



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU ÖNCESİ  
SPERM İMMOBİLİZASYON SOLUSYONLARI İLE İNKÜBASYONUN  
SPERM MORFOLOJİSİ VE APOPTOTİK AKTİVASYON ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**Dr. Aysun YERMEZLER**

**UZMANLIK TEZİ**

**Bursa- 2013**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU ÖNCESİ  
SPERM İMMOBİLİZASYON SOLUSYONLARI İLE İNKÜBASYONUN  
SPERM MORFOLOJİSİ VE APOPTOTİK AKTİVASYON ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**Dr. Aysun YERMEZLER**

**UZMANLIK TEZİ**

**Danışman: Prof. Dr. Şahin SIRMALI**

**Bursa- 2013**

## İÇİNDEKİLER

Özet.....	ii
İngilizce özet.....	iv
Giriş.....	1
Gereç ve Yöntem.....	17
Bulgular.....	21
Tartışma ve Sonuç.....	43
Kaynaklar.....	49
Ekler.....	54
Teşekkür.....	55
Özgeçmiş.....	56

## ÖZET

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için morfoloji ve motilite esaslı sperm seçimi yapılmaktadır. Fertilizasyon kapasitesi düşük, anormal morfolojili sperm normal fertilizasyon sürecinde elimine edilebilirken, ICSI işleminde bu aşamanın by-pass edilmesi nedeniyle DNA bütünlüğü bilinmeyen spermin enjekte edilme riski bulunmaktadır. Pratikte ICSI uygulamalarında, manipülasyon kolaylığı sağlaması amacıyla sperm hareketini yavaşlatmada sentetik polimer yapıda PVP (polivinilprolidon) ya da genital traktın fizyolojik bileşeni olan hyaluronat ile sperm örneği muamele edilmektedir. Bu çalışmada 24 ejakulatta (normozoospermi grubu; n=11, teratozoospermi grubu; n=13) TUNEL metodu ile PVP ve hyaluronat'ın sperm DNA fragmentasyonuna etkisi morfolojik özellikleri ile korelasyonu kurularak kantitatif olarak ve transmisyon elektron mikroskopik (TEM) inceleme ile kalitatif olarak değerlendirildi. Normozoospermik ve teratozoospermik ejakulatlarda, PVP ve hyaluronat ile inkübasyon sonrası, sperm DNA fragmentasyon oranında kontrol grubu lehine istatistiksel açıdan anlamlı bir artış bulunurken, PVP ve hyaluronat grupları arasındaki karşılaştırmada istatistiksel anlamlılık görülmedi. Farklı morfoloji anomalilerine sahip spermelerde DNA fragmentasyon oranları karşılaştırıldığında; normozoospermi grubunda kontrol-deney grupları arasında ve deney gruplarının birbirleriyle karşılaştırılması sonucunda anlamlılık bulunmadı. Teratozoospermi grubunda baş anomalili spermelerde oluşan DNA hasarı; PVP ve hyaluronat gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bulunurken, boyun anomalili spermelerde yalnız PVP grubu ile kontrol grubu arasında anlamlılık görüldü. TEM bulguları, TUNEL verilerini destekler nitelikte bulundu. Sonuç olarak, immobilizasyon medyumunu olarak PVP ve hyaluronat'ın, sperm DNA'sı üzerine hasarlandırıcı etkileri eşdeğerdir. Anormal baş morfolojisi ile birlikte immobilizasyon medyumlarının DNA üzerine hasarlandırıcı etkisi artmaktadır. Anormal morfolojilerde, DNA fragmentasyon artışı nedeniyle, özellikle maturasyon sürecini tamamlamamış



testiküler spermle yapılan ICSI uygulamalarında immobilizasyon medyumlarında bekletme süresi kısa tutulmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** Sperm, apoptozis, PVP, hyaluronat.

## **SUMMARY**

### **Evaluation of an Effect of Sperm Incubation in Immobilization Medium on Sperm Morphology and Apoptotic Activation before Intracytoplasmic Sperm Injection**

The sperm selection is made based on morphology and motility for intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Spermatozoa with abnormal morphology and low fertilization capacity can be eliminated by normal fertilization process. But in ICSI, this step is being by-passed, therefore there is a risk of being injected unknown sperm DNA integrity. In practical ICSI applications, the sperm samples are treated with a synthetic polymer structured PVP (polyvinylpyrrolidone) which is toxicity unknown or with hyaluronate the natural component in the genital tract in order to slow down the sperm movement and to ease the manipulation. In this study, the effects of PVP and hyaluronate on sperm DNA fragmentation rate was evaluated supported by sperm morphology correlation using the TUNEL method both quantitatively and qualitative by transmission electron microscopy (TEM) on 24 ejaculates (normozoospermic group; n=11, teratozoospermic group; n=13). A statistically significance rise in the DNA fragmentation rate after PVP and hyaluronate incubation in favor of the control group in normozoospermic and teratozoospermic ejaculates was observed, whereas a statistically significant result was not observed in the comparison between PVP and hyaluronate groups. In normozoospermic group, when compared the rates of the sperm DNA fragmentation with different sperm morphology anomalies between the control-experimental groups and the comparison between the experimental groups, there was no significant result. The DNA damage with a head anomaly spermatozoa in the teratozoospermic group; there was a statistically significance when compared to the PVP and hyaluronate groups with the control groups and sperms with a neck anomaly only between the

PVP and the control group. TEM findings were supported of the TUNEL data. Consequently; the detrimental effects of the immobilization mediums such as PVP and hyaluronate on sperm DNA are equal. The damage to the DNA on sperms with head anomalies increase together with the immobilization mediums. For abnormal morphologies, the treatment period of the sperms with immobilization mediums especially when using testicular sperms have not completed the process of maturation in ICSI applications should be shorter due to DNA fragmentation increase.

**Key words:** Sperm, apoptosis, PVP, hyaluronate

## GİRİŞ

İnfertilite yaklaşık olarak çiftlerin %15'inde görülen bir üreme sağlığı problemi olup vakaların yaklaşık %50'sinden erkek infertilitesi sorumlu tutulmaktadır. Bu vakaların %30'u sadece erkek, %20'si ise hem kadın hem erkek faktörü nedeniyle. Erkek infertilitesinin etyolojisi yaklaşık yarısında bilinmemektedir (idiyopatik). Diğer yarısını ise konjenital ya da kazanılmış defektler oluşturmaktadır (1,2).

Erkek fertilitasını etkileyebilecek nedenler (Tablo-1) hastanın değerlendirmesinde alınacak ayrıntılı anamnez, fizik muayene ve sonrasında laboratuvar ve radyolojik teknikler ile saptanabilir.

**Tablo-1:** Erkek infertilitesinde etyoloji (3).

<b>SPERM ÜRETİMİNDE ANORMALLİK</b>
Primer testiküler yetmezlik (hipergonadotropik hipogonadizm)
• Genetik anormalliler (Klinefelter sendromu, Y kromozom mikrodelsiyonları vb)
Sekonder testiküler yetmezlik
• Hipogonadotropik hipogonadizm
• Kriptorşidizm
• Atrofi (orşit)
• Eksojen androjen kullanımı
• Gonadotoksinlere maruziyet/ ısı
• Varikosel
<b>SPERM FONKSİYON ANORMALLİKLERİ</b>
• Anti-sperm antikolarlar
• Enfeksiyon
• Varikosel
• Sperm DNA fragmantasyonu
• Sperm-servikal mukus etkileşimi
• Zona pellusidaya bağlanma/ sperm penetrasyonu
• Akrozom reaksiyonu
• Biyokimyasal (reaktif oksijen türevleri)
<b>DUKTAL SİSTEM OBSTRÜKSİYONU</b>
• Vazektomi
• Konjenital vas deferens yokluğu
• Epididimal obstrüksiyon (konjenital ya da kazanılmış)
• Ejakulatuar kanal obstrüksiyonu (konjenital ya da kazanılmış)

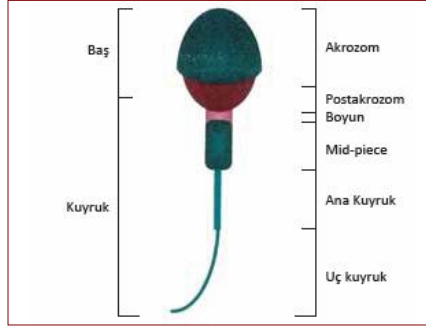
Günümüzde erkek infertilitesinin tanısı farklı zamanlarda alınan en az 2 semen analizi ile konulmaktadır. Semen örnekleri WHO 1999 (Dünya Sağlık Örgütü) (Tablo-2) ve/veya Kruger'in kesin kriterlerine göre değerlendirilir.

**Tablo-2:** Semen morfolojisinin WHO Kriterleri'ne (1999) göre değerlendirilmesi (4).

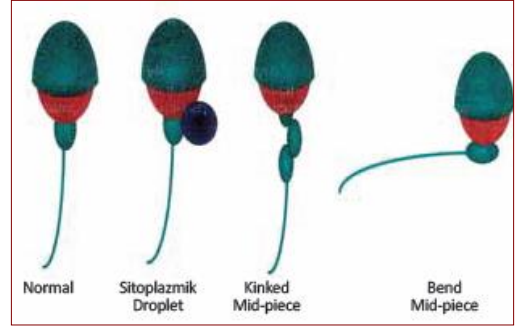
Likefaksiyon	< 60 dk
Görünüm	homojen, gri-opak
Volüm	≥ 2ml.
Morfoloji - WHO	≥ %30 normal şekil
- Kruger	≥ %14 normal şekil
Canlılık	≥ %75
Konsantrasyon	≥ 20 milyon/ml.
Total sayı	≥ 40 milyon/ejakulat
Motilite	≥ %50 ileri hareketli ilk 1 saatte
pH	≥ 7.2
Lökosit	< 1 milyon/ml

Kruger kriterlerine göre yapılan morfolojik değerlendirme ile sperm başı; düzgün konturlu, oval biçimli olmalı, en: 2-3 µm, boy: 4-5 µm ölçülerinde olup akrozom mutlaka sperm başının %40-70'ini oluşturmalı ve vakuol içermemelidir. Boyun bölümü 4-5 µm uzunluğunda, düzgün ve başın alt kısmına aksiller konumda bağlanmalıdır. Boyun bölgesinde sperm başının yarısından daha büyük sitoplazmik damlacık (sitoplazmik droplet) olmamalıdır. Kuyruk, 50-55 µm uzunluğunda, düzgün kıvrımlı, boyun kısmından son kısma doğru giderek incelmelidir (5,6). Buna göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdesinin %14 ve üstü değerleri "normal morfoloji", %5-14 değerleri "orta morfoloji" ve %5'in altı değerleri ise "kötü morfoloji" ye sahip örnek olarak kabul görmektedir (6). WHO kriterlerine göre yapılan morfolojik değerlendirmeye göre ise, normal morfolojiye sahip örnek olarak

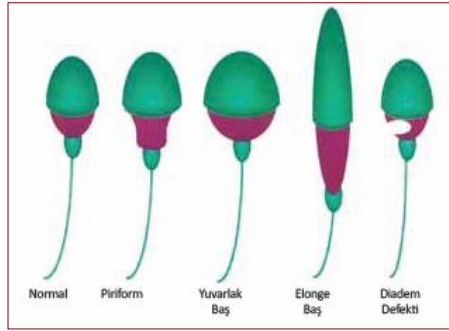
kabul edilme oranı %30'dur. Morfolojik değerlendirmede baz alınan normal görünüm, baş, akrozom, boyun ve kuyruk bölgesinde gözlenebilecek olası morfoloji anomalileri Şekil-1-5'de şematize edilmiştir (7).



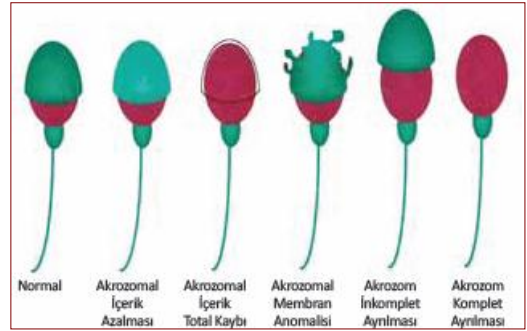
Şekil-1: Normal sperm morfolojisi.



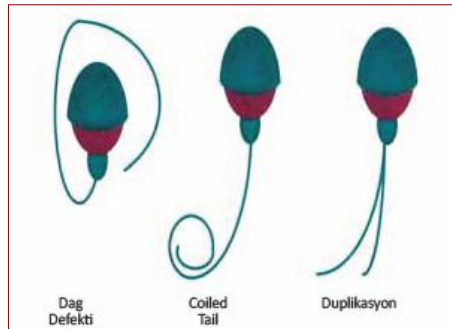
Şekil-2: Boyun bölgesi anomalileri.



Şekil-3: Çeşitli baş anomalileri.



Şekil-4: Akrozom defektleri.



Şekil-5: Kuyruk anomalileri.

Bazal semen analizi ile değerlendirilen volüm, konsantrasyon, motilite, morfoloji ve vitalite bulgularına göre kullanılan terminoloji Tablo-3'de verilmiştir.

**Tablo-3:** Semen değişkenleri için terminoloji (1,8).

Normozoospermi	sayı, hareket, şekil normal
Oligozoospermi	< 20 milyon/ml.
Astenozoospermi	< %50 ileri doğru progressif hareketli
Teratozoospermi	< %30 normal morfolojili sperm
Oligoastenoteratozoospermi	sayı, hareket, şekil anormalliği birarada
Azospermi	ejakulatta spermatozoa bulunmaması
Aspermi	ejakulat olmaması
Nekrospermi	canlı olmayan/ölü sperm
Hematospermi	semende eritrosit varlığı
Piyospermi	semende lökosit varlığı

### **Erkek İnfertilitesinin Patogenezi**

Anatomik ve fizyolojik açıdan bakıldığında erkeğin fertilitesi;

1-Hipotalamik-hipofizer aks fonksiyonu

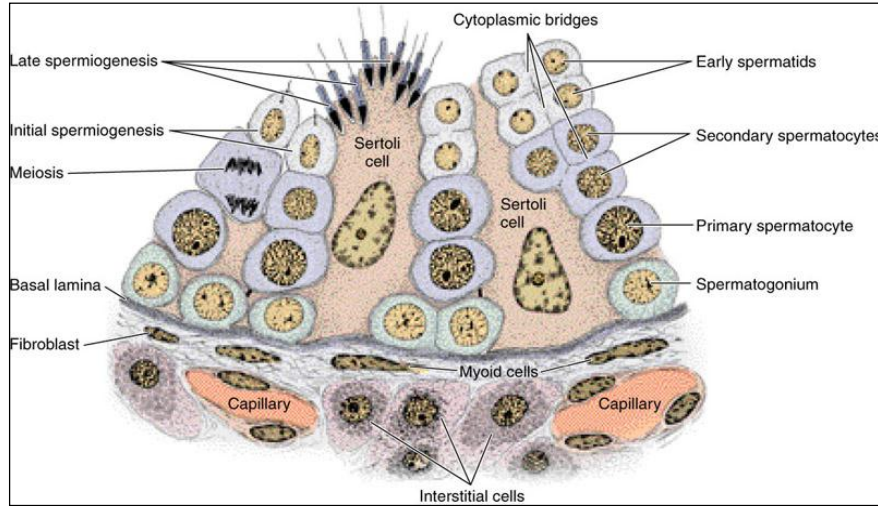
2-Spermatogenez süreci

3-Sperm depolanması, erektil ve ejakulatuar fonksiyon

4-Semen kalitesi ve spermatozoaların fertilize edici yeteneğine bağlıdır.

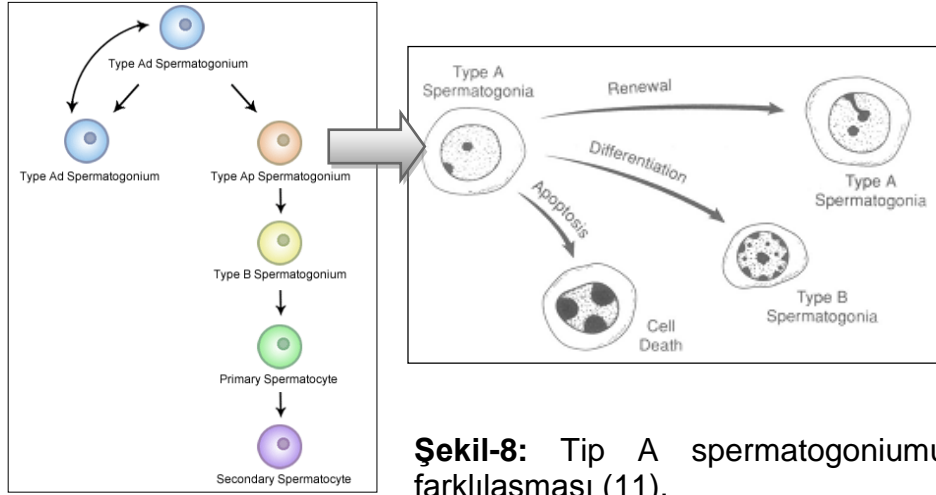
Hipotalamustan salgılanan ve portal venöz sistem aracılığıyla taşınan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) salınımının gerçekleşmesi için hipofiz ön lobunu uyarır. Seminifer tübüller kan-testis bariyerini de oluşturacak şekilde sıkı hücresel bağlantı kompleksleri ile birbirine bağlı olan Sertoli hücreleriyle kaplıdır. Sertoli hücreleri FSH'ya yanıt olarak androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılar. Testiste interstisyel alanlarda bulunan Leydig hücreleri ise LH

etkisiyle uyarılarak testosteron üretir ve üretilen testosteron kan dolaşımı yoluyla ve aromataz enzim aktivitesiyle östrodiol çevrilerek negatif feedback etkiyle LH salınımını düzenler. Spermatogenez boyunca üretilen germ hücreleri Sertoli hücreleri tarafından beslenir. Sertoli hücreleri arasında bulunan zonula okludens bağlantı kompleksleri seminifer tübül epitelini bazal ve adluminal kompartmanlara ayırır. Seminifer tübüllerin bazal kompartmanında bulunan diploid kök hücreler Tip A spermatogoniumlar olarak bilinir ve bunlardan Tip B spermatogoniumlar gelişir. Bu hücreler adluminal kompartmana geçerek primer spermatozoid aşamasında mayoz bölünme evresine geçerler. Primer spermatozoidler I. mayoz bölünmeyi tamamlayarak sekonder spermatozoidleri, II. mayoz bölünmeyi tamamlayarak haploid yapıda kromozoma sahip spermatozoidleri oluştururlar (Şekil 6-8).



