



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

FARKLI KRİYOPROTEKTAN SOLÜSYONLARLA SPERM
KRİYOPREZERVASYONU VE SONUÇLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

SİNEM ÖZGÖL
DANIŞMAN
Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL

2019



T.C.

BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

FARKLI KRİYOPROTEKTAN SOLÜSYONLARLA SPERM
KRİYOPREZERVASYONU VE SONUÇLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

SİNEM ÖZGÖL

DANIŞMAN

Prof. Dr. Tülay İREZ

İSTANBUL

2019

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji

Program Adı: Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Öğrencinin Adı Soyadı: Sinem ÖZGÖL

Danışman: Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Sinem ÖZGÖL tarafından hazırlanan "Farklı Kriyoprotektan Solüsyonlarla Sperm Kriyoprezervasyonu ve Sonuçların Değerlendirilmesi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:19/06/2019

(Jüri Üyesinin Ünvanı, Adı, Soyadı ve Kurumu)

İmza

Prof. Dr. Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi

Doç. Dr. Yasemin Müşteri OLTULU

Biruni Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Nurten DAYIOĞLU

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca bu tez jüri tarafından onaylanmış ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

İBEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı herhangi bir davranışının olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, çalışma ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynaklar listesi şeklinde eklediğimi, patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını beyan ederim.

Sinem ÖZGÖL



II.TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından itibaren en büyük katkısı ve desteği gösteren saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof.Dr. Tülay İREZ başta olmak üzere Fertijin Tüp Bebek Merkezi Klinik Direktörü Op.Dr.Seval TAŞDEMİR ve ekibine,

Çalışma sürecim boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve bu sektörde ilerlememde büyük katkıları olan, M.Sc.Bio.İlkay Şafak TAVUKÇUOĞLU'na Hayatımın her anında varlığıyla yanımda olan sevgili annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Sinem ÖZGÖL



III.İÇİNDEKİLER

İç Kapak.....	-
Onay Sayfası.....	-
I.BEYAN.....	iii
II.TEŞEKKÜR.....	iv
III.İÇİNDEKİLER.....	v
IV.SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	viii
V.TABLO LİSTESİ.....	ix
VI.ŞEKİL LİSTESİ.....	x
VII. GRAFİK LİSTESİ.....	xi
1.ÖZET VE ANAHTAR KELİMELEER.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4.GENEL BİLGİLER.....	5
4.1.Erkek Üreme Sistemi.....	5
4.1.1.Testis.....	5
4.1.1.1.Seminiifer tübüller.....	6
4.1.1.2.Sertoli hücreleri.....	7
4.1.1.3.Leyding hücreleri(İnterstisyel Hücreler).....	7
4.1.2.Genital boşaltım kanalları.....	8
4.1.2.1.Duktus epididimis	8
4.1.2.2.Duktus deferens(vasdeferans).....	8
4.1.2.3.Üretra.....	9
4.1.3.Seminal bezler.....	9
4.1.3.1.Prostat bezi.....	9
4.1.3.2.Bulboüretal bezler(Cowper Bezleri).....	10
4.1.3.3.Seminal vezikül.....	10
4.2.Spermin Yapısı.....	10
4.3.Spermatogenez.....	11
4.3.1.Spermatisitogenez (proliferasyon).....	11
4.3.2.Mayoz bölünme.....	12
4.3.3.Spermiyogenez (farklılaşma).....	12

4.4.Laboratuvar Değerlendirmesi.....	15
4.4.1.Semen analizi.....	15
4.4.1.1.Semenin makroskopik olarak incelenmesi.....	15
4.4.1.2.Semenin mikroskopik olarak incelenmesi.....	16
4.5.Sperm DNA Yapısı.....	22
4.5.1.Sperm DNA hasarları.....	23
4.5.2.Sperm DNA fragmentasyonu.....	24
4.5.3.Spermatozoa kromatin paketlenmesi.....	24
4.5.4. Apoptoz.....	24
4.5.5.Reaktif oksijen türevleri(ROS).....	25
4.6.Sperm DNA Fragmentasyon Analizi.....	25
4.6.1.Sperm kromatin yapısı tayini (SCSA).....	25
4.6.2.Toluidin mavisi ile DFI tespiti.....	26
4.6.3.Akridin turuncu testi (AOT).....	26
4.6.4.Asidik anilin mavisi testi.....	26
4.6.5. COMET (Cluster Of Motifs E-valueTool) Testi.....	27
4.6.6.Terminal transferaz(TUNEL) testi.....	27
4.6.7.In situ-nick translasyon (NT)Testi.....	27
4.6.8.DBD-FISH (DNA break age detection-FISH) testi.....	28
4.7.Sperm Kriyoprezervasyonu.....	28
4.7.1.Kriyobiyojinin temelleri.....	29
4.7.2. Kriyoprotektanlar.....	29
4.7.2.1.Permeabl(İnternal) kriyoprotektanlar.....	29
4.7.2.2.Nonpermeabl (Eksternal) kriyoprotektanlar.....	30
4.8.Kriyoprezervasyon Hasarları.....	30
4.9.Kriyoprezervasyon Teknikleri.....	31
5.GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
5.1.Çalışmaya dahil edilen hasta grupları ve özellikleri.....	32
5.2.Çalışmanın tasarımı.....	32
5.3.Çalışmada kullanılan yöntemler.....	33
5.3.1.Örnek alımı ve spermiyogram testi.....	33
5.3.2.Uygulanan sperm hazırlama tekniği.....	34
5.3.3.Sperm maturasyon değerlendirmesinde asidik anilin mavisi boyama.....	35

5.3.4.Sperm DNA fragmantasyonu değerdendirilmesinde AO boyama.....	35
5.3.5.İstatistiksel incelemeler.....	39
6.BULGULAR.....	40
7.TARTIŞMA.....	51
8.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
9.KAYNAKÇA.....	58
10.EKLER	67
Ek1.Gönüllü olur formu.....	67
Ek 2.Kurum izin yazısı.....	70
Ek 3.Etik kurul onayı.....	71
11.Özgeçmiş.....	73
İntihal Raporu.....	74

IV.SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

AB	Anilin Blue
ABP	Androjen Bağlayıcı protein
AMH	Anti-müllerian Hormon
AO	Akridin oranj
DNA	Deoksiribonükleik asit
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection
IVF	In Vitro Fertilizasyon
ml	Mililitre
OAT	Oligoastenoteratospermi
pH	Power of Hydrogen
Rpm	Revolutions per Minute
SCD	Sperm Chromatin Dispersion
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
TdT	Terminal Nukleotidil Transferaz
TUNEL	Terminal Uridine Nick - end Labeling
µl	Mikrolitre

V.TABLO LİSTESİ

Tablo No	TabloAdı	Sayfa No
Tablo 1	Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi	19
Tablo 2	Semen Analizi Normal Referans Değerleri	20
Tablo 3	Sperm DNA Hasarına Sebep Olan Faktörler	23
Tablo 4	Normozoospermi ve Oligoastenoteratozoospermi Hastalarının Sperm Parametrelerinin Karşılaştırılması	41
Tablo 5	Normozoospermi ve Oligoastenoteratozoospermi Hastalarının Dondurma Sonrası Motilitenin Karşılaştırılması	43
Tablo 6	Dondurma Öncesi ve Dondurma Sonrası DNA Fragmantasyonu ve Kromatin Kondansasyonu Yetersizliğinin Karşılaştırılması	44
Tablo 7	Normospermi ve Oligospermi Grupların Dondurma Sonrası Motilite ve DNA Fragmantasyonu	52
Tablo 8	Sağlıklı Grupta Dondurma Solüsyonlarının Karşılaştırılması	53
Tablo 9	Hasta Grupta Dondurma Solüsyonlarının Karşılaştırılması	50

VI.ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Şeklin Adı	Sayfa No
Şekil 1	Erkek Üreme Sistemi	5
Şekil 2	Testis Histolojisi	6
Şekil 3	Sertoli Hücreleri ile Gelişmekte Olan Sperm Arasındaki İlişkiyi Gösteren Seminifer Tübül Kesitinin Şematik Gösterimi	8
Şekil 4	Sperm Hücresinin Yapısı	11
Şekil 5	Erkek Germ Hücrelerinin Oluşumu	13
Şekil 6	Spermiyogenez	14
Şekil 7	Makler Sayım Kamerası	17
Şekil 8	Bir Epitel Hücresi, Debris, veya Spermatozoa ile Kümeleşmiş Spermatozoa Görüntüleri	18
Şekil 9	Akridin oranj boyama yeşil (normal), kavuniçi ve turuncu (defektli) DNA fragmentasyonunu göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskobu görüntüsü.)....	38
Şekil 10	Sperm Morfoloji Değerlendirmesi, Anormal Morfolojik Yapıda ki Spermilerin Gösterimi(100x immersiyon objektifi ışık mikroskobu görüntüsü).....	38

VII. GRAFİK LİSTESİ

Grafik No	Grafik Adı	Sayfa No
Grafik 1	Gruplara Göre Dondurma Öncesi Akridin Oranj (AO) ile Boyanan Spermin DNA Fragmentasyon Oranı.....	45
Grafik 2	Gruplara Göre Dondurma Öncesi Anilin Mavisi (AB) Boyası ile (+) Boyanan Spermin Kromatin Kondansasyonu Yetersizliği Oranı.....	45
Grafik 3	Gruplara Göre B Solüsyonu ile Dondurulup Çözülen Örneğin Akridin Oranj(AO) ile Boyandıktan Sonra ki DNA Fragmentasyon Oranı.....	46
Grafik 4	Gruplara Göre B Solüsyonu ile Dondurulup Çözülen Örneğin Anilin Mavisi ile Boyandıktan Sonraki kromatin kondansasyonu yetersizliği oranı.....	46
Grafik 5	Gruplara göre A Solüsyonu ile Dondurulan Sperm Örneğinin Dondurulup çözme sonrası akridin oranj ile Boyandıktan Sonraki DNA Fragmentasyon Oranı	47
Grafik 6	Gruplara Göre A Solüsyonu ile Dondurulan Sperm Örneğinin Dondurulup Çözme Sonrası Anilin Mavisi ile (+) Boyandıktan Sonraki Kromatin Kondansasyonu Yetersizliği Oranı.....	47
Grafik 7	Gruplara Göre C Solüsyonu ile Dondurulan Sperm Örneğinin Dondurulup Çözme Sonrası Akridin Oranj ile Boyandıktan Sonra ki DNA Fragmentasyon Oranı.....	48
Grafik 8	Gruplara Göre C Solüsyonu ile Dondurulan Sperm Örneğinin Dondurulup Çözme Sonrası Anilin Mavisi ile (+) Boyandıktan Sonra ki Kromatin Kondansasyonu Yetersizliği Oranı.....	48
Grafik 9	Farklı Kroyoprotektanlarla Dondurulan Normozoospermi Grubunun Dondurma Çözme Sonrası Motilite Yüzdeleri Oranı.....	49

Grafik 10	Farklı Kroyoprotektanlarla Dondurulan OAT Grubunun Dondurma Çözme Sonrası Motilite Yüzdeleri Oranı.....	49
Grafik 11	OAT Grubu Hastaların A,B ve C Solüsyonu ile Dondurulup Çözme Sonrası Akridin Oranj ile Boyandıktan Sonra ki DNA Fragmentasyon Oranları.....	50
Grafik 12	Normozoospermi Grubu Hastaların A,B ve C Solüsyonu ile Dondurulup Çözme Sonrası Akridin Oranj ile Boyandıktan Sonra ki DNA Fragmentasyon Oranları.....	50
Grafik 13	Normozoospermi Grubu Hastaların A,B ve C Solüsyonu ile Dondurulup Çözme Sonrası AB(+) ile Boyandıktan Sonraki Kromatin Kondansasyon Yetersizliği Oranı.....	51
Grafik 14	OAT Grubu Hastaların A,B ve C Solüsyonu ile Dondurulup Çözme Sonrası Anilin Mavisi(+) ile Boyandıktan Sonraki Kromatin Kondansasyon Yetersizliği Oranları.....	51

1.ÖZET VE ANAHTAR KELİMELELER

Kriyoprezervasyon; hücrelerin ve dokuların çok düşük sıcaklıkta soğutularak, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması, minimum hasar ve fonksiyon kaybı olmaksızın gelecekte kullanılması amacıyla uzun süreli saklanmasıdır. Günümüzde erkek faktörünün tedavisinde kullanılan sperm kriyoprezervasyonunda ki amaç spermin kriyoprezervasyon sonrası dölleme kapasitesini sürdürebilmesidir. Bu çalışmamız da kriyoprotektan farkının dondurma çözme sonrasında spermden DNA fragmentasyonuna, maturasyonu ve motilitesine etkisini araştırdık. Bu ve benzer çalışmalar ile sperm DNA hasarı en az olacak şekilde kriyoprezervasyon metodunda değişiklikler yapılarak DNA hasarını en aza indirgeyip merkezlerin gebelik ve canlı doğum başarıları artırılabilir. Çalışma ‘Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurul’una sunuldu ve 2017/6-3 sayılı ve 13.06.2017 tarihli etik kurul onayı alındı. Çalışma Eylül 2017- Nisan 2018 tarihleri arasında Fertijin Kadın Sağlığı ve Tüp Bebek Merkezine spermiyogram analizi için başvuran hastalarda uygulandı. Kliniğe başvuran hastalardan normozoospermi (n:20) ve oligoastenoteratozoospermi gruplarında (n:20) WHO kriterlerine uygun standart semen analizi uygulanarak ardından asidik anilin mavisi boyama yöntemi ile sperm maturasyonu ve akridin oranj boyama yöntemi ile sperm DNA fragmentasyon hasarı değerlendirildi. Sperm örnekleri sperm yıkama yöntemi olarak “gradient” (farklı yoğunluk ayırma) tekniği kullanılarak yıkandı ve yıkama sırasında kriyoprotektan olarak üç farklı solüsyonlar ile donduruldu 24 saat sonra çözülüp motilitesi, DNA fragmentasyonu ve sperm maturasyonu yönünden tekrar değerlendirildi. Bu tez çalışmasına göre farklı kriyoprezervasyon solüsyonlarıyla dondurulup çözülen sperm örneklerinin çözme sonrası sperm motilite, DNA fragmentasyonu ve sperm maturasyonu açısından kriyoprotektanlara göre anlamlı fark bulunamamış olup oligoastenoteratozoospermi olgularında normozoospermi olgularına göre motilite, DNA fragmentasyonu ve sperm maturasyonu yönünden dondurma çözme sonrası kötü etkileri benzer olarak tüm kriyoprotektan solüsyonlarda ortaya çıkmıştır.

Anahtar kelimeler: Asidik anilin mavisi, Akridin oranj, DNA fragmentasyonu, sperm maturasyonu, sperm dondurma

2.ABSTRACT

Evaluation of sperm cryopreservation and its results with different cryoprotectant solutions

Cells and tissues are cooled at very low temperature, all biological activities to stop, minimal damage and function without loss of long-term use the purpose of future storage. We investigated the effect of cryoprotectant on DNA fragmentation, maturation, motility in after freezing. Similar studies, it can be improved by making changes in the cryopreservation method with the least amount of sperm DNA damage these changes will minimize the damage of frozen sperm DNA, better quality sperm can be obtained and the success of pregnancy and live birth rate. The study was submitted to the Biruni University Non-Interventional Ethics Committee and was approved by the ethics committee of 2018-12-9 and dated 29.01.2018. The study was carried out between September 2017 - April 2018 in patients applying for spermiogram analysis to Fertijin Women's Health and IVF Center. Among the patients who applied to IVF Center, standard semen analysis was performed according to WHO criteria in normozoospermia (n: 20) and OAT groups (n: 20). Sperm samples were washed using the in gradient, technique as a sperm washing method and were thawed with three different solutions as the cryoprotectant in the wash thecnique. They were thawed after 24 hours before freezing. Then all samples were evaluated with acridine orange and acidic alanine blue painting procedure on about sperm maturation and DNA fragmentation. According to this study, there is no significant difference between in sperm motility, DNA fragmentation and sperm maturation in these sperm samples after thawing or frozen with different cryopreservation solutions.

Key words : Acridin orange, annilin blue, DNA fragmantation, sperm freezing, sperm maturation

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Erkek infertilitesi, bir erkeğin normal bir kadın partner varlığında cinsel olarak aktif olmalarına ve korunmasız cinsel ilişkilerine karşın, bir yılın içinde gebelik meydana gelmemesi veya çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanmaktadır (Dohle et al., 2009). Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde anamnez ve fizik muayeneyi takiben semen analizinin yapıldığı bilinmektedir. Semen analizinin de, sayı ve hareketlilik, sperm morfolojisi ayrıntılı olarak incelenmektedir. Fakat bu kriterler spermdeki DNA hasarı ve sperm maturasyonu hakkında bilgi vermemektedir. Standart semen analizinde kullanılan parametrelere ek olarak sperm maturasyon, kromatin kondansasyon testinin de rutin laboratuvar uygulamalarında yer alması spermin DNA'sı hakkında öngörü olarak kabul edilebilir (Hammadeh et al., 2001).

Son yıllarda yapılan araştırmalar erkek infertilitesinin de sperm DNA bütünlüğü üzerine yapılmaktadır. Bu çalışmalar da, sperm DNA bütünlüğünün, erkeğin fertilitésinin belirlenmesinde çok önemli bir role sahip olduğu gözlemlenmiştir (Koyuncu, 2011). Sperm örneklerinde DNA fragmentasyon oranının; infertil bireylerde fertil bireylere göre daha yüksek seviyede olduğu bilinmektedir (Sun et al., 1997). DNA fragmentasyonu tespit yöntemleri ile her yöntemde farklı değerler elde edilmiştir. Fakat sonuçlar genellenecek olursa, fertil bireylerin sperm DNA hasar oranı karşılaştırıldığında da, infertil bireylerin sperm DNA hasar oranının anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (Sun et al., 1997; Bianchi et al., 1993). YÜT ile yapılan bazı işlemler de sperm kriyoprezervasyonuna başvurulmaktadır. Üreme hücreleri ve dokularının da dondurulup saklanabilmesi ve istenildiği zaman çözülebilmesi Yardımcı Üreme Teknolojileri (YÜT) açısından oldukça önemlidir (Delilbaşı, 2008). Dondurulmuş sperm ilk kez 1949 yılında Polge ve arkadaşları tarafından YÜT' de kullanılmıştır (Polge et al., 1949). Kriyoprezerve edilmiş sperm ve taze spermin ICSI sonuçları üzerine etkisi çeşitli çalışmalarda tartışılmıştır. Taze sperme oranla dondurulmuş spermde fertilizasyon oranı, embriyo gelişme oranı ve gebelik oranları gibi parametrelerin düşmesine rağmen, sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içerisindedir. Borges ve ark. taze ejakülat spermin, dondurulmuş ejakülat sperme oranla daha yüksek fertilizasyon oranına sahip olduğunu ileri sürerken (Borges et al., 2007). Kuczynski ve ark. ise taze ejakülat sperm ile dondurulmuş

ejekülat spermin fertilizasyon ve implantasyon oranlarında herhangi bir farklılığın olmadığını ileri sürmüşlerdir (Borgeset al.,2007; Kuczynski et al., 2001).

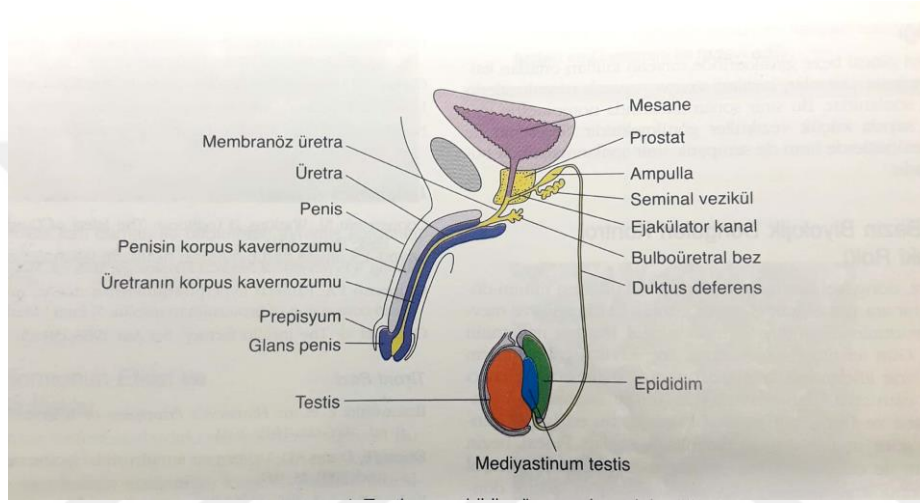
Bu çalışmanın amacı sperm hücresi dondururken kullanılan farklı kriyoprotektan solüsyonlarının dondurma çözme sonrasında DNA fragmentasyonuna, sperm maturasyonu ve motilitesine etkilerinin kıyaslanmasıdır. Bu şekilde gelecek çalışmalarda sperme daha az zarar veren teknikler geliştirilebilir ve böylelikle YÜT sonuçları pozitif yönde geliştirilebilir.



