

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NORMOSPERMİLİ KİŞİLERDE SPERM
KRİYOPREZERVASYONU ÖNCESİ VE SONRASI
SPERMATOZOADA ANNEXİN V TESTİ İLE APOPTOZİSİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tuba TUNCEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
(TIP) ANABİLİM DALI**

Danışman

Prof. Dr. Selçuk DUMAN

KONYA- 2013

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NORMOSPERMİLİ KİŞİLERDE SPERM
KRİYOPREZERVASYONU ÖNCESİ VE SONRASI
SPERMATOZOADA ANNEXİN V TESTİ İLE APOPTOZİSİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tuba TUNCEL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
(TIP) ANABİLİM DALI**

Danışman

Prof. Dr. Selçuk DUMAN

KONYA- 2013

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Tuba TUNCEL**'in "**Normospermili Kişilerde Sperm Kriyoprezervasyonu Öncesi ve Sonrası Spermatozoada Annexin V Testi İle Apoptozisin Değerlendirilmesi**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 15.05.2013

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Selçuk DUMAN
Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.

Jüri Üyesi
Prof.Dr.Tahsin Murad AKTAN
Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.

Jüri Üyesi
Prof.Dr.Hüseyin UYSAL
Fizyoloji A.B.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun **30 / 05 / 13** ve **10 / 35** sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neyhan Ergene

Enstitü Müdürü



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled "*Evaluation of apoptosis with Annexin V test on normospermic people's spermatozoa before and after sperm cryoprezervation*" by "*Tuba TUNCEL*" that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of "*Histology and Embryology*", Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan Konya,Turkey / 15.05.2013

Principal Advisors
Professor Selçuk DUMAN
Department of Histology and Embryology

Examination Committee Member
Professor Tahsin Murad AKTAN
Department of Histology and Embryology

Examination Committee Member
Professor Hüseyin UYSAL
Department of Physiology

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.


Prof. Dr. Neyhan Ergene
Director of Institute of Health Sciences

BEYANAT

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

05.06.2013

Tuba TUNCEL



ÖNSÖZ

Tüm yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Hasan Cüce'ye, Öğretim Üyesi hocalarım Prof. Dr. Serpil Kalkan, Prof. Dr. Aydan Canbilen, Prof. Dr. Murad Aktan'a ve Yrd.Doç.Dr.Gökhan Cüce'ye, laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyolog Hüseyin Akbulut'a, yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İç Kapak.....	i
Tez Onay Sayfası.....	ii
Approval.....	iii
Tez Beyan Sayfası	iv
Önsöz ve/veya Teşekkür.....	v
İçindekiler.....	vi
Simgeler ve Kısaltmalar Listesi.....	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Testis Embriyolojisi	1
1.2 Testis Anatomisi	1
1.3 Testis Histolojisi	3
1.3.1 Sertoli Hücresi.....	4
1.3.2 İntersitisyel Doku ve Leyding Hücreleri.....	4
1.3.3 Testisin Boşaltıcı Duktusları	5
1.3.3.1 Tubuli rekti.....	5
1.3.3.2 Rete testis	5
1.3.3.3 Duktuli efferentes.....	5
1.3.3.4 Duktus epididimis	6
1.3.3.5 Duktus deferens.....	6
1.3.3.6 Ampulla duktus deferens	6
1.3.3.7 Duktus ejakulatoryus.....	6
1.4 Spermatogonik Hücreler, Spermatogenez ve Spermiyogenez	6
1.4.1 Spermatogonyumlar	6
1.4.2 Spermatogenez	7
1.4.2.1 Spermatozitler	7
1.4.2.2.Spermatidler	8
1.4.3 Spermiyogenez.....	8
1.4.3.1 Golgi fazı.....	8
1.4.3.2 Akrozomal faz.....	8
1.4.3.3 Olgunlaşma fazı	9
1.5 Spermatogenezini Uyaran Hormonal Faktörler	9
1.6 Olgun Spermium-Spermatozoon.....	9
1.7 Aksesuar Genital Bezler.....	11
1.7.1 Seminal Veziküller.....	11
1.7.2 Prostat.....	11
1.7.3 Bulboüretal Bezler	11
1.8 Olgun Spermin Fizyolojisi	12
1.9 Semen.....	12
1.9.1 Semen Analizi	13
1.9.2 Semen Fiziksel İncelenmesi.....	13
1.9.3 Mikroskopik Muayene	14
1.9.4 Konsantrasyon Ölçümü	14
1.9.5 Motilite Tayini	15
1.9.6 Morfoloji Analizi	16

1.9.7 Spermatozoa Viabilite Testleri.....	17
1.10 Kriyoprezervasyon	17
1.10.1 Kriyoprezervasyon Aşamaları.....	18
1.10.2 Kriyobiyolojinin Temelleri	18
1.10.3 Kriyoprezervasyonda Başarıyı Etkileyen Etmenler	19
1.10.3.1 Buz Formasyonu	20
1.10.3.2 Ozmotik Stres ve Ozmotik Şişme	20
1.10.3.3 Kimyasal Koruma	21
1.10.4 Kriyoprotektanlar	21
1.10.4.1 Permabl (İnternal) Kriyoprotektanlar.....	22
1.10.4.2 Nonpermeabl (Eksternal) Kriyoprotektanlar	22
1.10.5 Kriyoprezervasyon Metodları	24
1.10.5.1 Klasik Yavaş Dondurma	24
1.10.5.2 Vitrifikasyon	26
1.10.6 Kriyoprezervasyon Sırasında Hücrede Meydana Gelebilecek Değişiklikler..	27
1.10.7 Sperm Kriyoprezervasyonu.....	28
1.11 Apoptozis	31
1.11.1 Apoptozisin Önemi	31
1.11.2 Apoptozisin Morfolojisi	33
1.11.3 Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	34
1.11.3.1 Fiziksel Farklılıklar	34
1.11.3.2 Morfolojik Farklılıklar	35
1.11.4 Apoptozis Mekanizmaları	35
1.11.5 Apoptozisin Genetik Kontrolü	36
1.11.5.1 Antiapoptotik Proteinler.....	36
1.11.5.2 Proapoptotik Proteinler	36
1.11.6 Spermatogenez ve Apoptozis.....	36
1.11.7 Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	38
1.11.7.1 Morfolojik Yöntemler	38
1.11.7.2 İmmünohistokimyasal Yöntemler	41
1.11.7.3 Biyokimyasal Yöntemler	43
1.11.7.4 Flow Sitometri Yöntemi.....	44
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	45
3. BULGULAR.....	47
4. TARTIŞMA	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
6. ÖZET.....	62
7. SUMMARY	63
8. KAYNAKLAR	64
9. EKLER.....	75
10. ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ATP: Adenozin trifosfat
Bcl-2: B Lösemi Hücresi 2
BSA: Bovine serum albumin
Ca: Kalsiyum
CK18: Sitokeratin 18
Cl: Klorür
CSF: Koloni uyarıcı faktör
Cu: Bakır
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
HE: Hematoksilen-eozin
HIV: Human Immunodeficiency Virus
ICSI: İnter Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-2: İnterlökin-2
IUI: İnteruterin inseminasyon
IVF: İn Vitro Fertilizasyon
K: Potasyum
LH: Luteinizan Hormon
Mg: Magnezyum
MİF: Müllerian inhibe edici faktör
Na: Sodyum
NaCl: Sodyum klorür
NGF: Nöron büyüme faktörü
PAS: Periyodik-Asit Schiff
PI: Propidium iyodür
PS: Fosfatidil serin
SRY: Sex-determining region Y
TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz
TESE: Testiküler sperm ekstraksiyonu
TNF: Tümör nekroz faktör
TUNEL: dUTP-nick end-laneling testi
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

YÜT: Yardımcı üreme teknikleri

Zn: Çinko

1. GİRİŞ

1.1 Testis Embriyolojisi

Testis gelişimi; endokrin, parakrin, büyüme ve mekanik faktörler arasında meydana gelen kompleks bir etkileşime bağlıdır. Döllenme anında, embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyetinin belirlenmiş olmasına karşın yedinci haftaya kadar gonadlarda cinsiyete özgü değişiklikler ortaya çıkmamaktadır. İlkel cinsiyet bezleri ilk olarak beşinci ve altıncı haftada, ürogenital kabartı olarak bilinen lokalize ilkel nefrik ve genital hücreleri içeren bir yoğunlaşma bölgesinde görülür. Gonad altıncı haftada, yüzeyel germinal epitel ve internal blastemden ibarettir. Gonad testis ya da overe yedinci haftada farklılaşmaya başlar. SRY geninin etkisiyle genital kabarıklıkta yer alan bipotansiyel gonadal dokular testis belirleyici gen olan testis yönünde farklılaşır (Sadler 2005).

Fötal yaşamın ikinci ayının sonuna doğru testis retroperitoneal bölgede yalancı pelviste yerleşmiştir. Testis yedinci aya kadar inguinal kanalın abdominal ucunda bulunur. Daha sonra prosesus vaginalisin arkasından, prosessus vaginalisi de içe doğru sürükleyerek inguinal kanala girer. Normalde sekizinci ay sonunda skrotuma ulaşır (Moore 2002).

1.2 Testis Anatomisi

Bir çift organ olan testisler funikulus spermatikusa asılı vaziyette skrotum içerisinde bulunur ve septum skroti ile birbirinden ayrılmıştır (Hutson 2006, Moore 2006).

Testisin ön kenarı, medial ve lateral yüzleri, alt ve üst uçları ile arka kenarın lateral yüzü epiorşium (lamina visceralis) ile örtülü olup düz, serbest ve parlaktır. Sadece arka kenarın medial yüzü peritonsuzdur. Testise peritonsuz yüzeyden epididimis tutunur ve buradan testis damarları, sinirleri ve kanalları geçer (Tortora 2006).

Erişkin insanda testisin ağırlığı 20-30 gr, uzunluğu 4-5 cm, genişliği 2,5 cm, kalınlığı 2-2,5 cm arasındadır.

Testisler periorşium (pariyetal yaprak) ve ligamentum skrotale testis aracılığı ile skrotuma tutunmuş, epididimis ve duktus deferens aracılığı ile funikulus spermatikusa asılmış durumdadır. Testisler tunika albuginea denilen çok sayıda kollajen lif bulunduran elastikiyeti az, sağlam bağ dokusundan yapılmış kapsülle sarılıdır. Kapsülün üzerinde processus vaginalisin uzantısı olan tunika vaginalis ve altında damar ağı olan tunika vasküloza vardır. Bağ dokusundan yapılmış septula testis denilen ince bölmeler tunika albugineadan içeriye doğru uzayarak, testis parankimini 200-300 adet lobüle ayırırlar. Arka kenarın yukarı kısmında bu bölmelerin birleşmesiyle mediastinum testis denilen cisim meydana gelir (korpus higmon). Burası damar ve sinirlerin girdiği kanalcıkların çıktığı yerdir.

Her bir testiküler lobülde 3-4 adet bulunan tubuli seminiferi contorti denilen testiküler kanallar, mediastinuma tubuli seminiferi rekti denilen düz bir kanalla uzanır ve orada rete testis denilen bir ağ meydana getirirler. Bu ağa Heller ağı da denir. Rete testisi yapan kanallar, üreme hücrelerini epididimise getiren duktus efferentes testis adı verilen kanallarla devam eder. (Moore 2006, Tortora 2006).

İnsan testiküler parankimi 100 gr doku için 9 ml/dk kan ile beslenir. Sol testise giden kan miktarı yine 100 gr doku için 1,6-12,4 ml/dk iken sağ testise giden kan miktarı 3,2-38,5 ml/dk olarak hesaplanmıştır (Schlegel ve Chang 1998).

Testis arterleri aortadan, renal arterlerin çıkış yerinin hemen altından çıkıp spermatik kordun içinden geçerek testise ulaşırlar. İnternal spermatik arter, internal iliak arterden gelen diferensiyel arterle spermatik kord içerisinde anastomoz yapar. Testisin venleri mediastinum testisten çıktıktan sonra spermatik kordun içindeki pleksus pampiniformise boşalırlar. Pampiniform pleksus internal spermatik ven olarak devam eder. İnternal spermatik ven, orta diferensiyel venler, eksternal spermatik venler testisin ven sistemini oluşturur (Moore 2006, Tortora 2006). Testisin arterleri ile venleri arasında intimal bağlantılar vardır. Bu bağlantılar ile arterlerden venlere doğru ters akımlı değişme sistemi ile ısı alış verişi yapılarak spermatogenez için testisin maksimum düzeyde soğutulması (yaklaşık 20°C) sağlanmış olur (Guyton 2007).

1.3 Testis Histolojisi

Testis, gametlerin meydana getirilmesi ve olunlaşması, steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılanmasını sağlayan hem ekzokrin hem endokrin işlevi olan bir organdır (Erbengi 1990, Sriraman ve ark 2003).

Testisler üç tabakadan meydana gelen testiküler kapsül ile sarılıdır. (Artan 1988, Young ve Heath 2000).

1. Tunika vaginalis
2. Tunika albuginea
3. Tunika vasküloza

Mediastinumdan testiküler kitleye doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250-300 lobçuğa böler. Spermatogenezis seminifer tubul bölümlerinde gerçekleşir. Herbir lobçuk 1-4 seminifer tubülü içerir (Junqueira ve ark 1998). Her bir seminifer tubul yaklaşık 150 µm çaptadır ve 80 cm uzunlukta kıvrıntılı bir yapıdadır (Kierszenbaum 2006). Etrafı zengin kılcacıklarla çevrilidir. Her testiste seminifer tubulun toplam uzunluğu 300-900 m dir. Seminifer tubul iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümeninden oluşur. Bu hücreler spermatogenetik hücreler ve sertoli hücreleridir. Seminifer tubuller, tubuli rekti denen düz tübüllerle birleşirler. Bu birleşme noktaları, mediastinum testisteki bağ dokusu içerisinde bulunan ve boşlukları epitelle döşeli bir ağı, rete testisi oluştururlar. (Angelova ve ark 1996).

Tubulus seminiferus bazal membran ile çevrilir (Dellmann ve Brown 1987). İnterstisyel alanda leydig hücrelerinin yanı sıra kan damarları, sinirler, lenfatik damarlar ve diğer bağ dokusu elemanları vardır. Germ hücreleri seminifer tubul içerisinde 4-7 hücre katmanlı kalın bir epitelyum oluşturur. Germ hücreleri tubulusun bazalinden lümenine doğru farklılaşır. Proliferasyonla hücreler lümenine doğru itilir (Leeson ve ark 1985). Bazal membran üzerine oturan, geniş tabanlı sertoli hücreleri ile bunların arasında yer alan çok sayıdaki spermatogonyumlar ilk sıradaki hücrelerdir (Tanyolaç 1999). Sertoli hücreleri bazal laminadan tubulusun lümenine doğru uzanır (Johnson 1991, Krinke 2000). Bazal membrandan ayrılan ve luminal yüze doğru yönelen spermatogonyumların büyümesiyle oluşan

primer spermatositler en iri germ hücreleridir. Sekonder spermatositler, primer spermatositlerin yaklaşık yarısı kadardır ve bu hücreler luminal yüze doğru uzanmışlardır (Leeson ve ark 1985). Tubulusun lümenine ulaşmış olan küçük, yuvarlak spermatidler başkalaşım geçirmek üzere sertoli hücrelerinin sitoplazma oyuntularına gömülürler ve bir süre sonra o türe özgü biçimlerini kazanarak, gelişmelerini tamamlamış spermatozoon olurlar. Farklılaşmasını tamamlayan spermatozoonlar epitel katmandan ayrılarak lümenine geçer (Tanyolaç 1999).

1.3.1 Sertoli Hücresi

Puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücre tipi Sertoli hücreleridir. Puberteden sonra, seminifer tubulleri döşeyen epitelin yaklaşık %10'unu oluşturur. Sertoli hücreleri spermatogenetik serideki hücreleri kısmi olarak saran piramidal hücrelerdir (Kierszenbaum 2006). Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminada tutunur. Apikal uçları ise seminifer tubul lümenine doğru uzanan bu hücrelerin sınırları düzensizdir ve sitoplazmada derin çöküntüler içerir. Büyük olan çekirdek, oldukça belirgin olan karakteristik bir çekirdekçiğe sahiptir (Kalaycı 1986).

Işık mikroskopunda incelendiğinde; oldukça düzensiz olan hücre sınırlarına sahip oldukları görülür. Sitoplazmaları; saydam, nukleusları; ince uzun, oluklu, hücrenin uzun eksenine paralel konumlu ve kromatince fakirdir. Bu nedenle nukleolus belirgin olarak seçilir. (Kalaycı 1986, Kierszenbaum 2006).

Sertoli hücrelerinin spermatogeneziste önemli görevleri vardır. Gelişmekte olan spermatozoonları destekler, korur ve beslenmesini sağlar. Gelişen eşey hücrelerinden arta kalan sitoplazma parçalarını fagozite eder. Spermin yaşaması için gerekli olan androjen bağlayıcı protein gibi pek çok maddeyi ve sıvıyı salgılar (Tanyolaç 1999).

1.3.2 İnterstisyel doku ve Leydig hücreleri

Seminifer tubuller arasındaki boşluklar sinirlerden, kan ve lenf damarlarından zengin gevşek bağ dokusudur. Bu bağ dokuda çeşitli hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve endokrin göreve sahip leydig hücreleridir (Junqueira ve ark 1998). Puberteden sonra, LH

ile uyarılmanın ardından, Leydig hücreleri, testosteron üretirler. (Eşrefoğlu 2009). Testosteron puberte döneminde spermatogenezi ve erkek aksesuar bezlerinin (prostat ve seminal vezikül) fonksiyonlarını sürdürür ve sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişmesi için gereklidir (Russel ve ark 1990, Ross ve ark 2003).

1.3.3. Testisin Boşaltıcı Duktusları

- 1- Tubuli rekti
- 2- Rete testis
- 3- Duktuli efferentes
- 4- Duktus epididimis
- 5- Duktus deferens
- 6- Ampulla duktus deferens
- 7- Duktus ejakulatoryus

1.3.3.1 Tubuli Rekti

Her lobülün tepesinde seminifer tubuller düz seyirli tubuli rektilerle devam eder. Tubuli rektiler çok kısa yapıdadır. Epiteli tek katlı kübiktir (Junqueira ve ark 1998, Kalaycı 1986).

1.3.3.2 Rete Testis

Rete testis mediastinumda kübik epitelle döşeli labirent şekilli kanallar halinde gözlenir. Kübik epitel hücreleri mikrovillus ve tek bir flagellum içerir (Erkoçak 1990).

1.3.3.3 Duktuli Efferentes

Duktuli efferentes 10-20 adet kısa borucuktur. Rete testisi duktus epididimise bağlar. Henüz hareket yeteneği kazanmamış olan spermatozoonların iletilmesine yardımcı olurlar (Tekelioğlu 2002).

Epitel, epididimis yönüne doğru hareketi sağlayan silyalı hücrelerle değişimli olarak silyasız kübik hücre gruplarından oluşur. Bu epitele tarak şeklindeki karakteristik görünümünü verir. (Junqueira ve ark 1998). Tüm duktus sisteminde hareketli sil sadece duktuli efferenteslerdedir. (Kalaycı 1986).

1.3.3.4 Duktus Epididimis

Duktus epididimis oldukça kıvrıntılı ve uzun bir borudur. Testisin arka kısmında yerleşmiştir. Baş, gövde ve kuyruk bölümü vardır. Duktus deferensle devam eder. Spermatozoonların olgunlaştığı ve depolandığı bölümdür. Testisten gelen sıvının %90' ı duktuli efferentes ve duktus epididimisten geri emilir (Tekelioğlu 2002).

1.3.3.5 Duktus Deferens

Epididimisin kuyruk kısmından sonra gelen boşaltım kanalı düz ve kalındır. Bu kısma duktus deferens adı verilir (Kerse 1974). Testisin arka kenarı boyunca aşağıya inen duktus deferens, kanalis inguinalisi katederek pelvisin yan duvarları boyunca üretraya doğru ilerler, uretranın prostatik kısmında sonlanır (Kalaycı 1986).

1.3.3.6 Ampulla Duktus Deferens

Duktus deferens prostata girmeden önce ampulla denen kısmı oluşturur. Bu kısmın duktus deferense göre lümeni daha geniş, epitelyumu daha kalın, mukozada kıvrımlar daha fazladır (Junqueira ve ark 1998).

1.3.3.7 Duktus Ejakulatoryus

Ampulladan sonra duktus deferens prostata girer ve prostatik üretraya açılır. Prostata giren kısım duktus ejakulatoryus kısmıdır. (Junqueira ve ark 1998).

1.4 Spermatojenik hücreler, Spermatojeniz ve Spermiojeniz

1.4.1 Spermatojenyumlar

Diploid spermatojenik hücreler olan spermatojenyumlar, kan-testis bariyeri dışında kalan bazal alanda, bazal lamina ile doğrudan ilişkili konumda

yer alırlar. Spermatogonyum yaklaşık 12 µm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan küçük bir hücredir. Cinsel olgunluk çağında spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlarlar ve yeni hücreler oluşur. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilirler: “Tip A spermatogonyumlar” olarak adlandırılan kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da süregiden mitotik döngüler boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar. “Tip B spermatogonyumlar” primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Primer spermatositler spermatogenik serinin en büyük hücreleridirler (Junqueira ve ark 1998). Spermatogonyumlar mitotik hücre bölünmeleri geçirmeye puberte döneminde başlarlar (Kierszenbaum 2006).

