



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİGARA İÇENLERDE DONDURMA-ÇÖZME İŞLEMİNİN
ZAMANA BAĞLI OLARAK SPERM PARAMETRELERİ,
İNCE YAPISI VE HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNE ETKİLERİ**

MEHMET ŞERİF AYDIN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Feriha ERCAN

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI**ÖRNEK**

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.

Tez Sahibi : Mehmet Şerif AYDIN

Tez Başlığı : Sigara içenlerde dindurma-çöme işleminin zamanı bağılı olarak, sperm parametreleri, ince yapısı ve hücre ölümü üzerine etkileri.

Sınav Yeri : Histoloji ve Embriyoloji ABD.

Sınav Tarihi : 09.08.2010

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Kurumu

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan,

Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Feriha Erkan MÜTÖP Fak. J.

Doç. Dr. Cem Aksoz

MÜTÖP

Doç. Dr. Sule Şehnel

MÜTÖP



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 16/08/2010 tarih ve 49 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Nimet GENÇOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Y.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

15.07.2010

Mehmet Şerif AYDIN



TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim aşamasında her türlü ilgisini ve desteğini gördüğüm, gerek akademik gerekse hayat bilgilerini bizimle paylaşan çok kıymetli danışman hocam ve Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Feriha Ercan'a

*eğitim ve tez hayatımda bilgi ve tecrübelerini bizlerden esirgemeyen,
her zaman yanımda olan çok değerli hocalarım*

Prof. Dr. Tangül Şan'a, Doç. Dr. Şule Çetinel'e, Doç Dr. Serap Şirvancı'ya,

*çalışmamı planlama aşamasında ve dondurma-çözme işlemlerindeki yardımlarıyla destek veren Acıbadem Üni. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi
Dr. Gözde Erkanlı Şentürk'e, ışık mikroskopik incelemelerdeki yardımlarından dolayı
Tek. Seher Başaranoğlu ve Tek. Mehtap Arın'a, çalışmamın TUNEL yöntemi bölümündeki yardımlarımdan dolayı Uzm. Bio. Çiğdem Çınar Yapan'a*

*her zaman ve her konuda desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım
Uzm. Dr. Dilek Akakın, Dr. Pınar Turan, Dr. Gazi Contuk, Dr. Demir Kıran,
Dr. Nükhet Dağbaşı, Pat. Naziye Özkan, Dok. Öğr. Esin Çalışkan Ak,
Dok. Öğr. Özlem Tuğçe Çilingir, Yük. Lis. Öğr. Eren Şahin,
Yük. Lis. Öğr. Olgu Enis Tok ve Yük. Lis. Öğr. Sercan Doğukan Yıldız'a*

*elektron mikroskopik preparasyondaki yardımlarından dolayı Kim. Müh. Necati
Yurdakul'a, elektron mikroskop yardımlarından dolayı Tek. Yücel Öztürk'e,
ışık mikroskopideki yardımlarından dolayı Tek. Ünal Devrim'e,*

*sevgi, ilgi, manevi destek ve varlıklarıyla bana güç veren arkadaşım Merve Menga,
canım ailem, babam Prof. Dr. Sabahattin Aydın, annem Uzm. Dr. Sibel Aydın
ve kardeşlerim Muhammed İkbâl Aydın ve Mahmut Emre Aydın'a*

sonsuz teşekkürler.

*Bu çalışma M. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir
(SAG-C-YLP-211009-0311).*

Temmuz-2010

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Spermatogenez	5
4.2. Apoptozis	8
4.3. Dondurma-Çözme (Kriyoprezervasyon)	9
4.4. Sigara ve İnfertilite	11
5. GEREÇ VE YÖNTEM	12
5.1. Denek Grupları	12
5.2. Motilite ve Konsantrasyon	12
5.3. Sperm Dondurma-Çözme İşlemi	12
5.4. Işık Mikroskopi İncelemesi.....	13
5.5. Sperm Kromatin Kondensasyon Tayini	13
5.6. DNA Fragmantasyonu Tayini	14
5.7. Geçirimli Elektron Mikroskobu İncelemesi	14
5.8. İstatistiksel Analiz	15
6. BULGULAR	16
6.1. Motilite ve Konsantrasyon	16
6.2. Işık Mikroskopi Bulguları	16
6.3. Işık Mikroskopik Değerlendirmenin İstatistiksel Analizi	23
6.4. Sperm Kromatin Kondensasyonu Tayini	27
6.5. Sperm Kromatin Kondensasyonu Tayininin İstatistiksel Analizi.....	27
6.6. DNA Fragmantasyonu Bulguları	30
6.7. DNA Fragmantasyonu Bulgularının İstatistiksel Analizi	33
6.8. Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları	35
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
8. KAYNAKLAR	52
9. ÖZGEÇMİŞ	57
10. ETİK KURUL ve SAĞLIK BAKANLIĞI ONAYI	59

1. ÖZET

Sigara içmek, sperm konsantrasyonunda düşüş, motilesinde azalma ve morfolojisinde bozulma meydana getirerek subfertiliteye neden olmaktadır. Sigara kullanımının sperm parametreleri üzerindeki etkileri bilinmesine rağmen, bunun kriyoprezervasyonla olan ilişkisi üzerinde yeterince durulmamıştır. Bu çalışma kriyoprezervasyonun sigara içen ve içmeyenlerin sperm parametreleri ve DNA fragmentasyonu üzerine olan etkilerini göstermeyi amaçlamaktadır. Semen örnekleri düzenli olarak sigara içen 20 kişi ve sigara içmeyen 21 kişi olmak üzere toplam 41 normospermik erkek gönüllüden alınmıştır. Semen örnekleri ikiye ayrılarak, ilk kısmı başlangıçtaki semen analizi için kullanılmıştır. İkinci kısma ise -196 °C’de sıvı nitrojen içerisinde 1 ay ve 3 ay süreyle dondurulup çözüldükten sonra aynı şekilde semen analizi yapılmıştır. Örnekler standart semen analizi ile morfoloji, motilite, konsantrasyon açısından ayrıca, TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) yöntemi kullanılarak DNA fragmentasyon oranı açısından değerlendirilmiştir. Ultrastrüktürel analiz geçirimli elektron mikroskopu (TEM) ile yapılmıştır. Kriyoprezervasyon sonrası sperm morfolojisinin sigara grubunda daha çok etkilendiği görülmüştür. TEM incelemelerinde membran yapılarında bozulma ve artmış subakrozomal şişme görülmüştür. Başlangıçta DNA fragmentasyonu hücre oranı, sigara grubunda kontrol grubuyla aynı olmasına rağmen kriyoprezervasyon sonrasında her iki grupta da artışın yanı sıra sigara grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptanmıştır. Sonuç olarak kriyoprezervasyon membran yapılarında bozulma meydana getirmekte, sigara içenlerde sigara içmeyenlere kıyasla sperm morfolojisinde bozulmayı ve DNA fragmentasyonunu daha fazla arttırarak spermde olumsuz etkileri tetiklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Sperm, kriyoprezervasyon, sigara, DNA fragmentasyonu, ultrastrüktür

2. SUMMARY

Time Dependent Effects of Cryopreservation on Sperm Parameters, Ultrastructure and Cell Death in Cigarette Smokers

Smoking causes subfertility due to sperm deterioration such as decreased concentration, impaired motility and abnormal morphology. Although evidence on the effect of smoking on sperm parameters is well known, its interference with cryopreservation is not clear. This study aims to investigate the effects of cryopreservation on sperm parameters and DNA fragmentation in smokers and nonsmokers. Semen samples were obtained from 41 normospermic male volunteers of whom 20 were smokers and 21 nonsmokers. The samples were separated into two aliquots. The first aliquot was kept for initial semen analysis. The second was stored in liquid nitrogen at -196°C , and analyzed following thawing after 1 and 3 months. Samples were analyzed in terms of motility, concentration and morphology with light microscope, and DNA fragmentation using TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) by fluorescence microscope. Ultrastructural alterations were investigated with transmission electron microscope (TEM). Sperm morphology seemed to be affected more after cryopreservation in samples obtained from smokers. TEM investigations showed alteration in integrity of the membranes and increased subacrosomal swelling. Before freezing, the increase in DNA fragmentation rate in smokers was not statistically significant compared to that of nonsmokers. However, after thawing, the DNA fragmentation rates were significantly high in both smokers and nonsmokers compared to their respective rates before freezing. The extent of the increase in DNA fragmentation rate was significantly higher in smokers after thawing compared to that of nonsmokers. In conclusion, cryopreservation causes alterations in integrity of the membranes and increases DNA fragmentation, thus triggering relatively negative effects on the sperm samples of smokers compared to that of nonsmokers.

Key Words: Sperm, cryopreservation, smoking, DNA fragmentation, ultrastructure

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Sigara içiminin özellikle akciğer kanseri başta olmak üzere diğer kanser çeşitleri, solunum hastalıkları, kalp ve damar hastalıkları gibi hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Sigara içimi ile ilgili önemli risklerden bir diğeri de erkek ve kadın üreme sağlığını olumsuz bir şekilde etkileyen infertilitedir. En fazla üreme çağında erkekler tarafından kullanılan sigara, içerdiği toksik kimyasallar mutajen ve kanserojen maddelerden dolayı sperm üzerinde bozukluklar meydana getirebildiği bilinmektedir (Zenses 2000).

Sperm kriyoprezervasyonu 1980'li yıllardan itibaren protokollerin geliştirilmesi sayesinde in vitro fertilizasyon'da (IVF) rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır (Cohen et al 1997). Dünyada donör inseminasyonlarında kullanılmakla birlikte ülkemizde özellikle kanser tedavisi gibi üreme fonksiyonlarına zararlı etki yapabilcek tedaviler öncesi sıklıkla başvurulanan bir yöntemdir. Cerrahi girişimler ve buna eşlik eden radyoterapi/kemoterapi uygulamaları testiküler yetmezlik veya ejakülatuar disfonksiyonlara neden olabilir.

Kriyoprezervasyon sırasında spermier fiziksel ve kimyasal strese maruz kalırlar, plazma membranı lipid yapısı değişir, baş büyüklüğünde azalma meydana gelir, ve fosfotidilserin çıkışı gerçekleşir (Schiller, Arnhold, Glander ve Arnold 2000, Buhr, Canvin ve Bailey 1989, Gravance, Vishwanath, Pitt, Garner ve Casey 1998, Glander ve Schiller 1999).

Apoptozis, hücrelerin yaşamları boyunca yapım-yıkım dengesini ayarlayan, vücutta gereksiz ya da uyuşmayan hücreleri ortadan kaldıran programlanmış hücre ölümü biçimidir. Apoptozise bağlı olarak meydana gelen en belirgin değişiklikler, fosfotidilserin çıkışı ve DNA fragmantasyonudur (Bratton, Fadok, Kailey, Guthrie ve Henson 1997). Apoptoziste DNA fragmantasyonu, hücre morfolojisindeki ultrasütrüktürel değişikliklerle ilişkilidir. Ejakülat spermierindeki apoptozisin karakteristik özellikleri; kromatin, mitokondri, nükleus membranı ve plazma membranı anormalliklerinin ultrastrüktürel olarak görülmesi, sitoplazmik vakuol ve apoptotik cisimlerin oluşumudur (Baccetti, Collodel ve Piomboni 1996).

Literatürde ağırlıklı olarak kriyoprezervasyonun sperm üzerine ve sigara kullanımının sperm parametreleri üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Sigara içenlerin spermlerinde kriyoprezervasyonun kullanılması ve bu iki olgunun birbiriyle olan ilişkisiyle ilgili araştırmaların yetersiz olduğu görölmektedir.

Bu çalışmanın amacı, kısa ve uzun süreli kriyoprezervasyonun sigara kullanımına bağlı olarak sperm parametrelerini, morfolojisini, ince yapısını ve DNA fragmantasyonu oranını etkileyip etkilemediği histolojik parametreler eşliğinde değerlendirmektir. Kriyoprezervasyon uygulamasının zamana bağlı olarak sperm morfolojisi ve olgunluğu üzerinde etkileri ışık mikroskopik tekniklerle, sperm ince yapısındaki etkileri elektron mikroskopik tekniklerle ve sperm kromatin yapısındaki DNA fragmantasyonu oranı üzerine olan etkileri TUNEL yöntemiyle gösterilecektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Spermatogenez

Spermatogenez, primitif germ hücrelerinin olgun spermelere dönüşmesini sağlayan bir süreçtir. Germ hücrelerinin olgunlaşması pubertede başlayıp yaşlılık dönemine kadar devam eder. Puberteyle birlikte spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlarlar ve tip A spermatogonyumları oluştururlar. Tip A spermatogonyumların üretiminin başlaması spermatogenezin başlamış olduğunu gösterir. Bu hücreler belirli bir mitoz bölünme süreci sonunda tip B spermatogonyumları meydana getirirler. Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucunda primer spermatositler oluşur. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) içerirler. Oluşumlarından hemen sonra primer spermatositler birinci mayoz bölünmeye girerler ve yaklaşık 22 gün süren bir profaz evresi geçirirler. Profaz evresi sonunda mayoz bölünme hızlı bir şekilde tamamlanır ve 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren sekonder spermatositler oluşur. İkinci mayoz bölünmeyle birlikte sekonder spermatositler spermatidleri meydana getirirler. Tip A spermatogonyumların kök hücre topluluğundan ayrılmalarını takiben çoğalıp farklılaşarak spermatidleri oluşturmalarıyla sitokinez tamamlanmış olur. Bu aşamada tüm hücreler birbirleriyle ilişkilerini koruyan ince sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı haldedirler. Ayrıca bu hücreler farklılaşma süreci boyunca Sertoli hücrelerinin sitoplazmadaki girintilerine gömülü olarak bulunurlar. Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde gelişmekte olan germ hücrelerini koruma, besleme ve desteklemede görev yaparlar.

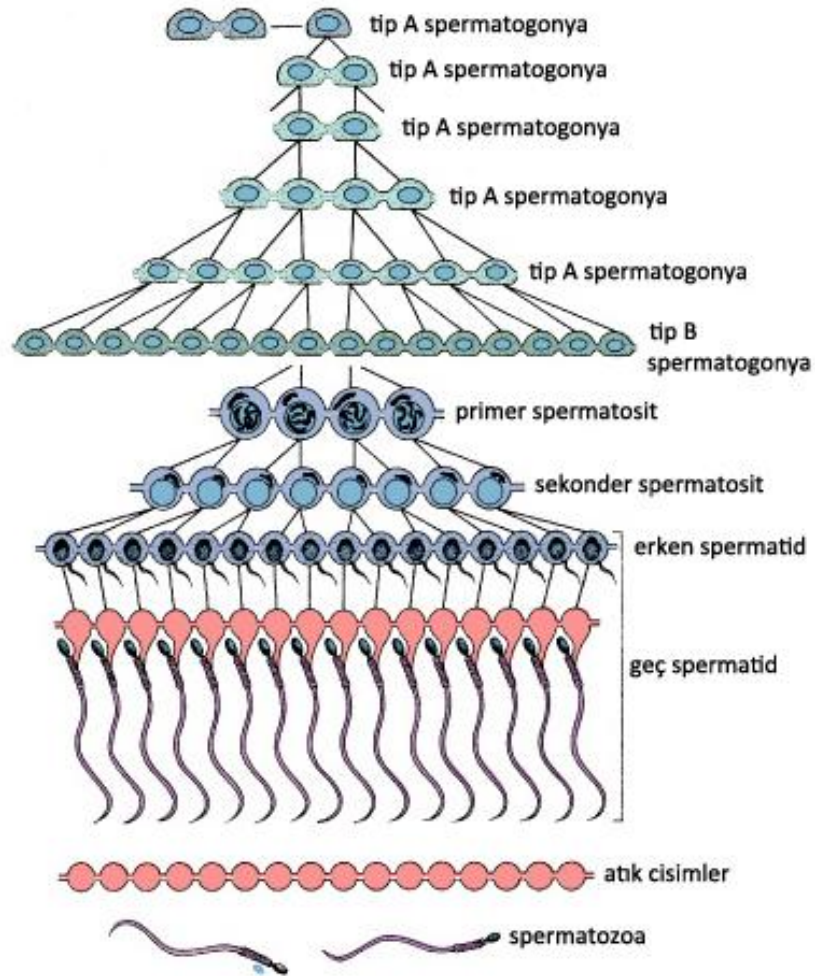
Spermiyogenez, spermatidlerin yeni bir bölünme olmaksızın belirli değişimler geçirerek olgun sperme dönüşme sürecidir. Bu değişimler üç aşamada gerçekleşir (Sadler 2005);

a. Golgi Fazı: Bu aşamadaki spermatid, içerisinde nükleus, Golgi kompleksi, mitokondriler, ribozom ve düz yüzlü endoplazmik retikulum içeren bir sitoplazmaya sahiptir. Golgi kompleksinde daha sonraki aşamalarda akrozomu oluşturacak olan proakrozomal granüller adı verilen granüller birikir ve

akrozomal granülü oluşturur. Sperm hareketini sağlayacak olan flagellum bu aşamada oluşmaya başlar.

b. Akrozomal Faz: Akrozomal granül, nükleusun ön tarafını kaplayacak şekilde yayılır ve akrozomu meydana getirir. Nükleus uzar ve daha yoğun bir hal alır. Bir tane sentriyol gelişerek flagellumu oluşturur. Sperm hareketi için enerji kaynağı olan mitokondriler, oluşan flagellumun proksimal kısmında toplanırlar ve spermın orta kısım denilen bölümünü meydana getirirler.

