

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

**PENTOKSİFİLİN VE PLATELET AKTİVE EDEN FAKTÖR
UYGULAMA SONRASI SPERM KROMATİN DAĞILIMI
METODU İLE DNA HASARININ İNCELENMESİ**

Moleküler Biyolog Gamze BEREKETOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2014

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**PENTOKSİFİLİN VE PLATELET AKTİVE EDEN FAKTÖR
UYGULAMA SONRASI SPERM KROMATİN DAĞILIMI
METODU İLE DNA HASARININ İNCELENMESİ**

Moleküler Biyolog Gamze BEREKETOĞLU

**Tez Danışmanı
Yard. Doç. Dr. EVRİM ÜNSAL**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2014

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Gamze BERKETOĐLU



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1.ÖZET	1
2.SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEM	4
4.1.1. Testis Histolojisi.....	4
4.1.2. Spermatogenez	7
4.1.2.1. Spermatogoniyal Evre.....	8
4.1.2.2. Mayoz Bölünme Evresi.....	9
4.1.2.3. Spermiyogenez Evresi	10
4.3. PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR (PAF).....	19
4.4. SPERM DNA HASARI	21
4.5. SPERM FONKİSYON DEĞERLENDİRME TESTLERİ	24
4.5.1. Sperm Kromatin Testleri	24
4.6. SPERM KROMATİN DAĞILIM TESTİ (SCD TESTİ).....	25
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
5.1. HASTA GRUPLARI.....	26
5.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI.....	26
5.3. PENTOKSİFİLİN VE PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR.....	30
5.3.1.Pentoksifilin Uygulama Protokolü	30
5.3.2 Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) uygulama Protokolü.....	31
5.3.3 Sperm Kormatin Dağılımı (SCD) Sperm Dna Fragmantasyon Analizi.....	31

6. BULGULAR	37
7.TARTIŞMA.....	49
8.SONUÇ.....	53
9.TEŞEKKÜR	55
10. KAYNAKLAR.....	56

SİMGE VE KISALTMALAR

ADP	: Adenozin Difosfat
AR	: Akrozom Reaksiyonu
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
Ca⁺²	: Kalsiyum
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CASA	: Bilgisayar Destekli Program
FISH	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
HOS	: Hipo Ozmolar Şişme Testi
IBMX	: İzobütilmetilksantin
ICM	: İç Hücre Kitlesi
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IgE	: İmmunoglobulin E
IUI	: İntrauterin İnseminasyon
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
M	: Molar
PAF	: Platelet Aktive Eden Faktör
PF	: Pentoksifilin
PH	: Hidrojenin Gücü
PAS	: Periyodik Asid Schiff Reaksiyonu
PMN	: Polimorfonükleer Nötrofilleri
RCT	: Randomize Kontrollü Klinik Çalışma
ROS	: Serbest Oksijen Türevleri
SPM	: Sfingo Miyelin
TCN	: Total Hücre Sayısı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 27/11/2013 tarih ve 14-85 numaralı karar ile onaylanmıştır.

T.C. İstanbul Bilim Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 28.03.2014 tarih ve 2014-01/02 proje numarasıyla desteklenmesine karar verilmiştir.

Araştırma Projesi No: HE/1812013

1. ÖZET

Evli çiftlerin yaklaşık %15'inde infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. İnfertilite (kısırlık) vakaları % 30-50 oranında erkeğe bağlı nedenlerden etkilenmektedirler. Erkek infertilitesinin başlıca nedenlerinden biri sperm motilitesindeki bozukluklardır. Sperm motilitesini olan erkeklerde sperm hareketliliğini arttırmaya yönelik çeşitli ajanlar tanımlanmıştır. Motilitenin başlatılmasında ve devam ettirilmesinde bu faktörler temel gereksinimdir. cAMP sperm fonksiyonlarının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. Sperm motilitesinin invitro şartlarda uyarılmasının esası da hücre içi cAMP seviyesini arttırarak sperm fonksiyonlarının uyarılmasına dayanmaktadır. Pentoksifilin gibi fosfodiesteraz inhibitörleri laboratuvarında semene eklendiklerinde, hücre içi cAMP düzeyini, glikozisi ve ATP yapımını arttırdığı görülmüştür. Bu maddeler motil sperm oranını yükseltmekte ve aynı zamanda canlı ama motil spermatozoalarda motiliteyi de tetiklemektedir. Dondurulup-çözünmüş örneklerde sperm motilitesini uyardığı da gösterilmiştir. Platelet Aktive Eden Faktör spermde mevcuttur ve endojen içeriğinin motilite ve gebelik oranı ile önemli ve olumlu ilişkisi vardır. PAF'ın eylem mekanizması tam olarak belli olmasa da, normal üreme fonksiyonuna dair önemi barizdir. Endojen PAF normal sperm fonksiyonu için bir biyobelirteç olarak da rol oynayabilir. PAF kullanmanın özel bir avantajı, sperm tarafından üretilen doğal bir madde olmasından ve pentoksifilin gibi diğer bazı hareketliliği uyarıcılardan farklı olarak toksik etkisinin olmamasındandır. Sperm motilitesinin geliştirilmesi yardımıyla üreme tekniği sonuçlarını etkili biçimde artırabilir. Özellikle total immotil olgularda canlı sperm seçiminde ve testis biyopsi örneklerinde kullanımı fertilizasyon oranlarını iyileştirici yönde etki göstermektedir. Bu projede Pentoksifilin ve Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) uygulaması sonrasında Sperm Kromatin Dağılımı metodu ile DNA hasarının incelenmesini ve sonuçların kıyaslanmasını amaçladık.

Anahtar Kelimeler: Sperm, Motilite, Pentoksifilin, Platelet-Aktive Eden Faktör, PAF

2. SUMMARY

Pentoxifylline and Platelet Activating Factor Sperm Chromatin After Application Distribution Method For The Analysis of DNA Damage

Approximately 15 percent of married couples have infertility problems. 30-50% of infertility cases are due to the reasons related to men. One of the main causes of male infertility is the disorder in the sperm motility. A variety of agents have been identified to improve sperm motility's of men who have sperm motility problems. These factors are the basic requirements in the initiation and continuation of motility. cAMP plays a key role in the regulation of sperm function. The basis of the stimulation of sperm motility in vitro conditions is based on the stimulation of sperm functions by increasing intracellular cAMP levels. When phosphodiesterase inhibitors, such as pentoxifylline, are added to semen in the laboratory, they increase intracellular cAMP level, glucose and the production of ATP. These substances increase the rate of motile sperm and at the same time they start lively but nonmotilspermatozoa motility. It has also been observed that it stimulates frozen-dissolved sperm motility. PAF is present in human sperm and endogenous content has an important and positive relationship between motility and the rate of pregnancy. Although the exact mechanism of action of PAF isn't certain, its function about normal reproduction is obvious. Endogenous PAF may also play a role as a biomarker for normal sperm function. One of the special advantage of using PAF is because of the fact that it is a natural substance produced by sperm and it is non-toxic unlike some other motility stimulants such as pentoxifylline. Improving sperm motility can efficiently increase the results of assisted reproduction techniques. In this project, we aimed to analyse the DNA damage with Sperm Chromatin Distribution (SCD) method after the application of Pentoxifylline and Platelet Activating Factor (PAF).

Key Words: Sperm, Motility, Pentoxifylline, Platelet-Activating Factor, PAF

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite olgularının yaklaşık %20'si erkek faktöründen kaynaklanmaktadır. Erkek infertilitesi konsensüs grubu, infertil çiftlerde babayı primer klinik olgu olarak tanıır ve erkek infertilitesinin kendi kuralları içerisinde disiplinler arası bir konu olduğunu kabul eder (1).

Erkek fertilitesinde azalma konjenital ya da kazanılmış ürogenital bozukluklardan, genital sistem enfeksiyonlarından, skrotal ısı yüksekliğinden (varikosel), endokrin bozukluklardan, genetik hastalıklardan ve immünolojik faktörlerden kaynaklanabilir.

Sperm kromatinin fertilizasyonda önemli bir etkisi olduğu bilindiğinden bu durumdaki bozukluklar erkek fertilitesi üzerinde negatif bir etkiye sahip olabilir (2). Bu durumda sperm kromatin hasarının belirlenmesinde DNA kromatin matüritesine/DNA bütünlüğüne bakılmaktadır. Oral pentoksifilin kullanımının sperm kalitesi üzerindeki olumlu etkileri bilinmektedir. Tüp bebek uygulamalarında mikroenjeksiyon sonrası fertilizasyon oranlarının artırılabilmesi için sperm seçimi son derece önemlidir. Total immotil (semende hiç hareketli sperm bulunmayan) örneklerde canlı spermin seçimini sağlayan bazı alternatif yöntemler kullanılmakla birlikte Pentoksifilin ve Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) gibi motiliteyi uyaran ajanların kullanımı oldukça yaygındır. Çalışmamızda astenospermik ve normospermik olgularda elde edilen semen örneklerinde Pentoksifilin ve PAF uygulaması sonrası Sperm Kromatin Dağılımı metodu ile sperm DNA hasarı incelenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEM

Erkek üreme sistemi, haploid erkek gametin (spermatozoa veya sperm) devamlı üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından sorumludur (3).

Erkek üreme sistemi;

- İki adet testis (erkek gonadları),
- Genital kanallar,
- Aksesuar bezler,
- Penis,

Erkek üreme sistemi sperm yapımı, erkek seks hormonlarının üretimi ve erkek gamet hücrelerinin dişi üreme sistemine iletilmesi işlevlerini yerine getirir (2).

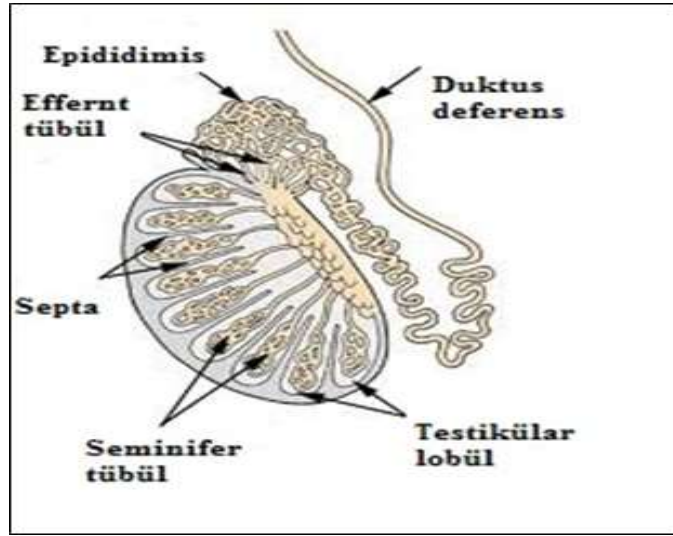
4.1.1. Testis Histolojisi

Testisler normal spermatogenez için gerekli olan 34-35°C'yi sağlamak amacıyla karın boşluğu dışında, vücut ısısından 2-3 °C daha düşük ısıda olan skrotum içinde ayrı bölümlerde yerleşmiş, oval şekilli organlardır. Testis ekzokrin ve endokrin salgılama görevlerinden dolayı karışık bir bezdir (4).

Testislerin çevresinde fibromusküler yapıda bağ dokusu bulunur. Tunika albuginea adı verilen bu doku, mediastinum testis bölümünde kalınlaşır ve buradan çıkan septumlar testisi 250 kadar lobuli testise böler. Her lobülde 1 ile 4 adet, kıvrımlı yapıda, ana işlevi sperm üretimi olan seminifer tübüller bulunur. Seminifer tübüllerin duvarı birkaç hücre tabakası kalınlığında epitelle döşelidir. Bu epitelin bazal hücreleri Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlardan oluşmaktadır. Spermatogonyumlar kendilerini çoğaltmak ve primer spermatositleri oluşturmak üzere mitoz aktivitesiyle bölünürler. Diploid yapıdaki primer spermatositler birinci mayoz bölünme sonrasında sekonder spermatositleri meydana getirirler. Bu bölünmenin ardından ikinci mayoz bölünmeyi tamamlayan hücreler haploid spermatidler halini almışlardır. Bu sürecin ardından spermatidler sitoplazmalarının çoğunu

kaybederler, organelleri yeniden organize olur ve erkek gamet hücresi olan spermelere dönüşürler .

Sperm farklanması Sertoli hücrelerinin fiziksel ve besleyici desteği ile olaylanır. Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantılar, gelişmekte olan üreme hücrelerini olumsuz otoimmün etkilerden koruyan kan-testis bariyerini oluşturur (4). Sertoli hücreleri arasındaki bağlantılar 2 sitoplazmik bileşenle karakterizedir. Spermatozidler, spermatidler ve sperm hücreleri gelişim süreçleri boyunca Sertoli hücreleri tarafından fiziksel ve metabolik olarak desteklenirler. Ayrıca spermiyogenezis sırasında atılan sitoplazma artıkları Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Sertoli hücreleri ayrıca, spermeleri destekleyen ve bu hücrelerin seminifer tübüllerde ve genital kanallarda taşınmaları için gerekli akışkan ortamı sağlayan fruktozdan zengin bir sıvı salgılar. Sertoli hücreleri embriyonik gelişim esnasında Müller kanalının gelişimini engelleyen anti-müllerian hormonu üretirler, böylece embriyonun erkek olarak gelişmesi kesinleşmiş olur (3).



Şekil 1. Testis Histolojisi (5)

Seminifer epitel, fibromusküler yapıda tunika propriya ile çevrelenmiş olan bazal membran üzerinde oturur. Seminifer tübüllerini çevreleyen bağ dokusu içinde damar-sinir paketlerinin yanı sıra androjen hormonu sentezleyen endokrin hücre kümeleri bulunur. Bunlar Leyding hücreleridir. Bu hücreler erkek cinsiyet hormonu olan testosteronu üretirler. Puberteden önce testosteron üretilmez.

Spermatogenezis, seminifer túbüller boyunca tekrarlanan ve senkronize olmayan bir süreç gösterir. Bu nedenle seminifer túbül epitelinde, çeşitli gelişim evrelerindeki spermatogenetik seri hücrelerini izlemek olasıdır. Her bir hücre katmanı birbirlerine hücrelerarası köprülerle bağlı gruplardan meydana gelmektedir. Bunlar eş zamanlı olarak seminifer túbülün lümenine doğru göç ederler. Spermatogenezisin üç fazı vardır.

Bunlar;

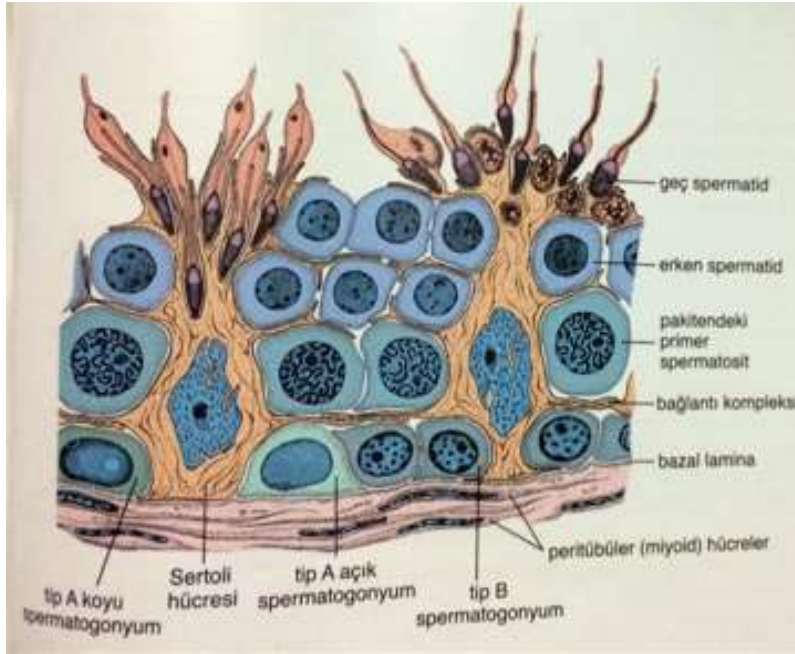
- Spermatositogenezis
- Mayoz
- Spermiyogenezis fazlarıdır.

Spermatositogenezis mitoz sürecidir. Burada, iki temel morfolojik spermatogonyal hücre tipi gözlenebilir.

- 1) **Tip A spermatogonyum:** Soluk Tip A ve tip B spermatogonyumları oluşturmak üzere bölünürler. Bu iki hücre de diploiddir. Koyu tip A spermatogonyum ise normalde bölünmeyen, fakat bölündüğü zaman da soluk tip A spermatogonyumları oluşturan yedek hücre topluluğunu temsil eder.
- 2) **Tip B spermatogonyumlar:** Mitoz yoluyla, diploid yapıda primer spermatositleri oluştururlar. Bütün spermatogonyum hücreleri seminifer túbülün bazal bölümünde yer alırken, primer spermatositler lümenine komşu bölüme göç ederler.

Mayoz fazı, primer spermatositlerin ($4n$ DNA içeriği) birinci mayoz bölünmesiyle başlar. Birinci mayoz bölünme sonucunda; iki adet, kısa yaşam döngüsüne sahip sekonder spermatosit ($2n$ DNA içeriği) oluşur. Sekonder spermatositler DNA'larını eşlemeden hızla ikinci mayoz bölünmeye başlarlar ve her biri iki adet haploid(n) spermatid oluşturur.

Spermiyogenez süreci spermatidlerin sperme dönüştüğü, hücre farklanması sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi izlenmez. Bunun yerine spermatid sitoplazmasının çoğunu kaybederek (Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir) bir akrozom granülü, uzunbir silyum, birleşik dış yoğun lifler ve kaba fibröz bir kılıf meydana getirir. Oluşan ve seminifer túbül lümenine salınan sperm hareketli değildir ve oositi dölleme kapasitesi yoktur. Sperm hücreleri epididimisi terk edinceye kadar hareket kazanmazlar. Dışı üreme sistemine geçtikten sonra, spermler kapasitasyon geçirir ve böylece dölleme yeteneği kazanır (5).



Şekil 2. Seminifer epiteldeki hücrelerin dağılımları (4)

4.1.2. Spermatogenez

Spermatogenez hücreleri, düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme farklılaşan hücrelerdir. Bu hücreler, testisin erken gelişim evresinde gonadal gebelik kesesinden kaynaklanan ve gonadal kabartılarda kolonize olan primordiyal germ hücrelerinden gelişirler. Spermatogenez hücreleri komşu Sertoli hücrelerinin arasında ilerleyici gelişim sergileyen, belirgin olmayan tabakalar halinde düzenlenmişlerdir. Spermatogonyum olarak adlandırılan en immatür (olgunlaşmamış) spermatogenez hücreleri bazal laminanın üzerinde uzanırlar. Spermatid olarak adlandırılan en matür (olgun) hücreleri Sertoli hücrelerinin apikal bölümüne tutunmuşlardır ve tübülün lümeninin sınırını oluştururlar.

