

T. C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERMATOZOONLARIN MİKTAR, BİÇİM VE HAREKET BAKIMINDAN
NORMAL OLAN ERKEKLERDE SPERM DONDURMA – ÇÖZME İŞLEMİNDE
DNA HASAR TAYİNİ

Moleküler Bio. Turgay DİNÇ

KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL

2015

T.C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERMATOZOONLARIN MİKTAR, BİÇİM VE HAREKET BAKIMINDAN NORMAL
OLAN ERKEKLERDE SPERM DONDURMA – ÇÖZME İŞLEMİNDE DNA HASAR TAYİNİ

Moleküler Bio. Turgay DİNÇ

KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK

İSTANBUL

2015

TEZ ONAYI

Kurum : Maltepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans

Anabilim Dalı : Klinik Embriyoloji AD

Tez Sahibi : Turgay DİNÇ

Tez Başlığı : : "SPERMATOZOONLARIN MİKTAR, BİÇİM VE HAREKET BAKIMINDAN NORMAL OLAN ERKEKLERDE SPERM DONDURMA-ÇÖZME DNA HASAR TAYİNİ"

Sınav Yeri : Maltepe Üniversitesi Kültür Merkezi 1. Kat 5'nolu derslik.

Sınav Tarihi : 10.07.2015

Saat : 11:00

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

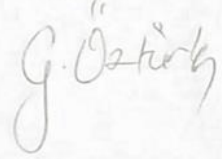
Danışman (Unvanı,Adı,Soyadı)

Kurumu

İmza

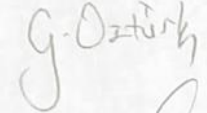
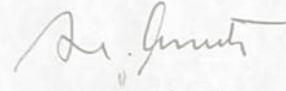
Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK

Fizyoloji ABD



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan,Adı Soyadı)

- Prof.Dr.Mehmet CINCIK (Maltepe Üniversitesi Hastanesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı)
- Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK (Maltepe Üniversitesi Hastanesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı)
- Doç. Dr. Füsün Belgin SELAM Kadıköy Acıbadem Hastanesi Kadın-doğum Uzmanı



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 10.07.2015 tarih ve 14/12 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. A.Zafer ÖZTEK

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez danışmanım sayın Prof. Dr. Güler Öztürk'e, hem ders dönemim olsun hem tez dönemim, her zaman yanımda olduğunuz için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Benim için zorlu bir döneme denk gelen tezimin hazırlanması esnasında verdiğiniz destek ve ayırdığınız zaman için sonsuz saygılarımı sunarım.

Embriyoloji alanında yetişmemde büyük emeği olan sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Cıncık'a, verdiğiniz teorik ve pratik bilgilerden dolayı teşekkür ederim.

Yine bu süreçte lisansüstü eğitimi alırken desteklerini esirgemeyen sayın hocalarım Prof. Dr. Ümit Özekici'ye, Yrd.Doç.Dr. Namık Kemal Kurt'a, Öğr. Gör. Dr. Mustafa Sarıkaya'ya ve Dr. Erdal Yücel'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez dönemim boyunca yardımlarını esirgemeyen ve çokça zaman ayıran dönem arkadaşım Bio. Şenay Cankut'a ayrıca sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İş arkadaşlarımdan Yusuf Bolu'ya, Abdullah Sert'e, Neval Sevinç'e, Levent Temel'e, Ahmet Barış'a, Osman Doluca'ya ve Gazi Turgut'a teşekkür ederim.

Tezimin bitmesi konusunda manevi destek gösteren lise arkadaşlarım Can Özgiray, Şeyh Şamil Sözen, Yunus Emre Yılmaz, Rabia Yılmaz, Caner Turan, Sait Erten, Mehmet Özbabalık ve Burak Zeki İskender'e sonsuz teşekkür ederim.

Daima yanımda olan ve her türlü fedakarlıkta bulunan annem Ayşe Dinç, babam Mustafa Dinç, abim Türker Dinç, kardeşim Tayfun Dinç, yengem Canan Dinç ve yeğenim *Efe Dinç*'e teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Mol.Bio Turgay Dinç, Spermatozoonların miktar, biçim ve hareket bakımından normal olan erkeklerde sperm dondurma – çözme işleminde dna hasar tayini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı, İstanbul, 2015. Erkeklerde gelecekteki fertilitenin korunması için kemoterapi, radyoterapi yada testis cerrahisinden önce bireylerin spermini alarak daha sonra kullanılmak üzere dondurularak saklanması yardımcı üreme tekniklerinin uygulandığı tedavi merkezlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tezin amacı, IVF merkezlerinde kullanılan yardımcı üreme tekniklerinden olan sperm kriyoprezervasyon(dondurma) işlemi sırasında, Dünya Sağlık Örgütü tarafından sperm parametreleri normal olarak kabul edilen bireylerden alınan spermelerde oluşabilecek DNA fragmantasyonun istatistiksel olarak anlamlı çıkıp çıkmayacağını saptayabilmektir. Bu ve benzer çalışmalar ile sperm DNA hasarı en az olacak şekilde kriyoprezervasyon metodunda değişiklikler yapılarak geliştirilmesi sağlanabilir. Bu değişiklikler dondurulmuş sperm DNA hasarını en aza indirgeyeceği için daha kaliteli sperm elde edilip merkezlerin gebelik ve canlı doğum başarısını arttırabilir.

Tez çalışmamıza üreme çağındaki 20-40 yaş aralığında toplam 100 normal sperm parametresine sahip kişiler katıldı. Aynı semen örneği ikiye ayrılarak bir kısmı taze iken diğer kısmı dondurulup bir ay sonra çözülerek TUNEL(terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP etiketleme) tekniğiyle, sperm DNA fragmantasyonu sonuçları karşılaştırılarak değerlendirildi.

Anahtar kelimeler: DNA Fragmantasyonu, Sperm, Kriyoprezervasyon, TUNEL

ABSTRACT

Mol.Bio. Turgay DINC, The determination of DNA damage in sperm freezing and thawing about males spermatozoon content, presence and motility that are under normal circumstances, Institute of Health Science Clinical Embryology Master's Degree Program, Istanbul, 2015. Keeping individuals' sperm frozen for later use before chemotherapy, radiotherapy or testis surgery in order to protect future fertility is widely used in treatment centres where assisted reproductive techniques were carried out. Objective of the thesis is determining if DNA fragmentation of sperm samples taken from individuals whose sperm parameters as normally accepted by World Health Organization is statistically significant or not, during sperm cryopreservation, one of the assisted reproductive techniques used in IVF centres. As a result of these situations, cryopreservation method can be developed after making change in order to be least sperm DNA damage. While these changes will minimize the banked sperm damage, sperm with higher quality may be achieved so that successful operations may be increased.

100 individuals at fertility age between 20 - 40 who have normal sperm parameters have attend to test. The same semen sample was half investigated in liquid form, the remaining was kept frozen and after one month it was thawed, re-evaluated with TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) technique and the results were comprised.

Key words: DNA Fragmentation, Sperm, Cryopreservation, TUNEL

İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ	1
1.1	Araştırmanın Önemi.....	1
1.2	Araştırmacının Amacı.....	1
2	GENEL BİLGİLER	3
2.1	Sperm	3
2.2	Spermatogenez:	5
2.2.1	Spermatositogenez:	6
2.2.2	Mayoz	6
2.2.3	Spermiyogenez:.....	7
2.3	Sperm İncelemesi	11
2.3.1	Semen Toplanması.....	11
2.4	Kriyoprezervasyon:	20
2.4.1	Sperm kriyoprezervasyonu:	20
2.4.2	Kriyobiyojinin Temel Prensipleri:	21
2.5	Sperm DNA Fragmantasyonu.....	22
2.5.1	Spermatozoon DNA'sı Hasarı.....	22
2.6	DNA Fragmantasyonu Tayini	26
3	GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1	Semen Analizi	27
3.1.1	Örnek Toplama ve İşlem.....	27
3.1.2	Makroskopik Değerlendirme:	27

3.1.3	Mikroskopik ve Sperm Hareketliliği Değerlendirmesi:.....	28
3.1.4	Sperm Sayısı Değerlendirmesi:	28
3.1.5	Sperm Morfolojik Değerlendirmesi:	29
3.2	Sperm Dondurma-Çözme İşlemi	29
3.3	TUNEL Metodu ile DNA Fragmantasyonu Tayini.....	30
3.4	DNA Fragmantasyon Değerlendirilmesi:.....	32
3.5	İstatiksel Analiz	34
4	BULGULAR.....	36
5	TARTIŞMA.....	44
6	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
7	KAYNAKLAR.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP Etiketleme
YÜT	Yardımcı Üreme Teknikleri
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
DNA	Deoksiribonükleik Asit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TAK	Toplam Antioksidant Kapasitesi
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ATP	Adenintrifostat
LH	Lüteinleştirici Hormon
dUTP	Biotinlenmiş Deoksiuridin Trifosfat
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	4', 6 Diamidino -2- Fenilindol
FITC	Floresan İzotiyosinat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil1: Sperm Morfolojisi (9)	4
Şekil 2: Spermatogenezin evreleri.	10
Şekil 3: Makler Sayma Kamerası.....	16
Şekil 4: Makler kamerasında sperm görünümleri (20)	16
Şekil 5: Sperm şekil bozukluklarının farklı tipleri (Üreme teknikleri kitabından alınmıştır, 26)	18
Şekil 6: Diff-Quik ile boyanmış spermler(26)	19
Şekil 7: Sperm hareketliliğinin değerlendirilmesi	28
Şekil 8: Kriyoprezervasyonda kullanılan aletler	30
Şekil 9: DNA hasar oranı <%20 olduğundan dolayı normal sperm.....	33
Şekil 10: DNA hasar oranı >%20 olduğundan dolayı TUNEL pozitif, anormal DNA hasarlı sperm.....	34
Şekil 11: Dondurma öncesi, taze spermden, TUNEL negatif spermler mavi renkte (DAPI II), TUNEL pozitif hücrelerde yeşil renkte (FITC) gözükmektedir. Sperm örneğinde 1 adet komplet DNA fragmentasyonu ve 2 adet parsiyel DNA fragmentasyonu gözükmektedir.	41
Şekil 12: Dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermlerde, TUNEL negatif spermler mavi renkte (DAPI II), TUNEL pozitif hücreler ise yeşil renkte (FITC) gözükmektedir. Sperm örneğinde 1 adet komplet DNA fragmentasyonu ve 4 adet parsiyel DNA fragmentasyonu gözükmektedir.	42
Şekil 13: Çözme sonrası 7 numaralı kişinin sperm TUNEL görünümü	43
Şekil 14: Çözme sonrası 14 numaralı kişinin sperm TUNEL görünümü.	43
Şekil 15 Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası arasındaki DNA fragmentasyon artış oranları	40

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Makler kamerasının avantajları (20).....	15
Tablo 2: Dünya Sağlık Örgütü normal sperm değerleri (25-26).....	17
Tablo 3: Kriyoprezervasyon Öncesi ve Çözme Sonrası DNA Fragmantasyonu.....	40

1 GİRİŞ

1.1 Araştırmanın Önemi

İnfertil vakaların yaklaşık %50'si erkek kökenli bir probleme bağlıdır (1). Erkek germ hücrelerinin, DNA hasarına olan yatkınlıkların temelinde spermatogenezin geç döneminde DNA tamir mekanizmalarının azaltılarak düzenlenmesi yer alır (2). Sperm hücrelerinde görülen DNA hasarının oluşma mekanizmaları tam olarak bilinmese de üzerinde durulan üç temel mekanizma; sperm kromatin paketlenmesinde ortaya çıkan hasar, başarısız apoptozis ve oksidatif strestir (3).

Erkek infertilitesinin araştırılmasında rutin semen analizi kullanılmaktadır. Semen analizi ile yapılan değerlendirmede sperm sayısı, hareketlilik ve morfoloji belirlenmektedir. İnfertil erkeklerin yaklaşık %15'inde normal semen analiz sonuçlarına rağmen infertilitenin kesin nedeni ortaya konulamamaktadır. Düşük sayı, motilite ve anormal morfoloji gibi bozuk semen parametreleri olan olgularda sperm DNA hasarı yüksek olarak belirlenmiştir. Normal semen parametrelerine sahip hastaların %8'inde sperm DNA hasarı belirlenmiştir (4).

Erkek bireylerin sperm kalitesini etkilemeyecek olan hastalıklarda ancak tedavisi sperm kalitesini bozacak olduğu durumlarda, örneğin kemoterapi, radyoterapi yada üreme organına yapılması gereken cerrahi işlemlerden önce bireylerin spermalarının kendi istekleri doğrultusunda alınarak fertilitiyi korumak amacıyla saklanması gerekmektedir (5). Bu durumların sonucunda gerçekleştirilen kriyoprezervasyon metodundan kaynaklanabilecek sperm DNA fragmantasyonunun derecesini belirleyerek fragmantasyonu engelleyecek ya da azaltacak yeni metodlar geliştirilebilir. Bu yeni metodlar merkezlerin başarılarını arttırarak fayda sağlayabilir.

1.2 Araştırmacının Amacı

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın üremeye yardımcı tedavi yönetmeliğinde de belirtilen; erkeklerde üreme hücreleri ve gonad dokularının saklanması gerektiren tıbbi zorunluluk hallerinden;

- a) Cerrahi yöntemlerle sperm elde edilmesi halinde,
- b) Kemoterapi ve radyoterapi gibi gonad hücrelerine zarar veren tedaviler öncesinde,
- c) Üreme fonksiyonlarının kaybedilmesine yol açacak olan ameliyatlara (testislerin alınması ve benzeri) öncesinde,
- d) Çok az sayıda sperm olması (kriptozoospermi) durumunda,

ruhsatlı merkezlerde sperm saklanmasına izin verilir. Saklanmasına izin verilen hastalarda sperm kriyoprezervasyonu sırasında sperm DNA'sında oluşabilecek fragmantasyonunun embriyo gelişiminde olumsuz etkilerinden dolayı bu şekilde olan hastalara başka teşhis ve tedavi alternatifleri geliştirilebilir.

Sperm hücrelerinin çok küçük olması, az miktarda sitoplazma içermesi ve hücre çekirdeğinin kondanse halde olması kriyoprezervasyon işleminden diğer hücrelere göre çok daha yüksek bir sağkalımla çıkmasını sağlar. Yine de kriyoprezervasyon işleminden diğer hücrelere göre çok daha yüksek sağkalımla çıkmasını sağlar. Yine de kriyoprezervasyon sonrasında spermatozoonlar büyük ölçüde motilite ve viabilite kaybına uğramaktadırlar. Üstelik bu etki kişiden kişiye değişmekte ve ne derecede gerçekleşeceği ön görülememektedir. Dondurulmuş semen ile iyi sonuçlar alanlar olsa da gebelik oranları taze semene göre daha düşüktür (6-9).

Normospermik erkeklerde yapılan tez çalışmamızda TUNEL tekniği kullanılarak sperm kriyoprezervasyonunun DNA fragmantasyonu üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

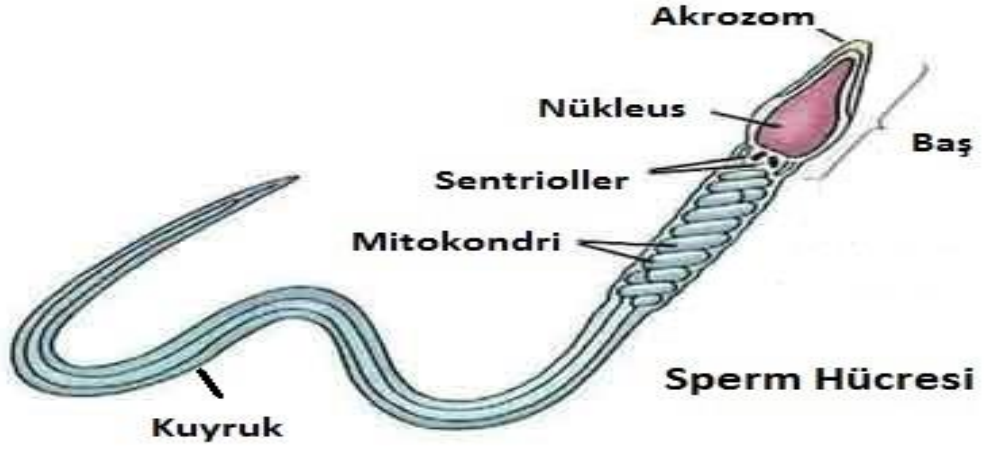
2 GENEL BİLGİLER

2.1 Sperm

Testisler, gametlerin (sperm hücresi, spermatozoa, spermiyum) meydana getirilmesi (gametogenezis, spermatogenezis) ve steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılanması (steroidogenezis) ile yükümlüdür. Testislerin endokrin işlevi Leydig hücreleri (interstisiyel hücreler) tarafından yürütülür. Leydig hücreleri testis dokusu içinde, loblar arasındaki bağ dokusu bölmelerde bulunur ve ürettikleri steroid yapıdaki hormon olan testosteronu doğrudan kana verirler. Testosteron, hipotalamusta gonadotropin serbestletici hormon (GnRH) sekresyonunu ve ön hipofiz de ise LH ve folikül stimulan hormon (FSH) sekresyonu üzerine negatif geri bildirim sağlar (10,11).