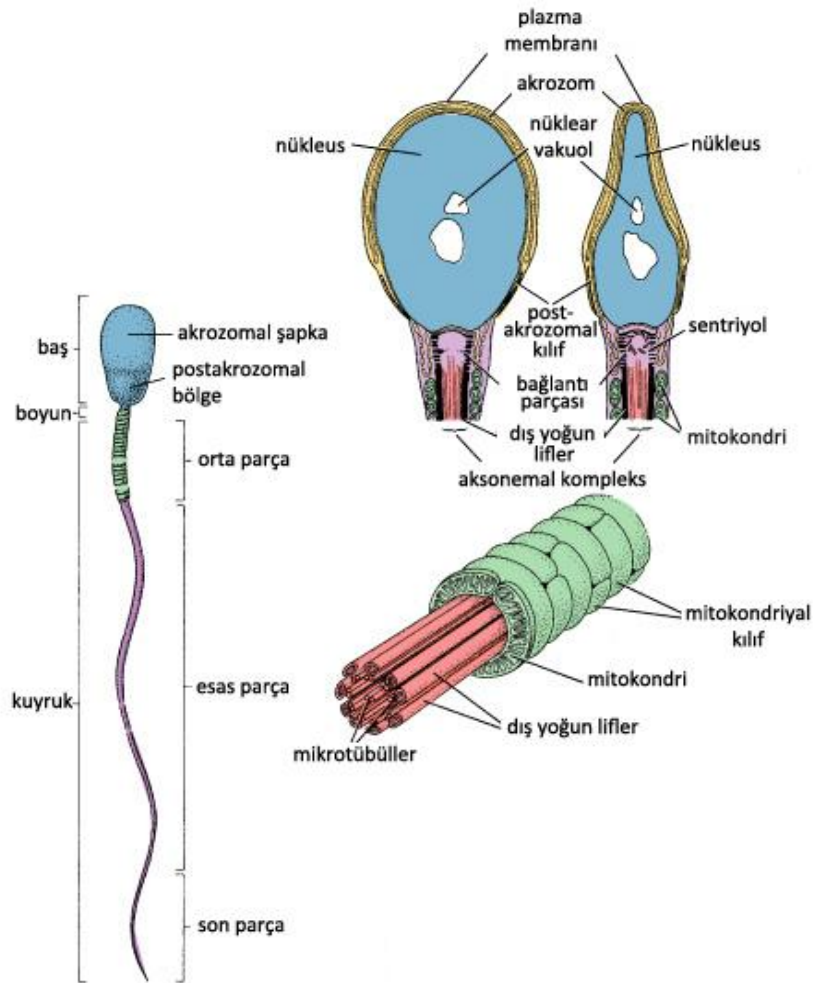
c. Olgunlaşma Fazı: Tüm organellerin belirli bir düzen almasından sonra geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve olgunlaşmış spermier seminifer tübül lümenine salınırlar.



Şekil 1: Spermatojenik hücre serisinin şematik gösterimi (Ross ve Romrell 2006).

Spermler seminifer tübül lümeninden pasif taşıma yoluyla, depolanıp işlevsel olarak olgun hale gelecekleri epididimise geçerler. Buradan da vas deferens yardımıyla üretraya ulaşırlar. Spermatogonyumun olgun sperm haline gelmesi için gereken süre yaklaşık 64 gündür.

Olgun sperm baş ve kuyruktan oluşur. Baş kısmı, ortalama 5 µm büyüklüğündedir, haploid nükleus ve nükleusun ön tarafını kapsayacak şekilde fertilizasyon sırasında gerekli olacak enzimleri taşıyan akrozomu içerir. Sperm hareketini sağlayan kuyruk yaklaşık olarak 50 µm uzunluğundadır ve orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Orta parçada, kuyruğun diğer kısımlarından farklı olarak, hareket için gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondriler bulunur (Junqueira, Carneiro ve Kelley 2006).



Şekil 2: İnsan sperminin şematik gösterimi (Ross ve Romrell 2006).

Spermiyogenez sırasında nükleusta meydana gelen ana değişimlerden biri de haploid nükleusta bulunan histonların arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirmesi olayıdır. Protaminler %60'ı arjininden yapılı küçük proteinlerdir. Bu değişim sonucunda nükleusta transkripsiyon sona ererek sperm genomik DNA'sını stabilize eder ve korur (Peschon, Behringer, Brinster ve Palmiter 1987, Kierszenbaum AL 2006).

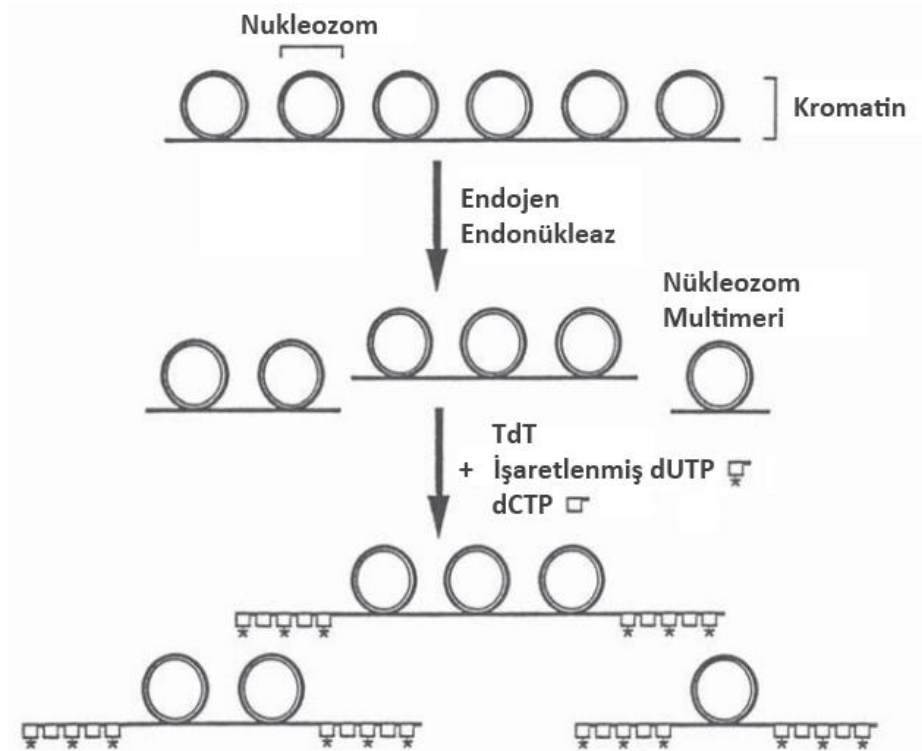
4.2. Apoptozis

Apoptozis, hücrelerin yaşamları boyunca yapım-yıkım dengesini ayarlayan, vücutta gereksiz ya da uyuşmayan hücreleri ortadan kaldıran programlanmış hücre ölümü biçimidir. Bu süreçte hücre morfolojisi tamamen değişmektedir. İlk olarak gerçekleşen hücre büzüşmesini takiben, kromatin parçalanması, membran kabarcıklanması, nüklear yoğunlaşma ve son olarak fagosite edilebilen apoptotik cisimlere bölünme gerçekleştiği görülmektedir (Virginia 1999).

Apoptozis, patolojik bir hücre ölümü olan nekrozdan farklıdır. Apoptozisin nekrotik hücre ölümünden çeşitli morfolojik ve biyokimyasal farklılıkları vardır. Apoptoziste sitoplazmanın parçalanma sürecinde oluşan kabarcıklar plazma zarı ile korunmuş durumdadırlar. Bu kabarcıklar makrofajlar tarafından fagosite edilirler, ancak herhangi bir yangısal cevap gerçekleşmez. Nekrozda ise hücre şişer, organellerin hacmi artar ve sonuçta patlayarak içeriği hücre dışına atılır. Makrofajlar nekrotik hücre kalıntılarını fagosite ederler ve yangısal cevap oluşmasını sağlayacak moleküller salgırlar (Wijsman et al 1993).

Apoptozise bağlı olarak meydana gelen en belirgin değişiklikler; fosfotidilserin çıkışı ve DNA fragmentasyonudur (Bratton, Fadok, Kailey, Guthrie ve Henson 1997). Apoptoziste DNA fragmentasyonu, hücre morfolojisindeki ultrasüruktürel değişikliklerle ilişkilidir. Ejakülat spermelerindeki apoptozisin karakteristik özellikleri; kromatin, mitokondri, nükleus membranı ve plazma membranı anormalliklerinin ultrastrüktürel olarak görülmesi, sitoplazmik vakuol ve apoptotik cisimlerin oluşumudur (Baccetti, Collodel ve Piomboni 1996).

Apoptozisde meydana gelen DNA fragmentasyonunu göstermenin bir yolu da TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transpherase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) metodudur. TUNEL metodu, apoptozisin ilk aşamalarında açığa çıkan DNA'nın serbest 3'OH uçlarının kimyasal olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nükleotidler bağlanarak gösterilmesi prensibine dayanır. İşaretlenmiş nükleotidlerin, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak enzimatik olarak DNA'nın 3'OH uçlarına bağlanması sağlanır. İşaretli nükleotidlerin TdT ile bağlanmalarının ardından, DNA fragmentasyonu sonucunda apoptotik cisimciklerde çok yüksek oranda bulunan 3'OH uçlarının hassas ve spesifik boyanması sağlanır ve bu yapılar immünohistokimyasal veya immünofloresan tekniklerle kolayca görülebilir (Lovelace, Zhang, Vaneg ve Collier 1996, Wijsman et al 1993).



Şekil 3: Kırık kromatin yapısının TUNEL metoduyla işaretlenmesi (Virginia 1999).

4.3. Dondurma-Çözme (Kriyoprezervasyon)

Kriyoprezervasyonun genel prensibi; dondurulacak materyalin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içinde -196°C'de

depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak dondurulan materyalin canlılığını sürdürebileceği fizyolojik ortamlara geçirilmesidir. Kriyoprezervasyon işlemi sırasında canlılığı etkileyebilecek önemli faktörler dondurulan materyal türü, kullanılan kimyasallar ve dondurma-çözme yöntemidir. Materyalin düşük ısılarda soğutulması ve çözme işleminde fizyolojik ısı ve ortama döndürülmesi dikkatle yapılması gereken aşamalardır (Schroeder, Champlin, Mobraaten ve Eppig 1990). Optimal çözme ısısı dondurulan materyale, kullanılan kriyoprotektanların özelliğine ve hücrelerin içerdiği su miktarına göre ayarlanmalıdır.

Kriyoprotektanlar, dondurma işlemi sırasında koruyucu özelliğe ve yüksek oranda H₂ bağlama kapasitesine sahiplerdir. Kriyoprotektanların koruyucu özelliklerini göstermeleri için her zaman hücre içine girmelerine gerek yoktur. Çünkü hücrede harabiyetin en hızlı ve etkili meydana geldiği yer hücre zarıdır. Kriyoprotektanlar hücre içine geçip geçmemelerine göre, intrasellüler (permeabl) ve ekstrasellüler (nonpermeabl) olmak üzere ikiye ayrılır (Delilbaşı 1997).

Permeabl ajanların kullanımı, dondurma işlemi sırasında hücre içerisinde oluşabilecek buz kristallerinin oluşumunu -40°C'ye kadar düşürebilmektedir. Bu ajanlar hücreyi dondurma işleminin zararlı etkilerine karşı olabildiğince korurlar. Hücre içine geçişleri solüsyonun kendi geçiş gücü, hücre içi ve hücre dışı kriyoprotektanların konsantrasyon farkı, ısı ve hücre yüzeyi ile doğru orantılıdır (Delilbaşı 1997).

Nonpermeabl ajanlar tek başlarına kriyoprotektan olarak kullanılmamalarına karşın permeabl ajanlarla birlikte kullanıldıklarında özellikle ozmotik basınç değişikliklerinden meydana gelen harabiyete karşı korucuyu etki gösterirler. Nonpermeabl ajanlar, ozmotik değişikliğe bağlı olarak gelişen su geçişine etkilidir ve çözme işleminde hücresel şişmeyi önlerler. Hücre zarından geçmeyen bu ajanlar arasında en çok sükröz kullanılır ve kullanımı sırasında ortam ısısı çok önemlidir (Delilbaşı 1997).

Sperm kriyoprezervasyonu 1980'li yıllardan itibaren protokollerin geliştirilmesi sayesinde in vitro fertilizasyon (IVF)'da rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır

(Cohen et al 1997). Dünyada donör inseminasyonlarında kullanılmakla birlikte ülkemizde özellikle kanser tedavisi gibi üreme fonksiyonlarına zararlı etki yapabilecek tedaviler öncesi sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir. Cerrahi girişimler ve buna eşlik eden radyoterapi/kemoterapi uygulamaları testiküler yetmezlik veya ejakülatuvar disfonksiyonlara neden olabilir (Delilbaşı 1997).

Gliserolün ilk olarak sperm kriyoprezervasyonunda kullanılmasından sonra diğer kriyoprotektif ajanlar sperm kriyoprezervasyonunda da kullanılmaya başlanmıştır (Gilmore, Liu, Woods, Peter ve Critser 2000). Sperm dondurulmasında da temelde permeabl ve nonpermeabl ajanlar kullanılır ve %5-10'luk gliserol en sık tercih edilen ajanlardandır (Salzbrunn, Benson, Holstein ve Schulze 1996). İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun obstrüktif ve nonobstrüktif azoospermi olgularında testislerden elde edilen spermle de uygulanabiliyor olması, zaman içinde cerrahi girişimlerle elde edilen bu spermelerin dondurularak saklanması da gündeme taşınmıştır (Delilbaşı 1997).

Kriyoprezervasyon sırasında spermeler fiziksel ve kimyasal strese maruz kalırlar, plazma membranı lipid yapısı değişir, baş büyüklüğünde azalma meydana gelir, ve fosfolipidlerin çıkışı gerçekleşir (Schiller, Arnhold, Glander ve Arnold 2000, Buhr, Canvin ve Bailey 1989, Gravance, Vishwanath, Pitt, Garner ve Casey 1998, Glander ve Schiller 1999).

4.4. Sigara ve İnfertilite

Sigara içiminin özellikle akciğer kanseri başta olmak üzere diğer kanser çeşitleri, solunum hastalıkları, kalp ve damar hastalıkları gibi hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Sigara içimi ile ilgili önemli risklerden bir diğeri de erkek ve kadın üreme sağlığını olumsuz bir şekilde etkileyen infertilitedir. En fazla üreme çağında erkekler tarafından kullanılan sigara, içerdiği toksik kimyasallar mutajen ve kanserojen maddelerden dolayı sperm üzerinde bozukluklar meydana getirebildiği bilinmektedir (Zenses 2000). Sigara içmek; sperm konsantrasyonunda (Vine, Margolin, Morrison ve Hulka 1994), motilitesinde ve sayısında azalmaya (Gandini et al 1997), morfolojisinde bozulmaya, penetrasyon yeteneğinde düşüşe ve DNA hasarının artmasına yol açabilmektedir (Terzioğlu, Yücel ve Karatay 2008).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Denek Grupları

Çalışmamızda, kontrol grubu (n=21) ve sigara içen grup (n=20) olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Kontrol grubundaki bireyler, aktif üreme döneminde olup, 20-50 yaş arası, herhangi bir sistemik hastalık, çocuk yaşlarda ateşli hastalık, testis travması ve kriptorşidizm gibi üreme fonksiyonlarını etkileyen bir hastalık geçirmemiş, kronik ilaç-madde kullanımı olmayan (antidepresan, böbrek, tansiyon ilaçları, sigara, alkol), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) laboratuvar kılavuzuna göre (World Health Organisation 1991) normospermik olan kişilerden seçilmiştir. Sigara grubu ise kontrol grubundan farklı olarak, son ≥ 6 ay süreyle günlük ≥ 20 sigara içen DSÖ laboratuvar kılavuzuna göre normospermik olan kişilerden oluşturulmuştur.

Semen örnekleri, 3 günlük cinsel perhiz sonrasında steril kaplara mastürbasyon yöntemiyle alınmıştır. Deneklerden semen örneği alınmadan önce “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” ile imzalı onayları alınmıştır. İstanbul 2 No’lu Etik Kurulu’ndan etik kurul onayı (B.30.2.İST.0.02.00.01/Yİ-864) ve çalışmanın uygunluğu ile ilgili Sağlık Bakanlığı’ndan gerekli bilgi ve onay (B.10 OTHG.0.79.00.07/11972) alınmıştır.

5.2. Motilite ve Konsantrasyon

Sperm motilitesi Makler sayma kamarası (Sefi Medical Instr., İsrail) kullanılarak dondurma işlemi öncesi ışık mikroskobu düzeyinde değerlendirilmiştir. Her bir sperm hareketi “a”, “b”, “c” veya “d” olarak DSÖ laboratuvar kılavuzuna göre belirlenmiştir (WHO 1991). Sperm konsantrasyonu belirlenmesi de semen örneği üzerinden Makler sayma kamarası kullanılarak yapılmış, 20-200 milyon/ml sperm sayısına sahip olan bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.

5.3. Sperm Dondurma-Çözme İşlemi

Herbir gruptan semen örnekleri alındıktan sonra 37°C’de 30 dk inkübe edilerek örneklerin likefiye olmaları sağlanmıştır. Likefiye işleminden sonra her bir semen örneği üç parçaya ayrılmıştır; parçalardan biri herhangi bir dondurma işlemi

uygulanmaksızın taze olarak yapılacak incelemeler için kullanılmıştır, diğer iki parça ise sırasıyla 1 ay ve 3 ay süreyle dondurulup çözüldükten sonra yapılacak olan incelemeler için kullanılmıştır.

Dondurma işlemi için semen örneği ve kriyoprotektan (MediCult, Sperm freezing medium, 10670010) 1:1 oranında karıştırılmıştır ve steril tüpler (CryoVial®, T308-2A) içerisine toplam hacim 1 ml olacak şekilde alınmıştır. Üzerlerine denek grubu ve numarası yazılan tüpler, sırasıyla, 4°C’de 20 dk, -20°C’de 20 dk ve sıvı azot seviyesinden 15 cm yükseklikte azot buharında 20 dk tutulduktan sonra sıvı azot içerisine (-196°C) yerleştirilmiştir.

Çözme işlemi, tüpler sıvı nitrojenden çıkartılıp 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 37°C su banyosunda yapılmıştır. Örnek tamamen çözüldükten sonra üzerine yıkama solüsyonu (Vitrolife, G-SPERM™ PLUS, 10107) eklenip 300xg’de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak kriyoprotektan uzaklaştırılmıştır. Çözme işlemi sonrası elde edilen sperm örnekleri morfoloji, kromatin kondensasyonu, ince yapı ve DNA fragmantasyonu değerlendirmeleri için kullanılmıştır.

5.4. Işık Mikroskopi İncelemesi

Işık mikroskopik morfolojik inceleme Diff-Quik kit (Medion Diagnostics, Germany) ile boyama sonrası yapılmıştır. Sperm örneğinden lam üzerine 10µl damlatılarak lamelle yayılıp havada kurutulmuştur. Kurutulan lam, kit içerisinde bulunan sırasıyla fiksatifin, katyonik ve anyonik boyaların içinde birer dakika bekletildikten sonra sudan geçirilip tekrar havada kurumaya bırakılmıştır. Boyanan preparatlar Olympus BX51 fotomikroskop kullanılarak 1000x büyütmede immersiyon yağı ile Kruger strick kriterlerine (Menkveld et al 1991) göre değerlendirilmiştir. Her bir örnek için 200 sperm sayılarak baş, boyun ve kuyruk yapısındaki bozukluklar kaydedilmiş ve fotoğraflanmıştır.