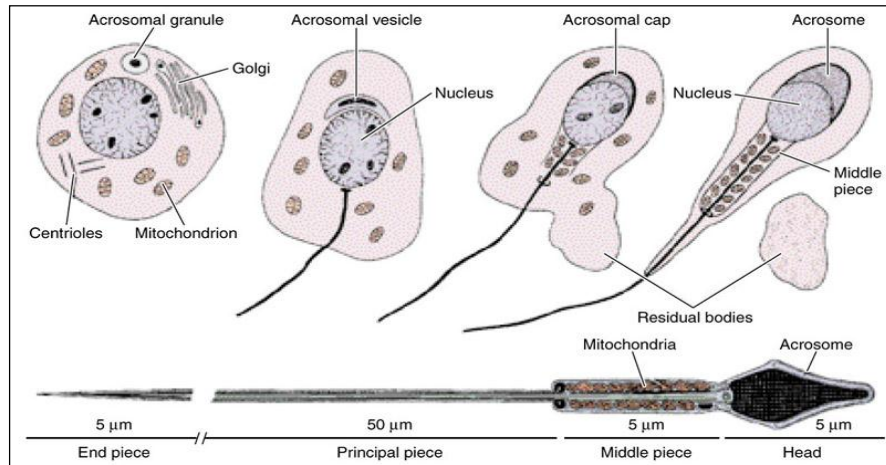
**Şekil-6:** Spermatogoniumdan olgun sperm oluşumu (9).





**Şekil-7:** Tip A spermatogoniumdan sekonder spermatozoid oluşumu (10).

Küre ya da poligonal biçimli spermatidın, sentrik yerleşimli yoğun kromatine sahip sferik nükleusu ve çekirdeğe yakın yerleşimli golgi kompleksi, çok sayıda mitokondrisi ve bir çift sentriolünde birtakım şekil değişimleri gerçekleşir. Spermatogoniumdan spermatid oluşumu ile (çoğalma ve farklılanma ile) spermatozoidogenez ve mayoz bölünme evresi, oluşan spermatidın morfolojik değişim geçirerek spermatozoa'nın oluşumu ile de spermiyogenez evresi tamamlanır (Şekil-9).



Spermatozoa'lar seminifer túbülden sonra intratestiküler kanallar olan tubuli rekti ve rete testise, daha sonra ekstratestiküler kanallar olan efferent kanallara geçerek epididimisin baş kısmında yoğunlaşırlar. 2-12 günlük bir sürede epididimisin baş ve gövde kısmını geçen spermatozoalar, ejakulasyon öncesi epididimisin kuyruk kısmı, seminal vezikül ve vazal ampullada depolanır. Spermatogenez sonrası oluşup seminifer túbüllere salınan spermatozoalar morfolojik olarak matür olmakla birlikte fonksiyonel olarak immatür, hareketsiz ve ovumu dölleme yeteneği sınırlıdır. Spermium epididimise Sertoli ve rete testis hücreleri tarafından salgılanan testiküler sıvı içinde taşınır. Seminifer túbül duvarındaki myoid hücrelerin ve efferent túbüllerden itibaren de duktus duvarlarında bulunan düz kas tabakasının kontraksiyonu spermin ilerleyişine yardımcıdır. Epididimisten geçişleri ve depolanması sürecinde olgunlaşan spermatozoalar kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu sonrası fertilize edici yeteneğe sahip olurlar (8,12).

### **Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezlerinde (ÜYTM) Erkek İnfertilitesine Yaklaşım ve ICSI Uygulamaları**

Louis Brown'nun 1978 yılında in vitro fertilizasyon (IVF) yöntemiyle dünyaya gelmesi infertilite tedavisinde atılan devrim niteliğindeki adımlardan biri olmuştur. ÜYTM'de yapılan IVF uygulamalarında, normal parametrelere sahip olmayan semen örnekleri kullanıldığında fertilizasyon başarısı düşmektedir. İn vivo ortamda ve IVF uygulamalarında oositi polispermi ve fiziksel hasarlardan koruyan zona pellusida, düşük sayıda ve/veya kötü kalitede spermin varlığında fertilizasyon aşamasında engel oluşturmaktadır. Fertilizasyonun ilk basamaklarından olan spermlerin zona pellusidaya penetrasyonunda oluşan başarısızlık; motilitenin yetersizliği, anormal kapasitasyon ve/veya akrozom reaksiyonunun bir sonucudur. Oligostenoteratozoospermi (OAT) gibi şiddetli erkek infertilitesi olgularında spermin penetrasyon potansiyelinin kaybından dolayı klasik IVF uygulamalarının yetersiz kalması sebebiyle, spermin zona bariyerini aşarak oosit içine mekanik olarak bırakılması yöntemi olan intrasitoplazmik sperm

enjeksiyonu (ICSI) yapılmaktadır (2). Normal morfolojide ve motil bir sperm hücrelerinin ICSI yöntemiyle oosit içine enjeksiyonu erkeğe bağlı infertilite olgularında başarı şansını arttırmıştır. Primer testiküler yetmezlik nedeniyle azospermik olan pek çok hastada uygulanan testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) veya testiküler sperm aspirasyonu (TESA) yoluyla elde edilen spermatozoaların intrasitoplazmik enjeksiyonu ile fertilitte sağlanabilmektedir (8).

ICSI tekniğinde sırasıyla;

1. Oositi çevreleyen kumulus ve korona radiata hücrelerinin uzaklaştırılması ve oosit nüklear matürasyonunun değerlendirilmesi
2. Semen parametreleri doğrultusunda uygun olan sperm hazırlama metodunun uygulanması
3. Sperm immobilizasyonu
4. Matür (metafaz II) oosit sitoplazması içine sperm enjeksiyonu yapılır.

Mikroenjeksiyon işleminin gerçekleştirildiği ICSI kabında oositin konulduğu dış ortam kültür medyumuna ait droplar, sperm drobu ve sperm drobu ile bağlantılı sperm immobilizasyon solusyon drobu bulunur. Immobilizasyon solusyonu içine doğru yüzen, ileri progressif motilitesi olan ve normal morfolojili sperm seçilerek ICSI işleminde kullanılır. Immobilizasyon solusyonu içinde ilerleyen ve mikroenjeksiyon için seçilen sperm, mikroenjeksiyon iğnesi ile kuyruğunun kırılması vasıtasıyla immobil hale getirilir. Sperm kuyruğunun kırılması ile oluşan plazmalemma hasarı oositin sitoplazmik aktivasyonu ve buna bağlı olarak döllenme oranında artış için önemlidir. Oosit aktivasyonunun sağlanması, sperm nükleusunun dekondansasyonu ve erkek pronükleusunun oluşumu için ön şarttır. ICSI sırasında spermin hareketsizleştirilmesi ve oluşan plazma membran hasarı akrozom reaksiyonunu başlatır, oosit aktivasyonunu indükler ve ooplazmanın hareketli sperm kuyruğu ile zarar görmesini önleyerek ICSI başarısını arttırmaktadır (13-15). Spermin proksimal sentriyolü, oositin birinci mitoz bölünmesinin (klivaj) gerçekleştirebilmesi için gerekli olan bipolar iç

iplikçiklerinin oluşumunda rol alır. Bu nedenle proksimal sentriyolün hasarlanmaması için, sperm kuyruğu boyun kısmından uzak bir yerden kırılarak immobilizasyon gerçekleştirilmelidir (2).

### **Sperm İmmobilizasyon Solusyonları**

İdeal bir sperm immobilizasyon solusyonu; sperm motilitesini azaltarak ICSI pipeti içine kolaylıkla alınmasını sağlayacak şekilde yeterince yoğun olmalı, spermin pipet içinde kolaylıkla aspire edilip bırakılabilmesini sağlayabilecek şekilde yeterince sıvı ve akışkan olmalı, spermin ICSI pipet camına yada plastik kültür kabına yapışmasını önlemeli, sperme ve ICSI sonrası zigot gelişimine zararlı etkileri bulunmamalıdır (16). Sperm immobilizasyonu gerçekleştirilirken, spermin immobilizasyon solüsyonu içinde yüzerek ilerlemesi, seçimi ve yakalanarak enjeksiyon pipeti içine alınıp bırakılması gibi manipülasyonlar esnasında mikroenjeksiyonu yapan kişinin manüplasyon tecrübesi ile ters orantılı olarak belirli bir süre immobilizasyon solüsyonuna maruz kalır. Pratikte testiküler spermin kullanıldığı azospermik hastalarda, oositlerin inkübatör dışında uzun süre tutulmaması amacıyla, işlem öncesi sperm seçimi ve immobilizasyonu yapılarak, spermler rutin uygulamadan daha uzun bir süre immobilizasyon solüsyonuna maruz kalmaktadır. Dolayısıyla kullanılan immobilizasyon medyumunun sperme olası toksik etkilerinin dikkate alınması gerekmektedir.

IVF laboratuvarlarında rutinde 360000 dalton molekül ağırlığına sahip polivinilprolidon'un (PVP) %10 oranına sahip immobilizasyon medyumları kullanılır. PVP, ICSI işlemi sırasında sperm hareketliliğini azaltmada, hücrenin enjeksiyon pipeti çeperine yapışmasının engellenmesinde ve ICSI pipeti içerisinde sıvıların akışının daha kontrollü şekilde yapılabilmesinin sağlanmasında rol oynar. Ayrıca PVP sperm hazırlama ve dondurma medyumları içerisinde de bulunmaktadır (13). ICSI uygulamaları sırasında sperm ile bir miktar PVP'nin ooplazma içine girmesi durumunda, PVP lizozomal enzimlerce sindirilememekte ve oosit içerisinde uzun süre kalmaktadır (16,17).

PVP etken maddesi ICSI uygulamaları dışında deterjan ve şampuanlarda kıvam arttırıcı, cilt koruyucu amaçlı kozmetik uygulamalarda, yapıştırıcılarda, boyalarda, plastik üretiminde, cam elyafı, seramiklerin yapısında, fotoğraf film üretimi, böcek ilaçlarında aktif maddenin bitkiye yapışmasını iyileştirici gibi farklı amaçlarda kullanıma sahip bir kimyasaldır (13,17-20). Medikal alanda intravenöz veya intramüsküler uygulanan ilaçlarda plazma genişletici olarak bulunan PVP'nin bu yararlı etkilerinin yanında, uygulamaya bağlı olarak depolanma sonucu gelişen papül yada nodül tarzı cilt lezyonlarına ve karaciğer, dalak yada böbrekte birikime neden olduğu gösterilmiştir (17).

Yapılan bazı çalışmalarda PVP'nin fare embriyo gelişimi üzerine toksik etkileri olduğu bildirilmiştir (13,20,21). PVP'nin spermatozoa'nın primer olarak plazma membranı üzerinde, bunun yanısıra kromatin yapısında ve ince yapısında bozulmalara neden olduğu (13,17,19), oligozoospermik örneklerde DNA fragmentasyonunu indüklediği, dondurulmuş çözülmüş normo ve oligozoospermili örneklerde DNA fragmentasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (22).

PVP'nin olası zararlı etkilerinden kaçınmak için daha fizyolojik ve sperm yapısına zarar vermeyecek etken maddelerin arayışına girilmiştir. ICSI işleminde, PVP ile aynı amaçla kullanılmak üzere, fizyolojik şartlarda reproduktif sistemde bulunan hyaluronat alternatif olarak kullanılmaktadır (23). Oositi çevreleyen kumulus ooforus hücreleri arasındaki ekstrasellüler matriksinin ara maddesinde bulunan hyaluronik asit (24) fertilizasyonda matür spermin oosite ulaşması sürecinde bir labirent sistemi oluşturarak kumulus hücrelerini birarada tutar. Hyaluronatın doğal fertilizasyon sürecinde fertilizasyon kapasitesi yüksek sperm seçiciliğinde rol oynadığı yönünde ilişkilendirilen mekanizmalar, yapılan çalışmalarla kanıtlanarak, hyaluronatın "Fizyolojik ICSI" uygulamalarında sperm seçici olarak kabul görmesini sağlamıştır (16,25-28). Hyaluronat tıpta doku rejenerasyonunda, synovial sıvı yapım desteği olarak, dermatolojide cilt onarımı ve anti-aging gibi çeşitli kullanım alanlarına sahiptir (29).

Hyaluronat ticari olarak plastik kültür kabında hyaluronat mikro damlacıkları bulunan hazır ICSI tabağı şeklinde yada hyaluronat içeren vizköz medyum şeklinde iki şekilde bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda hyaluronat'ın klinik olarak embriyo kalitesi ve implantasyon başarısı üzerine olumlu etkileri tespit edilmiştir (25). ICSI uygulamaları sırasında hyaluronat'ın etkin şekilde sperm motilitesini azalttığı, manüpülasyon kolaylığı sağlayarak spermatozoa'nın pipete yada ICSI tabağına yapışmasını önlediği, ayrıca ICSI sonrası zigot gelişimi üzerine zararlı etki göstermediği tespit edilmiştir (16). Hyaluronatın, fertilizasyon potansiyeli yüksek sperm seçimini sağlayarak, embriyo kalitesi ve implantasyon oranı artışında anlamlı derecede etkin olduğu ve lizozomal enzimlerce sindirildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (20,25).

### **Spermde DNA Hasarının Önemi ve Apoptozis**

Erkek faktörüne bağlı infertilitede fertilizasyon başarı oranını artırmak için tercih edilen ICSI yöntemi sırasında; motilite ve morfoloji esaslı sperm seçimi yapılmaktadır. Günümüzde normal değerlere sahip spermelerin DNA bütünlüğü bilinmemekte ve ICSI yöntemi ile bu tip spermelerin seçimi risk teşkil etmektedir (30-32). İnfertil erkeklerin %15'inin normal spermiyogram bulgularına sahip olması (33,34), rutinde kullanılan parametrelerin, sperm kalitesini değerlendirmede yetersiz olduğunu göstermektedir. Sperm morfoloji ve motilite anomalilerinin DNA hasarı ile ilişkili olduğu (35-37), hasarlı DNA'ya sahip sperm fertilizasyon oranını negatif yönde etkilediği (31,38,39), embriyo gelişim kalitesini bozduğu ve düşük oranında artışa neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (40-43). Doğal fertilizasyon sürecinde anomalili sperm eliminasyonunun, ICSI işlemiyle bypass edilmesi nedeniyle DNA hasarlı sperm enjekte edilme riski bulunmaktadır (30,35). Bu riski en aza indirebilmek için, çeşitli sperm morfoloji anomalileri ile DNA hasarını ilişkilendiren çalışmalar yapılmış (44-47) ve bu anomalilere sahip spermelerin kullanımından sakınılması önerilmiştir.

Sperm motilite ve morfoloji anomalileri ile anöploidi arasında ilişkiyi gösteren çalışmalar bulunmaktadır (33,49-54). Bu sebeple günümüzde DNA hasarına sahip sperm enjeksiyonu ile doğan bebeklerde birtakım genetik hasarlara ve çocukluk çağı kanserlerine neden olunabileceği yönünde endişeler bulunmaktadır (33,34,49-53,55-58).

Günümüzde IVF merkezlerinde tüm erkek infertlitesi yönetimindeki olumlu gelişmelere rağmen fertilitite başarısı %60-70 civarındadır (38,44). Çoğunlukla morfolojiye dayalı seçim ile elde edilen başarı oranı arasındaki ilişki, sperm faktörü ve ooplazmik maturasyon ile ilgili bilinmeyenleri öngörmektedir.

DNA hasarlı sperm örneğinde fertilizasyon oranının, motilite anomalisine göre 9,5 kat düşük olması, ICSI seçimi sırasında motiliteye dayanan seçimden ziyade DNA hasarına sahip olmayan sperm seçiminin önemine işaret etmektedir (48). ICSI öncesi oosite enjekte edilecek spermde DNA hasarını tespit etmeye yönelik noninvaziv, pratik bir yöntemin olmaması nedeniyle, halen sperm morfolojisi, sperm seçiminde kullanılan en yaygın yöntemdir. Literatürde detaylı sperm morfoloji değerlendirmesi ile korelasyonlu olarak, sperm immobilizasyon medyumlarının sperm hücresinde DNA fragmantasyonuna etkisini karşılaştıran kantitatif bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Spermde DNA hasarı 6 ana mekanizma ile indüklenmektedir:

1) spermatogenez sırasında apoptoz 2) spermiyogenezde kromatin remodellingi sırasında kol kırıkları 3) erkek reproduktif traktında ilerlerken serbest oksijen radikalleri ile indüklenen post-testiküler DNA fragmantasyonu 4) endojen endonükleazların indüklemesi 5) radyoterapi yada kemoterapi ile indüklenme 6) sigara içimi yada hava kirliliği gibi çevresel faktörler yolu ile oluşan DNA hasarı (34,40). Anormal kromatin paketlenmesi, reaktif oksijen ürünleri ve apoptozis DNA bütünlüğünü bozan en önemli etyolojik faktörlerdir. Testiste apoptozis, aşırı gamet oluşumunu önlemekte ve proliferasyon düzeylerinin kontrolünü sağlamakta, hasarlı DNA'ya sahip germ hücre proliferasyonunu engellemektedir. Spermatogenezde sitoplazmanın remodelling'i sırasında oluşan aksaklık "abortif apoptozis" olarak

adlandırılmakta ve defektli sperm hücreleri ejakulatta görülmektedir. Serbest oksijen radikalleri normal hücre metabolizması sırasında fizyolojik olarak oluşmaktadır. Ancak yüksek düzeyleri sperm kalite ve fonksiyonu üzerine zararlı etkilerde bulunmaktadır. Ayrıca artmış serbest oksijen radikallerinin hasarlandırıcı etkisi aktive olan lökositlerin etkisiyle de meydana gelmektedir. Bu sırada 8-OHdG oluşumu (8-hidroksi 2-deoksiguanozin) oksidatif DNA hasarında anahtar belirteç olarak rol oynamaktadır. Oksidatif stres, sperm kromatin bütünlüğünü etkilemekte, tek yada çift zincir kırıkları, baz modifikasyonu, delesyon, çerçeve kayması, çarpaz bağlanma ve yeniden kromozomal düzenleme ile sonuçlanmaktadır (59).

