



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

FARKLI SEMEN KONSANTRASYONLARINDA YAPILAN
SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN SPERM CANLILIĞI
VE DNA FRAGMENTASYONUNA ETKİSİ

Zeynep ÖNER

DANIŞMAN
Prof. Dr. MURAT AKKUŞ

OCAK, 2020



T.C.
BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

FARKLI SEMEN KONSANTRASYONLARINDA YAPILAN
SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN SPERM CANLILIĞI
VE DNA FRAGMENTASYONUNA ETKİSİ

Zeynep ÖNER

DANIŞMAN
Prof. Dr. MURAT AKKUŞ

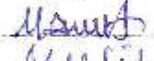
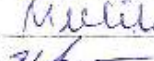
OCAK, 2020

Tarih: 03 / 02 / 2020

Anabilim Dalı : HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
Program : KLİNİK EMBRİYOLOJİ
Öğrencinin;
Adı ve Soyadı : ZEYNEP ÖNER
Öğrenci No : 170805003
Danışman : PROF. DR. MURAT AKKUŞ

Biruni Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Zeynep ÖNER tarafından hazırlanan "Farklı Semen Konsantrasyonlarında Yapılan Sperm Kriyoprezervasyonunun Sperm Canlılığı ve DNA Fragmentasyonuna Etkisi" adlı tez çalışması jüri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03 / 02 / 2020

Jüri Üyesinin Unvanı, Adı, Soyadı	Çalıştığı Kurum	İmza
PROF. DR. MURAT AKKUŞ	DICLE ÜNİVERSİTESİ	
PROF. DR. YUSUF ÇELİK	BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ	
DR. ÖĞR. T. YENİ NAZLI ECE ÖRDÜK	BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ	

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

Prof. Dr. Leman ŞENTURAN
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı herhangi bir davranışımın 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 davranışımın olmadığını beyan ederim.

Zeynep ÖNER



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın başından itibaren en büyük katkısı ve desteği gösteren saygıdeğer hocam sayın Prof.Dr. Tülay İREZ ve tez danışmanım sayın Prof.Dr. Murat AKKUŞ ve ikinci danışmanım sayın Dr. Öğr. Üy. Sibel Demirci DELİPINAR hocama ve Biruni Üniversitesi Üroloji bölümünde görevli Dr.Emre SALLABAŞI hocama teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her anında varlığıyla yanımda olan sevgili annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürü borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇ KAPAK.....	i
ONAY SAYFASI.....	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TÜRKÇE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELEr.....	x
İNGİLİZCE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELEr.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Seminal Vezikül	4
2.3. Spermatogenez	5
2.3.1. Spermatositogenez (Proliferasyon)	5
2.3.2. Mayoz bölünme.....	6
2.3.3. Spermiyogenez (farklılaşma)	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	9
3.1. Semen Analizi	9
3.2. Semen in Makroskobik Olarak İncelenmesi	9
3.3. Semen in Mikroskobik Olarak İncelenmesi	10
3.3.1. Sperm Konsantrasyonu	11
3.3.2. Makler Sayım Kamerası.....	11
3.4. Sperm Hareketlerinin Sınıflandırılması.....	12
3.4.1. Sperm Aglütinasyonu	13
3.4.2. Sperm Canlılığı	13
3.4.3. Sperm Morfolojisi	13
3.4.4. Sperm Morfolojik Anomalileri	14
3.5. Dünya Sağlık Örgütü Parametrelerine Göre Sperm Analizi Terminolojilerinin Tanımları.....	15
3.6. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi.....	17