Embriyonik ve fetal gelişim döneminde spermatogonyum hücreleri primordiyal germ hücrelerinden köken alırlar. Yeni doğanda seminifer tübüller, tunika propriya tarafından çevrelenmiş bir seminifer epitelten meydana gelmektedir. Epiteli oluşturan hücreleri sertoli hücreleri, destek hücreleri olarak da bilinmektedir. Sertoli hücreleri, komşu spermatogenez hücreleri çevreleyen ve onların arasındaki boşluğu dolduran yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir. Sertoli hücreleri, seminifer epitelin tüm kalınlığı boyunca uzanarak tübüllere yapısal düzen verirler. Yaşlılığın normal bir sonucu olarak

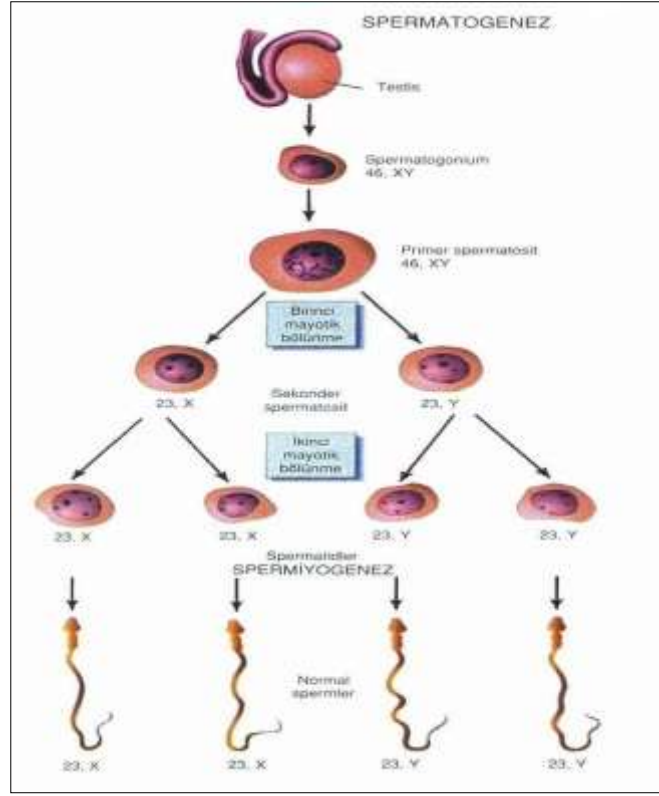
tunika propriyanın kalınlığında artış olur. Bu kalınlaşmaya sperm üretim hızında düşüş ve seminifer tübül boyutlarında genel bir azalma eşlik eder. Erken yaşlarda tunika propriyadaki yoğun kalınlaşma infertilite ile ilişkilidir (6).

Spermilerin üretildiği süreç olan spermatogenezde kompleks ve eşsiz bir olaylar serisi gerçekleşmektedir. Puberteden kısa bir süre önce, hipofiz gonadotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisi altında başlar ve yaşam boyunca devam eder. Tanımlayıcı olması için, üç farklı faza ayrılmaktadır. Spermatogonyal fazda spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek kendi yerlerine geçecek hücreleri oluştururken, sonuçta primer spermatositlere farklılaşacak olan adanmış spermatogonyum popülasyonunu da oluştururlar. Spermatosit fazında (mayoz) primer spermatositler iki mayotik bölünmeye uğrayarak kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını azaltırlar ve spermatid adı verilen haploid hücreleri oluştururlar (7).

Spermatid fazında (spermiyogenez), spermatidler matür (olgun) sperm hücrelerine farklılaşırlar. Spermatogenezin sonunda spermatidler son olgunlaşmalarını geçirirler ve spermiasyon olarak adlandırılan bir süreç ile Sertoli hücrelerinden seminifer tübülün lümenine salıverilirler.

4.1.2.1. Spermatogonyal Evre

Spermatogonyal fazda kök hücreler bölünerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri ve adanmış spermatogonyum popülasyonunu oluştururlar. Spermatogonyal kök hücreler çok sayıda bölünme geçirirler ve nüklear görünümde farklılıklar gösteren spermatogonyal soyları üretirler. Birkaç bölünmeden sonra, tip A spermatogonyumlar tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar. Tip B spermatogonyumların görünümü spermatogonyal fazdaki son olayı temsil eder.

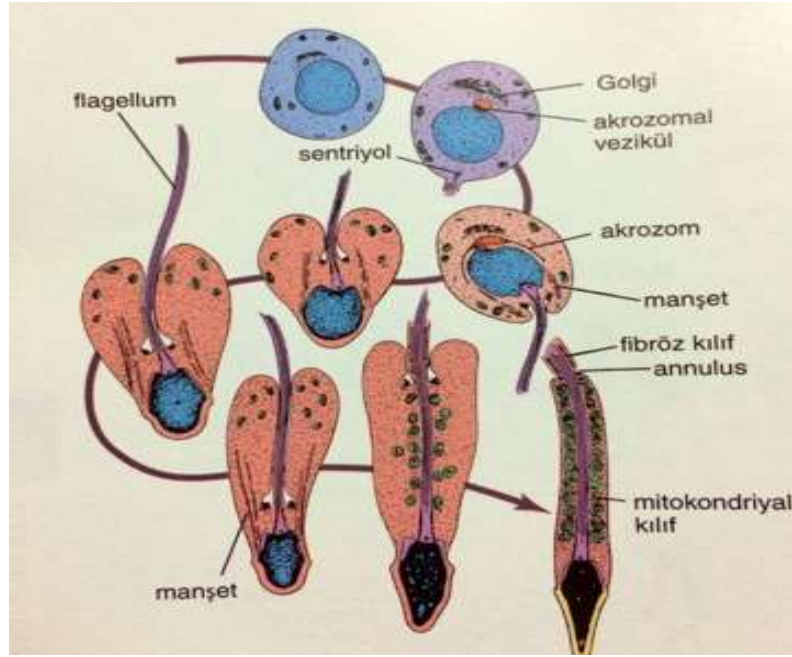


Şekil 3. Spermatogenezis: (a) Birinci mayotik bölünme, (b) İkinci mayotik bölünme (5).

4.1.2.2. Mayoz Bölünme Evresi

Spermatosit fazında primer spermatositler mayozu uğrayarak hem kromozom sayısını, hem de DNA miktarlarını azaltırlar. Tip B spermatogonyuların mitotik bölünmesi primer spermatositleri üretir. Oluştuktan kısa süre sonra ve mayoz başlamadan önce DNA'larını replike ederler. Böylece, her primer spermatosit normal sayıda kromozom ($2n$) ve iki katı miktarda DNA ($4d$) içerir. Her kromozom iki kardeş kromatidden oluşur. Bundan dolayı DNA miktarı $4d$ 'dir. Mayoz I, kromozom sayısını ($2n$ 'den $1n$ 'ye) azaltır ve DNA miktarını haploid duruma ($4d$ 'den $2d$ 'ye) getirir. Böylece, sekonder spermatosit haploid kromozom sayısı ($1n$) ve $2d$ miktarda DNA ile karakterizedir. Mayoz II'den önce DNA replikasyonu olmadığı için bu bölünmeden sonra her bir kromozom tek bir kromatid ($1d$) içerir. İnsan primer spermatositlerinde 22 gün kadar süren birinci mayotik bölünmenin profazında kromatin görülebilen kromozomları oluşturacak şekilde yoğunlaşır. Profazın sonunda 44 otozom ve bir X ve bir Y kromozomu, her biri iki kromatin ipliğine

(kromatidler) sahip halde fark edilebilir. Homolog kromozomlar metafaz çizgisi boyunca dizilerek eşleşirler. Birinci mayotik bölünme ile oluşan hücreler sekonder spermatositler olarak adlandırılmaktadır. Bu hücreler yeni DNA sentezlemeden hemen ikinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Her sekonder spermatositin kromozom sayısını azaltmıştır. (1n),22 otozom ve bir X ya da bir Y kromozomuna sahiptirler. Bu kromozomların her biri iki kardeş kromatidden oluşur. Sekonder spermatosit diploid DNA miktarına (2d) sahiptir. İkinci mayotik bölünmenin metafazında kromozomlar metafaz plağında dizilirler. Kardeş kromatidler ayrılır ve mekiğin zıt kutuplarına hareket eder. İkinci mayotik bölünme tamamlandığında ve nükleer membranlar yeniden oluştuğunda her bir sekonder spermatositten her biri 23 tek iplikli kromozom (1n) ve 1d miktarında DNA içeren iki haploid spermatid oluşur (7).

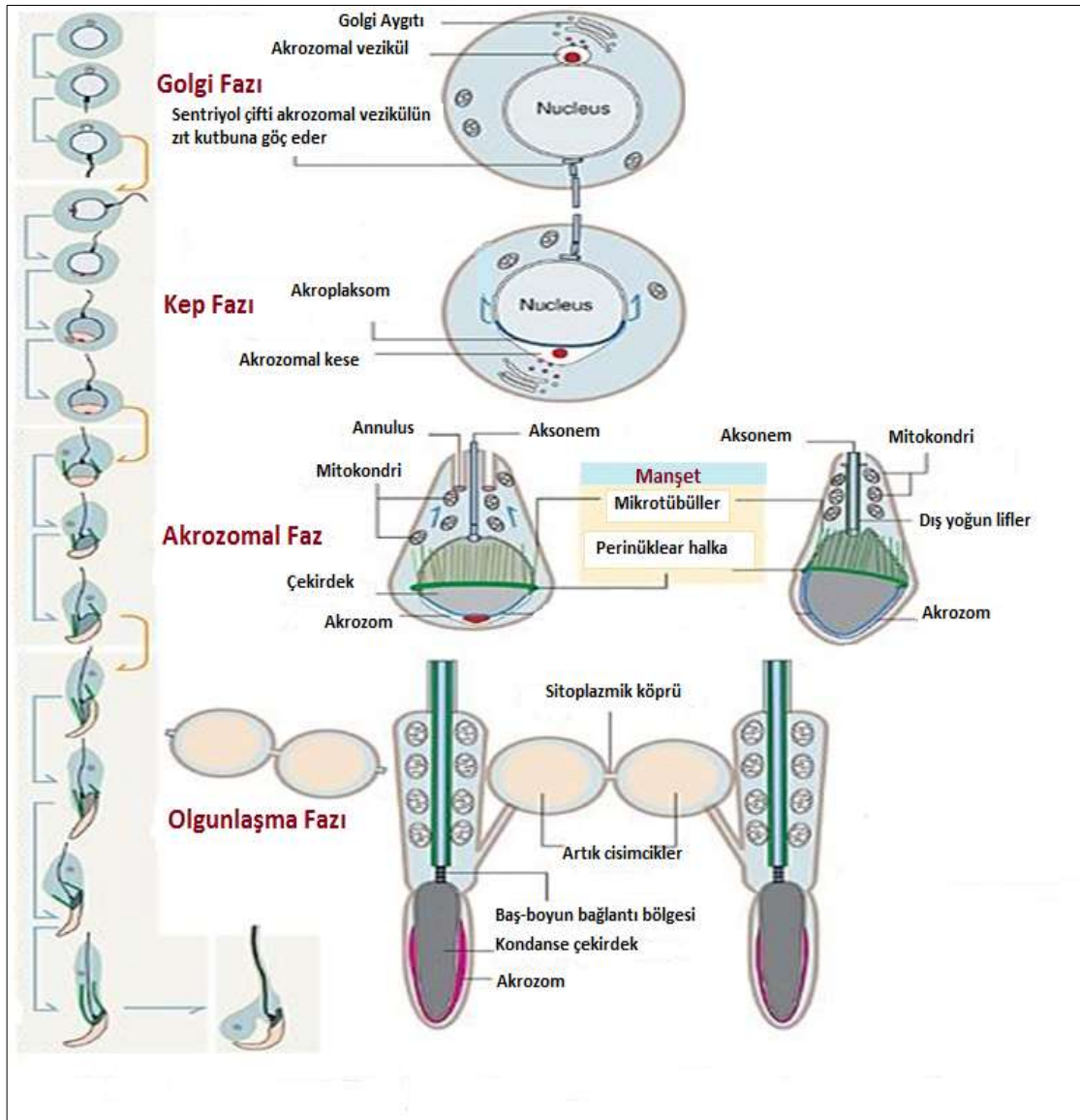


Şekil 4. Spermatid'ten, spermatozoa oluşumu 'Spermiyogenez evresi'(6)

4.1.2.3. Spermiyogenez Evresi

Spermatid fazında, spermatidler olgun sperme farklılaşırken yüksek düzeyde yeniden şekillenmeye uğrarlar. İkinci mayotik bölünmenin sonucunda oluşan her spermatid DNA içeriği olarak haploiddir. Haploid spermatidler, olgun spermi oluşturan bir

farklılaşma sürecine uğrarlar. Matür sperm de haploiddir. Sperm bir oositi fertilize ettiği (döllediği) zaman normal diploid durum yeniden oluşur. Spermatid popülasyonunun olgun sperme farklılaşması esnasında meydana gelen yoğun yeniden şekillenme (spermiyogenez) dört fazdan oluşmaktadır. Bu fazlar meydana gelirken spermatidler fiziksel olarak Sertoli hücrelerinin plazma membranına özelleşmiş bağlantılar ile tutunmuş haldedirler. Haploid spermatidler seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanda yerleşmişlerdir. Spermatidler, Sertoli hücrelerinin stoplazma kriptaları içinde gömülüdür. Spermiyogenez, spermatogenezin son aşamasıdır.



Şekil 5. Akrozom gelişmesinin fazları: golgi fazı, kep fazı, akrozomal faz, olgunlaşma fazı (7)

- **Golgi fazı:** Bu faz, spermatidin çok sayıdaki kompleksinde kümelenen periyodik asit-Schiff (PAS) pozitif granüllerin bulunması ile karakterizedir. Bu proakrozomal granüller, glikoprotein bakımından zengindirler ve akrozomal vezikül denen ve nüklear zarfa komşu membranla sınırlandırılmış bir vezikülü oluşturmak üzere bir araya gelirler. Bu fazda akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar. Akrozomal vezikülün pozisyonu, gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler. Bu fazda, sentriyoller de jukstanükleer bölgeden spermatidin arka kutbuna göç ederler. Arka kutupta olgun sentriyol plazma membranına dik açı ile hizalanır. Sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi mikrotübülün parçasının biraraya gelmesini başlatır.
- **Kep fazı:** Bu fazda akrozomal vezikül, nükleolusun yarısının üzerinde yayılır. Bu, yeniden şekillenmiş yapıya akrozomal kep denmektedir. Akrozomal kepin altındaki nüklear zarf parçası porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Nüklear içerik de yoğunlaşır.
- **Akrozomal faz:** Akrozom, çekirdeğin üst 1/3'lük kısmını örter ve sarmaya devam eder ve manşet gelişir. Distal sentriyol, 9+2 eş merkezli dizilmiş mikrotübül çiftlerinden oluşan aksonemi oluşturur. Mitokondriyonlar gelişen aksonem boyunca göç ederler.
- **Olgunlaşma fazı:** Spermatidin yeniden modellenmesinin bu son fazında flagellanın etrafındaki fazla sitoplazma azaltılır ve olgun spermatozoon oluşur. Daha sonra, rezidüel cisimcik olarak da adlandırılan fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatidler artık birbirlerine bağlı değildirler ve Sertoli hücrelerinden salıverilirler (8).

4.1.3. Spermin Kapasitasyonu ve Motilite Kazanması

Spermatozoonların epididimiste matürasyondan sonra dişi üreme kanalının içinde aktive olmaları gerekmektedir. Kapasitasyon adı verilen bu aktivasyon sürecinde spermatozonda yapısal ve fonksiyonel değişiklikler meydana gelir. Başarılı kapasitasyon,

spermatozoonların hiperaktivasyonu ile teyit edilir. Hiperaktive spermatozoonlar kamçı gibi kuvvetli flagella atım örüntüsü ile kendilerini gösterirler.

Kapasitasyon ile spermatozoonda ve onun plazma membranında bazı biyokimyasal değişiklikler ve modifikasyonlar gerçekleşmektedir. Bunlar;

- Adenil siklaz aktivitesinin artması ile cAMP düzeylerinin yükselmesi
- Tirozin fosforilasyon hızının yükselmesi
- Ca kanallarının aktivasyonu sonucunda intraselüler Ca düzeyinin artması
- Spermatozoon başının yüzeyinden seminal sıvı glikokonjugatlarının serbestleştirilmesi
- Kapasitasyonun baskın inhibitörü olan kolesterolün plazma membranından uzaklaştırılması ve fosfolipidlerin ve karbonhidrat parçalarının yeniden dağıtımı ile membranın ileri modifikasyonu

4.1.4. Semen

Semen testisten gelen spermleri ve sıvıları ve epididimis, duktus deferens, prostat, vezikula seminalisler ve bulboüretal bezlerden gelen salgı ürünlerini içermektedir. Semen alkali özelliktedir ve böylece üretra ile vajinadaki asidik ortamın nötralize edilmesine yardımcı olabilmektedir. Semen, hem erkek hem de dişi üreme kanallarında spermin taşınmasını etkileyen fertilize oosit implantasyonunda rol oynayabilen prostaglandinleri de içermektedir. Ejekülasyonla atılan semenin ortalama hacmi yaklaşık 3 ml'dir ve normalde 100 milyona yakın sperm içermektedir. Herhangi bir ejakülattaki spermlerin %20'sinin morfolojik olarak anormal ve yaklaşık %25'inin de hareketsiz olduğu tahmin edilmektedir.

İnsanda ejakülat miktarı kişisel farklılıklar göstermekle birlikte 2-6 ml. kadardır. Semen pH'sı 7.2-8.0 arasında değişkenlik gösterir ve diğer pek çok memeliden farklı olarak insan semeni ejakülasyonun hemen sonrasında koagüle olur ve yaklaşık 20dk içinde yeniden çözülerek likefiye olur (9).

4.1.4.1. Semen Analizinde Spermatozoanın Mikroskopik İncelenmesi

Olgun bir sperm, baş ve kuyruk olmak üzere iki bölümden oluşur. Bir bağlantı parçası ile baş kuyruğa bağlanmıştır. Sperm başı ortalama 4-5µm uzunlukta, 2,5-3,5µm

genişliğindedir. Baş akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdeğin ön yarısını akrozom örter ve lizozomlarda sıkça bulunan hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluronidaz) içerir.

Akrozomal enzimler, oosit saran korona radyat ve zona pellusida'dan sperm girişini kolaylaştırmak için döllenme anında salınır. Spermin boyun kısmı kısa bir parça olup bağlantıyı sağlamaya yönelik segmentli kolonlardan ve proksimal sentriyolden oluşur. Orta parça ise sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz adet uzunlamasına seyreden kolonlardan oluşur. Kuyruk kısmı ise yedi dış yoğun lifçe sarılı aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur.

a) Konsantrasyon: Sperm sayısı, direkt olarak semenin ince bir tabaka halinde lamel arasında Makler, sayacıları kullanılarak incelenmesi ile belirlenir. Sperm konsantrasyonu milyon/ml olarak değerlendirilir. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) kriterlerine göre sperm konsantrasyon > 20 milyon spermatozoa olmalıdır (10).

b) Motilite: Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından hareketlilik 4 kategoriye ayrılmıştır.

