

T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

**NORMOZOOSPERMİK VAKALARDA FARKLI DONDURMA
PROTOKOLLERİNİN SPERM GERİ KAZANIMI, VİTALİTESİ VE DNA
FRAGMENTASYONU YÖNÜNDEN KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tuba Varlı Yelke

1. Tez Danışmanı
Prof. Dr. Tülay İrez

2. Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ersi Kalfoğlu

İSTANBUL
Temmuz 2015

**T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi: 14/07/2015

Prof. Dr. Tülay İrez

**Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr. Ersi Abacı Kalsoğlu
İstanbul Bilim Üniversitesi
Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Melike Erkan
İstanbul Üniversitesi**

**Prof. Dr. Ali Demir Tiryaki
Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

**Prof. Dr. Gül Baktır
Yeni Yüzyıl Üniversitesi**

Her zaman yanımda olan Aileme ithaf ediyorum

İÇİNDEKİLER

Tez Onayı	ii
İçindekiler.....	iv
Şekiller Listesi.....	ix
Tablolar Listesi.....	vii
Semboller / Kısaltmalar Listesi.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Spermatogenez.....	3
2.1.1. Golgi Fazı.....	3
2.1.2. Akrozomal Faz.....	4
2.1.3. Olgunlaşma Fazı.....	4
2.2. Apoptozis.....	6
2.3. Dondurma-Çözme (Kriyoprezervasyon).....	8
2.4. Kriyoprotektanlar.....	10
2.4.1. Permeabl (internal) kriyoprotektanlar.....	11
2.4.2. Non-permeabl (eksternal) kriyoprotektanlar.....	11
2.4.3. Yumurta sarısı.....	11
2.4.4. Diğer kriyoprotektif ajanlar.....	11
2.5. Mikroenjeksiyon (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu).....	12
2.6. Testiküler Sperm Eldesi.....	13
2.6.1. Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) Uygulaması.....	13
2.6.2. Testiküler Sperm Aspirasyonu (TESA).....	14
2.7. Sperm Hazırlama Teknikleri.....	15
2.7.1. Swim-Up Tekniği.....	15
2.7.2. Dansite Gradient Tekniği.....	15

3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Çalışmaya Dahil Olan Vakaların Özellikleri.....	17
3.2. Konsantrasyon, Motilite ve Vitalite Değerlendirmesinde WHO 2010 Kriterleri.....	18
3.2.1. Sperm Konsantrasyon Değerlendirmesi.....	18
3.2.2. Sperm Motilite Değerlendirmesi	19
3.2.3. Sperm Vitalite Değerlendirmesi.....	20
3.3. Sperm Yıkama Teknikleri	21
3.3.1. Swim-Up Tekniği.....	21
3.3.2. Sperm Gradient Separasyon Tekniği	23
3.4. Sperm Dondurma-Çözme Teknikleri	25
3.4.1. Sperm Vitrifikasyonu ve Çözülmesi	25
3.4.1.1. Sperm Vitrifikasyonu	25
3.4.1.2. Vitrifikasyon ile Dondurulan Spermlerin Çözülmesi.....	26
3.4.2. Konvansiyonel Dondurma-Çözme İşlemleri	26
3.4.2.1. Dondurma İşlemi	26
3.4.2.2. Çözme İşlemi	26
3.5. DNA Fragmantasyonu Tayini	27
3.5.1. TUNEL Test Uygulama Protokolü	27
3.6. İstatistiksel Analiz.....	28
4. BULGULAR	29
4.1. Sperm Örneklerinin Konsantrasyon, Motilite ve Vitalite Bakımlarından Değerlendirilmesi	29
4.2. Semen Örneklerinin Hazırlık Öncesi ve Sonrasında DNA Fragmantasyonu Açısından Değerlendirilmesi.....	31
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ	36
7. ÖZET	37

8. SUMMARY	38
9. KAYNAKLAR	39
10. TEŞEKKÜR.....	42
11. ETİK KURUL KARARI.....	43
12.AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	46
13. ÖZGEÇMİŞ.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Spermatogenik hücre serisinin şematik gösterimi	5
Şekil 2-2: İnsan sperminin şematik gösterimi	6
Şekil 2-3: Kırık kromatin yapısının TUNEL metoduyla işaretlenmesi	8
Şekil 2-4: ICSI işlemi için kullanılan mikropipetler	12
Şekil 2-5: Mikroenjeksiyon işlemi	13
Şekil 2-6: TESE işlemi	14
Şekil 2-7: TESE işleminde diseksiyon	14
Şekil 2-8: TESA işlemi	15
Şekil 3-1: Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi	19
Şekil 3-2: Eozin-Y uygulaması sonrasında boyanan cansız ve boya almamış canlı spermelerin değerlendirilmesi	21
Şekil 3-3: Swim-up tekniği	23
Şekil 3-4: Sperm gradient separasyon tekniği	24
Şekil 3-5: ASD tekniği ile spermelerin inverted mikroskopta cryotopa yüklenmesi	25
Şekil 3-6: Cryotopa spermelerin yüklenmesi sonrası sıvı azot buharında -70°'ye soğutma işlemi	26
Şekil 4-1: Dondurma öncesi yapılan değerlendirmede kırmızı oklar DNA fragmentasyonu içermeyen; mavi oklar ise DNA fragmentasyonuna uğramış sperm hücrelerini göstermektedir	31
Şekil 4-2: Konvansiyonel yöntemiyle dondurulan örneklerin çözme sonrası TUNEL test değerlendirmesinde kırmızı oklar DNA fragmentasyonu içermeyen; mavi oklar ise DNA fragmentasyonuna uğramış sperm hücrelerini göstermektedir	32

Şekil 4-3: Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan örneklerin çözme sonrası TUNEL test değerlendirmesinde kırmızı oklar DNA fragmentasyonu içermeyen; mavi oklar ise DNA fragmentasyonuna uğramış sperm hücrelerini göstermektedir32

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Konsantrasyon, motilite ve vitalite değerlendirmesinde WHO 2010 kriterleri	17
Tablo 3-2: Neubauer kamarası kullanımında gerekli dilüsyon.....	19
Tablo 4-1: Çalışmaya katılan erkeklerin semen analizi sonuçları.....	29
Tablo 4-2: özme sonrası örneklerin konsantrasyon, motilite ve vitalite bakımından değerlendirilmesi	30
Tablo 4-3: özme işlemleri sonrası konvansiyonel ve SSF yöntemi kullanılan vakalar da TUNNEL test sonuçları.....	33

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ICSI: *Intracytoplasmic Sperm Injection* İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu

ROS: *Reactive Oxygen Species* Reaktif Oksijen Radikalleri

ASD: Az sayıda spermin dondurulması

YÜT: Yardımcı üreme teknikleri

ÜYTE: Üremeye Yardımcı Teknikler

TUNEL ya da TUNNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling

DNA: Deoksiribonükleik asit

TESE: Testiküler Sperm Extraksiyonu

TESA: Testiküler Sperm Aspirasyonu

PESA: Perkütan Sperm Aspirasyonu

dUTP: Deoksiuridin trifosfat

TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz

IVF: In vitro fertilizasyon

DMSO: Di-metil sulfoksit

PROH: Propan diol

PAF: Platelet aktivasyon faktörü

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*, Floresan boyası

HTF: *Human Tubal Fluid*, İnsan tubal sıvısı

HSA: *Human Serum Albumin*, İnsan serum albumini

OAT: Oligoastenozoospermi

WHO: *World Health Organization*, Dünya Sağlık Örgütü

PBS: *Phosphate buffered solution*, Fosfatlı Tuz Solüsyonu

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

BSA: *Bovine serum albumin* Sığır serum albümini

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kriyobioloji, 1949 yılında gliserolün kriyoprotektan olarak keşfi ile tarihteki yerini almıştır. Polge ve arkadaşları gliserol kullanımı ile ilk başarılı dondurmaya gerçekleştirmişlerdir Polge, Smith [1]. Kriyoprezervasyon işlemindeki amaç çok düşük ısıda canlı bir hücre veya dokunun, minimum hasarla ve fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır^{GH}. [2]. Zaman içinde kriyobioloji alanındaki gelişmeler kontrollü dondurma, hızlı dondurma ve vitrifikasyon tekniklerinin geliştirilmesi ve kullanılması ile sadece gamet hücrelerinin değil gonad dokularının da başarılı bir şekilde dondurularak saklanmasını mümkün kılmıştır.

1980'li yılların sonlarına doğru Yardımcı Üreme Tekniklerinin (YÜT) tüm dünyada yaygınlaşmaya başlaması ile birlikte gamet hücreleri ve embriyoların dondurularak saklanması ve daha sonra yapılacak uygulamalarda kullanılması işlemleri kriyobiolojinin önemli konularından olmuştur [3]. 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 [4]. 1964 yılında, insan sperm örneğinin gliserol ile dondurulup, sıvı nitrojen ile saklanması sonrası ilk canlı doğum gerçekleşmiştir [5].

Özellikle Palermo ve arkadaşları tarafından 1992 yılında İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonunun (ICSI) keşfi ile erkek kısırlığında yeni bir çığır açılmıştır [6]. Özellikle sperm konsantrasyonun 5 milyon/ml'nin altında olduğu şiddetli erkek kısırlığı vakalarında bu yöntemle başarılı gebelik oranları elde edilmiştir.

Sperm hücreleri günümüzde birçok ülkede sperm bankalarında saklanmaktadır. Ayrıca son yıllarda gamet hücreleri, kemoterapi-radyoterapi öncesi; testis cerrahisi öncesi gibi durumlarda fertilitte koruma amaçlı olarak dondurulmakta ve uzun yıllar saklanabilmektedir. Ek olarak kanal tıkanıklığına bağlı (obstrüktif) ve tıkanıklığa bağlı olmayan (non-obstrüktif) azospermik erkeklerde testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE), testiküler sperm aspirasyonu (TESA) ve perkutan sperm aspirasyonu (PESA) gibi farklı cerrahi yöntemlerle elde edilen sperm hücreleri dondurularak saklanabilmekte

ve ardışık yardımla üreme tekniği (YÜT) denemelerinde çözme işlemi sonrası kullanılabilir [7].

Sperm hücrelerinin çok az sayıda bulunabildiği bu durumlarda spermatozoayı konvansiyonel dondurma (freezing) yöntemleriyle saklamanın spermatozoa kaybına neden olduğu düşünülmektedir [8].

Sperm hücrelerinin dondurulmasına yönelik çalışmalarda, spermin donma hızını ve çözme sonrasında daha kolay kullanılabilmesi için farklı taşıyıcılar, birçok bilim adamı tarafından denenmiştir. Abdelhafez ve arkadaşlarının yaptığı sistematik derlemede spermatozoa dondurulması için 7 tanesi biyolojik olmayan ve 2 tanesi biyolojik olmak üzere 9 farklı taşıyıcı denenmiştir. Bu taşıyıcılar; boş zona pellusida [9,10]; straw, ministraw ve açık straw [11,12]; mikrodrop [12, 13]; ICSI pipeti [14]; volvox algleri [15]; aljinat küreler [16]; bakır çubuklar [17,18]; cryoloop [19] ve agaroz mikroküreleri [20] olarak özetlenebilir [9]. Biz de çalışmamızda konvansiyonel ve vitrifikasyon teknikleri kullanılarak dondurulan ejakülat örneklerinin çözme sonrası sperm geri kazanımı, motilite, vitalite ve DNA fragmentasyonu açısından farklılık içerip içermediğini ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spermatogenez

Spermatogenez, primitif germ hücrelerinin olgun spermelere dönüşmesini sağlayan bir süreçtir (Şekil 2-1). Germ hücrelerinin olgunlaşması pubertede başlayıp yaşlılık dönemine kadar devam eder. Puberteyle birlikte spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlarlar ve tip A spermatogonyumları oluştururlar. Tip A spermatogonyumların üretiminin başlaması spermatogenezin başlamış olduğunu gösterir. Bu hücreler belirli bir mitoz bölünme süreci sonunda tip B spermatogonyumları meydana getirirler. Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucunda primer spermatositler oluşur. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) içerirler. Oluşumlarından hemen sonra primer spermatositler birinci mayoz bölünmeye girerler ve yaklaşık 22 gün süren bir profaz evresi geçirirler. Profaz evresi sonunda mayoz bölünme hızlı bir şekilde tamamlanır ve 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren sekonder spermatositler oluşur. İkinci mayoz bölünmeyle birlikte sekonder spermatositler spermatidleri meydana getirirler. Tip A spermatogonyumların kök hücre topluluğundan ayrılmalarını takiben çoğalıp farklılaşarak spermatidleri oluşturmalarıyla sitokinez tamamlanmış olur. Bu aşamada tüm hücreler birbirleriyle ilişkilerini koruyan ince sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı haldedirler. Ayrıca bu hücreler farklılaşma süreci boyunca Sertoli hücrelerinin sitoplazmadaki girintilerine gömülü olarak bulunurlar. Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde gelişmekte olan germ hücrelerini koruma, besleme ve desteklemede görev yaparlar.