Birbirinden farklılıkları olan iki tip eşey hücresi vardır. Yumurta, insandaki en büyük hücrelerden biriyken, sperm en küçüklerindedir. Yumurta hareketsiz olup, büyüme ve gelişme için gerekli geniş hammadde yedeklerini sağlamanın yanı sıra, etkin koruyucu dış örtüsüyle anasal genlerin sağkalımına yardımcı olur. Genellikle son derece hareketlidir ve tasarımı, dölleme görevini hızlı ve verimli olarak yapmaya uygundur. Erkek bir insanın üretken yaşamı boyunca bıraktığı milyarlarca spermden, yalnızca bir kaç yumurta döllemeyi başarabilir (10-12).

Sperm, çıplak yapıda hücre olup, sulu ortamda yumurtaya ulaşmada kendisini ileri doğru iten güçlü bir yapıdadır. Sperm, stratejik olarak kamçısına en verimli şekilde güç aktarabilecek biçimde donatılmıştır ve çok sayıda mitokondri içerir (13).



Şekil1: Sperm Morfolojisi (9)

Sperm tek bir plazma zarıyla çevrili, morfolojik ve işlevsel açıdan birbirinden farklı iki ayrı bölgeden oluşur (12).

- **Baş:**

Baş, spermi yumurtaya doğru itmesine yardımcı olan ve yumurta üzerinde oyuk açmasına yardımcı olan, kuyruk ile yoğunlaşmış bir haploid çekirdek içeren kısımdır (13).

Çekirdekte bulunan DNA, taşıma için hacim olarak en az şekilde, son derece sıkı paketlenmiştir ve yazılıma kapalıdır. Birçok spermin kromozomları, somatik hücrelerdeki histonlardan arınmış, basit, yüksek oranda artı yüklü, protamin denilen proteinlerle paketlenir. Akrozomal kesecik, spermin baş kısmında ve çekirdek zarının ön ucunda özelleşmiş bir salgı keseceği bulunur. Akrozomal kesecik, spermin yumurtanın dış kabuğunu delip geçmesine yardımcı olabilen hidrolitik enzimler içerir. Akrozom tepkimesi ise spermin yumurtaya temas ettiğinde keseciğin içeriği eksositozla salınır ve bu tepkime spermin yumurtaya sıkıca bağlanmasına yardımcı olan özgül proteinlerin açığa çıkartmasına sebep olur (13).

- **Kuyruk:**

Hareketli kuyruk, uzun bir kamçıdır ayrıca orta aksonemi çekirdeğin tam arka tarafında yerleşik bazal cisimden çıkar. Aksonem, spermin kuyruk hareketinin temelini oluşturur. Aksonem, iki adet tekli merkezi mikrotübülü çevreleyen, eşit aralıklarla yerleşmiş dokuz adet ikili mikrotübülden oluşur. Spermilerin kamçıları, aksonemin 9+2 örüntüsünü çevreleyen dokuz adet yoğun dış lif bulundurur. Lifler bükülme ve kasılmaz özelliği vardır (13).

Hareketli kuyruk, dışta 9, ortada 2 adet tubulin çiftlerinden oluşmaktadır. Bu yapılar hareketi sağlamak için enerji ürünü olan ATP'nin mitokondride oluşturduğu kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye çevirerek yapar. Kamçı hareketi, ATP hidrolizi kaynaklı enerjinin mikrotübüller üzerinde kaymak için kullanılan dinein motor proteinleriyle sağlanır. Sperm kuyruğunun ön kısmında bulunan mitokondriler tarafından ATP üretimi gerçekleştirilir (13).

2.2 Spermatogenez:

Spermatogenez primordial germ hücrelerinden sperm üretimine denir (12).

Spermin oluşumu sırasındaki proliferatif ve hücrel değişiklikleri kapsayan spermatogenez 3 evrede incelenebilir (14).

Spermatositogenez (Proliferasyon): Tip A spermatogonya, Tip B spermatogonyayı oluşturmak için bir dizi bölünmeye uğrayarak sayıca çoğalır. Primer spermatositler en son oluşan spermatogonyanın bölünmesiyle meydana gelir.

Mayoz (Redüksiyon): Spermatositler kromozom sayısını yarıya indirir ve böylece iki olgunlaşma bölünmesine uğrayarak ve spermatid kümelerini oluşturur.

Spermiyogenez (Farklanma): Spermatidler, spermatozoaya dönüşmek için belirgin hücrel değişikliklere uğrayarlar (14).

Spermatogenezin ilk evresinde germinal epitelin bazal membranına komşu yerleşimli Tip A spermatogonya denen ilkel spermatogonya 4 kez mitozla bölünerek 16 adet, daha farklılaşmış hücreler olan Tip B spermatogonyayı meydana getirir. Bu evrede spermatogonya Sertoli hücrelerine doğru ilerler. Sertoli hücreleri çok

büyükdür ve membranları bazal ve yan yüzlerde birbirine sıkıca bağlanır. Böylece bir bariyer meydana gelir (14).

Ortalama 24 günlük bir süre sonra Sertoli hücre bariyerini geçen her spermatogonyum büyür ve primer spermatositi oluşturur (14).

2.2.1 Spermatositogenez:

Spermatogonya denenen hücreler bazal lamina üzerinde yerleşir ve puberteden sonra testosteron etkisiyle hücre siklusuna girerler. Puberteden sonra seminifer tübüllerin germinal epitelindeki Tip A hücreleri aralıklarla DNA'larını ikiye katlayarak mitoz ile bölünürler. Üç tip spermatogonya vardır; koyu Tip A, açık Tip A ve Tip B (14, 15).

2.2.1.1 Koyu Tip A

Küçüktür ve kubbe şeklinde görünümüne sahiptirler. Oval yassılaştırmış çekirdeği vardır. Heterokromatini bol olduğu için çekirdek koyu görünümüne sahiptir. Koyu Tip A hücreleri rezerv hücrelerdir ve hücre siklusuna girmezler. Ancak mitoz yaparak koyu Tip A diğer jenerasyon hücreleri yaparlar ve sonunda açık Tip A'yı oluştururlar (14).

2.2.1.2 Açık Tip A

Çekirdeğin görünümü dışında koyu Tip A ile benzer yapıdadır. Açık Tip A hücrelerinin çekirdekleri ovoid, ökromatinden zengin ve soluk görünümündedir. İki çekirdekçiği bulunur. Bu hücrelerin organelleri azdır ve testosteronla uyarılınca çoğalarak, mitozla yeni açık Tip A ve Tip B spermatogonyayı yapar (14).

2.2.1.3 Tip B

Açık Tip A hücrelerine benzer. Fakat daha yuvarlak ve merkezde yerleşen çekirdeği ve daha kaba heterokromatini ile ayırt edilir.

2.2.2 Mayoz

Mayoz ve spermatogenez testislerde ergenlik çağına kadar başlamaz ve bu dönemden sonra, seminifer tüpçükler oldukça uzun, sıkıca bükülü tüpçüklerin iç epitelde sürekli olarak üretilir. Sadece ovaryumlarda ve testislerde gerçekleşir. Tek tur DNA replikasyonu, iki hücre bölünmesi gerçekleşir. Kadınlarda mayoz gestasyonun ilk üç aylık döneminde başlarken erkeklerde ergenliği izler. Spermatogonyum, olgunlaşmamış germ hücreleri, bu tüpçüklerin dış kenarı boyunca, bazal laminanın hemen altında yerleşmiştir ve burada mitoz bölünme ile sürekli çoğalırlar. Yavru hücrelerin bazılarında çoğalma durur ve birincil spermatositlere farklılaşırlar. Homolog kromozomlar arasında meydana gelen genetik materyal değişimi birinci mayozda profaza girerler ve birinci mayoz bölünme evrelerinden geçerek, 22 adet çift otozomal kromozom ve bir adet çift X veya Y kromozomu içeren, iki ikincil spermatosit üretirler. Birincil spermatositten türeyen bu iki ikincil spermatosit, ikinci mayoz bölünmeyi geçirerek her biri haploid sayıda tek kromozom içeren dört adet spermatid üretir. Haploid spermatidler, daha sonra morfolojik olarak spermilere farklılaşır ve seminifer tüpçüklerin lümenine geçerler. Spermiler sonradan daha ileri düzeyde olgunlaştıkları ve depolandıkları yer olan, testisi kaplayan bükümlü bir tüp yapısındaki epididime geçer (13-15).

Spermatogenezde, gelişmekte olan erkek germ hücrelerinin mitoz ve mayoz sırasında sitoplazmik bölünmeyi tamamlamamasıdır. Burada olgunlaşan bir spermatogonyumdan gelişmiş, çok sayıdaki farklılaşan yavru hücreler, sınısityum oluşturacak şekilde birbirine sitoplazmik köprülerle bağlı kalır. Sitoplazmik köprüler, sperm farklılaşmasının en sonunda, spermier tüpçük lümenine serbest bırakılana kadar bağlı kalırlar. Sitoplazmik köprüler, sperm farklılaşmasının en sonunda, spermier tüpçük lümenine serbest bırakılana kadar bağlı kalırlar (13).

2.2.3 Spermioyenez:

Spermatidin spermatozoaya dönüştüğü mayoz sonrasındaki değişiklikler dizisidir (14).

Spermatid çekirdeği haploid kromozom seti içerir. Terminal farklanmanın uzun bir evresi olan spermiogenezise girildiğinde, otozomlar az miktarda rRNA, mRNA ve protein sentezlemeye devam ederler (15).

Mayozdan sonraki birkaç haftada her spermatid kendisini çevreleyen Sertoli hücresi tarafından beslenir ve yeniden şekillendirilir. Böylece giderek spermatozoona dönüşür. Spermatozoona dönüşme sırasında sitoplazmasının bir kısmı kaybolur, çekirdek kromatini yeniden organize olur, kompakt bir baş meydana gelir ve kuyruk gelişir (14).

Spermiyogenezdeki olaylar şunlardır (14):

- a) Çekirdek kondenzasyonu ve çekirdeğin hücrenin periferine gitmesi.
- b) Modifiye bir lizozom olan akrozomun oluşması ve çekirdek yüzeyine tutunması.
- c) Flajel oluşumu, sentriyolden aksonem gelişmesi.
- d) Artık cisimlerin atılması.

Spermatidler spermatozoidlerden daha küçüktür ve epitelin daha üst kısmında bulunurlar. Yuvarlak hücrelerdir, sıklıkla polygonal şekil alırlar. Çekirdekleri kaba heterokromatinden yoksundur ve sitoplazmasında kısa mitokondri, veziküler ve tübüler profile sahip endoplazmik retikulum ve belirgin bir golgi kompleksi bulunur. Spermatozoaya dönüşmesinin ilk işareti küçük, membranla çevrili proakrozomal granülün jukstanükleer golgi kompleksinin trans yüzünde ortaya çıkmasıdır. Gelişme ilerlerken bu tek bir büyük granule dönüşür ve büyük bir akrozomal vezikülün içinde yer alır. Bu vezikülün sınırlayıcı membran çekirdek kılıfına yapışır. İlk tutunma noktası gelecekteki yoğunlaşmış sperm çekirdeğinin tepesini belirler. Golgi kompleksi akrozomal vezikülün yüzeyi ile yakın ilişkide kalır ve onunla kaynaşan yoğun vakuoller oluşturmaya devam eder. Bu vakuoller içeriklerini veziküle boşaltır. Akrozomal vezikülün hacmi arttığında çekirdek kılıfına yapışan membran bölgesi ile temas noktasından yanlara doğru yayılır ve hemisferik şekil alır. Bu spermiyogenezin golgi fazının tamamlandığını gösterir. Kep fazında yoğun akrozomal granül çekirdek kutbunda kalır. Akrozom fazında akrozomal granülün maddesinin büyük kısmı

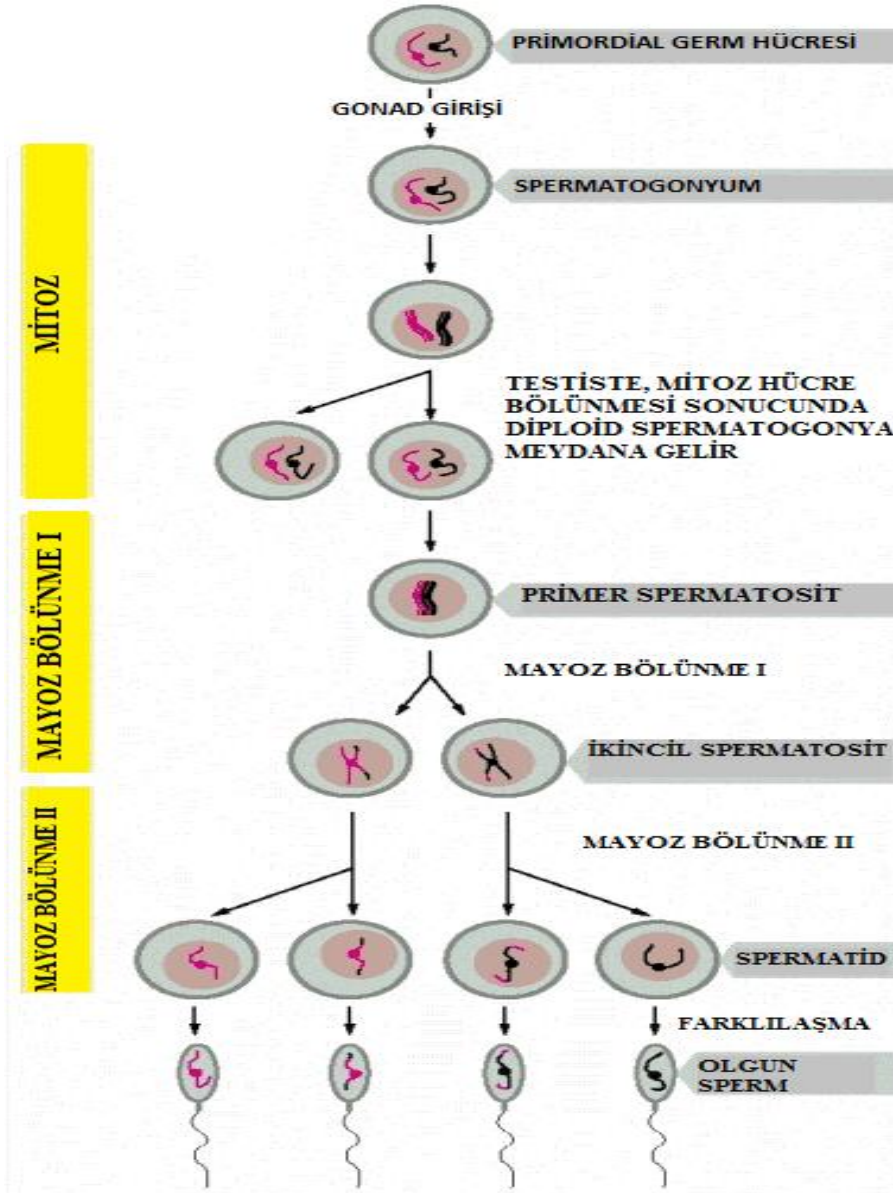
akrozom vezikülü tarafından oluşturulan kepin içinde yeniden dağılır. Bu değişiklikle akrozom veya akrozomal kep oluşumu tamamlanır. İnsanda akrozomal kep sadece kutup kısmında ve hafifçe kalındır (14).

Akrozom çekirdeğin ön kutbunda meydana gelirken sentriyoller spermatidin arka kutbunda hücre yüzeyine doğru hareket ederler. Burada sentriyollerden birisi hücre zarına dik yerleşir ve duvarındaki üçlü mikrotübül yapısı sayesinde sperm kuyruğunun aksoneminin oluşmasını başlatır. Uzayan flagella spermatid ve sertoli hücresi arasındaki boşluktan dışarı doğru uzanır. Çekirdek yoğunlaşması başladığında, sentriyol çifti çekirdeğin arka kutbuna doğru hareket eder (14).