- Hızlı ilerleyen = hızlı ileriye hareket etme kabiliyeti
- İlerleyen = yavaş, uyuşuk ileriye hareket etme kabiliyeti
- İlerlemeyen = yerine hareketlilik, daire içinde yüzen
- Hareket etmeyen = yerinde sayan, hiçbir hareketlilik göstermeyen

Sperm hareketliliği ejakülasyondan sonra 60 dakika içinde, ileri hızlı, hareketli ve ileri yavaş hareketli sperm sayısı %50 den fazla veya ileri hızlı hareketli spermelerin sayısı %25'den fazla olmalıdır.

c) Morfoloji: Sperm hücresi baş, boyun ve gövde olmak üzere üç kısımdan oluşmuştur. Sperm başı içerisinde genetik materyel bulunur. Başın şekli oval olmalıdır. Başın boyu 4.0-5.0µm ve genişliği 2.5-3.5µm olmalıdır. Baş bölgesinin %40-%70'ini kapsayan iyi tanımlanmış bir akrozomal bölge olmalıdır. Orta kısım silindir şeklinde ve 1µm genişlikte ve baş uzun luğunun 1,5 katı uzunlukta olmalıdır. Kuyruk orta kısmından hafifçe ince, kıvrım içermeyen 45µm uzunlukta olmalıdır. Kruger vekriterlerine göre morfolojik değerlendirmenin sonuçları, normal morfolojiye sahip grup için %14 ve üzeri sperm olmalıdır (11).

d) **Morfolojik Bozuklukların İnfertiliteye Etkisi:** Son yıllarda bu konu üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sperm morfolojisi, spermin zona pellusidaya bağlanması ve invitro fertilizasyon sonuçları ile sperm nuklear normalliği arasında anlamlı bir korelasyon bulunmaktadır. İnvitro fertilizasyonun sonucu üzerinde önceden tahmin ettirici en önemli parametreler olarak zona pellusidaya bağlanan spermatozoa sayısı, normal morfolojili spermatozoa yüzdesi ve normal DNA taşıyan spermatozoa yüzdeleri gösterilmektedir (12).

Akrozom: Sperm penetrasyonu

Nukleus: DNA içerik bozukluğu

Sitoplazmik artık: Sperm maturasyonu

Orta parça: Enerji noksanlığı

Kuyruk: Motilite düşüklüğü

Non-aksiyel: Motilite düşüklüğü

Globozoospermiya: Döllenme bozukluğu (13).

e)Terminoloji:

Normospermi: Volüm >2 ml, motilite %50 ve normal morfoloji>%4 ml'deki sperm sayısının 20 milyon/ml olması.

Oligospermi: ml'deki sperm sayısının 20 milyon/ml'den az olması.

Polispermi: Sperm sayısının 20 milyon/ml'den çok fazla olması.

Azospermi: Ejakülasyonun santrifüjden sonra bile hiç sperm içermemesi.

Aspermi: Ejakülasyona seminal sıvının üretilmemesi.

Nekrospermi: Ejakülattaki ölü spermlerin oranının % 25'den fazla olması.

Astenospermi: Sperm motilitesi (%50) düşük olması.

Teratospermi: Normal sperm morfolojisinin < % 4'den az olması.

Lökositospermi: Semende lökositlerin 1 milyon/ml'den daha fazla olması.

Hiperspermi: Ejakülatın 6ml'den daha fazla olması.

Hipospemi: Ejakülat miktarının 1 ml'den daha az olması.

Globozoospermi: Spermde akrozom yokluğu.

4.2. PENTOKSİFİLİN

İnsanda spermatozoa fonksiyonlarının invitro stimülasyonu için bu güne kadar çok sayıda madde tanımlanmıştır: serum, periton sıvısı, insan follikül sıvısı, prostazomlar, enzimler, platelet aktive edici faktör, kreatin fosfat, kalsiyum iyonofor, kalsiyum

şelatörleri, hyalüronik asit, siklik nükleotid analogları ve adenozin analogları gibi. Bunlar arasında en çok kafein, pentoksifilin, teofilin gibi metilksantin grubu ile 3-isobutiyl-1-metilksantin (IBMX) üzerinde durulmuştur.

Kafein, pentoksifilin gibi fosfodiesteraz inhibitörleri laboratuvarında semene eklendiklerinde, hücre içi cAMP düzeyini, glikozisi ve ATP yapımını arttırmaktadırlar. Bu maddeler motil sperm oranını yükseltmekte ve aynı zamanda canlı ama nonmotil spermatozoalarda motiliteyi de başlatmaktadırlar. Bunların dondurulup çözülmüş sperm motilitesini uyardığı da gösterilmiştir. Bir metilksantin türevidir olan Pentoksifilin (PF), canlı ortamda (8) ve laboratuvar ortamında (9, 10) insan sperm hücrelerinin hareketliliğini artırdığı ortaya konulmuştur. Pentoksifilin cAMP fosfodiesterazını inhibe eder ve böylelikle hücre içi cAMP konsantrasyonunu artırır (11). cAMP konsantrasyonunun artması sperm hücrelerinin spermatozoadaki hareketlilik, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi cAMP-ye bağlı süreçlerinde artışa sebep olur (12, 13).

Metilksantinlerin testis mikrosirkülasyonunu düzenleyici ve invitro şartlarda sperm motilitesini uyarıcı etkileri bulunmaktadır. Metilksantinlerin invitro kullanımıyla ilgili çok sayıda çalışma bildirilmiş olmakla birlikte, genel kanı bu maddelerin bireysel etki gösterdiği ve farklı sonuçlar verdiği (14, 15). Sonuçlar üzerinde etkili en önemli faktörler ilacın konsantrasyonu ve inkübasyon süreleridir.

Pentoksifilin gibi Metilksantinler fosfodiesteraz aktivitesini inhibe eder, müteakiben hücre içi cAMP seviyelerinde artışa yol açar. Pentoksifilin siklik adenozin monofosfatı fosfodiesterazını (cAMP) inhibe eder, böylelikle kuyruk seviyesinde hücre içi cAMP konsantrasyonunu (16) ve tirozin fosforilasyonunu artırır (17).

cAMP sperm fonksiyonlarının düzenlenmesinde anahtar role sahiptir. cAMP insan sperminin respirasyonunu ve hareketliliğini uyarır. Sperm motilitesinin invitro şartlarda uyarılmasının esası da hücre içi cAMP seviyesini arttırarak sperm fonksiyonlarının uyarılmasına dayanmaktadır. cAMP fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifilin bu sayede hücre içi cAMP konsantrasyonunu arttırırken tirozin fosforilasyonunu en düşük seviyede tutar. cAMP konsantrasyonunu arttıran tedaviler genelde spermin hareketinin artmasına ve akrozom reaksiyonunda ve dölleme artışına sebep olur. Aynı zamanda PF'nin reaktif oksijen guruplarını da temizleyebildiği varsayılmıştır. Sperm sıvısının dondurulmadan önce pentoksifiline maruz bırakmak sperm sıvısının eritilmesi sürecinde akrozom kayıplarını azalttığı, eritme sonrası reseptör tesirindeki akrozom reaksiyonu oranını

arttırdığı söylenmiştir. Teknoloji yardımlı üremede Pentoksifilin astenozoospermia'da sperm hareket ve dölleme kabiliyetlerine olumlu etkisi doğrulanmıştır (18). cAMP fosfodiesteraz aktivitesi inhibitörü pentoksifilin hücre içi cAMP konsantrasyonunun artmasını sağlar.

Hücre içi cAMP konsantrasyonlarının artırılması işlemleri sıklıkla sperm hareketliliğinde ve deviniminde, bunun yanısıra agonist-indüklenmiş akrozom reaksiyonunda ve fertilizasyon oranlarında bir artışa sebep olur (18). Pentoksifilin aynı zamanda sperm hücrelerinin oosit saran membranöz yapıyı bağlama kapasitelerini de artırır (19). Laboratuvar ortamında dölleme oranlarını artırmada, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için epididimal ve testiküler sperm hareketliliğinin uyarılmasında ön işlem olarak başarıyla kullanılmaktadır (20). Pentoksifilin sperm fonksiyonları üzerindeki ve erkekten kaynaklanan kısırlık tedavisindeki yararlı etkileri önceki bazı çalışmalarda gösterilmiştir.

Sperm hücrelerinin kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu (AR) gerçekleştirmedeki yeteneği başarılı bir döllemenin olabilmesi için en önemli olaylardan biri olarak kabul edilir (21). Oositin invitro şartlarda fertilizasyonu ve hamilelik oranları sperm hareketliliğine son derece bağlıdır. Bu hareketlilik de pentoksifilin ve progesteron gibi sperm hareketliliğini uyarıcıların ilave edilmesiyle artırılabilir (22, 23). Erkeğe bağlı kısırlık tedavisi için yardımcı üreme teknolojisinde bu gibi uyarıcıların kullanımına yönelik artan bir ilgi vardır (23, 24).

İnvitro kullanımında pentoksifilin, hücre düzeyinde fosfodiesteraz inhibisyonu yapar. Ayrıca lipid peroksidasyonunu artırarak sperm membran geçirgenliğinde etkilemektedir. Süperoksit dismutaz enzimini inhibe edici etkisi de bulunmaktadır. Astenozoospermik semende peroksit oluşumunu inhibe etmektedir.

Ancak bir çalışmada pentoksifilin ve pentoksifilin+2-deoksiadenozin kombinasyonunun embriyo gelişimini olumsuz etkilediği gösterilmiştir (25). Burada pentoksifilin yumurta üzerine olan direkt etkisinin sorumlu olabileceği düşünülerek, fertilizasyondan önce spermatozoanın yıkanarak bu ilacın ortamdaki uzaklaştırılması önerilmiştir. Ortamdan pentoksifilin yıkanarak uzaklaştırılmasını takiben bu ilacın etkisinin normozoospermiklerde 3-4 saat, astenozoospermiklerde ise 2 saat daha devam ettiği bildirilmektedir. Etkisinin hemen kaybolduğu da bir çalışmada bildirilmiştir.

Bütün bu sonuçlar, embriyo gelişimi üzerine olası zararlı etkilerinden dolayı pentoksifilin'in kullanımının dikkatli yapılması gereğini ortaya koymaktadır.

Yumurtanın vücut dışında döllenesi ve gebelik oranları spermilerin pentoksifilin ve progesteron gibi uyarıcılar ile de geliştirilebilen hareket kabiliyetlerinden etkilenmektedir. Pentoksifilin işlemi görmüş infertil bireylerden alınan spermilerinin yapay döllenede (IVF) oranını arttırdığı rapor edilmiş ve ek olarak bu ajanın sperm zona pellucidaya bağlanma kabiliyetini arttırdığı ve büyükbaşlarda yapay döllene oranlarını arttırmada başarılı bir şekilde kullanılabileceği rapor edilmiştir. Pentoksifilin ile invitro sperm iyileştirmesi sperm hareketliliğinde, akrozom reaksiyonlarında ve sperm plazma zarlarının korunmasında belirgin bir artış sağlar. Bu özellikler yardımcı üremelerde sperm hazırlamak için ajan kullanımının faydalı olabileceğini göstermektedir. CASA (bilgisayar destekli sperm değerlendirmesi) sistemiyle incelendiğinde, motilite parametrelerini farklı şekillerde etkilediği ve birçoğunda da etkileşimin iyileşme yolunda olduğu bildirilmiştir. Örneğin, lateral kafa hareketlerinde artma gözlemlenirken motilitede azalma saptanmıştır. PF'nin kullanımıyla normozoospermi ve oligozoospermi olgularında motilitede olumlu yönde etkilenmektedir. Pentoksifilin, spermle ilk karşılaştığı andan itibaren motiliteyi artırırken hiperaktivasyonu da uyarıcı etkisiyle dikkati çekmiştir (26).

Spermatozoanın oosite erişmesi ve fertilize edebilmesinde motilite gerekli ana fonksiyonel şartlardan sadece birisidir. Laboratuvarında swim-up (yüzdürme), dansite gradiyent sistemleri gibi sperm hazırlama yöntemlerinin sperm motilitesi üzerine olan olumlu etkileri kesin olarak ortaya konmuştur. Metodun basitliği ve az zaman alması, etkinliği, semenin kalitesi ve istenilen sperm özellikleri göz önüne alınarak, en uygun yöntem seçilmelidir. Hastalar ve yöntemler arasında, benzer semen örneklerinde bile, aralarında kendilerine özgü değişiklikler bulunabilir (27).

Diğer yandan, astenozoospermi olgularında sperm motilitesini düzeltmek amacıyla biyolojik ya da kimyasal maddelerin kullanılmasını destekleyen kanıtlar bulunmaktadır. Sperm motilitesini düzeltmeye yönelik invitro hangi teknik kullanılırsa kullanılsın, amaç diğer fonksiyonlarını ve embriyo gelişimini olumsuz yönde etkilemeden sperm fonksiyonlarını düzeltmek olmalıdır. Bütün bu sonuçlar, pentoksifilin bir grup olguda sperm motilitesini düzeltici etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır (28,29).

4.3. PLATELET AKTİVE EDEN FAKTÖR (PAF)

Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) organizmada lökosit, makrofaj, trombosit, damar endotel hücreleri ve lenfosit gibi hücrelerin zarlarındaki fosfolipidlerden oluşan ve etkisini, özelleşmiş PAF reseptörlerine bağlanarak gösteren bir mediatördür. Oluştuktan hemen sonar salınır. Kemotaktik etkenler ve immün etkenler PAF üretimine neden olurlar. PAF etkisini organizmada bulunan spesifik PAF reseptörlerine bağlanarak gösterir. Organizmada birçok doku üzerinde PAF reseptörleri bulunmaktadır. İnsan trombositleri üzerinde de PAF reseptörleri olduğu belirlenmiştir. Bu reseptörlerin PAF tarafından uyarılması sonucu trombositlerin etkin hale geldiği ve trombositlerin agregasyonunda önemli bir rol oynadığı ortaya konmuştur. Aynı zamanda sperm yapısında doğal olarak mevcut olan ve hamilelik sonucu ile pozitif korelasyon gösteren etkili bir fosfolipittir. PAF özellikle motil spermler üzerinde etki göstermekte, hareket kabiliyetini, kapasitesini, akrozom reaksiyonunu ve fertilizasyon yeteneğini arttırıp hamilelik oranlarını yükseltmektedir (30).

Primat erkekte üreme, döllenme için oositin zona pellucidasını bağlamak ve ona nüfuz etmek için kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu geçirme kapasitesine sahip yeterli sayıda normal motil sperm miktarının üretilmesini gerektirir. Bu süreçlerin herhangi birindeki anormallik erkek kısırlığına veya subfertiliteye yol açabilir.

Çeşitli ilaç tedavileri, mikro cerrahi veya endoskopik müdahaleler sonucu yeterli düzelme sağlanan ancak normal cinsel ilişki ile çocuk sahibi olmayan vakalarda rahimiçi aşılama yöntemi (IUI) ilk seçilen yardımcı üreme tekniklerinden biridir (31).

PAF, pleiotropik biyolojik aktiviteler için güçlü bir uyarıcı fosfolipiddir. Keşfedilmesinden bu yana pek çok araştırmacı PAF'ın çeşitli dokularda varlığını ortaya koymuştur. PAF ve reseptörleri hem somatik hemde üreme hücrelerinde bulunurlar. PAF döllenme, erken preimplantasyon embriyo gelişimi, implantasyon ve embriyo gelişimini içeren olayların çoğu için kritik öneme sahiptir. İnsan dahil birçok memelinin sperm hücresinde PAF bulunur. Sperm tarafından sentezlenir, metabolize edilir ve kullanılır. PAF sperm kapasitasyonu için bir biyobelirteç olabilir. İnsan ve diğer memeli türlerinde endojen PAF konsantrasyonları doğrudan sperm hareketi, döllenme, implantasyon ve gebelik oranları ile ilişkilidir.

Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) sperm ile sınırlıdır ve seminal salgılarda mevcut değildir. Bu bulgu PAF'ın sperm hücrelerinde lokalize olduğuna ve seminal plazmada

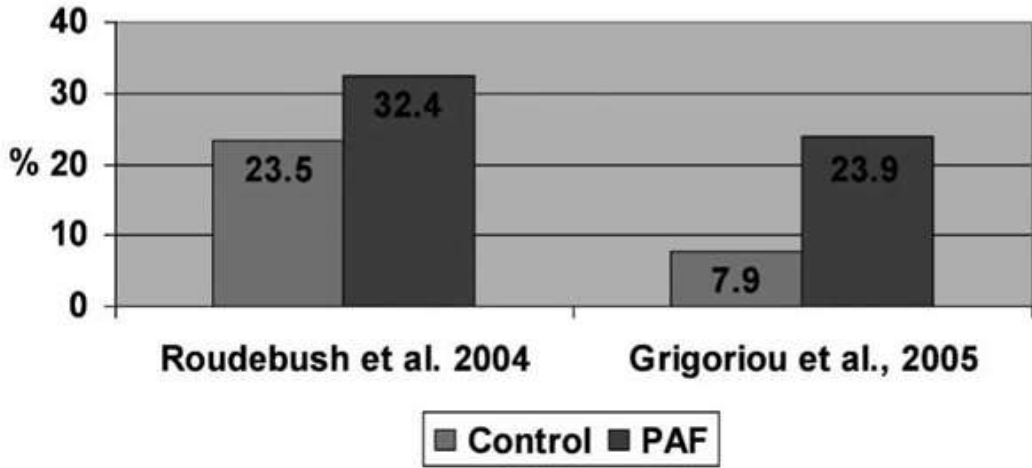
bulunmadığına dair raporlarla uyumludur. PAF metabolizması androjen, östrojen ve progesteronlardan etkilenir. Androjenik hormonlar erkek fertilitesinde önemli bir role sahiptir ve üreme dönemi dışında önemli ölçüde düşer. Dolayısıyla hormon düzeylerindeki mevsimsel değişiklikler spermatozoa-türevi PAF düzeylerini etkileyebilirler.

1970'lerin başlarında keşfedildiğinden beri bu özgün bileşik geniş bir yelpazedeki üreme fonksiyonlarına dahil edilmiştir. Kesin mekanizma belirsizdir, ancak normal primat üremesinde bir hayli öneme sahiptir. Sperm zarının lipid bileşiminin primat spermının fonksiyonel özellikleri üzerinde önemli bir etkisi vardır.

Primat spermindeki PAF'ın ve eylem mekanizmasını ve düzeylerini etkileyen artı faktörlerin temel düzeyde anlaşılması ve bilinmesi birçok sebepten önemlidir. Örneğin, sperm fonksiyonunun bir markörü için biyokimyasal bir test geliştirilmesi sperm fonksiyonel anormalliklerinin daha kesin biçimde tanımlanmasını ve sperm fonksiyonlarını artırmak böylece de primat üretkenliğini kolaylaştırmak için eksojen PAF kullanımını sağlayacaktır.

Testiste üretilen memeli spermi ilk önce hareketsizdir ve epididime doğru taşınmaları sırasında ileri yüzme yeteneğini kazanırlar. Boşalmanın ardından, sperm hareketli hale gelir, fakat dölleme yeteneğinden yoksundur. Sperm kadının genital bölgesinde sınırlı bir süre yerleştikten sonra dölleme yeteneği kazanır. Sperm bu süre boyunca geçirdiği fizyolojik değişikliklere müstereken "kapasitasyon" denir. İlk defa bağımsız olarak Chang (1951, 1955) ve Austin (1951, 1952) tarafından tanımlanan ve tarif edilen kapasitasyon karmaşık bir süreçtir. Türe bağlı olarak, yumurta kanalında veya rahimde meydana gelir. Kapasitasyon süreci sperm plazma zarının değiştirilmesini, hücre içi kalsiyum yoğunluğunun ((Ca²⁺)_i) artırılmasını ve cAMP düzeyinin yükseltilmesini, hücre içi pH (pH_i)'sında bir artışı, ve protein tirozin fosforilasyonunun uyarılmasını kapsar. Bu, enerji tüketimine, hipermotiliteye ve sonunda sperm akrozom reaksiyonuna (AR) yol açar.

Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) kapasitasyon için gerçekten bir biyogösterge olabilir. PAF'ın varlığı ve yoğunluğuyla ilgili çelişkili verilerin çoğu kapasitasyon olmayan sperm kullanımına atfedilebilir. Üstelik bazı laboratuvar prosedürleri PAF konsantrasyonlarını yanlışlıkla azaltabilir (32).



Şekil 6. PAF IUI Gebelik Oranları

İnfertilite erkekleri ve kadınları eşit derecede etkiler. Erkeğin üretkenliği yeterince hareketli ve oositin kumukus ooforusuna girmek ve döllenme için zona pellucidayı bağlamak için hiperaktivasyona, kapasitasyona ve akrozom reaksiyonuna uğrama yeteneğine sahip, morfolojik olarak normal spermatazoanın üretilmesini gerektirir. Bu gerekli olayların herhangi birindeki kusurlar kısırlığa götürecektir. Birçok endojen faktör sperm hücresinin üretkenlik potansiyelinin üretkenlik potansiyelinin düzenlenmesine dahil edilir, trombosit aktive edici faktör buna dahildir (PAF) (32).

İnfertilite tedavisinde IUI terapisi gören hastalar için PAF terapisinin kullanılmasını yaygınlaştırmak için ek klinik çalışmalar taahhüt edilmiştir. Özellikle, daha yüksek sayıda erkek kaynaklı infertilite hastası PAF-IUI terapisinin bu hastalar için önemini ortaya koyacaktır. Kısaca, spermın PAF'a maruz bırakılması IUI gebelik oranlarını önemli ölçüde arttırmaktadır (28).

4.4. SPERM DNA HASARI

Erkek infertilitesinde yüksek oranda sperm nükleusu DNA kırıklarına rastlanılmaktadır. DNA hasarları semen kalitesi, özellikle sayısı ile korelasyon gösterir. DNA'daki kırıklar spermatozoa tarafından ROS üretiminde artış ile de yakın ilişkilidir. Ayrıca, oksidatif DNAhasarları da ortaya konmuştur. Böyle oksidasyona bağlı DNA hasarları IVF (in vitro fertilizasyon) ile tedavi edilmeye çalışılan erkek infertilitesi olgularında fertilizasyon ve gebelik oranlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Oksidatif

stres seviyesindeki artışla paralellik gösteren DNA hasarlanması, sperm fonksiyonlarında daha fazla bozulmaya yol açarak fertilizasyon potansiyelini düşürebilmektedir. Neticede, oksidatif stresin erkekte germ hücrelerinde DNA hasarlanmasını artırıcı potansiyeli, in vitro veya in vivo fertilizasyon sonrasında doğacak çocuğa da bu defektlerin aktarılma potansiyeli bulunduğu kanısını vermektedir. Sperm DNA fragmentasyonunun erkek infertilitesinde önemli bir yeri olduğu bilinmektedir. Sperm DNA hasarının üreme potansiyeli üzerine etkisi ile ilgili yapılmış çok sayıda çalışma çeşitli farklı sonuçlar ortaya koymuş olup konu tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır.

Sperm DNA hasarına neden olan faktörlerin ortaya konması önem taşır. DNA hasarlanması sperm kalitesinde bozulmayla doğrudan ilişkili olduğu için, ICSI'de (laboratuvar ortamında dölleme) kullanılan gametlerin çoğunun da hasarlı olduğu ortaya çıkmaktadır. Bazı çalışmalarda DNA hasarlarının fertilizasyon ve gebelik oranlarını anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Diğer yandan, hasarlı DNA'nın ICSI sırasında yeni oluşacak embriyoya da geçebileceği ve neticede doğacak çocukta ortaya çıkması olası etkilerin önemi konusunda da ciddi şüpheler öngörülmektedir (12).

Spermin genetik yapısındaki bozulma ile infertilite arasında kuvvetli bir birliktelik görülmektedir. Sperm DNA hasarlarının infertilitedeki önemi çok sayıda in vitro ve in vivo çalışmada gösterilmiştir. DNA hasarlı spermatozoa oranı arttıkça (>%30-40) doğal yolla gebe kalma şansı da azalmaktadır (25, 26).

Kötü kalitedeki sperm DNA'sının fertilizasyonu bozabileceği in vitro çalışmalarda da ortaya konmuştur. Gerçekten de, in vitro fertilizasyon (IVF) uygulanan hastalarda >%4 spermatozoa hasarlı genetik yapıya sahipse fertilizasyon oranları %58'den %38'e düşmektedir ($p<0.05$) (27). İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sırasında bu verilerin önemi, hasarlı DNA'nın fertilizasyonu önlemeyeceği ve neticede bu genetik materyali taşıyan embriyoların oluşabileceğinin vurgulanmış olmasıdır (17). Dolayısıyla, ejakulatta DNA hasarlı spermatozoa oranının bilinmesi gerek fertilizasyon şansının tahmin edilmesinde gerekse embriyonun maruz kalabileceği risklerin belirlenmesinde önem kazanmaktadır. Fertilite potansiyelinin belirlenmesinde sperm DNA'sının sağlamlılığının değerlendirilmesinin standart sperm analizi sonuçlarından daha anlamlı olduğu düşünülmektedir. Veriler, tubal obstrüksiyon gibi kadın faktörü bulunan infertilite olgularında erkeklerin de önemli bir kısmında DNA hasarlı sperm oranının yüksek

olduğunu ortaya koymuştur (24). Bu sonuçlar, şiddetli kadın faktörü olgularında aslında erkeğe ait faktörlerin de eşlik edebileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

Spermde DNA hasarlarının hangi nedenlere bağlı olarak ortaya çıktığı konusu tam olarak izah edilmiş değildir. Değişik çalışmalarda inflamasyon, apoptoz, sigara ve oksidanların (serbest oksijen türevleri, ROS) spermde kromatinin kondanase hale geçmesini engelledikleri gösterilmiştir (18). Kromatinde yeterli kondensasyon gelişmez ise sperm DNA'sı da kırık gelişmesine daha hassas hale gelmektedir.

DNA hasarı geçiren sperm sonuçta;

- 1) tamir olabilir
- 2) tamir kapasitesini aşmış ise hasarlı olarak çoğalmasına devam edebilir
- 3) spermatogenez bir seviyede duraklayabilir (maturasyon duraklaması)
- 4) hücre ölebilir

Apoptozis, yani programlı hücre ölümünün de DNA hasarlanması ile ilişkisi gösterilmiştir. Spermatozoa için de aynı şey söz konusudur. İnfertilite nedeni olarak bilinen çoğu faktör spesifik mekanizmalarla apoptoza yol açar. Apoptoz ise DNA'nın parçalanması ile gerçekleşir.

Deneysel çalışmalarda germ hücrelerinin apoptozunda testosteronun da etkili olduğu bildirilmiştir (10). Spermatogenez sırasında apoptozun başlatılmasında etken bir başka faktör ise germ hücreleri ve lökositlerden kaynaklanan ROS yapımı ve miktarı ile ilişkilidir. İnsan spermi ile yapılan çok sayıdaki çalışmada hücre ölümü ile ROS üretimi arasında sıkı ilişki bulunduğu vurgulanmıştır. İnfламasyon hücreleri salgıladıkları sitokinler ile apoptozu başlatabilir (14). Bütün bu sonuçlar infertilite olgularında sperm DNA hasarlarının önemli bir faktör olabileceğini vurgulamaktadır. Defektif genetik materyalin yeni doğana aktarılması olasılığı ise ayrıca önemlidir. Günümüzde erkek faktörü infertilite olgularında sıklıkla önerilen ICSI ile seçici birçok bariyer atlanılarak fertilizasyon başarıyor olmakla birlikte, IVF yapıldığında DNA hasarlarının embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin gözlenmiş olması, böyle hastaların tedavisinde daha başka önlemlerin alınması ve tedavi alternatiflerinin geliştirilmesinin gerekli olduğu kanısını vermektedir.

4.5. SPERM FONKSİYON DEĞERLENDİRME TESTLERİ

Spermin yumurtayı fertilize etmesinden gebelik oluşmasına kadar geçirilen aşamalar ve başarılı bir gebeliğin meydana gelmesi spermlerin fonksiyonunun normal olması ile mümkündür. Fonksiyonel olarak normal bir sperm iyi bir morfolojiye sahip, hızlı hareket yeteneği olan, membran geçirgenliği normal, akrozom reaksiyonunu yeterince gerçekleştiren, oosit zona pellusida'sına penetre olabilen ve kromatin'i oosit sitoplazması'nda iyi kondanse olan sperm demektir. İdiopatik erkek infertilitesinin, toplam erkek infertilisi olgularının yaklaşık olarak % 25'ini oluşturduğu düşünülürse, fertilizasyon belirteci olarak fonksiyon testlerinin kullanılmasının önemi daha iyi anlaşılabilir (11).

Sperm fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla şu testler yapılabilir:

- Sperm otoantikorları,
- Postkoital test,
- Hipo-osmolar şişme test (HOS),
- Akrozin tayini,
- Akrozom reaksiyonu,
- Hamster yumurta penetrasyon testi,
- Hemizona bağlanma testi,
- Servikal mukus penetrasyon testi,
- Hyaluronik asit bağlanma testi.

4.5.1. Sperm Kromatin Testleri

Semen analizi erkek infertilitesinin teşhisinde kullanılan temel bir yöntem olmasına karşın, artık standart sperm konsantrasyonu ile sperm motilitesi ve morfoloji ölçümlerinin yeterli olmadığı görülmüştür. Sperm nükleus matüritesi, DNA fragmantasyonu ve denatürasyonu fertilitiyi olumsuz yönde etkilemektedir. Sperm kromatin anomalileri ve DNA hasarları spermatogenez sırasında ve sonrasında meydana gelebilir. Bu konuda geliştirilmiş üç ayrı hipotez vardır. Bunlar sırasıyla defektif sperm kromatin paketlenmesi, apoptosis ve oksidatif stres olarak özetlenebilir. Lökospermi veya varikosel olgularında sperm DNA hasarlarının ortaya çıktığı bilinmekle birlikte semen parametreleri normal olgularda görülen fertilizasyon yetersizlikleri araştırmacılara sperm DNA incelemeleri için yeni bir yaklaşım getirmiştir.

4.6. SPERM KROMATİN DAĞILIM TESTİ (SCD TESTİ)

Sperm kromatin hasarının belirlenmesinde DNA kromatin bütünlüğüne bakılmaktadır. İnfertil erkeklerde sperm anomalileri, kötü paketlenen DNA, artan DNA zincir kırıkları ve asitle indüklenen DNA denatürasyonuna olan duyarlılık, fertil erkeklerin spermatozoalarından daha fazladır. Son zamanlarda tanımlanan sperm kromatin dağılımı testi (SCD-Sperm Chromatin Dispersion) yöntemi, DNA fragmentasyonu için basit ve pahalı olmayan bir tekniktir. Testin temeli, DNA hasarı olan spermlerin asit denatürasyonu sonrası ve nükleer proteinlerin açığa çıkmasını takiben agarozda karakteristik bir halo vermesidir. Sperm DNA hasarının tespiti için kullanılan yöntemler özel ekipman ve iyi yetiştirilmiş teknisyen gerektiren pahalı işlemler olmasına karşın, yardımla üreme tekniklerinin sonucunu tahmin etmede invaziv olmayan bir yoldur (15).

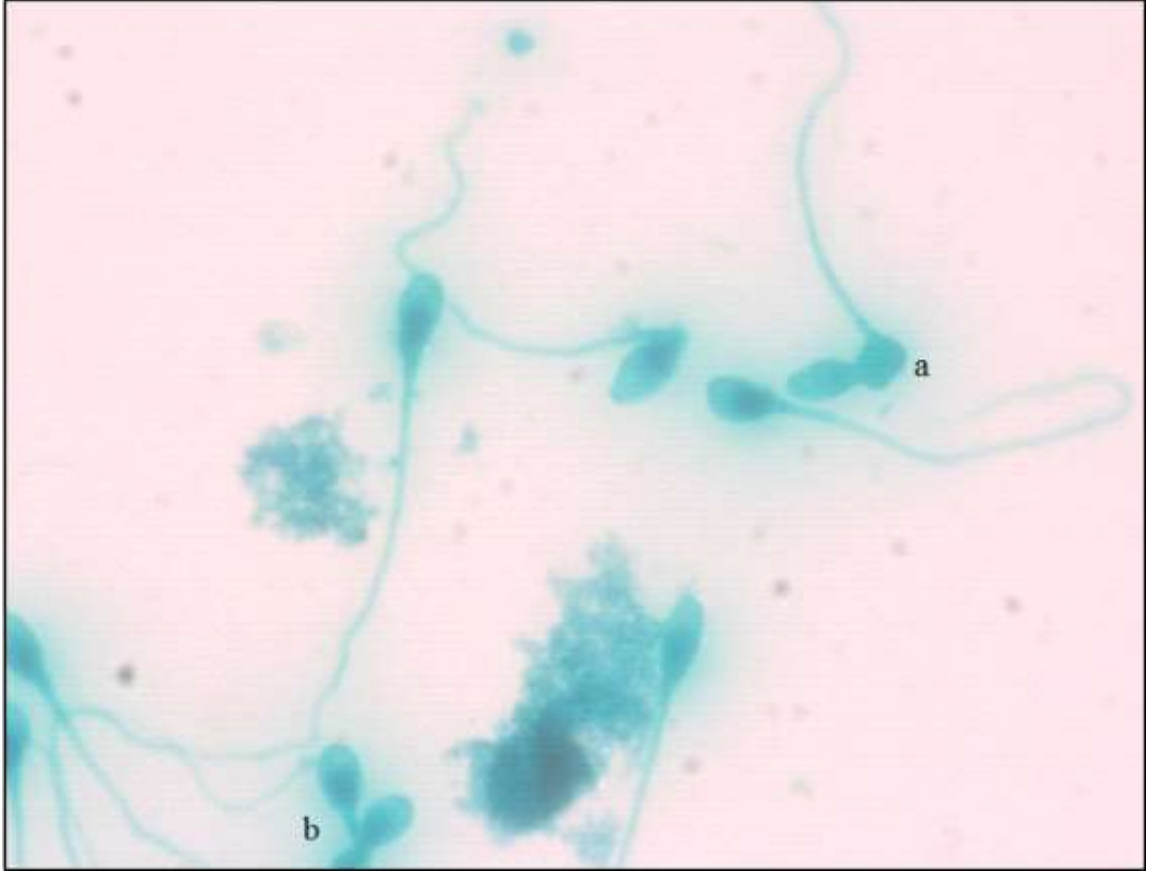
5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1. HASTA GRUPLARI

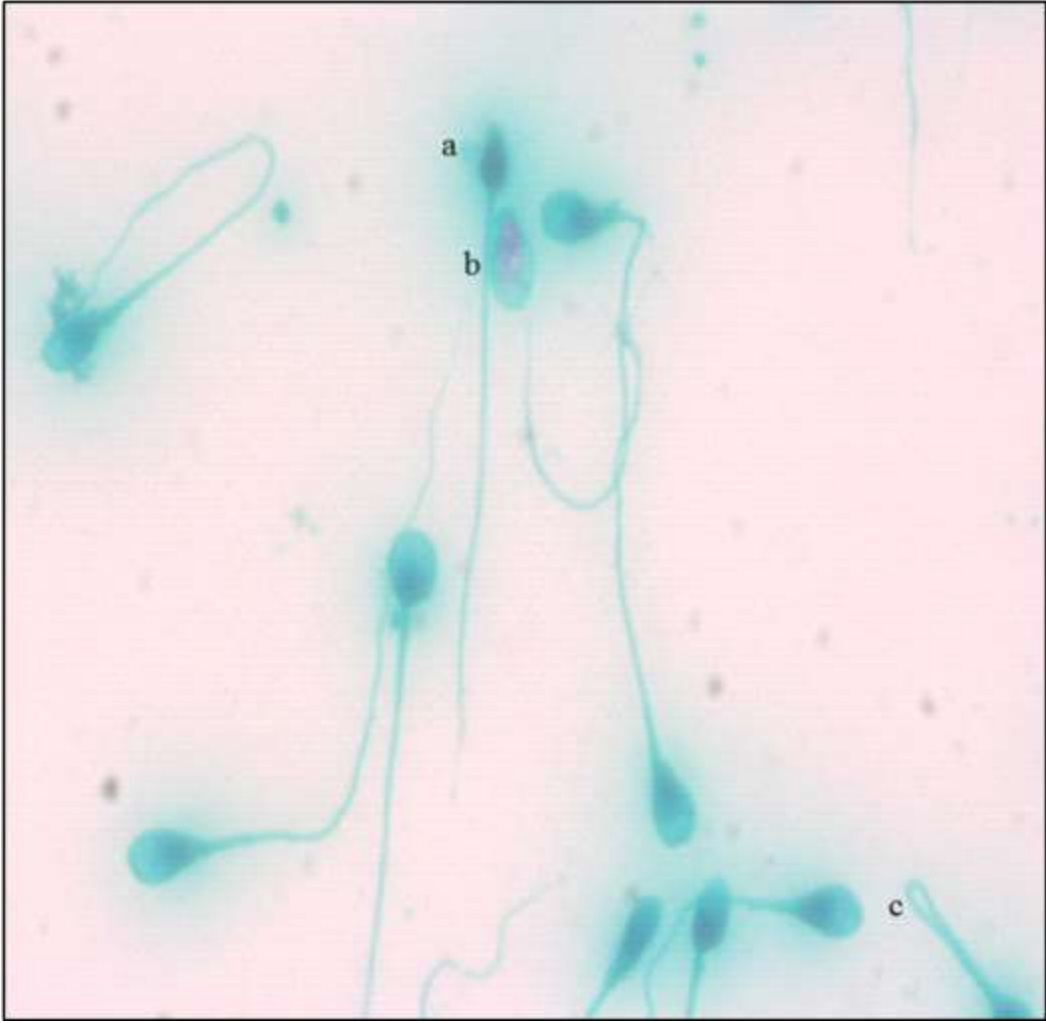
Bu çalışmaya infertilite merkezine başvurmuş olan Normospermi (sayı 20 milyon/ml ve üzeri, motilite %50 ve üzeri, n=20), Oligospermi (20 milyon/ml ve altı, motilite %50 ve üzeri, n=20) astenospermi (motilite %30 ve altı) hasta grupları dahil edilmiştir.

