

Halosperm Tekniği ile Bakılan DNA Fragmentasyon Oranının IVF-ICSI Sonuçları Üzerine Olan Etkisi

The Effect of DNA Fragmentation Rate Measured by Using Halosperm Technique on IVF-ICSI Outcomes

Mustafa Kara¹, Nurettin Türktekin², Turgut Aydın²

¹Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Yozgat, ²Kayseri Tıp Bebek Merkezi, Kayseri

ABSTRACT

AIM: Damage in sperms' DNA is an important cause of male infertility and effects the outcomes of in vitro fertilization. We aimed to study the influence of DNA fragmentation rate on IVF-ICSI outcomes.

METHODS: A total of fifteen patients were included in the study. The patients were involved in a grouping process according to the treatment protocols of antagonize and long protocols, or according to the DNA fragmentation rate of 30% and more or less than 30%. The outcomes of the IVF-ICSI processes were evaluated by comparison of the groups. DNA fragmentation rates were demonstrated by using the halosperm technique.

RESULTS: Infertility characteristics of the comparison groups were similar. The comparison according to the treatment protocols did not show significant differences between the outcomes of the treatments ($p>0.05$). In addition, comparison according to the sperms' DNA fragmentation rates also did not show significant differences between treatment outcomes ($p>0.05$). The total fertilization rate was 29.7% and the clinical pregnancy rate was 6.6%. Mean DNA fragmentation rate of the sperms was 25.2 ± 13.6 .

CONCLUSION: Although, our study could not demonstrate a correlation between the DNA fragmentation rates of the sperms and the IVF-ICSI outcomes, we think that future prospective randomized controlled trials with larger samples will be more enlightening.

Key words: ICSI; in vitro fertilization; DNA fragmentation rate; sperm; Halosperm technique; determination

ÖZET

AMAÇ: Sperm DNA hasarı erkek infertilitesinin önemli bir sebebi- dir ve IVF'in sonuçlarını etkiler. Bu çalışmada DNA fragmentasyon oranının IVF-ICSI sonuçları üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

YÖNTEM: Toplam 15 hasta çalışmaya dahil edildi. Tedavi protokolü- nün antagonist ve uzun protokol olmasına ve DNA fragmentasyonu- nun %30 ve üstünde ya da %30'un altında olmasına göre hastaların iki ayrı gruplama işlemi sonrası IVF-ICSI sonuçları değerlendirildi. DNA fragmentasyonu halosperm tekniği ile hesaplandı.

BULGULAR: Karşılaştırma gruplarına göre çalışmada yer alan hastaların infertilite özellikleri benzerdi. Tedavi protokolüne göre kıyaslamada gruplar arası anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0,05$). DNA fragmentasyon oranına göre kıyaslamada da tedavi sonuçları açı- sından farklılık izlenmedi ($p>0,05$). Fertilizasyon oranı % 29,7 olarak bulundu. Klinik gebelik oranı % 6,6 idi. Spermilerin ortalama DNA fragmentasyon oranı (DFO) $25,2\pm 13,6$ idi.

SONUÇ: Çalışmamız spermatozoadaki DNA fragmentasyon oranı- nı IVF-ICSI sonuçları ile ilişkisiz bulsa da, daha büyük örnekleme yapılan prospektif randomize kontrollü çalışmaların daha aydınlatıcı olacağını düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: ICSI; in vitro fertilizasyon; DNA fragmentasyon oranı; sperm; Halosperm tekniği; belirleme

Giriş

Erkek kaynaklı infertilite; infertil çiftlerin % 40'ında görülen bir problemdir ve rutin olarak semen analizi ile değerlendirilmektedir¹. Konvansiyonel semen analizi örnekteki spermilerin morfoloji, hareket ve sayısını dikkate almakta ancak, bu parametreler fertilitate potansiyelini belirlemede yetersiz kalmaktadır. Bu hastaların % 20'sinde spermioqram sonuçlarının normal olarak saptanmasına rağmen gebelik gerçekleşmemektedir². In vitro fertilizasyon ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF, ICSI) tekniklerinin tüm dünyada yaygın bir şekilde uygulandığı göz önüne alındığında rutin semen analizi ile karşılaştırıldığında tanısal değeri daha yüksek olan bir yöntemin önemi yadsınamaz.