DNA hasarı, tek yada her iki DNA iplik kırığı ile nükleotidlerinin modifikasyonunun bozulması şeklinde tanımlanır. Spermatogonial germ hücrelerinden ejakulattaki sperme kadar transformasyonun herhangi bir basamağında gelişebilmesi nedeniyle, testiküler spermde, epididimal spermde ve ejakulattaki spermde DNA hasarı görülebilir. Mitoz geçirmiş spermatogoniumun mayozdaki spermatosite transformasyonunda çift DNA iplik kırığı normalde tanınıp çarpazlanma sonrası bağlanır. Eğer tamir edilmezse, ejakulatta hasarın gerçekleştiği fazın hücresi tespit edilir. Spermiyogenez sürecinde protaminler ile histonlar yer değiştirir ve genomun kompaksiyonu gerçekleşir. Kromatin paketlenmesinde oluşan hata, sperm DNA'sının hasara daha yatkın olmasına sebep olur. Epididimal maturasyon sürecinde protamin disülfid çarpaz bağlanması tamamlanır ve sperm kromatininin kompakt yapısı sağlanır. Eğer disülfid çarpaz bağlanması eksik olursa suboptimal kompaksiyon sonucu DNA hasarına neden olur. Epididimiste sperm depolanması ve geçişi sırasında yada ejakulasyon sonrası gelişen DNA hasarında, spermiyogenez sonrası transkripsiyon ve translasyonun öneminin olmaması nedeniyle tamiri yapılmamaktadır (34). Spermiyogenez başlıca 2 faza ayrılmaktadır; birinci fazda, nükleus yuvarlak olup başlıca nüklear proteini histonlardır. İkinci fazda kromatin yapısında, nüklear şekilde değişim gelişir ve kromatin kondanse hale gelip histonların yerini başlıca protein olarak protaminler alır. Böylece kromatin remodelingi tamamlanır ve bu sırada DNA kırıkları oluşabilir (60). Protaminler sperm



kromatinin sıkıca paketlenmesini sağlarken rezidüv histonlar spesifik DNA dizilerine bağlanarak daha gevşek kromatin kompaksiyonuna neden olurlar. İnfertil erkeklerde, fertil erkekler ile karşılaştırıldığında histon/protamin oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (61). Ejakulat spermatozoasında kaspaz aktivasyonu, fosfotidilserinin eksternalizasyonu, mitokondrial membran potansiyel değişimi ve DNA fragmentasyonu apoptozun belirteçleri olarak bulunmuştur. Çalışmalar infertil erkeklerin fertil olanlarla karşılaştırıldığında daha yüksek oranda apoptotik sperme sahip olduğuna işaret etmektedir (57,62). DNA fragmentasyon yüzdesinin %30'un üzerinde olması başta fertilitate problemi olmak üzere çeşitli klinik problemler olarak karşımıza çıkmaktadır (63,64). Sperm DNA hasarı fertilitate potansiyelini tahmin etmede faydalı bir göstergedir (65). Embriyonik gelişim sırasında ve sonrasında hücrel apoptozis normal bir süreçtir. Apoptozis yolu ile germ hücre kaybı spermatogenez sırasında baskın olup p53, p21, kaspazlar, bcl-2 ve Fas ekspresyon düzeyleri ile ve alternatif yollar ile gerçekleşmektedir. Anormal sperm parametrelerine sahip bireylerde Fas ve p53 ekspresyon düzeyleri yüksek iken, normal parametrelere sahip bireylerde düşük bulunmuştur. Ayrıca immatür sperm varlığı apoptotik belirteçlerin yüksekliği ile birlikte (62,64,66). Eldeki verilere göre günümüzde DNA hasarlı spermin oositi fertilize edebilme riski bulunmaktadır. Oosit ve zigot paternal genomdaki hasarı bir dereceye kadar onarabilme yeteneğine sahip olmakla birlikte DNA çift zincir kırıklarının onarımı güçleşmekte ve bu durum embriyo gelişimini etkilemektedir. Bu nedenle fertilize olabilen ancak implantasyon başarısızlığı veya erken dönem düşüklüğünün görüldüğü durumlarda sperm DNA'sı önem taşımaktadır (67). Sperm morfolojisi ile birlikte DNA bütünlüğü diğer sperm parametrelerine göre daha güvenilir bulunmaktadır. Sperm baş morfolojisi, sperm nüklear kondansasyonunun ana belirleyicisi olabilir ancak günümüzde aradaki ilişki tam olarak bilinmemektedir (68). Yine sperm nüklear alanının %50'sinden fazlasını kaplayan büyük nüklear vakuollerin anormal kromatin paketlenmesine sahip olduğu ve DNA hasarına daha yatkın olduğu savunulmaktadır (57).

## DNA Hasarının Tespiti

Günümüzde sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmede çeşitli testler kullanılmaktadır. Sperm kromatin paketlenme defektlerinin tayininde; toluidin mavisi, anilin mavisi ile boyanma ve kromamisin A3 testi, sperm DNA bütünlüğünün değerlendirilmesinde; akridin turuncusu ile boyanma testi, SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), asıl çentik okuma tayini (ISNT- In situ nick translation assay), tek hücre jel elektroforezi (COMET), sperm kromatin ayrılma testi olan Halosperm test (SCD-Sperm Chromatin Dispersion test) ve TUNEL (the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated (TdT) deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labelling assay) testleri kullanılmaktadır (59,69). Bu tekniklerden sıklıkla TUNEL, COMET ve SCSA teknikleri DNA bütünlüğünü değerlendirmede tercih edilmektedir. Bu çalışmada tercih edilen TUNEL yöntemi; TdT enziminin katalize ettiği reaksiyonla tek yada çift zincir kırıklarına dUTP'nin birleştirilmesiyle DNA kırıklarının işaretlenerek flow sitometri, floresan mikroskopisi yada ışık mikroskopisi ile direkt DNA kırıklarının saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. Kullanılan yöntemle ait ekipmanlara kolay ulaşılabilir olması, yaklaşık 4 saat gibi kısa bir süre içerisinde analiz için hazır hale getirilebilmesi, varyasyon katsayısının düşük olması avantajları iken, arka plan boyanması ile etkinliğinin azalması, eşik değerinin standardize edilmemiş olması (58,59,61,70) ise dezavantajlarıdır (71). Bu testlerin tümü DNA bütünlüğünü ölçmede farklı mekanizmaları kullansa da genel olarak birbirleriyle korelasyon göstermektedir (69).

Semenin değerlendirilmesinde ışık mikroskopisi sınırlı bilgi verirken elektron mikroskopisi ile sitolojik detaylar tanınabilmektedir. Fertilizasyonun; ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede WHO (1999) kriterlerine göre normal form yüzdesinin  $\geq$  %30, kesin kriterlere göre ise  $\geq$  %5 olduğu durumlarda sözkonusu olduğu kabul edilmektedir. Günümüzde elektron mikroskopisi spermatozoa yapısındaki değişimleri incelemeye ışık mikroskopisinin tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır. Elektron mikroskopisi ile normal ve anormal formların yüzdesini ayıran eşik değer ise henüz

saptanmamıştır (72). Özellikle anormal baş, vakuol varlığı, sitoplazmik droplet, çeşitli boyun ve kuyruk anomalileri gibi morfoloji anomalilerinin, elektron mikroskopisinin ince yapısal detayların incelenmesine olanak verme özelliği ile DNA hasarı ve infertilite ilişkisi gösterilmiştir (65,73-77). DNA bütünlüğü infertilitenin tahmininde önemli bir özelliğe sahiptir. Bu amaçla, elektron mikroskobu desteğiyle nuklear şekil ve içeriği ayrıntılı olarak incelenebilmektedir. Şekil değişimine uğramış akrozom, kondanse olmamış kromatin ile birlikte yuvarlak yada oval şekilli, şekil bozukluğu gösteren nukleus ve sitoplazmik droplet varlığı immatüritenin karakteristik özelliği iken, kenar yerleşimli kromatin, şeffaf sitoplazmik vakuoller ile şişkin ve yerleşim bozukluğu gözlenen mitokondri, apoptozisin tipik yapısal özellikleridir. Plazma membran harabiyeti, akrozomun reakte yada olmayışı ve kromatini dağılmış nukleusun şekil bozukluğu göstermesi, aksonemal ve periaksonemal hücresel yapılarda gözlenen değişimler ise nekroz nedeniyledir (42,78,79). Apoptotik spermatozoada post akrozomal bölgede aşırı membran üretimi ile boyun ve orta kısımda lokalize olan sitoplazmik dropletin membran yapıları içeren otofajik vakuoller ile dolu olduğu, plazma membranının genellikle normal olduğu zaman zaman düzensiz yapıda ve dışa doğru çıkıntılar yaptığı elektron mikroskopik olarak gözlenmiştir (74).

IVF laboratuvarlarında implantasyon ve gelişim potansiyeli yüksek embriyoların elde edilmesi ve sonuçta sağlıklı bir bebeğin doğması primer amaçtır. Kaliteli bir embriyonun eldesinde en önemli aşama embriyo oluşturma potansiyeli yüksek oosit ve sperm eldesidir. Sperm seçiminde morfoloji ve motilite, ICSI uygulamalarında kullanılan noninvaziv seçme yöntemidir. Bu çalışmada ICSI uygulamalarında sperm hareketini yavaşlatma amacıyla kullanılan immobilizasyon medyumlarının, birbirleriyle karşılaştırmalı olarak, spesifik sperm morfoloji anomalilerinde DNA fragmentasyonuna etkisinin ışık ve elektron mikroskopik düzeyde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla PVP ve hyaluronat etken maddelerinin sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkileri TUNEL yöntemi ile kantitatif olarak saptanıp, morfolojik anomaliler kalitatif olarak elektron mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 28 Şubat 2012 tarih ve 2012-5/20 no'lu kararı ile Tüp Bebek Merkezi Androloji Laboratuvarı ile Histoloji ve Embriyoloji AD. Prof. Dr. Şermin Paker Hücre ve Embriyo Kültür Laboratuvarı, Kültür Laboratuvarı Destek Birimi ve Elektron Mikroskopi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiş ve UÜ. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından UAP(T) 2012/7 numara ile projelendirilmiştir.

### Örneklerin eldesi ve deney gruplarının oluşturulması

Tüp Bebek Merkezi'ne spermiyogram tetkiki için başvuran hastalara çalışma ile ilgili ayrıntılı açıklama yapıp, 'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu' ile onayları alınarak, semen örnekleri çalışmaya dahil edildi. Hastalardan 2-3 günlük cinsel perhiz sonrası masturbasyon yolu ile elde edilen steril plastik kaplardaki semen örnekleri, inkübatör içinde 30 dk bekletilerek likefaksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Makroskobik olarak görünüm, renk ve likefaksiyon süresinin değerlendirilmesi yapıldı. Mikroskobik olarak makler sayım kamerası kullanılarak sperm konsantrasyon ve motilitesi değerlendirildi. Diff-3 boyaması (EK-1) yapılarak immersiyon objektifi ile morfolojik değerlendirilme yapıldı. Spermiyogram tetkiki sonrası kalan semen örneği çalışmaya dahil edildi. Örnekler; kontrol grubu, PVP uygulanacak ve hyaluronat uygulanacak deney grupları oluşturulmak üzere ayrıldı. Değerlendirmeler için yeterli sperm konsantrasyonunu belirlemek amacıyla yapılan ön çalışmalar sonucunda; TUNEL boyaması için 10 µL örnekte yaklaşık 2 milyon, elektron mikroskobik değerlendirme için 10 milyon sperm hücresi içeren semen örnekleri eppendorf tüplerine alınarak TUNEL ve transmisyon elektron mikroskopi (TEM) uygulamaları için ayrıldı. Deney gruplarında örnekler sırasıyla;

- 1- 500 µL G-IVF medyumuna ile 500 G'de 15 dk santrifüj edildi.
- 2- Süpernatantlar uzaklaştırılarak, pelet üzerine 10'ar µL PVP veya hyaluronat eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

- 3- Üzerlerine 500 µL G-IVF medyum ilavesiyle 500 G'de 15 dk süreyle santrifüj edilerek yıkandı.
- 4- TUNEL boyaması uygulanacak örnekler lam üzerine yayılarak oda sıcaklığında kurutuldu ve 1 saat taze hazırlanmış %4 paraformaldehit (EK-2) immersiyouna bırakılarak fiksasyon gerçekleştirildi.

Fiksasyonun ardından örnekler daha sonra boyanmak üzere  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de depolandı.

### **Elektronmikroskopik Preparasyon**

Elektron mikroskopik değerlendirme için ayrılan 3 gruba ait örnekler, PVP veya hyaluronat inkübasyonu sonrası peletin dağılmaması ve TUNEL uygulamasında gerçekleşen 30 dk'lık inkübasyon süresini tamamlamak amacıyla 15 dk süreyle bir kez daha 650 G'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak, pelete taze hazırlanmış 500 µL %3 gluteraldehit (EK-3) ilave edildi ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de gece boyunca bekletilerek fiksasyon gerçekleştirildi. Fiksasyonu takiben aşağıda ayrıntılı olarak belirtilen rutin elektron mikroskopik doku takibi uygulandı.

- 1- PBS ile 2x30 dk  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de yıkama
- 2- Süpernatant atılarak, altta kalan peletler parçalanmamasına dikkat edilerek eppendorf tüpten numaralandırılması yapılmış küçük cam şişelere alındı.
- 3- 1 ml %1'lik osmium tetroksit ilavesi ile  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de şişeler alüminyum folyo ile ışıktan korunarak 1 saat süreyle postfiksasyon
- 4- PBS ile 2x30 dk süreyle oda sıcaklığında yıkama
- 5- Dehidrasyon (oda ısısında artan konsantrasyonda alkollerle 10'ar dk; absolü alkolde 2x15 dk)
- 6- Propilen oksitte bekletme 2x30 dk
- 7- Propilen oksit/epon (1/1) karışımında oda sıcaklığında 1 gece inkübasyon

Parçalar saf epon içersine alınıp oda sıcaklığında yarım gün bekletildikten sonra pelet küçültülerek elde edilen parçalar epon kapsüllerine gömüldü.

Polimerizasyonu gerçekleştirmek amacıyla 60 °C etüvde 48 saat bekletildi. Epon bloklardan yarı ince kesitler alınarak Olympus BX50-DP71 ataçmanlı fotomikroskopta değerlendirildi. Ardından ince kesitler alınarak grid üzerine yerleştirildi. İnce kesitlere uygulanan uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlamanın ardından, JEOL JEM 1011 akselere 80 Kv voltajla çalışan transmisyon elektron mikroskobunda analysis programı ile değerlendirilerek CCD kamera ile fotoğraflandı.

### **TUNEL uygulaması**

Sperm DNA fragmentasyon oranı terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) tekniği ile değerlendirildi. Çalışmada In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) kullanılarak, fluorescein-dUTP işaretli tek ve çift DNA kırıkları üretici firmanın önerdiği protokol birebir uygulanarak gerçekleştirildi. PVP, hyaluronat ve kontrol gruplarına ait -20 °C'de depolanan yayma preparatlarda metot ve hücre sayımı için uygun büyüklükte bir alanın sınırları pappen ile belirlendi. Önerilen protokol doğrultusunda (1-5, 7, 9 ve 11-14 nolu basamaklar oda sıcaklığında gerçekleştirildi);

- 1- PBS ile 2x15 dk yıkama
- 2- Proteinaz K (50 µL Proteinaz K/50 ml PBS) inkübasyonu 20 dk
- 3- PBS ile 2x5 dk yıkama
- 4- Hidrojen peroksit (64 ml metanol'e 4 ml hidrojen peroksit ilavesiyle) inkübasyonu 10 dk
- 5- PBS ile 2x5 dk yıkama
- 6- Triton X-100 (50 ml PBS'e 125 µL Triton X-100 ilavesiyle) inkübasyonu, -20 °C' de 5 dk
- 7- PBS ile 6X5 dk yıkama
- 8- Tunel mixture (kesit başına 2 µL enzim, 18 µL label) inkübasyonu, 37 °C etüvde 60 dk
- 9- PBS ile 2x5 dk yıkama

- 10-Tunel POD (25 µL/kesit) inkübasyonu, 37 °C etüvde 10 dk
- 11- PBS ile 2x5 dk yıkama
- 12- DAB boyama (kesit başına 50 µL; 1/9 oranında DAB substrat, peroksidaz tamponu karışımı) 10 dk (mikroskop kontrolünde)
- 13- PBS ile 2x5 dk yıkama
- 14- Rehidrasyon (azalan konsantrasyonlarda alkollerde 5'er dips) ve ksilol uygulaması ardından DPX ile kapatma

### **Değerlendirme ve İstatistiksel Analiz**

Kesitler Olympus BX50 fotomikroskopunda immersiyon objektifi kullanılarak incelendi. Kahverengi çekirdek boyanması görülen spermier TUNEL pozitif, çekirdek boyanması görülmeyen spermier TUNEL negatif olarak kabul edildi. Pappenle sınırlı alan içinde kalan sperm hücrelerinin sayısı belirlendi. Her lamda boyanma özellikleri sperm morfolojik özelliklerine göre değerlendirilip kaydedildi. Tüm değerlendirme ve sayımlar aynı kişi tarafından çift tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen kantitatif sonuçlar pozitif boyanan sperm sayısı x 100/toplam sperm hücre sayısı şeklinde orantılanarak DNA fragmantasyon yüzdesi belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi; Kruskal Wallis testi ile Sigma Plot 12 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi ve paired t-test uygulaması ile gerçekleştirildi.

## BULGULAR

### Işık Mikroskopik Değerlendirme Bulguları

Çalışma, 11 adet normozoospermik, 14 adet teratozoospermik olmak üzere toplam 24 örnekle gerçekleştirildi. Çalışma kapsamına alınan ancak ışık ve elektron mikroskopik preparasyonun ardından gerçekleştirilen kantitatif değerlendirilme aşamasında yeterli hücre sayısının sağlanamaması nedeniyle 12, 14 ve 25 nolu örnekler çalışma dışı bırakıldı. Normozoospermik örneklerde (n=11) ortalama sperm konsantrasyonu 105 milyon/ml, sperm motilite oranı %81 ve normal morfolojiye sahip (Diff-3 boyaması) sperm oranı %36 olarak bulundu. Teratozoospermik ejakulatlarda (n=13) ortalama sperm konsantrasyonu 65 milyon/ml ve sperm motilitesi %58 idi. Diff-3 boyaması sonrası teratozoospermik 14 ejakulatta normal morfolojili sperm oranı %12 olarak bulundu. Morfoloji anomalisine sahip spermilerin detaylı değerlendirilmesi sonucunda; %65 oranıyla ilk sırada baş anomali (küçük, büyük, çift, pinhead, piriform, yuvarlak, sitoplazmik vakuollü vb), %11 oranıyla boyun anomali (kırık, asimetrik giriş vb), %4 oranında sitoplazmik droplet ve %5 oranında kuyruk anomali (kısa, düzensiz, çift kuyruk vb) görüldü (Tablo-4).

