



T.C.
İstanbul
YENİ YÜZYIL
ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE FARKLI ANTİOKSİDAN MADDELERİN
SPERM KRİYOPREZERVASYON YÖNTEMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARIN KERPİÇÇİ

DANIŞMAN

PROF. DR. ÖZEN BANU ÖZDAŞ

İSTANBUL, Ağustos 2015



T.C.
Istanbul
YENİ YÜZYIL
ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KLİNİK EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE FARKLI ANTİOKSİDAN MADDELERİN SPERM
KRİYOPREZERVASYON YÖNTEMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ARIN KERPİÇÇİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ÖZEN BANU ÖZDAŞ

İSTANBUL, Ağustos 2015



T.C.
İstanbul
YENİ YÜZYIL
ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

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

Tez Savunma Tarihi: 14.08.2015

Jüri Başkanı

Prof.Dr. Tülay İrez

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Üye

Prof.Dr. Özen Banu ÖZDAŞ

İstanbul Üniversitesi

Üye

Yrd. Doç. Nurten Dayıoğlu

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

BEYAN

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

Arın KERPİÇCİ

İTHAF

Değerli anneme, babama ve eşime ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Tezimin her aŐamasında değerli bilgileriyle bana yol gosteren ve desteğini hiğbir zaman esirgemeyen sayın danıŐman hocam Prof. Dr. Özen Banu ÖZDAŐ'a, lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım baŐta Klinik Embriyoloji Koordinatörü Sayın Prof. Dr. Tülay İREZ olmak üzere tüm değerli öğretim üyelerine, eğitimimin yanı sıra özellikle ęalıŐma hayatım süresince bana olan katkılarından dolayı iŐ arkadaşlarım Dr. Seda KARABULUT ve Bio. Elif YILMAZ'a, hiğbir zaman yardımdan kaçınmayan sevgili Dr. Asiye İzem SANDAL'a, ęalıŐmam boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm embriyolog arkadaşlarıma, her konuda sabırla yardımcı olan eŐim Enis KERPIĆCI'ye, bütün hayatım boyunca sevgi, anlayıŐ, sabır ve tüm maddi, manevi desteklerini benden esirgemeyen ANNEME VE BABAMA sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

ABSTRACT

Sperm freezing is a method which is used in donor inseminations and cancer treatment, in addition to the assisted reproduction techniques. Sperm cryopreservation in male infertility is important with regard to the maintenance and transmission of the fertility to the next generations.

When the frozen stored sperm cells are used in assisted reproduction techniques, sperm parameters such as motility or viability may be adversely affected and thus this may result in poor fertilization, embryo development or implantation rates.

In this thesis study, sperm samples of 45 patients were frozen via TYB (Tris Egg Yolk Buffer) media supplemented with glutathion and β -ME antioxidants, post-thaw sperm parameters were investigated and in order to support the study, DNA fragmentation levels were analysed via Halosperm test.

In the study a total of 5 groups were constructed as follows: pre-freeze, TYB media no supplemented with antioxidant, Glutathion added TYB media (final concentration: 1 mM), β -ME added TYB media (final concentration: 0.5 mM) and Sperm Freeze SolutionTM (Vitrolife).

The motility and vitality rates, A motility % (forward and fast motile spermatozoon), B motility % (forward but slow motile spermatozoon), C motility % (slow motile, not progressive spermatozoon) and D motility % (immotile spermatozoon) were investigated before the freezing and after the thawing procedures, and the statistical results were evaluated via Analysis Of Variance.

As a conclusion, post-thaw vitality, motility and B motility % values were statistically significantly decreased, whereas D motility % was increased as expected. Pre- and post-thaw values of C motility % were statistically insignificantly changed. It was observed that A motility % was significantly decreased in the groups other than the second which included glutathione added TYB medium. In addition, these 5 groups investigated were further analysed via Halosperm test (Halotech DNA, S.L.), but no significance was detected.

ÖZET

Sperm dondurma, yardımla üreme teknolojilerinin yanı sıra donör inseminasyonları ve kanser tedavisinde de kullanılan bir yöntemdir. Erkek infertilitesinde sperm kriyoprezervasyonu, üremenin korunması ve gelecek nesillere aktarılması açısından önem teşkil etmektedir.

Dondurularak saklanan sperm hücreleri yardımla üreme tekniklerinde kullanıldığında, hareketlilik ve canlılık gibi sperm parametreleri olumsuz etkilenmekte ve dolayısıyla dölleme, embriyo gelişimi ve implantasyon oranlarına yansımaktadır.

Bu tez çalışmasında, 45 hastanın semen örnekleri glutatyon ve β -ME antioksidanları eklenen TYB (Tris Egg Yolk Buffer) medyumunu ile donduruldu, çözme sonrası sperm parametreleri incelendi ve çalışmayı desteklemek amacıyla Halosperm testi ile DNA fragmentasyon seviyeleri analiz edildi.

Çalışmada, dondurma öncesi (Taze semen), antioksidan eklenmeyen TYB medyumunu, glutatyon (son konsantrasyon 1 mM) eklenen TYB medyumunu, β -ME (son konsantrasyon 0.5 mM) eklenen TYB medyumunu ve Sperm Freeze Solution™ (Vitrolife) medyumunu olmak üzere toplamda 5 grup oluşturuldu.

Dondurma öncesi ve sonrasında toplam motilite, vitalite, %A motilite (ileri hızlı hareketli spermatozoon), %B motilite (ileri yavaş hareketli spermatozoon), %C motilite (yerinde hareketli spermatozoon) ve %D motilite (hareketsiz spermatozoon) oranları incelenerek sonuçlar istatistiksel olarak Varyans Analizi (Tek yönlü) ile değerlendirildi.

Çalışmamız sonucunda, çözme sonrası canlılık, hareketlilik, %B hareketli değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı, %D hareketliliğın ise beklendiğı gibi arttığı sonucuna varıldı. %C hareketli değerlerinin dondurma öncesi ve sonrası farkı istatistiksel olarak önemsiz bulunup, glutatyon eklenen TYB medyumunun bulunduğı 3. grup dışındaki diğer grupların %A oranının önemli düzeyde azalmakta olduğı görüldü. Ayrıca değerlendirilen bu 5 grup, çözme sonrasında Halosperm test (Halotech DNA, S.L.) ile incelendi fakat aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamadı.

KISALTMALAR

AC: Askorbik asit

ASRM: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (American Society for Reproductive Medicine)

ATP: Adenozin trifosfat

β -ME: Beta merkaptoetanol

BMI: Vücut kitle indeksi (Body Mass Index)

CA: Tek hücre jel elektroforezi (Comet Assay - Single Cell Gel Electrophoresis assay –SCGE)

CR1aa: Charles Rosencrans medyumu

DBD-FISH: DNA kırıkları belirleme yöntemi (DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization test)

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

EG: Etilen glikol

GSH: İndirgenmiş Glutatyon

GSR: Glutatyon redüktaz

GSSH: Okside Glutatyon

ICSI: Intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)

IUI: Aşılama (Intrauterin İnseminasyon)

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)

IVF: Hücre dışı dölllenme (In Vitro Fertilization)

IVM: Hücre dışı olgunlaşma (In Vitro Maturasyon)

mL: Mililitre

OPU: Yumurta toplama işlemi (Oosit Pick Up)

PBS: Fosfat çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)

pH: Hidrojen potansiyeli

PN: Pronükleer

PROH: 1,2-propanediol

ROH: Alkoller

ROT: Reaktif oksijen türevleri

RSH: Tiyoller

SCD: Sperm kromatin dağılım testi (Sperm Chromatin Dispersion)

SCSA: Sperm Kromatin Yapısı Tayini (Sperm Chromatin Structure Assay)

TCM-199: Doku kültür medyumunu-199

TUNEL: The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase- Mediated Deoxyuridine

(TdT) Triphosphate (dUTP) Nick End Labeling Assay

ÜYTE: Üremeye Yardımcı Tedavi

WHO: Dünya sağlık örgütü (World Health Organization)

beyan.....	ii
ithaf.....	iii
teşekkür.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖZET.....	vii
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kısırlık (İnfertilite).....	4
2.2 İnfertil çifte yaklaşım.....	4
2.2.1 Kadın.....	4
2.2.2 Erkek.....	5
2.3 Semen Analizi ve Değerlendirilmesi.....	5
2.3.1 Makroskopik Değerlendirme.....	6
2.3.2 Mikroskopik Değerlendirme.....	7
2.3.3 Semen Terminolojisi.....	9
2.3.4 Spermatogenez.....	9
2.4 Kriyoprezervasyon.....	10
2.4.1 Kriyoprezervasyonunun Tarihçesi.....	11
2.4.2 Kriyoprotektanlar.....	12
2.4.3 Kriyoprezervasyon Yöntemleri.....	13
2.5 Reaktif Oksijen Türevleri (ROT).....	14
2.5.1 ROT ve Spermatozoa.....	15
2.5.2 ROT ve Korunma.....	15
2.6 Antioksidanlar.....	16
2.6.1 Glutasyon.....	18
2.6.2 Beta-merkaptotanol.....	20
2.7 DNA Hasarı ve Sperm.....	22
3 GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
3.1 Hasta Grubu.....	24
3.2 Semen Hazırlanması.....	24
3.3 Sperm Dondurma Medyumunun Hazırlanması.....	25

3.4	Spermin dondurulması ve çözülmesi	27
3.5	Sperm DNA Hasarı Belirlenmesi (Halosperm).....	27
3.6	İstatistiksel Değerlendirmeler	30
4	BULGULAR.....	31
4.1	Sperm Özellikleri	31
4.1.1	Vitalite'nin Değerlendirilmesi	31
4.1.2	Motilite'nin Değerlendirilmesi	33
4.1.3	%A Motilitenin (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) Değerlendirilmesi.....	35
4.1.4	%B Motilitenin (İleri Yavaş Hareketli Spermatozoon) Değerlendirilmesi	37
4.1.5	%C Motilitenin (Yerinde Hareketli Spermatozoon) Değerlendirilmesi	39
4.1.6	%D Motilitenin (Hareketsiz Spermatozoon) Değerlendirilmesi	41
4.1.7	DNA Fragmantasyon Oranlarının Değerlendirilmesi	43
5	TARTIŞMA.....	45
6	KAYNAKLAR.....	50
7	EKLER.....	68

1 GİRİŞ

Dünya nüfusu hızla artmaya devam ederken kısırlık her geçen gün daha fazla sayıda çifti etkileyen bir sorun olarak devam etmektedir. Her ikisini birlikte düşünmek çelişki gibi görünse de kısırlık; insanlık tarihi boyunca güncelliğini koruyan en önemli sorunlardan biri olmuştur ve olmaya devam etmektedir. Günümüzde kısırlık sorunu geliştirilen tıbbi yöntemlerle büyük ölçüde çözülebilmektedir. Çocuk istemi olan ve doğal yollarla çocuk sahibi olamayan çiftlere, üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) merkezleri yardım edebilmektedir (1).

Bu ÜYTE merkezlerinde çocuk sahibi olmak isteyen kısır çiftlerin, anamnezleri alındıktan sonra çeşitli tetkik aşamalarından geçirilmektedir. Kadınlarda jinekolojik muayene, hormon ölçümü, histerosalpingogram gibi tetkikler, erkeklerde ise testis muayenesi yapılır ve semen değerleri incelenir. Bu incelemeler sonucunda çiftler uygun tedaviye yönlendirilir. Kullanılan yöntemler; aşılama (IUI), invitro fertilizasyon (IVF) ve intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)'dur. Uygulanan bu yöntemlerde anne adayının menstrual dönemi takip edilerek oositlerin gelişimi sağlanır. Aşılama yönteminde, oositler yeterli olgunluğa eriştiğinde babadan alınan semen örneği hazırlanarak bir kateter yardımıyla anne rahmine enjekte edilir. IVF ve ICSI işleminde ise oositlerin gelişimi sağlandıktan sonra oositler toplanır ve bu işleme OPU (oosit pick up) adı verilir. Babadan alınan semen ile toplanan oositler gerekli işlemlerden geçirildikten sonra in vitro ortamda döllenmeleri sağlanır. Daha sonra zigot belli süre laboratuvar ortamında kültüre edilir ve embriyoların durumuna göre ikinci gün, üçüncü gün ya da beşinci gün anne uterusuna yerleştirilir (2).

Günümüzde yardımla üreme teknolojisinin gelişimi açısından üreme hücreleri ve dokularının başarılı bir şekilde dondurulup saklanabilmesi büyük önem taşımaktadır (1).

Sperm hücrelerinin dondurulması, dondurma çözme protokollerinin kullanıldığı ilk günlerden beri araştırmacıların dikkatini çekmiştir. 1980'li yıllardan beri sperm dondurma yeni protokollerin geliştirilmesi sayesinde IVF'de kullanılan rutin işlemlerden biri haline gelmiştir (3).

Sperm dondurma, yardımla üreme tekniklerinin yanı sıra kanser tedavisinde ve KKTC, İsrail gibi bazı ülkelerde donör inseminasyonunda kullanılmaktadır. Ülkemizde donör olunması ve kimi ülkelerde kullanılan sperm bankası sistemi kanunen yasal değildir. Bunun yanı sıra sitotoksik kemoterapi, radyoterapi ve diğer cerrahi girişimler, testiküler yetmezlik ya da ejakülasyon fonksiyon bozukluklarına neden olabileceğinden dolayı bu tedaviler öncesinde spermin dondurularak saklanması ülkemizde yasal bir süreç olup hastaya ileride çocuk sahibi olma şansı vermektedir (4).

