştir. Sperm DNA bütünlüğünü belirlemede kullanılan bu testlerin mekanizmaları birbirinden farklılık göstermektedir. Bu testlerden bazıları sperm kromatin anomalilerini bazıları ise direk olarak DNA ipliğindeki kırılmaları ölçmektedir.

#### ***Sperm Kromatin Yapı Analizi (SCSA):***

SCSA ilk olarak 25 yıl önce tanımlanmıştır (Evenson ve diğ. 1980). Bu tahlilin temeli kromatin anomalisi olan sperm kromatinlerinin asid ve sıcaklık denatürasyonuna daha yatkın olması durumuna dayanmaktadır (Darzynkiewicz ve diğ. 1975, Rilger ve diğ. 1969). Akridin Orange'ın metakromatik özelliğini kullanarak SCSA sperm DNA'sının asid kaynaklı denatürasyonunun duyarlılığını ölçmektedir. Flow sitometri kullanılarak hücrelerin asitle muamele edilmesi sonucu Akridin Orange'ın metakromatik özelliğinden kaynaklanan yeşilden kırmızıya renk geçişi ile birlikte DNA denatürasyonunun derecesi belirlenebilmektedir (Darzynkiewicz ve diğ. 1975, Evenson ve diğ. 1980). SCSA kullanılarak elde edilen parametreler çalışmalarda bir DNA denatürasyon ölçüsü olan DNA fragmantasyon göstergesi olarak belirtilmektedir.

#### ***Akridin Orange Testi (AO):***

Akridin Orange'ın yeşilden kırmızıya renk geçişiyle metakromatik özelliği kullanılarak DNA denatürasyon duyarlılığının ölçümesidir. Bu özelliği ile SCSA ile benzerlik göstermektedir. Ancak bu yöntem SCSA'dan daha basit ve daha ucuzdur. Çünkü doğrudan floresan mikroskopuyla gözlem yapılabilir. SCSA gibi flow sitometri kullanılmasına ve özel SCSA tekniklerine ihtiyaç duyulmamaktadır (Tejada ve diğ. 1984). Ancak renklerin belirsiz olması, çabuk solma, heterojen boyanma gibi bir takım olumsuzluklar mikroskop ile inceleme sırasında zorluklara yol açabilmektedir (Chohan ve diğ. 2006).

#### ***Toluidin Mavisi (TB):***

Toluidin mavisi sperm kromatin bütünlüğünü belirlemede kullanılan temel boyalardan biridir. Gevşek paketlenmiş kromatinli veya bozuk DNA'lı spermin artık fosfatları toluidin mavisi gibi temel boyalarla boyanmaya daha yatkındır. Bu yüzden, ışık mikroskopundaki incelemelerde görülen boyanmamış ya da açık renkli spermler normal

kromatin kondensasyonuna sahip olarak değerlendirilirken mavi, mor boyananlar hasar görmüş, kromatin kondensasyon defektli spermiler olarak değerlendirilmektedir.

***Anilin Mavisini (AB):***

Sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmede kullanılan asidik boyalardan biridir. DNA'sı hasar görmüş spermiler genellikle histon proteinlerinin kalıntılarını içerirler. Bu kalıntılar DNA paketlerinin daha gevşek olmasına yol açmaktadır. Gevşeyen kromatin paketleri, nükleoprotein gruplarına ulaşımı artırarak DNA'yı anilin mavisini gibi asidik boya ile boyanmaya eğilimli bir hale getirmektedir (Auger ve diğ. 1990, Dadoune ve diğ. 1988).

***TUNEL:***

TUNEL sperm DNA kırılma miktarını direkt olarak göstermede kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde deoxyuridine triphosphate (dUTP), Tdt enziminin katalizörlüğü eşliğinde tek iplikli ve çift iplikli DNA kırıklarına birleştirilmektedir (Gorczyca ve diğ. 1993). dUTP ile birleştirilmiş DNA kırıkları işaretlenerek ışık mikroskobu, floresan mikroskobu veya flow sitometri ile gözlenip ölçülebilmektedir. Daha sonra spermiler TUNEL pozitif ve TUNEL negatif olmak üzere gruplandırılarak toplam sperm popülasyonuna göre yüzdeleri belirlenir.

***In Situ Nick Translasyon Analizi (NT):***

NT analizi TUNEL analizine benzer olarak DNA kırıklarındaki dUTP birleşmelerini hesaplamaktadır. Ancak TUNEL'de yer alan hem çift hem tek iplikli DNA kırıklarının analizinden farklı olarak NT analizinde sadece tek iplikli DNA kırıkları DNA polimeraz enzimi ile belirlenmektedir. Diğer analiz yöntemleri ile karşılaştırıldığında basit bir test olmasına karşın hassasiyeti daha azdır (Tigg ve diğ. 1998).

***Tek Hücre Jel Elektroferez Analizi (COMET):***

Tek hücre jel elektroferez (Comet) analizi sperm DNA kırıklarını doğrudan değerlendiren farklı bir testtir (Haines ve diğ. 1998). Kromatin yapısı çözünmüş sperm agaroz jelde süspansiyon edilerek elektroforetik bir yoğunluğa maruz bırakılmakta daha sonra DNA bağlayan floresan bir boya ile boyanmakta ve görüntülenmektedir. Düşük moleküler ağırlıklı DNA, hem tek iplikli hemde çift iplikli DNA'nın kısa parçaları, elektroferez boyunca karakteristik 'comet' kuyruğu şeklinde birikmektedir. Yüksek moleküler ağırlıktaki DNA segmentleri ise birikmemekte ve comet'in baş kısmında bulunmaktadır. Görüntüleme ile kuyruk uzunluğu ve floresan yoğunluğu olarak ölçülmekte ve DNA kırıkları fazla olan spermilerde bu ölçüm yüksek olmaktadır (Klaude ve diğ. 1996).

### 1.3. Sperm Yapısı

Son derece özelleşmiş olan sperm hücresi, baş ve kuyruk kısmı olmak üzere iki ana kısma ayrılmıştır. Sperm hücresinin baş kısmı akrozom, çekirdek, sitoplazma ve sitoskeletal yapıları içerir (Sutovsky ve Manandhar 2006).

Oositin zona pellusidasiyla sperm etkileşiminde rol alan akrozomun içerdiği proteazlar ve reseptörler akrozom ekzositozunun başlangıcına kadar inaktif kalırlar. İç ve dış akrozomal membranlar sıkı akrozom matriksinin etrafında yapısal desteklik sağlarlar. İç membran olduğu gibi kalırken, dış membran akrozomal eksositoz sürecinde kaybolur. Ekvatorial bölgede (akrozomun posterioru), spermin, yumurta hücre zarına ilk bağlanma aşamasında rol oynayan reseptörleri içerdiği bildirilmiştir (Oko ve Stovsky, 2009).

Spermin post akrozomal baş kısmının, oosit aktivasyonu ve zigot gelişiminin başlangıcıyla ilişkili sinyal proteinlerini eksprese ettiğine inanılmaktadır (Sutovsky ve diğ. 2003).

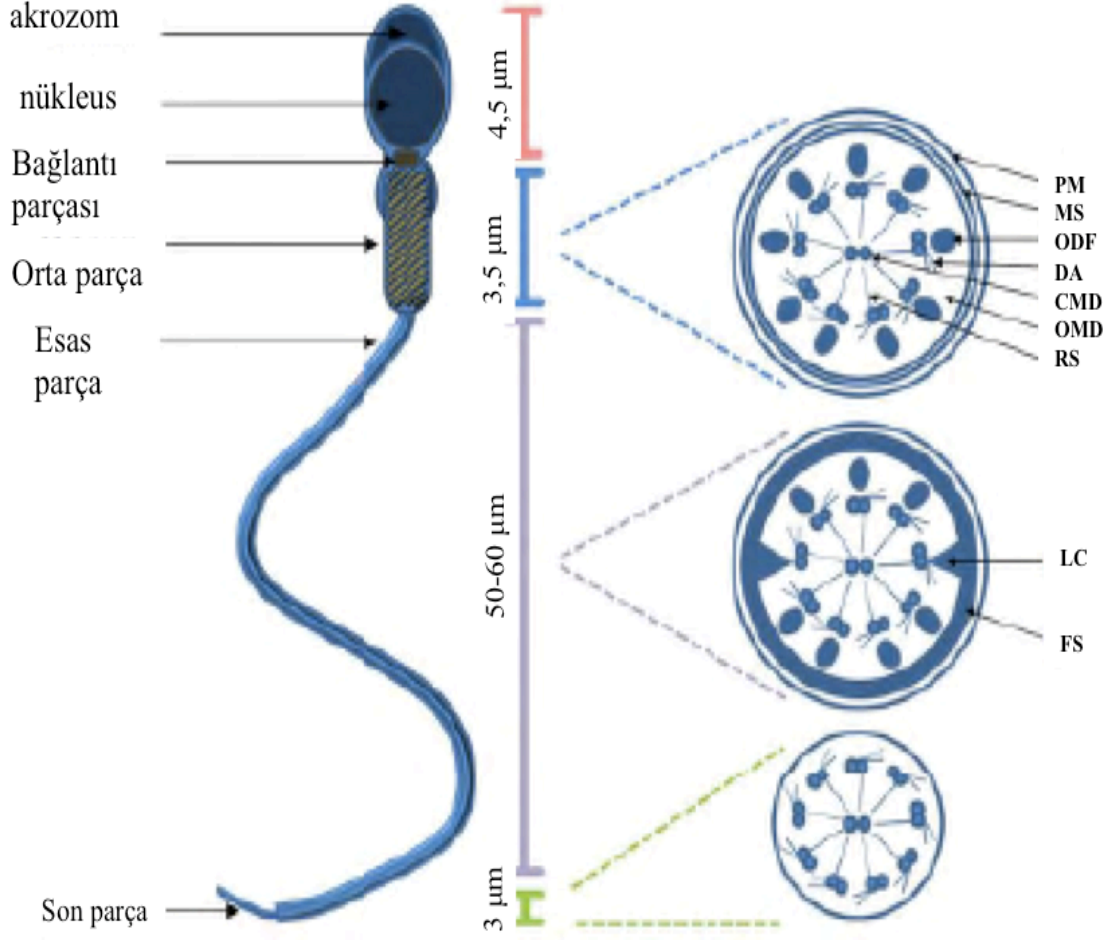
Flagellum, dynein kollarıyla birbirine bağlı simetrik düzenlenimdeki mikrotübül çiftlerini ve merkezi tübül çiftini içermektedir. Sperm aksonemini 9+2 mikrotübül formu oluşturmaktadır (Turner 2006). Kuyruk ince yapısı proksimalden distale doğru; bağlantı parçası, orta parça, esas parça ve son parça olarak 4 kısma ayrılmaktadır (Çizim 1.4)(Fawcett 1975).

Bağlantı parçası kuyruk ve baş kısmını bağlar ve kuyruk boyunca devam eder.

Orta parçada mitokondriyonlar sarmal bir şekilde yer alır. Sperm metabolizması için gerekli olan enerji bu bölgeden sağlanmaktadır.

Esas parça fibröz kılıfın iki longitudinal sütunu ile çevrilidir. Fibröz kılıf esas parçaya özeldir ve dış yoğun fibrillere ek destek sağlar.

Son parça kuyruğun terminal kısmını oluşturur ve sadece hücre zarı ile çevrili axonemal çiftleri içerir (Turner 2006).



**Çizim 1.4.** Sperm yapısı.

**PM**, Plazma membrane; **MS**, Mitekondriyal kılıf; **ODF**, Dış yoğun fibriller; **DA**, Dynein kolları; **CMD**, Merkez mikrotübül çiftleri; **RS**, radial çubuklar; **LC**, longitudinal sütunlar; **FS**, Fibröz kılıf. Şekil Turner (2006)'dan uyarlanmıştır.

#### 1.4. Erkek İnfertilitesi

1978'de elde edilen ilk başarılı in vitro fertilizasyon (IVF) uygulamasından beri, IVF infertilite için etkili bir yöntem haline gelmiştir (Edwards ve diğ. 1980). Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 2013) infertiliteyi, iki yıl süre ile düzenli korunmasız cinsel ilişki sonrası çocuk sahibi olamama olarak tanımlar. Günümüzde, erkek faktörü infertilitenin ana nedenlerinden biridir. Erkek kısırlığının başlıca nedenlerini; varikosel (%25), genital kanal tıkanıklığı (%15), testis yetmezliği (%15), kriptorşidizm (%14), idiyopatik (%12), genetik durumlar (%8), enfeksiyonlar (%3), ejakülasyon disfonksiyon (%3), hormonal fonksiyon bozukluğu (%2), immünolojik koşullar (%2), kanser (%0.5) ve sistemik hastalıklar (%0.5) oluşturmaktadır (Esteves ve diğ. 2011). Erkek üreme potansiyelini teşhis etmek için tanıya yardımcı bir çok method mevcut olmasına rağmen bunlar kısıtlı kalmaktadır. En yaygın olarak kullanılan WHO'ne ait konvansiyonel semen analiz değerleri Çizelge 1.1'de verilmiştir. Bu bilgiler in vivo koşullarda erkek partnerin baba olabilirliğinin klinik olarak anlaşılabilmesine yardımcı olmaktadır (Silber ve diğ. 1989). Semen parametreleri, örneğin sperm morfolojisi, spermin penetrasyon yeteneği ve embriyo gelişimi hakkında bilgi sağlasa da infertilite için mutlak bir gösterge oluşturmamaktadır (Barratt ve diğ. 1995, Barros ve diğ. 1983, Maettner ve diğ. 2013).

**Çizelge 1.1.** WHO'e ait semen parametreleri ve referans değerler (2010).

<b>Parametreler</b>	<b>Referans değerler</b>
Semen hacmi (mL)	≥ 1,5
Toplam sperm sayısı (milyon)	≥ 39
Sperm konsantrasyonu ( milyon/mL)	≥ 15
Toplam hareketlilik (%)	≥ 40
İleri hareketlilik (%)	≥ 32
Canlılık (canlı spermler, %)	≥ 58
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	≥ 4
pH	≥ 7,2
Peroksidaz pozitif lökositler (milyon/mL)	< 1.0

Tüm infertil çiftlerin yaklaşık yarısında erkek faktörü bulunmaktadır. Seminal hacim, pH, sperm sayısı, sperm hareketi ve morfolojisini kapsayan rutin semen analizleri erkek faktör değerlendirmesi için hala değerli bir yöntemdir. Ancak erkek infertilitesine sahip hastaların yaklaşık % 15'i normal semen analizine sahiptir (Agarwal ve diğ. 2005) ve bu durum göstermektedir ki rutin semen analizi (Centola ve diğ. 1996) sonucu ile erkek infertilitesi ile ilgili kesin bir tanı yapılamayabilir. Geçtiğimiz on yıl içinde erkek faktör infertilitesinde sperm DNA bütünlüğünün rolünü araştıran çalışmaların oranı artmıştır ve rutin semen analizlerine göre sperm DNA bütünlüğünün erkek faktör infertilitesinin daha iyi bir belirleyicisi olabileceği ileri sürülmüştür. Fertil erkeklere göre infertil erkeklerin spermelerinde daha yüksek oranda DNA hasarı mevcuttur ve bu DNA hasarının fertilizasyon potansiyeli üzerinde olumsuz etkisi bulunmaktadır (Evenson ve diğ. 1999, Guzick ve diğ. 2001, Kodama ve diğ. 1997). Yüksek oranda sperm DNA hasarı ile azalmış sayı, hareketlilik veya normal morfoloji gibi zayıf seminal parametreler genellikle koreledir (Irvine ve diğ. 2000, Lopes ve diğ. 1998). Ayrıca normal semen parametrelerine sahip erkeklerin %8'in de sperm DNA hasarı bulunduğu bildirilmektedir (Zini ve diğ. 2001).

Erkek subfertilitesi için ana seçenek yardımıyla üreme teknikleri (YÜT); intra uterin inseminasyon (IUI), in vitro fertilizasyon (IVF) ve intra stoplazmik sperm enjeksiyonunu (ICSI) içerir. Semen kalitesine ve klinik tabloya göre hastalar IUI, IVF veya ICSI'ye yönlendirirler.

Günümüzde kaliteli sperm seçimi için sıkı kurallar bulunmamakta ve genellikle her klinik, semen özellikleri için kendine özel kriterler belirlemektedir (Jones ve diğ. 2012). Spermatozoa kalitesi IVF'in başarısını belirlemede önemli bir faktördür (Aitken ve diğ. 1984; Donnelly ve diğ. 1998, Evenson ve diğ. 2007, Lewis ve diğ. 2005). Ancak embriyo gelişimini etkileyebilen paternal faktörlerle ilgili bilgiyi basit semen analizleri her zaman sağlayamaz (Tesarik ve diğ. 2002). Konvansiyonel semen parametreleri (hacim, sperm sayısı, hareket veya morfoloji) in vitro blastosist oranını veya fertilizasyonu belirleyememektedir (Benchaib ve diğ. 2003, Seli ve Saklas 2005). Aynı zamanda, sperm DNA bütünlüğü veya kromozomal anomaliler semen analizleri ile rutinde çalışılmamakta fakat erkek infertilitesinin tedavisi ve tanısı için oldukça önem taşımaktadır. Kromatin defekti, DNA hasarı, anöploidi, mikrolezyonlar ve mutasyonlar gibi genetik faktörlerle paternal etki ilişkili olabilir (Seli ve Sakkas 2005) Bunun yanı sıra, DNA hasarı yüksek seviyede olan spermatozoa ile oosit fertilize olabilmekte, etkilenmiş embriyo gelişimi

gerçekleşebilmektedir (Avendano ve diğ. 2010). 2004'de Virro ve arkadaşları, erkeklerde DNA fragmentasyon indeksi (DFI >%30) yüksek seviyede olan çiftlerin, düşük blastosist ve gebelik (<%30) oranı ile düşük sayısında artışın olduğunu bildirmiştir.

Embriyo gelişiminin 3. gününden önce paternal genoma ait DNA hasarı belirgin değildir. Bu da DNA fragmentasyon ve fertilizasyon oranı arasındaki korelasyon yokluğuna karşılık gelmektedir (Larson-Cook ve diğ. 2003). Fakat embriyo gelişiminin 3. gününden sonra paternal genom etkinliği kendini göstermektedir ve spermde yüksek oranda DNA fragmentasyonu söz konusu ise bu durum, gebelik ve blastosist oranlarında önemli bir azalmaya sebep olabilir (Muriel ve diğ. 2006, Virro ve diğ. 2004).

### **1.5. Sperm Seçim Yöntemleri**

Semen içeriği; seminal plazma, hücre artıkları, epitel ve lökositleri kapsamaktadır. Spermatozoa toplam semen hacminin yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Seminal plazma, hücre artıkları ve lökositler gibi semen içerikleri spermatozoaya sadece enerji sağlamazlar, vajinanın asidik çevresinden spermatozoayı korurlar. Fakat spermin semen içerisinde uzun süre bekletilmesi spermin fertilizasyon kabiliyetini olumsuz olarak etkiler (Aitken ve diğ. 1989, Kanwar ve diğ. 1979). Ayrıca yıkama işlemi uygulanmayan semenin IVF programının tümünü tehlikeye atabilecek önemli bir kontaminasyon kaynağı olabileceği bilinmektedir (Zarutskie ve diğ. 1992). Bu nedenle seçilmiş, işlem yapılarak yıkanmış semen ART (yardımla üreme teknikleri) için esansiyel bir basamaktır.

Bu prosedür en motil sperm fraksiyonunun dekapasitasyon faktörleri içeren seminal plazmadan ayrılmasını sağlar; aynı zamanda lökositleri, hücre artıklarını ve kontaminasyon yaparak spermin fertilizasyon kabiliyetini olumsuz etkileyen bakterilerin izole olmalarını sağlar (Chang 1957).

Farklı sperm seçim yöntemleri olmasına rağmen, dişi üreme sistemi içinde fizyolojik sperm seçim süreçleri hakkında bilginiz hala kısıtlı kalmaktadır. Bu seçimin özel sperm karakteristikleri üzerine mi dayalı veya rastgele olarak mı gerçekleştiği hala tartışmalıdır. Cohen ve McNaughtan (1974) tavşanların dişi genital kanalında fertilizasyon için sperm seçimini araştırmışlardır. Tavşan uterusundan toplanan spermler, yıkama uygulanan spermler ve farklı genotipli ejaküle spermlerle karşılaştırılmak için ikinci kez uterus içine insemine edilmiştir. Dişi genital kanalının üst kısmından elde edilen spermlerin daha çok dölleme yeteneğine sahip olduğu görülmüştür. Dişi genital kanalın fonksiyonlarından biride dölleme için sperm seçimidir. Bu umut verici sonuçlar doğrultusunda benzer çalışmalar etik sebepler ve teknik kısıtlılıklardan dolayı insanlarla yapılamamıştır.



Çoğu sperm izolasyon tekniklerinde asıl gereklilik spermin hareketli olmasıdır. Sperm hareketi ile ilgili bilgi önemlidir fakat fertilizasyon ve gebeliği belirlemek için yeterli değildir (Takeda ve diğ. 2012). Diğer sperm izolasyon metodları örneğin elektroforetik filtrasyon sistemi ve density gradient yöntemi (DGC) gibi sperm şarjına veya yoğunluğuna dayalıdır ve fizyolojik değildir. Buna rağmen bu iki metodlarda elde edilen spermlemlerle gebelik elde edilebilmektedir. Fakat şarj, yoğunluk ve fertilizasyon kapasitesi arasındaki ilişki net değildir. Ayrıca kapsamlı çalışmalarda fertilizasyon ve gebelik oranları için önemli olan diğer sperm parametreleri değerlendirildiğinde ise eğrisel, düz çizgisel hız ve IVF başarı oranları arasında önemli korelasyon olduğu bildirilmektedir. Rutin sperm hazırlama tekniklerinde (DGC ve swim up) gözardı edilen, apoptoz, DNA bütünlüğü, membran gelişimi ve ultrastrüktürel yapı gibi önemli sperm parametreleri mevcuttur. Bununla beraber bu özellikler üzerine yapılan araştırmalarda bunların sperm hazırlama tekniklerinden olumsuz etkilenebildiği ve böylece IVF'in başarısını azalttığı bildirilmektedir (Shibahara ve diğ. 2004).

Eğer dişi üreme sistemindeki fizyolojik sperm seçim süreçleri in vitro olarak çoğaltılabilirse, yardımla üreme tekniklerinde kullanılan spermlemlerin kalitesi de potansiyel olarak artabilir.

**Çizelge 1.2.** Farklı sperm seçim yöntemlerine ait avantaj ve dezavantajlar

<b>Sperm seçim yöntemleri</b>	<b>Avantajlar</b>	<b>Dezavantajlar</b>
Swim up	Temiz hareketli sperm geri kazanımı	Ros maruziyeti ile sperm DNA hasarı için risk potansiyeli Yüksek sperm konsantrasyonu gerekli
Density gradient	Temiz hareketli sperm geri kazanımı Subfertil hastalar için etkin	Santrifüj sebebiyle membran stresi ve hücre hasarı riski Özel, pahalı solüsyon ve ekipman gerekli
Mikro akışkan çip	Temiz hareketli sperm geri kazanımı	Özel çip gerekli Kısıtlı hacimde semen kullanılmakta
Migrasyon Sedimentasyon	Temiz hareketli sperm geri kazanımı	Özel tüp gerekli Az miktarda sperm elde edilmekte Yüksek sperm konsantrasyonu ve hareketliliği gerekli
Glass wool filtrasyon	Tüm ejakülat yöntem ile yıkanmakta	Özel tüp gerekli Hazırlık sonrası fraksiyonda artık bulunmakta
Elektroforetik filtrasyon	Hızlı yöntem	Ticari olarak ekipmana ulaşılamamakta

### **1.5.1. Swim up**

Swim up yöntemi likefiye semenden spermin üst yüzeye yayılan medyuma doğru aktif hareketine veya önceden yıkanmış hücre pelleti üstüne yayılan medyuma doğru hareketine dayalıdır. Bu yöntemle herhangi bir seçim elementi olmadan yüksek oranda hareketli sperm seçimi yapılabilmektedir (Aitken ve Clarkson 1988). Bu yöntemin dezavantajı spermilerin birbiriyle, hücre artıkları ve lökositlerle yakın temas halinde olması, ve bunların da yüksek oranda reaktif oksijen türevi (ROS) üretimine öncülük etmesidir. Sperm plazma membranında yüksek konsantrasyonlarda satüre olmayan yağ asidi bulunmakta ve buna bağlı olarak semendeki ROS lipid peroksidasyonuna sebep olmakta ve bu da sperm fonksiyonunu ve hareketini azaltmaktadır (Aitken ve diğ. 1998).

Swim up metodunda ROS, normal kromatin kondensasyonu olan sperm oranını düşürebilmekte (Muratori ve diğ. 2003) ve bu nedenle IVF için swim up uygulanan vakalarda başarı azalmaktadır (Ward 2010).

### **1.5.2. Density Gradient**

Yardımla üreme teknikleri için sperm hazırlama yöntemleri arasında en yaygın olanlarından biridir. Density gradient (DGC) polyvinyl pyrrolidone veya koloidal silika parçacıkları (15-30 nm) ile çevrelenmiş salin süspansiyonudur. Teknik olarak bu metod swim up'a göre daha karmaşıktır. Çünkü bu metotta farklı medyalara ve santrifüj hızı ve zamanı için de kontrole ihtiyaç vardır. Bu metod 1951'de geliştirilmiş (Brakle 1951) ve daha sonra insan semeninde uygulanmıştır (Lessley ve Garner 1983). DGS ile ayırma, sperm yoğunluğundaki farklılıklara dayanmaktadır. Normal morfolojideki spermler yüksek oranda paketlenmiş kromatine sahiptirler ve gradient yoğunluğunun yüksek olduğu bölgeye göçerler (Moustafa ve diğ. 2004). Bu metod iki basamak içerir; DGS ile spermi izole etme ve izole edilen sperm kısmının yıkanmasından oluşmaktadır. Semen DGC medyumunun üst kısmına yavaşça yayılır ve 300g'de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüjden sonra süpernatant alınır ve atılır. Sonra tekrar taze medium ile süspansiyon edilir. Spermin yıkanması için ikinci kez santrifüjleme gerekmektedir. Bu teknik kullanılarak yüksek hareketliliğe sahip spermlerin bulunduğu temiz bir kısmın geri kazanılması mümkündür. Diğer yandan DGC'nin devavantajları bulunmaktadır. Pahalı medium ve ekipmandan ayrı olarak spermin santrifüjü; membran stresi ve hücre hasarı ile ilişkili olabilmektedir (Sills ve diğ. 2002). IVF'de defektli spermatozoa kullanımının embriyo içinde DNA hasarını uyarması ihtimali hala tartışılıyor olmasına rağmen, santrifüj süreci sperm DNA'sını etkileyebilir (Sauer ve diğ. 2012). 2010'da Mahfouz ve arkadaşları spermin içindeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub> seviyeleri üzerine çalıştılar ve santrifüj süperoksit dismutaz aktivitesini arttırabildiğini bildirdiler. Buda sperm kalitesini potansiyel olarak olumsuz etkilemektedir (Burnaugh ve diğ. 2007).

### **1.5.3. Mikro akışkan çip**

Mikro akışkan çip yöntemi yeni olmasına rağmen biyolojik araştırmalarda güçlü bir alettir (Wang ve diğ. 2009). Schuster ve arkadaşları 2003'de mikrofluidik teknoloji uygulanarak sperm seçimi için bir cihaz geliştirdiler. Bu sistem iki paralel akımdan oluşmaktaydı. Biri semen akımı bir diğeri medium akımıydı. Nano teknoloji ile geliştirilmiş küçük kanallar arasında karışma olmadan birbirlerine paralel bir şekilde akım olabilmektedir. Buda yüksek motilitede (yaklaşık % 98) spermlerin geri kazanımını sağlayabilmektedir (Schuster ve diğ. 2003). Bu yöntemde santrifüj, pipetleme gibi sağlıklı

hücrelere zarar verebilecek ve ROS üretimini arttıracak basamaklara ihtiyaç duyulmamaktadır. Böylece herhangi bir hücre artığı olmadan, sperm DNA fragmantasyon oranı düşük, yüksek harekete sahip spermler elde edilmektedir. Mikro akışkan teknolojilerinde kimyasal çekici (atraktanlar), sıvı akış ve termotaktik güçler gibi prensipler kullanılarak sperm seçimleri yapılabilmektedir.

Pasif geçişin olduğu mikro akışkan teknolojilerinde bu güçlerin hiç biri bulunmamaktadır, geçiş sadece sperm hareketine dayalıdır. Pasif geçişli mikro akışkan sistemde; en hareketli spermlerin en optimal sürede az motil yada motil olmayan spermleri arkada (inlet) bırakarak mikro akışkan kanalların çıkış (outlet) kısmında toplanmalarına dayalı bir görüş vardır. Bu sisteme dayalı çalışmalar daha çok sıçan spermi üzerinde yapılmıştır. Taşoğlu ve arkadaşları tarafından hem insan hemde sıçan spermi ile deneysel sonuçları karşılaştırarak spermin polikarbon membran filtresinden geçişinde optimum zamanın ve optimum por genişliğinin araştırıldığı pasif geçişli bir model oluşturulsa da bu yeni yöntemle ilgili daha kapsamlı ve yeni çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (Taşoğlu ve diğ. 2013).

#### **1.5.4. Migrasyon sedimentasyon**

Migrasyon sedimentasyon yöntemi Tea ve arkadaşları tarafından 1984'de geliştirildi. Bu metod swim up ve bir sedimentasyon basamağının kombinasyonudur. Bu metodun uygulanması için içinde özel koni bulunan bir plastik yada cam tüp gerekmektedir. Likefiye semenden spermler süpernatanta doğru ve sonrada iç konik sediment doğru yüzerler. Santrifüj basamağına ihtiyaç duyulan metodla kıyaslandığı zaman (DGC gibi) bu metod oldukça zararsız ve nazik bir yöntemdir.