Sperm DNA hasarı infertil erkeklerde daha sık görülmektedir ve DNA fragmentasyon oranı (DFO) arttıkça fertilitate bozulmaktadır³⁻⁵. Bu çalışma spermatozoadaki DNA hasarı ya da başka bir deyişle kromatin yapısındaki değişikliğin güncel bir yöntem olan halospermi kiti ile değerlendirilmesini ve bu değeri belirlermenin IVF-ICSI sonuçları üzerine olan etkisini belirlemeyi amaçlamaktadır.

Yöntem

Bu çalışmaya en az 1 kez IVF-ICSI başarısızlığı olan, spermogram ve Halospermi tekniği ile bakılmış sperm DNA raporu olan 15 hasta alındı. Çalışmaya alınan erkekler sigara içmiyordu ve tıbbi öykülerinde bilinen bir infertilite nedeni yoktu.

Erkeklerde yaş, sperm sayısı, hareket, morfoloji ve DNA fragmentasyon oranlarını içeren parametreler kaydedilirken, kadınlarda yaş, beden kitle endeksi, bazal FSH ve estradiol düzeyleri kaydedildi. Folikül aspirasyonu öncesi stimülasyonla gelişen ovaryan foliküller 12–17 mm ve 18 mm ya da üstünde olmalarına göre sayıldı. Aynı dönemde her kadında endometrium kalınlığı belirlendi. Ovum aspirasyonunda elde edilen toplam oosit ve metafazın 2. evresindeki oosit sayıları belirlendi. Fertilizasyonu değerlendirmek için 2 hücreli embryo, embryonun bölünmeye başlaması, transfer edilen embryo sayısı, klinik ve devam eden gebelik sayıları belirlendi.

Sperm örnekleri 3–5 günlük seksüel abstinans sonrası mastürbasyon ile alındı. Likefaksiyon sonrasında semen örnekleri IVF-ICSI ve sperm DNA analizi için olmak üzere ikiye ayrıldı. Spermiler Gamet 20 mediumu (Göteborg, İsveç) ile 1/10 oranında seyreltildi, 200 devirde 10 dakika santrifüj edildi, ve spermatozoalar swim-up yöntemi ile yüzdürüldü. Spermilerin morfoloji, motilite, ve konsantrasyonu Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre değerlendirildi.

Sperm sayısı 0 çıkan 6 olguda testiküler sperm eks-traksiyonu (TESE) uygulandı.

Sperm DNA'sının Hazırlanması

Eppendorf tüpleri mikrodalga fırında 5 dakika ısıtıldı. 25 mikrolitre semen örneği ilave edildi ve karıştırıldı. Karışımdan 15 mikrolitrelik bir örnek slayt üzerine konuldu ve içindeki agarı katılaştırmak için +4 derecede 5 dakika fikse edildi. 10 ml distile suya 80 mikrolitre denatüre edici solüsyon eklendi. Slayt denatüre edici solüsyonda 7 dakika bekletildi. Daha sonra slayt denatüre edici solüsyondan çıkarıldı ve lizis solüsyonunda 25 dakika muamele edildi. Slayt distile suda 5 dakika boyunca yıkandı. Sonra sırasıyla %70, % 80 ve % 90'lık etil alkol solüsyonlarında ikişer dakika bekletildi. Oda ısısında kurutuldu, dif-kuik boyası ile boyandı. Slaytlar Olympus BX 50 ışık mikroskobu (Olympus Comp., Tokyo, Japonya) kullanılarak incelendi. Sperm nükleusu etrafında oluşan

halonun genişliği ölçülerek sperm DNA'sının hasarlı olup olmadığı değerlendirildi.