3.7.	Sperm DNA Yapısı	17
3.7.1.	Sperm DNA Hasarları	17
3.7.2.	Sperm DNA Fragmentasyonu	18
3.7.3.	Spermatozoa Kromatin Paketlenmesi	18
3.7.4.	Reaktif Oksijen Türevleri (ROS)	19
3.8.	Sperm DNA Fragmentasyon Analizi.....	19
3.9.	Akridin Oranj Testi (AOT).....	20
3.10.	Sperm Kriyoprezervasyonu	20
3.11.	Kriyobiyojinin Temelleri	21
3.11.1.	Kriyoprotektanlar	21
3.11.2.	Permeabl (İnternal) Kriyoprotektanlar	21
3.11.3.	Nonpermeabl (Eksternal) Kriyoprotektanlar.....	22
3.11.4.	Kriyoprezervasyon Hasarları	22
3.11.5.	Kriyoprezervasyon Teknikleri	23
3.12.	Çalışmanın Tasarımı	24
3.13.	Çalışmada Kullanılan Yöntemler.....	25
3.13.1.	Örnek Alımı ve Spermiyogram Testi.....	25
3.13.2.	Semen Analizi	25
3.13.3.	Sperm DNA Fragmentasyonun Belirlenmesinde Akridin Oranj Boyama İşlemi	26
3.13.4.	STOK AO çözeltisi ve diğer solüsyonlar.....	26
4.	BULGULAR.....	28
4.1.	Floresan Mikroskobu Görüntüleri	28
4.2.	İstatistiksel Analizler	29
4.3.	Korelasyon Analizi	30
4.4.	Wilcoxon İşaretli Sıralar Testleri (Wilcoxon Signed Rank Test)	32
4.5.	DNA Fragmentasyonu ve Canlılık Karşılaştırmaları	38
5.	TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	41
6.	KAYNAKLAR	44
7.	EKLER.....	48
8.	ÖZGEÇMİŞ	51
9.	İNTİHAL RAPORU	52

SİMGE/SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

AO	:Akridin Turuncu
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
µl	:mikrolitre
ICSI	:İntracytoplasmic Sperm İnjection
IVF	:İn Vitro Fertilizasyon
ml	:mililitre
pH	:Power of Hydrogen
Rpm	:Revolutions per minute
YÜT	:Yardımla Üreme Teknikleri

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 3.1.	Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi.....	13
Tablo 3.2.	Dünya Sağlık Örgütü (2010) Sperm Kriterleri.....	14
Tablo 3.3.	Sperm DNA Fragmentasyon Sınıflandırması	19
Tablo 4.1.	Tanımlayıcı istatistik analizler	30
Tablo 4.2.	Değişkenlerle ilgili korelasyon analizi.....	31
Tablo 4.3.	Wilcoxon signed rank testi(Canlılık eozin öncesi- Dondurma kontrol eozin).....	32
Tablo 4.4.	Wilcoxon signed rank testi(Canlılık eozin öncesi- dondurma sonrası eozin yüzde20).....	33
Tablo 4.5.	Wilcoxon signed rank testi(Canlılık eozin öncesi- Dondurma sonrası eozinyüzde50)	33
Tablo 4.6.	Wilcoxon signed rank testi(Dondurma kontrol eozin - Dondurma sonrası eozin yüzde20)	34
Tablo 4.7.	Wilcoxon signed rank testi(Dondurma kontrol eozin - Dondurma sonrası eozin yüzde50)	34
Tablo 4.8.	Wilcoxon signed rank testi(Dondurma sonrası eozin yüzde20- Dondurma sonrası eozin yüzde50).....	35
Tablo 4.9.	Wilcoxon signed rank testi(Fragmentasyon - Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon).....	35
Tablo 4.10.	Wilcoxon signed rank testi(Fragmentasyon - Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon).....	36
Tablo 4.11.	Wilcoxon signed rank testi(Fragmentasyon - Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon).....	36
Tablo 4.12.	Wilcoxon signed rank testi(Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon - Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde20).....	37
Tablo 4.13.	Wilcoxon signed rank testi(Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon - Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde20).....	37
Tablo 4.14.	Wilcoxon signed rank testi(Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde20- Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde50).....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 2.1.	Bir sperm hücresinin kısımları.....	5
Şekil 2.2.	Erkek germ hücrelerinin oluşumu	7
Şekil 2.3.	Spermiyogenez fazlarının oluşumu	8
Şekil 3.1.	Makler sayım kamerası.....	12
Şekil 4.1.	Acridin oranj boyama yeşili (normal), kavuniçi ve turuncu (defekli) DNA fragmentasyonunu göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskobi görüntüsü)	28
Şekil 4.2.	Acridin oranj boyama yeşili (normal) DNA'ya sahip spermleri göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskobi görüntüsü)	29
Şekil 4.3.	Eozin öncesi, kontrol grubu ve kriyoprezervasyon uygulanmış deney gruplarının canlılık ortalamalarının karşılaştırılması	39
Şekil 4.4.	Eozin öncesi, kontrol grubu ve kriyoprezervasyon uygulanmış deney gruplarının DNA fragmentasyon ortalamalarının karşılaştırılması.....	39