Yardımla üreme teknikleri uygulamalarında kullanılacak olan semen örneği çeşitli yıkama işlemlerinden geçirilir. Bu esnada spermatozoon hücreleri, enerji, mineral maddeler ve çeşitli antioksidanlar içeren ve kendilerini dış ortama karşı koruyan seminal plazmadan uzaklaştırılmaktadır. Bu durum, spermatozoon'ların oksidatif strese karşı daha hassas olmalarına neden olmaktadır. Oksidatif stres sonucu reaktif oksijen türevi (ROT) üretiminin neden olduğu zararlar ile birlikte, spermatozoonun fertilizasyon potansiyeli olumsuz yönde etkilenmektedir (5).

Yapılan alışmalar sperm dondurma ve çözme işlemleri sonrasında antioksidan maddelerin sperm motilite ve DNA yapısı üzerine etkileri olduğunu göstermiştir (6).

Antioksidanlar, semen sıvısında bulunan ve spermatozoon hücrelerini oksidatif stresin neden olduğu hasarlardan korumakla görevli Sistein, Sisteamin, Glutasyon, Beta-Merkaptoetanol, E vitamini gibi çeşitli maddelerdir (7).

Bu çalışmada da birer antioksidan madde olan Glutasyon ve Beta-Merkaptoetanol'un, sperm dondurma yöntemi sonrası sperm kalitesi üzerine etkisini araştırmak amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kısırlık (İnfertilite)

Kısırlık, diğerk bir deyişle infertilite, üreme çağında olan bir çiftin herhangi bir doğum kontrol yöntemi kullanmaksızın, en az bir yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebeliğın oluşmaması olarak tanımlanır (8). İnfertilite üreme çağdaki çiftlerin %15'ini etkilemektedir. Korunmasız geçen 12 aylık süre sonunda çiftlerin %80'i ilk 6 ay içinde, geri kalanların ancak %10'u takip eden 6 ay içinde gebe kalabilmektedir (9,10). Tüm kısır çiftlerin %30-40'ında erkek, %40-50'sinde kadın faktörü tespit edilirken, %20-25 çiftte hem erkek hem de kadına ait patolojiler birlikte gözlenir. %15 çiftte ise tüm tanısal tetkikler sonucunda bir infertilite nedeni tanımlanamaz (açıklanamayan infertilite) (11).

Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre infertilite, tüm dünyada 50-80 milyon kadını etkilemektedir (12). Buna göre dünyada infertilite oranının %8-12 arasında olduğu söylenebilir. Türkiye'de ise bu oran evli çiftlerin %10-20'si arasındadır (13).

2.2 İnfertil çifte yaklaşım

2.2.1 Kadın

Kadın nedenli infertilitenin araştırılmasına anamnez ve muayene ile başlanmalıdır. Anamnezde; infertilite süresi, daha önce kullanılan doğum kontrol yöntemleri, seksüel öykü, birleşme sıklığı, önceki gebelikleri, menstrual siklus düzeni, daha önceden geçirilmiş operasyonlar, sigara, alkol ya da sürekli kullanılan

ilaçlar, tiroid hastalığı, androjenik deri değişiklikleri, ağrılı adet görme ve ağrılı cinsel ilişki varlığı, smear sonuçları, ailede erken menopoz sorgulanır. Fizik muayenede; ağrılık ve vücut kitle indeksi (BMI) belirlenir. Androjen hakimiyeti, sekonder seks karakterleri, galaktore varlığı incelenir (14).

2.2.2 Erkek

Erkek nedenli infertilite anemnezinde ise; doğum kusurları, gelişimsel anomaliler, seksüel hikaye testis enfeksiyonları ve hasarları sorgulanmalıdır. Fiziksel muayenede; kıl dağılımının incelenmesi, tiroid bezi palpasyonu, jinekomasti için göğüslerin incelenmesi, genital inceleme ve testis ölçümünü içermektedir. Semen analizi ise ejakülatın incelenmesidir ve erkek infertilitesinin belirlenmesinde çok önemli bir parametredir (15).

2.3 Semen Analizi ve Değerlendirilmesi

Semen analizi ile semenin görünüş, hacim, pH, viskozite, motilite, morfoloji, semen sıvısındaki diğer hücrelerin tanımlanmaları ve konsantrasyonlarının belirlenmesi gibi birçok parametre incelenmektedir (15).

İnfertil bir erkek değerlendirilirken 4-6 hafta ara ile en az 2 kez semen analizi yapılır. Semen örneği 3-6 günlük cinsel perhiz sonrası alınmalı ve en geç 1 saat içinde değerlendirilmelidir. 2010 Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre referans değerler Tablo 1'deki gibidir (16).

Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre semen analizi değerleri.

Parametreler	En düşük referans değer
Semen hacmi (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (ml)	15 (12-16)
Total motilite (%)	40 (38-42)
Progressive motilite (%)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3.0-4.0)
pH	>7.2
Peroksidaz-pozitif lökosit (ml)	<1.0
MAR (Mixed antiglobulin reaction) testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50

2.3.1 Makroskopik Değerlendirme

Konsantrasyon, motilite ve morfoloji gibi semen parametrelerinin değerlendirilebilmesi için tüm örneğin homojen bir yapıda olması gerekmektedir. Yaklaşık olarak 15-30 dakika arasında likefiye olan semenin görüntüsü gri opak olmalıdır. Hoş olmayan koku veya görüntü, mukus ya da jöle partikülleri kaydedilmelidir (17).

Günümüzde semen hacmini değerlendirmede volümetrik metodlar ile ölçüm önerilmektedir. Volümetrik olarak ölçümde en ideal yöntem olarak serolojik pipet yardımıyla 0,1 ml üzerinden değerlendirme yapılabilir.

pH belirlenmesinde ise en kolay yöntem pH kağıtları kullanılarak yapılan değerlendirilmedir. Semen pH değeri 7,2 – 7,8 arasında olmalıdır (18).

2.3.2 Mikroskopik Değerlendirme

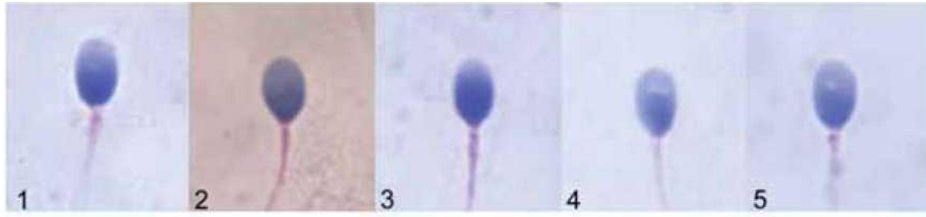
Konsantrasyon; Spermatozoonların fertilizasyon potansiyelini belirlemek için kullanılan önemli bir kriterdir. Belli bir seviyenin altında spermatozoon konsantrasyonu, yumurtayı dölemek için yeterli değildir. Bu değer, mililitredeki spermatozoon sayısı olarak belirlenir. Normal bir semen, mililitrede en az 20 milyon spermatozoon içermelidir (16).

Motilite (Hareket edebilme yeteneği); Spermatozoonların fertilizasyon potansiyelini belirlemek için kullanılan diğer önemli bir kriterdir çünkü spermatozoon yumurtayı döleyebilmek için hareketli olmalıdır. Spermatozoonların hareketleri aşağıda sıralanan kriterler göz önüne alınarak A, B, C, D olarak sınıflandırılır. Semen motilite değeri, yüzde olarak belirlenir. A motilite, hızlı ve ileri hareketli spermatozoonlar için, B motilite, yavaş ve ileri hareketli spermatozoonlar için, C motilite, yerinde hareketli spermatozoonlar için, D motilite ise hareketsiz spermatozoonlar için kullanılır (16).

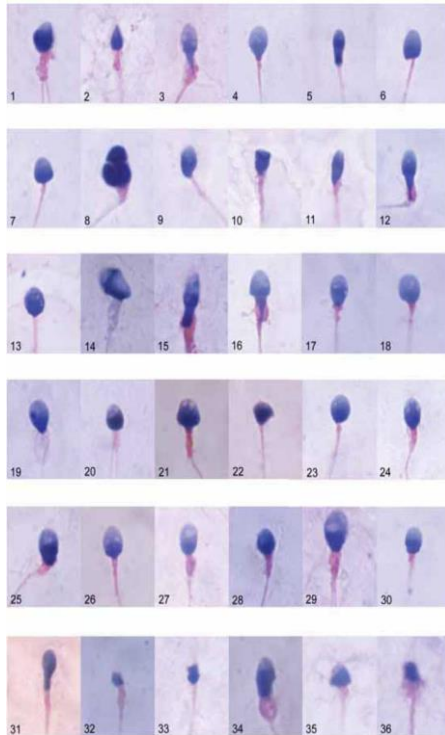
Morfoloji; Spermin yapısal özelliklerinin incelenmesidir. Spermatozoonun baş, boyun ve kuyruk bölümlerine bakılarak değerlendirme yapılır. Spermatozoonun döleme potansiyelini belirlemek için kullanılan önemli bir kriterdir. Spermatozoonun yumurtayı döleyebilmesi için morfolojisinin düzgün olması gerekir. Kruger kriterlerine göre bu oran %4'dür (16).

Morfolojik değerlendirme, semen rneği lam üzerine ince bir Şekilde yayıldıktan sonra boyanarak mikroskop altında (100X objektif) immersiyon yağı ile bakılarak yapılır (1).

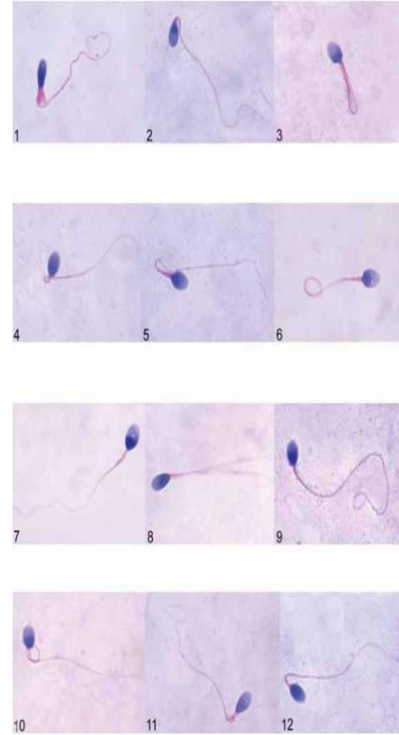
a



b



c



Resim 1: a. Normal sperm b. Baş ve boyun anomalileri c. Kuyruk anomalileri (WHO 2010 Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction Cambridge University Press Fourth Edition)

2.3.3 Semen Terminolojisi

Eliasson ve arkadaşları (1970) semen değişkenleri ile ilgili bir terminoloji önermişlerdir. Bu terminoloji WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından da önerilmiştir (1999).

Normospermi: Normal ejakülat

Oligozoospermi: Referans değerlerden düşük sayıda sperm konsantrasyonu

Astenospermi: Referans değerden düşük motiliteye sahip sperm

Teratospermi: Referans değerden düşük morfolojiye sahip sperm

Oligoastenoteratosperm: Referans değerden düşük morfoloji, motilite ve konsantrasyona sahip sperm

Azospermi: Ejakülatta sperm bulunmaması

Aspermi: Ejakülat bulunmaması

2.3.4 Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumun olgun sperme dönüşmesidir. Seminifer tübül içinde spermatogonya (46, XY), primer spermatosite (46, XY) dönüşür. Sonra her primer spermatosit 1. mayoz bölünme geçirerek sekonder spermatosite (23,X) bölünür. Ardından sekonder spermatositler 2. mayoz (23,X) geçirir ve sonuçta 4 adet haploid kromozomlu spermatid oluşur (19).

Spermiogenezis, yuvarlak şekilli spermatidin olgun şekilli sperme dönüşmesidir. Olgun sperm, baş boyun ve kuyruktan oluşan, serbest olarak

yüzebilen, aktif olarak hareketli bir hücredir. Spermiogenizde stoplazma kaybı, kuyruğun gelişmesi ve akrozomun şekillenmesi gerçekleşir. Spermiogenezis de dahil olmak üzere spermatogenezis yaklaşık iki ay sürer ve tamamlandığında spermler seminifer tübüllerin lümenine geçer (19).

2.4 Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama); hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısılarına kadar soğutularak, bütün biyolojik aktivitelerinin yavaşlatılması ve gelecekte kullanılması amacıyla saklanmasını ifade eder (ASRM 2012).

Gamet ve embriyo kriyoprezervasyonun genel prensibi; dondurma esnasında su kristallerinin oluşturabileceği hücresel hasarların kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra gamet hücresinin soğutularak sıvı nitrojen içinde, -196 ° C da depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanlar uzaklaştırılarak gamet ve embriyoların canlılıklarını koruyabilecekleri ve gelişimlerini sürdürebilecekleri fizyolojik ortamlara geçirilmesidir (1). Sıcaklığın düşmesiyle hücre içindeki su sıvı halden katı hale geçer ve buz kristalleri oluşturur. Oluşan buz kristalleri iç hücre sistemini koruyan membran bütünlüğü için tehlike yaratmakla birlikte, geriye kalan tuzlar için hücre dışı ortamdaki çözünürlük etkisi de giderek azalır. Dolayısıyla molariteleri artar, yüksek oranda pH değişiklikleri meydana gelir ve farklı konsantrasyonlarda tuz etkisine maruz kalır. Bu durum lipoprotein denatürasyonuna ve buna bağlı olarak membran içinde bozulmalara neden olabilir (20).

Kriyoprezervasyon teknolojisindeki ilerleme; küçük hücreli organizmalar, dişi ve erkek gamet hücreleri ya da embriyolar gibi daha karmaşık organizmalar da dahil olmak üzere bir çok hücre tipinde dondurarak saklama yöntemlerinin gelişmesini sağlamıştır (21).