Fonksiyonel olarak yeterli sayıda hareketli spermatozoa elde etmek için migrasyon sedimentasyon yöntemi uygundur. 1996'da Sanchez ve arkadaşları oligo ve astenozoospermiye sahip vakalarda 2-3 saatlik inkübasyon sonrası ICSI için yeterli sayıda hareketli sperm elde edilebildiğini gösterdiler. Bu araştırmacılar DGC ile kıyaslandığında yüksek progresif hareket, normal sperm morfolojisi ve ölü sperm yüzdesindeki azalmanın daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Ancak DGC ve swim up yöntemlerine göre kıyaslandığında verim çok düşüktür. Böylelikle bu metod güncel kullanımlarda geniş bir yere sahip değildir. Zavos ve arkadaşları (2000) swim up ve sedimentasyon vasıtasıyla ART için fonksiyonel sperm geri kazanımında çok bölmeli bir tüpün bu metodun ileriki jenerasyonu için öneride bulundular.

### **1.5.5. Glass Wool Filtrasyon**

1977'de Paulson ve Polakoski tarafından tanımlanan glass wool filtrasyon süresince hareketli sperm semenden yoğun paketlenmiş glass wool lifleri sayesinde ayrılmaktadır (Paulson ve Polakoski 1977). Bu yöntemin altında yatan prensip, hem spermatozoanın ileriye itme hareketine hemde glass woolun filtrasyon etkisine dayanmaktadır. Ejekülat glass wool stünunun en üstündeki bölmede inkübe edilir. Semen medyum ile dilue olmuş glass wool sütununa doğru geçiş yapar ve 300 g'de 10 dk santrifüj edilir. Santrifüj basamağından sonra ART'de seçilen spermler kullanılabilir. Bu metodun etkinliği glass liflerinin özelliği üzerine dayanmaktadır Glassın kimyasal doğasındaki (borat glass, slika glass veya kuvars glass) gibi faktörler, glass woolun yüzey yapısı, glass wool liflerinin inceliği veya filtrenin gözeneklerinin boyutu önemlidir (Ford ve diğ. 1992). Bu yöntemin dezavantajı; filtrattaki glass wool bölümünden dolayı potansiyel bir sperm hasarı riskine sahip olmasıdır. Diğer metodlarla kıyasladığımızda glass wool filtrasyon tekniğinde ejakülatın tüm hacmi kullanıldığı için toplam motil sperm sayısı önemli ölçüde fazladır. Bu yöntem özellikle oligo ve /veya astenospermi hastaları için kullanılabilir (Berger ve diğ. 1985) Ancak, fonksiyonel spermlerin hareketsizler arasından ayrışmasından sonra bir santrifüj basamağı seminal plazmanın uzaklaşması için gerekmektedir. Spermatozoanın ayrışmasına ek olarak, lökositleri etkili bir biçimde ayrışmaktadır (Henkel ve diğ. 1997). Bu metodla temiz sperm fraksiyonu elde edilse de, geniş kullanımı bulunmamaktadır; çünkü yöntem tam olarak standardize edilmemiş ve yöntemin ticari kiti mevcut değildir.

### **1.5.6. Elektroforetik Filtrasyon**

Elektroforetik filtrasyon yöntemi elektro negatif şarja dayalı spermleri seçmek için geliştirilmiştir. En kaliteli sperm en fazla negatif şarjı taşımaktadır (Giuliani ve diğ. 2004) ve lökosit ve hücre artıkları gibi diğer hücrelerden izole olabilirler (Ainswort ve diğ. 2005) Ainswort ve arkadaşları (2007) spermleri yüklerine dayalı olarak seçmek için Mikroflow CS-10 isimli bir sistem geliştirdiler. Semen hazneye yüklenir ve sonra özel bir bufferla 18-21 V arası değişken bir voltaj ve 7 MmA'luk sabit bir akımdan oluşan elektriksel alanla 5 dk için dengelenir. Bu metodun hazırlığı sadece 5 dk gerektirmektedir. Bu da sperm oksidatif stresini minimize etmede değerli olabilir. Ancak, DGC veya Mikroflow CS-10'la izole edilen spermlerle fertilizasyon ve gebelik oranı arasında statistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır. Araştırmacılar tarafından not edilen tek avantaj DGC'den daha kısa sürede yıkama yapılmasıdır (Fleming ve diğ. 2008).

## 2. AMAÇ

Tüm infertil çiftlerin yaklaşık yarısında erkek faktör infertilitesi bulunmaktadır. Rutin semen analizleri erkek faktör değerlendirmesi için hala ciddi bir araç olarak görülsede yapılan son çalışmalarda; sperm DNA bütünlüğü, apoptoz, reaktif oksijen türevleri (ROS) ve ultrastrüktür gibi değerlendirmelerin erkek faktör infertilitesinde daha iyi bir belirleyici olabileceği ileri sürülmektedir. Benzer çalışmalarda farklı sperm parametreleri ile fertilizasyon ve gebelik oranları arasında önemli korelasyon olduğu bildirilmektedir. Ayrıca sperm parametreleri yıkama yöntemlerinden etkilenebilmekte ve böylece IVF'in başarısını düşürebilmektedir. Rutin sperm yıkama yöntemleri olan swim up ve density gradient en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Ancak her iki yıkama metodu da spermın santrifüj ve pipetleme işlemlerini gerektirmektedir ve yüksek ROS oranı söz konusudur. Bu işlemler sonrası sperm morfolojik olarak normal, hareketli ve sayı olarak yüksek konsantrasyonda olmalarına rağmen, düşük DNA bütünlüğü ve yüksek ROS oranlarına sahip olabilirler.

En iyi sperm seçimi ve hasarlı sperm ayrıştırılması yardımıyla üreme tekniklerinde başarı için kritik bir öneme sahiptir. Mikro akışkan çip yöntemi doğal sperm seçiminden ilham alınarak geliştirilmiş yeni bir yöntemdir. Bu yöntemde nanoteknoloji ile geliştirilmiş mikro kanallardan, sağlıklı sperm kendi hareketlerine dayalı olarak seçilmektedir. Böylece mikro akışkan çip ile santrifüj olmadan kaliteli sperm seçilebilmektedir.

Yardımla üreme tekniklerini kullanan normal semen parametrelerine sahip çiftler için düşük DNA bütünlüğü ve yüksek ROS oranı, altta yatan infertilite sebebi olarak görülmektedir. Semende bu defektleri üreten mekanizmalar; hatalı apoptoz, defektli olgunlaşma ve ROS üretiminin olduğu oksidatif stressdir. Santrifüj ve örneklerin pipetlenmesi gibi işlemler boyunca spermde oksidatif stress artmakta ve DNA bütünlüğü de bozulmaktadır. Fonksiyonel içeriği en iyi olan sperm seçmek için uygun yöntemi belirleme semen özelliklerine dayanmaktadır. Normal semen özelliklerine sahip ancak infertil hasta grubu için en ideal metodu belirlemek başarılı tedavi için önceliklidir.

Çalışmamızda; normozoospermik infertil hastalar için altta yatan sebepler göz önünde bulundurularak swim up, density gradient ve mikro akışkan çip yöntemleri ile elde edilen sperm rutin semen analizleri yanı sıra immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak incelemeyi ve uygun yöntemi belirlemeyi hedefledik.

### 3. YÖNTEM

Çalışma, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun (2015/70) onayı ile yapılmıştır. Çalışma için gerekli kimyasallar ve sarf malzemeler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenen 2015.08.03.970 nolu proje kapsamında sağlanmıştır.

#### 3.1. Hasta Grubu ve Deneysel Düzen

Çalışmada Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğine infertilite nedeni ile başvuran hastaların semen örnekleri kullanıldı.

Değerlendirilen hastalardan Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) göre spermiyogramı normal değerler içinde olan 20 normozoospermik infertil hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalara çalışma hakkında detaylı bilgiler verildikten sonra bilgilendirilmiş olur formları imzalatıldı. İki yedi gün arasında cinsel perhizi olan hastalardan alınan semen örnekleri likefaksiyon için 37°C'lik ısıtıcı yüzey üzerinde 20-30 dakika kadar bekletildi. Sonrasında 20 normozoospermik infertil hastaya ait spermiyogram değerlendirmeleri yapıldı. Makroskobik ve mikroskobik incelenmesi tamamlanan her hastanın semen örnekleri 4 eşit hacime ayrıldı. Herhangi bir işlem yapılmayan semen Grup 1, density-gradient yöntemi ile yıkama uygulanan kısım Grup 2, swim up yöntemi ile yıkama uygulanan kısım Grup 3 ve mikro akışkan çip yöntemi ile yıkama uygulanan kısım ise Grup 4'ü oluşturdu. Kromatin kondensasyon defektlerinin belirlenmesi için her gruba asidik anilin mavisi ve toluidine mavisi ışık boyamaları, apoptotik hücreleri (DNA fragmentasyonunu) belirlemek için TUNEL boyaması uygulandı, ayrıca reaktif oksijen türevi (ROS) açısından 2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat (DFCH-DA) ile flowsitometrik ölçüm ve ince yapı değerlendirmesi için de transmisyon elektron mikroskop (TEM) takibi yapıldı.



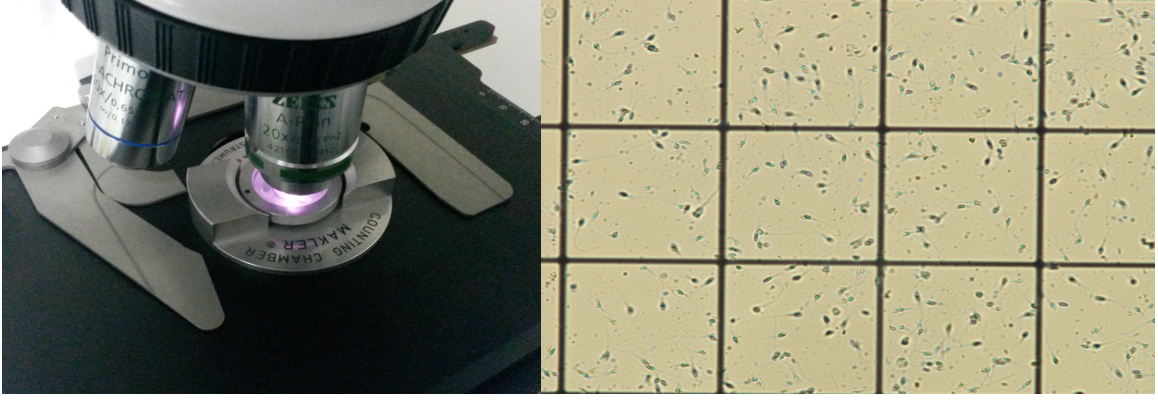
**Çizim 3.1.** Hasta grubu ve deneysel düzen.

### 3.2. Semen Örneklerinin Değerlendirilmesi

#### 3.2.1. Konsantrasyon

Sperm konsantrasyon değerlendirmesi için derinliği 0.01 mm ve üst lamelinde 100 kare bölmeye sahip makler sayma kamarası kullanıldı (Çizim 3.2). Makler kamarasının ortasına bir damla semen yerleştirilip 100 kareli lamelin üst ve alt 10 karesinde yer alan sperm sayısı x200'lük büyültmede incelenerek hesaplandı toplam sayı 2'ye bölünerek elde edilen sperm sayısı milyon (M) ile çarpıldı. Sperm konsantrasyonu 15 M/ml üzerinde olan hastalara ait semen örnekleri çalışmaya dahil edildi.





**Çizim 3.2.** Makler sayma kamarasına ait makroskobik ve mikroskobik görüntüler; x200'lük büyültmede makler sayma kamarası karelerinde sperm görüntüleri.

### 3.2.2.Hareketlilik

Hareketlilik değerlendirmesi için hastalara ait sperm örneklerinden 10 $\mu$ l lam üzerine damlatılarak lamel ile kapatıldı, oda sıcaklığında faz kontrast mikroskop ile x200'lük büyütmede 4-5 mikroskop alanı incelenerek yaklaşık olarak 200 sperm sayıldı. Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre semen örnekleri;

+4 (a) ileri hızlı hareketli

+3 (b) ileri yavaş hareketli

+2 (c) yerinde hareketli

+1 (d) hareketsiz olarak sınıflanmaktadır.

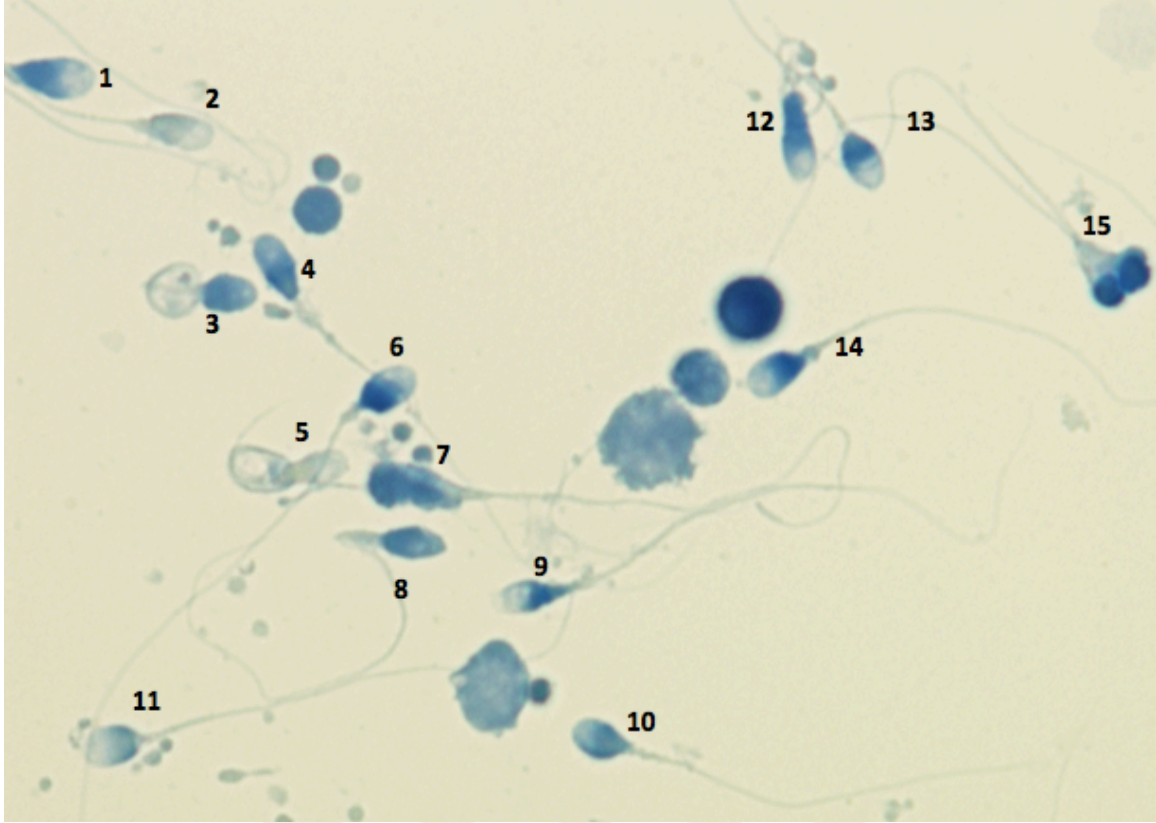
Hızlı ileri hareketli sperm saniyede 25 $\mu$ m'lik bir yol kat etmesi gereklidir (bir sperm uzunluğunun yarısı kadar). Toplam hareketli sperm yüzdesi, ileri hareketli ve yerinde hareketli toplamının tüm sperm sayısına oranı ile elde edildi. WHO kriterlerine göre normal bir semen örneğinde a+b değeri en az %39 olmalıdır. Bu çalışmada hareketlilik a+b değeri en az %39 olan hastalar çalışmaya dahil edildi. Dünya Sağlık Örgütü'ne ait insan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi adlı laboratuvar el kitabına göre 1980'den 2010'a kadar olan normal sperm değerleri Çizelge 3.1'de verilmektedir.

**Çizelge 3.1.** 1980'den 2010'a WHO'e ait normozoosperm semen parametrelerindeki değişiklikler.

<b>Semen Parametreleri</b>	<b>WHO 1980</b>	<b>WHO 1987</b>	<b>WHO 1992</b>	<b>WHO 1999</b>	<b>WHO 2010</b>
<b>Hacim, ml</b>	–	≥ 2	≥2	≥2	≥1,5
<b>Sperm konsantrasyonu, M/ml</b>	20-200	≥20	≥20	≥20	≥15
<b>Toplam sperm sayısı, M</b>	–	≥40	≥40	≥40	≥39
<b>Toplam hareketlilik, % hareketli</b>	≥60	≥50	≥50	≥50	≥40
<b>Prograsif Hareketlilik &gt;25µm</b>	≥2 (0-3)	≥25	≥25 (a sınıfı)	≥25 (a sınıfı)	≥32 (a+b)
<b>Morfoloji, % normal</b>	≥80,5	≥50	≥30	≥14 Kruger'in kriterleri	≥4 Kruger'in kriterleri
<b>Lökosit konsantrasyonu, M/ml</b>	< 4.7	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

### 3.2.3. Sperm Morfoloji Değerlendirmesi

Morfoloji değerlendirme için sperm örneklerinin lam üzerine 45 derecelik bir açıyla WHO laboratuvar prosedürüne uygun olarak yayması yapıldı. Her grup için sperm örneklerden 4 yayma prepabrat hazırlandı ve 30 dakika kadar havada kurutuldu. Morfoloji değerlendirme asidik anilin mavisi ile boyanan preparatlarda x1000'lik büyültmede immersiyon objektifiyle 200 sperm sayılarak Kruger'in sıkı (Kruger-Strict) kriterlerine göre yapıldı.



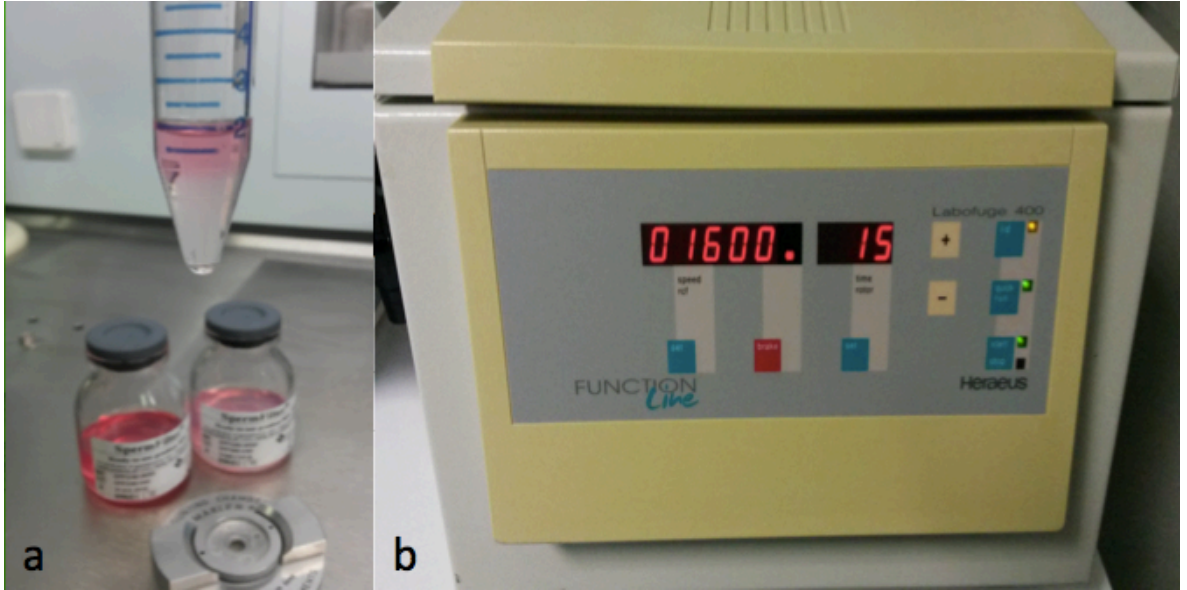
**Çizim 3.3.** Asidik anilin mavisi ile boyanan sperm morfolojileri: 1– büyük başlı sperm, 2– tapered (uzamış) başlı sperm, 3– kıvrık kuyruklu anormal sperm, 4– tapered (uzamış) başlı sperm, 5– (tapered pyriform) uzamış başlı sperm, 6– normal, 7–amorf sperm, 8– tapered (uzamış) başlı sperm, 9– baş bölgesinde 1/3’den fazla vakuola sahip küçük başlı sperm,10– anormal başlı sperm, 11– normal sperm, 12– sitoplazmik dropletli anormal sperm, 13– normal sperm, 14–(abaksiyel) boyun kısmı asimetrik olarak başa bağlanma gösteren sperm, 15– çift başlı ve çift kuyruklu sperm.

Değerlendirme sonrası normal sperm morfolojisi %4’ün üzerinde olan hasta örnekleri çalışmaya dahil edildi. Normozoospermik olarak değerlendirilen 20 hastaya ait semen (Grup 1) örneklerine eş zamanlı olarak density gradient (Grup 2), swim up (Grup 3) ve mikro akışkan çip (Grup 4) yöntemleri uygulandı. Yıkama sonrası her grup için sperm sayımı ve hareketlilik değerlendirmeleri tekrarlandı. Ayrıca her grup için yıkanmış sperm örneklerinin bir kısmından ışık mikroskobik ve immünohistokimyasal boyamalar için yayma preparatlar hazırlandı. Geriye kalan sperm örneklerinden 200 µl flow sitometrik değerlendirme için -80°C’de ve elektron mikroskobik değerlendirme için seçilenler tespit edilerek +4°C’de saklandı.

### 3.3. Sperm Seçim Yöntemlerinin Uygulanması

#### 3.3.1. Density Gradient Yöntemi

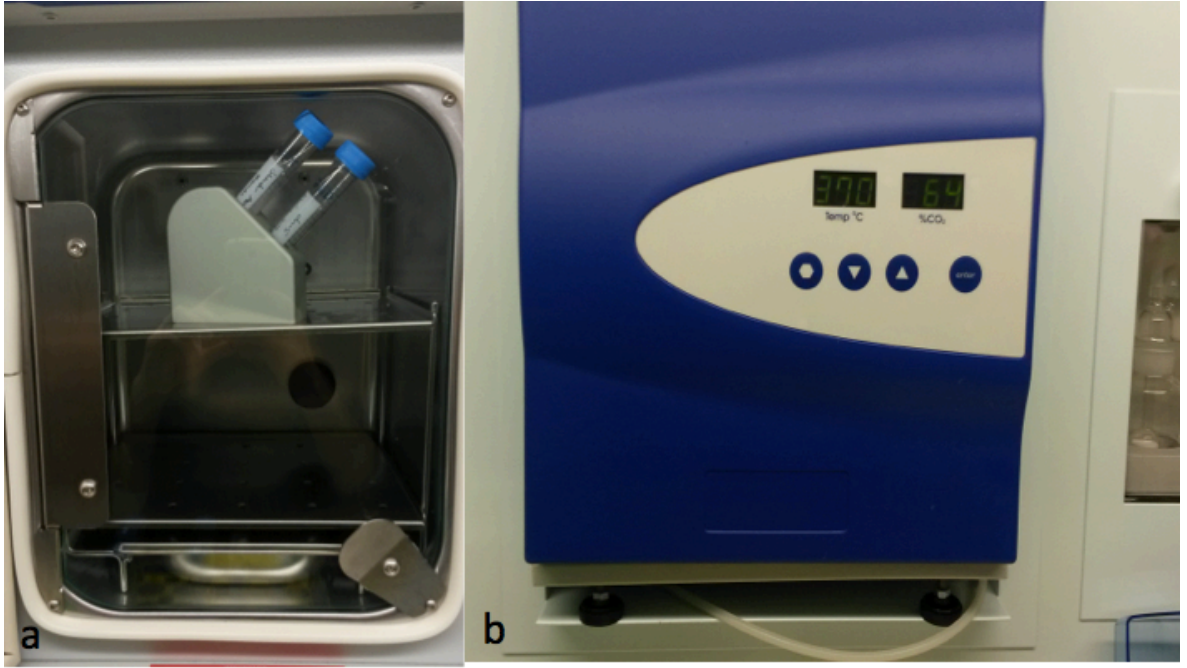
Silika partiküllerinden oluşan %100'lük SpermFilter® gradient medyumunu SpermWash® (HSA, pyruvate, Hepes, Phenol red, sodiumbicarbonate and Gentamicin (10µg/ml) medyumunu ile dilüe edilerek %90'luk ve %50'lik solüsyonlar hazırlandı. Önce 1 ml %90'luk solüsyon, sonra 1 ml %50'lik solüsyon yavaşça üst faz oluşturacak şekilde 15 ml'lik konik tüpe konuldu. Daha sonra gradient solüsyonları üzerine yavaşça hastalara ait semen örnekleri konuldu. 1600 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra kalitesiz spermlerin ve semen artıklarının yer aldığı üst faz %90'luk solüsyonuna kadar atıldı. Üzerine 5 ml SpermWash® ile resüspense edilip 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Sonrasında tekrar supernatant atılarak yaklaşık 0,5 ml kadar yıkama medyumunu ile karıştırılarak aşılama uygun olarak hazırlandı. Hazırlanan örneğin bir bölümü ışık mikroskopik araştırma için polilizinli lamlara yayma yapıldı, bir bölümü flowsitometrik ROS ölçümü için ayrıldı, kalan bölüm ise elektron mikroskopik inceleme için kullanıldı.



**Çizim 3.4.** Density gradient yöntemine ait fotoğraflar; **a.** 15 ml'lik konik tüpte alt fazda % 90'luk ve üst fazda %50'lik gradient solüsyonları, **b.** kaliteli spermlerin seçimi için 1600 rpm'de 15 dk santrifüj işlemi.

### 3.3.2. Swim up Yöntemi

Hasta semen örneklerinin bir kısmı önce konik tüp içerisine alınarak 3 ml SpermWash® yıkama solüsyonu ile pipetlenerek karıştırıldı ve 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra alt kısmın üzerine yavaşça 1 ml yıkama solüsyonu eklenerek, yüzey alanını arttırmak amacıyla 45 derece eğimle 37°C derecede 45 dakika inkübe edildi (Çizim 3.5). Sonrasında kaliteli spermlerin bulunduğu üst faz alınarak density-gradient yönteminde olduğu gibi farklı değerlendirmeler için kullanıldı.

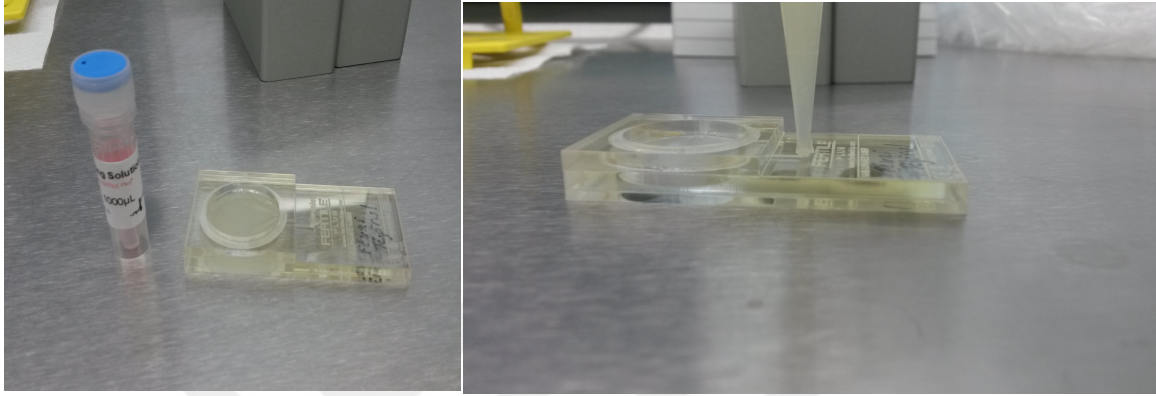


**Çizim 3.5.** Swim up yöntemine ait fotoğraflar; **a, b.** Sperm örneklerinin konik tüpte 45 derece eğimle, 37°C derecede 45 dakika inkübasyonu.

### 3.3.3. Mikro Akışkan Çip Yöntemi

Çalışmada Fertile® Plus mikro akışkan sperm çipleri kullanıldı. Mikro akışkan sperm ayıklama çipleri çok katmanlı zar (membran) sistemi içermektedir. Üst zar çapı 4µm, orta zar çapı 5µm ve alt zar çapı 8µm'dir. Bu sistemde başarılı sonuç olabilmek için semen örneğinin tam olarak likefiye olması gerekmektedir. Likefiye hasta semen örneğinin 850 µl'si Fertile® Plus çipinin inlet (küçük) kısmından yavaşça verilerek, membranın altında kalan alanın tam olarak doldurulması sağlandı. 850 µl Fertile® plus sorting solüsyonu, Fertile® çipin outlet (büyük) havuzuna verildi (Çizim 3.6). Solüsyon verilirken

outlet havuzunda yer alan zara mikropipet ucunun değmemesine özen gösterildi. Sonrasında 37°C derecede 30 dakika inkübe edildi ve outlet havuzunda kaliteli spermilerin yer aldığı solüsyon yine mikropipet ucunun değmemesine özen gösterilerek 700 µl olarak alındı. Alınan sperm örneği farklı değerlendirmeler için kullanıldı.



**Çizim 3.6.** Fertile® Plus mikro akışkan sperm çip sistemine ait görüntü; çipin inlet kısmına likefiye olmuş semenin verilışı.

### 3.4. Işık Mikroskopik Boyaların Hazırlanışı ve Boyama Yöntemleri

#### 3.4.1. Asidik Anilin Mavisi

Önce fosfatlı tampon çözeltisi (PBS) hazırlandı. 5 gr Anilin mavisi 100 ml PBS ile karıştırılıp, kaynayınca kadar ısıtıldı ve soğumaya bırakıldı. Daha sonra bu karışım filtre kağıdı ile süzülerek bir şişede 2 ay süre ile saklanabilecek şekilde kullanıldı. Boyanın pH'sı %100'lük HCL ile titre edilerek 3.5'e getirildi. Tespit için; 12 ml %25'lik gluteraldehid PBS ile 100 ml'ye tamamlandı ve %3'lük gluteraldehid elde edildi. Işık mikroskopik kromatin değerlendirmesi için her hastaya ait semen örneklerinden 2'ser preparat hazırlandı. Kuruyan preparatlardan biri asidik anilin mavisi için %3'lük gutaraldehid ile 30 dakika tepit edildikten sonra 7 dakika asidik anilin mavisi (pH: 3.5) ile boyama yapıldı. Preparatlar iki aşamalı olarak PBS'de yıkandı ve kurumaya bırakıldı, daha sonra lamel ile kapatıldı.