4.GENEL BİLGİLER

4.1.Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi: testisler, genital kanal sistemi(epididimis, duktus deferens, duktus ejakulator ve erkek üretrasının bir kısmı), salgı bezleri (seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretral bezler) ve penisten meydana gelir (Abraham, 2002; Ross et al., 2003).



Şekil 1: Erkek üreme sistemi (Junqueira et al., 1998).

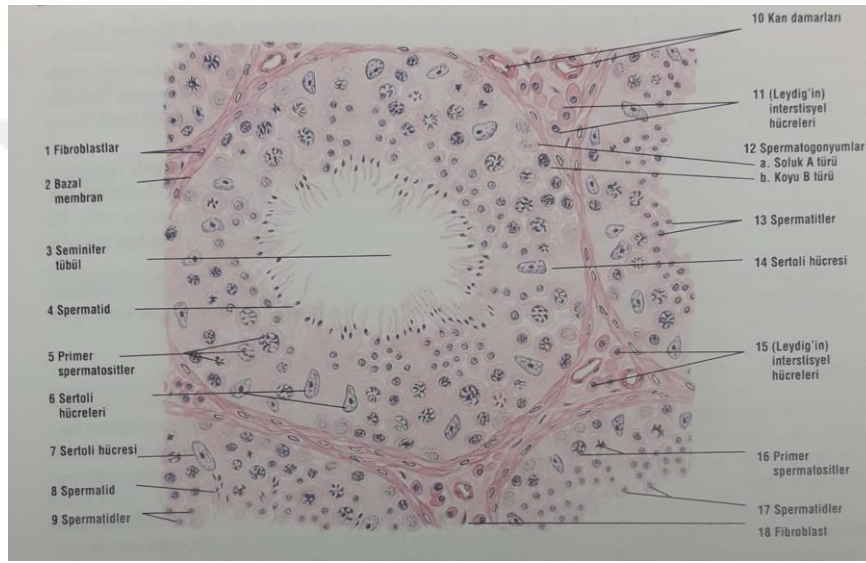
4.1.1.Testis

Testis, vücut boşluğunun dışında skrotum içinde sağ ve solda yerleşmiş oval şekilli bir çift organdır. Dıştan içe doğru tunica vaginalis, tunica albuginea, tunica vaskuloza olmak üzere üç tabaka ile çevrilidir (Junqueira et al., 1998).

Testisler, spermatogenez ile sperm hücresinin üretilmesi (spermatozoa) ve steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılanmasından (steroidogenezis) sorumludur. Testislerdeki endokrin işlevi Leydig hücreleri (interstisiyel hücreler) tarafından yürütülür ve üretilen testosteron doğrudan kana verirler. Testosteron, hipotalamusta gonadotropin serbestletici hormon (GnRH) sekresyonunu ve ön hipofiz de ise LH ve folikül stimülasyon hormon (FSH) sekresyonu üzerine negatif geri bildirim sağlar (Gilberts, 2000).

Erkek genital sistemi testis ve epididimisin genital sistemde ki diğer bölümlerden farklılıkları ve testiküler lobüllerin bağlantıları gösterilmektedir (Junqueira et al., 2006).

Testis histolojisi: Testisler, skrotum içinde yerleşmiş yaklaşık 4-4,5 cm boyutlarında, 20-30 gram ağırlığında ve tunika albuginea adı verilen kalın bir bağ dokusu ile çevrili üreme organlarıdır. Her testis, yaklaşık 250 adet lobüle ayrılmıştır. Lobüllerin herbiri 1-4 adet seminifer tübülden ve Leydig (intersitisyel) hücrelerinin bulunduğu bağ dokusu stromasından oluşmuştur (Abraham, 2002).



Şekil 2: Testis Histolojisi (Victor P. Histoloji atlası).

4.1.2.Seminifer Tübüller

Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Boyları 30-70 cm çapları 150-250 µm dir. Bir testiste toplam tübül uzunluğu 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve uçlara doğru daralarak devam ederler ve rete testise bağlanırlar. Rete testis kanalları da duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanmaktadır. Seminifer epitel iki tip hücre içerir: sertoli ile spermatogenez serisini oluşturan hücreler (Junqueira et al., 1998).

4.1.3.Sertoli Hücreleri

Seminifer tübül membranından lümene kadar uzanan prizmatik hücrelerdir. Spermatogenez serisindeki hücreleri saran sertoli hücrelerinin birçok işlevi vardır; Spermiyogenez sırasında fazla sitoplazmik parçacıkları fagosite ederler. FSH (Follicle Stimulating Hormone, Folikül Uyarıcı Hormon), direkt sertoli hücrelerini uyarır ve spermatogenez için uygun ortam oluşturur.

Gelişmekte olan spermatozoonları sitoplazmik uzantılarıyla destekler, besler ve korurlar.

Kusurlu spermleri fagosite eder.

Erkeklerde, kadındaki kadar 1/5'i kadar östrojen üretimi sertoli hücrelerinde yapılır.

Anti-Müllerian hormon(AMH) üretimi yapar.

Sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunarak kan –testis bariyerini oluştururlar.

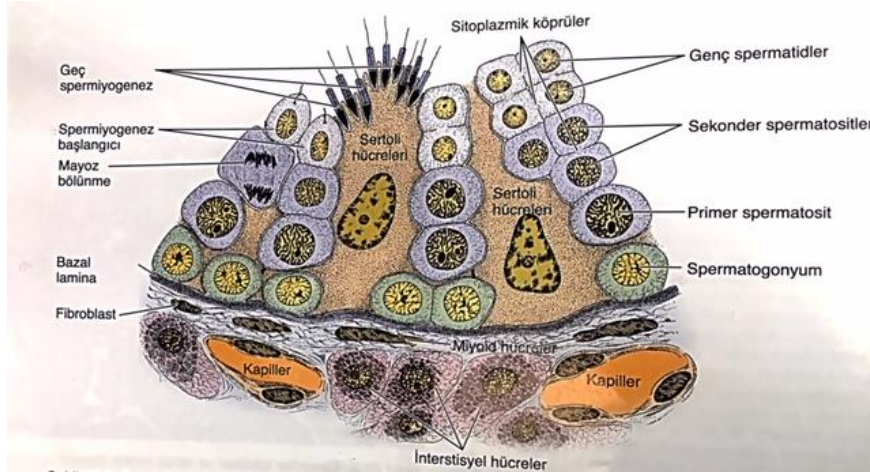
Folikül uyarıcı hormon(FSH) ve testesteron kontrolü altında Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) üretir (Sinclair et al., 1990).

Sertoli hücreleri aynı zamanda inhibin ve aktivin alt birimlerini de salgılar. İnhibin hipotalamustan ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör (GnRH) ve FSH üzerine negatif geri bildirim etkisi yaparken, aktivin FSH salınımı üzerine pozitif geri bildirim etkisi gösterir (Abraham, 2002).

4.1.4.Leydig Hücreleri (İnterstisyel Hücreler)

Leydig hücreleri testis dokusu içinde, loblar arasındaki bağ dokusu bölmelerinde bulunur ve erkeklik hormonu olan testesteronu üretirler. Testesteron ise hipofiz ön lobundan salgılanan Lüteinleştirici hormonun stimülasyon veya inhibisyonu için önemlidir (Grudzinska and Yovich.,1995).

Testesteron embriyonal ve fetal yaşam sırasındaki cinsiyet farklılaşması için gereklidir. Puberte döneminde ise spermin üretiminin ve aksesuar bezlerin sekresyonunun başlaması ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi için gereklidir. Erişkinler de spermatogenezin, bezlerin sekretuar aktivitelerini ve sekonder seks karakterlerinin devam etmesi için gerekmektedir (Gartner and Hiatt., 2016).



Şekil 3: Sertoli hücreleri ile gelişmekte olan sperm arasındaki ilişkiyi gösteren seminifer tübül kesitinin şematik gösterimi (Junqueira et al., 1998).

4.1.2.Genital Boşaltım Kanalları

Testiste üretilen spermatozoonları penise doğru taşıyan kanallar duktus epididimis, duktus deferens(vasdeferens) ve üretradır.

4.1.2.1.Duktus epididimis

Yaklaşık 4-6 m uzunluğunda tek ve kıvrımlı kanaldır. Çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları ile epididimin kuyruk ve gövdesini oluşturur. Epididimisin epiteli spermatogenez sürecinde oluşan artık cisimciklerin sindirilmesine yardımcı olur (Junqueira L. et al.,1998).

4.1.2.2.Duktus deferens (vasdeferans)

Duktus deferens spermatik kordonun bir parçasını oluşturur. Prostata girmeden önce genişler ve ampullayı oluşturur. Ampulla'nın son kısmında seminal vesiküller duktusa katılır. Daha sonrada prostata girer ve prostatik üretraya açılır. Prostata giren segmente ejakülatuar kanal denir (Junqueira et al., 1998).

4.1.2.3.Üretra

Mesaneden başlayan ve penis içerisinde ilerleyen üretra, idrarın ve semenin dış ortama taşınmasını sağlar. Penil üretranın büyük bölümü yalancı çok katlı prizmatik epitel ile örtülüdür. Mukus salgılayan littre bezleri penil üretra boyunca bulunur (Junqueira et al.,1998).

4.1.3.Seminal Bezler

Spermatozoa, testislerdeki seminifer tübüllerde üretilir, epididimlerde depolanır ve aksesuar bezlerden gelen sıvı salgılarıyla karışarak seyreltilir. Semen ise spermatozoanın konsantre süspansiyonundan oluşturulur (Ross and Pawlina ., 2014).

4.1.3.1.Prostat bezi

En büyük aksesuar cinsiyet bezidir. Prostat bezinin epitelyal hücrelerinden salgılanan ekstrasellüler veziküllere prostasom adı verilir. Prostasomlar, spermatozoonların kapasitasyon zamanını düzenler, akrozom reaksiyonunu indükler ve sperm motilitesini stimüle eder. Ayrıca, kadın genital sisteminde immün hücrelerle etkileşerek spermatozoonları fagositten korur ve ömürlerini uzatır (Aalbertset al.,2014). Prostat bezi salgısı, seminal sıvının %20–30'unu oluşturur ve hafif alkalidir(pH: 7,29). Salgı ürünleri; prostat asit fosfataz (PAP), prostat spesifik antijen (PSA), amilaz, sitrik asit, çinko ve fibrinolizindir (Aalbertset al.,2014; Gardner et al.,2010). Semenlikefiye olmasını sağlayan proteolitik enzim (serin proteaz olan) PSA'dır. Fibrinolizin ise semeni akışkan hale getirir (Ross and Pawlia,2014).

4.1.3.2.Bulboüretal bezler (Cowper Bezleri)

Seminal sıvının %2–5'ini salgısı oluşturur. Bol miktarda galaktoz, galaktozamin, galakturonik asit, metilpentoz ve ortalama miktarda sialik asit içerir. Kayganlaştırıcı yapıya sahip sekresyonları, erkek üretrasında ki rezidüe idrarı ve kadındaki asidik vajinal salgıları nötralize eder (Gardner et al., 2010).

4.1.3.3.Seminal vezikül

Seminal sıvının büyük bir (%50–70) kısmını sarı renkte visköz seminal vezikül salgısı oluşturur. Salgı içerisinde fruktoz, amino asit, prostaglandin, askorbik asit, basit şekerler ve seminal veziküle özgü proteinler vardır. Fruktoz, ejakülasyonla atılan spermin ana enerji kaynağıdır. Ejakülasyon sırasında seminal veziküllerin düz kasının kasılması sonucu salgı, ejakülatuar kanal içine boşaltılır ve spermatozoanüretra dışına atılır (Gardner et al., 2010). Seminal veziküllerin salgılama fonksiyonunu göstermek için fruktoz ölçümü yapılır (WHO 5.baskı, 2011).

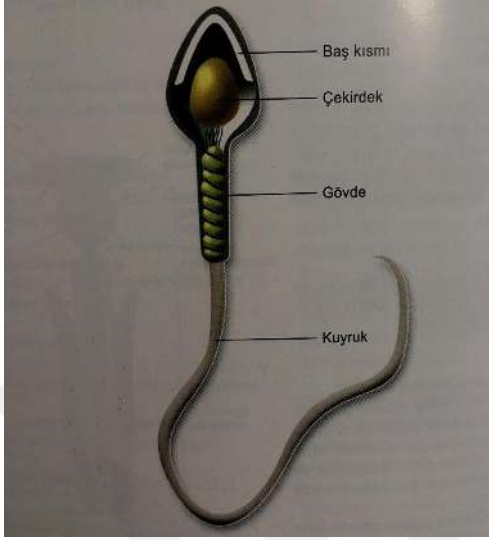
4.2.Spermin Yapısı

Sperm (spermatozoon, çoğulu; spermatozoa), erkek bireye ait olgun germ hücresidir. Sperm uzunluğu yaklaşık 60 µm kadardır. Baş, boyun ve kuyruk bölümünden oluşmaktadır. Baş kısmının boyu 3-5 µm, eni 2-3 µm'dir. Başın 2/3 ön kısmı akrozom adı verilen bir kılıfla kaplanmıştır. Akrozom kesesi içerisinde yumurta zarını delmek için gereken hidrolitik enzimler (hiyaluronidaz, akrozin, proteazlar, asit fosfatazlar) bulunmaktadır (Fawcett, 1965).

Boyun, kuyruk ile sperm başı arasında 0.5 µm uzunluğunda kısa bir parçadır. Mitokondriler burada bulunur ve sperm hücresine gerekli olan enerjiyi sağlayan mitokondriler tarafından sağlanır (Curry M.R., 1995). Sperm boynunda sentrozom organeli bulunur. Sentrozom, sperm kuyruğunun başlangıç kısmıdır. Sentrozomun görevi, yumur hücresinin bölünerek çoğalması ve embriyo gelişim sürecinin başlatılmasıdır.

Kuyruk bölgesi 45-50 µm uzunluğundadır. İnsan sperminin kuyruğu orta parça, esas parça ve son parça olarak üçe ayrılır. Kuyruğun merkezinde 9+2 düzenlemesine uyan 9 dış çift mikrotübül yapısı ve ortada bir çift mikrotübül yapısı bulunmaktadır.

Mikrotübül yapısının etrafı kalın fibrillerde çevrili olup bu dış fibriller kuyruğa diklik kazandırmaktadır. Aksonem ise hareketlilik sağlar. Spermatozoa hareketini flagellum ile gerçekleştirir.



Şekil 4 : Sperm hücresinin yapısı (Süzen, 2012).

4.3.Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonial hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm hücresinin oluşumudur.

Spermatogenez sırasında da, spermatozoa morfolojik ve fizyolojik olarak normal sperm fonksiyonu için gerekli epididimal olgunlaşma girer. Bu sebeple, spermatogenez esnasında meydana gelen bir aksaklık hatalı sperm üretimine sebep olur (Shafik et al., 2006).

Spermatogenez 3 evrede incelenir:

4.3.1.Spermatositogenez (proliferasyon)

İnsanda spermatogenetik 3 tip hücre vardır: Koyu tip A, açık tip A, tip B. Koyu tip A spermatogoniumlar kaynak hücrelerdir ve gereğinde açık hücreleri meydana getirirler. Üç tip spermatogenik hücre de bazal membran üzerinde yerleşik,

yuvarlak, iri hücrelerdir ve boyanma özellikleriyle histolojik kesitlerde ayırt edilebilirler (Clermont,1972). Tip A spermatogonia Tip B spermatogonia oluşturmak için bölünerek sayıca çoğalır.

Primer spermatositler Tip B spermatogonyanın bölünmesiyle meydana gelir. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) ve 4n DNA içerir (n haploid kromozom sayısını insanlarda 23 kromozom) ya da bu kromozomlarda ki DNA miktarını gösterir). Primer spermatositler oluşmalarından hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürer (Özdamar ve ark., 2002).

4.3.2.Mayoz bölünme

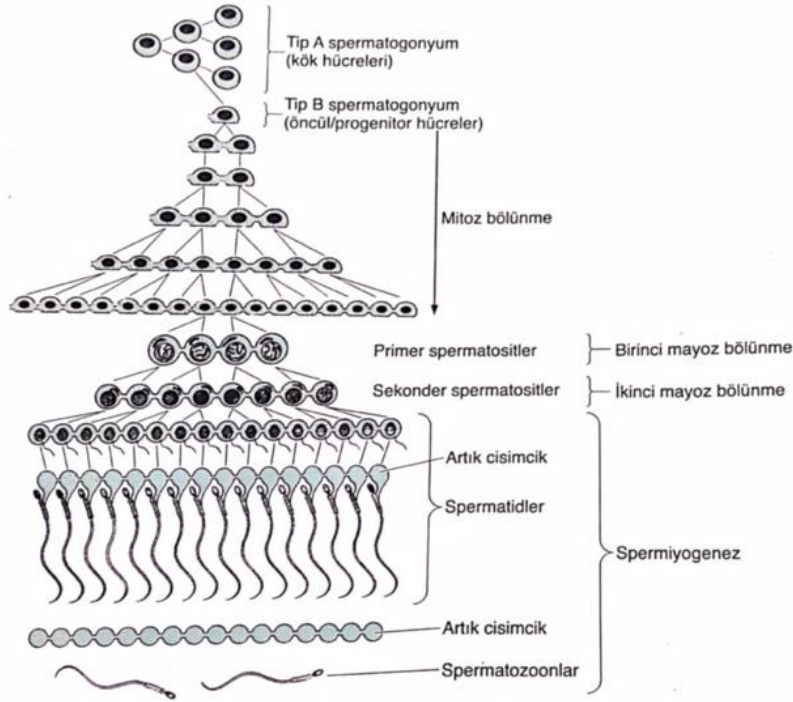
Primer spermatositler 1. mayoz girer ve DNA'larını replike ederler.1.mayozu tamamlaması sonucu oluşan sekonder spermatositler homolog kromozomların yarısını (23 haploid kromozom) ve DNA'nın yarısını (2n DNA) taşırlar.

Sekonder spermatositler 2. mayoz girerek, 23 haploid (n DNA) kromozom içeren spermatid' leri oluşturur.

4.3.3.Spermiyogenez (farklılaşma)

Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Mayoz bölünmeler sonucu meydana gelen spermatidlerin sertoli hücreleri içindeki gelişim ve farklılaşma süreçleridir. Bu süreç sonunda spermatidler olgun spermiumlar halinde seminifer tübülün lümenine atılır (Fawcett, 1965).

Lümeninde Sertoli hücresi tarafından beslenir ve yeniden şekillendirilir. Böylece giderek spermatozoona dönüşür. Spermatozoona dönüşme sırasında sitoplazmasının bir kısmı kaybolur, çekirdek kromatini yeniden organize olur, kompakt bir baş meydana gelir ve kuyruk gelişir (Hassa, 2003).



Şekil 5: Erkek germ hücrelerinin oluşumu(Junqueira et al., 1998).

Üç aşamada spermiyogenez meydana gelir:

Sekonder spermatositlerin bölünmesi ile oluşan spermatid hücrelerinin olgun spermiumlara dönüşmesi olayına spermiyogenez denir.

Bu süreçte, akrozom oluşur, çekirdek yoğunlaşır ve uzar, flagellum gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybolur. Sonuçta seminifer tübülün lümenine salınan olgun spermatozoon meydana gelir (Junqueira et al., 1998).

Spermiyogenez: golgi fazı, akrozomal faz ve maturasyon fazı olmak üzere üç fazdan oluşur:

Golgi Fazı:

Spermatidlerin sitoplazmasında nukleusun yanında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve endoplazmik retikulum bulunur.

Çekirdeğin üzerindeki akrozom bölgesi spermin ön kutbunu belirler. Spermin gelişiminin bu aşamasında, mitokondriler aniden sitoplazmanın kenarına doğru göç ederek plazma zarına yakın yerleşir. Akrozom granülü ve vezikülü oluşurken iki adet

silindirik şeklinde ve birbirine dik konumdaki sentriyol, oluşan akrozomun aksi yönünde, çekirdeğin arkasına doğru hareket eder (Junqueira et al., 1998).