Kriyoprezervasyon özellikle testis yetmezliği ya da ejakülasyon bozukluğunun neden olduğu kemoterapi ve radyoterapi gibi uygulamalar öncesinde erkek fertilesinin korunması açısından büyük önem taşımaktadır. Aslında bu yöntem gelecekte kanser hastaları için çocuk sahibi olabilme şansı vermektedir (21).

Yapılan araştırmalar sonucunda, dondurulmuş ve taze spermatozoa ile ICSI yapılıp (intrastoplazmik sperm enjeksiyonu) gebelik sonuçları karşılaştırıldığında fark olmadığı saptanmıştır (22).

2.4.1 Kriyoprezervasyonunun Tarihçesi

Kriyobioloji araştırmaları 1930'lu yıllarda yoğunlaşmış ve tavşan spermlerinin dondurulması sırasında 0 ° ile -45 ° C arasındaki ısı değerlerinin etkileri araştırılmıştır (23,24). Polge ve arkadaşlarının 1949 yılında meniye dondurmak için gliserolü kullanmasıyla kriyoprotektan kullanımında ilk başarılı sonuca varılmıştır. Gliserol günümüzde hala yaygın bir şekilde kriyoprotektan olarak kullanılmaktadır (25).

Hemen ardından yapılan çalışmalarda, insan spermlerinin dondurulmasında gliserol kullanılmaya başlanılmış ve sonuçta dondurulmuş spermlerin IUI (Intrauterin İnseminasyon) için uygun olduğu belirtilmiştir (26).

1960-1970'li yıllarda hücreye özgü soğutma ve çözme ısıları formüle edilmiştir. Bu saptamalardan birçoğu kriyobiyolojinin prensipleri olarak kabul edilmiş ve günümüzde halen kullanılmaktadır (27, 28).

İlk kez 1972 yılında -196° ve -296°C 'de fare embriyoları dondurulduğunda canlılıklarını koruyabildikleri gözlemlenmiştir (29). Aynı dönemde 8 hücreli fare embriyolarının dondurulduğu çalışmada, embriyo dondurma-çözme protokollerinde, soğutma ve çözme ısıyla kriyoprotektanların etkisi incelenmiştir (30).

1980'li yıllar insan gamet ve embriyolarının dondurulmasına yönelik prensiplerin oluşturulduğu bir dönem olmuştur. Dondurulup çözülmüş insan embriyosuyla oluşan ilk gebelik Avusturalya'dan (31), ilk doğum Hollanda'dan (32) bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda PROH (1,2-propanediol) kullanılarak zigotların da dondurulabileceği bilgisi literatüre girmiştir (31).

İlk kez 1986 yılında kriyoprezervasyonun başarısı yapılan araştırmalar sonucunda belgelenmiştir. Araştırmacı dondurulmuş embriyo transferi yaptıkları 317 hastada 45 gebelik elde ettiklerini ve 16 bebeğin doğduğunu belirterek embriyo transferi başına canlı doğum oranının %5, gebelik oranının %14 olarak gerçekleştiğini belirtmiştir (33).

2.4.2 Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar hücre için toksik olmakla birlikte, gametlerin dondurma, saklanma ve çözme aşamalarında hücreyi koruyan maddelerdir. Hücre içinde proteinleri stabilize ederek hücre içi buz oluşumunu azaltırlar. Tüm kriyoprotektanlar suyla tamamen karışabilirler ve bazıları çok yüksek konsantrasyonda bile toksik

özelliik göstermezler. Hepsi hiperozmotiktir ve yüksek oranda H₂ bağlama kapasiteleri vardır. Hücre zarından geçebilme yeteneklerine göre iki gruba ayrılabilirler. Küçük moleküllu, geçirgen olan kriyoprotektanlar; Gliserol, etilen glikol (EG), 1,2-propan-diol (PROH) ve dimetilsülfoksit (DMSO)'dir. Bu kriyoprotektan maddeler sudan yavaş da olsa hücre zarından geçerler. Büyük moleküllu, geçirgen olmayan kriyoprotektanlar; şekerler, polimerler ve amfipatik bileşiklerdir. Bu maddeler ise hücre zarından geçemezler ve hücre dışında belirgin bir ozmotik etki gösterirler (17,18).

2.4.3 Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Hücre ve doku kriyoprezervasyonu için yavaş dondurma ve hızlı dondurma olmak üzere iki tip temel dondurma yöntemi vardır.

Yavaş dondurma: Yavaş dondurma için kullanılan işlemler genellikle oldukça benzerdir. Hücre ya da dokular kriyoprotektan ve sükrozun optimal bir konsantrasyonunu içeren sulu bir çözelti içerisinde dengelenir ve dondurma çubukları ya da tüpler içerisinde dondurulur. Kriyoprotektana maruz kaldıktan sonra sıcaklık yavaşça düşürülür ve çözeltide buz kristali oluşumu başlatılır (kontrollü buzlandırma). Tüp ya da dondurma çubukları -6.5° ile -7° C'de kontrollü buzlandırılır (seeding), 0.3° – 0.5 °C/dakikalık bir hızla yavaşça yaklaşık -40° C'ye soğutulur ve ardından, depolama için en son sıvı nitrojene transferinden önce hızla -150° C'ye soğutulur. Embriyo ve spermatozoa sıvı nitrojen içerisinde depolandıklarında onlarca yıllarca bozulmazlar (18).

Hızlı Dondurma (Vitrifikasyon): Vitrifikasyon hücrede cam benzeri bir katılaşma meydana getirerek hücre içinde buz kristallerinin oluşumunu önleyen bir yöntemdir. Hızlı soğutma genellikle sıvı nitrojene ya da buharına doğrudan temasla gerçekleştirilir ve bu nedenle de programlanabilir dondurma makinelerine ihtiyaç yoktur. Başarılı bir vitrifikasyon, son derece hızlı bir soğutma hızıyla birlikte kriyoprotektanların oldukça yüksek konsantrasyonlarda kullanımına dayanır (17,18)

2.5 Reaktif Oksijen Türevleri (ROT)

ROT, oksijen metabolizması sonucunda oluşan metabolitlerdir (34). Oksijen, biyokimyasal olaylar sırasında organik moleküllerle etkileşir ve çok aktif ara ürünler olan ROT oluşumuna neden olur. Bu türevlere genel olarak serbest radikaller denir (35). Bunlar çok kısa ömürlü (10^{-11} - 10^{-9} saniye) moleküllerdir. Metabolizmada oksijen bulunduğu sürece, ROT'nin oluşumu normal bir durumdur (36) ve belli seviyelerde ve kontrollü üretildiklerinde hücrelerde sinyal molekülleri olarak görev almak gibi bazı fizyolojik fonksiyonlarda rol alabilecekleri gibi, kontrolsüz üretimleri, birçok patolojik olayda önemli bir faktör olabilir (37,38).

ROT'nin üretimine neden olan ana biyolojik kaynak mitokondri membranlarında gerçekleşen elektron transportudur. Oksijenin H_2O 'ya oksidaz yoluyla dönüşümü, serbest radikal oluşumuna neden olan elektronların ardışık transferini gerektirir (39).

ROT'nin membran ile bağlantılı olmayan diğer bir üretim yerleri de fagositik aktivitede görev alan hücrelerdir. Konağın kendini mikroorganizmalara karşı

savunması için gerekli olan fagositik aktivite sırasında meydana gelen solunum patlaması ROT oluşumuna neden olur (39).

2.5.1 ROT ve Spermatozoa

ROT yağ peroksidasyonu ile yağlara zarar verir (40). Sperm hücre zarı fosfolipid tabakasındaki doymamış yağ asitlerinin varlığı, sperm hücrelerini yüksek oksijen konsantrasyonuna karşı oldukça duyarlı hale getirmektedir ve ROT'ne maruz kaldıklarında doymamış yağ asiti içeriği %20'den fazla oranla düşmektedir (36,41).

Fazla miktarda ROT'ne maruz kalan spermatozonlar membran akışkanlığındaki azalma sonucu membran birleşmesi olayına bağlı olan fonksiyonlarını gerçekleştiremezler (42).

Membran bütünlüğünün bozulması hücrenin elektrolitlere karşı geçirgenliğinin bozulmasına da neden olarak kalsiyum ve kısmen sodyum iyonlarının hücre içine alınmasını, hücrenin enerji üretme mekanizmasını bozar ve ATP azlığına neden olur. Kalsiyum iyonlarının hücre içi artışı proteazları ve fosfolipazları da aktive ederek proteinlerin ve yağların zarar görmesine neden olur. Serbest radikaller enzim inaktivasyonuna da neden olarak DNA'da yapısal hasara neden olur ve bu da hücrenin ölümüyle sonuçlanır (43,44,45).

2.5.2 ROT ve Korunma

Hücre içi ve dışı koruma sistemlerinden biri olan antioksidanlar serbest radikallerin potansiyel toksik etkilerine karşı hücreyi koruyan mekanizmalardır. Spermatozoanın lipid peroksidasyonundan korunmaları bu hücrelerin fonksiyonlarını

doğru bir Şekilde yerine getirebilmeleri ve hũcre zararının devamlılığını koruyabilmeleri aĥısından ĥok bũyũk önem taŐır (46,47,48).

Koruma mekanizmaları primer ve sekonder olarak gruplandırılır. Primer koruma mekanizmaları antioksidan bileŐiklerini (E, A ve C vitamini, glutatyon ve ũrik asit) ve antioksidan enzimlerini (sũperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) iĥermektedir. Sekonder koruma mekanizmaları ise lipolitik enzimler, fosfolipazlar, proteolitik enzimler, proteazlar, peptidazlar, DNA onarım enzimleri, endonũkleazlar, eksonũkleaz ve ligaz olarak sıralanmaktadır (49).

2.6 Antioksidanlar

Oksidasyon, elektronların bir atom ya da molekũlden ayrılmasını sağlayan kimyasal tepkimedir ve bunun sonucu serbest radikaller oluŐabilir. Bu serbest radikaller hũcre hasarına ve hatta hũcre lũmũne neden olan bir dizi zincirleme reaksiyonun oluşumuna neden olur. Antioksidanlar, serbest radikal ara maddelerini kaldırarak bu zincir reaksiyonlarını sonlandırmak ve diğer oksidasyonları önlemekle görevli molekũllerdir. Genelde kendilerini oksitleyerek indirgeyici ajanlar olarak görev alırlar (50).

Antioksidan, oksit giderici her tũrlũ kimyasal maddeye verilen addır ve sadece biyolojik sistemlerde kullanılmazlar. Aynı zamanda, yiyecek ve kozmetik gibi birĥok endũstriyel kullanıma sahiptir (51).

Antioksidanlar ũreme biyolojisinde de önemli görevler almaktadır. Sığır embriyolarında yapılan bir ĥalıŐmada, elde edilen oositler, siteamin iĥeren ve iĥermeyen TCM-199 medyumuna aktarılarak geliŐmeleri takip edildikten sonra

döllenme işlemi sonrasında dondurulmuş, çözme sonrasında CR1aa ve sentetik ovidukt sıvısında geliştirilmek üzere iki alt gruba bölünmüştür. Çalışma sonucunda sistemin varlığı çözme sonrasında CR1aa medyumunda olumlu yönde gelişimi etkilemiştir (53).

Sperm ve seminal plazma da kendilerini oksidatif strese karşı koruyan bir dizi antioksidanlar ile donatılmıştır. Seminal plazmada süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi yüksek molekül ağırlıklı antioksidanlar ve seminal sıvı kapasitesinin büyük bölümünü oluşturan ve enzimatik olmayan (askorbik asit, tokoferol, pirüvat, glutatyon, karnitin, taurin, hipotaurin) antioksidanlar bulunur (6).

İnfertil erkeklerle yapılan bir çalışmada %25'inin semeninde yüksek düzeyde ROT tespit edilmiştir. ROT ve sperm DNA hasarı arasındaki ilişki antioksidanların kullanımını için temel oluşturmaktadır (54,55).

Antioksidanların, ejakülata anormal spermatozoa ve lökosit bulunan infertil erkeklerde, ROT'un neden olduğu dış etkiyi hafifletme potansiyeli açısından klinikte anlamlı olduğu gösterilmiştir (56). Vitamin E, katalaz, glutatyon gibi antioksidanların sperm hareketini ROT'un dış etkilerinden koruduğu gösterilmiştir (57,58). Glutatyon, E vitamini, N-asetil sistein ve Katalaz gibi antioksidanların sperm üretimi esnasında ROT seviyesini azaltarak sperm motilitesinin azalmasını önlemede etkili olduğu söylenirken (59-63), bazı araştırmacılara göre hareket kaybını önlemede etkisiz olduğu belirtilmiştir (64-66).

Erkek infertilitesinde, sperm DNA hasarı ve sperm fonksiyon bozukluklarının en önemli nedenlerinden birinin seminal oksidatif stres olduğu bildirilmiştir.

Oksidatif stres oluşumunun ise reaktif oksijen türevleri ve bunları yok etmekle görevli olan seminal antioksidanların arasındaki dengesizlik olduğu savunulmuştur (54,67-69).

2.6.1 Glutasyon

Glutasyon, glutamik asid, sistein ve glisin molekülünden oluşan bir tripeptittir. Serbest radikaller ve peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu önemli hücresel hasarları önleyen bir antioksidandır (70).

Glutasyonun indirgenmiş (GSH) ve oksitlenmiş (GSSH) olmak üzere iki formu bulunur. Sağlıklı hücre ve dokularda glutasyonun %90'ı indirgenmiş formu olan GSH, %10'dan daha azı ise oksitlenmiş formu olan GSSH olarak bulunur. GSSH'nin yükseltgenerek GSH'a dönüşmesi oksidatif stresin göstergesidir. Bu değişimi sağlayan ise glutasyon redüktaz (GSR) enzimidir (71).

Glutasyon hücre içinde sentezlenir. Hücre içinde sentezlendikten sonra glutasyon gama glutamil transpeptidaz ile hücre dışına taşınır (72).

