

T. C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NORMOSPERMİK ERKEKLERDE SPERM KRİYOPREZERVASYONU
ÖNCESİ VE SONRASINDA SPERMATOZOADA DNA
FRAGMENTASYONUNUN HALOSPERM TEKNİĞİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Bio. Şenay CANKUT

KLİNİK EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL

2015

T. C.
MALTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NORMOSPERMİK ERKEKLERDE SPERM KRİYOPREZERVASYONU
ÖNCESİ VE SONRASINDA SPERMATOZOADA DNA
FRAGMENTASYONUNUN HALOSPERM TEKNİĞİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ

Bio. Şenay CANKUT

KLİNİK EMBRİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet CINCIK

İSTANBUL

2015

TEZ ONAYI

Kurum : Maltepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans

Anabilim Dalı : Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Sahibi : Şenay CANKUT

Tez Başlığı : "Normospermik Erkeklerde Sperm Kriyoprezervasyonu Öncesi ve Sonrasında Spermatozoada DND Fragmantasyonun Halosperm Tekniği İle Değerlendirilmesi"

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

Sınav Tarihi : 10.07.2015

Saat : 12:00

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

Danışman (Unvanı,Adı,Soyadı)

Kurumu

İmza

Prof. Dr. Mehmet CINCIK

Maltepe Üniversitesi Hastanesi
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

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

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../2015 tarih ve 14/1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. A.Zafer ÖZTEK

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜRLER

Sıfır maliyetle dünyanın en karlı yatırımıdır teşekkür etmek. Basit bir minnet ifadesi olarak öncelikle, yüksek lisansa girmem için binbir zahmete girip, beş yıldır hayatımda hep var olan ve mesleğimle ilgili daimi desteğini hiçbir şekilde esirgemeyen bir tanecik hocam sayın Prof. Dr. Mehmet CINCIK'a teşekkür ediyorum.

Emek verip zaman ayıran ve destekleyen sevgili hocalarım Prof. Dr. Güler ÖZTÜRK, Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ, Yrd. Doç. Dr. Namık Kemal KURT'a, Dr. Mustafa SARIKAYA'ya ve Dr. Erdal YÜCEL'e, çalışmam boyunca desteğiyle, neşesiyle beni sürekli motive eden, gerektiğinde evini açan canım arkadaşım ve meslektaşım Emb. Canan ASLAN'a, tez aşamasını birlikte atlattığım tez arkadaşım Mol. Bio. Turgay DİNÇ'e, yine çok anlamadığım bilişim konularında desteğini esirgemeyen arkadaşım Mehmet ÖZKAYA'ya, hayatımın her aşamasına tanıklık etmiş ve beni bu konuda sonuna kadar destekleyen biricik aile üyelerim olan babam Hüsnü CANKUT, annem Hanım CANKUT, kardeşlerim Okay-Elif ve Gözde CANKUT'a ve dahilindeki tüm arkadaşlarıma, sevdiklerime sonsuz TEŞEKKÜRLER.

ÖZET

Bio. Şenay CANKUT, Normospermik Erkeklerde Sperm Kriyoprezervasyonu Öncesi ve Sonrası Spermatazoada DNA Fragmantasyonunun Halosperm Tekniği ile Değerlendirilmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı, İstanbul, 2015.

İnsan sperm DNA fragmantasyonu, erkek infertilitesi ile ilgili temel göstergelerden biri olarak öne sürülmüştür ve IVF/ ICSI (in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection) sonuçlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Sperm nükleer DNA hasarları ile infertilite ve gebelik oluşumu arasında korelasyon olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT) ile yapılan işlemlerde gerekli durumlarda sperm kriyoprezervasyonuna (dondurma) başvurulmaktadır. Kriyoprezervasyon hem üremeye yardımcı tedavilerdeki başarıyı arttırmış, hem de testis cerrahisi, kemoterapi ve radyoterapiden önce, gelecekteki fertilitenin korunmasına katkıda bulunmuştur. Gamet ve embriyo kriyoprezervasyonunun genel prensibi; materyalin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içinde -196°C 'de depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak gamet ve embriyoların canlılıklarını koruyabilecekleri fizyolojik ortamlara geçirilmesidir. Tezin önemi YÜT'de sıklıkla kullanılan sperm kriyoprezervasyon işlemlerinden sonra, DNA fragmantasyonu açısından sperme hasar verip vermediğini saptayabilmektir. Bu şekilde gelecek çalışmalarda sperme daha az zarar veren teknikler geliştirilebilir ve böylelikle YÜT sonuçları pozitif yönde geliştirilebilir.

Normospermik sperm parametresine sahip toplam yüz (n=100) kişi (21-39 yaş aralığı) kişi teste dahil edildi. Sperm DNA hasarı Halosperm Tekniği ile değerlendirildi. Taze örnek likefiye olduktan sonra çalışılıp kalan kısım dondurularak saklandı ve bir ay sonra çözülüp tekrar Halosperm Tekniği kullanılarak değerlendirilip sonuçlar karşılaştırıldı.

Anahtar kelimeler: Halosperm, Kriyoprezervasyon, İnsan, Sperm, DNA Hasarı.

ABSTRACT

Bio.Senay CANKUT, The evaluation of spermatozoon DNA fragmentation in pre and post sperm cryopreservation about normospermic males with Halo sperm technique, Institute of Health Science Clinical Embryology Master's Degree Program, Istanbul, 2015.

Human sperm DNA fragmentation has been proposed as one of the basic elements of male infertility. That affects IVF / ICSI (in vitro fertilization / Intracytoplasmic sperm injection) adversely. There are numerous studies that sperm nuclear DNA damages are showing an association between infertility and pregnancy with formation.

In the processes with assisted reproductive techniques (ART) sperm cryopreservation (sperm freezing) may applied in the cases where it is essentials. Cryopreservation both increased success in assisted reproductive cure and testis surgery, it made contribution to protect following fertility before chemotherapy and radiotherapy. Common principles of gamete and embryo cryopreservation are; freezing the material after stabilized with cryoprotectant, storing in liquid nitrogen at - 196 °C and while thawing changing physical media where gamete and embryo can protect their aliveness after removing cryoprotectants. The significance is determining of sperm cryopreservation frequently used in ART after these processes how much damage gives related to DNA fragmentation. In case of such studies less harmful techniques may be improved so that ART results can be improved positively.

One hundred (n=100) persons who are with normospermic sperm parameters (between 20-40 ages) were tested. Sperm DNA damage were evaluated with Halosperm Technique. Fresh sample were investigated in liquid form, the remaining was kept frozen and after one month it was thawed, re-evaluated with Halo sperm technique and the results were comprised.

Key words : Halosperm, Cryopreservation, Human, Sperm, DNA Fragmentation.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜRLER.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v-vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix-x
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	
1.1 Araştırmanın Önemi.....	1-2
1.2 Araştırmanın Amacı.....	2-3
2. GENEL BİLGİLER	
2.1 Sperm.....	4-5
2.2 Sperm Gelişimi ve Yapısal Özellikleri.....	5-7
2.2.1 Sertoli Hücreleri.....	7-8
2.2.2 Spermatogenetik Hücreler.....	8
2.2.2.1 Spermatogonial Evre.....	9
2.2.2.2 Mayoz Bölünme Evresi.....	9
2.2.2.3 Spermiyogenezis.....	9-11
2.3. Erkek İnfertilitesinde Taniya Yönelik Testler.....	11

2.3.1 WHO Kriterleri.....	12-13
2.3.2 Spermiyogram Nedir?.....	13
2.4 Sperm Kriyoprezervasyonu.....	13-14
2.4.1 Sperm Kriyoprezervasyon Endikasyonları.....	14-15
2.4.2 Kriyoprezervasyonda Hukuksal Durum.....	16
2.4.3 Erkekde İnfertilitenin Korunması.....	16-18
2.4.4 İnsan Spermatozoasının Kriyobiyoloji prens. ve Uygula.....	17
2.4.4.1 Tarihçe.....	18
2.4.4.2 Prensip ve Uygulamalar.....	19-20
2.4.5 İnsan Sperminin Kriyoprezervasyonu İçin Uygun Kriyoprotektan Maddenin Seçimi.....	20-21
2.4.6 Sperm Kriyoprezervasyonu Etkileyen Bireysel Farklılıklar	21-22
2.4.7 Kriyoprezervasyon Hasarları.....	22-23
2.5 Sperm DNA Hasarları.....	23-25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1 Semen Analizi.....	26
3.1.1 Örnek Toplanması.....	26-27
3.1.2 Örnek Hazırlanması.....	27-28
3.2 Halosperm Tekniği.....	28
3.2.1 Method Prensipleri.....	28
3.2.2 Kit İçeriği.....	29

3.2.3 Kit İçeriğinde Bulunmayan Gerekli Materyal ve Ekipmanlar.....	29
3.2.4 Kullanım Talimatları.....	29-30
3.2.5 Mikroskop Görünümü.....	30
3.2.6 Sperm Sınıflandırılması.....	30-31
3.2.7 Değerlendirme Sınırları.....	31
3.3 Kriyobiyolojide Kullanılan Ekipman ve Malzemeler.....	31-32
3.4 Kriyoprezervasyon Protokolü.....	32-33
3.5 Dondurulmuş Spermin Çözülmesi.....	33
3.6 İstatistiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR.....	35-42
5. TARTIŞMA.....	43-46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR.....	48-61

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltma	Açıklama	İngilizce Açıklama
YÜT	Yardımcı Üreme Teknikleri	Assisted Reproductif Technics
ICSI	İn Vitro Sperm Enjeksiyon	Intracytoplasmic Sperm Injection
IVF	İn Vitro Fertilizasyon	In Vitro Fertilizatation
DNA	Deoksiribonükleik Asit	Deocsiribonucleic acid
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (DSO)	Worl Health Organization
Straw	Dondurma Çubuğu	Freezing Straw
ROS	Reaktif Oksijen Türleri	Reactive Oxyjen Species
TESE	Tetiküler Sperm Ekstraksiyonu	Testicular Sperm Extraksion
MAR	Karma Antiglobülin Reaksiyonu	Mixed Antiglobulin Reaction
MESA	Mikro Epididimal Sperm Aspirasyonu	Micro-Epididymal Sperm Aspiration
TESA	Testiküler Sperm Aspirasyonu	Testicular Sperm Aspiration
LH	Lüteinleştirici Hormon	Luteinizing Hormone
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon	Follicle Stimulating Hormone
ASRM	American Üreme Tıbbı Derneği	American Society for Reproductive Medicine
ÜYTE	Üremeye Yardımcı Teknikler	
DMSO	Dimetilsülfoksit	Dimetilsulfoxido
PROH	Propanediol	Propanediol
AD	Asit Denatürasyon	Acid Denaturation
MIF	Mülleri İnhibe Edici Faktör	Mullerian Inhibiting Factor
HAS	İnsan Albümin Solüsyonu	Human Albumin Solution

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Sperm Mikroskopik Anatomisi (Reproductive Technologies, Inc. Sperm Bank Of California, 2014, Cynthia) (Sayfa 4).

Şekil 2: Normal spermin boyama sonrası mikroskopik görüntüsü (100x) (Sayfa 5).

Şekil 3: Erkek Ürogenital Sistemi (Sayfa 6).

Şekil 4: Seminifer tübüllerin ışık mikroskobu görüntüsü. a: Spermatogonium b: Primer Spermatozoid c: Spermatid sh: Sertoli Hücresi m: Myoid Hücre k: Kapıları (Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, Cilt 24, Sayı 2, 2010) (Sayfa 7).

Şekil 5: Seminifer tübülün enine kesiti. Leydig hücreleri, Kan-Testis bariyeri, Sertoli Hücreleri (John Wey & Sone, Inc, 2005) (Sayfa 8).

Şekil 6: Erkek fertilitésinin korunması için güncel yaklaşım (Gürhan, T. (2012). İnfertilite ve Yardımla Üreme Teknikleri, Güneş Tıp Kitapevleri. İstanbul) (Sayfa 17).

Şekil 7: a-Makler sayım aracı ve b-Mikroskop görüntüsü (Sayfa 28).

Şekil 8: Halosperm Tekniği ile boyanan spermlerin görüntüsü (Sayfa 31).

Şekil 9: Sperm Kriyoprezervasyon Protokolü (Origio, Sperm Freezing Medium) (Sayfa 33).

Şekil 10: Kriyoprezervasyon öncesi Halosperm Tekniği ile çalışılan 14 numaralı örneğin boyama preparatı: a; büyük halo, b; orta halo, c; küçük halo, d; halosuz, e; degrade (Sayfa 39).

Şekil 11: Kriyoprezervasyon sonrası Halosperm Tekniği ile çalışılan 14 numaralı örneğin boyama preparatı: a; büyük halo, b; orta halo, c; halosuz, d; degrade (Sayfa 40).

Şekil 12: Kriyoprezervasyon öncesi Halosperm Tekniği ile çalışılan 38 numaralı örneğin boyama preparatı: a; büyük halo, b; orta halo, c; halosuz, d; halosuz (Sayfa 41).

Şekil 13: Kriyoprezevasyon sonrası Halosperm Tekniği ile çalışılan 38 numaralı örneğin boyama preparatı: a; büyük halo, b; orta halo, c; küçük halo, d; halosuz (Sayfa 42).



TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ

Tablolar

Tablo 1: WHO 2010 semen kriterleri (Sayfa 13).

Tablo 2: Kriyoprotektan ve Kriyoprotektif Medyumların kompozisyonu (Sayfa 20-21).

Tablo 3: Halosperm Tekniği ile çalışılan yüz (100) hastanın kriyo öncesi ve kriyo sonrası oranları (Sayfa 35-37).

Grafikler

Grafik 1: Yüz (100) rneğin değerlendirilmesi sonucunda kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon sonrası artış grafiği. Artış oranı %15 (Sayfa 38).

Grafik 2: 14 numaralı örneğin 1- kriyoprezervasyon öncesi ve 2- kriyoprezervasyon sonrası değerlendirmesi (Sayfa 40).

Grafik 3: 38 numaralı örneğin 1- kriyoprezervasyon öncesi ve 2- kriyoprezervasyon sonrası değerlendirmesi (Sayfa 42).

1. GİRİŞ

1.1 Araştırmanın Önemi

Erkek infertilitesi, genellikle %30 gibi azımsanmayacak bir sıklıktadır. Bunların %15'inde normal semen analiz sonuçlarına rağmen infertilite görülmektedir (1, 2). Dolayısıyla fertil ve infertil erkeği birbirinden ayıracak, gebelik sonuçlarını öngörecek yeni belirteçlere ihtiyaç artmıştır ve dikkatler sperm DNA bütünlüğü üzerine yoğunlaşmıştır. Günümüzde yapılan yoğun çalışmalarla önem kazanan sperm deoksiribonükleik asit (DNA) hasarları, gerek fertilizasyonu, gerekse embriyonal yaşamdan ölüme kadar olan süreci olumsuz yönde etkilemektedir (3).

Sperm DNA fragmentasyonu, erkek infertilitesi ile ilgili temel göstergelerden biri olarak öne sürülmüştür ve IVF/ ICSI (in vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection) sonuçlarını olumsuz yönde etkilemektedir (4, 5). Ejakülasyondan önceki kusurlu apoptozis, anormal DNA paketlenmesi ya da fazla miktarda üretilen reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species, ROS) DNA fragmentasyonunu neden olmaktadır (6). Fakat mekanizma henüz net bir açıklığa kavuşturulamamıştır ve ileri çalışmalar gerekmektedir.

Erkek infertilitesi kompleks bir durum olup, çeşitli patolojileri içermektedir. Sperm kromotin anomalilerinin sperm fonksiyonları üzerine etkisinin incelenmesi, infertilite çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır. Sperm nüklear DNA hasarları ile infertilite ve gebelik oluşumu arasında ilişki olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (7-11). Zini ve arkadaşları; denatüre ve fragmente DNA taşıyan spermatozoa oranlarının sperm parametrelerindeki bozulma ile anlamlı bir ilişki gösterdiğini, infertil erkeklerde (sırasıyla %25 ve %27) fertillere göre (sırasıyla %10 ve %13) daha yüksek bulunduğunu bildirmektedir (12). Elde edilen sonuçlar, fertilite potansiyelinin belirlenmesinde sperm DNA'sının sağlamlığının değerlendirilmesinin standart sperm analizi sonuçlarından daha anlamlı olduğunu düşündürmektedir. İdiopatik infertilite olguları ile karşılaştırıldığında normospermik fertil erkeklerin spermalarında DNA hasarı bulunma oranları anlamlı ölçüde azalmaktadır (13).

Spermilerin in vivo şartlarda genital traktusta (kanalda) ilerleyişi sırasında, fallop tüplerine tutunanların, tutunmayanlara göre daha sağlam DNA'ya sahip

oldukları bilinmektedir. Bu da in vivo fertilizasyon sırasında doğal olarak DNA'sı sağlam spermin seçildiğini göstermektedir. Oysa spermler IVF/ICSI gibi in vitro şartlarda seçildiğinde, seçim düzgün morfolojiye sahip olanlar arasında rastgele yapıldığı için ve özellikle semen parametreleri bozuk olan erkeklerde hasarlı genetik materyal taşıyan hücre sıklığı da artmış olacağından, bunlarda DNA hasarlı hücre kullanma riski de ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, ejakülatta DNA hasarlı spermatozoa oranının bilinmesi, gerek fertilizasyon şansının tahmin edilmesinde gerekse embriyonun maruz kalabileceği risklerin belirlenmesinde önemlidir (14).

YÜT ile yapılan işlemlerde zorunlu durumlarda sperm kriyoprezervasyonuna (dondurarak saklama) başvurulmaktadır. Kriyoprezervasyon hem üremeye yardımcı tedavilerdeki başarıyı arttırmış, hem de testis cerrahisi, kemoterapi ve radyoterapiden önce, gelecekteki fertilitenin korunmasına katkıda bulunmuştur. Gamet ve embriyo kriyoprezervasyonunun genel prensibi; materyalin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içinde -196°C 'de depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak gamet ve embriyoların canlılıklarını koruyabilecekleri fizyolojik ortamlara geçirilmesidir. Tezin önemi YÜT'de sıklıkla kullanılan sperm kriyoprezervasyon işlemlerinden sonra DNA fragmantasyonu açısından sperme hasar verip vermediğini saptayabilmektir. Bu şekilde gelecek çalışmalarda sperme daha az zarar veren teknikler geliştirilebilir ve böylelikle YÜT sonuçları pozitif yönde geliştirilebilir.

1.2 Araştırmanın Amacı

İnfertilite olgularında sperm DNA hasarlarının önemli bir faktör olabileceği bilinmektedir. Dolayısıyla ejakülatta DNA hasarlı spermatozoa oranının bilinmesi gerek fertilizasyon şansının tahmin edilmesinde gerekse embriyonun maruz kalabileceği risklerin belirlenmesinde önem kazanmaktadır. Günümüzde erkek faktörü infertilite olgularında sıklıkla önerilen Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYTE) kullanılarak seçici birçok bariyer atlanılarak fertilizasyon başarıyor olmakla birlikte, DNA hasarlarının embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkilerinin gözlenmiş olması, böyle hastaların tedavisinde daha başka önlemlerin alınması ve tedavi alternatiflerinin geliştirilmesinin gerekli olduğunu düşündürmektedir (4).