### 3.4.2. Toluidin Mavisi

Öncelikle %50'lik pH'sı 3.5 olan McIlvain's buffer hazırlandı. 1,395 gr sitrik asit monohidrat ile 1,272 gr disodyumfosfat 2H<sub>2</sub>O karışımı üzerine 100 ml distile su eklendi. Hazırlanan 100 ml McIlvain's buffer ile 50 mg toluidin mavisi karıştırılarak boya hazırlandı. Ardından zayıf asit olarakta 0,1 N HCL ve tespit için; etanol/aseton (1:1) karışımı hazırlandı. Kuruyan preparatlar etanol/aseton (1:1) ile 30'-12 saat aralığında tespit edildi. Tespit sonrası havada kurutulan preparatlar zayıf bir asit olan 0,1M HCL 'de +4°C derecede 5 dakika hidroliz edildi. 3 kez 2'şer dakika distile su ile yıkandı. Preparatlar 5 dakika %0.05 toluidin mavisi solüsyonunda bekletildi ve distile su ile yıkanan preparatlar lamel ile kapatıldı.

### 3.4.3 Sperm Kromatin Kondensasyonunun Değerlendirilmesi

İmmersiyon objektifiyle x1000'lik büyütmede incelenen örneklerde anilin mavisi ile anormal kromatin kondensasyonuna sahip sperm başları koyu mavi boyanırken (+), normal kromatin kondensasyonuna sahip sperm başları açık mavi (-) olarak boyandı. Her preparat için 200 spermdeki (+) sperm oranı hesaplandı.

Metakromatik özellik gösteren toluidin mavisi ile anormal kromatin kondensasyonu gösteren spermler koyu mavi veya mor renkte boyanırken, normal kromatin kondensasyonu gösteren spermler yeşil veya açık mavi renkte boyandı. Koyu mavi veya mor renkteki spermler (+) kabul edilerek her preparat için 200 spermdeki (+) sperm oranı hesaplandı. Her iki boyama ile + boyanan spermler kromatin kondensasyon defektli olarak değerlendirildi.

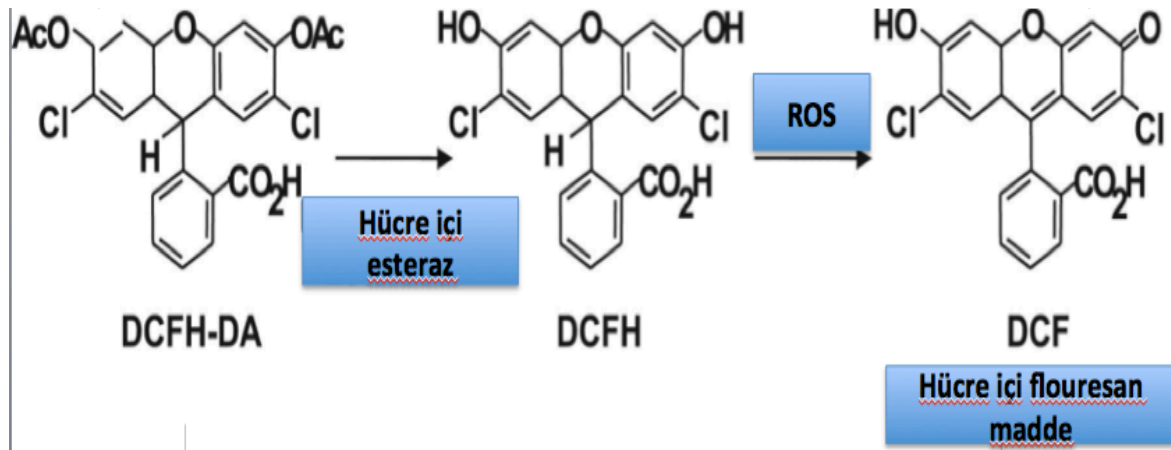
### 3.5. TUNEL Yöntemi ile DNA Fragmantasyonunun Değerlendirilmesi

Apopitoz oranını (DNA fragmantasyonu) belirlemek amacıyla kırılan DNA parçalarının 3'-OH uçları terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi kullanılarak digoksigenin isaretili dUTP ile in situ olarak işaretlendi. Her preparat için 200 sperm sayılarak TUNEL pozitif boyanma yüzdeleri hesaplandı. Preparatlar TUNEL (Millipore) boyama protokolüne uygun olarak önce metanol ile 20 dakika fikse edildi. PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Yıkama sonrasında Pap-Pen ile belirlenen alanlara 5 dakika süre ile %0.3 'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanıp, 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Ardından örnekler dengeleme

(equilibration) tampon solüsyonu ile 10 saniye yıkandı. TdT-enzimi solüsyonu ile 37°C de 1 saatlik inkübasyon sonrası PBS ile 3 kez 1'er dakika yıkama yapıldı. Örnekler Anti-digoksinin antikoru/peroksidaz konjugatı ile 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. PBS ile 2 dakika yıkandıktan sonra örnekler diaminobenzidin (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra metil green ile zıt boyama uygulandı. Daha sonra preparatlar dereceleri artan alkol serilerinden geçirildi, 15 dakika ksilen ile seffaflastırarak entellan ile kapatıldı. Boyama sonrası preparatlar x1000'lik immersiyon objektifi ile değerlendirildi. Kahverengi boyanan sperm başları TUNEL (+), yeşil boyanan sperm başları ise TUNEL (-) olarak değerlendirildi. Her preparat için 200 sperm sayılarak TUNEL (+) apoptotik sperm yüzdeleri hesaplandı. Çalışmamızda "TUNEL Apoptosis Detection Kit" (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) kullanıldı.

### 3.6. Reaktif Oksijen Türevi (ROS) Değerlendirilmesi

Hücre kültürü ve akışkan sistemlerde, ROS etkisi Dichlorofluorescein (DCFH) ile değerlendirilmektedir. DCFH'nin diasetat formu serbestçe hücre zarından geçebilmekte ve hücrenin hidrofobik bölgelerine dahil olmaktadır (Bass et al., 1983). Hücre içi esterazlar tarafından 2',7 -dichlorodihydrofluorescein (H2DCF-DA) enzimatik olarak hidrolize edilerek floresan özelliği olmayan DCFH'ye dönüşür. ROS varlığında DCFH hızla yüksek floresan (yeşil) özelliği olan DCF'ye okside olur (Çizim 3.7.).



**Çizim 3.7.** ROS varlığında DCFH-DA'nın floresan özelliğe sahip DCF'ye dönüşümü.



### 3.6.1. DCFH-DA / PI ile Flow sitometrik Boyama

Sperm örnekleri  $5 \times 10^6$  sperm/ml konsantrasyonunda olacak şekilde ependorf tüplerde seyreltildi. 25 mg/ml olacak şekilde DMSO (dimethyl sulfoxide) ile çözüldü. Propidium iyodid (PI) zıt boyama olarak kullanıldı. 5 µl DCFH -DA (10 mM) ve 3 µl PI, 492µl seyreltilmiş sperm üzerine ilave edildi. Örnekler 30 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi ve ölçümden hemen önce karıştırıldı. DCFH pozitif ve PI negatif spermlerin miktarı ve DCFH floresan yoğunluğu ölçüldü.

### 3.6.2. Flow sitometrik Analiz

Tüm gruplara ait örneklerde ROS ölçümü 488-nm argon laser ışın ile Becton Dickinson FACS Calibur Flow sitometrisi (BD Biosciences, Singapore) kullanılarak yapıldı. Her bir sperm örneği için yaklaşık 100 hücre/saniye akış hızında minimum 10 000 spermatozoa değerlendirildi. Floresan olmayan DCFH-DA'nın hücre içi  $H_2O_2$  ile etkileşerek yeşil floresan renge sahip DCFH'ye dönüşümü ile 500 and 530 nm dalga boyu aralığında boyanan spermler değerlendirildi. DCFH boyaması ile beraber nükleik asit boyası olan propidium iyodide (PI) zıt boyaması kullanıldı ve böylece apoptotik spermler değerlendirme dışı tutuldu. PI kırmızı fluoressan 580–630 nm dalga boyu aralığında FL-2 kanalında analiz edildi. PI pozitif hücrelerin yüzdesi ve ortalama floresan hesaplandı. Sonuçların analizleri flow sitometri CellQuest Pro yazılımı ile yapıldı.

### 3.7. TEM Takibi

Gruplara ait sperm örnekleri elektron mikroskopik tetkikler için PBS ile dilüe edilip, 5 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi. Yıkama sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Alt kısımda kalan spermler önce %3 lük Millonig's fosfat tamponunda gluteraldehit (sigma) ile 5 saat-30 gün tespit edildi. Daha sonrada 1 saat süre ile %1 osmium tetroxide ile tespit edildi. Dehidratasyonu takiben örnekler EPON 812 ile gömüldü. Örnekler 70°C'de gece boyunca polimerize edildi. LKB ultramikrotom ile alınan ince kesitlere uranyl acetate ve Reynold'un kurşun sitrat ile ikili boyama yapıldı. Son olarak JEOL JEM-1011 transmisyon electron mikroskobu ile incelendi (JEOL USA,Peabody,MA,USA).

## **İstatistik Analiz**

Çalışmada elde edilen ölçümlere ait tanımlayıcı değerler ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum olarak verildi. Yapılan ölçümler bakımından grupların karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümlerde varyans analizi kullanıldı ve semen (G1), density gradient (G2), swim up (G3) ve mikro akışkan çip (G4) yöntemlerine ait gruplar Bonferroni testi ile incelendi. İstatistik değerlendirmeler sonucunda  $p < 0.0001$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ve hesaplamalarda SPSS (version 21) programı kullanıldı.



#### 4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 20 normozoospermik infertil hastanın yaş ortalamaları  $32,75 \pm 6,95$  (22-49) olarak bulundu. Aşağıdaki tabloda hastalara ait işlem öncesi semen parametrelerinin tanımlayıcı istatistiksel değerleri ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum olarak verilmektedir.

**Çizelge 4.1.** Hastalara ait semen parametreleri ve değerleri

Parametreler	Değerler
Hasta sayısı	20
Yaş	$32,75 \pm 6,95$ (22– 49)
Konsantrasyon (xM/ml)	$86,45 \pm 35,732$ (32–174)
Toplam hareketlilik (%)	$62,40 \pm 10,10$ (38–78)
Hızlı progresif hareketlilik (%) <sup>a</sup>	$12,30 \pm 6,23$ (5–22)
Yavaş progresif hareketlilik (%) <sup>b</sup>	$42,00 \pm 7,30$ (29–54)
Normal morfoloji (%) <sup>c</sup>	$11,55 \pm 4,89$ (4–25)

ortalama değerler  $\pm$  SD ( aralık )

M milyon

<sup>a</sup> a sınıfı hareket

<sup>b</sup> b sınıfı hareket

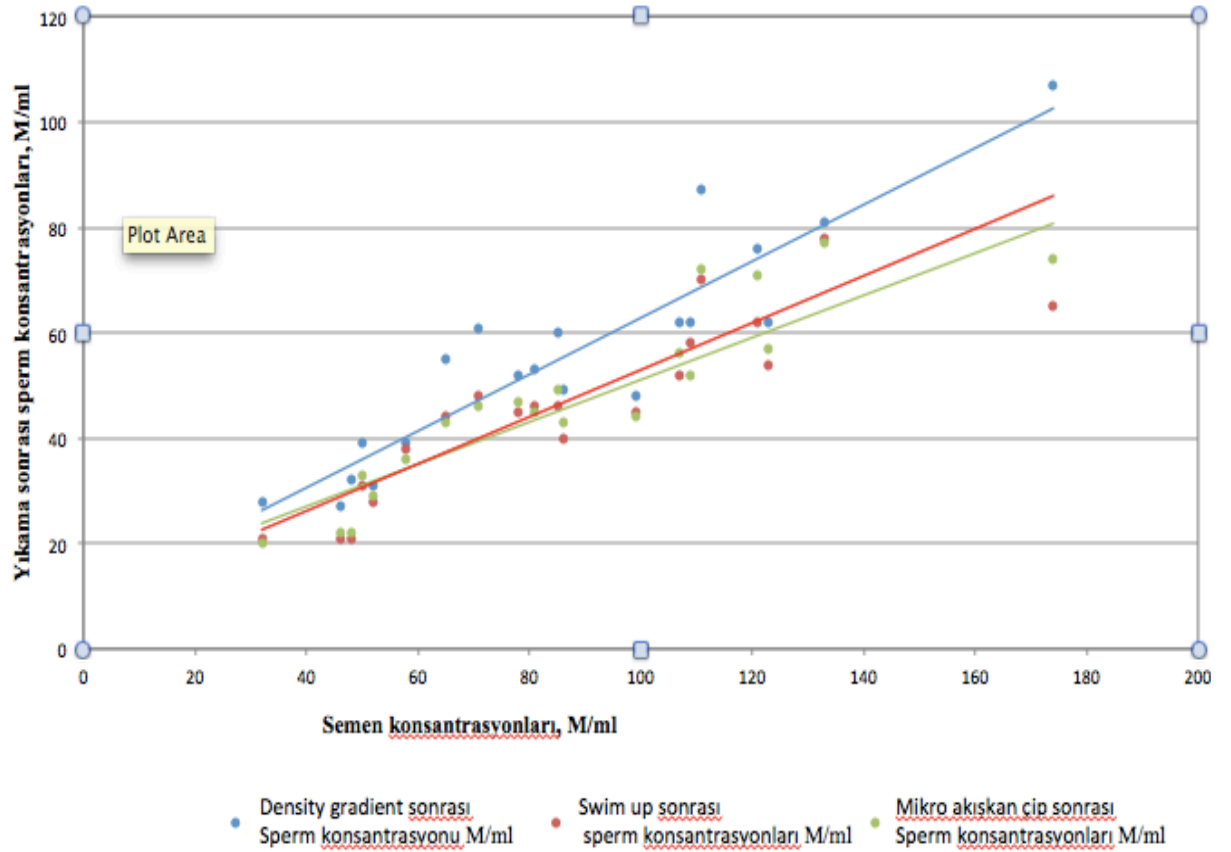
<sup>c</sup> Kruger'in sıkı(strict kriteria ) kriterlerine göre olarak ifade edildi.

##### 4.1. Sperm Konsantrasyonu

Yıkama öncesi 20 normozoospermik infertil hastanın semen grubuna (G1) ait sperm konsantrasyon ortalaması  $86,45 \text{ xM/ml} \pm 35,732 \text{ xM/ml}$  olarak hesaplandı. Yıkama yöntemlerinin ortalama konsantrasyonlara ait değerleri Çizelge 4.2'de verilmektedir. Konsantrasyon bakımından yıkama öncesi semen (G1) ile density gradient (G2), swim up (G3) ve mikro akışkan çip (G4) yıkama sonrası karşılaştırıldığında yöntemlerin tümünde azalma ve anlamlı fark olduğu görüldü. Ayrıca her üç yıkama yöntemi de kendi aralarında konsantrasyon açısından karşılaştırıldığında Grup 3 ve Grup 4 arasında anlamlı fark olmadığı ancak diğer gruplar arasında anlamlı fark olduğu bulundu ( $P < 0.0001$ ).

**Çizelge 4.2.** Tüm grupların konsantrasyona ait istatistiksel değerleri.

Konsantrasyon(xM/ml)	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SD	P
Semen (G1)	20	32	174	86,45	35,732	<b>&lt;0.0001</b>
Density gradient (G2)	20	27	107	55,55	20,869	
Swim up (G3)	20	21	78	45,65	16,210	
Mikro akışkan çip (G4)	20	20	77	46,90	17,329	



**Çizim 4.1.** Semendeki sperm konsantrasyonu ile density gradient (G2), swim up (G3) ve mikro akışkan çip (G4) yöntemleri yıkama sonrası sperm konsantrasyonları arasındaki ilişki grafiği (örnek sayısı=20).

Çizelge 4.2.'e göre konsantrasyon bakımından swim up ve mikro akışkan çip yöntemleri ile density gradient yöntemi arasında anlamlı fark olduğu görülmektedir ( $P < 0,0001$ ). Başlangıçtaki semene ait sperm konsantrasyonundaki azalma density gradient yönteminde ortalama %30,9 iken swim up ve mikro akışkan çip yöntemlerinde %40,8 ve %39,55 idi. Yıkama yöntemlerini, sperm sayısındaki azalma oranları ile değerlendirdiğimizde, density gradient yöntemi ile yıkama sonrası daha fazla sayıda sperm elde edildi. Swim up ve mikro akışkan çip yöntemleri ile benzer oranda ve daha az sayıda sperm elde edilmektedir (Çizim 4.1).

#### 4.2. Sperm Hareketliliği

Yıkama öncesi 20 normozoospermik infertil hastanın semen grubuna (G1) ait toplam hareketlilik yüzdelerinin ortalaması  $62,40 \pm 10,102$  olarak hesaplandı. Yıkama sonrası hareketli sperm yüzdeleri her üç yıkama yönteminde de anlamlı olarak yükseldi ( $P < 0,0001$ ). Hareketliliğe ait yüzde ortalamaları density gradient sonrası %83,80, swim up sonrası %86,15 ve mikro akışkan çip sonrası ise %90,20 olarak hesaplandı (Çizelge 4.3).

Her üç yönteme ait toplam hareketlilik yüzdeleri kendi aralarında karşılaştırıldığında Grup 2 ve Grup 3 arasında anlamlı fark olmadığı ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi ( $P < 0,0001$ ).

Çizelge 4.3 incelendiğinde;

- a sınıfı hareketli sperm yüzdeleri bakımından bütün gruplar arasında anlamlı fark olduğu ( $P < 0,0001$ ) (Çizim 4.2),
- a+b sınıfı hareketli sperm yüzdeleri bakımından bütün gruplar arasında anlamlı fark olduğu ( $P < 0,0001$ ) (Çizim 4.4),
- ve sadece b sınıfı hareketli sperm yüzdeleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi ( $P = 0,136$ ) (Çizim 4.3).

**Çizelge 4.3.** Tüm grupların hareketlilik yüzdelerine ait istatistiksel değerleri.

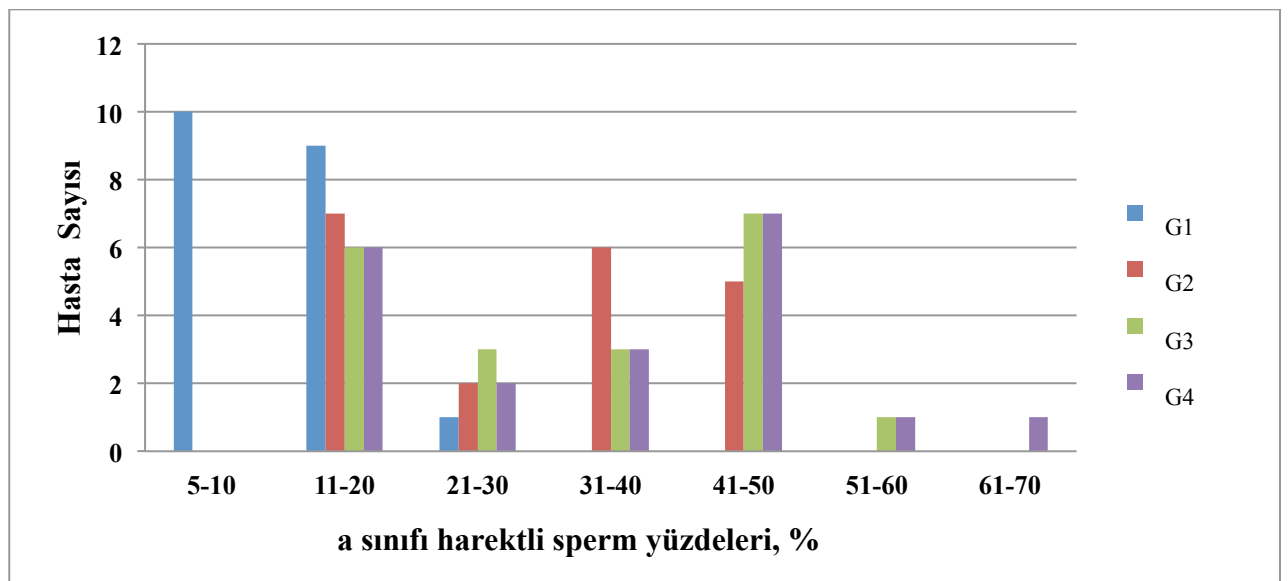
	N	Minimum(%)	Maximum(%)	Ortalama(%)	SD	P
Toplam hareket G1	20	38	78	62,40	10,102	<0.0001
Toplam hareket G2	20	67	98	83,80	8,703	
Toplam hareket G3	20	73	95	86,15	6,459	
Toplam hareket G4	20	74	99	90,20	7,237	
a sınıfı hareket G1	20	5	22	12,30	6,233	<0.0001
a sınıfı hareket G2	20	12	50	29,70	13,429	
a sınıfı hareket G3	20	13	55	33,30	14,772	
a sınıfı hareket G4	20	15	61	35,65	15,104	
b sınıfı hareket G1	20	29	54	42,00	7,305	0.136
b sınıfı hareket G2	20	29	65	44,80	11,441	
b sınıfı hareket G3	20	26	69	47,00	13,530	
b sınıfı hareket G4	20	28	72	47,40	15,322	
a+b hareket G1	20	36	77	54,55	11,237	<0.0001
a+b hareket G2	20	56	88	75,05	8,894	
a+b hareket G3	20	55	92	79,60	8,870	
a+b hareket G4	20	58	99	83,55	9,087	

a sınıfı hareket = hızlı progresif hareket

c sınıfı hareket = yerinde hareket

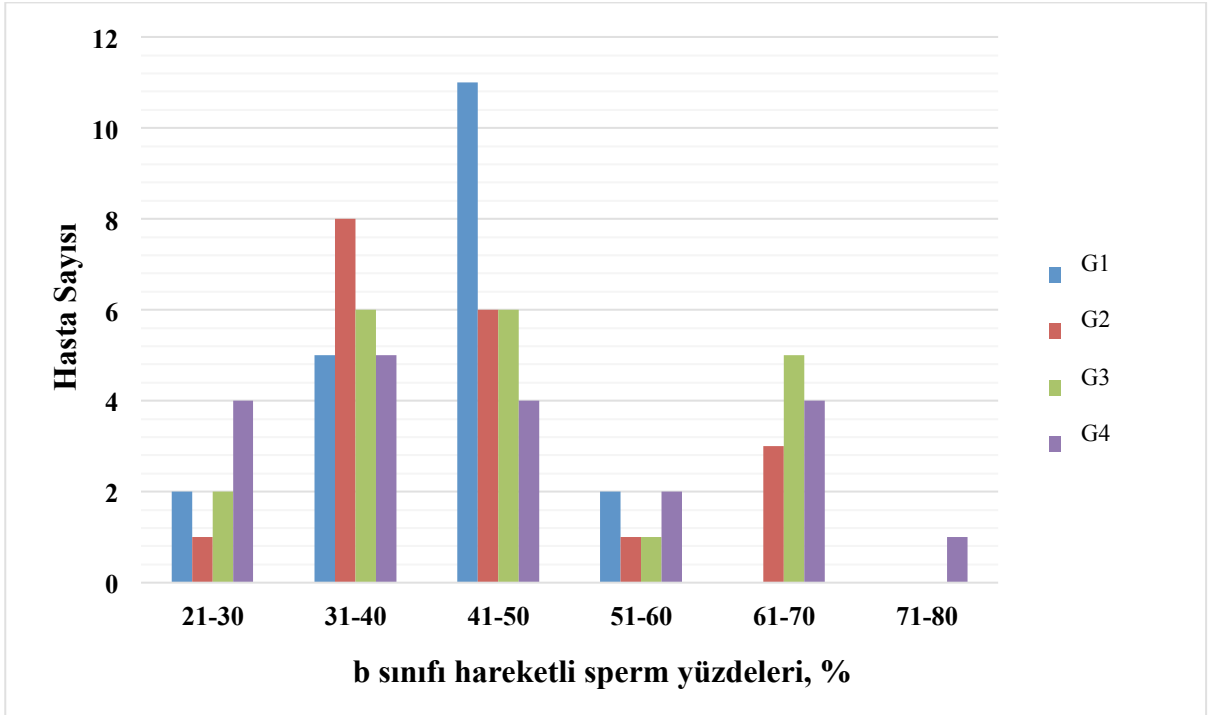
b sınıfı hareket = yavaş progresif hareket

Toplam hareket = a+b+c



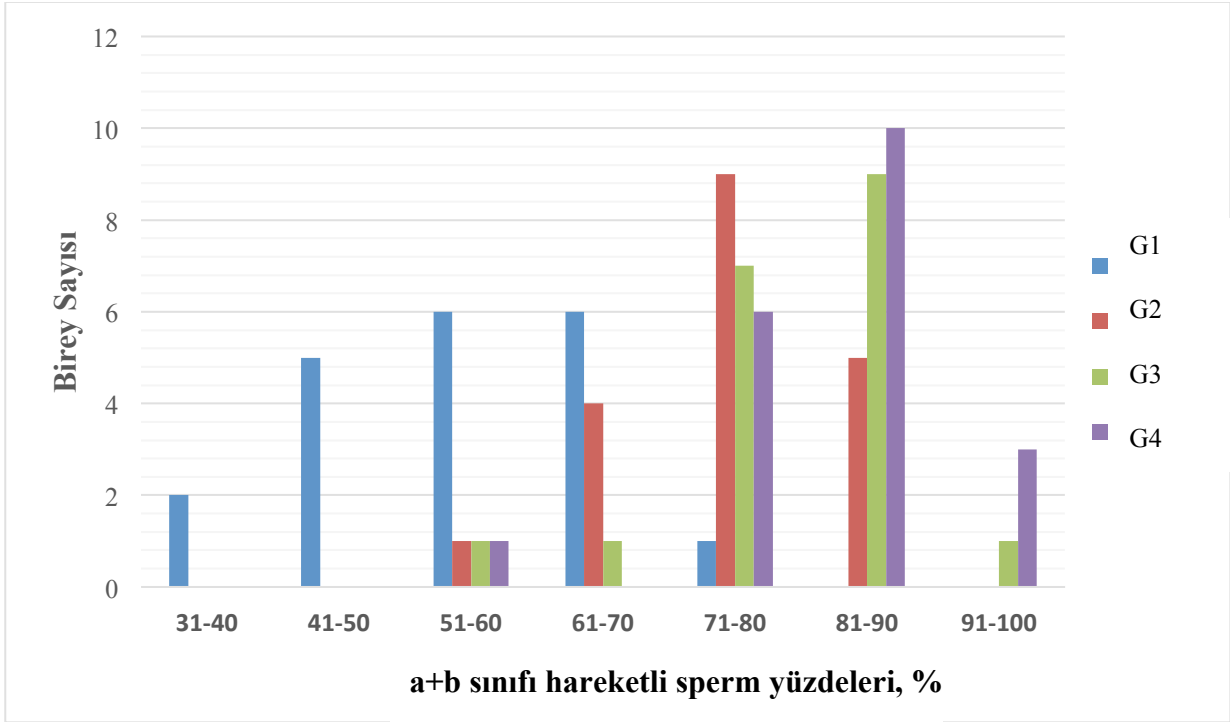
**Çizim 4.2.** Gruplara ait a sınıfı hareketli sperm yüzde dağılımını gösteren grafik.

Çizim 4.2.'de density gradient, swim up ve mikro akışkan çip yöntemleri ile yıkama sonrası a sınıfı hareketli sperm yüzdesinin işlem uygulanmayan semen grubuna göre anlamlı derecede arttığı, ayrıca yıkama uygulanan gruplar arasında da anlamlı fark olduğu ( $P<0.0001$ ) görülmektedir. A sınıfı hareketliliğe ait yüzde ortalamaları, density gradient sonrası %29,70, swim up sonrası %33,30 ve mikro akışkan çip sonrası %35,60 iken yıkama öncesi semen grubunda %12,30 olarak hesaplandı.



**Çizim 4.3.** Gruplara ait b sınıfı hareketli sperm yüzde dağılımını gösteren grafik.

Çizim 4.3.'de sadece b sınıfı hareketli sperm yüzdeleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark olmadığı ( $P=0.136$ ) görülmektedir. b sınıfı hareketliliğe ait yüzde ortalamaları, yıkama öncesi semen grubunda %42,00, density gradient sonrası %44,80, swim up sonrası %47,00 ve mikro akışkan çip sonrası %47,40 olarak hesaplandı.



**Çizim 4.4.** Gruplara ait a+b sınıfı hareketli sperm yüzde dağılımını gösteren grafik.

Çizim 4.4’de a+b sınıfı hareketli sperm yüzdeleri bakımından bütün gruplar arasında anlamlı fark olduğu ( $P < 0.0001$ ) görülmektedir. a+b sınıfı hareketliliğe ait yüzde ortalamaları, yıkama öncesi semen grubunda %54,55, density gradient sonrası %75,05, swim up sonrası %79,60 ve mikro akışkan çip sonrası %83,55 olarak hesaplandı.