Glutasyon DNA sentezi ve onarımı, protein sentezi, prostaglandin sentezi amino asit transportu ve enzim aktivasyonu gibi metabolik ve biyokimyasal reaksiyonlarda kullanılır. Özellikle immün sistemi, sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve akciğer sistemi olmak üzere vücuttaki her sistem GSH metabolizmasından etkilenir (73).

GSH sperm ve oosit hücrelerinde bulunan en önemli antioksidan maddelerden biridir (74).

Glutasyon mayotik iğlerin konumlanmasında rol oynar. Döllenme sonrası erkek pronükleus oluşumunda aktif rol oynar ve blastosist evresinde erken embriyogenez üzerine olumlu etkileri vardır (75).

GSH seviyesinin artmasının, döllenme, embriyonik gelişim, sperm fonksiyonu ve olgunlaşmasında önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Özellikle domuz oosit olgunlaşmasında hücre içi glutasyon sentezi önemli bir olaydır. Glutasyonun DNA ve protein sentezine, memeli hücrelerinde amino asit iletimi ve embriyo gelişimine faydalı etkileri vardır (76,77).

Boğalarda sperm dondurma medyumuna GSH eklenmesiyle normal akrozom oranının ve motilitenin arttığı hem de fertilizasyona olumlu etkisinin olduğu savunulmuştur (78).

Sığırlarda sisteaminli IVM medyumunda, β -ME, sistein ve sisteine bağlı sentezlenen glutasyon eklenmesiyle, sisteaminin oosit gelişimine etkisi test edilmiş ve in vitro fertilizasyonda, thiol komponentleri ile IVM uygulandığında GSH sentezinin başlaması sonrası yüksek intrasülüler GSH seviyesinin, in vitro kültürün başlangıç seviyesinde olduğu sonucuna varılmıştır. Dahası sonuçlara göre bu metabolik yolun in vitro embriyo gelişimini etkileyecek olan stoplazmik maturasyon için önemli bir bileşeni olduğu belirtilmiştir. Koyunlarda ise in vitro maturasyonunda, β -ME'un değil de sisteaminin embriyo gelişimini arttırdığı görülmesine rağmen tiyol bileşenleri ile uygulanan IVM'den sonra, yumurtadaki intrasellüler GSH seviyelerinin ne kadar süreyle kalacağı bilinmemektedir (79).

2.6.2 Beta-merkaptetanol

Tiyoller (RSH), alkollerin (ROH) kükürtlü benzerleridir. IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) sistemine göre tiyollerin isimleri alkan ismine -tiyol son eki getirilerek oluşturulur. Ana zincirin numaralandırılması, -SH grubunu taşıyan karbona daha küçük numara verilecek yönde yapılır. SH grubu süstitüent olduğunda 'merkapt'o' adını alır. Bu grup ayrıca sülfhidril grubu olarak bilinmesine rağmen sistematik adlandırmada bu isim kullanılmaz. Tiyoller zayıf asitlerdir ancak alkollerden çok daha asidiklerdir. Ciddi derecede toksik maddelerdir. Özellikle düşük molekülü tiyollerin en belirgin özelliği kötü kokularıdır. Etantiyol doğal gaza, gaz kaçaklarının fark edilmesi için karıştırılır (80).

2-Merkaptetanol disülfid bağlarını indirgeyerek koparan kimyasal bir bileşiktir ve hidroksil radikalleri ile biyolojik bir antioksidan olarak işlev görebilir. Bazı proteinler 2-ME tarafından denatüre edilebilirler. Proteinlerin disülfid bağlarını kopararak tersiyer ve kuaterner yapıları bozabilir. Bu özelliğinden dolayı yaygın olarak monomerik, dimerik ya da polimerik protein molekülleri elde edebilmek için protein analizlerinde kullanılır (80).

Beta-merkaptetanol maddelerin redüksiyonunda görev alan tiyol bileşimidir ve sistinin sisteine oksidasyonunu önleyerek sistein aktivitesini artırır (81).

Beta-merkaptetanol direk antioksidan olarak görev yaptığı gibi hücre içi GSH ve sistein aktivitesini artırarak da etkisini gösterir (82).

In vitro fertilizasyonda β -ME takviyesinin gametlerin fonksiyonu üzerine yararlı bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (83). Domuzlarda, IVM sırasında sistein ve β -ME eklenmesi erkek pronükleusunun oluşumuna ve embriyoların gelişimine faydası olduğu bildirildiği gibi ineklerde blastosist kalitesine herhangi bir fayda sağlamadığı bildirilmiştir (76,84,85).

Domuzlarda yapılan bir başka çalışmada ise iki farklı antioksidanın (AC, β -ME), in vitro kültür aşamasındaki blastosistlerin gelişimi ve çözme işleminde kültür medyumuna eklenmesiyle kriyotoleransı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre in vitro kültüre eklenen antioksidanların embriyo gelişimi, total hücre sayısı ya da apoptoz indeksi üzerine etkisi görülmediği gibi, β -ME varlığının kriyotolerans üzerinde etkisi olmadığı bildirilmiştir. Buna rağmen AC ile kültüre edilen embriyolarda ROT seviyesi ve dondurma- çözme sonrası canlılık oranlarında önemli ölçüde düzelme gözlemlenmiş ve embriyo canlılığı ve kalitesinin de arttığı görülmüştür (86).

Pronüklear aşamadaki (PN) fare embriyolarının çeşitli dondurma yöntemleri ile dondurma çözme sonrası embriyo gelişimi ve implantasyon oranı üzerindeki etkileri incelenen bir çalışmada, dondurma sonrası in vitro kültür medyumuna β -ME eklenmesinin embriyo gelişimi ve implantasyon oranlarını arttırdığı görülmüştür (87).

GSH, kaliteli embriyo elde etmek için yaygın olarak kullanılan antioksidanlardan biridir ve domuzlarla ilgili yapılan çalışmalarda, oosit maturasyonunda sistein ile desteklenmiş IVM kültür medyumlarının kullanılmasının basit ve etkili bir yöntem olduğu bildirilmektedir (88). Yine domuzlarla yapılan bir

çalışmada, oosit maturasyonunda β -ME 'in rolüne bakıldığında IVM medyumundaki BME konsantrasyonlarının, embriyo gelişimi ve domuz yumurtalarındaki intraselüler GSH düzeyi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (76).

2.7 DNA Hasarı ve Sperm

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılmaktadır. Kimyasal bileşikler, ultraviyole ve X-ışınları gibi çevresel faktörlerin yanı sıra hücre içinde üretilen reaktif oksijen türevleri DNA'nın bütünlüğünü tehdit etmektedir (89).

ROT'nin düşük seviyesi sperm fonksiyonu için gerekli olup yüksek seviyeleri sperm fonksiyonlarının bozulmasına neden olabilir (90).

Spermatogenez sırasındaki normal olmayan kromatin paketlenmesi, ejakülasyondan önceki apoptoz ya da sperm hücrelerindeki aşırı ROT üretimine bağlı DNA parçalanmasının altında yatan sebeplere henüz açıklık getirilmemiştir (91).

İnfertil erkeklerin fertil erkeklere göre daha fazla DNA hasarına sahip olduğunu ve DNA hasarının üreme sonuçlarını olumsuz etkileyebileceğini gösteren kanıtlar vardır (92-95).

Kriyoprezervasyonun spermin antioksidan aktivitesini azaltarak ROT hasarına daha açık hale getirdiği de gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonda ROT ve antioksidan enzimlerdeki düşüş hücre apoptozuna neden olmaktadır. Apoptoz

sırasında mitokondriden salınan apoptoz indükleyici faktörlerin DNA fragmantasyonuna neden olduğu belirtilmiştir (96).

Düşük sayı, motilite ve anormal morfoloji gibi bozuk semen parametreleri yüksek DNA hasarı ile birlikte gösterilmesine rağmen normal semen parametrelerine sahip hastaların %8'inde sperm DNA hasarı olduğu bilinmektedir (97,98).

Son yıllarda erkek infertilitesinde sperm DNA bütünlüğünün rolünü araştıran çalışmalar artmış olmakla birlikte erkek infertilitesini öngörmede semen analizine oranla sperm DNA bütünlüğünün daha iyi bir belirteç olduğu savunulmaktadır. Bu amaçla birçok test çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Bu testler; Sperm Kromatin Yapısı Tayini (Sperm Chromatin Structure Assay) (SCSA), Akridin Turuncu Testi (Acridine Orange Test) (AOT), Toludin Mavisi (Toluidine Blue) (TB), Anilin Mavisi (Aniline Blue), TUNEL [The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine (TdU) Triphosphate (dUTP) Nick End Labeling Assay], Asıl Çentik Okuma Tayini (In Situ Nick Translation Assay) (NT), Tek Hücre Jel Elektroforezi (COMET), Sperm Kromatin Ayrılma Testi (Halosperm Test) (Sperm Chromatin Dispersion Test) (SCD) (99).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Hasta Grubu

Bu tez konusu için Kadıköy Florence Nightingale Hastanesi'ne başvuran 18 – 45 yaş arası, 45 erkek hasta çalışmaya alındı. Üç-yedi günlük cinsel perhiz süresinin ardından mastürbasyon yoluyla verilen örnek her hasta için değerlendirildi.

Çalışma için tablo 1'de belirtildiği gibi 5 grup oluşturulmuştur. Dondurma öncesi ve sonrasında her bir grup için toplam motilite, vitalite, %A motilite (ileri hızlı hareketli spermatozoon), %B motilite (ileri yavaş hareketli spermatozoon), %C motilite (yerinde hareketli spermatozoon) ve %D motilite (hareketsiz spermatozoon) incelenmiştir.

Tablo 2: Çalışma yapılan gruplar.

1. Grup:	Dondurma öncesi (Taze semen)
2. Grup:	Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu (Kontrol grubu)
3. Grup	Glutasyon eklenen TYB medyumu
4. Grup	β -ME eklenen TYB medyumu
5. Grup	Sperm Freeze Solution TM -Vitrolife medyumu

3.2 Semen Hazırlanması

Verilen semen örneği 37°C'lik inkübatörde likefiye olana kadar bekletildi. Tüplere (Falcon/2095) koyularak hacimleri ölçüldü. Daha sonra konsantrasyonu, motilitesi, vitalitesi ve pH'ı (Merck) belirlendi.

Semen örneğinden Makler sayma kamarasına 10 µl koyulup, faz kontrast mikroskopunda (Olympus, CX31), 40X objektif altında tüm kareler sayılarak konsantrasyon ve motilite değerlendirildi.

Motilite; A motilite (ileri hızlı hareketli spermatozoon grubu), B motilite (ileri yavaş hareketli spermatozoon grubu), C motilite (yerinde hareketli spermatozoon grubu) ve D motilite (hareketsiz spermatozoon grubu) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. En az 100 adet spermatozoon incelemeye alınarak A, B, C ve D oranları % olarak belirlendi. Toplam motilite oranı ise %A, %B ve %C motilitenin toplamı olarak belirlendi.

Vitalite için 10 µl semen örneği ve 10 µl boya (Merck Eosin Y Çözeltisi) lam üzerinde karıştırılarak üzeri lamel ile kapatıldı. Fazkontrast mikroskopunda (Olympus, CX31), 40X objektif altında en az 100 adet sperm sayılarak canlılık oranı belirlendi.

3.3 Sperm Dondurma Medyumunun Hazırlanması

- Yumurta Sarısı Hazırlama;
 1. Alınan taze yumurta distile su ile yıkanarak temizlenir.
 2. 17 mL yumurta sarısı üzerine 83 mL distile su konularak son hacim 100 mL'ye tamamlanır ve köpürtmeden dikkatlice karıştırılır.
 3. Karışım tüplere eşit şekilde bölünerek santrifüj edilir. (12000 RCF, 45', 5 °C)
 4. Santrifüj sonrası kalan pellet atılıp üstü alınır ve 0.45 µm'lik filtreden geçirilir.

- Toz malzemeler tartıldıktan sonra 50 mL'lik tüp içine konulur.
- Hazırlanmış olan toz karışım içerisine yumurta sarısı ilave edilir ve homojen hale gelinceye kadar karıştırılır (100).
- Son konsantrasyon %5'lik olacak şekilde gliserol eklenir.
- Hazırlanan karışım dondurma işleminde kullanılmak üzere 10'ar mL'lik tüplere bölünür.
- Tüplerden birine son konsantrasyon 1 mM olacak şekilde Glutasyon (101), diğerine son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde β -ME (102) ilave edilir.

Tablo 3: TYB medyumunu için kullanılan malzeme listesi

Malzeme	Sigma	Miktar (50 mL için)	Final Konsantrasyon
Tris	T6066	1.355 gr	273.70 mM
D-Fruktoz	F0127	0.500 gr	55.50 mM
Sitric asit	C0706	0.700 gr	72.87 mM
Trehaloz	T0167	0.946 gr	50 mM
Penislin	P7794	50.000 gr	1000 IU/mL
Streptomisin	S1277	50 gr	1 μ g/mL
Gliserol	G2025	5 ml	%5

3.4 Spermin dondurulması ve çözülmesi

Hazırlanan medyum ile likefiye olmuş semen örneği 0,5'er mL oda sıcaklığında 1:1 oranında çok yavaş bir şekilde damla damla iyice karıştırılır ve kriyotüp (Nunc Cryotube Thermo/377267) içerisine konulur. -196 °C sıvı azot buharında 30 dakika bekletilir ve sıvı azot içerisine daldırılır.





Sıvı azottan çıkarılan kriyotüpler oda sıcaklığına gelinceye dek bekletilir. 1 ml medium ile yıkanır (G-IVF/Vitrolife) ve ardından 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilir. Üst faz atılıp fazkontrast mikroskopunda (Olympus, CX31), 40X objektif altında tüm kareler sayılarak dondurma öncesinde olduğu gibi motilite ve vitalite değerlendirilir.