TÜRKÇE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELELER

Erkek faktörü infertil çiftlerin yaklaşık %20'sinde esas neden olarak geçmektedir. Her iki tarafın birlikteliği dahil edildiğinde ise bu oran %30-%40'lara çıkmaktadır. Günümüzde, erkek infertilitesinin testinde rutin semen analizi kullanılmaktadır. Fakat infertil erkeklerin dahi yaklaşık olarak yüzde 15'inde semen analizinin sonuçlarına bakılarak infertilitenin kesin tanısı yapılamamaktadır. Dolayısıyla fertil ve infertil erkeği semen analizi haricinde kesin olarak birbirinden ayıracak, gebe kalınıp kalınmadığını anlayabilmek için farklı deneylere ihtiyaç artmıştır ve konuyla ilgili sperm DNA bütünlüğü üzerine yoğunlaşmıştır.

Sperm DNA hasarlarının infertil erkeklerde fertil erkeklere nazaran daha çok olduğu ve spermdeki DNA hasarının bu bireylerde fertilité oranını eksi yönde etkilediği çalışmalar sonucu belirlenmiştir. Sayının düşük olması, motilite ve normal olmayan yapı gibi bozuk semen etkenleri, çoğunlukla yüksek sperm DNA hasarı ile varlık göstermekte olup sadece normal semen özelliklerine mahsup bireylerin yüzde 8'inde sperm DNA hasarı olduğu da kanıtlanmıştır. Tüm bunlara ilaveten, hasar görmüş DNA'ya sahip spermilerin intrastoplazmik sperm enjeksiyonunda (ICSI) kullanımına bağlı olası sonuçları noktasında tereddütler mevcuttur.

Farklı iç veya dış sebeplerden ötürü DNA yapısında farklı düzeyde hasarlar ortaya çıkmaktadır. DNA yapısında meydana gelen bu hasarların bazıları şunlardır; kromatin içyapısının bozulması, DNA bazlarının oksidasyonu, yanlış eşleşmesi ve tubulin polimerizasyonun baskılanması, bazların kimyasal olarak değişmesi, kromatin yapısındaki anomaliler, DNA zincirinin kırılması, DNA-DNA ve DNA-protein çaprazlaşmaları, DNA da mutasyonlar gibi bir takım yapısal değişimlerdir.

Sperm kriyoprezervasyonu olarak adlandırılan bu yöntem üreme bozuklukları sonucu yardımcı tedavilerde sıklıkla kullanılan bir metoddur. Dondurma ve tekrar çözündürme aşamalarının ardından hedeflenen nokta spermilerinin en az şekilde zarar görmesidir. Çalışmamızda Biruni Üniversite Hastanesi Üroloji Polikliniğine 2018-2019 tarihleri arasında başvuran 18-50 yaş arası 33 erkek hastadan rutin semen analizi sonrası atık numune ile çalışma yapılması planlandı. Farklı semen konsantrasyonlarda sperm kriyoprezervasyonunun sperm canlılığı ve sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla, öncelikle çalışmaya dahil edilecek tüm hastalara Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO) kriterlerine göre standart semen analizi yapılarak sperm

konsantrasyonu, motilite ve morfoloji değerlendirildi. Sperm canlılık oranı tespiti için eozin boyama yapılarak ışık mikroskobunda değerlendirildi. Sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkisini araştırmak için yayma preparat hazırlanarak 1/3 asetik asit metanol karışımında 30 dakika oda sıcaklığına veya -40 derecede (buzdolabında) fikse edilerek akridin oranj boyama yapıldı ve immunofloresans mikroskobuyla Biruni Üniversitesi tarafından desteklenendi.

Anahtar kelimeler: Akridin oranj, sperm çözme, DNA fragmentasyonu, sperm dondurma, canlılık



İNGİLİZCE ÖZET ve ANAHTAR KELİMELELER

In about 20% of infertile couples, the male factor is the main cause. If the combination of male and female factors is included, this rate is reached to 30% -40%. Nowadays, routine semen analysis is used to evaluate male infertility, but in 15% of infertile men, despite the results of normal semen analysis, the definitive diagnosis of infertility cannot be established by routine semen analysis. Therefore, the need for new markers to differentiate between fertile and infertile men and predict the outcome of pregnancy has increased and attention has been focused on sperm DNA integrity.

It has been proven that sperm DNA damage is more common in infertile men than fertile men and that sperm DNA damage negatively affects fertility potential in these patients. Impaired semen parameters such as low number, motility, and abnormal morphology are often associated with high sperm DNA damage, but in patients with normal semen parameters. In addition, there are concerns about the potential consequences of the use of sperm with damaged DNA in intrastoplasmic sperm injection (ICSI).