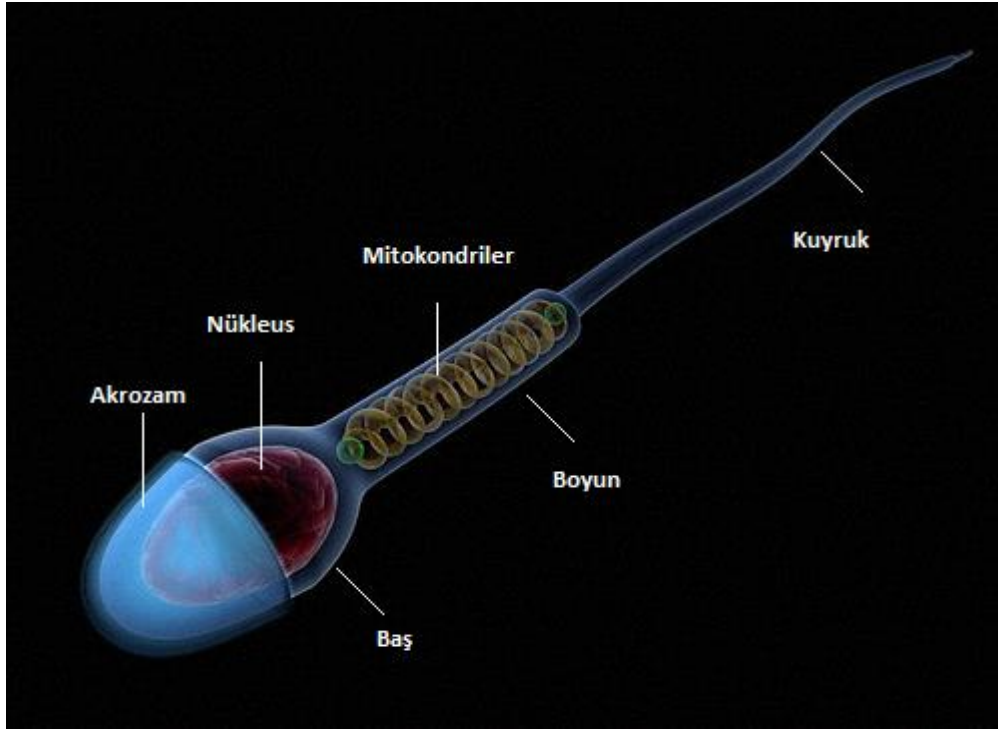
Sperm DNA bütünlüğünü farklı yönlerden değerlendiren birçok test olmakla beraber optimal teknik veya uygun klinik eşik değer seviyesi konusunda henüz bir fikir birliği yoktur. İnfertilitede sıkça karşımıza çıkan bir sorun ise sperm DNA hasarı üzerindedir ve YÜT başarısıyla ters orantılıdır (4, 5). Hasarlı sperm DNA'sının doğacak çocukta oluşturabileceği potansiyel olumsuz etkiler konusunda yeterli bilgiye henüz sahip değiliz.

YÜT'de sıklıkla başvuru alan işlemlerden biri de sperm kriyoprezervasyonudur (dondurarak saklama). Sperm kriyoprezervasyonu, gonadotoksik işlemlerden önce sistematik olarak uygulanmalıdır. Azoospermik (ejekülatında hiç sperm bulunmayan) kişilerde Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) ve ona benzer cerrahi tekniklerle testislerden sperm elde edilip dondurulmakta ya da çeşitli nedenlerden dolayı (testis kanseri gibi), kemoterapi-radyoterapi uygulanacak hastalarda tedavi sonrası sperm bulunamama olasılığına karşı sperm kriyoprezervasyon işlemi yapılmaktadır (15). Hipotezimiz ise kriyoprezervasyon sırasında ve sonrasında sperm DNA hasarının kriyoprezervasyon öncesine oranla artıp artmadığını gözlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

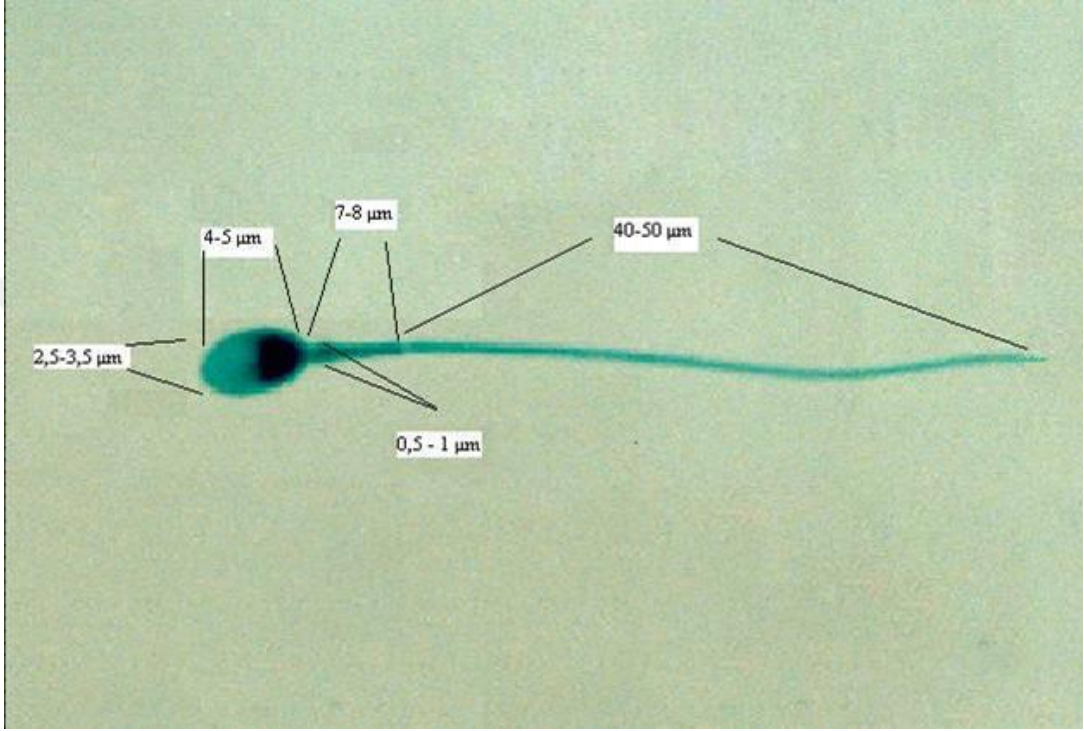
2.1 Sperm

Sperm (spermatozoon, çoğulu; spermatozoa), erkeğe ait üreme hücresidir. Testislerde oluşan bu hücrelerin üretimi ergenlik döneminde başlar. Sperm hücrelerinin üretimi ve olgunlaşması yaklaşık 72 gün kadar sürer. Baş kısmında dölleme sırasında yumurtaya aktaracağı kalıtsal bilgi (DNA) taşır. Kuyruğu vardır ve hareketlidir. Bir coitus sırasında ortalama 150-200 milyon sperm salınır. Ancak yumurtayı yalnızca tek bir sperm dölleyebilir. Bir sperm bir yumurta hücresine ulaştığında, yumurtaya girmek için akrozomundaki enzimler yardımıyla yumurta zarından geçerek kalıtsal bilgileri yumurtaya ulaştırmış olur. Akrozom, spermilerin baş kısmında çekirdeğin üstünde şapka şeklinde yer alan kısmıdır. İçerisinde golgi aygıtı ve lizozom gibi organelleri bolca ihtiva eder. Ayrıca, içerdiği enzimler sayesinde dişi yumurta hücresi olan oositin çevresini saran granüloza hücreleri ve zarın eritilmesini sağlar. Spermiler yoğun kıvamda bir sıvının içinde bulunurlar. Bu sıvının ismi meni ya da ersuyudur (16). Spermin mikroskopik anatomisi şekil 1'deki gibidir.



Şekil 1: Sperm Mikroskopik Anatomisi (Reproductive Technologies, Inc. Sperm Bank Of California, 2014, Cynthia).

Aşağıda şekil 2’de normal spermin 100x büyütmeli objektifteki morfolojik görüntüsü izlenmektedir.



Şekil 2: Normal spermin boyama sonrası mikroskopik görüntüsü (100x).

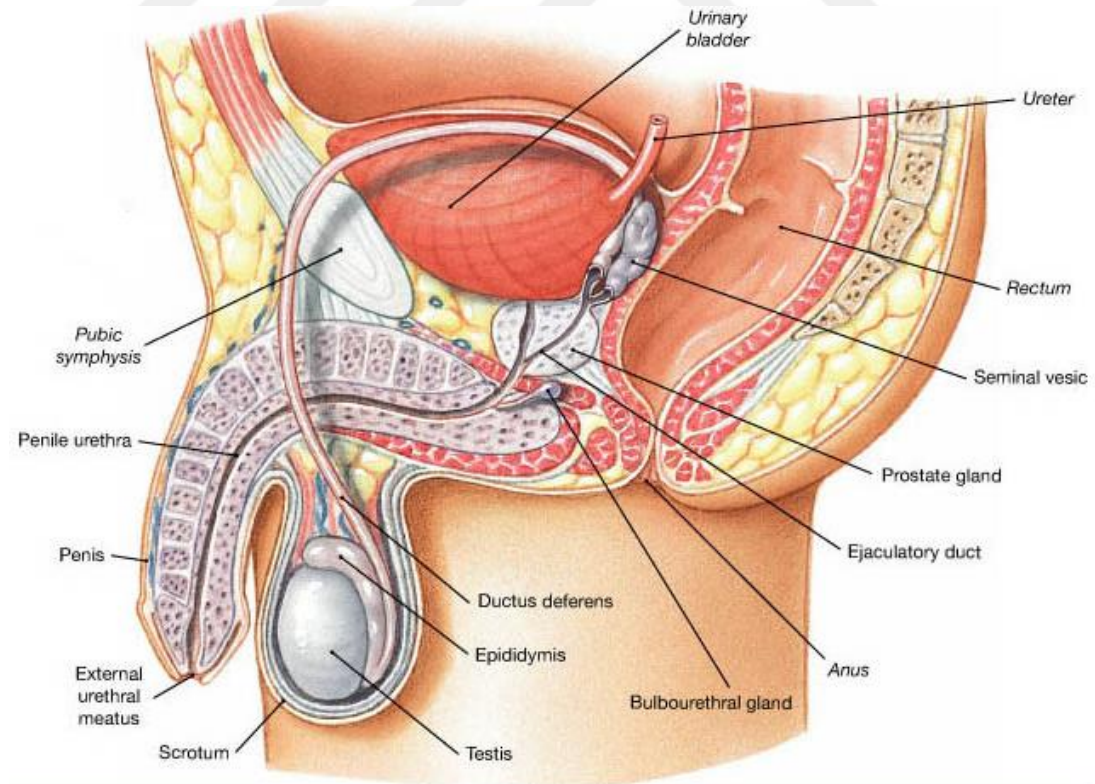
2.2 Sperm Gelişimi ve Yapısal Özellikleri

Erkek genital sistemi bir çift gonad (testisler), genital boşalma yolları (tubuli rekti, rete testis, duktali efferentes, epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoris) ve aksesuar bezlerle (prostat, vezikula seminalis ve glandula bulboüretalis) penisten oluşur (16).

Testisler, gametlerin (sperm hücresi, spermatozoa, spermiyum) meydana getirilmesi (gametogenezis, spermatogenezis) ve steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılanması (steroidogenezis) ile yükümlüdür. Endokrin işlevi Leydig hücreleri (interstisiyel hücreler) tarafından yürütülür. Leydig hücreleri testis dokusu içinde, loblar arasındaki bağ dokusu bölmelerinde bulunur ve ürettikleri steroid

yapıdaki hormonu (testesteron) doğrudan kana verirler. Testesteron ise hipofiz ön lobundan salgılanan LH'nın (Lüteinleştirici hormon) stimülasyon veya inhibisyonundan sorumludur. (16,17)

Testisler dıştan tunika vaginalis ile sarılıdır. Spermiler, testis dokusu içindeki tübüler yapılarda (tubuli seminiferi kontorti) gelişimlerini sürdürürler ve seminifer tübüllerin bulunduğu bölmeleri (lobuli testis) fibroz bağ dokusundan oluşan Tunika albuginea çevreler (şekil 3-4). Tunika albugineadan ayrılan ince, fibröz bağ dokusu bölmeler (septa) mediastinuma doğru uzanarak testisi, sayıları 200-300 arasında değişen piramidial lobüllere ayırır. Her bir lobül içinde bir ya da dört tane çok kıvrımlı seminifer tübül bulunur (şekil 5). Bu tübüllerin çapı 150-250 mikrometre, uzunlukları da 30-80 cm kadardır. Seminifer tübüller belirgin bir bazal membranla çevrilidir ve bunun dışında gevşek bağ dokusu yapısındaki lamina propria bulunur. Bazal membranın hemen dışında, insanda, tübüllerin çevresinde 3-4 sıra myoid hücre dizisi bulunur. Bu hücrelerin ritmik kasılmasıyla seminifer tübüllerdeki sperm, boşalma kanallarına doğru ilerlerler (16-22).



Şekil 3: Erkek Ürogenital Sistemi.

Seminifer túbüller (şekil 4) kompleks, çok katlı bir epitel örtüsüyle çevrili olup iki grup hücre içerir: Sertoli hücreleri ve spermatogenetik hücreler.



Şekil 4: Seminifer túbüllerin histolojik görünümü. a: Spermatogonyum b: Primer Spermatozoid c: Spermatozoid sh: Sertoli Hücresi m: Myoid hücre k: Kapiller (Fırat Üniv. Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, Cilt 24, Sayı 2, 2010).

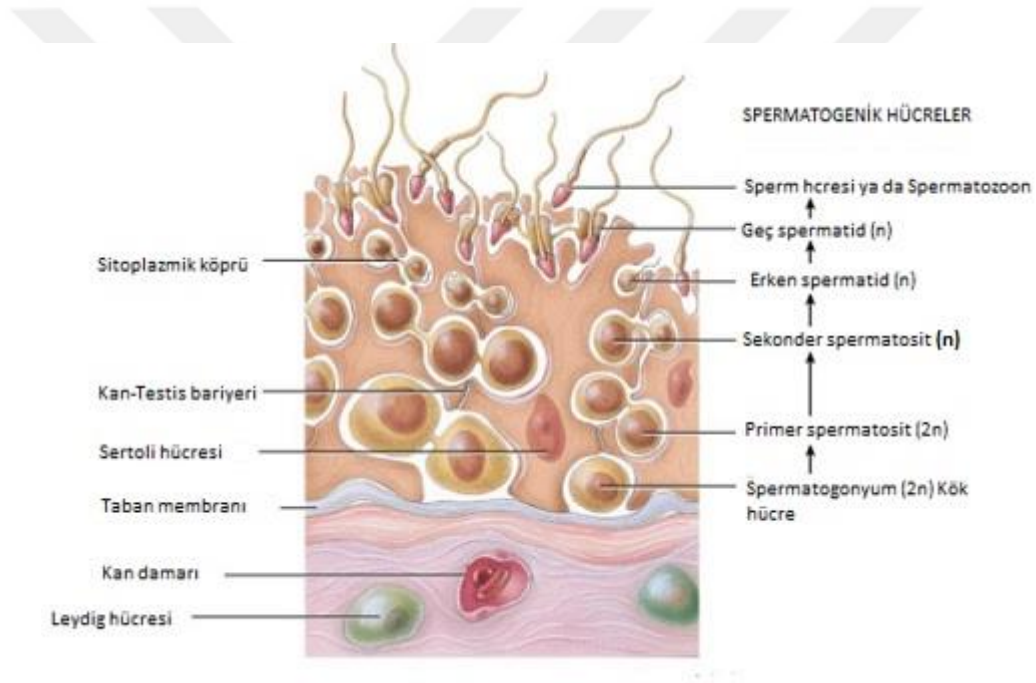
2.2.1 Sertoli Hücreleri

Seminifer túbül membranından lümene kadar uzanan prizmatik hücrelerdir, birbirleriyle oluşturdukları bağlantı birimleriyle kan-testis bariyerini oluştururlar ve aralarındaki kompartımanlarda farklı olgunlaşma sürecindeki spermatogenetik hücreler bulunur. Spermatogenetik hücrelerden farklı olarak çoğalma özelliği göstermeyen Sertoli hücreleri, yerleşimleri ve birbirleriyle ilişkileri nedeniyle spermatogenetik hücrelere mekanik desteklik sağlar, beslenmelerine yardımcı olur ve onları kan yoluyla gelen kimi zararlı maddelerden korurlar. Spermiyogenez sırasında atılan sitoplazma parçacıklarını fagosite ederler. FSH (Follicle Stimulating Hormone, Folikül Uyarıcı Hormon), direkt sertoli hücrelerini uyarır ve spermatogenez için uygun ortam oluşturur: Gelişmekte olan spermleri sitoplazmik uzantılarıyla destekler, besler ve şekillendirir. FSH ve testosteron bu hücrelerdeki reseptörlere bağlanır, parakrin madde salgısı (besleyici) ayrıca androjen ve östrojen

bağlayan globulin, fetal hayatta MIF (Mülleri inhibe edici faktör) ve inhibin (spermiumların hareketini engeller) salgılar. Kusurlu spermleri fagosite eder. Erkek, kadındaki 1/5'i kadar östrojen üretimi sertoli hücrelerinde yapılır (22-24).

2.2.2 Spermatogenetik Hücreler

Spermatogenezis tam farklılaşmamış diploid ($2n$) spermatogenetik hücrelerden hayli özelleşmiş haploid (n) spermatozoaların geliştiği olaylar dizisidir (şekil 5). Bu hücrelerin geçirdiği evreler; spermatogonial evre (spermatogenezis), mayoz bölünme evresi ve (spermiyogenezis) evresidir.



Şekil 5: Seminifer tübülün enine kesiti. Leydig hücreleri, Kan-Testis bariyeri, Sertoli Hücreleri (John Wey & Sone, Inc, 2005).

2.2.2.1 Spermatogonial Evre

Seminifer epitelde, bazal membran üzerinde bulunan ve diploid olan spermatogoniumlar mitotik aktivite ile birkaç kez çoğalırlar. Bu çoğalma ile spermatogenezis için yeterli sayıda hücre sağlanırken, bir bölümü de kaynak hücre olarak işlev görür (20, 21).

İnsanda spermatogenetik hücrelerin üç tipi ayırt edilmiştir: Koyu tip A, açık tip A, tip B. Koyu tip A spermatogoniumlar kaynak hücrelerdir ve gereğinde açık hücreleri oluştururlar. Her üç tip de bazal membran üzerinde yerleşik, iri, yuvarlak hücrelerdir ve boyanma özellikleriyle histolojik kesitlerde ayırt edilebilirler (23).

2.2.2.2 Mayoz Bölünme Evresi

İlk mayoz bölünmede, her bir primer spermatozoid (her birinde diploid sayıda, 46 kromozom bulunur) iki sekonder spermatozoid (her birinde haploid sayıda, 23 çift kromozom bulunur) oluşturur. İkinci mayoz bölünme ile de 4 adet spermatid (her birinde haploid sayıda, 23 tek kromozom bulunur) meydana gelir.

Spermatogenezisde spermatidlerin oluşmasından sonra bölünmeler devam etmez, böylece her bir spermatid tek bir spermatozoaya dönüşür. Her bir spermatozoidi oluşturan spermatogonium mitoz bölünme ile 4 primer spermatozoid oluşturduğundan ve her bir sekonder spermatozoid de mayoz bölünme ile spermatozoaya dönüşecek 4 spermatid oluşturduğundan, her defasında bir spermatogonia spermatogenezis sürecine girdiğinde insanda teorik olarak 16 spermatozoa oluşur.

2.2.2.3 Spermiyogenezis

Mayoz bölünmelerden sonra oluşan spermatidler halen yapısal olarak farklılaşmamış spermatogoniumlara benzerler. Spermatidlerden oldukça özelleşmiş, hareketli spermatozoaların üretimi hücresel yapıların paketlenmesini gerektirir. Epididimiste olaylanan bu sürece 'spermiyogenezis' adı verilir. Spermiyogeneziste spermelerde sitozolün büyük bir bölümü ve sperm genetik bilgisini oosite aktarmada işlev görmeyen tüm organeller çıkarılır. Spermiyogenezis sonucunda şekillenen spermatozoon dört bölüme ayrılır;

- 1- Baş
- 2- Akrozom
- 3- Orta parça (midpiece)
- 4- Kuyruk

Baş, spermin genetik bilgisini içeren nükleustan oluşur.