Kontrol ve deney gruplarına ait kesitler TUNEL uygulama sonrası değerlendirilerek, DNA fragmentasyon oranı ve sperm morfoloji anomalileri karşılaştırılıp aralarındaki korelasyon tartışıldı. Normal morfolojili ve farklı morfoloji anomali spermilerin Diff-3 boyama ve TUNEL sonrası DNA fragmentasyonuna ait pozitif ve negatif form görüntüleri Şekil-10'da gösterilmiştir.

TUNEL uygulama sonrası 11 normozoospermik ve 14 teratozoospermik ejakulata ait örneklerde morfoloji ve DNA fragmentasyon oranları hesaplandı. Normozoospermik ejakulatlarda; kontrol grubunda DNA fragmentasyon oranı, ortalama %33.90 oranında görülen normal morfolojili spermelerde %1.27, ortalama %41.63 oranında anormal baş morfolojili



spermlerde %21.96, ortalama %8.45 oranında görülen anormal boyun morfolojisinde %15.85 olarak bulundu. Ortalama %6.36 oranında saptanan anormal kuyruk morfolojili spermlerde DNA fragmentasyonu %0.83 olarak saptandı (Tablo-4 ve 5). PVP grubunda ortalama sperm DNA fragmentasyon oranı, normal morfolojili spermlerde %2.41, anormal baş morfolojili spermlerde %30.69, anormal boyun morfolojisinde %26.79 ve anormal kuyruk morfolojisinde %9.09 olarak bulundu (Tablo-4 ve 5). Hyaluronat grubunda ortalama sperm DNA fragmentasyon oranı, normal morfolojili spermlerde %1.57, anormal baş morfolojili spermlerde %28.99, anormal boyun morfolojisinde %16.73 ve anormal kuyruk morfolojisinde %6.06 olarak bulundu (Tablo-4 ve 5). Teratozoospermik ejakulatlarda; kontrol grubunda DNA fragmentasyon oranı, ortalama %12.38 oranında görülen normal morfolojili spermlerde %1.37, ortalama %65.46 oranında görülen anormal baş morfolojili spermlerde %18.87, ortalama %11.23 oranında görülen anormal boyun morfolojisinde %8.61, ortalama %4.53 oranında saptanan anormal kuyruk morfolojili spermlerde %2.61 olarak bulundu (Tablo-4 ve 5). PVP grubunda ortalama sperm DNA fragmentasyon oranı, normal morfolojili spermlerde %3.70, anormal baş morfolojili spermlerde %29.72, anormal boyun morfolojisinde %23.97 ve anormal kuyruk morfolojisinde %8.55 olarak bulundu (Tablo-4 ve 5). Hyaluronat grubunda ortalama sperm DNA fragmentasyon oranı, normal morfolojili spermlerde %6.63, anormal baş morfolojili spermlerde %31.54, anormal boyun morfolojisinde %17.16 ve anormal kuyruk morfolojisinde %2.38 olarak bulundu (Tablo-4 ve 5).

**Tablo-4:** Normozoospermik ve teratozoospermik ejakulatların spermiyogram ve morfoloji sonuçları.

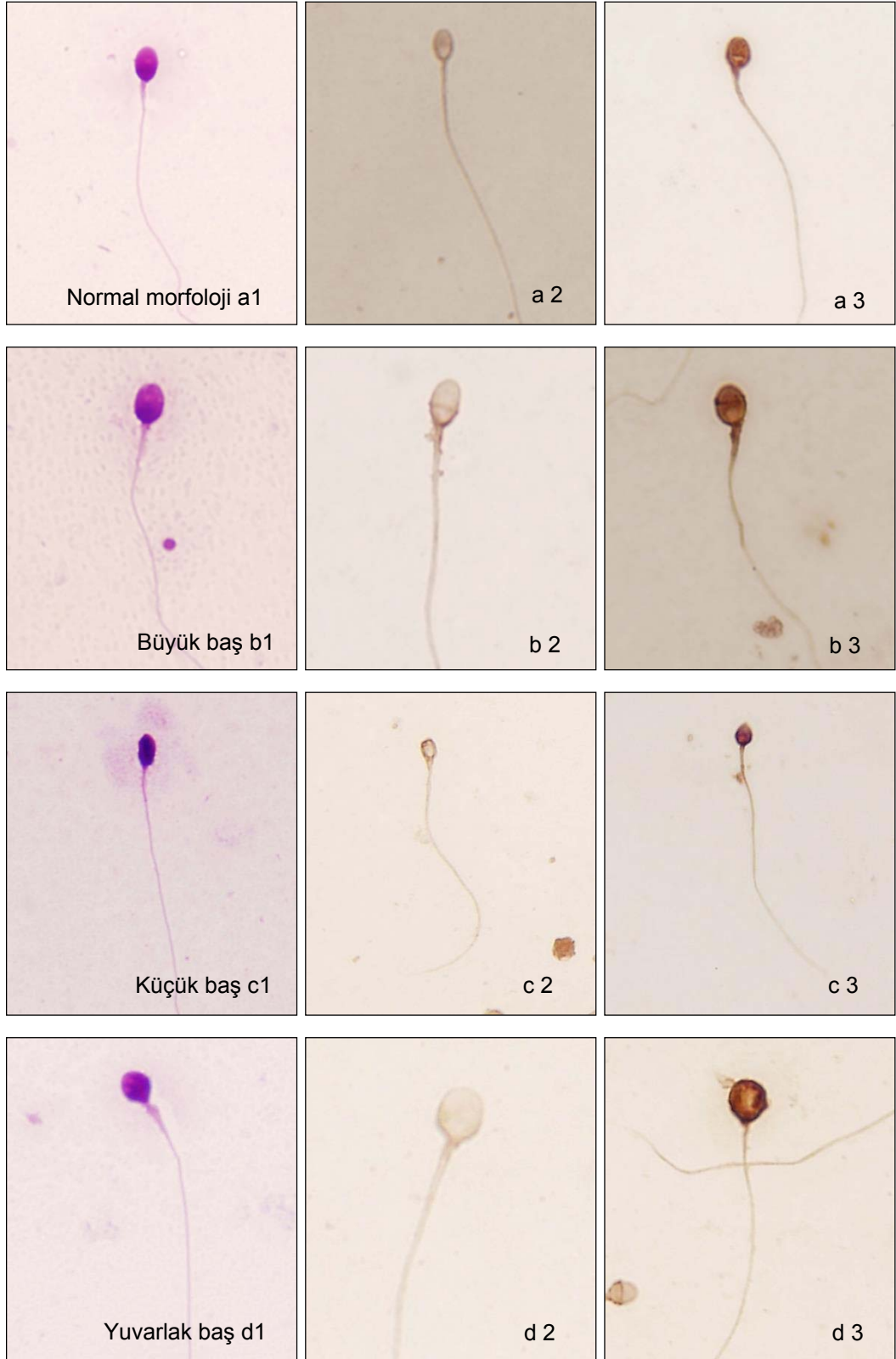
Ör. No	Sperm Konsant x10 <sup>6</sup> /ml	Total Sperm Sayısı x10 <sup>6</sup>	Total Motilite %	Total Anormal Morfoloji %	Baş Anomali %	Boyun Anomali %	Kuyruk Anomali %
2*	56	224	82	43	30	4	3
4*	38	133	79	68	51	6	4
7*	175	175	50	70	30	16	10
9*	59	295	76	68	55	6	5
10*	62	217	89	70	52	1	7
15*	192	576	83	37	28	6	2
16*	35	70	71	68	34	9	18
17*	213	959	92	70	52	5	8
18*	112	336	89	70	40	16	9
21*	91	273	88	70	35	13	3
24*	125	313	94	66	51	11	1
1	15	53	19	99	94	0	1
3	136	612	76	85	58	9	9
5	81	122	64	94	46	21	13
6	19	76	32	96	72	13	3
8	93	605	73	77	54	13	2
11	153	153	85	77	67	7	1
13	26	65	62	86	67	11	5
19	87	174	5	88	64	14	4
20	27	108	74	80	53	14	5
22	84	336	75	82	58	16	6
23	27	54	56	87	66	8	4
26	80	440	81	89	66	12	4
27	20	70	55	99	86	8	2
N* ort.	105	325	81	64	42	8	6
T ort.	65	221	58	88	65	11	5

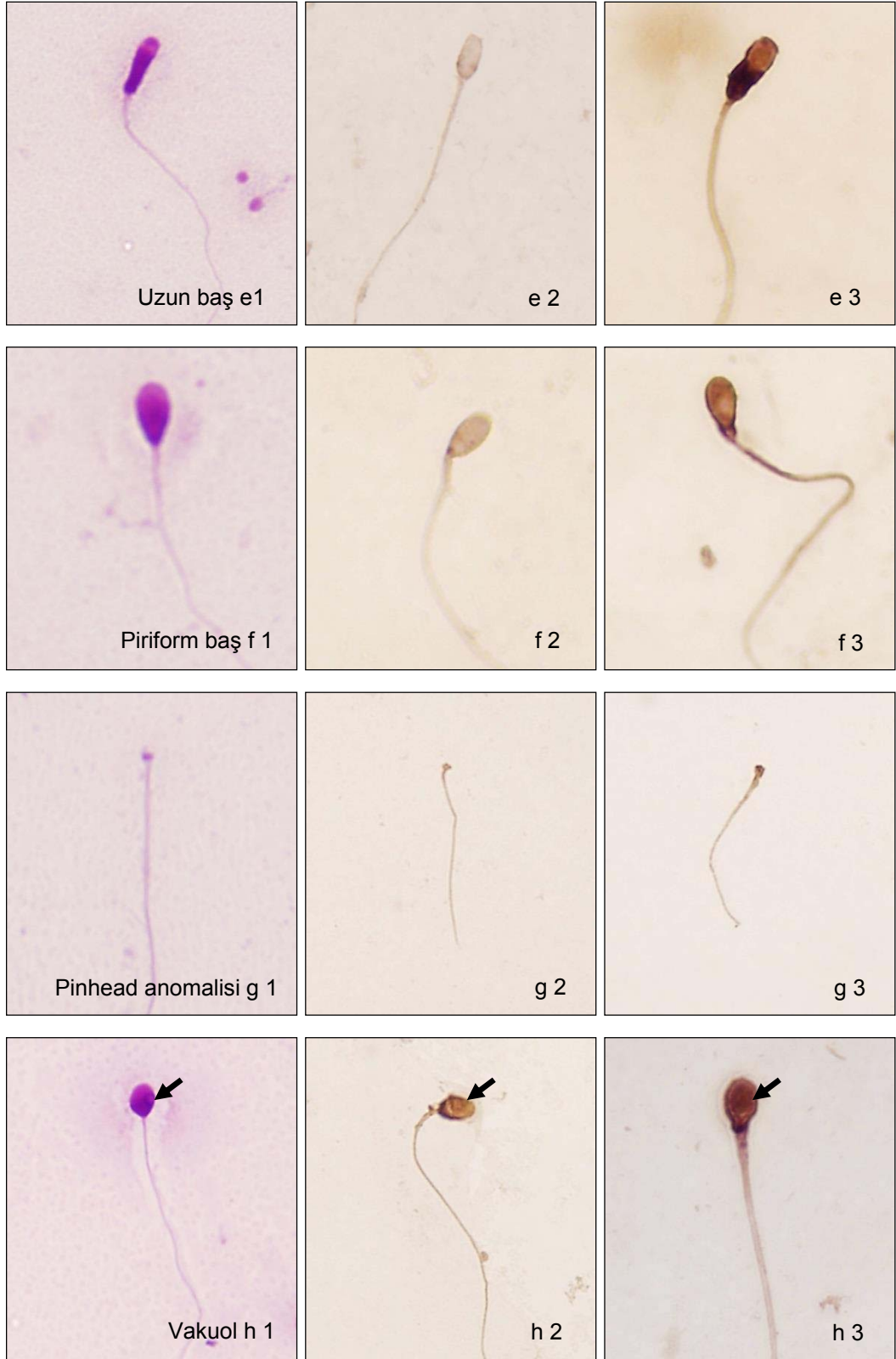
\*: Normozoospermi grubu (n=11), T: Teratozoospermi grubu (n=13).

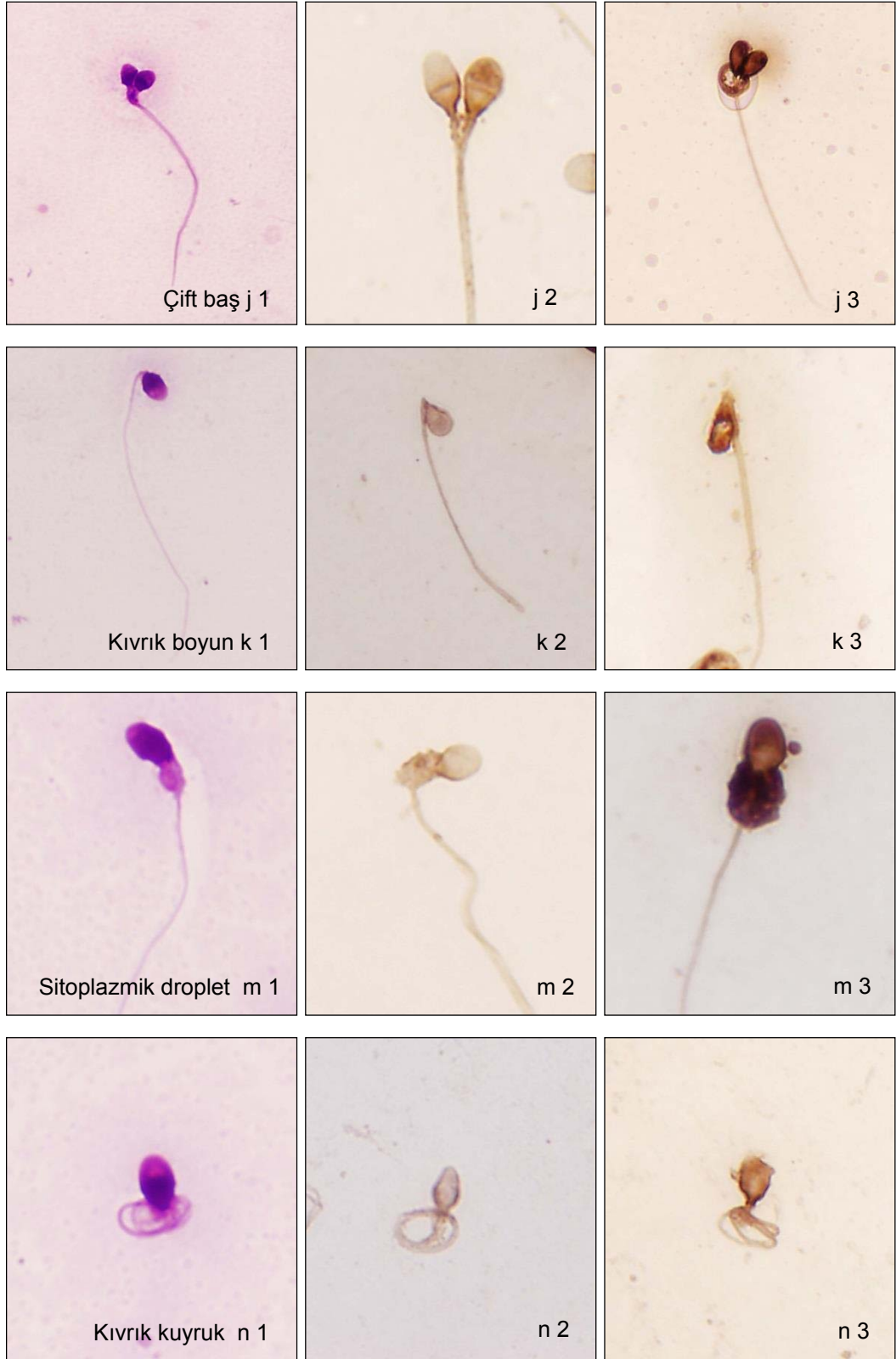
Tablo-5: TUNEL uygulama sonrası DNA fragmantasyon oranları.