Spermiyogenez, spermatidlerin yeni bir bölünme olmaksızın belirli değişimler geçirerek olgun sperme dönüşmeleri sürecidir. Bu değişimler üç aşamada gerçekleşir ^[10];

2.1.1. Golgi Fazı

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

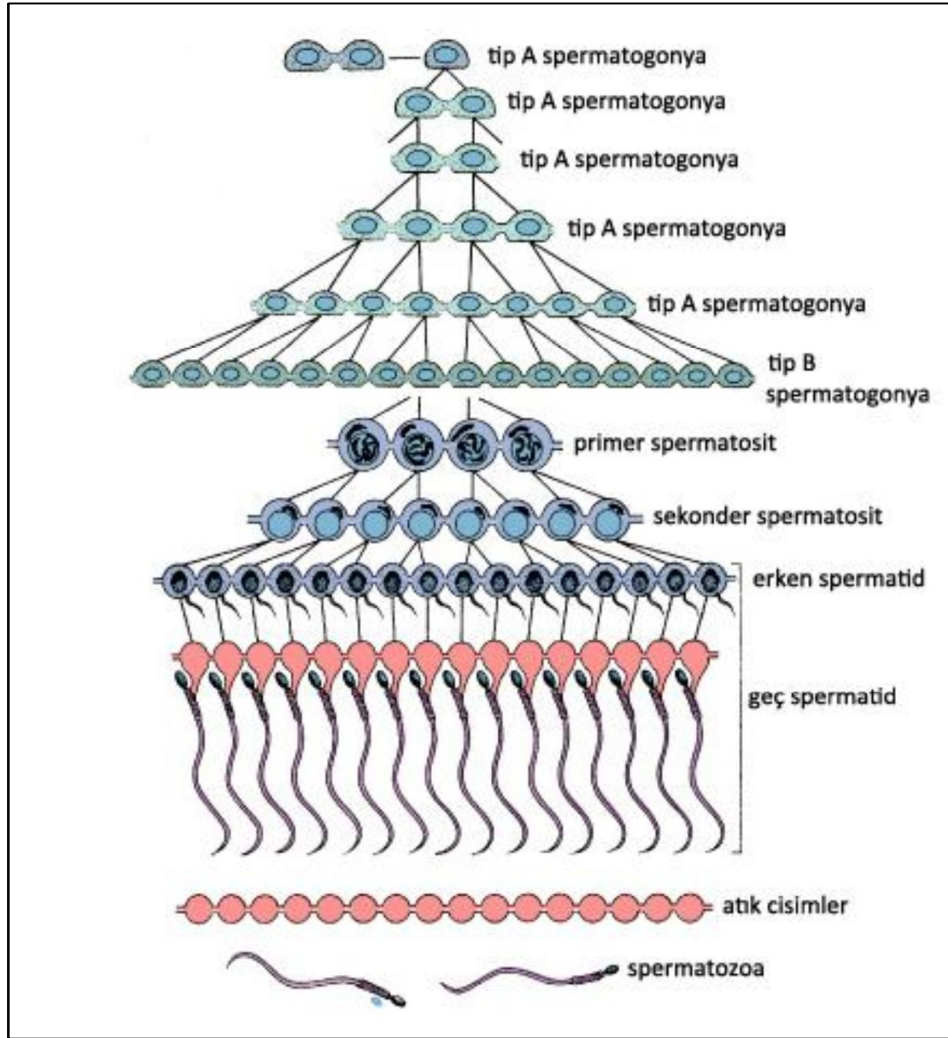
granüller adı verilen granüller birikir ve post akrozomal vezikülü oluşturur. Sperm hareketini sağlayacak olan flagellum bu aşamada oluşmaya başlar.

2.1.2. Akrozomal Faz

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

2.1.3. Olgunlaşma Fazı

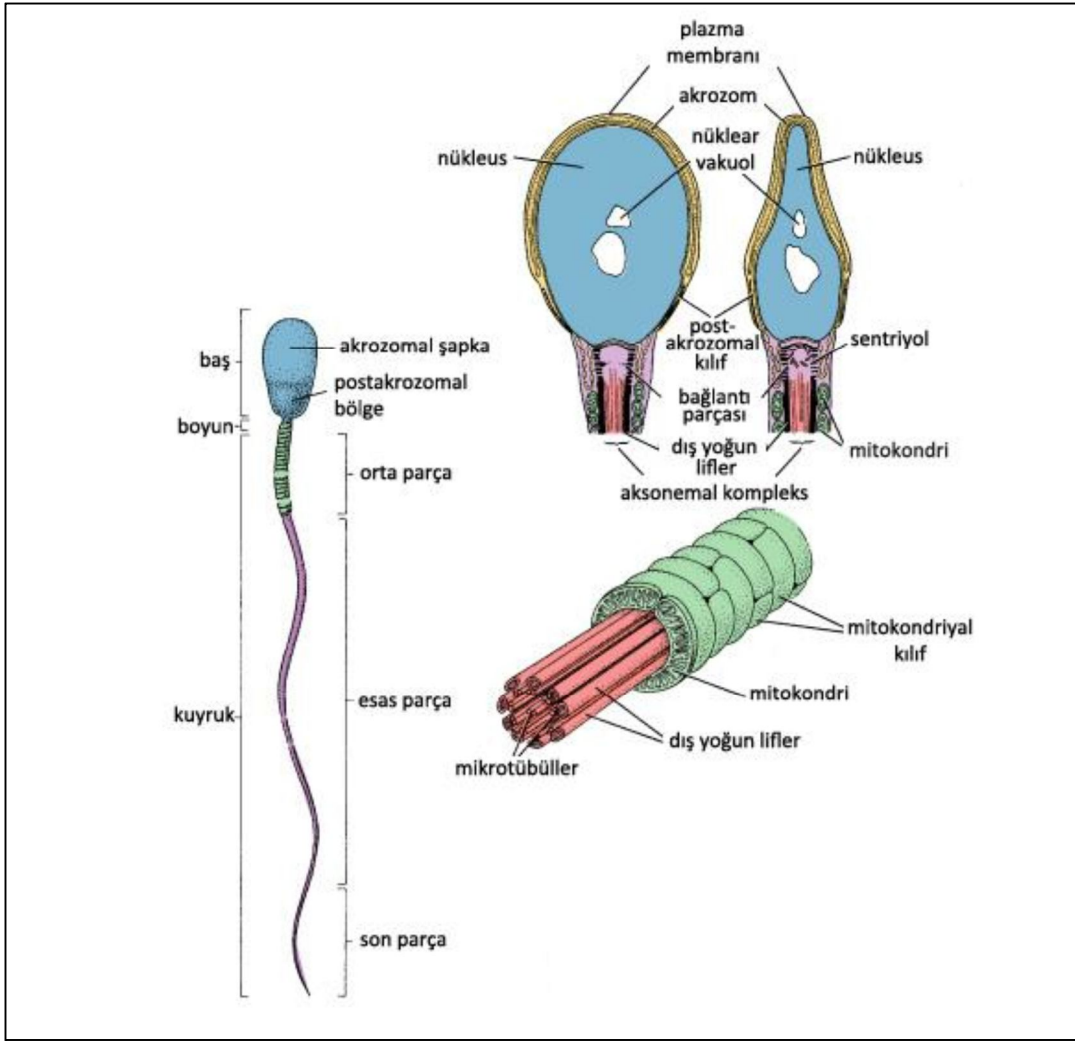
Tüm organellerin belirli bir düzen almasından sonra geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve olgunlaşmış spermler seminifer tübül lümenine salınırlar.



Şekil 2-1: Spermatojenik hücre serisinin şematik gösterimi (Ross ve Romrell, 2006)[11]

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

Olgun sperm baş ve kuyruktan oluşur (Şekil 2-2). Baş kısmı, ortalama 5 µm büyüklüğündedir, haploid nükleus ve nükleusun ön tarafını kapsayacak şekilde fertilizasyon sırasında gerekli olacak enzimleri taşıyan akrozomu içerir. Sperm hareketini sağlayan kuyruk yaklaşık olarak 50 µm uzunluğundadır ve orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Orta parçada, kuyruğun diğer kısımlarından farklı olarak, hareket için gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondriler bulunur ^[12].



Şekil 2-2: İnsan sperminin şematik gösterimi (Ross ve Romrell, 2006)[11]

Spermiyogenez sırasında nükleusta meydana gelen ana değişimlerden biri de haploid nükleusta bulunan histonların arjinin ve lizinden zengin protaminlerle yer değiştirmesi olayıdır. Protaminler %60'ı arjinden yapıları küçük proteinlerdir. Bu değişim sonucunda nükleusta transkripsiyon sona ererek sperm genomik DNA'sını stabilize eder ve korur^[13].

2.2. Apoptozis

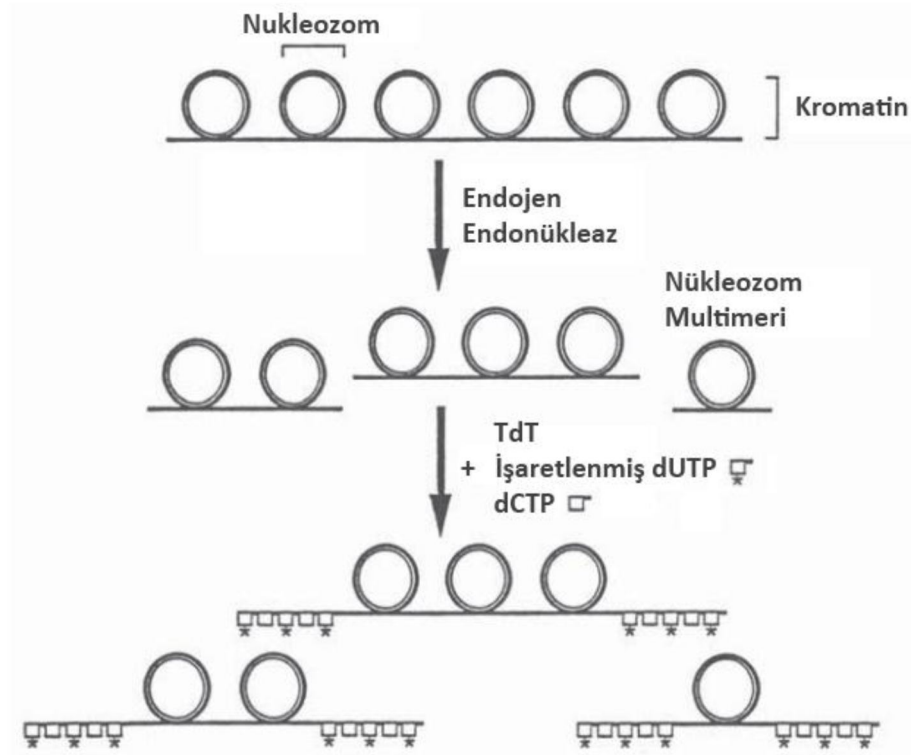
Apoptozis, hücrelerin yaşamları boyunca yapım-yıkım dengesini ayarlayan, vücutta gereksiz ya da uyumsuz hücreleri ortadan kaldıran programlanmış hücre ölümü biçimidir. Bu süreçte hücre morfolojisi tamamen değişmektedir. İlk olarak gerçekleşen hücre büzülmesini takiben, kromatin parçalanması, membran kabarcıklaşması, nüklear

yoğunlaşma ve son olarak fagosite edilebilen apoptotik cisimlere bölünme gerçekleştiği görülmektedir^[14].

Apoptozis, patolojik bir hücre ölümü olan nekrozdan farklıdır. Apoptozisin nekrotik hücre ölümünden çeşitli morfolojik ve biyokimyasal farklılıkları vardır. Apoptoziste sitoplazmanın parçalanma sürecinde oluşan kabarcıklar plazma zarı ile korunmuş durumdadırlar. Bu kabarcıklar makrofajlar tarafından fagosite edilirler, ancak herhangi bir yangısal cevap gerçekleşmez. Nekrozda ise hücre şişer, organellerin hacmi artar ve sonuçta patlayarak içeriği hücre dışına atılır. Makrofajlar nekrotik hücre kalıntılarını fagosite ederler ve yangısal cevap oluşmasını sağlayacak moleküller salgırlar^[15].

Apoptozise bağlı olarak meydana gelen en belirgin değişiklikler; fosfotidilserin çıkışı ve DNA fragmentasyonudur^[16]. Apoptoziste DNA fragmentasyonu, hücre morfolojisindeki ultrasüruktürel değişikliklerle ilişkilidir. Ejakülat spermlerindeki apoptozisin karakteristik özellikleri; kromatin, mitokondri, nükleus membranı ve plazma membranı anormalliklerinin ultrastrüktürel olarak görülmesi, sitoplazmik vakuol ve apoptotik cisimlerin oluşumudur^[17].

Apoptoziste meydana gelen DNA fragmentasyonunu göstermenin bir yolu da TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) metodudur (Şekil 2-3). TUNEL metodu, apoptozisin ilk aşamalarında açığa çıkan DNA'nın serbest 3'OH uçlarının kimyasal olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nükleotidler bağlanarak gösterilmesi prensibine dayanır. İşaretlenmiş nükleotidlerin, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak enzimatik olarak DNA'nın 3'OH uçlarına bağlanması sağlanır. İşaretli nükleotidlerin TdT ile bağlanmalarının ardından, DNA fragmentasyonu sonucunda apoptotik cisimciklerde çok yüksek oranda bulunan 3'OH uçlarının hassas ve spesifik boyanması sağlanır ve bu yapılar immünohistokimyasal veya immünofloresan tekniklerle kolayca görülebilir^[13, 16].



Şekil 2-3: Kırık kromatin yapısının TUNEL metoduyla işaretlenmesi (Virginia, 1999)[14].