Akrozom, enzimle dolu bir vezikldr ve başın ucunda nükleusun n kısmında yer alır. Oosite girmek için enzimatik matkap işlevi gören akrozom, endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi tarafından üretilen veziküllerin agregasyonu ile oluşur.

Orta parçada enerjiyi sağlayan mitokondriler bulunur.

Kuyruk sentriollerin birinden oluşur ve spermatozoanın hareketini sağlar. Kuyruğun hareketi, spermin boyun kısmındaki mitokondrilerden sağlanan enerji ile mikrotübüllerin birbiri üzerine kayması ile gelişir.

Spermiyogenezis, spermatidlerin spermatozoalara olgunlaşma sürecidir. En önemli evresi akrozomun gelişmesidir. Bu sürecin ilk fazında golgi aygıtı akrozom için materyal üretilir. Bu yapı sıkı, oturan bir şapka şeklinde nükleusun başını yanlardan öne doğru kısmen kaplar. Akrozom glikoproteinlerden zengin birçok enzime sahip, modifiye olmuş bir lizozom olarak kabul edilebilir. Bu enzimler, fertilizasyon sırasında oositi çevreleyen zona pellusidayı eritmek için gereklidir (16-19).

Spermiyogenezis tamamlanırken; nükleus, oldukça kondanse olmuş kromatine sahip yoğun, sıkıştırılmış oval bir şekil alır. Akrozom büyümesi bir kutupta devam ederken, sentriyoller de karşı kutba hareket ederek kuyruk oluşumunu başlatır. Başlangıçta yaygın olarak bulunan mitokondriyumlar oluşan kuyruk bölgesine göç ederek, enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere boyun kısmı etrafında u uca spiral şeklinde sıralanırlar (18). Spermiyogenezisin son safhasında, hormon desteğinin gerekliliğini düşündüren oldukça fazla veri vardır (24).

Bireyin cinsiyeti seks kromozomlarının kombinasyonu ile belirlenir. Mayoz bölünme süresince, 23 çift kromozom birbirinden ayrılınca, her bir sperm ya da

yumurta hücresi her bir kromozom çiftinden sadece bir tanesini alır. Bu kromozom çiftlerinde 22 tanesi genel insan karakterlerinin yanı sıra, göz rengi gibi spesifik özellikleri de kodlayan otozomal kromozomlardır. Geri kalan bir çift kromozom ise, genetik olarak iki farklı tipte bulunan X ve Y seks kromozomlarıdır. Erkekler hem X hem Y kromozomuna sahip iken, dişilerde iki adet X seks kromozomu bulunur. Bu nedenle, erkekler ve dişiler arasındaki bütün anatomik ve işlevsel ayrımlardan sorumlu olan genetik farklılık tek bir Y kromozomundan kaynaklanmaktadır. Gametogenez süresince, mayoz bölünmenin bir sonucu olarak, bütün kromozom çiftleri birbirinden ayrılırlar. Böylece yavru hücreler her bir çiftin sadece bir tanesini içerir. XY seks kromozom çifti ayrıldığında, sperm hücrelerinin yarısı X, diğer yarısı ise Y kromozomunu alır. Oogenez esnasında her bir yumurta hücresi X kromozomunu alır. Fertilizasyon sırasında X taşıyan sperm ile X taşıyan yumurta hücresinin kombinasyonu genetik dişi (XX) oluştururken; Y taşıyan sperm ile X taşıyan yumurta hücresinin birleşmesiyle genetik erkek (XY) oluşur.

2.3 Erkek İnfertilitesinde Tanıya Yönelik Testler

Üreme çağındaki çiftlerin bir sene boyunca düzenli cinsel ilişki sonrasında ancak %85’inde gebelik oluşması; çiftlerin %15’inde infertilite sorunu olduğunu göstermektedir. İnfertil çiftlerin %30’unda infertiliteye neden olan erkek faktörü saptanmış ve %20’sinde de erkek ve kadına ait faktörlerin birlikte olduğu bildirilmiştir (25-27).

Erkek infertilitesinin belirlenebilmesi için semen analizinin rutin olarak yapılması ilk olarak 1902 de Edward Martin tarafından önerilmiş ve 1956’da MacLeod, sperm sayısı yanında sperm hareketliliği ve morfolojisinin de önemine dikkat çekmiştir. 1980 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise semen analizi için çıkardığı kılavuzda konu ile ilgili ilk standart tetkik kriterlerini belirtmiştir (28). Bu klavuz 2010 yılında revize edilmiş olup halen yürürlüktedir.

2.3.1 WHO Kriterleri

Yirmi beş yıldan uzun bir süredir, WHO semen örneğinin fertilité potansiyelinin değerlendirilmesi için standartlaştırılmış bir yaklaşım geliştirmek amacıyla çalışmalarını sürdürmektedir. Bu standartlar, bir ejakülatın fiziksel özellikleri gibi ölçülebilir parametreleri, ejakülatın hücresel içeriğinin sperm veya lökosit olarak tahmini sayımı, sperm morfolojisinin ve hareketliliğinin derecelendirilmesi ve sperm ile seminal plazmanın veya uterin serviks tarafından üretilen preovülatuar mukusun içeriği arasındaki olası immün etkileşim ile ilgilidir. Yerel kalite kontrol düzenlemeleri gereğince yapılan androloji laboratuvarı akreditasyon ve belgelendirme uygulamaları, bu standartların dünya çapında benimsenmesine katkıda bulunmuştur (28).

Geleneksel semen analizi, yüksek derecede uzmanlaşmış bir hücre olan sperm hücresi tarafından sergilenen biyolojik özellik çeşitliliğini kendi başına karşılayamamaktadır. Temel semen analizi erkek infertilitesinin ayırıcı tanısı için genellikle yetersiz kalmaktadır. WHO kriterlerinin büyük başarısı, ilk çalışmaların ardından gelen klinik çalışmalar ve araştırmalar sonucunda duyulan çeşitli endişelere yönelik olarak sperm kalitesinin daha detaylı tetkiklerinin yapılması için zemin hazırlamıştır. Herşeyden önce, semen analizi sonuçları çok subjektif olabildiğinden, intra ve interobserver varyasyona açıktır. Günümüzde sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu, apoptozis ve spermin hem in vivo, hem de in vitro üreme yeteneği gibi süreçlerin etkileri hakkında daha iyi bir anlayış geliştirmiş bulunmaktayız. Güncel WHO klavuzunda sperm fonksiyonu ve fizyolojisinin bu açılardan yapılmış değerlendirmelerine yer verilmemiştir. Son olarak, literatürdeki çeşitli çalışmalar sperm kalitesindeki düşüşle birlikte, testis kanserinin görölme sıklığının arttığını göstermektedir. Bu bulgular sperm kromatininin tahribatına bağlanmaktadır. İn vivo üreme sırasında, doğal seleksiyon süreci nedeniyle yalnızca normal genomik yapıdaki sperm hücresi oositi fertilize edebilir. Ancak, bazı YÜT bu doğal seleksiyon sürecini atladıklarından, oositi fertilize etmesi için anormal bir sperm hücresinin seçilmesi söz konusu olabilir (28).

WHO 2010 Sperm Kriterleri

3- 7 günlük cinsel perhiz ile verilen semen örneğinin Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre referans değerleri,

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

Tablo 1: WHO 2010 semen kriterleri. * A: hızlı progresif motil, B: yavaş progresif motil, C: yerinde motil. **Kruger strict kriterlerine göre.

2.3.2 Spermiyogram Nedir?

Semen analizi günümüzde laboratuvar koşullarında yapılabilecek en basit testlerden biri olarak gözüksede; belli kriterlere uygun olarak yapılmayan semen analizleri, klinisyenin yanlış yönlendirilmesine ve sonuçta hastaya yanlış uygulamaların yapılmasına neden olabilmektedir.

Spermiyogram (semen analizi, sperm analizi) sperm sayısını, morfolojisini, hareketini değerlendirmek için yapılan bir testtir. Semen analizi makler sayım aracı ile yapılır. Bu sayım aracı iki kısımdan oluşur ve spermi tek tabaka halinde yaymamızı sağlar. Böylelikle sayım sırasında hatalar en aza indirgenir.

2.4 Sperm Kriyoprezervasyonu

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama); hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısılarla kadar soğutularak, gelecekte kullanılması amacıyla saklanmasını ifade eder (ASRM 2012). Kriyoprezervasyon işlemindeki amaç çok

düşük ısıda canlı bir hücre veya dokunun, minimum hasarla ve fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (29). Üreme hücreleri ve dokularının da başarılı bir şekilde dondurulup saklanabilmesi ve istendiğinde çözülmesi YÜT gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır (30).

Gamet ve embriyo kriyoprezervasyonunun genel prensibi; materyalin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içinde, -196°C'da depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak gamet ve embriyoların canlılıklarını koruyabildikleri ve ileri gelişimlerini sürdürebilecekleri fizyolojik ortamlara geçirilmesidir (31).

2.4.1 Sperm Kriyoprezervasyonunun Endikasyonları

Yardımcı üreme tekniklerindeki gelişmelerle birlikte sperm kriyoprezervasyonunun endikasyonları giderek artmaktadır.

ICSI'nin başarılı bir metod olarak uygulanmaya başlanması dolayısıyla, gerçekten herhangi bir ejakülat veya aspirasyonla alınan semen kalitesi kötü olsa bile dondurma yapmaya değer hale gelmiştir. Spermin kriyoprezervasyonu, YÜT uygulamasından hemen önce taze sperm temin etme zorunluluğunu ortadan kaldırmaktadır. Literatürde donmuş spermin, oositleri döllemesi ve bunu takip eden gelişmelerin oluşması açısından en az taze sperm kadar iyi olduğunu gösteren çok sayıda bulgu vardır (32-35). Günümüzde geçerli olan geleneksel ve geleneksel olmayan sperm kriyoprezervasyonunun gerekli olduğu endikasyonlar aşağıda olduğu gibi özetlenebilir (35-40).

1. Kanser hastaları: kanser tedavisinin testis fonksiyonu üzerinde şiddetli etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin süresi değişebilir veya kalıcı olabilir. Kanser hastası olan erkek için gonadotoksik kanser tedavisine başlamadan önce ona sperm kriyoprezervasyonunu önermek çok önemlidir.
2. Vazektomi: Vazektomi öncesi sperm dondurma, vazektomiden sonra tekrar evliliklerde veya doğal afet sonucu kaza sebebiyle çocuksuz kalma durumlarında üreme açısından bir sigorta oluşturur. Vazektomi öncesi sperm dondurma işlemine alternatif olarak uygun vazektominin cerrahi geri çevrilmesi: pahalıdır, hasta anestezi ve cerrahi riske maruz kalmaktadır ve daima başarılı olmamaktadır.

3. Spinal kord harabiyeti olan hasta: Spinal kord hasarı olan hastalarda, elektroejakülasyonla alınan materyal dondurulabilir ve YÜT uygulamasında başarılı şekilde kullanılabilir.
4. Oligospermik/astenozoospermik örnek: Çok sayıda dondurulmuş örneğin birleştirilerek hareketli spermelerin havuzlanması (pooling) sağlanabilir.
5. MESA, TESE ve TESA: Çok sayıda biopsi ve cerrahi önlem için.

Sperm kriyoprezervasyonu ve depolanmasının uygulandığı diğer daha seyrek görülen durumlar;

6. Damarsal ve vasoepididimal düzeltme uygulamaları.
7. Ejakülator duktusların transüretal rezeksiyonu.
8. Postmortem sperm alma ve depolama.
9. Erkek partnerin ölümünden sonra gebeliğin oluşumuna izin veren ülkelerde tehlikeli mesleklerde (polis, asker gibi) çalışan kişilerin spermelerinin saklanması.
10. Spermatogenezi bozmakla suçlanan ilaçların (Nitrofurantoin, simetidin, sulfasalazin, alkol, nikotin, kafein gibi) zorunlu kullanım gerektiren durumlarda bir seçenek olarak sunulabilir. Kalsiyum kanal blokerlerinin sperm membran fonksiyonlarını bozdukları ve fertilizasyon kapasitesini azalttıkları öne sürülmektedir. Ayrıca sporcuların kullandıkları anabolizanların da spermatogenezi arreste götürebildikleri bildirilmektedir.
11. Hipotalamo-hipofizer hipogonadizm için gonadotropin tedavisi veya kalıcı olmayabilen genital trakt obstrüksiyonu cerrahisi gibi infertilite tedavisi için,
12. YÜT prosedürü sırasında sperm veremeyen hastalar.
13. Donasyon spermeleri: fertil olduğu bilinen sağlıklı erkek vericiden alınan sperm ileride kullanılmak üzere dondurularak saklanabilir. Ancak ülkemizde donasyon yasal değildir (41-44).

2.4.2 Kriyoprezervasyonda Hukuksal Durum

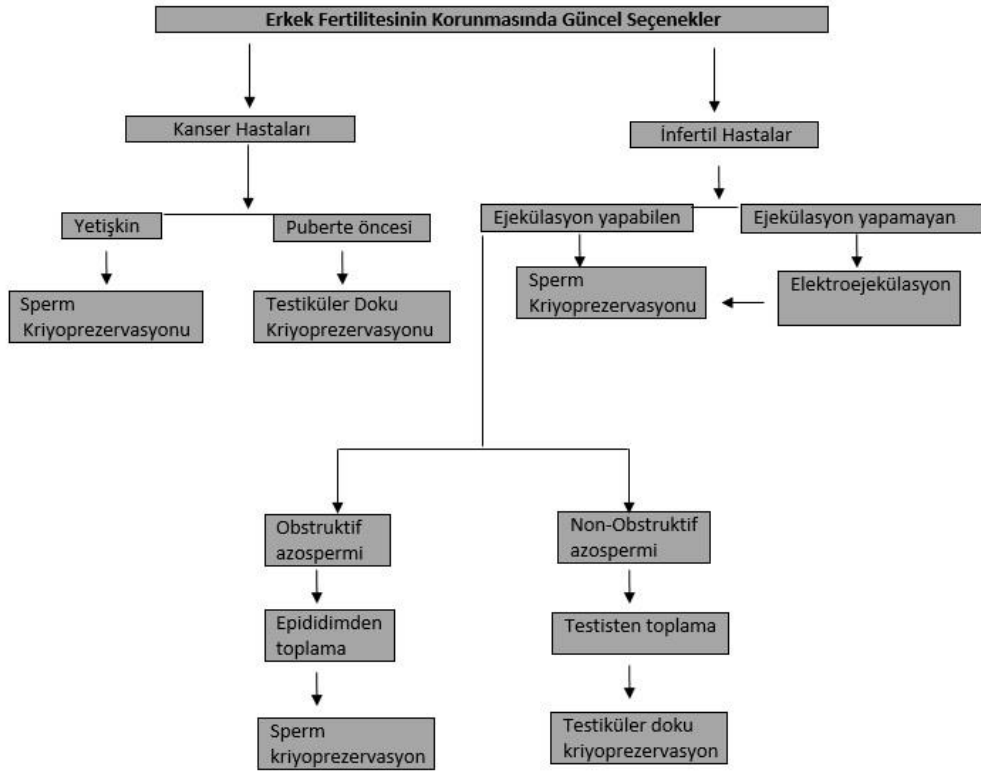
Ülkemizde sperm kriyoprezervasyonu ile ilgili uygulamalar Sağlık Bakanlığı tarafından hazırlanıp 06.03.2010 tarihinde yürürlüğe giren "Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri Hakkında Yönetmelik"le yasal düzenleme altına alınmıştır. Bu yönetmeliğe göre aşağıda belirtilen tıbbi zorunluluk durumları dışında erkek üreme hücreleri ve gonad dokularının saklanması yasaktır.

1. Cerrahi yöntemlerle sperm elde edilmesi halinde,
2. Kemoterapi ve radyoterapi gibi gonad hücrelerine zarar veren tedaviler öncesinde,
3. Üreme fonksiyonlarının kaybedilmesine yol açacak olan ameliyatlarda (testislerin alınması vb.) öncesinde,

Yine aynı yönetmeliğe göre 'üreme hücreleri ve gonad dokuları, bu materyallerin güvenliği açısından verici adaya ait DNA analizi ile birlikte saklanır'.

2.4.3 Erkekte İnfertilitenin Korunması

Kriyoprezervasyon teknolojisi kadın ve erkeğin yaşamları boyunca beklenmedik bir durumda karşılaşılabileceği olaylarda üremelerinin korunmasında kullanılabilir. Radyoterapi ve kemoterapi uygulanacak kanser hastaları ve infertil hastaların fertilitelerinin korunması için güncel yaklaşımlar Şekil 6'daki algoritmada gösterilmektedir.



Şekil 6: Erkek fertilitesinin korunması için güncel yaklaşım (Gürgan, T. (2012). İnfertilite ve Yardımla Üreme Teknikleri, Güneş Tıp Kitapevleri. İstanbul).

Spermin dondurularak saklanması, azospermik erkeklerden 1990'lı yıllarda cerrahi yöntemlerle testiküler sperm alınarak kullanılmaya başlanmasıyla zorunlu hale gelmiştir. Batı ülkelerinde uygulanan donör programları ve ticari sperm bankalarının kurulması kriyoprezervasyonu çok kullanılır bir yöntem haline getirmiş ve semen kriyoprezervasyonu tekniklerinin hızla gelişmesini sağlamıştır. Kriyoprezervasyon hem üremeye yardımcı tedavilerdeki başarıyı arttırmış, hem de testis cerrahisi, kemoterapi ve radyoterapiden önce, gelecekteki fertilitenin korunmasına katkıda bulunmuştur. Sperm hücreleri çözüldüğünde mümkün olan en az hasarla geri dönmeli ve canlı türlerinin devamlılığını sağlayabilecek kapasitede olması gerekmektedir (45).

Güncel kanser tedavileri ile genç erkeklerin yaşam süreleri uzamasına karşın kullanılan kemoterapi ve radyoterapi infertiliteye neden olabilmektedir. Testis kanserli erkeklerde sperm konsantrasyonlarının diğer kanser tiplerine göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Tedavi için kullanılan kemoterapi ve radyoterapi

spermatogenezi negatif olarak etkilemektedir. Buna rağmen kemoterapi gören erkeklerin sperm parametreleri bir yıl sonra, radyoterapi görenlerde ise iki yıl sonra tedavi öncesi değerlere dönebilir. Erkeklerde tedavi öncesinde azospermi görüldüğü durumlarda orşiektomi ile eş zamanlı testisten sperm elde ederek (TESE) sperm saklama uygulanabilir. **Sperm kriyoprezervasyonu, kanser hastalarında fertilité potansiyelinin korunması için altın standarttır.** Bu nedenle testis kanseri teşhis edilen erkeklerin tedavilerine başlamadan önce mevcut potansiyellerinin anlaşılması ve sperm dondurma işlemi için infertilite merkezlerine başvurmaları desteklenmelidir (46).

2.4.4 İnsan Spermatozoasının Kriyobioloji Prensipleri ve Uygulamaları

2.4.4.1 Tarihçe

Sperm dondurma ile ilgili ilk fikirler 1776 da Spallanzani'nin soğğun semen üzerindeki etkilerini inceleyen araştırmasında dondurulan spermlerin çözüldüklerinde motilitelerini bir miktar koruyabildiklerini gözlemlemesinden sonra gelişmeye başlamıştır. 1886'da askeri doktor olan Montegazza ilk kez insan spermini dondurarak saklama fikrini ortaya atmıştır. 1940'larda gliserolün spermleri dondurmanın zararlı etkilerinden koruyabildiğinin tesadüfen keşfi, -79°C'de kuru buz üzerinde saklanmış insan spermlerinin kullanılmasının yolunu açmış ve ilk kez insan spermi dondurma işlemi 1949'da Polge ve arkadaşları tarafından gliserol kullanılarak başarılmıştır. 1953'de ise Bunge ve Sherman tarafından dondurulmuş çözülmüş donör sperminden elde edilen ilk fertilizasyon ve embriyo gelişimini yayınlamıştır.