Tüm hastalara standart IVF-ICSI işlemi uygulandı. Hastalara daha önceki tedaviye verilen yanıt, beden kitle endeksi ve yaşa göre uzun protokol (long protocol) ya da antagonist protokol uygulandı.

Uzun protokoldeki hastalara bir önceki siklusun 21. gününde 1mg/gün dozunda Löprolid asetat (Lucrin® daily 0.25 mg Abbott, USA) başlandı. En az 10 günlük tedavi uygulandıktan sonra, ovaryan baskılanmayı saptamak amacıyla hastalar menstrüel döngünün 2. gününde transvajinal ultrasonografi ve serum estradiol (E₂) düzeyleri açısından takibe alındı. Ovaryan baskılanma doğrulandıktan sonra (serum E₂ seviyesinin 50 pg/ml'nin altına düştüğü teyit edilince) hastalara ileri derecede saflaştırılmış üriner FSH (Fostimon HP® 150 IBSA, Switzerland) 450 IU dozunda başlandı ve GnRHa (Löprolid asetat) dozu 0,5 mg/gün'e düşürüldü.

Antagonist protokoldeki hastalara, foliküllerin gelişmesine (önde giden folikül 13–14 mm çapa ulaştıncaya) ve E₂ düzeyine göre (E₂ seviyesi 600-800 pg/ml olunca) siklusun 6. ya da 7. gününde başlanan Cetrotide (Cetrotide® 0.25 Merck-Serono, İsviçre) hCG ile triger yapılacak güne kadar aynı dozda verildi. Kontrollü ovaryan stimülasyona (KOS) siklusun 3. gününde 225 iu üriner FSH dozu ile başlandı ve doz E₂ ölçümleri ve folikül gelişimine göre ayarlandı. Bir ya da iki folikül 17 mm çapa ulaştığı zaman final matürasyonu için hCG (Pregnyl® 10.000 iu, Schering-Plough, USA) verildi. hCG verildikten 36 saat sonra transvajinal ultrasonografi eşliğinde foliküler sıvı aspirasyonu uygulandı. Toplanan oositler 2-4 saat boyunca inkübatörde inkübe edildikten sonra denüdas-yon işlemi için hyaluronidaz (Vitrolife, İsveç AB, Kungsbacka, İsveç) uygulandı.

İstatistiksel analiz için SPSS 17.00 (SPSS Inc., Chicago) kullanıldı. Değişkenlerin grup içi dağılımını incelemek için Kolmogorov-Smirnov testi uygulandı. Uzun ve antagonist protokol ve DNA fragmentasyonunun %30 ve üstünde ya da %30 altında olmasına göre oluşturulan gruplar Mann Whitney U testi ile kıyaslandılar. DNA fragmentasyon oranının diğer çalışma parametreleriyle ilişkisi Spearman korelasyon testi kullanılarak ölçüldü. P değerinin 0,05'ten küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmada yer alan kadınlar yaş, infertilite süresi, beden kitle endeksi, bazal FSH düzeyi, bazal E₂ düzeyi gibi demografik parametreler açısından değerlendirildiğinde, uygulanan protokol farklılığına göre gruplar arasında anlamlı farklılık izlenmedi (Tablo 1).

Çalışmada yer alan erkeklerin temel sperm parametreleri (sayı, motilite ve morfoloji) normal değerler ile şiddetli oligo-asteno-teratozoospermi arasında değişen geniş bir spektrumda seyrediyordu. Sperm parametrelerinin ve sperm DNA fragmentasyon oranlarının tedavi protokolüne göre karşılaştırılması ve ortalama değerler Tablo 2'de özetlenmiştir. Sperm

DFO'ları %9 ile %58 arasında değişiyordu ve ortalama DFO %25,2±13,6'dı. Karşılaştırılan parametreler açısından iki grup arasında anlamlı farklılık izlenmedi (p>0,05). Erkeklerin yaş ortalaması 29,2±4,2 olarak bulundu.