5.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

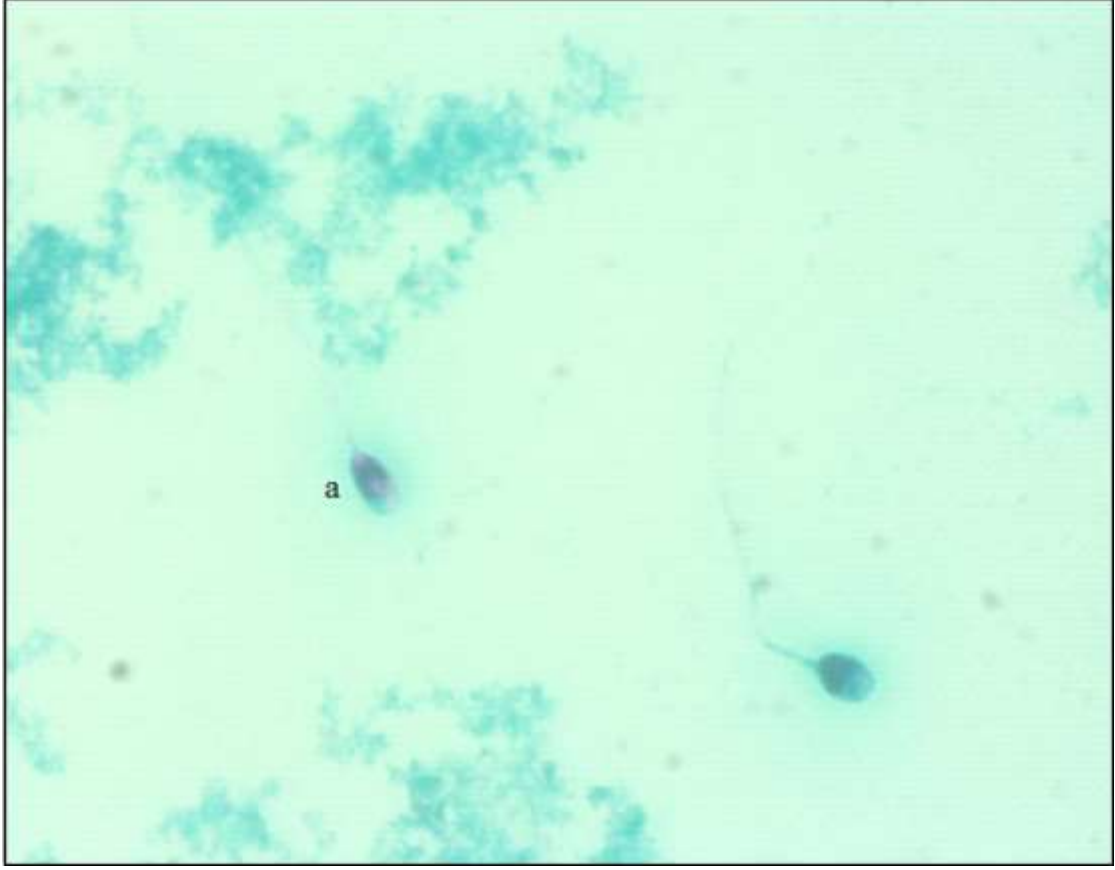
Semen örnekleri, 3-5 günlük cinsel perhizle Tüp Bebek Merkezi'ne gelen hastalardan, hastanın adının, soyadının yazılı olduğu steril kaplara, masturbasyon yöntemi ile alınmıştır. Sperm likefikasyonu sağlandıktan sonra mililitredeki sperm sayısını belirlemek üzere, Makler sayma kamarasına (Counting Chamber Makler, Sefi Medikal Instruments, İsrail) yaklaşık 500µl semen örneği konulmuştur. Toplam sperm sayısı ve progresif hareketli ve immotil sperm sayısı ile motilite değerlendirme yapılmıştır. (8X20 büyütme). Morfolojik değerlendirme için semen örneği lam üzerine yayılıp kurutularak Sperm Mac boya (internetten firma ve ülke bilgisini ver) ile boyanmıştır. Faz kontrast mikroskopta, X100 büyültmede Kruger kriterlerine göre morfolojik değerlendirme yapılmıştır.



Resim 1. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için sperm boyama yöntemlerinden SperMac boyama sonrası sperm morfoloji görüntülerinden (a) ile gösterilen spermde orta parça anomalisi, (b) ile gösterilen immatür sperm formu gözlemlenmiřtir.



Resim 2. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için sperm boyama yöntemlerinden SperMac boyama sonrası sperm morfoloji görüntülerinden (a) ile gösterilen total akrozom kaybı, (b) ile gösterilen amorf sperm anomali,(c) ile gösterilen kuyruk anomalisi gözlemlenmektedir.



Resim 3. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için sperm boyama yöntemlerinden SperMac boyama sonrası sperm morfoloji görüntülerinden (a) ile gösterilen akrozom içerik azalması aynı zamanda nükleus vakuolleri gözlemlenmektedir.



Resim 3: Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için sperm boyama yöntemlerinden SperMac boyama sonrası sperm morfoloji görüntülerinden (a) ile gösterilen normal sperm morfolojisine sahip sperm görüntüsü gözlemlenmiřtir.

5.3. PENTOKSİFİLİN VE PLATELET AKTİVE EDİCİ FAKTÖR

5.3.1. Pentoksifilin Uygulama Protokolü

Gradyent yıkama prosüdürü ile steril konik tabanlı 14 ml hacimli tüpe %90 konsantrasyonunda 1 ml Sperm Grad (Vitrolife Sweden) solüsyonu konuldu. zerine 1 ml

%40'lik konsantrasyondaki Sperm Grad solüsyonu tüp kenarından yavaşça sızdırılarak eklendi ve tabakalar oluşturuldu. Bu tabakaların üzerine en fazla 2 ml semen örneği yine aynı şekilde eklenerek 600 g'da 18 dk santrifüj edildi. Dipte kalan 0.5 ml pellet 3 ml Sperm Rinse (Vitrolife Sweden) sperm yıkama medyumunu ile santrifüj edildi. Yıkama sonrası alınan örnek üzerine bire bir 400 mg pentoksifilin ilave edilerek 37 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.

5.3.2 Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) uygulama Protokolü

Tüm sistem bileşenleri ve örnek oda sıcaklığına ya da 37 °C'ye getirilir. Steril santrifüj tüpüne silika density solüsyonu ile gradient hazırlanır. Üzerine 2 ml likefiye olmuş semen eklenerek 350-400 g'de 15-20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında gözle görülür pellet yok ise prosedüre 5 dk'lık ikinci santrifüj ile devam edilir. PAF'a 10 ml sperm wash eklenir ve kullanmadan önce 1 dk boyunca vortekslenir. Sperm wash medyumuna 3 ml PAF eklenir ve pellet tekrar süspansedilir. Final konsantrasyonun 10^{-4} M olması sağlanır. 37 °C'de 15 dk inkübe edilerek 300 g' de 8-10 dk santrifüj edilir. Süpernatant atılarak üzerine uygun medyum eklenir.

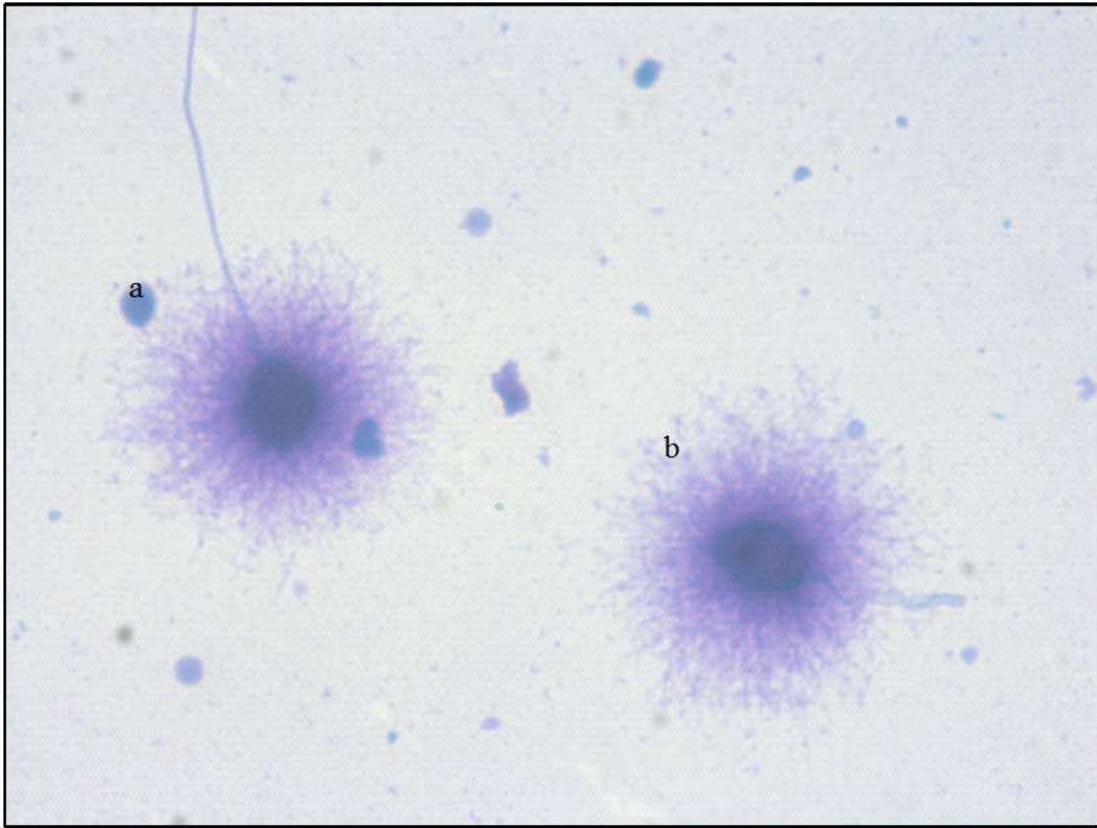
5.3.3 Sperm Kromatin Dağılımı (SCD) Sperm Dna Fragmentasyon Analizi

Çalışmamızda sperm kromatin dağılım testini gerçekleştirmek üzere Halosperm SCD test kiti (Halotech – İspanya) kullanıldı. Semen örneği konsantrasyonu 5-10 ml/ 10^{-4} olacak şekilde sperm yıkama solüsyonu ile sulandırıldı. Agaroz içeren eppendorf içinde mikrodalga fırında akışkan hale gelene kadar yaklaşık 3-4 dk çevrildi. Agarozdan 20 µl semenden 15 µl alınarak iyice karıştırılıp, 14 µl karışımdan lam üzerine koyularak üzerine lamel kapatıldı. Buzdolabında yaklaşık 5 dk bekledikten sonra lamel sıyrılarak yavaşça çıkartıldı. Lizis solüsyonunda oda sıcaklığında bekletildi. Asit denaturant solüsyonu hazırlandı (10 ml distile suyun içerisine 80 µl denaturant solüsyon eklendi). Asit denaturant solüsyon inkübasyon yapılacak kabın içine dökülüp, lam yatay bir pozisyonda denaturant solüsyonu içerisinde 7 dk bekletildi. 10 ml lizis solüsyonu farklı bir inkübasyon kabına döküldü. Lam yatay bir pozisyonda lizis solüsyonu içerisinde 25 dk bekletildi. Lizis solüsyonunu uzaklaştırmak için lam, yeterli miktarda distile su içeren inkübasyon kabında 5 dk bekletildi. Lam yatay olarak önce %70 etanol, %90 etanol ve daha sonra %100 etanol

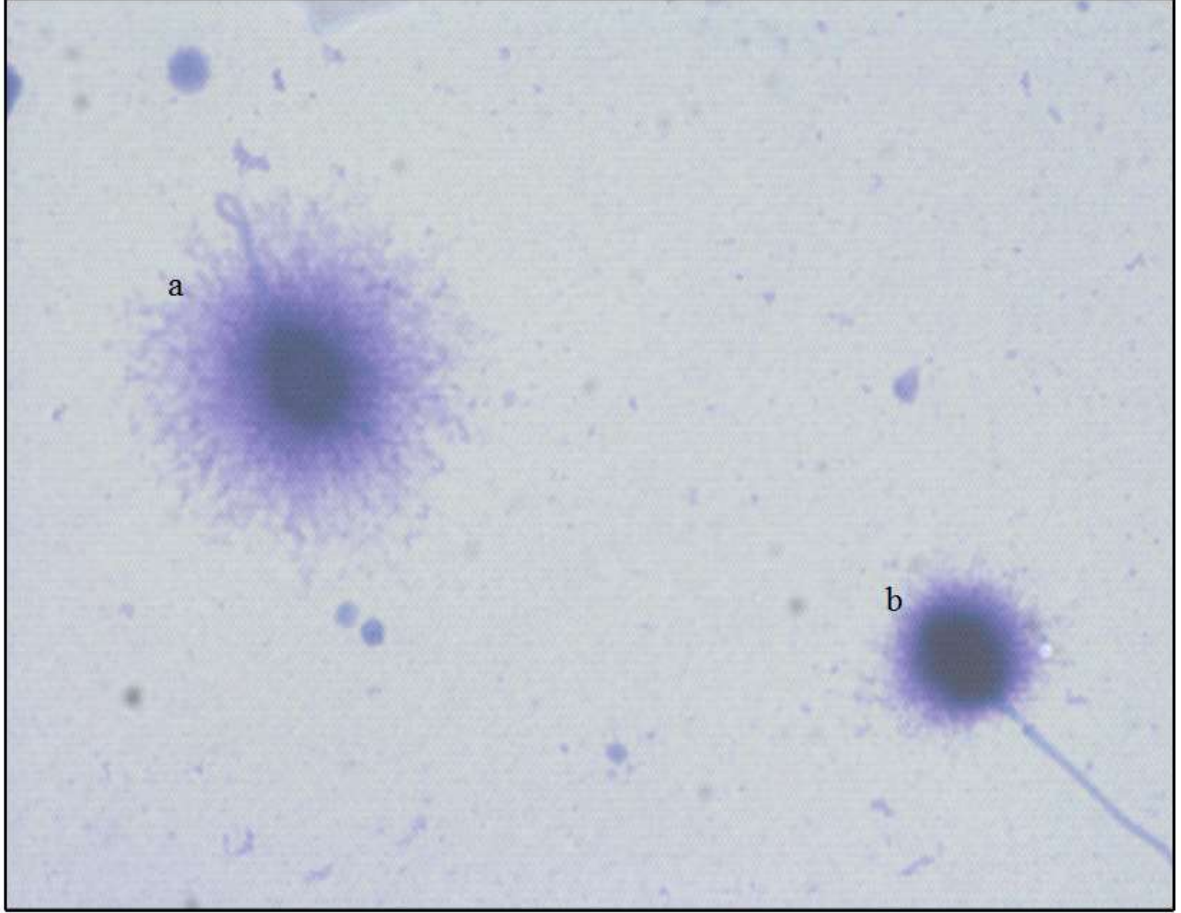
içeren kaplarda 2'şer dk tutulup oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Boyama için, yatay tutulan lamın üzerine Eosin solüsyonu (kırmızı) damlatıldı ve 6 dk bekletildi. Eosin solüsyonu lamın üzerinden dökülerek Azur B solüsyonu (mavi) damlatılıp ve 6 dk bekletildi. Lam oda sıcaklığında kurutuldu. DNA hasar değerlendirmeleri faz kontrast mikroskop altında preparatlara immersiyon yağı damlatılarak X100 büyültmede gerçekleştirildi.

Sperm başı etrafında yoğun ve büyük halo yapısı görülen hücreler hasarlı, bu halo yapısının daha küçük olduğu spermiler az hasarlı, hiç halo yapısı görülmeyen spermiler ise hasarsız olarak değerlendirildi. Her hasta örneğinde 500 adet sperm değerlendirmeye alınıp üç tip DNA hasar durumu gösteren sperm örnekleri ayrı ayrı oranlandı. Çalışma bulgularında az hasarlı sperm örnekleri de hasarsız grupla bir değerlendirildi.