1.4.2 Spermatogenez

Spermatogenez, haploid hücrelerin mitoz ve mayoz bölünmeler sonucunda spermatozoonlara dönüşmesi sürecidir (Noguchi 2002). Bu süreç primitif bir germ hücresi olan “spermatogonyum” ile başlar.

Birinci mayoz bölünmenin sonunda “sekonder spermatosit” olarak adlandırılan daha küçük hücreler oluşur. Sekonder spermatositlerin bölünmesi “spermatid” lerin oluşmasıyla sonuçlanır (Junqueira ve ark 1998).

1.4.2.1 Spermatositler:

Tip B spermatogonyumlar, ard arda mitotik bölünmeler geçirdikten sonra, son S fazının hemen ardından mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler. Primer spermatosit 4C DNA miktarına sahiptir. Bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatositi oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye girer. Sekonder spermatositler çok hızlı bir şekilde ikinci mayoz bölünmeye giderler. Her bir sekonder spermatosit ikinci mayoz bölünmenin ardından sperm şeklinde olgunlaşan iki adet spermatid meydana getirir. Birinci mayoz bölünmenin sonunda primer spermatositin 4C olan DNA miktarı sekonder spermatositte 2C’ye düşer. İkinci mayoz bölünmenin sonunda ise 2C olan DNA miktarı 1C’ye düşer. Sonuçta meydana gelen spermatidler haploid kromozom sayısına sahiptirler ve spermiyogenez sürecine girerler (Kierszenbaum 2006).

1.4.2.2 Spermatidler:

Haploid spermatidler 7-8 µm çapa sahip küçük boyutları ve yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nukleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tubul içerisinde lümene yakın yerleşim gösterirler (Junqueira ve ark 1998, Kierszenbaum 2006).

1.4.3 Spermiyogenez

Spermatozoa üretiminin son aşaması; yani spermatidlerin son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoonlara dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez (Junqueira ve ark 1998).

Spermiyogenez akrozom oluşumu, nukleus yoğunlaşması ve uzaması, flagellum gelişmesi ve sitoplazmanın büyük bir kısmının kaybolması olaylarını kapsayan karmaşık bir süreçtir. Spermiyogenez 3 faza ayrılabilir;

1-Golgi fazı

2-Akrozomal faz

3-Olgunlaşma fazı

1.4.3.1 Golgi fazı

Bu fazda spermatid sitoplazması; nukleusun yakınında yer alan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz yüzlü endoplazmik retikulum tübüllerini içerir. Golgi kompleksinde “proakrozomal granüller” olarak adlandırılan küçük PAS (+) granüller birikir (Junqueira ve ark 1998).

1.4.3.2 Akrozomal faz

Sperm morfolojisinde oluşan birkaç değişiklikle karakterizedir. Çekirdek sıkılaşır, hücre uzar ve mitokondrionlar uygun yerlerine yerleşir. Çekirdek koyu kromatinli ve küçüktür. Kromozom hacmi ve çekirdek hacmi azalır. Çekirdek yassılaşır, türe özgü şeklini alır (Gartner 2001).

1.4.3.3 Olgunlaşma fazı

Spermiyogenez tamamlanırken gerçekleşen olaylar sonucunda mitokondriler gelişen flagellum boyunca dizilmelerini tamamlarlar. Nukleus uzar ve yoğunlaşır, flagellumun orta parçasında yoğunlaşan mitokondriler nukleusun arkasında kalacak şekilde kuyruk yönünde göç ederler. Olgunlaşma işlemi; nukleus uzamış ve yoğunlaşmış olarak son şeklini aldığıında, mitokondriler dağılmaya başladığında ve kuyruk iskeleti yapısal düzenini tamamladığında sona erer (Kierszenbaum 2006).

1.5 Spermatogenezi Uyaran Hormonal Faktörler

- 1- Testosteron
- 2- Lüteinizan Hormon
- 3- Folikül Stimulan Hormon
- 4- Östrojen
- 5- Büyüme Hormonu (ve diğer bir çok hormon) (Guyton 2007).

1.6 Olgun Spermium-Spermatozoon

Silindirik biçimli, total uzunluğu 55-65 µm olan hareketli hücrelerdir. 4 kısımdan oluşur:

1- BAŞ: Yassı armut şeklindedir. Fusiform şekilli, kromatinden zengin çekirdeği ve akrozomal kepi taşıyan bölümdür. Çekirdeğin yoğun olması hacmini küçültür, böylece hareketliliği artar. Akrozomal membran çekirdek zarına yapışıktır. Lizozomal enzimlerin akrozomda bulunuşu fertilizasyonda yardımcıdır.

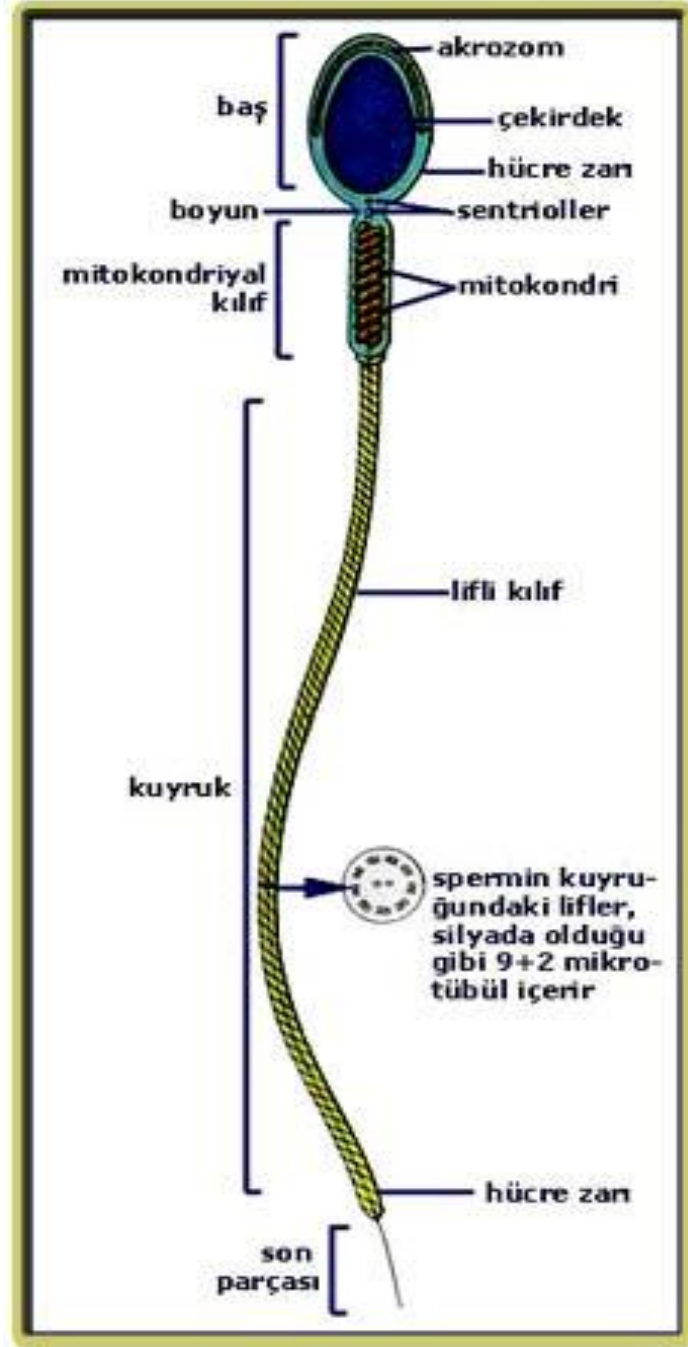
2- BOYUN: Spermin baş ile orta parçasını bağlayan kısa bir bölümdür.

3- ORTA PARÇA: Tipik flagellum ve mitokondrial kılıf bulunur.

4- KUYRUK: En uzun kısımdır. Flagellum çevresindeki kaba longitudinal fibriller başlangıç kısmında görülür daha sonra kaybolur. Orta parçadaki

mitokondri kılıfı kuyrukta yoktur. Elektron mikroskopunda bakıldığında flagellumun çevresinde, fibröz kılıf ince bir sitoplazma ve plazmalemma görülür. Kuyruğun son kısmında fibröz kılıf kaybolur. Sadece flagellum yapıyı oluşturur (Kalaycı 1986).

İnsanda olgun spermatozoon üretimi 70 ± 4 günlük bir zamanda tamamlanır (Ross ve Romrell 1989).



Şekil 1.1 Spermatozoa (İnsan Mucizesi.com 2013)

1.7 Aksesuar Genital Bezler

1.7.1 Seminal veziküller

Ampulla duktus deferensin yan tarafında uzanan bir çift bezdir. Ön yüzü fundus vesika ürinerya, arka yüzü ise rektum ile komşudur. 4-5 cm uzunluğunda ve 2-2,5 cm genişliğindedir. Bezin üst kısmı daha geniş olup alt uca doğru daralarak duktus ekskretoryusu oluşturur. (Drake ve ark 2006).

Seminal veziküllerin salgısı sarı, yapışkan, früktozdan zengin ve hafif alkali pH' a sahiptir. Metabolitler, globulin, askorbik asit ve prostaglandinleri içerir ve spermatozoaların beslenmesi için önemlidir (Kalaycı 1986, Şeftalioğlu 2003).

Seminal veziküllerin salgıladığı fruktoz spermatozoa hücreleri için esas enerji kaynağıdır (Anafarta ve ark 2007).

1.7.2 Prostat

Prostat erkek üreme sisteminin en büyük yardımcı bezidir. 3 cm yüksekliğinde, 4 cm genişliğinde, 2 cm kalınlığında ve yaklaşık 20 gr ağırlığında kestane şeklinde bir organdır (Gökmen 2003).

Prostat sitrik asit, asit fosfataz ve amilazdan zengin, ince su kıvamında, hafif asidik bir sıvı salgılar. Sıvıdaki fibrolizin ejakülasyondan sonra pıhtılaşmaya uğramış semenin sıvılaşmasını sağlar (Eroschenko 2001).

1.7.3 Bulboüretal bezler (Cowper Bezi)

Çapları 3-5 mm olan bezelye büyüklüğünde bir çift birleşik tubuloalveolar bezdir (Junqueira ve ark 1998).

Bulboüretal Bezler (Cowper Bezi), berrak yapışkan ve mukus benzeri bir salgı salgırlar. Sialoprotein ve amino şekerlerden zengin olan bu salgı, cinsel stimulasyon sırasında salınarak üretrayı kaygan hale getirir (Kalaycı 1986, Şeftalioğlu 2003).

1.8 Olgun Spermin Fizyolojisi

Normal olarak harekete sahip ve fertil olan sperm, flagellalarının hareket yeteneği ile sıvı ortamda dakikada yaklaşık 1-4 mm hızla ilerleyebilir. Sperm aktivitesi ejakülat semeninde olduğu gibi, nötral ve hafif alkali ortamda büyük bir artış gösterir; ancak orta derecede asidik ortamda büyük ölçüde baskılanır. Kuvvetli asit ortam spermelerin hızla ölümüne neden olur. Sperm aktivitesi ısı artışı ile belirgin artış gösterir, ancak bu koşullarda metabolizma hızı da yükselerek sperm ömrünü önemli ölçüde kısaltır. Sperm testislerin genital kanallarında birkaç hafta canlı kalabildiği halde, kadın genital kanalında sadece 1 veya 2 gün yaşar (Guyton 2007).

1.9 Semen

Ejakülasyon ile dışarı atılan; spermatozoalar, epididimis, seminal vesikül, prostat ve bulboüretal bezlerin salgılarından oluşan grimsi opak bir sıvıdır (vesikula seminalis %60, prostat %30, bulboüretal bez %10).

Ayrıca yapısında prostaglandinler, epitel döküntüleri, bağ dokusu gezgin hücreleri, kökeni bilinmeyen yuvarlak hiyalin cisimler, prostat taşları, lipitler, proteinler ve pigment granülleri bulunur.

Semenin sadece %1'ini spermatozoa oluşturur. Geriye kalanlar erkek genital bezlerinden gelen sıvılardır. Bu sıvılar spermatozoayı beslemek için fruktoz, spermatozoayı hareketsiz kılan vajina ve üretra ortamındaki asiditeyi nötralize eden alkalın salgı, spermatozoayı hareketli kılan tamponlayıcı tuzlar ve fosfolipitleri içerir.

Semenin %90' ı sudur. Ancak pek çok madde de içerir. Bunlardan en göze çarpanı enerji kaynağı olan fruktozdur. Ayrıca vitamin C ve inositol gibi vitaminler ile Ca, Zn, Mg, Cu, sülfür gibi iz elementleri de içerir. Vücutta en yüksek prostaglandin konsantrasyonu semendedir.

Ereksiyon sırasında bulboüretal bezlerin salgıları ile üretra kayganlaşır. Ejakülasyon başlangıcında asit fosfataz ve sitrik asitten zengin prostat sıvısı, bunun arkasından duktus deferens ve duktus epididimisin distal kısmındaki kasların kontraksiyon gücü ile spermiumlar salınır. En son olarak, fruktoz ve

prostaglandinlerden zengin, koyu kıvamlı seminal vezikül salgısı ejakulata katılır (Çoruh 2010).

1.9.1 Semen Analizi

Semen analizi yani spermiyogram; semenin hacmi, yoğunluğu, kıvamı, pH'ı, likefaksiyon süresi, spermelerin sayısı, hareketlilik oranı, içerdiği akyuvarlar ve morfolojisi hakkında bilgi verir. Sperm analizi semenin nitelik ve nicelik açısından değerlendirilmesidir (Dere 1999).

Spermiyogram tetkiki 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası yapılmalıdır. Bunun yanı sıra 10 günü aşan cinsel perhiz motiliteyi değiştirmektedir. Ayrıca doğru sonuca ulaşmak için 1-2 ay aralarla en az 3 defa tekrarlamak gereklidir. Analiz sonuçları birbirine %20 yakınlıkta ise ilave örneklere gerek yoktur, %20'nin üzerinde ise tekrarlamak daha doğrudur (Kayıkçı ve ark 2002).

Normal spermatozoa analizi değerleri:

- Volüm: 1,5 - 5 ml
- pH: >7,2
- Viskozite: < +2
- Spermatozoa konsantrasyonu: ≥ 20 milyon/ml
- Total spermatozoa sayısı: > 40 milyon
- Motilite yüzdesi: a+b \geq %50 ya da \geq %25 ileri hızlı hareket
- Morfoloji: > %30 WHO, > %14 Kruger Strict
- Lökosit: < 1 milyon/ml (WHO 2010).

1.9.2 Semen Fiziksel İncelemesi

Likefaksiyon: Ejakulat ilk çıkarıldığında sıvı, sonra hemen koagulumla dönüşür. Seminal veziküllerde bulunan semenogelin proteini ile koagule olan semen, prostatik proteolitik enzimler sayesinde sıvılaşır (Pryor ve Howards 1997). Semen sıvılaşmasına likefaksiyon denir (Gökçe 2011).

Renk: Genital duktus ve yardımcı bezlerin salgılarından oluşan semen opak, beyazımsı bir sıvıdır (Kalaycı 1986).

Koku: Kendine özgü kokusu perhiz süresine ve enfeksiyon varlığına bağlı olarak değişebilir. Kokusunun özelliği prostat salgılarından kaynaklanan sperm oksidasyonu sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir (Kayıkçı ve ark 2002).

Volüm: Normalde semenin hacmi 1,5-5 ml arasındadır (WHO 2010). 5ml'den fazla olan semen hiperspermik, 1 ml veya daha az ise hipospermik olarak isimlendirilir (Pryor ve Howards 1997).

Viskozite: Likefaksiyondan sonra geniş ağızlı (yaklaşık 1.5 mm) plastik pipete örneği dikkatlice çekerek ve yerçekiminin etkisiyle damlamasını bekleyip damla ile pipet arasında oluşan ince ipliğin uzunluğu gözlenerek viskozitesi ölçülebilir. Normal bir örnek, pipeti küçük ayrı damlalar şeklinde terk eder. (Gökçe 2011).

pH: Semen pH'ı esas olarak alkali özellikteki seminal vezikül sekresyonu ile asidik prostatik sekresyon olmak üzere aksesuar bezlerin sekresyonları arasındaki dengeyi yansıtır (Gökçe 2011). Normal semen pH'ı 7,2-8 arasındadır (Dunphy ve ark 1998).

1.9.3 Mikroskopik Muayene

Bu incelemede sperm sayısı, hareket özellikleri, morfolojik yapı aglütinasyon olup olmadığı, lökosit ve yuvarlak hücrelerin boyanması ve sayımı, gerekli hallerde vitalite araştırmaları yapılır (Kayıkçı ve ark 2002).

1.9.4 Konsantrasyon Ölçümü

Sperm hücrelerinin ejakulattaki konsantrasyonunu belirlemek için genellikle Neubauer hemositometre, Makler kamarası ve tek kullanımlık sayım cihazlarından biri (Mikro-Cell) kullanılmaktadır (Kayıkçı ve ark 2002). Günümüzde spermatozoa sayımı en çok Makler sayım kamarası kullanılarak yapılır. Bir damla semen derinliği 10 µm olan Makler kamarasının ortasına damlatılır, kamaranın üzerine her biri 0,1 x 0,1 mm boyutlarında 100 kareden oluşan, 1 mm² boyutlarında grid camı kapatılır. Böylece, cihaz yardımıyla sabit

hacimde semenin incelenmesi mümkün olur. Grid üzerinde 3x10 küçük kare sayılır, ortalaması alınır ve sonuç milyon cinsinden 1 ml'deki spermatozoa sayısını verir (Erimşah 2006, WHO 2010).

Sperm konsantrasyonu için en düşük referans değer ml' de 15 milyondur. Total sperm sayısı ise sperm konsantrasyonunun tüm ejakülat volümüyle çarpılması sonucu hesaplanır ve en düşük referans değeri 39 milyondur (Gökçe 2011).

1.9.5 Motilite Tayini

Spermatozoaların servikal mukusu geçerek, fallop kanalında yumurtayı dölleyebilmeleri için aktif hareketli olmaları gerekir. Özellikle motilite değerlendirmelerinin subjektif olarak yapılması günümüzde farklı laboratuvar sonuçlarına yol açmaktadır (Kayıkçı 2002). Semende motil spermatozoa sayısı arttıkça gebelik şansı artar. Döllenme için spermatozoanın hareketli olması yeterli değildir, bu hareketin spermatozoayı ileri doğru itecek şekilde olması da zorunludur. Progresif aktivite denen bu ileri hızlı hareket, sadece spermatozoanın dişi genital kanalda ilerlemesi için değil, aynı zamanda oositi örten kılıfların delinip döllenmenin gerçekleşmesi için de gereklidir (Ishikawa ve ark 1989).

Ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde, tercihen likefaksiyondan sonraki 30 dakikada motilite değerlendirilmelidir. Taze hazırlanmış preparatların stabil hale gelmesi için yaklaşık bir dakika bekletilir (Gökçe 2011).

Spermatozoaların motilite değerlendirmesi:

(+4) İleri hızlı hareket 25 $\mu\text{m/s}$ 37°C'da ya da 20 $\mu\text{m/s}$ 20°C'da 25 μm yaklaşık olarak beş baş uzunluğuna veya yarım bir kuyruk uzunluğuna tekabül eder.

(+3) İleri yavaş hareket (<5 $\mu\text{m/s}$)

(+2) Yerinde hareketli (sadece baş veya kuyruk)

(+1) Hareketsiz

WHO kriterlerine göre, spermatozoaların en az %50' sinin motil, motil spermatozoaların da en az %25 'inin ileri hızlı hareketli olması gerektiği açıklanmıştır (WHO 2010).

Motilite değerlendirilirken konsantrasyon sayımında olduğu gibi X20 büyütme altında ve karelerde yapılır. Motil spermelerin toplam sperm sayısına oranı yüzde olarak motiliteyi verir (Duru 1998, Makler Counting Chamber 2005, Rrumbullaku 2005).

1.9.6 Morfoloji Analizi

Günümüzde infertil çiftlerin çocuk sahibi olabilmesi için kullanılan tekniklere her gün yenileri eklenmekte ve başarıyla uygulanmaktadır. Klasik İn Vitro Fertilizasyon yöntemlerinde başarıyı etkileyen faktörler araştırıldığında, sperm morfolojik özelliklerinin fertilizasyon üzerinde direkt etkili olduğu saptanmıştır (Menkveld ve ark 1990).

Normal sperm morfolojik özellikleri Kruger kriterleri ve WHO kriterleri ile belirlenmiştir.

Kruger Kriterleri

Baş; Düzgün oval yapıda olmalı, akrozom başın ön kısmının %40-70'ni oluşturmaktadır. Normal baş ölçümlerinde uzunluk 3-5µm, genişlik ise 2-3µm'dir. Başın eni, uzunluğunun 3/5 ve 2/3'ü arasında değişmelidir. Sınırdaki normal baş şekilleri ve/veya oval şekle yakın baş ile beraber belirgin bir şekil bozukluğu olmasa da bu anormal kabul edilir.