On iki hastaya antagonist, üç hastaya ise uzun protokol tedavisi uygulandı. Tablo 3 ovulasyon indüksiyonu sonrası elde edilen veriler ve IVF-ICSI verilerinin tedavi protokollerine göre karşılaştırılmasını özetlemektedir. Çift pronükleus ve bölünme sayısı dışında gruplar arası anlamlı farklılık izlenmedi. Fertilizasyon oranı % 29,7 saptandı. Yalnızca 1 gebelik elde edildi. Klinik gebelik oranı 1/15 (%6,6) idi.

Tablo 1. Çalışmada yer alan kadınların yaşlarının, siklus başındaki hormonal durumlarının ve beden kitle endekslerinin ovaryan stimülasyon gruplarında karşılaştırılması.**

Karakteristik	Antagonist protokol (n=12)	Long protokol (n=3)	P değeri**
Yaş	27	30	>0,05
İnfertilite süresi (yıl)	3,5	4	>0,05
Bazal FSH düzeyi (iu/l)	6,6	8,3	>0,05
Bazal E ₂ düzeyi (pg/ml)	41,15	37,30	>0,05
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	28	30	>0,05

*Veriler medyan değerleri ile sunulmuştur
**Grupların karşılaştırılmasında Mann Whitney U Testi kullanılmıştır

Tablo 2. Çalışmada yer alan hastaların temel sperm parametreleri ve DNA fragmentasyon oranlarının gruplara göre karşılaştırılması.

	SS (x10 ⁶ /ml)	SM (%)	M (%)	DFO (%)
Antagonist protokol grubu	5,58±10,41	9,17±14,04	0,08±0,29	22,75±11,84
Long protokol grubu	20,00±20,88	19,67±19,40	0,00±0,00	30,67±23,86
P değeri*	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

SS: Sperm sayısı, SM: Sperm motilitesi, M: Morfoloji, DFO: DNA fragmentasyon oranı, * Mann Whitney U Testi

Tablo 3. Çalışmada yer alan hastaların IVF-ICSI sonuçlarının gruplara göre karşılaştırılması

	Antagonist protokol grubu	Uzun protokol grubu	P değeri*
Gelişmekte olan folikül sayısı (12–17mm)	8,67±4,70	8,00±1,73	>0,05
Matür folikül sayısı (>18mm)	3,17±1,03	3,00±0,00	>0,05
hCG öncesi endometrial kalınlık (mm)	9,92±1,00	10,67±3,78	>0,05
hCG öncesi Estradiol (pg/ml)	1311,67±599,10	1334,00±331,00	>0,05
Aspirasyondaki toplam oosit sayısı	12,67±5,76	11,00±2,64	>0,05
Metafazın II. Evresindeki oosit sayısı	9,17±5,24	7,00±1,00	>0,05
Çift pronükleus sayısı	1,92±2,15	5,33±2,08	<0,05
Bölünme sayısı	1,667±2,19	5,33±2,08	<0,05
Transfer edilen embryo sayısı	1,08±1,24	1,67±0,58	>0,05
Klinik gebelik sayısı	0,00±0,00	0,33±0,58	>0,05

*Mann Whitney U Testi

Sperm DNA fragmentasyonu oranının %30 ve üstünde olması ile %30'un altında olması açısından iki grup oluşturulduğunda (Tablo 4), sperm parametreleri, transfer edilen embryo sayısı, embryo bölünme sayısı ve klinik gebelik açısından iki grup açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Sperm DNA fragmentasyon oranıyla sperm parametreleri, pronukleus sayısı ve sonrasındaki bölünme sayısı, transfer edilen embryo sayısı ve gebelik oranları arasında korelasyon kurulamadı ($p>0,05$).