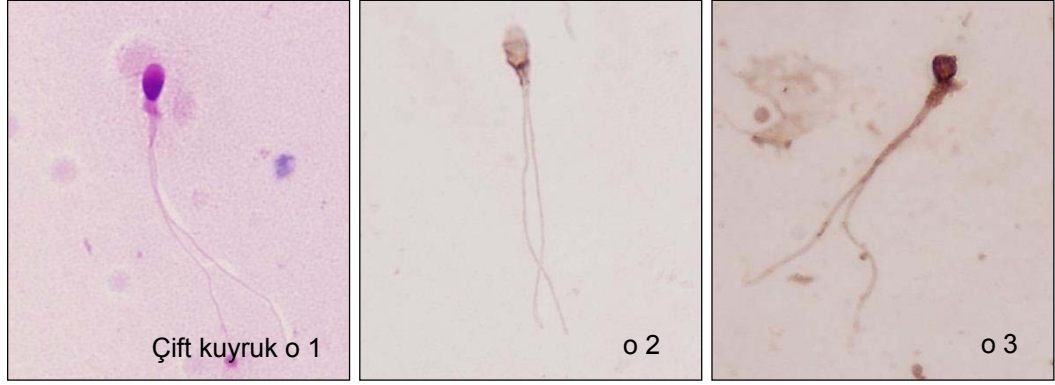
Ör. No	TUNEL(+) % Değeri			Normal Morfoloji % Değeri	TUNEL(+) Normal Morfoloji %Değeri			TUNEL(+) Baş Anomalili % Değeri			TUNEL(+) Boyun Anomalili % Değeri			TUNEL(+) Kuyruk Anomalili % Değeri		
	K	P	H		K	P	H	K	P	H	K	P	H	K	P	H
1	16.0	28.0	26.0	1.0	0.0	0.0	16.6	16.6	28.9	29.2	21.4	33.3	12.5	0.0	0.0	
2*	27.0	35.0	28.0	57.0	7.7	16.0	9.3	51.3	52.9	48.8	25.0	71.4	33.3	0.0	75.0	
3	14.0	25.0	33.0	15.0	0.0	0.0	16.1	19.6	34.9	50.0	0.0	9.1	10.0	0.0	16.6	
4*	6.0	13.0	8.0	32.0	6.2	0	8.0	6.1	20.0	7.3	12.5	8.3	12.5	0.0	16.6	
5	33.0	42.0	48.0	6.0	11.1	23.1	40.0	35.7	54.5	60.8	13.9	42.1	46.6	21.4	27.7	
6	32.0	40.0	34.0	4.0	0.0	25.0	0.0	41.2	44.1	43.4	15.4	50.0	20.0	0.0	50.0	
7*	16.0	37.0	24.0	30.0	0.0	0.0	0.0	19.3	50.0	33.9	26.6	6.6	16.6	0.0	0.0	
8	28.0	32.0	38.0	23.0	6.6	0.0	13.3	34.4	37.9	49.2	0.0	46.2	22.2	0.0	0.0	
9*	38.0	39.0	40.0	32.0	0.0	10.5	0.0	52.9	48.4	47.2	22.2	50.0	50.0	0.0	50.0	
10*	17.0	12.0	22.0	30.0	0.0	0.0	0.0	25.0	20.0	29.0	25.0	0.0	33.3	9.1	0.0	
11	6.0	13.0	8.0	23.0	0.0	0.0	0.0	6.8	14.5	13.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
13	9.0	20.0	12.0	14.0	0.0	0.0	0.0	9.6	21.9	16.6	7.7	25.0	16.6	0.0	0.0	
15*	20.0	26.0	38.0	63.0	0.0	0.0	0.0	30.0	28.2	46.2	0.0	50.0	0.0	0.0	0.0	
16*	7.0	17.0	14.0	32.0	0.0	0.0	0.0	8.3	22.9	19.4	15.4	16.6	18.2	0.0	0.0	
17*	5.0	13.0	12.0	30.0	0.0	0.0	0.0	7.5	14.5	19.4	14.3	30.0	0.0	0.0	0.0	
18*	10.0	20.0	24.0	30.0	0.0	0.0	0.0	12.7	37.2	30.6	16.6	16.6	20.0	0.0	0.0	
19	6.0	28.0	17.0	12.0	0.0	0.0	0.0	10.2	20.0	20.9	0.0	61.5	10.0	0.0	0.0	
20	3.0	7.0	18.0	20.0	0.0	0.0	0.0	3.5	8.0	21.4	0.0	6.6	0.0	0.0	0.0	
21*	8.0	15.0	9.0	30.0	0.0	0.0	0.0	9.7	17.1	11.9	16.6	20.0	0.0	0.0	25.0	
22	18.0	28.0	25.0	18.0	0.0	0.0	0.0	25.8	32.5	30.0	11.8	20.0	20.0	0.0	0.0	
23	18.0	26.0	22.0	13.0	0.0	0.0	0.0	20.0	33.3	29.4	33.3	0.0	0.0	0.0	16.6	
24*	14.0	19.0	15.0	34.0	0.0	0.0	0.0	18.6	26.2	25.4	0.0	25.0	0.0	0.0	0.0	
26	10.0	22.0	32.0	11.0	0.0	0.0	0.0	13.0	25.8	36.8	8.3	10.5	40.0	0.0	16.6	
27	7.0	25.0	11.0	1.0	0.0	0.0	0.0	8.8	30.0	8.2	0.0	7.1	25.0	0.0	0.0	

\*: Normozoospermi grubuna ait örnekler, K: Kontrol grubu, P: PVP grubu, H: Hyaluronat grubu.









**Şekil-10:** Normal (a1) ve farklı anormal morfolojilere sahip spermatozoaların (b1-o1) Diff-3 boyama sonrası, benzer morfolojik özellikteki spermatozoaların TUNEL metodu sonrasında DNA fragmentasyonu negatif (a2-o2) ve pozitif görünümünün mikrofotografaları (a3-o3) (X100).

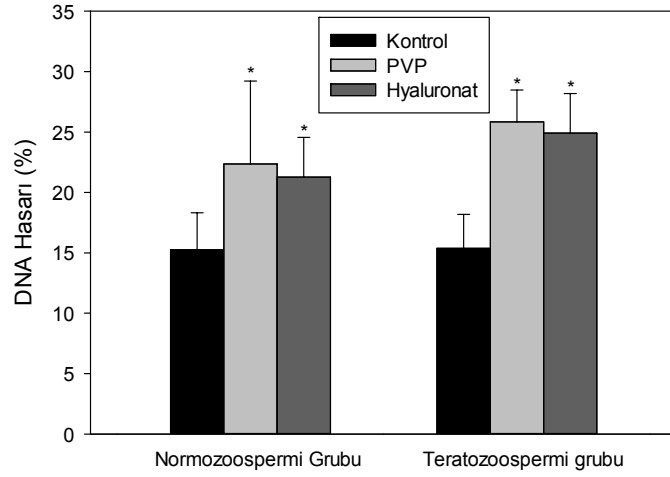
Deney gruplarının istatistiksel analizinde; Kruskal-Wallis testi ile gruplar genel olarak değerlendirildiğinde kontrol, PVP ve hyaluronat gruplarında oluşan DNA hasarı, kontrol grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0.006$ ). Morfolojik özelliklere göre; 3 grup birbiriyle karşılaştırıldığında baş ve boyun anomalilerinde oluşan DNA hasarı açısından kontrol grubu lehine istatistiksel olarak anlamlılık bulunurken ( $p=0.004$  ve  $p=0.040$ ), normal morfolojili spermelerde, kuyruk, sitoplazmik droplet ve serbest baş morfolojilerinde DNA hasar oranında anlamlılık saptanmamıştır ( $p=0.661$ ,  $p=0.537$ ,  $p=0.808$  ve  $p=0.923$ ) (Tablo-6).

**Tablo-6:** PVP ve hyaluronat gruplarında oluşan DNA hasarının morfolojik özellikler ile ilişkisi.

Özellik	Deney Grubu	PVP Grubu (n=24)	Hyaluronat Grubu (n=24)	Kontrol Grubu (n=24)	p değeri
	Ort±(min-max)	Ort±(min-max)	Ort±(min-max)		
Toplam DNA fragmentasyonu		25 (7-42)	23 (8-48)	14 (3-38)	0.006*
Normal morfoloji		0 (0-8)	0 (0-5)	0 (0-4)	0.661
Baş anomalisi		18 (6-36)	20 (4-36)	10 (3-36)	0.004*
Boyun anomalisi		2 (0-8)	2 (0-7)	1 (0-6)	0.040*
Kuyruk anomalisi		0 (0-5)	0 (0-2)	0 (0-3)	0.537
Sitoplazmik droplet		0 (0-3)	0 (0-2)	0 (0-2)	0.808
Serbest baş		0 (0-5)	0 (0-3)	0 (0-5)	0.923

Örnekler klinik alt gruplarına göre ayrılarak oluşan DNA hasarı paired t-testi ile değerlendirildiğinde, normozoospermi grubunda (n=11); kontrol-PVP grubu ve kontrol-hyaluronat grubu arasında yapılan karşılaştırmada, oluşan DNA hasarı bakımından ayrı ayrı istatistiksel anlamlılık bulunurken (p=0.004, p<0.001), PVP-hyaluronat grupları arasında yapılan karşılaştırmada anlamlılık saptanmamıştır (p=0.637). Teratozoospermi (n=13) klinik alt grubunda, DNA hasarı bakımından kontrol-PVP grubu ile kontrol-hyaluronat grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık bulunurken (p<0.001 ve p<0.001), PVP-hyaluronat grupları arasında DNA hasarı oluşumu açısından anlamlılık saptanmamıştır (p=0.694) (Şekil-11, Tablo-7).



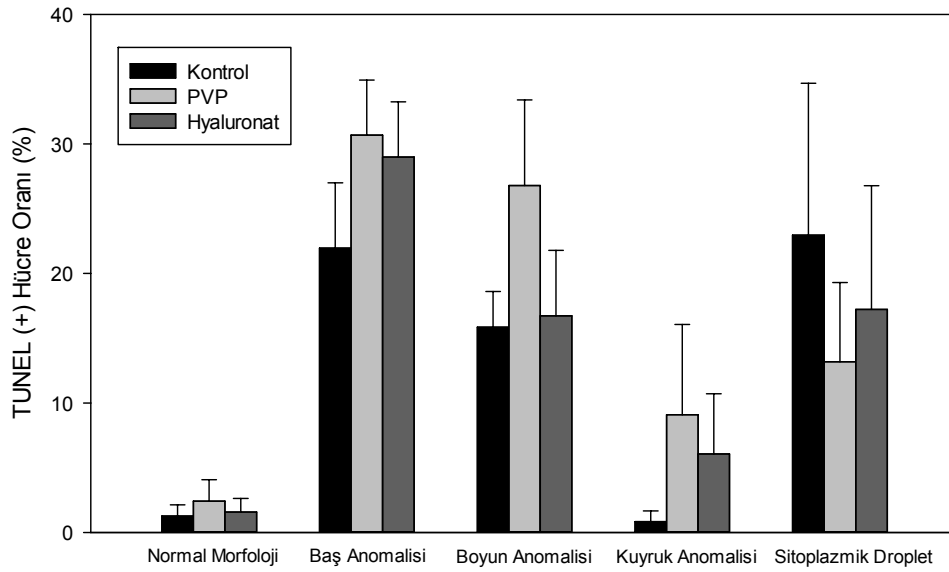


**Şekil-11:** Klinik alt gruplarda görülen DNA hasar oranları ve deney grupları ile arasındaki korelasyonu.

**Tablo-7:** Klinik alt grupların kontrol, PVP ve hyaluronat gruplarında görülen DNA hasarının karşılaştırması

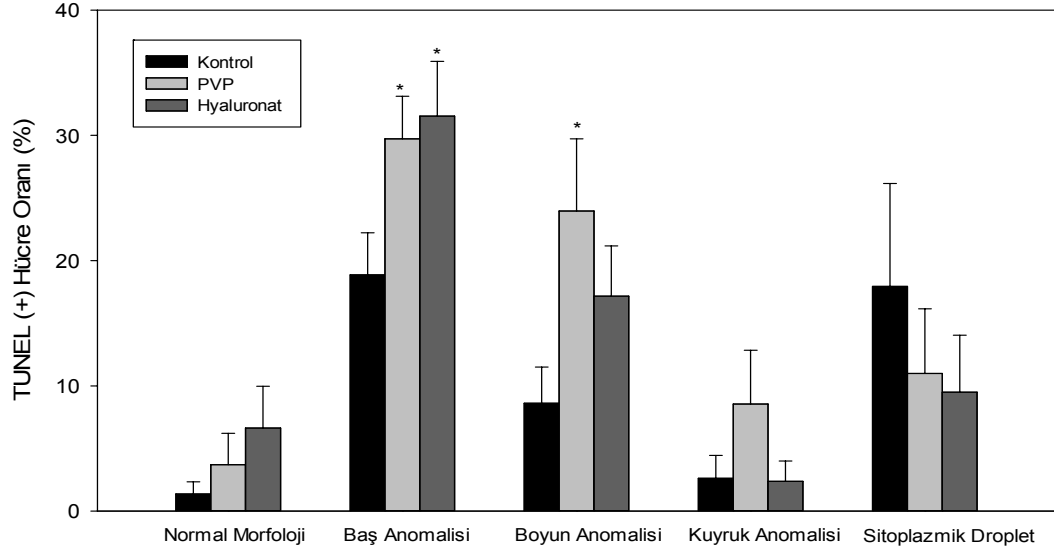
Klinik alt gruplar Deney grupları	Normozoospermi grubu (n=11)		Teratozoospermi grubu (n=13)	
	Ort ± SEM	p değeri	Ort ± SEM	p değeri
Kontrol grubu	15.27±3.05	0.004*	15.39±2.80	<0.001*
PVP grubu	22.36±3.08		25.84±2.63	
Kontrol grubu	15.27±3.05	<0.001*	15.39±2.80	<0.001*
Hyaluronat grubu	21.27±3.29		24.92±3.27	
PVP grubu	22.36±3.08	0.637	25.84±2.63	0.694
Hyaluronat grubu	21.27±3.29		24.92±3.27	

Klinik alt gruplara ayrılmaksızın baş ve boyun morfoloji anomalilerinde saptanan DNA fragmentasyonunun istatistiksel anlamlılığı klinik gruplara göre analiz edildiğinde; normozoospermi grubunda (n=11) kontrol ve deney grupları arasındaki karşılaştırmada, baş ve boyun morfoloji anomalisinde ( $p=0.250$  ve  $p=0.252$ ) ve farklı anormal morfolojili spermelerde oluşan DNA hasarı tüm deney grupları içinde tek yönlü varyans analizi testiyle değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlılık bulunmadı (Şekil-12).



**Şekil-12:** Normozoospermi klinik alt grubunda, kontrol ve deney gruplarında görülen DNA hasarının karşılaştırması.

Teratozoospermi grubunda (n=13) baş anomalisine sahip spermelerde kontrol-PVP ve kontrol-hyaluronat grupları arasındaki karşılaştırmada, oluşan DNA hasarı açısından kontrol grubu lehine anlamlılık saptandı ( $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ). Teratozoospermi grubunun boyun anomalili spermelerde yapılan karşılaştırmasında ise sadece kontrol-PVP grupları arasındaki karşılaştırmada kontrol grubu lehine istatistiksel olarak anlamlılık saptanmıştır ( $p=0.036$ ) (Şekil-13, Tablo-8).



**Şekil-13:** Teratozoospermi klinik alt grubunda, kontrol ve deney gruplarında görülen DNA hasarının karşılaştırması.

**Tablo-8:** Teratozoospermi grubunda istatistiksel anlamlılık bulunan baş ve boyun anomalileri için PVP ve hyaluronat grupları arasındaki DNA hasar ilişkisi.

Morfolojik özellik / Deney grupları	Baş anomalisi		Boyun anomalisi	
	Ort ± SEM	p değeri	Ort ± SEM	p değeri
Kontrol grubu	18.87±3.36	<0.001*	8.61±2.89	0.036*
PVP grubu	29.72±3.41		23.97±5.75	
Kontrol grubu	18.87±3.36	<0.001*	8.61±2.89	0.109
Hyaluronat grubu	31.54±4.37		17.16±4.01	

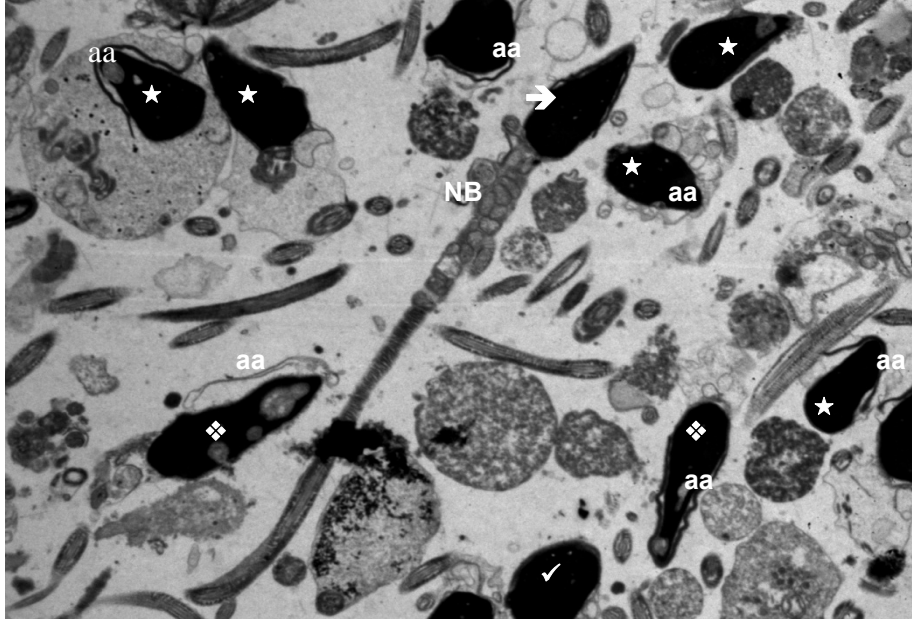
## Elektron Mikroskopik Değerlendirme Bulguları

Kontrol ve deney gruplarına ait normozoospermik ve teratozoospermik örneklerde, anormal sperm morfolojilerinin ultrastrüktürel görünümünün, sperm DNA hasarının ve nekroz belirtilerinin ultrastrüktürel kanıtlarının değerlendirmesi yapıldı.

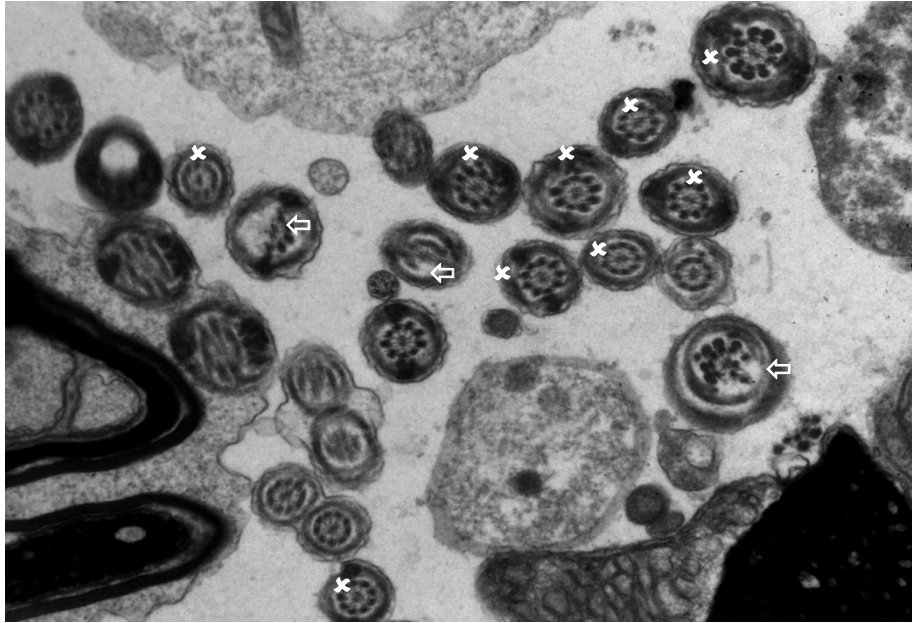
Kontrol grubuna ait normo ve teratozoospermik örneklerde, normal morfolojili spermlerin yanısıra çeşitli çekirdek, akrozom, boyun ve kuyruk anomalilerine sahip spermler görüldü (Şekil-14 ve 15). Baş anomalili (amorf, piriform, yuvarlak, vakuoler, küçük, tapered, çift baş) spermler yoğunlukta olmak üzere, çeşitli sperm morfoloji anomalileri gözlemlendi (Şekil-16, 17, 18). Normal DNA yapısında kondanse kromatine sahip spermlerin yanısıra, farklı boyutlarda vakuoller içeren, kromatin yapısı dekonpanse spermatozoalar görüldü (Şekil-19). Akrozom yapısı değerlendirildiğinde; akrozomal matrikste şişme ve filamantöz görünüme sahip ya da akrozomun hiç gelişmediği yuvarlak baş anomalili spermatozoalara rastlandı (Şekil-14, 16, 18 ve 19). Kontrol normo ve teratozoospermi gruplarında sperm boyun ince yapıları değerlendirildiğinde, normal boyun morfolojisi gösteren spermlerin yanısıra (Şekil-14 ve 19), boyun bölgesinde mitokondriyal yapılarda şişme, disorganizasyon ve krista kaybının olduğu spermatozoalar gözlemlendi (Şekil-18). Spermiyogenez sırasında sitoplazmik çekilmenin tam olarak gerçekleşmemesi sonucu boyun bölgesinde lokalize sitoplazmik droplet anomalisi ve bu bölgede membran bütünlüğünü koruyan mitokondrionlar ile translüsen vezikül yapılarına sahip spermatozoalar gözlemlendi (Şekil-17 ve 18). Sperm kuyruk ince yapıları değerlendirildiğinde, normozoospermik ve teratozoospermik örneklerde normal morfoloji gösteren kuyruk aksonem yapılarının çoğunlukta olduğu, ancak yer yer kesitlerde aksonemal yapılarda disorganizasyon ve tübüler yapılarda silinmelerin varlığı gözlemlendi (Şekil-15).