Boyun; İmplantasyon başın uzun eksenine boyunca ve intakt olmalıdır.

Orta Kısım; Silindirik şekilli ve başa uzun eksenine doğrultusunda bağlanmış olmalıdır. Eni yaklaşık 1µm, boyu ise uzunluğunun 1,5 mislidir. Başın büyüklüğünün 1/2'sini geçen stoplazmik artıklar anormal kabul edilir.

Kuyruk; Düzgün yapıda ve orta kısımdan biraz ince kıvrım ve bükülme olmamalıdır. Uzunluğu 35-45µm olmalıdır. Diğerleri anormal kabul edilir (Kruger ve ark 1988).

WHO Kriterleri

Baş; Oval şekilli ve düzgün kenarlı olmalıdır. Akrozomal kısım baş yüzeyinin 1/3'den fazlasını kaplamalıdır. Normal baş ölçümleri uzunluk 4,1µm, genişlik 2,8µm olmalıdır.

Boyun ve Orta kısım; Silindir şekilli olmalıdır. Genişlik 0,6µm, uzunluğu 4 µm olmalıdır.

Kuyruk; Silindir şeklindedir. Kıvrım ve bükülme olmamalıdır. 35-45µm uzunluğunda ve düzgün bir dış yapıya sahip olmalıdır. Diğer değerler anormal kabul edilir (WHO 2010).

Morfolojik değerlendirme için en az 100, tercihen 200 sperm incelenmesi gereklidir. İmmersiyon merceği kullanılmalıdır, anormal sperm formları baş, ana parça ve kuyruk anormalliklerini içerir (Kayıkçı 2002).

1.9.7 Spermatozoa Viabilite (Canlılık) Testleri

Sperm canlılığı hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranının %40'dan az olduğu durumlarda özellikle önemlidir. Aynı zamanda bu testle hareketlilik değerlendirmesinin doğru yapıp yapılmadığı da kontrol edilebilir. Canlı spermelerin oranı boya eksklüzyonu ya da hipoozmotik şişme yöntemleri ile hücre zarı sağlam olanların değerlendirilmesi ile hesaplanabilir (Gökçe 2011). Eosin Y, Tripan mavisi gibi boyalarda viabilite testlerinde kullanılmakta olan boyalardandır.

1.10 Kriyoprezervasyon

1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı özelliğini bulmasından sonra bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları başlamıştır ve ilk dondurulan hücre de sperm olmuştur. Bu anlamda, kriyobioloji hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bir bilim dalı olarak önemini artırmıştır (Mazur 1984, Polge ve ark 1949).

Hayati olaylar biyolojik bir saatin ritmine uygun olarak döllemenin başlaması ile birlikte işlemeye başlar. Kriyoprezervasyon işlemi biyolojik saati durdurur ve bu işleyişe müdahale imkanı sağlar (Özkavukçu ve Erdemli 2002). Kriyoprezervasyon işleminin amacı, çok düşük sıcaklıkta canlı bir hücre veya dokunun, minimum hasarla ve fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (Wetzels 1996).

1.10.1 Kriyoprezervasyon Aşamaları

Kriyoprezervasyonun beş önemli aşaması vardır, bunlar;

- Suyun kristalizasyonundan kaynaklanabilecek hüresel hasarı azaltan kriyoprotektanlarla olan ilk etkileşim,
- Sıfır derecenin altındaki sıcaklıklara kadar dondurma,
- Saklama,
- Çözme,
- Dilüsyon ve kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılması, fizyolojik mikroçevreye geri dönüş ve ileri gelişim olarak sınıflandırılabilir.

Bu aşamalar arasında en kritik olanı; başlangıç fazından düşük sıcaklıklara iniş dönemi ve fizyolojik ortama geri dönüştür. Düşük sıcaklıklara ulaştıktan sonra bu sıcaklık -196°C 'dir. Bu sıcaklıkta geçen zamanın canlılık üzerine etkisi yoktur (Delilbaşı 2008).

1.10.2 Kriyobiyojinin Temelleri

Hücre dondurulurken izotonik bir ortam olması, ısının azalmasına bağlı olarak su moleküllerinin sayısının azalması, ortamın ozmolaritesinin artması ve oluşan hipertonic ortamda hücrenin su kaybetmesi sonucu hücrede dehidrasyon olması kriyobiyojinin amaçları olarak sıralanabilir.

Hücrenin canlılığının devam etmesi için dehidrasyon hızı önemlidir. Dehidrasyon hızını belirleyen parametreler suya karşı plazma membran

geçirgenliğinin yeterliliği, kriyoprotektanların tipi, kriyoprotektanların aktivasyon enerjileridir (Wetzels 1996).

Sıvı nitrojen -196°C ' de bulunur ve tüm kimyasal reaksiyonlarda inhibe olur. Bu sıcaklık hücrel faaliyetlerin durmasına neden olur. Dondurma süreci hücrelerdeki bazı kimyasal olayların yavaşlamasına ya da durmasına yol açarken bazılarının da hızlanmasını sağlayabilmektedir. Hücrelerin hayatta kalmayı başarmaları aşırı düşük sıcaklıklara dayanma becerilerinden çok; donma ve ısınmada iki kez geçmek zorunda oldukları, ölümcül olarak kabul edilen, ara bölge sıcaklıklarındaki sağ kalımlarına bağlıdır (-5°C ila -15°C). Isıya bağımlı reaksiyonların çalışmasına -196°C ' lik sıcaklık izin vermez. Bu sıcaklıklarda varolan tek şey fiziksel hal, camsı ve kristalli partiküllerdir. Ayrıca -196°C ' de kimyasal reaksiyonlar için yeterli termal enerji yoktur (Delilbaşı 2008).

-196°C 'deki donmuş sulu düzeneklerde oluşabilecek tek reaksiyon iyonize radyasyon ve kozmik ışınların direkt etkisiyle meydana gelen serbest radikallerin oluşumu ve makromoleküllerde kırık oluşumu gibi fotofiziksel olaylardır. Bu kadar düşük sıcaklıklarda enzimatik tamir mekanizmaları çalışmayacağından çok uzun süre geçirilse bile bu iyonlaşmalar zararlı ve geri dönüşümsüz DNA kırıklarına yol açabilir. Kültürdeki memeli hücrelerinin %63 'ünün ölümüne yol açan iyonize radyasyon dozu 200-400 rad' dır. Dünyadan yayılan radyasyon dozunun yılda 0.1 md olduğu göz önüne alındığında -196°C 'de korunan tipik memeli hücre popülasyonun, bu oranda bir hasara uğraması için 2,000 ila 4,000 yıl geçmesi gerekmektedir. Bu oransal hesaplamaların yanı sıra; -196°C ' de hücre saklama yöntemlerinde kromozomal veya genetik değişikliklerin ortaya çıktığını gösteren bir kanıt yoktur (Aydiner 2008).

1.10.3 Kriyoprezervasyonda Başarıyı Etkileyen Etmenler

Hücre içi buz oluşumu, soğutma hızı artıkça artacaktır. Kullanılan kriyoprotektanlardan bağımsız hücre hacmi ve membran kompozisyonlarına göre her hücrenin optimum bir soğutma hızı vardır. Hücre içinde buz oluşturmayacak en hızlı soğutma optimum soğutma hızıdır. İn vitro fertilizasyon için önemli olan bazı hücreler için ise hala açık, optimum bir değer ortaya konulmuş değildir. Donma anında hipertonic ortamlarda hücrelerin gösterdiği tepkinin birçok nedeni

vardır. Hücrenin hacmi ve yüzey alanı, suya karşı plazma membran geçirgenliğinin yeterliliği, kriyoprotektanların aktivasyon enerjisi, kriyoprotektanın tipi ve konsantrasyonu ve soğutma hızı bunlardan bazılarıdır (Wetzels 1996).

Soğutma hızı hücrede meydana gelen fiziksel olaylarla yakından ilişkilidir. Eğer soğuma yeterince yavaş olursa, hücre, içindeki suyu ekzosmozis ile hızlıca kaybeder böylece hücre içi ve dışı ortamlar kimyasal potansiyeller açısından bir dengeye ulaşacaktır. Sonuçta hücre dehidrate olacak ve intraselüler olarak donmayacaktır. Ancak, eğer hücre çok hızlı soğutulursa dengeye ulaşmak için suyunu yeterince hızlı kaybedemeyecek; gittikçe aşırı soğuyan hücre içinde denge, intraselüler buzlanma ile sağlanacaktır. Hücre içi buz oluşumu hücrenin ölümüne neden olabilmektedir (Delilbaşı 2008).

1.10.3.1 Buz Formasyonu

Genellikle -15°C ' nin altında kriyoprotektif solüsyonlar buz oluştururlar. Bir sıvının, sıvı fazdan katı faza geçmeden normal donma noktasının altında bir sıcaklığa soğuması aşırı soğuma (supercooling) olarak adlandırılmaktadır. Bu haldeki sıvının partikülleri katı kristal formuna geçemezler ancak enerjilerini kaybeder. Kristalleşmenin yarattığı stres faktörü, hücrede ozmotik büzüşmeye ve polimerizasyona bununla birlikte membran lipid fazında istenmeyen değişimlere yol açmaktadır (Watson 1995, Woods ve ark 2000).

-5°C ve -15°C arasında, hücre dışında kendiliğinden ya da uyarı ile buz oluşumu gerçekleşir buna rağmen hücre içi aşırı soğuk ama donmamış bir halde kalır. Bunun sebebi, plazma zarının hücre içinde buz kristalleri gelişimine engel olmasıdır. Hücre içindeki aşırı soğuk sıvı, dışarıdaki yarı donuk çözeltiye göre daha yüksek bir kimyasal potansiyele sahiptir. Aradaki bu potansiyel fark hücre içindeki sıvının dışarı çıkmasına ve dışarıda donmasına sebep olmaktadır (Aydiner 2008).

1.10.3.2 Ozmotik Stres ve Ozmotik Şişme

Donma işleminde etkili en önemli faktör hücrede oluşan ozmotik strestir. Donma sırasında hiperozmotik ortam oluşmasına rağmen, çözme esnasında

kristalizasyonun ortadan kalkmasıyla bu ortam azalmaktadır. Ozmotik stres intrasellüler ve ekstrasellüler ortamdaki ozmotik farktan ileri gelmektedir. Bu ozmotik farklılığın hesaplanması, hücreden hangi oranda suyun uzaklaştırılmasında önemlidir. Suyun uzaklaştırılma oranı ise doğrudan ortama katılacak kriyoprotektan yoğunluğuyla ilişkilidir.

Kriyoprotektanların ilavesi ortamın hiperozmotik olmasına, hücre membranından içeriye girmesiyle hücrede dehidrasyonun şekillenmesine neden olmaktadır. Kriyoprotektanların uzaklaştırılmasında hücreler tekrar şişmekte ve isoozmotik hacme ulaşmaktadır. Bu değişimler kritik anları geçtiğinde, hiperozmotik bağli, geri dönüşümsüz olarak membran yıkımı meydana gelir. Ayrıca hücrede bulunan küçük porlar potasyum ve sodyum iyonlarının giriş-çıkışını sağlayarak, hücrenin hipoozmotik stres ve koloidal ozmotik hemolize hassasiyetini artırır (Bucak ve Tekin 2007).

1.10.3.3 Kimyasal Koruma

Dondurma prosedürlerinde sadece sıcaklığın kontrolü hücrenin canlılığının korumasında yeterli değildir.

1.10.4 Kriyoprotektanlar

Kriyobiyojji biliminde en büyük gelişme 1900'lü yılların ortalarında kriyoprotektan maddelerin keşfiyle kaydedilmiştir. Kriyoprotektan maddeler, hücreleri ve membranlarını dondurma prosesleri sırasında meydana gelebilecek hasarlardan korumaktadırlar. (Duran ve ark 2001).

Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm esnasında dekrizalizasyona ve gelişen membransel destabilizasyona karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılır. Genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler. Hücre, dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkubasyona tabi tutularak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır (Bucak ve Tekin 2007).

Kriyoprotektanların koruyucu etkileri, suyla hidrojen bağları oluşturarak, buz kristallerinin boyutlarını kltmeleriyle ortaya çıkmaktadır. Gliserol ve propanediol, bu içi hidroksil grupları ile (-OH) yaparken dimetil sülfoksit (DMSO) ise oksijen atomu sayesinde yapmaktadır (Watson 1995). Kriyoprotektanlar medyumun donmadan kalan kısmındaki elektrolit konsantrasyonunu da azaltarak koruyucu etki göstermektedirler. Hücrelerin başarıyla dondurulması, plazma membranından suyun ve kriyoprotektanların basit difüzyonunu ve hızlı transportunu gerektirir. Son yıllarda membranda transport işlevli protein yapısında olan su kanalları (aquaporin) saptanmıştır. Bu proteinlerin dondurma sıvısına katılmasıyla hücrenin yaşam gücü artırılmaktadır (Edashige ve ark 2003).

Kriyoprotektanlar işlevsel olarak iki gruba ayrılmaktadır

Permeabl kriyoprotektanlar,

Permeabl olmayan kriyoprotektanlar.

1.10.4.1 Permabl (İnternal) Kriyoprotektanlar

Permeabl özelliğe sahip kriyoprotektan olarak, en yaygın kullanılanları DMSO, Gliserol, Etilen glikol ve Propilen glikoldr.

Bu tür kriyoprotektanlar etkilerini, hücre zarından içeriye girerek ve koligatif (bağlaşık) olarak göstermektedir. Koruyucu etkileri donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik bzşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (Bucak ve Tkin 2007). Permeabl kriyoprotektanlar buz kristallerinin oluşumunu -40°C kadar düşürebilmekte ve hücre solüsyonların zararlı etkilerinden korunabilmektedir. Permeabl kriyoprotektanların hücre içine geçişleri solüsyonun kendi geçiş gücü, hücre içi ve dışındaki kriyoprotektanların konsantrasyon farkı ısı ve hücre yüzeyi ile orantılıdır (Aydiner 2008).

1.10.4.2 Nonpermeabl (Eksternal) Kriyoprotektanlar

Eksternal kriyoprotektanlar, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranlarını esnek

hale getirir. Bu olay da çözme esnasında hücrel şışmeyi engeller. Ayrıca, hücrede donma-çözümüne sırasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışrlar. Permabl kriyoprotektanlara ilave edilen sıvılar düşük oranda kullanılmakta, bu da internal kriyoprotektanların olası toksik etkilerini osmotik basınç farklılıkları oluşturarak azaltmaktadır. Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır (Arav ve ark 1993, Cabria ve ark 2001).

Makromoleküller; makromoleküllerden en çok kullanılanları, polietilen glikol, ficoll 70, Bovine serum albumin (BSA), dekstran, mannitol ve polivilinilprolidon'dür. BSA' nın lipit peroksidasyon inhibitörü olduğu düşünölmektedir. (Kasai 1996, Mcgann 1999, Cabria ve ark 2001).

Sakkaritler; sakkaritlerden glukoz, sükroz ve disakkaritler sayılabilir. Sakkaritler, lethal etkili intrasellöler kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar (Rudolph ve Crowe 1985, An ve ark 2000). Şekerler donma ve çözme sırasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak koruma sağlamaktadır. Çözme işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedir (Mcgann 1978).

Yumurta sarısı; yumurta sarısında bulunan düşük dansiteye sahip fosfolipitler, sperm yüzeyine bağlanır ve hücrel adenilat siklazı aktive ederek kriyoprotektif etki gösterirler (Holt 2000). Birçok araştırmada lipozomlardan elde edilen fosfolipitlerin koruyucu etkileri araştırılmış, türe göre koruyucu etkili fosfolipit kaynakları saptanmıştır (Leeuw ve ark 1993). Umut verici bir kriyobuffer, taze yumurta sarısı (%20), 11mM dekstroze ve %1 penisilin streptomisin ile beraber Tris ve TES' in bir kombinasyonu olan TEST YOLK BUFFER' dır. Test yolk bufferdaki ajan tamponlama 21mM TES ve 96mM Tris içeren bir zwitteryondur. TES ve Tris bufferlar bir çok enzimle uygunluğu ve onların tamponlama aralıklarından dolayı bufferlar içinde genişçe kullanılmıştır.

Semen kriyoprezervasyonu için test yolk bufferın kullanımı motil spermin daha yüksek geri kazanımıyla sonuçlanır.

Test yolk buffer fonksiyonunun mekanizması belirsizdir. Fosfolipitte değişim; sperm membranının kolesterol oranı ya da yumurta sarısı lipidlerinin değişimi, serbest radikallerin sebep olduğu hasarı azaltmasıyla sperm membranlarını stabilize edebilir.

Seminal plazma proteinleri ve yumurta sarısı arasındaki bir makromoleküler etkileşim diğer olası mekanizmadır ve TES ve Tris komponentleri sinerjik etkili de olabilir. Son olarak yumurta sarısı eklenmesiyle kriyoprezervasyon akrozin/proakrozin membran enzim sistemlerinde kararlılığı artırabilir.

Test yolk bufferın kullanımı erkek infertilitesinin tedavi ve teğhisinde oldukça büyük klinik öneme sahiptir. İnvitro fertilizasyon öncesi test yolk buffer ile spermin kısa bir inkübasyonu spermin fertilizasyon potansiyelini de artırabilir. Test yolk buffer sperm penetrasyon testi yani sperm fertilizasyon ve fonksiyonel bütünlüğünün ölçümüne olanak sağlamanın yanında diğer labarotuvara örneklerin taşınmasında saklama medyumu olarak da kullanılabilir. Yüksek vizkoziteli semen örneklerinde, test yolk bufferın eklenmesi spermin kapasitasyon geçirmesine izin verirken sperm motilitesini artırabilir, ama akrozom reaksiyonunu engelleyebilir.

Yardımcı üreme tekniklerinde donmuş spermatozoanın kullanım genişiliği, cerrahi bir yöntem kullanılarak geri kazanılan spermatozoa, fertilizasyona desteğinin gelişmesiyle birlikte, insan spermatozoa kriyoprezervasyonunu geliştirmek için ek çalışmalara ihtiyaç doğmuştur (Hallak ve ark 2000).

1.10.5 Kriyoprezervasyon Metodları

Kriyoprezervasyonda birkaç metod uygulamaktadır.

1.10.5.1 Klasik Yavaş Dondurma

Embriyo ve oosit dondurulmasında en çok tercih edilen yöntemlerden biri yavaş dondurma tekniğidir. Birçok çeşidi olmakla birlikte şu basamakları içerir;

- 1- Kriyoprotektanın eklenmesi,
- 2- Dondurma kaplarının içine hücrelerin yerleştirmesi,
- 3- Kapların dondurma makinesine alınması,

- 4- Kristalizasyonun (seeding) uyarılması,
- 5- Yavaş soğutma,
- 6- Sıvı nitrojen içinde saklama,
- 7- Örneklerin çözülmesi ve kriyoprotektanın uzaklaştırılması.

Hücrelerin dehidre edilmesinin amacı, hücre içi buz oluşumunu engellemek ve neden olacağı zararı azaltmaktır. Bu amaçla %10-11 civarında kriyoprotektan içeren solüsyonlar kullanılmaktadır (Shaw ve ark 2000).

Hücreler, kriyoprotektan eklenmesinden sonra dengelenme sürecine girer ve su kaybetmeye başlar. Su kaybının nedeni, ekstraselüler ortamın hiperozmotikliği ve hücre zarının kriyoprotektana nazaran suya daha geçirgen olmasından kaynaklanmaktadır. Hücre büzülmesinin durması; hücre dışına su çıkışı ve hücre içine kriyoprotektanın girişi dengeye ulaştığı anda son bulur (Fahning ve Garcia 1992).

Dondurma makinesinde 0°C' nin altındaki sıcaklıklarda kontrollü olarak buz oluşumunun uyarılması gerçekleşir. Dondurma işleminin yavaş yapılmasının nedeni bu dengeleme sürecine zaman tanımak içindir. Aksi takdirde, su hücre içinde donacak ve hücrenin ölümüne neden olacaktır.

Yavaş dondurma tekniğinin kullanılmasıyla biyolojik yapılarda iki tip hasar oluşma riski vardır;

- Soğutmanın hızlı yapılmasına bağlı olarak oluşan hücre içinde buz oluşumu,
- Soğutma çok yavaş yapıldığında medyumdaki buz kristallerinin oluşumuna bağlı meydana gelen eriyik konsantrasyonunun artmasıdır (Gao ve Critser 2000).

Soğutma oranının saptanmasında, membran yapısı, hücre plazma membranının suya ve kriyoprotektana karşı ısıya bağımlı geçirgenliği ve yüzey/hacim oranı olmak üzere 3 önemli faktör kullanılmaktadır (Agca 2000). Çoğu kriyoprotektan hücre içine giriş hızına karşın, suyun hücreden çıkışı hızı

kadar bir hızla hücre içine giremediklerinden, hücrede dehidrasyona ve büzüşmeye neden olurlar. Bu olay kriyoprotektanin dilusyonu sırasında tersine dönmektedir. Dilusyon medyumundaki su, hücre içine hızla girerken, hücre içindeki kriyoprotektan aynı hızla çıkamamaktadır. Sonuçta, hücrede şişme meydana gelmektedir. Bunu önlemek amacıyla dilusyon medyumlarına, hücre zarını geçemeyen sükröz katılmaktadır. Sükröz, suyun hücre içine girişini yavaşlatarak hücrenin aniden şişmesine ve ozmotik bir şok yaşamasına engel olmaktadır (Mazur ve Schneider 1968).