1945 yılında Parkes ve ekibi soğutma hızının dondurulup çözülen materyalin yaşama oranıyla ilişkisini tesadüfen gözlemlemiştir. Araştırmacı dondurulan semen örneğinin hacmi ve kullanılan kapların büyüklüğünün etkilerini incelerken bu sonuca varmıştır. Büyük kaplar içerisinde fazla miktarda sperm dondurulursa, çözüldüklerinde motilitenin iyi olduğunu saptamıştır. Böylece, yavaş dondurma yönteminin hücrelerin çözüldükten sonraki yaşam şanslarıyla doğrudan ilişkili olduğu ortaya çıkmıştır (47).

2.4.4.2 Prensip ve Uygulamalar

Dondurulan materyalin içinde bulunduğu sıvıda buz kristalleri oluştuğunda solüsyonun osmolaritesi artar ve hücreler buna su kaybederek yanıt verirler. Isının yavaş yavaş düşürülmesiyle zamanla hücrenin su kaybı artar ve çözme işleminden sonra da hücrenin su kaybetmesine bağlı olarak intrasellüler buz kristali oluşmadığı veya minimal olduğu için canlılığın daha yüksek olduğu gözlenir (48).

İnsan sperm hücrelerinin kriyoprezervasyon esaslarını belirleyen termodinamik kurallar diğer hücrelerin kriyoprezervasyonuna benzer (40, 49-54). Sperm kriyoprezervasyon uygulaması dört temel adımdan oluşur. Bunlar, ısı azalması, hücresel dehidrasyon, dondurma ve çözülme. Kriyoprotektanın görevi, dondurma esnasında hücre içinde buz oluşumunu önlemek veya minimize etmek için, sperm hücresindeki su miktarını azaltmak veya uzaklaştırmaktır. Spermatozoa kriyoprotektan solüsyona maruz kaldığında başlangıçta spermatozoada büzülme olur, nedeni ekstrasellüler osmolaritenin yüksek olmasına bağlı olarak intrasellüler suyun çekilmesidir. Sperm hücreleri, kriyoprotektan maddenin intrasellüler alana geçmesi ile tekrar eski orijinal hacimlerine dönerler. Genellikle güncel kriyoprezervasyon işleminde, kriyoprotektanın eklenmesine ısı düşürülmesi de eşlik eder. Soğutma işleminde ısı -5'den -15°C ulaştığında ekstrasellüler buz oluşur ve bir ekstrasellüler katı faz gelişimi olur (54). Sperm hücresi donmamıştır fakat çok soğutulmuştur. Çok soğumuş intrasellüler su osmotik hücre dışına çıkar ve ekstrasellüler donma devam eder. Bunun sonucu olarak hipertonsite oluşur ve sperm hücresinde su azalması artar ve kriyoprezervasyon hedefi olan dehidratasyona ulaşılır. Çözülme zamanında, sperm hücreleri hidrasyon/dehidratasyon olaylarını aynı şekilde fakat tersine olacak şekilde geçirir. Yavaş donma hızı geçiren spermatozoa çözme esnasında yavaşça ısıtılmalıdır, keza hızlı dondurma yapılırsa hızlı çözdürülmelidir (52-54).

İnsan spermi diğer memeli spermleri gibi düşük ısıya dayanıklı değildir. Tüm memeli spermleri soğutmaya duyarlıdır. Soğuk şokunun (0°C üzerinde soğuma), hareket, membran geçirgenliği ve diğer metabolik fonksiyonlar üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Isının azaltılması membran fosfolipidlerinin sıvı kristalden jel durumuna geçişine sebep olabilir. Bu soğuk şokunun zarar verici etkileri soğuma hızının kontrolüyle ve kriyoprotektan yardımıyla önlenabilir. Dondurmaya bağlı hasar soğuk şokundan farklıdır. Sıfırın altındaki (-5 ile -10°C) ve bunun altındaki

ısılar, buz kristallerinin oluşumuna bağlı mekanik stresten dolayı hücrel yapıların bozulmasına neden olur. Kontrollü soğuma hızı ve kriyoprotektanlar, buz kristallerinin hücre bütünlüğü üzerindeki etkisini mümkün olduğu kadar önlemek için kullanılır (52-54).

2.4.5 İnsan Sperminin Kriyoprezervasyonu İçin Uygun Kriyoprotektan Maddenin Seçimi

Kriyoprezerve edilen hücrelerin yaşamlarını sürdürmeleri, kriyoprotektan ajanların keşfi ve kullanımı sonrasında gerçek olmuştur. Kriyoprotektanlar hücre içine girip girmemelerine göre: permeabl olan veya olmayan diye sınıflandırılabilir. Bu güne kadar bulunan kriyoprotektanların çoğu permeabl ajanlardır. İnsan spermatozoasının kriyoprezervasyonu için sıklıkla kullanılan kriyoprotektanlar tablo 2’de gösterilmektedir. Bununla birlikte, gliserol insan spermatozoası için seçilen kriyoprotektandır (54-58). Gliserolün, insan sperminin kriyoprezervasyonunda %5-10’luk konsantrasyonu kullanılmaktadır. Kriyosurvival oranının dondurma metodunda kullanılan gliserol kokteyline (genişletilmiş farklı kompleks tampon medyumları içeren gliserol) bağlı olarak değişiklik gösterdiği bildirilmiştir.

Tablo 2 : Kriyoprotektanlar ve Kriyoprotektif Medyumlar İçindeki Belli Başlı Maddeler

Gliserol	Büyük oranda kullanılan ve insan spermatozoası için başarılı kriyoprotektan olarak yaklaşık %7’lik en uygun konsantrasyon olarak görülmektedir.
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Isıya duyarlı
Etilen glikol	Penetrasyon hızını artırır.
Propanediol (PROH)	İnsan embriyosunun erken bölünme döneminde çok başarılıdır fakat insan spermatozoasında az uygulanır.
Egg yolk	Genellikle kriyoprotektan içinde bulunur fakat tek başına kriyoprotektan değildir. Esas olarak membran akışkanlığının devamını sağlar.

Tamponlama ajan. Kriyoprotektan medyumun pH'ını sabit tutarak, spermatozoayı hasara neden olabilecek asit/alkali değişikliğinden korur.
(TES, Tris, glisin, sitrat)

İnsan albümin solüsyonu (HAS)

Rekombinant insan insülini

Gentamisin sülfat

2.4.6 Sperm Kriyoprezervasyonunu Etkileyen Bireysel Farklılıklar

Dondurulmuş sperm kullanılarak insanda gebelik yaklaşık 50 yıl önce gerçekleşmiştir. O günden bu yana bu başarıya bakıldığında, kriyoprezervasyon uygulamaları standardize edilmeye çalışılmıştır (55, 59-62). Kriyoprotektana maruziyet, soğutma, çözme veya kriyoprotektanın uzaklaştırılması sırasında oluşan sperm hasarının mekanizması iyi anlaşılamamıştır. Aynı kriyoprezervasyon işlemine, farklı spermlerin, neden farklı cevaplar verdiği henüz bilinmemektedir. Birçok erkeğin sperminin, dondurma-çözme siklusunda neden hasarlandığı veya harap olduğu henüz açık değildir.

Literatürde bildirilen kriyoprezervasyon verileri göstermektedir ki sperm hücrelerinin %50'si dondurma ve çözme ile hasarlı veya haraplanmış olmaktadır. Bunların hepsi sperm kriyoprezervasyonunun etkinlik ve verimliliğinin sınırlı olduğunu gösterir (62-66). Günümüzde bu sorunun cevabı çok açık değildir. Farklı erkeklerin spermatozoaları, aynı kriyoprezervasyon protokolüne çok farklı cevaplar verir. Erkekler arasında kriyoprezervasyona hassasiyetteki bu değişiklikler, kriyoprezervasyon metodunun başarısı üzerinde pratik olarak çok etkilidir. McLaughlin ve ark. kriyoprezervasyona karşı bazı bireysel hassasiyet farklılıkları gösterdiklerine dair güçlü bulguları gösteren araştırmalar yürütmüşlerdir. Aynı kişiden alınan farklı ejakülatlar arasında uyumlu, fakat farklı erkeklerden alınan ejakülatlar arasında, kriyoprezervasyon hasarı açısından farklı cevaplar verdiğini göstermişlerdir (62). Bu farkların nedeninin membran özelliklerinden kaynaklandığını ve bunun genetik olarak tespit edilebileceğini gösteren çalışmalar vardır. Sperm membranlarının bireysel farklılıklar göstermesi nedeniyle permeabilite özellikleri de keza farklılık gösterir. Bu şekilde

membranlardaki kompozisyon farklılıkları, spermatozoanın dondurulma duyarlılığında olduğu gibi çözümede de belirgin farklılıklara neden olur (58).

Hormonal farklılıklar da bireysel dondurma farklılıkları üzerine etkilidir. Farklı yaşlardaki erkeklerin, hormon konsantrasyonları da farklılıklar gösterir. Endokrinolojik farklılıklar, sperminin farklı yaşlarda donma hasarına yatkınlığını etkileyebilir (68, 69).

2.4.7 Kriyoprezervasyon Hasarları

Dondurma esnasında hücrelerin maruz kaldığı iki temel ve fiziksel stres kategorisi mevcuttur:

1. Düşük sıcaklığın doğrudan etkileri.
2. Buz oluşumuna bağlı fiziksel değişiklikler.

Sıcaklıktaki ani düşüştü kaynağlanan hücre yapısı ve fonksiyonu ile ilgili hasarı, membran geçirgenliğindeki ve hücre iskeleti yapısındaki değişimlerle ilgilidir (70).

Dondurma hasarı nedeniyle çözme sonrası spermin motilitesi, sperm oosit füzyon kapasitesi azalabilir veya plazma membran lipid peroksidasyonuna bağlı olarak fertilizasyon olumsuz etkilenebilir. Serbest oksijen radikallerinin (hidrojen peroksit gibi) üretim artabilir. Bazı araştırmacılar bu olumsuz etkileri önlemek için kültür ortamına askorbik asit, E vitamini, katalaz gibi antioksidan maddelerin eklenmesini önermektedirler (71).

Dondurma hasarının sebepleri:

1. Hücre içi buz kristallerinin oluşumu
2. Yoğun dehidratasyon
3. pH değişiklikleri
4. Protein denatürasyonu

Ayrıca; ortam ısısı, hücre zarı geçirgenliği, konsantrasyon farkı, hücre yüzeyinin hücre hacmine oranı, kriyoprotektanın niteliği, hücre zarının yapısı da kriyoprotektan maddelerin hücre içine geçişlerini düzenleyeceği için dondurma hasarına neden olabilir. Kriyoprotektan maddelerin kendisinin yol açabileceği veya lizozomal enzimlerin serbestleşmesi ve aktiflenmesi ile meydana gelebilecek toksik hasarları da göz ardı etmemek gereklidir. Elektron mikroskopisi ile hücre zarında meydana gelen hasarlar gözlemlenebilmektedir. Bu hücre hasarları;

protrüzyonlardan, dalgalanmalardan ve vezikülasyonlardan, sitoplazma içeriğinin dışarı çıktığı membran kayıpları, yırtılmaları ve erimeleri gibi membran bütünlüğünün bozulduğu ağır harabiyete kadar gidebilir. Spermden fertilizasyon kapasitesini azaltan boyun kırıkları görülebilir ve biyokimyasal yöntemlerle spermatozoada bulunan akrozomal penetrasyon enzimlerinin (hyaluronidaz, akrozin gibi) kaybı gösterilebilir (72).

Diğer hücre tipleri ile karşılaştırıldığında, spermin sitoplazmasındaki düşük su içeriği (yaklaşık %50) ve yüksek membran akışkanlığı nedeni ile kriyoprezervasyon hasarına karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir. Ancak, **en uygun dondurma-çözme protokollerinin uygulanması sonrasında bile (genelde çözme sonrasında) %30-50 oranında motilite kaybı gözlenmektedir (73).** Kriyoprezervasyonda hücre hasarının nedenleri, buz kristalleri kaynaklı yapısal hasarlar ve oksidatif stres ile ilişkili reaktif oksijen radikallerinden kaynaklanan hasarlar şeklinde özetlenebilir. Bununla birlikte, **spermlerde en sık karşılaşılan kriyo-hasarlar membran hasarı, organel hasarı ve DNA bütünlüğünün bozulması (DNA fragmentasyonu) şeklinde karşımıza çıkmaktadır.**

Kriyoprezervasyon son yıllarda üzerinde en fazla çalışılan konular arasında yer almaktadır. Yapılan araştırmaların hepsinde **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 (73, 74).** Kriyoprezervasyon sonrasında çözme işleminin insan sperminde DNA hasarına yol açtığı halen tartışılmakla beraber bu teknik YÜT'de önemini korumaktadır.

2.5 Sperm DNA Hasarları

Sperm DNA hasarlarının oluşumunda başlıca üç önemli mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan ilki matür spermden anormal kromatin paketlenmesi olup yapılan çalışmalarda, sperm DNA hasarlarının çoğunun spermden anormal kromatin paketlenmesine bağlı olduğu gösterilmiştir (75-77). Sperm DNA hasarının görülmesine neden olan diğer mekanizma, spermatogenez sırasında hasarlı germ hücresinin genetik havuzdan fonksiyonel olarak elimine olabildiği programlı hücre

ölümü olan apoptozisten, hasarlı DNA'ya sahip spermatozoaların kaçmasıdır (abortive apoptozis) (78-80). Üçüncü mekanizma ise kötü semen kalitesine eşlik eden, özellikle azalmış protaminasyon ve disülfid bağ yapımı varlığında reaktif oksijen türlerinin aşırı üretilmesinin neden olduğu sperm DNA hasarıdır (81).

Ayrıca ilerleyen erkek yaşı, lökosperrinin eşlik ettiği genital sistem enfeksiyonları, xenobiyotik maruziyeti, sperm DNA hasarlarına yol açabilen önemli nedenler arasında ele alınmaktadır (82).

Yapılan çalışmalarda normal sperm morfolojisi ile DNA fragmentasyon derecesi arasında negatif bir ilişki olduğu saptanmıştır (83-85). Yüksek oranda baş anomalisi gösteren, özellikle yüksek amorf başlı sperm yüzdesine sahip örneklerde artan derecede DNA fragmentasyonu saptanmıştır (86). Baş anomalileri ile sperm anöploidisi arasındaki korelasyon ispat edildiğinden beri (87, 88) anormal sperm baş morfolojisinin sperm DNA hasarının bir göstergesi olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir (89). Buna rağmen Avendano ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada orta ve şiddetli teratozoospermisi bulunan infertil hastalarda, yıkama sonrası motil kısımda, morfolojik olarak normal görünen spermatozoalarda DNA fragmentasyonunun olabileceği saptanmıştır (87). Dolayısıyla normal morfolojisi de her zaman sperm DNA bütünlüğünü göstermeyebilmektedir. Sperm DNA fragmentasyon analizlerinin, fertilitate potansiyelinin belirlenmesinde sperm analizi sonuçlarından daha anlamlı olabileceği düşünülmektedir.

Literatürdeki çoğu çalışmada sperm DNA hasarı ile fertilizasyon arasındaki ilişki gösterilememiş (90-94) ancak daha az sayıdaki çalışmada bu ilişkinin varlığı saptanmıştır (95-97), elonge başa sahip spermlerin fertilizasyon oranını etkileyebileceği sonucuna varılmıştır (86). Buna karşın **sperm DNA fragmentasyonu ile embriyo/blastosist gelişimi ve gebelik arasında açık olarak negatif ilişki saptanmıştır (98-101)**. Ahmedi ve arkadaşları sperm DNA hasarının fertilizasyonu engelleyip blastosist oluşumunu ve kaliteli embriyo gelişimini engelleyebileceğini rapor etmişlerdir (102). Seli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmanın sonuçları da bu düşüncüyü destekler nitelikte olup, sperm DNA hasarının embriyo gelişiminin blastosist safhasında ilerlemesini etkilediğini ortaya koymuşlardır (100). Sonuçlar, bugün için yaygın olarak kabul edilen embriyo gelişiminin ilk basamaklarının maternal kontrolde olduğu, paternal genlerin

ekspresyonunun 4-8 hücreli iken meydana gelen değişikliklerle etkili olduğu, bu sebeple iyi kalite embriyo gelişimini engelleyebileceği görüşünü savunanlar vardır (101).

Bütün bu veriler infertilite olgularında sperm DNA hasarlarının önemli bir faktör olabileceğini vurgulamaktadır. Defektif genetik materyalin yeni doğana aktarılma olasılığı ise ayrıca önemlidir. Ancak günümüzde DNA üzerinde yapılan testlerden elde edilen sonuçlar fertilizasyon ve sonrası olaylar hakkında sadece tahmini fikir vermektedir. Çünkü her ne kadar laboratuvar çalışmalarında güvenilirliği yüksek testler kullanılarak bu hasarlar gösterilebilse de, fiksasyon, denatürasyon ve boyama işlemleri sırasında hücrede kalıcı dejenerasyon oluşturduklarından, IVF/ICSI'de kullanılmak üzere seçilen spermde bunu göstermek mümkün olmamaktadır. Dolayısıyla, ÜYTE'de kullanılan semen örneğinin sadece bir kısmında araştırma yapılmakta ve burada saptanan DNA hasar oranı tüm semene yorumlanmaktadır.

3- GEREÇ VE YÖNTEM

Toplam yüz (n=100) kişi çalışmaya dahil edilmiştir. Kişiler 21-39 yaş arasında olup, herhangi sistemik bir hastalık, çocuk yaşta ateşli hastalık, testis travması gibi üreme fonksiyonelliğini etkileyen bir hastalık geçirmemiş olanlar WHO laboratuvar klavuzuna göre normospermik kişilerden seçilmiştir.

Spermiyogram sonuç kriterleri tek kişi tarafından değerlendirilmiş olup yine Halosperm Tekniğinin uygulanması, kriyoprezervasyon ve çözme işlemi aynı uzman tarafından yapılmıştır. Buradaki amaç subjektif etkileri ortadan kaldırmak ve işlemleri standardize etmektir.

Kişilerden alınan örnekler, likefaksiyondan sonra aşağıda anlatıldığı gibi semen analizi kurallarına uygun bir şekilde değerlendirilip, Halosperm Tekniği uygulandıktan sonra arta kalan kısmı dondurulmuştur. Dondurulan örnekler bir ay sonra çözülüp tekrar Halosperm Tekniği uygulanarak kriyo öncesi, kriyo sonrası fragmantasyon oranı saptanıp değerler karşılaştırılmıştır.

3.1 Semen Analizi

3.1.1 Örnek Toplanması

- Semen ortam sıcaklığındaki değişikliklere maruziyetini kısıtlamak, örneğin alınmasıyla analizi arasındaki zamanı kontrol etmek amacıyla örneğin laboratuvarın yakınındaki özel bir odada verilmesi gerekir.
- Örnek en az üç en fazla yedi günlük cinsel perhizden sonra alınmalıdır.
- Kişiye, semen örneğinin alınmasıyla ilgili anlaşılır yazılı sözlü bilgilendirme yapılmalıdır. Semen örneğinin tamamının toplanması ve örneğin herhangi bir kısmının ziyan olması halinde durumun ilgili kişiye bildirilmesi gerektiği vurgulanmalıdır.
- Rapor formuna aşağıdaki bilgiler kaydedilmelidir: kişinin adı soyadı, doğum tarihi, kod numarası, cinsel perhiz süresi ve örneğin alındığı tarih.
- Örnek mastürbasyonla elde edilmeli, ejakülat spermatozoa için toksik olmadığı doğrulanmış cam veya plastikten temiz ve geniş ağızlı bir kap içine alınmalıdır.