PVP ve hyaluronat uygulanan gruplara ait kesitler değerlendirildiğinde, teratozoospermik örneklerde daha yoğun olmak üzere kontrol grubu ile benzer morfoloji anomalilerine sahip spermatozoalar görüldü (Şekil-20 ve 21). Tüm gruplarda görülen büyük vakuole granüler

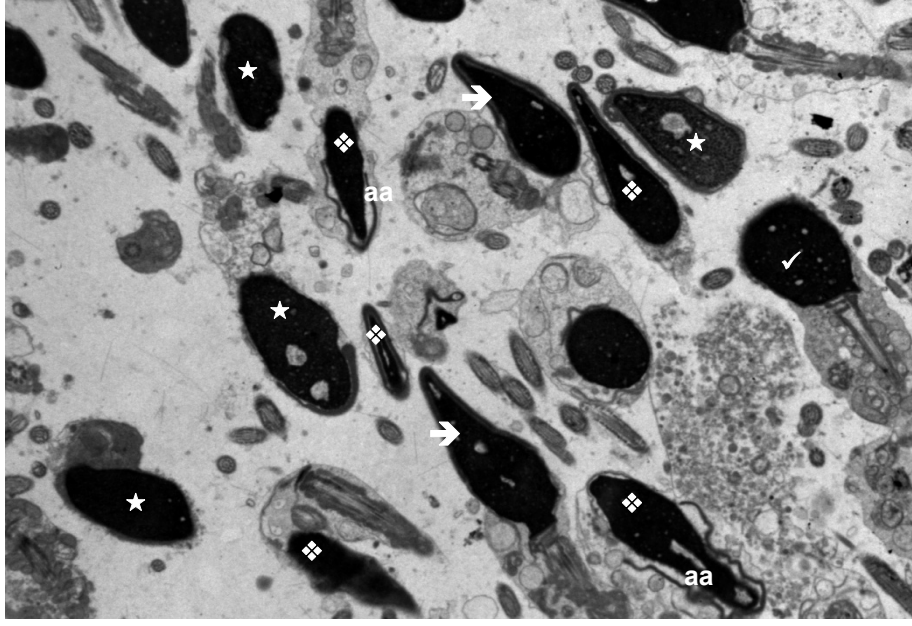
yapıda kromatin yapısına sahip çekirdek ve akrozomal yapıda değişimlerin gözlendiği, boyun bölgesinde sitoplazmik rezidüvlerle veziküllerin ve mitokondriyonlarda şişme ile krista yapılarında bozulmaların görüldüğü hücreler apoptotik aktivasyon gösteren spermatozoalar olarak değerlendirildi (Şekil-22-26). Bu kesitlerde mitokondrion membran ve hücre membran bütünlüğünün korunduğu gözlendi. Kesitlerde akrozomun yer yer bütünlüğünü kaybettiği ya da tamamen yok olduğu (Şekil-27), nükleolemmal yapısal bütünlüğün bozulduğu ve yer yer parçalandığı, anormal morfolojili çekirdeğe sahip, plazma membran harabiyeti gerçekteşmiş, çekirdek kromatin yapısı dağılmış hücreler, lizisin gerçekteşmesiyle nekroza giden spermatozolar olarak değerlendirildi (Şekil-26 ve 28).



**Şekil-14:** Normozoospermik kontrol grubunda; normal baş, boyun morfolojili (→) ve elonge (◊), piriform (★), akrozomsuz yuvarlak baş (✓) morfoloji anomalilerine sahip spermatozoaların izlendiği mikrofotograf, 6000k. (NB: Normal boyun morfolojisi, aa: akrozomal yapıda bozulma).



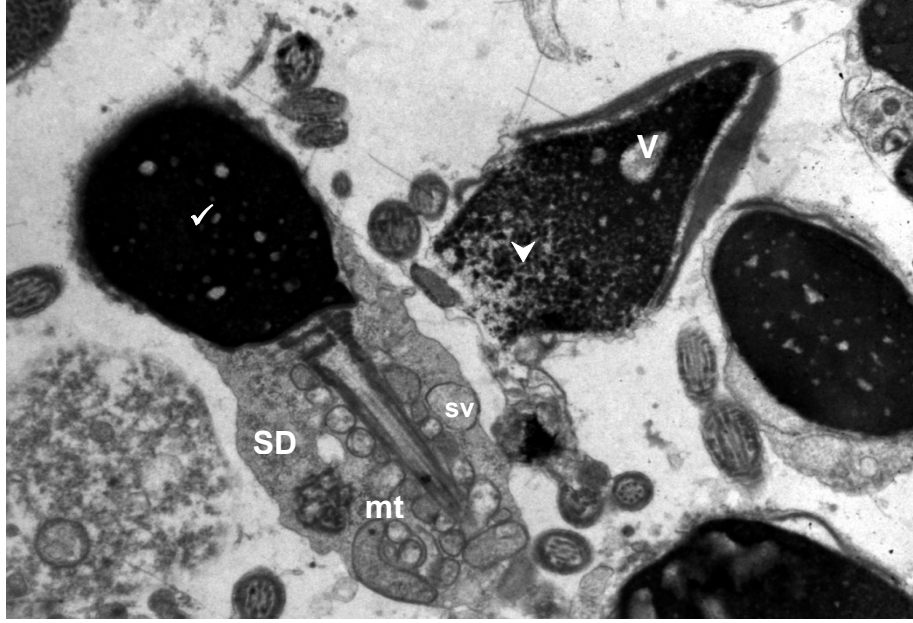
**Şekil-15:** Normozoospermik kontrol grubunda normal kuyruk morfolojisi (\*) yanında, aksonem bileşeni periferik mikrotübüllerde silinmenin (⇐) gözleendiği mikrofotograf, 25k.



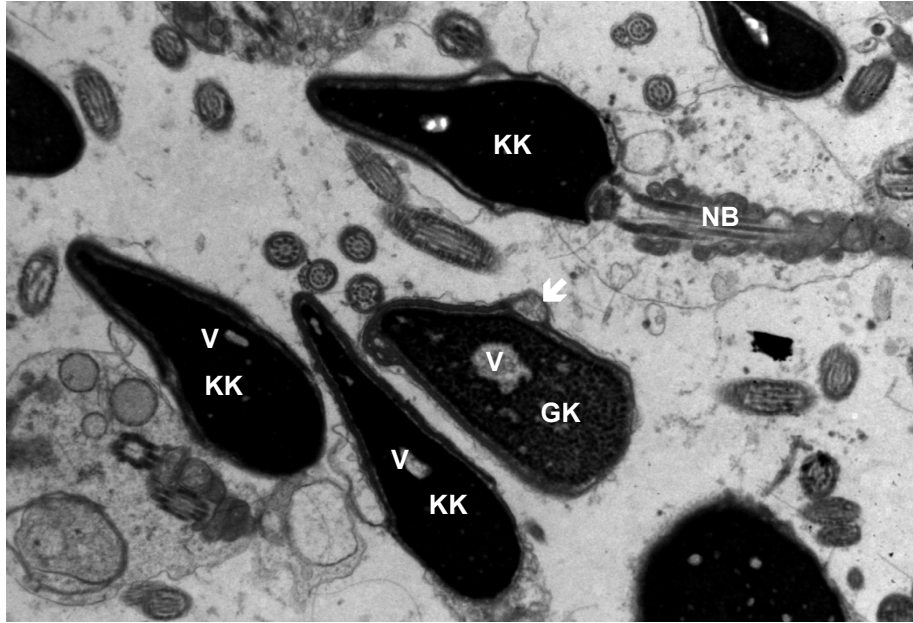
**Şekil-16:** Teratozoospermik kontrol grubunda normal baş (→) morfolojisi, akrozomsuz yuvarlak (✓), uzun (❖), piriform (★) baş anomalileri ile akrozom anomalilerinin (aa) izlendiği mikrofotograf 6000k.



**Şekil-17:** Teratozoospermik kontrol grubunda sitoplazmik droplet (SD) ve içinde translüsen veziküllere (sv) sahip spermatozolara ait mikrofotograf, 15k.

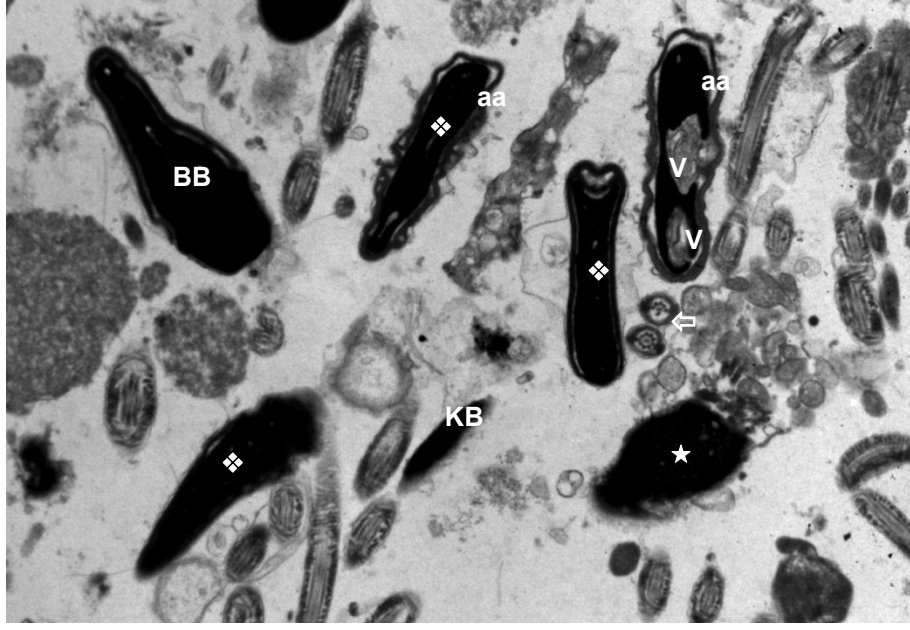


**Şekil-18:** Teratozoospermi grubunda akrozomu bulunmayan yuvarlak baş anomali (✓) ile veziküllere sahip (sv) sitoplazmik droplet (SD) ve ekvatoryal bölgesinde membran bütünlüğü bozulmuş, lizise (▼) giden spermatozoa mikrofotografı, 15k. (V: vakuol, mt: mitokondrial disorganizasyon).

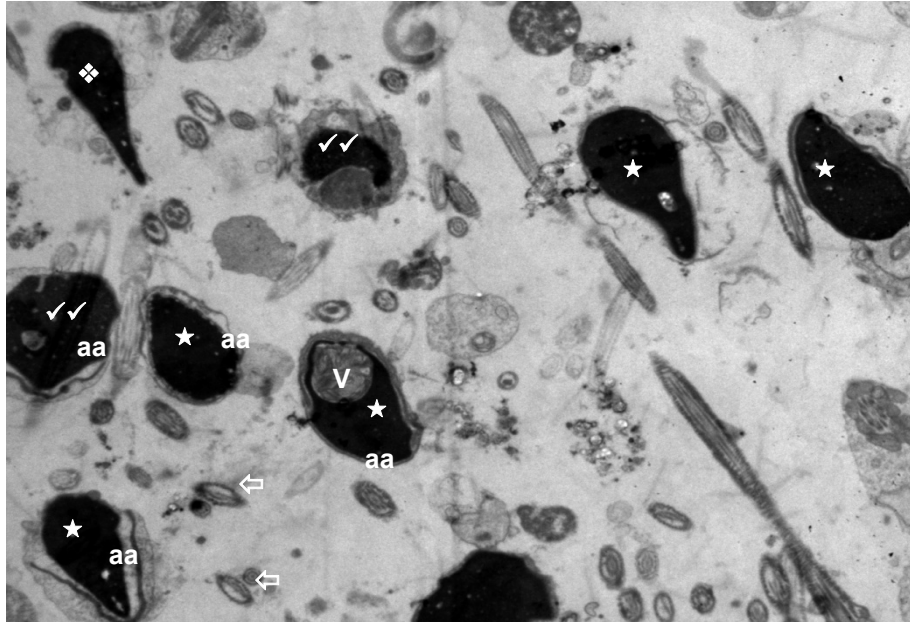


**Şekil-19:** Teratozoospermik kontrol grubunda kondanse (KK) ve granüler kromatinli (GK) spermatozoalara ait mikrofotograf, 12k. (NB: normal boyun morfolojisi, ↙: akrozomal şişme, V: vakuol ).

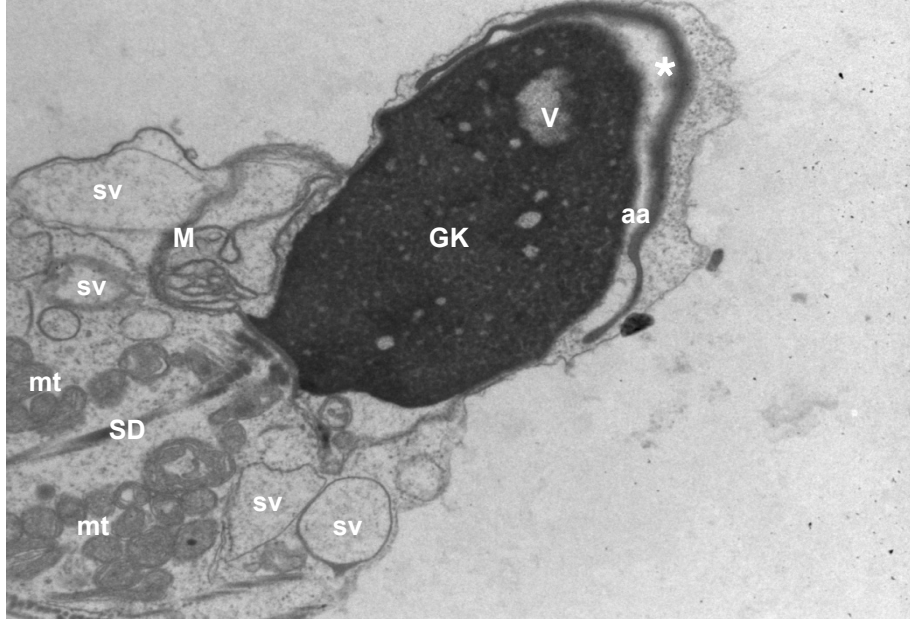




**Şekil-20:** Teratozoospermik PVP deney grubuna ait çeşitli morfoloji anomalilerinin izlendiği mikrofotoğraf, 10k. (V: vakuol, aa: akrozomal anomali, ★:piriform baş, BB: büyük baş, ❖: uzun baş, KB: küçük baş anomali, ⇐:mikrotübüler silinme).



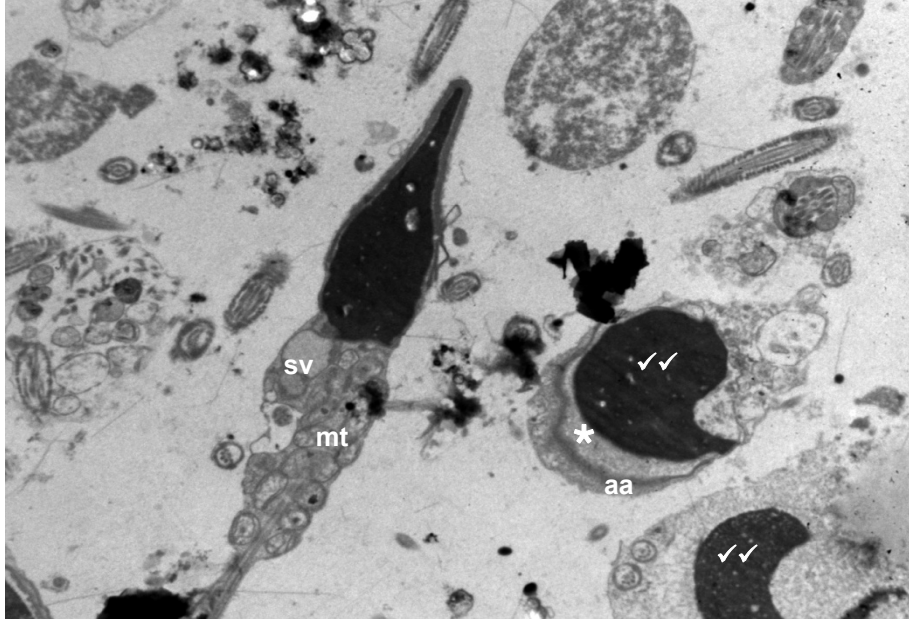
**Şekil-21:** Teratozoospermik hyaluronat deney grubunda sıklıkla izlenen baş morfoloji anomalilerine ait mikrofotoğraf, 7500k. (V: vakuol, aa: akrozomal anomali, ★:piriform baş, ✓✓:amorf baş, ❖: uzun baş anomali, ⇐: mikrotübüler silinme).