Tartışma

Sperm DNA'sının değerlendirilmesi, fertilizasyon kapasitesini ölçmede giderek artan bir sıklıkta kullanılmaktadır ve sperm morfolojisi, konsantrasyonu ve motilitesi ile yapılan klasik sperm değerlendirme yöntemine göre de daha fazla tanısal ve prognostik önemi olan bir belirteçtir. Rutin semen analizi her zaman sperm DNA'sının kalitesini göstermez. Aslında analiz sırasında sperm DNA'sı hasarlı olsa da bu rutin analizde görülmeyebilir⁶. Zini ve ark. semen analizi normal olan erkeklerin % 8'inde DNA hasarı olduğunu göstermişlerdir^{5,7}.

IVF-ICSI'nin yaygın bir şekilde kullanıldığı günümüzde sperm DNA kalitesini değerlendirmek elzem hale gelmiştir. Seli ve arkadaşları hasarlı DNA'ya sahip olan spermle yapılan IVF-ICSI'lerde embriyonik lethalite olabileceğini ileri sürmüşlerdir⁸. Evenson ve arkadaşları sperm DNA'sındaki hasar % 30'dan fazla olduğunda doğal gebeliğin mümkün olmadığını bildirmişlerdir⁹. Bizim çalışmamızda sperm DNA'sındaki hasar oranı ortalama $25,2\pm 13,6$ idi. Bulunan bu değer literatürde belirtilen % 30'luk eşik değerinin altında olmasına rağmen yalnızca 1 hastada (%6,6) gebelik gerçekleşti. Ayrıca bizim yaptığımız korelasyon analizinde

DNA fragmentasyonu ile pronukleus sayısı, bölünme sayısı, transfer edilen embriyo ve klinik gebelik sayısı arasında da bir ilişki kurulamamıştır. Ancak bizim hasta gruplarımızın küçüklüğü belki de var olan bir ilişkinin maskelenmesine sebep olabilir.

Sperm DNA bütünlüğünü göstermek için pek çok test kullanılmaktadır. Bunlardan Halosperm testinde sperm agaroz matriks jele yerleştirilir ve denatüre olması için asit solüsyon eklenir. Sonra sperm membranı ve proteinlerinin uzaklaştırılması için litik bir tampon solüsyonu eklenir. Böylece merkezi bir çekirdek çevresinde DNA'ların ayrılması sonucu periferik bir halo (hale) oluşur. Normal DNA'ya sahip olan sperm geniş bir halo oluştururken, hasarlı DNA içeren sperm çok küçük halo verir ya da hiç halo vermez¹⁰. Bu çalışmada sperm DNA hasarını saptama yöntemlerinden Halospermi yöntemi ve bunun klinik yansımaları değerlendirilmiştir. Hasta sayısının az olması çalışmanın değerini azaltsa da literatürde aynı hasta sayıları ile yapılan benzer çalışmalar mevcuttur. Greco ve ark. 18 hastalık çalışmalarında testiküler ve ejakülat spermatozolarını karşılaştırmış ve testiküler spermatozoalar ile yapılan IVF-ICSI sonuçlarını anlamlı şekilde daha iyi olarak bulmuşlardır¹¹. Bizim çalışmamızda örnekler ejakülat spermatozolarından alındı. Spermioqramı yetersiz olan 6 olguda TESE uygulanarak sperm bulundu.

Evenson ve arkadaşları 25 yıldan daha fazla zamandır kullanılmakta olan sperm kromatin yapısal deneyi (SKYD) ile Halosperm testini karşılaştırdıkları çalışmalarında her iki yöntemin tanısal başarı açısından birbirine benzer olduğunu sonucuna varmışlardır¹². Chohan ve arkadaşları aynı şekilde Halosperm'in SKYD kadar değerli bir test olduğunu vurgulamışlardır¹³.