Spermatid sitoplazmasında mikrotübüller sayıca artar ve kaba silindirik bir düzende manşeti oluşturur. Bu akrozomal kepin arka kenarındaki çekirdek kılıfının dairesel bir özelleşmesinin kaudalinde uzanır. Manşet oluşmasıyla birlikte spermatid belirgin olarak uzar, sitoplazma çekirdeğin arkasına doğru flajelin proksimaline yakın bölgeye hareket eder. Bu kayma sonucunda hücrenin ön ucundaki membrane arada sitoplazma olmayacak şekilde dış akrozom membranıyla birleşir (14).

Bu aşamaya kadar, gelen spermin kuyruğu sadece membran ile çevrili aksonemden oluşmaktadır. Flagella membran hücre gövdesinin membranıyla devam ettiği yerde sitoplazmik yüze tutunan materyal yoğunlaşarak bir halka yapar, bu ilerde sperm kuyruğunun esas parçası ve orta parçasının birleşme bölgesindeki anulusun taslağını oluşturur (14).

Daha sonra manşetin mikrotübülleri dağılır ve mitokondri aksonemin başlangıç segmentinin çevresine toplanır, öyle ki uç uca sıkı bir heliks şeklinde düzenlenerek sperm orta parçasının mitokondriyal kılıfını yapar (14).



Şekil 2: Spermatogenezin evreleri.

Spermatogonyum, embriyogenezin erken evrelerinde testise göçen ilksel germ hücrelerinden köken alır. Cinsel olarak olgunlaştığında spermatogonyumlar hızla çoğalmaya başlar ve üretilen bazı hücre soyları sonsuz sayıda bölünme yeteneğini korurken, diğer soylar sınırlı sayıda ek mitotik bölünme döngüsünden sonra primer spermatozoidleri oluşturmak için mayoz girerler. Birincil spermatozoidler birinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak, ikincil spermatozoidlere dönüşür. İkincil spermatozoidler, ikinci mayoz bölünmeyi tamamladıktan sonra, olgun sperme farklılaşacak olan haploid spermatidlere dönüşür (15).

2.3 Sperm İncelemesi

İnfertil çiftin değerlendirilmesinde semen analizi en önemli yeri tutar. Buna rağmen, azospermi dışında semen analizi, hastaların steril ve fertil gruplar şeklinde kesin ayrımının yapılmasını sağlamaz. Semen parametrelerinin kalitesi azaldıkça istatistiksel olarak gebelik şansı da azalır ama sıfıra inmez. Buna rağmen doğru şekilde yapılmış bir semen analizi infertil erkeğin değerlendirilmesinde önemli bir araçtır (16).

2.3.1 Semen Toplanması

Semen örneği polistirenden, steril, tek kullanımlık, kapağı kilitli ve ağzı geniş bir kaba alınmalıdır. Semen toplama kaplarının plastik yapısı daha önceden kimyasal ve biyolojik testlerle araştırılmış olmalıdır. Bu testler özellikle semen parametreleri incelenmiş ve plastik maddenin neden olduğu bir değişiklik saptanmamıştır (17).

Semen örneğinin toplanmasında en güvenilir ve kabul edilir yol mastürbasyondur (18).

Semen örneği mümkün olduğunca hastanelerde veya tanı veren merkezlerde hastalar için hazırlanan özel odada verilmelidir. Semen örneği eğer dışardan analiz için getiriliyorsa en fazla 45 dakikada, vücut sıcaklığında muhafaza edilerek laboratuvara iletilmelidir. Daha geç zamanlarda sperm örneğinde motilitesinde düşüşe neden olabilir (17,18).

Semen örneği vermek üzere gelen kişinin cinsel perhiz süresi 3-5 gündür. Cinsel perhiz süresi infertil olmayan kişilerde sadece sayısal özellikleri etkileyen parametredir. Sperm sayısı ile cinsel perhiz süresi arasındaki doğru orantı belirlenmiştir. Uzun süreli cinsel perhizde de spermilerin akrozin içeriğinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (17, 18).

2.3.1.1 Semen Makroskopik İncelenmesi:

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasında ilk spermiyogram analizinde Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından belirlenen kriterler esas alınmaktadır. Sperm analizi makroskobik ve mikroskobik incelemelerden oluşur.

Makroskobik incelemede semen, likefaksiyon (sıvılaşma süresi), görünüm, miktar ve pH özellikleri değerlendirilir (19).

2.3.1.1.1 Likefaksiyon:

Ejakülasyondan 5 ila 40 dakika sonra semen önce koagüle daha sonra likefiye olur. Likefaksiyonu gerçekleştiren mekanizmada proteolitik enzimler, plazminojen faktörleri ve prostat spesifik antijen vardır (18).

2.3.1.1.2 Görünüm ve Koku:

Taze ejakulat gri-beyaz opelasan görünümündedir. Cinsel perhiz süresi uzadıkça renk sarıya döner. Semende eritrositlerin bulunması halinde ise görünüm kırmızı veya kahverengidir (17-18).

Semenin kokusu “Kestane Çiçeği” ‘ne benzemektedir (18).

2.3.1.1.3 Volüm

Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre semen hacmi 2 ml veya daha fazla olmalıdır. 1 ml’den az olması durumu, hipospermik olarak isimlendirilip kısa cinsel perhiz süresi, retrograd ejakülasyonu veya ejakülatör kanalda darlık ya da toplama sırasında örneğin dökülmüş olabileceği gibi nedenler düşünülebilir. Miktarı 6 ml’den fazla olan semen içeriği hiperspermik olarak adlandırılır. Bu durumda cinsel perhiz süresi uzun veya seminal sıvı fazladır (17).

2.3.1.1.4 pH

Ejakülatın normal ph’sı 7,5-7,8 arası ve hafif baziktir (18).

2.3.1.2 Semen Mikroskobik İncelenmesi

Normal şartlar altında semen, hipotalamo-pitüiter testiküler aks dahilinde testislerin işlevi ve posttestiküler boşaltma kanallarıyla aksesuar bezlerinin salgılarından oluşur (17).

Klinik olarak semenin değerlendirilmesi tüm androlojik yaklaşımlarla birlikte erkek faktörünün tanımlanmasını sağlayacaktır. İnfertilitede erkek faktörünün kesinlik kazanabilmesi için: öykü, semen analizi, genel fizik muayene ve hormonal tetkikler sırasıyla yapılmalıdır. Gerekli görülürse testis biyopsisi, fonksiyon testleri ve biyokimyasal analizler yapılmalıdır (17).

Sperm analizi, kişiden kişiye değişiklik gösterdiği için standardize edilmesi zor olan bir tekniktir. Çünkü kişiden kişiye olduğu kadar, aynı kişide bile cinsel perhiz süresi, ısı farklılığı, günün farklı saatleri, semen örneğinin verildiği yer, çalışma koşulları ve emosyonel duruma göre farklılık gösterebilir. Semen örneği 2-7 günlük cinsel perhizden sonra alınmalıdır. Aynı kişide 3-4 hafta arayla iki kez semen analizi yapılmalı ve çeşitli parametreler arasındaki farklılık %20'den fazla ise üçüncü kez yinelenmelidir (17, 18).

Taze semen değerlendirmesi için faz-kontrast mikroskopisi önerilir. İlk mikroskopik değerlendirme sırasında konsantrasyon, motilite, mukus iplikleri formasyonu, sperm agregasyon ve aglütinasyonu ve spermden farklı hücresel elemanların değerlendirmesi yapılabilir. Örnek iyi karıştırılmamışsa aynı örnekten yapılan iki ayrı inceleme arasında motilite, canlılık, konsantrasyon ve morfolojik olarak belirgin farklılıklar gözlenebilir. Ayrıca sperm kameraya konmasından hemen sonra yapılmalıdır. Bekletildiği takdirde mikroskop ışığı ile ısınan örnek içindeki spermler daha hızlı hareket edecekleri için sayıdaki hataları arttırabilir. Geniş ağızlı plastik bir pipete 10 kez aspire edilmesi ile örnek karıştırılabilir. Spermlere hasar verebileceğinden dolayı yüksek hızlı karıştırıcılar kullanılmamalıdır. Semen hacmi ve lamel boyutlarının da standart olması gerekir. Böylece analizler her zaman derinliğin yaklaşık 20 µm'de sabit olduğu preparatlarla yapılmış olur. Derinliğin 20 µm'nin altında olması spermlerin rotasyonel hareketini zorlayabilir. 10 µl'lik hacimde semen lam üzerine konur. Üzeri lamelle kapatılır. Lam ile lamel arasında hava kabarcığı oluşturulmamalıdır. Hareketsiz spermlerin birbirleriyle, mukus

iplikleriyle debris veya sperm olmayan hücelere yapışması sonucu oluşan nonspesifik agregasyon gözlenirse kaydedilmelidir. Hareketli spermlerin birbirlerine baş-baş, kuyruk-kuyruk veya miks şekilde yapışmalarına aglütinasyon denir ve bu izole form, orta, çok ve şiddetli olmak üzere derecelendirilebilir. Aglütinasyon, agregasyondan ve hareketli spermlerin debris veya sperm dışı hücelere yapışmasından ayırt edilmelidir. Aglütinasyon olması infertilitenin nedeninin immünolojik olduğu için yeterli kanıt değildir ama antisperm antikor çalışmasını ve daha ileri incelemelerin yapılmasını düşündürebilir. Şiddetli aglütinasyon sperm motilite ve konsantrasyon değerlendirmesini etkileyebilir (17, 18).

Semen analizde mikroskopik değerlendirmenin sağlıklı sonuç verebilmesi için faz kontrast mikroskop kullanılmalı ve değerlendirmeler 10x20 büyütmede yapılmalıdır (19).

2.3.1.2.1 Sperm Sayımı

Makler® sperm sayma kamerası 10 mikron derinliğindedir. Optik olarak düz iki parça camdan meydana gelir. Üst cam kapak görevi görmekte olup merkezinde her biri 0,1 x 0,1 mm'lik 100 kareye bölünmüş 1 mm²'lik ince kılavuz çizgiler bulunmaktadır. Aradaki boşluk kuvars pimlerle sağlam olarak sabitlenmiştir. Analiz ediliş biçimi ise, iyice sıvılaşmış ve karıştırılmış, seyreltilmemiş semenden küçük bir damla alınarak diskin merkezine konulur ve üzerine kapama camı kapatılarak mikroskop altında 20'lik objektif ile sayım yapılır. Doğru bir sayım için önce semenin iyice sıvılaşması gerekir. Ardından örnekten küçük bir damla alınarak diske yerleştirilir ve sayım yapılır. Yukarıdan aşağıya ya da soldan sağa yan yana on karelik bir alan içindeki spermler sayılır. Bulunan sayı mL'de kaç milyon sperm olduğunu gösterir. Oligospermik semenlerde tüm kılavuz alan içindeki spermler sayılır, bulunan rakam mL'de kaç yüz bin sperm olduğunu gösterir. Kullanımdan sonra suyla iyice yıkadıktan sonra temas yüzeyleri özel mercek kağıdı ile kurulanır ve tekrar kullanım için hazır hale getirilir. Sperm sayımı yapılan alandaki (yukarıdan aşağıya ya da soldan sağa yan yana 10 kare) hareketsiz spermler sayılır ve toplam sperm sayısı ile orantılanarak hareketli sperm sayısı hesaplanır. Bu işlem birçok

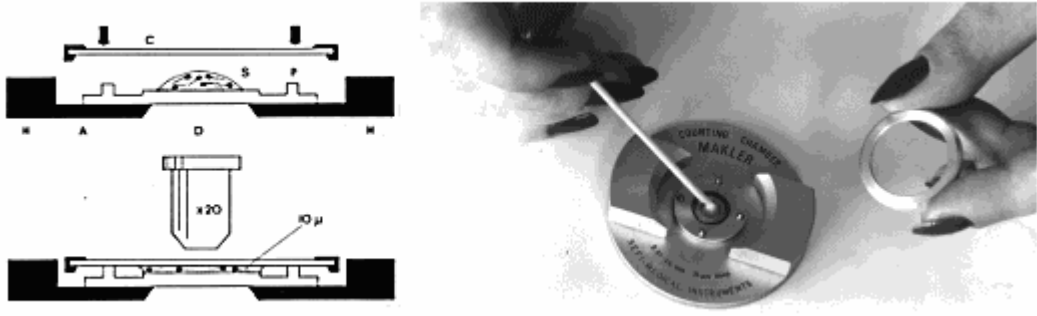
alanda tekrarlanır ve ortalamaları alınır. Ardından hareketlilik yüzdesi ve kalitesi hesaplanır (20).

Makler kamerasının çokça avantajı bulunmaktadır bu avantajlar Tablo1’de verilmiştir. Örnekte mikroskopla hiç sperm görülmediyse yeni bir taze preparat hazırlanır. Yine sperm görülmezse azospermiden şüphelenilebilir (20, 21)

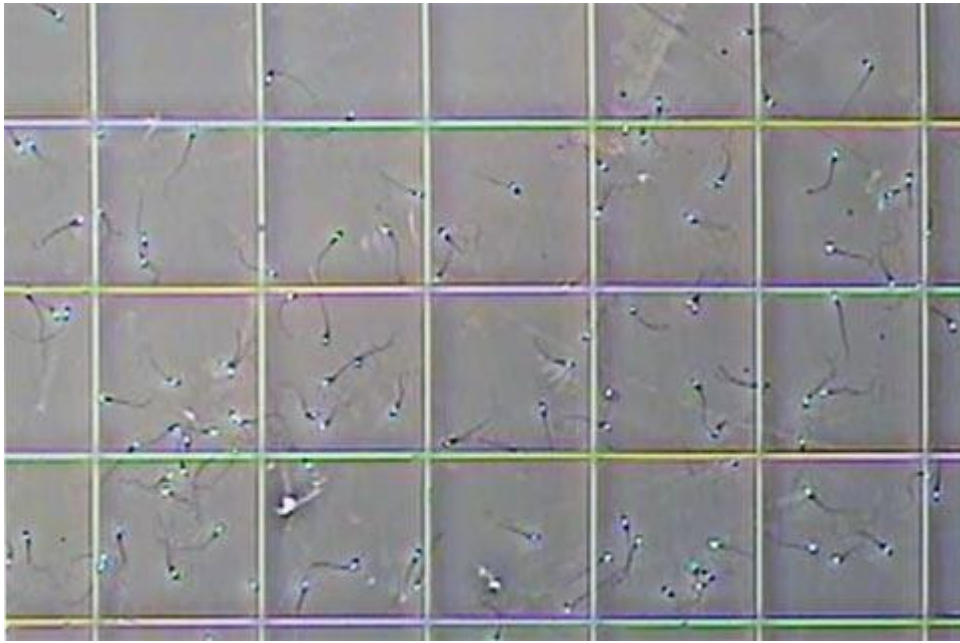
Makler hızlı ve ideal biçimde sperm sayısı ve motilitesini değerlendirmek için kullanılan bir sayma kamerasıdır (Şekil 3) (20).

Tablo 1: Makler kamerasının avantajları (20).

1	Spermatozoalar homojen ve tek kat olarak dağılır ve tek bir fokal düzlemde gözlemlenir.
2	Semen numuneleri seyreltilmeden doğrudan orijinal örnekten analiz yapılır.
3	Tüm spermatozoaların sürtünmesiz yatay hareketleri sabit şartlar altında incelenirler ve değerlendirilir.
4	Normal hemositometrik tekniğin gerektirdiği birçok adımın elenmesi ve her seferinde aynı şartlar altında motilitenin inceleniyor olması doğruluk derecesini artırır.
5	Semen analizinde kullanılan objektifin alan derinliğine yaklaşık olarak uyduğu için 10 mikron derinliğindeki Makler diski sabit veya hareketli kamera fotomikrografisi için idealdir.
6	Disk kolay ve çabuk bir şekilde tekrar kullanıma hazırlanabilir. Yoğun bir laboratuvarında, asgari teknik ve malzeme kullanılarak, tek bir teknisyen tarafından bir saatte çok sayıda test yapılabilir.



Şekil 3: Makler Sayma Kamerası



Şekil 4: Makler kamerasında sperm görünümleri (20)

Sperm sayma işlemi;

1. 10µl semen örneği diskin üzerine yerleştirilir. 2. kısım olan cam disk 4 pinin üzerine oturacak şekilde yerleştirilir.
2. Sperm sayma işlemi 20 x 'lik objektifle yapılır.
3. Sayma sırasında yan yana 10 kare içindeki sperm sayısı belirlenir. Bu sayı milyonla çarpılır.