There are different levels of damage to DNA due to various internal and external causes. The main damages in DNA are; degradation of chromatin structure, oxidation of DNA bases, mismatch and suppression of tubulin polymerization, chemical change of bases, anomalies in chromatin structure, breakage of DNA chain, DNA-DNA and DNA-protein crossings, DNA and DNA mutations.

Sperm cryopreservation is a frequently used method in assisted reproductive therapy. After thawing, it is the target that sperms are damaged at least. In our study; The aim of this study is to investigate whether there is a change in sperm DNA condensation after sperm freezing thawing process, to determine whether this change is correlated with decreasing motility, and also to investigate whether semen raw state or post-wash ice cream has an effect on motility, morphology and DNA condensation.

In our study, 33 male patients aged between 18-50 years who applied to Biruni University Hospital Urology Outpatient Clinic were planned to work with waste sample after routine semen analysis. In order to investigate the effect of sperm cryopreservation at different semen concentrations on sperm viability and sperm DNA fragmentation, first semen analysis was performed according to World Health Organization (WHO) criteria for all patients to be included in the study and sperm

concentration, motility and morphology were evaluated. For the determination of sperm viability, eosin staining was performed and evaluated under light microscope. In order to investigate the effect on sperm DNA fragmentation, smear was prepared by fixing 1/3 acetic acid in methanol mixture for 30 minutes at room temperature or - 40 degrees (refrigerated) and stained with acridine ratio and supported by Biruni University with immunofluorescence microscope.

Keywords: Acridine turuncu, DNA fragmentation, sperm freezing, sperm thawing, viabil



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Erkek infertilitesi, Erkek bireyin, bir kadın partner ile birlikte cinsel olarak aktif olmalarına ve korunmasız olarak cinsel ilişkiye girmelerine karşın, bir yıl veya daha fazlası süre içerisinde gebelik oluşmaması yahut bir çocuk sahibi olamamasına erkek infertilitesi denir (Dohle G.R. et al, 2009).

Erkek infertilitesinin kesin olarak belirlenmesinde normal şartlarda anamnez ve fizik muayenenin ardından semen analizi yapılır ve sonuç değerlendirilir. Semen numenesi, testislerden üretilerek ejakulasyon kanalıyla taşınan sperm hücrelerinin dışında seminal veziküler, seminal veziküler prostat ve bulboüratral bezlerin ürettiği salgıların karışımından oluşmaktadır. Semen analizinde makroskopik ve mikroskopik incelemeler yapılmaktadır.

Makroskopik incelemede sıvılaşma süresi, vizkozite, renk, hacim, pH bakılmaktadır. Mikroskopik incelemede sayı, motilite, canlılık, yuvarlak hücre, lökosit ve morfoloji incelenmektedir. Lakin bahsi geçen bu parametreler, spermdeki DNA hasarı ve sperm maturasyonu ile ilgili net bilgi ve sonuçlar vermemektedir. Standart olarak yapılan semen analizinde belirlenen parametrelere ilave olarak sperm maturasyon, kromatin kondansasyon testlerinin de laboratuvar şartlarında yer alması spermin içyapısı ve DNA'sı hakkında bilgi veren bir kaynak olarak görülebilmektedir (Hammadeh M.E et al., 2001).

Yakın zamanda yapılan bilimsel araştırmalar erkek infertilitesinde sperm DNA bütünlüğü ile ilgili olmaktadır. Bahsi geçen bu çalışmalarda, sperm DNA bütünlüğünün, erkek infertilitesine karar verilmesi noktasında çok önemli katkıda bulunduğunu göstermektedir (Koyuncu H., 2011).

Dondurarak soğutma olarak bilinen kriyoprevezyon, hücrelerin kriyojenik sıcaklıklarda canlılık kapasitesini ve işlevliğini kaybetmeden yapılan bir işlemdir. YÜT ile yapılan bazı işlemlerde sperm kriyoprezervasyonu (dondurarak saklama) kullanılmaktadır. Üreme hücreleri ve ilgili dokularının da dondurularak

saklanabilmesi ve gerekli zamanlarda çözülerek kullanılması Yardımla Üreme Teknolojileri'nin (YÜT) açısından oldukça önemlidir(Delilbaşı L., 2008).