5.5. Sperm Kromatin Kondensasyon Tayini

Yıkama işlemi sonrası yayma preparat yapılan örnekler havada kurulduktan sonra %2,5 ‘luk 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit fiksatif ile 30 dk

muamele edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra asidik anilin mavisinde 7 dk tutulmuştur. Her bir örnek Olympus BX51 fotomikroskop ile 1000x büyütmede immersiyon yağı ile 200 sperm sayılarak normal kromatin kondensasyon gösteren ve kromatin kondensasyon bozukluğu olan sperm sayıları kaydedilmiş ve fotoğraflanmıştır.

5.6. DNA Fragmantasyonu Tayini

DNA fragmantasyonu TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak incelenmiştir. Yıkama sonrası elde edilen pellet distile su eklenerek 1200 rpm hızında 3 x 10 dk santrifüj edilmiştir, 0.075 M hipotonik KCl solüsyonu ile homojenize edildikten sonra 1200 rpm hızında 10 dk santrifüj edilmiştir ve 37°C’de 30 dk inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında metanol-asetik asit karışımı (2:1) eklenerek 1200 rpm hızında 3 x 10 dk santrifüj edilmiştir. İki lam üzerine yayma preparat yapılarak bir gece bekletilmiştir. Kurutulan lamalar 5 dk PBS’te bekletildikten sonra yükselen alkol serisinden (%70, %85, %100) geçirildikten sonra kurutulmuştur. TUNEL kitindeki 1. solüsyondan 5 µl, 2. solüsyondan 45 µl karıştırılarak, her lam üzerine 25’er µl damlatılıp lamelle kapatılmıştır. Işık almayacak şekilde 37°C’de 45 dk tutulan lamalar üzerindeki lameller kaldırıldıktan sonra PBS ile yıkanmıştır. Lamaların üzerine nükleusu göstermek amacıyla DAPI II (Abbott Molecular, U.S.A, 06J50-001) boyası damlatılarak lamelle kapatılmıştır. Olympus BX51 flouresans mikroskop ile 1000x büyütmede immersiyon yağı ile 200 hücre sayılarak DNA fragmantasyonu olan hücreler “TUNEL pozitif” olarak kaydedilmiş ve fotoğraflanmıştır.

5.7. Geçirimli Elektron Mikroskobu İncelemesi

Elektron mikroskobik incelemeler için alınan semen örneklerine likefaksiyondan sonra yıkama solüsyonu eklenerek 1500xg’de 10 dk santrifüj edilmiş ve pelletin üzerinde kalan süpernatant kısmı atılmıştır. Oluşan pellete %2,5 ‘luk 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit fiksatifi içerisinde 4°C’de 4 saat süreyle immersiyon fiksasyonu yapılmış, tamponda yıkamadan sonra, %1’lik OsO₄ ile 1 saat postfiksasyon yapılmıştır. Yükselen alkol serisinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek suyu alınmış, propilen oksitten geçirilerek 60°C’deki etüvde Epon 812’ye

gömülmüştür. Ultramikrotomda (Leica Ultracut II, Leica Microsystems GmbH; Wetzlar) alınan yarı ince kesitler (1 µm) toluidin mavisi ile boyanmıştır. Bu kesitlerde seçilen alanlardan yaklaşık 60 nm kalınlığında ince kesitler alındıktan sonra, bakır gridler üzerine alınarak uranil asetat, kurşun sitrat ile kontrastlama yapılmıştır. Kontraslanan gridler, JEOL 1200 SX TEM ile baş, boyun ve kuyruk değişiklikleri açısından incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

5.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analizler için paired t-test ve ANOVA testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Motilite ve Konsantrasyon

DSÖ laboratuvar kılavuzuna göre yapılan motilite değerlendirmesinde, kontrol grubunda dondurma işlemi öncesi “a+b” toplam motilite oranı 58.71 ± 3.17 iken sigara grubunda bu oran 55.01 ± 3.17 olarak belirlenmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

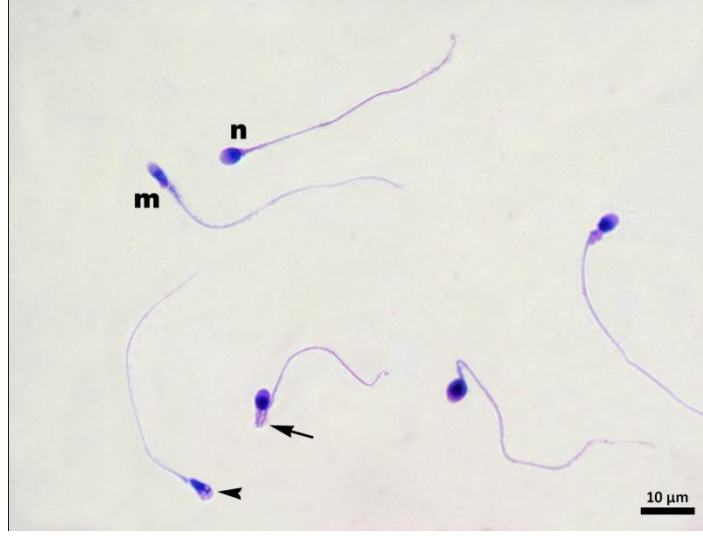
6.2. Işık Mikroskopi Bulguları

Morfolojik değerlendirme Diff-Quik ve toluidin mavisi ile boyama sonrası yapılmıştır. Kontrol grubu spermelerinde dondurma işlemi öncesinde normal morfolojide spermelerin yanı sıra, akrozomal bozukluğa sahip, artmış vakuollü, büyük, küçük, pin-head, amorf özellikte baş hasarı olan, boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren ve boyun kırıkları olan, kısa, uzun ve çift kuyruklu olan spermeler de gözlenmiştir (Resim 1, 2).

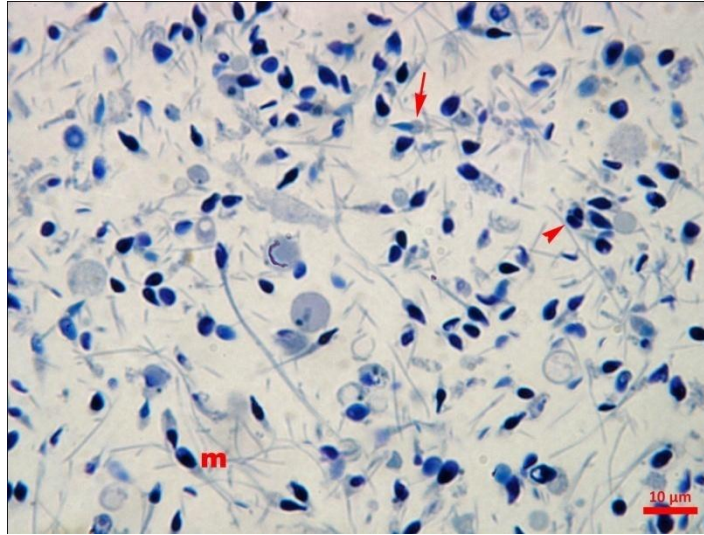
Kontrol grubu spermelerinde dondurma işleminden 1 ay (Resim 3, 4) ve 3 ay (Resim 5, 6) sonra çözülen spermelerde normal morfolojiye sahip spermelerin sayısında önemli ölçüde azalma gözlenirken, dondurma öncesi gözlenen morfolojik hasara sahip spermelerin yanı sıra çok sayıda baş hasarı, kuyruğu kopmuş ya da kıvrılmış spermeler de gözlenmiştir.

Sigara grubu spermelerinde dondurma işlemi öncesinde kontrol grubu ile benzer şekilde normal morfolojide spermelerin yanı sıra, akrozomal bozukluğa sahip, vakuollü, büyük, küçük, pin-head, amorf özellikte baş hasarı olan, boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren ve boyun kırıkları olan, kısa, uzun ve çift kuyruklu olan spermeler de gözlenmiştir (Resim 7, 8).

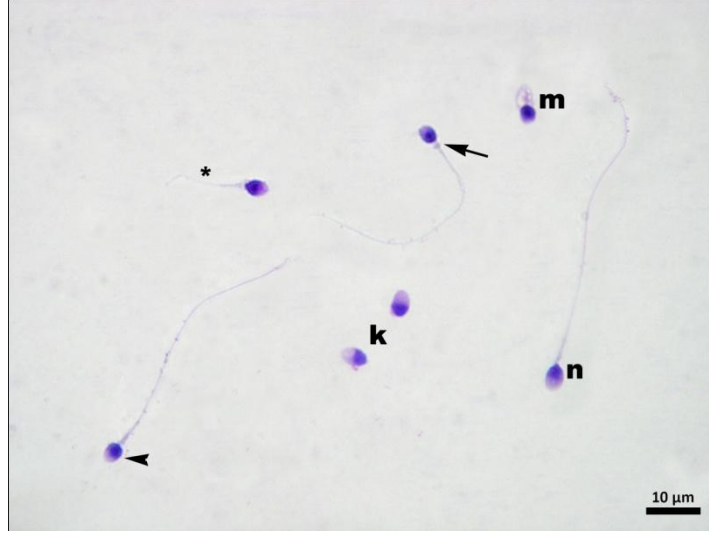
Sigara grubu spermelerinde kontrol grubuna benzer şekilde dondurma işleminden 1 ay (Resim 9, 10) ve 3 ay (Resim 11, 12) sonra çözülen spermelerde normal morfolojiye sahip spermelerin sayısında önemli ölçüde azalma gözlenirken, dondurma öncesi gözlenen morfolojik hasara sahip spermelerin yanı sıra çok sayıda baş hasarı olan, kuyruğu kopmuş ya da kıvrılmış spermeler gözlenmiştir.



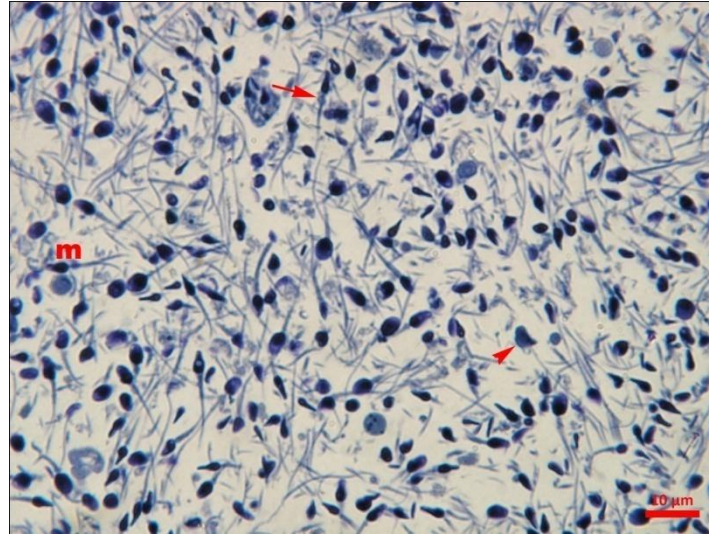
Resim 1: Kontrol grubunda dondurma öncesi, spermlerdeki morfolojik bozukluklar görülmektedir. Normal morfolojideki sperm (n), akrozom yapısı ve morfolojisi bozuk olan sperm baş hasarı (▴), boyun kırığı olan sperm (→), baş ve boyun hasarı olan sperm (m). Diff-Quik boyası.



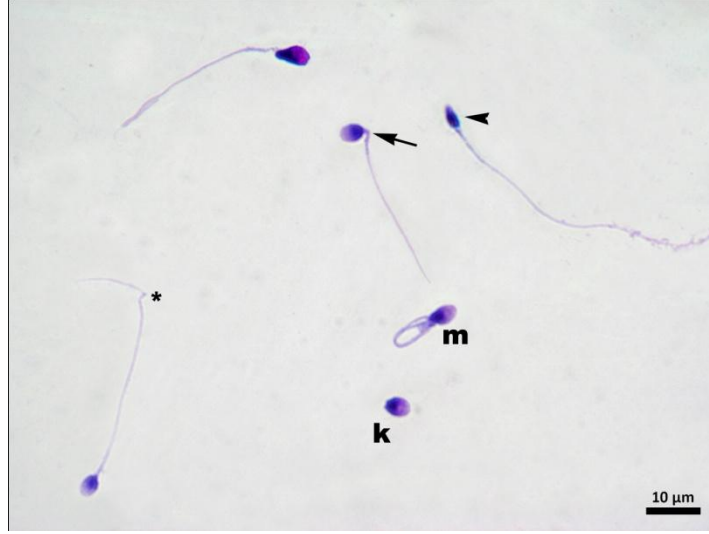
Resim 2: Kontrol grubunda dondurma öncesi, yarı-ince kesitlerde spermlerdeki morfolojik bozukluklar görülmektedir. Büyük başlı sperm (▴), boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren sperm (→), baş ve boyun hasarı olan sperm (m). Toluidin mavisi boyası.



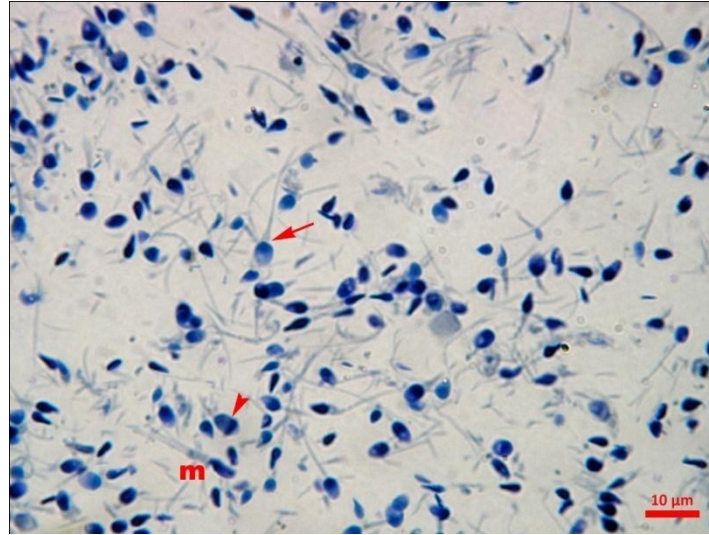
Resim 3: Kontrol grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde morfolojik bozukluklar görülmektedir. Normal morfolojideki sperm (n), yuvarlak başlı ve akrozom oranı değişmiş sperm (▴), kuyruğu kopmuş sperm (k), boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren sperm (→), kısa kuyruklu sperm (*), baş boyun ve kuyruk hasarı olan sperm (m). Diff-Quik boyası.



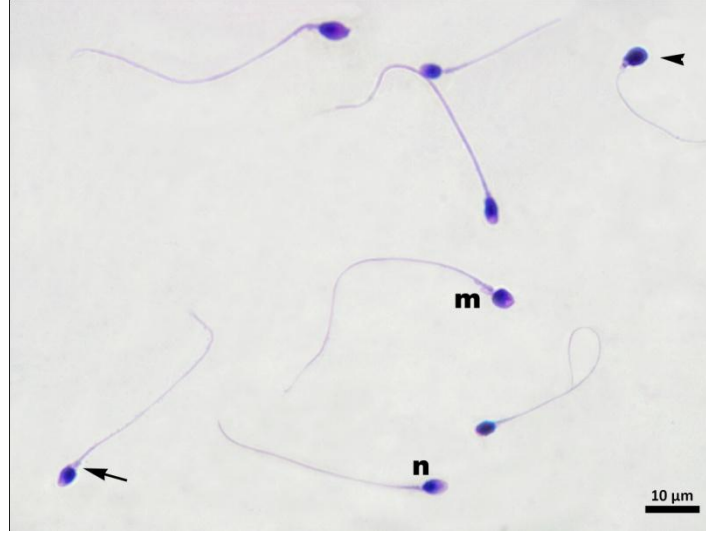
Resim 4: Kontrol grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde, yarı-ince kesitlerde morfolojik bozukluklar görülmektedir. Amorf yapıda baş hasarı içeren sperm (▴), boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren sperm (→), baş ve boyun hasarı içeren sperm (m). Toluidin mavisi boyası.



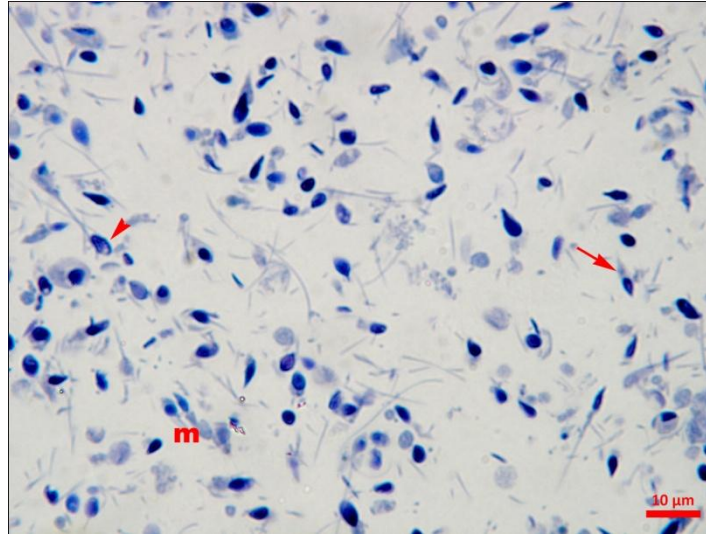
Resim 5: Kontrol grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözölen spermlerdeki morfolojik bozukluklar görölmektedir. Küçük başlı sperm (►), kuyruğu kopmuş sperm (k), boyun kırığı olan sperm (→), kuyruk kırığı olan sperm (*), baş, boyun hasarı ve kıvrık kuyruğu olan sperm (m). Diff-Quik boyası.



Resim 6: Kontrol grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözölen spermelerde yarı-ince kesitlerde morfolojik bozukluklar görölmektedir. Amorf özellikte başı olan sperm (►), boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren sperm (→), baş boyun ve kuyruk hasarı olan sperm (m). Toluidin mavisi boyası.