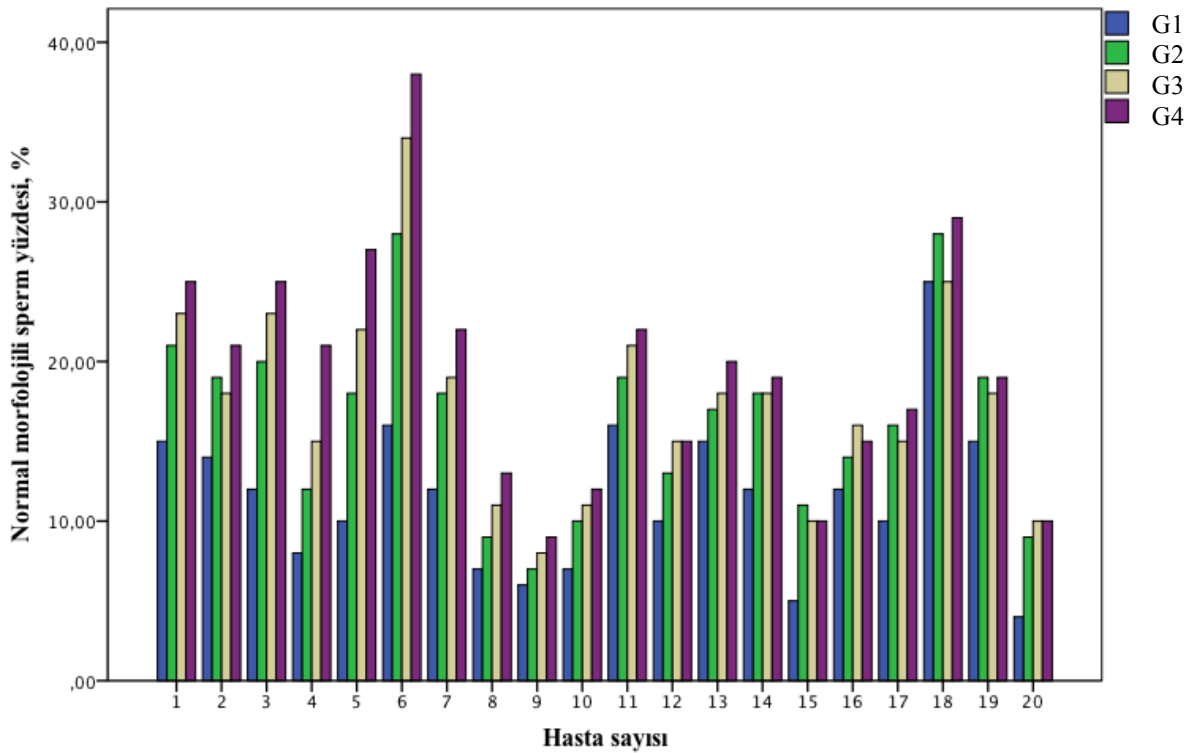
### 4.3. Sperm Morfolojisi

Gruplara ait normal morfolojili sperm yüzde ortalama ve standart sapmaları semen (G1), density gradient (G2), swim up (G3) ve mikro akışkan çip (G4) yöntemleri için;  $11,55 \pm 4,893$ ,  $16,30 \pm 5,786$ ,  $17,50 \pm 6,211$  ve  $19,45 \pm 7,265$  olarak hesaplandı (Çizelge 4.4). Normal morfolojili sperm yüzde ortalama değerleri her üç yıkama metodu ve kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark olduğu ( $P < 0.0001$ ) ancak density gradient ve swim up grupları arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi. Semen grubuna göre her 3 yıkama metodunda da normal morfolojili sperm yüzdesinde artış görülmekle birlikte mikro akışkan çip yöntemindeki artışın swim up ve density gradient yöntemlerinden daha fazla olduğu görüldü (Çizim 4.5). Sonuç olarak density gradient ve swim up yöntemlerinde normal morfolojili sperm yüzdesinde benzer artış oranı görülürken mikro akışkan çip yönteminde bu artış oranının diğer yöntemlere göre daha fazla olduğu belirlendi.



**Çizelge 4.4.** Tüm grupların normal morfolojili sperm yüzdelere ait istatistiksel değerleri.

Normal morfoloji (%)	N	Minimum	Maximum	Ortalama	SD	P
Semen (G1)	20	4,00	25,00	11,55	4,893	<0.0001
Density gradient (G2)	20	7,00	28,00	16,30	5,786	
Swim up (G3)	20	8,00	34,00	17,50	6,211	
Mikro akışkan çip (G4)	20	9,00	38,00	19,45	7,265	



**Çizim 4.5.** Gruplara ait normal morfolojili sperm yüzde dağılımını gösteren grafik.

Çizim 4.5’de semen (G1), density-gradient (G2), swim up (G3), mikro akışkan (G4) (n=20 semen örneği) seçim yöntemleri ile elde edilen spermere ait normal morfolojili sperm yüzdeleri görülmektedir. Her dikey sütun her bireye ait ortalamayı göstermektedir. Semendeki normal morfolojili sperm yüzdesine göre yıkama yöntemleri sonrası normal morfolojili sperm yüzdelerinde anlamlı fark olduğu ( $P<0.0001$ ) ayrıca swim up ve density gradient yöntemleri kendi aralarında kıyaslandığında ise anlamlı fark olmadığı görülmektedir.

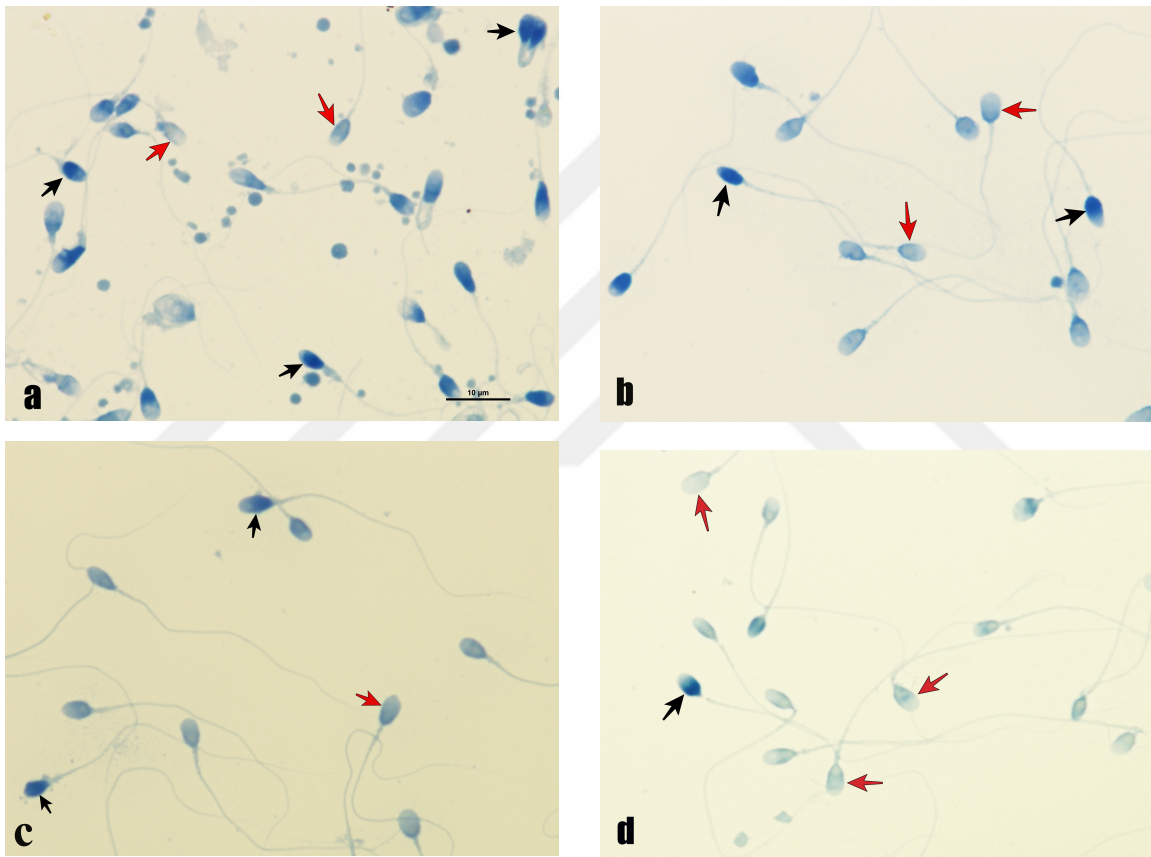
#### 4.4. Sperm Kromatin Kondensasyonu

Sperm kromatin kondensasyon defekti hakkında bilgi veren Asidik Anilin Mavisini ve Toluidin Mavisini boyamaları ile gruplar arası + boyanan sperm başları kromatin kondensasyon defektli sperm olarak değerlendirildi (Çizim 4.6-Çizim 4.7). Semen (G1), density gradient (G2), swim up (G3) ve mikro akışkan çip (G4) yöntemlerine ait + boyanma yüzdeleri hesaplandı. Semen grubu ile density gradient (G2), swim up (G3) ve mikro akışkan çip (G4) yöntemleri anilin mavisini boyanma yüzdeleri olarak karşılaştırıldığında her 3 yıkama sonrasında da anlamlı azalma olduğu görülmüştür ( $P<0.0001$ ).

Grupları ayrı ayrı incelediğimizde density gradient, swim up ve mikro akışkan çip yöntemlerinde Asidik Anilin Mavisini ile elde edilen verilere göre kromatin kondensasyon defekti %42,60, %33,90 ve %26,80 olarak hesaplandı (Çizelge 4.5). Yıkama yöntemleri de kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olduğu ve kromatin kondensasyon defektinin en az mikro akışkan çip, en fazla ise density gradient yıkama yönteminde olduğu hesaplanmıştır.

**Çizelge 4.5.** Tüm grupların Asidik Anilin Mavisi + boyanma yüzdelere ait istatistiksel değerleri.

+ boyanma (%)	N	Minimum	Maximum	Ortalama	SD	P
Semen (G1)	20	26,00	91,00	56,70	19,531	<0.0001
Density gradient (G2)	20	7,00	80,00	42,60	20,896	
Swim up (G3)	20	5,00	67,00	33,90	17,115	
Mikro akışkan çip (G4)	20	4,00	56,00	26,80	14,895	



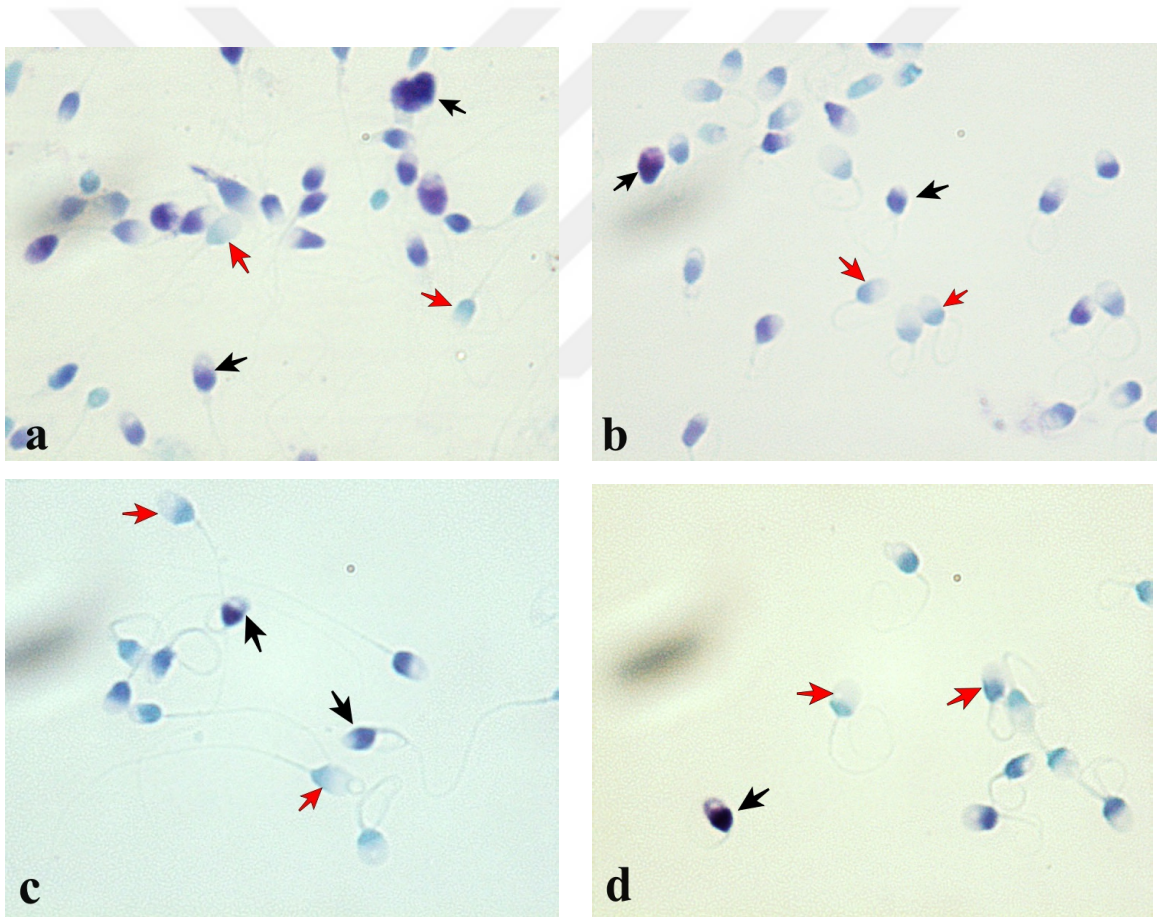
**Çizim 4.6.** Asidik Anilin Mavisi ile boyanma sonucu anormal kromatin kondensasyonuna sahip (siyah ok) sperm başları koyu mavi, normal kromatin kondensasyonuna sahip (kırmızı ok) sperm başları ise açık mavi görülmektedir. Semen (a), density gradient (b), swim up (c) ve mikro akışkan çip (d) yöntemlerine ait fotoğraflar.

Toluidin mavisi ile elde edilen verilere göre density gradient, swim up ve mikro akışkan çip yöntemlerinde kromatin kondensasyon defektleri %42,30, %32,20 ve %25,80 olarak hesaplandı. Semen grubu ile diğer yıkama yöntemleri Toluidin mavisi boyanma yüzdeleri olarak karşılaştırıldığında her 3 yıkama sonrasında da anlamlı azalma olduğu

görülmüştür ( $P < 0.0001$ ). Yıkama yöntemleri kendi aralarında karşılaştırıldığında Asidik anilin mavisi bulgularına benzer olarak aralarında anlamlı fark olduğu ve kromatin kondensasyon defektinin en az mikro akışkan çip, en fazla ise density gradient yıkama yönteminde olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** Tüm grupların Toluidine Mavisi ile + boyanma yüzdelere ait istatistiksel değerleri.

+ boyanma (%)	N	Minimum	Maximum	Ortalama	SD	P
Semen (G1)	20	22,00	92,00	53,80	21,045	<b>&lt;0.0001</b>
Density gradient (G2)	20	13,00	88,00	42,30	19,767	
Swim up (G3)	20	9,00	75,00	32,20	16,401	
Mikro akışkan çip (G4)	20	7,00	60,00	25,80	14,489	



**Çizim 4.7.** Toluidin Mavisi ile boyanma sonucu anormal kromatin kondensasyonuna sahip (siyah ok) spermler başları koyu mavi ve mor, normal kromatin kondensasyonuna sahip (kırmızı ok) spermler başları ise açık mavi ve yeşil görülmektedir. Semen (a), density gradient (b), swim up (c) ve mikro akışkan çip (d) yöntemlerine ait fotoğraflar.

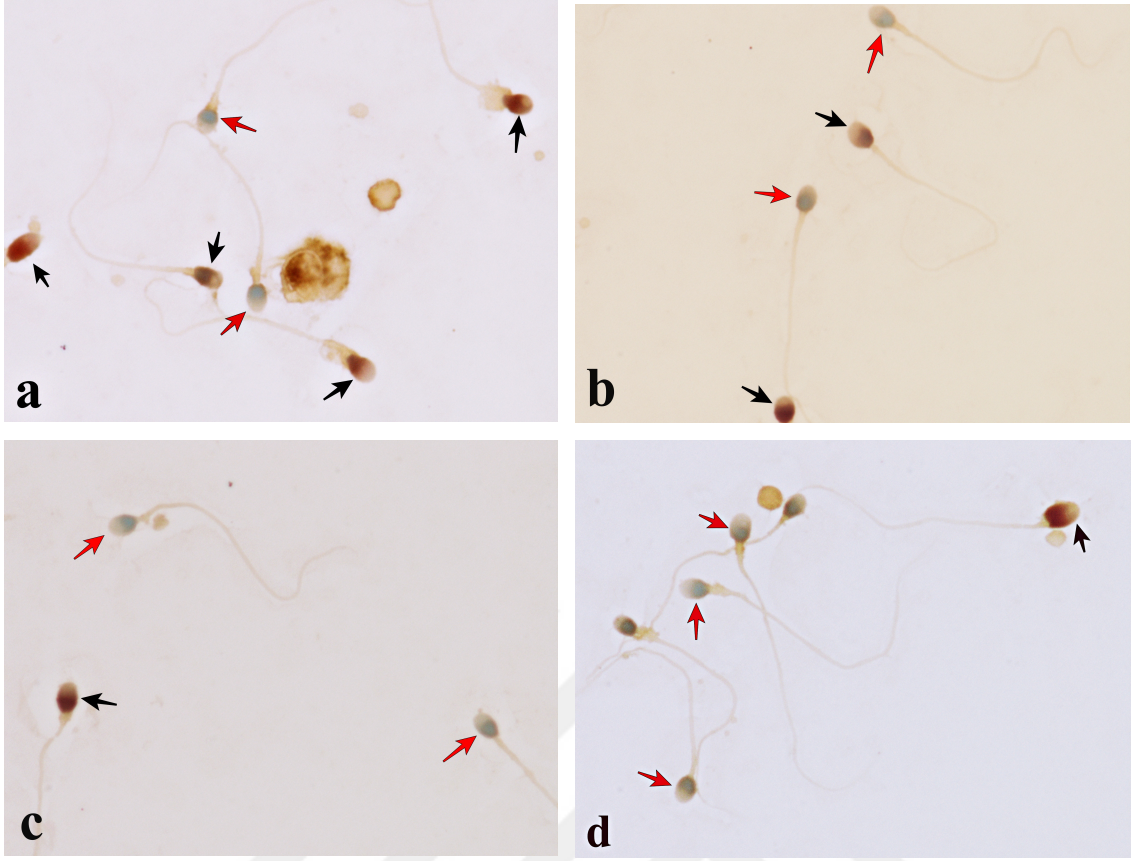
#### 4.5. Sperm DNA Fragmantasyonu

TUNEL boyaması ile değerlendirilen semen, density gradient, swim up ve mikro akışkan çip yöntemlerine ait sperm DNA fragmantasyonu yüzde ortalamaları; %30,1±13,859, %9,25±3,971, %5,95±2,928 ve %3,30±2,273 olarak hesaplandı. Yıkama öncesi semen (G1) ile yıkama sonrası density gradient (G2), swim up (G3) ve mikro akışkan çip (G4) yöntemleri karşılaştırıldığında tümünde sperm DNA fragmantasyonunda anlamlı azalma ve anlamlı fark olduğu görüldü (P <0.0001).

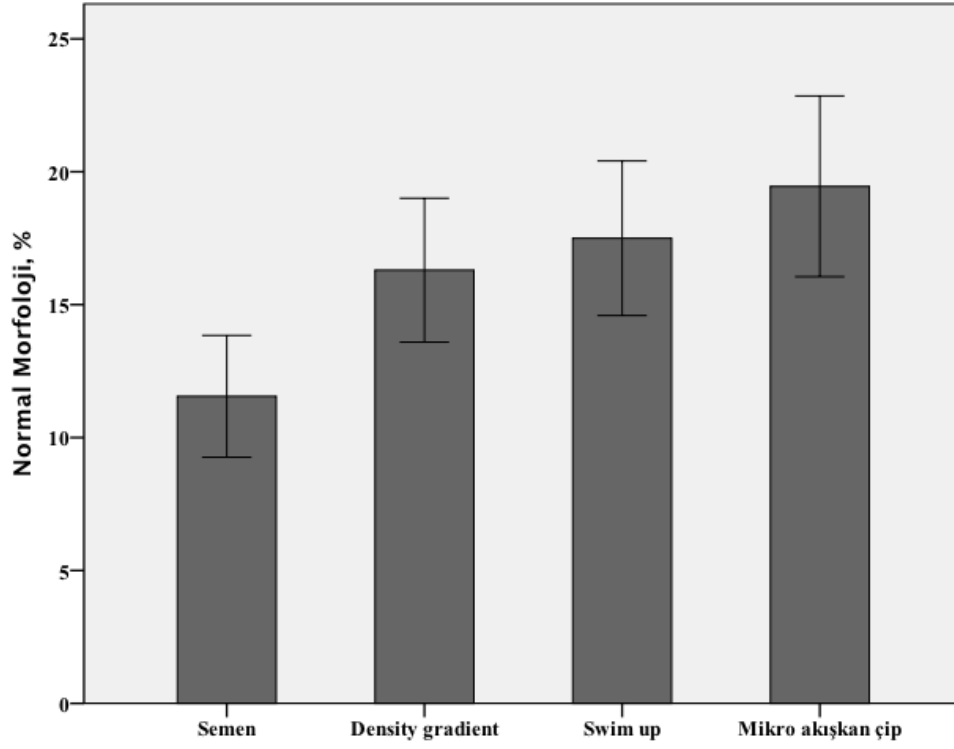
Ayrıca yıkama yöntemleride kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark olduğu ve sperm DNA fragmantasyonunun en az mikro akışkan çip, en fazla ise density gradient yıkama yönteminde olduğu hesaplanmıştır (Çizelge 4.7).

**Çizelge 4.7.** Tüm grupların TUNEL ile + boyanma yüzdelerine ait istatistiksel değerleri.

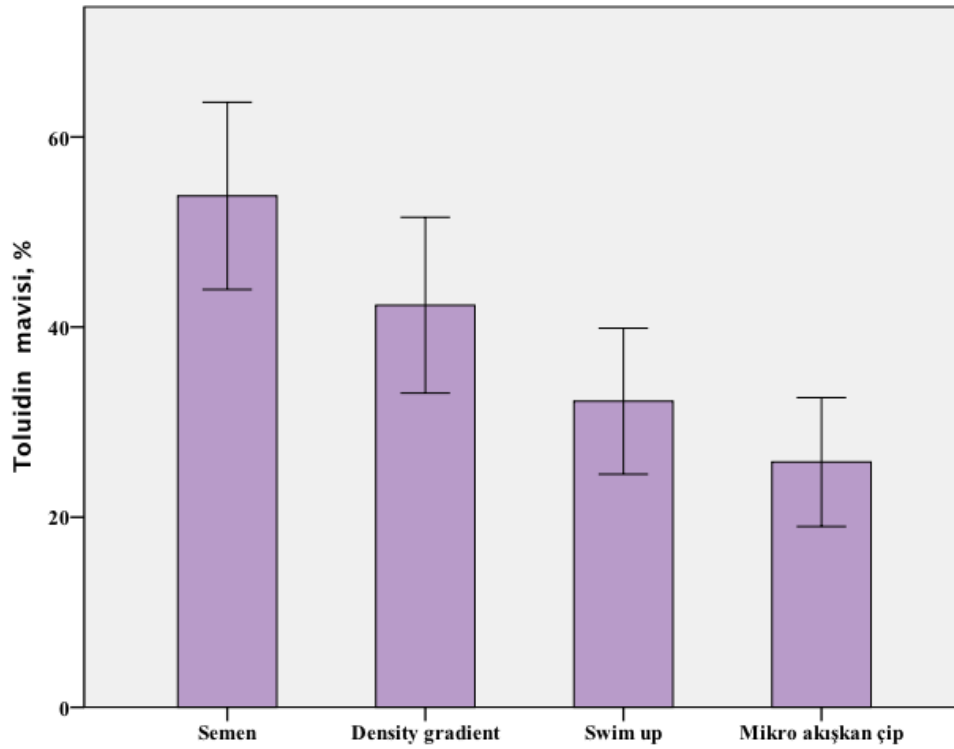
+ boyanma (%)	N	Minimum	Maximum	Ortalama	SD	P
Semen (G1)	20	10,00	61,00	30,1	13,859	<0.0001
Density gradient (G2)	20	4,00	19,00	9,25	3,971	
Swim up (G3)	20	2,00	12,00	5,95	2,928	
Mikro akışkan çip (G4)	20	1,00	8,00	3,30	2,273	



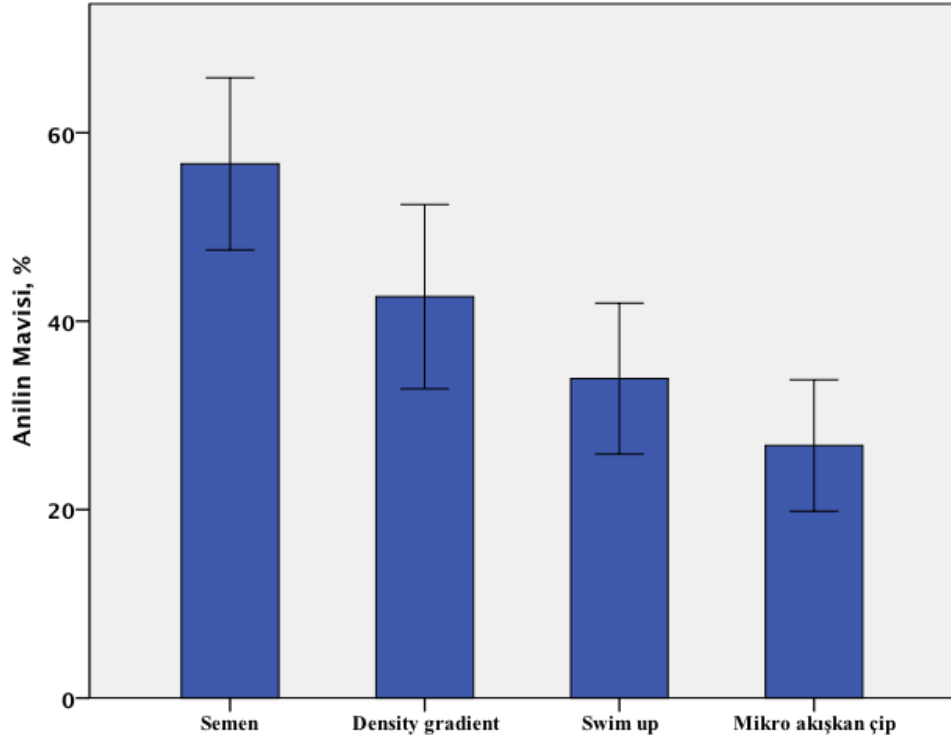
**Çizim 4.8.** TUNEL yöntemi ile boyanan DNA fragmentasyonuna sahip (apoptotik) (siyah ok) sperm başları kahverengi, DNA fragmentasyonu (apoptotik) olmayan (kırmızı ok) sperm başları yeşil görülmektedir. Semen (a), density gradient (b), swim up (c) ve mikro akışkan çip (d) yöntemlerine ait fotoğraflar.



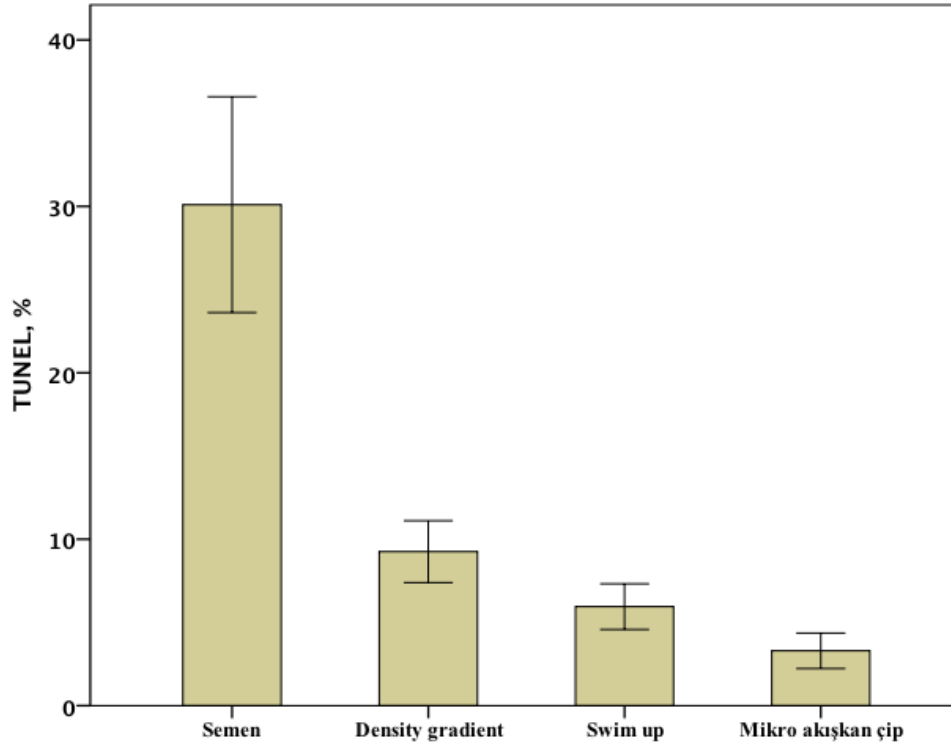
**Çizim 4.9.** Gruplar ve normal morfolojili sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.



**Çizim 4.10.** Gruplar ve toluidin mavisi ile + boyanan kromatin kondensasyon defektli sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.



**Çizim 4.11.** Gruplar ve asidik anilin mavisi ile + boyanan kromatin kondensasyon defektli sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.



**Çizim 4.12.** Gruplar ve TUNEL + boyanan DNA fragmentasyonuna sahip sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.