Akrozomal faz:

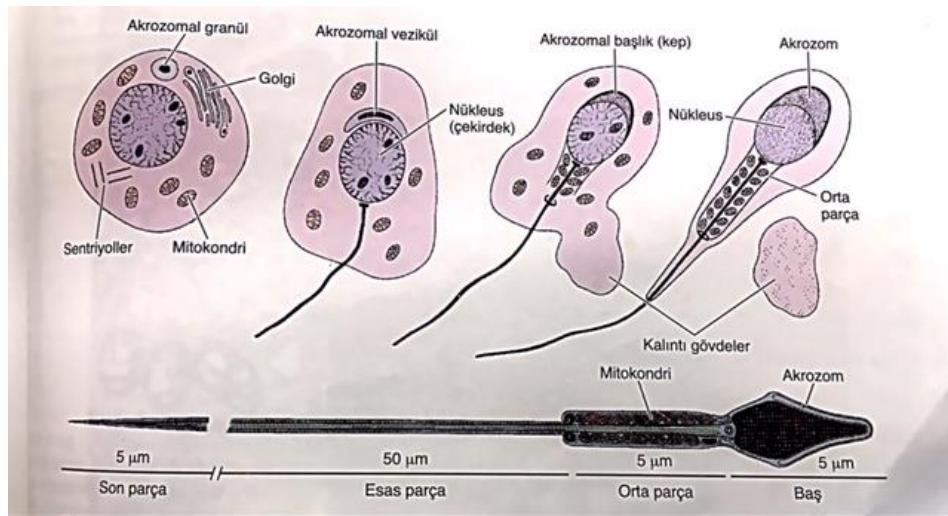
Akrozom vesikülü ve granülü çekirdeğin ön kısmını kaplayacak şekilde yayılır ve akrozom adını alır. Akrozom hyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve bazı hidrolitik enzimler içerir. Bu sebeple lizozom gibi işlev görerek korona radyata hücrelerini birbirinden ayırır ve bu enzimler zona pellusidayı sindirir.

Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu (kamçıyı) oluşturmaktadır. Mitokondriler de kamçının proksimal parçası etrafında toplanarak 'orta parça' adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir.

9+2 mikrotübül aksonem yapısındadır. Mitokondriler kuyruğun orta parçasında sarmalimsi bir kılıf oluşturur (Junqueira et al., 1998).

Maturasyon fazı :

Bu aşamada spermatid sitoplazması atılır ve sertoli hücrelerince fagosite edilir. Daha sonra sertoli hücreleri spermatidlerin tübül lümenine doğru serbest hale gelmesini sağlar (Junqueira et al., 1998).



Şekil 6: Spermiyogenez (Junqueira et al., 1998).

4.4.Laboratuvar Değerlendirmesi

4.4.1.Semen analizi

Semen analizi infertilite ile başvuran çiftlerde erkeğe uygulanan temel testlerden birisidir. Semen analizi spermatozoanın, seminal plazmanın, sperm dışı hücrelerin ve birçok faktörünün değerlendirmesinde anahtar role sahip bir tanısal testtir.

Semen analizinde sonuçların standardize edilebilmesi için en az 72 saatlik cinsel perhiz gereklidir. Bu sürenin 48 saatten az ya da 7 günden uzun olmamasına dikkat edilmelidir. Semen parametreleri fertil erkeklerde bile zaman içinde bazı değişiklikler gösterebilir, bu nedenle en az 2 hafta aralıklarla en az 2 sperm örneği incelenmelidir.

4.4.1.1.Semenin makroskopik olarak incelenmesi

Semen analizine, likefaksiyondan (incelme) hemen sonra başlamalıdır. Numunenin tamamı genellikle oda sıcaklığında 15 dakika içinde likefiye olur, bu durum nadiren 60 dakika veya daha uzun zaman alabilir. Altmış dakika içinde tam bir likefaksiyon oluşmazsa, bu durum kaydedilmelidir. Dehidratasyon veya ısı değişikliğinin semen kalitesini olumsuz yönde etkilememesi için ejakülasyondan sonra 30 dakika, en fazla bir saat içinde analiz yapılmalıdır(WHO 5.baskı, 2010) .

Normal likefiye olmuş semen numunesi homojen ve gri-opak bir görünüme sahiptir. Makroskopik olarak değerlendirilen parametreler: koagülasyon, likefaksiyon süresi, görünüm ve renk, viskozite, hacim, pH'dır.

Koagülasyon: Ejakülasyon sonrası semenin sıvı halden semisolid hale geçmesidir. Semende bulunan vezikül ve epididimal proteinler nedeniyle koagülasyon olur. Koagülasyonun olmaması durumunda seminal vezikülün veya vasdeferensin yokluğundan şüphelenilir (DuPlessis., 2013) .

Likefaksiyon (sıvılaşma süresi): Seminal sıvının tekrar sıvı hale geçmesidir. Prostattan sekrete edilen prostat spesifik antijen (PSA) ile veziküler proteinlerin etkileşimi ile gerçekleşir. Koagülasyon sonrası genellikle ilk 15 dakikada görülür. Ancak 60 dakikaya kadar uzayabilir. Nadiren sıvılaşma olmayabilir, mekanik veya

enzimatik çözme gerekebilir. Likefaksiyon normal prostat işlevinin göstergesi olarak kabul edilir (Mikhailichenko and Esiov., 2005).

Görünüm: Homojen ve gri-opak görünümündedir. Normal koku prostat sekresyonu ile oksidasyonu sonucu oluşur. Normal dışı kokular enfeksiyon göstergesi kabul edilir. Sperm konsantrasyonu çok düşükse, daha az opak bir görünüm alabilir; rengi de farklılaşabilir: örn: eritrositler mevcutsa (hemospermi) kırmızı-kahverengi veya hasta ikterikse veya bazı vitaminler veya ilaçlar alıyorsa sarı olabilir.

Hacim: Uygun cinsel perhiz süresi sonrası normal hacim 1,5 - 6 ml'dir.

Semen pH'sı: Bir damla semen pH kağıdı üzerine konur ve 30 saniye içindeki renk değişimi kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırılır. Normal pH, seminal vezikül sekresyonlarına bağlı olarak alkalidir. Normal bir örnek için alt referans değeri 7,2'dir.

4.4.1.2.Semenin mikroskopik olarak incelenmesi

Makroskopik incelemeyi takiben, ejakülattan 10 µl damla alınarak Makler sayım kamerası kullanılarak sperm konsantrasyonu faz-kontrast mikroskobu ile değerlendirilir. Preparat, toplam x100 büyütme altında taranır (ör: x10 büyütmeli objektif ve x10 büyütmeli okülerin kombinasyonu). Mikroskoptan bakılarak; (WHO 5.baskı, 2010).

Sperm sayısı, hareketliliği, morfolojisi

Sperm agregasyonu veya aglütinasyonu

Spermatozoa dışında hücrelerin varlığı

ör: epitel hücreleri “yuvarlak hücreler”

(lökositler ve immatürgerm hücreleri) ve izole sperm başları veya kuyrukları değerlendirilir.

Sperm örneği değerlendirilene kadar 20- 37 derece arasında muhafaza edilmelidir.

Sperm motilitesinin değerlendirmesi; likefaksiyon sonrası 30 dk bir saat içinde yapılmalıdır.

Sperm sayısı: Tüm ejakülattaki toplam sperm sayısıdır ve alt referans değeri $39 \times 10^6/\text{ml}$ 'dir. Sperm konsantrasyonunun total hacim ile çarpımından elde edilir.

Semende hiç sperm olmayan hastaların semeni 15 dakika süreyle 3000g santrifüj edilip pelet incelemesi yapılmadan azoospermi tanısı konulmamalıdır. Azospermi

tanısı alan erkelerin bu şekilde ayrıntılı incelenmeleri sonucu sperme rastlanabilir (Olshanet al., 1995) .

Makler sayım kamerası:

Sperm sayma kamerası 10 µl derinliğindedir. İki parça camdan meydana gelir. Üst cam her biri 0,1x0,1 mm 'lık 100 kareye bölünmüş 1 mm ² lik ince çizgiler bulunur.

Yine sıvılaşmış ve karıştırılmış, seyreltilmemiş semenden küçük bir damla alınarak diskin merkezine konulur, yerleştirilir ve sayım yapılır. Yukarıdan aşağıya ya da soldan sağa yan yana on karelik alan içerisinde ki sperm sayısı sayılır. Bulunan sayı ml'de kaç milyon sperm olduğunu gösterir.

Sperm sayımı yapılan alandaki (yukarıdan aşağıya ya da soldan sağa yan yana 10 kare) hareketsiz sperm sayısı sayılır ve toplam sperm sayısı ile orantılanarak hareketli sperm sayısı hesaplanır. Bu işlem birçok alanda tekrarlanır ve ortalamaları alınır. Ardından hareketlilik yüzdesi ve kalitesi hesaplanır (Demirel.,2006).



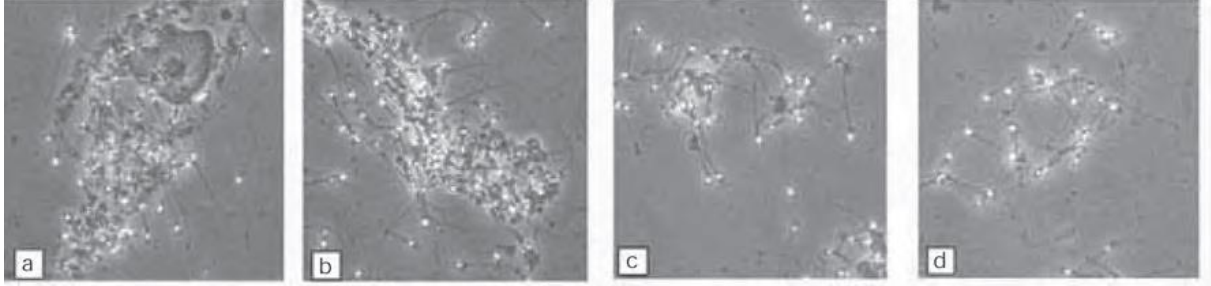
Şekil 7: Makler sayım kamerası (Laboratuvarımızda çekilmiştir).

Sperm hareketlerinin sınıflandırılması:

Spermatozoanın ileri hareketli, yerinde hareketli ve hareketsiz olarak kategorize edilmesi gerektiği önerilmektedir(a,b,c veya d şeklinde derecelendirme yerine) (WHO 5.baskı, 2010) .

- İleri hızlı(Progresif Motilite; PR): doğrusal veya geniş bir daire içinde aktif olarak hareket eden spermatozoa.
- İleri hızlı olmayan(Nonprogresif Motilite; NP): ileriye doğru hareketin olmadığı tüm diğer hareketlilik kalıpları,
- Hareketsiz (İmmotilite; IM)

Sperm agregasyonu: Hareketsiz spermilerin birbirleri ile ortamdaki mukus iplikleri gibi debris materyali ile veya sperm dışı hücreler ile yapışması sonucu gözlenebilir (WHO 5.baskı, 2010).



Şekil 8: Bir epitel hücresi (a), debris (b) veya spermatozoa (c, d) ile kümeleşmiş spermatozoa görüntüleri(WHO 5.baskı, 2010).

Sperm aglütinasyonu: Hareketli spermilerin birbirlerine baş-baş, kuyruk-kuyruk veya karışık olarak yapışarak bir arada bulunmasıdır. Grade 1-4 olarak sınıflandırılır (WHO 5.baskı, 2010)

Sperm canlılığı: Progresif hareketli sperm oranı $< \%40$ olduğu durumlarda sperm canlılık testleri özellikle önem kazanır. Hücre membran bütünlüğüyle belirlenir. Canlı spermilerin yüzdesi, boyayı tutmama veya hipotonik şişme testiyle sağlam membranlı hücreler belirlenerek değerlendirilir. Eozin-nigrosin veya eosin-Y testinde membran bütünlüğü hasar görmüş spermier boyayı alırlar ve boyanmış olarak gözlenirler. Hipoozmotik şişme testi ise, yalnızca membranları sağlam (canlı hücreler) hücrelerin hipotonik sıvılarda şişeceği ilkesine dayanır.

Sperm morfolojisi: Morfoloji anormallikleri (teratospermi) baş, boyun ve kuyruğa göre sınıflandırılır. DSÖ kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdesi $\%30$ 'un üzerinde olmalıdır. DSÖ'nün önerdiği morfolojik değerlendirme özelliklerini aynı alan ancak sınırda kabul edilen spermatozoayı da anormal gruba sokan daha kesin ölçütlerin kullanıldığı değerlendirme sistemi Kruger' in kesin ölçütleri olarak bilinir (Kruger, 1988).

Tablo 1: Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi (Kruger, 1986).

BAŞ	Uzunluk 5-6 Mikron / Genişlik 2,5-3,5 mikron
AKROZOM	Başın % 40-70'ini oluşturmali
ORTA PARÇA	Genişlik 1 mikron / Uzunluk 1.5 x Baş Uzunluğu
KUYRUK	Boy : 45 Mikron / Uniform / Orta parçadan daha ince / Kıvrılmamış / Kırık bulundurmamalı
SİTOPLAZMİK DAMLACIK	Baş alanının % 30-70'inden az sadece orta parçada lokalize

Sperm Morfolojik Anomalileri:

Normal görünüm dışında; baş, boyun ve kuyruk bölgesinde gözlenebilecek olası morfoloji anomalileri bulunmaktadır.

Baş anomalileri: Büyük ya da küçük, konik, piriform, yuvarlak, amorf, vakuollü (>2'den fazla vakuol, vakuoler alan boyanması %20'den fazla), çift başlı veya bunların kombinasyonu şeklinde görülebilmektedir.

Boyun ve orta kısım anomalileri: Başın asimetrik olarak orta parçaya girmesi, kalın ya da düzensiz olması, ince olması veya bunların kombinasyonudur.

Kuyruk anomalileri: Kısa, birden çok, kırık, keskin açılı, koil şekilli, düzensiz ve bunların kombinasyonlarıdır.

WHO 2010 Sperm Kriterleri:

Tablo 2: Semen Analizi Normal Referans Değerleri(WHO 5.Baskı, 2010)

: a) İlerleyici (progresif) hareket, b)İlerleyici (progresif) olmayan hareket,
c) Hareketsiz(immotil)

Parametreler	Alt limit değerleri
Miktar (volüm)	≥ 1.5 ml (1.4-1.7)
pH	≥ 7.2
ml de sperm sayısı (konsantrasyon)	≥ 15 milyon/ml (12-16)
Total sperm sayısı	≥ 39 milyon/ml (33-46)
Hareketlilik (motilite)	%40 (A+B+C)* %32 (A+B) (38-42)
Şekil (morfoloji)	≥ 4 (3-4)
Canlılık (Vitalite)	≥ 58 (55-63)
Lökosit	≤ 1 milyon/ml

WHO parametrelerine göre sperm analizi terminolojilerinin tanımları

Aspermi: Seminal sıvının tamamen olmamasına aspermi adı verilir. Azoospermi'den (seminal sıvıda sperm bulunmaması) ayırt edilmesi gerekir. Aspermi yapan nedenler arasında retrogradejakülasyon, vasküler nedenler, hormonal nedenler ve ereksiyon bozuklukları bulunmaktadır.

Hipospermi: Ejakulatvolümünün 1,5 ml' den az olmasıdır. Hipospermi yapan nedenler arasında prostat, seminal vezikül ve vasdeferensin enfeksiyonu, travma ve tümörlerinin yanı sıra; androjen eksikliği, ejakülatör kanalların tıkanıklıkları ve retrogradejakülasyon da bulunmaktadır.

Hiperspermi/ polizoospermi: Sperm konsantrasyonunun sürekli olarak 250 milyon/ml' den fazla olmasıdır. Prostat ve seminal veziküllerin enfeksiyonun da veya cinsel ilişkinin seyrek olması durumunda görülür.

Ejakulattakoagülasyon bozukluğu: Ejakülatınkoagüle olmaması durumudur. Seminal vezikül patolojilerinde görülür.

Ejekülattalikefaksiyon bozukluğu: Ejakülatınlikefiye olmaması durumudur. Prostat ve bulbo- üretral bezin patolojilerinde görülür.

Azospermi: Ejakulatta hiç sperm hücresinin olmamasıdır. Azospermiye genetik bozukluklar, hormonal değişiklikler, germinal aplazi, bilateral vasdeferens yokluğu ve ejakülatör kanallarda tıkanıklıklar neden olabilir.

Oligozoospermi: Sperm sayısının 15 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

Hafif oligozoospermi: Sperm sayısının 5- 15 milyon/ ml' nin arasında olmasıdır.

Şiddetli oligozoospermi: Sperm sayısının 5 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

Astenozoospermi: İleri hareketli spermatozoa' nın % 40 dan düşük olması ya da ileri hızlı hareketli olanların % 32 den düşük olması durumudur. Pek çok konjenital (Kartegener Sendromu) , enfeksiyon, ilaç, ısıdan dolayı oluşabilir.

Teratozoospermi: Normal sperm morfolojisinin %4 ün altında olması olması durumudur. Teratozoospermi yapan nedenler arasında kromozomal bozukluklar, toksik maddeler, seminal kanallarda deformasyon ve epididim enfeksiyonu bulunmaktadır.

Astenoteratozoospermi: Spermilerin motilite ve morfolojik incelemesinin her ikisinin de normal sınırların altında olmasıdır.

Oligoastenoteratozoospermi: Spermlerin sayı, motilite ve morfolojik incelemesinde üçünün birden normal sınırların altında olmasıdır.

Nekrozoospermi: Numunenin % 25' ten fazla ölü sperm hücresi içermesi anlamına gelir. İdiyopatik olabildiği gibi; toksik maddelerle temas, Kartagener Sendromu ve cinsel ilişki sıklığında azalma nedeniyle de oluşabilir.

Lökositospermi: Semende lökositlerin 1milyon/ml.'den fazla olmasıdır.

Hipospermi: Semen hacminin 1 ml. veya daha az olması durumudur.

Hiperspermi: Semen hacminin 6 ml.'den daha fazla olması durumudur.

Nükleer Anomali: Sperm hücresinin başının toplu iğne şeklinde olmasıdır (pinhead).

Globozoospermi: Sperm hücresinin baş kısmındaki akrozom yapısının bulunmamasıdır.

Kriptozoospermi:Yüksek hızda santrifüj sonrası ejakülatta sperm görülmesidir(WHO 5.Baskı,2010;Yaman ve ark.,1990; Satar ve Gençdal., 2013).

Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Erkek infertilitesinin teşhisinde semen parametrelerinin değerlendirilmesine dayanmaktadır. Ancak bu parametrelerin hiçbirinin bir çiftin tek başına doğurganlık potansiyelinin değerlendirmesinde güvenilir olmadığı bilinmektedir. Özellikle açıklanamayan infertilite hastalarında bu parametreler referans sınırları içerisinde. Kabul edilen standartlara göre; hasar gören spermin sayısının % 15'in altında olması beklenmektedir. %15-30 ara safha; %30'dan fazla anormal sperm içeren spermiyogram sonucuna sahip erkekler yüksek DNA fragmentasyonuna sahip olarak kabul edilir (Ashok et al., 2016).

4.5.Sperm DNA Yapısı

Sperm kromatini, DNA ve sperm nükleer proteinlerinin sıkı bir şekilde paketlenmesiyle oluşur. Bu nükleer proteinler çoğunlukla bazik özellik gösteren P1 ve P2 protaminlerdir. DNA iplikleri bu protaminlerin etrafında düzenli ve sıkı ilmekler oluşturacak biçimde sarmalanmıştır (Filatow et al., 1999). Spermatozoa kromatin yapısı bu şekilde protaminlerle sıkıca paketlenmişken, %15'lik bir kısmı histonlarla daha gevşek bir yapıda paketlenmiştir.

Spermiyogenez sırasında protaminler, histonlarla yer değiştirir. Bu geçişte TP1 ve TP2 proteinleri etkindir (Filatow et al., 1999).

4.5.1.Sperm DNA hasarları

Sperm DNA fragmentasyonu, spermatogenez esnasında kromatinin yanlış paketlenmesi, ejakülasyon öncesi meydana gelen apoptozis, ejakülatta yüksek miktarda reaktif oksijen türlerinin oluşması, endüstriyel ya da çevresel toksinlere maruz kalma, genetik, oksidatif stres veya sigara kullanımından kaynaklanabilir (Elder and Dale., 2014).

Sperm DNA'sı herhangi bir onarım mekanizmasına sahip değildir. Somatik hücrelerinin aksine spermde oluşabilecek DNA hasarı embriyonal açıdan daha kötü sonuçlara neden olabilmektedir. Kromozomal sapmalar sebebiyle, döllenmede ve embriyo gelişiminde sorunlar ortaya çıkabilir (Bordignon and Smith ., 1999).

Bu noktada onarım mekanizması olan oositin sperm DNA'sında tek zincir kırıklarını, çift zincir kırıklarına göre daha kolay onarabildiği bilinmektedir. Ancak onarım DNA hasarı çok genişse embriyo, paternal DNA'nın tamamını degregasyona uğratabilir (Yamauchi et al, 2007).