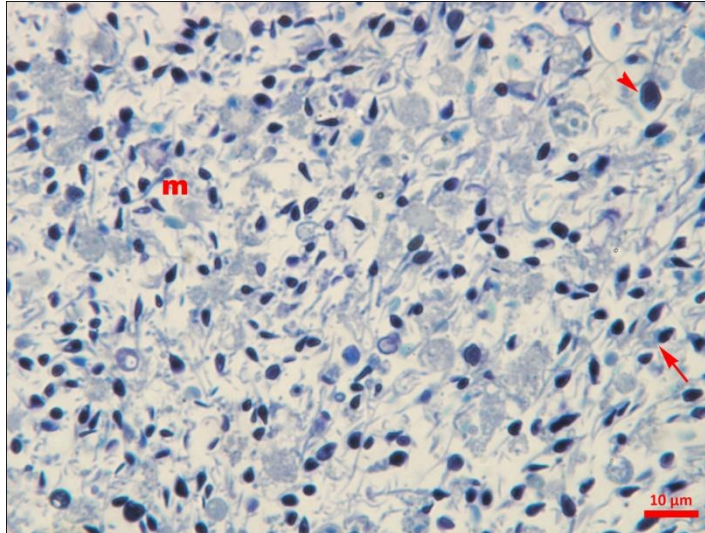
Resim 7: Sigara grubunda dondurma öncesi, spermlerdeki morfolojik bozukluklar görülmektedir. Normal morfolojideki sperm (n), akrozom yapısı ve morfolojisi bozuk olan sperm baş hasarı (►), boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren sperm (→), baş ve boyun hasarı olan sperm (m). Diff-Quik boyası.



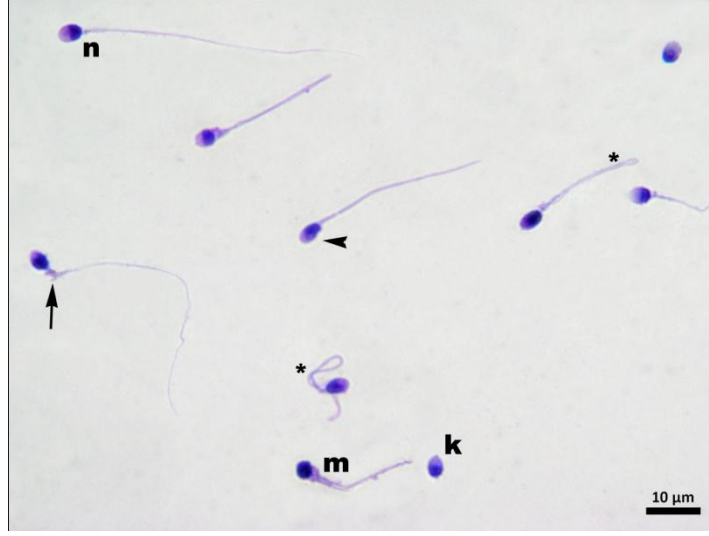
Resim 8: Sigara grubunda dondurma öncesi, yarı-ince kesitlerde spermlerdeki morfolojik bozukluklar görülmektedir. Akrozom hasarı olan sperm (►), boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren sperm (→), baş ve boyun hasarı olan sperm (m). Toluidin mavisi boyası.



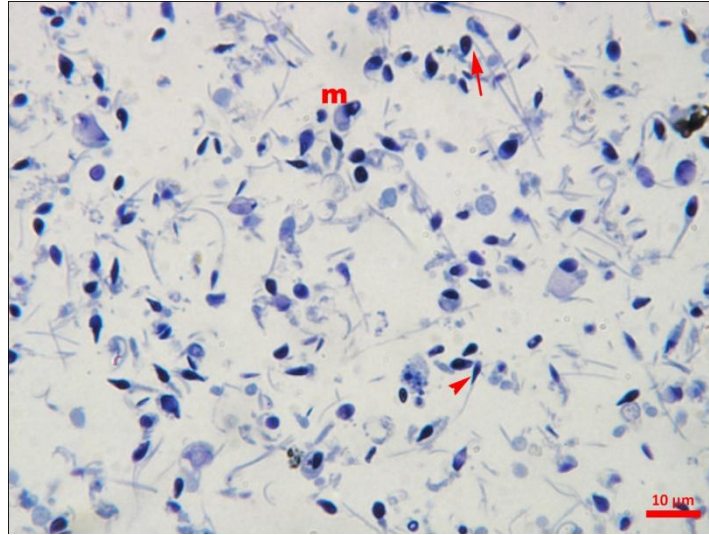
Resim 9: Sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözölen spermelerde morfolojik bozukluklar görölmektedir. Normal morfolojideki sperm (n), baş morfolojisi ve akrozom oranı değişmiş sperm (▶), boyun kırığı olan sperm (→), kıvrılmış kuyruğu olan sperm (*), baş boyun ve kuyruk hasarı olan sperm (m). Diff-Quik boyası.



Resim 10: Sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözölen spermelerde yarı-ince kesitlerde morfolojik bozukluklar görölmektedir. Büyük başlı sperm (▶), boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren sperm (→), baş ve boyun hasarı içeren sperm (m). Toluidin mavisi boyası.



Resim 11: Sigara grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözölen spermelerde morfolojik bozukluklar görölmektedir. Normal morfolojideki sperm (n), baş bölgesinde vakuol içeren morfolojisi değişmiş sperm (►), kuyruğu kopmuş olan sperm (k), boyun kırığı olan sperm (→), kıvrılmış kuyruğu olan sperm (*), baş boyun ve kuyruk hasarı olan sperm (m). Diff-Quik boyası.



Resim 12: Sigara grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözölen spermelerde yarı-ince kesitlerde morfolojik bozukluklar görölmektedir. Küçük başlı sperm (►), boyun kırığı olan sperm (→), baş ve boyun hasarı içeren sperm (m). Toluidin mavisi boyası.

6.3. Işık Mikroskopik Değerlendirmenin İstatistiksel Analizi

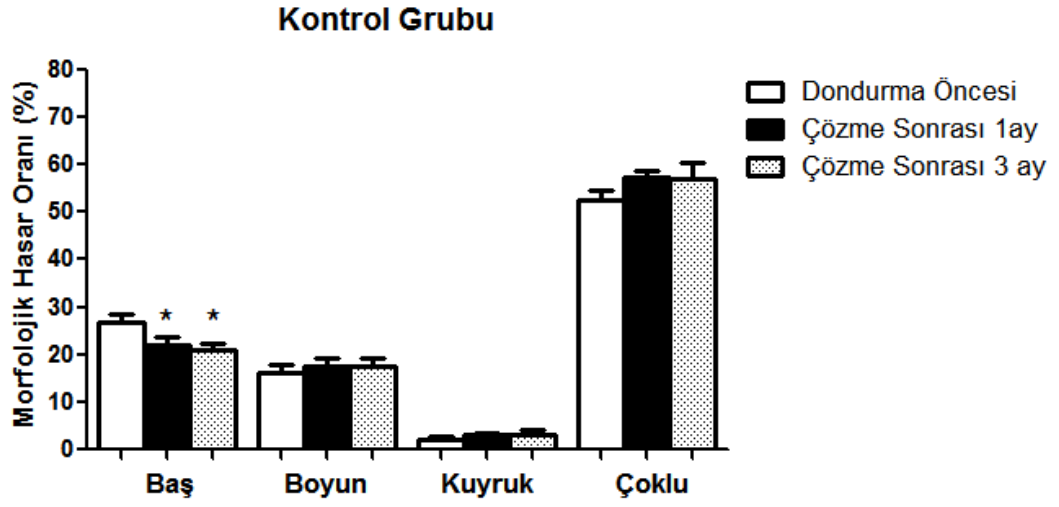
Kontrol grubunda dondurma işlemi öncesi baş hasarı 26.85 ± 1.550 iken dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 21.95 ± 1.778 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 20.80 ± 1.381 olmuştur. Kontrol grubunda dondurma işlemi öncesi boyun hasarı 16.25 ± 1.712 iken dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 17.70 ± 1.667 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 17.70 ± 1.578 olmuştur. Kontrol grubunda dondurma işlemi öncesi kuyruk hasarı 2.250 ± 0.403 iken dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 3.100 ± 0.552 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 3.20 ± 0.800 olmuştur. Kontrol grubunda dondurma işlemi öncesi çoklu hasar 52.35 ± 2.038 iken dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 57.15 ± 1.585 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 56.80 ± 3.438 olmuştur (Şekil 1).

Sigara grubunda dondurma işlemi öncesi baş hasarı 27.70 ± 1.418 iken dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 20.25 ± 1.718 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 19.27 ± 1.954 olmuştur. Sigara grubunda dondurma işlemi öncesi boyun hasarı 16.90 ± 1.216 iken dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 19.95 ± 1.516 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 20.09 ± 1.232 olmuştur. Sigara grubunda dondurma işlemi öncesi kuyruk hasarı 2.80 ± 0.479 iken dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 2.55 ± 0.467 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 3.63 ± 0.636 olmuştur. Sigara grubunda dondurma işlemi öncesi çoklu hasar 50.50 ± 1.876 iken dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 56.55 ± 2.173 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 56.45 ± 1.615 olmuştur (Şekil 2).

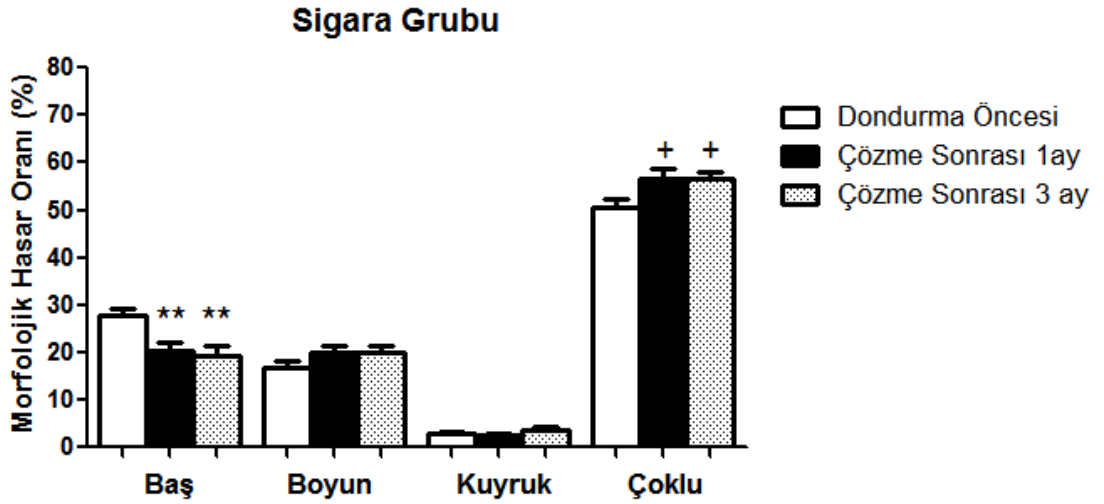
Kontrol grubu dondurma öncesi sperm baş hasarı ile dondurma işleminden 1 ay ($p < 0.05$) ve 3 ay ($p < 0.05$) sonra çözülen spermelerdeki baş hasarı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüş olduğu görülmüştür. Dondurma öncesi sperm çoklu hasarı ile dondurma işleminden 1 ay ve 3 ay sonra çözülen spermelerdeki çoklu hasar karşılaştırıldığında artış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 1).

Sigara grubu dondurma öncesi sperm baş hasarı ile dondurma işleminden 1 ay ($p<0.01$) ve 3 ay ($p<0.01$) sonra çözülen spermlerdeki baş hasarı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşüş olduğu görülmüştür. Dondurma öncesi sperm çoklu hasarı ile dondurma işleminden 1 ay ($p<0.05$) ve 3 ay ($p<0.05$) sonra çözülen spermlerdeki çoklu hasar karşılaştırıldığında yine artış istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 2).

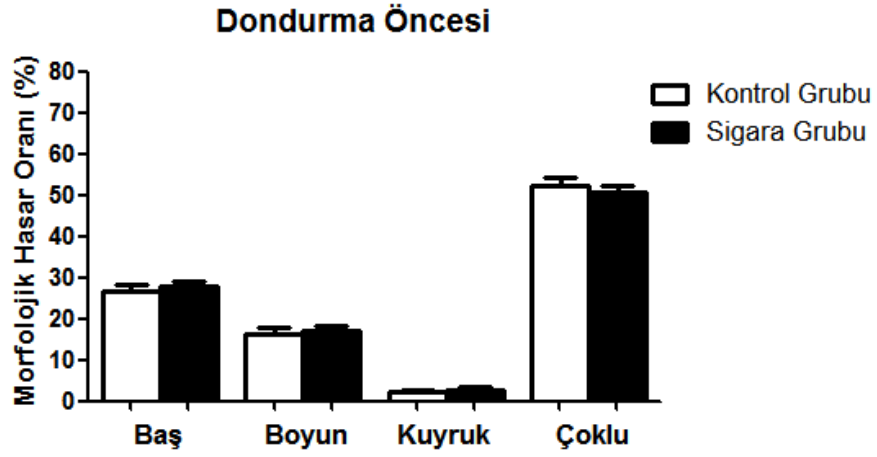
Kontrol grubu ile sigara grubu dondurma öncesi ve sonrası baş, boyun, kuyruk ve çoklu hasar yönünden karşılaştırıldığında istatistiksel bir fark bulunamamıştır (Şekil 3).



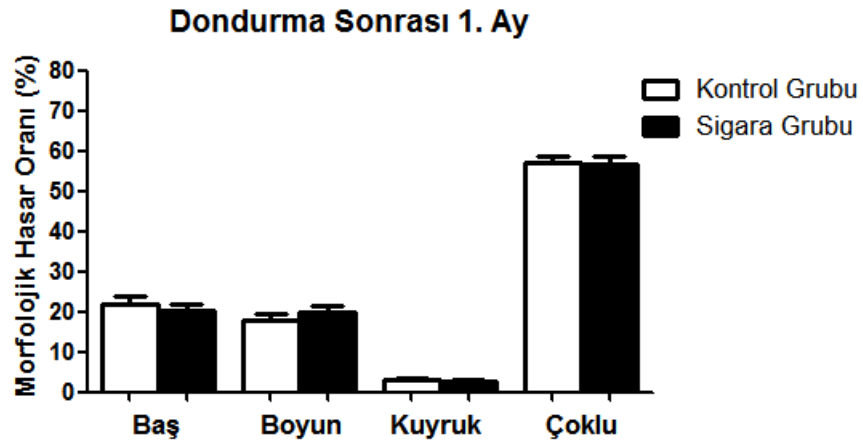
Şekil 1: Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış morfolojik hasar oranı grafiği.
*: $p < 0.05$; dondurma öncesi baş hasarı oranıyla kıyaslanmıştır.



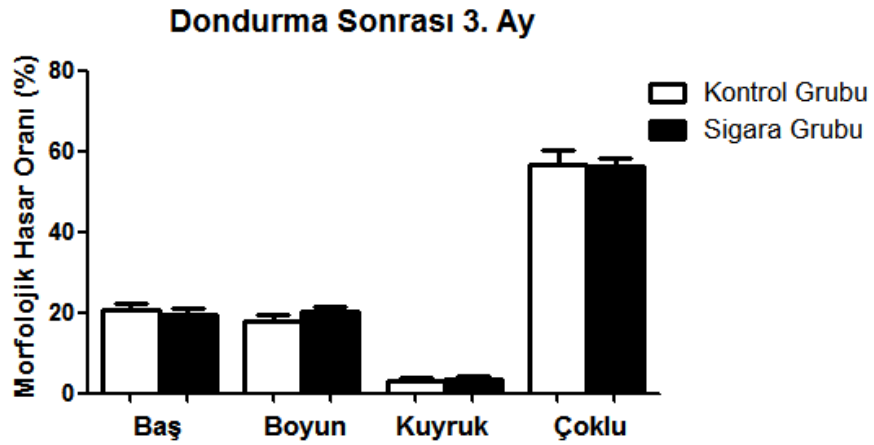
Şekil 2: Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış morfolojik hasar oranı grafiği.
**: $p < 0.01$; dondurma öncesi baş hasarı oranıyla kıyaslanmıştır, +: $p < 0.05$; dondurma öncesi çoklu hasar oranıyla kıyaslanmıştır.



A



B



C

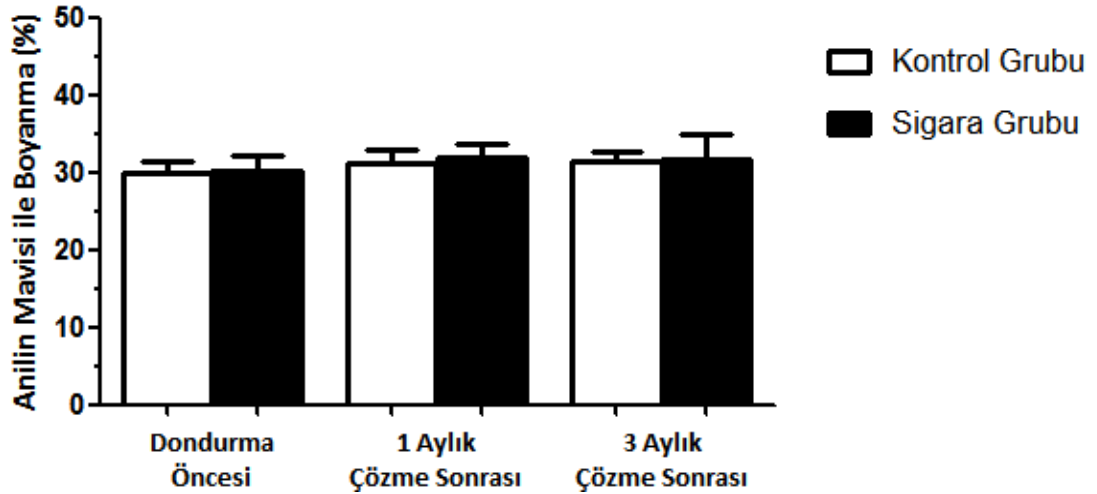
Şekil 3: Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış morfolojik hasar oranı grafiği. Dondurma öncesi (A), dondurma işleminden 1 ay (B) ve 3 ay (C) sonra çözülen spermler. Gruplar arasında istatistiksel fark yoktur.