4. 2-3 alan sayıldıktan sonra bunların ortalaması alınır ve sonuç olarak belirtilir (20-23).

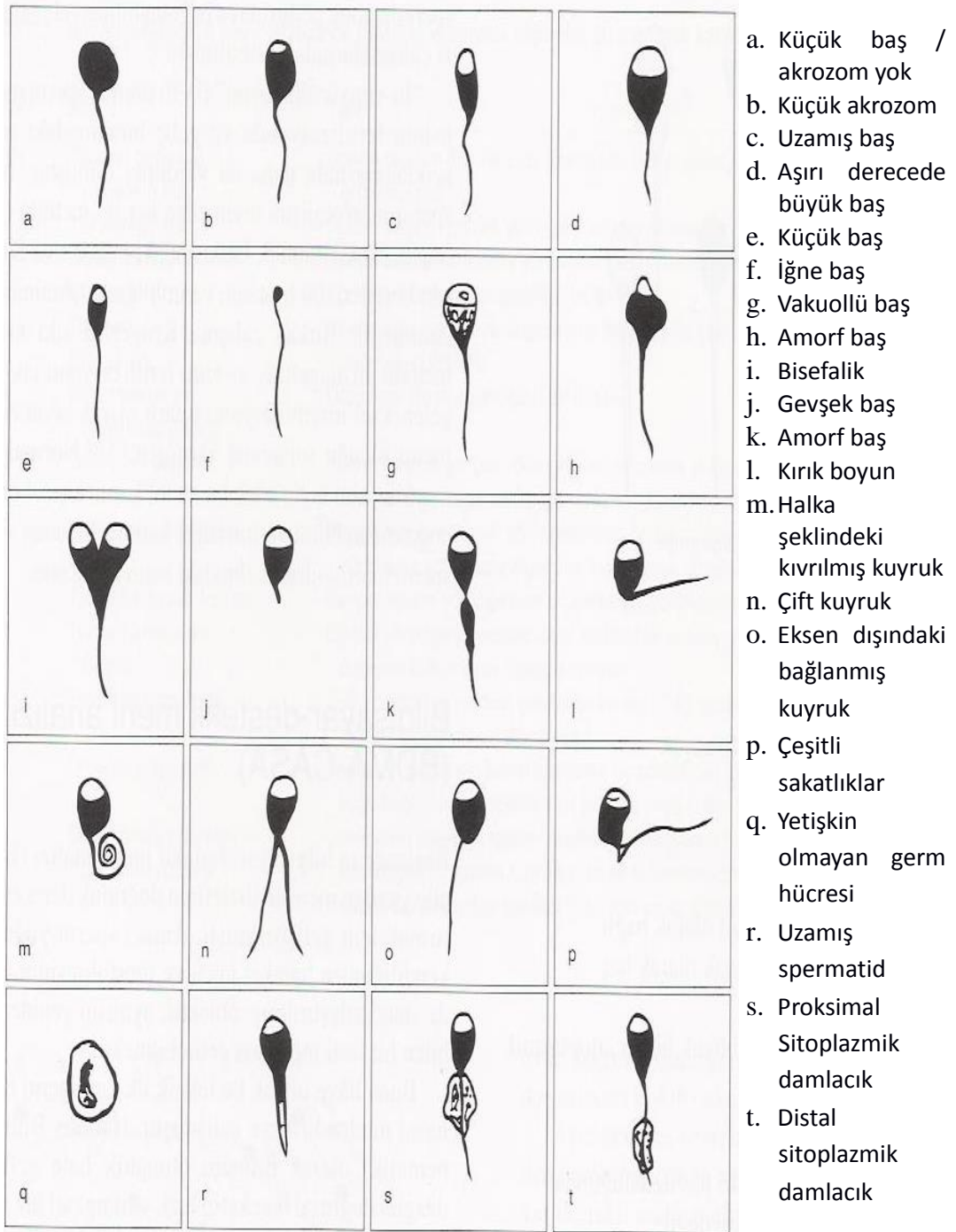
2.3.1.2.2 Sperm Değerlendirilmesi

Dünya Sağlık Teşkilatının semen analiz için verdiği normal değerler Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Dünya Sağlık Örgütü normal sperm değerleri, (* A: hızlı progresif motil, B: yavaş progresif motil, C: yerinde motil.) (25-26).

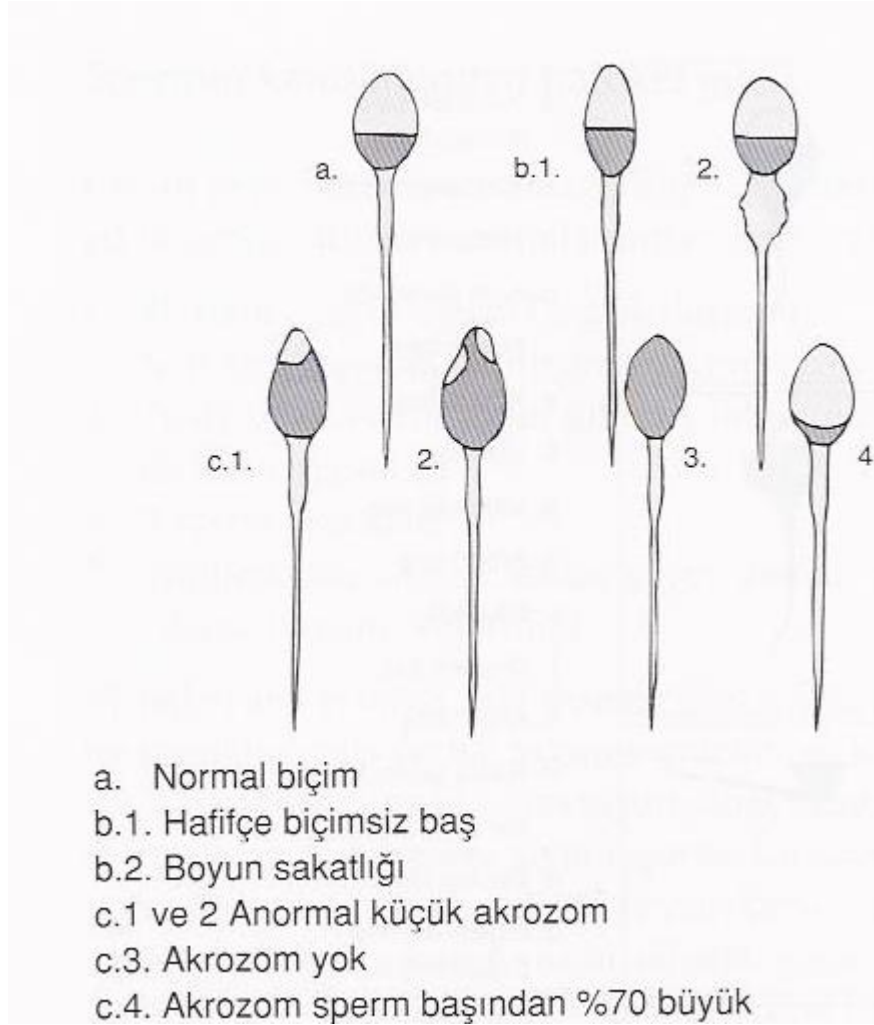
Parametre	WHO 2010
Miktar (volüm)	≥ 1.5 ml
pH	≥ 7.2
ml de sperm sayısı (konsantrasyon)	≥ 15 milyon/ml
Total sperm sayısı	≥ 39 milyon/ml
Hareketlilik (motilite)	%40 (A+B+C)* %32 (A+B)
Şekil (morfoloji)	≥ 4
Canlılık (Viability)	≥ 58
Lökosit (iltihap hücresi)	≤ 1 milyon/ml

Morfolojik olarak sperm değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Teşkilatının 3. ve 4. Baskılarındaki “Kruşerin sıkı kriterlerin”deki standartlar Şekil 5’te gösterilmiştir (24).



Şekil 5: Sperm şekil bozukluklarının farklı tipleri (Üreme teknikleri kitabından alınmıştır, 26)

Sperm morfolojisinde normal yapıların değerlendirilmesinde Diff-Quik boya seti ile hazırlanan lamalar ışık mikroskopunda 1000x ve daha fazla büyütme ile bakılır. Örnek Şekil 6'daki gibi değerlendirilir (26).



Şekil 6: Diff-Quik ile boyanmış sperm (Üreme teknikleri kitabından alınmıştır, 26)

Normal spermin Krugere göre kriterleri (26);

Baş:

- Düzgün: oval biçimli,
- Uzunluğu:5-6 μm

- Çap:2.5-3.5 µm
- Akrozom: Mutlaka sperm başının %40-70 oluşturmali

Orta Parça:

- İnce ve güzel hatlı, eksensel olarak bağlı
- 1 µm genişliğinde ve yaklaşık olarak baş uzunluğunun 1.5 katı
- Sperm başının yarısından büyük bir hiçbir sitoplazmik damlacığının olmaması

Kuyruk:

- Tek, kırılmamış, düzgün, 45 µm uzunluğunda bükülmemiş veya halka gibi değil

2.4 Kriyoprezervasyon

İnsan oosit, embriyo, sperm veya gonad dokularını saklamak için bu hücre ve dokuların sıfırın altında sıcaklıklara gelecek biçimde soğutulurlar. Bu işleme kriyoprezervasyon ya da dondurarak saklama denir (24).

2.4.1 Sperm kriyoprezervasyonu

İnfertiliteye neden olabilen sebeplerden olan, cerrahi operasyonların varlığında, radyoterapi ve kemoterapi gibi sitotoksik olan tedaviler öncesinde, testis hasarına neden olabilecek otoimmün hastalıkların tedavisi öncesinde veya şeker hastalığı olan diyabet gibi malign olmayan hastalıkların tedavisi öncesinde spermlerin sıvı azot içerisinde -196 °C saklanarak fertilitenin korunması amaçlanır. Diğer taraftan, sperm kriyoprezervasyonu, erkek infertilitesinin tedavisinde, azospermik hastalarda epididimal aspirasyon veya testis biyopsisi ile cerrahi operasyon ile alınmış spermin saklanması, önemli bir yer tutmaktadır (13).

Sperm hücrelerinin çok küçük olması, az miktarda sitoplazma içermesi ve hücre çekirdeğinin kondanse halde olması dondurma/çözme işleminden diğer hücrelere göre çok daha yüksek bir sağkalımla çıkmasını sağlar (24).

2.4.2 Kriyobiyojinin Temel Prensipleri

1. Spermilerin dondurulma işleminde öncelikle kriyoprotektan maddelerle bir araya getirilip denge oluşturulması gerekir.
2. Soğutma işleminin belirli bir hızda gerçekleştirildikten sonra sıvı azot içerisinde saklanması gerekir.
3. Dondurulmuş spermın çözülme aşamasında dilüsyon yapılarak kriyoprotektanların ortamdaki uzaklaştırılması ve gelişimlerine izin verecek fizyolojik solüsyonlar içerisinde alınması esasına dayanır. Bu işlemler yapılırken (13);
 - Hücre hasarı minimal olmalıdır.
 - Hücrenin yapısal bütünlüğü ve fonksiyonel özellikleri korunmalıdır.
 - İdeal olanı, -196 °C'de sıvı azotta saklamaktır. Ancak - 80 °C - 196 °C arasında daha kısa süre saklanabilir. (2 ay)
 - - 130°C'nin altında artık çok az ATP harcanır.
 - 37°C'den 7 °C'ye indiğinde hücredeki enzim reaksiyonları minimal seviyeye iner.
 - 0-5°C arasında hücre içi birçok reaksiyon stabilize haldedir.
 - Dondurma işleminde, damla damla kriyoprotektan eklenmiş spermiler - 5°C ile - 15°C arasında soğutulduklarında, aşağıdaki sırayı izleyen bir dizi olay gerçekleşir (13):
 - a) Önce hücrenin içinde bulunduğı ortamdaki su donar.
 - b) Hücre dışında buz kristalleri oluşarak sitoplazmayı soğutur.
 - c) Bu sırada, eklenen kriyoprotektan maddeler sebebiyle hücre dışında osmolarite daha yüksektir, bu sebeple hücreden dış ortama su geçişi başlar, (hızlı su kaybı-dehidratasyon) ve hücre önce büzülür. (Bu sırada sitoplazmanın kimyasal potansiyeli hücre dışından fazladır.)

- d) Hücre dışına çıkan su donar. (Dehidratasyona bağlı olarak hücre içi ile dışı arasındaki kimyasal potansiyel farkı giderek azalır.)
- e) Hücre dışına çıkan su, hücre harabiyetinin esas sebebi olabilecek buz kristalleri oluşmadan önce suyun büyük bölümü dışarı çıkmış olur. Böylece, hücre hasarına neden olabilecek intraselüler kristal oluşumu en aza indirilmiş olur (13).

Prensip, dondurma işlemi gerçekleştikçe, kriyoprotektanın hücre içine geçişi ve dengenin yeniden kurulması ile hücre tekrar yapısına döner (13).

Hücreler (spermiyum ya da embriyolar) zamanla değil de, aniden dondurulursa, hücre dışına su aktarımı ani ve fazla olacağından hücre içi ile dışı arasındaki dengelenme için yeterli zaman kalmaz ve zarda ozmotik hasar olur. Hızlı değil de, yavaş çözülürse bu defa, intraselüler buz kristalleri birbirleriyle birleşip büyüyebilir ve yine hücre zarında hasar meydana gelir. Bu sebepten ötürü hızlı çözme tercih edilerek buz kristallerinin hücrede etkili olabileceği süre en aza indirilmiş olmalıdır (13).

2.5 Sperm DNA Fragmantasyonu

2.5.1 Spermatozoon DNA'sı Hasarı

Sperm DNA fragmantasyonu, spermatogenez sırasında yanlış kromatin paketlenmesi, ejakülasyon öncesi apoptozis, ejakülatta yüksek oranda reaktif oksijen türlerinin oluşması, çevresel ya da endüstriyel toksinlere maruz kalma, genetik, oksidatif stres veya sigara kullanımına bağlı nedenlerden kaynaklanabilir (27).

Spermatozoon DNA'sında hasara neden olan faktörler (28);

2.5.1.1 İn-Vivo Faktörler:

Spermatozoon özellikle genotoksikler olarak bilinen ve DNA'da hasara yol açan toksik maddeler başta olmak üzere pek çok in vivo faktör tarafından hasara uğratılmaktadır. Bu konuda yıllardan beri çeşitli araştırmalar yapan bilim adamları

DNA'daki hasarın fiziksel veya kimyasal etkiler sonucunda meydana geldiğini bildirmektedirler. Bu faktörlerden bazıları şunlardır: (28)

2.5.1.1.1 Sigara:

Sigara DNA hasarını artıran mutajen veya karsinojen maddeler olarak bilinen veya varsayılan maddeleri (nitrozaminler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar-PAH) içermektedir (29). Sigara dumanındaki mutajenik etkiye bağlı olarak sperma kalitesinde özellikle spermatozoon sayısı, motilite oranı ve anormal spermatozoon oranında önemli düşüşler meydana gelmektedir (30-33). Sigara içmeye bağlı olarak insan spermasında anöploidi (kromozom anomalileri) seviyesi de artmaktadır (30). Ayrıca sigara içilmesine bağlı olarak seminal plazmadaki antioksidant seviyesinin düşmesi sonucunda da DNA hasarının arttığı bildirilmektedir (34, 35). Yapılan araştırmalar sigara içme oranı ile spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasar arasında önemli derecede pozitif bir ilişkinin olduğunu ortaya koymaktadır (36, 37).

Bir babanın sigara içmesi, kendi androjen seviyesinde değişimlerle birlikte bu babadan doğan çocuklarda da doğumsal anomaliler ve hatta çocukluk çağında bile çeşitli kanserlere neden olabilmektedir (29). Genotoksik maddeler spermatozoon hücresinde mutasyonu indükleyebilir ve çocuğa geçip onların gelişimini etkileyerek, kanser meydana getirebilir (38). Kimyasal karsinojenlerin DNA'yı etkileyen metabolitleri kan yoluyla diğer doku ve organlara taşınabilmektedir (39). Ancak sertoli hücrelerindeki kan-testis bariyerinden dolayı gelişen cinsiyet hücreleri ile kan dolaşımı doğrudan temas içerisinde değildir. Bununla birlikte nikotin ve nikotin metabolitlerine sigara içen kişilerin spermasında rastlanması DNA'yı etkileyen metabolitlerin bu engeli aşip cinsiyet hücrelerini etkilediğini göstermektedir (36,40).