2.3. Dondurma-Çözme (Kriyoprezervasyon)

Kriyoprezervasyonun genel prensibi; dondurulacak materyalin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen (LN2) içinde -196°C'de depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak dondurulan materyalin canlılığını sürdürebileceği fizyolojik ortamlara geçirilmesidir. Kriyoprezervasyon işlemi sırasında canlılığı etkileyebilecek önemli faktörler dondurulan materyal türü, kullanılan kimyasallar ve dondurma-çözme yöntemidir. Materyalin düşük ısılarda soğutulması ve çözme işleminde fizyolojik ısı ve ortama döndürülmesi dikkatle yapılması gereken aşamalardır [18]. Optimal çözme ısısı dondurulan materyale, kullanılan kriyoprotektanların özelliğine ve hücrelerin içerdiği su miktarına göre ayarlanmalıdır.

Kriyoprotektanlar, dondurma işlemi sırasında koruyucu özelliğe ve yüksek oranda H₂ bağlama kapasitesine sahiplerdir. Kriyoprotektanların koruyucu özelliklerini göstermeleri için her zaman hücre içine girmelerine gerek yoktur. Çünkü hücrede harabiyetin en hızlı ve etkili meydana geldiği yer hücre zarıdır. Kriyoprotektanlar hücre

içine geçip geçmemelerine göre, intrasellüler (permeabl) ve ekstrasellüler (nonpermeabl) olmak üzere ikiye ayrılır ^[19].

Permeabl ajanların kullanımı, dondurma işlemi sırasında hücre içerisinde oluşabilecek buz kristallerinin oluşumunu -40°C'ye kadar düşürebilmektedir. Bu ajanlar hücreyi dondurma işleminin zararlı etkilerine karşı olabildiğince korurlar. Hücre içine geçişleri solüsyonun kendi geçiş gücü, hücre içi ve hücre dışı kriyoprotektanların konsantrasyon farkı, ısı ve hücre yüzeyi ile doğru orantılıdır ^[19].

Nonpermeabl ajanlar tek başlarına kriyoprotektan olarak kullanılmamalarına karşın permeabl ajanlarla birlikte kullanıldıklarında özellikle ozmotik basınç değişikliklerinden meydana gelen harabiyete karşı korucuyu etki gösterirler. Nonpermeabl ajanlar, ozmotik değişikliğe bağlı olarak gelişen su geçişine etkilidir ve çözme işleminde hücrel şışmeyi önlerler. Hücre zarından geçmeyen bu ajanlar arasında en çok süzkroz kullanılır ve kullanımı sırasında ortam ısısı çok önemlidir ^[19].

Sperm kriyoprezervasyonu 1980'li yıllardan itibaren protokollerin geliştirilmesi sayesinde in vitro fertilizasyonda (IVF) rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır ^[20]. Dünyada donör inseminasyonlarında kullanılmakla birlikte ülkemizde özellikle kanser tedavisi gibi üreme fonksiyonlarına zararlı etki yapabilecek tedaviler öncesi sıklıkla başvurulmuş bir yöntemdir. Cerrahi girişimler ve buna eşlik eden radyoterapi/ kemoterapi uygulamaları testiküler yetmezlik veya ejakülatuar fonksiyon bozukluklarına neden olabilir ^[19].

Gliserolün ilk olarak sperm kriyoprezervasyonunda kullanılmasından sonra diğer kriyoprotektif ajanlar sperm kriyoprezervasyonunda da kullanılmaya başlanmıştır ^[21]. Sperm dondurulmasında da temelde geçirgen (permeabl) ve geçirgen olmayan (nonpermeabl) ajanlar kullanılır ve %5-10'luk gliserol en sık tercih edilen ajanlardandır ^[22]. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun obstrüktif ve nonobstrüktif azospermi olgularında testislerden elde edilen spermlerle de uygulanabiliyor olması, zaman içinde cerrahi

girişimlerle elde edilen bu spermlerin dondurularak saklanması da gündeme taşımıştır [19].

Kriyoprezervasyon sırasında spermler fiziksel ve kimyasal strese maruz kalırlar, plazma membranı lipid yapısı değişir, baş büyüklüğünde azalma meydana gelir, ve fosfatidilserin çıkışı gerçekleşir [22, 23, 24, 25].

2.4. Kriyoprotektanlar (Dondurma işleminde kullanılan kimyasal ajanlar)

Gamet hücrelerinin dondurulmasında kullanılan koruyucu maddeler olan kriyoprotektanlar, soğuk şoku ve donma esnasında gelişen diğer hasarlara karşı koruma sağlarlar. Kriyoprotektanların koruyucu etkileri, suyla hidrojen bağları oluşturarak, buz kristallerinin boyutlarını küçültmeleriyle ortaya çıkmaktadır. Gliserol ve propandiol, bu işi hidroksil grupları ile (-OH) yaparken dimetil sülfoksit (DMSO) ise oksijen atomu sayesinde yapmaktadır. Kriyoprotektanlar medyumun donmadan kalan kısmındaki elektrolit konsantrasyonunu da azaltarak koruyucu etki göstermektedirler [23].

Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözme esnasında dekrizalizasyona ve gelişen membran destabilizasyona karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılır. Hücre, dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkübasyona tabi tutularak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır.

Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır [27, 28]. Hücrelerin başarıyla dondurulması, plazma membranından suyun ve kriyoprotektanların basit difüzyonunu ve hızlı transportunu gerektirir.

Kriyoprotektanlar işlevsel olarak iki gruba ayrılmaktadır:

Permeabl kriyoprotektanlar,

Permeabl olmayan kriyoprotektanlar.

2.4.1. Geçirgen (İnternal) Kriyoprotektanlar

Permeabl özelliğe sahip kriyoprotektan olarak, en yaygın kullanılanlar DMSO, Gliserol, Etilen Glikol ve propilen glikoldür (PROH).

2.4.2. Geçirgen olmayan (Eksternal) Kriyoprotektanlar

Eksternal kriyoprotektanlar, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranları esnek hale getirir. Bu olayda çözme esnasında hücre sel şişmeyi engeller. Ayrıca, hücrede dondurma-çözme sırasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır. Makromoleküllerinden en çok kullanılanları şunlardır: Polietilen glikol, Ficoll 70, Bovine Serum Albumin (BSA), dekstran, mannitol ve polivilinilprolidon'dur. Sakkaritlerden glukoz, sükroz ve disakkaritler sayılabilir. Sakkaritler, letal etkili intrasellüler kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar ^[29, 30]. Şekerler donma ve çözme sırasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak koruma sağlamaktadır. Çözme işlemi sırasında da hücrelerin ozmotik şoka girmesini önlemektedirler ^[24].

2.4.3. Yumurta Sarısı

Yumurta sarısında bulunan düşük dansiteye sahip fosfolipitler, sperm yüzeyine bağlanır ve hücre sel adenilat siklazı aktive ederek kriyoprotektif etki gösterirler ^[25]. Birçok araştırmada lipozomlardan elde edilen fosfolipitlerin koruyucu etkileri araştırılmış, türe göre koruyucu etkili fosfolipit kaynaklar saptanmıştır. %20 yumurta akı 56°C ısıda 30 dk. inaktive edilerek serum ve gliserol ilave edilip kompleks bir kriyoprotektan oluşturulur ^[26].

2.4.4. Diğer Kriyoprotektif Ajanlar

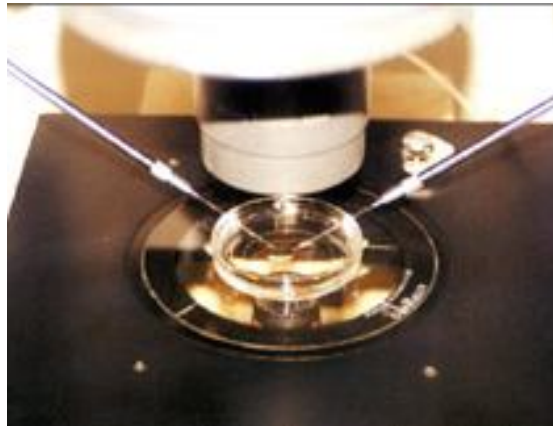
Kriyoprotektif ajanlardan soya fasülyesi ekstraktlarının, hücrenin soğutulması sırasında membran akışkanlığını azaltarak koruyuculuk sağladığını bildirilmektedir ^[32, 34]. Ayrıca pentoksifilin, kafein, sodium nitroprusid, platelet aktivasyon faktörü (platelet

activating factor, PAF) ve hiyaluronik asid'in spermin çözüme sonrası vitalitesine katkı sağladığı bildirilmektedir [27].

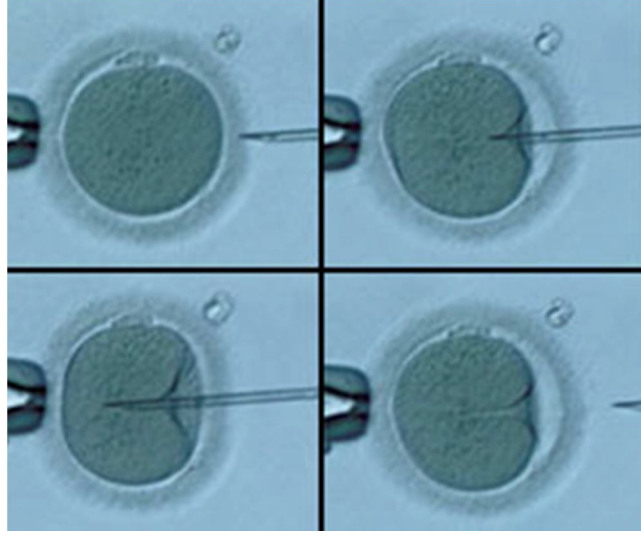
2.5. Mikroenjeksiyon (İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu)

Mikroenjeksiyon, Palermo ve ark tarafından 1992 yılında özellikle şiddetli erkek kısırlığı tedavisi için mihenk taşı sayılabilecek nitelikte geliştirilmiş bir yardımcı üreme tekniği yöntemidir. Bu yöntem ile sperm hücresinin yumurta içine direkt olarak enjekte edilmesi ile döllenme amaçlanır. Şiddetli erkek kısırlığına yol açan durumlarda klasik tüp bebek yöntemi de dahil olmak üzere bilinen diğer tedavi yöntemleri ile döllenme olmamakta veya çok düşük oranda gerçekleşmektedir. Sayı, hareketlilik ve şekil bozukluğu olan spermlerin kendiliğinden yumurtaları döllemesi mümkün olmamaktadır. Mikroenjeksiyon uygulaması, mikro-pipetler yardımı ile mikroskop altında spermin, kadından elde edilen yumurtanın içine enjekte edilmesidir [6]. Mikroenjeksiyon işlemi, inverted mikroskobun ısıtılmış yüzeyinde, 200–400 kat büyütme altında, mikromaniplatör ve mikro pipetler kullanılarak yapılmaktadır (Şekil 2-4; Şekil 2-5).

Mikroenjeksiyon şiddetli erkek kısırlığı dışında, IVF (tüp bebek) ile döllenme sağlanamayan veya IVF (tüp bebek) için uygun sperm ve yumurta sayısı ve/veya kalitesine sahip olmayan çiftlerde uygulanmaktadır. Menideki çok az sayıda spermle işlem yapılabildiği gibi, menide spermin bulunmadığı durumlarda testislerden elde edilen spermler kullanılarak da mikroenjeksiyon yapılabilir. Bazı erkeklerde testislerde sperm bulunması mümkün olmayabilir.



Şekil 2-4: ICSI işlemi için kullanılan mikropipetler.



Şekil 2-5: Mikroenjeksiyon işlemi.
(Memorial Şişli Hastanesi Görüntüsü)

2.6. Testiküler Sperm Eldesi

ICSI'nin bulunmasından önce azospermik erkekler çaresiz bir şekilde infertil olarak bilinirdi. Fakat mikroenjeksiyonun tanımlanması ile birlikte bu azospermik kişiler artık potansiyel baba adayları olarak tanımlanmaktadır.

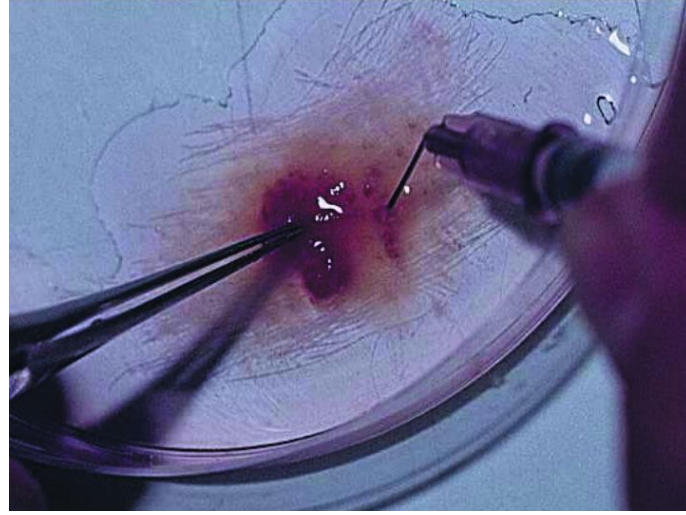
2.6.1. Testiküler Sperm Ekstraksiyonu (TESE) Uygulaması

Ejkalütta sperm bulunmaması durumunda uygulanan yöntemlerden biridir (Şekil 2-6). Özellikle non-obstrüktif (tıkanıklığa bağlı olmayan) azospermik vakalarda uygulanan bir yöntemdir. Erkek infertilesinde devrim sayılabilecek bu cerrahi operasyon ile spermin üretildiği testislerden alınan dokuda spermin varlığı mikroskop altında incelenir ve sperm var ise mikroenjeksiyon (ICSI) yöntemiyle kombine edilerek hastalara gebelik şansı sağlanır (Şekil 2-7) ^[28].