3.5 Sperm DNA Hasarı Belirlenmesi (Halosperm)

Semen örneklerinin DNA hasarı belirlenmesinde Halotech DNA, S.L. kit kullanılmıştır. Toplamda 6 semen örneğinde dondurma öncesi ve dondurma sonrası DNA fragmentasyonu incelenmiştir.

1. Lizis solüsyonu (LS) oda sıcaklığına getirilir (22 °C).
2. Semen örneği 5-10 milyon/mL olacak şekilde seyreltilir.
3. Agaroz (ACS) 5 dakika 90-100 °C'lik su banyosunda eritilir ve 37 °C oluncaya kadar soğuması beklenir.
4. 25 µl semen örneği agaroz jel ile güzelce karıştırılır.
5. Karışımdan 14 - 20 µl alınarak lama damlatılır ve 18x18 mm ya da 22x22 mm'lik lamel ile kapatılarak 5 dakika 4 °C'de buzdolabında bekletilir.
6. Lamel yatay bir şekilde dikkatlice çekilerek alınır.

7. 10 mL distile su içerisine 80 mikrolitre (AD) konularak denatürasyon solüsyonu hazırlanır ve lam bu solüsyonda 7 dakika bekletilir.
8. Daha sonra lizis solüsyonunda (LS) 25 dakika bekletilir.
9. Distile suda 5 dakika bekletilerek lizis solüsyonundan uzaklaştırılır.
10. Sonra sırasıyla %70'lik, %90'lık ve %100'lük alkol serilerinden geçirilerek kurumaya bırakılır.
11. Boyama işlemi için PBS (phosphate buffered saline) ile Eosin (Wright's Eosin Methylene Blue solution for microscopy. Merck) 1:1 oranında karıştırılır. Lam yatay bir şekilde bırakılarak 5-10 dakika boyama işlemi yapılır. Kurumaya bırakılır.
12. İmmersiyon yağı ile 100X objektif ile mikroskop altında incelenir. En az 100 sperm sayılarak değerlendirilir.

Fragmantasyon Yok		Fragmantasyon Var		
				
1. Büyük Halo	2. Orta Halo	3. Küçük Halo	4. Halo yok	5. Bozulmuş

Figür 1: Fragmente olan ve olmayan spermiler (Halotech DNA, S.L.)

3.6 İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmamızda elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirmesi için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 13.0 programı kullanılmıştır. Dondurma öncesi ile çözme sonrası medyum grupları Varyans Analizi (Tek yönlü) ile karşılaştırılmış ve önemli farklılık gösteren değişkenlerde, ikili grup karşılaştırmaları için Dunnet testi kullanılmıştır. Rastgele seçilen 6 örneğin DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesinde ise Wilcoxon Signed Ranks testi uygulanmıştır.

Bu çalışma %95'lik güven düzeyinde yürütülmüştür.

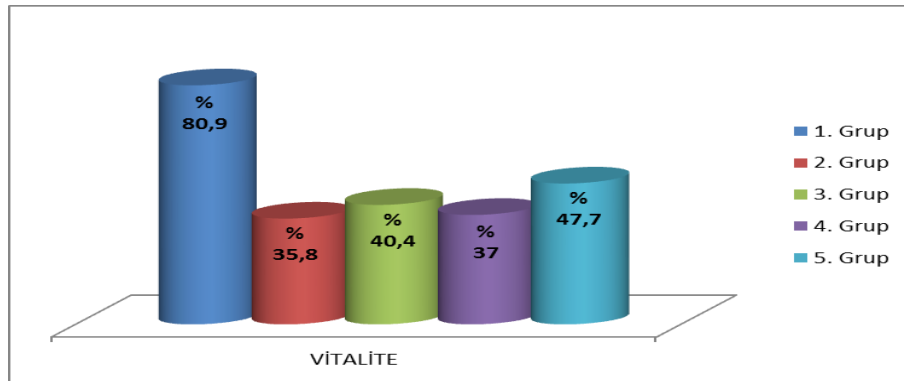
4 BULGULAR

4.1 Sperm Özellikleri

Yapılan çalışmada, 45 hastanın semen örneği dondurma öncesi (1.grup), antioksidan eklenmeyen TYB medyumu (2.grup, Kontrol grubu), Glutasyon eklenen TYB medyumu (3. grup), β -ME eklenen TYB medyumu (4.grup), Sperm Freeze SolutionTM-Vitrolife medyumu (5.grup) olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Dondurma öncesi ve sonrasında toplam motilite, vitalite, %A motilite (ileri hızlı hareketli spermatozoon), %B motilite (ileri yavaş hareketli spermatozoon), %C motilite (yerinde hareketli spermatozoon) ve %D motilite (hareketsiz spermatozoon) incelenmiştir.

4.1.1 Vitalite'nin Değerlendirilmesi

Dondurma öncesi ve sonrasında vitalite değerleri karşılaştırıldığında, dondurma öncesine göre her 4 grup için de vitalite oranının anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (F=21,11; p=0,0005).



Grafik 1: Dondurma öncesi ve sonrası ortalama “% Vitalite” değerleri.

1.Grup: Dondurma öncesi taze semen analizi değerleri. 2.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu. 3.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyumu. 4.Grup: β -ME eklenen TYB medyumu. 5.Grup: Sperm Freeze SolutionTM-Vitrolife medyumu

Vitalite değerlerine ilişkin ortalamalar, standart sapmalar ve varyans analizi sonucu Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 4: “% Vitalite” değerlerinin ortalaması, standart sapması ve tek yönlü varyans analizi test değerleri.

	Ortalama	Std. Sapma	n	P Dunnett (Dondurma ncesi ile karşılaştırma)
Dondurma ncesi	80,96	14,910	45	
1.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu	35,83	27,571	45	0,0005
2.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyumu	40,47	31,063	45	0,0005
3.Grup: β-ME eklenen TYB medyumu	37,07	28,051	30	0,0005
4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	47,71	29,984	45	0,0005

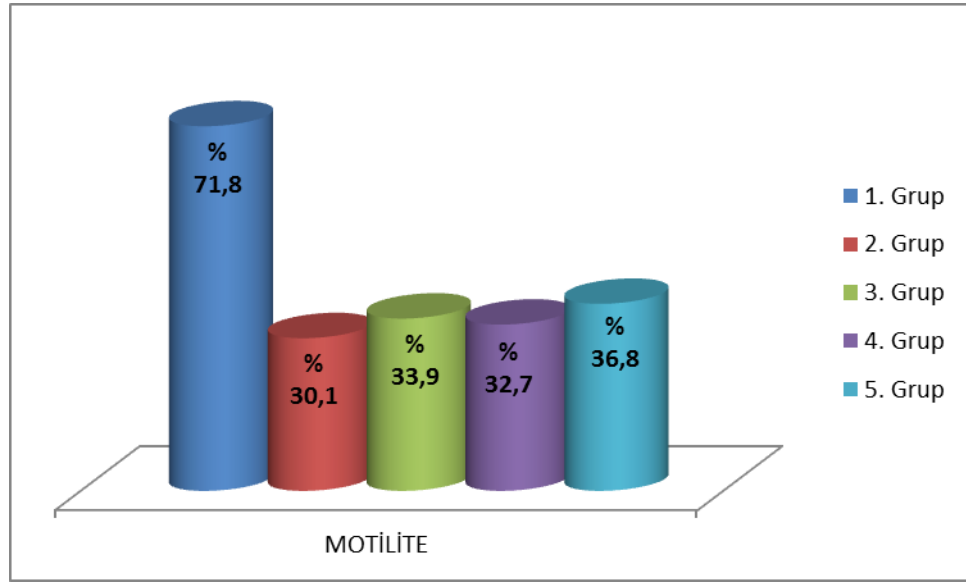
Çalışılan 4 grup vitalite özelliği bakımından kendi arasında değerlendirildiğinde birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo: 4).

Tablo 5: Medyum gruplarında ‘% Vitalite’ değerlerinin karşılaştırılması.

GRUPLAR		P (Dunnett)
1.Grup: TYB medyumu	2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	1,000
1.Grup: TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	1,000
1.Grup: TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	0,467
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	1,000
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	0,464
3.Grup: β -ME + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	0,460

4.1.2 Motilite'nin Değerlendirilmesi

Dondurma öncesi ve sonrasında motilite değerleri karşılaştırıldığında, dondurma öncesine göre her 4 grup için de motilite oranının anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (F=18,90; p=0,0005).



Grafik 2: Motilite'nin dondurma öncesi ve sonrası değerlendirilmesi.

1.Grup: Dondurma öncesi taze semen analizi değerleri. 2.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyum. 3.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyum. 4.Grup: β -ME eklenen TYB medyum. 5.Grup: Sperm Freeze SolutionTM-Vitrolife medyum

Motilite değerlerine ilişkin ortalamalar, standart sapmalar ve varyans analizi sonucu Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 6: “% Motilite” değerlerinin ortalaması, standart sapması ve tek yönlü varyans analizi test değerleri.

	Ortalama	Std. Sapma	n	P Dunnett (Dondurma öncesi ile karşılaştırma)
Dondurma öncesi	71,87	19,260	45	
1.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu	30,10	26,581	45	0,0005
2.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyumu	33,96	30,465	45	0,0005
3.Grup: β-ME eklenen TYB medyumu	32,78	26,931	30	0,0005
4.Grup: Sperm Freeze SolutionTM- Vitrolife medyumu	36,87	30,410	45	0,0005

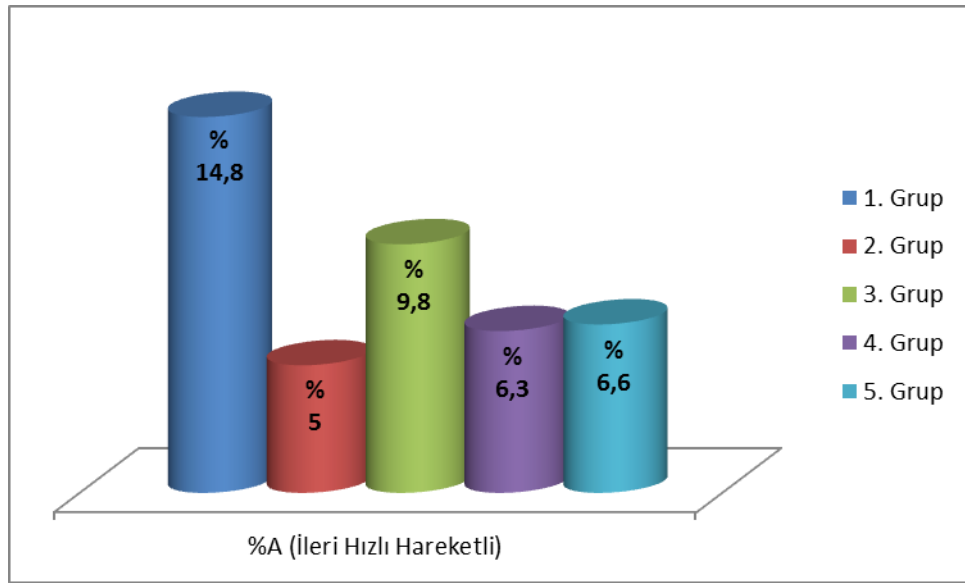
Çalışılan 4 grup motilite özelliği bakımından kendi arasında değerlendirildiğinde birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo: 6).

Tablo 7: Medyum gruplarında '%Motilite' değerlerinin karşılaştırılması.

GRUPLAR		p (Dunnett)
1.Grup: TYB medyumu	2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	1,000
1.Grup: TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	1,000
1.Grup: TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	0,995
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	1,000
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	1,000
3.Grup: β -ME + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	0,939

4.1.3 %A Motilitenin (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) Değerlendirilmesi

Dondurma öncesi ve sonrasında %A motilite karşılaştırıldığında, dondurma öncesine göre her 4 grup için %A motilitenin anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (F=5,20; p=0,001).



Grafik 3: %A Motilitenin (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) dondurma öncesi ve sonrası değerlendirilmesi

1.Grup: Dondurma öncesi taze semen analizi değerleri. 2.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyum. 3.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyum. 4.Grup: β -ME eklenen TYB medyum. 5.Grup: Sperm Freeze SolutionTM-Vitrolife medyum

%A Motilite değerlerine ilişkin ortalamalar, standart sapmalar ve varyans analizi sonucu Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 8: “%A” Motilite (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) değerlerinin ortalaması, standart sapması ve tek yönlü varyans analizi test değerleri.

	Ortalama	Std. Sapma	n	P Dunnett (Dondurma öncesi ile karşılaştırma)
Dondurma öncesi	14,82	13,042	45	
1.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu	5,03	7,797	45	0,001
2.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyumu	9,80*	14,535	45	0,001
3.Grup: β -ME eklenen TYB medyumu	6,38	7,823	30	0,001
4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	6,64	9,227	45	0,001

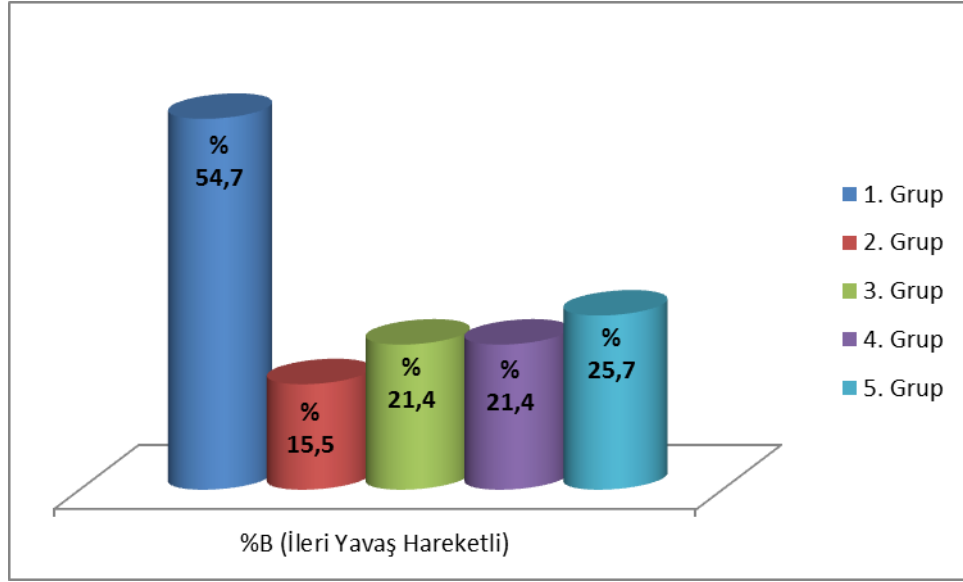
Çalışılan 4 grup %A motilite bakımından kendi aralarında değerlendirildiğinde; Glutasyon eklenen TYB medyumunun bulunduğu 3. grup dışındaki diğer grupların, %A motilitenin önemli düzeyde azalmakta olduğu görülmüştür (Tablo: 8).