Tablo 3: Sperm DNA Hasarına Sebep Olan Faktörler (Durmaz ve Dikmen ., 2010).

ÇEVRESEL FAKTÖRLER	BİYOLOJİK FAKTÖRLER
Radyasyona maruz kalma	Anormal Kromatin Paketlenmesi
Sigara alışkanlığı	Apoptozis
Kimyasal maddeye maruz kalma	Reaktif Oksijen Türevleri
Kemoterapi	
Varikosel	
Genital Enfeksiyonlar	

4.5.2.Sperm DNA fragmantasyonu

Sperm DNA'sı ortalama 60 kb büyüklüğündedir. Sperm nükleoproteinleri %80 oranında sıkıştırılmış yapıda bulunur. P1 ve P2 protaminleri içeren sperm DNA'sı, P1 protamini P2'ye göre daha yoğundur.

P2 protaminin düşük yoğunluktaki bu yapı sperm DNA'sı herhangi bir onarım mekanizmasına sahip değildir. Somatik hücrelere göre spermde oluşabilecek DNA hasarı embriyonal açıdan daha kötü sonuçlara neden olmaktadır. Çünkü sperm DNA'sı herhangi bir onarım mekanizmasına sahip değildir. Paternal genomun ekspresyonu başladığı andan itibaren kromozomal sapmalar nedeniyle, döllenme ve embriyo gelişiminde sorunlar ortaya çıkabilir (Bordignon et al,1999).

Böyle durumlar da oositin sperm DNA'sında tek zincir kırıklarını, çift zincir kırıklarına göre daha kolay onarabildiği bilinmektedir. Ancak onarım DNA hasarı çok fazlaysa embriyo, paternal DNA'nın tamamını degregasyona uğratabilir (Yamauchi et al., 2007).

4.5.3.Spermatozoa kromatin paketlenmesi

Sperm hücresi kromatini, DNA ve sperm nükleer proteinlerinin sıkı bir şekilde paketlenmesiyle oluşur. Bu nükleer proteinler P1 ve P2 bazık özellik gösteren protaminlerdir. Sperm DNA iplikleri bu protaminlerin etrafında düzenli ve sıkı ilmekler oluşturacak biçimde sarmalanmıştır. Sperm kromatininin büyük bir kısmı protaminlerle sıkıca paketlenmişken, %15'likbir kısmı histonlarla daha gevşek bir yapıda paketlenmiştir. Fertil erkeklerde bu oran korunurken, infertil erkeklerde bu oranın artmış olduğu gözlemlenmiştir (Oğuz, 2013; Tesarik and Greco. ,2002; Ashoket al., 2017).

4.5.4. Apoptoz

Apoptozis programlı hücre ölümü olarak tanımlanabilir. Spermatogenez sırasında iki apoptotik görev vardır. Birincisi anormal spermatozoonları elemine etmek; ikincisi ise sertoli hücrelerinin desteklediği germ hücrelerinin sayısını sınırlandırmaktır. Apoptoz esnasında oluşabilecek herhangi bir hatada bu spermatozoonlar yok edilmeyebilir. Böylece DNA hasarlı sperm hücreleri ejakülate

dahil olur. Yapılan bir çalışmada apoptozun hatalı DNA materyalinin embriyoya geçmesini engelleyen son basamak olduğu düşünülmüştür (Singh and Muller., 2002).

4.5.5.Reaktif oksijen türevleri(ROS)

Serbest radikaller yüksek enerjili, kararlı olmayan bileşiklerdir. Semendeki ROS kaynağı lökositler ve anormal morfolojiye sahip spermatozodur. Semendeki lökositleri prostat ve epididim oluşturmaktadır. Lökositler mikroorganizmalara karşı koyarken ortama süper oksit (O_2^-) salarlar. Bu süper oksit anyonu diğer ROS ve oksidanlarla reaksiyona girerek hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil grubu (OH^-) veya hipoklorid (ClO^-) gibi toksik maddelerin oluşmasına neden olur (Lamirande and Gagnon,1993; Baker and Aitken., 2005). Bütün bu mekanizmalar reaktif oksijenlerin spermin genetik materyalinde, morfolojisinde zararlara yol açmaktadır.

4.6.Sperm DNA Fragmentasyon Analizi

Kabul edilen standartlara göre; hasar gören spermin sayısının % 15'in altında olması beklenmektedir. %15-30 ara safha; %30'dan fazla anormal sperm içeren spermiyogram sonucuna sahip erkekler yüksek DNA fragmentasyonuna sahip olarak kabul edilir. Böyle yüksek DNA parçalanması olan sperm örnekleri ICSI için kullanıldığında başarısız döllenme oranları, gebelik kayıpları yavaş embriyo gelişimleri görülmüştür (Ashok et al., 2016).

DFI <%15: İyi Fertil Potansiyel

%15- 30 DFI: Orta Fertil Potansiyel

>%30 DFI: Kötü fertil potansiyel

4.6.1.Sperm kromatin yapısı tayini (SCSA)

Fragmente olmuş DNA'lı spermleri ayırt etmek için akrinin oranj ışıması değişikliğine dayanır. Akrinin oranj ışıması çift DNA'ya (dsDNA) bağlandığında yeşil renkte floresanlanır ancak tek zincirli (ssDNA) DNA'ya bağlandığında kırmızıya dönüşür. Florasan ışık altında metakromatik boyanan hücreler kırmızı ve

yeşil renklere göre gruplandırılıp sayılır. SCSA'da saptanan DNA hasarı DFI (DNA fragmentasyon indeksi) oranlarına göre yorumlanır. DFI alt limiti infertillerde büyük oranda %30'dur. Flow sitometrik bir teknik olduğu için hem pahalı hem de gözlemcinin tecrübesi gerekli olduğundan pek tercih edilmeyen bir yöntemdir (Kazım et al, 2006; Fernandez et al., 2005; Gandini et al., 2004).

4.6.2.Toluidin mavisi ile DFI tespiti

Sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan bir boyadır. Toluidin mavisi sperm DNA'sında bulunan histon proteinlerinin fosfat gruplarına bağlanarak sperm kromatin yoğunlaşmasının ortaya çıkmasını sağlar (Nabi et al., 2013).

Sperm DNA'sının denatürasyonu ile sperm DNA'sına tutunan toluidin blue ışık mikroskopunda analizine dayanan bir yöntemdir. Koyu mavi ve pembe renkler düzgün paketlenmemiş sperm DNA'sının, sperm hücresinin baş kısmına aldığı yüksek düzeyde toluidin blue yüzünden kaynaklanır. Açık mavi, mavi ve mor menekşe renkleri normal DNA bütünlüğüne sahip spermlerin göstergesidir.

4.6.3.Akridin turuncu testi (AOT)

Akridin turuncu, nükleik asit'e özgü, katyonik floresan boyadır. Çift sarmal ya da tek sarmal DNA'ya bağlandığında floresan mikroskopta görünürlüğü farklıdır. Yeşil renkte görüntülenenler normal DNA'ya sahip spermatozoaları, sarı ve kırmızı renkte görüntülenenler DNA hasarı olan spermatozoaları gösterir (Cebesoy ve ark,2006; Khalili et al., 2006).

4.6.4.Asidik anilin mavisi testi

Lizinden zengin histonlarla, arjinin/sistein zengini protaminlerin ayırt edilebilmesi için kullanılan bir boyadır. Olgun olmayan spermatozoonun bol miktarda lizin içeren histon barındıran nükleusu işlem bitiminde mavi renge dönecektir. Matür spermatozoonun arjinin-sistein zengini protaminli nükleusu az miktarda lizin ihtiva ettiği için anilin mavisiyle renk almayacaktır (Agarwal et al., 2017).

4.6.5. COMET (Cluster Of Motifs E-valueTool) Testi

Tek hücre jel elektroforezi kullanımı gerektirir. Agaroz içerisine sabitlenen sperm lizizde elektroforeze bırakılır. Negatif yüklü DNA, pozitif yüklü uca doğru çekilir. DNA kırıkları COMET'in baş kısmında yoğun halde bulunurken, çift ve tek DNA zincirindeki kırıklar COMET'in kuyruğuna doğru yönelir. Spermatozoon hem tek hem de çift zincir kırıklarını gösterebildiği için kullanımı daha avantajlı bir metottur. Sonuçların iyi ve düzgün bir şekilde verilebilmesi için yetişmiş insanlara ihtiyaç duyulmaktadır (Morris et al., 2002).

4.6.6. Terminal transferaz(TUNEL) testi

Apoptoz sonucu meydana gelen DNA parçalanmasını ölçmek için kullanılır. TUNEL tekniği apoptoz sonucu meydana geldiğine inanılan semendeki sperm popülasyonunun tanımlanması için ilk defa Gorczya ve arkadaşları tarafından uygulanmıştır (Shamsi et al., 2011).TdT (Terminal Deoksi nukleotidil Transferaz) enziminin katalizlediği bir tepkimedir. Tek ve çift zincirli DNA'da dUTP'nin (deoksi uridin trifosfatın) katılımı prensibi ile çalışır. DNA kırıklarının 3'OH ucuna, terminal deoksi nukleotidil transferaz (TdT) enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, biyotinlenmiş uridin trifosfat (dUTP) bağlanır. Normal DNA'lı spermatozoon da yalnızca arkadaki bölüm floresan ışıktaki görülür, fragmente DNA (çoklu kromatin 3'-OH uçları) açık floresan ışıktaki görülür. Fakat uygulaması zor ve pahalı bir yöntemdir (Kazım et al., 2006).

4.6.7. In situ-nick translasyon (NT)Testi

Yalnızca tek zincir kırıklarını tespit etmektedir. Biyotinlenen deoksi uridin trifosfatın (dUTP), tek dal DNA kırıklarında yoğunlaşması ile ssDNA kırıklarının tespiti yöntemidir. Özel olarak endojen DNA hasarını belirler ve değişken seviyelerini barındıran spermatozoonu boyar. NT yöntemi spermatozoon da, nükleer DNA'nın yeniden şekillenmesi aşamasında meydana gelen anomalileri saptar (Esteve et al., 2015).

4.6.8.DBD-FISH (DNA break age detection-FISH) testi

FISH yöntemi mikro delesyon gibi kromozom anomalilerini saptamak için kullanılan bir metottur. Hücreler agaroz matriksle bir slayta gömüldüğünde denatüre edici bir alkali çözücü solusyonla parçalanır, tek zincirli DNA motifleri DNA zincir kırıklarına dönüşür. Nötralize edilir ve protein uzaklaştırılır, tek zincirli DNA, bütün genom ya da spesifik DNA problemleriyle hibridlenerek floresan ortam da incelenir (Fernandez et al., 1993).

4.7.Sperm Kriyoprezervasyonu

Sperm dondurma ilk kez 1949'da Polge ve arkadaşları tarafından gliserol kullanılarak yapılmıştır (Mazur P., 1984).

Amaç düşük sıcaklıkta canlı bir hücre veya dokunun, fonksiyon kaybı olmadan minimum hasar ile uzun süreli saklanmasıdır (Wetzels A.M.M., 1996).

Sperm kriyoprezervasyonunun genel prensibi; materyalin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içinde, -196°C'da depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak spermilerin canlılıklarını koruyabildikleri ve ileri fizyolojik ortamlara geçirilmesidir (Gardner D.K., 2007). Kriyoprezervasyon işlemi sırasında kullanılan kimyasallar, dondurma-çözme yöntemi canlılığı etkileyebilecek yöntemlerdir. Materyalin düşük ısılarda soğutulup çözme sırasında fizyolojik ısı ve ortama döndürülmesi dikkatle yapılması gereken işlemlerdir (Schroeder A.C. et al.,1990). Günümüzde geçerli olan sperm kriyoprezervasyonunun gerekli olduğu endikasyonlar aşağıda olduğu gibi özetlenebilir (Davis N.S., 1997).

Cerrahi yöntemlerle sperm elde edilmesi halinde,

Kemoterapi ve radyoterapi gibi gonad hücrelerine zarar verebilecek sitotoksik tedaviler öncesinde özellikle genç bireylerde,

Üreme fonksiyonlarının kaybedilmesine yol açacak olan ameliyatlarda (testislerin alınması vb.) öncesinde,

YÜT planlanan hastasından psikolojik nedenlerle işlem günü örnek alınma problemi olabileceği düşünülüyorsa önceden sperm örneği alınıp saklanması,

Azoospermik hastalarda başarılı cerrahi işlem sonrasında işlemleri tekrarlamamak için alınan örneğin saklanması,

Yine aynı yönetmeliğe göre 'üreme hücreleri ve gonad dokuları, bu materyallerin güvenliği açısından verici adaya ait DNA analizi ile birlikte saklanır (Sanger et al., 1992).

Maturasyon evreleri farklı olan spermelerin dondurma ve çözme yöntemleri de birbirinden farklıdır. Ejekülat sperm testiküler ve epididimal sperme göre kriyoprezervasyon da daha hassastır. Kriyoprezervasyon sonrası motilite, canlılık ve fertilizasyon kapasitesi serbest oksijen radikallerinin (hidrojen peroksit vs) üretimini arttığı için düşebilir (De Lamirande et al., 1997).

4.7.1.Kriyobiolojinin Temelleri

4.7.2. Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar gamet hücrelerinin dondurulmasında kullanılan koruyucu maddelerdir. Koruyucu özellikleri yüksek oranda H₂ (Hidrojen) bağları oluşturup buz kristallerinin boyutlarını küçültürler (Sanger et al.,1992).

Kriyoprotektanlar: permeabl ve permeabl olmayan kriyoprotektanlar olarak ikiye ayrılır.

Permeabl kriyoprotektanlar hücre içersine geçebilirken, permeabl olmayan kriyoprotektanlar hücre içersine geçememektedir (Delilbaşı, 1997)

4.7.2.1.Permeabl(İnternal) kriyoprotektanlar

En yaygın kullanılanları DMSO, gliserol, etilen glikol ve propilen glikoldür (PROH).

Bu kriyoprotektanlar hücre zarından içeriye girerek etkilerini gösterirler. Koruyucu etkileri donma sırasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklığın yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır (Leeuw et al,1993).

4.7.2.2.Nonpermeabl (Eksternal) kriyoprotektanlar

Monosakkaritler (glukoz, heksoz), disakkaritler (sükroz) ve trisakkaritler (raffinöz) hücre dışında kalan koruyucu maddelerdir. Bu koruyucu maddeler hücre zarını osmotik basınca karşı esnek hale getirir ve hücrenin aşırı şişmesini önlerler (Aray et al,1993).

4.8.Kriyoprezervasyon Hasarları

Dondurulma esnasında hücrelerin temel ve fiziksel strese maruz kalırlar.

Dondurma hasarının sebepleri:

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

Sıcaklıkta ani düşüşten kaynaklanan hücre yapısı ve fonksiyon hasarı, membran geçirgenliği ve hücre iskeleti yapısındaki değişimlerle ilgilidir (Elder and Dale .,2013).

Dondurma işlemi sırasında karşımıza çıkabilecek en temel hücre hasarı dondurma ve özellikle çözme aşamasında olur. Hücreler aniden dondurulursa, hücre dışına su aktarımı ani ve fazla olacağından zarda ozmotik hasar olur. Hızlı değil de yavaş çözülürse bu defa intrasellüler buz kristalleri birbirleriyle birleşip büyüyebilir ve yine hücre zarında hasar meydana gelir. Yavaş dondurma ve hızlı çözme bu nedenle önemlidir (Albert et al., 2008). Kriyoprezervasyon da hücre hasarının nedenleri, buz kristalleri kaynaklı yapısal hasarlar ve oksidatif stres ile ilişkili reaktif oksijen radikallerinden kaynaklanan hasarlar şeklinde özetlenebilir. Bununla birlikte, spermelerde en sık karşılaşılan kriyo-hasarlar membran hasarı, organel hasarı ve DNA bütünlüğünün bozulması (DNA fragmentasyonu) şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

En uygun dondurma-çözme protokollerinin uygulanması sonrasında bile %30-50 oranında motilite kaybı gözlenmektedir (Paoli et al.,2014).

Dondurma hasarı sebebi ile de çözme sonrası spermin motilitesi, sperm oosit füzyon kapasitesi azalabilir veya fertilizasyon olumsuz etkilenebilir. Serbest oksijen radikallerinin (hidrojen peroksit gibi) üretim artabilir.

Kriyoprezervasyon ve DNA fragmantasyonu arasında kesin bir ilişki gösterilmiş olmasa da, genel olarak normal örnekler ile karşılaştırıldığında sperm kalitesi düşük olan örneklerin kriyoprezervasyon kaynaklı DNA hasarı ve hücre ölümüne yatkınlığının arttığı gözlenmiştir (Paoli et al.,2014; Said et al.,2010).

4.9.Kriyoprezervasyon Teknikleri

Dondurma işlemi sırasındaki dondurma hızı hücre özelliğine uygun olmalıdır. Yavaş soğutmada fazla miktarda buz kristalleri oluşur ve büyüklükleri farklıdır. Fakat ani soğutmada buz kristalleri daha küçüktür ve çok hızlı oluştukları için küçük hücreler bunların arasına sıkışıp daha fazla sayıda hayatta kalma oranı gösterirler. Hızlı dondurma işlemlerinin yavaş dondurma protokollerinden en önemli farkı kullanılan kriyoprotektan maddelerin yüksek konsantrasyon da olmasıdır. Kriyoprezervasyonun genel prensibi; materyalin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içinde -196 °C’da depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak spermilerin canlılıklarını koruyabildikleri ve ileri gelişimlerini sürdürebilecekleri fizyolojik ortamlara geçirilmesidir (Gardner, 2007).

5.GEREÇ VE YÖNTEM

5.1.Çalışmaya Dahil Edilen Hasta Grupları Ve Özellikleri

Bu çalışma Fertijin Kadın Sağlığı ve Tüp Bebek Merkezine Eylül 2017-Nisan 2018 tarihleri arasında başvuran %50'si (n:20) normozoospermi, %50'si (n:20) oligoastenoteratozoospermi olan toplam 40 olguyla yapılmıştır. Çalışmaya katılan olguların yaşları 21 ile 52 arasında değişmekte olup, ortalama $33,45 \pm 7,52$ yaş olarak saptanmıştır. Çalışma retrospektif bir çalışmadır, uygulanacak protokollerin bütün hastalar için belirli bir standartizasyonda olmasına dikkat edilmiştir. Çalışmamızın Biruni Üniversitesi Girişimsel olmayan araştırmalar etik kurulu tarafından 13/06/2017 tarihli 2017/6-3sayılı toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

5.2.Çalışmanın Tasarımı

Bu çalışma da Normozoospermi ve Oligoastenoteratozoospermi çalışma grupları kriterlerine uyan 40 hastanın sperm örnekleri sperm yıkama yöntemi olarak “gradient” (farklı yoğunluk ayırma) tekniği kullanılarak yıkandı. Yıkama sonrasında kriyoprotektan olarak origio sperm freeze, irvinefreezing medium - TEST yolku buffer (TYB) ve vitrolife sperm freeze markalı üç farklı solüsyon kullanılarak dondurup çözdükten 24 saat sonra spermler sayı, motilitesi, DNA fragmentasyonu ve sperm maturasyonu yönünden dondurma öncesi ve dondurma sonrası şeklinde değerlendirildi.

Çalışmaya dahil olma kriterleri:

Normospermi Grup için;

Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre yıkama işlemi öncesi sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml fazla olması, normal morfolojinin %4 den fazla olması ve ileri hareketli sperm yüzdesinin %35 den fazla olması.

Oligoastenoteratozoospermi Grup için;

Erkeğin semen analizinin Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kriterlerine göre yıkama işlemi öncesi sperm yoğunluğunun 15 milyon/ml az olması, normal morfolojinin %4 den az olması ve ileri hareketli sperm yüzdesinin %35 den az olması.

Her iki grup için;

- Erkeğin yaşının en az 20 en fazla 55 olması
- Endokrinolojik ve/veya metabolik bozukluklar göstermemesi
- Varikosel ve/veya prostat tanısı konulmamış olması
- En az 3 en fazla 7 gün cinsel perhiz süresi uygulanması

5.3.Çalışmada Kullanılan Yöntemler

5.3.1.Örnek alımı ve spermiyogram testi

Semen örnekleri 3-7 günlük ideal cinsel perhiz süresi sonrası semenin ortam sıcaklığındaki değişikliklere maruziyetini engellemek, analizi arasındaki zamanı kontrol etmek amacıyla laboratuvarın yakınındaki özel bir odada mastürbasyon yöntemiyle elde edildi. Mastürbasyon sırasında herhangi bir kayganlaştırıcı kullanılmamıştır. Alınan örneğin üzerine hastanın bilgileri okunabilir şekilde not edildi ve hastaya gerekli bilgiler doğru bir şekilde anlatıldı. Hastaya örneği dışarıya kaçırmaması gerektiğini belirtmek önemlidir.