Şekil 2-6: TESE işlemi.

(Memorial Şişli Hastanesi Görüntüsü)



Şekil 2-7: TESE işleminde diseksiyon.

(Nisa Hastanesi Görüntüsü)

2.6.2. Testiküler Sperm Aspirasyonu (TESA)

Testislerde üretilen spermelerin penise ulaşmasını sağlayan kanallarda tıkanıklık olması veya kanalların olmaması durumları dışında sperm sayıca az ve hareketlilik yönünden sıkıntılı olduğu durumlarda da uygulanan yöntemdir (Şekil 2-8). TESA yönteminde TESE'den farklı olarak mikrocerrahi operasyon uygulanmaz, iğne ile testilere girilir ve testis dokusu aspire edilerek sperm elde edilmeye çalışılır ^[29].



Şekil 2-8: TESA işlemi
(Memorial Şişli Hastanesi Görüntüsü)

2.7. Sperm Hazırlama Teknikleri

Sperm hazırlığı ejakülatta bulunan en iyi morfolojiye sahip spermelerin elde edilmesi için kullanılan tekniklerdir. ÜYTE (Üremeye Yardımcı Teknikler) denemelerinde oositin fertilizasyon şansını arttırmak, iyi kalite embriyo geliştirilmesi, embriyo transferi sonrasında yüksek gebelik şansı sağlanması ve arta kalan embriyoların dondurulması için iyi kalite spermelere ihtiyaç vardır.

2.7.1. Swim-Up (Yukarı Yüzdürme) Tekniği

Swim up uygulamasında progressif motiliteye (ileri harekete) sahip spermatozoaların yıkanmış peletten ayrılıp, taze kültür mediumuna yüzmesi sağlanır. Swim-up yönteminin IVF ve IUI'da (intra uterin inseminasyon) uygulanabilmesi için yeterli sayıda progresif motil sperm varlığını gösteren bir bazal semen analizine ihtiyaç vardır ($>4 \times 10^6/\text{ml}$, $>20\%$ progressif motil). Swim-up tekniği ile motil sperm konsantrasyonunun artırılması amaçlanmaktadır ^[30].

2.7.2. Dansite Gradient (Yoğunluk Sıralayıcısı) Tekniği

Bu teknikte koloidal silika partikülleri kullanılır. Semen örneği dansite gradient mediumunun üzerine yavaşça konur ve 300-400g de 15-20 dk santrifuj edilir.

Semen örneğinde bulunan artık hücreler, debriler, lökositler, ROR (Reaktif Oksijen Radikalleri) ve ölü spermilerin elimine edilmesi açısından önemlidir. Ayrıca Hepatit B, C ve HIV gibi viral kontaminasyon taşıyan örneklerde en emniyetli sperm yıkama yöntemidir. Gradient medium düşük vizkoziteye sahip olması nedeniyle santrifüjleme süresince spermin alt bölgeye geçişine engel olmaz. Mini-gradient ve tabakalı gradient olmak üzere farklı kullanım şekilleri mevcuttur ^[39, 40].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Dahil Olan Vakaların Özellikleri

Semen Analizi için başvuru yapan hastalardan alınan örneklerde, inceleme sonrası WHO 2010 kriterlerine göre (Tablo 1) Normozoospermi tanısı konan erkek hastalar çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya katılan ve 48-72 saat abstinansa sahip erkeklerden mastrübasyon yolu ile alınan ejakulat örnekleri kullanıldı. Semen örnekleri, belirtildiği gibi, cinsel perhiz sonrasında steril kaplara mastrübasyon yöntemiyle alındı. Deneklerden semen örneği alınmadan önce “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” ile imzalı onayları alındı. İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulun’dan gerekli onay (Sayı: 10840098-64) alındı.

Tablo 3-1: Konsantrasyon, motilite ve vitalite değerlendirmesinde WHO 2010 kriterleri

Paramereler	En düşük referans değer
Semen volümü(ml)	1,5 (1,4-1,7)
Total sperm sayısı (106)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (106)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
Progressif motilite (PR, %)	32 (31-34)
Vitalite (Canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (Normal formlar, %)	4 (3,0-4,0)
pH	>7,2
Peroksidaz-pozitif lökosit (106/ml)	<1,0
MAR testi (%)	<50
İmmunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2,4
Seminal früktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukosidaz (mU/ejakülat)	>20

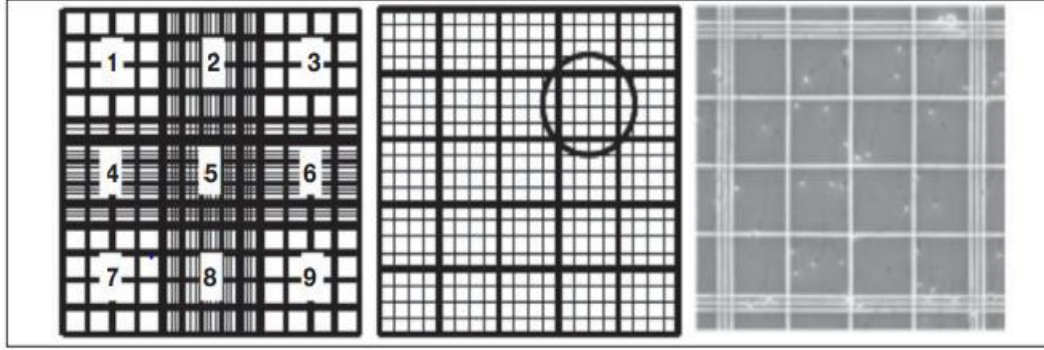
3.2. Konsantrasyon, Motilite ve Vitalite Değerlendirmesinde WHO 2010 Kriterleri

3.2.1. Sperm Konsantrasyon Değerlendirmesi

WHO 2010 kriterlerine göre sperm sayımı için 100 µm derinlikte hemositometre sayma kamarasının kullanılması önerilmektedir^[31]. Sperm konsantrasyonunun doğru bir şekilde sayılıp hesaplanabilmesi için semenin önceden belirlenmiş olan dilüsyon oranları kullanılarak dilüe edilmesi gereklidir. Dilüsyon oranları, taze preparatta 200 veya 400 büyütmede görüntü alanı başına sayılan sperm hücresi sayısına göre belirlenebilir (Tablo 3-2). Semen örneğinin 3000 g'de 15 dakika santrifüj edilmesi sonrasında sperm hücresi tespit edilirse kriptozoospermi, görülmezse azoospermi tanısı konur. Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi 3x3 mm'lik iki ayrı sayım kamarası içerir. Sayım kamarası ile arasında 0,1mm'lik mesafe sağlayan özel kalınlıkta (0,44 mm) bir lamel kullanılır. Her bir kamara 1x1 mm'lik 9 kare içerir. 100 µm derinlikte bu karelerin her biri 100 nl'yi ifade eder. Bu karelerden 1, 3, 7 ve 9 numaralı olanlar 16 adet (6,25 nl), 2, 4, 6 ve 8 numaralı olanlar 20 adet (5 nl) ve 5 numaralı kare ise 25 (4 nl) adet küçük kareden oluşmaktadır (Şekil 3-1). Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi ile sayım yaparken kabul edilebilir düşüklükte bir sayım hatasına ulaşabilmek için her birinde 200 sperm olan iki sayım yapılmalıdır. Sayım sonuçları arasındaki fark makul sınırlar üzerinde ise bu yanlış sayım, dilüsyon hatası veya spermilerin eşit dağılmamış olduğunun bir göstergesi olabilir. Yeniden dilüsyon hazırlanması ve sayım işleminin tekrar edilmesi gereklidir. Sperm konsantrasyonu hesaplaması sayım sonucu elde edilen sperm sayısının o spermilerin içinde bulunduğu volüme bölünmesi ile hesaplanır ve "C = (N/n) x (1/20) x dilüsyon faktörü" formula kullanılır. (C: konsantrasyon, N: sperm sayısı, n: sayım yapılan kare sayısı). Sperm konsantrasyonu için en düşük referans değer 15x10⁶ /ml'dir. Total sperm sayısı ise sperm konsantrasyonunun tüm ejakülat volümüyle çarpılması sonucu hesaplanır ve en düşük referans değeri 39x10⁶ 'dır ^[31].

Tablo 3-2: Neubauer kamarası kullanımında gerekli dilüsyon oranları

Sperm (her 400 büyütmede)	Sperm (her 200 büyütmede)	Gerekli dilüsyon	Semen (μ l)	Fiksatif (μ l)	Kamara	Sayılacak alanlar
>101	>404	1:20 (1 + 19)	50	950	Geliştirilmiş Neubauer	5, 4, 6
16-100	64-400	1:5 (1 + 4)	50	200	Geliştirilmiş Neubauer	5, 4, 6
2-15	8-60	1:2 (1 + 1)	50	50	Geliştirilmiş Neubauer	5, 4, 6
<2	<8	1:2 (1 + 1)	50	50	Geliştirilmiş Neubauer veya büyük volüm	9 karenin tamamı



Şekil 3-1: Geliştirilmiş Neubauer hemositometresi

3.2.2. Sperm Motilite Değerlendirmesi

Ejakulat örneğinin alınmasından sonra ortalama 20-30 dk likefaksiyon için beklenmelidir. Bu süre sonrasında motilite değerlendirilmesi yapılır. Sperm motilite değerlendirilmesi oda sıcaklığında, faz kontrast mikroskopta 200-400 büyütmede yapılır. Farklı motilite kategorilerindeki spermelerin oranlarını hesaplayabilmek için en az beş mikroskopik alanda en az 200 sperm hücresinin değerlendirilmesi gerekir. Aynı semen örneğinden hazırlanmış başka bir preparatta tekrar 200 sperm sayılıp birbirinden bağımsız bir şekilde motilite yüzdeleri kıyaslandığında kabul edilebilir farklılık oranları varsa işleme devam edilir. Büyük farklar varsa bu durumda yeni preparat hazırlamak gerekir. Fokal bir mikroskop düzleminde gratikülle belirlenmiş çizgilerin sınırladığı alanda ya da sperm sayısı azsa tüm alanda sperm hücreleri sayılarak motilite değerlendirilir.

Motilitenin değerlendirilmesi için spermeleri progresif hareketli, nonprogresif hareketli ve hareketsiz şeklinde sınıflandıran basit bir yöntem kullanılır.

Progressif (ileri) hareket: sperm hücresi doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde hızdan bağımsız olarak ilerleyici bir şekilde hareket eder.

Nonprogresif (yerinde) hareket: ilerleyici olmayan hareketlerin tamamını içerir. Örneğin çok küçük daireler şeklinde, kuyruğun hareketiyle baş kısmının çok zor olarak yer değiştirmesi, sadece kuyruğun hareket etmesi gibi.

Hareketsiz: Hiç hareketin olmaması.

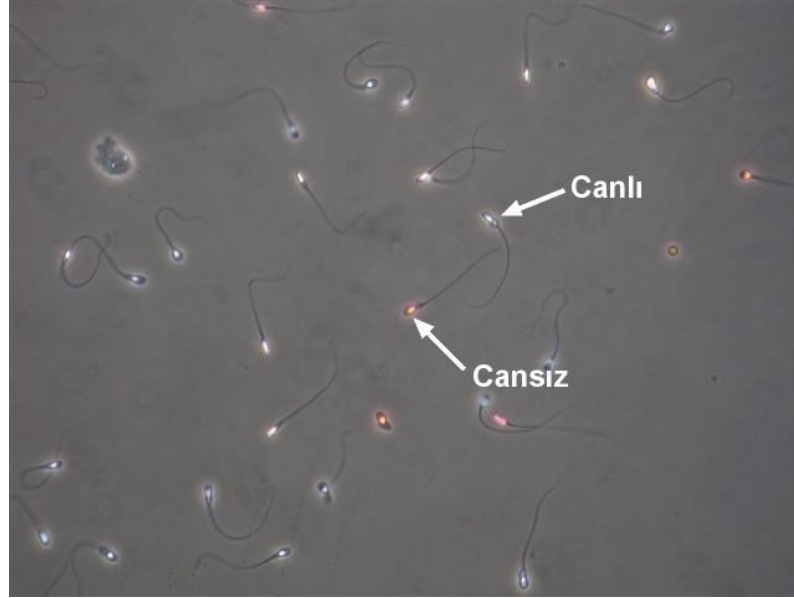
Bir önceki WHO (Dünya Sağlık Örgütü) baskısında progressif hareketli sperm hızı ileri hareketli ve yavaş ileri hareketli olarak sınıflandırılıyordu, ancak bunun teknisyenler tarafından yanlışlık olmadan doğru bir şekilde hesaplanması zordur. Ayrıca sperm motilitesi tartışılırken total hareketliliğin mi yoksa progresif hareketliliğin mi olduğu belirtilmelidir. Önce progresif hareketli olanlar sonra nonprogresif hareketliler ve hareketsizler değerlendirilir. Total hareketlilik için en düşük referans değer %40 iken bu değer progresif hareketlilik için %32'dir ^[32].

3.2.3. Sperm Vitalite Değerlendirmesi

Sperm canlılığı hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranının %40'dan az olduğu durumlarda özellikle önemlidir. Aynı zamanda bu testle motilite değerlendirmesinin doğru yapıp yapılmadığı da kontrol edilebilir. Canlı olmayan hücrelerin sayısı hareketsiz olan sperm sayısını aşmamalıdır. Normalde canlı hücrelerin sayısı motil hücrelerden fazladır.