2.5.1.1.2 Varikosel

Varikoselin spermatozoondaki DNA hasarına nasıl yol açtığı henüz tam olarak anlaşılmamakla birlikte, varikoselli hastaların testis dokusunda DNA polimeraz seviyesinde önemli bir azalma olduğu ve bu enzim eksikliğinin spermatogenezis üzerine olumsuz bir etki yaparak DNA hasarı meydana getirebileceği belirtilmektedir (41). Varikoselli fertil veya infertil hastalarda yapılan

araştırmalar, seminal oksidatif strese bağlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunda artış ve toplam antioksidant kapasitede (TAK) azalmaların meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Artan seminal oksidatif stres ürünleri spermatozoon DNA'sındaki hasarla birlikte spermatozoonun plazma membranında lipid peroksidasyona, spermatozoon motilitesi, metabolizması ve fertilizasyon kapasitesinde ise azalmalara neden olarak spermatozoonun fonksiyonunu engellemektedir (42). Ayrıca oksidatif stres spermatozoonun kromatin bütünlüğünü etkileyerek tek ve  ift DNA sarmalı kırılmalarına sebep olmaktadır (43).

2.5.1.1.3 Yaş

Yaşlanma ile doğru orantılı olarak spermatozoon DNA'sında hasar meydana gelmektedir. DNA  ift sarmalındaki hasar ile spermatozoondaki apoptozisin yaşlanmaya paralel olarak artmakta olup bu artış muhtemelen spermatogenezis esnasında ve sonrasında hücre seçim sistemindeki yetersizliğin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (44). Bazı araştırmacılar normal ve infertil erkeklerde sperm motilitesi ile yaş arasında pozitif bir ilişkinin bulunduğunu, yaşa bağlı azalan spermatozoa motilitesi ve artan DNA hasarının muhtemelen sperma süspansiyonu içerisindeki lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen moleküllerinden kaynaklandığını ileri sürmektedirler (42, 44). Yaş ile semendeki lökosit sayısı ve reaktif oksijen türleri arasında bir ilişkinin olmadığı rapor edilmiştir. Yaşın ilerlemesiyle spermatozoon DNA'sında meydana gelen hasarların arttığı ve bu hasarlı hücrelerin eliminasyonunun da güçleştiği bildirilmiştir (45-47).

2.5.1.1.4 Genotoksikler

Genotoksikler, hücre DNA'sında hasara yol açan maddelerdir. DNA'da mutasyona ve kansere yol açmaktadır. Ayrıca spermatozoon DNA'sında da hasara neden olduğu tespit edilmiştir (48). Uzun süreli demir verilmesini takiben canlı vücudunda oksidatif strese bağlı olarak mayoz sonrası testis hücrelerinde meydana gelen DNA hasarının yanısıra spermatozoonun fizyolojisi ve fonksiyonunda bozukluklar oluşmaktadır (49). Kemoterapotik ajan olan ve testis kanseri tedavisinde

kullanılan *cisplatin* ilacı da spermatozoonun baş kısmında anomalilere ve spermatozoon DNA'sında hasara sebep olan genotoksik bir maddedir (28).

2.5.1.2 İn-Vitro Faktörler:

Spermatozoon DNA'sında hasara neden olan in vitro faktörler genellikle spermanın işlenmesi aşamalarında kullanılan tekniklere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Spermanın alınmasından dişinin tohumlanmasına kadar geçen bu süre içerisinde uygun tekniklerle alınan sperma uygun şekillerde işlemlere tabi tutulur. Bu süreçte spermatozoa DNA'sında hasar meydana gelebilmektedir (51).

2.5.1.2.1 Spermin Sıvı Azot İçerisinde(-196°C) Saklanması

Spermanın dondurularak saklanması işlemleri sırasında herhangi bir uygulama basamağında uygun olmayan bir işlemin yapılması, bu uygulamalar esnasında spermatozoon DNA'sında meydana gelebilecek muhtemel hasarın düzeyinde artışa sebep olacaktır (51-53).

2.5.1.2.2 Seminal Plazma

Seminal plazmada antioksidan seviyesi azaldığında oksidatif strese bağlı olarak DNA hasarı düzeyinde artış görülmektedir (54). Seminal plazmada antioksidan seviyesinin azalması sonucu reaktif oksijen moleküllerinin artmasından dolayı DNA hasarından kaynaklanan infertilite meydana geldiği bildirilmektedir (55).

2.5.1.2.3 Reaktif Oksijen Moleküllerine Maruz Kalma

Aslında reaktif oksijen molekülleri sınırlı seviyede olduğunda spermatozoanın kapasitasyonu sırasında fizyolojik role sahiptir (57,60). Ancak yüksek düzeyde reaktif oksijen moleküllerine maruz kalma spermatozoa DNA'sında hasara ve lipid peroksidasyona neden olmaktadır (59).

2.5.1.2.4 Kryoprotektanlar

Spermayı dondurarak saklama esnasında spermatozoonda oluşabilecek zararlı etkiler kryoprotektan maddeler kullanılarak azaltılabilmektedir. Hemen hemen her türün sperması farklı özelliklere sahip olduğu için dondurma işleminden önce spermaya katılacak olan kryoprotektanın çeşidi, yoğunluğu ve spermanın kryoprotektana maruz bırakılma süresi türe göre ayarlanması gerekir (59). Farklı türlerin spermasının kryopreservasyonunda dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol, propilen glikol, metanol, butandiol asetamid ve 1,2- propandiol gibi kryoprotektanlar yaygın olarak kullanılmaktadır (60-61). Kryoprotektanlar dondurma esnasında spermatozoonun baş kısmındaki intrasellüler kompartmana geçerek sıvının donmasını ve buz kristallerinin oluşmasını seçici olarak engeller. Yapılan araştırmalar dondurma amacıyla spermaya kryoprotektanların katılmasının spermatozoon DNA'sında herhangi bir hasara neden olmadığını göstermektedir. Diğer bir ifadeyle spermaya kryoprotektan katılıp katılmaması spermatozoon DNA'sını etkilememektedir (61).

2.6 DNA Fragmantasyonu Tayini

Sperm kromatini durumunun halini değerlendirilmesi için metodlar kullanılır. Bu metodlar da hasarlı kromatinler gözükmemektedir (26).

DNA farmantasyonu tayini için kullanılan metodlardan biri olan TUNEL testidir. Bu testin analizi DNA polimeraz 1 kalıp-bağımlı enzim ile katalize edilen reaksiyon tek DNA iplik kırılmalarının biotinlenmiş deoksiuridin trifosfat (dUTP) ile birleşme miktarını belirtir. Özellikle spermlerin hissedilebilir endojen ve değişik seviyelerdeki DNA hasarlarını boyar. TUNEL analizi spermdeki DNA'nın yeniden modellenmesi esnasında meydana gelen anomalileri gösterir. Daha ziyade şekilsel olarak gösterilemeyen sperm anomalilerini ortaya çıkarmaktadır.(26)

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Semen Analizi

3.1.1 Örnek Toplama ve İşlem

a) Kayıt Bilgisi:

Örnek verme öncesinde gönüllü kişinin kimlik bilgisi alındı, cinsel perhiz süresi, sigara ve alkol kullanımını sorulup anket dolduruldu.

b) Gönüllü Kişi Bilgilendirmesi:

Kişilere yazılı belge halinde, kendilerinden alınan örneğin ne zaman, nerede, hangi işlemler için kullanılacağına bilgisi özellikle cinsel perhiz süresinin 3 ila 5 gün olduğunun bilgisi verildi ve imza altına alındı.

c) Örnek Verme Metodu:

Cinsel perhiz süresi sonrasında kişilerden mastürbasyon yöntemi ile örnek alındı.

d) Örnek Verme Yeri:

Örnekler inceleme yapılan merkezin özel odasında alınmış veya örnek evde verilip 1 saat içerisinde inceleme yapılan merkeze getirilmiştir.

e) Örnek Kabı:

Örnekler daha önceden belirlenmiş geniş ağızlı polistren kaplara alındı.

f) Örnek Verme Sonrası İşlemler:

Örnek verildikten sonra kişi, tarafımıza kabı vererek kap üstüne ad, soyad, protokol numarası yazılarak kayıt altına alındıktan sonra, 1 saat 37 °C'lik inkübatörlerde likefiye olması(sıvılaşması) beklendi.

3.1.2 Makroskopik Değerlendirme:

Likefiye olmuş örnek değerlendirilmeye alındı;

- a) Görünümü ve yoğunluğu değerlendirildi, semen kokusuz ve gri görünüme sahipti.
- b) Likefaksiyon ve viskozite değerlendirildi, ilk 30 dakika içerisinde likefiye olan sperm örnekleriyle beraber geç likefiye olanlarda oldu.
- c) Spermin alındığı kaptan volüm hesabı yapıldı.
- d) pH ölçümü pH kağıtlarıyla yapıldı.

3.1.3 Mikroskopik ve Sperm Hareketliliği Değerlendirmesi:



Şekil 7: Sperm hareketliliğinin değerlendirilmesi

Yukarıdaki tabloda belirtilen sperm kalitesi “A” ve “B” olan kişiler teze dahil edilmiştir.

3.1.4 Sperm Sayısı Değerlendirmesi:

Sperm konsantrasyonu hesabını sayım sonucu elde edilen sperm sayısının o spermlerin içinde bulunduğu volüme bölünmesiyle yapıldı. Formülü,

“Sperm Sayısı milyon/ml = Sayım yapılan alanda 10 karedeki sperm sayısı” şeklinde hesaplandı.

3.1.5 Sperm Morfolojik Değerlendirmesi:

Spermlerin morfolojik incelemesi Diff-Quik kit (Medion Diagnostics, Germany) ile boyama sonrası yapılmıştır. Sperm örneğinden lam üzerine 10µl damlatılıp lamelle yayılarak havada kurutulmuştur. Kurutulan lam, kit içerisinde bulunan sırasıyla fiksatifin, katyonik ve anyonik boyaların içinde birer dakika bekletilip sonra sudan geçirildikten sonra tekrar havada kurutulmuştur. Boyanan preparatlar ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir. %15 veya daha fazla normal sperm morfoloji gösteren sonuçlar normal olarak değerlendirildi.

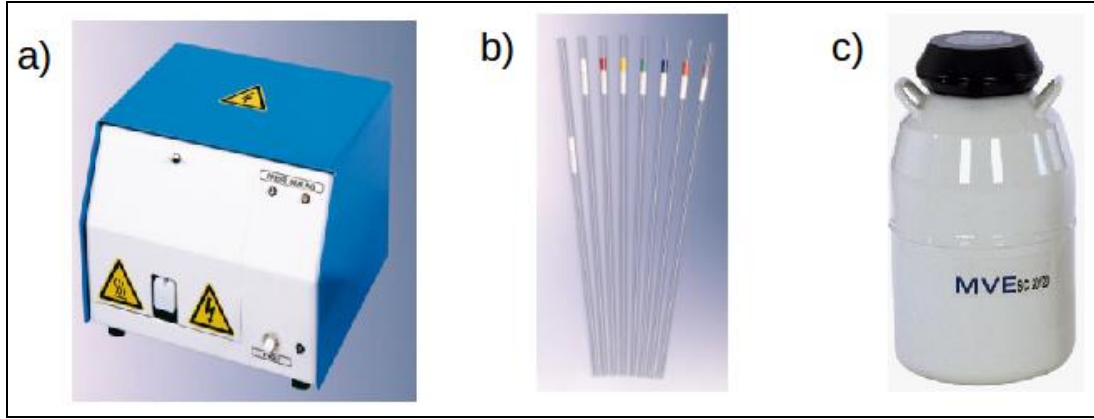
3.2 Sperm Dondurma-Çözme İşlemi

Sperm dondurma ve çözme işleminde sperm dondurma medyumu kullanılmıştır (Product number:1067, ORIGO Medicult Media Denmark). Kit içeriğinde belirtilen protokol takip edilmiştir.

Dondurma işlemi aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

1. Medyum kullanılmadan 2 saat önce +4°C'den oda sıcaklığı olan +20 °C'ye çıkarıldı.
2. Ejekülat sıvılaştıktan sonra miktarı ve analizi yapıldı.
3. Medyum oda sıcaklığına geldiğinde semen ile 1:1 oranında dilüsyon yapıldı. Medyum semen üzerine damla damla koyduktan sonra her damladan sonra karıştırıldı.
4. Semen medyum karışımı en az on dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. Bekleme sonrası karışım çubuklara ve tüplere konularak mühürlendi ve bilgiler yazıldı. Çözme aşamasında önemli olduğu için, çubuğun alt tarafında mühürleme öncesi hava boşluğu bırakılıldı.

6. Mühürlenmiş çubuklar sıvı azot buharında yatay olarak 30 dakika boyunca bekletildi.
7. Çubuklar 30 dakika sonrasında hemen sıvı azot tank içerisine konuldu.



Şekil 8: Kriyoprezervasyonda kullanılan aletler

- a) Mühürleme için kullanılan cihaz, b) Dondurma işleminde kullanılan çubuklar,
- c) Sıvı azot tankı

Çözme işlemi aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1. Çubuklar sıvı azot tankından çıkartıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
2. Örnek tamamen çözüldükten sonra üzerine yıkama solüsyonu (Vitrolife, G-SPERM™ PLUS, 10107) eklenip 300 x g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak kriyoprotektan uzaklaştırılmıştır. Çözme işlemi sonrası sperm örnekleri elde edilmiştir.

3.3 TUNEL Metodu ile DNA Fragmantasyonu Tayini

Hem dondurma öncesi taze örnekten hemde dondurulup çözüldükten sonra sperm örneklerinin DNA fragmantasyonlarını karşılaştırmak için TUNEL (In Situ

Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kiti kullanılıp incelenmiştir.

Kit kullanımında ihtiyaç olan malzemeler:

- a) Pipet seti ve uçları(1000µl, 100 µl)
- b) Lam ve lamel
- c) Petri kapları
- d) Pasteur pipeti(2ml)
- e) PBS tablet(Fosfat tamponlu tuzlu su)
- f) PBS ile hazırlanmış % 3,7'lik para formaldehit, pH:7,4
- g) %0,1 Triton X 100 içeren Sodyum Sitrat
- h) BSA (Bovine Serum Albumin)
- i) Mini Santrifüj
- j) Floresan Mikroskop

Kit içeriğinde bulunan malzemeler:

- a) Mavi tüp (Enzim solüsyonu): Terminal deoksinukleotidil transferaz
- b) Mor tüp (İşaretleme solüsyonu): Nükleotid karışımı içeren reaksiyon solüsyonu

Kit protokolü aşağıdaki gibi yapılmıştır;

1. 1 – 2 milyon sperm içeren pellet, PBS (fosfat tamponlu tuz) solüsyonu eklenerek pipetaj yapıp yıkandıktan sonra 5 dakika 800 x g'de santrifüj edildi.
2. Pelletin üstünde ki süpernatant steril 2 ml'lik pasteur pipeti ile çekilerek atıldı.

3. Seminal plazma ayrılıp, pellet %1 sığır serum albümini(BSA) içeren PBS ile 2 kez yıkandı.
4. Pellet, 100 µl %1 BSA içeren PBS solüsyonu ile sulandırılıp, %3,7 paraformaldehit içeren ve pH'ı 7,4 olan PBS ile 1 saat, oda ısısında çalkalanarak fikse edildi.
5. Sperm hücreleri %1 BSA içeren PBS solüsyonu ile yıkayıp, önceden hasta numarası yazılmış temiz lam üzerine 10 µl damlatıldı ve bunun havada kuruması beklenildi.
6. Kuruma sonrası lamlar PBS ile yıkandı. Sodyum sitrat içerisinde %0,1 Triton X 100 ile 2 dakika buz üzerinde permeabilize edildi.
7. 2 kez daha PBS ile yıkanan lamalara, DNA elongasyonu için terminal deoksiniükleotidil transferaz(TdT)-aracılı dUTP-etiketleme'den 5 µl ve işaretleme solüsyonundan 45 µl ile oluşturulan karışımdan her lama 25 µl damlatılıp lamelle kapatıldı. Işık almayacak şekilde ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
8. İnkübasyon sonrası lamlar üzerindeki lameller kaldırıldıktan sonra 2 kez PBS ile yıkandı ve nükleusu görüntüleyebilmek için 1mg/ml 4',6 diamidino-2-fenilindol (DAPI II) (Abbott Molecular, U.S.A, 06J50-001) ile boya damlatılıp lamelle tekrar kapatıldı.
9. Her örnekte 100 sperm, floresan mikroskobu ile floresan izotiyosiyanat (FITC) değerlendirilmesi yapıldı. Her alanda DAPI(mavi) ile boyanmış spermler sayıldı. Yeşil FITC floresan veren spermlerin (TUNEL pozitif) sayılan alandakilere oranı raporlandı.