1.10.5.2 Vitrifikasyon

Sperm hücresinin dondurulmasında kullanılan bir diğer yöntem de vitrifikasyon (camlaşma) tekniğidir. Bu yöntemde viskozitenin artarak bir su bazlı çözeltinin sıvıdan katıya dönüşmesi sağlanır. Vitrifikasyon yavaş dehidratasyon ortamı yerine çok yüksek ozmolarite ortamının kullanıldığı çok hızlı dondurma yöntemidir. Çok hızlı dehidratasyon sonrası örnekler doğrudan sıvı azota yerleştirilir. Su kristalize olmaz ve buz oluşmaz (Tunç ve Bozkırlı 2006).

Vitrifikasyon tekniğinde sıcaklığın ani düşürülmesi çok önemlidir. Bunun başlıca iki nedeni bulunmaktadır;

- Soğutma hızı yüksek olursa, vitrifikasyon için gereken kriyoprotektan miktarı azalmakta, böylece toksik hasar riski düşmektedir.
- Aynı şekilde, soğuğa duyarlı olan biyolojik yapıların zarar gördüğü, sıcaklık dereceleri (-5, -15°C arası) hızla geçilebilmektedir.

Saniyede 107°C' lik soğutma oranı ile su bile vitrifiye edilebilmektedir. Payetlerin nitrojene daldırılması ile 2500°C/dk' lık bir soğutma oranı sağlanmaktadır.

Başarılı bir vitrifikasyon için, viskozitede çok yoğun bir artış gerekmektedir. Bunun için ya yüksek soğutma oranları ya da düşük sıcaklık derecelerinde viskoziteyi artıran ve buz kristallerinin oluşumunu baskılayan kriyoprotektan çözeltilerin kullanımı gerekir (Sutton 1991, Vajta 2000).

1.10.6 Kriyoprezervasyon Sırasında Hücrede Meydana Gelebilecek Değişiklikler

Sıcaklığın değişmesine bağlı olarak hücrede bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Sıcaklığın 37°C' den 7°C' ye kadar düşmesi ile enzim reaksiyonlarında yaklaşık olarak 7-8 kat azalma meydana gelmektedir. Sıcaklığın düşmeye devam etmesiyle beraber hücrenin içinde bulunduğu solüsyonlarda da bazı fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelir.

Hücrelerin dondurulmasında suyun biyolojik formunun değişimi söz konusudur. Yani dondurma, suyun biyolojik olarak kristalleşmesi, şekil değiştirmesi ile gerçekleşir. Hücrelerin dondurulma işlemi sırasında ekstrasellüler solüsyon kendiliğinden veya etkime (seeding) ile -5 ila -100°C' de kristalleşir. Ancak intrasellüler ortam hücre membranının etkisiyle henüz donmamıştır. Söz konusu oluşum sırasında ekstrasellüler suyun buzlaşması nedeniyle ortamda bulunan maddelerin yoğunluğunda artış oluşur. Bu durum kimi kimyasal maddelerin hücre içinde ve dışında farklı yoğunlukta bulunmalarına yol açar. Meydana gelen farklı yapı ya da denge nedeniyle bir kısım sıvının hücre dışına çıkması (dehidrasyon) ile bu kez de hücre içinde bulunan bir kısım erimiş maddelerin yoğunluğunda yükselme meydana gelir ve hücre içerisinde de kristaller oluşur. Dondurulma sırasında hücrede meydana gelebilecek değişiklikler;

1. Çözücüler ve tuz solüsyonları sıvı fakat vizkozitesi yüksek fazda ise, su, buz kristallerine dönüşür, sıvı fazdan katı hale geçer. Sıcaklığın düşmesi sonucunda meydana gelen buz kristalleri, hücre içi sistemi koruyan hücre membranlarında büyük lezyonlar oluşturabilir.

2. Sıcaklığın düşmesi ve suyun buz kristalleri oluşturması nedeniyle geride kalan tuz solüsyonları ekstrasellüler ortamdaki çözünürlük etkilerini gittikçe azaltır. Su-tuz-buz karışımı kristalize olduğu anda buna ötektik noktaları denir. Tuz bileşenler, ötektik noktalarına suyun kristalleşmesi ile ulaşır. Bu değerler normal kültür solüsyonları için -10°C ile -17°C arası, sodyum klorid için ise -25°C dir. Bu sebeple kriyoprotektif ajanların yokluğunda mortalite artacak, hücreler yüksek oranlarda pH değişikliklerine ve farklı konsantrasyonlarda tuzların etkisine maruz

kalacaktır. Bu durum lipoprotein denatürasyonu ve buna bağlı olarak membran içinde zorlanmalara neden olur ve bu da solüsyon etkisi olarak açıklanabilir.

3. Dondurma solüsyonu içindeki tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte hücre ozmotik hale geçer ve su kaybeder, bunu takiben pasif dehidratasyon ve büzüşme başlar. Hücre yoğunluğundaki azalmanın çok olması hücre yapısında geri dönüşümsüz hasarlara yol açarak hücrenin ölümüne sebep olur.

4. Kriyoinjury: Gametlerdeki soğutma zararı hiperozmotik stres, soğuk şoku stresi, ozmotik büzüşme-şişme sonucu oluşmaktadır. Hiperozmotik çevrenin yaratılmasında ortam pH' ı, sellüler dehidrasyonda artış, hücre membran protein-lipit kompleksinin zayıflaması önemli yer tutar. Donma esnasında, oosit ve embriyoda oluşan koyu lipit damlacıklarının soğuk şoku hasarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir.

Gamet ve embriyonun soğuk şokuna maruz kalmasında gelişen zararlar, intrasellüler dehidrasyon, membran lipit ve proteinlerinde destabilizasyon-denatürasyon, hücre ve endoplazmik retikülümünde ozmotik şişme, plazma membranında intramembranöz kümeleşme, zona pellusidada fraktür, akrozomal enzimlerin salınımı, soğuk şokuyla spermin sirküler hareketi ve motilite kaybı, oositlerin IVF kayıpları olarak sıralanabilir. Bunların sonucunda, hücrede apopitozis, serbest radikal oluşumu, ATP sentezinde aksama, fertilitate kaybı, polispermi ve tetraploidi oluşmaktadır (Aydiner 2008).

1.10.7 Sperm Kriyoprezervasyonu

Sperm hücreleri dondurulduktan sonra canlı olarak uzun yıllar saklanabilir ve istenildiği takdirde çözülerek yardımcı üreme tekniklerinde kullanılabilir.

Sperm ve dondurucu hava sıcaklığı ile ilgili ilk gözlemlerin 1770 yıllarda yapıldığı bildirilmiştir. 1866 yılında ilk kez insan sperminin dondurularak saklanması fikri ortaya atılmıştır. 1940 yılında Londra' da Sir Alan Parker ve arkadaşları kümes hayvanı spermatozoasını dondurarak saklamak istemişler, fakat çok başarılı olamamışlardır. Dondurulmuş çözülmüş sperm kullanılarak elde edilen ilk gebelik 1953 yılında bildirilmiştir. 1960 yılında sperm dondurma ve saklamada sıvı nitrojen kullanılmaya başlanmıştır. 1961 yılında Audrey Smith

yayınladığı makalede, boğa spermini gliserol kullanarak dondurduğunu ve donmuş bu spermın çözülüp kullanılması ile başarılı gebelik elde ettiğini bildirmesi ile bu konudaki çalışmalar hızlanmıştır.

1972 yılında ilk hücre dondurma bankası kurulmuştur. Bir yıldan fazla süredir saklanan sperm ile dünyaya gelen ilk sağlıklı bebek 1973 yılında doğmuştur. Tyler Tıp Merkezinde 20 yıl gibi uzun bir süredir saklanmakta olan sperm ile canlı bir bebek doğumu da 1998 yılında gerçekleşmiştir. (Tunç ve Bozkırlı 2006).

Kriyoprezervasyonun yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) önemli bir yer tuttuğu bilinmekle beraber sperm kriyoprezervasyonu kullanım amaçlarını şu şekilde sıralayabiliriz;

1. Sperm parametreleri normal olup; kemoterapi, radyoterapi görecekt hastaların örneklerinin alınıp saklanması,
2. Spermatogenezi inhibe edebilecek ilaçların kullanım öncesinde ejakülattan sperm alınıp saklanması,
3. Testis veya prostat cerrahisi öncesinde ejakülattan sperm alınıp saklanması,
4. Obstrüktif azospermiden şüphelenilen ve yardımcı üreme tekniklerinde kullanılması planlanan hastalarda öncesinde testisin histopatolojisi hakkında bilgi sahibi olunması, eşi hazırlanmamış olan nonobstrüktif azospermik hastalarda testiküler sperm ekstraksiyon (TESE) ile bulunan spermilerin saklanması,
5. Azospermik hastalarda başarılı veya başarısız bir işlem sonrasında istenilen gebeliklerde cerrahi işlemleri tekrarlamamak için alınan örneğin saklanması,
6. Prepubertal dönemde malignensi sebebiyle kemoterapi ya da radyoterapi,

7. YÜT planlanan hastanın psikolojik faktörler gibi sebepler nedeniyle işlem günü örnek alınma problemi olabileceği düşünülüyorsa önceden örnek alınıp saklanması (McCoshen ve Fernandes 1990, Rengi ve ark 2003).

Spermatozoondaki membransel yapılar (plazma membranı, dış akrozomal membran ve mitokondri membranı) ile oosit-embriyo membranı, donma/çözünme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Membran yapıları akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitlerle bezeli iki sıralı fosfolipit katmanından oluşmuştur. Bu yapıların termodinamik özellikte ve %65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden (yağ asidi) oluşması, membranların soğutulmalarının sonucu olarak irreversibl faz değişimine, sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmaktadır (Watson 1995, Watson 2000).

Gelişen faz değişimi membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol açarak, çözüm sonu canlılığını azaltmaktadır. Bu değişimler sonrası oluşan stabilizasyonun bozulmasıyla da hücrede soğuk şoku gelişmekte, bu durum terminolojide soğutma hasarı olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca membranların doymamış fosfolipitlerce zengin olması, lipit peroksidasyonuna karşı duyarlılığı doğurmakta, hücrelerin kısa ya da uzun süreli saklanması sırasında hücresel zararı şekillendirmektedir (Watson 1995, Holt WT 2000a, 2000b).

Spermin değişik oluşum evrelerine spesifik kriyoprezervasyon yapılabilir. Sperm testisten çıktıktan sonra plazma membran lipid ve proteinlerinde fiziksel ve kimyasal değişiklikler olur. Değişik maturasyon evresindeki spermier farklı kriyobiyojik özellikler gösterirler ve farklı dondurma çözme yöntemi gerekir. Ejakulat sperminin dondurma ve çözme sensitivitesi epididimal sperm ve testiküler spermden daha yüksektir. Kriyoprezervasyon sırasında sperm hasarlanması olabilir. Sperm motilitesi ve sperm-oosit füzyon kapasitesi azalabilir veya plazma membran lipid peroksidasyonuna bağlı olarak fertilizasyon azalabilir. Bunların sebebi serbest oksijen radikallerinin (hidrojen peroksit vs) üretiminin artmasıdır (De Lamirande ve ark 1997).

Sperm dondurmanın sperm motilitesi ve canlılığı üzerine olumsuz etkisi olabilir. Bunu önlemek için bazı araştırmacılar kültür ortamına koruyucu olarak askorbik asit, katalaz, E vitamini vs. gibi antioksidanların eklenmesini önerirler.

Dondurma çözme işlemi sırasında spermin fertilizasyon kapasitesini azaltan boyun kırıkları görülebilir (Verheyen ve ark 1997). Akrozomal ve plazma membranlarında şişme ve parçalanma olabilir (Askari ve ark 1994).

1.11 Apoptozis

Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur. Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (Thompson 1995, Ameisen 1996).

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise de belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (Bellamy ve ark 1995, Cummings 1997).

Apoptozis ve mitozis erişkin dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (Bellamy ve ark 1995, Majno ve Torisl 1995, Schwartzman ve Cidloski 1993).

Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (Lu ve ark 2000). Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir (Gavrieli ve ark 1992, Lu ve ark 2000).

1.11.1 Apoptozisin Önemi

İnsan vücudunda her saniyede 100.000 hücre mitoz ile oluşurken, yine benzer sayıda hücre apoptozis ile ölür (Vaux 1999).

Programlanmış hücre süreci ya da apoptozis genel olarak belirli morfolojik özellikler ile karakterize edilen, ATP bağımlı biyokimyasal bir mekanizmadır. Apoptozis normal hücre turnoverı, normal gelişim, immün sistem fonksiyonu, hormon bağımlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal olarak uyarılmış hücre ölümünü içeren çeşitli işlemlerin hayati komponenti olarak göz önünde bulundurulmaktadır. Uygun olmayan apoptozis nörodejeneratif hastalıklar, iskemik zarar, otoimmün rahatsızlıklar ve birçok kanser tipini kapsayan bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (Elmore 2007).

Apoptozis normal olarak gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamını sağlamak için bir homeostatik mekanizma olarak karşımıza çıkabileceği gibi, aynı zamanda hastalık ya da zararlı ajanlar tarafından hücreler zarar gördüğünde ya da immün reaksiyonlar gibi bir savunma mekanizması olarak da oluşabilir (Eröz ve 2012).

Normal fizyolojideki apoptozisin rolü, karşıtı olan mitozis kadar önemlidir ve çeşitli hücre popülasyonunun düzenlenmesinde mitozise zıt rol oynamaktadır. Organogenez sırasında dokuların yıkılarak yeniden yapılması sırasında da fizyolojik apoptozis önemli yer tutar. Erişkin bir insan vücudunda homeostazisin devamlılığı gereklidir ve apoptozis tarafından gerçekleştirilen bu ölümleri dengelemek için her gün yaklaşık olarak 10 milyar hücre yapılır (Eröz ve ark 2010, Renehan ve ark 2001).

Apoptozis çeşitli gelişim basamakları süresince kritik öneme sahiptir. Örnek olarak sinir sistemi ve immün sistemin her ikisi hücrelerin aşırı üretimi ile açığa çıkar. Bu başlangıçtaki aşırı üretimi daha sonra sırasıyla fonksiyonel sinaptik bağlantılarını kuramayan ya da antijen spesifitesini üretemeyen hücrelerin ölümü takip eder (Nijhawan ve ark 2000, Opferman ve Korsmeyer 2003).

Apoptozis aynı zamanda patojenlerin istila ettiği hücrelerden vücudu kurtarmak için gereklidir ve skar içerisindeki granülasyon dokusunun değişimi ve inflamatuvar hücrelerin uzaklaştırılmasını içeren yara iyileşmesinin hayati bir komponentidir. Apoptozis periferel dokularda ya da merkezi lenfoid organlarda (kemik iliği ya da timus) ki olgunlaşma süresince aktive edilmiş ya da otoagresif

immün hücrelerin elimine edilmesi için de gereklidir. Daha da ötesi, organizmalar yaşlandıkça, bazı hücreler hızlı bir oranda kötüleşmeye başlarlar ve apoptozis yolu ile elimine edilirler (Eröz ve ark 2012).

1.11.2 Apoptozisin morfolojisi

Apoptozisde ana morfolojik olay, nukleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır (Akşit ve Bildik 2008). İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (Walker 1999). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz. Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey yapılarını kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, bir kaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler etrafında açık bir parlama şeklinde görülmektedir.

Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Akşit ve Bildik 2008). Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidilserin (PS), aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri PS ile bağlanır ve fagositozu uyarır. (Öktem ve ark 2001).

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapı 'zeiozis' olarak tanımlanır. Zardaki

tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (Tomatır 2003). Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptozis sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosite edilirler. Apoptozis 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptozisde önemli bir role sahiptir (Saraste ve Pulkki 2000).

Elektron mikroskopunda apoptozis esnasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan "Apoptozis İndükleyici Faktör" salınımı, gerçekleştiği bildirilen morfolojik değişikliklerdendir (Öktem ve ark 2001, Akşit ve Bildik 2008).

1.11.3 Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar

1.11.3.1 Fiziksel Farklılıklar

1- Nekroz birleşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptoziste tek tek hücreler etkilenir (Cummings ve ark 1997, Spencer ve ark 1996).

2- Nekroz fizyolojik olmayan uyaranlarla başlar, apoptozis fizyolojik uyaranla da başlayabilir (Wyllie 1980, Bellamy ve ark 1995)

3-Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda inflamatuvar cevap vardır, apoptoziste ise yoktur (Bellamy ve ark 1995, Cummings ve ark 1997, Majno ve Torisl 1995).

1.11.3.2 Morfolojik Farklılıklar

1- Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptoziste zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz (Cohen 1993b, Spencer ve ark 1996).

2- Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar, apoptoziste ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (Cohen 1993a, Cummings ve ark 1997).

3- Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptozis hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (apoptotik cisimler) (Cummings ve ark 1997).

4- Nekrozda hücre zarında vezikül formasyonu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptoziste zara bağlı veziküller oluşur (Cohen 1993b).

5- Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptoziste; apoptozisi başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur (Cohen 1993a, 1993b).

1.11.4 Apoptozis Mekanizmaları

Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır (Erdoğan 2003). Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer olarak başlatılabilir ya da bir uyarıcı sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyarıcılar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktör (IGF), interlökin-2 (IL-2) gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüslerde de (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir (Akşit ve Bildik 2008).

Apoptozisin induklenmesinde üç sinyal yolunun olduğu bilinmektedir.

Bunlar:

1-Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması,

2-Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme,

3-Endoplazmik Retikulum aracılı apoptozis oluşturulması.

1.11.5 Apoptozisin Genetik Kontrolü

1.11.5.2 Antiapoptotik Proteinler

p-53; apoptozisi düzenleyen, tümör baskılayıcı bir gen dir. Hipoksi ve serbest radikal oluşumu p-53 aracılı DNA onarımı ve apoptozisi başlatır (Banasiak ve Haddad 1998).

c-myc; bir transkripsiyon düzenleyici faktör olan c-myc proteini, ortamda bazı faktörlerin bulunmasına bağlı olarak hücrenin proliferasyonuna ve apoptozise uğramasına neden olur (Evan ve ark 1992).

Bcl-2 ve Bcl-x1; Bcl-2 (antiapoptotik protein) ailesi apoptotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur ve bir düzineden fazla üyesi vardır. Bunlardan bazıları apoptotik aktivitenin öncüleri iken (bax ve bad), diğerleri antiapoptotik (hücre koruyucu) proteinlerdir (Lu ve ark 2000, Newton ve Strasser 1998).

1.11.5.3 Proapoptotik Proteinler

Bax, Bad ve Bid; apoptozisi indükleyen proteinlerdir.

1.11.6 Spermatogenez ve Apoptozis

Doku canlılığında ve canlılığın devamında, normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptozis, testiküler dokuda da sıklıkla saptanan bir olaydır. Bilindiği üzere spermatogenezis, spermatogonial kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm hücresinin oluşmasıdır (Koçyiğit ve Çevik 2011). Normal spermatogenez sırasında, hücre

gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (Sinha ve ark 1998, Sharpe 1994).

Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyumda hücre ölümüne yol açar (Beumer ve ark 2000). Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (Jefferson ve ark 2000). Testiste devamlı olarak kendiliğinden apoptozis gerçekleştiği belirlenmiştir (Kerr 1992). Testiste, hasarlı germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin %75' i apoptozise maruz kalır (Hsueh ve ark 1996). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre elenmesi, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (Koçyiğit ve Çevik 2011).

Testiste, germ hücresi apoptozisinin hormonlar gibi çeşitli dış faktörler ile kontrol edildiğinin bilinmesine karşın fizyolojik önemi konusunda tam bir bilgi yoktur (Dunkel ve ark 1997). Fizyolojik olarak germ hücresi ölümü yaşam boyu sürer (Bartke 1995, Billig 1995).

Radyasyon veya toksinlere maruz kalma gibi dış etkiler de germ hücresi apoptozisine neden olur (Henriksen ve ark 1995, Allard ve Boekelheide 1996, Henriksen ve ark 1996, Schlegel ve ark 1996, Lee ve ark 1997). Bunun yanında Fas-FasL etkileşiminin de germ hücresi apoptozisine neden olduğu belirlenmiştir (Lee ve ark 1997). Bu sistem, birçok hücre tipinde apoptozisin fizyolojik düzenleyicisidir (Henriksen ve ark 1995, Henriksen ve ark 1996).

Apoptozisin, normal bir spermatogenez sırasında varsayılan iki rolü vardır; germ hücre sayısını sertoli hücrelerinin destekleyebileceği bir sayıda tutmak ve olası anormal spermatozoonları seçici olarak azaltmaktır (Sakkas ve ark 2002, Sakkas ve ark 2003). Ancak hasarlı apoptotik germ hücrelerinin uzaklaştırılması başarısız olursa semen içinde anormal sperm sayısı yükselir ve düşük fertiliteye neden olur (Anzar ve ark 2002).