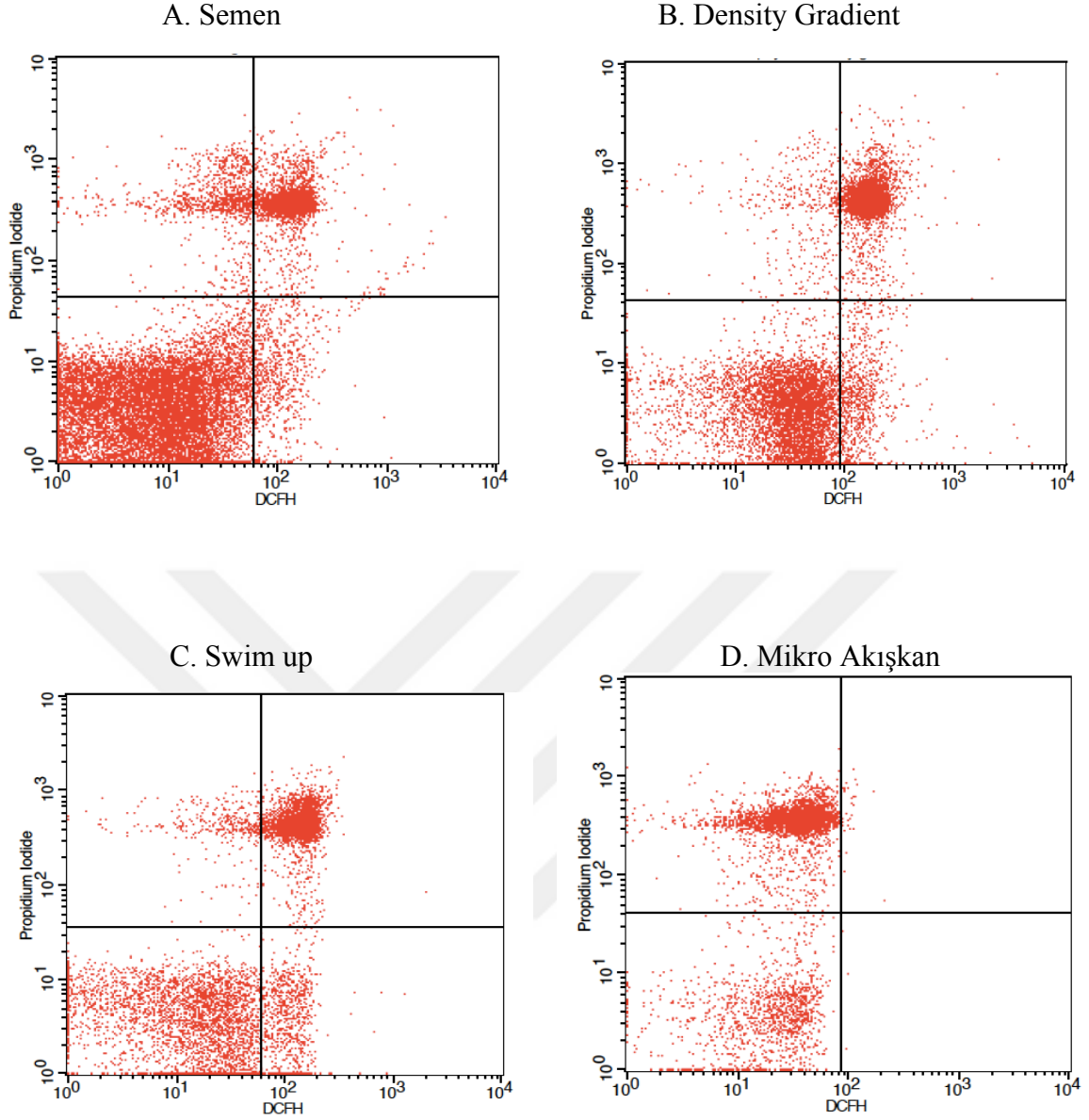
#### 4.6. Flowsitometrik ROS Analizi

Sperm dışı yapılar, ilgilenilen hücre popülasyonunu çevreleyen bir bölge çizilerek ön ve yan saçma nokta çizimine dayalı olarak değerlendirme dışında tutuldu ve elde edilen veriler her örnek için listelendi (Çizim 4.13).

Gruplara ait flowsitometrik ROS seviyeleri Çizim 4.14’de ve Çizelge 4.8’de gösterilmektedir. DCFH (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ile boyanma sonuçlarına göre gruplar karşılaştırıldığında kendi aralarında anlamlı fark olduğu görüldü (P<0.0001). ROS analizlerine göre gruplar arasında DCFH ile boyanan sperm sayısı, swim up yönteminde en yüksek (%23,74) ve mikro akışkan çip yönteminde anlamlı olarak en düşük (%7,45) olarak hesaplandı. Density gradient ve swim up yöntemlerinde ise semen grubuna (%12,47) göre hücre içi ROS oranının %20,43 ve %23,74 olarak arttığı belirlendi.

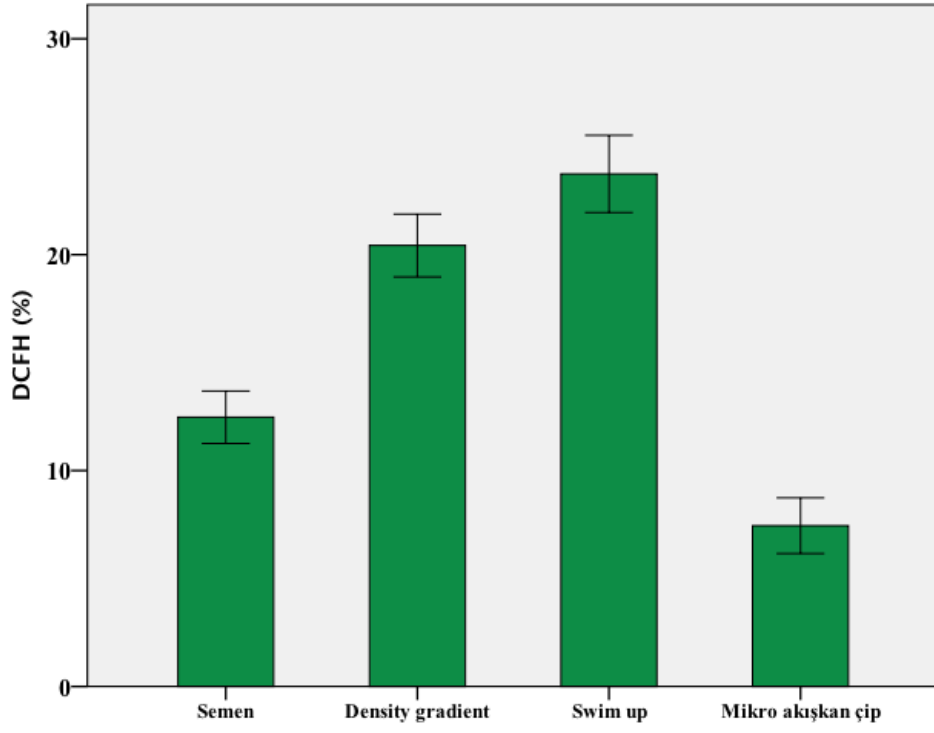
**Çizelge 4.8.** Tüm grupların DCFH ile pozitif boyanma yüzdelerine ait istatistiksel değerleri.

DCFH + (%)	N	Minimum	Maximum	Ortalama	SD	P
Semen (G1)	20	7,55	17,65	12,47	2,597	<0.0001
Density gradient (G2)	20	14,76	25,90	20,43	3,104	
Swim up (G3)	20	16,56	33,08	23,74	3,827	
Mikro akışkan çip (G4)	20	0,54	11,39	7,45	2,753	



**Çizim 4.13.** Gruplara ait DCFH ve propidium iyodid ile boyanan spermelerde flow sitometrik ROS ölçüm değerleri.

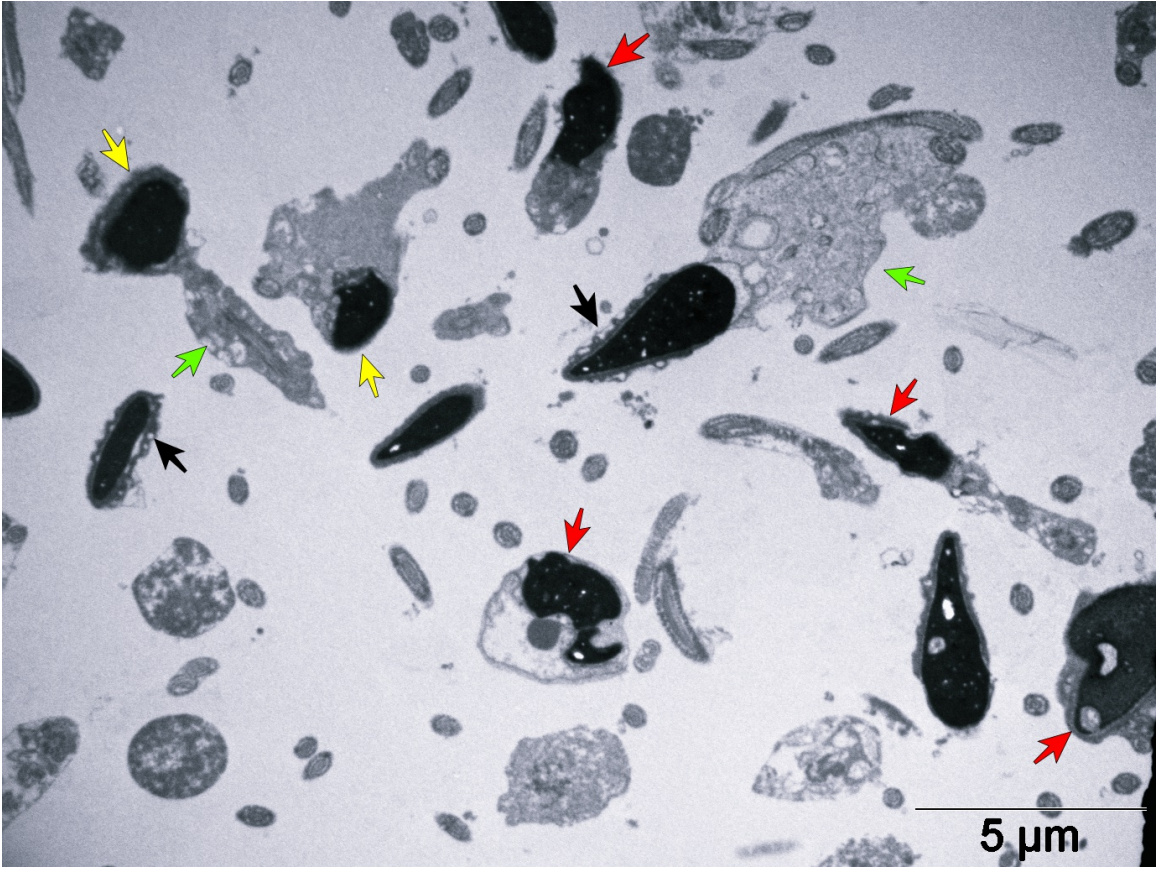
Çizim 4.13’de gruplara ait hücre içi hidrojen peroksit ölçümlerinin nokta çizim histogramları görülmektedir. Histogramların alt sol dörtgeni (quadran) canlı boyanmayan spermeleri, alt sağ dörtgen ise canlı ve hücre içi yüksek hidrojen peroksit tespit edilen spermeleri göstermektedir. Bununla beraber üst sol dörtgen hidrojen peroksit tespit edilmeyen apoptotik hücreleri ve üst sağ ise hücre içi yüksek hidrojen peroksit tespit edilen apoptotik spermeleri göstermektedir. Değerlendirme için alt sağ dörtgene ait DCFH (+) ve PI (-) spermelere ait ortalama DCFH floresan yoğunluğu hesaplandı.



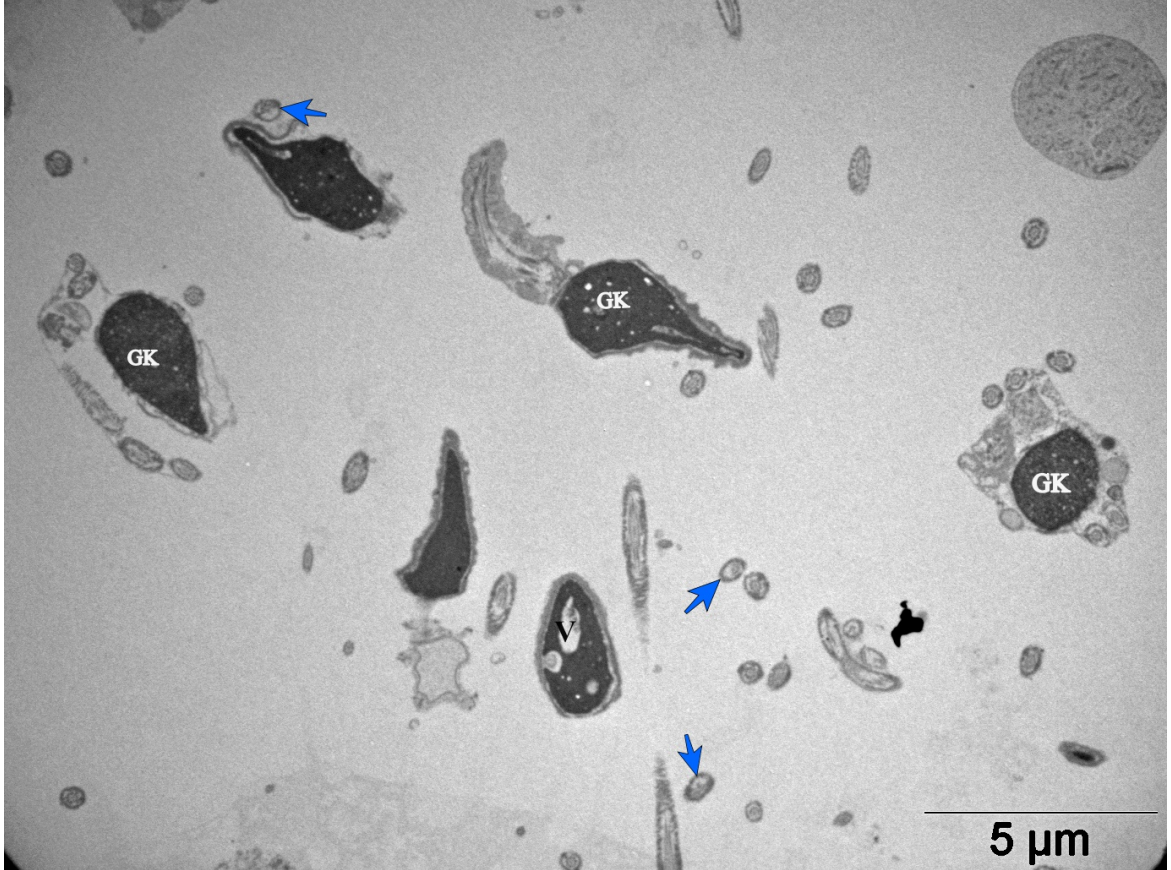
**Çizim 4.14.** Gruplar ve DCFH + boyanan hücre içi ROS yüksek olan sperm yüzde ortalamaları  $\pm$  standart sapma arasındaki ilişki.

#### 4.7. TEM BULGULAR

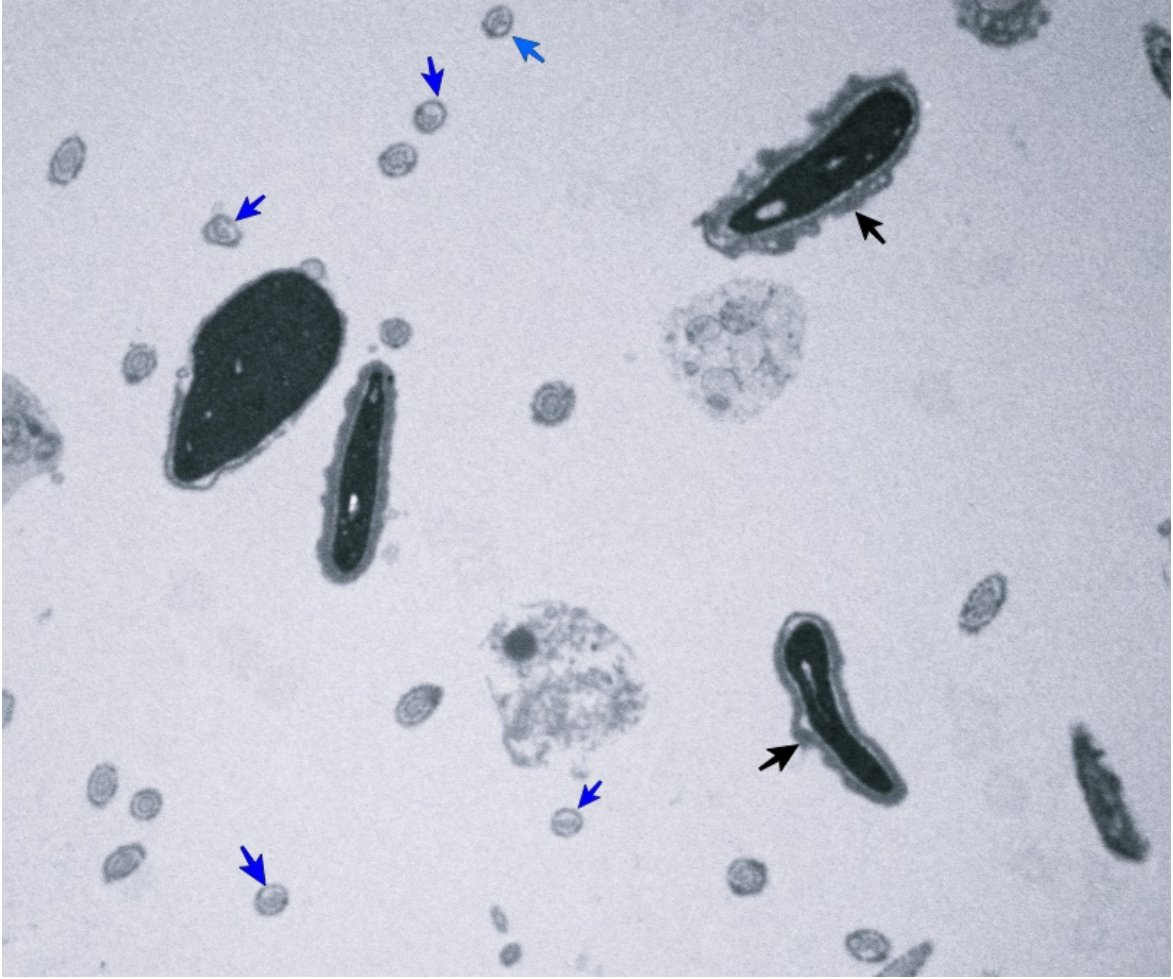
Transmisyon elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde semen grubuna ait sperm örneklerinde başa ait yapılarda; kromatin kondensasyon defektlerine, kromatin içerisinde farklı derecelerde vakuolizasyona, amorf, uzamış, yuvarlak, çift başlı, immature form ve akrozom defektlerine, ayrıca orta parça ve kuyrukta da anormalliklere sperm yıkama metodları uygulanmış diğer gruplara göre daha sıklıkla rastlandı (Çizim 4.15-4.16). Yıkama sonrası elde edilen gruplara ait spermleri incelediğimizde kromatine ait kondensasyon defektlerine (Çizim 4.18) ve apopitoza (Çizim 4.21) her üç grupta, özellikle G3 ve G4'de daha az rastlandı Ayrıca sperm akrozomlarında; en sıklıkla akrozomal (irregülasyon) düzensizlik olmak üzere (Çizim 4.19), yoğunluk azalması, hipoplazi, inklüzyon (Çizim 4.24) gibi yapısal defektlere G2'de G3 ve G4'e göre daha sık rastlandı. Kondanse kromatin ve normal akrozom yapısına sahip spermler ise G3 ve G4'de sıklıkla görüldü.



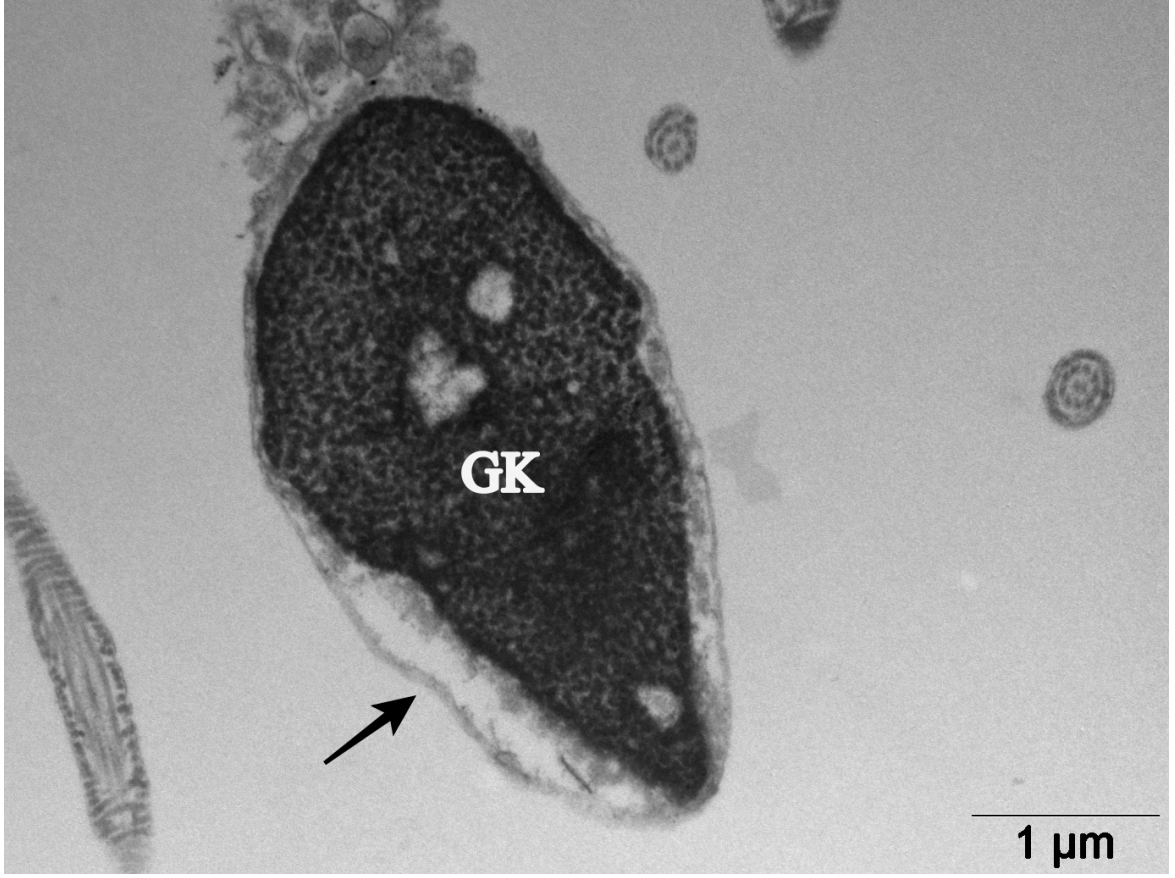
**Çizim 4.15.** Semen grubuna ait elektron mikroskobik görüntü; kromatin içerisinde farklı derecelerde vakuolizasyon, amorf (kırmızı ok) ve yuvarlak (sarı ok) baş, akrozomal defektler (siyah ok), ayrıca orta parçada ve boyunda (yeşil ok) anormallikler (x5000)



**Çizim 4.16.** Semen grubuna ait elektron mikroskopik görüntü; başta granüler kromatin (GK) ve vakuol (V) yapısı ve kuyrukta 9+2 mikrotübül yapısında eksiklik (mavi ok) (x5000)

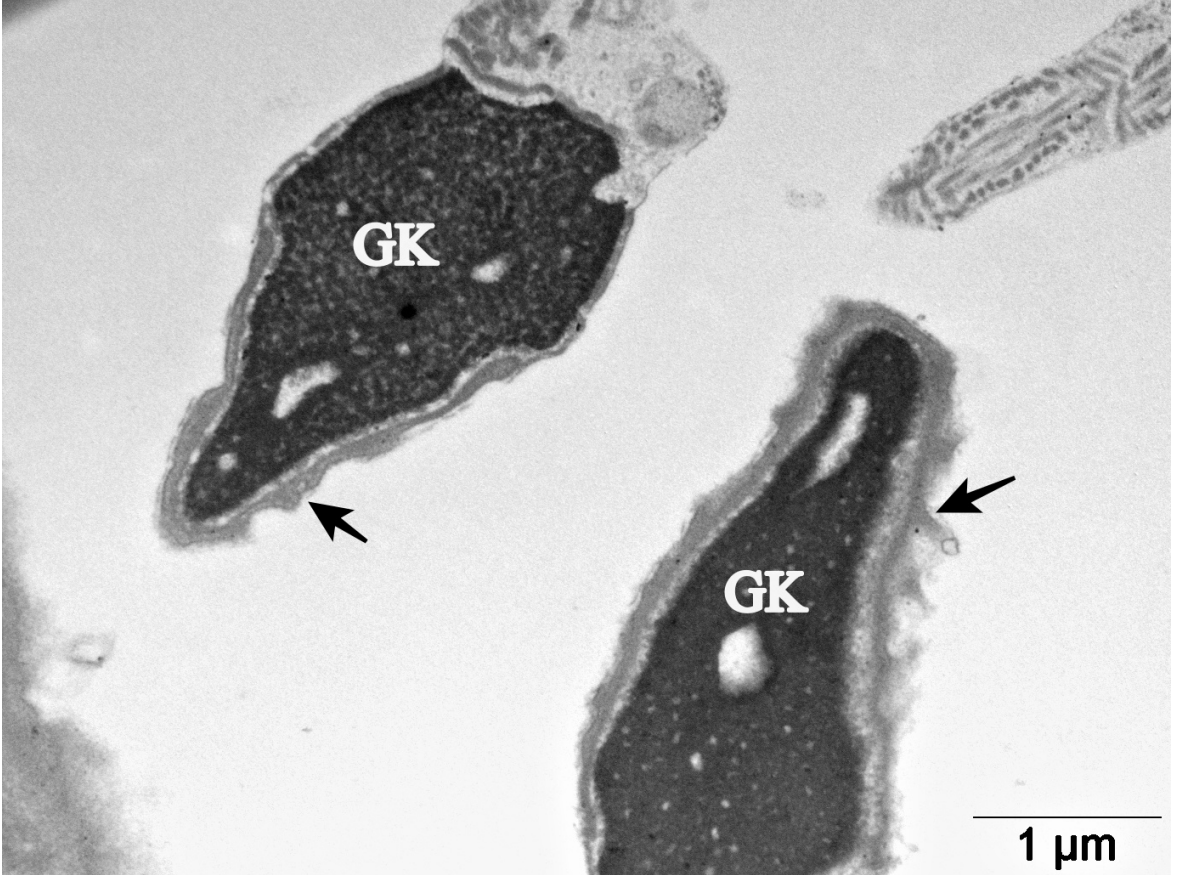


**Çizim 4.17.** Density gradient grubuna ait elektron mikroskobik görüntü; akrozomal (irregülasyon) düzensizlik ve kuyrukta 9+2 mikrotübül yapısında eksiklik (mavi ok)(x5000).

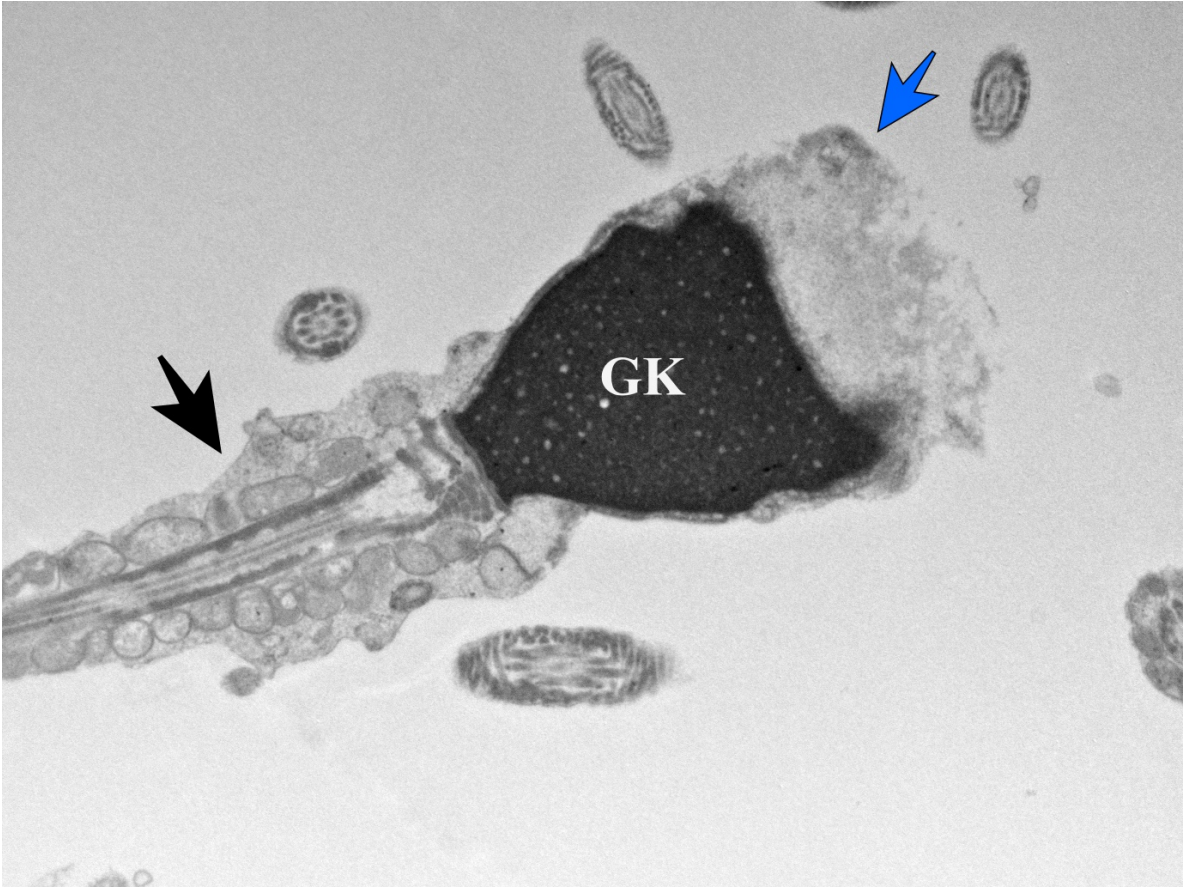


**Çizim 4.18.** Kromatin kondensasyonu anormal, granüler kromatinli (GK) başa sahip, akrozomal düzensizliği ve genişlemeleri (ok) bulunan spermatozoon (x20000).