Kriyoprevezyon yöntemi ile dondurulmuş spermler tarihte ilk olarak Polge ve ark. tarafından 1949 yılında kullanılmaya başlanmıştır(Polge G. et al.,1949). Dondurulmuş sperm ve taze spermin ICSI verileri hakkında çeşitli yapılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda taze sperme nazaran kriyoprezerve edilmiş spermde fertilizasyon oranı, embriyo gelişme oranı ve gebelik oranları gibi parametrelerin düşük çıkmasına nazaran, kabul edilebilir sınırlar içinde kaldığı için olumlu bir çalışma olarak kabul edilmiştir.

Konuyla ilgili farklı bir çalışmada Borges ve arkadaşları taze olarak alınmış ejakülat sperm numunelerinin, kriyoprezerve edilmiş ejakülat sperm numunelerine göre daha yüksek fertilizasyon oranına sahip olduğunu belirtirken (Borges E. et al.,2007).Kuczynski ve arkadaşları ise taze olarak alınmış ejakülat sperm numuneleri ile kriyoprezerve edilmiş ejakülat sperm numunelerinin hem fertilizasyon hem de implantasyon oranlarında herhangi bir farklılığın olmadığını belirtmişlerdir (Kuczynski W. et al., 2001).

Sperm DNA fragmentasyonu, özellikle sub-fertil ve infertil erkeklerde, paternal DNA anomalisinin progene bulaşmasının en sık nedeni olabilir. Bu bağlamda sperm DNA fragmentasyonu, erkek faktörü çalışmasında infertilitenin önemli bir nedeni olarak giderek daha fazla önem kazanmakta ve geniş çapta araştırılmaktadır. Sperm DNA'sının bütünlüğü, genetik bilginin doğru iletimi için gereklidir ve herhangi bir DNA hasarı erkek kısırlığına neden olabilir. Erkek gametindeki olası olası DNA anomalileri arasında, özellikle infertil popülasyonda DNA fragmentasyonu en sık görülür. Parçalanmış DNA içeren bir sperm canlı, hareketli, morfolojik olarak normal olabilir ve bir oositi dölleyebilir. Oositin, DNA hasarının türüne, oosit kalitesine ve yaşına bağlı olarak DNA hasarını onarabildiğine dair kanıtlar vardır, ancak destekli üreme tekniklerinde önemli sayıda kadın hastada ileri yaş veya yumurtalık infertilite nedeni vardır DNA onarımının doğal kapasitesini zorlayabilir.

Erkeklerde yüksek DNA sperm fragmentasyonu infertilite, doğurganlık da nükleer vakuolizasyon, anormal kromatin yoğunlaşması, semende artmış CD4 ve CD8

T lenfositleri veya sperm DNA fragmentasyonu ve gebelik kaybı gibi semen kalitesi arasındaki bağlantıları göstermektedir. Bu bağlamda semen çalışmasında önemli bir parametre de oksidatif stres (OS), aslında sperm DNA hasarının ve erkek kısırlığının nedenlerinden biri, ROS üretimi vücudun kendi doğal antioksidanını aştığında ortaya çıkan dengesiz reaktif oksijen türlerinin (ROS) varlığıdır. ROS, sperm çekirdeğindeki DNA'nın bütünlüğüne saldırır, bu da baz modifikasyonlarına, iplik kopuşlarına ve kromatin çapraz bağlantısına neden olur. Bu işlem özellikle kompaksiyon kötü olduğunda ve kromatin protaminasyonu eksik olduğunda mümkündür düşük sonuçlar ve ayrıca gebelik kaybında artış ile ilişkilidir.

Çalışmamızda, sperm dondurma çözme işlemi sonrası sperm DNA kondensasyonunda değişim olup olmadığını incelemek, varsa bu değişimin azalan motilite ile korelasyonu olup olmadığını belirlemek, ayrıca semeni raw hali veya yıkama sonrası dondurmanın motilite, morfoloji ve DNA kondensasyonu üzerine etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Ayrıca DNA fragmentasyonu belirlemek için ise Akridin turuncu testi (Acridine Turuncu Test) kullanılmıştır. Bunun yanında çalışmada akridin turuncusunun asitli ortamda yeşilden kırmızıya dönüşmesi ile DNA denatürasyon genişliği floresan mikroskopta değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Seminal Vezikül