Spermatogenez esnasında germ hücrelerinin apoptozisinin kontrolü özellikle önemlidir. Bu kontrol germ hücreleriyle yakından ilişkili sertoli hücrelerinden türevlenen sinyaller ile gerçekleştirilir. Bu sinyallerin anlaşılması

genetiği değiştirilmiş hayvanların spermatogenik bozukluklarının çalışılmasıyla ortaya çıkar. Diğer hücre tipleri gibi, erkek germ hücreleri de dış sinyallerle, hücreler arası sinyalleme yollarını kendi iç çevrelerinde aktive ederek kendi kaderlerini belirleyen yanıtı verirler. Bcl-2 ailesi proteinleri germ hücrelerinin kaderlerini belirleyen bir sinyalleme yoludur. Bu ailenin bazı yeleri hücrelerin hayatta kalmasını düzenler (rneğin; Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1) diğerleri de antagonistik çalışır (Bax, Bak, Bim) (Print ve Loveland 2000).

Son yıllarda seminifer epitelyum döngüsünde apoptozisin meydana geldiği bilinmektedir. İndüklenmiş germ hücre apoptozisi spermatogenik döngünün spesifik aşamalarında açığa çıkarılmıştır ve spermatogenezis sırasında germ hücre ölümünün hücre dışı kontrolü rapor edilmiştir (Levy ve Seifer-Aknin 2001). Ancak, ejakula spermdeki apoptozisin biyolojik önemi bilinmemektedir (Ricci ve ark 2002).

Yapılan çalışmalarda sperm kriyoprezervasyon işleminin fosfatidilserin translokasyonuna yol açmak suretiyle apoptozisi indüklediği bildirilmiştir. Özellikle, sıvı azot buharı, sperm sulandırma ve ekilibrasyon aşamaları apoptozis ve benzeri olayların potansiyel başlatıcılarıdır. Düşük sperm yoğunluğu ve anomalilerin apoptozisi indüklediği belirtilmiş, insanlardaki bir çalışmada 35 yaş ve üzeri grubun 25 yaş altı gruba göre yüksek apoptozis gösterdiği belirtilmiş olsa da herhangi bir ilişkinin bulunmadığı yönünde sonuçlanan çalışmalarda mevcuttur (Koçyiğit ve evik 2011).

1.11.7 Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

1.11.7.1 Morfolojik Yöntemler

A) Işık Mikroskobu:

Apoptozis, Jain ve arkadaşları tarafından hücreler boyandıktan sonra işık mikroskobu kullanılarak değerlendirilmesi gerektiği bildirildi (Jain ve ark 2009).

-Hematoksilen-Eozin Boyama (HE)

Morfolojik boyama metodlarının en ucuz ve en kolay olanı HE boyamadır. HE ile boyanan materyaller hemen hemen tüm laboratuarlarda işık mikroskobu

kullanılarak değerlendirilir. HE boyama hem *invivo* dokularda hem de *invitro* hücrelerde kullanılabilir (Brown ve ark 2001, Huang ve ark 1997).

Eğer boyama iyi yapılmışsa apoptozis için spesifik değişiklikler kolayca gözlenebilir. Mitotik hücrelerin erken fazı (profaz veya metafaz) bazı durumlarda apoptotik hücrelerle karıştırılabildiğinden dolayı tecrübeye ihtiyaç duyulmaktadır.

HE boyamada, hematoksilin boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi.

-Giemsa boyama

Giemsa ile boyamada, HE ile boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilin boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilin boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur. Bu boyamanın toplam süresi bir saatten daha azdır aynı zamanda ucuz bir boyama yöntemidir (Ulukaya ve ark 2011).

B) Floresan mikroskopi:

Floresan mikroskopi, floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI “4,6-diamidine-2’-phenylindole”, propidium iodide, Annexin V, akridin orange, ethidium bromide, FITC “fluorescein isothiocyanate”) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA’ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanırırlar. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. Propidium iyodür) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekroz ile ölüp

ölmediklerinin ayrımı, hematoxilen boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisine bakılarak yapılır. Kromatin kondensasyonu veya nukleus fragmentasyonu olan hücrelerin apoptotik hücreler olduklarını düşündürür (Güleş ve Eren 2008).

C) Elektronmikroskopi:

Elektron mikroskobuyla değerlendirilen apoptozis en değerli metot olarak düşünülmektedir (Asher ve ark 1995). Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir (Ulukaya ve ark 2011).

D) Faz kontrast mikroskopi:

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları alt tabakadan ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (blebs) izlenebilir. Hücreler henüz substratuma yayılmış haldeler ise hücrelerin sitoplazmasında ortaya çıkan vakuoller de gözlenebilir. Hücre kültürü ortamında apoptozise giden hücrelerin başlangıçta hücre membranları intakt olmasına rağmen ileri dönemlerde sekonder nekroz gelişir ve böylece membran bütünlükleri bozular.

Cepciklerin oluştuğu aşamada membran bütünlüğü halen tamdır ve bu aşamada nukleus morfolojisindeki değişiklikler floresan boyalarla gözlenebilir. Fakat bu dönem uzun sürmez dakikalar içinde membran bütünlüğü bozular. İstenirse hem faz kontrast mikroskopisi hem de floresan mikroskopisi aynı anda kullanılabilir. Böylece nukleusu renklendirilmiş ve belirgin bir şekilde ortaya konmuş hücrelerin faz kontrast mikroskopisi fotoğrafları elde edilebilir (Güleş ve Eren 2008).

1.11.7.2 İmmünohistokimyasal Yöntemler:

A) Anneksin V yöntemi

Membran fosfolipidlerinden biri olan PS normalde membranın sitoplazmazmik yüzeyinde lokalize olur. PS molekülü apoptozise uğrayan hücrede, hücrenin dış yüzeyine transloke olur. Bu translokasyon, hücre ortamına uygulanan bir floresan madde ile işaretlenen Annexin V, hücrenin apoptozise dönmesini ve PS' yi tesbit etmesini sağlar. Translokasyon hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (Vermees ve ark 1995, Li ve ark 2011). Spermatozoanın bütünlüğü propidium iyodür (PI) ile annexin V boyama yönteminin konjugasyonu ile kolayca tesbit edilebilir (Sion ve ark 2004). PI membrandan geçemeyen vital bir boyadır ve ölü spermatozoada membran bütünlüğü tamamen bozulduğu için PI membrandan geçerek DNA' yı boyar (Glander ve ark 1999). Bununla birlikte nekroz geçiren bir hücre de anneksin V + FITC ile boyanmış olabilir ancak verilerin yorumlanmasına dikkat edilmelidir çünkü hücrenin dış zarına çıkıp boyanan PS molekülleri ve membran hasarı aracılığıyla sitoplazmaya giren işaretleyici yanlış pozitif bir sonuç verebilir. Floresan mikroskopu mevcut değilse flow sitometrik metodu da anneksin V + FITC için kullanıma uygundur (Özdemir 2011).

B) TUNEL yöntemi

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar (Ansari ve ark 1993).

Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak "TdT-dUTP

nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır (Güleş ve Eren 2008).

Parafin bloklar, frozen kesitler ve hücre kültürleri bu metodla kolayca analiz edilebilir. Bu yöntem bir hücre populasyonundaki apoptotik hücre ölümlerini belirgin bir şekilde görüntüler. Genellikle immünohistokimyasal kurallar örnekler için uygulanmaktadır.

Fragmente ya da kondanse olan apoptotik hücreler DAB ile boyanırsa pozitif olan hücreler kahverengi boyanır. Normal hücreler hematoksilin ile kırmızı-mavimsi veya metilen yeşili ile yeşil boyanır. Bununla birlikte TUNEL yönteminin bazı sınırlılıkları vardır. TUNEL yöntemiyle işaretlenen hücrelerin bazıları esasen aktif proliferatif hücreler olabilir (Ulukaya ve ark 2011).

C) M30 yöntemi

M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18’in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler. Sadece sitokeratin 18’i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır. Sitokeratin 18 (CK18) tek katlı ve glandüler epitelyum hücrelerinde bulunan tip 1 intermediate filament proteinidir. Çoğunlukla akciğer, karaciğer, prostat, göğüs ve kolon kanser tiplerinde eksprese edilirken, lenfoid ve nöral hücrelerde bulunmaz (Overbeeke ve ark 1998, Pınarbaşı 2007).

D) Kaspaz-3 yöntemi

Prokaspaz-3 farklı hücre tiplerinde apoptoziste anahtar bir rol oynayan proteazdır (Janicke 1998). Prokaspaz-3 apoptozis içeren farklı teşvik ediciler tarafından aktive edildikten sonra aktif kaspaz 3 olarak adlandırılır. Kaspaz 3’ ün kırılıp kırılmadığı immünohistokimyasal olarak tesbit edilebilir. Kaspaz 3’ ün kırılmasının tesbiti, doku ve hücrelerde apoptozisin tesbit edilmesi için spesifik bir metodu (Arroyo ve ark 2010, Cheng 2011).

E) ELİSA Testi

ELISA testi, viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonların tanısında ve apoptozisin belirlenmesinde kullanılan, serolojik tanı yöntemlerinden biridir (Güleş ve Eren 2008).

Hem hücre kültüründe hem de insan serumunda ELİSA aracılığıyla internükleozimal DNA fragmentasyon tesbiti için de uygundur. DNA fragmentasyonuna ek olarak sitokeratin 18'i kıran kaspaz, ELİSA aracılığıyla ölçülen ya hücre kültürü ya da serumda apoptozis için yeni bir marker olan M30 antijeni olarak da adlandırılır (Ulukaya ve ark 2007, Takada 2004).

1.11.7.3 Biyokimyasal Yöntemler

A) Agaroz Jel Elektroforezi:

Apoptozis sırasında genomik DNA belirli bölgelerde çoklu veya 180 baz çifti biçiminde bölünür bu yüzden elektroforezden sonra bir merdiven basamağı gibi görünür (Gerschenson ve Rotello 1992). Bu nedenle bu bulgu apoptozisin ayırt edici bir özelliğidir ve nekrozda bu olay yoktur. Sonuç olarak nekrozu apoptozisten ayırt etmek için kullanılan bir yöntemdir. Temelde, son zamanlardaki çalışmalarda diğer metodlarla birlikte agaroz jel elektroforezi apoptozis ve nekrozu onaylamak için başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Rainaldi ve ark 2008).

B) Western blotting

Bu metot yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. Bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriden çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilir. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır (Yılmaz 2005).

4- "Flow" Sitometri Yöntemi

Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozise eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür (Özdemir 2011). Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi ile klinikte apoptozisin belirlenmesi açısından kullanışlıdır. Apoptozis flow sitometri uygulamasında iki şekilde belirlenir

- Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- Anneksin V kullanılarak (Ulukaya ve ark 2011).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne Aralık 2012 - Ocak 2013 tarihleri arasında başvuran hastalarla gerçekleştirildi. WHO 2010 kriterlerine göre normospermik olan toplam 20 hasta 2012/200 no.lu etik kurul kararınca seçildi (Etik kurul kararı ektedir).

Bu hastalardan 3 günlük cinsel perhiz sonrasında alınan numuneleri steril, toksik olmayan polypropilen bir kaba toplandı ve ortalama 25 dk'lık likefaksiyon süresinin ardından semen analizleri yapıldı. Semen analizleri ilk önce fiziksel muayene yapılarak koku, renk, volüm ve viskozite yönünden değerlendirildi. Semen örneği viskozitesi, 5ml' lik pipet kullanılarak semikantitatif olarak ölçüldü. Likefaksiyondan sonra ejakulat 5 ml' lik pipetle aspire edilip bir damla semenin kendi ağırlığı ile pipetten damlamasına izin verildi. 2 cm' den fazla ipliksi bir şekilde uzayan semen damlaları hipervisköz olarak değerlendirildi.

Geçerli viskozite 25 dakikalık likefaksiyon sonrası +1 derece olarak kabul edildi. Semen volümü dereceli pipetle ölçülerek saptandı. Daha sonra mikroskopik incelemeleri yapmak için semenden alınan 10 µl örnek derinliği 0.01 mm olan Makler sayım kamarasının (Sefi - Medical Instruments) ortasına damlatılarak üzerine grid camı kapatıldı. Nikon T1A Input AC ışık mikroskopunda toplamda 200X büyütme altında değerlendirme yapıldı. Gridin üzerinde iki satır bir sütun veya iki sütun bir satır içerisindeki spermatozoalar sayılarak ortalaması alındı ve böylece spermatozoa konsantrasyonu milyon/ml olarak tespit edildi. Aynı zamanda Makler sayım kamarası kullanılarak motilite değerlendirmesi yapıldı. Motilite değerlendirmesi için 100 hücre sayıldı. Doğrusal hareket göstererek en az 3 kareyi kat eden spermatozoaların motilitesi +4, karenin dışına çıkan ancak 1-2 kare sonra geri dönme hareketi gösteren spermatozoaların motilitesi +3, bir kare içerisinde yerinde baş veya kuyruk sallama şeklinde hareket eden spermatozoaların motilitesi +2, hiç hareket göstermeyen spermatozoaların motilitesi +1 olarak değerlendirildi (Makler 1980, WHO 2010).

Viabilityyi değerlendirmek için likefiye olmuş semen üzerine bire bir oranında %10 sulu Tripin mavisi boyası damlatıldı ve lamelle kapatıldı. 400X

büyütmede en az 100 hücre sayıldıktan sonra boya alan spermatozoalar nonviabl, boya almayan spermatozoalar ise viabl olarak değerlendirildi ve viabilite oranı yüzde olarak kaydedildi.

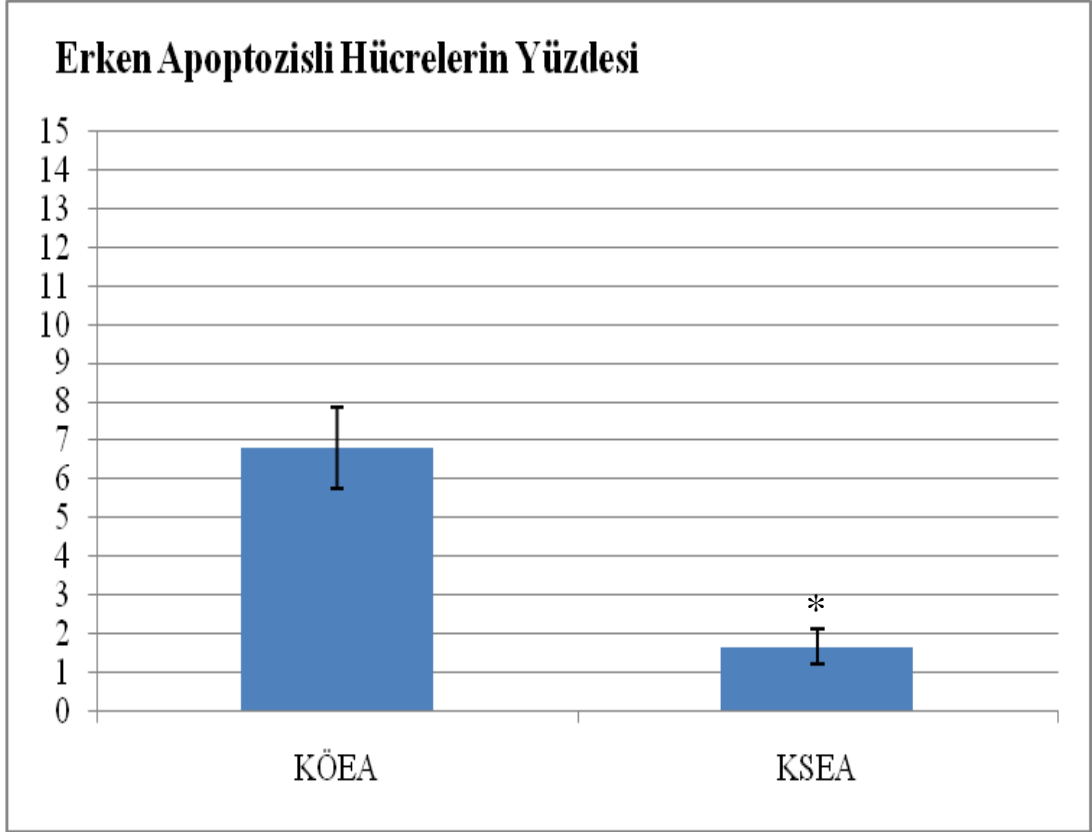
WHO 2010 kriterleri morfoloji değerlendirmesi için kullanıldı. 400X büyütmede morfolojisi sağlam ve normospermi sınıfına girenler çalışmaya dahil edildi. Bundan sonraki aşamada her bir hastadan alınan örneklerin semen parametreleri incelendikten sonra iki gruba ayrıldı. İlk gruba dondurulmadan AnnexinV testi uygulanırken, ikinci gruba dondurma-çözme işlemi uygulandıktan sonra AnnexinV testi uygulandı.

Dondurma işleminde Test Yolk Buffer adlı kriyoprotektan kullanıldı. Dondurulacak semen örneklerinin üzerine sperm dondurma medyumu 1:1 oranında damla damla ilave edildi. Her bir damla sonrası semenin ve sperm dondurma medyumunun karışmaları sağlandı. Bu karışım straw adı verilen hücre dondurmak için kullanılan dondurma tüplerine yüklendi. Sıvı azot buharında (sıvı azot üst seviyesinden en az 7 cm yukarıda) sıvı azotun bulunduğu kabın ağzı yarı açık şekilde strawlar 10 dakika bekletildi ve daha sonra sıvı azotun bulunduğu kabın ağzı tam kapalı olacak şekilde de 20 dakika bekletildikten sonra tanklardaki yerlerine transfer edildi. Bir saat bekletildikten sonra çözme işlemine geçildi. Strawlar sıvı azot tankından çıkarıldı, 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra eriyinceye kadar 37°C 'de bekletildi. Strawların içerikleri 1 ml' lik ependorflara aktarıldı. Son aşama ise Annexin V' in kullanılması. Bunun için dondurulmuş-çözölmüş semen ve dondurma işlemi yapılmamış semenden total hücre sayısı 1 milyon olacak şekilde örnek 1 ml' lik ependorflara aktarıldı. Bu iki gruba ayrılan semen örneklere Fosfat Buffer Saline (PBS) eklenip 1000rpm'de 5dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Pellete hazır kit Annexin V ilave edildi ve karıştırıldı. Karışımdan her bir lama yaklaşık olarak 45-50µl damlatılıp üzerleri lamelle kapatıldı ve oda sıcaklığında yaklaşık 10-15 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra Olympus BH-2 foto ataşmanlı floresan mikroskop altında karanlık ortam koşullarında incelendi.

3. BULGULAR

Çalışmamız, Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Yardımcı Üreme Teknikleri Ünitesi'ne başvuran, normospermik toplam 20 kişi ile gerçekleştirildi. Semen kalitesi WHO kriterlerine göre standart olan bu erkeklerle gerçekleştirdiğimiz çalışmada alınan numuneler kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası olmak üzere 2 grupta incelendi.

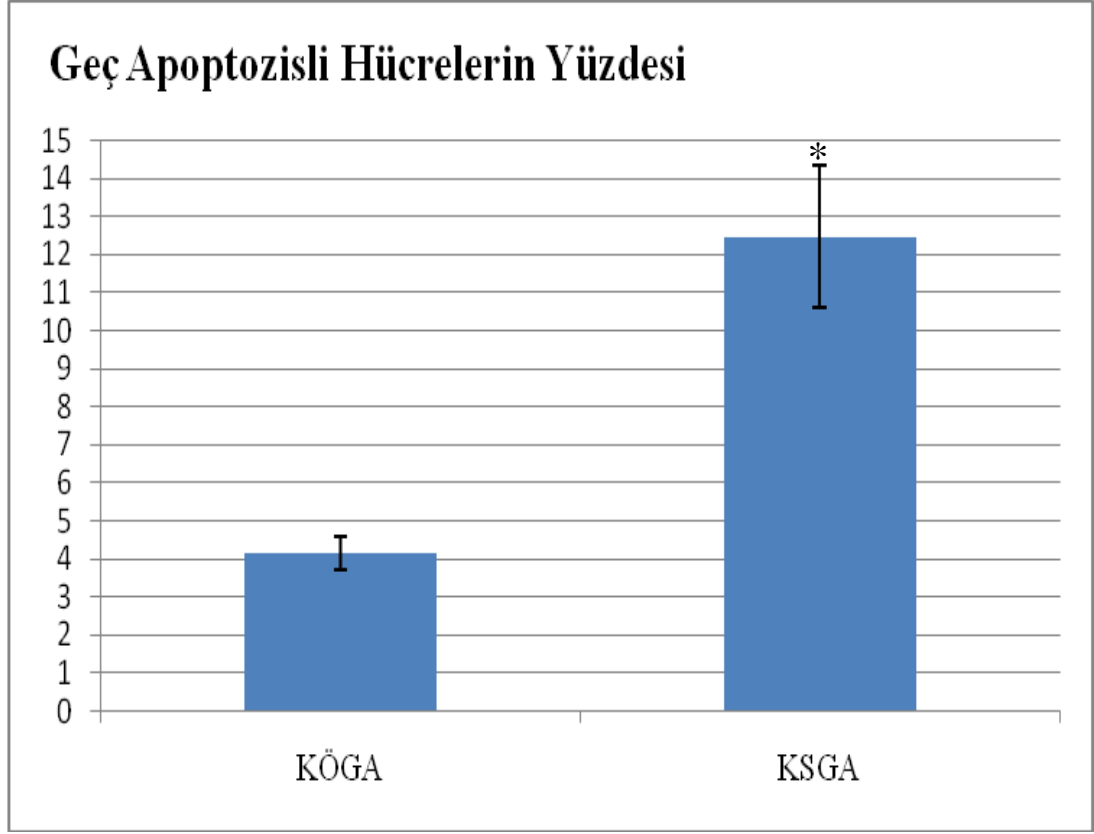
Çalışmamızda kriyoprezervasyona tabi tutulan örnekler Test Yolk Buffer ile muamele edildikten sonra önce azot buharında daha sonra sıvı azota daldırılarak işlem tamamlandı. Çözme işlemi 1 saat sonra gerçekleştirildi. Dondurulmuş örnekler tanktan çıkarıldıktan sonra 1 dakika oda sıcaklığında, 5 dakika 37°C inkübatörde bekletildikten sonra çözme işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra çözülen örnekler Annexin V kiti ile muamele edilip preparatlar Olympus BH-2 foto ataşmanlı floresan mikroskop ile kontrol edildi ve fotoğraflandı. Kriyoprezervasyon uygulanmayan semen örneklerine ise yıkama işlemi sonrası Annexin V kiti uygulandı. Preparatlar Olympus BH-2 foto ataşmanlı floresan mikroskop ile kontrol edildi ve fotoğraflandı.