6.4. Sperm Kromatin Kondensasyonu Tayini

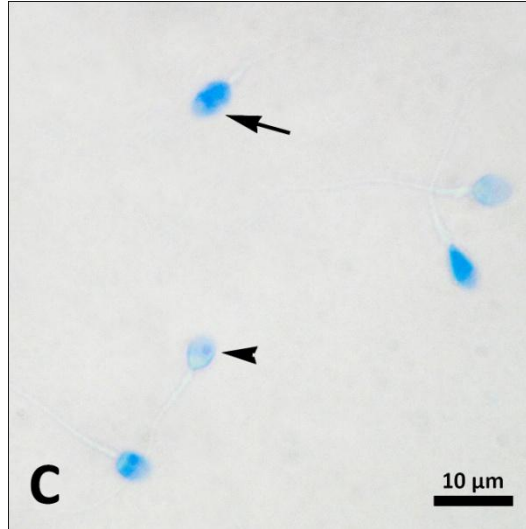
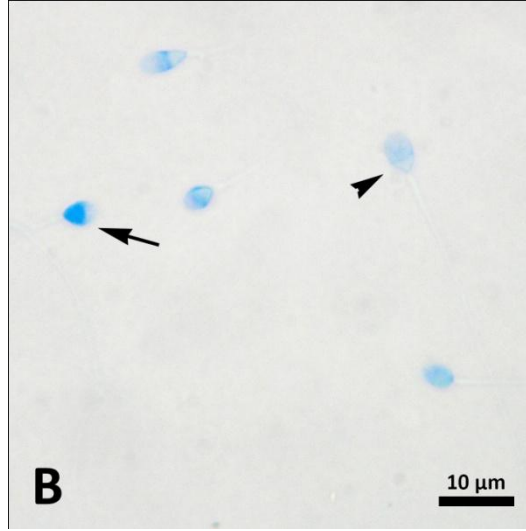
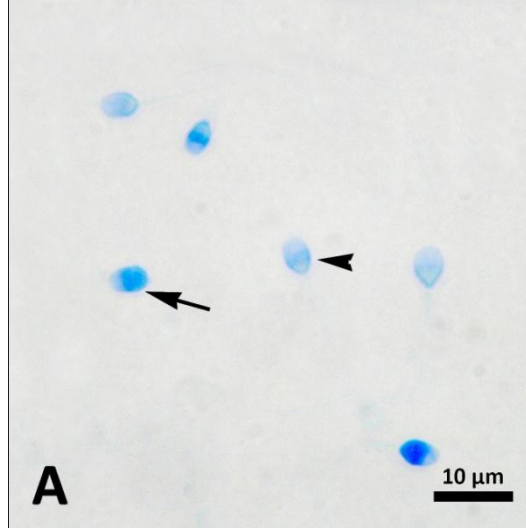
Sperm kromatin kondensasyonunu tayin etmek amacıyla sperm yayma preparatları anilin mavisiyle boyanmışlardır. Kontrol ve sigara grubunda dondurma öncesi (Resim 13A, 14A) ve dondurma sonrası 1 ay (Resim 13B, 14B) ve 3 ay (Resim 13C, 14C) gruplarında sperm kondensasyonu normal olan spermier anilin mavisi ile açık mavi renkte boyanırlarken, kondensasyon defekti olan spermier koyu mavi boyalı olarak izlenmişlerdir.

6.5. Sperm Kromatin Kondensasyonu Tayininin İstatistiksel Analizi

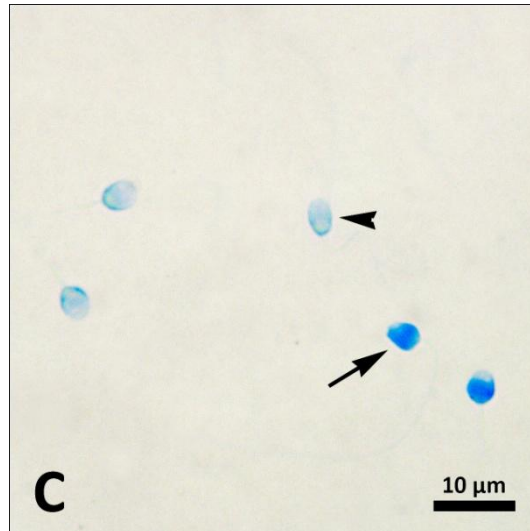
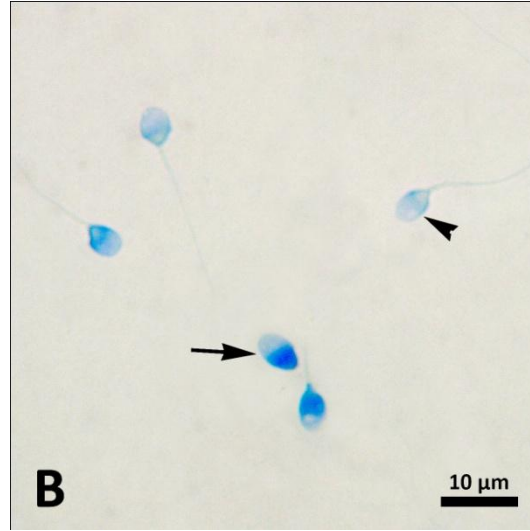
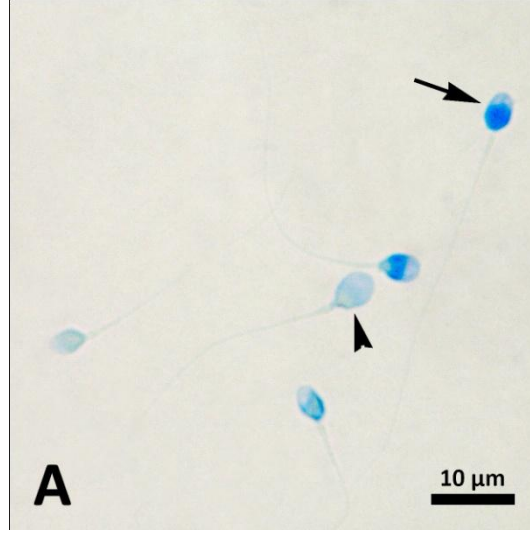
Kontrol grubunda dondurma öncesi decondensasyon oranı 29.95 ± 1.373 iken dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermierde 31.20 ± 1.691 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermierde $31,33 \pm 1,386$ olmuştur. Sigara grubunda dondurma öncesi decondensasyon oranı 30.25 ± 1.942 iken, dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermierde 31.82 ± 1.867 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermierde 31.71 ± 3.194 olmuştur (Şekil 4). Gruplar arasında anilin mavisi boyama sonuçlarına göre istatistiksel fark gözlenmemiştir.



Şekil 4: Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış anilin mavisi boyanma oranı grafiği. Gruplar arasında istatistiksel fark yoktur.



Resim 13: Kontrol grubunda dondurma öncesi (A), dondurma işleminden 1 ay (B) ve 3 ay (C) sonra çözülen spermelerde normal kondensasyonlu (→) spermeler ve kondensasyon defekti (▶) olan spermeler görülmektedir. Anilin mavisi boyası.

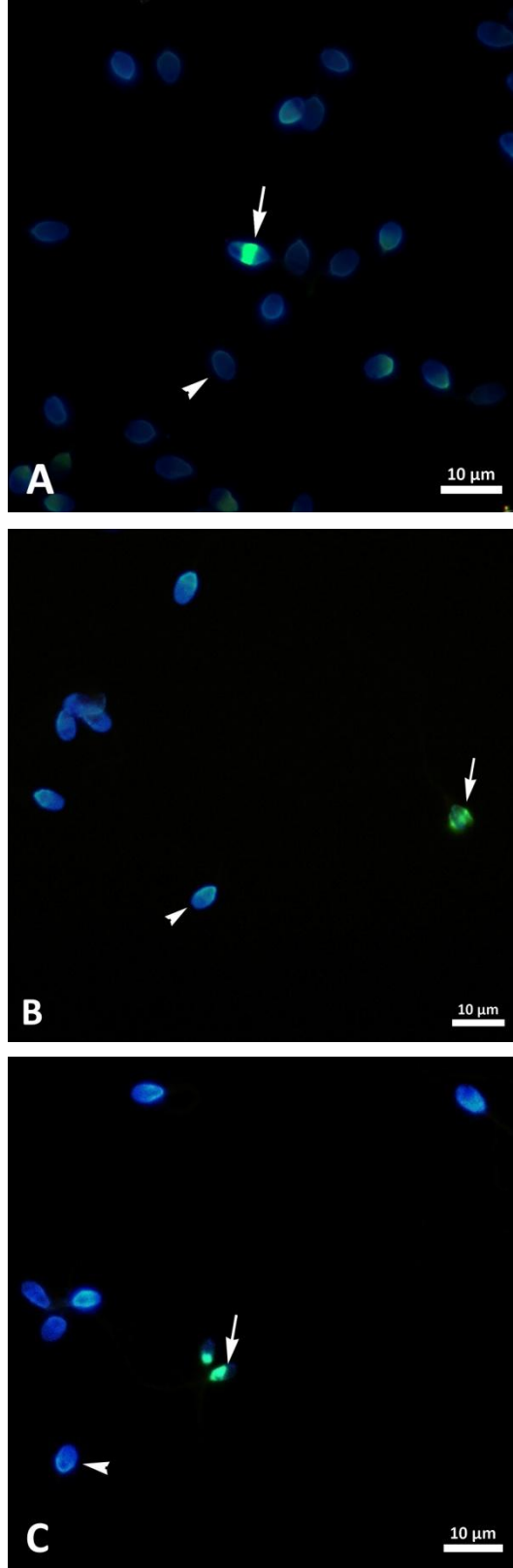


Resim 14: Sigara grubunda dondurma öncesi (A), dondurma işleminden 1 ay (B) ve 3 ay (C) sonra çözülen spermelerde normal kondensasyonlu (\rightarrow) spermeler ve kondensasyon defekti (\blacktriangleright) olan spermeler görülmektedir. Anilin mavisi boyası.

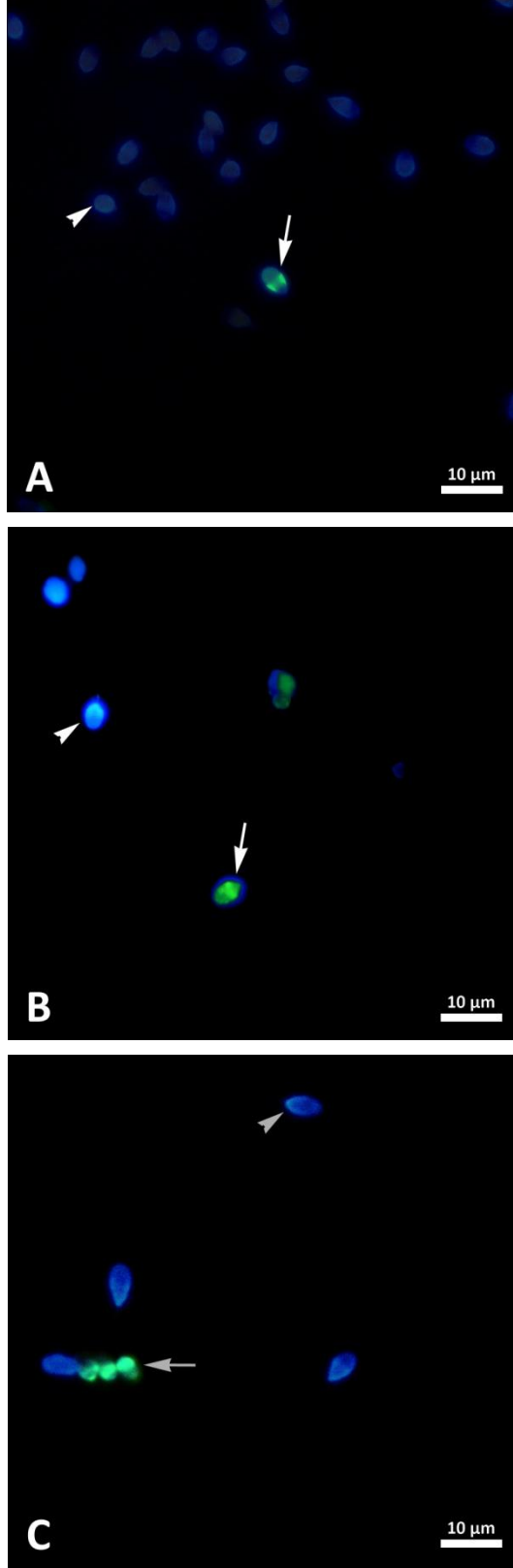
6.6. DNA Fragmantasyonu Bulguları

Kontrol grubunda dondurma işlemi öncesinde az sayıda spermde TUNEL pozitif hücreler yeşil boyalı olarak görülmüştür. TUNEL negatif olanlar DAPI II ile mavi boyalı olarak görülmüşlerdir (Resim 15A). Kontrol grubunda dondurma işleminden 1 ay (Resim 15B) ve 3 ay (Resim 15C) sonra çözülen spermelerde, dondurma işlemi öncesine oranla TUNEL pozitif sperm oranında bir artış olduğu görülmüştür.

Sigara grubunda dondurma işlemi öncesinde az sayıda spermde TUNEL pozitif hücreler yeşil boyalı olarak görülmüştür. TUNEL negatif olanlar DAPI II ile mavi boyalı olarak görülmüşlerdir (Resim 16A). Sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay (Resim 16B) ve 3 ay (Resim 16C) sonra çözülen spermelerde, dondurma işlemi öncesine oranla TUNEL pozitif sperm oranında artış görülmüştür.



Resim 15: Kontrol grubunda dondurma öncesi (A), dondurma işleminden 1 ay (B) ve 3 ay (C) sonra çözülen spermelerde TUNEL negatif (►) spermeler mavi, TUNEL pozitif (→) spermeler yeşil renkte görülmektedir. DAPI II boyası, TUNEL kiti.



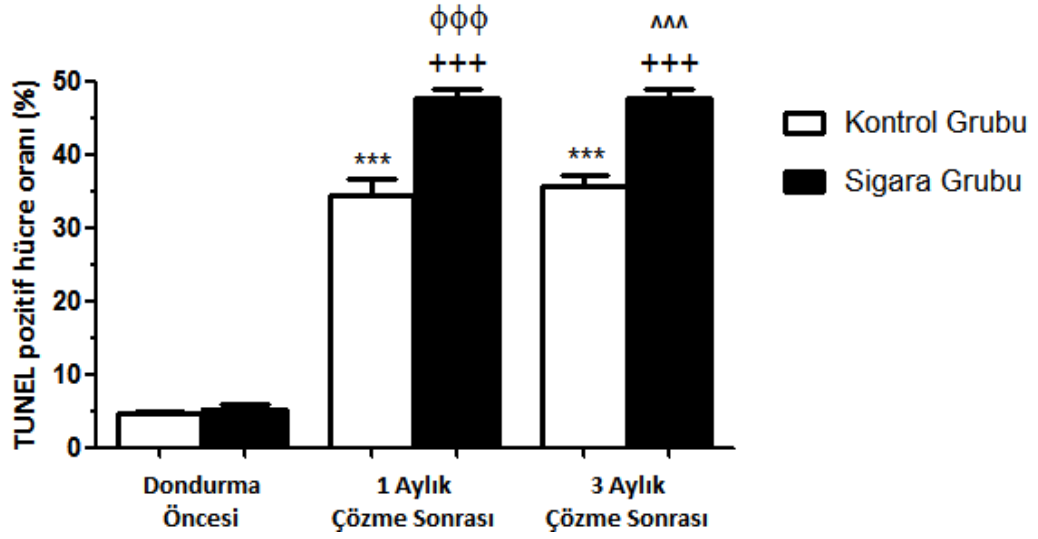
Resim 16: Sigara grubunda dondurma öncesi (A), dondurma işleminden 1 ay (B) ve 3 ay (C) sonra çözölen spermelerde TUNEL negatif (►) spermeler mavi, TUNEL pozitif (→) spermeler yeşil renkte görölmektedir. DAPI II boyası, TUNEL kiti.

6.7. DNA Fragmantasyonu Bulgularının İstatistiksel Analizi

Kontrol grubunda dondurma öncesi TUNEL pozitif sperm oranı 4.65 ± 0.337 iken, dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 34.54 ± 2.117 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 35.64 ± 1.596 olmuştur. Kontrol grubunda dondurma öncesi ile dondurma işleminden 1 ay ($p < 0.001$) ve 3 ay ($p < 0.001$) sonra çözülen spermeler karşılaştırıldığında TUNEL pozitif sperm oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Dondurma işleminden 1 ay ile 3 ay sonra çözülen spermeler arasında anlamlı fark yoktur (Şekil 5).

Sigara grubunda dondurma öncesi TUNEL pozitif sperm oranı 5.268 ± 0.637 iken, dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde 47.57 ± 1.426 , dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde 47.73 ± 1.197 olmuştur. Sigara grubunda dondurma öncesi ile dondurma işleminden 1 ay ($p < 0.001$) ve 3 ay ($p < 0.001$) sonra çözülen spermeler karşılaştırıldığında TUNEL pozitif sperm oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Dondurma işleminden 1 ay ile 3 ay sonra çözülen spermeler arasında anlamlı fark yoktur (Şekil 5).

Kontrol grubu ile sigara grubu dondurma öncesi TUNEL pozitif sperm sayısında istatistiksel fark bulunmazken, kontrol grubu ile sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay ($p < 0.001$) ve 3 ay ($p < 0.001$) sonra çözülen spermeler arasında anlamlı bir artış görülmüştür (Şekil 5).



Şekil 5: Gruplar arasında istatistiksel analiz yapılmış TUNEL pozitif sperm oranı grafiği. ***: $p < 0.001$; kontrol grubu dondurma işlemi öncesi ile, +: $p < 0.001$; sigara grubu dondurma işlemi öncesi ile, ϕϕϕ: $p < 0.001$: kontrol grubu 1 aylık dondurma-çözme işlemi sonrası ile, ^^: $p < 0.001$: kontrol grubu 3 aylık dondurma-çözme işlemi sonrası ile kıyaslanmıştır.

6.8. Geçirimli Elektron Mikroskopi Bulguları

Kontrol ve sigara grubunda spermier dondurma işlemi öncesi ve zme işlemi sonrasında baş, boyun ve kuyruk ince yapısı açısından incelenmiştir.

Kontrol grubunda dondurma işlemi öncesinde çoğunlukla tipik baş şekli, bozulmamış hücre membranları, homojen dağılım gösteren akrozom ve nükleusa sahip, normal morfolojili spermier gözlenmiştir. Plazma membranının altında, bozulmamış i ve dış akrozom membranları ve elektron-yoğun akrozom yapısı grlmştir (Resim 17). Bunun yanı sıra baş morfolojisi bozuk ve boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren (Resim 18) ve kromatin kondensasyon bozukluğu olan (Resim 19) spermilere de rastlanmıştır.