- Ejakülasyondan sonra spermatozoayı olumsuz etkileyebilen geniş çaplı ısı değişikliklerinden kaçınmak için, numune kabı 20°C ila 37°C arasındaki ortam sıcaklığında tutulmalı, kabın üzerine erkeğin adı, kod numarası ve örneğin alındığı tarihin yazılı olduğu bir etiket yapıştırılmalıdır.
- Semen likefiye olurken örnek kabı laboratuvar sehpası üzerinde veya bir inkübatörde (37° C) bırakılmalıdır.

3.1.2 Örnek Hazırlanması

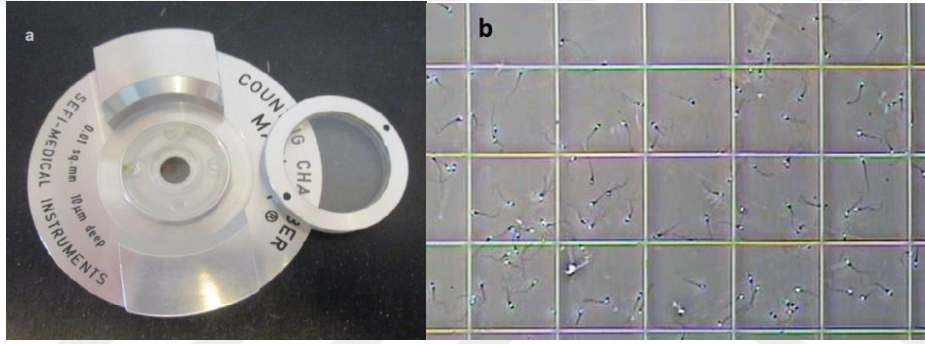
İlk 5 dk içinde:

- Örnek kabını likefaksiyon için laboratuvar sehpası üstüne veya bir inkübatörde (37°C) bekletilir.

30 ila 60 dk arasında:

- Likefaksiyon ve semen görünümü değerlendirilir.
- Semen örneğinin homojenizasyonu sağlamak için karıştırılır.
- Semen hacmi ölçülür.
- Semen pH'sının ölçümü yapılır (gerekliyse).
- Mikroskobik görünüm, sperm motilitesi ve sperm sayısını belirlemek için gerekli seyreltme derecesini değerlendirmek üzere preparat hazırlanır.
- Sperm vitalitesini değerlendirilir (hareketli hücrelerin yüzdesi düşükse).
- Sperm morfolojisini değerlendirmek için semende yayma preparatı hazırlanır. Preparat hazırlandıktan sonra havada kurutulur. Boyama için *Sperm Mac* ve *Diff-Quick* gibi boyalar kullanılır. Yaygın olarak kullanılan *Diff-Quick* boyası 3 aşamadan oluşur. Kit içerisinde bulunan sırasıyla fiksatifte 10 dk, katyonik ve anyonik boyaların içinde birer dakika bekletilip sonra sudan geçirildikten sonra tekrar havada kurutulur. Kuruma sonrasında faz kontrast mikroskopunun 100x büyütmeli objektifinde sperm morfolojisi değerlendirilir.
- Sperm konsantrasyonunu değerlendirmek üzere semen seyreltilir.
- Sperm sayısını değerlendirilir.

- Motite bir örnekteki hareket eden sperm yüzdesidir ve hareketlerinin yönünü ve oranlarını gösterir. Spermin motilitesi de yumurtayı dölleyebilmesi açısından çok önemlidir çünkü ancak hareketli spermeler kadının üreme kanallarında ilerleyerek yumurtayı dölleyebilirler. Motilite dört gruba ayrılır. A: hızlı progresif hareketli, B: yavaş progresif hareketli, C: yerinde hareketli ve D: hareketsiz.
- MAR [(mixed antiglobulin reaction (karma antiglobülin reaksiyonu)] testi uygulanır (gerekliyorsa).
- Peroksidaz pozitif hücreleri değerlendirilir (yuvarlak hücreler mevcutsa).
- Semen santrifüjü yapılır.



Şekil 7: a-Makler sayım aracı ve b- mikroskop görüntüsü.

3.2 Halosperm Tekniği

3.2.1 Method Prensipleri

Bu yöntem sperm kromatin dağılımı testine (SCD, Sperm Chromatin Dispersion) dayanmaktadır (103). Spermi lam üzerine fikse etmek için agaroz mikro jel ile karıştırılır. Daha sonra denaturasyon solüsyonu ile muamele edip bunu takiben lizis solüsyonu ile nükleer proteinlerin çoğunu çıkarır ve eğer sperm DNA fragmantasyonu yok ise veya minimal düzeyde ise sperm etrafında büyük halo oluşturur. Bununla birlikte DNA fragmantasyonu çok olan spermlerde halo yoktur ya da çok minimal seviyededir.

3.2.2 Kit İÇeriği (Halosperm Halotech, Halotech DNA, Türkiye dağıtıcısı Doğan Medikal)

Her kit 10 test için yeterlidir.

- 10 tane lam
- 10 tane düşük erime noktalı agaroz ependorf tüpü
- 1 tüp asit denatürasyon solüsyonu
- 1 şişe lizis solüsyonu

3.2.3 Kit İÇeriğinde Bulunmayan Gerekli Materyal ve Ekipmanlar

Mikroskop, 4°C buzdolabı, 90-100°C ve 37°C'de inkübasyon banyosu, plastik eldiven, lamel (18 mm X18xmm ya da 22 mm X 22mm), mikropipet, yatay pozisyon için tabla, distile su, alkol (%100, %90, %70) ve mikrodalga.

3.2.4 Kullanım Talimatları

1. Lizis solüsyon oda sıcaklığına getirilir (22°C).
2. Semen örneği mililitrede 5-10 milyon olacak şekilde kültür solüsyonu ile ya da PBS (Phosphate Buffer Solution, Fosfat Tampon Solüsyonu) ile seyreltilir.
3. İÇinde agoroz olan ependorf, çözdürölmek üzere mikrodalgaya ya da sıcak su banyosuna koyulur. Agoroz 5 dk 90°C-100°C bekletilir.
4. Daha sonra agoroz tüpü 37°C'deki su banyosunda 5 dk bekletilir.
5. 25 mikrolitre (µl) sperm örneği agoroz tüpüne eklenip iyice karıştırılır. Bu karışımdan 14µl - 20 µl kadarı pipet yardımıyla lama damlatılır ve baloncuk oluşturmadan lamel ile kapatılır.
6. Bütün işlem boyunca lamin, yatay bir konumda tutulmasına dikkat edilir.
7. Preparat 4°C'de buzdolabında 5 dk bekletilir.
8. Asit denaturasyon solüsyonu (AD, Acid Denaturation Solution) hazırlanır. Bunun için 10 ml distile su ile 80 µl AD karıştırılır.
9. Preparat buzdolabından çıkarılır ve lamel nazik bir şekilde bir lanset yardımıyla kaldırılır. Bundan sonraki aşamalarda eldiven giymeye ve lanset kullanmaya özen gösterilir.
10. Bundan sonra lam, adım 8'de hazırlanışı anlatılan AD'na yatay konumda 7 dk inkübasyon için bırakılır.
11. 7 dk'nın ardından 10 ml lizis solüsyonunda 25 dk inkübasyona bırakılır.

12. Lizis solüsyonundan arındırmak için yatay konumda distile su banyosunda bekletilir.
13. Sonra sırasıyla ikişer dk %70'lik, %90'lık ve %100'lük alkol içerisinde yatay konumda bekletilir.
14. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.
15. Kuruduktan sonra, boyama yapılarak incelenebilir ya da örnek karanlıkta arşiv amaçlı aylarca saklanabilir.

3.2.5 Mikroskop Görünümü

Halosperm tekniği için tavsiye edilen iki boya tipi bulunmaktadır.

1. *Diff-quick* ile boyama: Yatay konumda, Eosin solüsyonunda (kırmızı renk) 6 dk ve Azur B solüsyonunda (mavi renk) 6 dk bekletilir.
2. *Wright* boyama: Fosfat tampon solüsyonu ile *Wright* boyası 1:1 oranında karıştırılır. Örnek yatay konumda tutularak 10-15 dk boyunca pipetaj yapılarak boyanır. Fazla boya su ile yıkanır ve kurumaya bırakılır.

Görüntüleme 20X veya 40X objektifle ışık mikroskopunda değerlendirilir ve sınıflandırılır.

3.2.6 Sperm Sınıflandırılması

Her örnekte minimum 100 spermatozoa sayılır. (103). Mikrojin kenarına gelen spermatozoaları sınıflandırmaya almaktan kaçınılmalıdır. Sınıflandırma:

DNA Fragmantasyonu olmayan spermatozoa:

Büyük halolu spermatozoa: Halo çapı sperm çekirdeğinin çapı kadar ya da daha fazla olan spermler (şekil 8).

Orta büyüklükte halolu spermatozoa: Bunların halo hacimleri, büyük halo ve küçük halonun ortasında kalanlar (şekil 8).

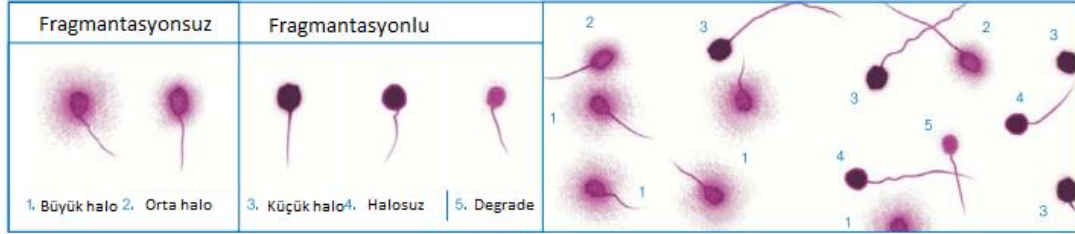
Fragmente DNA'ya sahip spermatozoa:

Küçük halolu spermatozoa: Halo çapı sperm çekirdeği çapına yakın veya küçük olan spermler (şekil 8).

Halosuz spermatozoa: (şekil 8)

Halosuz ve degrade (aşınmış) olanlar: Halosuz olanlar ve çekirdek düzensizliği olanlar ya da zayıf boyananlar (şekil 8).

Diğerleri: Hücre çekirdeği spermatozoaya uyumlu olmayanlar. Bunları ayırt edici özellik ise kuyruğun olmayışıdır.



Şekil 8: Halosperm Tekniği ile boyanan spermallerin görüntüsü.

3.2.7 Değerlendirme Sınırları

Parametreler bir uzman tarafından analiz edilir. Elde edilen veriler DNA fragmentasyon oranına göre %30'a eşit ve altında ya da %30'un üstünde şeklinde yorumlanır. Aynı sperm örneği hem kriyoprezervasyon öncesinde hem de kriyoprezervasyon sonrasında değerlendirilip veriler girilir ve sperm DNA fragmentasyon oranında artma olup olmadığı tayin edilir. %30'a eşit ve altında ise sperm DNA fragmentasyon oranı negatif, %30'un üzerinde ise pozitif olarak değerlendirilir.

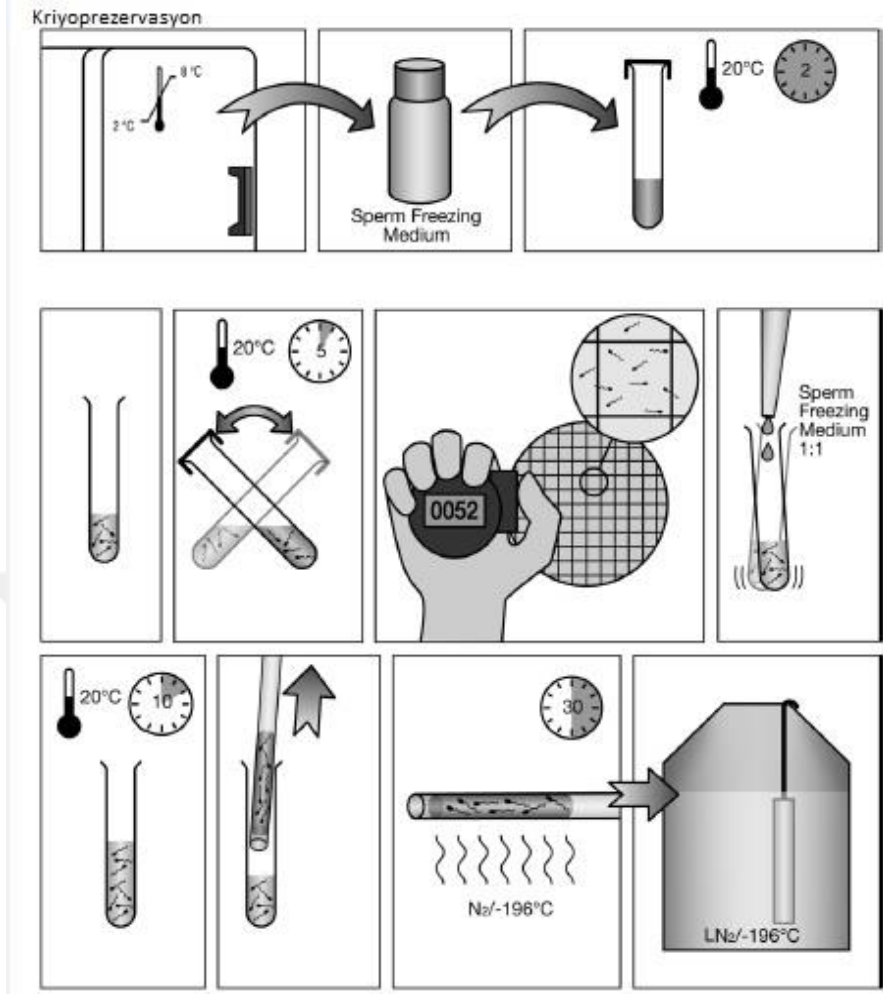
3.3 Kriyobiyolojide Kullanılan Ekipman ve Malzemeler

Dondurma yöntemlerinin temelinde materyalin sıvı nitrojen içinde depolanması gerektiğinden dondurma protokollerinin uygulandığı merkezlerde sıvı nitrojenin ayrı bir depo tankında sürekli bulundurulması gerekir. Sıvı nitrojen miktarı, kullanılan dondurma protokolüne, dondurma cihazının tipine ve aletin kullanma sıklığına bağlı olarak değişir. Dondurulan materyallerde sıvı nitrojen içeren tanklarda saklanır ve bu amaçla kullanılan embriyo, oosit ve sperm dondurma tanklarının ayrı ayrı olması gerekir. Bu, hem enfeksiyon kontaminasyonunu hemde karışıklığı engelleyen bir yöntemdir. Sıvı nitrojen tanklarının boyun kısmı çok geniş olmamalıdır. Geniş boyunlu tanklar kullanımda kolaylık sağlamakla birlikte, sıvı nitrojenin hızlı buharlaşması nedeniyle tercih edilmezler. Tanklardaki sıvı nitrojenin azalması, dondurulan materyalin hava ile temas etmesine neden olacağından, sıvı nitrojen miktarının sıklıkla kontrol edilmesi gerekir. Bu amaçla her bir tankın üstüne

alarm sistemi takılmalı ya da plastik cetvelle sıvı nitrojen miktarı aralıklarla ölçülmelidir. Sıvı nitrojen buharları inhale edilmemeli, olası tehlikelere karşı eldiven ve şeffaf koruyucu gözlük kullanılmalıdır. Laboratuvarlarda dondurulacak materyalin depo tanklarına taşınması sırasında küçük sıvı nitrojen kapları (termoslar) kullanılmalıdır. Diğer malzemeler ise; dondurma strawları ve kriyoprotektanlardır.

3.4 Kriyoprezervasyon Protokolü

- Sperm freezing medyumunu oda sıcaklığında minimum 2 saat önceden ısıtılır.
- Sıvılaşmadan sonra ejakülatın total hacmi ölçülür ve gerektiği şekilde semen analizi yapılır.
- Hem semen örneği hem de sperm dondurma solüsyonunun oda sıcaklığında olduğundan emin olduktan sonra semen, sperm dondurma solüsyonu ile 1:1 oranında seyreltilir. Vasat, semene damla damla eklenmeli ve karışım her eklemekten sonra karıştırılmalıdır.
- Karışım oda sıcaklığında minimum on dakika bırakılır. Seyreltilmiş örnek çubuklara veya tüplere yüklenir, üretici firmanın talimatına göre kapatılır ve bilgiler yazılır.
- Çubuğun alt tarafında mühürleme için ve ayrıca donma sırasında solüsyonun genişletilmesini mümkün kılacak şekilde hava boşluğu bırakmamız önemlidir.
- Çubuklar sıvı nitrojen buharında yatay bir şekilde 30 dakika bekletilir.
- Son olarak çubuklar sıvı nitrojen tanklarına yerleştirilir ve -196°C 'de bekletilir.



Şekil 9: Sperm Kriyoprezervasyon Protokolü (Origio, Sperm Freezing Medium).

3.5 Dondurulmuş Spermin Çözülmesi

Dondurulmuş spermin kullanımı, kriyoprotektanın uzaklaştırılıp motiliteleri yeniden kazandırdıktan sonra mümkündür. Bunun için örnek, sıvı nitrojenden çıkarılır ve hücrelerin motilitesini tekrar kazanabilmesi için kriyoprotektanlar uzaklaştırılır. Çözme işlemi sperm dondurucu çubukların oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilmesi ile ya da 37°C'deki distile su banyosuna 30 sn daldırılıp bekletilmesi şeklinde olabilir. Çözülen örnek steril tüplere aktarılıp uygun yöntemle yıkayıp hazırlanır.

3.6 İstatistiksel Analiz

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

Kriyo öncesi ve sonrası fragmentasyon dataları normal dağılıma uymadığı ve aynı kişiden alınan sperm örnekleri, Halosperm Tekniği uygulandıktan sonra dondurulup daha sonra tekrar çözülüp aynı teknik ile değerlendirildiği için non-parametrik test olan **Wilcoxon Signed Rank Test** kullanılmıştır. Her iki grubun medyan degerleri arasında istatistiksel fark saptanmıştır ($P < 0,001$).



4. BULGULAR

Aşağıdaki tabloda toplam yüz (n=100) hastada kriyo öncesi ve kriyo sonrasındaki fragmantasyon oranları verilmiştir.