Grafik 3.1 Kriyoprezervasyon öncesi erken apoptozisli hücrelerin (KÖEA) ve kriyoprezervasyon sonrası erken apoptozisli hücrelerin (KSEA) yüzdesi.

Veriler SPSS Windows 13.0 programı ve bağımsız iki grup arası farkların t test sonuçlarına göre yorumlandı (Kriyoprezervasyon öncesi erken apoptozisli hücrelerin yüzdesi $6,8 \pm 1,05$; kriyoprezervasyon sonrası erken apoptozisli hücrelerin yüzdesi $1,65 \pm 0,45$).

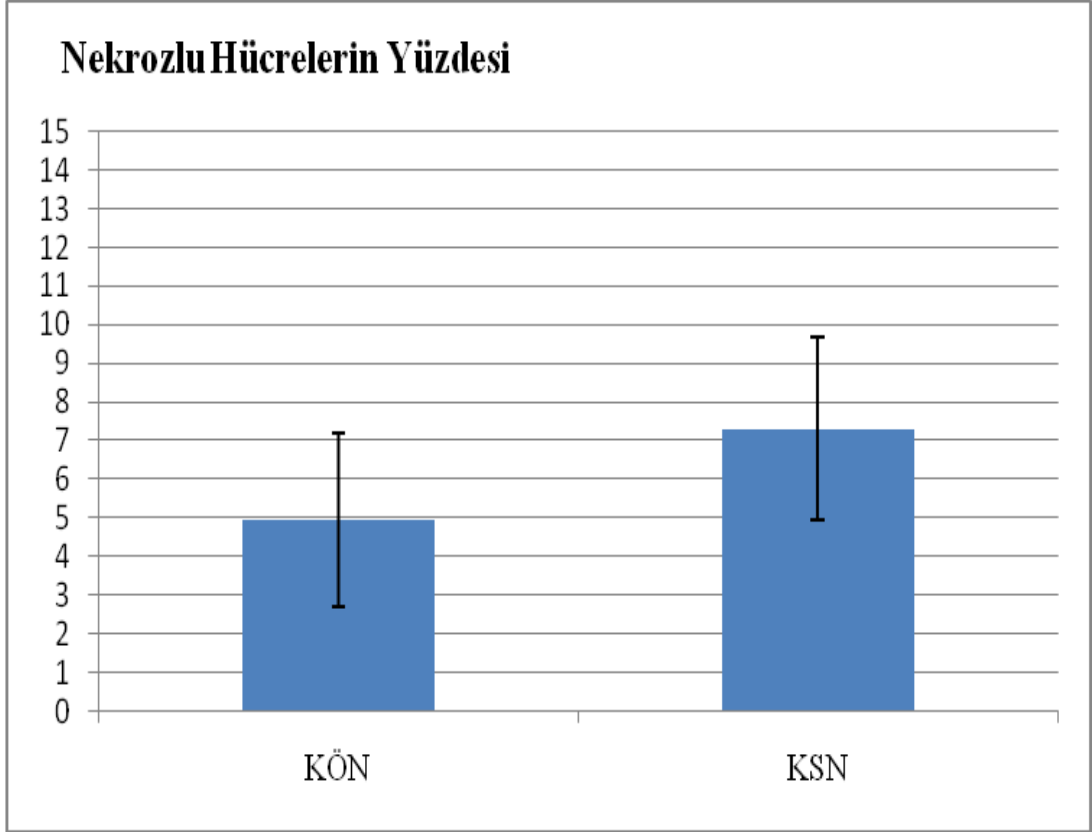
Bu çalışmada kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon sonrası semen örneklerinin erken apoptozis sayılarında $p=0.03^*$ düzeyinde ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı. ($p<0.05$)



Grafik 3.2 Kriyoprezervasyon öncesi geç apoptozisli hücrelerin (KÖGA) ve kriyoprezervasyon sonrası geç apoptozisli hücrelerin (KSGA) yüzdesi.

Veriler SPSS Windows 13.0 programı ve bağımsız iki grup arası farkların t test sonuçlarına göre yorumlandı (Kriyoprezervasyon öncesi geç apoptozisli hücrelerin yüzdesi $4,15 \pm 0,44$; kriyoprezervasyon sonrası geç apoptozisli hücrelerin yüzdesi $12,45 \pm 1,87$).

Bu çalışmada kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon sonrası semen örneklerinin geç apoptozis sayılarında $p=0.001^*$ düzeyinde ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı. ($p<0.05$)



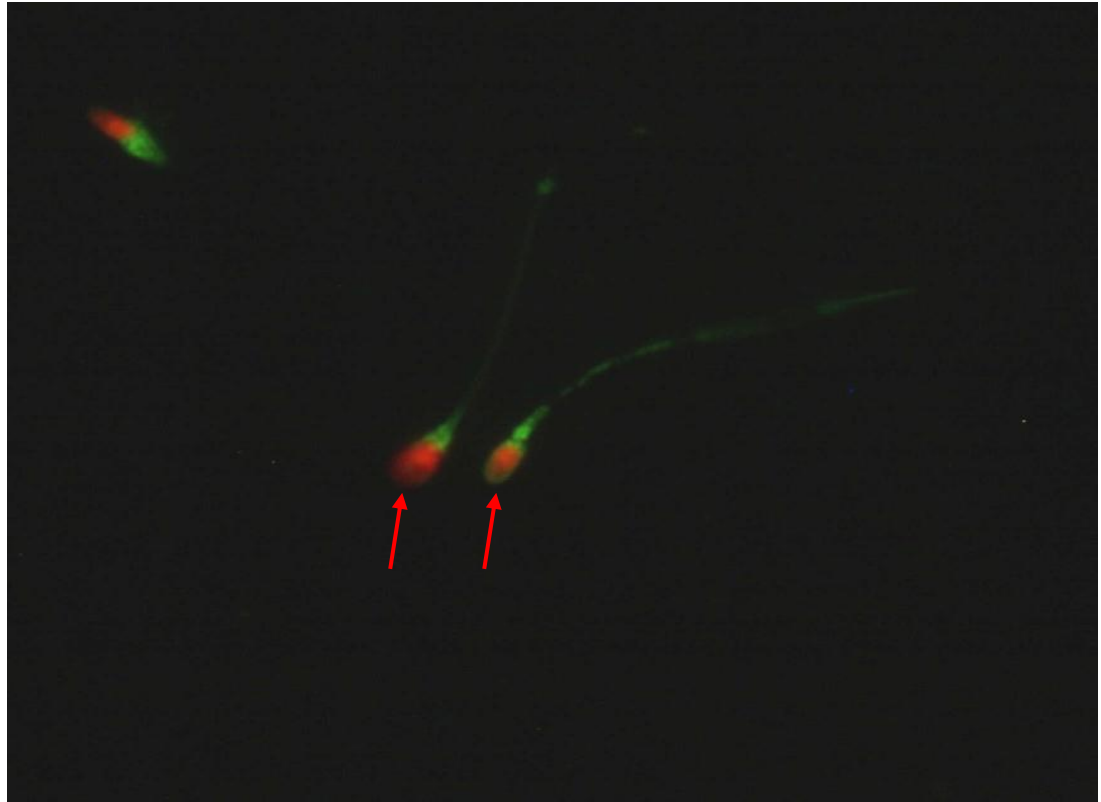
Grafik 3.3 Kriyoprezervasyon öncesi nekrozlu hücrelerin (KÖN) ve kriyoprezervasyon sonrası nekrozlu hücrelerin (KSN) yüzdesi.

Veriler SPSS Windows 13.0 programı ve bağımsız iki grup arası farkların t test sonuçlarına göre yorumlandı (Kriyoprezervasyon öncesi nekrozlu hücrelerin yüzdesi $4,95 \pm 2,24$; kriyoprezervasyon sonrası nekrozlu hücrelerin yüzdesi $7,3 \pm 2,37$).

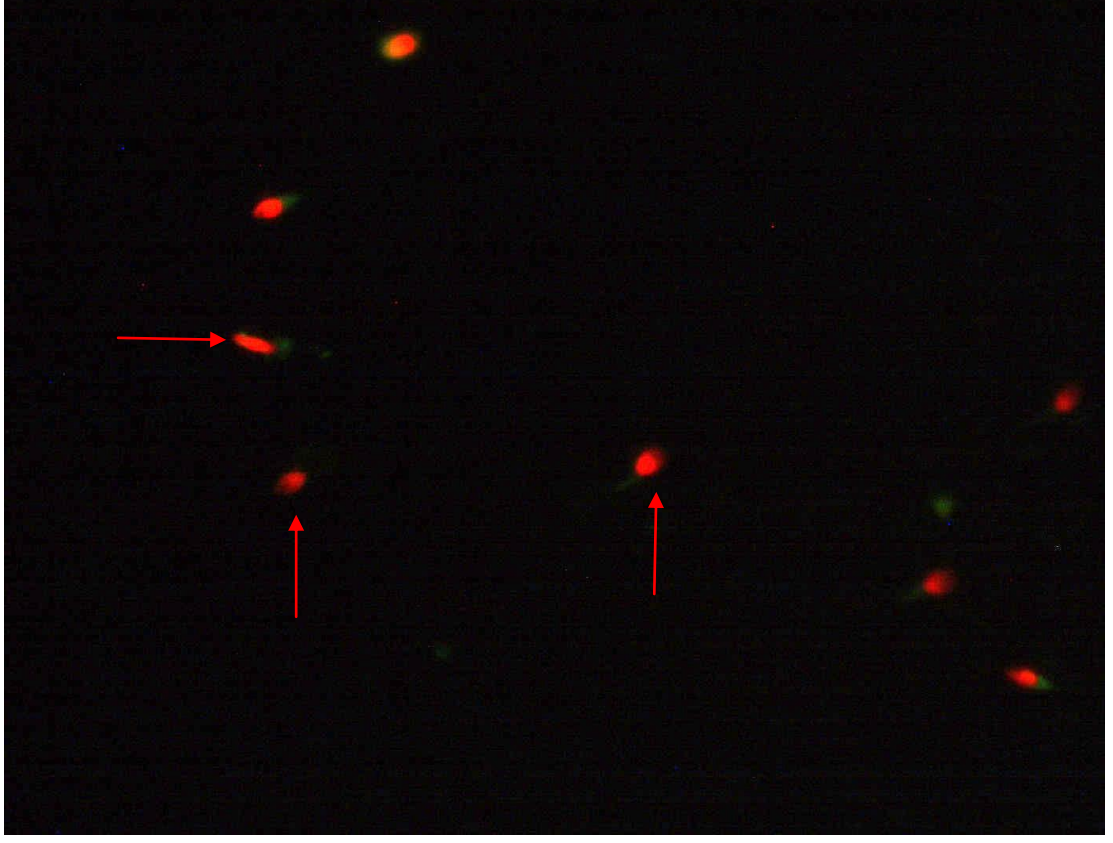
Bu çalışmada dondurma öncesi ve dondurma sonrası semen örneklerinin nekroz sayılarında $p=0.48$ düzeyinde anlamlı bir fark olmadığı saptandı. ($p<0.05$)



Şekil 3.1 Annexin V ile boyanmış erken apoptozisli hücre FBM 66X



Şekil 3.2 Annexin V ile boyanmış geç apoptozisli hücre FBM 132X



Şekil 3.3 Annexin V ile boyanmış nekrozlu hücreler FMB 66X

4. TARTIŞMA

İnsan semeninde kriyoprezervasyon uygulaması infertilite tedavisinde başarılı bir tedavi seçeneğini temsil eder. Ancak kriyoprezervasyon boyunca spermatozoa fiziksel ve kimyasal strese maruz kalır ki sonuçta spermin membran lipit kompozisyonu, hareketi, canlılığı, ve akrozom durumu olumsuz olarak değişir. Bütün bu değişimler kriyoprezervasyon sonrası insan spermatozoasının fertilizasyon kapasitesi azaltır (Martinez-Soto ve ark 2011).

Bütün bu gelişmeler, doğal olarak, infertil çiftlerin %40-50'sinin etyolojisinde yer alan erkek faktörüne çözüm arayan Yardımcı Üreme Tekniklerinde çalışanların ilgi odağı olmuştur. Kriyoprezervasyon sonrası normal donörlerden alınan spermlerin sadece %65-70 kadarının artifisiyal inseminasyon için yeterli harekete sahip olduğu gösterilmiştir (Cıncık 2003).

İnfertilite nedenlerinin yaklaşık yarıdan fazlasının erkek kaynaklı olduğunun saptanmasından sonra yeni yöntemlerin geliştirilmesi, sperm fonksiyonları hakkında bilgilerin artırılması gereğini doğurmuş ve erkek infertilitesinde klinik tanının önemi daha da artmıştır (Allan ve ark 1987). Dolayısıyla sperm apoptozis konusu da gündeme gelmiştir.

Patolojik hücre ölümü olan ve ATP miktarının azalıp, hücre homeostazının hızla bozulduğu, inflamasyon yanıtının geliştiği nekrozdan tamamen farklı olarak, apoptozis; inflamasyon olmaksızın hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır (Tomatır 2003).

Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (Kerr ve ark 1972).

Son zamanlarda, apoptozisin spermatogenezdeki rolü birçok önemli araştırmayı tetiklemiştir (Print ve Loveland 2000). Şöyle tahmin edilir ki insan testislerinde bir spermatogonyum sadece 100 kadar spermatid oluşturur ve bu tek spermatogonyum teorisindeki 4096 rakamının çok altında bir değer olup bu süreçte fizyolojik hücre ölümünün olduğunu gösterir. Şu anda germinal hücre apoptozisinin normal spermatogenez için temel bir mekanizma olduğu anlaşılmaktadır. İnsan

testis biyopsilerinde belli bir derece spontan apoptozis gözlemlenmiştir (Shen ve ark 2002).

Diğer yandan normal spermatogenezisle karşılaştırıldığında azoospermia ya da şiddetli oligozoospermialı erkeklerin testis dokularında yüksek oranda apoptotik germ hücrelerine sahip olması, kadmiyum gibi birikebilen toksinlerin germ hücre apoptozisini ortaya çıkarabilmesi gözlemlerine dayanılarak bozulmuş bir apoptotik sürecin erkek infertilitesi ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Shen ve ark 2002).

Üstelik transgenik hayvanlarla olan deneyler göstermiştir ki bax yetersizliğine sahip hayvanlarda, germ hücrelerinde apoptozis seviyesinde bir yükselme ve bozulmuş fertilitate görülmüştür (Knudson 1995, Rodriguez 1997). Buna karşılık ejakulat içindeki sperm apoptozisi daha az çalışılmıştır. Bazı son çalışmalar spermdeki apoptotik ölü hücreler ile geleneksel seminal parametreleri birbirine bağlamaya çalışmıştır. Fakat apoptozisin sperm fonksiyonu ve kalitesi üzerindeki etkisi anlaşılabilir durumdadır. Bunun yanında, spermdeki apoptozisin ana kanıtı olarak standart DNA kırıkları ele alınmıştır (Shen ve ark 2002).

Apoptozis yoğun olarak testiste spermatogoniumlarda, spermatositlerde ve spermatidlerde incelenmiş ve pek çok apoptotik faktör tanımlanmıştır. Ancak ejakulat sperminde apoptozis üzerine yapılan araştırmalar tartışmalıdır (Tapanainen ve ark 1993, Pentikainen 2000, Ricci ve ark 2002).

İnfertil hastaların testis biyopsilerinde yüksek oranlarda apoptozis olduğu TUNEL yöntemi ve morfometrik çalışmalarla ortaya konmuştur. Yeni yapılan çalışmalarda ise, infertil hastaların ejakulat spermlerinde apoptozisin tipik göstergeleri olan DNA parçalanması (TUNEL yöntemi) ve PS' nin plazma membranı translokasyonu (AnnexinV/Propidium iodide yöntemi) saptanmıştır. Bu belirleyicileri rutin semen analizleri ile göstermek olası değildir ve bu spermler normal olarak değerlendirilip, İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) yöntemi ile oosite enjekte edilirse hasarlı genomdan dolayı ciddi sorunlara yol açabilir (Weng ve ark 2002).

2000 yılında Print ve Loveland, genetik hasarlı germ hücrelerini ayıran apoptozisin genetik anomalili hücrelerin aktarımını engellediğini savundu (Print ve

Loveland 2000). Bacetti ve arkadaşları bu yüzden apoptotik spermin, semen içinde mevcut anormal spermi temsil ettiğini bildirdiler. Örneğin insan apoptotik sperm yüzdesi testiküler seminoma taşıyıcılarında %50, fertil erkeklerde %0,1 arasındadır (Bacetti ve ark 1996).

Bunun yanında kriyoprezervasyon sonrasında spermde akrozom bozuklukları, sarmal kuyruk ve hasarlı membranlar gibi morfolojik bozukluklar da meydana geldiği bildirilmiştir (Check ve ark 1991). Kriyoprezervasyonda canlı sperm sayısındaki azalmaya, DNA' nın aşırı yoğunlaşması ve apoptozis neden olmaktadır (Paasch ve ark 2004). Kriyoprezervasyon ile sitoplazmadaki aktif kaspaz seviyesi anlamlı olarak artmakta ve bunun sonucu olarak canlı spermin plazma membran bütünlüğü bozulmakta, mitokondrial membran potansiyeli artmakta ve böylece aktif apoptozis benzeri süreç görülmektedir (Brum ve ark 2008). Kriyoprezervasyon sonrasında sperm motilitesi, canlılığı ve normal morfolojisi oranlarında düşüş olup, bunların yanında DNA fragmantasyonunda artış olduğu birçok çalışmayla gösterilmiştir (Petyim ve Choavaratana 2006). Buna karşın, sperm DNA' sının kriyoprezervasyondan etkilenmediğini ileri süren çalışmalar da mevcuttur (Evenson ve ark 1989).

Sperm hareketi, plazma membran bütünlüğü ve mitokondriyal fonksiyon soğutma oranları ile ters ilişkilidir ki çok hızlı veya çok yavaş soğutma oranları bu parametrelerde tehlikeye neden olabilir (Said ve ark 2010). Bunun yanında kriyoprezervasyon işlemi sırasında dondurma ya da çözmenin ozmotik etkilerinin, spermin hücre zarına zarar verdiği ve spermin motilitesini azaltarak spermin fertilizasyon kapasitesini ciddi oranda düşürdüğünü yapılan çalışmalar ortaya koymuştur (Centola ve ark 1992, Critser ve ark 1987).

Sperm kriyobiolojisi birkaç açıdan olağandışıdır. Çözülmeden sonra hayatta kalan maksimum hücre canlılığına bakılarak, hücrenin birçok tipiyle net optimal bir dondurma oranı tespit edilmiştir. İnsan spermiyle, -1°C veya -100 ° C' ye soğuttuktan sonra, çok geniş bir tepki eğrisi ve hayatta kalmada çok az bir fark vardır. Memeli hücreler için olağandışı olan soğutmaya duyarsızlık, sperm hücreleri için olağandır. İnsan sperminin kriyoprezervasyonu hakkında yayımlanan birçok çalışma arasında, soğutma oranının hücrenin hayatta kalmasına etkisi hakkında çok az miktarda çalışma bulunmaktadır. Buna karşılık,

hem embriyo hem oositin hayatta kalmasında soğutmanın farklı oranlarının etkileri üzerine birçok yayın bulunmaktadır. İnsan spermının dondurma ve çözülmeden sonra yaşama kabiliyeti nispeten düşüktür, çözülmeden sonra %50-60' ı motiliteye sahiptir (Morris 2002).