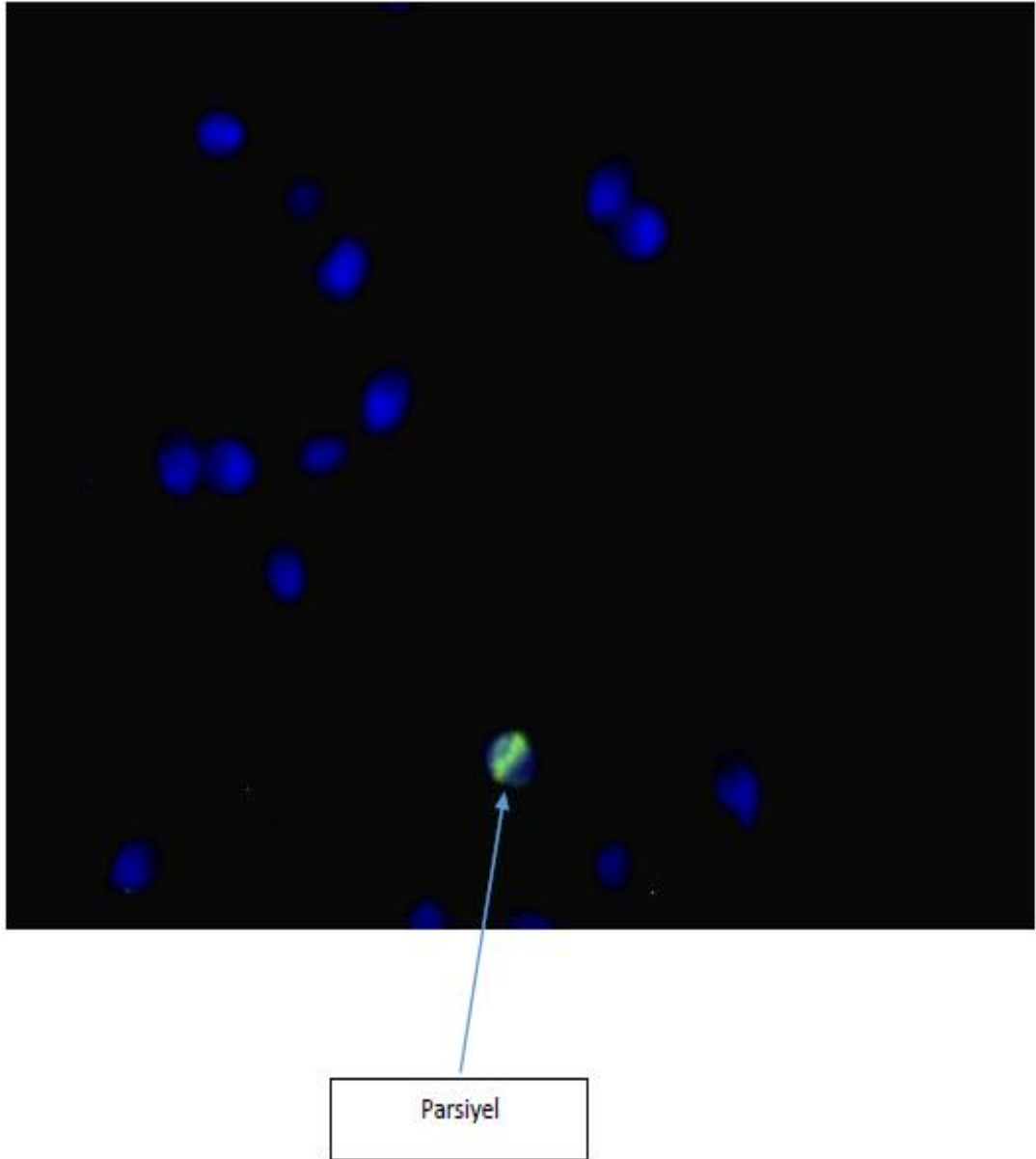
3.4 DNA Fragmantasyon Değerlendirilmesi:

DNA fragmantasyonun sonuçlandırılmasında, kişilerden alınan sperm örneklerinde dondurma öncesi ve sonrasında, 100 hücrede TUNEL pozitiflik oranları belirlenerek istatistiksel analiz yapılmıştır.

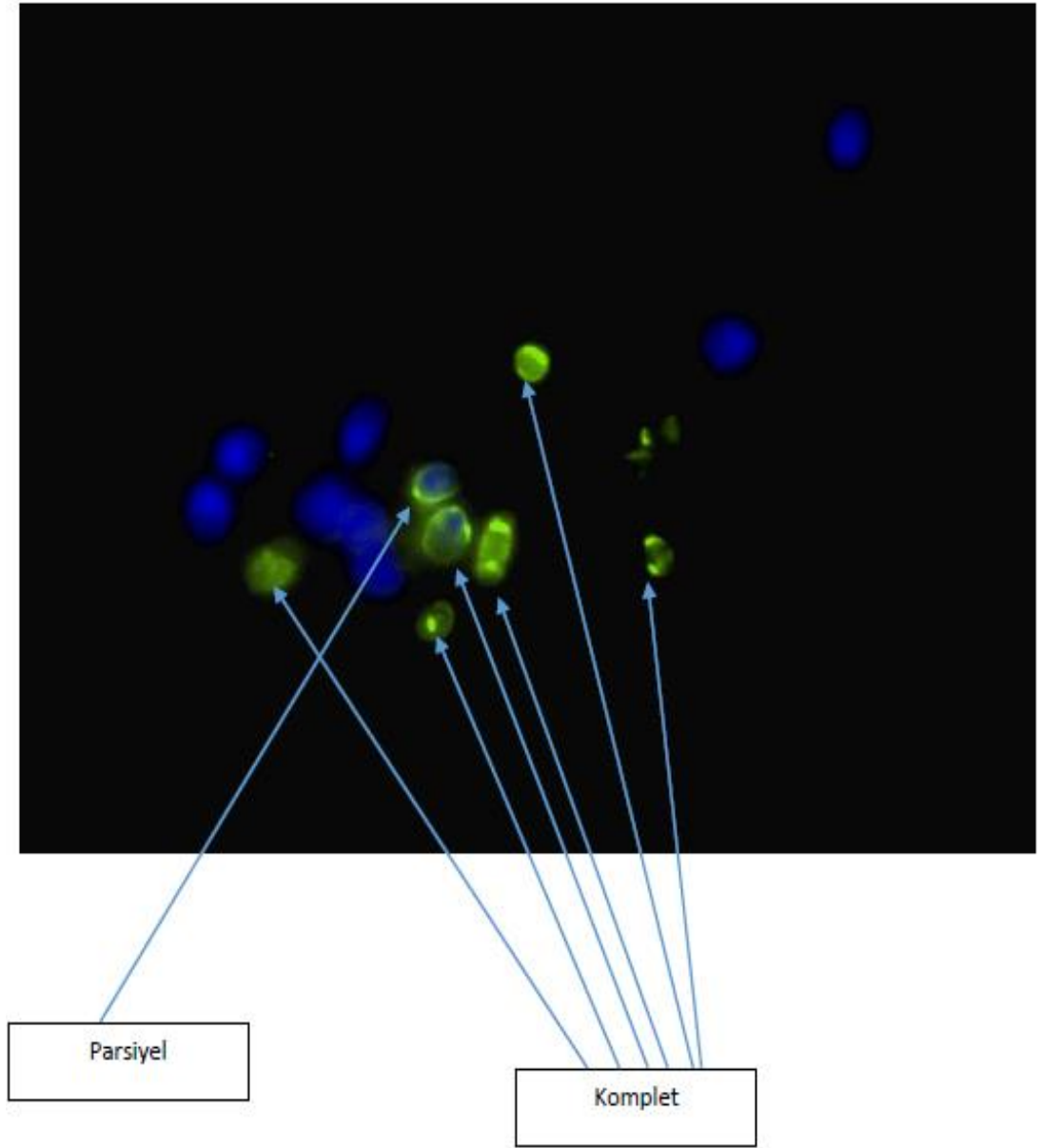
TUNEL pozitiflik, aşağıda belirtilen şekilde hasarlı hücree sayısının toplam hücree sayısına oranının %20 üzerinde olması durumunda gerçekleşir (63-65).

Normal sperm DNA hasarı(TUNEL negatif): <% 20

Anormal DNA hasarı(TUNEL pozitif): >% 20



şekil 9: DNA hasar oranı <%20 olan semen örneğinde normal sperm (ok)



Şekil 10: DNA hasar oranı $>20\%$ olduğundan dolayı TUNEL pozitif, anormal DNA hasarlı sperm örnekleri

3.5 İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler SigmaStat 3.0 (Systat Software Inc., Erkrath, Germany) programı ile yapılmıştır.

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerini incelemek için Kolmogorov-Smirnov testi uygulanmıştır. Yapılan testler sonucunda verilerin normal dağılım göstermedikleri tespit edilmiştir. Aynı kişilerden alınan sperm örnekleri kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası değerlendirildiği için non- parametrik test olan **Wilcoxon Signed Rank Testi** uygulanmıştır. Veriler medyan değerleri ve ayrıca en düşük ve en yüksek değerler olarak gösterilmiştir. Aynı zamanda medyan değerlerin yer aldığı yüzdeler de gösterilmiştir.

4 BULGULAR

Çalışmamız yaş grubu 21 ila 39 arasından seçilmiş toplam 100 kişide yapılmıştır. Kişilerin medyan yaşı 29 olarak hesaplandı. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre sağlıklı erkeklerden alınan numuneler (normospermik) çalışmaya dahil edilmiştir.

Işık mikroskobu incelemelerinde dondurma işlemi sonrasındaki morfolojik incelemede, dondurma öncesi gözlenen morfolojik hasarlı spermilerin haricinde baş ve boyun hasarı olan, kuyruğu sarmal yapmış spermeler gözlenmiştir.

Aşağıdaki listede örneklerimizde DNA fragmantasyon hücre sayıları verilmiştir.

Kriyoprezervasyon Öncesi			
Hasta Numarası	Hasta Yaşı	Fragmente olan hücre sayısı	Fragmente olmayan hücre sayısı
1	28	15	85
2	29	17	83
3	28	19	81
4	28	30	70
5	26	6	94
6	24	3	97
7	25	10	90
8	30	19	81
9	30	28	72
10	30	21	79
11	30	7	93
12	29	9	91
13	35	10	90
14	33	26	74
15	36	15	85
16	27	8	92
17	26	17	83
18	26	15	85
19	29	26	74
20	33	29	71
21	31	14	86
22	32	15	85
23	22	19	81
24	28	18	82
25	27	17	83
26	27	39	61
27	28	15	85
28	29	16	84
29	35	26	74
30	26	15	85
31	29	17	83
32	27	19	81
33	32	20	80
34	37	25	75
35	33	27	73
36	31	18	82
37	32	20	80

Çözme Sonrası	
Fragmente olan hücre sayısı	Fragmente olmayan hücre sayısı
36	64
41	59
46	54
72	28
14	86
7	93
24	76
46	54
67	33
50	50
17	83
22	78
24	76
62	38
36	64
19	81
41	59
36	64
62	38
70	30
34	66
36	64
46	54
43	57
41	59
94	6
36	64
38	62
62	38
36	64
41	59
46	54
54	46
68	33
73	27
49	51
54	46

Kriyoprezervasyon Öncesi			
Hasta Numarası	Hasta Yaşı	Fragmente olan hücre sayısı	Fragmente olmayan hücre sayısı
38	39	16	84
39	38	18	82
40	28	19	81
41	25	11	89
42	27	15	85
43	29	16	84
44	30	15	85
45	33	18	82
46	35	19	81
47	32	43	57
48	34	8	92
49	34	16	84
50	21	17	83
51	25	18	82
52	26	35	65
53	28	12	88
54	28	16	84
55	26	17	83
56	24	11	89
57	25	19	81
58	30	25	75
59	25	11	89
60	30	13	87
61	30	16	84
62	29	24	76
63	35	14	86
64	33	16	84
65	36	18	82
66	28	17	83
67	26	14	86
68	26	12	88
69	29	13	87
70	33	15	85
71	31	14	86
72	32	23	77
73	26	24	76
74	28	26	74

Çözme Sonrası	
Fragmente olan hücre sayısı	Fragmente olmayan hücre sayısı
43	57
49	51
51	49
23	77
32	69
34	66
32	69
38	62
40	60
90	10
17	83
34	66
36	64
38	62
74	27
25	75
34	66
36	64
23	77
40	60
53	48
23	77
27	73
34	66
50	50
29	71
34	66
38	62
36	64
29	71
25	75
27	73
32	69
29	71
48	52
50	50
55	45

Kriyoprezervasyon Öncesi			
Hasta Numarası	Hasta Yaşı	Fragmente olan hücre sayısı	Fragmente olmayan hücre sayısı
75	27	28	72
76	27	10	90
77	29	12	88
78	29	15	85
79	31	17	83
80	26	18	82
81	29	20	80
82	27	21	79
83	26	25	75
84	37	13	87
85	33	19	81
86	35	17	83
87	32	9	91
88	39	16	84
89	38	18	82
90	24	20	80
91	25	21	79
92	27	15	85
93	28	17	83
94	30	9	91
95	33	14	86
96	31	4	96
97	32	9	91
98	34	7	93
99	32	12	88
100	21	16	84

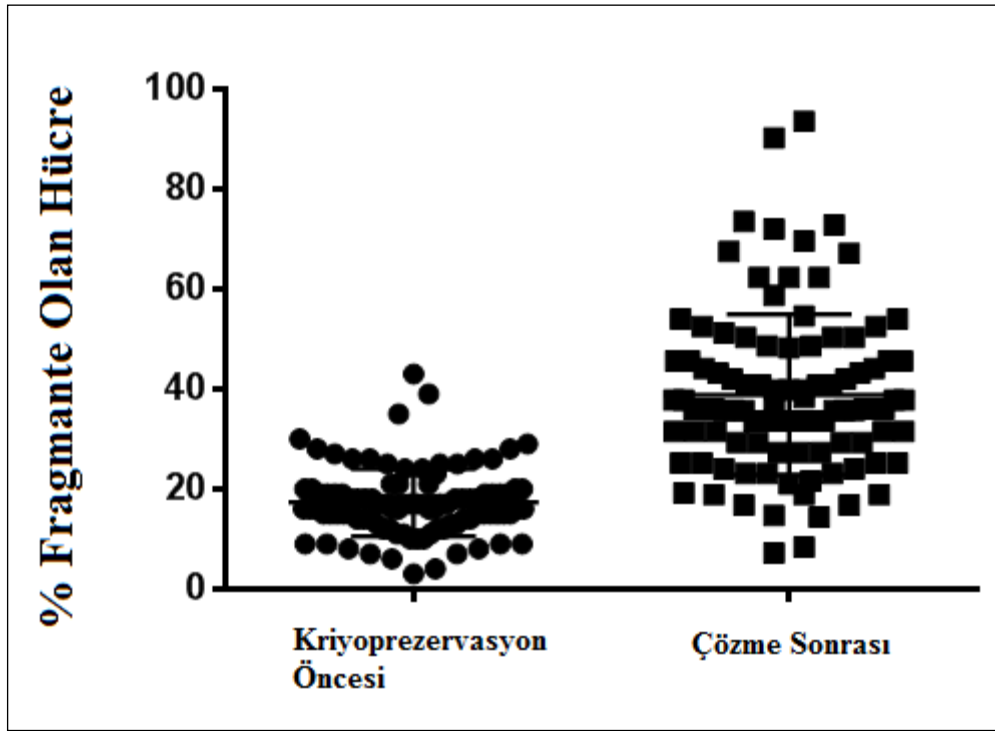
Çözme Sonrası	
Fragmente olan hücre sayısı	Fragmente olmayan hücre sayısı
59	41
21	79
25	75
32	69
36	64
38	62
42	58
44	56
53	48
27	73
40	60
36	64
19	81
34	66
38	62
42	58
44	56
32	69
36	64
19	81
29	71
8	92
19	81
15	85
25	75
34	66

Tablo 3: Kriyoprezervasyon Öncesi ve Çözme Sonrası DNA Fragmantasyonu

Gruplar	n	Medyan	Medyan %25 - 75
Yaş	100	29 (21-39)	
Kriyoprezervasyon Öncesi DNA Fragmantasyon Oranı	100	17,0 (3-43)	14,0 - 19,5
Çözme Sonrası DNA Fragmantasyon Oranı	100	36,0 (7-94)*	29,0 - 47,0