Kontrol grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra üzülen spermierde az sayıda normal morfolojili spermin (Resim 20) yanı sıra çok sayıda spermde akrozom yapısında bozulma, kayıp ve vezikl oluşumu, plazma membranında ayrılma ve kayıp (Resim 21) ve kromatin kondensasyon bozukluğu (Resim 22) gözlenmiştir.

Kontrol grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra üzülen spermierde az sayıda normal morfolojili spermin (Resim 23) yanı sıra, kromatin kondensasyon bozukluğu olan spermier (Resim 24) ve çok sayıda spermde de akrozom yapısında bozulma, kayıp ve vezikl oluşumu, subakrozomal genişleme, boyun bölgesinde plazma membranında ayrılma ve kayıp, mitokondrilerin diziliminde bozulma, bazı spermierde de kuyruk kopmaları gözlenmiştir (Resim 25).



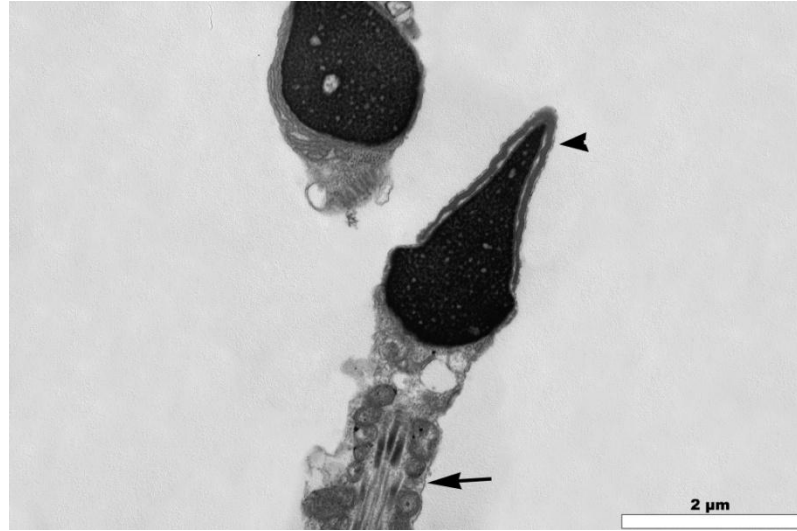
Resim 17: Kontrol grubunda dondurma işlemi öncesi, sağlam yapıda akrozom membranları ve plazma membranı (►), düzgün dizilim gösteren mitokondriler ve sağlam boyun yapısına (→) sahip normal sperm görülmektedir.



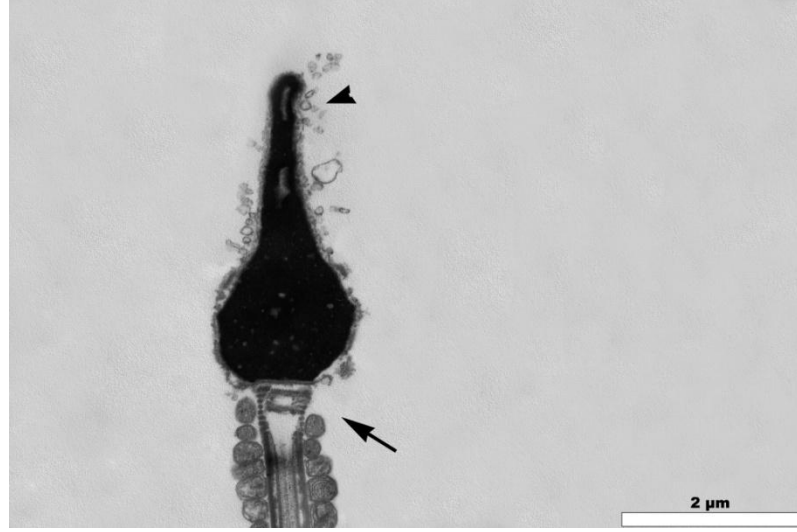
Resim 18: Kontrol grubunda dondurma işlemi öncesi, morfolojik baş hasarı ve akrozom yapısında bozulma (►), düzgün dizilim gösteren mitokondrilerin yanı sıra boyun kısmında sitoplazmik artık (→) içeren morfolojik hasarlı sperm görülmektedir.



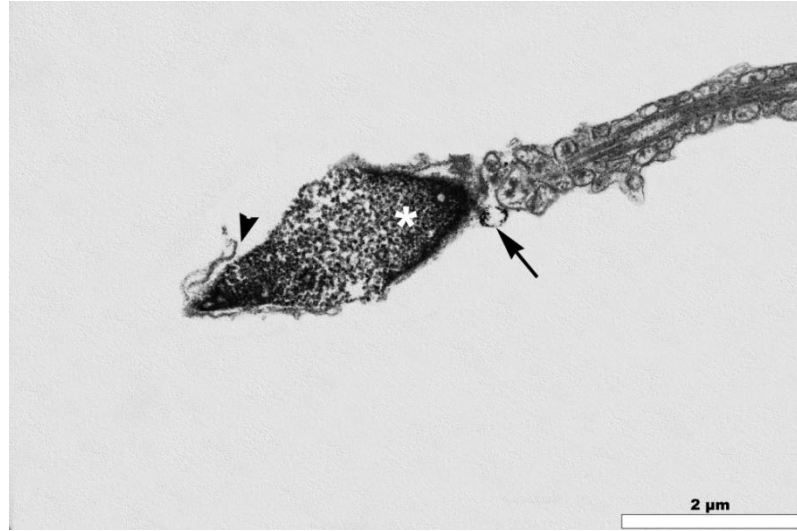
Resim 19: Kontrol grubunda dondurma işlemi öncesi, düzgün şekilli baş, sağlam yapıda akrozom membranları ve plazma membranı (→), nüklear vakuol artışı (▶) kromatin kondensasyon bozukluğu (*) olan sperm görülmektedir.



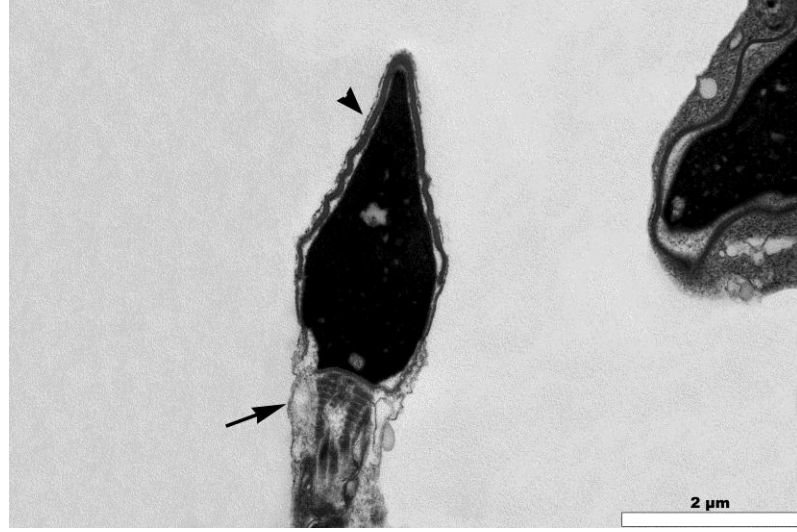
Resim 20: Kontrol grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde sağlam yapıda akrozom membranları ve plazma membranı (▶), düzgün dizilim gösteren mitokondriler ve sağlam boyun yapısına (→) sahip normal sperm, görülmektedir.



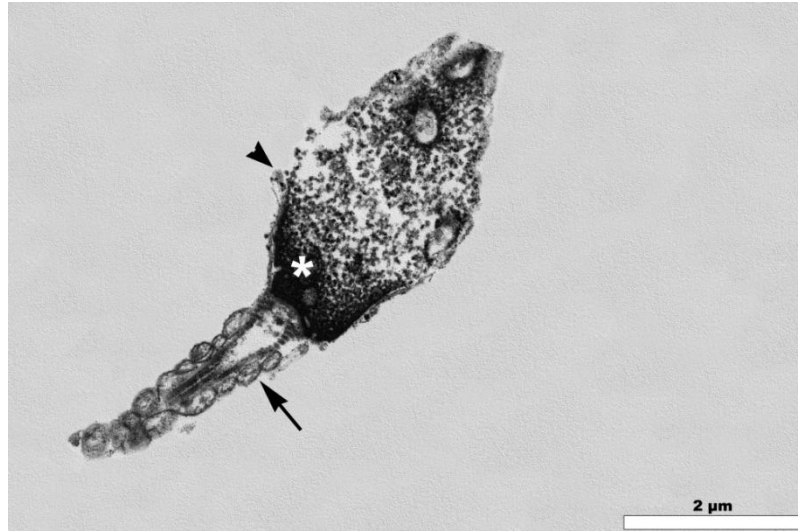
Resim 21: Kontrol grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözölen spermelerde akrozomda dağılmalar, plazma membranı bütönlüğünde bozulma ve vezikölasyon (►), düzgün dizilim gösteren mitokondrilerin yanı sıra boyun kısmındaki plazma membranında kayıpları (→) olan hasarlı sperm görölmektedir.



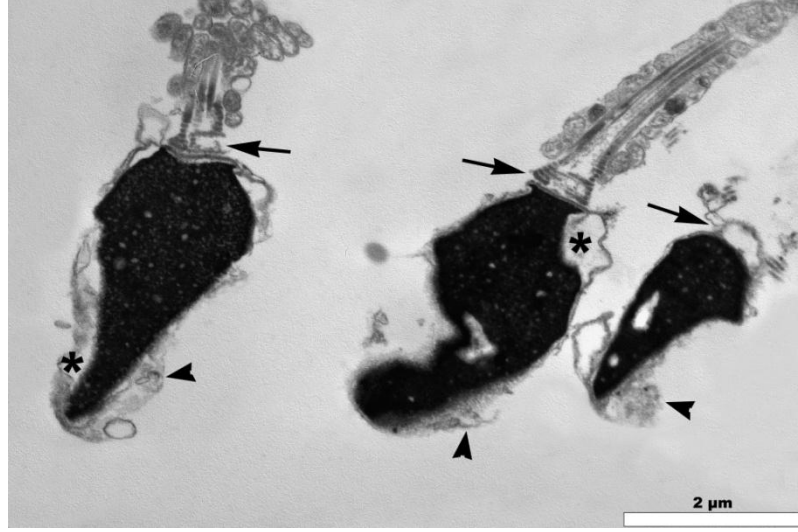
Resim 22: Kontrol grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözölen spermelerde akrozomal kayıplar, plazma membranında kopma ve açılmalar (►), düzgün dizilim gösteren mitokondrilerin yanı sıra boyun kısmındaki plazma membranında kayıplar (→) ve kromatin kondensasyon bozukluğu (*) olan hasarlı sperm görölmektedir.



Resim 23: Kontrol grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde düzgün şekilli baş, sağlam yapıda akrozom membranları, plazma membranı (►) ve boyun yapısı (→) olan normal sperm görülmektedir.



Resim 24: Kontrol grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde akrozom kaybı, akrozom membranları ve plazma membranında kopma ve açılmalar (►), düzgün dizilim gösteren mitokondrilerin yanı sıra boyun kısmındaki plazma membranında kayıplar (→) ve kromatin kondensasyon bozukluğu (*) olan hasarlı sperm görülmektedir.

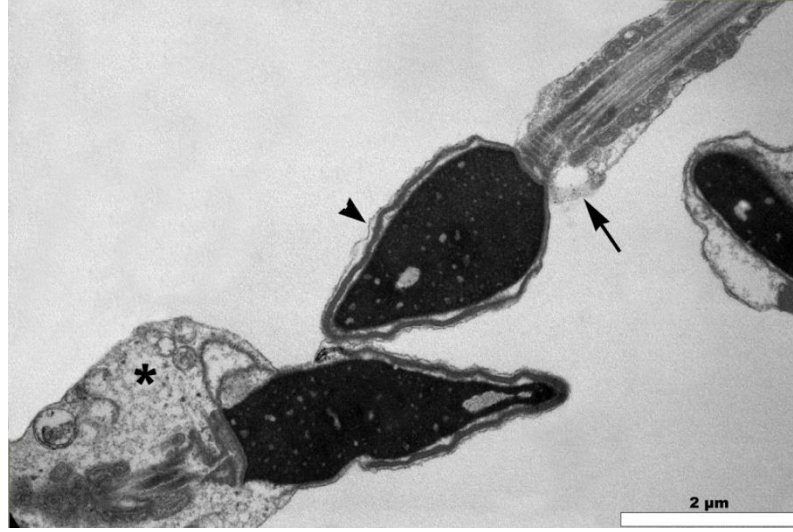


Resim 25: Kontrol grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde akrozomda dağılma ve plazma membranı bütünlüğünde bozulma (▶), subakrozomal açılma (*), boyun kısmında morfolojik bozulmalar ve plazma membranında kayıpları (→) olan hasarlı spermeler görülmektedir.

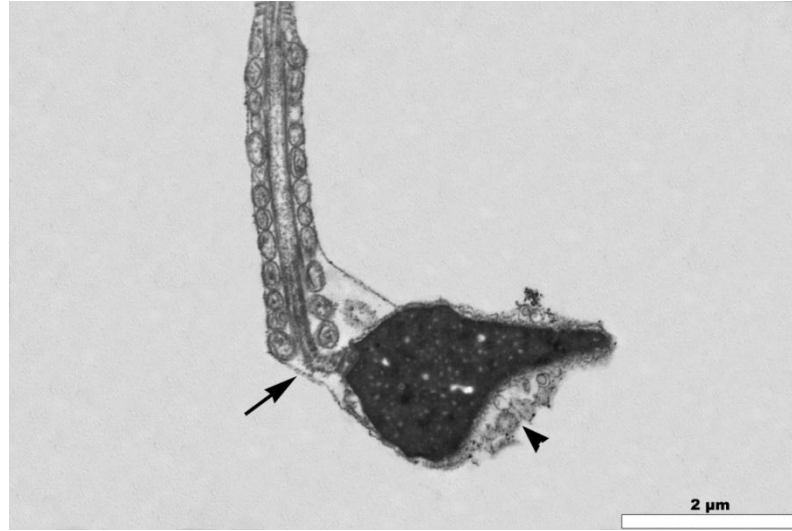
Sigara grubunda dondurma işlemi öncesinde çoğunlukla tipik baş şekli, bozulmamış hücre membranları, homojen dağılım gösteren akrozom ve nükleusa sahip normal morfolojili spermeler rastlanmıştır. Plazma membranının altında, bozulmamış iç ve dış akrozom membranları ve elektron-yoğun akrozom görülmüştür. Bunun yanı sıra baş morfolojisi bozuk, boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren (Resim 26), boyun kırığı olan (Resim 27) ve kromatin kondensasyon bozukluğu olan (Resim 28) spermeler gözlenmiştir.

Sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde az sayıda normal morfolojili spermin (Resim 29) yanı sıra, kromatin kondensasyon bozukluğu olan spermeler (Resim 30) ve çok sayıda spermde de akrozom yapısında bozulma, kayıp ve vezikül oluşumu, subakrozomal genişleme, plazma membranında şişme, ayrılma ve kayıp gözlenmiştir (Resim 31, 32).

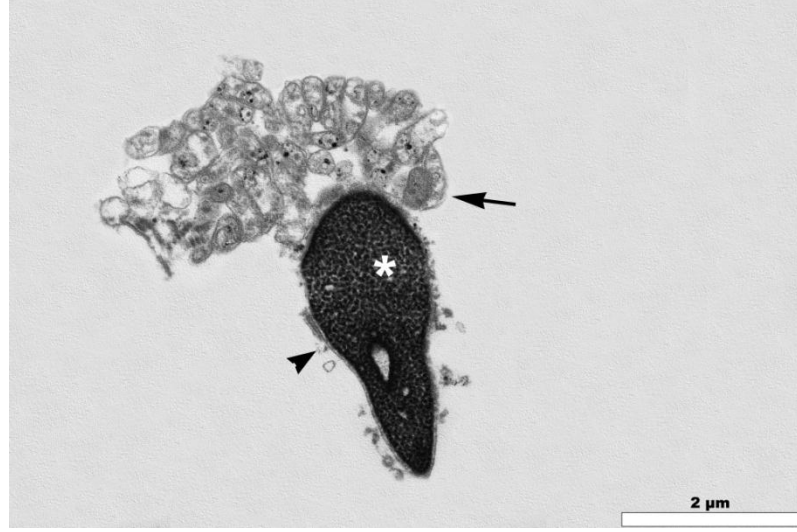
Sigara grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde az sayıda normal morfolojili spermin (Resim 33) yanı sıra çok sayıda spermde akrozom yapısında bozulma, kayıp ve vezikül oluşumu, subakrozomal genişleme, baş ve boyun bölgesinde plazma membranında ayrılma ve kayıp, mitokondrilerin diziliminde bozulma, kromatin kondensasyon bozukluğu ve bazı spermelerde de kuyruk kopmaları gözlenmiştir (Resim 34-37).



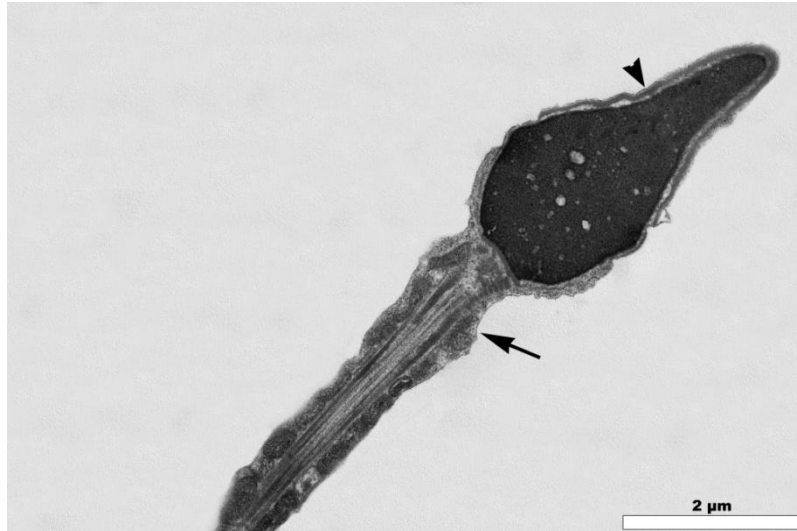
Resim 26: Sigara grubunda dondurma işlemi öncesi, sağlam yapıda akrozom membranları ve plazma membranı (►), düzgün dizilim gösteren mitokondriler ve sağlam boyun yapısı (→) olan normal sperm ve boyun kısmında sitoplazmik artık (*) içeren hasarlı sperm görülmektedir.