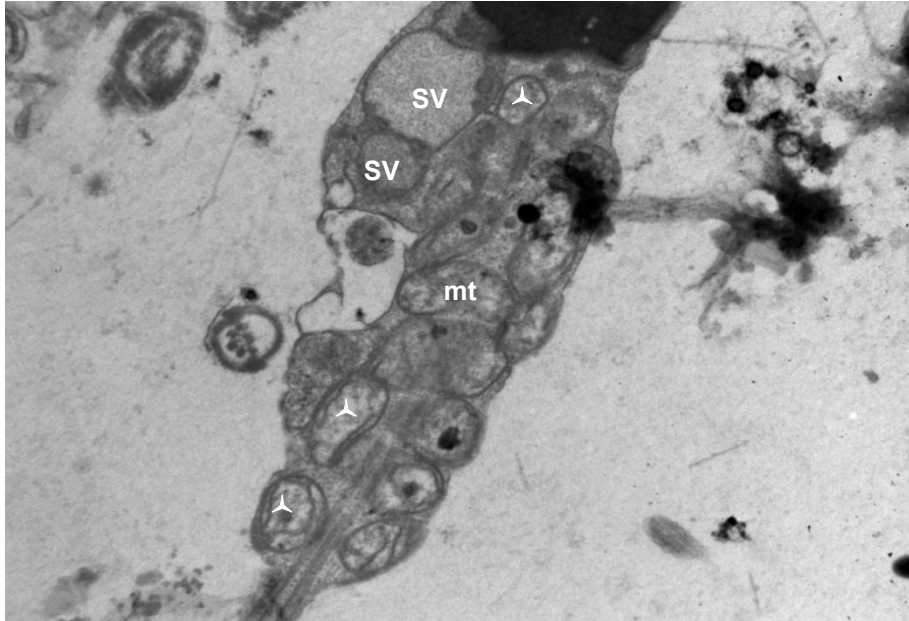
**Şekil-22:** Normozoospermik PVP grubuna ait subakrozomal şişlik(★) ile akrozom anomalisinin (aa) izlendiği vakuole (V) ve granüler kromatinli (GK), postakrozomal membran üretimi (M) gösteren apoptotik spermatozaya ait mikrofotoğraf. Sitoplazmik droplet (SD) içi disorganize mitokondri (mt) ve veziküller (sv) izlenmektedir, 20k.



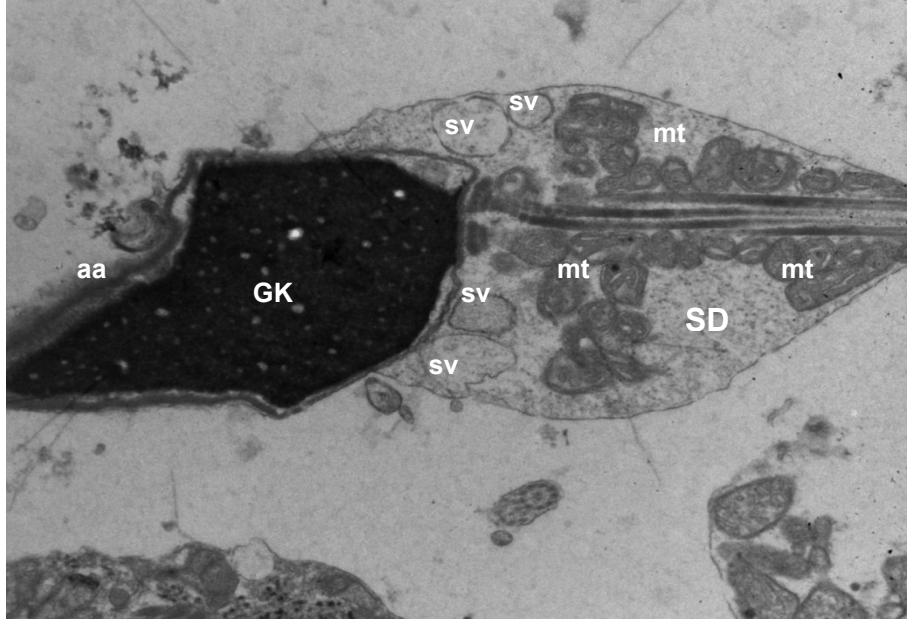
**Şekil-23:** PVP uygulanan teratozoospermi grubuna ait vakuole (V) dekonpanse granüler kromatini (GK) ile apoptotik spermatozoa mikrofotografı, 20k.



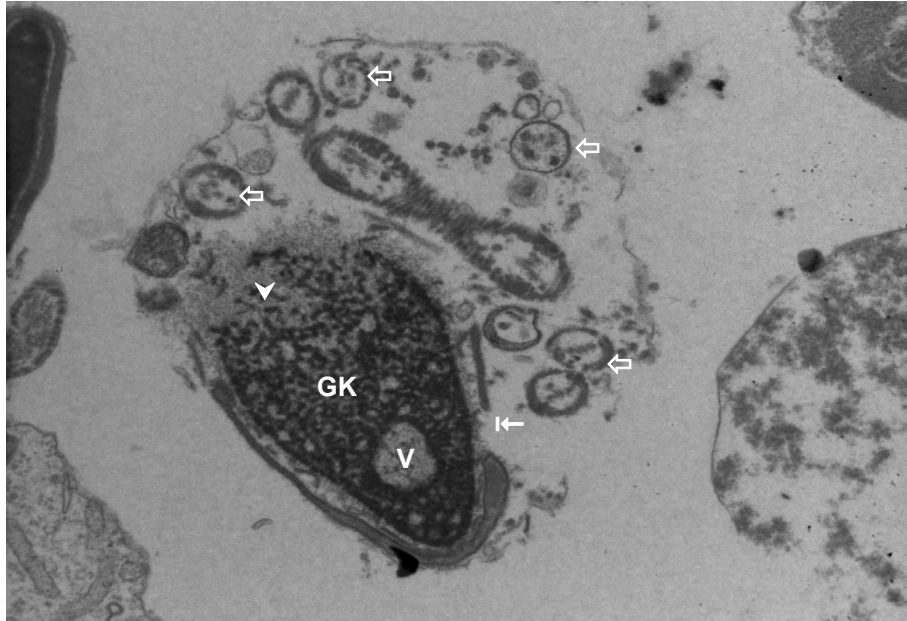
**Şekil-24:** Teratozoospermik hyaluronat grubuna ait örnekte akrozom anomalisi (aa) ile subakrozomal şişlik (\*) ve amorf baş anomalisi (✓✓) ile disorganize mitokondrial şişmenin (mt) gözlendiği mikrofotograf, 10k.



**Şekil-25:** Teratozoospermik hyaluronat grubuna ait kesitte mitokondriyon krista yapılarında silinmelere (∧) işaret eden mikrofoğraf, 25k. (mt: mitokondrial disorganizasyon ve şişme).



**Şekil-26:** PVP uygulanan teratozoospermik gruba ait sitoplazmik droplet (SD) içinde disorganize ancak membran bütünlüğü sağlam mitokondrionlara (mt) sahip spermatozoa mikrofotografı, 20k. (GK: granüler kromatin, sv : vezikül, aa: akrozom anomalisi)



**Şekil-27:** Akrozomal bütünlüğünü kaybetmiş (↔) vakuollü (V) ve granüler kromatine (GK) sahip, çekirdekte lizis (▼) ile nekroza giden normozoospermik PVP grubuna ait spermatozoa mikrofotografı, 20k. (↔: mikrotübüler silinme).



**Şekil-28:** Teratozoospermik hyaluronat grubuna ait akrozom yapısı ve hücre membran bütünlüğü bozulmuş, çekirdek kromatin yapısı dağılmış nekroza giden spermatozoa (↓↓) mikrofotografı, 25k.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Programlı hücre ölümü (apoptoz) birçok multisellüler organizmanın homeostazisinde, diferansiyasyon ve büyümenin regülasyonunda rol oynayan önemli bir biyolojik süreçtir. Normal insan testis ve ejakulatında görülen fizyolojik bir mekanizmadır. Spermatogenez oldukça kompleks bir biyolojik gelişim sürecidir. Testiste spermatogenez sürecini düzenleyen kontrol mekanizması apoptozdur (56). Testiste spermatogonium, spermatozoid ve spermatidlerde yoğun apoptotik faktör aktivasyonu gösterilmiştir (80). Kaspaz aktivasyonu, fosfotidil serinin eksternalizasyonu, mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim ve DNA fragmentasyonu insan ejakulat spermında görülen apoptotik belirleyicilerdir. Bu belirteçler subfertil erkekte ve fonksiyonel kapasitesi düşük spermatozoada daha fazladır (38,39). İntratestiküler programlı hücre ölümü spermatogenezin klonal ekspansiyonunun kontrolünü sağlayan bir mekanizma olarak kabul edilmiştir fakat ejakulat spermında görülen apoptozisin biyolojik temeli hala aydınlatılamamıştır (56,62).

Apoptotik ölümün biyokimyasal karakteristik özelliği endojen endonükleazların aktivasyonu ve bunun sonucunda gelişen DNA degradasyonu, kromatin decondansasyonu ve DNA çift zincir yapısında oluşan kırılmalardır. Bu kırıklar eksojen DNA polimeraz (nick-translation assay) veya TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) kullanılarak saptanabilir. TdT temelli reaksiyon apoptotik hücrelere spesifiktir ve DNA kırıkları apoptoza giden hücrelerin nekrotik hücrelerden ayırtedilmesine izin verir.

Sperm DNA hasar oranı, erkek fertilité potansiyelini göstermede faydalı bir belirleyici olarak kabul görmektedir (34,58,62,65,76,81). Literatürde sperm DNA hasar derecesinin fertilizasyon başarısını etkilemediğini (44,81) veya olumsuz etkileri olduğunu bildiren çalışmaların yanı sıra (38,39,45,48), yalnız embriyo kalitesi üzerine olan negatif etkisi (31) ve spontan abortus ile korelasyonu üzerinde duran çalışmalar mevcuttur

(40-43). Günümüzde ICSI için morfoloji ve motilite esaslı sperm seçimi yapılmakta ve bu yolla elde edilen sperm, oosit içine enjekte edilmektedir (31,38). WHO veya Kruger kriterlerine göre değerlendirilen sperm morfolojisi, erkek fertilité potansiyelinin tahmininde yetersiz kalmaktadır (33). Anormal morfolojili, düşük motiliteye sahip ve/veya DNA hasarına sahip sperm normal fertilizasyon sürecinde elimine edilebilirken, ICSI işleminde bu aşamanın by-pass edilmesi nedeniyle DNA yapısı hatalı sperm oosit sitoplazmasına enjekte edilme riski bulunmaktadır (30,32,44). Mikroenjeksiyonda anormal DNA yapısına sahip sperm enjekte edilmesi durumunda, oositin hasar derecesine bağlı olarak sınırlı ölçüde sperm onarabilme yeteneğine sahip olması nedeniyle ICSI ile fertilizasyon sağlanabilmekte, fakat embriyoda mutasyonların gelişimi ile henüz tam olarak bilinmeyen pek çok çocukluk çağı hastalığı açısından risk oluşmaktadır (30,31,57). Rutin morfoloji değerlendirmesi ile sperm kromatin yapısı ve DNA içeriği hakkında yetersiz bilgi sağlanırken, örneği hemen ICSI öncesi DNA hasarı açısından değerlendirip mikroenjeksiyonda kullanımını mümkün kılacak bir yöntem bulunmamaktadır (25,32,37,68). Bu nedenle rutin ICSI uygulamalarında sperm morfolojisi ile DNA hasarı arasındaki korelasyon, yüksek fertilizasyon başarısı ve kaliteli embriyo eldesi açısından önemini korumaktadır.

ICSI uygulamalarında sperm hareketsizleştirilmesi amacıyla yapılan kuyruk kırma işleminin, sperm plazma membranında hasar oluşturarak akrozom reaksiyonunu başlatır ve oositin sitoplazmik aktivasyonunu sağlar. Sperm kuyruk kırma işleminin fertilizasyon başarısını arttırdığı kabul edilmektedir (13-15). Bu uygulama esnasında sperm hareketini yavaşlatmak amacıyla sentetik polimer PVP veya hyaluronat kullanılmaktadır. ICSI uygulamaları sırasında, manipülasyon hatasına bağlı olarak PVP'nin ooplazma içine girmesi durumunda, PVP hücre dışına atılamamakta ve lizozomal enzimlerce sindirilememektedir (17). Hyaluronat ise PVP'nin aksine lizozomal enzimlerde sindirilebilmektedir (20). İnsan spermi-PVP inkübasyonu sonrası yapılan elektron mikroskopik değerlendirmede, PVP'nin sperm akrozom, nukleus şekil ve kromatin yapısı ile mitokondrionlarda

morfolojik yapıda bozulmalara neden olduğu, aksonemal yapıları ise minimal derecede etkilediği gösterilmiştir. PVP'nin plazma membranında oluşturduğu harabiyet istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (13).

Yapılan hayvan çalışmalarında, PVP'nin plazma membranı üzerine stabilize edici etkisi ve bu etkinin spermin penetre olduğu oositlerde kalsiyum osilasyonunu geciktirdiği, nükleer dekonkansasyonu önlediği bildirilmiştir (13,20). ICSI uygulamalarında sperm membran ve kromatin bütünlüğünün korunması için PVP inkübasyon süresinin kısa tutulmasının gerekliliği 21 infertil erkek ejakulatında gösterilmiştir (19). Belirtilen çalışmada 15, 30 ve 60 dakika süreyle PVP inkübasyonu uygulanmış, inkübasyon süresinin artışıyla sperm membran ve kromatin bütünlüğünün bozulduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada 30 dk süreyle PVP veya hyaluronat inkübasyonu uygulanmıştır. Bu süre, rutin ICSI uygulamaları sırasında immobilizasyon medyumunda sperm yüzdürme süreci ve uzun inkübasyonu gerektiren TESE uygulamaları da dikkate alınarak belirlenmiştir.

PVP'ye alternatif olarak genital traktın fizyolojik bileşeni olan hyaluronat kullanılmaktadır (25). Matür spermatozoalarda daha yüksek dansitede hyaluronik asit reseptör sayısının bulunması ve oositi çevreleyen kumulus ooforus'un ekstrasellüler matriks ara maddesinin bir komponenti olan hyaluronata bağlanma kapasitelerinin yüksek olması, ICSI uygulamalarında dölleme kapasitesi yüksek, matür spermin seçilmesinde hyaluronat kullanımını sağlamıştır. Bu yolla seçilen spermle yapılan mikroenjeksiyon "Fizyolojik ICSI" olarak kabul edilmektedir (25-28). Ayrıca hyaluronat, motilitenin azaltılmasında ve manipülasyon kolaylığı sağlamada PVP kadar etkin bulunmuştur (16,23). PVP ve hyaluronat ile 30 dk inkübe edilen oligozoospermik örneklerde ve dondurulmuş çözölmüş oligo ve normozoospermik örneklerde Comet yöntemiyle DNA bütünlüğü değerlendirildiğinde, PVP'nin DNA fragmantasyonunu indüklediği, hyaluronatın ise kontrol grubuna eşdeğer olduğu tespit edilmiştir (22). Permeagani ve ark. (26) 15 dk süreyle PVP ile inkübe edilen veya hyaluronata bağlanarak seçilmiş normo ve oligozoospermik örneklerdeki DNA hasarını, sperm kromatin dağılımı metodu ile değerlendirdiklerinde;



hyaluronata bağlanarak seçilen sperm grubunda hasarın, istatistiksel olarak anlamlı seviyede düştüğü, fertilizasyon, implantasyon ve embriyo gelişiminin yüksek olduğu, ancak istatistiksel anlamlılığının bulunmadığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada insan spermatozoasında apoptotik aktivasyonun varlığını, farklı klinik alt gruplarda ve iki immobilizasyon medyumunu (PVP ve hyaluronat) ile inkübasyon sonrası, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) aktivitesinin artışı kantitatif olarak gösterildi ve sperm apoptotik aktivasyonu ultrastrüktürel delillerle desteklendi. Erkek faktörüne bağlı infertilitede, ICSI adayı olan hastanın kötü kalitede sperm örneğine sahip olduğu ve bu örneklerde DNA hasar oranının daha yüksek olduğu bilinmektedir (38,45). Yapılan çalışmalarda oligozoospermik, astenozoospermik, teratozoospermik veya birkaç parametredeki bozukluğun bir arada bulunduğu olgularda, sperm anöploidi oranı daha yüksek bulunmuştur (50-52,55). Bu çalışmada normozoospermik örnekler ile teratozoospermik örneklere ait klinik alt grupları oluşturdu. Rutinde kullanılan iki farklı sperm immobilizasyon medyumunun etkileri, sperm apoptotik aktivasyonuna etkisi baz alınarak değerlendirildi.

Çalışmada elde edilen verilerin sonucunda; klinik alt gruplar dikkate alınmaksızın ham semenin değerlendirildiği kontrol grubuna ait örneklerde DNA fragmentasyon oranı, PVP ve hyaluronat uygulanan gruplardan düşük bulundu. Sperm immobilizasyon medyumunu ile inkübasyon sonrası değerlendirilen normozoospermik ejakulatlarda en düşük apoptotik aktivasyon normozoospermik-kontrol (NK) grubunda saptandı. NK ve normozoospermik-PVP (NP) ile NK-normozoospermik-hyaluronat (NH) grupları arasındaki DNA fragmentasyon oranının karşılaştırmasında kontrol grubu lehine istatistiksel açıdan anlamlılık bulundu. Bu sonuç immobilizasyon medyumunu ile inkübasyon sonrası sperm apoptotik aktivasyonunun arttığını göstermektedir. Ham semenin değerlendirildiği teratozoospermik erkeklere ait örneklerde (TK) ve immobilizasyon medyumlarında inkübe edilen teratozoospermik-PVP (TP) ile TK-teratozoospermik-hyaluronat (TH) grupları arasındaki DNA fragmentasyon oranının karşılaştırılmasında kontrol grubu lehine istatistiksel olarak anlamlılık bulundu. Normozoospermik ve

teratozoospermik gruplarda PVP ve hyaluronat uygulanan gruplar arasında oluşan DNA hasarı bakımından istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

Apoptozis ve seminal parametreler arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, anormal morfoloji ile birlikte DNA fragmentasyon oranının arttığı görülmüştür. Özellikle atipik baş morfolojilerine sahip spermatozoalarda DNA fragmentasyon oranı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Bu bulgular spermatogenezin morfolojik değişim sürecindeki disregülasyonunun sperm çekirdek kromatin yapısı ve DNA fragmentasyon oranında artışa neden olduğunu göstermektedir. Bu verilerimiz literatürdeki verileri destekler niteliktedir (44,45,49).