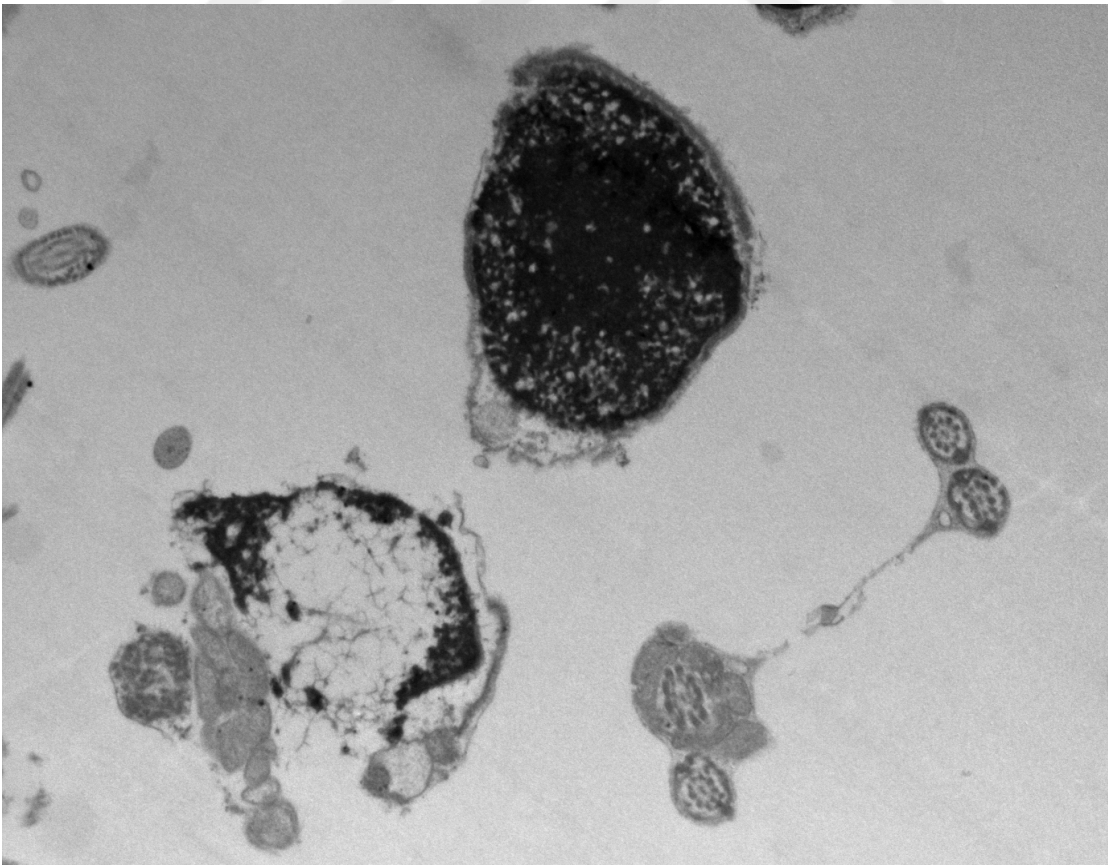
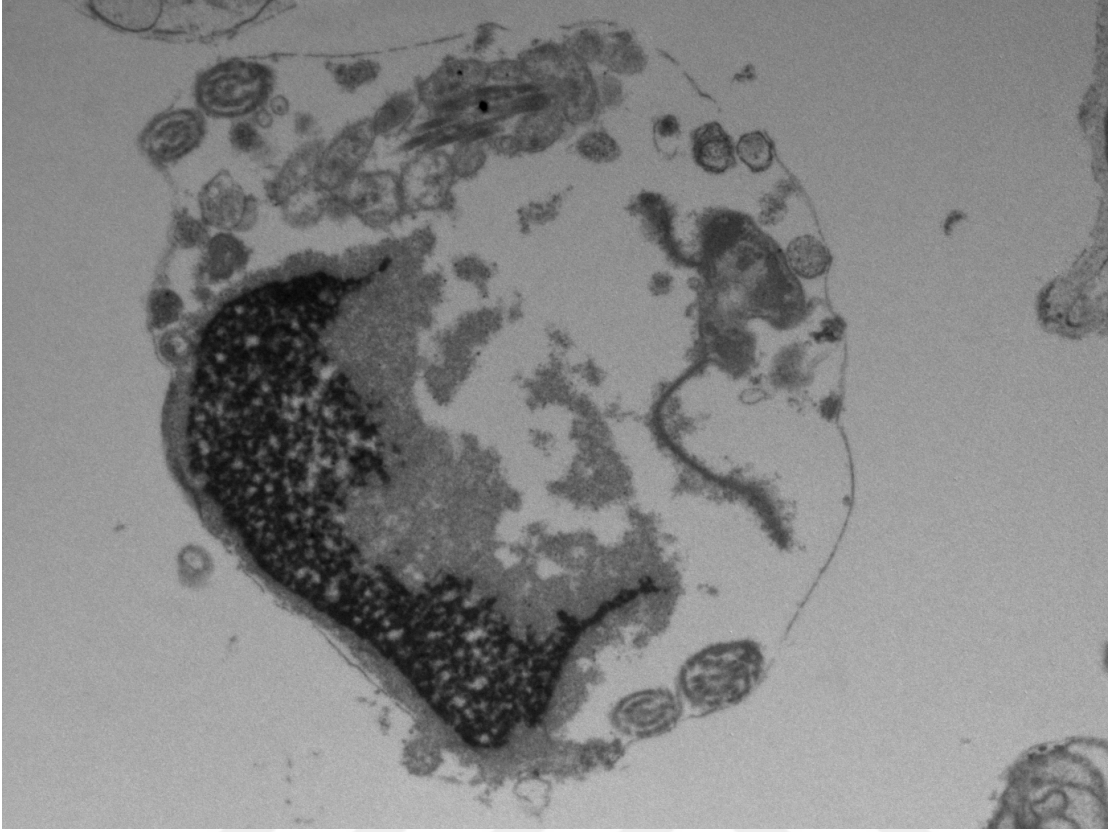




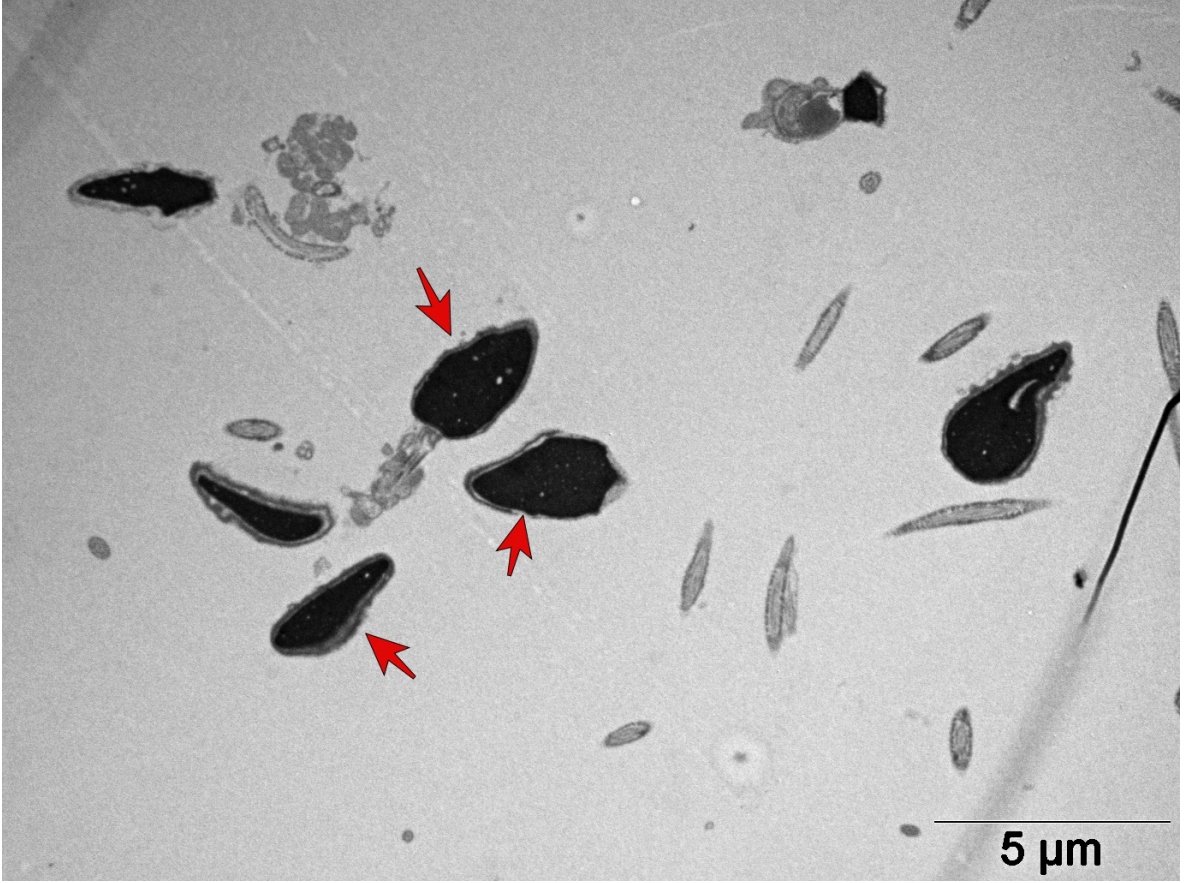
**Çizim 4.19.** Granüler kromatin (GK) ve akrozomal düzensizliğe (ok) sahip spermatozoa (x20000).



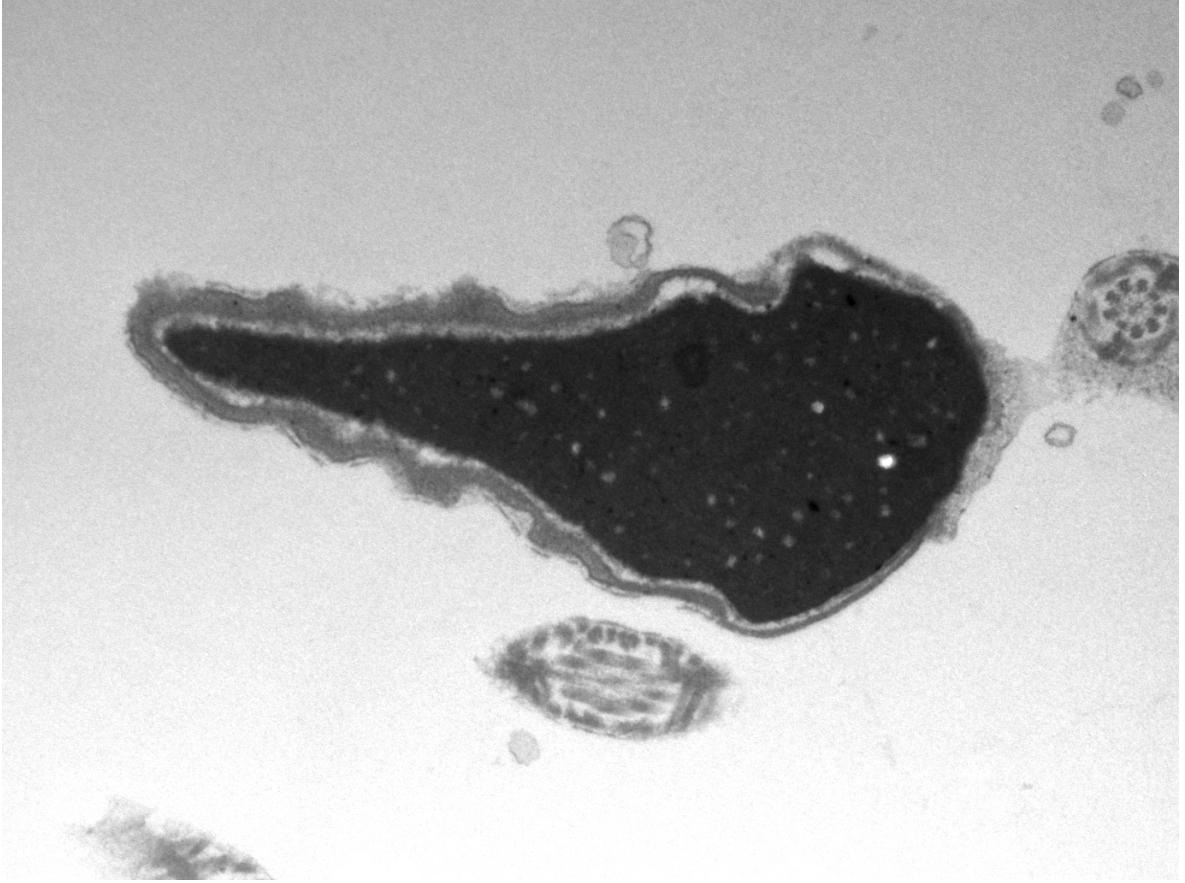
**Çizim 4.20.** Granüler kromatinli (GK), akrozomda düzensizlik ve yoğunluk azalmasına (mavi ok) sahip, stoplazmik dropletli (siyah ok) amorf başlı spermatozoon. (x15000)



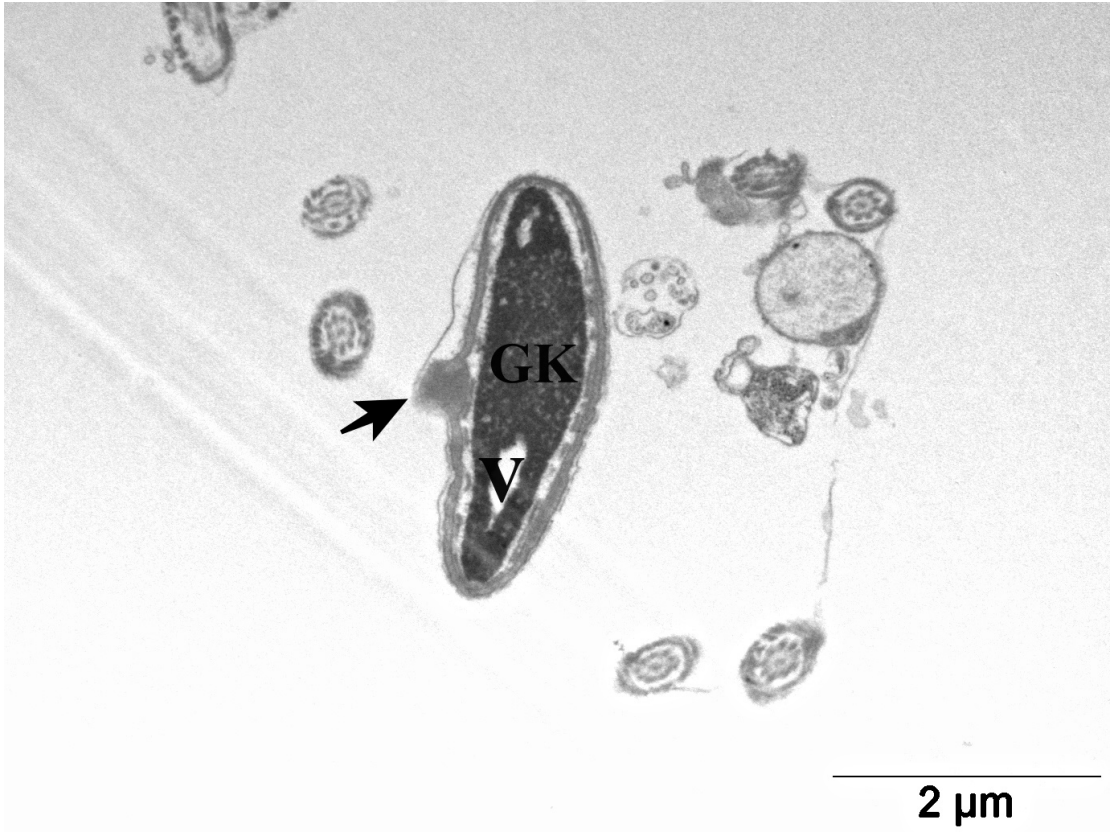
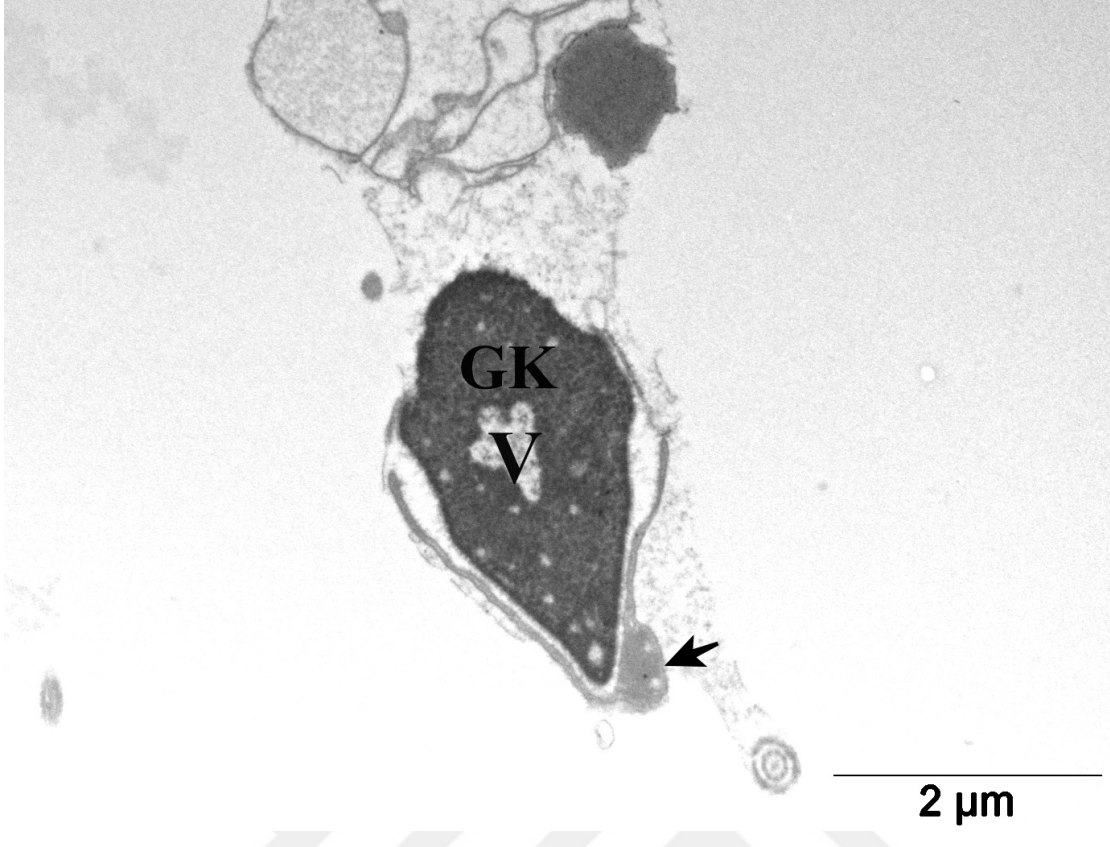
**Çizim 4.21.** Apoptotik spermatozoon görüntüleri (x15000)



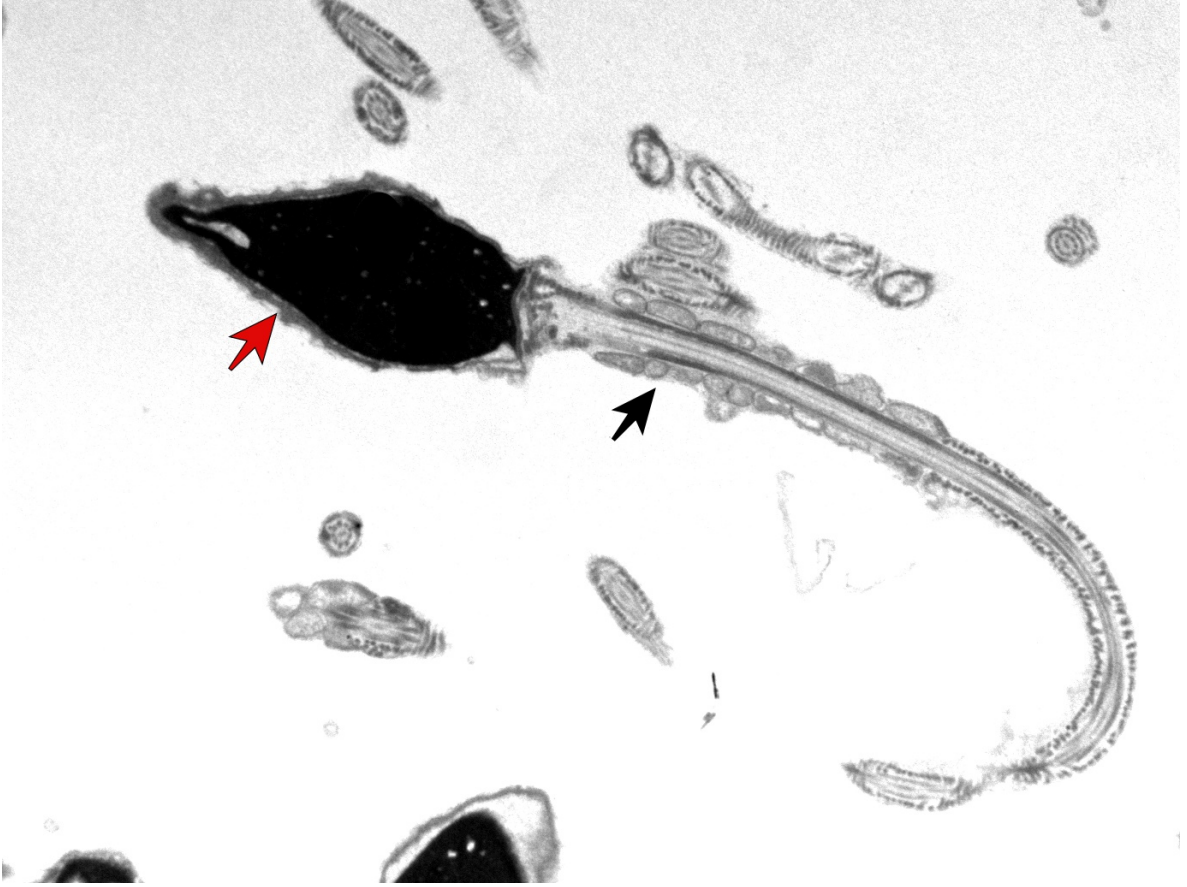
**Çizim 4.22.** Swim up grubuna ait elektron mikroskobik görüntü; normal kromatin kondensasyonu ve akrozoma (kırmızı ok) sahip spermatozoa (x5000).



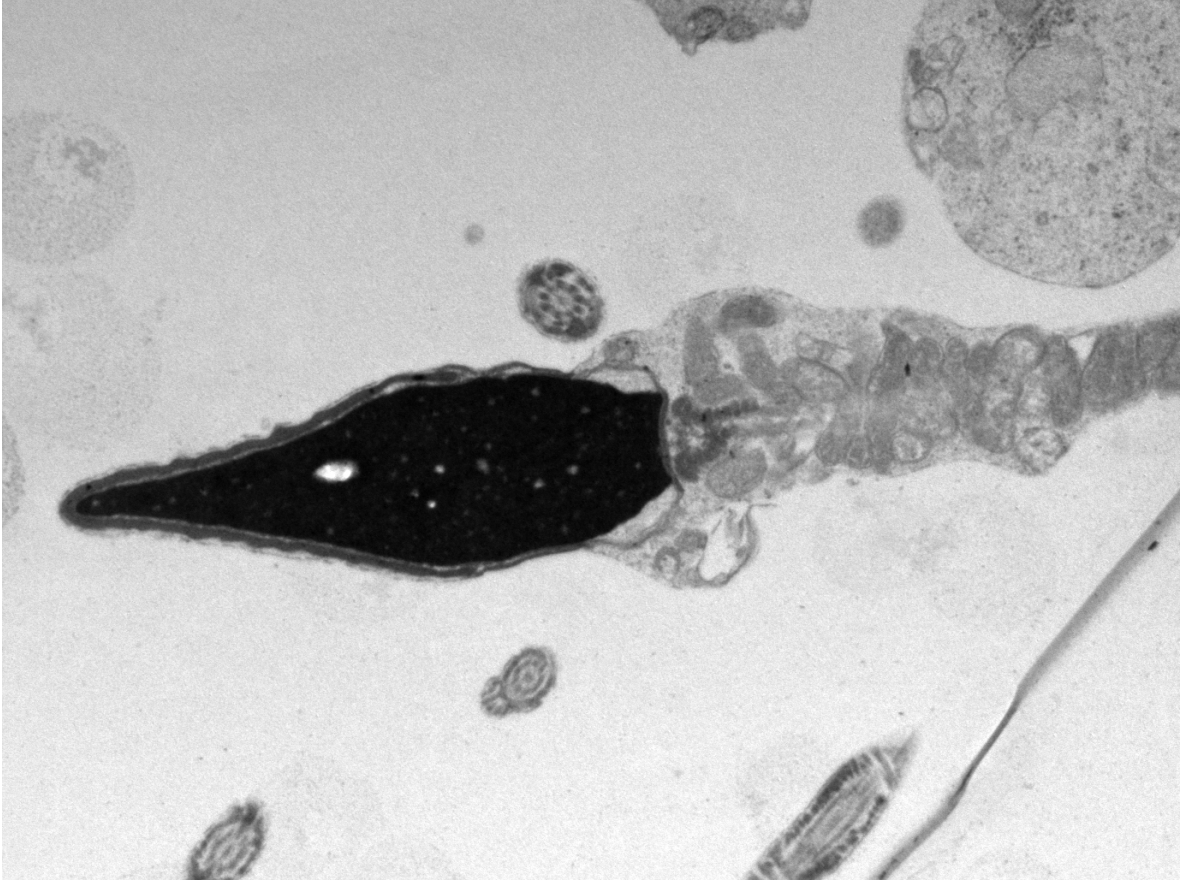
**Çizim 4.23.** Akrozomal düzensizliğe ve normal kromatin kondensasyonuna sahip spermatozoon (x25000 )



**Çizim 4.24.** Akrozomda inklüzyon (ok) ve granüler kromatine (GK) sahip vakuollü (V) baş yapıları (x15000).

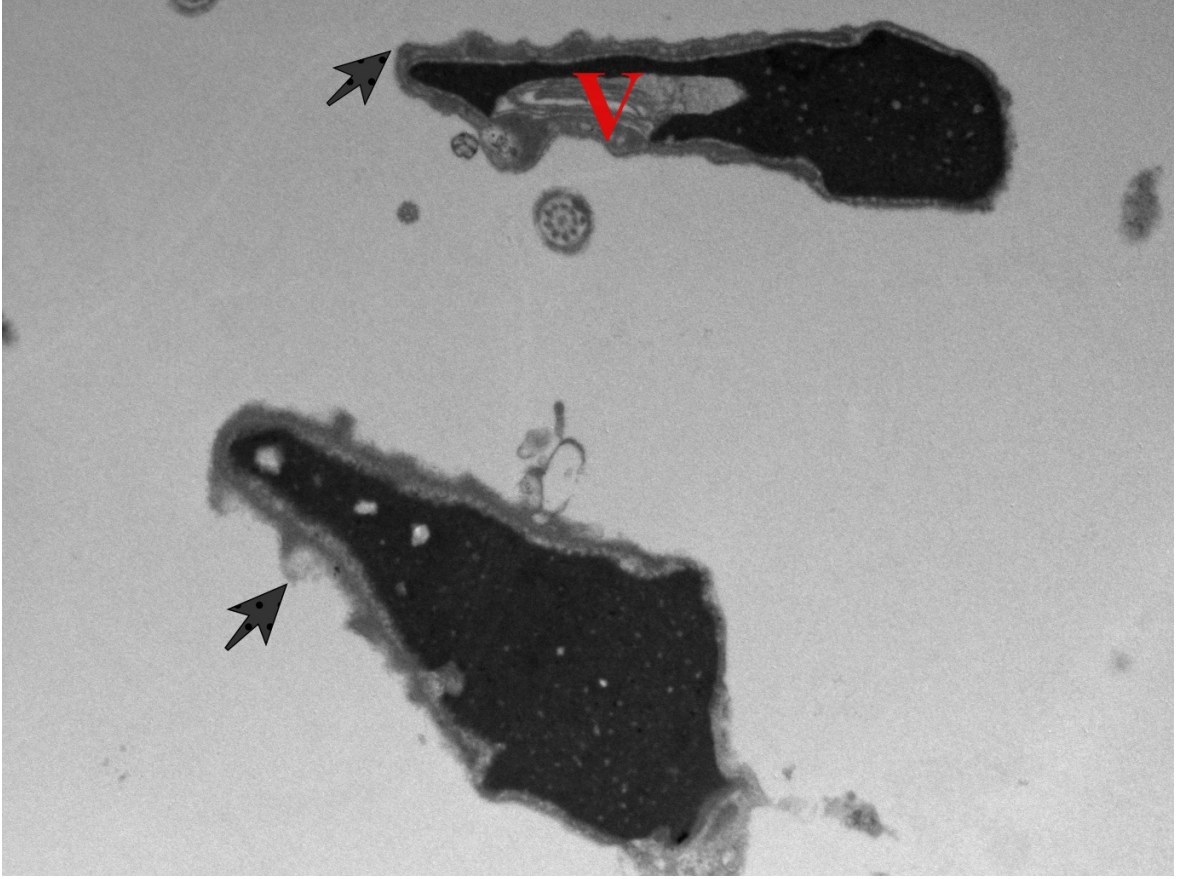


**Çizim 4.25.** Normal kromatin kondensasyonu, normal boyun ve kuyruğa (kırmızı ok), aynı zamanda akrozomal düzensizliğe (siyah ok) sahip spermatozoon (x10000)

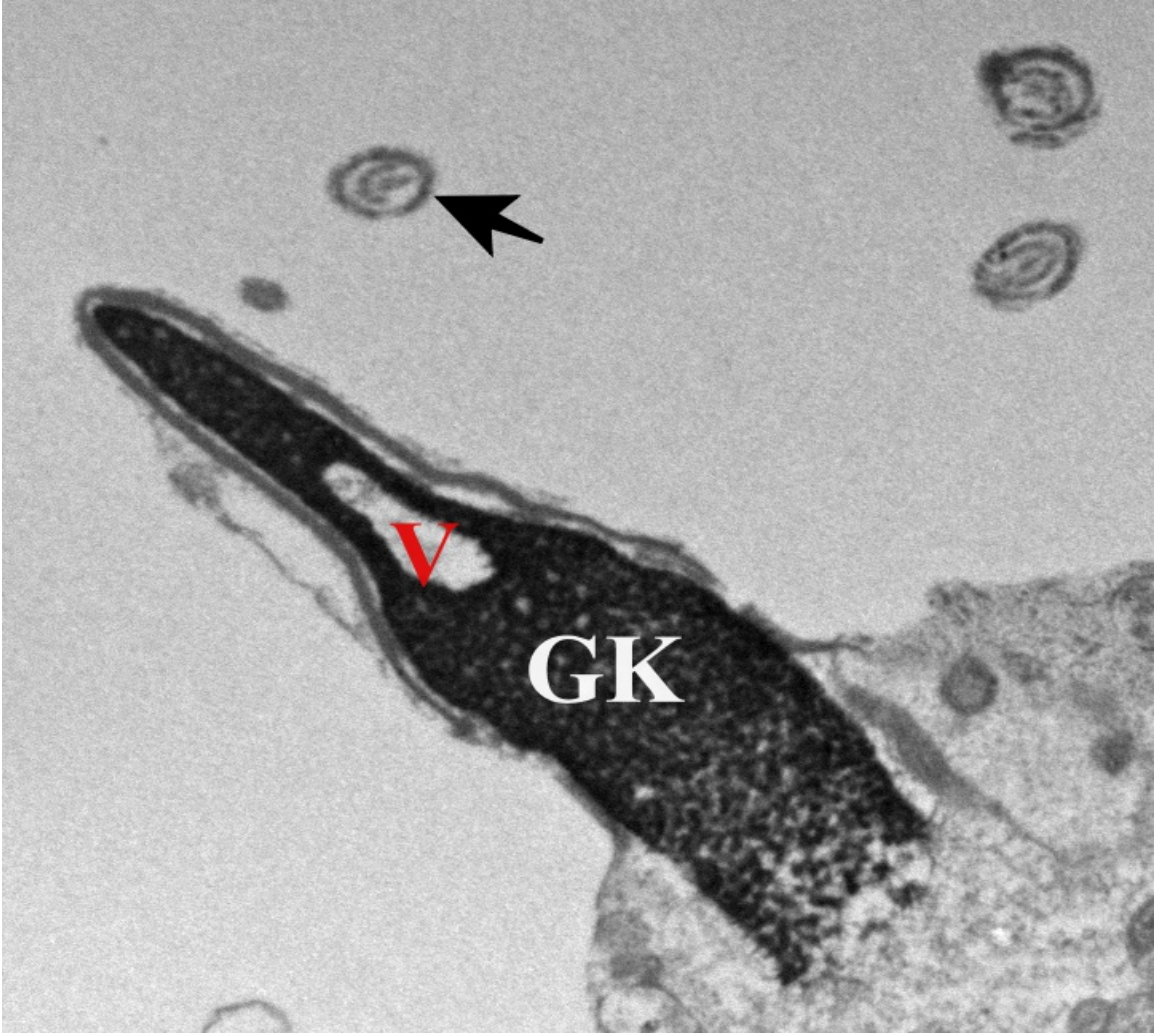


**Çizim 4.26.** Mikro akışkan çip grubuna ait normal kromatin kondensasyonuna ve normal akrozoma sahip spermatozoon (x15000)





**Çizim 4.27.** Akrozomal düzensizlik (ok) ve büyük vakuole (V) sahip spermatozoa (x15000)



**Çizim 4.28.** Granüler kromatin (GK) ve vakuole sahip spermle birlikte 9+2 mikrotübül yapısında eksiklik (ok)(x15000)

#### 4. TARTIŞMA

Dünya genelinde yaklaşık 70 milyon çift (Boivin ve diğ. 2007, Ombelet ve diğ. 2008) doğal olarak çocuk sahibi olamamakta ve yardımla üreme teknikleri olan in vitro fertilizasyon (IVF), intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ve intrauterin inseminasyon (IUI) gibi tedavi yöntemlerine ihtiyaç duymaktadır (Cooper ve diğ. 2010).