Canlı sperm oranı, boyaya olan direç ya da hipoozmotik şişme yöntemleri ile hücre zarı sağlam olanların değerlendirilmesi ile hesaplanabilir. Boyanın hücre içine alınmaması sperm hücrelerin canlı olarak değerlendirilmesine; Eosin boyasının hasarlanan plazma zarından geçmesi ise sperm ölümü olarak değerlendirilmesine olanak sağlar. Bu yöntem eozin-nigrozin veya sadece eozin boyaları kullanılarak yapılabilir. Hipoozmotik şişme testi ise, membran bütünlüğü bozulmamış olan sağlam hücrelerin hipotonik solüsyonlarda şişmesi prensibine dayanır. Isı değişikliği ve dehidratasyonun sperm canlılığı üzerine olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla likefaksiyondan sonrasında (örneğin alındıktan 20-30 dakika sonra) ya da en geç ejakülasyondan sonraki bir saat içinde canlılık değerlendirilmelidir. Hareketsiz sperm canlı olup olmadıkları klinik açıdan önemlidir. Canlılık değerlendirmesinin sonuçları aynı

semen örneğinin hareketlilik sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmelidir. Canlı ama hareketsiz hücrelerin büyük oranda bulunması kuyruktaki yapısal defektlerin göstergesi olabilir. Hem hareketsiz hem de ölü hücrelerin (nekrozoospermi) yüksek oranda bulunması ise epididimal bir patolojiyi akla getirebilir. Sperm canlılığı için en düşük referans değer %58'dir [43, 44, 45, 46] (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: Eozin-Y uygulaması sonrasında boyanan cansız ve boya almamış canlı spermilerin değerlendirilmesi.

3.3. Sperm Yıkama Teknikleri

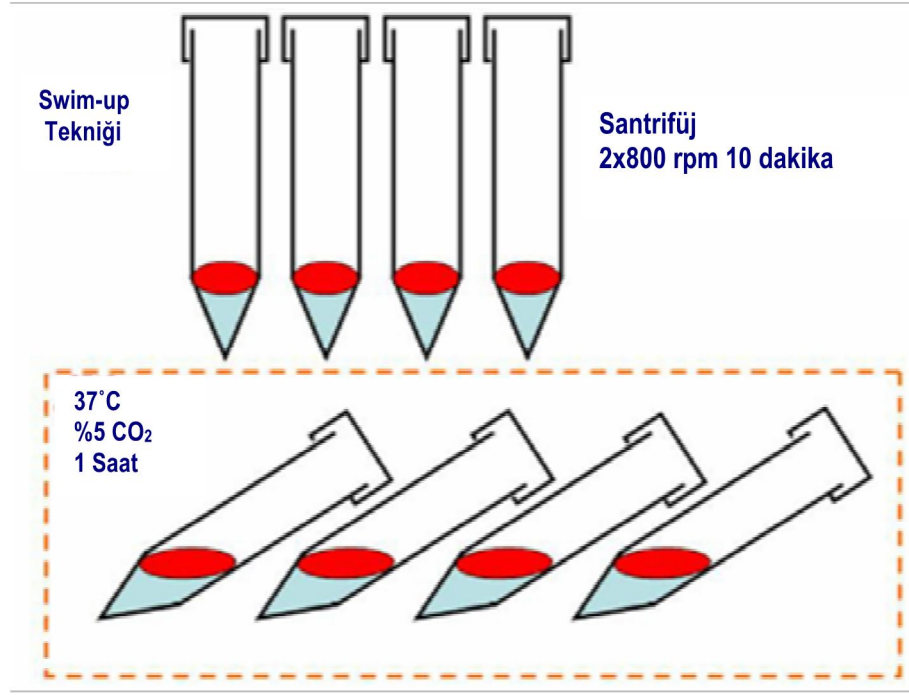
3.3.1. Swim-Up (Yukarı Yüzdürme) Tekniği

Swim-up uygulaması şu şekilde gerçekleştirilmektedir:

- a) Likefaksiyon tamamlandıktan sonra bir pastör pipeti ile semen birkaç kez pipetlenir.
- b) Semen 5 veya 10 ml'lik pipet (Falcon 7543 ve Falcon 7551) vasıtasıyla 15 ml (Falcon 2095) konik santrifüj tüpüne alınır. Bu sırada hacmi ölçülüp kaydedilir. 5 µl alınarak Makler sayma kamarasına yerleştirilir.
- c) Aynı miktarda sperm yıkama mediumu tüpe ilave edilip birkaç kez pipetlenerek karışmaları sağlanır. Bu süspansiyon 4 adet (Falcon 2095) santrifüj tüpüne paylaştırılır (aynı tüp + üç yeni tüp).
- d) 10 dakika 800 rpm' de santrifüj (Heraus –Labofuge 400) edilir.
- e) Supernatant (üst faz) pastör pipeti kullanılarak 10 ml (Falcon 2001) tüp içerisine

aktarılır ve bu tüp atılır.

- f) Her tüpe 0.5'er ml sperm yıkama mediumu ilave edilip birkaç kez pastör pipeti ile pipetlenerek karışması sağlanır.
- g) 10 dakika 800 rpm'de santrifüj edilir.
- h) Supernatant (üst faz) pastör pipeti kullanılarak 10 ml (Falcon 2001) tüp içerisine alınır ve bu tüp atılır.
- i) Her tüp üzerine 0.25 ml sperm yıkama mediumu tüplerin diplerindeki pellet (çökelti) bozulmadan yavaş yavaş ilave edilir.
- j) 10. Bu dört tüp 45 derecelik açıyla 37°C sıcaklıkta %6 CO₂ neme doymuş olan inkübatörde kapağı yarım açık şekilde bir saat inkübasyona bırakılır.
- k) Supernatantlar pastör pipeti kullanılarak bir 5 ml (Falcon 2003) tüp içerisine alınır.
- l) 5 mikrolitre alınarak Makler sayma kamarasına yerleştirilir, sperm parametreleri değerlendirilir. 10 µl alınarak temiz bir lam üzerinde morfolojik değerlendirme için smear hazırlanır.
- m) IVF ve ICSI için gerekli konsantrasyon ve dilüsyonlar yapılır.
- n) Şiddetli olmayan oligozoospermik, astenozoospermik, teratozoospermik örnekler için swim-up yöntemi kullanılması gerektiğinde, 9. basamakta kullanılan sperm yıkama mediumunun hacmi 0.1 ml veya daha az kullanılabilir. Böylece daha konsantre bir halde progressif motil (ileri hareketli) sperm elde edilmiş olur. Şiddetli OAT (Oligoastenoteratozoospermi) vakalarında ise gradient (yoğunluk sıralayıcısı) tekniğini uygulamak gerekmektedir ^[38, 39, 40] (Şekil 3-3).



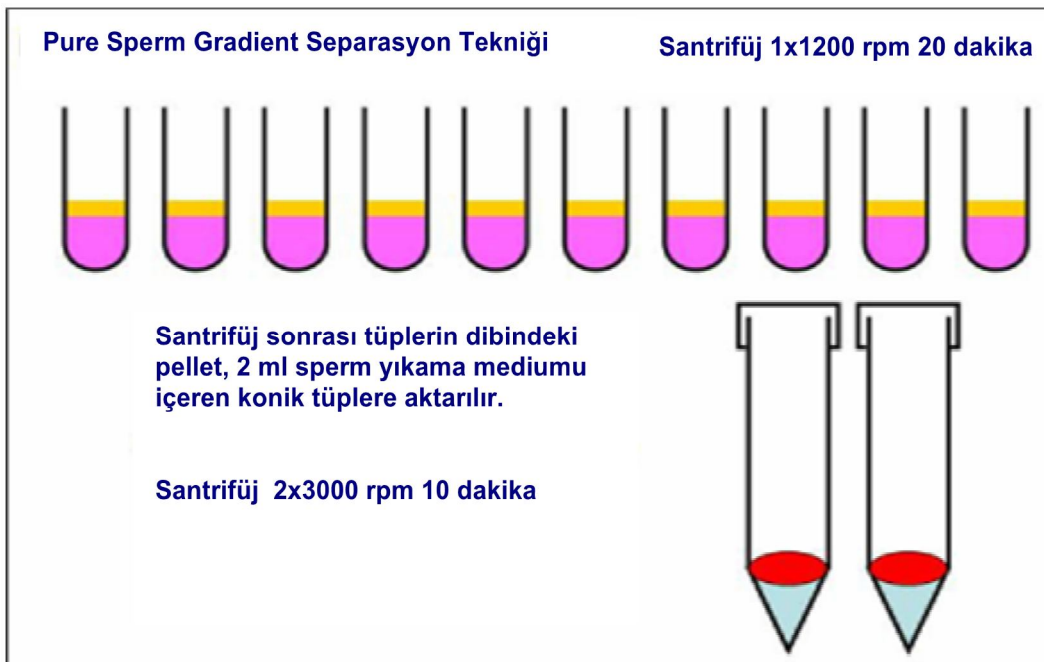
Şekil 3-3: Swim-up tekniği.

3.3.2. Spermilerin Yoğunluk Sıralıyıcısı ile Ayırma (Gradient) Tekniği

Mikromanipulasyon işlemi için sperm hazırlamak amacıyla kullanılır. Bu amaçla kollaidal silika süspansiyonu içeren solüsyonlar kullanılmaktadır. Teknik, yoğunluğa bağlı gradient separasyonu esasına dayanmaktadır.

- Likefaksiyon tamamlandığında semen pastör pipeti ile birkaç kez pipetlenir. 5 µl alınarak Makler sayma kamarasına yerleştirilir. Konsantrasyon, motilite ve progresyon değerlendirilip kaydedilir.
- 5 veya 10 ml'lik pipet ile (Falcon 7543 ve Falcon 7551) semen (Falcon 2095) santrifüj tüpüne alınır. Bu sırada hacmi ölçülür.
- Aynı hacimde sperm yıkama mediumu ilave edilip birkaç kez pipetlenerek karışmaları sağlanır. Bu örnek iki ayrı (Falcon 2095) tüpe eşit olarak bölünür (Aynı tüp ve bir tüp daha).
- 10 dakika 3000 rpm' de santrifüj edilir. Supernatant pastör pipeti ile alınır, (Falcon 2001) tüpe aktarılır, bu tüp atılır.
- Her iki tüpe 0.5'er ml sperm yıkama mediumu konur. Pastör pipeti ile birkaç kez pipetlenerek resüspanse edilir.

- f) Bu süspansiyon, daha önce 5 ml (Falcon 2003) tüplerde 0.5'er ml olarak hazırlanmış gradient (yoğunluk sıralayıcı) medium üzerine yavaş yavaş bir tabaka oluşturacak şekilde yerleştirilir.
- g) 1200 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir.
- h) Bir pastör pipeti kullanılarak en aşağıda bulunan gradient tabakasına ulaşılır. Bu tabakaya pipet ile girildiği anda bir hava kabarcığı verilir. Böylece gradient tabakasının seçtiği kısma, üst tabakalardan herhangi bir karışma olması engellenmiş olur. Tüpün zemininden pellet ve gradient ile birlikte 0.2-0.4 ml kadar aspire edilir, 4 ml sperm yıkama mediumu içeren (Falcon 2095) tüpe aktarılır. Aynı işlem diğer tüp için de yapılır.
- i) 5 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilir. Supernatant (Falcon 2001) tüp içine ayrılır, bu tüp atılır.
- j) Her iki tüpe 4'er ml sperm yıkama mediumu eklenir.
- k) 5 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilir. Supernatant (Falcon 2001) tüp içine alınır, bu tüp atılır.
- l) Pellet 100 µl ile 200 µl sperm yıkama mediumu ile resüspanse edilir. Pellet ne kadar küçük ise o kadar az medium, ne kadar büyük ise o kadar çok medium kullanılır.
- m) 5 µl alınarak Makler sayma kamarasında değerlendirme yapılır ^[38, 39, 40] (Şekil 3-4).



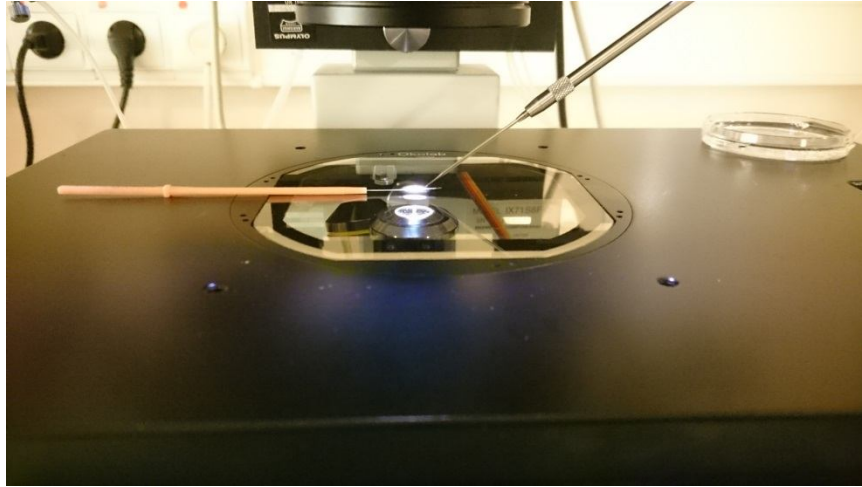
Şekil 3-4: Sperm gradient separasyonu (yoğunluk sıralayıcısı ile ayırma) tekniği.