Tablo 9: Medyum gruplarında “%A” Motilite (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) değerlerinin karşılaştırılması.

GRUPLAR		p (Dunnett)
Dondurma Öncesi	2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	0,590
1.Grup: TYB medyumu	2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	0,829
1.Grup: TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	0,998
1.Grup: TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	1,000
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	0,503
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	0,935
3.Grup: β -ME + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	0,990

4.1.4 %B Motilitenin (İleri Yavaş Hareketli Spermatozoon) Değerlendirilmesi

Dondurma öncesi ve sonrasında %B motilite karşılaştırıldığında, dondurma öncesine göre her 4 grup için de %B motilitenin anlamlı derecede azaldığı belirlenmiştir (F=21,83; p=0,0005).



Grafik 4: %B Motilitenin (İleri Yavaş Hareketli Spermatozoon) dondurma öncesi ve sonrası değerlendirilmesi

1.Grup: Dondurma öncesi taze semen analizi değerleri. 2.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu. 3.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyumu. 4.Grup: β -ME eklenen TYB medyumu. 5.Grup: Sperm Freeze SolutionTM-Vitrolife medyumu

%B Motiliteye ilişkin ortalamalar, standart sapmalar ve varyans analizi sonucu Tablo 9’te verilmiştir.

Tablo 10: “%B” Motilite (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) değerlerinin ortalaması, standart sapması ve tek yönlü varyans analizi test değerleri.

	Ortalama	Std. Sapma	n	P Dunnett (Dondurma öncesi ile karşılaştırma)
Dondurma öncesi	54,73	17,042	45	
1.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu	15,57	17,886	45	0,0005
2.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyumu	21,42	22,896	45	0,0005
3.Grup: β -ME eklenen TYB medyumu	21,42	22,953	30	0,0005
4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	25,71	24,830	45	0,0005

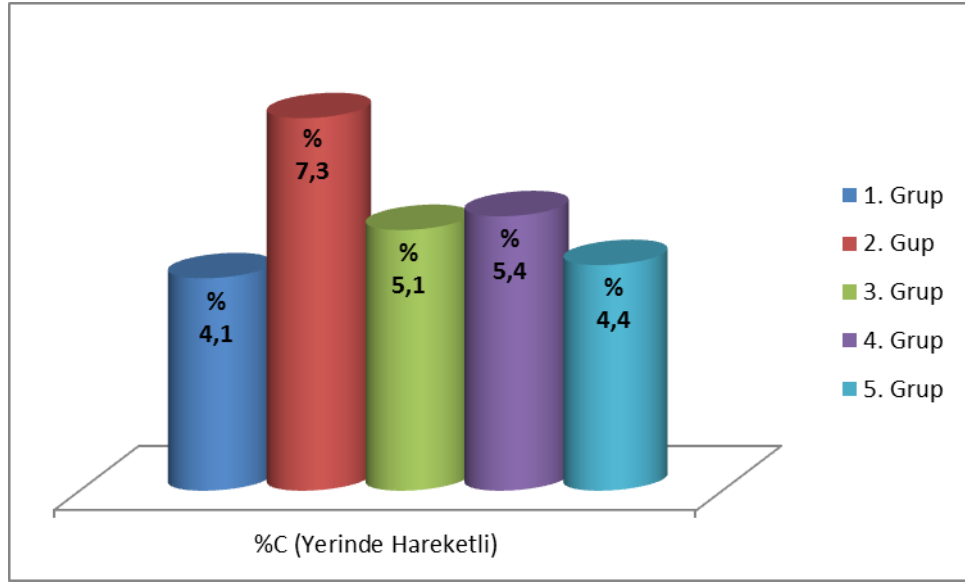
Çalışılan 4 grup %B motilite bakımından kendi arasında değerlendirildiğinde birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo: 10).

Tablo11: Medyum gruplarında “%B” Motilite (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) değerlerinin karşılaştırılması.

GRUPLAR		p (Dunnett)
1.Grup: TYB medyumu	2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	1,000
1.Grup: TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	0,907
1.Grup: TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	0,988
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	0,906
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	0,987
3.Grup: β -ME + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	0,318

4.1.5 %C Motilitenin (Yerinde Hareketli Spermatozoon) Değerlendirilmesi

Dondurma öncesi ve sonrasında %C motilite karşılaştırıldığında, dondurma öncesine göre her 4 grup için de %C motilite bakımından aralarındaki fark anlamlı bulunamamıştır. (F=0,78; p=0,534).



Grafik 5: %C Motilitenin (Yerinde Hareketli Spermatozoon) dondurma öncesi ve sonrası değerlendirilmesi

1.Grup: Dondurma öncesi taze semen analizi değerleri. 2.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyum. 3.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyum. 4.Grup: β -ME eklenen TYB medyum. 5.Grup: Sperm Freeze SolutionTM-Vitrolife medyum

%C Motiliteye ilişkin ortalamalar, standart sapmalar ve varyans analizi sonucu Tablo 11’da verilmiştir.

Tablo 12: Medyum gruplarında “%C” Motilite (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) değerlerinin karşılaştırılması.

	Ortalama	Std. Sapma	n	P Dunnett (Dondurma öncesi ile karşılaştırma)
Dondurma öncesi	4,18	4,711	45	
1.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu	7,33	10,854	45	0,534
2.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyumu	5,13	10,498	45	0,534
3.Grup: β -ME eklenen TYB medyumu	5,40	8,577	30	0,534
4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	4,44	4,984	45	0,534

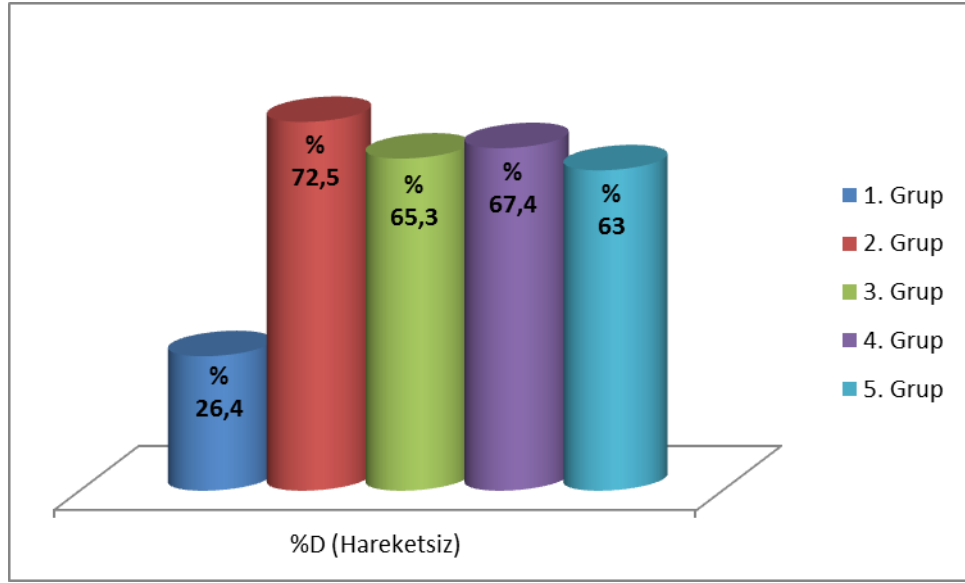
Çalışılan 4 grup %C motilite bakımından kendi arasında değerlendirildiğinde birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo: 12).

Tablo 13: Medyum gruplarında %C Motilite değerlerinin karşılaştırılması

GRUPLAR		p (Dunnett)
1.Grup: TYB medyumu	2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	1,000
1.Grup: TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	0,994
1.Grup: TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	0,999
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	0,991
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	1,000
3.Grup: β -ME + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution TM - Vitrolife medyumu	0,845

4.1.6 %D Motilitenin (Hareketsiz Spermatozoon) Değerlendirilmesi

Dondurma öncesi ve sonrasında % D motilite karşılaştırıldığında, dondurma öncesine göre her 4 grup için de % D motilitenin anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir (F=22,44; p=0,0005).



Grafik 6: %D Motilitenin (Hareketsiz Spermatozoon) dondurma öncesi ve sonrası değerlendirilmesi

1.Grup: Dondurma öncesi taze semen analizi değerleri. 2.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyum. 3.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyum. 4.Grup: β -ME eklenen TYB medyum. 5.Grup: Sperm Freeze SolutionTM-Vitrolife medyum

%D Motilite değerlerine ilişkin ortalamalar, standart sapmalar ve varyans analizi sonucu Tablo 13'da verilmiştir.

Tablo 14: “%D” Motilite (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) değerlerinin ortalaması, standart sapması ve tek yönlü varyans analizi test değerleri.

	Ortalama	Std. Sapma	n	P Dunnett (Dondurma öncesi ile karşılaştırma)
Dondurma öncesi	26,47	18,108	45	
1.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu	72,57	23,114	45	0,0005
2.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyumu	65,36	30,051	45	0,0005
3.Grup: β -ME eklenen TYB medyumu	67,40	26,908	30	0,0005
4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	63,04	26,861	45	0,0005

Çalışılan 4 grup %D motilite bakımından kendi arasında değerlendirildiğinde birbirleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo: 14).

Tablo 15: Medyum gruplarında “%D” Motilite (İleri Hızlı Hareketli Spermatozoon) değerlerinin karşılaştırılması.

GRUPLAR		p (Dunnett)
1.Grup: TYB medyumu	2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	1,000
1.Grup: TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	0,990
1.Grup: TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	0,992
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	3.Grup: β -ME + TYB medyumu	0,933
2.Grup: Glutasyon + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	1,000
3.Grup: β -ME + TYB medyumu	4.Grup: Sperm Freeze Solution™- Vitrolife medyumu	0,599

4.1.7 DNA Fragmantasyon Oranlarının Değerlendirilmesi

Dondurma öncesi ve sonrasında % DNA fragmantasyon karşılaştırıldığında, dondurma öncesi değerler ile 4 grup için dondurma sonrası değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Çalışılan 4 grup DNA fragmantasyonu bakımından kendi aralarında değerlendirildiğinde, gruplar arası farklılık önemli bulunmamıştır.

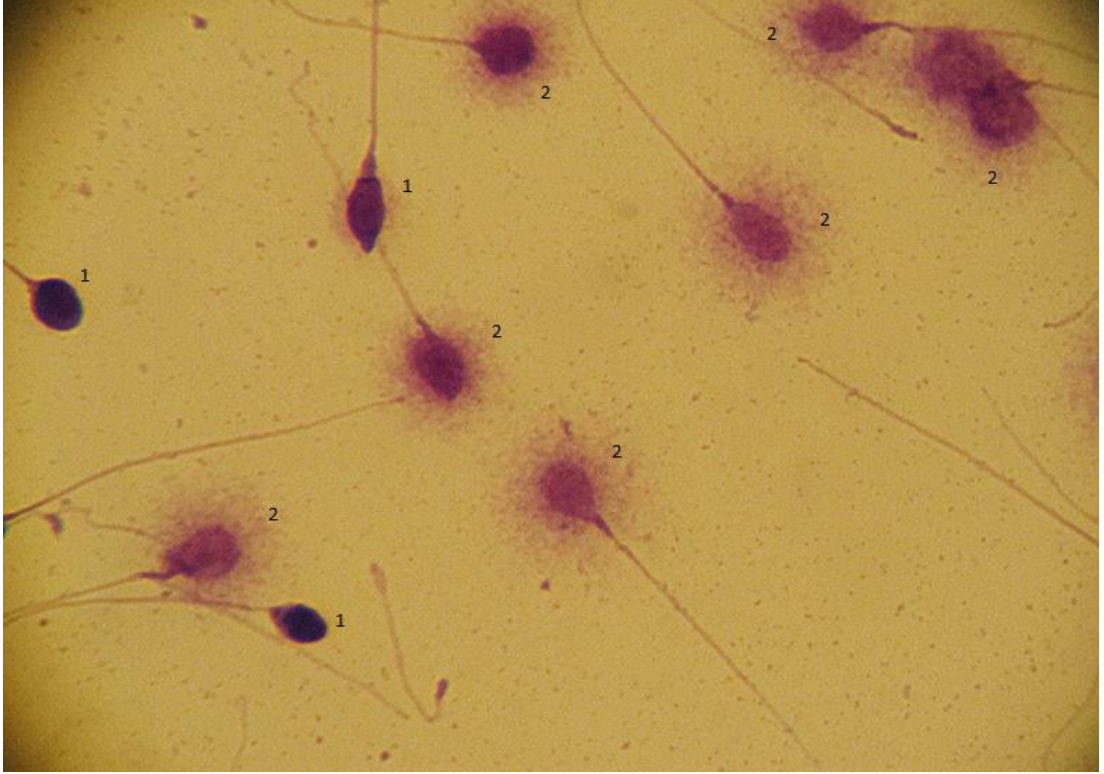
Tablo 16: Dondurma öncesi ve sonrası ‘%DNA Fragmantasyon’ değerlerinin karşılaştırılması.

	n	Ortalama	Std. Sapma	min	max	Medyan	P-Değeri ^a
Dondurma öncesi	6	11,15	5,765	4,2	20,1	9,650	
1.Grup: Antioksidan eklenmeyen TYB medyumu	6	11,13	7,166 ^b	3	20	9,85	0,893
2.Grup: Glutasyon eklenen TYB medyumu	6	14,92	10,074 ^b	4,5	28,5	12,100	0,248
3.Grup: β-ME eklenen TYB medyumu	6	14,30	7,584 ^b	5,9	26,4	12,200	0,249
4.Grup: Sperm Freeze Solution™-Vitrolife medyumu	6	20,80	14,855 ^b	7,6	44,3	15,550	0,058

^a: Grupların dondurma öncesi değerlerle karşılaştırılması sonucu elde edilen ‘P’ değerleri.