Rutin ICSI uygulamasındaki sperm membran hasarı oluşturulmaksızın PVP ve hyaluronat etken maddelerinin membran yapıları üzerine olası etkilerinin ayrı ayrı ultrastrüktürel düzeyde değerlendirildiği bu çalışmada, sperm ultrastrüktürel yapı değişimleri ile membran ve kromatin bütünlüğünün korunması açısından immobilizasyon medyumları ile olan inkubasyon sürelerinin kısa tutulmasının gerekliliği (19) literatür bulgularını destekler bulunmuştur. Yüksek DNA hasar oranına sahip sperm örneklerinin kimyasal ve çevresel ajanların toksisitesine daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (63,78). PVP ve hyaluronatın sağlam yada anomalili sperm üzerine etkisi, seçiciliğindeki ölçüt ve oluşturacağı hasarın gücü belirsizdir.

Bu çalışmada PVP ve hyaluronatın spermatozoa yapısı üzerine özellikle membran ve kromatin yapısı üzerine hasarlandırıcı etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. Ultrastrüktürel değerlendirmelerin sonucunda, ejakulat sperm morfolojisinde görülen nüklear ve sitoplazmik yapıdaki değişiklikler, literatürde sperm apoptotik aktivasyonunu tanımlayan morfolojik görünümle uyumlu bulundu (42,74,78,79). Apoptoza giden spermelerde görülen diğer dejeneratif özellikler apoptoz mekanizmasından ziyade, apoptoz sürecinin bir sonucu olarak değerlendirildi. Nüklear membranın aşırı üretimi, alınlmamış kromatin paterni apoptozla ilişkili olabilir. Sperm kromatin yapısında görülen fibriler-mikrogranüler kromatin kaybı ve kromatin dağılımında kutuplaşma, apoptotik süreçte nüklear materyalin yıkımının sebep olduğu ultrastrüktürel düzeydeki morfolojik görünümlelerdir.

Ultrastrüktürel düzeyde yapılan incelemeler ile TUNEL uygulamasında elde edilen bulgular, hasarın PVP ve hyaluronat etken maddelerinde eşdeğer düzeyde olduğu, klinik alt gruplara göre değerlendirildiğinde ise var olan morfoloji anomalili sperm üzerine olan hasarlandırıcı etkinin daha fazla olduğu yönündedir.

Sonuç olarak; seminal sıvıdaki sperm DNA fragmentasyonu, spermatogenez sürecindeki aksamalar ve fizyolojik şartlarla ilişkilidir. Spermiyogenez kontrol sistemindeki deregülasyonun bir sonucu olarak sperm apoptotik aktivasyonu gerçekleşmektedir. IVF uygulamalarında invitro şartlarda spermin inkübe edildiği immobilizasyon medyumlarının sperm apoptotik aktivasyonunu indükleyici etkisi vardır. Bu aktivasyon sperm anormal morfolojisi ve özellikle atipik baş morfolojilerinde daha belirgindir. Matürasyon sürecini tamamlamamış intratestiküler sperm ile yapılan ICSI uygulamalarında immobilizasyon medyumlarının sperm DNA fragmentasyon oranını arttırıcı etkisi pratik uygulamalarda dikkate alınmalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J 2009; 50(4): 336-7.
2. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. İn: Delilbaşı L. (eds). Ankara: Öncü Basımevi; 2008.
3. Kım HH, Schlegel P, Goldstein M. Infertility: The Male. Chapter 34. Section 6. Reproductive Biology 2010: 366- 80.
4. Günalp S, Aktan E, Yücel A, (eds). WHO Laboratuvar El Kitabı. 4. Baskı. Ankara: Tıp Teknik; 2002.
5. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z (eds). Yardımla Üreme Teknikleri Temel Kitabı. İn: İrez T, Arda O, Kaleli S. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2010.
6. Kayıkçı MA, Çam HK, Akman Y, Erol A. Erkek İnfertilitesini Değerlendirmede Semen Analizinin Özellikleri ve Rolü. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 4(3): 35-8.
7. Erdemir F, Fırat F, Gençten Y. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi. Turk Urol Sem 2011; 2: 11-7.
8. Rainsbury PA, Viniker DA (eds). Üreme Tıbbına Pratik Yaklaşımlar. İn: Işık AZ, Vicdan K, Alaybeyoğlu L. Ankara: Atlas Kitapçılık Ltd. Şti.; 1998.
9. Ross MH, Poulina W. Histology A text and Atlas. Sixth edition. Philadelphia; 2011.
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/Spermatocytogenesis>. 30.10.2013.
11. Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. Proc. Notl. Acad. Sci. USA 1994; 91: 11287-89.
12. Paker Ş. Histoloji. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1990
13. Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa. Human Reproduction 1998; 13(1):120-3.
14. Mizuno K, Hoshi K, Huang T. Fertilization and embryo development in a Mouse ICSI model using human and mouse sperm after immobilization in polyvinylpyrrolidone. Human Reproduction 2002;17(9): 2350-5.
15. Takeuchi T, Colombero LT, Neri QV, Rosenwaks Z, Palermo GD. Does ICSI require acrosomal disruption? An ultrastructural study. Human Reproduction 2004; 19(1): 114-7.
16. Balaban B, Lundin K, Morrell JM, Tjellström H, Urman B, Holmes PV. An alternative to PVP for slowing sperm prior to ICSI. Human Reproduction 2003;18(9):1887-9.
17. Jean M, Mirallie S, Boudineau M, Tatin C, Barriere P. Intracytoplasmic sperm injection with polyvinylpyrrolidone: a potential risk. Fertility and Sterility 2001; 76(2): 419-20.
18. <http://en.wikipedia.org/wiki/Polyvinylpyrrolidone>. 30.10.2013.
19. Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Aboutorabi R, Sheikhi A, Mohammadpour M. Effect of PolyVinyl Pyrrolidone on Sperm

- Membrane Integrity and Chromatin Status. *International Journal of Fertility and Sterility* 2008; 1 (4): 155-8.
20. Kato Y, Nagao Y. Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction. *Reprod. Med. Biol.* 2012; 11: 165-76.
  21. Fujii Y, Motoyama H, Hiraguchi K, Kobashi C, Kunitomi K. A simple method for recovering the motile spermatozoa from extremely low quality sperm samples. *Human Reproduction* 1997; 12(6): 1218-21.
  22. Salian SR, Kalthur G, Uppangala S, Kumar P, Adiga SK. Frozen-thawed spermatozoa from oligozoospermic ejaculates are susceptible to in situ DNA fragmentation in polyvinylpyrrolidone- based sperm-immobilization medium. *Fertility and Sterility* 2012; 98(2): 321-5.
  23. Sbracia M, Grasso J, Sayme N, Stronk J, Huszar G. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/ thawed human spermatozoa. *Human Reproduction* 1997; 12(9): 1949-54.
  24. Petersen CG, Massaro FC, Mauri AL, Oliveira JB, Baruffi R, Franco JG. Efficacy of hyaluronic acid binding assay in selecting motile spermatozoa with normal morphology at high magnification. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010; 8: 149.
  25. Parmegiani L, Cognigni GE, Ciampaglia W, et al. Efficiency of hyaluronic acid (HA) sperm selection. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 13-6.
  26. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo L, Ciampaglia W, Filicori M. "Physiologic ICSI": Hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertility and Sterility* 2010; 93(2): 598-604.
  27. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and Sterility* 2003; 79(3): 1616-24.
  28. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati AA, Fathi F, Tavalae M. Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet* 2008; 25: 197-203.
  29. <http://en.wikipedia.org/wiki/Hyaluronan>. 30.10.2013.
  30. Avendano C, Franchi A, Taylor S, Morshedi M, Bocca S, Oehninger S. Fragmentation of DNA in morphologically normal human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 2009; 91(4): 1077-84.
  31. Avendano C, Franchi A, Duran H, Oehninger S. DNA fragmentation of normal spermatozoa negatively impacts embryo quality and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Fertility and Sterility* 2010; 94(2): 549-57.
  32. Avendano C, Oehninger S. DNA Fragmentation in Morphologically Normal Spermatozoa: How Much Should We Be Concerned in the ICSI Era? *Journal of Andrology* 2011; 32 (4): 356-63.

33. Pedrix A, Travers A, Chelli MH, et al. Assessment of acrosome and nuclear abnormalities in human spermatozoa with large vacuoles. *Human Reproduction* 2011; 26(1): 47-58.
34. Shamsi BM, Imam SY, Dada R. Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. *J Asist Reprod Genet* 2011; 11: 9631-8.
35. Zini A, Jamal W, Cowan L, Al-Hathal N. Is sperm dna damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28: 391-7.
36. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, et al. Functional and Ultrastructural Features of DNA-fragmented Human Sperm. *Journal of Andrology* 2000; 21(6): 903-12.
37. Sharbatoghli M, Valojerdi MR, Amanlou M, Khosravi F, Jafar-abadi MA. Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 286(5): 1315-22.
38. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 1998; 69(3): 528-32.
39. Huang CC, Cheng Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Hsien C, Sheng Lee M. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertility and Sterility* 2005; 84(1): 130-40.
40. Robinson L, Gallos ID, Conner SJ, et al. The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* 2012; 0(0): 1-10.
41. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* 2008; 23(12): 2663-8.
42. Collodel G, Giannerini V, Pascarelli NA, Federico MG, Comodo F, Moretti E. TEM and FISH studies in sperm from men of couples with recurrent pregnancy loss. *Andrology* 2009; 41: 352-60.
43. Zhang L, Wang L, Zhang X, et al. Sperm chromatin integrity may predict future fertility for unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *International Journal of Andrology* 2012; 35: 752-7.
44. Daris B, Goropevsek A, Hojnik N, Vlaisavljevic V. Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Arch Gynecol Obstet* 2010; 281: 363-7.
45. Mehdi M, Khantouche L, Ajina M, Saad A. Detection of DNA fragmentation in human spermatozoa: correlation with semen parameters. *Andrologia* 2009; 41: 383-6.
46. Auger J. Assessing human sperm morphology: top models, underdogs or biometrics? *Asian Journal of Andrology* 2010; 12: 36-46.
47. Menkveld R, Holleboom C, Rhemrev J. Measurement and significance of sperm morphology. *Asian Journal of Andrology* 2011; 13: 59-68.

48. Simon L, Lewis SE. Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2011; 57: 133-8.
49. Prisant N, Escalier D, Soufir JC, et al. Ultrastructural nuclear defects and increased chromosome aneuploidies in spermatozoa with elongated heads. *Human Reproduction* 2007; 22(4): 1052-9.
50. Vicari E, Palma A, Burrello N, et al. Absolute Polymorphic Teratozoospermia in Patients With Oligo-Asthenozoospermia Is Associated With an Elevated Sperm Aneuploidy Rate. *Journal of Andrology* 2003; 24(4): 598-603.
51. Sun F, Ko E, Martin RH. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006; 4(1): 1-5.
52. Tang SS, Gao H, Zhao Y, Ma S. Aneuploidy and DNA fragmentation in morphologically abnormal sperm. *International Journal of Andrology* 2010; 33: 163-79.
53. Zini A, Philips S, Courchesne A, et al. Sperm head morphology is related to high deoxyribonucleic acid stainability assessed by sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility* 2009; 91(6): 2495-500.
54. Burrello N, Arcidiacono G, Vicari E, et al. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-astheno-teratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Human Reproduction* 2004; 19(10): 2298-302.
55. Brahem S, Mehdi M, Elghezal H, Saad A. Detection of DNA fragmentation and meiotic segregation in human with isolated teratozoospermia. *J. Assist Reprod Genet* 2011; 28: 41-8.
56. Aitken RJ, Koppers AJ. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology* 2011; 13: 36-42.
57. Franco JG, Mauri AL, Petersen CG, et al. Large nuclear vacuoles are indicative of abnormal chromatin packaging in human spermatozoa. *International Journal of Andrology* 2012; 35(1): 46-51.
58. Lewis SEM, Simon L. Clinical implications of sperm DNA damage. *Human Fertility* 2010; 13(4): 201-7.
59. Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 2008; 127: 115-23.
60. Andrabi SMH. Mammalian sperm chromatin structure and assesment of DNA fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 561-9.
61. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *Journal of Andrology* 2009; 30(3): 219-29.
62. Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S. Apoptosis, spermatogenesis and male infertility. *Frontiers in Bioscience* 2012; 4: 746-54.
63. Menezo Y, Entezami F, Lichtblau I, Belloc S, Cohen M, Dale B. Oxidative stress and fertility: incorrect assumptions and ineffective solutions? *Zygote* 2012; 0(0): 1-11.
64. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reproduction* 1999; 4: 31-7.

65. Manochantr S, Chiamchanya C, Sobhon P. Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. *Andrologia* 2012; 44: 187-99.
66. Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in Ejaculated Human Spermatozoa and the Possible Involvement of Apoptosis. *Biology of Reprpduction* 2002; 66: 1061-7.
67. Tamburrino L, Marchiani S, Montoya S, et al. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian Journal of Andrology* 2012; 14: 24-31.
68. Abu HA, Franken DR, Hoffman B, Henkel R. Accurate sperm morphology assessment predicts sperm function. *Andrologia* 2012; 44: 571-7.
69. Koyuncu H. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri. *Türk Üroloji Seminerleri* 2011; 2: 18-23.
70. Sharma RK, Sabanegh E, Mahfouz R, Gupta S, Thiyagarajan A, Agarwal A. TUNEL as a Test for Sperm DNA Damage in the Evaluation of Male Infertility. *Urology* 2010; 76(6): 1380-6.
71. Dugum M, Sandlow JI, Brannigan RE. Sperm DNA Damage Evaluation Techniques. *Journal of Andrology* 2011; 32(3): 207-9.
72. Visco V, Raffa S, Elia J, et al. Morphological sperm defects analyzed by light microscopy and transmission electron microscopy and their correlation with sperm motility. *International Journal of Urology* 2010; 17: 259-66.
73. Güven MC, Can B, Saran Y. Ultrastructural Changes in the Spermatozoa of Infertile Men. *T Klin J Med Res* 1998; 16: 103-5.
74. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction* 2000; 15(4): 830-9.
75. Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, et al. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Human Reproduction* 1998; 13(9): 2521-6.
76. Skowronek F, Casanova G, Alciaturi J, et al. DNA sperm damage correlates with nuclear ultrastructural sperm defects in teratozoospermic men. *Andrologia* 2011; 44: 59-65.
77. Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction* 2007; 22(5): 1413-9.
78. Collodel G, Moretti E, Fontani V, et al. Effect of emotional stress on sperm quality. *Indian J Med Res* 2008; 128: 254-61.
79. Baccetti B, Capitani S, Collodel G, Strehler E, Piomboni P. Recent advances in human sperm pathology. *Contrception* 2002; 65: 283-7.
80. Bubenik J. Genetically Modified Vaccines Augment the Efficacy of Cancer Surgery and Chemotherapy. *Folia Biologica* 2009; 55: 199-200.
81. Bakos HW, Thompson JG, Feil D, Lane M. Sperm DNA damage is associated with assisted reproductive technology pregnancy. *International Journal of Andrology* 2007; 31: 518-26.



## EKLER

### **EK-1:** Diff-3 Boyaması: hazır ticari solusyonlar

- Diff-3 fiksatif: 5 dips
- Solusyon A: 4 dips
- Solusyon B: 3 dips
- Rinse Buffer – lam pembeleşene dek yıkanır.

### **EK-2:** %4 Paraformaldehit fiksatifin hazırlanması:

- 80 ml distile suda, 4 gr paraformaldehit 58 °C'ye dek karıştırılarak eritilir.
- Isıtıcı kapatılıp 0,8 ml NaOH ilave edilip bir yandan karıştırılarak solusyonun berraklaşması gözlenir.
- Solusyon süzdürülüp 100 ml'ye PBS tampon ile tamamlanır.
- 1 M NaOH/HCl ile pH 7,4'e ayarlanır.

### **EK-3:** %3 Gluteraldehit fiksatifin hazırlanması:

- 5 ml PBS ( pH 7,4)
- 0,75 ml %25 gluteraldehit

## TEŞEKKÜR

Eğitimim s¼recinde varlığı ve desteğinden g¼¼ aldđđm Anabilim Dalı başkanı değerli hocam Prof. Dr. Semiha Ersoy'a, tezin hazırlık s¼recinde katkıları ve deneyimleriyle danışman hocam Prof. Dr. şahin Sırmalı ve yoğun iç temposunda vakit ayırarak desteğiyle Doç. Dr. Berrin Avcı'ya, bilgi ve deneyimlerinden yararlandıđđm hocalarıml Prof. Dr. İlkin Çavuşoğlu, Prof. Dr. Zeynep Kahveci, Prof. Dr. Zehra Minbay, Prof. Dr. Özhan Eyigör'e, verdiği moral desteği ile Bio. Dr. Elif Evke'ye, diğer yüksek lisans ve doktora eğitimi alan çalışma arkadaşlarıma,

Elektron mikroskopik gör¼nt¼leme sırasında destekleri ile İstanbul Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanı hocam Prof. Dr. Ayhan Bilir ve Elektron Mikroskopi Ünitesi çalışanlarına, tez istatistiklerinin hazırlanmasında yardımlarıyla hocam Prof. Dr. Vahide Savcı ve Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Dr. Güven Özkaya'ya,

G¼zel paylaşımları ve yardımseverlikleriyle T¼p Bebek Ünitesi'nin değerli çalışanlarına,

Ve... her zaman desteği ile yanımda olup bana g¼¼ veren aileme teřekk¼r ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Bursa'da dünyaya geldim. İlköğrenimimi Atatürk İlkokulu'nda, orta ve lise öğrenimimi Bursa Kız Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Pratisyen hekim olarak Bursa Büyükşehir Belediyesi'nde poliklinik ve kurum hekimliği hizmetlerinde, Taksim İlyayardı Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yaklaşık 16 ay Patoloji Anabilim Dalı'nda ve Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı'nda 3 ay sürelerle asistanlık görevlerinde bulundum. 2009 Eylül TUS sınavı sonrası Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimine başladım. Asistanlık döneminde bulunduğum çalışmalar;

- “Sıçanlarda uzun süreli kardiyak iskemi-reperfüzyon hasarında CDP-kolin'in koruyucu etkisinin araştırılması” T-2008/43, uzmanlık tez çalışması.
- “Sıçanlarda uzun süreli iskemi-reperfüzyon modelinde N-asetil sistein ve Timetazidin'in S100B, oksidatif stres ve apoptozis üzerindeki etkisi” UAP(T)-2009/6, doktora tez çalışması.
- “Koroziv özefajite sekonder darlıklar extractum cepae, heparin ve allantoin jel ile önlenbilir mi?” uzmanlık tez çalışması.
- “Elektrospinning yöntemi ile biyomedikal kullanıma yönelik nanolif yüzey üretimi ve uygulaması” Tekstil Mühendisliği, 108M396 nolu TÜBİTAK Projesi, yüksek lisans tez çalışması.