Aşılama, en yaygın kullanılan kolay ve düşük maliyetli yardımcı üreme tekniklerindedir. Başarılı bir aşılama için, sperm dölleme yeteneğini engelleyecek olan ejakülat içerikliğini mümkün olduğunca ayırtmak, hızlı hareketli ve normal morfolojili sperm seçmek gerekmektedir (Bjorndahl ve diğ. 2005, Mortimer ve diğ. 1998 Sharma ve Agarwal 1996, Zini ve Sigman 2009). Bu yüzden diğer hücreler arasından fonksiyonel sperm seçecek olan yöntem tercih edilmelidir (Aitken ve Clarkson 1988).

Seminal plazmadan kapasitasyon ve fertilizasyon kabiliyetindeki sperm için swim-up, density gradient santrifügasyon (Gorus ve Pipeleers, 1981), glass-wool filtrasyon (Paulson ve Polakoski 1977), migrasyon sedimentasyon (Tea ve diğ. 1984) ve mikro akışkan çip (Tasoglu ve diğ. 2013) gibi çok sayıda yıkama yöntemi geliştirilmiştir. Bunlardan density gradient ve swim up yöntemleri rutinde en yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir (Tasoglu ve diğ. 2013). Bu çalışmada en yaygın olarak kullanılan yıkama yöntemleri ile yeni kullanılmaya başlanan mikro akışkan çip karşılaştırılmış, bu yöntemlerin kaliteli sperm seçimine etkileri değerlendirilmiştir.

Aşılama sonrası sadece basit yıkama uygulaması ile ileri düzey yıkama yöntemleri gebelik açısından karşılaştırıldığında, ileri düzey yıkama yöntemleri ile daha yüksek oranda gebelik gözlemlendiği bildirilmektedir (Carrell ve diğ. 1998). Bu sonuçlar göstermektedir ki uygun yıkama yönteminin seçilmesi gebelik oranını arttırmaktadır. Aşılama sonucu gebelik olması için en az 10 M/ml sperm sayısı öngörülmektedir. Bazı araştırmacılar, toplam ilerleyici (prograsif) hareketli sperm sayısının 10 milyonun altında olduğu durumlarda gebelik oranlarının düştüğünü (pratikte daha düşük sayıda sperm sayısı ile yinede gebelik olabileceği mümkün olsada) görmüşlerdir (Miller ve diğ. 2002, Weert ve diğ. 2004, Voorhis ve diğ. 2001). Eğer toplam sperm sayısı çok düşük ve erkek faktörü önemli derecede belirleyici ise IVF gibi daha ileri düzey teknikler denenmelidir.

Bu çalışmada aşılama tedavisi planlanan, uygun semen parametrelerine sahip olan normozoospermik infertil hastaların örnekleri kullanıldı. Her üç yıkama yöntemi ile orijinal semen örneklerine göre daha iyi spermiyogram parametreleri elde edildi. Normal sperm parametrelerine sahip olmalarına rağmen infertilite problemine sahip bu hasta

grubuna uygun yıkama yönteminin belirlenmesi, rutin semen analizleriyle beraber daha iyi bir belirteç olabileceği öngörülen sperm DNA bütünlüğü, hücre içi ROS'u belirleyen flow sitometrik ve ultrastrüktürel değerlendirme yapıldı.

#### **4.1.Konsantrasyon**

Yıkama yöntemleri sonrası progresif hareketli sperm konsantrasyonu elde etmek önemlidir. Eğer semen, normal sayı ve hareketli sperme (normozoospermi) sahip ise swim up IVF laboratuvarlarında en yaygın olarak tercih edilen yöntemdir. Density gradient yönteminde ise yıkama sonrası daha yüksek sayıda sperm elde edilmekte, bu nedenle bu yöntem, sayı olarak daha fazla sperme ihtiyaç duyulan; oligozoospermi, teratozoospermi veya asthenozoospermi gibi düşük sayıda sperme sahip hasta gruplarında tercih edilmektedir (Zini ve diğ. 2001). Mikro akışkan çip yönteminde ise kullanılabilen semen hacmi kısıtlı olduğundan (850 µl), yıkama sonrası daha yüksek konsantrasyonda sperm elde edilmektedir, bu nedenle swim up'da olduğu gibi normozoospermi vakalarında bu yöntem daha etkili olduğundan tercih edilebilir.

Çalışmada her üç yöntemde de semene göre hareketli sperm konsantrasyonunda anlamlı fark görüldü ancak gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında swim up ve mikro akışkan çip yöntemleri arasında anlamlı fark görülmezken density gradient yönteminde literatüre benzer olarak daha yüksek konsantrasyonda sperm elde edildi (Hammadeh ve diğ. 2001). Çalışmaya ait ortalama konsantrasyon değerleri yıkama öncesi semen grubunda 86,45 M/ml iken yıkama sonrası density gradient için 55,55 M/ml, swim up için 45,65 M/ml ve mikro akışkan çip içinse 46,90 M/ml olarak azalma gösterdi. Konsantrasyondaki azalma açısından değerlendirildiğinde, density gradient yıkama yöntemindeki azalma (%30,9) swim up (%40,8) ve mikro akışkan çip (%39,55) yıkama yöntemlerinden daha az olduğundan avantajlı olarak görülmektedir. Spermilerin kendi hareketine dayalı olarak seçildiği swim up ve mikro akışkan çip yöntemlerinde harekete ait parametrelerin daha iyi olmasına rağmen, density gradient yönteminde santrifüj etkisi ile anlamlı olarak daha yüksek konsantrasyonda sperm elde edildi. Ancak çalışmaya dahil edilen normozoospermik semen örnekleri için diğer iki yıkama yöntemi ile elde edilen sperm konsantrasyonları aşılama tedavisi için başarıyı olumsuz etkileyecek sayılarda değildi. Her grup içinde semen eşit hacimlere bölünerek kullanıldı. Mikro akışkan çip yönteminde sadece 850 µl semen yıkandığından, diğer metodlara göre yıkama sonrası daha düşük sayıda sperm elde edilmektedir. Ancak yine de normozoospermik hastalar için elde edilen sperm sayısı, yüksek DNA bütünlüğü ve düşük ROS oranına sahip sperm oranı olarak değerlendirildiğinde mikro akışkan çip ile yeterli sayıda kaliteli sperm elde edildiği

saptanmıştır. Sperm konsantrasyonunun gebelik oranlarındaki etkisi göz önünde bulundurulduğunda konsantrasyonu 15 M/ml'den az olan hastalar için density gradient daha etkili bir yöntem olabilir.

#### **4.2. Hareketlilik**

Semendeki sperm hareketliliği, herhangi bir teknikle yıkama sonrası elde edilen sperm sayısına önemli bir etkisi vardır (Henkel ve diğ. 2003). Bu nedenle çalışmada hareketlilik; toplam hareketlilik, a sınıfı (hızlı progresif hareket), b sınıfı (yavaş progresif hareket) ve a+b sınıfı hareketlilik olarak daha ayrıntılı çalışıldı. Çalışmada normozoospermik infertil hastalarda yıkama öncesi toplam hareketlilik %62,40 iken sperm yüzdeleri density gradient sonrası %83,80, swim up sonrası %86,15 ve mikro akışkan çip sonrası ise %90,20'e anlamlı olarak yükseldi. Çalışmalarda yıkama sonrası metodlar hareket yüzdeleri değerlendirildiğinde swim up yönteminde hareket yüzdesinin density gradiente göre anlamlı yüksek olduğu bildirilmektedir (Hinting ve Lunardi 2001) ancak farklı olarak density gradient yöntemi ile daha kaliteli sperm elde edildiğini bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (Moohan ve diğ. 1995). Bu çalışmada swim up yöntemi ile hareketli sperm yüzdesi density gradient yöntemine göre daha yüksek olarak hesaplanırsa da istatistiksel olarak density gradient ve swim up arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi. Mikro akışkan çip yönteminde ise harekete ait yüzde artışı diğer iki gruba karşılaştırıldığında mikro akışkan sistem çalışmalarına benzer olarak anlamlı yüksek bulundu ( $P < 0.0001$ ) (Asghar ve diğ. 2014).

Yıkama öncesi a sınıfı (hızlı progresif hareketlilik) hareketli sperm %12,30 iken yıkama sonrası a sınıfı harekete sahip sperm yüzdeleri bakımından bütün gruplar arasında anlamlı artış görüldü. A sınıfı hareketteki artış oranı density gradient sonrası %41, swim up sonrası %75 iken en yüksek olarak mikro akışkan çip sonrası %91 olarak belirlendi. Ancak b sınıfı (yavaş progresif hareketli) hareketli sperm yüzdeleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark görülmedi. A sınıfı harekette olduğu gibi a+b sınıfı hareketli sperm yüzdeleri bakımından da tüm gruplar arasında anlamlı fark görüldü. Dolayısıyla gruplar arasında b sınıfı olarak anlamlı fark görülmesede a ve a+b sınıfı hareketli sperm yüzdesinin daha belirleyici olduğunu göz önünde bulundurarak, mikro akışkan çip yöntemi ile normozoospermik infertil hasta grubunda daha kaliteli harekete sahip sperm elde edilmektedir.

Swim up yöntemi, hareketi düşük olan hasta gruplarının %20'si kadarında uygulanmakta (Dosortsev 1995) iken density gradient yöntemi düşük hareketli sperme sahip hasta grubu için fazla sayıda hareketli sperm elde edilen daha ideal bir yöntem olarak

kullanılmaktadır (Centola ve diğ. 1998) Mikro akışkan akışkan yöntemle, swim up yöntemine göre daha yüksek oranda hareketli sperm elde edildiği bildirilmiştir (Benchaib 2003).

#### **4.3. Sperm Morfolojisi**

Sperm morfolojisinin fertilitiyi belirlemede önemli rol oynadığı ve fertilizasyonla ilişkili olarak doğal gebelik ve bununla beraber IVF'deki gebelik oranlarında etkili olduğu bildirilmektedir (Bartov ve diğ. 1993, Berkovitz ve diğ. 1999). Ayrıca bazı çalışmalarda yüksek DNA fragmantasyonu oranı ile anormal sperm morfolojisi ve zayıf embriyo kalitesi arasında ilişki olduğu bildirilmektedir (Sakkas ve diğ. 1998, Tomlinson ve diğ. 2001)

Sperm morfolojisi ile kromatin kondensasyon defekti arasında negatif korelasyon olduğu bildirilmektedir (Hammadeh ve diğ. 1999). Çalışmada yıkama öncesi normal morfolojili sperm ortalaması semen grubunda %11,55 iken her üç yıkama yönteminde de normal morfolojisiye sahip sperm oranında istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü. Ancak bazı çalışmalardan farklı olarak, yıkama yöntemlerini kendi aralarında değerlendirildiğinde density gradient (%16,30) ve swim up (%17,50) gruplarına ait morfoloji değerleri arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi (Hinting ve Lunardhi 2001, Hammadeh ve diğ. 2001). Bununla beraber mikro akışkan çip (%19,45) yöntemindeki artışın çalışmalara benzer olarak, swim up ve density gradient yöntemlerinden daha fazla olduğu görüldü (Asghar ve diğ. 2014). Sonuç olarak normal morfoloji ile ilişkili olan kromatin defekti ve DNA fragmantasyon oranı düşük olan kaliteli spermler, mikro akışkan çip ile normozoospermik infertil hasta grubu için daha ideal seçimi yapmaktadır. Her üç yıkama yönteminde de semene göre a sınıfı hareket ve normal morfolojiye sahip sperm oranında artış görüldü. Ancak mikro akışkan çip yönteminde sperm kalitesine yönelik bu bulgular daha iyiydi. Bunun sebebi mikro akışkan metodunda mekanik hasarın daha az olmasıyla beraber aynı zamanda herhangi bir kimyasala maruziyet olmadan kaliteli sperm seçiminin optimum zamanda farklı por çaplarına sahip özel bir zardan (3µm, 5µm, 8µm) spermin kendi hareketine dayalı olması olarak açıklanabilir. Yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilmiştir (Tamburrino ve diğ. 2012, Asghar ve diğ. 2014).

#### **4.4. Sperm Kromatin Kondensasyonu**

Sperm kromatin kondensasyon değerlendirmesi için çalışmalarda yaygın olarak kullanılan asidik anilin ve toluidin mavisi boyaları kullanıldı. Spermiyogenez sırasında protaminlerle histonların yer değişiminde problem olan; kondensasyon defektli spermler yıkama öncesi semen grubunda anilin mavisi ile %56,70 ve toluidin mavisi ile % 53,80 olarak bulundu. Yıkama sonrası her iki boyama metodu ile birbirini destekler oranda benzer sonuçlar elde edildi. Her üç grup da kromatin kondensasyon defektinde anlamlı

azalma görüldü. Çalışmalara (Wang ve diğ. 2011, Asghar ve diğ. 2014) benzer olarak anilin mavisi ile kromatin kondensasyon defekti en az mikro akışkan çip (%26,80), en fazla ise density gradient yıkama yönteminde (%42,60) ve yine toluidin mavisi ile kromatin kondensasyon defekti en az mikro akışkan çip (%25,80), en fazla ise density gradient (%42,30) yıkama yönteminde görüldü. Nosrati ve arkadaşları geliştirdikleri mikrokanallara sahip bir alet ile, %80 üzerinde DNA bütünlüğüne sahip spermlerin seçimini gerçekleştirmişlerdir (Nosrati ve diğ. 2014). Takip eden başka bir çalışmada mikro kanalların, hatalı kondensasyon ve vakuole sahip spermleri ayırarak, kromozomal anöploidi (X,Y,18) oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Seiringer ve diğ. 2013).

#### **4.5. Sperm DNA Fragmantasyonu**

Sperm DNA fragmantasyon ölçüm değerleri, çalışmalara ve belirleyici metodlara göre değişmektedir. Belloc ve arkadaşları 1974 normozoospermik ve 4345 infertil vakalara ait semen örneğinde infertil grup için anlamlı olarak SDF >%30 eşik değerini bulmuşlardır (Belloc ve diğ. 2014). Normozoospermik grupta ortalama SDF değerinin %17.6 olduğu, başka bir çalışmada ise Evenson ve arkadaşları %25 SDF değerinin normal gebelik süresini arttığı veya tamamen erkek infertilitesine sebep olduğunu belirtmişlerdir (Evenson 2013). Avendano ve arkadaşları, SDF prevalansını %3,9 ile %9,8 oranında TUNEL (+) sperme sahip fertil erkekleri subfertil grup olarak değerlendirmişlerdir (Avendano ve diğ. 2003). Normozoospermik hastalarda SDF eşik değeri net değildir, SDF'nin gebelik üzerine etkisini inceleyen çalışmalar sonucunda değerin, <10% ile >35% arasında değerlendirilmesi önerilmiştir (Borinive diğ. 2006, Frydman ve diğ. 2008, Benchaib ve diğ. 2003).

Sperm DNA fragmantasyonu %30'un üzerinde ise ileri derecede hasarlı görülmekte ve bu durum fertilizasyon oranını belirgin düşürmektedir (Agarwal ve Allamaneni 2005).

Çalışmada DNA fragmantasyonunu belirlemek için sıklıkla kullanılan yöntemlerden TUNEL, kromatin kondensasyon değerlendirmesi için de ışık mikroskobu yardımı ile değerlendirebileceğimiz asidik anilin ve toluidin mavisi boyamaları tercih edildi. Normozoospermik infertil hastaların yıkama öncesi semen örneklerinde diğer çalışmalara benzer olarak %30,1 oranında SDF hesaplandı. Normal sperm parametrelerine sahip olmalarına rağmen SDF oranının yüksek olması, infertilite için altta yatan problemin sperm DNA bütünlüğüyle ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Sperm DNA fragmantasyonunu belirlemede sperm kromatin yapı analizi (SCSA), TUNEL, in situ nick translasyon analizi (NT), tek hücre jel elektroforez analizi, akrinin orange ve sperm kromatin ayrıştırma testi (Halosperm®) gibi bir çok teknik

kullanılmaktadır (Tamburrino ve diğ. 2012). Bu çalışmada sperm DNA fragmantasyon analizi için ışık mikroskobu kullanarak değerlendirilebilen TUNEL metodu kullanıldı.

TUNEL metodu ile değerlendirilen yıkama öncesi semen grubuna göre SDF değeri %30,1 iken yıkama sonrası her üç metotta da SDF oranının da anlamlı azalma görüldü. Ancak en belirgin azalma %3,30 değeri ile mikro akışkan çip yönteminde belirlendi. En yaygın olarak kullanılan density gradient ve swim up yöntemlerinde ise bu değerler %9,25 ve %5,95 olarak belirlendi. Her iki yöntem için sperm seçimi bir veya iki aşamalı olarak santrifüj gerektirmekte ve bu da hasara neden olabilmektedir (Alvarez ve diğ. 1993). Bununla beraber santrifüj sperm DNA fragmantasyonuna neden olan ROS seviyesini de arttırmaktadır (Muratoro ve diğ. 2003). Ancak mikro akışkan çip yönteminde kaliteli spermlerin seçimi santrifüj olmadan gerçekleştirilmekte ve daha düşük oranda sperm DNA fragmantasyonuna sahip spermler elde edilmektedir. Aynı zamanda spermler daha az strese maruz kalmaktadır. Bu yöntem klasik yıkama yöntemlerinden farklı olarak sperme zarar vermeden kaliteli spermin seçimi gerçekleştirmektedir. Mikro akışkan çip ile hazırlanan hareketli spermleri, yaygın olarak kullanılan swim up ve density gradient yöntemleriyle hazırlanan spermlerle karşılaştırdığımızda SDF'nin daha düşük olduğunu gördük.

Düşük SDF oranı görülen spermlerin seçimi sayesinde normal morfoloji ve yüksek harekete sahip spermlerin seçimi de söz konusudur (Schuster ve diğ. 2003, Matsuura ve diğ. 2008, Cho ve diğ. 2003). Yardımla üreme tekniklerine ihtiyaç duyan normozoospermik infertil hasta grubu için SDF oranı tedavide başarıyı etkileyebilir.

#### **4.6. ROS**

Sperm seçiminde en iyi yöntemin belirlenmesi semenin sahip olduğu parametrelere dayanmaktadır. Normozoospermik infertil hasta grubu için semendeki yüksek ROS oranı göz önünde bulundurularak ideal olan yöntemin belirlenmesi IVF tedavilerinde başarıyı arttırabilir (Agarwal ve diğ. 2005). Klinikte en yaygın olarak kullanılan swim up ve density gradient teknikleri sperm seçiminde farklı verime sahiptirler. Swim up ile seçilen spermler temiz, hareketli ve aynı zamanda yüksek DNA bütünlüğüne sahip olmalarına rağmen, yüksek ROS oranı nedeniyle spermler zarar görmektedir; density gradient yönteminde ise seçilen spermler swim up yöntemine göre ROS oranı daha düşük olmasına rağmen düşük DNA bütünlüğü olduğu tespit edilmiştir. Bir çok çalışmada düşük gebelik oranının sperm DNA'sı ile ilgili olduğu bildirilmektedir (Loft ve diğ. 2003, Spano ve diğ. 2000, Evenson ve diğ. 2008).

En iyi spermin seçimi ve hasarlı spermin ayrıştırılması, yardımla üreme



tekniklerinde başarı için kritik bir öneme sahiptir. Swim up ve density gradient metodlarında spermlerin semenden ayrıştırılması için bir veya iki santrifüj basamağı gerekmektedir, bu da spermde hasara sebep olmaktadır (Alvarez ve diğ. 1993). Santrifüj dolayısıyla oluşan sperm hasarı, ROS seviyelerini arttırarak SDF'ye yol açmaktadır (Muratori ve diğ. 2003), SDF de yardımcı üreme tekniklerini kullanan çiftler için infertiliteye sebep olmaktadır. Spermler ve lökositler semen içerisinde fertilizasyonu olumsuz etkileyebilecek oldukça fazla oksijen radikali üretebilmektedir (Agarwal ve Sekhon 2010, Aitken ve diğ. 1998, Shamsi ve diğ. 2008). Mikro akışkan çip yöntemi ile santrifüje gerek duyulmadan kaliteli spermler seçilebilmektedir (Schuster ve diğ. 2003). Mikro akışkan çip kullanılarak semenden, yüksek harekete ve normal morfolojiye sahip spermler seçilmekte ve seçilen spermlerde daha düşük oranda SDF görülmektedir. (Schuster ve diğ. 2003, Matsuura ve diğ. 2008)

Çalışmalarda genellikle luminometre ve flow sitometri kullanılarak hücre içi ROS oranı ölçülmektedir, ancak kemiluminisans metodu ile canlı ve cansız hücre ayrımı yapılmaksızın ölçüm gerçekleştirilmektedir (Menella ve Jones 1980, Breininger ve diğ. 2005). Çalışmamızda gruplara ait ROS seviyeleri DCFH (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) boyanma sonuçlarına göre flow sitometri ile canlı ve cansız spermlerde analiz edilerek karşılaştırıldı. Gruplar karşılaştırıldığında kendi aralarında anlamlı fark olduğu ve ROS analizlerine göre gruplar arasında DCFH ile boyanan sperm sayısı, swim up yönteminde en yüksek (%23,74) ve mikro akışkan çip yönteminde ise anlamlı olarak en düşük (%7,45) olarak bulundu. Benzer çalışmalarda olduğu gibi density gradient ve swim up yöntemlerinde ise semen grubuna göre hücre içi ROS oranının %20,43 ve %23,74 olarak artmış olması ve mikro akışkan çip yönteminde ise belirgin azalma görülmesi ROS açısından mikro akışkan çip yönteminin normozoospermik infertil hastalar için daha ideal bir yöntem olduğunu düşündürmektedir (Asghar ve diğ. 2014).

#### 4.7. TEM

Sperm morfolojisi sperm yıkama öncesi ve sonrası ışık mikroskobu ile Kruger'in sıkı kriterleri'ne göre değerlendirilmektedir (Menkveld ve Kruger, 1995). Ancak bu metod ile sperme ait organel, kromatin ve ayrıntılı yapı değerlendirilebilmektedir. Transmisyon elektron mikroskobu kullanılarak (TEM) hücrelerin yapısal bütünlüğü gösterilebilmektedir (Piomboni ve diğ. 1996, Baccetti ve diğ. 1995) Mikro akışkan çiple yıkama sonrası spermlerle ilgili ultrastrüktürel herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada TEM kullanarak sperm seçim metodları ile elde edilen spermler ayrıntılı olarak incelendi. Yıkama yapılmayan semen grubunda anormal yapıdaki sperm sayısının çok fazla olduğu

saptandı. Bu tablo yapılan çalışmalar sonucunda da bildirilmektedir (Skowronek ve diğ. 2010, Skowronek ve diğ. 2012). Normozoospermik hastalara ait yıkanma öncesi semen grubunda, spermlerin baş kısımlarında anormal paketlenen kromatinle beraber vakuolizasyon, akrozom defektleri, orta parçada anormal şekilli mitokondriyonlar, kuyrukta túbül çiftlerinde eksiklikler ve apoptotik spermler sıklıkla görüldü. Anormal hareketli ve apoptotik spermlerin yüksek olduğu semen örneklerinde bu yapısal anomaliler daha sıklıkla görüldü. Ayrıca bu semen grubuna ait sperm akrozomlarında, en sık akrozomal düzensizlik olmak üzere yoğunluk azalması, hipoplazi, lakünasyon ve inklüzyon gibi yapısal bozukluklara da rastlandı.

Yıkama sonrası her üç gruba ait spermleri incelediğimizde kromatine ait kondensasyon bozukluğunun ve apoptozun azaldığı görüldü. Density gradient yönteminde akrozomal düzensizliklere, swim up ve mikro akışkan çip yöntemlerine göre daha sık rastlandı. Density gradient yönteminde görülen bu bozuklukların, santrifüj etkisiyle ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir (Machado ve diğ. 2009). Ayrıca kondanse kromatinli ve normal akrozoma sahip spermler, swim up ve mikro akışkan çip yönteminde, density gradient yöntemine göre daha sık görüldü.

TEM değerlendirmesi sonucunda, üç yıkama yönteminde de anormal kondensasyon ve vakuole sahip spermler gözlenmesine rağmen, yıkanma yöntemi uygulanmayan semen grubuna göre bunların sayılarının oldukça azalmış olduğu tespit edilmiştir.

## **6. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Normozoospermik infertil hastalarda density gradient, swim up ve mikro akışkan çip yöntemleri ile elde edilen spermleri rutin semen analizleri yanı sıra immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak incelediğimiz çalışmada;

1. 20 normozoospermik infertil hastada semen parametreleri; konsantrasyon (86,45M/ml) toplam hareketlilik (%62,40), hızlı progresif hareketlilik (%12,30), yavaş progresif hareketlilik (%42,00) ve normal morfolojili (%11,55) sperm yüzdesi olarak değerlendirildi.
2. Yıkama yöntemleri konsantrasyon açısından değerlendirildiğinde, swim up (45,65M/ml) ve mikro akışkan çip (46,90M/ml) yöntemleri ile benzer oranda ve daha az sayıda sperm elde edilirken, density gradient (55,55M/ml) yöntemi ile yıkama sonrası anlamlı olarak daha yüksek sayıda sperm elde edildi ( $P<0.0001$ ).
3. Hareketliliğe ait yüzde ortalamaları density gradient sonrası %83,80, swim up sonrası %86,15 ve mikro akışkan çip sonrası ise %90,20 olarak hesaplandı. Yıkama sonrası hareketli sperm yüzdeleri her üç yıkama yönteminde de anlamlı olarak yüksekti. Bununla beraber density gradient ve swim up arasında anlamlı fark olmadığı ancak diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu belirlendi ( $P <0.0001$ ).
4. Yıkama öncesi a sınıfı (hızlı progresif hareketlilik) hareketli sperm %12,30 iken yıkama sonrası a sınıfı harekete sahip sperm yüzdeleri bakımından bütün gruplar arasında anlamlı artış görüldü ( $P<0.0001$ ). A sınıfı hareketteki artış oranı density gradient sonrası %41, swim up sonrası %75 iken en yüksek olarak mikro akışkan çip sonrası %91 olarak belirlendi. Ayrıca b sınıfı (yavaş progresif hareketlilik) hareketli sperm yüzdeleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark olmadığı ( $P=0.136$ ) belirlendi.
5. Morfoloji değerlendirmelerinde, density gradient (%16,30) ve swim up (%17,50) yöntemlerinde normal morfolojili sperm yüzdesinde benzer oranlar görülürken mikro akışkan çip (%19,45) yönteminde bu oran diğer yöntemlere göre anlamlı olarak daha yüksek belirlendi ( $P<0.0001$ ).
6. Anilin mavisi ve toluidin mavisi ile yapılan kromatin kondensasyon değerlendirmelerinde, semen grubu ile density gradient, swim up ve mikro akışkan çip yöntemleri boyanma yüzdeleri olarak karşılaştırıldığında her 3 yöntemde de anlamlı azalma olduğu görülmüştür ( $P<0.0001$ ). Yıkama yöntemleri de kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu; kromatin kondensasyon defektinin en az mikro

- akışkan çip, en fazla ise density gradient yıkama yöntemi sonrası spermelerde olduğu görüldü.
7. TUNEL metodu uygulanan yıkama öncesi semen grubu (%30,1) ile yıkama yöntemlerine ait örnekler karşılaştırıldığında tümünde sperm DNA fragmentasyonunda anlamlı azalma ve anlamlı fark olduğu görüldü ( $P < 0.0001$ ). Ayrıca yıkama yöntemleri de kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu ve sperm DNA fragmentasyonunun en az mikro akışkan çip (%3,30), en fazla ise density gradient (%9,25) yıkama yönteminde olduğu belirlendi.
  8. ROS analizlerine göre gruplar arasında DCFH ile boyanan sperm sayısı, swim up yönteminde en yüksek (%23,74) ve mikro akışkan çip yönteminde anlamlı olarak en düşük (%7,45) hesaplandı. Density gradient ve swim up yöntemlerinde ise semen grubuna (%12,47) göre hücre içi ROS oranının %20,43 ve %23,74 olarak arttığı belirlendi.
  9. Ultrastrüktürel değerlendirmelerde semen grubuna ait sperm örneklerinde kromatin kondensasyon defektlerine, vakuole, anormal baş yapısı, immature form ve akrozom defektlerine, ayrıca orta parça ve kuyrukta anormalliklere sperm yıkama metodları uygulanmış diğer gruplara göre daha sıklıkla rastlandı. Yıkama sonrası her üç gruba ait spermleri incelediğimizde kromatine ait kondensasyon defektinin ve apoptozun azaldığı görüldü. Ancak density gradient yönteminde akrozomal düzensizliklere swim up ve mikro akışkan çip yöntemlerine göre daha sık rastlandı.
  10. Mikro akışkan çip ile hazırlanan hareketli spermleri yardımcı üreme tekniklerinde en yaygın olarak kullanılan swim up ve density gradient metodlarıyla hazırlanan hareketli spermlerle karşılaştırdığımızda kromatin kondensasyon defekti, DNA fragmentasyonu ve hücre içi ROS oranının daha az olduğunu gördük. Ayrıca sperm parametreleri sonuçlarına göre yeterli sayıda kaliteli sperm mikro akışkan çip ile yıkama sonrası elde edildi ve ultrastrüktürel değerlendirmelerde de kondense kromatin ve normal akrozoma sahip spermler sıklıkla görüldü.
  11. Mikro akışkan çip yönteminde; hücre içi ROS değerinin düşük olması, DNA bütünlüğüne sahip hareketli ve normal morfolojili spermlerin basit ve kibar bir şekilde seçilebilmesi avantajları olarak belirlenirken, tüm ejakülatın kullanılamaması ve daha az sayıda sperm elde edilmesi dezavantajlarıdır.