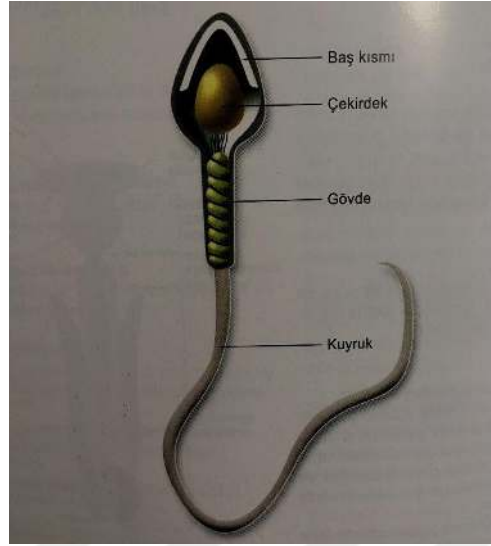
Seminal sıvının % 50 ile %70 arasında değişen çoğunluk kısmı sarı viskoz seminal vezikül sekresyonundan oluşur. Salgı, fruktoz, amino asit, prostaglandin, askorbik asit, basit şekerler ve seminal veziküle özgü proteinleri içerir. Fruktoz, boşaltılmış spermin ana enerji kaynağıdır. Boşalma sırasında, seminal veziküllerin düz kasının kasılması sonucunda, salgı ejakülatuar kanala boşaltılır ve spermatozoan üretradan dışarı atılır (Gardner D. K. ve ark., 2010). Fruktoz ölçümü seminal veziküllerin salgılama fonksiyonunu göstermek için yapılır. (WHO 5.baskı, 2011).

2.2.Spermin Yapısı

Sperm kelimesi Latince spermatozoon ve çoğul olarak spermatozoa şeklinde kullanılır. Spermatozoon erkek olgun germ hücresi olarak tanımlanır. Sperm uzunluğu yaklaşık 60 µm'dir. Baş, boyun ve kuyruk bölümlerinden oluşur. Kafanın uzunluğu 3-5 µm ve genişliği 2-3 µm'dir. Başın ön kısmı akrozom adı verilen bir kılıfla kaplıdır. Akrozom kesesinde yumurta zarını delmek için hidrolitik enzimler (hiyalüronidaz, akrosin, proteazlar, asit fosfatazlar) gereklidir (Fawcett D.W., 1965).

Boyun adı verilen kısım, spermin kuyruk ve kafası arasında 0.5 mikrometrelik kısa bir segmenttir. Mitokondri burada bulunur ve sperm hücresine gerekli enerjiyi sağlayan mitokondri tarafından sağlanır (Curry M.R., 1995). Sperm boynunun sentrozomu organelde bulunur. Centrozom sperm kuyruğunun ilk kısmıdır. Centrozomun görevi yumurtayı bölmek ve çoğaltmak ve embriyo gelişim sürecini başlatmaktır.

Spermin kuyruk kısmı 45-50 mikrometre boyundadır. İnsan sperminin kuyruğu üç kısma ayrılır: orta kısım, ana kısım ve son kısım. Kuyruğun merkezinde, 9 + 2 düzenlemesine uyan 9 dış çift mikrotübül ve ortada bir çift mikrotübül vardır. Mikrotübül yapısı kalın fibrillerle çevrilidir ve bu dış fibriller kuyruğa diklik verir. Aksonem hareketlilik sağlıyor. Flagellum ile spermatozoa hareketi yapar.



Şekil 2.1. Bir sperm hücresinin kısımları

Kaynak: Süzen B., 2012

2.3.Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonial hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucunda olgun sperm hücresinin hücre farklılaşması ile oluşmasıdır. Spermatogenez sırasında spermatozoa, normal sperm fonksiyonu için gerekli epididimal olgunlaşmayı morfolojik ve fizyolojik olarak girer. Bu nedenle, spermatogenez sırasındaki bir kusur hatalı sperm üretimine neden olur (Shafik A. ve ark. 2006).

Spermatogenez 3 aşamada incelenir. Bu aşamalar aşağıda ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır.

2.3.1. *Spermatositogenez (Proliferasyon)*

İnsanlarda 3 tip spermatogenetik hücre vardır: Karanlık tip A, açık tip A, tip B. Karanlık tip A spermatogonyumlar kaynak hücrelerdir ve gerekirse açık hücreler oluşturur. Taban zarı, yuvarlak, büyük hücreler ve boyama özellikleri üzerinde bulunan her üç tip spermatogenik hücre histolojik bölümlerde ayırt edilebilir (Clermont Y., 1972).