Semen Analizi: Elde edilen semen örneğilikefaksiyon için laboratuvar sehpaı üzerinde bekletildi. Likefiye olduktan sonra ilk olarak makroskopik ardından mikroskopik olarak değerlendirildi.

Makroskopik olarak hacmi ölçüldü, rengi, kokusu, viskozite, likefaksiyon süresi ve koagülasyonu değerlendirildi. Mikroskopik olarak değerlendirmek için makler sayım kamerasına 1 damla(10µl) örnekten damlatılarak 200x büyütme altında yan yana 10 kare sayılarak mililitre başına düşen sperm sayısı tespit edildi. Ardından motiliteve progresyon oranı belirlendi.

Her bir spermin motilitesi 4 kategoride skorlandı:

- a)İlerleyici (progresif) hareket
- b) İlerleyici (progresif) olmayan hareket
- c) Hareketsiz

Temel sperm parametreleri (konsantrasyon, hareketlilik, morfoloji) WHO 2010 kriterlerine göre kaydedildi.

Ardından hematoksilin boyama yapılarak morfoloji değerlendirilmesi yapıldı.

Sperm morfolojisinin kesin kriterleri: Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde, Krüger kriterleri ve diğer parametreler için WHO kriterleri kullanıldı.

Sperm başı ovoid ve düzgün konturlu olmalı, iyi sınırlanmış bir akrozomal kılıf içermelidir.

Baş boyutları, uzunluk 5-6 Mikron / Genişlik 2,5-3,5 mikron olmalıdır.

Akrozom, baş alanının %40–70' ini kaplamalıdır.

Boyun, orta parça ve kuyruk anomalisi olmamalıdır.

Orta parça sitoplazmik artık içermemelidir.

Kuyruk uniform, orta parçadan daha ince ve 45–55 mikron uzunluğunda olmalıdır.

Ayrıca sperm maturasyon testi ve DNA fragmentasyon testi için asidik anilin mavisi ve akridin oranj boyaması yapılarak değerlendirildi.

5.3.2.Uygulanan Sperm Hazırlama Tekniği

5.3.2.1.Dansite Gradient Yöntemi (yoğunluk farkıyla ayırma)

37°C'de 15-30 dklikefiye olmuş semen örneği, pasteur pipetiyle (Falcon® Disposable TransferPipets 3ml) homojenize edildi.

Konik bir tüpe (Falcon 15ml Conical Centrifuge Tubes) 0,5 ml %80'lik (Fertipro PureWash Gradient)gradient medyumuna üzerine 0,5 ml %40'lık(Fertipro Pure Wash Gradient) gradient medyumuna birbirine karışmayacak şekilde eklendi.

Semen örneğinden 1 ml medyumların üzerine birbirlerine karışmayacak şekilde eklendi. Semen, %40 ve %80'lik medyum içeren 3 katmanlı tabaka oluşturdu.

Konik tüp, 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası (pellet+ süpernatant) üst kısımda ki süpernatant çekilip atıldı.

Geriye kalan pelletin üzerine 1 ml sperm yıkama medyumuna (Irvine Scientific Sperm WashingMedium) eklendi ve homojenize edildi. Tekrar santrifüje 5 dk kondu ve pellet dipte kalacak şekilde üst kısım çekildi.

Yıkanmış sperm örneğinden 10 µl alınarak, sperm sayı ve motilitesi tekrar incelendi ve kaydedildi.

Ardından 20 µl semen örneği temizlenmiş lam üzerine yayılıp kurutuldu. Sonrasında geriye kalan sperm örneği üçe bölünerek dondurma işlemi için viallere konuldu.

5.3.3.Sperm maturasyon değerlendirmesinde asidik anilin mavisi boyama

Her hastanın preparatı uygulanan (oda sıcaklığında 30 dk) %3'lük glutaraldehit fiksatifinde 30 dk süreyle tutulup fikse edildi ve hava ile kurutuldu. Daha sonra kuruyan preparatlar %5 lik anilin mavisi solüsyonu (pH=3.5) ile 5 dakika boyandı. Preparatlar havada kurutulduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak ışık mikroskopunda x100 büyütmede değerlendirildi. Koyu mavi boyanmış sperm nükleusları anilin mavisi (+), boya almamış spermler anilin mavisi (-) olarak değerlendirildi.

5.3.4.Sperm DNA fragmentasyonu değerlendirilmesinde akridin oranj boyama

Her hastanın örneği uygulanan (solüsyonu oda sıcaklığında 2 saat) preparat taze Carnoyfiksatifinde (3: 1 oranında, metanol: glasiyal asetik asit en az 3 saat süreyle) tutuldu ve hava ile kurutuldu. Preparatlar daha sonra AO boyasına alındı ve karanlıkta 5 dk süreyle boyandı. Distile suyla yıkanan preparatlar kurumadan lamelle kapatılarak mikroskop ve 100'lük immersiyon objektifinde floresan mikroskopta 450-490 nm dalga boyunda incelenir. Yeşil floresan veren spermler normal DNA'lı sperm, sarı-oranj-kırmızı floresan verenler hasarlı DNA'ya sahip spermler olarak değerlendirildi. Ortalama 100 hücre sayılarak yüzde fragmentasyon çıkarıldı.

STOK AO çözeltisi ve diğer solüsyonlar

%1 AO distile suda hazırlanır (1gr AO/100 ml distile suda çözülür)

0,1 Molar sitrik asit (19,212gr/ 1 litre distile suda)

0,3 molarNa₂HPO₄.H₂O (47,991gr/ litre distile suda)

Carnoyfiksatifi (metanol 75 ml, asetik asit 25 ml)

BOYA Çözeltisi

%1 AkridinOranj..... 2,5 ml

0,1 Mol/L sitrik asit..... 10 ml

0,3 M Na₂HPO₄.....400 µl

Sperm örneklerinin dondurulması

Örnekler semen parametreleri incelendikten sonra üçe bölündü. Üç farklı sperm dondurma solüsyonu ile ayrı ayrı donduruldu.

A sperm dondurma solüsyonu

SpermFreezeMediumforfreezinghuman sperm

Bileşimi:

HEPES

fizyolojik tuzlar

glisin,

dekstrozmonohidrat

laktat

gliserol

sukroz

serum albümin

Solüsyon 30 dakika boyunca 37°C'da ısınmaya bırakıldı.

Gradient yöntemiyle yıkanan sperm örneği vialer aktarıldı.

1ml sperme 0.7ml Sperm Freeze oranı olacak şekilde damla damla medyum eklendi.

Karışımı dengeye getirmek için oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

Sıvı azot seviyesinin hemen üstünde, 15 dakika boyunca dikey olarak donduruldu.

Sıvı azot içinde saklandı.

B sperm dondurma solüsyonu

Freezing Medium - TEST Yolk Buffer (TYB)

with Glycerol and Gentamicin

Bileşim

Antioksidan..... sodyum sitrat

Protein Tavuk yumurta sarısı(EggYolk)

TamponTES Tampon, Trizma tabanı

Enerji substratları.....Fruktoz

Kriyokoruyucu.....Gliserol

Antibiyotik Gentamisin

Solüsyon 30 dakika boyunca 37°C'da sıvılaşmaya bırakıldı.

Bir viyal medyum çözündürüldü ve 37°C'ye getirildi.

Gradient yöntemi ile yıkanan sperm örneği steril, 15 ml viale aktarıldı, hacim belirlendi ve 1:1'lik bir örnek: medyum oranına ulaşılan kadar medyum damla damla eklendi. Örnek-medyum karışımı yavaşça soğumasını sağlamak için kap 2°C - 5°C sıcaklıkta soğutuldu (dakikada 0.5°C/dakika).

90 dakika sonra örnek geleneksel yöntemler kullanılarak vial içinde dondurulmaya hazır hale geldi. Sıvı azot tankına aktarıldı.

C sperm dondurma solüsyonu

Vitrolife sperm Freeze Solution

Bileşimi

Kalsiyum klorür

Gliserin

MOPS

Kimyasal olarak tanımlanmış lipid konsantresi

Glisin

Sodyum dihidrojen fosfat

Glikoz

Magnezyum klorür

Sodyum klorit

Sakkaroz

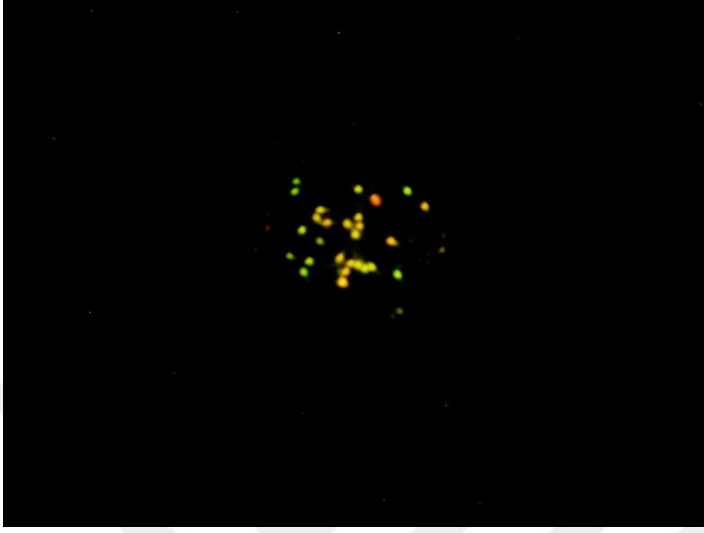
Potasyum klorür

Sodyum hidroksi

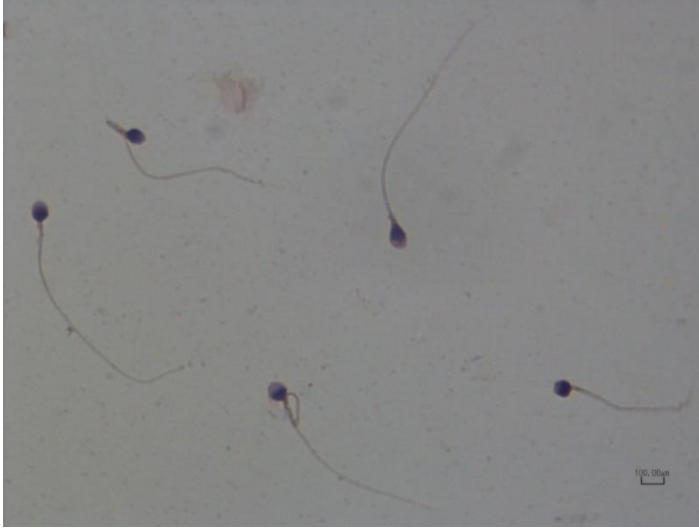
Donmuş sperm örneklerinin çözülmesi

Vialler sıvı azot tankından çıkarıldı. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra eriyinceye kadar 37°C 'de bekletildi. Viallerin kapakları açılarak içerikleri yıkama için santrifuj tüplerine aktarıldı. Kriyopektan maddelerin uzaklaştırılmak, motiliteleri yeniden kazandırmak amacıyla sperm yıkama medyumunu eklenip 1200 rpm' de 10 dakika santrifuj edildi ve üstte kalan kısım atıldı. 0,5 ml sperm yıkama medyumunu ilave edilerek 30 dkbeklendi. Çözünen spermatozoa lamlara yayılıp her solüsyon için

ayrı ayrı fıkse edilip akridinoranj ve anilin mavisi boyası ile boyanıp florasana ve ışık mikroskobunda tek tek değerdendirildi.



Şekil 9: Akridin oranj boyama yeşil (normal), kavuniçi ve turuncu (defektli) DNA fragmantasyonunu göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskobi görüntüsü).



Şekil 10: Sperm morfoloji değerdendirmesi, anormal morfolojik yapıdaki spermilerin gösterimi (100x immersiyonobjeksifi ışık mikroskobu görüntüsü)

5.3.5.İstatistiksel İncelemeler

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar(ortalama, standart sapma, medyan, frekans, minimum, maksimum) kullanıldı. Nicel verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ve grafiksel incelemeler ile sınanmıştır. Normal dağılım gösteren nicel değişkenlerin iki grup arası karşılaştırmalarında Student-t testi, normal dağılım göstermeyen nicel değişkenlerin iki grup arası karşılaştırmalarında Mann-Whitney U test kullanıldı. Normal dağılım gösteren nicel değişkenlerin grup içi karşılaştırmalarında Paired Samples Test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edildi.

6.BULGULAR

$0.01 \leq p < 0.05$ İstatistiksel anlamlılık *

$0.001 \leq p < 0.01$ Yüksek düzeyde istatistiksel anlamlılık **

$p < 0.001$ Çok yüksek istatistiksel anlamlılık ***

$0.05 \leq p < 0.10$ Anlamlılık eğilimi(sınırdan anlamlılık)

$p > 0.10$ Fark tesadüften ileri gelmiştir(istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır).

Çalışma Eylül 2017-Nisan 2018 tarihleri arasında %50'si (n=20) normozoospermi, %50'si (n=20) oligoastenoteratozoospermi olan toplam 40 olguyla yapılmıştır. Çalışmaya katılan olguların yaşları 21 ile 52 arasında değişmekte olup, ortalama $33,45 \pm 7,52$ yaş olarak saptanmıştır.

Tablo 4: Normozoospermi ve oligoastenatozoospermi hastaların sperm parametrelerinin karşılaştırılması

		Gruplar			Test Değeri
		Toplam	Normal (n=20)	OAT (n=20)	p
Yaş (yıl)	<i>Min-Maks</i>				t:-1,053
	<i>(Medyan)</i>	21-52 (32,5)	21-45 (30)	23-52 (34)	
	<i>Ort±Ss</i>	33,45±7,52	32,20±7,48	34,70±7,53	^a 0,299
Volüm (ml)	<i>Min-Maks</i>				Z:-1,334
	<i>(Medyan)</i>	1-4 (2)	1,5-4 (2)	1-4 (2)	
	<i>Ort±Ss</i>	2,22±0,7	2,30±0,57	2,13±0,82	^b 0,182
Konsantrasyon (milyon/ml) Sayı	<i>Min-Maks</i>				Z:-5,391
	<i>(Medyan)</i>	5-240 (28,5)	25-240 (103)	5-32 (12)	
	<i>Ort±Ss</i>	62,08±69,24	111,70±67,95	12,45±6,13	^b 0,001**
Total Konsantrasyon (milyon/ml)	<i>Min-Maks</i>				Z:-5,413
	<i>(Medyan)</i>	6-480 (74,5)	86-480 (249)	6-63 (23)	
	<i>Ort±Ss</i>	131,6±142,4	237,25±133,96	25,95±13,28	^b 0,001**
Motilite %	<i>Min-Maks</i>				t:5,135
	<i>(Medyan)</i>	5-75 (42)	5-75 (53,5)	21-46 (34,5)	
	<i>Ort±Ss</i>	43,08±14,68	52,35±14,72	33,8±6,65	^a 0,001**
Motilite İleri Hızlı %	<i>Min-Maks</i>				Z:-5,076
	<i>(Medyan)</i>	2-30 (7,5)	5-30 (15)	2-10 (5)	
	<i>Ort±Ss</i>	10,38±7,8	15,95±7,45	4,80±2,02	^b 0,001**
Motilite İleri Yavaş %	<i>Min-Maks</i>				t:6,118
	<i>(Medyan)</i>	5-40 (18)	5-40 (25)	8-26 (14)	
	<i>Ort±Ss</i>	19,83±8,52	25,75±7,66	13,9±4,05	^a 0,001**
Motilite Yerinde Titrek %	<i>Min-Maks</i>				Z:-0,725
	<i>(Medyan)</i>	4-35 (13)	5-35 (10)	4-27 (13)	
	<i>Ort±Ss</i>	13,65±6,57	12,95±6,20	14,35±7,01	^b 0,468
Morfoloji %	<i>Min-Maks</i>				Z:-5,419
	<i>(Medyan)</i>	1-10 (4)	4-10 (7,5)	1-4 (2)	
	<i>Ort±Ss</i>	4,7±2,89	7,20±1,70	2,20±1,06	^b 0,001**
^a Student-t Test		^b MannWhitney U Test		**p<0,01	

Gruplara göre olguların yaşları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Gruplara göre olguların volüm ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Oligoastenoteratozoospermi grubu olguların yıkama öncesi mililitredeki sperm sayısı (Konsantrasyon), normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır (** $p=0,001$; $p<0,01$).

Oligoastenoteratozoospermi grubu olguların yıkama öncesi mililitredeki spermin hareketlilik yüzdesi (Motilite İleri Yavaş), normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır (** $p=0,001$; $p<0,01$).



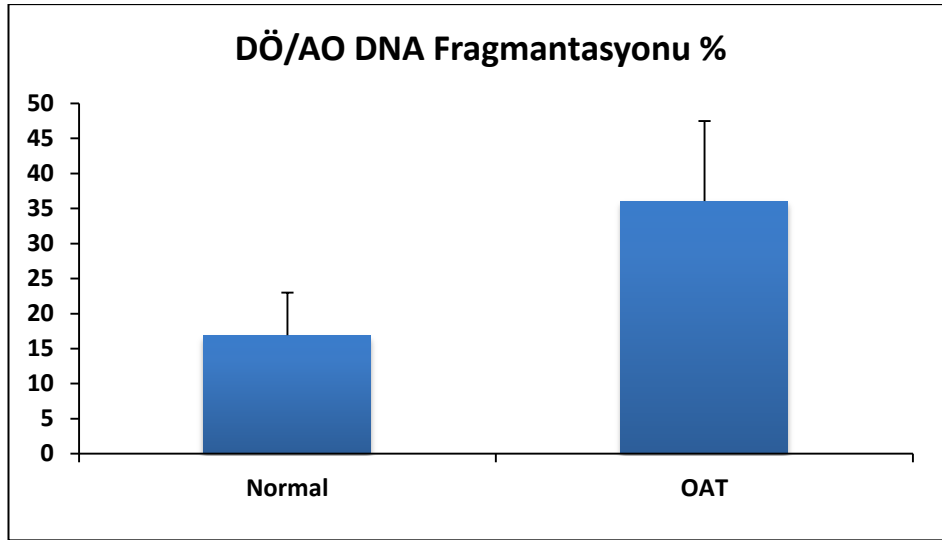
Tablo 5: Normozoospermi ve Oligoastenoteratozoospermi hastalarının dondurma sonrası motilitelerinin karşılaştırılması

		Gruplar			Test Değeri
		Toplam	Normal (n=20)	OAT (n=20)	<i>p</i>
GRAD Yöntem	<i>Min-Maks</i>				Z:-5,412
(Milyon) Sayı	<i>(Medyan)</i>	2-263 (27,5)	34-263 (123,5)	2-21 (6,5)	
	<i>Ort±Ss</i>	66,30±80,60	125,20±77,51	7,40±4,65	^b 0,001***
GRAD Motil	<i>Min-Maks</i>				t:5,104
Sayı %	<i>(Medyan)</i>	42-95 (68)	62-95 (73,5)	42-77 (62)	
	<i>Ort±Ss</i>	68,05±11,35	75,20±8,91	60,90±8,81	^a 0,001***
A/DS Sayı	<i>Min-Maks</i>				Z:-5,423
(milyon)	<i>(Medyan)</i>	0,2-83 (6)	7-83 (35,5)	0,2-5 (2)	
	<i>Ort±Ss</i>	20,45±25,24	38,75±24,52	2,15±1,3	^b 0,001***
A/DS Motil %	<i>Min-Maks</i>				t:1,520
	<i>(Medyan)</i>	10-70 (41,5)	10-70 (46,5)	19-53 (36)	
	<i>Ort±Ss</i>	40,35±15,23	43,95±18,44	36,75±10,42	^a 0,139
B/DS Sayı	<i>Min-Maks</i>				Z:-5,436
(milyon)	<i>(Medyan)</i>	0,3-78 (8)	10-78 (38,5)	0,3-6 (2)	
	<i>Ort±Ss</i>	19,63±23,53	37,15±22,1	2,12±1,34	^b 0,001***
B/DS Motil %	<i>Min-Maks</i>				t:1,618
	<i>(Medyan)</i>	4-65 (40)	15-65 (44)	4-60 (37,5)	
	<i>Ort±Ss</i>	38,41±16,4	42,53±17,42	34,3±14,6	^a 0,114
C/DS Sayı	<i>Min-Maks</i>				Z:-5,430
(milyon)	<i>(Medyan)</i>	0,5-82 (7)	8-82 (37)	0,5-6 (3)	
	<i>Ort±Ss</i>	19,88±23,55	37,25±22,37	2,5±1,67	^b 0,001***
C/DS Motil %	<i>Min-Maks</i>				t:1,958
	<i>(Medyan)</i>	15-67 (43,5)	15-67 (46)	15-56 (35)	
	<i>Ort±Ss</i>	40,38±14,3	44,65±15,22	36,1±12,24	^a 0,058
^a Student-t Test		^b MannWhitney U Test		^{**} <i>p</i> <0,01	

Oligoastenoteratozoospermi grubu olguların Gradient yöntemi ile yıkanan sperm örneği sayısı, normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır (**p=0,001; p<0,01).