**12.** Bu çalışmanın sonuçları göstermektedir ki mikro akışkan çip yıkama yöntemi aşılama hastalarının tedavisinde density gradient ve swim up yöntemlerine göre daha etkili ve fizyolojik bir yöntemdir. Bu yaklaşım, mikro akışkan çip ile seçilen spermier kullanıldığında embriyo gelişimi, fertilizasyon, implantasyon ve gebelik oranlarında iyileşme olup olmadığını gösteren ileri çalışmalarla desteklenebilir.



## KAYNAKLAR DİZİNİ

Abraham L. Üreme Sistemi, Histoloji ve Hücre Biyolojisi (1. Baskı) Palme yayıncılık, Ankara ,2006.

Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril.* 2005; 84: 850–853.

Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction.* 2003; 9(4): 331-45.

Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility.* 2010; 13(4): 217–225.

Aitken J, Gordon E, Harkiss D ve diğ. Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa. *Biol of Reprod.* 1998; 59: 1037–1046.

Aitken J, Best FS, Warner P ve diğ. A prospective study of the relationship between semen quality and fertility in cases of unexplained infertility. *Journal of Andrology.* 1984; 5(4): 297-303.

Aitken J, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology.* 1988; 9(6): 367-376.

Aitken J, Bowie H, Buckingham D ve diğ. Sperm penetration into a hyaluronic acid polymer as a means of monitoring functional competence. *Journal of Andrology.* 1992; 13: 44–54.

Aitken J, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of Reproduction.* 1989; 41 (1): 183-197.

Aitken J, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001; 122:497–506.

Ainsworth C, Nixon B Aitken R. J. Development of a novel electrophoretic system for the isolation of human spermatozoa. *Human Reproduction,* 2005; 20 (8): 2261-2270.

Alvarez JG, Iasso JL, Blasco L ve diğ. Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim up procedure without centrifugation extends their motil lifetime. *Human Reproduction.* 1993; 8: 1087-92.

Alvarez JG, Sharma RK, Ollero M ve diğ. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2002; 78: 319–329.

Arnon J, Meirou D, Lewis-Roness H ve diğ. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. *Hum Reproduction.* 2001; 7: 394–403.

Asghar W, Velasco V, Kingsley JL ve diğ.. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Adv. Healthc. Mater.* 2014; 3(10): 1671-9

Auger J, Mesbah M, Huber C ve diğ. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *International Journal Andrology.* 1990; 13: 452–462.

Avendano C, Franchi A, Duran H ve diğ. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility.* 2010; 94 (2): 549-557.

Avendano C, Franchi A, Taylor S ve diğ. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2003; 91:1077-84.

Baccetti B, Bernieri G, Burrini AG ve diğ. Mathematical evaluation of interdependent submicroscopic sperm alterations. *Journal Andrology* 1995; 16(4): 356–71.

- Barratt CLR, Naeeni M, Clements S ve diğ. Andrology: Clinical value of sperm morphology for in-vivo fertility: comparison between World Health Organization criteria of 1987 and 1992. *Human Reproduction*. 1995; 10 (3), 587-593.
- Barros C, Vigil P, Herrera E ve diğ. Selection of morphologically abnormal sperm by human cervical mucus. *Archives of Andrology*. 1983; 12, 95-107.
- Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 2000; 15: 1338–1344.
- Bartoov B, Eltes F, Pansky M ve diğ. Estimating fertility potential via semen analysis data. *Human Reproduction*. 1993; 8: 65–70.
- Belloc S, Benkhaifa M, Cohen-Bacrie M ve diğ. Sperm deovynicleic acid damage in normozoospermic men is related to age and sperm progressive motility. *Fertil Steril*. 2014; 101: 1588-93.
- Benchaib M, Braun V, Lornage J ve diğ. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assiste reproductive technique. *Human Reproduction*. 2003; 18(5): 1023-1028.
- Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 1985; 43 (2): 268-273.
- Berkovitz A, Eltes F, Soffer Y ve diğ. ART success and in vivo sperm cell selection depend on the ultramorphological status of spermatozoa. *Andrologia*. 1999; 31: 1–8.
- Bjorndahl L, Mohammadi M, Pourian M ve diğ. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *Journal of Andrology*. 2005; 2: 170-73.
- Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reprod*. 2007; 22(6):1506–1512.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D ve diğ. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*. 2006 ; 21:2876-81.
- Brakke MK. Density Gradient Centrifugation: A New Separation Technique. *Journal of the American Chemical Society*. 1951; 73(4): 1847-1848.
- Burnaugh L, Sabeur K, Ball BA. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*. 2007; 67(3): 580-589.
- Carrell DT, Kuneck PH, Peterson CM ve diğ.. A randomized, prospective analysis five sperm preparation techniquesbefore intrauterine insemination of husband sperm. *Fertil Steril*. 1998 ; 69(1): 122-26.
- Centola G, Ginsburg K. Evaluation and treatment of the infertile male. Cambridge, *United Kingdom: Cambridge University Press*; 1996.
- Centola G, Herko R, Andolina E ve diğ. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. *Fertil Steril* . 1998; 70: 1173±1175.
- Chang MC. A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. *Nature*. 1957; 168 (697): 258-259.
- Chatterjee R, Haines GA, Perera DM ve diğ. Testicular and sperm DNA damage after treatment with fludarabine for chronic lymphocytic leukaemia. *Hum Reproduction*. 2000; 15: 762–766.
- Cho BS, Schuster TG, Zhu X ve diğ. Passively driven integrated microfluidic system for separation of motile sperm. *Analitic Chemistry*. 2003; 75: 1671-5.

- Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M ve diğ. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal Andrology*. 2006; 27: 53–59
- Cohen J, McNaughton DC. Spermatozoa: the probable selection of a small population by the genital tract of the female rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1974; 39(2): 297-310.
- Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S ve diğ. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction*. 2010; 16(3): 231–245.
- Cooper TG1, Yeung CH. Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians. *Fertil Steril*. 2006; 85(1): 220-4.
- Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod*. 2009; 15:213–227.
- Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*. 1988; 20: 211–217.
- Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T ve diğ. Thermal denaturation of DNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry. *Exp Cell Res*. 1975; 90: 411–428.
- De Jonge C. The clinical value of sperm nuclear DNA assessment. *Human Fertility*. 2002; 5(2): 51-3
- Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. *Palme Yayıncılık*. İstanbul, 2006.
- Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA ve diğ. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility*. 1998; 70(2): 305-314.
- Donnelly ET, Steele EK, McClure N ve diğ. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reproduction*. 2001; 16: 1191–1199.
- Dosortsev D (1995) Intracytoplasmic sperm injection in human. Investigations of mechanism of fertilization and development of methodology. PhD Thesis. Rijksuniversiteit Gent, Belgium.
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. Establishing Full-term Human Pregnancies Using Cleaving Embryos Grown In Vitro. *An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 1980; 87(9): 737-756.
- Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J ve diğ. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *Journal Andrology*. 2002; 23: 717–723.
- Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*. 2011; 66 (4): 691-700.
- Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA). *Methods Molecular Biology*. 2013; 927: 147-64.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. 1980; 210: 1131–1133
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D ve diğ. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*. 1999; 14: 1039-1049.
- Evenson DP, Kaspersen K, Wixon RL. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*. 2007; 65: 93-113.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Andrology*. 2002; 23: 25–43.
- Evenson DP, Wixon R. Data analysis of two in vivo fertility studies using Sperm Chromatine Structure Assay-derived DNA fragmentation index vs. pregnancy out come. *Fertil Steril*. 2008; 90(2): 1229-31.



- Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology*. 1975; 44(2): 394-436.
- Fischer MA, Willis J, Zini A. Human sperm DNA integrity: correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology*. 2003; 61: 207-211.
- Fleming S.D, Ilad R.S, Griffin A G, ve diğ. Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. *Human Reproduction*, 2008; 23 (12), 2646-2651.
- Ford WCL, McLaughlin EA, Prior SM ve diğ. The yield, motility and performance in the hamster egg test of human spermatozoa prepared from cryopreserved semen by four different methods. *Human Reproduction*. 1992; 7 (5): 654-659.
- Frydman N, Prisant N, Hesters L ve diğ. Adequate ovarian follicular status does not prevent the decrease in pregnancy rates associated with high sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril*. 2008 ; 89:92-97.
- Genesca A, Caballin MR, Miro R ve diğ. Repair of human sperm chromosome aberrations in the hamster egg. *Human Genetic*. 1992; 89: 181-186.
- Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*. 1993; 53: 1945-1951.
- Giuliani V, Pandolfi C, Santucci R. ve diğ. Expression of gp20, a human sperm antigen of epididymal origin, is reduced in spermatozoa from subfertile men. *Molecular Reproduction and Development*. 2004; 69: 235-240.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P ve diğ. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001; 345:1388-1393.
- Haines G, Marples B, Daniel P ve diğ. DNA damage in human and mouse spermatozoa after in vitro-irradiation assessed by the comet assay. *Adv Exp Med Biol*. 1998; 444:79-91.
- Hammadeh ME, Kuè Hnen A, Amer AS ve diğ. Comparison of sperm preparation methods: effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer international. *Journal of Andrology*, 2001; 24: 360±368.
- Hammadeh ME, SAI-Hasani, DieS K ve diğ. Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome *Human Reproduction*. 1999; 14 (2): 363-367.
- Harper M. Sperm and egg transport. Cambridge University Press. *In Germ Cells and Fertilization*. 1982; 102-127.
- Henkel R, Ichikawa T, Sanchez R ve diğ. Differentiation of ejaculates showing reactive oxygen species production by spermatozoa or leukocytes. *Andrologia*. 1997; 29(6): 295-301.
- Hikim AP, Lue Y, Yamamoto CM ve diğ. Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology*. 2003; 144: 3167-3175.
- Hinting A, Lunardi H. Better sperm selection for intracytoplasmic sperm injection with the side migration technique. *Andrologia*, 2001; 33: 343-346.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL ve diğ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Andrology*. 2000; 21:33-44.
- Jones J, Horne G, Fitzgerald C. Who needs ICSI? A nationwide UK survey on ICSI use. *Human Fertility*. 2012; 15(3): 144-149.
- Kanwar KC, Yanagimachi R, Lopata A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 1979; 31(3): 321-327.

Klaude M, Eriksson S, Nygren J ve diğ. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res.* 1996; 363: 89–96.

Kobayashi H, Larson K, Sharma RK ve diğ. DNA damage in patients with untreated cancer as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2001; 75: 469–475.

Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J ve diğ. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 1997; 68: 519–524.

Laberge RM, Boissonneault G. On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biological Reproduction.* 2005; 73: 289–296.

Lamirande E, Gagnon C. The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function. In: The male gamete: from basic science to clinical applications. *Cache River Press.* 1999; 455–467.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA ve diğ. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril.* 2003; 80: 895–902.

Lee J, Richburg JH, Younkin SC ve diğ. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology.* 1997; 138: 2081–2088.

Lessley BA, Garner DL. Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in Percoll®. *Gamete Research.* 1983; 7 (1): 49-61.

Lewis SEM, Aitken RJ. DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and Tissue Research.* 2005; 322 (1), 33-41.

Loft S, Kold-Jensen T, Hjollund NH ve diğ. Oxidative DNA damage in human sperm influences time to pregnancy. *Human Reproduction.* 2003; 18: 1265-72.

Lopes S, Sun JG, Jurisicova A ve diğ. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998; 69: 528–532.

Machado GM, Carvalho, Filho ES ve diğ. Effect of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology.* 2009; 71(8): 1289-87

Maettner R, Sterzik K, Isachenko V ve diğ. Quality of human spermatozoa: relationship between high magnification sperm morphology and DNA integrity. *Andrologia.* 2013; 9: 331-45.

Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol Reprod.* 2004; 70: 910–918.

Matsuura K, Takeanmi M, Kuroda Y, Naruse K. Development and performance of plastic microfluidic sperm sorter. *Fertil Steril.* 2008; 90: 241.

McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem.* 1993; 37: 109–128.

McVicar CM, McClure N, Williamson K ve diğ. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril.* 2004; 81(1): 767–774.

Meistrich ML. Potential genetic risks of using semen collected during chemotherapy. *Human Reproduction.* 1993; 8(1): 8-10.

Mennella MR, Jones R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation and reactions in semen. *Biochem J.* 1980.1;191(2):289-

Menkveld R, Kruger TF. Advantages of strict (Tygerberg) criteria for evaluation of sperm morphology. *Int J Androl* 1995; 18(2): 36–42.

Mescher Anthony L. Junquera's Temel Histoloji Çev. Ed. Solakoğlu S. *Nobel Tıp Kitabevi* (13.Basım), İstanbul. 2015.

Miller DC, Hollenbeck BK, Smith GD ve diğ. Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology*. 2002; 60: 497–501.

Moohan JM1, Lindsay KS. Spermatozoa Selected by a Discontinuous Percoll Density Gradient Exhibit Better Motion Characteristics, More Hyperactivation, and Longer Survival Than Direct Swim-Up. *Fertil Steril*. 1995; 64(1): 160-5.

Morris ID. Sperm DNA damage and cancer treatment. *Int J Androl*. 2002; 25: 255–261.

Mortimer ST, Swan MA, Mortimer D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 1998; 13(8): 2139–2146.

Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J ve diğ. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*. 2004 ; 19 (1): 129-138.

Muratori M, Maggi M, Spinelli S ve diğ. Spontaneous DNA fragmentation in swim-up selected human spermatozoa during long term incubation. *Journal of Andrology*. 2003 ; 24 (2):253-262.

Muratori M, Marchiani S, Maggi M ve diğ. Origin and biological significance of DNA fragmentation in human spermatozoa. *Front Biosci*. 2006; 11: 1491–1499.

Muriel L, Meseguer M, Fernández JL ve diğ. Value of the sperm chromatin dispersion test in predicting pregnancy outcome in intrauterine insemination: a blind prospective study. *Human Reproduction*. 2006; 21 (3): 738-744.

Nosrati R, Vollmer M, Eamer L, San Gabriel, ve diğ. Rapid selection of sperm with high DNA integrity. *Lab Chip*. 2014; 14: 1142–1150.

O'Donovan P, Vandekerckhove P, Lilford L ve diğ. Treatment of male infertility: is it effective? Review and meta-analyses of published randomized controlled trails. *Hum Reprod*. 1993; 8:1209-1214.

Oko R, Sutovsky P. Biogenesis of sperm perinuclear theca and its role in sperm functional competence and fertilization. *J. Reprod.Immunol*. 2009; 83 (1-2): 2-7.

Oko R, Clermont Y. Biogenesis of specialized cytoskeletal elements of rat spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci*. 1991; 637:203-23.

Oko R. Developmental expression and possible role of perinuclear theca proteins in mammalian spermatozoa. *Reprod.Fertil.Dev*. 1995; 7(4): 777-797.

Oliva R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2006; 12: 417–435.

Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC ve diğ. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod*. 2001; 16: 1912–1921.

Ombelet W, Cooke I, Dyer S ve diğ. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Human reprod. updat*. 2008; 14(6):605–21.

Paul C, Povey JE, Lawrence NJ ve diğ. Deletion of genes implicated in protecting the integrity of male

germ cells has differential effects on the incidence of DNA breaks and germ cell loss. *PLoS ONE*. 2007; 10: 1–10.

Paulson JD, Polakoski KL. A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertility and Sterility*. 1977; 28 (2): 178.

Piomboni P, Strehler E, Capitani S ve diğ. Submicroscopic mathematical evaluation of spermatozoa in assisted reproduction. *Notulae seminologicae. J Assist Reprod Genet* 1996; 13(8): 635–46.

Potts RJ, Newbury CJ, Smith G ve diğ. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res*. 1999; 423: 103–111.

Rigler R, Killander D, Bolund L ve diğ. Cytochemical characterization of deoxyribonucleoprotein in individual cell nuclei. Techniques for obtaining heat denaturation curves with the aid of acridine orange microfluorimetry and ultraviolet microspectrophotometry. *Exp Cell Res*. 1969; 55: 215–224.

Rodriguez I, Ody C, Araki K ve diğ. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J*. 1997 ; 16:2262–2270.

Ross MH, Pavlina W. Histology; A text and atlas with correlated cell and molecular biology, 5. baskı. *Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia: Lippincott W&W*. 2014. 784-829p.

Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G ve diğ. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod*. 1999; 4: 31–37.

Sakkas D, Seli E, Bizzaro D ve diğ. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 2003; 7: 428–432.

Sakkas D, Urner F, Bizzaro D ve diğ. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproductin*. 1998; 13(14):11–9.

Saleh RA, Agarwal A, Nada EA ve diğ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril*. 2003; 79(3): 1597–1605.

Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK ve diğ. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 2003 ; 80:1431–1436.

Sanchez R, Concha M, Ichikawa T ve diğ. Glass wool filtration reduces reactive oxygen species by elimination of leukocytes in oligozoospermic patients with leukocytospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1996; 13 (6): 489-494.

Santos F, Hendrich B, Reik W ve diğ. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*. 2002; 241:172-82.

Sauer R, Coulam CB, Jeyendran RS. Chromatin intact human sperm recovery is higher following glass wool column filtration as compared with density gradient centrifugation. *Andrologia*. 2012; 44 (1): 248-251.

Schuster TG, Cho B, Keller LM ve diğ. Isolation of motile spermatozoa from semen samples using microfluidics. *Reproductive Biomedicine Online*. 2003; 7 (1):75-81.

Seiringer, M., Maurer, M., Shebl, O., Dreier, K., Tews, G., Ziehr, S., et al., 2013. Efficacy of a sperm-selection chamber in terms of morphology, aneuploidy and DNA packaging. *RBM Online* 27, 81–88.

Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Human Reproduction Update*. 2005 ; 11(4), 337-349.

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

- Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996 ; 48(6):835-50.
- Shibahara H, Obara H, Hirano Y ve diğ. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *International Journal of Andrology*. 2004 ; 27(2):63-68.
- Silber SJ. The relationship of abnormal semen parameters to male fertility. *Human Reproduction*. 1989 ; 4 (8):947-953.
- Sills ES, Wittkowski KM, Tucker MJ ve diğ . Comparison of centrifugation-and noncentrifugation-based techniques for recovery of motile human sperm in assisted reproduction. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2002 ; 48 (2):141-145.
- Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*. 1999 ; 4:38-47.
- Skowronek F, Casanova G, Alciaturi J ve diğ. DNA sperm damage correlates with nuclear ultrastructural sperm defects in teratozoospermic men. *Andrologia* 2012; 44(1):59-65.
- Skowronek F, Alciaturi J, Casanova G ve diğ. Value of quantitative ultramorphological sperm analysis in infertile men. *Reprod Biol* 2010;10(2): 125-39.
- Spano M, Bonde JP, Hjollund HI ve diğ. Spermchromatine damage impairs human fertility. *Fertil Steril*. 2000 ; 73:43-50
- Sutovsky P, Manandhar G, Wu A ve diğ. Interactions of sperm perinuclear theca with the oocyte: implications for oocyte activation, anti-polyspermy defense, and assisted reproduction. *Microsc.Res.Tech.*, 2003; 61 (4): 362-378.
- Sutovsky P, Manandhar G. "Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis", in De Jonge, C. & Barratt, C.L. (eds), *The Sperm Cell*. 2006; pp. 1-30.
- Şeftalioğlu A. Genel insan embriyolojisi. *Ankara Üniversitesi Basımevi*, Ankara 1991.
- Takeda N, Yoshii N, Hoshino Y ve diğ. A New Human Spermatozoon Selection Method Based on Penetration of Cervical Mucus for Intracytoplasmic Sperm Injection. *Journal of Mammalian Ova Research*. 2012; 29 (1): 65-74.
- Tamburrino L, Marchiani S, Montoya M ve diğ. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl*. 2012;14:24-31.
- Taşoğlu S, Safaee H, Zhang X ve diğ. Exhaustion of racing sperm in nature-mimicking microfluidic channels during sorting. *Small*. 2013; 25: 9(20):3374-84.
- Tea NT, Jondet M, Scholler R. A migration-gravity sedimentation method for collecting motile spermatozoa from human semen. *In Vitro Fertilization, Embryo Transfer and Early Pregnancy*. 1984; 117-120.
- Tejada RI, Mitchell JC, Norman A ve diğ. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril*. 1984; 42:87-91.
- Tesarik J, Mendoza C, Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*. 2002; 17 (1):184-189.
- Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, et al. Interrelationship between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod*. 2001;16:2160-5.
- Torok L: Treatment of oligozoospermia with tamoxifen(open and controlled studies). *Andrologia*. 1985; 17: 497-500.

- Turner RM. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod.Fertil.Dev.* 2006; 18(1-2): 25-38.
- Twigg J, Irvine DS, Houston P ve diğ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4:439–445.
- Van Voorhis BJ, Barnett M, Sparks AET ve diğ. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2001 ; 75(4): 661-8.
- Van Weert JM, Repping S, Van Voorhis ve diğ. Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2004; 82(3): 612-20.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA®) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility.* 2004; 81 (5), 1289-1295.
- Wang C. J, Levchenko A. Microfluidics technology for systems biology research. In *Systems Biology*. New York, NY: Humana Press. 2009. 203-219
- Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular Human Reproduction.* 2010 ; 16 (1): 30-36.
- WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: *Cambridge University Press*; 1999.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cambridge: *World Health Organization* 2010.
- Yamauchi Y, Shaman JA, Ward WS. Non-genetic contributions of the sperm nucleus to embryonic development. *Asian J Androl.* 2011;13:31-5.
- Zarutskie PW, Dixon L, Hiller SL. Identifying sources of bacterial endotoxin contamination in an in vitro fertilization (IVF) culture environment. *Journal of assisted reproduction and genetics.* 1992 ; 9(1):77-80.
- Zavos PM, Abou-Abdallah M, Aslanis P ve diğ. Use of the Multi-ZSC one-step standardized swim-up method: recovery of high-quality spermatozoa for intrauterine insemination or other forms of assisted reproductive technologies. *Fertility and Sterility.* 2000; 74 (4):834-835.
- Zini A, Bielecki R, Phang D ve diğ. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 2001; 75:674–677.
- Zini A, Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl.* 1993; 16:183–188.
- Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? *J of Androl*, 2009; 30(3):219-29.

## ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Sevilay ERİMŞAH

2. **Doğum yeri ve Tarihi:** Kocaeli/Karamürsel, 13.02.1980

3. **Uyruğu:** TC

4. **Medeni Durumu:** Evli

5. **Çalıştığı kurum:** Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

6. **İletişim Bilgileri**

**Adres:** Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gölköy Kampüsü, 14280, Bolu

**İş Telefonu:** 0374 254 1000 - 3704

**Mail :** [sevilayerimsah@ibu.edu.tr](mailto:sevilayerimsah@ibu.edu.tr)

3. **Eğitim:**

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Tıbbi Biyolojik Bilimler	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	1999-2003
Yüksek Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	2003-2006
Doktora/Uzmanlık	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	2011-

**Yabancı Dil:** İngilizce, Almanca

**Yüksek Lisans Tezi:** Sperm Morfolojisi ve Kromatin Kondensasyon Defektleri Arasındaki Korelasyon

**Doktora Tezi:** Normozoospermik İnfertil Hastalardan Farklı Seçim Yöntemleri İle Elde Edilen Spermilerin İmmünohistokimyasal Ve Elektron Mikroskopik İncelenmesi

4. **Mesleki Deneyimi**

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Görev Yılı
Embriyolog	Süleymaniye Doğum Evi Tüp Bebek Merkezi	2006-2006
Embriyolog	Özel Harran Tüp Bebek Merkezi	2006-2008
Embriyolog	Kocaeli Üniversitesi Tüp Bebek Merkezi	2011 -2014
Uzman	Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi	2014-

## **5. Üyesi Olduğu Dernekler**

### **Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği**

## **6. Bilimsel Yayınlar**

### **6.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler**

1. Eyup Burak Sancak, Hakan Türkön, Selma Çukur, Sevilay Erimşah, Alpaslan Akbas, Murat Tolga Gulpinar, Huseyin Toman, Hasan Sahin, Metehan Uzun. Major Ozonated Autohemotherapy Preconditioning Ameliorates Kidney Ischemia-Reperfusion Injury, Inflammation February 2016. 39; 209–217.

2. Sevilay Erimşah, Hakan Elçin Terzi, Tülin Fırat, Aysel Kükner, Ayşegül Aytekin, Gizem İlter, Gizem Söyler, Havva İmran Özdemir, Metaphors of Medical Students About Embryology Education. The Turkish Online Journal of Educational Technology – July 2015: 381-385.

### **6.2. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler**

1. S. Erimşah, İ. Seçkin, S.Uludağ, T.İrez. Sperm Morfolojisi ve Kromatin Kondensasyon Defektleri Arasındaki Korelasyon, Cerrahpaşa Tıp Dergisi Cilt:39 Sayı:4 Yıl:2008 S:128-135.

### **6.3. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

1. Sevilay Erimşah, Hakan Elçin Terzi, Tülin Fırat, Aysel Kükner, Ayşegül Aytekin, Gizem İlter, Gizem Söyler, Havva İmran Özdemir. Metaphors of Medical Students About Embryology Education. International Conference on New Horizons in Education 2015, Spain.

### **6.4. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

1. Sevilay Erimşah, İsmail Seçkin, Seyfettin Uludağ, Tülay İrez, Teratozoospermi Olgularında Sperm Akrozom ve Kromatin Kondensasyon Defektlerinin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi, 17. Ulusal Elektron Mikroskopisi Kongresi 2005, Gebze.



2. Serdar Filiz, Sevilay Erimşah, Özcan Budak, Yiğit Çakıroğlu, Birol Vural, Beklenenin Altında Follikül Toplanan Hastalarda Fertilizasyon Oranları, 5.Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi, 2012
3. Serdar Filiz, Özcan Budak, Sevilay Erimşah, Yiğit Çakıroğlu, Birol Vural, HCG gününde önde giden folikül büyüklüğüne göre fertilizasyon oranları, 5. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi, 2012
4. Yiğit Çakıroğlu, Firdevs Şekerci, Sevilay erimşah, Serdar Filiz, Birol Vural, Oral Kontraseptif-GNRH Agonist Protokolünün Karşılaştırılması, 5. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi, 2012
5. Elçin Hakan Terzi, Esra Fidan, Sevilay Erimşah, Pınar Göç Rastgele, Meral Kekeçoğlu, Merve Kambur, Orman gülü balının fare testis dokusuna etkisi. 13th National Histology and Embryology Congress with International Participation April 30- May 3, 2016.
6. Sevilay Erimşah, Leyla Kılınç, Elçin Hakan Terzi, Tülin Fırat, Aysel Kükner, Süheyla Gonca, Normozoospermik İnfertil Hastalarda Sperm DNA Bütünlüğü ve Konvansiyonel Semen Parametreleri Arasındaki İlişki, 13th National Histology and Embryology Congress with International Participation April 30- May 3, 2016.

## **7. Projeler**

1. Unilateral testis torsiyon hasarına protocatechuic asidin (PCA) etkisinin araştırılması  
Proje No: 2015.8.01.939
2. Normozoospermik İnfertil Hastalardan Farklı Seçim Yöntemleri ile Elde Edilen Spermilerin İmmünohistokimyasal ve Elektron Mikroskopik İncelenmesi  
Proje No: 2015.08.03.970

## **8. Ulusal Ödüller**

1. En iyi sunu 3. lük belgesi

Katılımlı 17. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi 2005, Gebze-Tübitak.

## **9. Konuşmacı Olarak Katılınan Kongre, Sempozyum, Kurs ve Paneller**

1. Uluslararası katılımlı 17. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi 2005, Gebze-Tübitak.