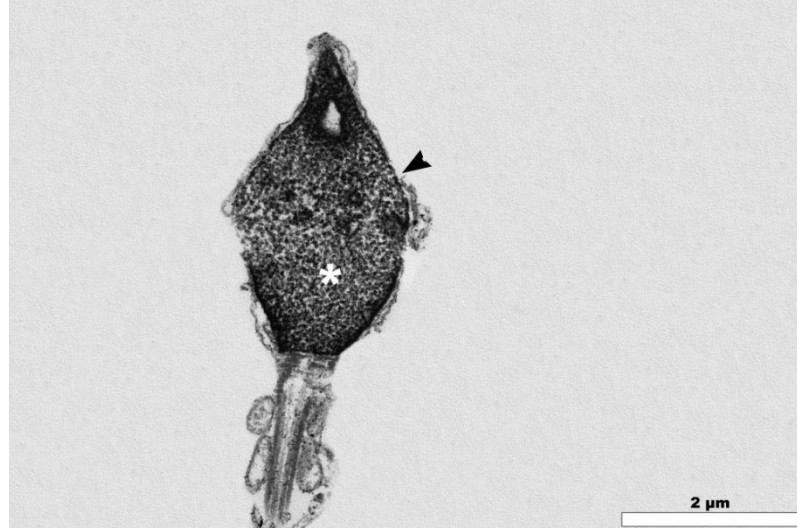
Resim 27: Sigara grubunda dondurma işlemi öncesi, morfolojik baş hasarı ve akrozom bütünlüğünde bozulma (►), düzgün dizilim gösteren mitokondrilerin yanı sıra boyun kısmında kırılma (→) olan morfolojik hasarlı sperm görülmektedir.



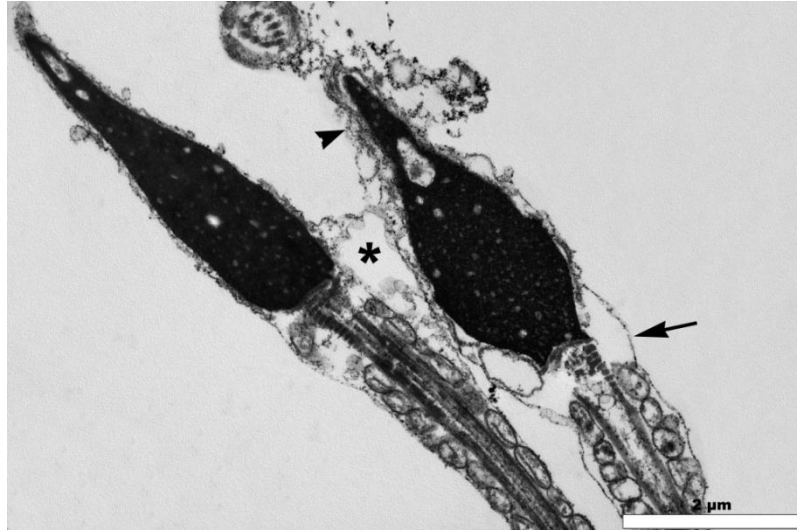
Resim 28: Sigara grubunda dondurma işlemi öncesi akrozomal kayıplar, plazma membranında kopma ve açılmalar (▶), boyun yapısında ve mitokondri diziliminde hasar (→) ve kromatin kondensasyonunda bozukluk (*) olan sperm görülmektedir.



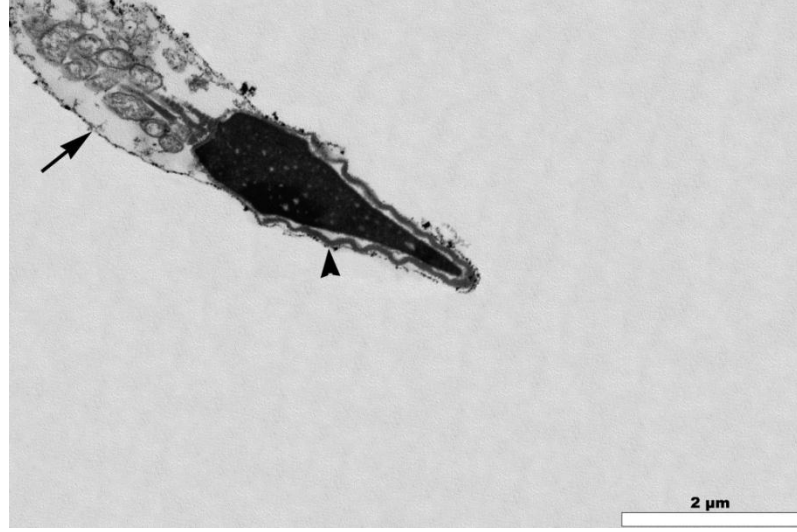
Resim 29: Sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde, sağlam yapıda akrozom membranları ve plazma membranı (▶), düzgün dizilim gösteren mitokondriler ve sağlam boyun yapısı (→) olan normal sperm görülmektedir.



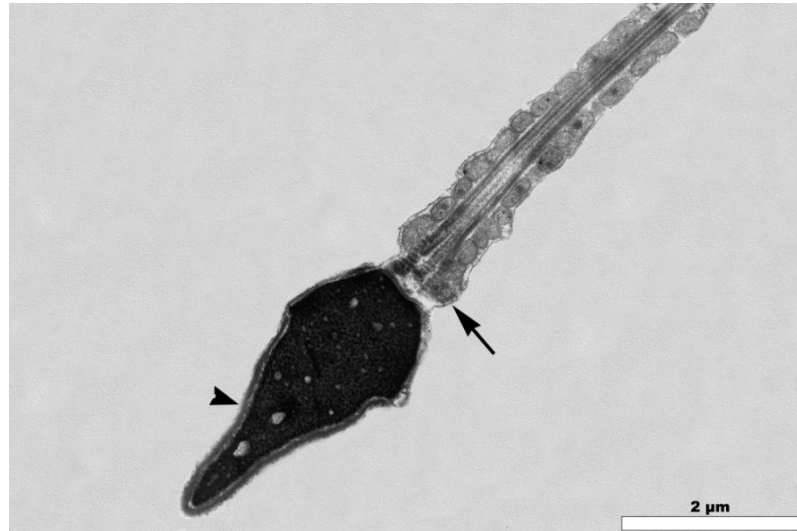
Resim 30: Sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde akrozom membranları ve plazma membranında kopma ve açılmalar (►) ve kromatin kondensasyonunda bozukluk (*) olan sperm görülmektedir.



Resim 31: Sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde akrozomda dağılmalar, vezikül oluşumu ve membran bütünlüğünde bozulmalar (►), plazma membranında açılmalar (*), boyun kısmında bozulmalar (→) olan hasarlı spermeler görülmektedir.



Resim 32: Sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay sonra çözölen spermelerde, plazma membranında kayıplar ve subakrozomal şişme (▴), boyun kısmında şişme ve genişleme (→) olan hasarlı sperm görölmektedir.



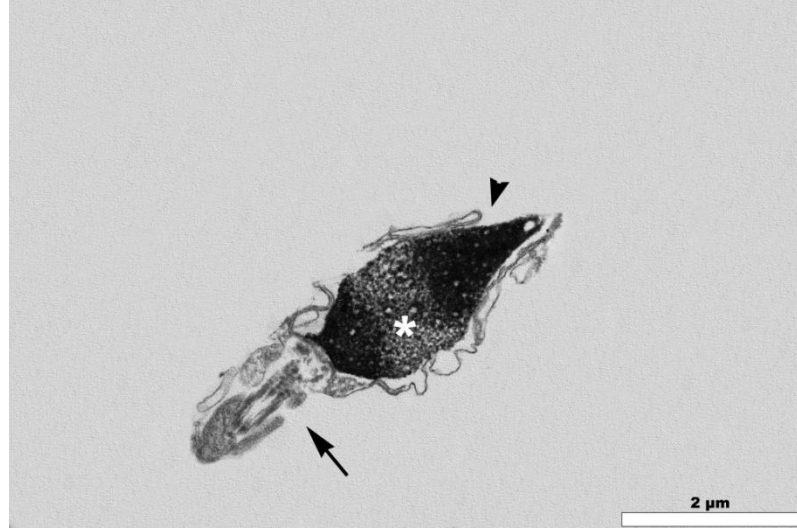
Resim 33: Sigara grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözölen spermelerde sağlam yapıda akrozom membranları ve plazma membranı (▴), düzgün dizilim gösteren mitokondriler ve sağlam boyun yapısı (→) olan normal sperm görölmektedir.



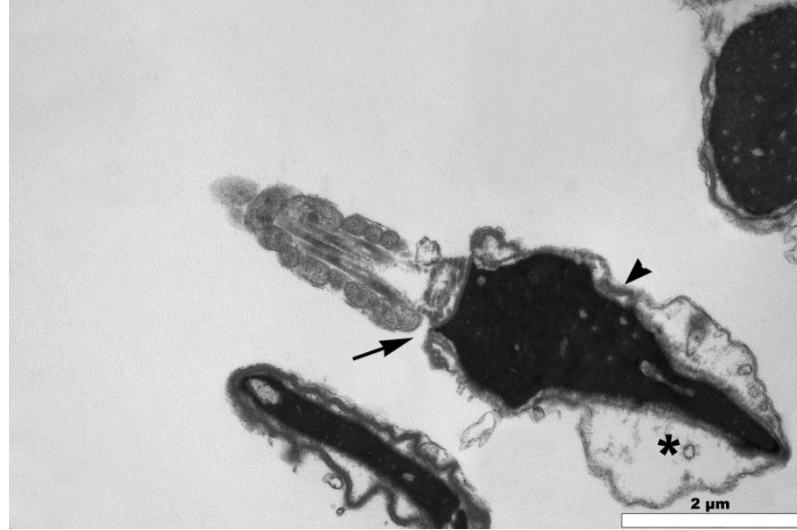
Resim 34: Sigara grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde plazma membranında açılma ve kayıp (►), subakrozomal şişme (*), boyun kısmında bozukluk (→) olan hasarlı sperm görülmektedir.



Resim 35: Sigara grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözülen spermelerde akrozom yapısında bozulma ve açılma (►), plazma membranında yer yer kopmalar (*), boyun kısmında açılma ve mitokondri diziliminde bozukluk ve dağılma (→) olan hasarlı sperm görülmektedir.



Resim 36: Sigara grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözölen spermelerde akrozomal kayıp, akrozom membranları ve plazma membranında şişme, açılma ve kopma (►), boyun kısmında plazma membranında kayıp (→) ve kromatin kondensasyonunda bozulma olan hasarlı sperm görölmektedir.



Resim 37: Sigara grubunda dondurma işleminden 3 ay sonra çözölen spermelerde plazma membranında şişme ve veziköl oluşumu (*), akrozom yapısında açılma (►), boyun kısmında membran kaybı (→) olan hasarlı sperm görölmektedir.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda sigara içenlerin ve içmeyenlerin spermleri, karşılaştırmalı olarak dondurma işlemi öncesi ve sonrasında, sperm parametreleri, DNA fragmentasyonu ve ince yapısı açısından incelenmiştir. Her iki grupta da dondurma-çözme işlemi sonrasında morfolojik hasarda ve DNA fragmentasyonunda artış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca sigara içenlerde dondurma-çözme işlemi sonrasında DNA fragmentasyonu oranının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Sigara kullanımının başta akciğer kanseri olmak üzere birçok hastalığa yol açtığı ve spermatogenez üzerinde zararlı etkiler yaptığı bilinmektedir. Sigara kullanımının erkek infertilitesi ve özellikle standart sperm parametreleri üzerindeki zararlı etkileri birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir (Evans, Fletcher, Torrance ve Hargreave 1981, Trummer Habermann, Haas ve Pummer 2002). Sigaranın sperm konsantrasyonunda (Vine et al 1994), motilitesinde ve sayısında azalma (Gandini et al 1997), morfolojisinde bozulma ve penetrasyon yeteneğinde düşüş (Terzioğlu ve ark 2008) gibi olumsuz etkileri bilinmesine karşın, sigara kullanımının sperm parametreleri üzerinde etkisinin olmadığını ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (Trummer et al 2002).

Çalışmamızda, sigara kullanımına bağlı olarak sperm parametreleri ve DNA fragmentasyonu açısından olumsuz etkiler görülen kişilerde, kriyoprezervasyon işlemi uygulaması sonrasında bu verilerinin daha da kötüleşeceği varsayılmıştır. Sigara içenler ile içmeyenlerin sperm parametrelerine kriyoprezervasyonun etkisini kıyaslayabilmek için bir standardizasyona ihtiyaç duyulmuş ve her iki grup için karşılaştırılabilir parametrelere sahip sperm örneklerinin seçilmesine özen gösterilmiştir. Bu nedenle sigara grubuna, DSÖ laboratuvar kılavuzuna (WHO 1991) göre normospermik değerlere sahip bireyler, yani sigara içmesine rağmen sperm parametrelerinde herhangi bir bozulma görülmeyen kişiler dahil edilmiştir. Kontrol grubu ve sigara grubu dondurma işlemi öncesi sperm motilitesi, konsantrasyonu ve morfolojisi açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Erkek infertilitesinin tedavisinde, sperm kriyoprezervasyonu, cerrahi yöntemlerle alınan testiküler spermin korunmasında, kemoterapi, radyoterapi ya da testis cerrahisi öncesinde, üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinde önemli bir araçtır (Delilbaşı 1997, Vicdan ve ark 1999, Taşçı ve Samast 1997). Kriyoprezervasyon sırasında spermeler fiziksel ve kimyasal strese maruz kalırlar. Bu stresten dolayı plazma membranı lipid yapısında değişiklikler meydana geldiği (Schiller et al 2000, Buhr et al 1989) sperm başlarında küçülme olduğu (Gravance et al 1998) ve fosfotidilserin çıkışı gerçekleştiği (Glande et al 1999) gösterilmiştir. Bir başka çalışmada kriyoprezervasyon işleminin plazma membranında hasar oluşturarak spermin metabolik durumunu azalttığı ve üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinde kullanılabilir fonksiyonel sperm oranını düşürdüğü gösterilmiştir (Hammerstedt, Graham ve Nolan 1990). Bunun yanında kriyoprezervasyon sonrasında spermde sarmal kuyruk, hasarlı membranlar ve akrozom bozuklukları gibi morfolojik bozukluklar da meydana gelmektedir (Check, Check ve Long 1991, Cross ve Hanks 1991). Kriyoprezervasyonun canlı sperm sayısında da düşüşe neden olduğu bilinmektedir. Bu da DNA'nın aşırı yoğunlaşması ve apoptozis sonucu olmaktadır (Paasch et al 2004). Kriyoprezervasyon sonrasında sperm motilitesi, canlılığı ve normal morfolojisi oranlarında düşüş olduğu, bunun yanında DNA fragmentasyonunda artış olduğu birçok çalışmayla gösterilmiştir (Zribi et al 2010, Ngamwuttiwong ve Kunathikom 2007, Petyim ve Choavaratana 2006). Buna karşın, sperm DNA'sının kriyoprezervasyondan etkilenmediğini ileri süren çalışmalar da mevcuttur (Evenson, Baer ve Jost 1989). Biz de çalışmamızda dondurma işlemi öncesinde sperm motilitesi, konsantrasyonu ve morfolojisi açısından benzer değerlere sahip sigara ve kontrol gruplarını 1 ay ve 3 ay süreyle uyguladığımız dondurma işlemi sonrasında çözdüğümüzde, her iki grupta da baş hasarı oranında düşüşün yanı sıra çoklu morfolojik hasar oranında artış olduğunu gördük. Baş hasarı oranındaki bu düşüşün, gerçek bir düşüş olmayıp hasar değerlendirmesinin görece bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Dondurma işlemi öncesinde yalnızca baş hasarı olan spermelerde dondurma-çözme işlemi sonrasında baş hasarına ilaveten boyun ya da kuyruk hasarı oluşmakta ve çoklu hasar olarak değerlendirilmektedir. Böylece çoklu hasar oranı artarken, baş hasarı oranı görece olarak düşmektedir.

Sperm nüklear kromatini, histonların yerini protaminlerin almasından ve artan disülfid bağlarından dolayı, diğer hücrelerle karşılaştırıldığında çok daha kondense bir yapıdadır (Balhorn 1982). Bunun sonucu olarak sperm DNA'sı fiziksel ve kimsayal denatürasyona karşı çok dayanıklıdır. İnfertil bireylerde, histonların protaminlerle değişmeden devam ettiğini gösteren anilin mavisi boyanmasında artış olduğu gösterilmiştir (Foresta, Zorzi, Rossato ve Varotto 1992). Kromatin yapısında bozukluk olan spermlerin fertilizasyon potansiyelinin azaldığı bilinmektedir (Dozortsev, Rybouchkin, De Sutter, Qian ve Dhont 1995). Yaptığımız çalışmada kontrol ve sigara grubunda dondurma işlemi öncesi, dondurma işleminden 1 ay ve 3 ay sonra çözme işlemi uygulaması sonrasında anilin mavisi ile spermlerde kondensasyon tayini yapılmıştır. Anilin mavisi boyama sonuçlarına göre kontrol ve sigara gruplarında dondurma öncesi ve çözme sonrası dönemlerde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık görülmemiştir. Bunun sebebi olarak, histon protamin değişiminin spermiyogenez sırasında tamamlanmasından dolayı kriyoprezervasyon işleminin bu değişim üzerinde herhangi bir etkisinin bulunmadığını düşünmekteyiz.