Spermatozoondaki membransel yapılar (plazma membranı, dış akrozomal membran ve mitokondri membranı) ile oosit-embriyo membranı, donma/çözünme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Membran yapıları akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitlerle bezeli iki sıralı fosfolipit katmanından oluşmuştur. Bu yapıların termodinamik özellikte ve % 65-70 oranında doymamış fosfolipitlerden (yağ asidi) oluşması, membranların soğutulmalarının sonucu olarak irreversibl faz değişimine, sıvı fazdan jel fazına geçmesine neden olmaktadır (Watson 1995, Watson 2000).

Lipid tabakası boyunca fosfolipidlerin asimetrisinin düzenlenmesi biyolojik membranların ayırt edici bir özelliğidir. Sfingomiyelin ve fosfatidilkolin gibi kolin içeren fosfolipitler plazma membranlarının dış yaprağında bulunurlar. Fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin gibi amino fosfolipidler iç kısımda yer alır. Membran içindeki fosfolipidlerin düzenlenme asimetrisi fippase tarafından kontrol edilen fosfatidilserinin dışında kesin değildir. Fosfatidilserin membran translokasyonunun işleyişi iç yapraktan dış yaprağa translokasyonunun oluşması ve hücre içindeki önemli bir biyolojik olay olarak tanımlanmıştır. Fosfatidilserin membran translokasyonu apoptotik hücrelerde oluşur. Apoptotik hücrelerde fippase aktivitesinin azaldığı öne sürülmüştür (Kotwicka ve ark 2013).

Hücre yüzeyine PS çıkışı makrofajlara yollanan 'beni ye' sinyalinin bir elementi olduğu varsayıldı; buna rağmen, apoptotik hücrelerin lokalize olduğu yere, makrofajların göçüne sebep olan sinyallerin oluşumu belirsizliğini koruyor. Fagosit hücreleri üzerinde lokalize olan PS reseptörleri ile PS'nin bağlanması direkt olarak fagsitozla sonuçlanmaz fakat bir apoptotik hücrenin bağlanmasını teşvik eden bir sinyali temsil eder (Hoffmann ve ark 2005, Somersan ve Bhardwaj 2001).

Yüzeysel PS çıkışı talesemi, kronik böbrek yetmezliği ve orak hücreli anemi teşhisli hastaların eritrositlerinde bulundu ve yaşlanan eritrositlerde de tanımlanmıştır. Böylece bu, yaşlanan ya da abnormal hücrelerin eliminasyonu için

bir sinyal olabilir. Somatik hücrelerin yanı sıra insan spermatozoa hücre membran tabakalarının da dış-ıç asimetrisini gösterir (Kotwicka ve ark 2008, Kotwicka ve ark 2011).

Mevcut veriler spermatozoada fosfatidil serin translokasyon oluşumu ya da bu prosesin biyolojik etkilerinin varlığı altındaki şartları açıkça açıklayamamaktadır. Fosfatidil serin translokasyonu, kapasitasyon ve akrozom rekasiyonu sırasında ya da patolojik spermatozoanın eliminasyonu sırasında oluşan spermatozoa hücre membranındaki değişikliklerin bir ifadesi olarak kabul edilebilir. (Kotwicka ve ark 2013).

Son dönemde fosfatidil serin translokasyonunun tesbit edilmesinde kullanılan en önemli işaretleme yöntemlerinden biri de Annexin-V boyamasıdır. Bu boya hücre duvarının normalde iç yüzeyinde olan ancak apoptotik cisimlerde dış yüzeyde yer alan fosfatidil serinin varlığını göstermek için kullanılmaktadır (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu 2002).

Annexin V, negatif yüklü fofolipitlerden olan PS ile yakınlığı olan, yüksek kalsiyum bağımlı bir proteindir (Vermes ve ark 1995).

Annexin V' in bir ligandı olan PS normalde plazma membranının iç yaprağında bulunur. Apoptotik sürecin başlangıcında plazma membranının dış yaprağına transloke olur (Barroso ve ark 2000). Dolayısıyla Annexin V hücre yüzey reseptörlerine bağlanmayı kolaylaştırarak apoptozis için bir biyolojik işaretleyici olarak işlev görür. Bununla birlikte Annexin V, hücre membran bütünlüğünü kaybettiği zaman geç apoptozisi belirlemede yetersiz olur ve hücrenin durumu nekrotik hücrelere benzerdir. Şu anda, canlı bir vital boya (PI) ile konjuge Annexin V testi geç apoptozis veya nekroz ve erken apoptozisin progresif basamağının tesbiti için hasas bir metod olarak geliştirilmiştir (Shen ve ark 2002). Annexin V testi membran yapısının erken değişikliklerinin tesbitinde PI boyamadan daha hassastır (Peirouvi ve ark 2007).

Yapılan bir çalışmada plazma membranındaki lipid difzyonunun, kriyoprezerve-çözülmüş insan spermiyle taze sperm karşılaştırıldığında ciddi derecede bozulduğunu tesbit etmişlerdir (James ve ark 1999).

Taze ve dondurulmuş spermle yapılan intrauterin inseminasyonlar (IUI) arasında başarı araştırıldığında, tek etkili faktörün kadının yaşı olduğu bulunmuştur (Ferrara ve ark 2002). Taze ve dondurulmuş spermatozoa ile intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gebelik sonuçları karşılaştırıldığında fark bulunmamıştır (Kupker 2002). Literatürde TESE ile alınan örneğin dondurulması ve çözülmesi ile yapılan ICSI başarısının taze spermden daha az olmasının sebebinin spermin dondurma işlemi ile ilgili olmadığı, spermin immatüritesi ile ilgili olduğu bildirilmiştir. 2004 yılı Avrupa Üroloji Kongresinde taze ve dondurulmuş sperm ile yapılan ICSI uygulamalarında anlamlı bir fark bulunmadığı bildirilmiştir. Dondurma-çözme işlemi sırasında spermatozoanın fertilizasyon kapasitesini azaltan boyun kırıkları görülebilir (Verheyen ve ark 1997). Akrozomal ve plazma membranlarında şişme ve parçalanma olabilir (Nogueira ve ark 1999). Gilmore ve arkadaşları kriyoprezervasyon yapıldıktan sonra ICSI öncesi çözülme işleminden sonra spermatozoa hareket ve canlılığında %50 azalma olduğunu rapor etmişlerdir (Gilmore ve ark 1998). Buna rağmen Thompson Cree ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sperm kriyoprezervasyonu ile TESE ve normal TESE karşılaştırılmış olup kriyoprezervasyon ile TESE olgularında %26 oranında, normal TESE ile %30 oranında gebelik gerçekleşmiştir (Thompson Cree ve ark 2003). Hatta bazı çalışmalarda sperm kriyoprezervasyonu sonucu spermatozoa bulma oranı daha yüksek bulunmuştur (Huang ve ark 2000, Windt ve ark 2002). Buna rağmen günümüzde birçok merkezde sperm kriyoprezervasyonu yerine taze spermin kullanılması tercih edilmektedir.

Taze ve dondurulmuş örnek kullanılması arasındaki fark kriyoprezervasyonda hücre hasarına yol açacak faktörlerin bilinip önlemlerin alınması ile ortadan kaldırılabilir.

Alvarez ve Storey (1992) en belirgin olarak fosfatidilkolin ve fosfatidiletanolamin kaybı ile kriyoprezervasyon sonrası membran fosfolipid içeriğinin azaldığını bildirmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada kriyoprezervasyon-çözme sırasında, normalde plazma membranının iç yaprağında olan fosfolipidlerin dış yaprağına hareket ettiği raporlandı; dondurulan çözülen koç spermatozoasında

fosfatidilgliserolün dış yaprağa translokasyonu gösterildi (Hinkovska-Galcheva ve ark 1989).

Vermes ve arkadaşları membran bozukluğu olan hücrelerde PS' nin dışarıya çıktığını göstermiştir (Vermes ve ark 1995).

Gomez-Lopez ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmalarında, PS' nin translokasyonu hücre membranının bozulması ve DNA fragmentasyonunun tanımlanması dahil olmak üzere ejakulat içindeki spermatozoada erken ve geç apoptotik sinyalleri tanımlamışlardır. Aynı çalışmada infertil erkeklerin spermatozoasının fertil erkeklere göre daha yüksek oranda DNA fragmentasyonu ve PS translokasyonu içerdiğini bulmuşlardır (Gomez-Lopez ve arkadaşları 2013).

Grunewald ve Paasch (2013) yaptıkları çalışmada, insan sperminde var olan sperm DNA fragmentasyonu gibi normal olmayan PS' nin çıkışı, kaspaz-3'ün aktivasyonu, mitokondriyal transmembran potansiyelinin bozulması gibi apoptoz sinyalini aktive eden temel özelliklerin yardımcı üreme boyunca fertilizasyonun başarısızlığında direkt etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca kriyoprezervasyon ve çözme ile PS' nin dış yaprağa çıkmasıyla aktif apoptotik sinyal veren sperm hücrelerinin yüzdesinin arttığını raporlamışlardır.

Martin ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada kriyoprezervasyonun, sıgır spermatozoasında plazma membran geçirgenliğini arttırdığını ve bunun sonucu erken bir akrozomal reaksiyon ya da erken bir hücre ölümünün olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca apoptozis ve plazma membran değişikliklerinin reaktif oksijen türleri tarafından da indüklenebileceğini savunmuşlardır.

Glander ve Schaller 1999 yılında vital boya PI ve Annexin V kullanarak insan spermi üzerine kriyoprezervasyon-çözmenin etkilerini raporladılar ve dondurulan çözülen spermatozoada membran bütünlüğünün tesbiti için bu yöntemin kullanılabilirliğini önerdiler. Biz de insan spermiyle yaptığımız kriyoprezervasyon çalışmasında benzer şekilde vital PI ve Annexin V kullanarak sperm membran bütünlüğünün değerlendirilebileceğini gözledik.

Bir diğer çalışmada sağlam membranlı canlı hücrelerin yüzdesi kriyoprezervasyon-çözme sonrası önemli derecede azaldı. Hasta ve kontrollerin

çözme sonrası örneklerinde PS çıkışlı canlı hücrelerin yüzdesi önemli derecede arttı. Çözme sonrası örneklerde nekrotik hücrelerin yüzdesinde de önemli bir artış oldu. TUNEL sonuçlarında ise, dondurma öncesi ve çözme sonrasında DNA fragmantasyonlu hücrelerin yüzdesinde önemli bir farklılık açığa çıkmadı. Bu çalışmada, dondurma öncesi değerlerden ziyade çözme sonrası progresif hareket ve hız önemli ölçüde daha düşüktü. Yani bu çalışmada dondurma ve çözme sonrası yaşayan normal hücrelerin yüzdesi azalırken nekrotik hücrelerin ve PS translokasyonlu hücrelerin yüzdesi artışla sonuçlandı. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada PS çıkışlı erken ve geç apoptotik hücrelerin yüzdesi önemli derecede artarken nekrotik hücrelerin yüzdesinde herhangi bir değişiklik gözlemedik. PI boyama ile kombine annexinV boyamanın membran fonksiyonlarının bozulmasının tesbitinde sadece vital boya PI den daha güvenilir olduğu raporlandı. PI normalde membrandan geçemeyen bir boyadır. Ancak ölü hücreler hücre içi boyamayla sonuçlanan PI girişi için dirençlerini kaybederler (Duru ve ark 2001).

Peirouvi ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada dondurma sonrası PS translokasyonlu erken apoptotik hücreler ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin her ikisinde de gözlemlenildi. Spermin baş, orta parça ve kuyruğunda Annexin V boyamalarını buldular. Sonuçlarda vitrifikasyon sonrası infertil ve fertil erkeklerin her ikisinde de erken apoptotik ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerde önemli ölçüde artış görüldü. Ancak bu oran infertil erkeklerde fertil erkeklerden daha yüksek oldu. Onlar, hem fertil hemde infertil erkeklerde 24 ve 48 saat dondurulan spermilerin apoptotik ve nekrotik hücrelerin sayılarını artırdığını gösterdi. Vitrifikasyon infertil ve fertil erkeklerin her ikisinde de benzer şekilde apoptozis ve nekrozis gibi sperm üzerinde değişiklikleri indükler fakat bu orantılı olarak infertil erkeklerin semeninde fertil erkeklere göre daha yüksektir. Peirouvi ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları çalışmada geç apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler aynı olarak değerlendirilmiştir ancak bizim çalışmamızda hücreler, erken apoptotik hücreler, geç apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler olmak üzere üç grupta incelenmiştir ve dondurma sonrası PS lokasyonlu erken apoptotik ve geç apoptotik hücrelerde anlamlı bir artış söz konusuysen nekrotik hücrelerde herhangi bir artma ya da azalma söz konusu olmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda son yıllarda hızla gelişim gösteren in vitro fertilizasyonun ayrılmaz bir parçası olan sperm kriyoprezervasyonu konusunu ele aldık. Sperm kriyoprezervasyonu yardımcı üreme tekniklerinde, radyoterapi/kemoterapi öncesinde, vazektomi uygulanan hastalarda fertilitenin korunmasında kullanılmaktadır. Bunun yanında azospermik hastalarda testis biyopsisi ya da epididimal aspirasyon ile elde edilen spermatozoonların depolanması için de kullanılmaktadır. Spermin dondurularak saklanması üremeye yardımcı tedavilerdeki başarıyı %10 nispetinde arttırmıştır.

Kriyoprezervasyon yöntemi ile -196°C' de dondurulan sperm hücreleri sıvı azot içinde saklanmaktadır. Kriyoprezervasyon amacıyla sıvı azot içine alınan spermelerde bazı hasarlar meydana gelebilir. Bu hasarların oluş mekanizması hala tam olarak anlaşılammıştır. Kriyoprezervasyon hakkında bilimsel açıdan açıklanmayı bekleyen birçok soru vardır. Buda kriyoprezervasyonun son yıllarda en fazla çalışılan konular arasında olmasına neden olmuştur.

Çalışmamızda normospermili kişilerin semen örnekleriyle yaptığımız kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve sonrası spermatozoa membranındaki PS'nin translokasyonundan kaynaklanan apoptozis ve nekroza gitme oranlarını Annexin V kiti ile inceledik. Kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon sonrası semen örneklerinin erken apoptozis sayılarında anlamlı bir fark olduğu, geç apoptozis sayılarında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu ve nekroz sayılarında ise anlamlı bir fark olmadığı saptandı.

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular daha önceki çalışmalarla uyum içerisindedir ve kriyoprezervasyonun apoptotik sperm oranında bir artış ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Yardımcı üreme tekniklerinde, PS membran translokasyonlu spermelerin rutin semen analizleriyle normal olarak değerlendirilip oosite enjekte edilmesinden sonra zigotun gelişimine devam edememesinin sebeplerinden birinin de bu hasarlı spermelerden kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. Apoptozisle ilgili tartışmalı literatüre katkı sağlamak ve nekrozisle ilgili yeni bulgular elde etmek üzere yapılan bu çalışmanın, alanındaki bilgilere bir yarar sağlaması beklenmektedir.

6. ÖZET

Sperm kriyoprezervasyonu, onkolojik veya immünolojik hastalıklar ve tedavilerinden kaynaklanabilecek fertilizasyon problemlerinde, ileride eşlerin çocuk isteme durumunda kullanılmak üzere hastanın spermlerinin saklanması işlemidir. Kriyoprezervasyon sonrası spermlerde bazı hasarlar meydana gelebilir. Bu hasarların oluş mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Bu amaçla 20 normospermik numune çalışma kapsamına alınmıştır. Bu normospermik numuneler kriyoprezervasyon uygulanan ve uygulanmayan olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Kriyoprezervasyon uygulanan örnekler 1 saat sonra çözülmüştür ve her iki gruba da Annexin V testi uygulanarak spermatozoa membranındaki PS'nin translokasyonundan kaynaklanan apoptozise gitme oranları istatistiksel olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon sonrası semen örneklerinin erken apoptozis sayılarında anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0.05$). Kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon sonrası semen örneklerinin geç apoptozis sayılarında ileri derecede anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0.05$) ve son olarak kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon sonrası semen örneklerinin nekroz sayılarında anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p<0.05$).

Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgular kriyoprezervasyonun apoptotik sperm oranında bir artış ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Sperm; kriyoprezervasyon; apoptozis; Annexin V.

7. ABSTRACT

Sperm cryopreservation is a process of keeping sperms of the patient to be used when the couples wish to have children in the future in fertilization problems resulting from oncologic or immunologic problems and their treatments. In post-cryopreservation period, some deformities may be encountered in the nature of sperms, and the mechanisms of such deformities still remain unknown.

Twenty normospermic specimens were included into the study due to the uncertainty of the condition. The normospermic specimens were grouped into two as those with cryopreservation and others without. One hour after the process, cryopreservation exposed specimens were melted and, by performing Annexin V test, the rate of their apoptosis arising from the translocation of PS on spermatozoa membrane was tried to be evaluated statistically.

In our study, a significant difference was found in the number of early apoptosis in semen samples of pre-and post cryopreservation periods. A higher rate of significant difference was found between the late number of pre and post cryopreservation semen samples. Finally it was found that there is no significant difference between pre and post cryopreservation necrosis number of semen samples.

In conclusion, our findings indicated that cryopreservation is associated with an increase at the rate of apoptotic sperm number.

Key Words: Sperm; cryopreservation; apoptosis; Annexin V.

8. KAYNAKLAR

- Agca Y, Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. *Ilar J.* 2000;41(4): 207-220.
- Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi.* 2008; 19(1): 55-63.
- Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR. Cell death in spermatogenesis. In: Porter CS editor. *Perspective on Mammalian Cell Death.* Oxford: Oxford University Pres; 1987. p . 229 -258.
- Allard EK, Boekelheide K. Fate of germ cells in 2,5- hexanedione-induced testicular injury.II.Atrophy persists due to a reduced stem cell mass and ongoing apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 137(2):149-56.
- Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode for sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl.* 1992;13(3):232–241.
- Ameisen J S. The origin of programmed cell death. *Science.* 1996; 272(5266):1278-1279.
- An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Takashi M, Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. *Cryobiology.* 2000; 40(3): 237-249.
- Angelova P, Davidoff M, Bakalska M, Kanchev L. In vitro effects of substance P and arginin zasopression on testosterone production in Leydig cells of short and long photoperiodic hamsters. *Andrologia.* 1996;28(6): 321-326.
- Ansari B, Coates PJ, Greenstein BD, Hall PA. In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. *J Pathol.* 1993; 170 (1): 1-8.
- Anzar M, He L, Buhr MM, Kroetsch TG, Pauls KP. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertilitiy. *Biology of Reproduction.* 2002;66(2):354-360.
- Arav A, Hehu D, Mattioli M. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil.* 1993;99(2): 353-358.
- Arroyo JA, Li C, Schlabritz-Loutsevitch N, McDonald T, Nathanielsz P, Galan HL. Increased placental XIAP and caspase 3 is associated with increased placental apoptosis in a baboon model of maternal nutrient reduction. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203(4):364.e13-8.
- Artan E. *Histoloji, 1.baskı.* İstanbul. İstanbul Üniversitesi Basımevi. 1988; 357- 375.
- Asher E, Payne CM, Bernstein C. Evaluation of cell death in EBV-transformed lymphocytes using agarose gel electrophoresis, light microscopy and electron microscopy. II. Induction of non-classic apoptosis (“para-apoptosis”) by tritiated thymidine. *Leuk Lymphoma.* 1995; 19 (1-2): 107-19.
- Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A, Effect of natural antioxydants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freez thaw process. *Arch Androl.* 1994;33(1):11-15.
- Aydiner F. Sperm kriyoprezervasyonu sonrasında apoptozun değerlendirilmesi. İzmir. Dokuz Eylül Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi. 2008;5-61.
- Bacetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1996;28(4):587-596.
- Banasiak KJ, Haddad GG. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res.* 1998; 797(2): 295-304.

- Barroso G, Morshedi M, Oehninger S. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2000; 15(6):1338-1344.
- Bartke A. Apoptosis of male germ cells, ageneralized or a cell type-specific phenomenon? *Endocrinology.* 1995;136(1):3-4.
- Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology.* 1995; 6(1): 3-16.
- Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW, Tycho KB, Kal HB, Rooij DG. Apoptosis regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 family members. *Mol Repr Development.* 2000; 56(3): 353-359.
- Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. Apoptosis in human germ cells:developmental changes in gonodotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology.* 1995;136(1):5-12.
- Brown WA, Skinner SA, Malcontenti-Wilson C, Vogliagis D, O'Brien PE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs with activity against either cyclooxygenase 1 or cyclooxygenase 2 inhibit colorectal cancer in a DMH rodent model by inducing apoptosis and inhibiting cell proliferation. *Gut.* 2001; 48 (5): 660-6.
- Brum AM, Sabeur K, Ball BA. Apoptotic-like changes in equine spermatozoa separated by density-gradient centrifugation or after cryopreservation. *Theriogenology.* 2008;69(9):1041-1055.
- Bucak MN, Tekin N. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2007; (54): 67-72.
- Cabria E, Anel L, Herraes MP. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology.* 2001; 56(4): 623-635.
- Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. *J Androl.* 1992; 13(3): 283-288.
- Check ML, Check JH, Long R. Detrimental effects of cryopreservation on structural and functional integrity of the sperm membrane. *Archives of Andrology.* 1991;27(3):155-160.
- Cheng XS, Li MS, Du J, Jiang QY, Wang L, Yan SY, Yu DM, Deng JB. Neuronal apoptosis in the developing cerebellum. *Anat Histol Embryol.* 2011;40(1):21-7.
- Cıncık M. Sperm kriyoprezervasyonu. *Gülhane Tıp Dergisi.* 2003; 45(1):100 -106.
- Cohen J J. Apoptosis. *Immunol Today.* 1993;14: 126-130. A
- Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract.* 1993; 28(12): 35-43. B
- Critser JK, Arneson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Post thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril.* 1987; 47(6): 980-984.
- Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997; 21(1): 88-101.
- Çoruh D. Cep Telefonu Kullanımının İn Vitro Düzeyde Bazı Semen Parametrelerine Etkileri. Konya. Selçuk Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi. 2010;1-24.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod.* 1997;2(1): 48-54.

- Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon Laboratuar Yöntemleri. Birinci baskı. Ankara. Güneş Tıp Kitabevleri. 2008; 229-255.
- Dellmann HD, Brown EM. Textbook of Veterinary Histology. 3th Edition. Philadelphia. Lea & Febiger. 1987; p. 286-312.
- Dere F. Anatomi Atlası ve Ders Kitabı. 3. Baskı. Adana. Nobel Tıp Kitabevleri. 1999;987- 1008.
- Drake LR, Vogl W, Mitchell AW. Pelvis vePerineum. In Yıldırım M. editor. Gray's Anatomi Tıp Öğrencileri için. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2006 .p. 401-464.
- Dunkel L, Taskinen S, Hovatta O, Tilly JL, Wilkstrom S. Germ cell apoptosis after treatment of cryptorchidism with human chorionic gonadotropin is associated with impaired reproductive function in the adult. J Clin Invest. 1997; 100(9):2341-2346.
- Dunphy BC, Kay R, Barrat CLR. Quality during the conventional analysis of semen, an essential exercises. Journal of Andrology. 1998;10:378-85.
- Duran N, Yarkın F, Allahverdiyev AM. Çeşitli dondurma yöntemlerinin hep-2 ve tavşan böbrek hücrelerinin kriyoprezervasyonunda hücre canlılığına etkisi. Türk Hij Den Biyol Derg. 2001;58(2):53-60.
- Duru NK, Morshedı MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not dna fragmentation. Journal of Andrology. 2001; 22(4): 646-651.
- Duru NK. Subfertil ve İnfertil Sperm Parametreleri. GATA Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Notları. Ankara. 1998.
- Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M. Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. Biol Reprod. 2003; 68: 87-94.
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicol Pathol. 2007; 35(4):495-516.
- Erbengi T. Temel Histoloji. 2. Baskı 2. Cilt. Ankara. Güneş Kitabevi. 1990;210-230.
- Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fasfasl bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi. 2003;4:165-174.
- Erimşah S. Sperm morfolojisi ve kromatin kondensasyon defektleri arasındaki korelasyon. İstanbul. İstanbul Üniversitesi. Yüksek Lisans Tezi. 2006; 5-40.
- Erkoçak A. Özel Histoloji, Genital Sistem, 2.baskı. Ankara. Ankara üniversitesi tıp fakültesi yayınları, 1990;166-194.
- Eroschenko VP. Erkek üreme sistemi. In: Demir R. editor. Histoloji atlası. 9.baskı. Ankara: Palme yayıncılık; 2001 .p. 285-299.
- Eröz R, Akbulut M, Yılmaz S, Ayvaz A, Sadykhov S. Age dependent DNase activity in larvae, pupae and adult stages of Mediterranean Flour Moth *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) Türk Entomol Derg. 2010; 34 (1): 3-13.
- Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S. Apoptozis Hakkında Bilinenler. Düzce Tıp Dergisi. 2012; 14(2): 87-10.
- Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 1. Baskı. Malatya. Medipres yayıncılık. 2009; 260-261.
- Evan G L, Wyllie A H, Gilbert G S, Littlewood T D, Lond H, Breaks M. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. Cell. 1992;69(1): 119-128.

- Fahning ML, Garcia MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*. 1992; 29(1):1-8.
- Ferrara I, Balet R, Grudzinskas JG. Intrauterin insemination with frozen donor sperm. Pregnancy outcome in relation to age and ovarian stimulation regime. *Hum Reprod*. 2002; 17(9): 2320-2324.
- Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar J*. 2000;41(4):87-196.
- Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook histology*. 2.Baskı. Newyork. W.B.Saunders company. 2001;487-508.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992; 119(3): 493-501.
- Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J*. 1992; 6(7): 2450-5.
- Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Cristser JK. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Reprod*. 1998; 58(1): 28-36.
- Glander HJ, Schaller J. Binding of annexin V to plasma membranes of human spermatozoa: a rapid assay for detection of membrane changes after cryostorage. *Mol Hum Reprod*. 1999;5(2):109-115.
- Gomez-Lopez N, Estrada-Gutierrez G, Colin A, Flores-Pliego A, Flores-Escobar X, Oehninger S, Barroso G. The apoptotic pathway in fertile and subfertile men: a case-control and prospective study to examine the impact of merocyanine 540 bodies on ejaculated spermatozoa. *Fertil Steril*. 2013;99(5):1242-8.
- Gökçe A. Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine Göre Standart Semen Analizi. *Turk Urol Sem*. 2011; 2: 1-7.
- Gökmen FG. *Sistematik Anatomi*. Birinci baskı. İzmir. Güven Kitabevi, 2003; 549-560.
- Grunewald S, Paasch U. Sperm selection for ICSI using annexin V. *Methods Mol Biol*. 2013;927:257-62.
- Guyton A, Hall J. Erkeklerde Üreme İşlevleri ve Hormonal İşlevler. In: Çavuşoğlu H, Yeğen BÇ. editörler. *Tıbbi Fizyoloji*. 11.basım. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2007.p. 996-1006.
- Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008;(2):73-78.
- Hallak J, Sharma RK, Wellstead C, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *Int J Fertil Womens Med*. 2000; 45(1):38-42.
- Henriksen K, Hakovirta H, Parvinen M. Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in-situ quantification in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate. *Endocrinology*. 1995;136(8): 3285-3291.
- Henriksen K, Kangasniemi M, Parvinen M, Kaipia A, Hakovirta H. In-vitro, follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion. *Endocrinology*. 1996;137(5): 2141- 2149.
- Hinkovska-Galcheva V, Petkova D, Koumanov K. Changes in the phospholipid symmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. *Cryobiology*. 1989;26(1):70-75.
- Hoffmann PR, Kench JA, Vondracek A, Kruk E, Daleke DL, Jordan M, Marrack P, Henson PM, Fadok VA. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine inhibits immune responses in vivo. *J Immunol*. 2005; 174:1393-404.

- Holt WT, Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci.* 2000;62: 3-22. B
- Holt WT, Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 2000;53(1): 47-58. A
- Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res.* 1996; 51: 432-457.
- Huang FJ, Chang SY, Tsai MY, Kung FT, Lin YC, Wu JF, Lu YJ. Clinical implications of intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved testicular spermatozoa from men with azoospermia. *J Reprod Med.* 2000; 45: 310-6.
- Huang JQ, Trasler JM, Igdoura S, Michaud J, Hanal N, Gravel RA. Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Hum Mol Genet.* 1997;6 (11): 1879-85.
- Hutson JM. Undescended testis, Torsion, and Varicocele. In: Groszfeld L. editor. *Pediatric Surgery.* 6th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2006. p. 1193-2000.
- Ishikawa H, Tomomasa H, Yoshii S. Correlation between the sperm motility and the adenylate cyclase activity in infertile man. *Andrologia.*1989;21(5):437-440
- İnsanMucizesi.com. Erişim adresi http://www.insanmucizesi.com/bolum1/bolum1_10.html. Erişim tarihi 06.05.2013.
- Jain A, Maheshwari V, Alam K, Mehdi G, Sharma SC. Apoptosis in premalignant and malignant squamous cell lesions of the oral cavity: a light microscopic study. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009; 52 (2): 164-6.
- James PS, Wolfe CA, Mackie A, Ladha S, Prentice A, Jones R. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1999;14(7):1827-1832.
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273 (16): 9357-60.
- Jefferson KP, Persad RA, Holly MP. Apoptosis and relevance to urologists. *Br J Urol.* 2000;86(5): 598-606.
- Johnson KE. *Histology and Cell Biology.* 2th edition. Pennsylvania. Harwal Publishing Company. 1991;295-304.
- Junqueira JC, Carneiro J, Kelley R. Erkek üreme sistemi. In: AYTEKİN Y, SOLAKOĞLU S, AHİŞHALI B, editors. *Temel Histoloji.* 8.Baskı. İstanbul. Barış Kitabevi, 1998; 407-422.
- Kalaycı Ş. *Histoloji.* Bursa. Uludağ Üniversitesi Basımevi. 1986; 374-377.
- Kayıkcı MA, Çam KH, Akman Y, Erol A. Erkek infertilitesini değerlendirmede semen analizinin özellikleri ve rolü. *Düzce tıp fakültesi dergisi.* 2002;4(3):35-38.
- Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil.* 1992; 95(3): 825-830.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26(4): 239-257.
- Kerse İ. *İnsan Embriyolojisine Giriş.* 1. Baskı. Ankara. Hacettepe Üniversitesi Basımevi. 1974;72-77.
- Kierszenbaum AL. Spermatogenez. In: Demir R. editor. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi.* Ankara: Palme Yayıncılık; 2006 .p. 531-550.

- Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*. 1995; 270(5233): 96-99.
- Koçyiğit A, Çevik M. Memeli Reprodüktif Dokuları, Gamet Hücreleri ve Embriyolarında Apoptozis. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*. 2011; 8(1) 33-41.
- Kotwicka M, Filipiak K, Jedrzejczak P, Warchol JB. Caspase-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reprod Biomed Online*. 2008; 16:657-63.
- Kotwicka M, Jendraszak M, Jedrzejczak P. Phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: topography in membrane domains and relations to cell vitality. *J Membrane Biol*. 2011; 24:165-70.
- Kotwicka M, Jendraszak M, Skibinska I, Jedrzejczak P, Pawelczyk L. Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique. *Human Cell*. 2013; 26:28-34.
- Krinke GJ. *The Laboratory Rat*. 1th edition. Switzerland. Academic Press. 2000; 150-312.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1988; 49(1): 112-117.
- Kupker W, Al-Hasani S, Johannisson R, Sandmann J, Ludwig M, Jocham D, Diedrich K. The use of cryopreserved mature and immature testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: risks and limitations. *Semin Reprod Med*. 2002; 20(1): 25-35.
- Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptoz ve kardiyovasküler hastalıklar. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*. 2002;4:323-329.
- Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*. 1997;138(5):2081-2088.
- Leeson RC, Leeson ST, Paparo AA. *Textbook of Histology*. 5th edition. London. WB Saunders Company. 1985; 486-489.
- Leeuw FED, Leeuw AMD, Daas JHG, Colenbrander BV, Verkleij AJ. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 1993; 30(1): 32-44.
- Levy R, Seifer-Aknin I. Apoptosis during spermatogenesis and in ejaculated spermatozoa: importance for fertilization. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2001; 59(5):531-45.
- Li Q, Kobayashi M, Kawada T. Ziram induces apoptosis and necrosis in human immune cells. *Arch Toxicol*. 2011; 85 (4): 355-61.
- Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of apoptosis. *Spine*. 2000; 25: 1859-1866.
- Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol*. 1995; 146(1): 3-15.
- Makler A. The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril*. 1980;33(3):337-338.
- Makler Counting Chamber
Erişim:http://sepalreproductivedevices.com/template_products.cfm?classID=50www.zdinc.com/maklercc.htm Erişim tarihi: 21.4.2005.

- Martin G, Cagnon N, Sabido O, Sion B, Grizard G, Durand P, Levy R. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. *Human Reproduction*. 2007; 22(2): 380-388.
- Martinez-Soto JC, Garcia-Vazquez FA, Gumbao D, Landeras J, Gadea J. Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellet. *Cryobiology*. 2011;63(3):1-6.
- Mazur P, Freezing of living cell: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 1984; 247:125-142.
- Mazur P, Schneider U, Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell biophys*. 1986;8(4): 259-285.
- Mcgann LE, Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology*. 1978; 15(4): 382-390.
- Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*. 1990;5(5):586-92.
- Moore KL, Agus AM. Pelvis vePerineum. In: Elhan A. editor. *Temel Klinik Anatomi*. İkinci baskı. Ankara. Güneş Kitabevi; 2006; 210-276.
- Moore KL, Persaud TVN. Ürogenital Sistem. In: Yıldırım M. editor. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. Birinci baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi. 2002;323-344.
- Morris GJ. A new development in the cryopreservation of sperm. *Human Fertility*. 2002 5(1); 23-29.
- Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8(1): 68-75.
- Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2000; 23:73-87.
- Noguchi J, Toyama Y, Yuasa S, Kikuchi K, Kaneko H. Hereditary defects in both germ cells and the blood-testis barrier system in as-mutant rats: Evidence from spermatogonial transplantation and tracer-permeability analysis. *Biology of Reproduction*. 2002; 67: 880-888.
- Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, Van Steirteghem AC. Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. *Hum Reprod*. 1999; 14(8): 2041-9.
- Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*. 2003; 4:410-415.
- Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C. Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*.1998;3: 115-121.
- Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*. 2001; 2 (1): 91-95.
- Özdemir O. Flow cytometric mast cell-mediated cytotoxicity assay: a three-color flow cytometric approach using monoclonal antibody staining with annexin V/propidium iodide co-labeling to assess human mast cell-mediated cytotoxicity by fluorosphere-adjusted counts. *J Immunol Methods*. 2011; 365 (1-2):166-73.
- Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Bio Reprod*. 2004;71(6):1828-1837.
- Peirouvi T, Farjah G, Rad JS, Novin MG. Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 2007;5(3):117-120.

- Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(5): 2057-2067.
- Petyim S, Choavaratana R. Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. *J Med Assoc Thai.* 2006;89(3):306-313.
- Pınarbaşı E. Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) In: Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. editors. *Moleküler Biyoloji.* 1.Baskı. Ankara: Nobel Yayın; 2007.p. 423-468.
- Polge C, Smith A, Parkes A, Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949; 164-166.
- Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: New insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays.* 2000; 22(5): 423-430.
- Pryor JL, Howards SS. Varicocele. *Urol Clin North Am.* 1997,14;3:499-51.
- Rainaldi G, Romano R, Indovina P, Ferrante A, Motta A, Indovina PL, Santini MT. Metabolomics using ¹H-NMR of apoptosis and Necrosis in HL60 leukemia cells: differences between the two types of cell death and independence from the stimulus of apoptosis used. *Radiat Res.* 2008;169 (2): 170-80.
- Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ.* 2001; 322:1536-1538.
- Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human Reproduction.* 2002;17(10): 2665-267.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.* 1997; 16(9): 2262-2270.
- Ross MH, Kaye IG, Pawlina W. *Histology a text and atlas.* 4th. edition. USA. Lippincott Williams Wilkins Pres. 2003; 690-694.
- Rrumbullaku L. Semen Analysis.Erişim: <http://Semen Analysis.htm> Erişim tarihi: 19.4.2005.
- Rudolph AS, Crowe JH. Membrane stabilization during: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology.* 1985;22(4): 367-377.
- Sadler TW. Ürogenital sistem. In: Başaklar AC. editor. *Langman's Medikal Embriyoloji.* 9. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005. p. 3-30.
- Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online.* 2010;21(4):456-62.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 2002; 66(4):1061-1067.
- Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2003;7(4); 428-432.
- Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research.* 2000; 45: 528-537.

- Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thomberry NA, Yamin TT, Nicholson DW. CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fasmediated apoptosis. *J Biol Chem.* 1996; 271(4): 1841-4.
- Schlegel PN, Chang TSK. Physiology of male reproduction: the testis, epididymis and ductus deferens. In: Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editors. *Campbell' s Urology.* 7th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1998. p. 1254-88.
- Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews.* 1993;14(2): 133-144.
- Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD. editors. *The Physiology of Reproduction.* 2.ed. New York: Raven Pres; 1994 .p. 1364-1434.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO, Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology.* 2000;53(1): 59-72.
- Shen HM, Dai J, Chia SE, Lim A, Ong CN. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reproduction.* 2002; 17(5): 1266-1273.
- Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X-H, Swerdloff RS. Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endoc and Metab.* 1998; 83(1): 152-156.
- Sion B, Janny L, Boucher D, Grizard G. Annexin V binding to plasma membrane predicts te quality of human cryopreserved spermatozoa. *International journal of andrology.* 2004;27:108-114.
- Somersan S, Bhardwaj N. Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J Cell Biol.* 2001;155:501-4.
- Spencer S, Cataldo NA, Jaffe RB. Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey.* 1996; 5(1): 314-323.
- Sriraman V, Sairam MR, Rao AJ. Evaluation of relative roles of LH and FSH in regulation of differentiation of leydig cells using an ethane 1,2 dimethyl sulfonate treated adult rat model. *Journal of Endocrinology.* 2003; 176: 151-161.
- Sutton RL. Critical cooling rates to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *J Chem Soc Faraday trans.* 1991; 87(1): 101-105.
- Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 4. Baskı. Ankara. Alp Ofset Matbaacılık. 2003:335-388.
- Takada M, Kataoka A, Toi M, Bando H, Toyama K, Horiguchi S, Ueno T, Linder S, Saji S, Hayashi Y, Funata N, Kinoshita J, Murakami S, Ohono S. A close association between alteration in growth kinetics by neoadjuvant chemotherapy and survival outcome in primary breast cancer. *Int J Oncol.* 2004;25 (2): 397-405.
- Tanyolaç A. Özel Histoloji, 3. Baskı. Ankara. Yorum basın yayın. 1999;132-143.
- Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as a testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol.* 1993; 7(5): 643-650.
- Tekelioğlu M. Özel Histoloji. 1. Baskı. Ankara. Ankara üniversitesi tıp fakültesi yayınları. 2002;231-244.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267(5203):1456-1462.

- Thompson-Cree ME, McClure N, Donnelly ET, Steele KE, Lewis SE. Effects of cryopreservation on testicular sperm nuclear DNA fragmentation and its relationship with assisted conception outcome following ICSI with testicular spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003; 7(4): 449-55.
- Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T Klin J Med Sci*. 2003; 23: 499-508.
- Tortora GJ, Derrickson B. *Principles of Anatomy and Physiology*. 11th ed. Philadelphia. Wiley. 2006;879-891.
- Tunç L, Bozkırlı İ. Sperm dondurma: yardımcı üreme tekniklerindeki uygulamalar. *Androloji Bülteni*. 2006;27: 314-317.
- Ulukaya E, Acilan C, Ari F, İkitimur E, Yılmaz Y. A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Türk biyokimya dergisi*. 2011;36(3):261-269
- Ulukaya E, Yilmaztepe A, Akgoz S, Linder S, Karadag M. The levels of caspase-cleaved cytokeratin 18 are elevated in serum from patients with lung cancer and helpful to predict the survival. *Lung Cancer*. 2007;56 (3): 399-404.
- Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sc*. 2000; 621: 357-364.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96(2):245-54.
- Verheyen G, Nagy Z, Joris H, De Croo I, Tournaye H, Van Steirteghem A. Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil*. 1997; 67(1): 74-80.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184 (1):39-51.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39-51.
- Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Enzymology*. 1999;17(4): 329-338.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995; 7(4); 871-891.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000; 60: 481-492.
- Weng SL, Taylor SL, Morshedi M, Schuffner A, Duran EH, Beebe S, Oehninger S. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(11):984-991.
- Wetzels AMM, Cryopreservation /Theory. In: Bras M Lens JW editor. *Laboratory aspects of in vitro fertilization*. The Netherlands: NV. Organon; 1996 .p. 229-244.
- Windt ML, Coetzee K, Kruger TF, Menkveld R, vander Merwe JP. Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa in men with azoospermia. *J Asist Reprod Genet*. 2002; 19; 53-9.
- Woods EJ, Gilmore JA, Liu J. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod*. 2000;15(2): 335-343.

World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and processing of Human Semen. Fifth Edition. Cambridge University Press, 2010.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature. 1980; 284: 555-556.

Yılmaz İ, Çek M. Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinin apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikozektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi. İstanbul. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği. Doktora tezi. 2005; 10-33.

Young B, Heath JW. Wheater's Functional Histology: A text and colour atlas. Fourth Edition. Edinburgh. Churchill Livingstone. 2000; 328-340.

9. EKLER

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2012/12

Toplantı Tarihi : 27.11.2012

Karar Sayısı 2012/200 N.E.Ü. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr.Selçuk DUMAN'ın, "Normospermili Kişilerde Sperm Kriyoprezervasyonu Öncesi ve Sonrası Spermatozoada Annexin V Testi ile Apoptozisin Değerlendirilmesi" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 12.11.2012 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr.Selçuk DUMAN'ın, "Normospermili Kişilerde Sperm Kriyoprezervasyonu Öncesi ve Sonrası Spermatozoada Annexin V Testi ile Apoptozisin Değerlendirilmesi" adlı araştırmanın kabulüne oy birliği ile karar verildi.



10. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılı Beyşehir doğumludur. İlköğrenimini 1997 yılında Beyşehir Gazi ilköğretim okulunda tamamladıktan sonra lise eğitimini 2004 yılında Beyşehir lisesinde tamamladı. 2009 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun olduktan sonra aynı yıl Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD’da yüksek lisans eğitimine başladı.