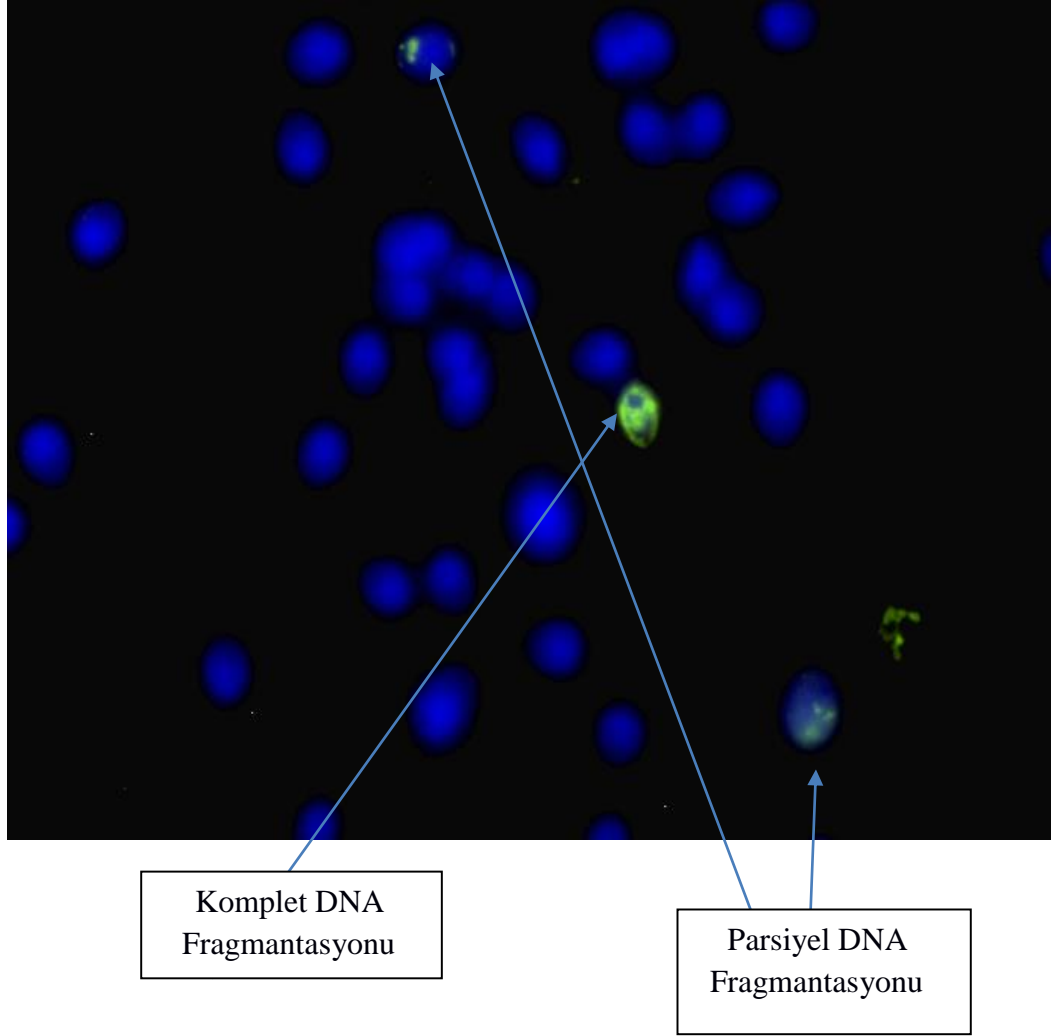
* p<0.001

DNA fragmantasyonu bulgularımızın istatistiksel analizi sonucunda kriyoprezervasyon öncesi TUNEL pozitif sperm oranı %17 bulunurken, çözme sonrası çıkan oran %36'dır. Kriyoprezervasyon öncesi ile çözme işlemi sonrasında DNA fragmantasyonu karşılaştırıldığında çözme sonrasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu bulunmuştur (p<0.001).

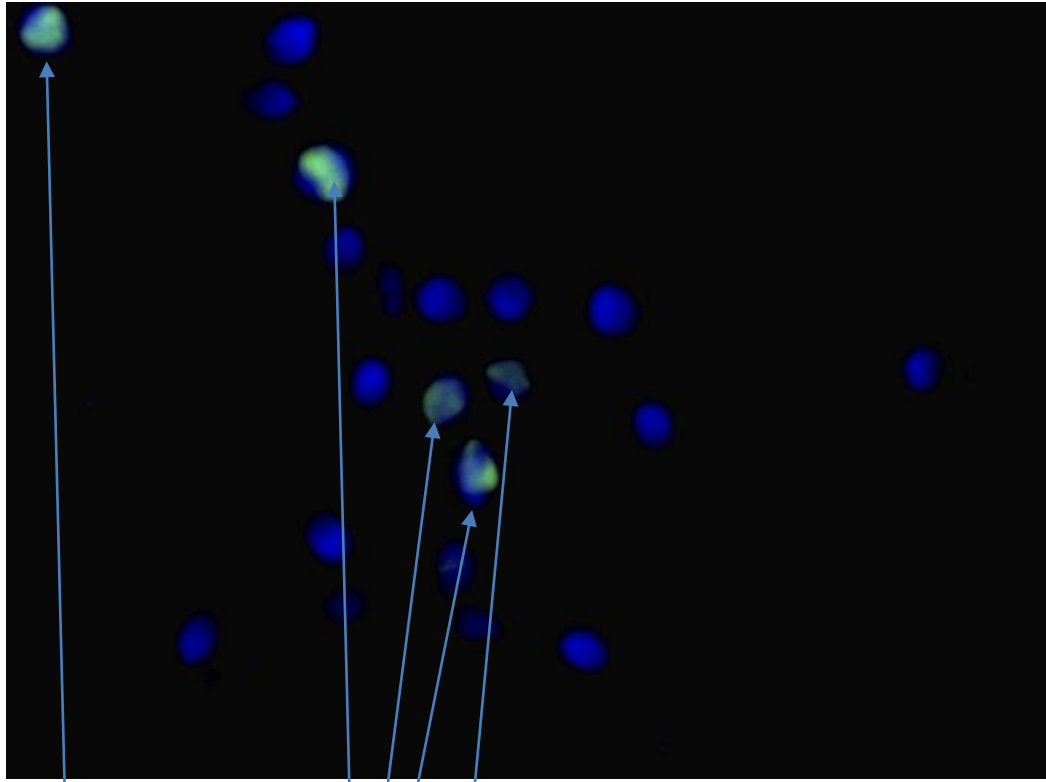


Şekil 11: Kriyoprezervasyon öncesi ve çözme sonrası arasındaki DNA fragmantasyon artış oranları

DNA fragmantasyon işleminde TUNEL pozitif hücreler yeşil boyalı olarak görülmüştür. TUNEL negatif olanlar DAPI II ile mavi boyalı olarak görülmüştür (Şekil: 11). Dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermelerde, dondurma işlemi öncesine oranla TUNEL pozitif sperm oranında bir artış olduğu görülmüştür (Şekil: 12).



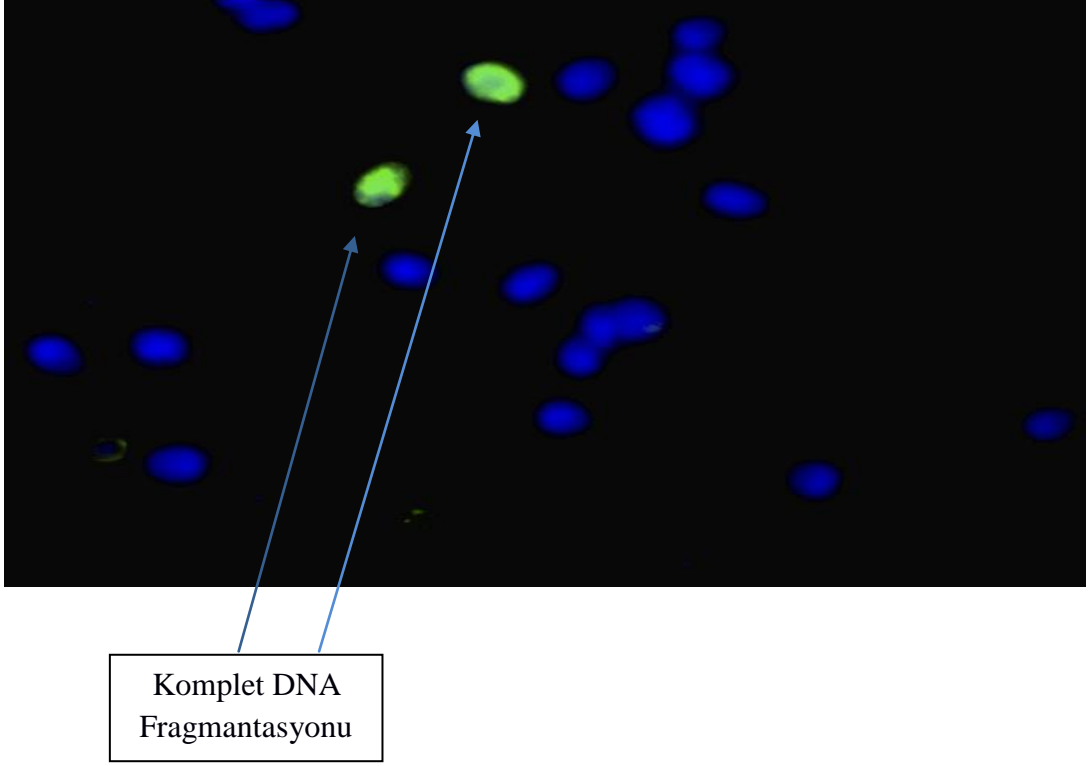
Şekil 12: Dondurma öncesi, taze spermde, TUNEL negatif spermeler mavi renkte (DAPI II), TUNEL pozitif hücrelerde yeşil renkte (FITC) gözükmektedir. Sperm örneğinde 1 adet komplet DNA fragmantasyonu ve 2 adet parsiyel DNA fragmantasyonu gözükmektedir.



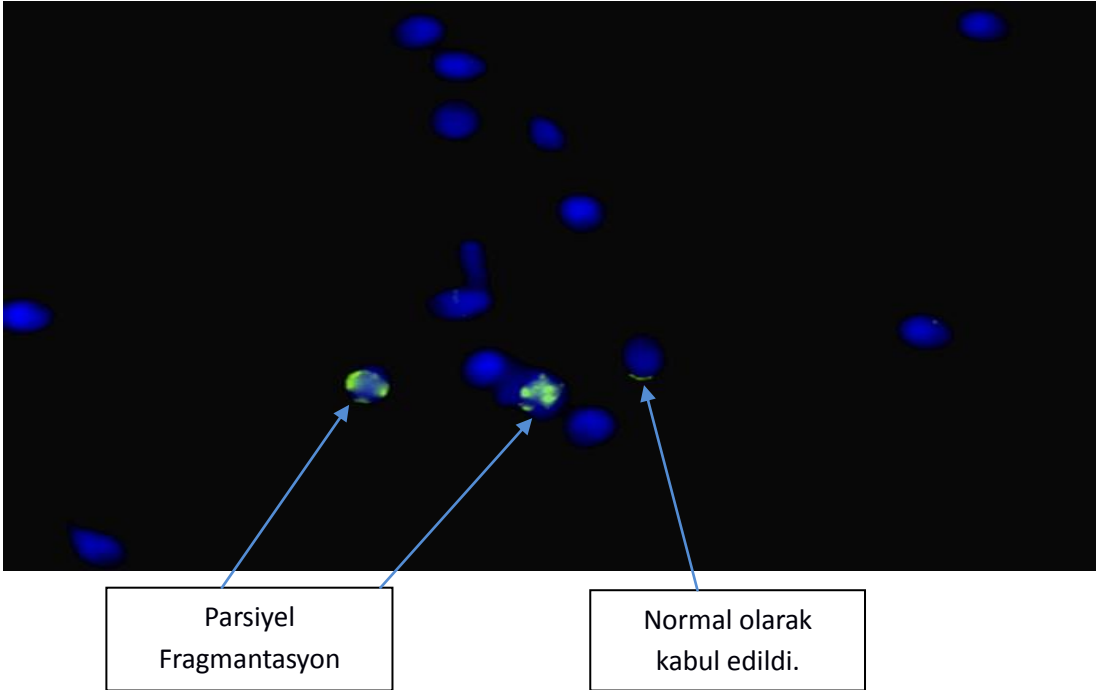
Komplet DNA
Fragmentasyon

Parsiyel DNA
Fragmentasyonu

Şekil 13: Dondurma işleminden 1 ay sonra çözölen spermelerde, TUNEL negatif spermeler mavi renkte (DAPI II), TUNEL pozitif hücreler ise yeşil renkte (FITC) gözökmektedir. Sperm örneğinde 1 adet komplet DNA fragmentasyonu ve 4 adet parsiyel DNA fragmentasyonu gözökmektedir.



Şekil 14: Çözme sonrası 7 numaralı kişinin sperm TUNEL görünümü



Şekil 15: Çözme sonrası 14 numaralı kişinin sperm TUNEL görünümü.

5 TARTIŞMA

Çalışmamızda normospermik kişilerde sperm örnekleri alınarak kriyoprezervasyon öncesi ve sonrasında DNA fragmentasyonları incelenerek karşılaştırılmıştır. Çözme işlemi sonrası DNA fragmentasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$).

Erkek infertilitesinin tedavisinde sperm kriyoprezervasyon işlemi; cerrahi yöntemlerle alınan testiküler spermin korunması için, radyoterapi, testis cerrahisi ya da kemoterapi öncesinde ve üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinde önemli bir işlemdir (17, 66-67).

Tüm canlı hücreler çok dar bir sıcaklık aralığında fonksiyon görebilmekte ve dondurma – çözme işlemlerinin zararlı etkilerine karşı duyarlı kalmaktadırlar. Tipik olarak normal olduğu tahmin edilen bağışlanmış spermlerin yaklaşık % 50'si tek bir dondurma – çözme işleminde kaybedilebilmektedir. Dondurma – çözme işlemlerindeki öldürücü etki, kısmen dondurma işlemleri sırasında gerçekten su kaybı ve iyonik yoğunluktan kaynaklanmaktadır (69). Sperm için hayati önem taşıyan hücre zarının hasara uğraması ve bütünlüğünün kaybı ile meydana gelen hücresel geçirgenliğin bozulması sonucu hücre içindeki çözelti kompozisyonunun dengesi bozulmaktadır (70). Dondurma – çözme aşamasında gerçekleşecek hasarlar arasında lipid peroksidasyonuna bağlı hücre zarı fosfolipid yapısının bozulması da olabilir (71).

Dondurma işlemi sırasında gerçekleşebilecek hasarlarda iki faktör hipotezi ileri süren başka bir çalışmada, yavaş hızda soğutma sırasında hücre dışı buz oluşumu hakim olmaktadır. Osmoz ile susuz kalan hücreler ve hücre içi çözeltinin zehirliliğine bağlı olarak hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Hızlı soğutma oranlarında hücreler için öldürücü olan şey hücre içi buz oluşumunun ön plana çıkmamasıdır (72).

Isıtma işlemi sırasındaki ısıtma hızı da hücre yaşamında önemli derecede etkilidir. Yavaş ısıtma hızlarında buz kristalleri birbirleriyle bir araya gelerek daha büyük kristalleri oluşturma eğilimindedirler (73).

Kriyoprezervasyon sırasında spermiler kimyasal ve fiziksel strese maruz kalabilirler. Buna bağlı olarak plazmada membranın lipid yapısında değişiklikler oluşabilir (68,74). Bu etkileşim sırasında sperm başlarında küçülme meydana gelir (75). Üremeye yardımcı tedavi yöntemlerinde kriyoprezervasyon işlemi sırasında kullanılabilir fonksiyonel sperm oranının düştüğü ve sperm metabolik işlevinin azaldığı gösterilmiştir (76). Hipo-Osmotik Şişme Test (HOS) tekniği kullanılarak yapılan kriyoprezervasyon sonrasında spermde akrozom bozuklukları, sarmal kuyruk ve hasarlı membranlar gibi morfolojik bozukluklar meydana geldiği bildirilmiştir (77, 78). Yine başka bir çalışmada akrinin turuncu boyama (AO test) test tekniğiyle yapılan deneyde kriyoprezervasyonda canlı sperm sayısındaki azalmaya DNA'nın aşırı yoğunlaşması ve apoptozisin neden olduğu gösterilmiştir (79). Kriyoprezervasyon sonrasında sperm motilitesi, canlılığı ve normal morfolojisi oranlarında düşüş olup, bunların yanında DNA fragmentasyonunda artış olduğu COMET ve TUNEL çalışmalarında gösterilmiştir (80-82). Buna karşın, sperm DNA'sının kriyoprezervasyondan etkilenmediğini ileri süren çalışmalar da mevcuttur (83).