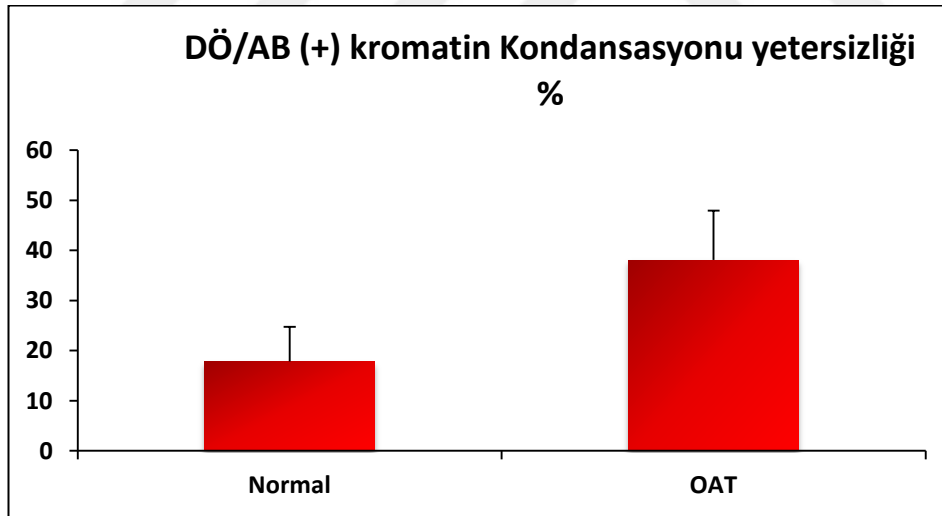
Tablo 6: Dondurma öncesi ve dondurma sonrası DNA fragmentasyonu ve kromatin kondansasyonu yetersizliğinin karşılaştırılması

				Gruplar			Test Değeri
				Toplam	Normal (n=20)	OAT (n=20)	p
DÖ/AO	DNA	<i>Min-Maks</i>					t:-6,602
Fragmentasyonu %		(<i>Medyan</i>)		9-68 (25)	9-27 (15)	18-68 (32,5)	
		<i>Ort±Ss</i>		26,48±13,27	16,9±6,09	36,05±11,45	^a 0,001***
DÖ/AB (+) kromatin		<i>Min-Maks</i>					t:-7,522
kondansasyonu		(<i>Medyan</i>)		7-57 (25)	7-35 (16,5)	24-57 (35)	
yetersizliği%		<i>Ort±Ss</i>		27,98±13,26	17,85±6,92	38,1±9,86	^a 0,001***
B/DS	AO	DNA	<i>Min-Maks</i>				t:-7,996
Fragmentasyonu %		(<i>Medyan</i>)		9-72 (35)	9-35 (20,5)	33-72 (42,5)	
		<i>Ort±Ss</i>		33,6±14,19	22,5±8,04	44,7±9,47	^a 0,001***
B/DS	AB(+)	<i>Min-Maks</i>					t:-8,437
kromatin		(<i>Medyan</i>)		9-65 (32,5)	9-36 (23)	30-65 (45)	
kondansasyonu		<i>Ort±Ss</i>		34,18±14,89	22,3±7,23	46,05±10,31	^a 0,001***
yetersizliği%							
A/DS	AO	DNA	<i>Min-Maks</i>				t:-7,330
Fragmentasyonu %		(<i>Medyan</i>)		11-69 (32)	11-38 (20)	30-69 (43,5)	
		<i>Ort±Ss</i>		33,2±14,69	22,1±8,62	44,3±10,45	^a 0,001***
A/DS	AB	<i>Min-Maks</i>					t:-7,855
(+)kromatin		(<i>Medyan</i>)		8-62 (33)	8-42 (23)	29-62 (45,5)	
kondansasyonu		<i>Ort±Ss</i>		34,1±14,29	23,00±7,95	45,20±9,82	^a 0,001***
yetersizliği %							
C/DS	AO	DNA	<i>Min-Maks</i>				t:-7,312
Fragmentasyonu %		(<i>Medyan</i>)		8-70 (31)	8-35 (21,5)	26-70 (45)	
		<i>Ort±Ss</i>		33,43±14,77	22,05±7,62	44,80±10,84	^a 0,001***
C/DS	AB(+)	<i>Min-Maks</i>					t:-7,680
kromatin		(<i>Medyan</i>)		10-62 (33,5)	10-42 (24,5)	30-62 (44)	
kondansasyonu		<i>Ort±Ss</i>		34,33±14,21	23,60±7,70	45,05±10,62	^a 0,001***
yetersizliği%							
^a Student-t Test				**p<0,01			



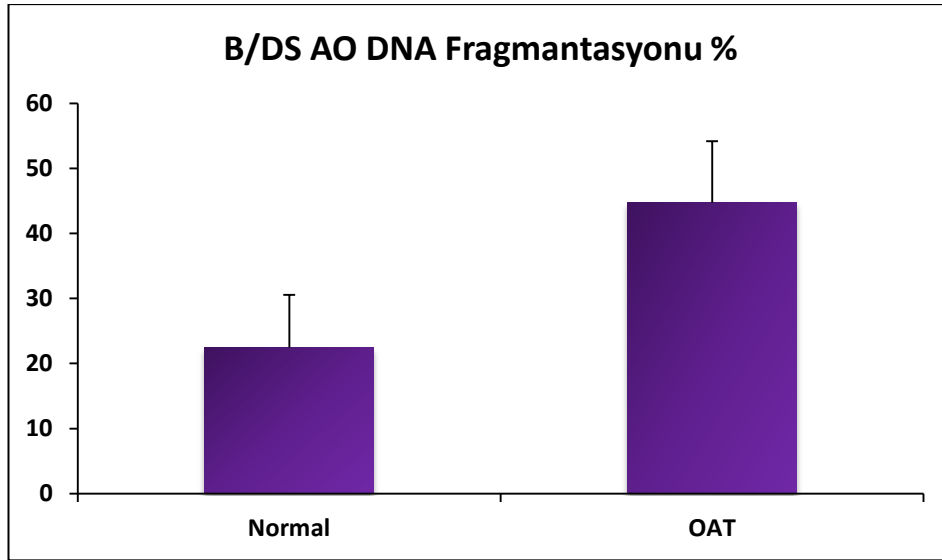
Grafik1: Gruplara göre dondurma öncesi Akridin oranj (AO) ile boyanan spermin DNA fragmentasyon oranı

OAT grubu olguların dondurma öncesi Akridinoranj (AO) ile boyanan spermin DNA fragmentasyon oranı, normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (**p=0,001; p<0,01).



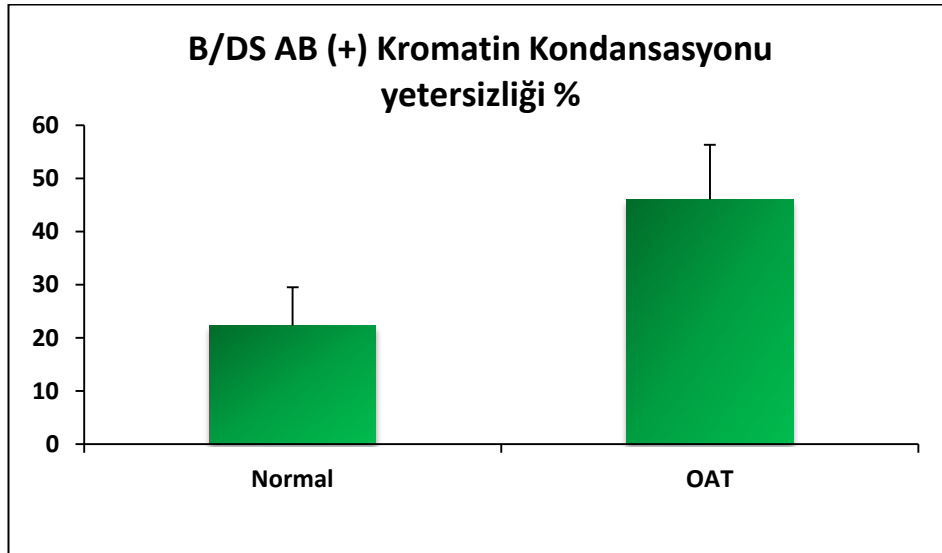
Grafik 2: Gruplara göre dondurma öncesi Anilin mavisi (AB) boyası ile (+) boyanan spermin kromatin kondansasyonu yetersizliği oranı

OAT grubu olguların dondurma öncesi anilin mavisi boyası ile boyanan spermin kromatin kondansasyonu yetersizliği oranı, normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (**p=0,001; p<0,01).



Grafik 3: Gruplara göre B solüsyonu ile dondurulup çözülen örneğin akridin oranj(AO) ile boyandıktan sonraki DNA fragmentasyon oranı

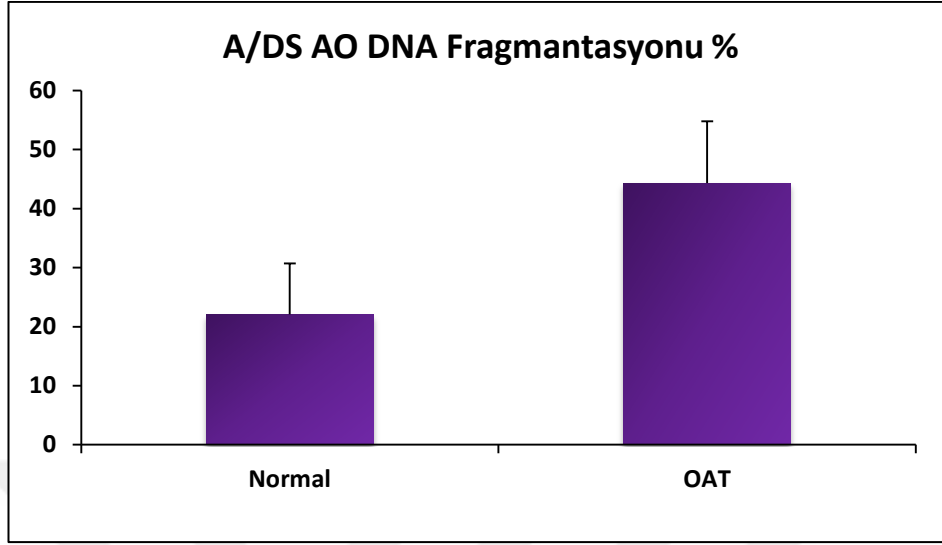
OAT grubu olguların B solüsyonu ile dondurulup çözülen örneğin anilin mavisi ile (+) boyandıktan sonraki kromatin kondansasyonu yetersizliği oranı, normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (**p=0,001; p<0,01).



Grafik 4: Gruplara göre B solüsyonu ile dondurulup çözülen örneğin Anilin mavisi ile (+) boyandıktan sonraki kromatin kondansasyonu yetersizliği oranı

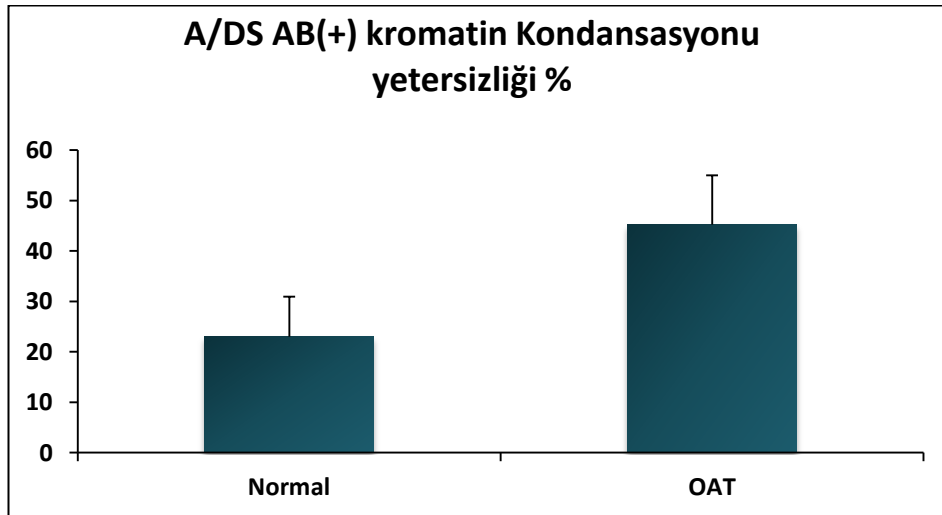
OAT grubu olguların A solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme sonrası akridin oranj ile boyandıktan sonraki DNA fragmentasyon oranı,

normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (**p=0,001; p<0,01).



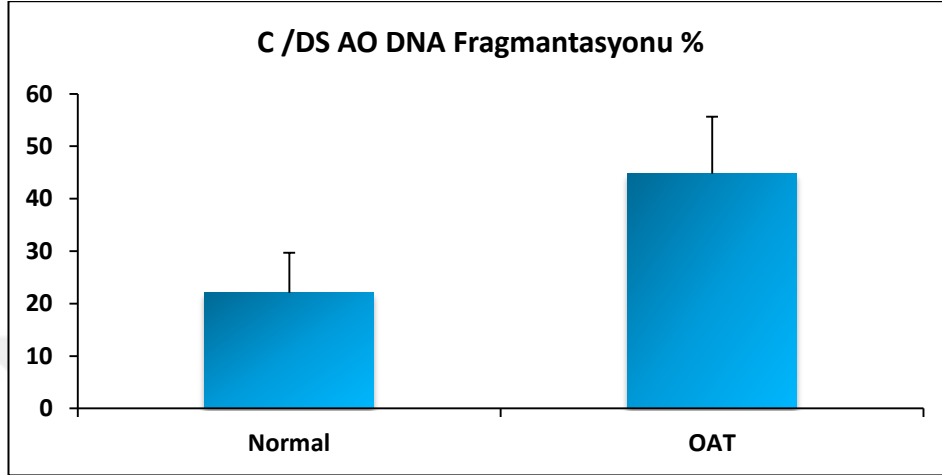
Grafik 5: Gruplara göre A solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme sonrası akridinoranj ile boyandıktan sonraki DNA fragmentasyon oranı

OAT grubu olguların A solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme sonrası annilinblue ile boyandıktan sonraki kromatin kondansasyonu yetersizliği oranı, normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (**p=0,001; p<0,01).



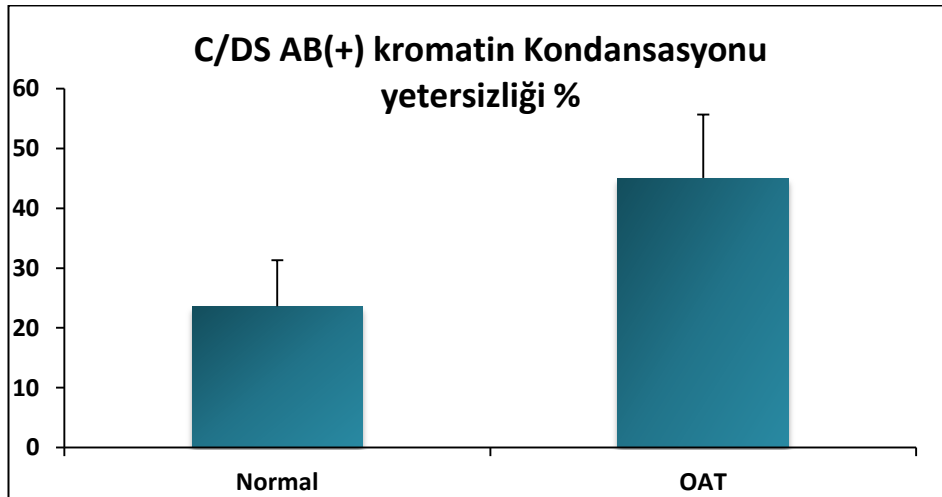
Grafik 6: Gruplara göre A solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme sonrası Anilin mavisi ile (+) boyandıktan sonraki kromatin kondansasyonu yetersizliği oranı

OAT grubu olguların A solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin çözme sonrası anilin mavisi ile boyandıktan sonraki kromatin kondansasyon yetersizliği oranı, normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (**p=0,001; p<0,01).



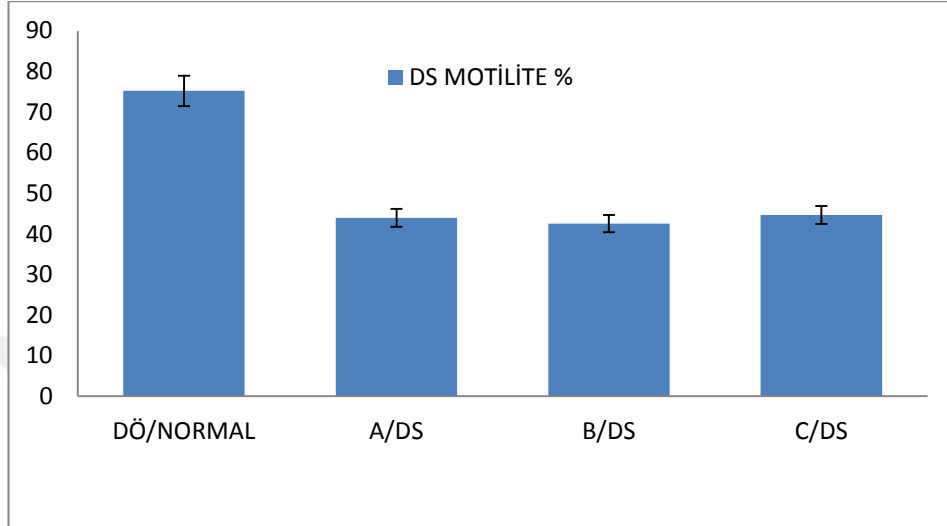
Grafik 7: Gruplara göre C solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme sonrası akridinoranj ile boyandıktan sonraki DNA fragmentasyon oranı

OAT grubu olguların C solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin çözme sonrası akridin oranj ile boyandıktan sonraki DNA fragmentasyon oranı, normozoospermi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (**p=0,001; p<0,01).

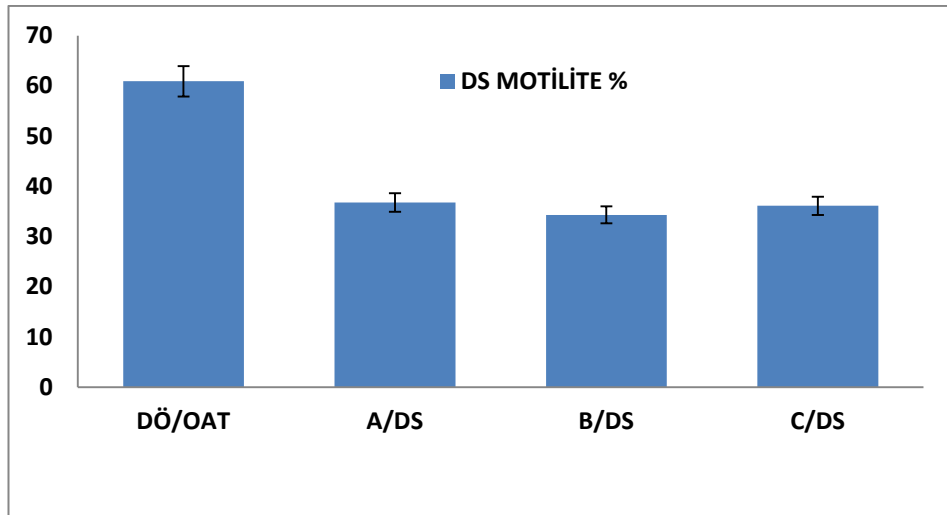


Grafik 8: Gruplara göre C solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme sonrası Anilin mavisi ile (+) boyandıktan sonraki kromatin kondansasyonu yetersizliği oranı

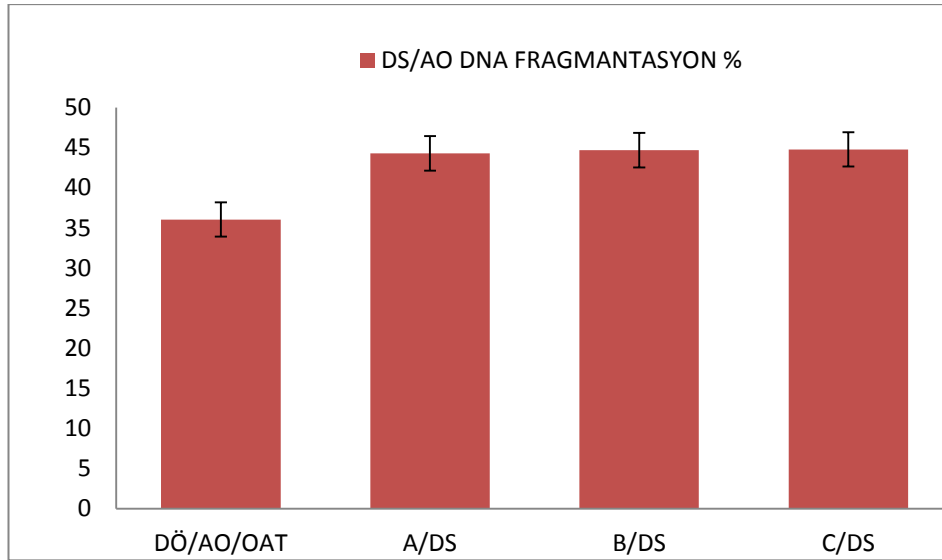
OAT grubu olguların C solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme sonrası anilin mavisi ile boyandıktan sonraki kromatin kondansasyon yetersizliği oranı, normozoospermi grubu olgulara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (** $p=0,001$; $p<0,01$).