HALOSPERM TEKNİĞİ					
		Kriyo Öncesi		Kriyo Sonrası	
	Yaş	Frag. Hücre	Frag. olmayan hücre	Frag. hücre	Frag. olmayan hücre
1	28	23	77	31	69
2	29	25	75	36	64
3	28	29	71	40	60
4	28	45	55	63	37
5	26	9	91	13	87
6	24	5	95	6	94
7	25	15	85	21	79
8	30	29	71	40	60
9	30	42	58	59	41
10	30	32	68	44	56
11	30	10	90	15	85
12	29	13	87	19	81
13	35	15	85	21	79
14	33	39	61	55	45
15	36	22	78	31	69
16	27	12	88	17	83
17	26	25	75	36	64
18	26	22	78	32	68
19	29	39	61	55	45
20	33	43	57	61	39
21	31	21	79	29	71
22	32	23	77	31	69
23	22	29	71	40	60
24	28	27	73	38	62
25	27	25	75	36	64
26	27	58	42	82	18
27	28	22	78	31	69
28	29	24	76	34	66
29	35	39	61	55	45
30	26	22	78	32	68
31	29	25	75	36	64

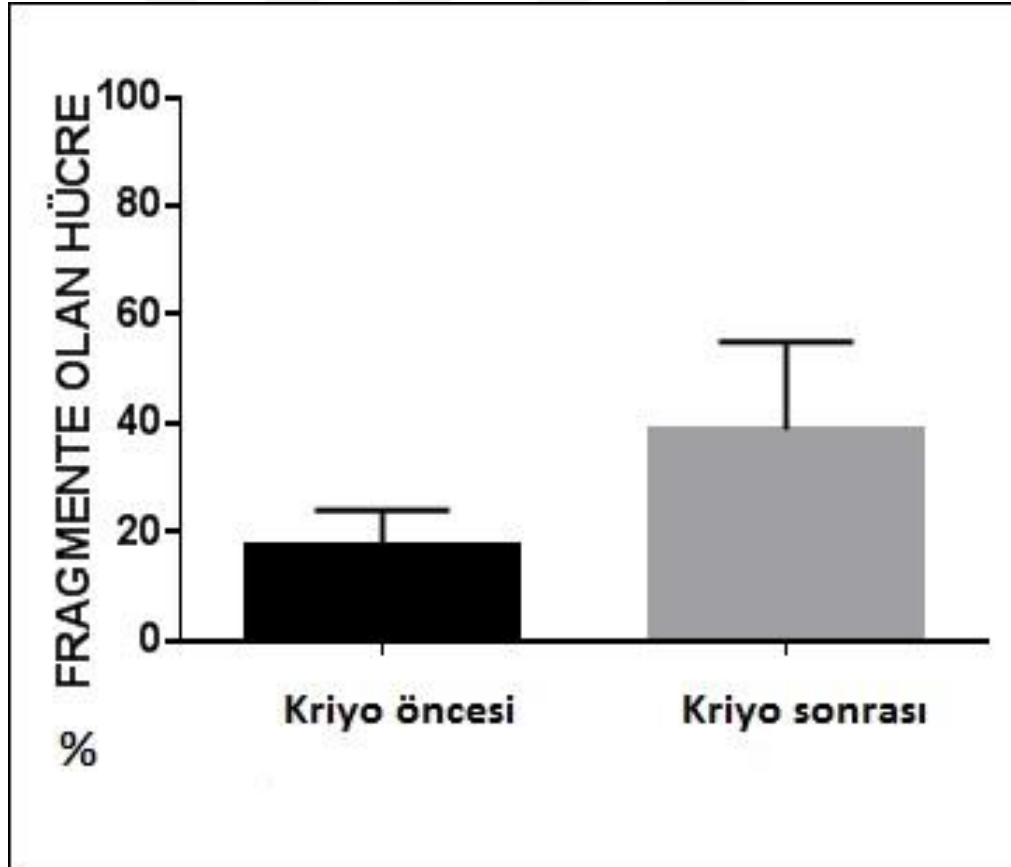
32	27	28	72	40	60
33	32	30	70	48	52
34	37	38	62	60	40
35	33	40	60	65	35
36	31	27	73	43	57
37	32	30	70	48	52
38	39	24	76	38	62
39	38	27	73	43	57
40	28	28	72	46	54
41	25	17	83	28	72
42	27	22	78	38	62
43	29	24	76	41	59
44	30	23	77	38	62
45	33	27	73	46	54
46	35	28	72	48	52
47	32	65	35	80	20
48	34	12	88	20	80
49	34	24	76	41	59
50	21	25	75	43	57
51	25	27	73	46	54
52	26	52	48	89	11
53	28	18	82	31	69
54	28	24	76	41	59
55	26	25	75	43	57
56	24	17	83	28	72
57	25	28	72	48	52
58	30	37	63	64	36
59	25	17	83	28	72
60	30	20	80	33	67
61	30	24	76	41	59
62	29	36	64	61	39
63	35	21	79	36	64
64	33	24	76	41	59
65	36	27	73	46	54
66	28	26	74	43	57
67	26	21	79	36	64
68	26	18	82	31	69
69	29	20	80	33	67
70	33	22	78	38	62
71	31	21	79	36	64

72	32	35	65	59	41
73	26	36	64	61	39
74	28	39	61	66	34
75	27	42	58	71	29
76	27	15	85	25	75
77	29	18	82	31	69
78	29	22	78	38	62
79	31	25	75	43	57
80	26	27	73	46	54
81	29	30	70	51	49
82	27	31	69	54	46
83	26	38	62	64	36
84	37	20	80	33	67
85	33	29	71	48	52
86	35	25	75	43	57
87	32	13	87	23	77
88	39	24	76	41	59
89	38	27	73	46	54
90	24	30	70	51	49
91	25	31	69	54	46
92	27	22	78	38	62
93	28	25	75	43	57
94	30	13	87	23	77
95	33	21	79	36	64
96	31	6	94	10	90
97	32	14	86	23	77
98	34	10	90	18	82
99	32	18	82	31	69
100	21	24	76	41	59

Tablo 3: Halosperm Tekniği ile çalışılan yüz (n=100) kişinin kriyo öncesi ve kriyo sonrası oranları.

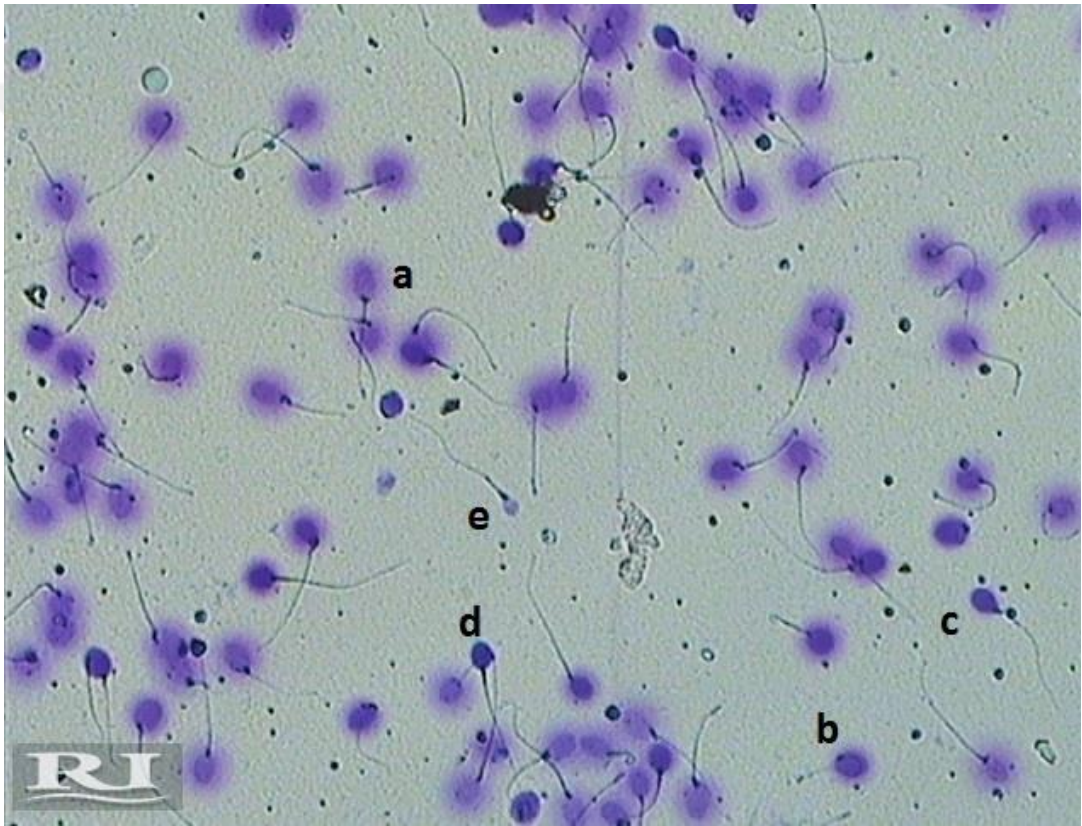
Toplam yüz (n=100) örnekte kriyo öncesinde ortalama fragmentasyon oranı %25 ve kriyo sonrasında ortalama fragmentasyon oranı %40 olarak saptanmış olup kriyo öncesi ve kriyo sonrasında toplam ortalama artış %15 olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda dondurma öncesi ile dondurma işleminden 1 ay sonra çözülen spermeler karşılaştırıldığında Halo pozitif sperm oranında istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p<0.001$) görülmüştür.

Grup	n	Kayıp	Medyan	25%	75%
kriyo öncesi fragm.	100	0	25,000	21,000	29,500
kriyo sonrası fragm.	100	0	40,000	31,000	48,000

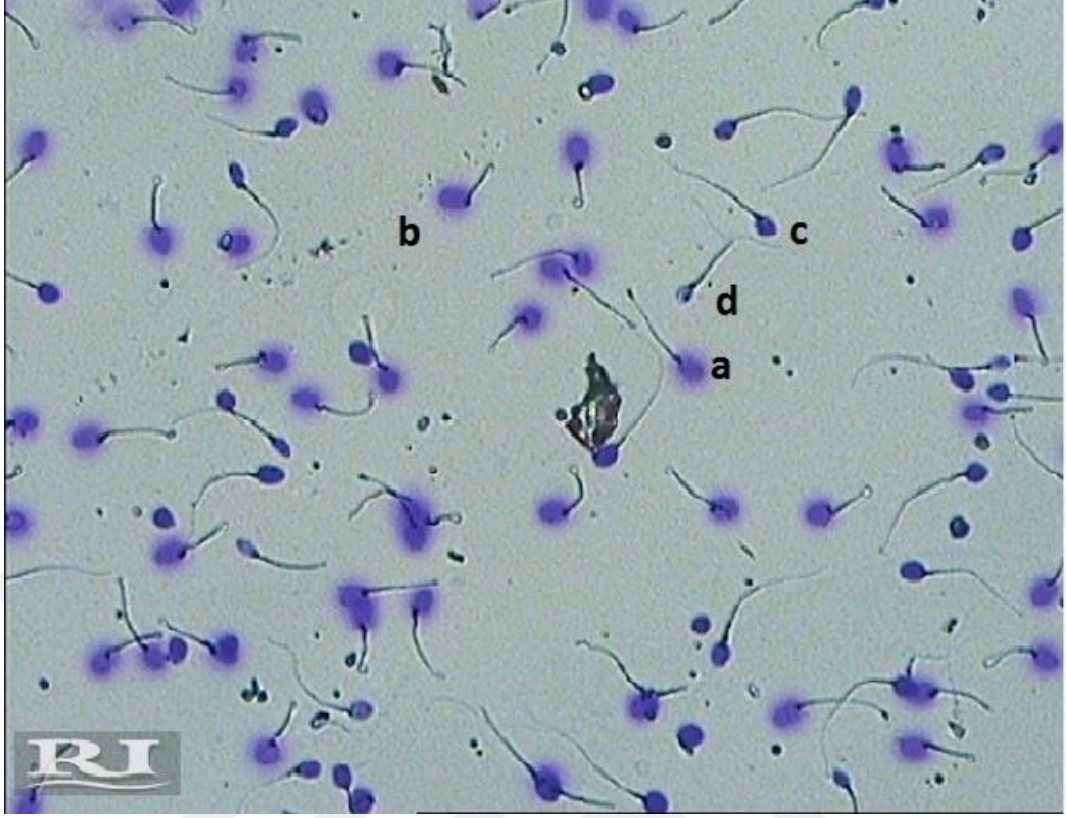


Grafik 1: Yüz (n=100) kişinin değerlendirilmesi sonucunda kriyoprezervasyon öncesi ve kriyoprezervasyon sonrası artış grafiği. Artış oranı %15 ($p<0.001$).

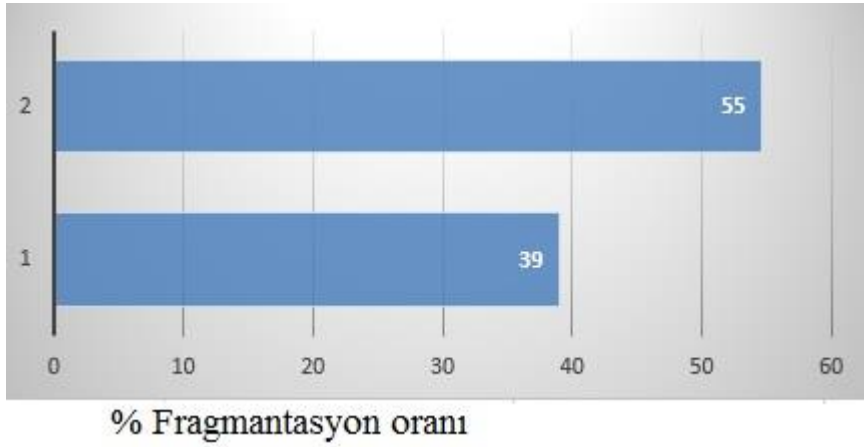
Aşağıda, işlemler sonrasındaki (kriyo öncesi ve kriyo sonrasında) durumu fotoğraflarla karşılaştırabilmek için çalışılan yüz kişi içinden, iki tanesi seçilerek (14 ve 38 numaralı örnekler) sunulmuştur. İlk örnekte (şekil 10-11) kriyo öncesinde fragmantasyon oranı %39 iken kriyo sonrasında bu oranın %55'e yükseldiği görülmektedir. İkinci örnekte (şekil 12-13) ise kriyo öncesi fragmantasyon oranı %24 iken, kriyo sonrası %38 olarak gözlenmiştir. İki örnekteki ortalama fragmantasyon artışı %15'tir.



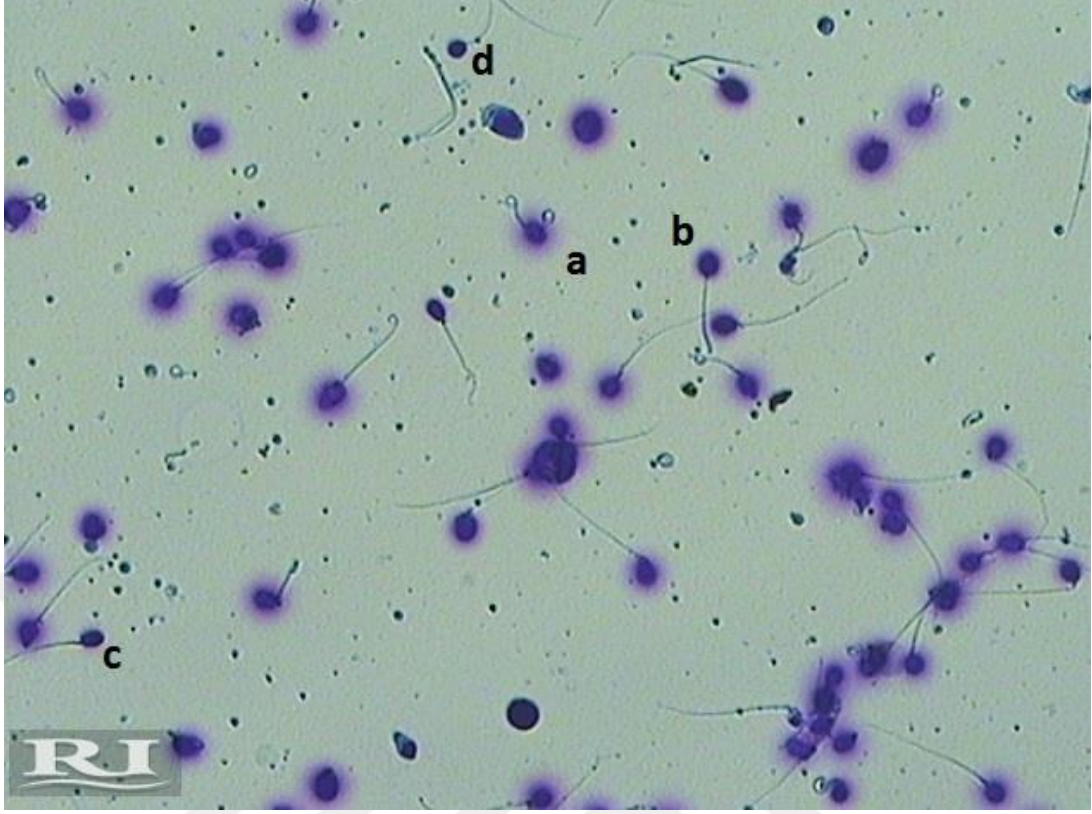
Şekil 10: Kriyoprezervasyon öncesi Halperm Tekniği ile çalışılan 14 numaralı örneğin boyama preparatı: a; büyük halo, b; orta halo, c; küçük halo, d; halosuz, e; degrade.



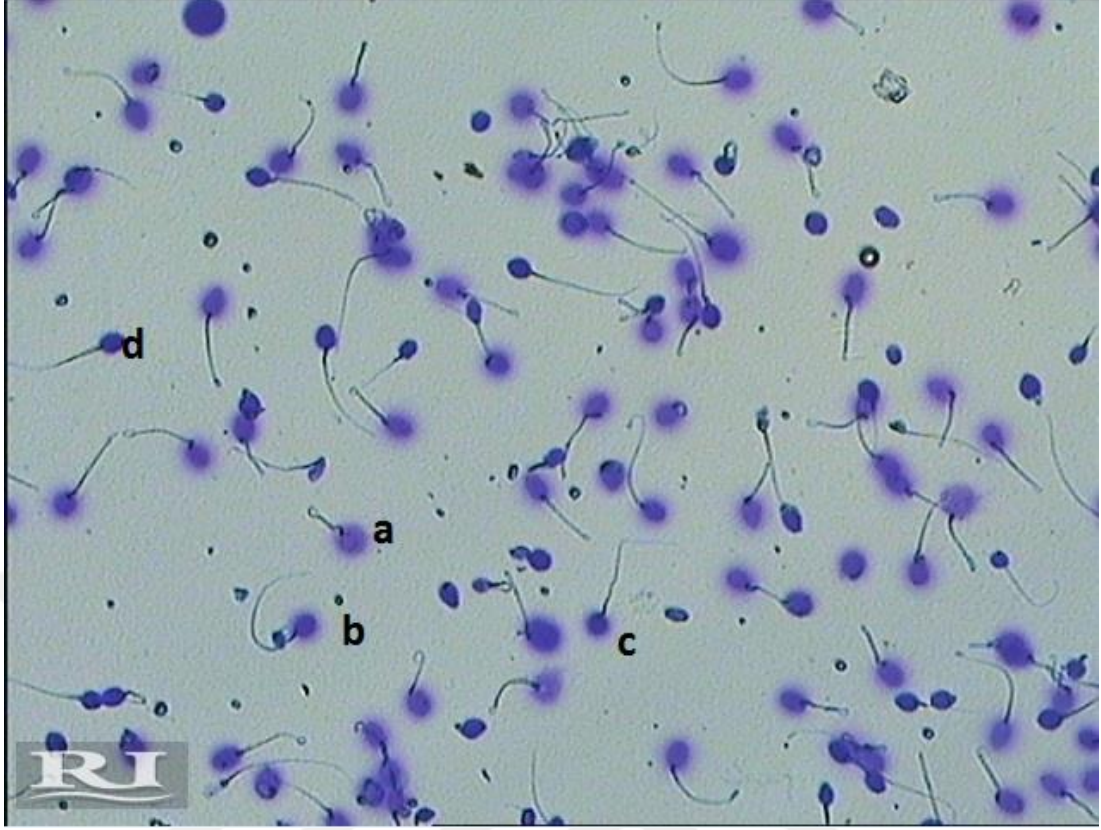
Şekil 11: Kriyoprezervasyon sonrası Halosperm Tekniği ile çalışılan 14 numaralı örneğin boyama preparatı: a; büyük halo, b; orta halo, c; halosuz, d; degrade



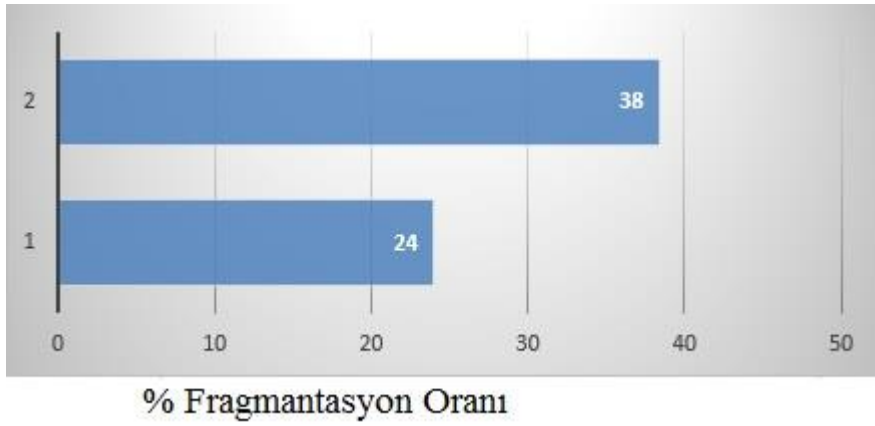
Grafik 2: 14 numaralı örneğin 1- kriyoprezervasyon öncesi ve 2- kriyoprezervasyon sonrası değerlendirilmesi.