Bu çalışmamızda ise kriyoprezervasyon işlemi öncesi ve sonrasında sperm DNA fragmentasyonunu TUNEL yöntemiyle çalıştık. Kriyoprezervasyon öncesi TUNEL pozitif sperm medyan değeri (DNA fragmentasyon varlığı) %17 iken kriyoprezervasyon sonrasında ise bu oran %36 olarak saptandı. Kriyoprezervasyon işlemi sonrasında DNA fragmentasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu gözledik ($p < 0.001$).

Kriyoprezervasyon öncesindeki sperm örneklerimizde fragmentasyon oranı düşük iken, kriyoprezervasyon sonrasında ise örneklerimizde fragmentasyon oranı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptandı. DNA fragmentasyonun çözme işlemi sonrasında yüksek olması, fiziksel ve kimyasal strese bağlı olarak hücre membran geçirgenliği ve yapısının bozulmasından kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

TUNEL tekniği kullanılarak yapılan başka bir çalışmada da DNA hasarının oluştuğu bildirilmiştir. Bu hasarın dondurma-çözme sırasında gerçekleşen

mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması ve kaspaz (3, 8) aktivasyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (83).

Sperm DNA kromatin yapısının sağlam olması, spermin fertilizasyon işlemine paternal katkısı, erken embriyonik ölümü engelleme ve hamileliğin devamı bakımından son derece önemlidir (84-85). İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işleminde DNA hasarlı sperm kullanılması, genom kalitesi nasıl olursa olsun, decondensasyonun başlamamasına ya da tamamlanmamasına ve bundan dolayı da fertilizasyon ve embriyo gelişimi başarısızlıklarına sebep olabilmektedir (84). Daha önceki çalışmalarda IVF ve ICSI sonrasında artmış DNA fragmentasyonu ile düşük fertilizasyon ve embriyo bölünme oranı arasında anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir (86-87). Araştırmalarda kriyoprezervasyon ve DNA fragmentasyonu arasında kesin bir ilişki gösterilmiş olmasa da, genel olarak normal örnekler ile karşılaştırıldığında sperm kalitesi düşük olan örneklerin kriyoprezervasyon kaynaklı DNA hasarı ve hücre ölümüne yatkınlığının arttığı gözlenmiştir. Bizde bu çalışmamız da dondurma - çözme işlemine bağlı olarak DNA fragmentasyonunda artış olduğunu saptadık. Dondurma - çözme işleminin insan sperminde DNA hasarına yol açtığı halen tartışılmakla beraber dondurarak saklama tekniği yardımıyla üreme teknikleri arasında önemini korumaktadır (86).

6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda yapmış olduğumuz dondurma-çözme işlemi sonrasında DNA fragmentasyon oranlarında kriyoprezervasyon öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır.

Üremeye yardımcı tedavi tekniklerinde kriyoprezervasyon işleminin daha verimli olarak kullanılabilmesi için, DNA fragmentasyon oluşum mekanizmalarını ortaya çıkaracak daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda sperm örneklerimiz bir ay süreyle dondurulmuştur. Kriyoprezervasyon işleminin sperm üzerinde süreye bağlı herhangi bir değişim olup olmadığının anlaşılması için farklı dondurma-çözme süreleri kullanılarak araştırmaların yapılması konunun aydınlatılması açısından önem taşımaktadır.

Ayrıca dondurma-çözme işlemi sırasında meydana gelen fiziksel ve kimyasal stresi minimuma düşürmek amacıyla kullanılacak olan kriyoprotektanların yanı sıra bu stresi azaltabilecek yeni kimyasal maddelerin kullanımıyla ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır.

7 KAYNAKLAR

1. Koşar, P., Özçelik, N. (2007). Erkek infertilitesinde genetik değerlendirme. SDÜ Tıp Fak. Dergisi, 14(3)/48-51
2. Boynukalın, F., Güven, S ve Günalp, S. (2014). Sperm DNA hasarı ve üremeye yardımcı teknikleri, Turk Soc Obstet Gynecol, 11:52-8.
3. Agarwal, A., Said, TM. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod, 9(4):331-45.
4. Zini, A., Bielecki R., Phang D., Zenzes MT. (2003). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation in fertile and infertile men. Fertil Steril, 75(4):674-7.
5. Bakırcıoğlu, ME., Alıcı, B. (2014). Testis kanserli hastalarda sperm dondurma ve infertilite. Üroonkoloji bülteni, 13:176-181.
6. O'Connel, M., McClure, N., Lewis, SEM. (2004). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. Hum Reprod, 19(12):2822-2830.
7. Richter, MA., Haning, RV., Shapiro, SS. (1984) Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control. Fertil Steril, 41(2):277-280.
8. Agarwal, A., Allamaneni, SS. (2005) Sperm DNA damage assesment: atest whose time has come. Fertil Steril, 84:850-3.
9. Whan, LB1., West, MC., McClure, N., Lewis, SE. (2006). Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol, the primary psychoactive cannabinoid in marijuana, on human sperm function in vitro. Fertil Steril, 85(3):653-60.
10. Gilbert, SF. (2000). Developmental Biology. 6th edition Sunderland (MA).
11. Leibo, SP. (2004). The early history of gamete cryobiology. In: Fuller BJ, Lane N, Benson EE, eds. Boca Raton: CRC Press, 347-70
12. Smith, AU. (1961). Biological effects on freezing and supercooling. Monographs of the Physiol Soc, No.9:p.101. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
13. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). Hücrenin Moleküler Biyolojisi.(TÜBA yayımları, Çev.) Ankara: Garland Science.
14. Hassa, H. (2003). İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları. Bölüm: Spermatogenez (sayfa:127-138), Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi yayımları No:087, 1. Baskı, OGÜ Basımevi.

15. De Kretser, DM., Loveland, KL., Meihardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Hum Reprod*, 13:1-8.
16. Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, II. (2004). DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod*, 19: 932-939.
17. Delilbaşı, L. (1997). Tüp bebek: Yardımcı üreme tekniklerinde laboratuvar yöntemleri (1. Bs). Ankara: Bayındır Sağlık, Eğitim ve Araştırma Vakfı.
18. Özdener, H. (1993). Semen analizi: Morfolojik yaklaşım. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 13:408- 417.
19. Tağa, S. (2008). Çukurova bölgesindeki infertil erkeklerde y kromozomu (Azf genleri) mikrodelyasyonlarının saptanması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
20. Bil-Tek Makler kamerası. Erişim: 17.06.2015, <http://www.biltek.biz.tr/ProductDetail.aspx?MenuId=12>
21. Demirel, E. (2006). İntrauterin inseminasyon uygulanan hastalarda sperm parametrelerinin gebelik oranlarına etkileri. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Süleymaniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul.
22. World Health organization: Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. (2010) Geneva: WHO Press.
23. Bil-Tek Makler kamerasının kullanım avantajları. Erişim: 17.06.2015 <http://www.biltek.biz.tr/Files/Makler%20Kamera011.pdf>
24. Çiçek, N., Mollamahmutoğlu, L. (2009). A'dan Z'ye Yardımcı üreme teknikleri. Ankara: Palme Yayıncılık.
25. Trevor, G., Cooper, E., Noonan, S. Jacques, A., H.W.Gordon, B., Hermann, M.B., Trine, B.H., Thinus, K., Christina, W., Michael, T.M., ve Kirsten, M.V., (2010) World health organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod*, 16: 231–245.
26. David, KG., Ariel, W., Colin, MH., Zeev, S. (2004). Yardımla üreme teknikleri temel kitabı (T.İrez, O. Arda ve S.Kaleli, Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. (2010).
27. Elder, K., Dale, B. (2010). İn-vitro Fertilizasyon (T. İrez, Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. (2014).
28. Leopardi, P., Villani, P., Cordelli, E. (2005). Assesment of the in vivo genotoxicity of vanadate: Analysis of micronuclei on DNA damage induced in mice by oral exposure. *Toxicol Lett*, 158:39-49.
29. Horak, S., Polanska, J., Widlak, P.B. (2003). DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. *Mutat Res Gen Tox En*, 537: 53-65.
30. Potts, RJ., Newbury, CJ., Smith, G. (1999). Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res-Fund Mol M*, 423: 103-111.

31. Pacifici, R., Altieri, I., Gandini, L. (1993). Nicotine, cotinine and trans-3-hydrocotinine levels in seminal plasma of smokers - effects on semen parameters. *Ther Drug Monit*, 15: 358-363.
32. Vine, MF., Tse, CKJ., Hu, PC. (1996). Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril*, 65: 835- 842.
33. Fraga, CG., Motchnik, PA., Wyrobek, AJ. (1996). Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res-Fund Mol M*, 351: 199-203.
34. Niu, ZH., Liu, JB., Shi, TY., Yuan, Y., Shi, HJ. (2010). Impact of cigarette smoking on human sperm DNA integrity. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 16(4):300-4.
35. Shen, HM., Chia, SE., Ni, ZY. (1997). Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. *Reprod Toxicol*, 11: 675-680.
36. Zenzes, MT., Bielecki, R., Reed, TE. (1999). Detection of benzo (a) pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed to cigarette smoke. *Fertil Steril*, 72: 330-335.
37. Gaspari, L., Chang, SS., Santella, RM. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human sperm as a marker of DNA damage and infertility. *Mutat Res-Gen Tox Env*, 535: 155-160.
38. Vine, MF. (1996). Smoking and male reproduction. *Int J Androl*, 19: 323-337.
39. Ginsberg, GL., Atherholt, B. (1989). Transport of DNAadducting metabolites in mouse serum following benzo(a)pyrene administration. *Carcinogenesis*, 10: 673-679.
40. Horak, S., Polanska, J., Widlak, P. (2003). Bulky DNA adducts in human sperm: relationship with fertility, semen quality, smoking, and environmental factors. *Mutat Res Gen Tox En*, 537: 53-65.
41. Fujisawa, M., Yoshida, S., Matsumoto, O. (1988). Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertil Steril*, 50: 795-800.
42. Armstrong, JS., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W. (1999). Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Rad Biol Med*, 26: 869-880.
43. Aitken, RJ., Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122: 497-506.
44. Hasarı, G., Türk, E.H., Aksu, T.B. (2006). Spermatozoon DNA'sı. *F.Üni. Sağlık Bil. Dergisi*, 20(1), 85-95.
45. Irvine, DS., Twigg, JP., Gordon, EL. (2000). Integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl*, 21: 33-44.

46. Narendra, PS., Charles, HM., Richard, EB. (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, 80: 1420- 1430.
47. Aitken, RJ., Gordon, E., Harkiss, D. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*, 59: 1037-1046.
48. Muralidhara, KD. (2005). Genotoxic consequences associated with oxidative damage in testis of mice subjected to iron intoxication. *Toxicology*, 206: 169-178.
49. Ateşşahin, A., Karahan, İ., Türk, G. (2006). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress. *Reprod Toxicol*, 21(1):42-7.
50. Evangelini, E., Konstantinos, C., Byron, A. (2014). Human sperm dna fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil*, 15(1): 2–14.
51. Susuula, Y., Junaid, K., Celine, J., Hani, B., Su, L.O., Laura, M., Kevin, C. (2012). Clinician-induced (iatrogenic) damage incurred during human infertility treatment: Detrimental effects of sperm selection methods and cryopreservation upon the viability, DNA integrity, and function of human sperm. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 1(1):69-75.
52. Eilish, T., Donnelly, NM., Sheena, EML. (2001). Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*, 76:5.
53. Potts, RJ., Notarianni, L.J., Jefferies, T.M. (2000). Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutat Res-Fund Mol M*, 447: 249-256.
54. Alkan, I., Simsek, F., Haklar, G. (1997). Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol*, 157: 140-143.
55. Oehninger, S., Blackmore, P., Mahony, M. (1995). Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*, 12: 41-47.
56. Thundathil, J., Lamirande, E., Gagnon, C. (2003). Nitric oxide regulates the phosphorylation of the threonineglutamine- tyrosine motif in proteins of human spermatozoa during capacitation. *Biol Reprod*, 68: 1291-1298.
57. Aitken, RJ. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev*, 7: 659-668.
58. Morris, GJ. (1981). *Cryopreservation: an introduction to cryopreservation in culture collections*. England: Institute of Terrestrial Ecology.
59. Holt, WV. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62: 3-22.

60. Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, II. (2004). DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod*, 19: 932-939.
61. Çelik, Ö. (2011). Yardımcı üreme teknikleri, temel klinik ve embriyolojik uygulamaları. Adana: Nobel Tıp Kitabevi.
62. Taşçı, Aİ. ve Samast, M. (1997). İnfertilitede laboratuvar ve uygulamalar. İstanbul: Hayat sağlık ve sosyal hizmetler vakfı yayınları. s.59-65
63. Rakesh, S. ve Ashok, A. (2014). Laboratory evaluation of sperm chromatin: TUNEL Assay. Springer..
64. Rakesh, K., Sharma, ES., Reda, M., Sajal, G., Aparna, T., Ashok, A. (2010) TUNEL as a test for sperm dna damage in the evaluation of male infertility. *Urology*, 76: 1380 –1386.
65. Cinthia, MF., Sandro, CE. (2014). Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Fertil Steril*, 101:1, 58-63.
66. Vicdan, K. ve Işık, AZ. (1999). In vitro fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar. Ankara: Çağdaş medikal yayın dağıtım, s.82-89.
67. Anzar, M., He, L., Buhr, MM., Kroetsch, TG., Pauls, KP. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod*, 66:354 -360.
68. Schiller, J., Arnhold, J., Glander, HJ., Arnold, K. (2000). Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy-effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids*, 106:145-156.
69. Schuster, TG., Keller, LM., Dunn, RL., Ohl, DA., Smith, GD. (2003). Ultrarapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. *Hum Reprod*, 18:788-95.
70. Sawada, Y., Ackerman, DR., Behrman, SJ. (1967). Motility and respiration of human spermatozoa after cooling to various low temperatures. *Fertil Steril*, 18:775-81.
71. Jeyendran, RS., Vander Ven, HH., Kennedy, W., Perez-Palez, M., Zaneveld, LJ. (1984). Comparison of glycerol and zwitterion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa. *J Androl*, 5:1-7
72. Leibo, SP. (1977). Preservation of mammalian cells and embryos by freezing. In: Simatos, D., Strong, DM., Turk, M., eds. France: Les Colloques de l'Institut National de la Sante et de la Recherchev Medicale,311-34.
73. Leibo, SP., Mazur, P., Jackowski, SC. (1974). The survival rates of different cell types as a function of the rate at which they were warmed from the frozen state. *Exp Cell Res*;89:79.

74. Gravance, GC., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, DL., Casey, PJ. (1998). Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J Androl*, 19:704-709.
75. Hammerstedt, RH., Graham, JK., Nolan, JP. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*, 11:73-78.
76. Check, ML., Check, JH., Long, R. (1991). Detrimental effects of cryopreservation on structural and functional integrity of the sperm membrane. *Arch Androl*, 27:155-160.
77. Cross, LN., Hanks, SE. (1991). Effect of cryopreservation on human acrosomes. *Human Reprod*, 6:1279-1283.
78. Paasch, U., Sharma, RK., Gupta, AK., Grunewald, S., Mascha, EJ., Thomas, AJ. (2004). Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Bio Reprod*, 71:1828-1837.
79. Petyim, S., Choavaratana, R. (2006). Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. *J Med Assoc Thai*, 89(3):306-313.
80. Ngamwuttiwong, T., Kunathikom, S. (2007). Evaluation of cryoinjury of sperm chromatin according to liquid nitrogen vapour method (II). *J Med Assoc Thai*, 90(2):224-228.
81. Zribi, N., Chakroun, NF., Euch, HE., Gargouri, J., Bahloul, A., Keskes, LA. (2010). Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*, 93(1):159-166.
82. Evenson, DP., Baer, PK., Jost, KL. (1989). Long-term effects of triethylenemelamine exposure on mouse testis cells and sperm chromatin structure assayed by flow cytometry. *Environ Mol Mutagen*, 14:79-89.
83. Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on dna integrity and implications for ART. *Adv Urol*, 854837.
84. Aitken, RJ., De Luliis, GN., McLachlan, RI. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl*, 32:46-56.
85. Sun, JG., Jurisicova, A., Casper, PE. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Bio of Reprod*, 56:602-607.
86. Lopes, S., Sun, JG., Jurisicova, A., Meriano, J., Casper, RF. (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 69(3):528-532.
87. Said, TM., Gaglani, A., Agarwal, A. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(4):456-462.