3.4. Sperm Dondurma-Çözme Teknikleri

3.4.1. Sperm Vitrifikasyonu ve Çözülmesi

3.4.1.1. Sperm Vitrifikasyonu

Hazırlanan sperm örnekleri Falcon 3801 petri kabı içerisine önceden hazırlanmış ve üzeri paraffin yağ (Life Global) kaplanmış HTF-HEPES (Life Global) solüsyonu içerisine mikropipet yardımı ile insemine edildi. Petri kabı daha sonra IX 71 Olympus Inverted Mikroskop üzerine yerleştirildi. Mikropipet (MIC 35-30 Origio Denmark) yardımıyla kültür kabından toplanan spermier cryotop (Kitazato) üzerine 0.25 M Sukroz (Sigma) içeren solüsyon içerisine konuldu ve cryotop kapatıldı. Cryotop daha sonra 2 dakika boyunca -80°C olduğu bilinen sıvı azot buharında ızgaraların üzerinde bekletildikten sonra sıvı azot içerisine daldırıldı. Çözme işlemi sonrasında TUNEL test için fazla sayıda sperm gerekliliği nedeni ile her hasta için 4-5 cryotop donduruldu ^[33] (Şekil 3-5; Şekil 3-6).



Şekil 3-5: ASD tekniği ile spermierin inverted mikroskopta cryotopa yüklenmesi.



Şekil 3-6: Cryotopa spermlerin yüklenmesi sonrası sıvı azot buharında -70°ye soğutma işlemi.

3.4.1.2. Vitrifikasyon ile Dondurulan Spermlerin Çözülmesi

Falcon ICSI kültür kabı içerisine 2 ml lik damlacık (Life Global HTFwHEPES) hazırlanır, damlacığın üzeri paraffin yağ (Life Global Parafin oil) ile örtülür ve 37°C ye inkübe edilir. Daha sonra cryotop, sıvı azot içerisinden çıkarılır çıkarılmaz damlacık içine daldırılır. 3-4 saniye bekletilir ve damlacık içinde hareket ettirilir. Spermlerin tamamının cryotop tan kurtarılması için aynı petri kabı içerisinde bulunan diğer damlacıkta işlem tekrarlanır^[33].

3.4.2. Konvansiyonel Dondurma-Çözme İşlemleri

3.4.2.1. Dondurma İşlemi

Hazırlanan sperm örnekleri (2075 Falcon) konik tüpler içerisine toplandı. Örneklerin üzerine dondurma solüsyonu (irvine scientific test yolk buffer) 1:1 oranında 2 dk süre ile yavaşça damlatılarak eklendi. Bu sürenin sonunda süspansiyonlar yüksek korumalı strawlar (cryo biosystem) içine çekildi. 8 dk oda ısısında bekletilir. 8dk sonunda sıvı azot buharı olan ızgaralar üzerine yerleştirilen strawlar -70°C de 8dk daha bekletildikten sonra sıvı azot içine atıldı^[34].

3.4.2.2. Çözme İşlemi

Çözme işleminde, tüpler sıvı nitrojenden çıkartılıp 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 37°C su içeren tüplere daldırıldı. Örnek tamamen çözüldükten sonra

tüplere (Falcon 2003) boşaltıldı ve üzerine yıkama solüsyonu (Life Global HTF with HSA) eklenip 300 g'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak kriyoprotektan uzaklaştırıldı. Çözme işlemi sonrası elde edilen sperm örneklerinde konsantrasyon, motilite, vitalite ve DNA fragmantasyonu değerlendirmeleri yapıldı ^[34].

3.5. DNA Fragmantasyonu Tayini

DNA fragmantasyonu TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Almanya) kiti kullanılarak incelendi.

3.5.1. TUNEL Test Uygulama Protokolü

- a) Yıkama sonrası elde edilen homojenat 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmek suretiyle konsantre edilir.
- b) Oluşan pellet her defasında üzerine 1 ml distile su ekleyip homojenize edildikten sonra 3 kez 1200 rpm'de 10'ar dakika santrifüj edilir.
- c) 2ml hipotonik solüsyon (KCl; 0,075 M) eklenir. Hafifçe vortekslendikten sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
- d) Süpernatant (üst faz) uzaklaştırılır ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilir.
- e) Pellet (çökelti) üzerine 2 ml fiksatif (2:1; metanol: asetik asit) eklenir. 15 dakika - 20°C'de bekletilir.
- f) 2 lam üzerine yaymalar yapılır. 5 dakika PBS'te (Phosphate-buffered saline) (1x), bekletilir. Daha sonra sırayla %70, %85 ve %100'lük etil alkol konsantrasyonlarından geçirilerek yıkanır.
- g) Bu aşamada hazır kit solüsyonlarının uygulanmasına geçilir. Önce birinci solüsyondan 5 µl, ikinci solüsyondan 45 µl alınarak hazırlanan stok solüsyondan hazırlanmış iki slaytın herbirinin üzerine 25 µl eklenir, üzerleri geniş birer lamelle kapatılır. Slaytlar kağıt ıslak havlu konmuş olan mapeye yerleştirilir ve üzerleri aliminyum folyo ile kapatılır. 45 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılır.
- h) İnkübasyon sonrası PBS ile 1 dakika boyunca yıkanır. İşlem 3 kez tekrar edilir. Örnekler oda ısısında kurumaya bırakılır.

i) Kurumuş slaytlar nukleusu göstermek amacıyla DAPI II (Abbott Molecular, U.S.A, 06J50-001) boya ile boyandı ve Olympus BX51 floresan mikroskopta 100X büyütmede 500 hücre sayılarak FITC filtresi kullanılarak değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

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

4. BULGULAR

4.1. Sperm Örneklerinin Konsantrasyon, Motilite ve Vitalite Bakımlarından Değerlendirilmesi

Yaptığımız prospektif çalışmada normozoospermik vakalardan alınan semen örneklerinin bazal olarak değerlendirilmesi yapıldı (Tablo 4-1). Bazal değerlendirmede ortalama konsantrasyon 48 ± 4.2 olarak saptandı. Bazal örneklerde motilite, progressif motilite ve vitalite (canlılık) oranları sırasıyla; 59 ± 6.1 , 47 ± 3.9 ve 88 ± 9.1 olarak saptandı (Tablo 4-1). Örnekler yapılan değerlendirmeler sonrasında, sırasıyla gradient ve swim-up teknikleri kullanılarak yıkama işlemlerine tabi tutuldu. Son yıkama işlemi olarak swim-up tekniği ile yukarı yüzen spermeler süpernatantın çekilmesiyle toplandı. Homojenizasyon sonrası tekrar motilite ve progresif motilite tayinleri yapıldı (Tablo 4-2). Çözme sonrası konsantrasyon oranları, dondurma öncesi kullanılan tekniklere bağlı olarak farklılık gösterdi. Fakat motilite, progressif motilite ve vitalite açısından iki teknik açısından istatistiksel anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Benzer şekilde çözme işlemi sonrası vitalite oranları bakımından ASD tekniği ile konvansiyonel teknik arasında fark gözlenmedi.

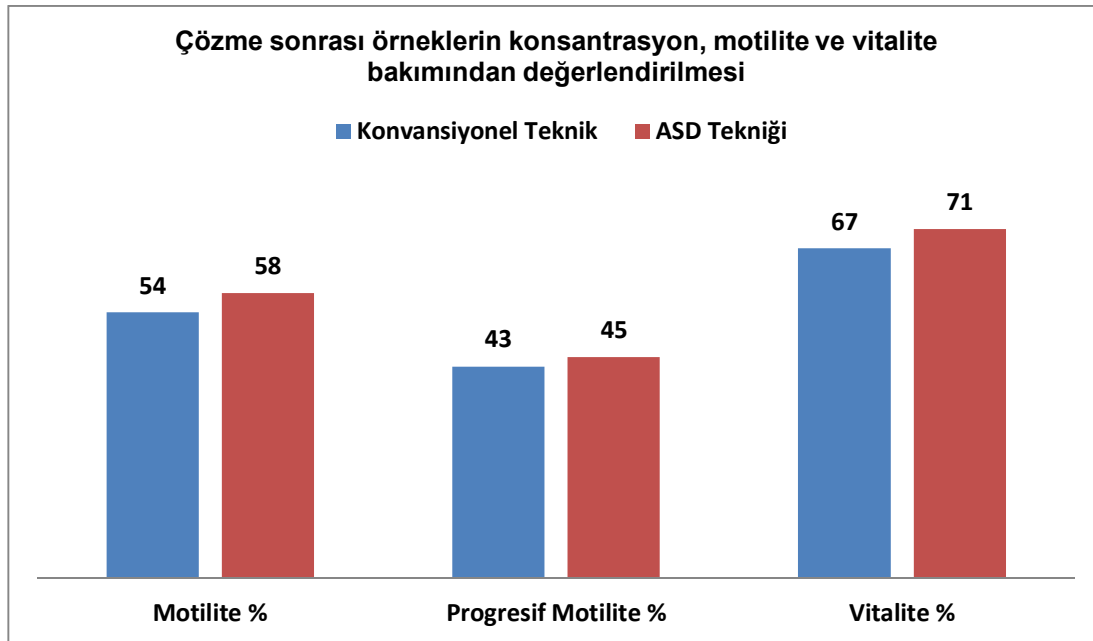
Tablo 4-1: Çalışmaya katılan erkeklerin semen analizi sonuçları

n: 20	
Konsantrasyon (10^6/ml)	$48\pm 4,2$
Motilite (Hareketlilik) (%)	$59\pm 6,1$
Progresif motilite (İleri Hareketlilik) (%)	$47\pm 3,9$
Vitalite (Canlılık) (%)	$88\pm 9,1$

Tablo 4-2: Çözme sonrası örneklerin konsantrasyon, motilite ve vitalite bakımından değerlendirilmesi

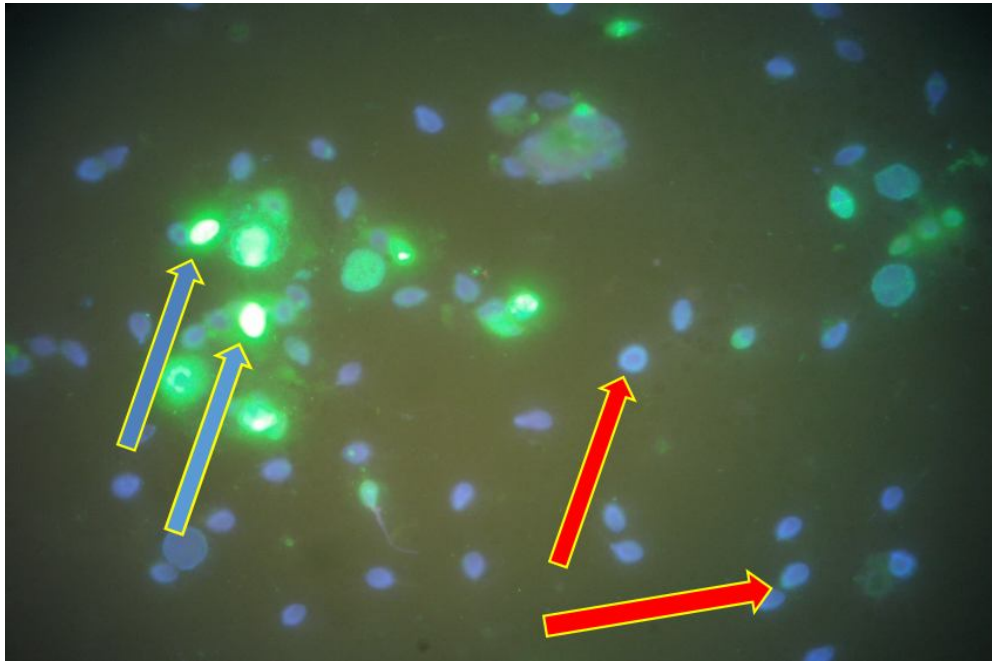
	Konvansiyonel Teknik	ASD Tekniği
Dondurma Öncesi Konsantrasyon (10 ⁶ /ml)	26±14	
Dondurma Sonrası Konsantrasyon (10 ⁶ /ml)	82±28	<1000
Motilite (Hareketlilik)%	54*	58*
Progresif Motilite (İleri Hareketlilik) %	43*	45*
Vitalite (Canlılık) %	67*	71*