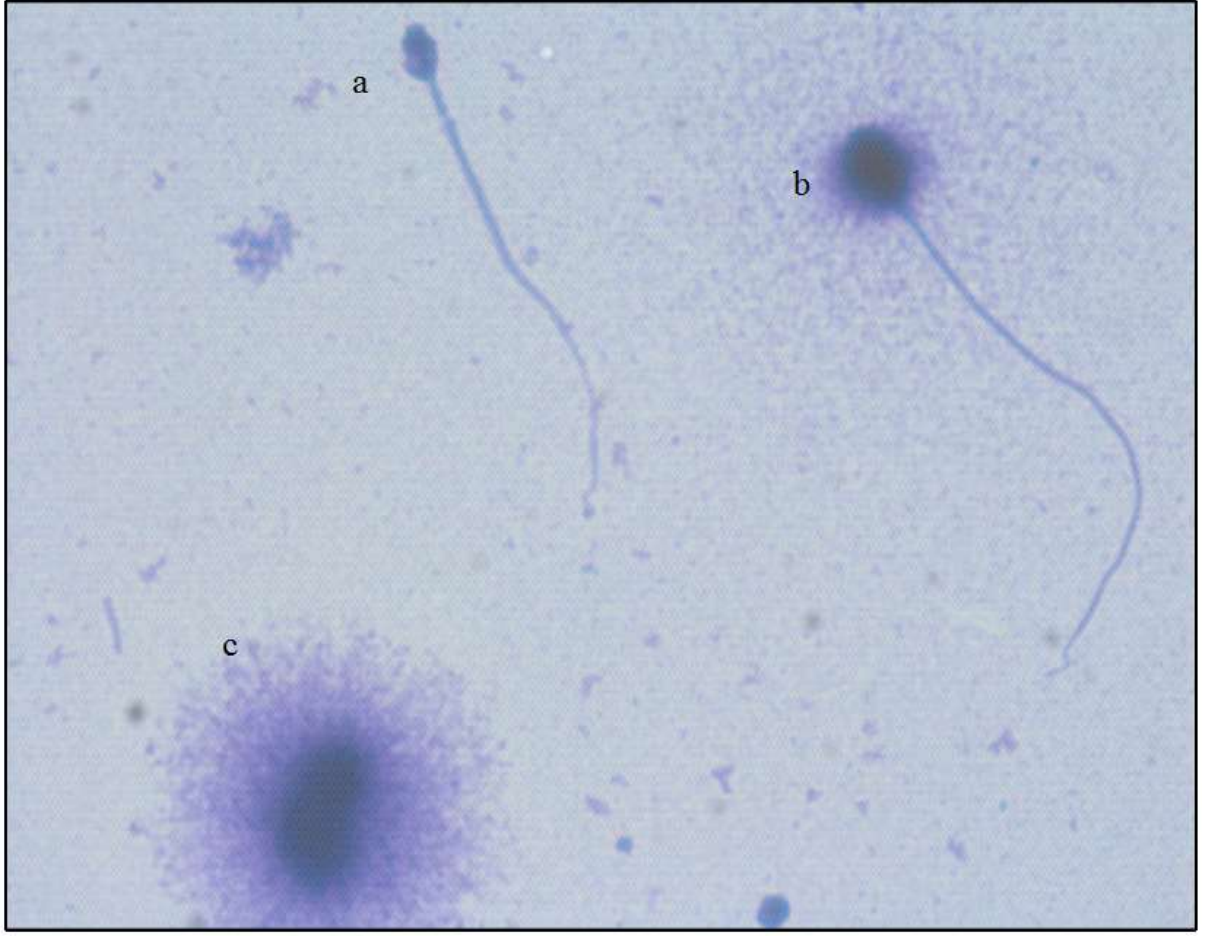
5.4. SPERM DNA FRAGMENTASYON HALOSPERM TEST GÖRÜNTÜLERİ



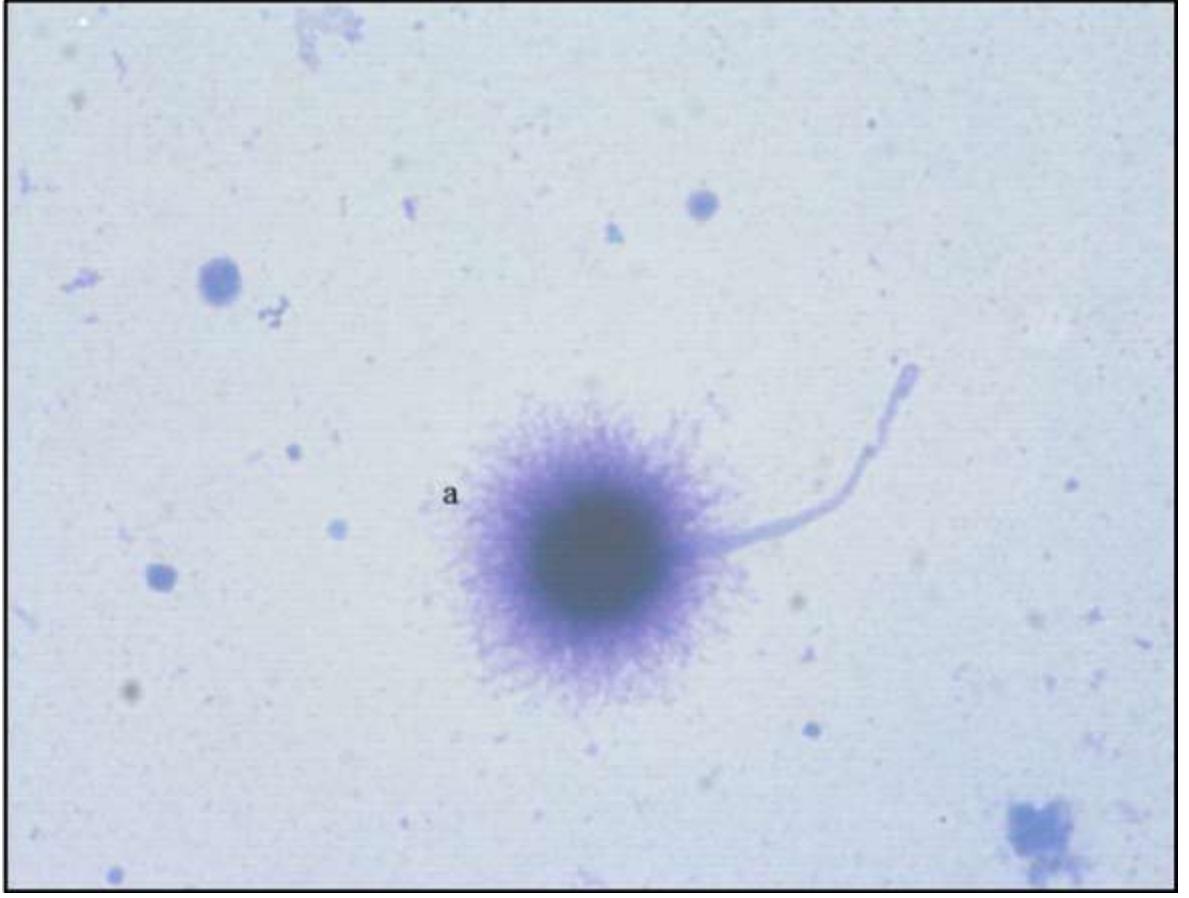
Resim 4. Sperm DNA fragmentasyon hasarı Halosperm testi görüntüsü.sperm nükleusu etrafında oluşan halonun genişliğine göre (a), (b) ile gösterilen normal DNA görüntüsü.



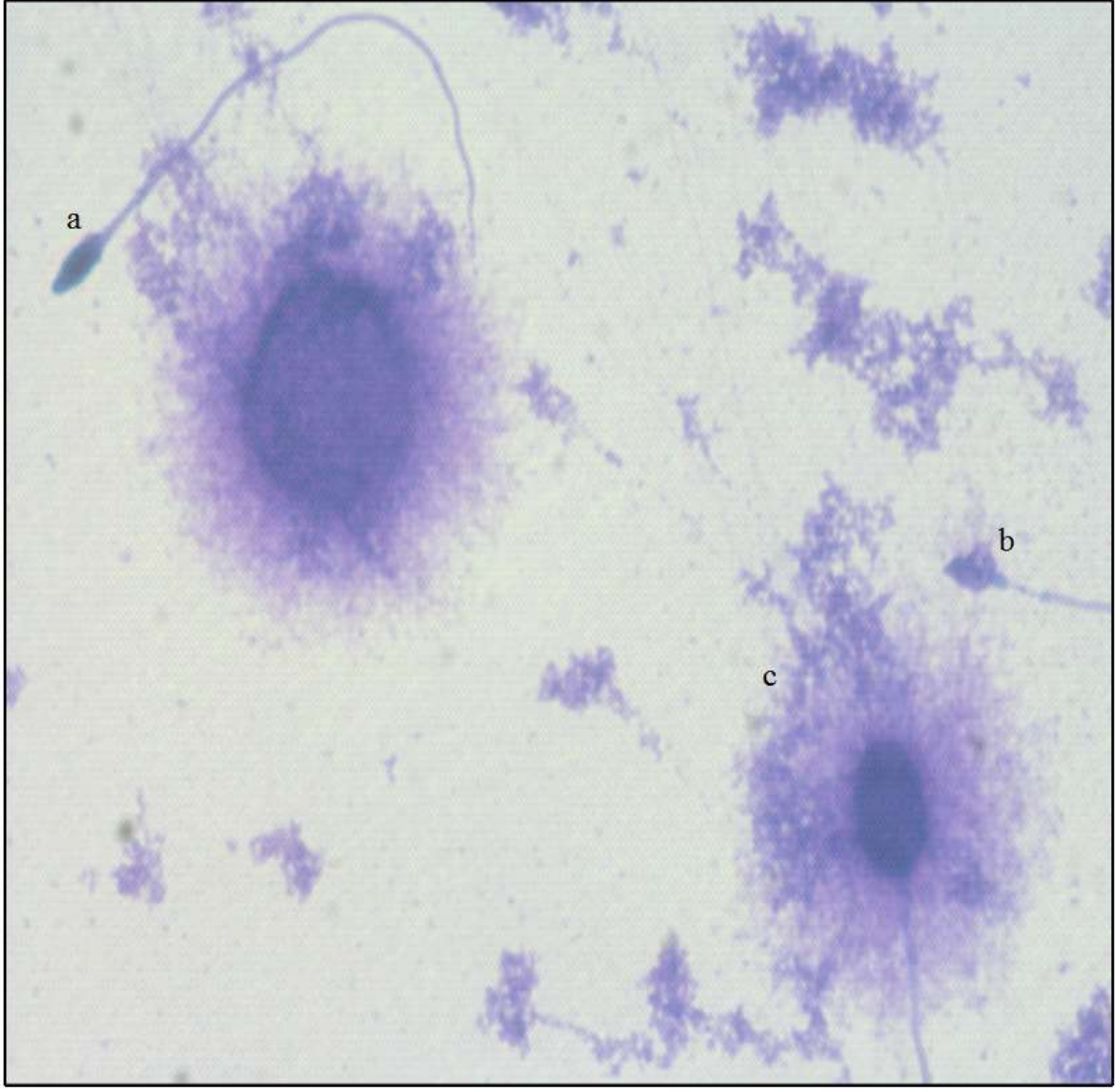
Resim 5. Sperm DNA fragmentasyon hasarı Halosperm tesiti görüntüsü.Sperm nükleusu etrafında oluşan halonun genişliğine göre (a) ile gösterilen normal DNA görüntüsü (b) ile gösterilen daha küçük halo normal DNA görüntüsü.



Resim 6. Sperm DNA fragmantasyon hasarı Halosperm testi görüntüsü..Sperm nükleusu etrafında oluşan halonun genişliğine göre (c) ile gösterilen normal DNA görüntüsü (b) ile gösterilen daha küçük halo genişliğine sahip normal DNA görüntüsü, (a) ile gösterilen bozulmuş anormal sperm DNA görüntüsü.



Resim 7. Sperm DNA fragmantasyon hasarı Halosperm testi görüntüsü. Sperm nükleusu etrafında oluşan halonun genişliğine göre (a) anormal fragmante DNA görüntüsü.



Resim 8. Sperm DNA fragmantasyon hasarı Halosperm testi görüntüsü..Sperm nükleusu etrafında oluşan halonun genişliğine göre (a) ile gösterilen anormal DNA, (b) ile gösterilen anormal DNA, (c) ile gösterilen normal DNA görüntüsü.

6. BULGULAR

Çalışmamızda 50 gönüllüden alınmış olan normospermi, oligospermi semen örneklerine Pentoksifilin ve Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) uygulandıktan sonra Sperm Kromatin Dağılım (SCD) testi ile değerlendirmeye alındı. Bununla birlikte farklı gruplara ait seminal plazmadaki Pentoksifilin / SCD ve Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) / SCD oranları hesaplandı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Bu bölümde, araştırma probleminin çözümü için, araştırmaya alınan 50 hastadan toplanan verilerin analizi sonucunda elde edilen bulgular yer almaktadır. Elde edilen bulgulara dayalı olarak açıklama ve yorumlar yapılmıştır.

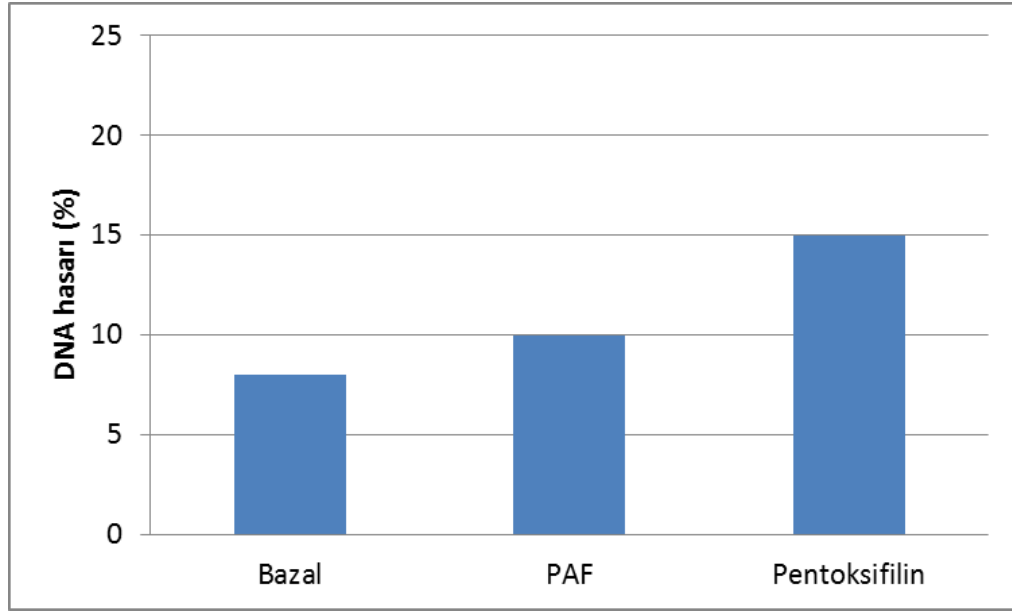
6.1.SPERM SAYISI, SPERM MOTİLİTESİ, SPERM MORFOLOJİSİNİN İSTATİSTİKSEL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Tablo 1. Olguların klinik özelliklerinin değerlendirilmesi

Değişkenler	n=50
Sperm sayısı (milyon), [medyan(min-mak)]	52 (0,3-200)
Sperm sayısı (milyon),[n (%)]	
Aşırı oligosperm	3 (6,0)
Oligosperm	11 (22,0)
Normosperm	36 (72,0)
Sperm motilitesi (%), [medyan(min-mak)]	58,5 (0-85)
Sperm motilitesi (%), [n (%)]	
Anormal	17 (34,0)
Normal	33 (66,0)
Sperm morfolojisi (%), [medyan(min-mak)]	2 (0-8)
Sperm morfolojisi (%), [n (%)]	
Bozuk	40 (80,0)
Normal	10 (20,0)

min: minimum, **mak:** maksimum, **n:** olgu sayısı

6.1.1. Bazal, PAF, Pentoksifilin Grupları Arasında İstatistiksel Analiz Yapılmış DNA Hasarının İstatistiksel Olarak Analizi



Grafik 1. Bazal, PAF, Pentoksifilin grupları arasında istatistiksel analiz yapılmış DNA hasar grafiği

Tüm olgular içerisinde izlem zamanları arasında medyan SCD oranları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0,001$). Bazala göre sırasıyla; PAF ve Pentoksifilin uygulandığında DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı ($p<0,001$). Ayrıca, PAF'a göre Pentoksifilin uygulandığında da DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı ($p<0,001$) (bkz grafik 1).

Tablo.2. Bazal, PAF, Pentoksifilin SCD Oranlarının Karşılaştırılması

İzlem zamanları	SCD oranı
Bazal	8 (3-35) ^{a,b}
PAF	10 (2-47) ^{a,c}
Pentoksifilin	15 (2-49) ^{b,c}
p-değeri†	<0,001

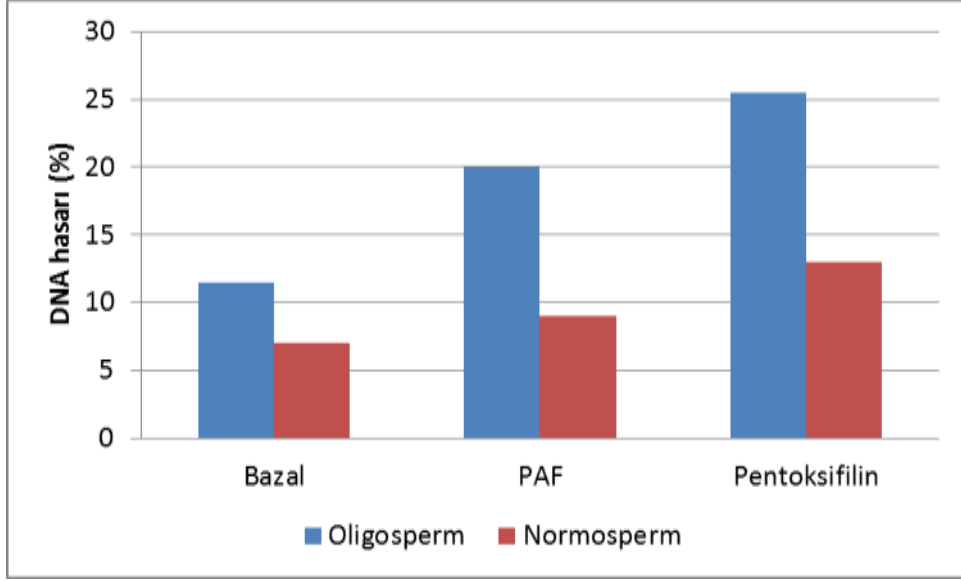
Veriler, medyan (minimum-maksimum) biçiminde gösterildi, † Friedman testi, a: Bazal ile PAF arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), b: Bazal ile Pentoksifilin arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), c: PAF ile Pentoksifilin arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) (Tablo 2).

Tablo 3. Sperm Sayısı, Sperm Motilitesi, Sperm Morfolojisi SCD Oranları Arasındaki Korelasyon Katsayıları ve Önemlilik Düzeyleri

	Bazal	PAF	Pentoksifilin
Sperm sayısı			
Korelasyon katsayısı	-0,305	-0,328	-0,399
p-değeri†	0,035	0,023	0,005
Sperm motilitesi			
Korelasyon katsayısı	-0,466	-0,495	-0,433
p-değeri†	<0,001	<0,001	0,002
Sperm morfolojisi			
Korelasyon katsayısı	-0,178	-0,261	-0,471
p-değeri†	0,227	0,073	<0,001

Spearman'ın korelasyon testi, Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

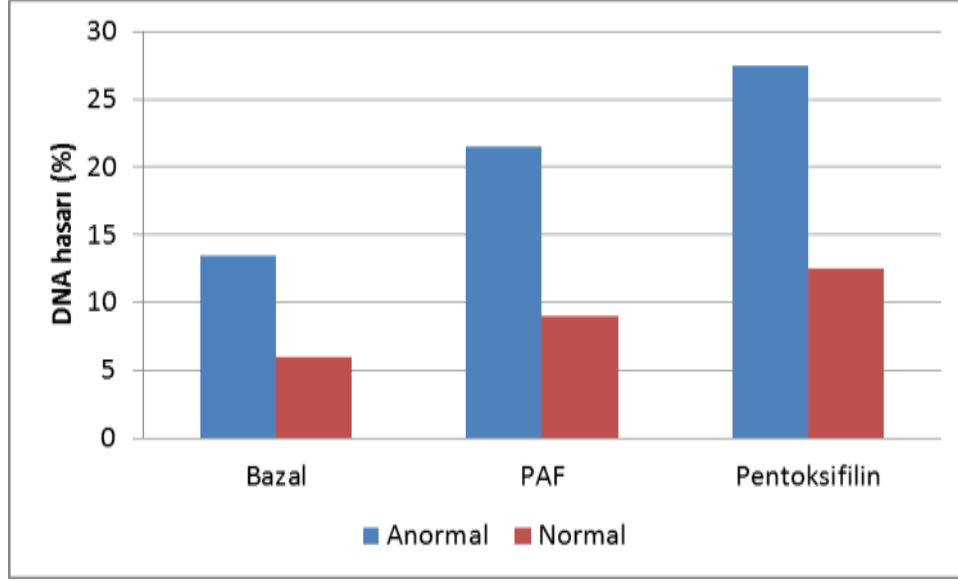
6.1.2. Oligosperm, Normosperm Grupları Arasında DNA Hasar Oranı



Grafik 2. Oligosperm, normosperm grupları arasında istatistiksel analiz yapılmış DNA hasar grafiği

Oligospermi grubu içerisinde izlem zamanları arasında medyan SCD oranları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0,001$). Normospermi grubu içerisinde izlem zamanları arasında medyan SCD oranları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0,001$). Gruplar arasında bazaldeki DNA hasarı ise Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak benzerdi. ($p = 0,031$) (bkz grafik 2).

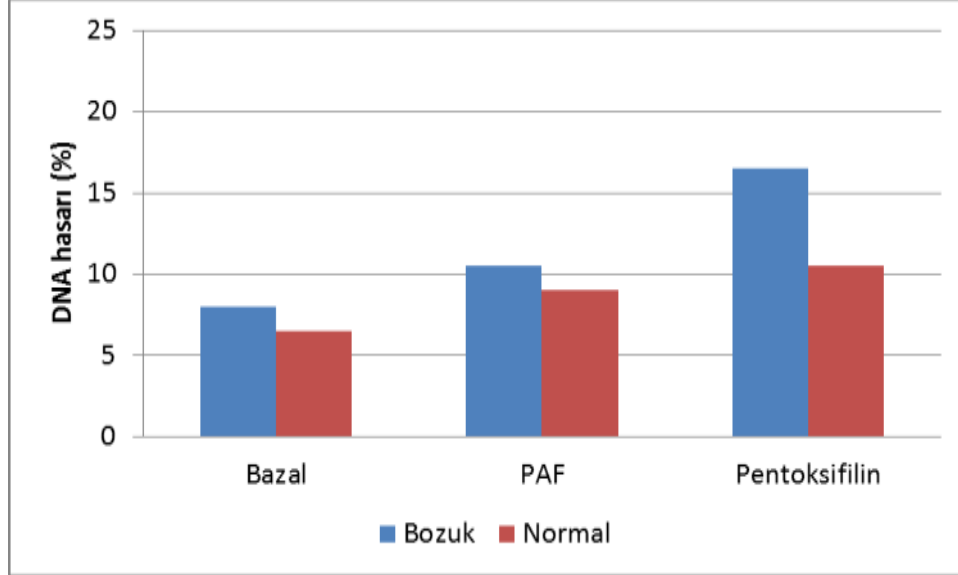
6.1.3. Bazal, PAF, Pentoksifilin Grupları Arasındaki DNA Hasar Oranı



Grafik 3. Bazal, PAF, Pentoksifilin grupları arasında istatistiksel analiz yapılmış DNA hasar grafiği

Sperm motilitesi anormal olan grup içerisinde izlem zamanları arasında medyan SCD oranları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0,001$). Bazale göre sırasıyla; PAF ve Pentoksifilin uygulandığında DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı ($p < 0,001$). Ayrıca, PAF'a göre Pentoksifilin uygulandığında da DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı ($p = 0,003$). Sperm motilitesi normal olan grup içerisinde izlem zamanları arasında medyan SCD oranları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0,001$). Bazale göre sırasıyla; PAF ve Pentoksifilin uygulandığında DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı ($p < 0,001$). Ayrıca, PAF'a göre Pentoksifilin uygulandığında da DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı ($p < 0,001$). Sperm motilitesi normal olan gruba göre anormal olan grubun bazal, PAF ve pentoksifilin uygulandıktan sonraki DNA hasarları istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0,001$) (bkz grafik 4).