Tablo 4. Çalışmada yer alan hastaların IVF-ICSI sonuçlarının DNA fragmentasyon oranlarına göre karşılaştırılması

Özellik	DNA fragmentasyonu <%30	DNA fragmentasyonu ≥%30	P değeri*
Erkeklerin yaşı	29,91±4,70	29,75±2,50	>0,05
Sperm sayısı (x10 ⁶ /ml)	9,09±15,01	6,75±9,91	>0,05
Normal sperm motilitesi (%)	14,09±16,79	3,50±3,51	>0,05
Normal sperm morfolojisi (%)	0,09±0,30	0,00±0,00	>0,05
Çift pronukleus sayısı	2,73±2,80	2,25±1,71	>0,05
Bölünme sayısı	2,45±2,80	2,25±2,22	>0,05
Transfer edilen embryo sayısı	1,18±1,17	1,25±1,26	>0,05
Klinik gebelik sayısı	0,09±0,00	0,00±0,00	>0,05

*Mann Whitney U Testi

Biz bu çalışmada Halosperm tekniği ile bakılan DFO'nun IVF-ICSI üzerine etkisini gösteren 15 hastalık ilk sonuçları sunmayı amaçladık. Klinik gebelik oranı % 6.6 idi. Toplam 6 hastada embriyo gelişimi olmadığı için transfer işlemi yapılamadı. Çalışmamızın sonuçlarına göre DNA fragmentasyonu ile gebelik oranı ilişkisiz bulunmuştur. Bu daha önceki çalışmalarda bulunan sonuçlarla uyumsuzdur⁸⁻¹³. Çalışmadaki katılımcı sayımızın az olması ve hastalarda farklı tedavi protokolleri olması bu farklılığın sebebi olabilir.

Bugün en iyi IVF merkezlerinde bile eve canlı bebek götürme oranı %30'larda seyretmektedir. Bu oran özellikle hasarlı sperm DNA'sının kullanıldığı IVF-ICSI sikluslarında daha da düşük olacaktır. Tekrarlayan IVF sikluslarındaki başarısızlık da çiftler üzerinde mali, emosyonel ve psikolojik külfet oluşturacaktır. Her ne kadar sperm DNA hasarı gebelik oluşma şansını azaltsa da gebelik için sınır değer bilinmemektedir¹⁴. Halosperm testi defnitif bir tetkik olmayabilir. Ancak yapılması ve yorumlanmasının kolay olması temel bir teste ya da laboratuvar ölçümüne entegrasyonunu mümkün kılmaktadır. Daha karmaşık olan diğer DNA testlerinin aksine basittir ve önceki çalışmalara göre hassas ve güvenilirdir. Halosperm testi standart semen analizine ilave edilirse IVF-ICSI başarısını ve sonucu öngörmeyi artırabilir.

Bizim çalışmamızda DNA fragmentasyonunun gebelik başarısı ve fertilité parametreleriyle uyumsuzluğunun araştırılması için daha iyi standardize edilmiş, daha büyük katılımcı olan gruplarla test edilmesi gerekir. Çalışmamız spermatozodaki DNA fragmentasyon oranını IVF-ICSI sonuçları ile ilişkisiz bulsa da, daha büyük örnekleme yapılan prospektif randomize kontrollü çalışmaların daha aydınlatıcı olacağını düşünüyoruz.

Kaynaklar

1. Shamsi MB, Kumar R, and Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 2008;127:115-123.
2. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005;84:850-3.
3. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med* 2001;345:1388-93.

4. 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;75:674-7.
5. Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology* 2001;58:258-61.
6. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9:331-45.
7. 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;75:674-7.
8. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005;11:337-49.
9. Evenson, D.P, Larson, K.L and Jost, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with the other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
10. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril* 2005;84:833-42.
11. Evenson DP, Wixon R. Comparison of the Halosperm® test kit with the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) infertility test in relation to patient diagnosis and prognosis. *Fertil Steril* 2005;84:846-9.
12. Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, and Ferrero S, et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 2005;20(1):226-30.
13. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl* (in press).
14. Koyuncu H. Sperm DNA hasarı tespit yöntemleri. *Turk Urol Sem* 2011;2:18-23.