Şekil 12: Kriyoprezervasyon öncesi Halosperm Tekniği ile çalışılan 38 numaralı örneğin boyama preparatı: a; büyük halo, b; orta halo, c; halosuz, d; halosuz



Şekil 13: Kriyoprezervasyon sonrası Halosperm Tekniği ile çalışılan 38 numaralı örneğin boyama preparatı: a; büyük halo, b; orta halo, c; küçük halo, d; halosuz.



Grafik 3: 38 numaralı örneğin 1- kriyoprezervasyon öncesi ve 2-kriyoprezervasyon sonrası değerlendirilmesi.

5. TARTIŞMA

İnsanlarda sperm DNA'sının çok büyük bir bölümü protaminlerle sıkı paketlenmiş haldedir ve bu yapı içerisindeki DNA spermin testis dokusundan transportu sırasında potansiyel zararlardan korunmaktadır. Sperm DNA'sını hasara yatkın hale getiren mekanizmalar arasında protamin eksikliği, oksidatif stres ve DNA tamir mekanizmasındaki yetersizlikler yer almaktadır (104).

Spermilerin sayılı miktarda tamir mekanizmasına sahip olmasına rağmen (105) iyi kalitedeki oositlerin sperm DNA hasarını belli bir oranda tamir etme kapasitesinin olduğu belirtilmiştir (106). Öte yandan, DNA fragmantasyon oranı çok yüksek olduğunda oosit tamir mekanizmasının da yetersiz kaldığı belirtilmektedir (106). Ancak, hangi tip DNA hasarının yardımıyla üreme tekniklerinin başarısını olumsuz etkilediği henüz bilinmemektedir.

Oksidatif stres, spermde DNA fragmantasyonunu potansiyel olarak uyarabilen temel mekanizmalardan birisidir (107). Somatik hücreler ile karşılaştırıldığında sperm hücresinin membranının özelliğinden dolayı oksidatif stres hasarına karşı açık olduğu belirtilmektedir (107). Bununla birlikte, çeşitli germ hücre ve myoblastoid hücre soyları ile kıyaslandığında insan sperminin nükleer ve mitokondriyel DNA'sının oksidatif strese karşı daha dayanıklı olduğu da öne sürülmüştür (108).

DNA fragmantasyonunun etiolojisinin açıklanması amacı ile üzerinde çalışılan hücresel mekanizmalardan bir diğeri ise apoptozdur. Yakın zamanda yapılan araştırmalarda kriyoprezervasyon ve takiben çözme işleminin kaspaz aktivasyonuna neden olduğu ve bu mekanizma aracılığı ile apoptozun uyarıldığı belirlenmiştir. Öte yandan, kaspaz aktivasyonun membran hasarına yol açmasına rağmen DNA bütünlüğünün bozulması ile ilişkisi gösterilememiştir (109). Ek olarak, DNA hasarı ve sperm işlevselliğinin kaybında kaspazlardan çok oksidatif stresin daha etkin rol oynadığı belirtilmektedir (110).

Sperm kriyoprezervasyonu son yıllarda üzerinde en fazla çalışılan konular arasında yer almaktadır. Yapılan araştırmaların hepsinde kriyoprezervasyon ve DNA fragmantasyonu 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 (111, 112). Kriyoprezervasyon-çözme işleminin insan sperminde DNA hasarına yol açtığı halen tartışılmakla beraber bu teknik yardımıyla üreme tekniklerinde önemini korumaktadır.

İnfertil bireylerin sperm örneklerinin fertil bireylere oranla daha yüksek düzeyde DNA fragmantasyonu içerdiği bilinmektedir (113). Ek olarak, canlı doğum oranlarını temel alan bir çalışmada açıklanamayan infertilite endikasyonu olan çiftlerin %80'inde DNA fragmantasyonu neden olarak gösterilmiştir (114). Değişik DNA fragmantasyon tayin yöntemleri ile farklı klinik eşik değerler elde edilmiş olsa da genel sonuç fertil bireyler ya da donör spermle karşılaştırıldığında, infertil erkeklerin örneklerinde DNA hasar oranının anlamlı derecede yüksek olduğu yönündedir (117, 113-116). Bizim çalışmamızın bulguları da bu hipotezi desteklemektedir.

Bununla birlikte, normal örnekler ile karşılaştırıldığında sperm kalitesi düşük olan örneklerde kriyoprezervasyon kaynaklı DNA hasarının ve hücre ölümüne yatkınlığın arttığı gözlenmiştir (112). Bu bulgu, membran hasarı olan ve anomalili spermilerin normal yapıdaki spermle karşılaştırıldığında kriyoprezervasyon ve çözme süreçlerinden kaynaklanan stresi tolere edememesi ve süreç sonunda normal spermilerin sağkalım oranlarının daha yüksek olması ile açıklanabilir. Ek olarak, infertil erkeklerde dondurma sonrası sperm DNA hasarının daha yüksek olarak bulunmasının nedenlerinden birisi düşük kaliteli örneklerde sperm kromatin kondansasyon oranının daha düşük olması şeklinde açıklanmıştır (117).

Birçok literatür kriyoprezervasyonun genetik bir sonucu olmadığını göstermektedir. Bazı literatürler, kriyoprezervasyon ile defektif spermilerin ortadan kaldırıldığı iddialarının belirtisi olarak da dondurulmuş spermle yapılan inseminasyonlarda spontan düşüklüklerin ve doğum defektlerinin daha az olmasını göstermektedir. Birçok araştırmacı, kriyoprezervasyondan önce ve sonra kromozomal anomalileri arasında belirgin fark olmadığını ve kriyoprezervasyona bağlı olarak seks oranlarında bir değişiklik olmadığını bildirmektedir. İnsan spermatozoası üzerine kriyoprezervasyonun sitogenetik etkisi, hamster oositi kullanılarak insan kromozomu elde edilerek araştırılmış ve kromozomal anomali

sıklığında bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir. Karşıt olarak, bazı literatürler, donmuş spermle yapılan artifisyel inseminasyonda trizomik doğum sıklığının arttığını bildirmektedir. Kriyoliteratürde, kriyoprezervasyona bağlı doğrudan zarar verici genetik sonuçların olduğuna dair elde kuvvetli bulgu bulunmamaktadır (35, 55, 58, 118-123).

Kriyoprezervasyondan sonra ilk olarak belirlenen hasarın yanı sıra spermilerin fertilizasyon işlemine kadar ilerleyen süre içerisindeki sağkalım oranları da önem taşımaktadır. Örneğin, dondurma-çözme işleminden sonra ilk 4 saatte DNA hasarının arttığı gözlenmiş ve bu nedenle de çözülen sperm için bir an önce kullanılması gerektiği öne sürülmüştür (124).

Kriyoprezervasyonun kesin olarak DNA hasarına neden olup olmadığı ya da hasar miktarı konusunda henüz kesin bir fikir birliğine varılmamıştır. Di Santo ve arkadaşlarının (125) da özetlediği gibi kriyoprezervasyonun DNA hasarı üzerine etkisini araştıran çalışmalar sonuçlarına göre üç farklı gruba ayrılmaktadır. Çalışmaların büyük bir kısmı kriyoprezervasyonun, bizim çalışmamızda olduğu gibi DNA hasarına neden olduğunu savunurken (126,127), bir kısım araştırmacı ise bu sonuçların eşlik eden faktörlerle bağlantılı olduğunu göstermişlerdir (128, 129). Diğer bir grup araştırmacı ise kriyoprezervasyonun DNA hasarına neden olmadığını öne sürmektedir (130, 131). Bununla birlikte, DNA hasarının kriyoprezervasyon tekniği ile değil taze örnekteki DNA fragmentasyon oranı ile ilişkili olduğunu gösteren sonuçlar da bulunmaktadır (132). Bu çalışmalar incelendiğinde, sonuç farklılığının olası sebepleri şu şekilde sıralanabilir:

- Çalışma gruplarındaki örnek sayılarının farklılığı
- Dondurma ve çözme prosedürlerinin farklılığı
- DNA bütünlüğünün belirlenmesinde kullanılan genetik testlerin farklılığı
- Dondurma öncesi kullanılan sperm hazırlama tekniklerinin farklılığı

Literatürde moleküler ve genetik düzeyde ortaya çıkan değişiklikleri belirlemek amacıyla sperm kriyoprezervasyonundan sonra apoptoz bulguları da

araştırılmış fakat bu konuda tam bir fikir birliğine ulaşılamamıştır. Apoptoz bulgularından en önemlisi olan DNA hasarı, bazı araştırmacılar tarafından kriyoprezervasyon sonrasında anlamlı derecede artmış olarak bildirilirken bazı araştırmacılar farklı görüşler bildirmişlerdir. Donnelly ve arkadaşlarının taze semen ile hazırlanmış sperm örneklerinde DNA bütünlüğünü dondurma öncesi ve sonrasında araştırmış ve seminal plazma içindeki spermin yani semenin direk dondurulmasının çözme sonrası DNA btnlğne daha az zarar verdiğini göstermişlerdir. Bunun nedeni olarak da semende bulunan antioksidanları ileri sürmüşlerdir (133).



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Normal DNA yapısına sahip sperm, fertilizasyonun gerçekleşmesi, sağlıklı bir embriyo gelişimi ve gebeliğin gerçekleşmesi için gereklidir. DNA fragmantasyonuna sahip olan spermiler ile döllenmiş embriyoların gelişimi sırasında genellikle duraklama gözlenmiştir. Bu sebeple DNA yapısının bütünlüğünün korunması Yardımcı Üreme Yöntemleri için önemlidir.

IVF laboratuvarlarında gerektiğinde sperm kriyoprezervasyon tekniğine başvurulmaktadır. Yaptığımız çalışmada sperm DNA fragmantasyonunun kriyoprezervasyon ile olan ilişkisi incelenmiştir. Spermdeki DNA fragmantasyonu, kriyoprezervasyon öncesinde ve sonrasında değerlendirilmiş olup, fragmantasyon oranları karşılaştırıldığında kriyoprezervasyondan sonra bu oran yaklaşık %15 artmıştır ve $p < 0,001$ değeri istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

Elde ettiğimiz sonuç ve istatistiksel veriler ışığında kriyoprezervasyonda rol alan moleküler mekanizmaların aydınlatılması kriyoprezervasyon sonrasında ortaya çıkan olumsuz etkilerin azaltılması ya da yok edilmesi yönünde yeni çalışmaların geliştirilmesinde fayda sağlayacaktır. Kriyoprezervasyonun sperm DNA fragmantasyonuna neden olması dolayısıyla kriyoprotektan maddelerin geliştirilmesi ve yeni tekniklerin uygulanması sperm DNA hasarını en aza indirebilir. Kriyoprezervasyonun spermin DNA hasarını artırdığını ileri süren araştırmacıların hiçbiri bu durumu indükleyen mekanizmayı aydınlatamamıştır.

Bu konularda daha kapsamlı moleküler, kontrollü randomize çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Agarwal, A., Allamaneni SS. (2005). Sperm DNA Damage Assesment: Atest Whose Time Has Come [Sperm DNA Hasarı Değerlendirme]. *Fertil Steril*, 84:850-853.
2. Centola, G., Ginsburg, K. (1996). Evaluation and Treatment Of The Infertile Male [Erkek İnfertilitesi Tedavi ve Değerlendirmesi]. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
3. Kjersten, L., Larson-Cook, Ph.D., John, D., Brannian, Ph.D., Keith A. Hansen, M.D. (October 2003). *Fertility and Sterility*, Vol. 80, No. 4.
4. Mehdi Benchaib^{1,2,3}, Vale Árie Braun², Jacqueline Lornage^{1,2}, Samia Hadj¹, Bruno Salle^{1,2}, Herve Á Lejeune^{1,2} and Jean Francois Gue Árin^{1,2}. *Human Reproduction* Vol.18, No.5 pp. 1023-1028, 2003.
5. Stephanie, Lopes, M. Sc., Jian-Guo Sun, Ph.D., Andrea Jurisicova, Ph.D., Jim MERiano, B.Sc., and Robert F. Casper, M.D. *Fertility and Sterility* Vol.69, No.3, March 1998.
6. Evenson, D., Wixon, R. (2006). Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online* 12, 466-472.
7. Sakkas, D. (1999). The Use Of Blastocyst Culture To Avoid Inheritance Of An Abnormal Paternal Genome After ICSI [Anormal Baba Genomunu Önlemek İçin ICSI'den Sonra Blastokist Kltrn Kullanmak]. *Hum Reprod*;14:4-5.
8. Evenson, DP., Jost, LK., Marshall, D., Zinaman, MJ., Clegg, E., Purvis, K., et al. (1999). Utility Of The Sperm Chromatin Structure Assay As A Diagnostic and Prognostic Tool In The Human Fertility Clinic [İnsan Fertilit Kliniklerinde Tanısal ve Prognostik olarak Sperm Kromatin Yapısından Yararlanmak]. *Hum Reprod*, 14:1039-1049.
9. Larson, KL., DeJonge, CJ., Barnes, AM., Jost, LK., Evenson, DP. (2000). Sperm Chromatin Structure Assay Parameters As Predictors Of Failed Pregnancy Following Assisted Reproductive Techniques [Yardımla reme Tekniklerinde Sperm Kromatin

Yapısı Testi Takip Eden Başarısız Gebeliklerin Belirleyicisidir]. *Hum Reprod*, 15:1717-1722.

10. Spano, M., Bonde, JP., Hjollund, HI., Kolstad, HA., Cordelli, E., Leter, G. (2000). Sperm Chromatin Damage Impairs Human Fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team [Sperm Kromatin Hasarı İnsan Fertilitisini Bozar. Danimarka Birinci Gebelik Planlama Ekibi]. *Fertil Steril*, 73:43-50.

11. Edwards, RG., Beard, HK. (1999). Is the succes of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts? *Hum Reprod*, 14:1-4.

12. Zini, A., Bielcki, R., Phang, D., Zenzes, MT. (2001). Correlations Between Two Markers of Sperm DNA Integrity, DNA Denaturation, DNA Fragmentation in Fertile and Infertile Men [Fertil ve İnfertil Erkeklerde DNA fragmentasyonu, DNA denatürasyonu ve DNA Bütünlüğü]. *Fertil Steril*, 75:674-677.

13. Irvine, DS., Twigg, JP., Gordon, EL., Fulton, N., Milne, PA., Aitken, RJ. (2000). DNA Integrity In Human Spermatozoa: Relationships With Semen Quality [İnsan Spermatozasında DNA Bütünlüğü: Semen Kalitesiyle Olan İlişki]. *J. Androl*, 21:33-44.

14. Ellington, JE., Evenson, DP., Wright, RW Jr., Jones, AE., Schneider, CS., Hiss, GA., et al. (1999). Higher-quality Human Sperm in a Sample Selectively Attach to Oviduct (fallopian tube) Epithelial Cells In Vitro [İn Vitro Epitel Hücrelerinde Yüksek Kaliteli İnsan Sperm Seçimi]. *Fertil Steril*, 71(5):924-926.

15. Poirot, C., Sitbon, L., Fortin, A., Berthaut, I., Jaudi, S., Anastacio, A., Prades, M. *Presse Med.* 2013 Nov;42(11):1513-20. doi: 10.1016/j.lpm.2013.06.019. Epub.

16. Sadler, TW. (1985). Gametogenesis [Gametogenezis]. *Langman's Medical Embryology*. 5.th ed., Baltimore, Williams and Wilkins.

17. Grudzinskab, JG., Yovich, JL. (1995) Gametes- The Spermatozoon [Gametler-Sperm]. 1sh ed., Cambridge University Pres.

18. Knobil, E., Neill, J., et al. (1998). *The Physiology of Reproduction* [Üreme Fizyolojisi]. 1st ed., New York, Raven Press.

19. Kretzer, DM de., Loveland, KL., Meinhardt, A., et al. (1998). Spermatogenesis. Current Theory and Practice of ICSI [Spermatogenezis. Güncel Teorisi ve ICSI Uygulaması]. Hum Rprod, 13 (Suppl 1):1.
20. Reinsbury, PA., Viniker, DA. (1997). Practical Guide to Reproductive Medicine [Üreme Tıbbı Uygulama Rehberi]. 1 st ed., New York-London, The Parthenon Publishing Group.
21. Means, AR., Fakunding, JL., Huckins, C. (1976). Folicle Stimulating Hormone, Sertoli cell and Spermatogenesis [Folikül Uyarıcı Hormon, Sertoli Hücresi ve Spermatogenezis]. Res Prog Horm Res, 32:447.
22. Fawcett, DW. (1975). The Mammalian Spermatozoa [Memeli Spermatozoası]. Dev Biol, 44:394.
23. Clermont, Y. (1972). Genetics of Spermatogenesis In Mammals. Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonium Renewal [Memelilerdeki Genetik Spermatogenezis. Seminifer Epitelyum Siklusu ve Spermatogonyum Yenilenmesi]. Physiol Rev, 52:198.
24. Soderstrom, RO., Andersson, LC. (1981). Identification of The Autoantigen-Expressing Cells In Rat Testis [Sıçan Testisinde Otoantikoruyla-salgılayan Hücrelerin Tanımlanması]. Exp Mol Pathol, 35:332-337.
25. MacLeod, J. (1971). Human Male Infertility [Erkek İnfertilitesi]. Obstet Gynecol Surv, 25:315.
26. Mosher, WE. (1985). Reproductive Impairments in the United States [Amerika Birleşik Devletleri'nde Üreme Bozuklukları]. 1965-1982, Demograohy, 22:415.
27. Simmons, FA. (1956). Human Infertility [İnsan İnfertilitesi]. N Eng J Med, 225:1440.
28. World Health Organization. (1999). WHO Laboratory Manual For the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction [İnsan Semen ve Sperm-servikal Mukus Etkileşimi İncelenmesi İçin DSÖ Laboratuvar El Kitabı]. Cambridge University Press. Fourth Edition.

- 29.** Wetzels, AMM., Bras, M., Lens, JW., Piederiet, MH., Rijnders, PM., Zeilmaker, GH. (1996). Laboratory aspects of in vitro fertilization. Cryopreservation/Theory, 229-244.
- 30.** Delilbaşı, L. (2008). A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık, 229-258.
- 31.** Gardner, DK. (2007). In Vitro Fertilization- A Practical Approach., Informa healthcare [In Vitro Fertilizasyon- Pratik Yaklaşım, Sağlık]. New York, London.
- 32.** Watson, PF. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. Reprod Fertil Dev, 7:871-91.
- 33.** Carson, SA., Gentry, WL., Smith, AL., Buster, JE. (1991). Feasibility of semen collection and cryopreservation during chemotherapy. Hum Reprod, 6:992-4.
- 34.** Verheyen, G., De Croco, I., Tournaye, H., et al. (1995). Comparison of four mechanical methods to retrieve spermatozoa from testicular tissue. Hum Reprod, 10:2956-9.
- 35.** Davis, NS. (1997). The hows, whys and when of sperm cryopreservation . In: ASRM 30th Postgraduate Program Course on Andrologic Practices; pp. 83-9, American Society for Reproductive Medicine, Burmingham, Alabama, USA.
- 36.** Averette, HE., Boike, GM., Jarrell, MA. (1990). Effects of cancer chemotherapy on gonadal function and reproductive capacity. Cancer J Clin, 40:199-209.
- 37.** Costabile, RA. (1993). The effects of cancer and cancer therapy on male reproductive function. J Urol, 149:1327-30.
- 38.** Arnon, J., Meirow, D., Lewis-Roness, H., Ornoy, A. (2001). Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. Hum Reprod Update, 7:394-403.
- 39.** Lee, SJ., Schover, LR., Partrid, AH., et al. (2006). American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patient. J Clin Oncol, 24: 2917-31.