^b: Deneme grupları arası farklılık anlamlı bulunmamıştır ($X^2=2,438$; $p=0,486$).

Resim 3'te çalışmamızda değerlendirilen Halo Test sonucu fragmente olan ve olmayan spermilerin görüntüleri yer almaktadır.



Resim 3: Halo test sonucu fragmente olan ve olmayan spermiler.

***1 Fragmente olan sperm. *2 Fragmente olmayan sperm.**

5 TARTIŞMA

Yardımla üreme teknikleri uygulamalarında sperm ve oositin kalitesi sonuçları etkileyen önemli parametrelerdir. Herhangi birindeki yapısal ya da morfolojik bozukluk fertilizasyon aşamasından implantasyona kadar geçen süreci olumsuz etkileyebilmektedir.

Sperm kriyoprezervasyonu, tüp bebek tedavisinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. Dondurma işleminin gerek motilite, morfoloji gibi sperm parametrelerinin olumsuz etkilenmesine, gerekse genetik ve moleküler araştırmalarla belirlenen yapısal bozulmalara neden olduğu bilinmektedir (103-109).

Gliserol içeren tris tamponlu yumurta sarılı medyum (TYBG) ile yapılan bir çalışmada, hızlı dondurma yönteminin basit ve pratik bir yöntem olmasına rağmen, insan sperminin buhar fazı yöntemiyle seminal plazma ile birlikte dondurularak saklanması, sperm hareketliliğini korumak için çok daha iyi bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda TYBG varlığında ve yokluğunda, iki dondurma yöntemi arasında, canlılık, akrozom durumu ve DNA bütünlüğü açısından anlamlı bir farklılık olmadığı belirtilmiştir (110).

Gliserol içeren tris tamponlu yumurta sarılı medyum (TYB), öncelikle kolay elde edilebilir ve düşük maliyetli bir dondurma medyum olması nedeniyle çalışmamızda kullanılmıştır. Kullandığımız protokol daha önce insanlarda denenmemiş bir yöntemdir ve çalışmamızda kullanılan bu medyum (TYB) ile piyasada hazır olarak bulunan SpFreeze Solution medyum karşılaştırıldığında, benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Dondurma öncesi %80 olan canlılık değeri, çözme

sonrasında TYB medyumu için %38 iken SpFreeze Solution medyumu için %48 olarak bulunmuştur. Hareketlilik değeri ise dondurma öncesinde %72 iken çalışma sonrasında TYB medyumu için %30, SpFreeze Solution medyumu için %37 olmak üzere birbirine yakın değerlerde gözlenmiştir. Bu durum kullandığımız medyumun, piyasada bulunan ticari medyumlara bir alternatif oluşturabildiğini göstermektedir.

Bir diğer parametre olan %A (ileri hızlı hareketli spermatozoa) değeri, dondurma öncesinde %15 iken, dondurma sonrasında Glutasyon eklenen medyum grubunda %10 olarak saptanmış olup diğer gruplar arasından dondurma öncesine en yakın değer olarak gözlemlenmiştir. %D (hareketsiz spermatozoa) oranı ise dondurma öncesi %26 iken, çözme sonrasında % 73, %65, %67, %63 gibi beklendiği gibi artmış ve 4 grup arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

İnfertilitede sperm DNA fragmantasyonunun etkisi birçok çalışmada tartışılan bir konu olagelmıştır. Normal semen parametrelerine sahip erkeklerde açıklanamayan infertilite nedenlerinden biri olarak DNA fragmantasyon seviyelerinin araştırılmasını akla getirmiştir (111). Bu amaçla DNA fragmantasyonunu ölçülmesinde birçok test kullanılabilir (TUNEL, CA, DBD-FISH, SCSA ve SCD) (112-116).

Bunlardan biri olan SCD testi, kolay ve güvenilir olmakla birlikte literatüre son dönemde girmiş bir yöntemdir (116). DNA fragmantasyonunun diğer sperm parametreleri ile olan ilişkisini değerlendiren farklı görüşler bulunmaktadır. 754 hasta ile yapılan bir çalışmada tüm semen parametreleri (motilite, morfoloji, konsantrasyon) ile DNA fragmantasyonu arasında negatif ilişki bulunmuştur (117). Morfoloji, akrozomal indeks ve motilite gibi semen parametrelerinin DNA hasarı ile

ilişkinin incelendiği başka bir çalışmada ise bir ilişki tespit edilmemiştir (91). DNA hasarını farklı yöntemlerle inceleyen çeşitli araştırmalar, semen parametreleri ile DNA hasarı arasında herhangi bir ilişki olmadığını desteklerken (118,119), kimi araştırmalarda bu parametreler arasında negatif bir ilişki varlığı bildirilmiştir (120,121). Biz de çalışmamızı genetik yönden desteklemek amacıyla, rastgele seçilen 6 örnekte TYB medyumuna Glutasyon ve β -ME antioksidanlarını ekleyerek DNA hasarı üzerine etkisini karşılaştırdık ve belki de örnek sayısının yetersiz olması nedeniyle sonuçlarımızda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşamadık.

Sıvı azot buharında dondurma ve bilgisayarlı dondurma yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, sıvı azotla dondurma sonrasında DNA hasarının daha fazla olduğunu gösterilmiştir (122). DNA bütünlüğünün araştırıldığı başka bir çalışmada ise taze semen ve hazırlanmış sperm örneklerinin, dondurma öncesi ve sonrasındaki değerleri karşılaştırılmış ve taze semenin dondurmanın, çözme sonrası DNA bütünlüğüne daha az zarar verdiğini gösterilmiş, bunun nedeni olarak da seminal plazma içinde bulunan antioksidanlar ileri sürülmüştür (105). Bizim çalışmamızda ise sıvı azot buharı kullanılarak antioksidan eklenen medyumlarla dondurulan taze semen örneklerinin DNA hasarı seviyesi açısından farkı karşılaştırılmış, fakat anlamlı bir sonuca varılamamıştır. Bu durum, örnek sayısının yetersiz olmasıyla açıklanabilir, örnek sayısı artırılarak yeni çalışmalar yapılabilir.

İnfertil erkeklerden alınan örneklerin fertil erkeklere göre oksidatif strese karşı daha duyarlı olduğu ve antioksidanlar tarafından korunmaya daha fazla ihtiyacı olduğu bilinmektedir (123). Semeninkübasyon ve santrifüj gibi işlemlerle hazırlanma aşamaları sırasında antioksidanların sperm DNA'sını korumak için sınırlı bir gücü bulunmakla birlikte (62,65,66,124), bazı durumlarda vitamin C ve E gibi

antioksidan kombinasyonlarının in-vitro kullanımı, sperm DNA hasarına da neden olabilmektedir (62,66,124). Çeşitli antioksidan maddelerin semenin hazırlanma ve dondurma süreçlerindeki olumsuz etkilerinin göz önünde bulundurarak biz de çalışmamızda Glutasyon ve β -ME antioksidanları eklenmiş TYB medyumunu kullanıp vitalite ve motilite değerleri üzerine etkilerini değerlendirdik. Çalışma sonucunda farklı antioksidanlar eklenmiş medyumlarla dondurulup çözülen taze semen örnekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi.

Sperm DNA'sı hasarının üreme potansiyeli üzerindeki etkisi birçok farklı çalışmada değişik sonuçlar gösteren tartışmalı bir konu olagelmiştir. Bazı araştırmacılar kriyoprezervasyon sonrasında DNA hasarında, anlamlı artış bildirilirken (104,124), bazı araştırmacılar daha farklı görüşler bildirmişlerdir (126,127). Ortaya çıkan bu görüş ayrılıkları, DNA hasarını belirlemede kullanılan teknikler, dondurma yöntemleri ve dondurma öncesinde uygulanan hazırlama tekniklerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda dondurma öncesinde ve farklı antioksidanlar eklenmiş dondurma medyumlarıyla dondurulan örneklerin çözme sonrasında DNA hasarını incelediğimizde, sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır. Dondurma sonrasında motilite, vitalite değerlerinin beklenildiği üzere anlamlı derecede azaldığı sonucuna varılmıştır.

Yardımla üreme tekniklerinde başarının artırılabilmesi için, oksidatif stresin olumsuz etkilerinin en aza indirmek üzere, antioksidan eklenmiş medyumların kullanımı ile yeni çalışmaların gerekliliği bildirilmiştir (37, 128-130).

Yaptığımız bu çalışmada dondurma-çözme sonrasında motilite, vitalite

değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığını belirledik. Bulgularımız, bu konuda yapılan diğer çalışmaların bulgularını desteklemektedir (108,109). Antioksidanların yararlı etkileri ve moleküler düzeyde geliştirilen tekniklerin ışığında yapılacak geleceğe yönelik çalışmalar, çözme sonrasında sperm kalitesini etkileyen olumsuz koşulları en aza indirmek amacıyla yapılmalıdır. Bu sayede çocuk sahibi olmak isteyen çiftler için daha yüksek gebelik oranları sağlayabilmek mümkün gibi görünmektedir.

6 KAYNAKLAR

1. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri – Yeni Uygulamalar ve Güncel Yaklaşımlar. 2008
2. Bras M, Lens JW, Piedeiet MH, Rijnders PM, Verveld M, Zeilmaker GH. Laboratory aspects of in vitro fertilization. Vy T. K. Phan, National Medicine Publisher of Vietnam, 2001.
3. Martine N, Willem O. Cryopreservation of human sperm. Human Fertility 2001; 4: 158-163.
4. Hull MG, Williams JA, Ray B, McLaughlin EA, Akande VA, Ford WC. The contribution of subtle oocyte or sperm dysfunction affecting fertilization in endometriosis-associated or unexplained infertility: a controlled comparison with tubal infertility and use of donor spermatozoa. Human Reproduction 1998; 13: 1825-1830.
5. Gomez E, Aitken J. Impact of in vitro fertilization culture media on peroxidative damage to human spermatozoa. Fertil Steril 1996; 65: 880-2.
6. Zini A, Al-Hathal N. Antioxidant therapy in male infertility: fact or fiction? Asian Journal of Andrology 2011; 13: 374–381.
7. R, Agarwal A, Kandirali E, Sharma R, Thomas A, Nada E, Evenson D, Alvarez J. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. Fertil Steril 2002; 78(6): 1215-122.

8. Vayena E, Rowe P, Griffin P. Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction. Report of a meeting on Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction held at WHO Headquarters In 2002; 17-21.
9. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. Hum Reprod 2003; 18: 1959- 66.
10. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J. Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a populationbased prospective study. Fertil Steril 2003; 79: 577-84.
11. Gomel V, Urman B, Yarali H. Investigation of the infertile couple. In: Aksel S, Beksac S. Reproductive Endocrinology and Infertility Medical Network, 1993; 143-55.
12. Bayer SR, Alper MM, Penzias AS. IVF İnfertilite El Kitabı. Zeki IA, Kubilay V. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2008.
13. Taşçı E, Bolsoy N, Kavlak O, Yücesoy F. İnfertil kadınlarda evlilik uyumu. Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi 2008; 2: 105-110.
14. Yumru AE, Öndeş B. İnfertil Çifte Yaklaşım ve İn Vitro Fertilizasyon'a Doğru Hasta Seçimi. JAREM 2011; 1: 57-60.
15. Aksel S, Beksac MS. Reproductive Endocrinology & Infertility Medical Network 1993: 143-146.

16. WHO 2010 Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction Cambridge University Press Fourth Edition
17. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of Assisted Reproductive Laboratory and Clinical Perspectives. UK: Informa; 2009.
18. Elder K, Dale B. İn-Vitro Fertilizasyon. İrez T (Çev), 3. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2013.
19. Keith LM, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Delilbaşı L (Çev). Ankara: Güneş Tıp Kitabevi; 2008.
20. Lovelock JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*. 1953; 11(1): 28-36.
21. Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Advances in Urology Volume 2012*; 12.
22. Kupker W, Al-Hasani S, Johannisson R, Sandmann J, Ludwig M, Jocham D, Diedrich K. The use of cryopreserved mature and immature testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: risks and limitations. *Semin Reprod Med*. 2002; 20(1): 25-35.
23. A. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens. *JEB* 1930; 7:201.
24. Hammond J. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vagina. *J Exp Biol* 1930; 7:175.

25. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666.
26. Sherman JK, Bunge RG. Observations on preservation of human spermatozoa at low temperatures. *Proc Soc Ex Biol Med.* 1953; 82(4): 686-8.
27. Mazur P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol.* 1963; 47: 347-69.
28. Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from chinese hamster tissue-culture cells. *Experimental Cell Research* 1972; 71: 345–355.
29. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196° and -296°C. *Science* 1972; 178: 411.
30. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *General and Molecular Biology* 1972; 11: 1071-1079.
31. Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertility and Sterility* 1986; 46(2):268-272.
32. Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril.* 1984; 42(2): 293-6.