Grafik 9: Farklı kroyoprotektanlarla dondurulan Normozoospermi grubunun dondurma çözme sonrası motilite yüzdeleri oranı

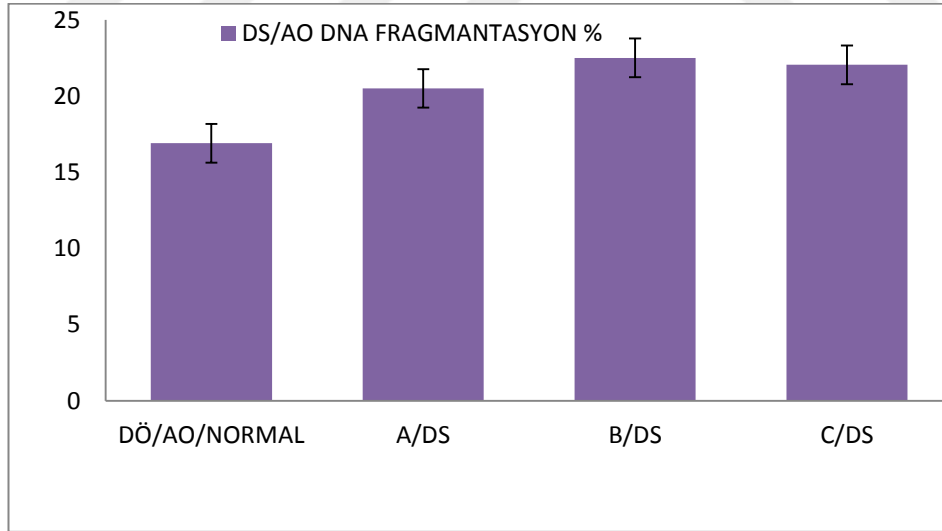


Grafik 10: Farklı kroyoprotektanlarla dondurulan OAT grubunun dondurma çözme sonrası motilite yüzdeleri oranı



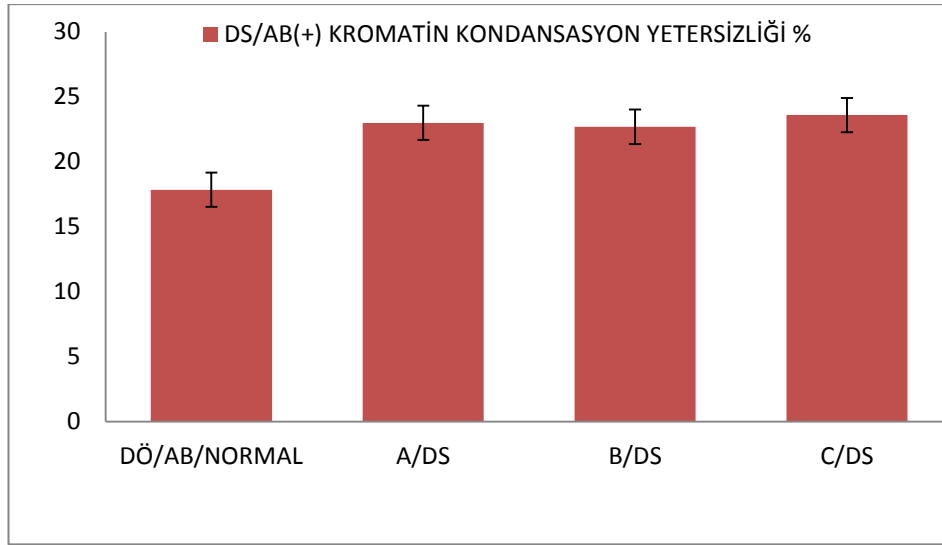
Grafik 11: OAT grubu hastaların A,B ve C solüsyonu ile dondurulup çözme sonrası akridin oranj ile boyandıktan sonraki DNA fragmentasyon oranları

OAT grubu olguların A,B ve C solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme sonrası acridinorange ile boyandıktan sonraki DNA fragmentasyon oranı değerleri karşılaştırıldığında kriyoprotektan solüsyonlarının birbirine üstünlüğü saptanmadı.



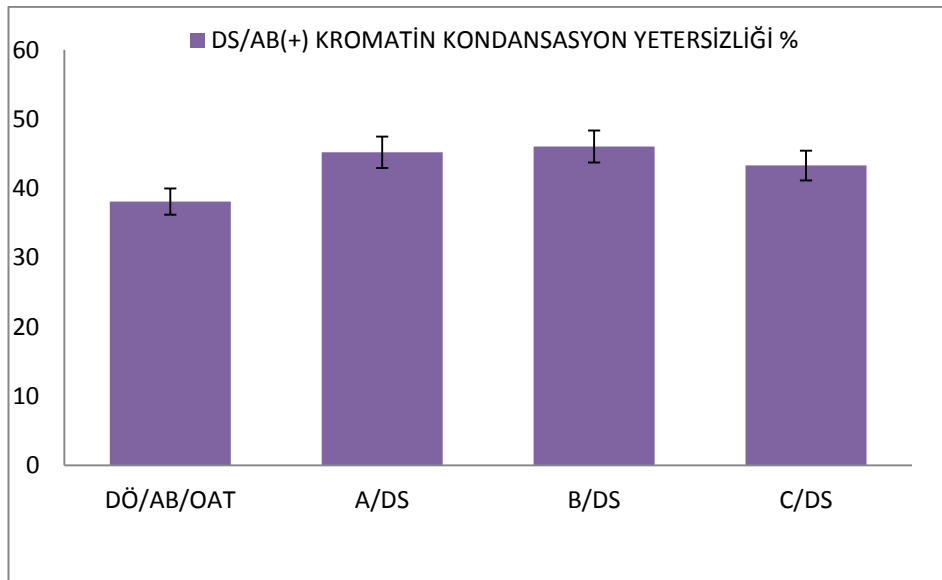
Grafik 12: Normozoospermi grubu hastaların A, B ve C solüsyonu ile dondurulup çözme sonrası akridinoranj ile boyandıktan sonra ki DNA fragmentasyon oranları

Normozoospermi grubu olguların A,B ve C solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme sonrası Akridin oranj ile boyandıktan sonra DNA fragmentasyon oranı değerleri karşılaştırıldığında kriyoprotektan solüsyonlarının birbirine üstünlüğü saptanmadı.



Grafik 13: Normozoospermi grubu hastaların A,B ve C solüsyonu ile dondurulup çözme sonrası AB(+) ile boyandıktan sonraki kromatin kondansasyon yetersizliği oranı

Normozoospermi grubu olguların A,B ve C solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme AB(+) ile boyandıktan sonraki kromatin kondansasyon yetersizliği oranı değerleri karşılaştırıldığında kriyoprotektan solüsyonlarının birbirine üstünlüğü saptanmadı.



Grafik 14: OAT grubu hastaların A, B ve C solüsyonu ile dondurulup çözme sonrası Anilin mavisi(+) ile boyandıktan sonraki kromatin kondansasyon yetersizliği oranları

Oligoastenatozoospermigrubu olguların A, B ve C solüsyonu ile dondurulan sperm örneğinin dondurulup çözme AB(+) ile boyandıktan sonraki

kromatin kondansasyon yetersizliği oranı değerleri karşılaştırıldığında kriyoprotektan solüsyonlarının birbirine üstünlüğü saptanmadı.

Tablo 7: Normospermi ve oligoastenoteratozoospermi grupların dondurma sonrası motilite ve DNA fragmentasyonu

	Normospermi	oligospermi	p
Grad sonrası motilite	75,20±8,91	60,90±8,80	0,0005
Dondurma sonrası motilite A	43,95±18,44	37,25±22,37	0,192
Dondurma sonrası motilite B	42,52±17,42	34,30±14,60	0,192
Dondurma sonrası motilite C	44,65±15,22	36,10±12,23	0,192
Dondurma öncesi DNA fragmentasyonu(%)	16,90±6,08	36,05±11,45	0,0005
Dondurma sonrası DNA fragmentasyonu (%) A solüsyonu	22,10±8,62	44,30±10,44	0,0005
Dondurma sonrası DNA fragmentasyonu (%) B solüsyonu	22,50±8,36	44,70±9,46	0,0005
Dondurma sonrası DNA fragmentasyonu (%) C solüsyonu	23,60±7,70	45,05±10,62	0,0005
DÖ AB (+) %	17,85±6,91	38,10±9,85	0,0005
DS AB(+) % A sol	23,00±7,95	45,20±10,62	0,0005
DS AB(+) % B sol	22,30±7,72	46,05±10,30	0,0005
DS AB(+) % C sol	22,05±7,61	44,80±10,83	0,0005

Normospermi ve oligoastenoteratozoospermi grupta gradient uygulaması sonrası sperm motiliteleri anlamlı olarak farklı bulundu ($p=0,0005$). Dondurma sonrası uygulanan her solüsyonda motilitede benzer düşüş görüldü. Kriyoprotektan solüsyonlarının sperm motilitesi açısından benzer etkileri bulundu. Gradient sonrası

alınan DNA fragmentasyon değerlerinin normospermik ve oligospermik olgularda anlamlı farklılıkları görüldü($p=0,0005$).

Normozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi örnekler kendi içlerinde değerlendirildiğinde dondurma ve çözme sonrası değerlerin önceki değerlere benzer olduğu görüldü. Buna göre kriyoprotektan solüsyonlarının birbirine üstünlüğü saptanmadı.

Tablo 8: Sağlıklı grupta dondurma solüsyonlarının karşılaştırılması

	Ortalama	Std. Sapma	p*
B DS/Sayı	37,15	22,10	0,704
A /Sayı	38,75	24,52	
C /Sayı	37,25	22,37	
B/DS/ Motil yüzde	42,53	17,42	0,192
A/Motil yüzde	43,95	18,44	
C/Motil yüzde	44,65	15,22	
B/DS/AO DNAFragmantasyonu	22,50	8,04	0,704
A/AO/DNA Fragmantasyonu	22,10	8,62	
C/AO/DNA Fragmantasyonu	22,05	7,62	
B/DS/AB Sperm maturasyonu	22,30	7,23	0,818
A/ABSpermmaturasyonu	23,00	7,95	
C/AB/Spermmaturasyonu	23,60	7,70	

*:Friedman Test

Tablo 9: Hasta grupta dondurma solüsyonlarının karşılaştırılması.

	Ortalama	Std. Sapma	p*
B/DS/Sayı	2,12	1,34	0,321
A/Sayı	2,15	1,30	
C/Sayı	2,50	1,67	
B/DS/Motil yüzde	34,30	14,60	0,786
A/Motil yüzde	36,75	10,42	
C/Motil/yüzde	36,10	12,24	
B/DS/AO/DNAFragmantasyonu	44,70	9,47	0,860
A/AO/DNAFragmantasyonu	44,30	10,45	
C/AO/DNAFragmantasyonu	44,80	10,84	
B/DS/AB Spermmaturasyonu	46,05	10,31	0,814
A/ABSpermmaturasyonu	45,20	9,82	
C/AB/Spermmaturasyonu	45,05	10,62	

*:Friedman Test

Her iki grupta da sperm özellikleri üç dondurma solüsyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir.

7.TARTIŞMA

Yumurtanın döl lenmesi spermin direk olarak yumurta hücresi ile teması sonrasında gerçekleşen membran füzyonu yolu ile birlikte dişi ve erkek çekirdeklerin birleşmesi ile oluşmaktadır. Bundan sonraki süreçte embriyonun sağlıklı bir gelişim göstermesi spermin DNA bütünlüğüne bağlıdır (Björndahl et al,2006). Doğru şekilde paketlenmiş olan sperm DNA'sı oluşan fertilizasyon ile doğru bir şekilde genetik materyalini aktarması gerekmektedir. Hasarlı DNA fertilizasyon problemlerine sebep olarak döl lenmenin oluşamamasına veya gelişen embriyolarda doğumsal anomalilere sebep olabilmektedir (Baker and Aitken., 2005). İnfertilite sorunu yaşayan çiftlerin ortalama %20'sinde erkek faktörü sebebi görülmektedir Bu durumda sperme bağlı DNA hasarlarının değerlendirilmesinde ve fertilitenin korunması amacı ile spermlerin dondurularak saklanması da birçok test ve yöntem uygulanabilmektedir. İn vitro fertilizasyon tekniklerinde zaman içerisinde gelişen teknikler ile son dönemde erkek kısırlığı konusunda yaşanan sorunlara çare olarak sperm dondurularak sonradan çözülmüş spermler üzerinde DNA bütünlüğünün korunması üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Koyuncu H. ,2011). Yapılan çalışmalarda DNA bütünlüğünün, sağlıklı gebelik elde edilebilmesi için büyük önem arz ettiğini göstermektedir (Chohan et al., 2006). DNA hasarını tespit eden bu testler sayesinde fertil ve infertil değerlendirmesinin daha kolay ortaya konabileceği gerçeğini saptamıştır (Boynukalın ve ark., 2014).

Günümüzde gelişmekte olan yardımcı üreme teknikleri ile erkek infertilitesi konusunda oldukça yol alınmıştır. Testiküler biyopsi sonrası veya çok az sayıda sperm hücresi elde edilen erkeklerin hücrelerinin dondurularak saklanması tedavilerde başarı oranını artırmaktadır. Fakat bu durum Sperm dondurma ve sonraki çözdürme prosedürlerin de sperm hareketliliğini de azalmaya sebep olabilmektedir (Georgiou et al,1998; Sharma et al,1997). Motilitenin dışında Sperm DNA bütünlüğünün korunması fertilizasyon ve sağlıklı embriyo gelişimi için önem taşıyan kriterlerden biridir (Donnelly et al.,2000). DNA defektlerindeki artışı ile fertilizasyon arasında ters orantı görülmektedir (Sakkas et al., 1996). Dadoune JP. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada DNA fragmanstasyonu konusunda spermleri asidik anilin mavisi ile boyayarak morfoloji değerlendirildiğinde sadece canlı ve anilin mavisi boyası ile baş kısmı boyanmamış spermler arasında anlamlı bir farklılık bulmuşlardır (Dadoune et al.,1988).

2006 yılında da Paula ve arkadaşları oligozoospermli vakalarında TEST yolk buffer solüsyonu ile standart dondurma işlemi sonrası TUNEL test ile dondurma öncesi ve sonrasında apoptotik hücrelerin durumunu değerlendirerek kriyoprezervasyon sonrasında oligozoospermli erkeklerde sperm nükleer DNA fragmentasyon oranının yükseldiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda normozoospermik erkeklerde de kriyoprezervasyonun DNA fragmentasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (De Paula et al.,2006). Bizim yaptığımız çalışma da normozoospermi ve OAT vakaların da Test yolk buffer, vitrolife sperm freezing, origio sperm freezing olmak üzere üç farklı kriyoprotektan içeren sperm dondurma solüsyonu kullanılarak gradient sonrası örnekler ayrı ayrı dondurulmuş ve 24 saat sonra çözülüp motilitesi, DNA fragmentasyonu ve sperm maturasyonu yönünden Anilin mavisi (AB) ve Akridin oranj (AO) boya ile boyanıp değerlendirilmiştir. OAT gruplu hastalar da üç farklı solüsyonun karşılaştırılması çözme sonrası DNA fragmentasyonu, sperm maturasyonu ve sperm motilitesi yönünden aralarında daha önce yapılan çalışmalarda ki sonuçlara kıyasla anlamlı fark bulunamamıştır. Ancak oligoastenoteratozoospermik hastaların spermleri normozoospermik hastalara göre dondurup çözme sonrası sperm motilitelerinde ciddi azalmalar olmuş ve DNA fragmentasyon ile kromatin kondansasyon yetersizliği oranının arttığı gözlemlenmiştir. Kriyoprezervasyon sonrası sperm motilite, vitalite ve normal şekil yapısı oranlarında düşme olduğu, DNA fragmentasyonunda ise artış olduğu bazı çalışmalarda desteklenmektedir (Petyim and Choavaratana.,2006;Ngamwuttiwong and Kunathikom.,2007). Verza Junior ve ark. tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak üç farklı marka kriyoprotektan ile 23 infertil erkek üzerinde yapılan çalışmada spermlerin canlılıkları test edilmiş iki markada diğerine göre bu oranın yüksek olduğu tespit edilmiştir (Junior et al., 2006).

Yapılan araştırmalarda farklı sonuçların elde edilmesinin sebepleri arasında çalışılan hasta sayısının azlığı ya da çokluğu, dondurma ve çözme sırasında uygulanan tekniklerin farklılığı ve sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan genetik testlerin çalışma prosedürlerinin farklı oluşu sayılabilir. Sperm hücrelerinin dondurulması mutlak suretle DNA hasarına sebep olduğu ya da hasar oranının yükseldiği konusunda net bir sonuca varılamamıştır. Ayrıca DNA hasarının dondurma ve çözme işlemine bağlı olmadan da taze sperm örneğinde de belli bir oranın üzerinde olabileceği tespit edilmiştir.

8.SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmadanormozoospermi ve oligoastenoteratozoospermi grubu toplam 40 hastanın sperm örnekleri konsantrasyon, motilite, progressif motilite, vitalite ve DNA fragmentasyonu, sperm maturasyonu bakımından incelendi. Daha sonra sperm yıkama yöntemi olan “gradient” (yoğunluk farkıyla ayırma) tekniği kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan örnekler üçe bölünerek irwine test yolk buffer, vitrolife sperm freezing, origio sperm freezing olmak üzere üç farklı sperm dondurma solüsyonu kullanılarak sperm örnekleri ayrı ayrı donduruldu ve 24 saat sonra çözülüp motilitesi, DNA fragmentasyonu ve sperm maturasyonu yönünden AB ve AO boyaları ile boyanıp değerlendirildi.

Elde ettiğimiz sonuç ve istatistiksel veriler ışığında üç farklı kriyoprotektan kullanılarak yapılan sperm dondurup çözme işlemi sonrası oligoastenateratozoospermi ve normozoospermi hastaların spermelerinde 24 saat sonra çözme sonrası hareketlilik (Motilitesi) yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Dondurma öncesi ve dondurma sonrası DNA fragmentasyonu ve kromatin kondansasyonu yetersizliğine bakıldığında ise Oligoastenateratozoospermi hasta grubunun çözme sonrası DNA fragmentasyonu ve sperm immatürite düzeyi normozoospermik gruba göre anlamlı düzeyde yüksek çıkmıştır. Solüsyonları motilite, DNA fragmentasyonu ve sperm maturasyonu bakımından kendi aralarında karşılaştırdığımızda ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Kriyoprezervasyonun sperm DNA fragmentasyonuna neden olması dolayısıyla kriyoprotektan maddelerin de geliştirilmesi ve yeni tekniklerin uygulanması sperm DNA hasarını en aza indirebilir.

9.KAYNAKÇA

Abraham L., Kierszenbaum M.D.(2002)Histology and Cell Biology, 2th edition, Mosby,; 529-550.

Agarwal A, Sharma R., Ahmad G.(2017) Sperm chromatin assessment. In Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Fifth Edition. CRC Press,;65-87.

Alberts M.Stout T.A., Stoorvogel W.(2014) Prostatosomes: extra vesicles from the prostate. Reproduction;147:R1–14. doi: 10.1530/ REP-13-0358.