Rutin olarak kullanılan ışık mikroskobundan farklı olarak elektron mikroskopisi ile spermlerde kromatin yapısı, plazma membranı, akrozom yapısı ve içeriği, boyunda yer alan mitokondrilerin yapısı ve düzeni gibi birçok yapı ile ilgili detaylı morfolojik bilgi elde edilebilmektedir. Dondurma işlemi öncesi yapmış olduğumuz geçirimli elektron mikroskobu incelemelerinde her iki grupta da normal morfolojili spermlerin yanı sıra baş morfolojisi bozuk, kromatin kondensasyon bozukluğu olan, boyun bölgesinde sitoplazmik artık içeren ve boyun hasarı olan spermlere de rastlanmıştır. Yapılan çalışmalarda dondurma-çözme işlemi sonrası spermlerde subakrozomal ve akrozomal şişme, akrozom membranlarında ayrılma, akrozomal vezikülasyon, hücre membranlarında ayrılma ve kopma meydana getirerek hücre ince yapısına zarar verdiği (Ozkavukcu, Erdemli, Işık, Öztuna ve Karahüseyinoğlu 2008, Nogueira, Bourgain, Verheyen ve Van Steirteghem 1999) ve akrozom membran yapılarını bozarak akrozomal içeriğin kaybına yol açabildiği gösterilmiştir (McLaughlin, Ford ve Hull 1993). Biz de çalışmamızda benzer olarak kontrol ve sigara grubunda dondurma işleminden 1 ay ve 3 ay sonra yapılan çözme işlemi sonrasında spermlerde az sayıda normal morfolojili spermin yanı sıra çok sayıda spermde akrozom yapısında bozulma, kayıp ve vezikül oluşumu, subakrozomal

genişleme, boyun bölgesinde plazma membranında ayrılma ve kayıp, mitokondrilerin diziliminde bozulma ve bazı spermelerde de kuyruk kopmaları olduğunu gördük. Görülen bu değişikliklerde sigara grubuna özgü olduğu düşünülen bir morfolojik hasara rastlanmamıştır.

Sperm DNA kromatin yapısının sağlamlığı, spermin fertilizasyon işlemine paternal katkısı, erken embriyonik ölümü engelleme (Evenson et al 1999) ve hamileliğin devamı açısından son derece önemli bir role sahiptir (Aitken, De Luliis ve McLachlan 2009). İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işleminde DNA hasarlı sperm kullanımı, genom kalitesi ne olursa olsun, decondensasyonun başlamamasına ya da tamamlanmamasına ve bu nedenle de fertilizasyon ve embriyo gelişimi başarısızlıklarına yol açabilmektedir (Sailer, Jost ve Evenson 1995). IVF (Sun, Jurisicova ve Casper 1997) ve ICSI (Lopes, Sun, Jurisicova, Meriano ve Casper 1998) sonrasında artmış DNA fragmentasyonu ile düşük fertilizasyon ve embriyo bölünme oranı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stres sperm plazma membranının akışkanlığı ile DNA bütünlüğüne zarar vermektedir ve reaktif oksijen türevlerinin neden olduğu DNA hasarı spermilerin apoptozisini hızlandırmaktadır (Agarwal, Saleh ve Bedaiwy 2003).

Çalışmamızda kontrol ve sigara grubunda dondurma işlemi öncesi, dondurma işleminden 1 ay ve 3 ay sonra çözme işlemi uygulandıktan sonra TUNEL yöntemiyle DNA fragmentasyonunu belirledik. Dondurma işlemi öncesinde kontrol ve sigara gruplarında düşük oranlarda görülen DNA fragmentasyonu oranları arasında anlamlı bir fark görülmedi. Yapılan çalışmalarda -20°C 'de (Elshal, El-Sayed, Elsaied, El-Masry ve Kumosani 2009) ve -80°C 'de dondurma sonrasında sigara içenlerin spermelerindeki DNA fragmentasyonunun sigara içmeyenlere kıyasla daha fazla olduğu ve normal sperm sayısında azalma meydana geldiği gösterilmiştir (Sepaniak et al 2006). Biz de çalışmamızda kontrol ve sigara gruplarına dondurma işleminden 1 ay sonra çözme işlemi uygulandıktan sonra, dondurma öncesine göre DNA fragmentasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış meydana geldiğini gördük. Bunun, fiziksel ve kimyasal strese bağlı olarak hücre membran geçirgenliği ve yapısının bozulmasından dolayı olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, dondurma sonrasında sigara grubunda DNA fragmentasyon oranının kontrol grubuna göre

istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu dikkati çekmektedir. Bu fark, sigaranın içerdiği hidrokarbon ve nikotin gibi zararlı kimyasal maddelerin hücre membran geçirgenliği ve yapısı üzerinde olumsuz etkiler meydana getirerek korunma mekanizmasını bozması ve kriyoprezervasyon uygulaması sonrası sperm morfolojisi ve kromatin yapısında daha ileri düzeyde hasar oluşumundan dolayı olabilir. Kontrol ve sigara gruplarının her ikisinde de, dondurma işleminden 1 ay ve 3 ay sonra çözme işlemi uygulanan spermelerde DNA fragmantasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu da incelediğimiz süre çerçevesinde dondurma işleminin spermeler üzerinde meydana getirdiği zararlı etkilerin dondurma süresine bağlı olmadığını göstermektedir. Kriyoprezervasyon işleminin sperm üzerinde süreye bağlı değişiklik meydana getirip getirmediğini incelemek amacıyla 1 yıl ve daha uzun sürelerde dondurma-çözme işlemi yapılması daha uygun olabilir.

Sonuç olarak yapmış olduğumuz detaylı histolojik, ultrastrüktürel ve histokimyasal çalışmada dondurma-çözme işleminin kontrol ve sigara gruplarında sperm ince yapısında hasara ve DNA fragmantasyonu üzerinde anlamlı artışa sebep olduğu, ancak sigara grubundaki bu artışın kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla olduğu gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz 1 aylık ve 3 aylık dondurma-çözme işlemi sonrasında istatistiksel bir fark görülmediği için, yapılacak çalışmalarda dondurma işlemi süresinin uzatılması, dondurma-çözme işleminin süreye bağlı olarak farklı etki meydana getirip getirmediğini anlamak açısından gereklidir. Üremeye yardımcı tedavi işlemlerinde kriyoprezervasyon işleminin daha verimli olarak kullanılabilmesi için, DNA fragmantasyonunun oluşum mekanizmasını anlamak amacıyla daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Sigara içenlerde dondurma-çözme işlemi uygulaması sonrası meydana gelebilecek DNA fragmantasyonu artışı ve kullanılacak fonksiyonel sperm sayısındaki azalma göz önünde bulundurulmalıdır. Dondurma-çözme işlemi sırasında meydana gelen fiziksel ve kimyasal stresi minimuma indirmek amacıyla kullanılacak olan kriyoprotektanların yanı sıra bu stresi azaltabilecek yeni kimyasal maddelerin kullanımıyla ilgili çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

8. KAYNAKLAR

1. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil and Steril*, 79(4):829-843.
2. Aitken RJ, De Luliis GN, McLachlan RI. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl*, 32:46-56.
3. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. (1996). Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 28:587-596.
4. Balhorn R. (1982). A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Bio*, 93:298-305.
5. Bratton DL, Fadok VA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *K Biol Chem*, 272:26156-26168.
6. Buhr MM, Canvin AT, Bailey JL. (1989). Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete Res*, 23:441-449.
7. Check ML, Check JH, Long R. (1991). Detrimental effects of cryopreservation on structural and functional integrity of the sperm membrane. *Archives of Andrology*, 27:155-160.
8. Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara TA, Kieck KA, Schimmel TW, Scott RT. (1997). Cryopreservation of single spermatozoa. *Hum Reprod*, 12(5):994-1001.
9. Cross LN, Hanks SE. (1991). Effect of cryopreservation on human acrosomes. *Human Repod*, 6:1279-1283.
10. Delilbaşı L. (1997). Tüp Bebek Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuvar Yöntemleri. Baysed Yayın No:10, Ankara. s.229-252.
11. Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M. (1995). Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Hum Reprod*, 10(2):403-407.
12. Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, El-Masry SA, Kumosani TA. (2009). Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. *Clinical Biochem*, 42:589-594.

13. Evans HJ, Fletcher J, Torrance M, Hargreave TB. (1981). Sperm abnormalities and cigarette smoking. *Lancet*, 1(8221):627-629.
14. Evenson DP, Baer PK, Jost KL. (1989). Long-term effects of triethylenemelamine exposure on mouse testis cells and sperm chromatin structure assayed by flow cytometry. *Environ Mol Mutagen*, 14:79-89.
15. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, Angelis P, Claussen OP. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay (CASA) as a diagnostic andrognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*, 14:1039–1049.
16. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. (1992). Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl*, 15(4):330-337.
17. Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Culasso F, Pacifici R, Zuccaro P, Dondero P. (1997). The in vitro effects of nicotine and cotinine on sperm motility. *Hum Reprod*, 12:727-733.
18. Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK. (2000). Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod*, 15(2):335-343.
19. Glander HJ, Schaller J. (1999). Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Hum Reprod*, 5:109-115.
20. Gravance GC, Vishwanath R, Pitt C, Garner DL, Casey PJ. (1998). Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J Androl*, 19:704-709.
21. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, 11:73-78.
22. Junqueira LC, Carneiro, Kelley OR. (2006). Temel histoloji (Çev: AYTEKİN Y, SOLAKOĞLU S, AHİŞHALI B). Nobel Tıp Kitabevleri, s.407-419, 431-433.
23. Kierszenbaum AL. (2006). Histoloji ve hücre biyolojisi (Çev: DEMİR R). Palme Yayıncılık, Ankara. s.529-564.
24. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 69(3):528-532.

- 25.Lovelace CIP, Zhang J, Vaneg PG, Collier B. (1996). Detecting apoptotic cells in situ. *Biomed Prod*, 21:76-77.
- 26.McLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. (1993). Effect of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187. *J Reprod and Fertil*, 99:71-76.
- 27.Menkveld R, Oettle EE, Kruger TF, Swanson RJ, Acosta AA, Oehninger S. (1991). Atlas of human sperm morphology. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 28.Ngamwuttiwong T, Kunathikom S. (2007). Evaluation of cryoinjury of sperm chromatin according to liquid nitrogen vapour method (II). *J Med Assoc Thai*, 90(2):224-228.
- 29.Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, Van Steirteghem AC. (1999). Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. *Hum Reprod*, 14(8):2041-2049.
- 30.Ozkavukcu S, Erdemli E, Işık A, Öztuna D, Karahüseyinoğlu S. (2008). Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*, 25(8):403-411.
- 31.Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ. (2004). Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Bio Reprod*, 71:1828-1837.
- 32.Peschon JJ, Behringer RR, Brinster RL, Palmiter RD. (1987). Spermatid-specific expression of protamine-1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84:5316-5319.
- 33.Petyim S, Choavaratana R. (2006). Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. *J Med Assoc Thai*, 89(3):306-313.
- 34.Ross HM, Romrell JL. (2006). Histology: a text and atlas. Section 21: Male reproductive system. 2nd edition. s.603-625.
- 35.Sadler TW. (2005). Langman Medikal Embriyoloji. Palme Yayıncılık, Ankara. s.3-30.
- 36.Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. (1995). Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl*, 16(1):80-87.
- 37.Salzbrunn A, Benson DM, Holstein AF, Schulze W. (1996). A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). *Hum Reprod*, 11(4):752-755.

- 38.Schiller J, Arnhold J, Glander HJ, Arnold K. (2000). Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy-effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids*, 106:145-156.
- 39.Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, Eppig JJ. (1990). Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. *J Reprod Fert*, 89:43-50.
- 40.Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Barbarino-Monnier P. (2006). The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology*, 223:54-60.
- 41.Sun JG, Jurisicova A, Casper PE. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Bio of Reprod*, 56:602-607.
- 42.Taşçı Aİ, Samast M. (1997). İnfertilitede laboratuvar ve uygulamalar. Hayat Sağlık ve Sosyal Hizmetler Vakfı Yayınları, İstanbul. s.59-65.
- 43.Terzioğlu F, Yücel Ç, Karatay G. (2008). Sigara ve infertilite. Sağlık Bakanlığı Yayın No:731, Ankara. s.14-19.
- 44.Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. (2002). The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod*, 6:1554-1559.
- 45.Vicdan K, Işık AZ. (1999). İn vitro fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar. Çağdaş Medikal Yayın Dağıtım, Ankara. s.82-89.
- 46.Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, Hulka BS. (1994). Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 61:35-43.
- 47.Virginia MH. (1999). Immunocytochemical methods and protocols. 2nd ed. Humana Press, 115:141-148.
- 48.Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van de cees CJH, Cornelisse J, Van Dierendonck JH. (1993). A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem*, 41:7-12.
- 49.World Health Organization. (1991). Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Press, New York.

50. Zenses MT. (2000). Smoking and reproduction: gene damage to human gametes and embryos. *Hum Reprod*, 6:122-131.
51. Zribi N, Chakroun NF, Euch HE, Gargouri J, Bahloul A, Keskes LA. (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*, 93(1):159-166.

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mehmet Şerif	Soyadı	Aydın
Doğum Yeri	Fatih	Doğum Tarihi	07.06.1988
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	11254866250
E-mail	serif_aydin@hotmail.com	Tel	05309399898

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	İstanbul Üniversite Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Özel Bağcılar Birikim Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	iyi	İyi	iyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	67.50							

Başarılımış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS:

International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	93	93	93
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	İyi
Photoshop	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

YURT İÇİ VE YURT DIŞI KONGRELER

1. Uluslararası Katılımlı 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 17-20 Mayıs 2010.
2. 19. Uluslararası Katılımlı Elektron Mikroskopisi Kongresi, 22-25 Haziran 2009.
3. 2. Güncel Üreme Endokrinolojisi, Yardımcı Üreme Teknikleri Kongresi ve 1. Üreme Tıbbı Kongresi, 17-20 Nisan 2008.

ULUSAL BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTABINDA BASILAN BİLDİRİLER

1. Mehmet Şerif Aydın, Gözde Erkanlı, Feriha Ercan. “Kriyoprezervasyonun Sigara İçenlerde Sperm Parametreleri ve DNA Fragmantasyonu Üzerine Etkileri”, Uluslararası katılımlı 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir 17-20 Mayıs 2010.
2. Sercan Doğukan Yıldız, Mehmet Şerif Aydın, Olgü Enis Tok, Özlem Tuğçe Çilingir, Demir Kıran, Tangül Şan. “İn Vivo Görüntüleme Tekniklerinde Quantum Dot Kullanımı: Ön Çalışma”, Uluslararası katılımlı 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir 17-20 Mayıs 2010.
3. Mehmet Şerif Aydın, Eren Şahin, Hakan Taban, Gökhan Yurul, Ertuğrul Pınar, Mikail Özdemir, Gülsün Memi, Göksel Şener, Berrak Yeğen, Şule Çetinel. “Egzersiz İndometazin İle Oluşturulan Mesane İnflamasyonuna Etkisi ve Oksitosin Reseptörünün Olası Rolü”, 19. Uluslararası Elektron Mikroskopisi Kongresi, Trabzon 22-25 Haziran 2009.

10. ETİK KURUL ve SAĞLIK BAKANLIĞI ONAYI



T.C.
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İSTANBUL 2 NO'LU KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 09/09/2009

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 01

Sorumlu araştırmacılığını Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Feriha ERCAN'ın üstlendiği ve öğrenci Bio. Mehmet Şerif AYDIN'ın yürüteceği 2009/2525- 8 protokol numaralı "Sigara içenlerde dondurma-çözme işleminin zamana bağlı olarak sperm parametreleri, ince yapısı ve hücre ölümü üzerine etkileri" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi.

Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İ.Ü. Farmakoloji ve Klinik Far. A.D.
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
İ.Ü. Kardiyoloji A.D. (Bşk. Yardımcısı)

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İ.Ü. İç Hastalıkları A. D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
İ.Ü. Nöroloji A. D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Rukiye Eker ÖMEROĞLU
İ.Ü. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

Uzm.Dr. Ahmet Rıza URAS
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. Biyokimya

Doç.Dr. H. Hanzade DOĞAN (T.Katılmadı)
İ.Ü. Cerrahpaşa T.F. Deontoloji

Prof.Dr. Ayşen BULUT (T.Katılmadı)
Halk Sağlığı (Emekli)

Doç.Dr. Tufan TÜKEK (T.Katılmadı)
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. İç Hast.

Prof.Dr. Ünal KUZGUN (T.Katılmadı)
Şişli Etfal Eğitim ve Araş. Hst. Ortopedi

Prof.Dr. Ahmet O. ARAMAN
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Eczacı

Prof.Dr. Demir TIRYAKI
Biyofizik (Emekli)

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
İstanbul Üniversitesi

M. Kerim AKMAN
İİBF İktisat Bölümü (Özel)

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü

Sayı : B.10 OTHG.0.79.00.07/ H.972
Konu: Tez Çalışmaları

22/03/2010

MARMARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE

İLGİ: a) 10.02.2010 tarih ve 2191 sayılı yazınız,
b) 12.02.2010 tarih ve 2333 sayılı yazınız.

İlgi (a ve b)'de kayıtlı yazılarınızda üniversiteniz sağlık bilimleri enstitüsü yüksek lisans öğrencisi M. Şerif AYDIN tarafından Prof. Dr. Feriha ERCAN danışmanlığında yürütülen; "Sigara içenlerde dondurma-çözme işleminin zamana bağlı olarak sperm parametreleri, ince yapısı ve hücre ölümü üzerine etkileri" ve yüksek lisans öğrencisi Eren ŞAHİN tarafından Doç.Dr. Şule ÇATİNEL danışmanlığında yürütülen "Varikozel olgularında dondurma-çözme işleminin zamana bağlı olarak sperm parametreleri, ince yapısı ve hücre ölümü üzerine etkileri" adlı tez çalışmalarının yapılmasında konu ile ilgili mevzuat bulunmadığından bahisle tezlerin gereği olan araştırma safhasının yürütülmesinde bazı tereddütler olduğu belirtilerek Bakanlığımız görüşünün istendiği anlaşılmaktadır.

Bilindiği üzere sağlık kurum ve kuruluşlarında yapılacak bilimsel araştırmalarda, araştırmanın mahiyeti ve türüne bağlı olarak bir takım hususlar gözetilmektedir. Bu itibarla, söz konusu lisans üstü tez çalışmaları gereği yapılacak araştırmalarda;

- a) Yapılacak çalışmanın deneysel olması,
- b) Yapılacak çalışma için ilgili "Etik Kurul" onayının alınmış olması,
- c) Söz konusu deneysel çalışma için özel olarak ayrılmış "dondurma tankı" kullanılması gerekmektedir.
- d) Kesinlikle deneysel amaçlar dışında (ÜYTE, bağış, vb.) kullanılması yasaktır.

Araştırmaların yürütüldüğü merkezde, zikredilen şartların ilgili tez çalışmalarına münhasıran sağlanması halinde araştırma çerçevesinde sperm dondurulmasında mahsur bulunmadığı mütalaa edilmektedir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.


Dr. Ali EDİZER
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı V.