Tip A spermatogoni Tip B spermatogoni, bölünerek formla çoğaltılır. Birincil spermatositler, B Tipi spermatogoninin bölünmesiyle oluşur. Birincil spermatositler 46 kromozom (44 + XY) ve 4n DNA (n haploid kromozomu) içerir. Birincil spermatositler, oluşumlarından hemen sonra ilk mayotik bölünmenin profazına girerler. Bu bölümün faz evresi yaklaşık 22 gün sürer (Özdamar S. ve ark., 2002).

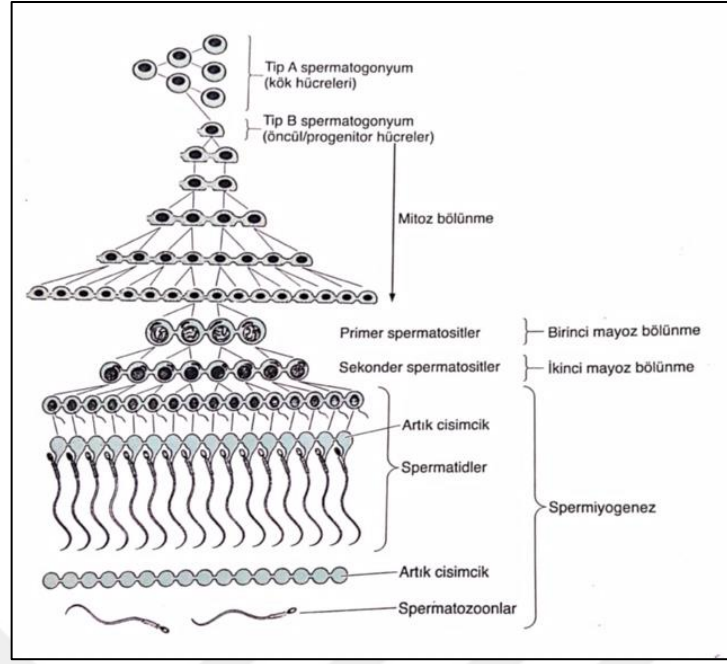
2.3.2. Mayoz bölünme

Primer spermatositler birinci mayoza girer ve DNA'larını replike ederler. Birinci mayozu tamamlaması sonucu oluşan sekonder spermatositler homolog kromozomların yarısını (23 haploid kromozom) ve DNA'nın yarısını (2n DNA) taşırlar. İkincil spermatositler ikinci mayoz bölünür ve spermatid içeren 23 haploid (n DNA) kromozomu oluşturur.

2.3.3. Spermiyogenez (farklılaşma)

Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Mayoz bölünmeler sonucu oluşan spermatitlerin sertoli hücrelerinde gelişme ve farklılaşma sürecidir. Bu işlemin sonunda, spermatidler olgun spermyum olarak seminifer tübülün lümenine atılır (Fawcett D.W., 1965).

Lümen içindeki Sertoli hücresi tarafından beslenir ve yeniden şekillendirilir. Böylece yavaş yavaş spermatozoon olur. Spermatozoaya dönüşüm sırasında sitoplazmanın bir kısmı kaybolur, çekirdek kromatin yeniden düzenlenir, kompakt bir kafa oluşur ve kuyruk gelişir (Hassa H., 2003).



Şekil 2.2. Erkek germ hücrelerinin oluşumu

Kaynak:Junqueira L.C. ve ark., 1998.

Spermiyogenez aşaması ise 3 aşamada meydana gelir. Spermidogenez, sekonder spermatositlerin olgun spermyumlara bölünmesiyle oluşan spermatid hücrelerinin transformasyonu olgusudur. Bu süreçte akrozom formları, çekirdek yoğunlaşır ve büyür, flagellum gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybolur. Sonuç olarak, olgun spermatozoon seminifer tübülün lümenine salınır (Junqueira L. C. vd., 1998).

Spermiyogenez aşaması **golgi fazı, akrozomal faz ve maturasyon fazı** olmak üzere üç fazdan oluşmaktadır. Bu fazlar aşağıda açıklanmıştır.