Agarwal A., Majzoub A., Esteves S.C. , Ko E. , Ramasamy R. , Zini A.(2016), Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios, Translational Andrology and Urology;5(6):935-950.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter P.(2008) , Hücrenin Moleküler Biyolojisi.(TÜBA yayımları, Çev.) Ankara: Garland Science.

Arav A, Hehu D. , Mattioli M.(1993) Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. J Reprod Fertil,99: 353-358.

Agarwal A., Cho C.L.,Esteves S.C. ,MajzoubA. , Implication of sperm processing during assisted reproduction on sperm DNA integrity Transl Androl Urol. 2017 Sep; 6(Suppl 4): S583–S585.

Bordignon V, Smith L.C.(1999)Ultraviolet-Irradiated Spermatozoa Activate Oocytes but Arrest Preimplantation Development After Fertilization and Nuclear Transplantation in Cattle1. Biology of Reproduction. 1999;61(6):1513-20.

Baker M.A, Aitken R.J.(2005)Reactive oxygen species in spermatozoa: methodsfor monitoring and significance for the origins of genetic disease andinfertility. Reproductive Biology and Endocrinology.3(1):67.

Björndahl L., Mohammadieh M., Pourien M. , Söderlund I. , Kvist U.(2006) Sperm DNA damage; clinical significance in the era of assisted reproduction. CMAJ;175:495-500

Bianchi P.G., Manicardi G.C. , Bizzaro D. , Sakkas D. , Bianchi U. A. (1993) cytochemical study of mature mouse spermatozoa after C-banding treatment. European journal of histochemistry: EJH.37(2):155-159.

Boynukalin F.K., Güven S., Günalp S.(2014) Sperm DNA Hasarı ve Üremeye Yardımcı Teknikler. J Turk Soc Obstet Gynecol. 1: 52-58.

Borges E. , Rossi L.M., Locambo de Freitas C.V, Guilherme P. , Bonetti T.C., Iaconelli A., Pasqualotto F.F.(2007)Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. Fertil Steril; 87: 316–20.

Clermont Y., (1972). Genetics of Spermatogenesis In Mammals. Seminiferous Epithelium Cycle and Spermatogonium Renewal [Memelilerdeki Genetik Spermatogenezis. Seminifer Epitelyum Siklusu ve Spermatogonyum Yenilenmesi]. Physiol Rev, 52:198.

Curry M.R. ,(1995)Sperm structure and function, in Gametes- the spermatozoon, I.G.J.a.Y.J. eds, Editor. Cambridge University PressP. 45-69.

Cebesoy F.B., Ünlü C., Aydos K. , Baltacı V. , The Relationship Between Sperm Morphology-Acridine Orange Staining Andfertilization Rate-Embryo Quality in Icsi. J Turkish-German Gynecol Assoc. 2006; 7(2):110-14.

Chohan KR, Griffin J.T. , Lafromboise M., Jonge C.J. , Carrell D.T.(2006) Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. J Androl. 27: 53–59.

Du Plessis, S.S., Gokul S. , and Agarwal A.(2013), Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. Front Biosci (Elite Ed), 5: p. 224-31.

De Lamirande E., Jiang H. , Zini A., Kodama H. , Gagnon C.(1997), Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 2(1): 48-54.

Durmaz A. , Dikmen N. (2010)İnfertil Erkeklerdeki Sperm Dna Hasarının Comet Assay İle Tayini 22-45.

Dadoune J.P, Mayaux M.J, Guihard-Moscota M.L.(1988) Correlation Between Defects in Chromatin Condensation of Human Spermatozoa Stained by Aniline Blue and Semen Characteristics. *Andrologia.*, 20(3): 211-217

De Paula T.S, Bertolla R.P. , Spaine D.M., Cunha M.A. , Schor N. , Cedenho A.P. ,(2006) Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and Sterility*, 2006. **86**(3): p. 597-600

Dohle G.R., Jungwirth A., Kopa Z. ,Krausz H. , Diemer T. ,Tournaye H.(2009) E.A.U. Guidelines on Male Infertility. 2009;6-7.

Donnelly E.T. , McClure N., Lewis S.E.(2000) Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*.15:61-8.

Delilbaşı L. (1997), Tüp Bebek Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuvar Yöntemleri. *Baysed Yayın No:10, Ankara.,; s.229-252.*

De Leeuw F.E. ,De Leeuw A. M., Den Daas J.H. , Colenbrander B. ,Verkleij A.J.(1993), Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30: 32-44.

Davis, N.S. (1997), The hows, whys and when of sperm cryopreservation. In: *ASRM 30th Postgraduate Program Course on Andrologic Practices American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama, USA; p. p. 83-9.*

Elder K., Dale B. (2010). İn-vitro Fertilizasyon (T. İrez, Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. (2014).

Esteves S.C. , Verza S. , Sharma R.K. , Gosálvez J. , Agarwal A.(2015), Role and Significance of Sperm Function in Men with Unexplained Infertility. Springer, New York, NY.;91-119.

Eroschenko V.P.(2001) Histoloji atlası fonksiyonel ilişkileriyle Çeviri editörü: Prof.Dr. Ramazan Demir Palme Yayıncılık .

Fernandez, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. Journal of andrology, 24(1), 59-66.

Fernández J.L., Muriel L, Goyanes V., Segrelles E., ve ark. (2005), Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. Fertil Steril.:(84):4

Fawcett D.W.(1965) , The anatomy of the mammalian spermatozoon with particularreference to the guinea pig. Z Zellforsch; 67: 279-296.

Filatov M.V. , Semenova E.V. , Vorob'eva O.A. , Leont'eva O.A. , Drobchenko E.A. ,(1999), Relationship between abnormal sperm chromatin packing and IVF results. MHR: Basic science of reproductive medicine.:(84):825-30.

Gandini L., Lombardo F. , Paoli D. , Caruso F. , Eleuteri P.(2004), Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. Hum Reprod.:(19) 6:1409-17.

Gardner, D.K. (2007). In Vitro Fertilization- A Practical Approach., Informa healthcare [İn Vitro Fertilizasyon- Pratik Yaklaşım, Sağlık]. New York, London.

Grudzinskab J.G., Yovich, J.L. (1995), Gametes- The Spermatozoon [Gametler- Sperm]. 1sh ed., Cambridge University Pres.

Gartner P.L., Hiatt L.J.(2016), Çeviri Ed.Canan Hürdağ, Hücre Biyolojisi ve Histolojisi, 7.Baskı, İstanbul Tıp Kitabevi.

Gilbert S.F. , (2000).Developmental Biology. 6th edition Sunderland (MA).

Gorczyca W., Gong J., Darzynkiewicz Z.(1993), Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. Cancer research. 1993;53(8):1945-1951.

Georgiou I., Syrrou M., Stefanidis K. , Konstantelli M., Lolis D.(1998) Effect of Percoll gradient and swim-up preparation on the chromomycin A3 staining of normal and abnormal semen samples. Andrologia. 1998;30:101-4.

Hassa, H. (2003). İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları. Bölüm: Spermatogenez (sayfa:127-138), Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi yayınları No:087, 1. Baskı, OGÜ Basımevi.

Junqueira L.C. , Carneiro J. , Kelley R .O. , (1998) , ‘22. Bölüm Erkek Üreme Sistemi’, ‘Basic Histology 8th edition’, Aytekin Y., Barış Kitabevi.

Junqueira I.C. , Carneiro J. ,Kalley R.O.(1998) . A Lange medical book. Çeviri editörü: Prof. Dr. Yener Aytekin. barış Kitabevi.

Junior V. , Feijo M., SchneiderC.T. , Esteves S.C.(2006) A comparative study of three commercially available cryoprotectants for cryopreservation of human sperm Fertility and Sterility,86 (2) 199-201

Kruger T.F. , Menkveld R. , Stander F.S. , Lombard C.J. , Van der Merwe J.P. , van Zyl J.A. , Smith K.(1986) Fertil SterilDec;46(6):1118-23.

Kuczynski W. , Dhont M., Grygoruk C. ,(2001), et al. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa—a prospective randomized study. Hum Reprod; 16: 2109–13.

Khalili M.A., Maybodi F.A. , Anvari M.(2006), Taleb A.R. Sperm nuclear dna in ejaculates of fertile and infertile men correlation with semen parameters. J Urol. 2006; 3(3):154-59.

Koyuncu H.(2011), Methods for the determination of sperm DNA damage. TurkUrol Sem. ; 2:18-23.

Leibo S.P. (2004), The early history of gamete cryobiology. In:Fuller BJ, Lane N, Benson EE, eds. Boca Raton: CRC Press, 347-70.

Lamirande E.D. , Gagnon C.(1993), A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. International Journal of Andrology.;16(1):21-25.

Lopes S., Sun J.G., Jurisicova A. , Meriano J. , Casper R.F.(1998) Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 69(3):528-32.

Mazur P.(1984) , Freezing of living cell: mechanisms and implications. Am J Physiol, 247: 125-142.

Morris I.D., Illott S., Dixon L., Brison D.R.(2002) The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. Hum Reprod.(17) 4:990-98.

Mikhailichenko V.V. and Esipov A.S.(2005), Peculiarities of semen coagulation and liquefaction in males from infertile couples. Fertil Steril. 84(1): p. 256-9.

Nabi A. , Khalili M.A. , Halvaei I. , Ghasemzadeh J. , Zare E.(2013) , Seminal bacterial contaminations: Probable factor in unexplained recurrent pregnancy loss. Iranian journal of reproductive medicine.11(11):925.

Ngamwuttiwong T. and Kunathikom S.(2007)Evaluation of cryoinjury of sperm chromatin according to liquid nitrogen vapour method (I). J Med Assoc Thai. 90(2);224-8.

Oğuz Y.(2013) Sperm Hazırlama Yöntemi Olarak “Swim-Up Ve Gradient”Tekniklerinin Dna Fragmentasyonuna Etkilerinin Karşılaştırılması [Uzmanlık Tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi.

Oktay K. , Meirow D. , (2007). Planing for fertility presevation before cancer treatment. Sexuality, Reproduction and Menopause (srn)- A Clinical Publication of American Society of Reproductive Medicine, 5(1):17-22.

Olshan A.F. , Ananth C.V. , Savitz D.A.(1995), Intrauterine growth retardation as an endpoint in mutation epidemiology: an evaluation based on paternal age, Mutat Res 344:89.

Özdamar S. , Çetin N. , Sorkun H.(2002), Genel Embriyoloji . 1.Baskı Kayseri .Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları.

Polge C. , Smith A. , Parkes A. (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 164, 166.

Petyim S. and Choavaratana R.(2006) Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. J Med Assoc Thai. **89**(3);306-13.

Paoli D. , Lombardo F. , Lenzi A. , Gandini L. , (2014). Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin Structure. In Advances in Experimental Medicine and Biology.

Ross H.M., Kaye G., Pawlina W.(2003), Histology, a text and atlas, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Philedelphia, 689-696.

Ross M.H. , Pawlina W.(2014) Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Baykal B, Çev. ed. Ankara: Palme Yayıncılık; p.784–830.

Said, T.M., Gaglani A. , Agarwal A. , (2010). Implication of apoptosis in sperm cryo-injury. Reproductive BioMedicine Online, 21(4):456–462.

Sanger W.G., Olson J.H. and Sherman J.K.(1992) Semen cryobanking for men with cancer--criteria change. Fertil Steril. **58**(5);1024-7.

SakkasD. , Urner F. , Bianchi P.G. , BizzaroD., Wagner I., JaquenoudN. ,Manicardi G.,Campana A.(1996). Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod.11:837-43

Schroeder A.C. , Champlin A.K. , Mobraaten L.E. , Eppig J.J. , (1990). Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. J Reprod Fert, 89:43-50.

Shafik A. ,Shafik A.A, Shafik I. El Sibai O.(2006) , Sperm DNA fragmentation. Arch Androl. May-Jun;52(3):197-208.

Shamsi, M. B. , Imam S.N.and Dada R. , (2011). Sperm DNA integrity assays: diagnostic and prognostic challenges and implications in management of infertility. Journal of assisted Reproduction and Genetics, 28(11), 1073-1085.

Sharma R.K, Vemulapalli S. , Kohn S. , Agarwal A.(1997) Effect of Centrifuge Speed, Refrigeration Medium, and Sperm Washing Medium on Cryopreserved Sperm Quality after Thawing. Arch Androl. 39(1):33-8.

Sun J.G., Jurisicova A. , Casper R.F.(1997) Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biology of reproduction. 56(3):602-607

Sinclair A.H. , Berta P. , Palmer M.S. , Hawkins J.R. et al.(1990). A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to cryopreserved DNA binding motif. Nature.346: 240-244.

Singh N.P. , Muller C.H. , Berger R.E.(2002) DNA double strand breaks and apoptosis in human sperm: effects of donor age. *Fertility and Sterility*.78:S69-S70.

Satar D.A., Gençdal S.(2013). Sperm Değerlendirmesi. *Archives Medical Review Journal*. 22(4): 532-542.

Tesarik J., Mendoza C., Greco E.(2002) Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod*. Jan;17(1):184-9.



10.EKLER

Ek1.Gönüllü Olur Formu

“GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR” İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: ‘Farklı kriyoprotektan solüsyonları ile sperm kriyoprezervasyonu ve sonuçlarının değerlendirilmesi ‘

Sizi, Farklı kriyoprotektan solüsyonları ile sperm kriyoprezervasyonu ve sonuçlarının değerlendirilmesi ’ başlıklı bir araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Bu anket çalışmasına katılmak tamamen gönüllülük esasına dayanmaktadır. Çalışmaya katılmama hakkına sahipsiniz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen araştırma amacı ile kullanılacaktır.

Sorumlu Araştırmacı: Prof.Dr.Tülay İREZ

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Sizi davet ettiğimiz çalışmanın amacı erkek gonad hücreleri olan spermatozoaların farklı kriyoprotektan maddelerle bir araya getirilerek dondurulması ve çözme işleminden sonra motilite ve DNA fragmantasyon oranının değerlendirilmesidir.

Spermioyogram tahlili amacıyla vermiş olduğunuz semen örneği değerlendirildikten sonra araştırma amacıyla kullanılacak ve daha sonra imha edilecektir. Örneğinizden analiz sonrası çalışılması planlandığı için sizin sağlık durumunuza ve spermioyogram analizine herhangi bir negatif etkinin olması öngörülmemektedir. Çalışmanın ortalama iki ay sürmesi ve yaklaşık 40 kişinin katılması planlanmaktadır.

Bu çalışmaya katılmalı mıyım? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, vermiş olduğunuz semen örneğinin analiziyle ilgili süreç rutin olarak

devam edecek ve işlem sonucunuzu yine planlanan tarihte almış olabileceksiniz. Kısacası bu çalışmaya katılıp katılmamanız analiz sürecini pozitif ya da negatif herhangi bir şekilde etkilemeyecektir.

Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir?

Bu çalışmaya katılmanız halinde herhangi bir maddi sorumluluk altına girmeyeceksiniz.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak? (Bu bölüm aynen korunacaktır)

Araştırma sorumlusu, kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde yalnızca bu araştırmada olmak üzere tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Sinem ÖZGÖL

GÖREVİ : Araştırma sorumlusu

TELEFON : 05396548797

Fertijin Kadın Hastalıkları ve Tüp Bebek Merkezinde Biyolog Sinem ÖZGÖL tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağının bilincindeyim). Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sorun ile karşılaştığımda; Bio. Sinem ÖZGÖL 'ün 05396548797 nolu telefondan arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Tel:

İmza:

Ek 2.Kurum izin yazısı

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığına;

İstanbul Biruni Üniversitesi Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencilerinden Bio. Sinem ÖZGÖL'ün sorumlu araştırmacısı olduğu Farklı kriyoprotektan solüsyonlar ile sperm kriyoprezervasyonu ve sonuçlarının değerlendirilmesi * isimli yüksek lisans tez araştırmasında, merkezimize spermiyogram testi amacıyla gelen hastaların spermiyogram değerlendirilmesi sonrası kalan semen örneklerinin araştırılma amaçlı kullanılması uygundur.

Saygılarımla

Fertijin Tüp Bebek Merkezi Klinik Direktörü

Op.Dr. Seval Taşdemir

Op.Dr. Seval TAŞDEMİR
KADIN DOĞUM UZMANI
Dip. No: 1430

Ek 3.Etik kurul onayı

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

13.06.2017

Sayın: Sinem Özgöl

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda “**Farklı Kriyoprotektan Solüsyonlarla Sperm Kriyoprezervasyonu ve Sonuçlarının Değerlendirilmesi**” isimli araştırmanızın kurulumuzun **13.06.2017** tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.

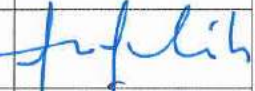
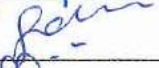
Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr. Tülay İrez



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Tarih:13.06.2017 Toplantı Sayısı:6	Karar No: 2017/6-3 Araştırmacı Sinem Özgöl'ün planladığı “Farklı Kriyoprotektan solüsyonlarla sperm kriyoprezervasyonu ve sonuçlarının değerlendirilmesi” konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.
---------------------------------------	--

ÜYELER

Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Tülay İrez	Temel Tıp Bilimleri	Histoloji ve Embriyoloji	Etik kurul Başkanı	
Doç.Dr.Leman Şenturan	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Hemşirelik	Etik Kurul Başkan Yardımcısı	
Prof.Dr.Fatma Çelik	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Beslenme ve Diyetetik	Üye	
Doç.Dr.Şölen Himmetoğlu	<u>Tıp</u> Fakültesi	Tıbbi Biyokimya	Raportör	
Yrd.Doç.Dr.Ayşe Tuğba Ceyhan Duman	Eğitim Fakültesi	Zihin Engelliler	Üye	
Yrd.Doç.Dr.Belen Şirinoğlu Çapan	<u>Diş</u> Hekimliği Fakültesi	Pedodonti	Üye	

11.Özgeçmiş

Adı Soyadı: Sinem Özgöl

Doğum Tarihi ve Yeri : 04.06.1991/İST

Mail Adresi: ozgolsinem@gmail.com

Unvanı: Biyolog

Öğrenim Durumu: Lisans

İş Tecrübesi: Fertijin Tüp Bebek Merkezi - Halen çalışıyor

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
Lisans	Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2013
Lise	Cibali Lisesi	2009
Ortaokul	Oruçgazi İlköğretim Okulu	2005

FARKLI KRİYOPROTEKTAN SOLÜSYONLARLA SPERM KRİYOPREZERVASYONU VE SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Yazar Sinem Özgöl

Gönderim Tarihi: 30-May-2019 01:03PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1137805129
Dosya adı: S_NEM_ZG_L_TEZ_27.05.2019_SON.docx (1.17M)
Kelime sayısı: 9102
Karakter sayısı: 65868

FARKLI KRİYOPROTEKTAN SOLÜSYONLARLA SPERM
KRİYOPREZERVASYONU VE SONUÇLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ

ORIJİNALLIK RAPORU

% 24	% 20	% 6	% 11
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 5
2	apps.who.int İnternet Kaynağı	% 2
3	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	% 2
4	ÜNAL, Murat Serkant, ÖZER, Mehmet Caner, SÖNMEZ, Ferhan Hacıoğlu, BAYRAK, Gülsen and DEMİRBAĞ, Hatice Oruç. "Seminal sıvının fertilizasyondaki rolü", Türk Androloji Derneği, 2017. Yayın	% 2
5	file.lookus.net İnternet Kaynağı	% 1
6	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1

7	www.uroturk.org.tr İnternet Kaynağı	%1
8	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	%1
9	maksfarma.com İnternet Kaynağı	%1
10	www.biltek.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
11	Submitted to Bahcesehir University Öğrenci Ödevi	%1
12	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	%1
13	uludagtipdergisi.org İnternet Kaynağı	%1
14	teh-med.com İnternet Kaynağı	%1
15	Submitted to Istanbul Medipol Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
16	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
17	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
18	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	

		<%1
19	www.toraks.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
20	dspace.trakya.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
21	www.mku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
22	www.saglikaktuel.com İnternet Kaynağı	<%1
23	Submitted to Beykent Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
24	utcd.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
25	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	<%1
26	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
27	Submitted to Cardiff University Öğrenci Ödevi	<%1
28	www.kaanaydos.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
	readgur.com	

29	İnternet Kaynağı	<%1
30	www.walsallhealthcare.nhs.uk İnternet Kaynağı	<%1
31	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
32	dspace.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
33	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
34	biotek.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
35	SOYLAR KILIÇ, Öznur, KILINÇ, Oğuz and ELLİDOKUZ, Hülya. "Toplumda gelişen pnömonide kombinasyon ve kinolon tedavisinin karşılaştırılması", Türk Tüberküloz ve Toraks Derneği, 2015. Yayın	<%1
36	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	<%1
37	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
38	Submitted to Universiti Kebangsaan Malaysia Öğrenci Ödevi	<%1