6.3.4. Bazal, PAF, Pentoksifilin Grupları Arasındaki İstatistiksel Analiz Yapılmış DNA Hasar Grafiğinin Karşılaştırılması: Morfolojik Etki



Grafik 4. Bazal, PAF, Pentoksifilin grupları arasında istatistiksel analiz yapılmış DNA hasar grafiğinin morfolojik olarak bozuk ve normal grup karşılaştırılması

Sperm morfolojisi bozuk olan grup içerisinde izlem zamanları arasında medyan SCD oranları yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p < 0,001$). Bazale göre sırasıyla; PAF ve Pentoksifilin uygulandığında DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı ($p < 0,001$). Ayrıca, PAF'a göre Pentoksifilin uygulandığında da DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı ($p < 0,001$). Sperm morfolojisi normal olan grup içerisinde ise izlem zamanları arasında medyan SCD oranları yönünden Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p = 0,032$). Sperm morfolojisi normal olan gruba göre bozuk olan grubun pentoksifilin uygulandıktan sonraki DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ($p = 0,010$). Gruplar arasında bazal ve PAF uygulandıktan sonraki DNA hasarları istatistiksel olarak benzer bulundu ($p = 0,077$ ve $p = 0,132$) (bkz grafik 4).

Tablo 4. PAF Ve Pentoksifilin Uygulandıktan Sonraki DNA Hasarının Sperm Sayısı, Sperm Motilitesi, Sperm Morfolojisine Göre Karşılaştırılması

	Bazal	PAF	Pentoksifilin	p-değeri†
Sperm sayısı				
Oligosperm	11,5 (3-35) ^{a,b}	20 (9-47) ^{a,c}	25,5 (11-49) ^{b,c}	<0,001
Normosperm	7 (3-34) ^{a,b}	9 (2-39) ^{a,c}	13 (2-42) ^{b,c}	<0,001
p-değeri‡	0,031	<0,001	<0,001	
Sperm motilitesi				
Anormal	13,5 (5-35) ^{a,b}	21,5 (9-47) ^{a,c}	27,5 (9-49) ^{b,c}	<0,001
Normal	6 (3-19) ^{a,b}	9 (2-22) ^{a,c}	12,5 (2-40) ^{b,c}	<0,001
p-değeri‡	<0,001	<0,001	<0,001	
Sperm morfolojisi				
Bozuk	8 (3-35) ^{a,b}	10,5 (2-47) ^{a,c}	16,5 (2-49) ^{b,c}	<0,001
Normal	6,5 (3-12)	9 (6-19)	10,5 (5-24)	0,032
p-değeri‡	0,077	0,132	0,010	

Veriler, medyan (minimum-maksimum) biçiminde gösterildi, gruplar içerisinde Bazal, PAF ve Pentoksifilin arasında yapılan karşılaştırmalar, Friedman testi, Bonferroni Düzeltmesine göre $p < 0,025$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 4).

Bazal, PAF ve Pentoksifilin uygulandıktan sonraki DNA Hasarının klinik gruplar arasında karşılaştırılmasında Mann Whitney U Testi, Bonferroni düzeltmesine göre $p < 0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bazal ile PAF arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$), Bazal ile Pentoksifilin arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$), PAF ile Pentoksifilin arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,0083$) kabul edilmiştir. Tek değişkenli doğrusal regresyon analizine göre bazaldeki DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede sperm sayısı ve morfolojisinin istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliği yokken ($p=0,085$ ve $p=0,172$), sperm motilitesi arttıkça DNA hasar oranı istatistiksel anlamlı olarak azalmaktaydı ($B=-0,0166$; %95 Güven Aralığı: $-0,0238 - -0,0095$ ve $p < 0,001$). Tek değişkenli doğrusal regresyon analizine göre PAF sonrası DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede sperm sayısı ve morfolojisinin istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliği yokken ($p=0,059$ ve $p=0,076$), sperm

motilitesi arttıkça DNA hasar oranı istatistiksel anlamlı olarak azalmaktaydı (B=-0,0173; %95 Güven Aralığı: -0,0243 – -0,0103 ve p<0,001).

Tek değişkenli doğrusal regresyon analizine göre Pentoksifilin sonrası DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede sperm sayısının Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliği yokken (p=0,028) sperm motilitesi arttıkça DNA hasar oranı istatistiksel anlamlı olarak azalmakta (B=-0,0164; %95 Güven Aralığı: -0,0238 – -0,0090 ve p<0,001), sperm morfolojisi arttıkça DNA hasar oranı istatistiksel anlamlı olarak azalmaktaydı (B=-0,1258; %95 Güven Aralığı: -0,2109 – -0,0408 ve p=0,005).

Tablo 5. Bazal, PAF Ve Pentoksifilin Uygulandıktan Sonra DNA Hasarındaki Değişimi Tahmin Etmede Tek Değişkenli Regresyon Analizine Göre Klinik Parametrelerin Etkisi

Değişkenler	Regresyon Katsayısı	%95 Güven Aralığı		p-değeri†
		Alt sınır	Üst sınır	
BAZAL				
Sperm Sayısı (Milyon)	-0,0034	-0,0073	0,0005	0,085
Sperm Motilitesi%	-0,0166	-0,0238	-0,0095	<0,001
Sperm Morfolojisi%	-0,0615	-0,1506	0,0276	0,172
PAF				
Sperm Sayısı (Milyon)	-0,0038	-0,0077	0,0001	0,059
Sperm Motilitesi%	-0,0173	-0,0243	-0,0103	<0,001
Sperm Morfolojisi%	-0,0794	-0,1677	0,0088	0,076
PENTOKSİFİLİN				
Sperm Sayısı (Milyon)	-0,0044	-0,0083	-0,0005	0,028
Sperm Motilitesi%	-0,0164	-0,0238	-0,0090	<0,001
Sperm Morfolojisi%	-0,1258	-0,2109	-0,0408	0,005

Bonferroni Düzeltmesine göre p<0,017 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 5).

Çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizine göre sperm sayısı ve morfolojisinden bağımsız olarak sperm motilitesinin bazaldeki DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede istatistiksel olarak anlamlı bir indikatör olduğu görülmüştür (B=-0,0176; %95 Güven Aralığı: -0,0263 – -0,0088 ve p<0,001). Sperm motilitesi arttıkça DNA hasar oranı istatistiksel anlamlı olarak azalmaktaydı. Çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizine göre sperm sayısı ve morfolojisinden bağımsız olarak sperm motilitesinin PAF uygulandıktan sonra DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede istatistiksel olarak anlamlı bir indikatör olduğu görülmüştür (B=-0,0175; %95 Güven Aralığı: -0,0261 – -0,0088 ve p<0,001). Sperm motilitesi arttıkça DNA hasar oranı istatistiksel anlamlı olarak azalmaktaydı. Çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizine göre sperm sayısı ve morfolojisinden bağımsız olarak sperm motilitesinin Pentoksiflin uygulandıktan sonra DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede istatistiksel olarak anlamlı bir indikatör olduğu görülmüştür (B=-0,0137; %95 Güven Aralığı: -0,0226 – -0,0048 ve p<0,001). Sperm motilitesi arttıkça DNA hasar oranı istatistiksel anlamlı olarak azalmaktaydı.

Tablo 6. Bazal, PAF ve Pentoksiflin Uygulandıktan Sonra DNA hasarındaki Değişimi Tahmin Etmede Çoklu Değişkenli Doğrusal Regresyon Analizine Göre Klinik Parametrelerin Etkisi

Değişkenler	Regresyon Katsayısı	%95 Güven Aralığı		p-değeri†
		Alt sınır	Üst sınır	
BAZAL				
Sperm Sayısı (Milyon)	0,0004	-0,0036	0,0044	0,836
Sperm Motilitesi%	-0,0176	-0,0263	-0,0088	<0,001
Sperm Morfolojisi%	0,0124	-0,0743	0,0990	0,775
PAF				
Sperm Sayısı (Milyon)	0,0004	-0,0036	0,0043	0,854
Sperm Motilitesi%	-0,0175	-0,0261	-0,0088	<0,001
Sperm Morfolojisi%	-0,0056	-0,0911	0,0799	0,895
PENTOKSİFİLİN				
Sperm Sayısı (Milyon)	-0,0001	-0,0042	0,0039	0,946
Sperm Motilitesi%	-0,0137	-0,0226	-0,0048	0,003
Sperm Morfolojisi%	-0,0643	-0,1520	0,0234	0,147

Bonferroni Düzeltmesine göre $p < 0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 6).

Tek değişkenli doğrusal regresyon analizine göre bazaldeki DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede sperm morfolojisinin istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliği yokken ($p=0,053$), normosperme göre oligospermde DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmakta ($B=0,2479$; %95 Güven Aralığı: $0,0477 - 0,4481$ ve $p=0,016$), motilitesi normal olan gruba göre anormal motilite de DNA hasarını istatistiksel anlamlı olarak artırmaktaydı ($B=0,8161$; %95 Güven Aralığı: $0,4837 - 1,1485$ ve $p < 0,001$).

Tek değişkenli doğrusal regresyon analizine göre PAF sonrası DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede sperm morfolojisinin istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliği yokken ($p=0,145$), normosperme göre oligospermde DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmakta ($B=0,3675$; %95 Güven Aralığı: $0,1832 - 0,5518$ ve $p < 0,001$), motilitesi normal olan gruba göre anormal motilite de DNA hasarını istatistiksel anlamlı olarak artırmaktaydı ($B=0,8421$; %95 Güven Aralığı: $0,5135 - 1,1708$ ve $p < 0,001$).

Tek değişkenli doğrusal regresyon analizine göre pentoksifilin sonrası DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede sperm morfolojisinin Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir belirleyiciliği yokken ($p=0,026$), normosperme göre oligospermde DNA hasarı istatistiksel anlamlı olarak artmakta ($B=0,3430$; %95 Güven Aralığı: $0,1504 - 0,5356$ ve $p < 0,001$), motilitesi normal olan gruba göre anormal motilite de DNA hasarını istatistiksel anlamlı olarak artırmaktaydı ($B=0,7201$; %95 Güven Aralığı: $0,3585 - 1,0818$ ve $p < 0,001$).

Tablo 7. Bazal, PAF ve Pentoksifilin Uygulandıktan Sonra DNA Hasarındaki Değişimi Tahmin Etmede Tek Değişkenli, Doğrusal Regresyon Analizine Göre Klinik Parametrelerin Etkisi

Değişkenler	Regresyon Katsayısı	%95 Güven Aralığı		p-değeri†
		Alt sınır	Üst sınır	
BAZAL				
Oligosperm	0,2479	0,0477	0,4481	0,016
Anormal motilite	0,8161	0,4837	1,1485	<0,001
Bozuk morfoloji	0,4521	-0,0061	0,9103	0,053
PAF				
Oligosperm	0,3675	0,1832	0,5518	<0,001
Anormal motilite	0,8421	0,5135	1,1708	<0,001
Bozuk morfoloji	0,3449	-0,1233	0,8131	0,145
PENTOKSİFİLİN				
Oligosperm	0,3430	0,1504	0,5356	<0,001
Anormal motilite	0,7201	0,3585	1,0818	<0,001
Bozuk morfoloji	0,5281	0,0663	0,9898	0,026

Bonferroni Düzeltmesine göre $p < 0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 7).

Çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizine göre sperm sayısı ve morfolojisinden bağımsız olarak sperm motilitesinin bozuk olmasının bazaldeki DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede istatistiksel olarak anlamlı bir indikatör olduğu görülmüştür ($B=0,8229$; %95 Güven Aralığı: 0,3972 - 1,2487 ve $p < 0,001$). Sperm motilitesi bozursa DNA hasar oranı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı.

Çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizine göre sperm sayısı ve morfolojisinden bağımsız olarak sperm motilitesinin bozuk olmasının PAF uygulandıktan sonra DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede istatistiksel olarak anlamlı bir indikatör olduğu görülmüştür ($B=0,6507$; %95 Güven Aralığı: 0,2331 - 1,0683 ve $p < 0,001$). Sperm motilitesi bozursa DNA hasar oranı istatistiksel anlamlı olarak artmaktaydı.

Çoklu değişkenli doğrusal regresyon analizine göre oligosperm, anormal sperm motilitesi ve sperm morfolojisinin bozuk olmasının birlikte etkileri incelendiğinde Pentoksifilin uygulandıktan sonra DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak hiçbirinin anlamlı etkisi görülmemiştir ($p>0,017$).

Tablo 8. Bazal, PAF ve Pentoksifilin Uygulandıktan Sonra DNA Hasarındaki Değişimi Tahmin Etmede Çoklu Değişkenli Doğrusal Regresyon Analizine Göre Klinik Parametrelerin Birlikte Etkisinin İncelenmesi

Değişkenler	Regresyon Katsayısı	%95 Güven Aralığı		p-değeri†
		Alt sınır	Üst sınır	
BAZAL				
Oligosperm	-0,0513	-0,2774	0,1749	0,650
Anormal motilite	0,8229	0,3972	1,2487	<0,001
Bozuk morfoloji	0,2474	-0,1650	0,6597	0,233
PAF				
Oligosperm	0,1539	-0,0679	0,3757	0,169
Anormal motilite	0,6507	0,2331	1,0683	0,003
Bozuk morfoloji	0,0397	-0,3647	0,4442	0,844
PENTOKSİFİLİN				
Oligosperm	0,1477	-0,0915	0,3870	0,220
Anormal motilite	0,4842	0,0337	0,9346	0,036
Bozuk morfoloji	0,2765	-0,1598	0,7128	0,208

Bonferroni Düzeltmesine göre $p<0,017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 8).

7. TARTIŞMA

Üreme yaşındaki çiftlerin % 10'u ile % 15'i başarılı bir gebelik sağlayamamakta ve infertil olarak nitelendirilmektedir (33). İnfertilite (kısırlık) vakaları % 30-50 oranında erkeğe bağlı nedenlerden kaynaklanmaktadır. Yardımla üreme tekniklerinin hızla gelişmesi ve bilimsel araştırmaların verdiği bilgiler ışığında günümüzde erkek infertilitesi büyük oranda tedavi edilmektedir. Sperm motilitesi özellikle ICSI uygulanırken, spermin canlı olması önemli bir göstergedir. Tüm ICSI prosedürlerinde amaç canlı spermin seçilmesidir. Pentoksifilin, insan foliküler sıvı, ksantin, kafein, ve platelet aktivasyon faktörü (PAF) dahil olmak üzere sperm hareketliliğini geliştiren bir çok madde incelenmiştir. Bizim çalışmamızda Pentoksifilin ve Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) uygulama sonrası sperm kromatin dağılımı metodu ile DNA hasarının incelenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda elde ettiğimiz sonuçlardan dikkat çekici olanı sperm motilitesinin DNA hasarı ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki içinde olduğudur. Sperm motilitesinin bozuk olmasının bazaldeki DNA hasarındaki değişimi tahmin etmede istatistiksel olarak anlamlı bir indikatör olduğu görülmüştür. Elde ettiğimiz verilerde Pentoksifilin ve PAF uygulanmış grupların bazal DNA hasar oranlarına göre daha yüksek bir DNA hasarına yol açtığı ortaya koyulmuştur. Ayrıca pentoksifilinin neden olduğu DNA hasar artışının PAF uygulananlara göre daha yüksek olduğu da belirlenmiştir. Sperm motilitesini arttıran pentoksifilin ve PAF gibi ajanlarla yapılmış pek çok çalışma literatürde yer almaktadır (34,35). Pentoksifilinin inkübasyon mediumundan uzaklaştırılmadığı durumlarda embriyo gelişimi ve blastosist formasyonunda herhangi bir farklılık gözlenmemekle birlikte, inseminasyon mediumundaki pentoksifilinin oositleri etkileyerek fertilizasyon oranını düşürdüğü saptanmıştır (36). Pentoksifilin'in embriyo üzerine toksik etkileri gösterilmiş olmasına rağmen, Pentoksifilin uygulaması sonrası sperm yıkama ile bu etkileri uzaklaştırılmaktadır (37). Başka bir çalışmada kısa süreli Pentoksifilin uygulaması sonrası sperm yıkaması yapılırsa ICSI sonrası klivaj oranları, gebelik oranı (PR) ve implantasyon oranı (IR) sırası ile %95.4, %30.6 ve %12,3 olarak belirtilmiştir. Bu nedenle astenozoospermili olgularda sperm motiltesinin artırılması amacıyla Pentoksifilin uygulaması uzun zamandır kullanılmaktadır (38). Başka bir çalışmada sperm motilitesinin düşük olduğu olgularda pentoksifilin etkisinin doğrudan gözlemlendiği ve etkileşimin pentoksifilin ile inkübasyon

süresine bağlı olduğu belirtilmektedir (39,40). Yardımla üremede pentoksifilin tedavisinin sonuçları yine de değişkenlik göstermektedir. Koşullara bağlı olarak spermatozoanın kapasitasyonuna bağlı olarak, aşırı stimülasyona neden olarak prematür akrozom reaksiyonuna yol açtığı da bildirilmiştir (41)

Platelet Aktive Eden Faktör de benzer mekanizma ile etki göstermekte olup, Pentoksifilin'e üstünlüğü daha az sperm DNA hasarına yol açmasıdır. Yapılan çalışmalar, testiküler sperm kullanımında elde edilen sonuçların daha iyi olduğunu ortaya koymaktadır. Testisten elde edilen spermlerin erken dönemde immotil oldukları bilinmektedir. Bu nedenle testiküler spermlerin öncelikle canlılıklarının değerlendirilmesi, sonrasında da motilite kazanmaları için Pentoksifilin veya Platelet Aktive Eden Faktör ile inkübe edilmesi önerilmektedir. Motil ve immotil spermlerle yapılan ICSI uygulamalarında implantasyon ve gebelik oranları farklı olmasa da fertilizasyon oranı motil testiküler spermler ile yapılan uygulamalarda daha yüksektir (42,43). İmmotil spermlerle yapılan ICSI uygulamalarında fertilizasyon ve gebelik oranları sırası ile %3-76,4 ve %0-38,3 arasında değişmektedir (44,45). Testiküler spermler ile yapılan uygulamada ise bu oranlar sırası ile %66 ve %38,3 olarak bildirilmiştir. Buradan sonuç olarak, sperm motilitesinin fertilizasyon ve gebelik sonuçlarına olan etkisi göz ardı edilemez. Sperm motilitesindeki artış ile birlikte akrozom reaksiyonunda da artış olduğunu belirten çalışmalar ve aksini söyleyen çalışmalar da vardır (46,47). Pentoksifilin'in sperm ve embriyoya etkilerini görmek için yapılan hayvan deneyleri sonucunda zararlı olduğu gösterilmiş ve embriyonik gelişime, sperm'in 3mM pentoksifilin ile kısa inkübasyonunda negatif etkisinin olmadığı belirtilmiştir (48,49,50,51). Başka bir çalışmada hafif erkek faktör infertilite vakalarında sperm hazırlanırken ekzojen PAF verilmesinin IUI'nın klinik hamilelik oranına etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada hafif erkek faktör infertilite nedeniyle IUI planlanan 92 çift çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalar her biri 46 çiftten oluşan iki gruba ayrılmış. Bir gruba ekzojen PAF ile hazırlanan spermle, diğer gruba ekzojen PAF'sız spermle en fazla 4 siklus IUI uygulanmış. Sonuçlar klinik hamilelik oranı açısından karşılaştırılmış. Her iki grup arasında kişisel medikal parametreler ve semen parametreleri arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Dört siklus IUI sonrası genel klinik hamilelik oranı ekzojen PAF verilerek sperm hazırlanan gruba, PAF'sız sperm hazırlanan grupta benzer olarak bulunmuştur (sırasıyla %12.24 ve %11.11). Aynı hasta grubunda sperm hazırlanma aşamasına PAF eklenmesi veya PAF kullanılanlarda PAF'ın çıkarılması sonuçlarda bir değişiklik

yaratmamıştır. Hafif erkek faktör infertilite nedeniyle IUI uygulanan hastalarda spermin eksojen PAF verilerek hazırlanmasının klinik hamilelik oranını arttırıcı bir etkisi yoktur. Ancak bu daha spesifik ve iyi tanımlanmış subfertil erkek hasta gruplarında ekzojen PAF tedavisinin yeri yoktur anlamına gelmemektedir (52).