40. Oktay, K., Meirow, D. (2007). Planing for fertility presevation before cancer treatment. *Sexuality, Reproduction and Menopause (srm)- A Clinical Publication of American Society of Reproductive Medicine*, 5(1):17-22.
41. Delilbaşı, L. (2008). A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık, 229-258.
42. Cıncık, M. (2203). Sperm Kriyoprezervasyonu. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(1): 100-106.
43. Editör: Ateş Kadioğlu.(2011). Who Laboratuvar El Kitabı. 5. Basım, İstanbul Nobel Yayıncılık, 169-176).
44. Tunç, L., Bozkırlı, İ. (2013). Sperm Dondurma: Yardımcı Üreme Tekniklerindeki Uygulamalar, www.androloji.org.tr/file/27.Say_Ä±%20Pdf/infertilite4.pdf.
45. Bunge, RG. (1953). Sherman JK. Fertilization capacity of frozen human spermatozoa. *Nature (London)*, 172:767-8.
46. Üroonkoloji Bülteni 2014;13:176-181.
47. Brinsden, PR. (2005). *Textbook of In Vitro fertilization and Assisted Reproduction*.3rd. ed, Taylor&Francis, London and New York.
48. Mazur, P. (1963). Kineticsof water from cells at subzero temoeratures and the likelihood of intracellular freezing. *J Genet Physiol*, 47:347.
49. Mazur, P. (1963). Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likehood of intracellular freezing. *J Gen Physiol*, 47:347-69.
50. Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 247:C125-42.
51. Wolfinbarger, L., Sutherlan, V., Braendle, L, Sutherlan G. (1996). Engineering aspects of cryobiology. *Adv Cryogenic Eng*, 41:1-12.
52. Gao, DY., Mazur, P., Crister, JK. (1997). Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow A, Crister JK, eds. *Reproductive Tissue Banking*. San Diego, CA: Academic Press; pp. 263-328.

- 53.** Leibo, SP., Bradley, L. (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon C, ed. *The Male Gamete*. Vienna II: Cache River Press; pp. 501-16.
- 54.** Kaminski, J., Centola, G., Lamb, DJ. (2003). Sperm cryopreservation. *Androl Embryol Rev Course*, 13.1-13.8.55. Sophonsritsuk, A., Rojanasakuln, A. (2003). Cryoprezervasyon of human spermatozoa. *Ramathibodi Med J*, 126:156-62.
- 56.** Weidal, L., Prins, GS. (1987). Cryosurvival of human spermatozoa frozen in eight different buffer systems. *J Androl*, 8:41.
- 57.** Crister, JK., et al. (1998). Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril*, 50:314-20.
- 58.** Leibo, SP., Picton, HM., Gosten, RG. (2001). Cropreservation of human spermatozoa. In: *Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction: A WHO Sponsored Symposium, Switzerland, September 17-21, 2001*, World Health Organization, WHO headquarters, Geneva, Switzerland.
- 59.** Centola, GM. (2002). The art of donor gamete cryobanking: current considerations. *J Androl*, 174-9.
- 60.** AATB (1995). *Standards for Semen Banking*. Revision draft. MCLean, VI: American Association of Tissue Bank.
- 61.** Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, II., et al. (2004). Cryoprotectant-free cryoprezervation of human sperm by vitrification and freezing in vapour: effect on motility, DNA integrity and fertilization ability. *Biol Reprod*, 71:1167-73.
- 62.** Centola, Gm., Raubertas, RF., Mattox, JH. (1992). Cryoprezervation of human semen. Comparison of cryopresevations, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. *J Androl*, 13:283-8.
- 63.** Fuller, B., Paynter, S. (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *RBM Online*, 9(6): 680-91.
- 64.** Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S., et al. (1996). Cryoprezervation of spermatozoa: a 1996 review. *Hum Reprod*, 2:553-9.

- 65.** Crister, JK. (1998). Current status of semen banking in the USA. *Hum Reprod*, 13(Suppl. 2):55-67.
- 66.** Taylor, PJ, et al. (1982). A comparison of freezing and thawing methods for the cryopreservation of human semen. *Fertil Steril*, 37:100-3.
- 67.** McLaughlin, EA. (1999). British Andrology Society guidelines for the screening of semen donor for donor insemination. *Hum Reprod*, 14:1823-6.
- 68.** Robinson, J. (1975). Effects of age and season on sexual behavior and plasma testosterone concentrations of laboratory rhesus monkeys. *Biol Reprod*, 13:203-10.
- 69.** Wickings, E., Nieschlag, R. (1980). Seasonality in endocrine and exocrine testicular function in adult rhesus monkey. *Int J Androl*, 13:3:87-104.
- 70.** Elder, K., Dale, B. (2013). *In-Vitro Fertilization*. 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti., 191-215.
- 71.** Wetzels, AMM., Bras, M., Lens, JW., Piederiet, MH., Rijnders, PM., Zeilmaker, GH. (1996). Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/ Theory*, 229-244.
- 72.** Morris, GJ. (1999). Acton E. Avery S. A novel approach to sperm cryopreservation. *Hum Reprod*, 14:1013-21.
- 73.** Paoli, D., Lombardo, F., Lenzi, A., Gandini, L. (2014). Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin Structure. In *Advances in Experimental Medicine and Biology 791: Genetic Damage in Human Spermatozoa* Eds: Baldi E, Muratori M. Springer, New York.
- 74.** Said, TM., Gaglani, A., Agarwal, A. (2010). Implication of apoptosis in sperm cryo-injury. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(4):456-462.
- 75.** Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H, Darzynkiewicz, Z. (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*, 207:202-205.
- 76.** Manicardi, GC., Bianchi, PG., Pantano, S., Azzoni, P., Bizzaro, D., Bianchi, U., Sakkas, D. (1995). Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human

spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod*, 52:864-867.

77. Bianchi, PG., Manicardi, GC., Urner, F., Campana, A., Sakkas, D. (1996). Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, 2:139-144.

78. Sakkas, D. (1999). The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod*, 14:4-5.

79. Shen, H., Ong, C. (2000). Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med*, 28:529-536.

80. Sakkas, D., Seli, E., Bizzaro, D., Tarozzi, N., Manicardi, GC. (2003). Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodeling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*, 7:428-432.

81. 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*, 69:528-532.

82. Aitken, RJ and De Luliis, GN. (2007). Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod BioMed online*, 14;6:727-733.

83. Shen, HM., Dai, J., Chia, SE., Lim, A., Ong, CN. (2002). Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod*, 17:1266-1273.

84. Said, TM., Agarwal, A., Sharma, RK., Thomas, AJ., Sika, SC. (2005). Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by II-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril*, 83:95-103.

85. Muratori, M., Piomboni, P., Baldi, E., Filimberti, E., Pecchioli, P., Moetti, E et al. (2000). Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl*, 21;903-12.

- 86.** Daris, B., Goropevsek, A., Hojnik, N., Vlaisavljevic, V. (June 2009). Sperm morphological abnormalities as indicators of DNA fragmentation and fertilization in ICSI. *Arch Gynecol Obstet*, Published online.
- 87.** Vicari, E., De Palma, A., Burrello, N., Longo, G., Grazioso, C., Barone, N., et al. (2003). Absolute polymorphic teratozoospermia in patients with oligoasthenozoospermia is associated with an elevated sperm aneuploidy rate. *J Androl*, 24:598-603.
- 88.** Calogero, AE., Burrello, N., De Palma, A., Barone, N., D'Agata, R., Vicari, E. (2003). Sperm aneuploidy in infertile men. *Reprod BioMed Online* 6:310-317.
- 89.** Bach, O., Glander, HJ., Scholz, G., Schwarz, J. (1990). Electrophoretic patterns of spermatozoal nucleoproteins (NP) in fertile men and infertility patients and comparison with NP of somatic cells. *Andrologia*, 22:549-555.
- 90.** Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., et al. (2003). Sperm DNA Fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod*, 18:1023-1028.
- 91.** Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, MA., Fava, L., Flamigni, C., et al. (2006). Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*, 21:2876-2881.
- 92.** Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R. et al. (2004). Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertil Steril*, 81:965-972.
- 93.** Lewis, SEM., Aitken, RJ. (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*, 322:33-41.
- 94.** Zini, A., Meriano, J., Kader, K., Jarvi, K., Laskin, CA., Cadesky, K. (2005). Potential adverse effect of sperm DNA damage on embryo quality after ICSI. *Hum Reprod*, 20:3476-3480.
- 95.** Sun, JG., Jurisiceva, A., Casper, RF. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*, 56:602-607.

- 96.** 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*, 69:528-532.
- 97.** Cebesoy, FB., Aydos, K., Unlu, C. (2006). Effects of Sperm Chromatin Damage on Fertilization Ratio and Embryo Quality Post-ICSI. *Arch Androl*, 52:397-402.
- 98.** Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., Guerin, JF. (2003). Sperm DNA Fragmentation Decreases The Pregnancy Rate In An Assisted Reproductive Technique. *Hum Rep*, 18:1023-1028.
- 99.** Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, MA., Fava, L., Flamigni, C., Coticchio, G. (2006). Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod*, 21:2876-2881.
- 100.** Seli, E., Gardner, DK., Schoolcraft, WB., MoVatt, O., Sakkas, D. (2004). Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 82:378-383.
- 101.** Tarozzi, N., Bizzaro, D., Flamigni, C., Borini, A. (2007). Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, 14:746-757.
- 102.** Ahmadi, A., Ng, SC. (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool*, 284:696-704.
- 103.** Fernandez et al., *J Androl* 24:59-66, 2003; *Fertil Steril* 84:833-842, 2005.
- 104.** Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil Steril*. 2006 Nov;86(5 Suppl 1):S35-7.
- 105.** Simon, L., Brunborg, G., Stevenson, M., Lutton, D., McManus, J., Lewis, SE. (2010). Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod*, 25(7):1594-1608.
- 106.** Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., García-Herrero, S., Remohí, J., Fernandez, JL. (Jan 2011). Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril*, 95(1):124-8.

- 107.** Lewis, SEM. (2014). Sperm DNA fragmentation and base oxidation. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology 791: Genetic Damage in Human Spermatozoa* Eds: Baldi, E., Muratori, M. Springer, New York.
- 108.** Sawyer, DE., Mercer, BG., Wiklendt, AM., Aitken, RJ. (2003). Quantitative of genespecific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation Research*, 529:21-34.
- 109.** Duru, NK., Morshedi, MS., Schuffner, A., Oehninger, S. (2001). Cryopreservation Thawing Of Fractionated Human Spermatozoa Is Associated With Membrane Phosphatidylserine Externalization and Not DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, 22(4):646–651.
- 110.** Thomson, LK., Fleming, SD., Aitken, RJ., De Iuliis, GN., Zieschang, JA., Clark, AM. (2009). Cryopreservation-induced Human Sperm DNA Damage Is Prodominantly Mediated by Oxidative Stress Rather Than Apoptozis [Kriyoprezervasyon Kaynaklı Sperm DNA Hasarı Ağırlıklı Oksidatif Stres Yerine Apoptoz Kaynaklı]. *Hum Reprod*, 24(9):2061-70.
- 111.** Paoli, D., Lombardo, F., Lenzi, A., Gandini, L. (2014). Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin Structure. In *Advances in Experimental Medicine and Biology 791: [Sperm Kriyoprezervasyonu: Kromotin Yapısına Etkileri. Tanısal Tıp ve Biyolojiye Katkıları]*. Genetic Damage in Human Spermatozoa Eds: Baldi E, Muratori M. Springer, New York.
- 112.** Said, TM., Gaglani, A., Agarwal, A. (2010). Implication of Apoptosis In Sperm Cryoinjury [Kriyo Hasarlarının Apoptoz İçeriği]. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(4):456–462.
- 113.** Sun, JG., Jurisicova, A., Casper, RF. (1997). Detection of Deoxyribonucleic Acid Fragmentation In Human Sperm: Correlation With Fertilization In Vitro [İnsan Sperminde Sperm DNA Fargmantasyonunun Belirlenmesi: IVF ile İlişkisi]. *Biol Reprod*, 56(3):602-607.
- 114.** Simon, L., Proutski, I., Stevenson, M., Jennings, D., McManus, J., Lutton, D. et al. (2013). Sperm DNA Damage Has Negative Assosation With Live Birth Rates After IVF [Sperm DNA Hasarı IVF'ten sonra Canlı Doğum Oranlarını Negatif Etkilemektedir]. *Reprod Biomed Online*, 26:68-78.

- 115.** Simon, L., Lutton, D., McManus, J., Lewis, SE. (2011). Sperm DNA Damage Measured by Alkaline Comet Assay as an Independent Predictor of Male Infertility and In Vitro Fertilization Success [Erkek Kısırlığının Bağımsız Bir Belirleyicisi Olarak ve İn Vitro Fertilizasyon Başarısı Alkalın Comet Testi ile Ölçülen Sperm DNA Hasarı]. Fertil Steril 2011;95:665-657.
- 116.** Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., Gil-Salom, M., Remohí, J., Fernandez, JL. (2009). Sperm DNA Fragmentation Levels in Testicular Sperm Samples From Azoospermic Males as Assessed by The Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test [Azospermik Erkeklerde Testiküler Biyopsi Sonrasında Sperm Fragmentasyonu Sperm Kromatin Testi ile Değerlendirildi]. Fertil Steril, 92:1638-1645.
- 117.** Bianchi, PG., Manicardi, GC., Bizzaro, D., Bianchi, U., Sakkas, D. (1993). Effect of Deoxyribonucleic Acid Protamination On Fluorochole Staining and In Situ Nick-translation of Murine and Human Mature Spermatozoa [Fluorochole Boyanma ve Kemirgen ve İnsan Olgun Sperm Yerinde Nick-translation İçinde Deoksiribonükleik Asit Protamination Etkisi]. Biol Reprod, 49(5):1083-1088.
- 118.** Mattei, JF., Lemarec, B. (1983). Genetic Aspects of Artificial Insemination by Donor (AID): Indications, Surveillance and Results [Donör ile Suni Tohumlama Genetik Yönleri (AID): Endikasyonları, Gözetim ve Sonuçlar]. Clin Genet, 23:132-8.
- 119.** Chernos, J., Martin, H. (1989). Acytogenetic Investigation of the Effects of Cryopreservation on Human Sperm [İnsan Sperm Üzerindeki Asitogenetik İncelemenin Etkileri]. Am J Hum Genet, 45: 766-77.
- 120.** Martin, RH, et al. (1991). Effect of Cryopreservation on the Frequency of Chromosomal Abnormalities and Sex Ratio in Human Sperm [Kriyoprezervasyonun Sperm Kromozomal Anomali Sıklığı ve Cinsiyet Oranlarına Etkisi]. Mol Reprod Dev, 30:159-63.
- 121.** Donnelly, E., Steele, K., McClure, N, et al (2001). Assesment of DNA Integrity and Morphology of Ejaculated Sperm Before and After Cryopreservation [Sperm Kriyoprezervasyon Öncesi ve Sonrasında DNA Bütünlüğü Değerlendirilmesi]. Hum Reprod, 16:1191-9.

- 122.** Rizk, B., Edwards, RG., Nicolini, U., et al. (1991). Edwards Syndrome after The Replacement of Cryopreserved Thawed Embryos [Dondurulmuş Çözölmüş Embriyo Değişimi Sonrasında Edwards Sendromu]. *Fertil Steril*, 55(1): 208-210.
- 123.** Rizk, B. (2007). Outcome of Assisted Reproductive Technology [Yardımla Üreme Teknolojilerinin Sonuçları]. In: Rizk B, Abdalla, H., eds. *Infertility and Assisted Reproductive Technology [İnfertilite ve Yardımla Üreme Teknolojileri]*. Oxford, UK:Health Press. pp. 214-16.
- 124.** Gosálvez, J., Cortés-Gutierrez, E., López-Fernández, C., Fernández, JL., Caballero, P., Nuñez, R. (2009). Sperm Deoxyribonucleic Acid Fragmentation Dynamics in Fertile Donors [Fertil Donörlerde Sperm DNA Dinamięi]. *Fertil Steril*, 92(1):170-3.
- 125.** Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., Borini, A. (2012). Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity and Implications for ART [İnsan Sperm Kriyoprezervasyonu: Tekniğin Güncelleştirilmesi, DNA Bütönlüğüne Etkileri ve YÜT'deki yeri]. *Adv Urol*, 854837.
- 126.** Spanò, M., Cordelli, E., Leter, G., Lombardo, F., Lenzi, A., Gandini, L. (1999). Nuclear Chromatin Variations In Human Spermatozoa Undergoing Swim-up and Cryopreservation Evaluated By The Flow Cytometric Sperm Chromatin Structure Assay [İnsan Spermindeki Nöklear Kromotin Varyasyonları Kriyoprezervasyon ve Yıkamadan Sonra Akım Sitometri Sper Kromotin Yapı Testi İle Değerlendirildi]. *Molecular Human Reprod.*, 5(1):29–37.
- 127.** De Paula, TS., Bertolla, RP., Spaine, DM., Cunha, MA., Schor, N., Cedenho AP. (2006). Effect Of Cryopreservation On Sperm Apoptotic Deoxyribonucleic Acid Fragmentation In Patients With Oligozoospermia [Kriyoprezervasyonun Oligospermik Hastalardaki Sperm DNA Apoptozuna Etkileri]. *Fertil Steril*, 86(3):597–600.
- 128.** Kalthur, G., Adiga, SK., Upadhya, D., Rao, S., Kumar, P. (2008). Effect Of Cryopreservation On Sperm DNA Integrity In Patients With Teratosperm [Kriyoprezervasyonun Teratospermik Hastalardaki Sperm DNA Bütönlüğüne Etkisi]. *Fertil Steril*, 89(6): 1723-1727.

- 129.** Donnelly, ET., McClure, N., Lewis, SE. (2001). Cryopreservation Of Human Semen and Prepared Sperm: Effects On Motility Parameters and DNA Integrity [Dondurulmuş İnsan Sperm ve Hazır Sperm DNA Bütünlüğü ve Hareketi]. Fertil Steril,76(5):892–900.
- 130.** Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, II., Rahimi, G., Schöndorf, T., Mallmann, P. et al. (2004). DNA Integrity and Motility Of Human Spermatozoa After Standard Slow Freezing Versus Cryoprotectant-free Vitrification [Standart Yavaş Dondurma Karşı Vitrifikasyonun Sperm DNA Bütünlüğü ve Motilitesi]. Human Reprod. 2004;19(4):932–39.
- 131.** Paasch, U., Sharma, RK., Gupta, AK., Grunewald, S., Mascha, EJ., Thomas, AJ. et al. (2004). Cryopreservation and Thawing Is Associated With Varying Extent Of Activation Of Apoptotic Machinery In Subsets Of Ejaculated Human Spermatozoa [Kriyoprezervasyon ve Çözme İşlemi İnsan Sperm Alt Apoptotik Makine Aktivasyon Kapsamıyla İlişkilidir]. Biology of Reprod., 71(6):1828–1837.
- 132.** Thomson, LK., Fleming, SD., Schulke, L., Barone, K., Zieschang, JA., Clark, AM. (2009). The DNA Integrity Of Cryopreserved Spermatozoa Separated For Use In Assisted Reproductive Technology Is Unaffected By The Type Of Cryoprotectant Used But Is Related To The DNA Integrity Of The Fresh Separated Preperation [Yardımcı Üreme Teknolojisinde Kullanılmak Üzere Ayrılan Kriyoprezerve Sperm DNA Bütünlüğü, Kullanılan Dondurarak Saklama Tipine Göre Etkilenmez Ama Taze örneğin DNA bütünlüğü ile ilgilidir]. Fertil Steril, 92(3):991-1001.
- 133.** Donnelly E. T., McClure N., Lewis SE. (2001). Criyoprezervation of Human Semen and Prepared Sperm: Effects on Metility Parameters and DNA Integrity. Fertility And Sterility., 76(5), 892-900.