*p > 0.05

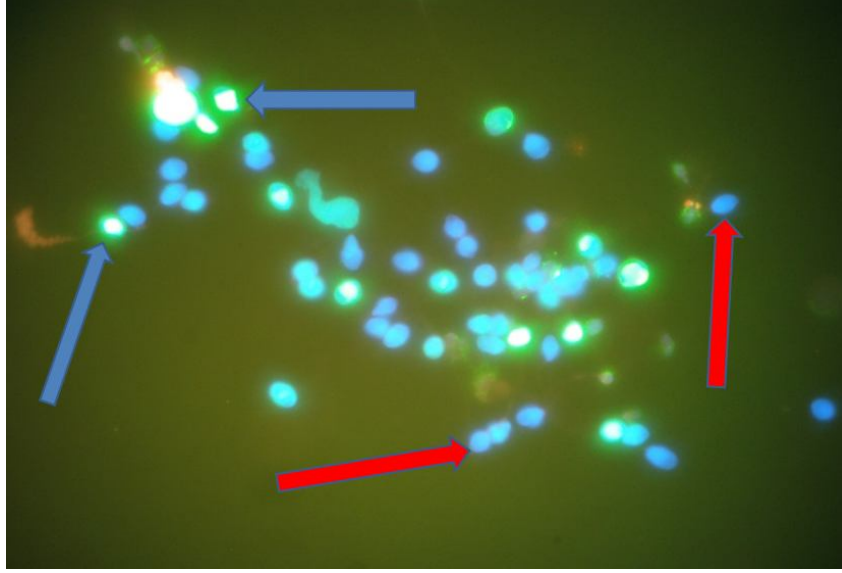


4.2. Semen Örneklerinin Hazırlık Öncesi ve Sonrasında DNA Fragmantasyonu Açısından Değerlendirilmesi

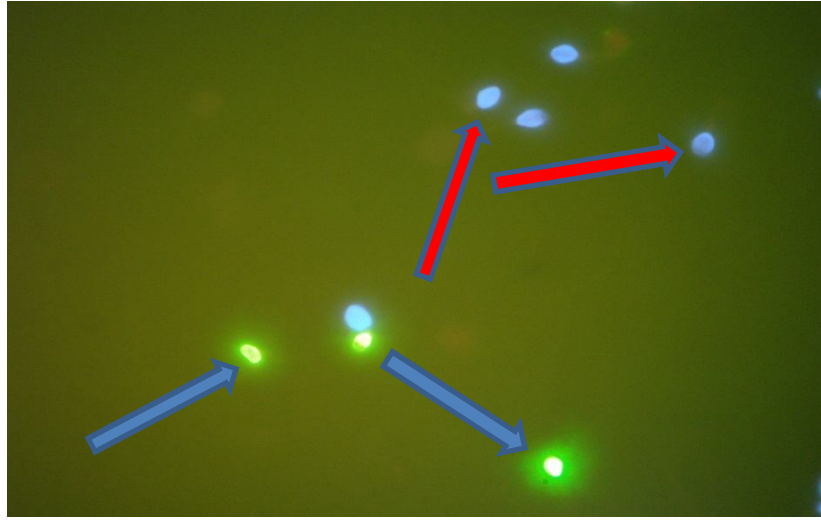
Semen belirtilen tekniklerle yıkama işlemlerine tabi tutuldu. Yıkama sonrası örneğin bir kısmı kullanılarak TUNEL test uygulandı. Dondurulan örnekler 1 ay sonra çözme işlemlerine tabi tutuldu. Çözme sonrası yapılan DNA fragmantasyonu incelemelerinde dondurma öncesine göre kısmi apoptoz ve komplet apoptoz oranlarında anlamlı derecede artış bulundu (sırası ile $p= 0.02$; $p= 0.03$) (Tablo 4-3) (Şekil 4-1; Şekil 4-2; Şekil 4-3). DNA fragmantasyonu olmayan normal sperm oranında ise çözme sonrası istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı ($p=0.01$) (Tablo 4-3).



Şekil 4-1: Dondurma öncesi yapılan değerlendirmede kırmızı oklar DNA fragmantasyonu içermeyen; mavi oklar ise DNA fragmantasyonuna uğramış sperm hücrelerini göstermektedir.

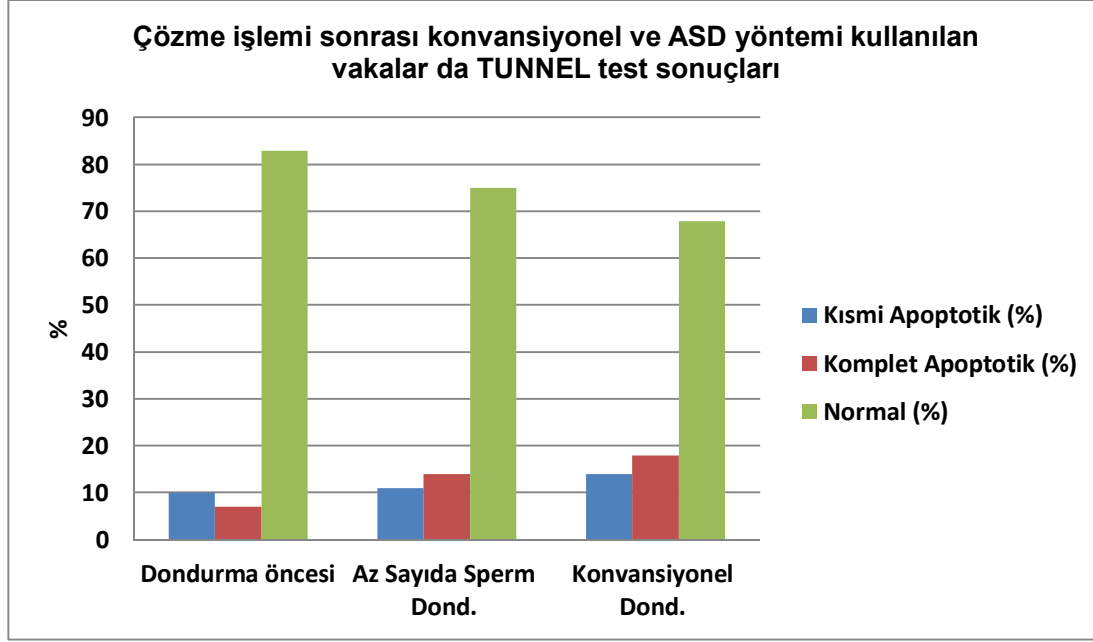


Şekil 4-2: Konvansiyonel yöntemiyle dondurulan örneklerin çözme sonrası TUNEL test değerlendirmesinde kırmızı oklar DNA fragmentasyonu içermeyen; mavi oklar ise DNA fragmentasyonuna uğramış sperm hücrelerini göstermektedir.



Şekil 4-3: Vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan örneklerin çözme sonrası TUNEL test değerlendirmesinde kırmızı oklar DNA fragmentasyonu içermeyen; mavi oklar ise DNA fragmentasyonuna uğramış sperm hücrelerini göstermektedir.

Tablo 4-3: Çözme işlemi sonrası konvansiyonel ve ASD yöntemi kullanılan vakalar da TUNNEL test sonuçları



	Dondurma öncesi	Az Sayıda Sperm Dond.	Konvansiyonel Dond.	p
Kismi Apoptotik (%)	10	11	14	0,02
Komplet Apoptotik (%)	7	14	18	0,03
Normal (%)	83	75	68	0,01

5. TARTIŞMA

Sperm dondurulması uzun zaman önce uygulanmaya başlamıştır. Buna karşın yıllar içerisinde dondurma protokollerinde çok farklı kriyoprotektanlar ve dondurma teknikleri kullanılmasına rağmen çözme işlemi sonrasında vitalite oranlarında pozitif yönde çarpıcı artışlar gözlemlenmemiştir. Ayrıca dondurma-çözme protokolleri az sayıda sperme sahip virtual (sanal) azoospermi, şiddetli OAT ya da testiküler yolla sperm elde edilen olgular için henüz optimize sonuçlar ortaya koyamamıştır ^[9]. Çözme işlemleri sonrası özellikle virtual (sanal) azoospermi olarak tanımlanan grupta (<1000 sp/ml) ya da TESE işlemi sonrası çok az sayıda sperm bulunan vakalarda sperm elde edilmesi oldukça güçleşmektedir. Sperm matürasyonun ve morfolojisinin göreceli olarak kötü olduğu olguların, tekrarlayan YÜT denemelerinde, çözme sonrası kullanılan spermle, dölleme şansını önemli derecede azaltmaktadır. Bazı durumlarda sperm çözme işlemi sonrası vital (canlı) sperm bulmak için inverted mikroskopta saatlerce arama yapılması gerekmektedir. Bu tip vakalardan toplanan spermelerin çözme sonrası daha kolay elde edilebilmesi amacıyla 90'lı yılların sonlarında Cohen ve arkadaşları tarafından oositten elde edilen zona pellisuda içerisinde toplanan spermeler dondurulmuş ve çözme sonrasında vitalite (canlılık) ve motilite (hareketlilik) açısından başarılı klinik sonuçlar elde edilmiştir. Fakat dondurma sırasında kullanılan zona pellisudanın etik problemler nedeniyle sorun teşkil etmesi çok fazla klinik kullanıma girememesine yol açmıştır.

Zaman içerisinde birçok bilim adamı tarafından farklı taşıyıcılar kullanılarak mikro volümler içerisinde sperm dondurma çalışmaları yapılmıştır. Abdelhafez ve arkadaşlarının yaptığı derleme çalışmasında 2'si biyolojik 7'si biyolojik olmayan toplam 9 farklı taşıyıcı denendiği bildirilmiştir ^[9]. Yuji ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda cryotop ve cell-sleeper ile çözme sonrası başarılı sonuçlar elde etmişlerdir ^[33].

McVicar ve arkadaşları 2004'de DNA fragmentasyonunun sperm kalitesi için kullanılabilir bir indikatör olarak kabul edilmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Bu yönde yapılan çalışmalar TUNEL ile yapılan ölçümlerle sperm DNA fragmentasyonunun erkek fertilitesinde yüksek oranda önemli olduğunu göstermiştir ^[35].

İlerleyen çalışmalar DNA fragmentasyonunun aza indirgenmesi ile ilgilenmiştir. İnsan sperminde swim-up (yukarı yüzdürme) ile yıkama öncesi ve sonrasında DNA fragmentasyon durumu karşılaştırıldığında swim up (yukarı yüzdürme) sonrası hazırlanan örneklerde yıkama öncesine göre nekrotik, apoptotik ve sitoplazmik artık bulunan spermlerin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Ancak immatür, akrozomu bozuk spermlerin swim up (yukarı yüzdürme) sonrasında da hala var olduğu bilinen bir durumdur ^[36]. 2006 yılında de Paula ve arkadaşları yaptıkları çalışmada oligozoospermli hastalara TEST yolk buffer solüsyonu kullanılarak uyguladıkları standart dondurma prosedüründen sonra TUNEL testi ile dondurma öncesi ve sonrasında apoptotik hücreleri değerlendirmişler ve kriyoprezervasyon sonrasında oligozoospermli erkeklerde kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası apoptotik sperm nükleer DNA fragmentasyon oranının daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Kriyoprezervasyonun normozoosperm ve oligozoospermik erkeklerde apoptotik DNA fragmentasyonunu yükseltici bir etki yaptığı gösterilmiştir ^[37].

Cryotop, biyolojik olmayan ve ticari olarak elde edilebilen düşük volümlerde sperm dondurulmasına olanak sağlayan bir taşıyıcıdır. Yaptığımız çalışmada literatürde belirtildiği gibi 3.5 µl volüm içerisinde dondurulan spermlerin çözme sonrasında yüksek oranda vitalite (canlılık) ve motilitesini (hareketliliğini) koruduğunu gözlemledik. Aynı zamanda her dondurma işlemi için kullanılan sperm vitrifikasyon tekniği ve konvansiyonel dondurma tekniği arasında, çözme sonrası DNA fragmentasyonu açısından anlamlı farklar bulunamamış ve benzer fragmentasyon oranları elde edilmiştir (Tablo 5).

Bu çalışmada amacımız vitrifikasyon tekniğinin etkinliğini ve güvenilirliğini göstererek şiddetli OAT, virtual (sanal) azoospermi gibi ejakülatında az sayıda sperm bulunan vakaların ve benzer şekilde cerrahi yöntemler kullanılarak testiküler yolla elde edilen az sayıdaki sperm hücresinin dondurma-çözme sonrasında çok daha verimli kullanılabilceğini göstermekti.

Çalışmanın sonuçları incelendiğinde ASD metodunun teknik anlamda umut verici olduğu gözlemlenmektedir. Bununla birlikte bu tekniğin klinik kullanımı ve sonuçlarının değerlendirilmesi, yaygın olarak kullanımına olanak sağlayacaktır.

6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmada ASD tekniğinin etkinliğini ve güvenilirliğini araştırdık. Bu amaçla öncelikle normozoaspermik tanısı konan 20 erkekte alınmış semen örnekleri bazal incelemeye tabi tutuldu ve konsantrasyon, motilite, progressif motilite, vitalite ve DNA fragmentasyonu bakımından incelendi. Daha sonra sırasıyla dansite gradient (yoğunluk sıralayıcısı) ve swim-up (yukarı yüzdürme) yöntemleri kullanılarak sperm hazırlama işlemleri uygulandı. Yıkama işlemlerinden sonra örnekler 2 farklı dondurma tekniği kullanılarak donduruldu. Yaklaşık 1 ay sonrasında dondurulan örnekler çözöldü ve çözme sonrası konsantrasyon, motilite, progresif motilite, vitalite ve DNA fragmentasyonu bakımından her iki dondurma tekniğinin etkileri karşılaştırıldı. Normozoaspermik denekler üzerinde yapılan bu çalışmada yeni bir teknik olan az sayıdaki spermin düşük volümler içinde cryotop kullanılarak dondurularak saklanması ile konvansiyonel teknik arasında yukarıda belirtilen parametreler bakımından anlamlı farklar bulunmadı. Bu sonuçlar özellikle az sayıda sperm hücrelerinin olduğu virtual (sanal) azoospermik ve cerrahi yöntemlerle elde edilen spermilerin, çözme işlemi sonrasında yüksek oranda sperm geri kazanımına ihtiyaç duyulan vakalarda oldukça umut verici sonuçlar elde edilmesine yol açmıştır.