Sperm hazırlanırken uygulanan kimyasalların sonuçları iyileştirebileceği konusu da ileri araştırma gerektiren bir konu olarak kalmıştır. Tüm bu çalışmalar ve bizim çalışmalarımızın sonucunda Pentoksifilin ve PAF'ın sperm motilitesini arttırdığı ancak DNA hasarı yarattığı ve yine de kullanılması gerektiği durumlarda ise PAF'ın Pentoksifiline tercih edilmesi gerektiği sonucuna vardık ve bu ajanların kullanılırken özellikle inkübasyon süresine, optimum sürede işlemin gerçekleştirilmesine dikkat edilmesi gerektiğini savunmaktayız. Aynı zamanda spermin yıkanması sırasında ortamdan uzaklaştırılması ya da ayrı havuz oluşturulup hareket gözlemlendiği anda ortamdan bu tür ilaçların uzaklaştırılması gerektiğini düşünmekteyiz. Pentoksifilin'in inseminasyon mediumundan uzaklaştırılmaması halinde elde edilen gebeliklerde fetal anomali oranında artış olduğunu belirten yayınlar da bulunmaktadır (53,54). Sonuç olarak yüksek oranda sperm DNA hasarı görülse bile fertilizasyon elde edilip embriyo gelişebilmekte ve gebelik oluşabilmektedir fakat DNA replikasyonu sırasında oluşan problemler çocukta, de novo mutasyonlara neden olabilmektedir. ICSI sırasında tüm doğal seçim yöntemleri ekarte edilip sperm rasgele seçildikleri için sperm DNA bütünlüğü ICSI uygulamalarında önemli bir parametre olarak değerlendirilmelidir. Spermde belirlenen DNA hasarının fertilizasyon ve gebelik oranlarını etkilememesine rağmen embriyo kalitesi ve spontan gebelik kaybı ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmaktadır. Sperm DNA bütünlüğünün korunmuş olması; başarılı bir gebelik ve genetik materyalin sonraki kuşaklara taşınması açısından büyük önem taşımaktadır. Sperm kromatin yapısı ve DNA bütünlüğünün fertilizasyonun gerçekleşmesindeki önemini gösteren birçok çalışma mevcuttur (55-57). İki ayrı çalışmada tekrarlayan düşüklerde gözlenen hasta gruplarında yüksek oranda sperm DNA kırıkları saptanmış ve sperm DNA kırıkları gözlenen hasta gruplarında kötü kalite embriyo gelişimi rapor edilmiştir. Sperm DNA hasarının saptanmasının embriyo oluşumu ve gelişiminin belirlenebilmesindeki önemini gösteren farklı çalışmalar da mevcuttur (58-60). DNA bütünlüğünün korunmadığı durumda da, bir sperm ile oositin döllenebileceği, hatta gebelik oluşturabileceği; ama gebeliğin devamının gerçekleşme olasılığının çok düşük olduğu unutulmamalıdır. Tüm bu nedenlerle; erkek infertilitesi tanı ve tedavisinde

sperm DNA hasarının olup olmadığının değerlendirilmesi ayrı bir önem taşımaktadır. Literatürdeki bütün bu çalışmalar göz önüne alındığında yüksek sperm DNA hasarının gebelik oluşturma ihtimalini azalttığı ancak gebelik için üst sınırın halen belli olmadığı görülmektedir. Sperm DNA'sının değerlendirilmesi, fertilizasyon kapasitesini ölçmede sıklıkta kullanılmaktadır ve sperm morfolojisi, konsantrasyonu ve motilitesi ile yapılan klasik sperm değerlendirme yöntemlerine göre daha fazla tanısal ve prognostik önemi olan bir belirteçtir. Bizim çalışmamızda ise; Pentoksifilin ve Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) Ajanı'nın her ikisinin de sperm DNA hasarına yol açtığı, motilite ve sperm fonksiyonlarının iyileştirilmesi adına Platelet Aktive Edici Faktör'ün Pentoksifiline tercih edilmesi gerektiği sonucuna vardık. Ayrıca PAF' la ilgili daha fazla bilimsel çalışma yapılmasının özellikle bizim çalışma konumuza daha fazla ışık tutacağı görüşündeyiz.

8. SONUÇ

Bu çalışmaya, infertilite merkezine başvurmuş olan 50 hastadan alınan seminal plazma örnekleri dahil edildi. Çalışma grubu olarak, semen örnekleri sperm morfolojisi, sperm sayısı ve sperm motilitesi açısından değerlendirilip normospermi (20 milyon/ml ve üzeri, motilite %50 ve üzeri), oligospermi (20 milyon/ml altı) ve astenospermi (motilite %30 ve altı) olmak üzere 3 grup oluşturuldu.

Bu gruplardan alınan semen örneklerine, sperm hareketliliğini artırıcı Pentoksifilin ve Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) ajanları uygulandı. Pentoksifilin ve Platelet Aktive Eden Faktör (PAF) uygulanan semen örneklerine Sperm DNA hasarının incelenmesi üzerine Sperm Kromatin Dağılım testi uygulandı. Aynı gruplardan elde edilen semen örnekleri, Sperm Kromatin Dağılım Testi kullanılarak elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular doğrultusunda, semen özelliklerini değerlendirdiğimiz parametrelerin (motilite, morfoloji, sperm konsantrasyonu) DNA hasarı oranı ilişkilendirilmesi sonrasında sperm sayısı ve sperm morfolojisinin DNA hasar oranları ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki içinde olmadığı ancak motilitenin DNA hasarı ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Motilitesi yüksek olan semen örneklerinde DNA hasarının azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgu sperm sayısının iyi ve normal morfoloji sınırlarında olduğu bir semen örneğinde nasıl olur da DNA hasarı yüksek olabilir ya da tersi bir biçimde sperm sayısı ve morfolojisi düşük olan bir örnekte klinisyen yüksek DNA hasarı beklerken nasıl normal seviyelerde olabilir sorularına da açıklık getirmektedir. Sperm motilitesi ile DNA hasar oranı arasındaki bu ters orantılı ilişki PAF ve Pentoksilin uygulamaları sonrası da benzer durumunu korumuştur. Sonuç olarak semende sperm DNA hasar oranını öngörmeye motilite bir belirteç özelliği gösterebilir.

Bazaldeki DNA hasar oranına göre Pentoksifilin ve PAF uygulaması sonrasında her iki grupta da DNA hasar oranının arttığı belirlenmiştir. Ancak Pentoksifilin uygulanan grupta PAF uygulanana gruba göre daha yüksek DNA hasarı belirlenmiş olup bu artış istatistiksel olarak ta anlamlı bulunmuştur. Bu bulgu ile özellikle total immotil ya da TESE olgularında tercih edilen ve motil spermi ayırt etmede pek çok tüp bebek laboratuvarında kullanılan pentoksifilinin tercih edilmemesi gereği ortaya çıkmıştır. Pentoksifilin ayrıca aşılama uygulamalarında da kullanılıyor olması bazale göre daha yüksek DNA hasarı

oluşturulmuş bir örneğin klinik olarak kullanıldığını ortaya koymaktadır. PAF uygulaması sonrası DNA hasarının yine arttığı ancak bu artışın pentoksifin uygulaması sonrası olan artışa göre istatistiksel olarak çok daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu ile motil spermi ayırt etmede ya da motilite oranını arttırmak amacıyla bir ajan kullanılmak isteniyorsa PAF'ın pentoksifiline tercih edilmesi gereği ortaya çıkmıştır.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Evrim ÜNSAL'a.

Çalışmam süresince gerekli her konuda ilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Canan HÜRDAĞ'a,

Çalışmam da istatistik verilerimin elde edilmesinde yardımını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Albena GAYEF'e

En çok ihtiyaç duyduğum zamanda yardımını esirgemeyen Pınar BEREKETOĞLU'na,

Hayatta en kıymetlilerim olan, üzerimde sonsuz emeğe sahip sevgili annem, sevgili babam ve biricik kardeşime, maddi manevi desteklerini, sevgilerini sonuna kadar paylaştıkları ve her zaman yanımda oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Abraham L. Kierszenbaum. Çev. Ed. Demir R. Üreme Sistemi Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006; 510-521
2. Bungum M, Humaidon P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. Hum Reprod. 19(6):1401-8, 2004 Jun.
3. Ahmadi A. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. J Exp Zool 1999;284(6):696-704 WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Laboratuvar El Kitabı: İnsan Semeni Değerlendirilmesi. Çeviri Editörü: Günalp S. Ankara, Tıp Teknik Kitapevi, 2002
4. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. J Exp Zool 1999;284(6):696-704.
5. Androl, 2003 59-66 Androl J. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. Jan-Feb 2003;24(1):59-66
6. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. Hum Reprod 1999;14(4):1039-49
7. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. 2000;21(1):33-44.
8. Hellstrom WJG, Wang R, Sikka SC. Platelet-activating factor stimulates motion parameters of cryopreserved human sperm. Fertil Steril. 1991;56:768-70.
9. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP: Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. Hum Reprod. 2000; 15: 1717-22.
10. Kumar R, Harper MJK, Hanahan DJ. Occurrence of platelet-activating factor in rabbit sperm. Arch Biochem Biophys. 1988;260:497-502.
11. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. Fertil Steril 2001;75(4):674-7.
12. Yakan B, Özçoban Ö, Cantürk F, Örez T, Ekmekçioğlu O, Yıldırım D, Cansu P. Varikosel Olgularında Sperm Morfolojisi ve DNA Hasarlarının İncelenmesi.

13. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000;73(1):43-50
14. Leslie P. Gartner, James L. Hiatt. *Renkli Histoloji Atlası*. Çeviri Editörü: Atilla D. F, Sevda M, Gülten K. Güneş Tıp Kitapevleri. 2009.
15. Roudebush WE, Purnell ET. Platelet-activating factor content in human sperm and pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 2000; 74:257-60.
16. Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte dependent histamine release from rabbit platelets: the role of Ig-E, basophils, and platelet-activating factor. *J Exp Med*. 1972;136:1356-76.
17. Jurisicova A, Lopes S, Meriano J, Oppedisano L, Casper RF, Varmuza S. DNA damage in round spermatids of mice with a targeted disruption of the Pp1cgamma gene and in testicular biopsies of patients with non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod* 1999;5(4):323-30
18. Kierszenbaum AL, Tres LL. Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome. *J Cell Biol* 1975;65(2):258-70.
19. Kuzan FB, Geissler FT, Henderson WR. Role of sperm platelet activating factor in fertilization. *Prostaglandins*. 1990;39:61- 74.
20. Roudebush WE, Mathur RS. Presence of platelet-activating factor in squirrel monkey (*Saimiri boliviensis*) sperm: seasonal differences. *Am J Primatol*. 1998;45:301-5
21. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998;69(3):528-32,5.
22. Roudebush WE, Gerald MS, Cano JA et al. Relationship between plateletactivating factor concentration in rhesus monkey (*Macaca mulatto*) spermatozoa and sperm motility. *Am J Primatol*. 2002;56:1-7
23. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56(3):602-7
24. Roudebush WE, Wild MD, Maguire EH. Platelet-activating factor receptor expression in human sperm: differences in mRNA content and protein distribution between normal and abnormal sperm. *Fertil Steril*. 2000;73:967-71.

25. Higuchi M, Singh S, Chan H, Aggarwal BB. Protease inhibitors differentially regulate tumor necrosis factor-induced apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, cytotoxicity, and differentiation. *Blood* 1995;86(6):2248-56
26. Çetinkaya B, Koca B, Aras D, Çakar Z, Özkavukcu S, CanA, Çınar Ö. Normozoospermi Olgularında Sağlam DNA'ya Sahip Sperm Hücrelerinin Seçimi için Uygun Yöntemin Belirlenmesi, Ankara Üniversitesi
27. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79(7):559-563
28. Krausz C, Gervasi G, Fori G, Baldi E. Effect of platelet activating factor on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1994;9:471-6.
29. Roudebush WE, Massey JB, Toledo AA et al. Platelet-activating factor significantly enhances intrauterine insemination pregnancy rates. *Fertil Steril.* 2004;82:52-6.
30. Shen HM, Chia SE, Ong CN. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999;20(6):718-23.
31. Zergeroğlu AD, Yılmaz E, Sofuoğlu K, Delikara N, Kutlu P, *International Journal of Fertility and Sterility*, Vol 4, No 2, Jul-Sep 2010:33. Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update* 1996;2(2):103-17.
32. Delilbaşı L. İnvitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni Uygulamalar ve Güncel Yaklaşımlar). Ankara, Güneş Tıp Kitapevi, 2008
33. William E. Roudebush, Ph.D., Andrew A. Toledo, M.D., Hilton I. Kort, M.D. Dorothy Mitchell-Leef, M.D., Carlene W. Elsner, M.D., and Joe B. Massey, M. Platelet-activating factor significantly enhances intrauterine insemination pregnancy rates in non-male factor infertility
34. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs.* 1987 Jul;34(1):50-97.
35. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *J Androl.* 2006 Jan Feb;27(1):45-52.
36. Yovich JL. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 1993 Nov;8(11):1786-1791.

37. Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL. Effect of pentoxifylline on mouse embryos. *Hum Reprod.* 1994 Mar;9(3):566.
38. Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach JL, Salzmann J, Urrutia V, Roulier R. Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2000 Apr;17(4):194-199.
39. Ebner T, Tews G, Mayer RB, Ziehr S, Arzt W, Costamoling W, Shebl. Pharmacological stimulation of sperm motility in frozen and thawed testicular sperm using the dimethylxanthine theophylline. *Fertil Steril.* 2011 Dec;96(6):1331-1336. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.08.041. Epub 2011 Sep 29.
40. Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2004 Jul-Oct;36(3-4):333-339.
41. Ghosh S, Chattopadhyay R, Bose G, Ganesh A, Das S, Chakravarty BN. Selection of birefringent spermatozoa under Polscope: effect on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Andrologia.* 2012 May;44 Suppl 1:734-738. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01258.x.
42. Crippa A, Magli MC, Paviglianiti B, Boudjema E, Ferraretti AP, Gianaroli L. DNA fragmentation and characteristics of birefringence in human sperm head. *Hum reprod* 2009; 24:i95:O-234.
43. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1994 Sep;62(3):639-641.
44. Tournaye H, Liu J, Nagy Z, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P. The use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in patients with necrozoospermia. *Fertil Steril.* 1996 Aug;66(2):331-334.
45. Kahraman S, Işik AZ, Vicdan K, Ozgür S, Ozgun OD. A healthy birth after intracytoplasmic sperm injection by using immotile testicular spermatozoa in a case with totally immotile ejaculated spermatozoa before and after Percoll gradients. *Hum Reprod.* 1997 Feb;12(2):292-293.
46. Baka S, Grigoriu O, Hassiakos D, Konidaris S, Papadias K, Makrakis E *Urology* 2009;74:1025-1028 Baka S, Grigoriou O, Hassiakos D et al. Treatment of sperm with platelet-activating factor does not improve intrauterine insemination outcome in unselected

- cases of mild male factor infertility: a prospective double-blind randomized crossover study. *Urology*. 2009;74(5):1025-8.
47. Ron-El R, Strassburger D, Friedler S, Komarovsky D, Bern O, Raziel A. Repetitive ejaculation before intracytoplasmic sperm injection in patients with absolute immotile spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998 Mar;13(3):630-633.
 48. Vandervorst M, Tournaye H, Camus M, Nagy ZP, Van Steirteghem A, Devroey P, Roudebush WE, Purnell ET. Platelet-activating factor content in human sperm and pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 2000; 74:257-60.
 49. S. Brahem, M. Mehdi, H. Elghezal & A. Saad. Study of aneuploidy rate and sperm DNA fragmentation in large-headed, multiple-tailed spermatozoa
 50. Vijay Mangoli, Ph.D, Ranjana Mangoli, Ph.D, Sucheta Dandekar, Ph.D. Kavita Suri, B.Sc. and Sadhana Desai, M.D. Selection of viable spermatozoa from testicular biopsies: a comparative study between pentoxifylline and hypoosmotic swelling test
 51. Roudebush WE, Wild MD, Maguire EH. Platelet-activating factor receptor expression in human sperm: differences in mRNA content and protein distribution between normal and abnormal sperm. *Fertil Steril*. 2000;73:967-71.
 52. Roudebush WE, Gerald MS, Cano JA et al. Relationship between platelet activating factor concentration in rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa and sperm motility. *Am J Primatol*. 2002;56:1-7
 53. David K. Gardner Çeviri Editörü: Hasan Serdaroğlu *In Vitro Fertilization Pratik Yaklaşım*. Doğan Tıp Kitapevi Yayınları, 2009
 54. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73:43–50
 55. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod*. 1998;4:439–445
 56. Agarwal A and Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod*. 2003; 9:331–345
 57. Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D. Sperm nuclear DNA damage in the human. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 518:73–84

58. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod.*2002; 17:990–998
59. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET and Evenson DP. 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
60. Lewis SEM, O'Connell M, Stevenson M, Thompson-Cree L and McClure N. An algorithm to predict pregnancy in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 2004; 19: 1385-1394