33. Ashwood-Smith MJ. The cryopreservation of human embryos. *Hum Reprod.* 1988; 3(2): 272.
34. Ford W, Whittington K, Williams AC. Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int. J. Androl.* 1997; 20(3): 44-49.
35. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum. Reprod.* 1998; 13(6):1429-36.
36. Griveau JF, Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int. J. Androl.* 1997; 20: 61-69.
37. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Clinical review. *Urology* 1996; 48(6): 835-850.
38. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem.* 2001; 8(7):851-62.
39. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews.* 1994; 74(1): 139-162.
40. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Devel.* 1993; 35: 302-315.
41. Geva E, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A. Free radicals, antioxidants and human spermatozoa: clinical implications. *Hum Reprod.* 1998; 13(6): 1422-4.

42. Hargreave TB. Male Infertility Second edition 1994; 94-103.
43. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-724.
44. Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leucocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J. Androl.* 2002; 23(5): 717-723.
45. Lopes S, Jurisicova A, Sun J, Casper R. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 1998; 13(4): 896-900.
46. Li TK. The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biol. Reprod.* 1975; 12: 641- 646.
47. Nissen HP, Kreysel HW. Superoxide dismutase in human semen, *Klin. Wochensh.* 1983; 61: 63-65.
48. Jeulin C, Soufir J.C, Weber P, et al. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 1989; 24: 185-196.
49. Byung Pal Yu. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 1994; 74(1): 139-162.
50. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997; 82 (2): 291-5.
51. Dabelstein W, Reglitzky A, Schütze A, Reders K. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* 2007.

52. Baillie JK, Thompson AAR, Irving JB, Bates MGD, Sutherland AI, MacNee W, Maxwell SRJ, Webb DJ. Oral antioxidant supplementation does not prevent acute mountain sickness: double blind, randomized placebo controlled trial. *QJM* 2009; 102 (5): 341–8.
53. Sandal Aİ. Modifiye TCM_199 Medyumunda Olgunlaştırılarak İn Vitro Üretilen Sığır Embriyolarının Dondurulması. Doktora Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2012.
54. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril*. 1992; 57: 409–16.
55. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl*. 1993; 16: 183–8.
56. Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW et al. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod*. 1995; 10: 2061–2071.
57. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992; 13: 368–378.
58. Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993; 97: 441–450.

59. Griveau JF, Le Lannou D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Int J Androl* 1994; 17: 225–31.
60. Oeda T, Henkel R, Ohmori H, Schill WB. Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? *Andrologia* 1997; 29: 125–131.
61. Verma A, Kanwar KC. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl* 1999; 1: 151–154.
62. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 1998; 13: 1240–1247.
63. Zheng RL, Zhang H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 581–586.
64. Calamera JC, Fernandez PJ, Buffone MG, Acosta AA, Doncel GF. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia* 2001; 33: 79–86.
65. Chi HJ, Kim JH, Ryu CS, Lee JY, Park JS et al. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2008; 23: 1023–8.

66. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis* 2000; 15: 61–8.
67. Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: clinical perspective. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26: 427–32.
68. Aitken RJ, de Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A, McLachlan RI. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Hum Reprod* 2010; 25: 2415–2426.
69. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11003–11006.
70. Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66 (8): 1499–1503.
71. Couto N, Naglis M, Gaskell S, Barber J. Partition and Turnover of Glutathione Reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: a Proteomic Approach. *Journal of Proteome Research* 2013; 12 (6): 2885-2894.
72. Meister A. Methods for the selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione transport. *Methods Enzymol.* 1985; 113: 571-85.

73. Ha SB, Smith AP, Howden R, Dietrich WM, Bugg S, O'Connell MJ, Goldsbrough PB, Cobbett CS. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell* 1999; 11 (6): 1153-64.
74. Kishida R, Lee ES, Fukui Y. In vitro maturation of porcine oocytes using a defined medium and developmental capacity after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 2004; 62(9): 1663-76.
75. Lubberda Z. The role of glutathione in mammalian gametes. *Reprod Biol*. 2005; 5(1): 5-17.
76. Abeydeera LR, Wang WH. Presence of beta-mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology*. 1998; 50(5): 747-756.
77. Nagai T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 2001; 55(6): 1291-1301.
78. Sławeta R, Laskowska T. The effect of glutathione on the motility and fertility of frozen bull sperm *Animal reproduction Science*. 1987; 13: 249-253.
79. de Matos DG, Furnus CC. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: Effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology*. 2000; 53(3): 761-71.
80. Atkins RC, Carey FA. *Organik Kimya*. Bilim Yayın Evi 2009.

81. Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. Promoting effect of β -Mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biol Reprod.* 2002; 66(3): 562-567.
82. Hardeland R1, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: Actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond).* 2005; 10; 2:22.
83. Funahashi H. Effect of beta-mercaptoethanol during in vitro fertilization procedures on sperm penetration into porcine oocytes and the early development in vitro. *Reproduction* 2005; 130(6): 889-98.
84. Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro. *Biol Reprod.* 1997; 57(1): 49-53.
85. Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 562–567.
86. Castillo-Martín M, Bonet S, Morató R, Yeste M. Comparative effects of adding β -mercaptoethanol or L-ascorbic acid to culture or vitrification-warming media on IVF porcine embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2014; 26(6): 875-882.
87. Bagis H, Akkoc T, Taskin C, Arat S. Comparison of different cryopreservation techniques: higher survival and implantation rate of frozen-thawed mouse pronuclear embryos in the presence of beta-mercaptoethanol in post-thaw culture. *Reprod Domest Anim.* 2010 Dec; 45(6): 332-337.

88. Viet Linh N, Dang-Nguyen TQ, Nguyen BX, Manabe N, Nagai T. Effects of cysteine during in vitro maturation of porcine oocytes under low oxygen tension on their subsequent in vitro fertilization and development. *J Reprod Dev* 2009; 55(6):594-8.
89. Dinant C, Houtsmuller AB, Vermeulen W. Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics Chromatin* 2008; 1: 9.
90. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*. 1994; 16: 259–267.
91. Yılmaz S, Demiroglu Zergeroglu A, Yılmaz E, Sofuoglu K, Delikara N, Kutlu P. Effects of sperm DNA fragmentation on semen parameters and icsi outcome determined by an improved scd test, halosperm. *IJSF* 2010; 4(2): 73-78.
92. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008; 23: 2663–2668.
93. Bungum M, Humaidan P, Axmon A, Spano M, Bungum L, Erenpreiss J, et al. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod*. 2007; 22: 174–179.
94. Sigman M, Zini A. Semen analysis and sperm function assays: what do they mean? *Semin Reprod Med*. 2009; 27: 115–23.
95. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril*. 2008; 89: 823–31.

96. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 2003; 80(3): 531–553.
97. Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; 75: 674-677.
98. Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology* 2001; 58: 258-261.
99. Koyuncu H. Sperm DNA Hasarı Tespit Yöntemleri. *Turk Urol Sem* 2011; 2: 18-23.
100. Mortimer D. *Practical Laboratory Andrology*. Toronto (NY): Oxford University; 1994.
101. Richards M, Bongso A. Propagation of human embryonic stem cells on human feeder cells.
102. Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology*. 2011 Feb; 62(1) :40-6.
103. Keel BA, Webster BW, Roberts DK. Effects of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Infertility* 1987; 81(1): 213-220.

104. McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 1992; 95(2): 527-534.
105. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction* 2001; 16(6): 1191-1199.
106. Yildiz C, Ottaviani P, Law N, Ayearst R, Liu L, McKerlie C. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the Mouse. *Reproduction* 2007; 133(3): 585-595.
107. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25(8): 403-411.
108. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y, Thijs H, Ombelet W. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online* 2009; 19(2): 202-206.
109. Czarny NA, Harris MS, De Iuliis GN, Rodger JC. Acrosomal integrity, viability, and DNA damage of sperm from dasyurid marsupials after freezing or freeze drying. *Theriogenology* 2009; 72(6): 817-825.
110. Darvishnia H, Lakpour N, Lahijani MS, Heidari-Vala H, Akhondi MA, Zeraati H, Sadeghi MR. Effects of very rapid versus vapor phase freezing on human sperm parameters. *Cell Tissue Bank* 2013; 14(4): 679-685.

111. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *J Androl.* 2006; 27: 53-59.
112. Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 1993; 53: 945-951.
113. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A3 accessibility. *Biol Reprod.* 1995; 52: 864-867.
114. Hughes CM, Lewis SE, Mc Kelvey-Martin VJ, Thompson WA. Comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men using a modified comet assay. *Mol Hum Reprod.* 1996; 2: 613-619.
115. Fernández JL, Goyanes VJ, Ramiro-Díaz J. Application of FISH for in situ detection and quantification of DNA breakage. *Cytogenet Cell Genet.* 1998; 82: 251-256.
116. Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril.* 2005; 84: 833- 842.
117. Velez de la Calle JF, Muller A, Walschaerts M, Clavere JL, Jimenez C, Wittemer C, Thonneau P. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation as assessed by the sperm chromatin dispersion test in assisted reproductive technology

programs:results of a large prospective multicenter study. *Fertil Steril*. 2008; 90(5): 1792-1799.

118. Khalili MA, Aghaie-Maybodi F, Anuari M et al. Sperm nuclear Dna in ejaculate of fertile and infertile men: correlation with semen parameters. *Urology Journal* 2006; 3(3): 154-159.

119. Sills ES, Fryman JT, Perloe M et al. Chromatin fluorescence chracteristics and standard semen analysis parameters: correlations observed in andrology testing among 136 males referred for infertility evaulation. *Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2004; 24(1): 74-77.

120. Muratori M, Marchiani S, Tamburrino L et al. Nuclear staining identifies two populations of human sperm with different DNA fragmentation extent and relationship with semen parameters. *Human Reproduction* 2008; 23(5): 1035-1043.

121. , Elzanaty S, Giwercman A. Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian Journal of Andrology* 2008; 10 (5): 786-790.

122. , Choavaratana R. Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. *Journal of the Medical Association of Thailand* 2006; 89: 306–313.

123. Libman J, Gabriel MS, Sairam MR, Zini A. Catalase can protect spermatozoa of FSH receptor knock-out mice against oxidant-induced DNA damage in vitro. *Int J Androl* 2010; 33: 818–22.

124. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. The effect of ascorbate and alpha-tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis* 1999; 14: 505-12.
125. de Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and Sterility* 2006; 86(3): 597–600.
126. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger A. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *Journal of Andrology* 2001; 22 (4): 646–651.
127. Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction* 2004; 4: 932–939.
128. Whittington K, Ford WCL. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int. J. Androl* 1999; 22: 229-235.
129. Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertil. Steril.* 1995; 63(6): 1293-1300
130. Krausz C, Mills C, Rogers S, Tan S.L, Aitken R.J. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides:

relationships with motility and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 1994; 62(3): 599-605.

131. Richards M, Bongso A. Propagation of human embryonic stem cells on human feeder cells. *Methods Mol Biol.* 2006; 331: 23-41.

132. Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology.* 2011 Feb; 62(1) :40-6.

7 EKLER

EK 1: Etik Kurul Onayı



ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA
HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU



ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Erkek infertilitesinde farklı antioksidan maddelerin sperm kriyoprezervasyon yöntemleri üzerine etkisi"	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	Zeynep Kamil Mah. Op.Dr.Burhanettin Üstünel Sok. No:4/3 Üsküdar 34668
	TELEFON	0216 391 06 80
	FAKS	0216 343 92 51
	E-POSTA	www.etikkurulsekretarya@zeynepkamil.gov.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr.Özen Banu Özdaş			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Dölerme ve Suni Döllenme			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>		
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Doç.Dr. Murat MUHCU
İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.



ZEYNEP KAMİL KADIN VE ÇOCUK HASTALIKLARI EĞİTİM VE ARAŞTIRMA
HASTANESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU



ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		"Erkek İnfertilitesinde farklı antioksidan maddelerin sperm kriyoprezervasyon yöntemleri üzerine etkisi"		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU				
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama		
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>		
	İLAN	<input type="checkbox"/>		
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>		
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>		
DİĞER:	<input type="checkbox"/>			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:223	Tarih: 26.12.2014		
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmann/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Doç.Dr. Murat MUHCU					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Başkan Doç.Dr. Murat MUHCU	Kad. Hast. ve Doğum	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr. Murat API	Kad. Hast. ve Doğum	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input 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. Ayşenur CELAYİR	Çocuk Cerrahisi	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input 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. Arif Aktuğ ERTEKİN	Kad. Hast. ve Doğum	Üsküdar Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Güner KARATEKİN	Neonatoloji	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Çetin ÇAM	Kad. Hast. ve Doğum	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Handan ÇETİNER	Patoloji	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Uzm. Dr. Meral İNALHAN	Çoc. Sağ. ve Hast.	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	E <input type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Sağ. Bak. Hizm. Müdürü Dr. Yeliz DOĞAN MERİH	Doğum ve Kadın Hastalıkları	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi	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. Hülya CABADAK	Biyofizik	Marmara Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Fulya İlçin GÖNENÇ	Hukuk	Marmara Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Günay CAN	Halk Sağlığı	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yard. Doç.Dr. Ahmet Özer ŞEHİRLİ	Farmakoloji	Marmara 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"/>	
Yard.Doç.Dr. Ayten ARIKAN	Tıp Tarihi ve Tıp Etiği	Yeni Yüzyıl Üniversitesi	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Huriye ÖLGE	Emekli	Emekli	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"/>	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Doç.Dr. Murat MUHCU

İmza:

Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.