7. ÖZET

Normozoospermik vakalarda, farklı dondurma protokollerinin sperm geri kazanımı, vitalite ve DNA fragmantasyonu yönünden karşılaştırılması

Yapılan çalışmalar konvansiyonel dondurma tekniklerinin gerek testiküler gerekse az sayıda sperm içeren örneklerde gerekli yeterlilikte olmadığını göstermiştir. İnsan sperm hücrelerinin vitrifikasyonu ve sonrasında ICSI için kullanılması YÜT pratiğinde önem arz etmektedir. Az sayıdaki sperm dondurulabilmesi ile özellikle çok az sayıda spermi olan, kemoterapi ya da radyoterapi uygulanacak hastalar, azospermik olgular gibi vaka gruplarında sperm eldesi için ardışık cerrahi operasyonlara gerek kalmadan çiftlere tekrar deneme şansı verilmiş olacaktır. Yaptığımız çalışmada daha önce az sayıda sperm dondurulması ile ilgili çalışmalarını destekleyen bulgular elde ettik. Çalışma sırasında taşıyıcı olarak kullanılan cryotop spermlerin yüklenmesi ve çözme işlemi sonrasında elde edilebilmesi açısından çok uygun bir araç olarak gözlemlendi. Benzer şekilde kriyoprotektan ajan olarak test yok buffer muadili olarak 0,25 M sukroz kullanılarak, sperm çözme işlemi sonrasında daha basit ve düşük maliyetli solüsyonlar kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Az sayıda ki sperm hücresinin dondurulması ve çözülmesi sonrası elde edilmesi ile ilgili günümüze kadar yapılan çalışmalar ve bizim yaptığımız çalışma umut verici sonuçlar elde edilmesine olanak sağlasa da klinik kullanımları ve canlı doğum oranları ile ilgili ileri çalışmalar bulguların güvenilirliği açısından destekleyici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Az sayıda sperm dondurulması, sperm vitrifikasyonu, konvansiyonel yöntem ile sperm dondurulması, sperm DNA fragmantasyonu.

8. SUMMARY

Comparison of two freezing techniques in terms of sperm recovery, vitality and DNA fragmentation in Normozoospermic cases

Conventional freezing techniques were shown not to be suitable for testicular sperm or for samples with low sperm count. Vitrification of human sperm and their subsequent use for ICSI is a step crucial in IVF practice. Single sperm freezing may offer another chance, a second IVF attempt without the need for consecutive surgeries, especially for patients who will receive chemotherapy or radiotherapy or for males with azoospermia.

In the present study, we reached the same conclusions as previously published work on single sperm freezing. We observed that the carrier we used (cryotop) was user friendly for the loading of sperm before vitrification and for the thawing process. Also, using 0.25 M sucrose instead of test yolk buffer as a cryoprotective agent was successful, simpler and cheaper.

Although single sperm freezing and the subsequent thawing was successful in the literature as in our study, the clinical application of the technique should be supported by prospective studies giving live birth rates which should be evaluated for a larger and safer application of the technique.

Key words: Single sperm vitrification, conventional sperm freezing, sperm apoptosis

9. KAYNAKLAR

1. Polge, C., A. Smith, and A. Parkes, Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 1949. **164**(4172): p. 666.
2. GH., W.A.B.M.L.J.P.M.R.P.Z., Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/ Theory* 1996: p. 229-244.
3. L., D., A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul,Veri Medikal Yayıncılık,, 2008: p. 229-258.
4. CINCIK, M., Sperm Cryopreservation. *Gulhane Medical Journal*, 2003. **45**(1): p. 100-106.
5. PERLOFF WH, S.E., SHERMAN JK., CONCEPTION WITH HUMAN SPERMATOZOA FROZEN BY NITROGEN VAPOR TECHNIC. *Fertil Steril.* , 1964 Sep-Oct. **15**: p. 501-504.
6. Palermo, G., et al., Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992. **340**(8810): p. 17-8.
7. Schlegel, P.N. and L.-M. Su, Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Human Reproduction*, 1997. **12**(8): p. 1688-1692.
8. Fusi, F., Calzi, F., Rabbellotti, E., Papaleo, E., Gonfiantini, C., Bonzi, V., Santis, L.D. and Ferrari, A. , Fertilizing capability of frozen-thawed spermatozoa recovered from microsurgical epididymal sperm aspiration and cryopreserved in oocyte-free human zona pellucida. *Hum. Reprod.*, 2001. **16**: p. 117.
9. AbdelHafez, F., et al., Techniques for cryopreservation of individual or small numbers of human spermatozoa: a systematic review. *Human reproduction update*, 2009. **15**(2): p. 153-164.
10. TW., S., Langman Medikal Embriyoloji. Palme Yayıncılık, Ankara, 2005: p. s.3-30.
11. Ross HM, R.J., *Histology: a text and atlas. Section 21: Male reproductive system.* 2006 (2nd edition): p. s.603-625.
12. Junqueira LC, C., Kelley OR. (Çev: Aytekin Y, Solakoglu and A.B. S, *Temel histoloji Nobel Tıp Kitabevleri*, 2006: p. s.407-419, 431-433.
13. Peschon JJ, B.R., Brinster RL, Palmiter RD, Spermatozoa-specific expression of protamine-1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987. **84**: p. 5316-5319.

14. MH., V., Immunocytochemical methods and protocols. 2nded. . Humana Press, , 1999). **115**: p. 141-148.
15. Wijsman JH, J.R., Keijzer R, Van de cees CJH, Cornelisse J, Van Dierendonck JH, A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. J Histochem Cytochem, 1993. **41**(7-12).
16. Bratton DL, F.V., Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM., Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. . K Biol Chem, 1997. **272**: p. 26156-26168.
17. Baccetti B, C.G., Piomboni P, Apoptosis in human ejaculated sperm cells. . J. Submicrosc Cytol Pathol, 1996. **28**: p. 587-596.
18. Schroeder AC, C.A., Mobraaten LE, Eppig JJ, Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. J Reprod Fert, 1990. **89**: p. 43-50.
19. L., D., Tüp Bebek Yardimci Üreme Tekniklerinde Laboratuvar Yöntemleri. Baysed Yayin No:10, Ankara, 1997: p. s.229-252.
20. Cohen, J., et al., Cryopreservation of single human spermatozoa. Human Reproduction, 1997. **12**(5): p. 994-1001.
21. Gilmore JA, L.J., Woods EJ, Peter AT, Critser JK. , Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. Hum Reprod., 2000. **15**(2): p. 335-343.
22. Salzbrunn A, B.D., Holstein AF, Schulze W. , A new concept for the extraction of testicular spermatozoa as a tool for assisted fertilization (ICSI). Hum Reprod, , 1996. **11**(4): p. 752-755.
23. Porcu E, Oocyte freezing. . Semin. Reprod. Med, , 2001; . **19**(3): p. 221-230.
24. LE, M., Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. Cryobiology, 1999. **15**: p. 382-390.
25. Holt WT, Basic aspects of frozen storage of semen. . Anim Reprod Sci, , 2000. **62**: p. 3-22.

26. Leeuw FED, L.A., Daas JHG, Colenbrander BV, ve ark., , Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*,, 1993; . **30**: p. 32-44.
27. Oehninger S, D.N., Srisombut C, Morshedi M, , Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol*, , 2000. **169**: p. 3-10.
28. DEVROEY, P., IIU, J., NAGY,Z., GOOSSENS, A., TOURNAYE,H., CAMUS,M., VAN STIERTEGHEM, A, and SILBER, S Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum, Reprod.* , 1995a. **10**: p. 1457-1460.
29. Craft, I., Tsigotis, M., Courtauld, E. and Farrer-Brown, G, Testicular needle aspiration as an alternative to biopsy for the assessment of spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 1997. **12**: p. 1483–1487.
30. Mahadevan M, B.G., Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization. In:Wood C,Trounson A, eds. *Clinical In Vitro Fertilization*. Berlin. Springer, 1984. **83**.
31. WHO laboratuvarı el kitabı. p. s:34-35.
32. WHO laboratuvar el kitabı. p. s: 21-25.
33. Yuji Endo, Y.F., Kasumi Shintani, Momoyo Seo,, Hiroaki Motoyama¹ and Hiroaki Funahashi² (Single Spermatozoon Freezing Using Cryotop. *J.Mamm.Ova Res.*,, 2011. **28**: p. 47-52.
34. David K.Gardner, A.W., Colin M Howles,, *Textbook of Aaiated Reproductive Techniques Laboratory and Clinical Perspectives Second Edition*. Zeev Shoham: p. s:303-304.
35. McVicar CM, M.N., Williamson K, Dalzell LH, Lewis SE. , Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril.* , 2004. **81**(1): p. 767 -774.
36. Piomboni P, B.E., Capitani S, Gambera L, Moretti E, La Marca A, De Leo V, Baccetti B. , Ultrastructural and dna fragmentat.on analyses in sw.m-up selected human sperm. *Arch Androl*, 2006. **52**: p. 51–59.
37. T. de Paula, R.B., D. Spaine, M. Cunha, N. Schor, A. Cedenho, Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and Sterility*, 2006. **86**(3): p. 597-600.

10. TEŞEKKÜR

Türkiye’de ilk Klinik Embriyoloji Programını kuran ve beni kabul ederek, yüksek lisansa başlamamı sağlayan Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Tülay İrez’e minnetlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Tezimin oluşturulmasındaki yardımlarından ve çalışmamın tüm aşamalarındaki desteğinden ötürü Prof. Dr. Ersi Kalfoğlu’na teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmam sırasında, kullandığım farklı tekniklerin uygulanmasında yardım aldığım ve desteklerini esirgemeyen; fikir ve önerileri ile her zaman yanımda olan ve bu zorlu dönemin her aşamasında gösterdiği ilgi, sabır ve yardımlarından dolayı Şişli Memorial Hastanesi IVF Laboratuvar Sorumlusu ve eşim Embriyolog Hakan Yelke’ye sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam süresince desteğinden ötürü Şişli Memorial Hastanesi ÜYTE Bölüm başkanı Prof Dr Semra Kahraman’a teşekkür ederim

Tez çalışmamın tüm aşamalarındaki destekleri ve yardımları nedeniyle iş arkadaşlarım Bio. Şebnem Yazıcı ve Bio. Tuğba Şenel’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan, varlıkları ile bana güç veren aileme bu süreçteki destek ve sabırları için sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

11. ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 10840098 – 64
Konu: Etik Kurulu Kararı

21/03/2014

Sayın Prof. Dr. Ersi ABACI KALFOĞLU

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Normozoospermik vakalarda farklı dondurma protokollerinin sperm geri kazanımı, vitalitesi ve DNA fragmantasyonu yönünden karşılaştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.



Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

EK:

-Karar Formu (2 sayfa)

21/03/2014-İ.FİL 

Tel: (0216)681 53 00
Faks:(0212)531 75 55
E-mail:ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres:Kavacık Mah.Ekinciler Cad.No:19,34810
Kavacık/BEYKOZ

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI	19.03.2014		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	19.03.2014		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 63		Tarih: 21.03.2014			
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.					

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Doç. Dr. Haneî ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlgili		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Tangül MÜDOK	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Haneî ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Berna EREN	Halk Sağlığı	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Emir YÜZBAŞIOĞLU	Protetik Diş Tedavisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. İlknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Op. Dr. Muhammed Fatih EVCİMİK	Kulak-Burun Boğaz	Özel Nisa Hastanesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR
FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Normozoospermik vakalarda farklı dondurma protokollerinin sperm geri kazanımı, vitalitesi ve DNA fragmantasyonu yönünden karşılaştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Ersi ABACI KALFOĞLU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tüp Bebek			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

AYDINLATILMIŞ (BİLGİLENDİRİLMİŞ) ONAM FORMU

Çalışmanın Adı ; Normozoospermik vakalarda farklı dondurma protokollerinin sperm geri kazanımı,vitalitesi ve DNA fragmantasyonu yönünden karşılaştırılması.

Bu araştırmanın amacı, Normozoospermik vakalarda insan sperm hücresinin minimal volüm içinde vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması ve akabinde çözme işlemi sonrası canlılık , motilite ve kromozom bütünlüğü açısından konvansiyonel yöntemle dondurulan spermle karşılaştırılması ,bunun sonucunda özellikle çok az sayıda sperme sahip olan olgularda elde edilen spermatozoanın çok küçük volümlerde donurulması ve çözme sonrası etkin şekilde kullanılabilmesi amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada yer alacak gönüllülerin sayısı 'dir.

Bu çalışmada sizin için herhangi bir risk ve rahatsızlık söz konusu değildir.

Bu çalışmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada çalışmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da hiçbir şekilde sizin zararınıza yol açmayacaktır. Araştırmacı, bilginiz dahilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız vb. nedenlerle sizi çalışmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz .

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Yukarıda yer alan ve çalışmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, aktarılması ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu çalışmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın gönüllü olarak kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcının,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Görevi:

Adresi:

Tel.-Faks:

Tarih ve İmza:

12. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuba	Soyadı	Varlı Yelke
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	29.01.1980
Uyruğu	TC	TC Kim No	40123548478
Email	tubayelke@gmail.com	Tel	0532 280 06 85

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Lisans	İ.Ü Fen Fakültesi Biyoloji	2001
Lise	Kazım Karabekir İHL	1996

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
1. Embriyolog	Avrupa Şafak Hastanesi	2002 - 2006
2. ÜYTE Lab Sorumlusu	Nisa Hastanesi	2006-2013
3. ÜYTE Lab Sorumlusu	Medipol Üniversitesi	2013-Halen

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma	KPDS	(Diğer)
				Puanı	
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office programları	Çok iyi