- **Golgi Fazı**

Spermatidlerin sitoplazmasında, belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondri, bir çift sentriol, serbest ribozom ve çekirdeğin yakınında bir endoplazmik retikulum vardır. Çekirdek üzerindeki akrozom bölgesi, spermin ön kutbunu belirler. Sperm gelişiminin bu aşamasında, mitokondri aniden sitoplazmanın kenarına göç eder ve plazma zarına yakın yerleşir. Akrozom granülü ve vezikülü oluşturulurken, birbirine dik iki silindirik merkezkaç, oluşan akrozomun çekirdeğin arkasına doğru ters yönde hareket eder (Junqueira L.C. ve ark., 1998).

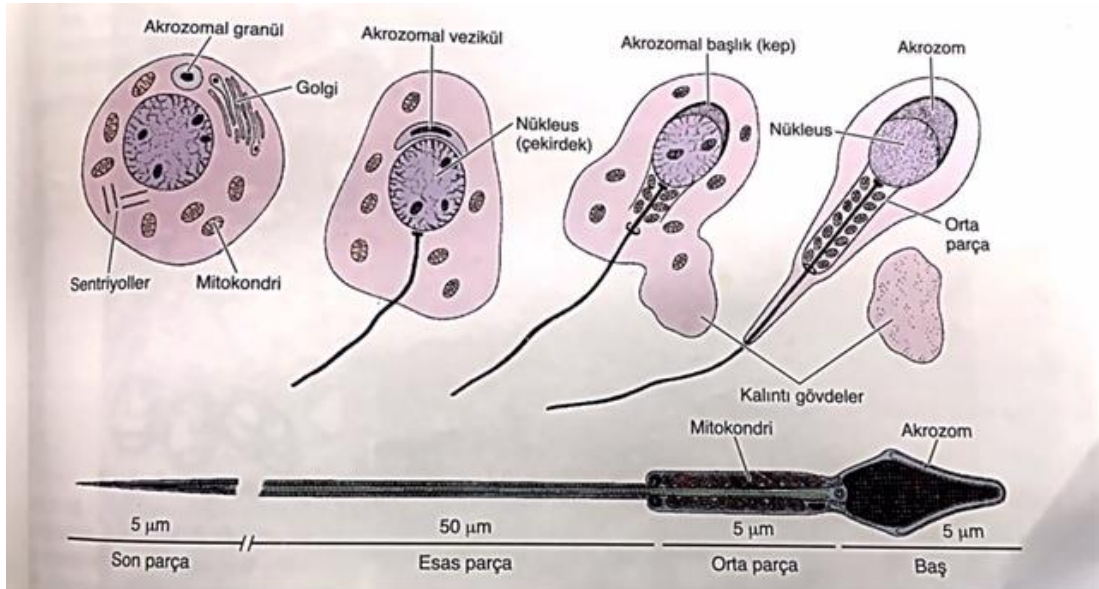
- **Akrozomal faz**

Akrozom vezikülü ve granülü çekirdeğin ön kısmını kaplayacak şekilde yayılır ve buna akrozomlar denir. Akrozom, hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve bazı hidrolitik enzimleri içerir. Bu nedenle, bir lizozom gibi davranır ve korona yayılan hücreleri birbirinden ayırır ve bu enzimler zona pellucidayı sindirir.

Aynı zamanda, merkezlerden biri flagellum'u oluşturmak için gelişir. Mitokondri, kırbaçların proksimal kısmının etrafında oluşur ve 'orta kısım' adı verilen kalınlaşmış bir alan oluşturur. Bu bölge spermatozoon hareketinin kaynağıdır. 9 + 2 mikrotübül aksonem yapısıdır. Mitokondri, kuyruğun orta kısmında sarmal bir kılıf oluşturur (Junqueira L.C. ve ark., 1998).

- **Maturasyon fazı**

Bu aşamada spermatid sitoplazma sertoli hücreler tarafından atılır ve fagositozlanır. Sertoli hücreleri daha sonra spermatidleri tübül lümenine doğru serbest bırakır (Junqueira L.C. ve diğerleri, 1998).



Şekil 2.3. Spermiyogenez fazlarının oluşumu

Kaynak:Junqueira L.C. et al., 1998

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Semen Analizi

Semen analizi, kısırlık ile başvuran bir çiftte erkeklere uygulanan temel testlerden biridir. Semen analizi, spermatozoa, seminal plazma, sperm olmayan hücreler ve birçok faktörün değerlendirilmesi için önemli bir tanı testidir.

Semen analizi, sonuçları standartlaştırmak için en az 72 saat boyunca standart cinsel perhiz gerektirir. Bu süre 48 saatten az veya 7 günden fazla olmamalıdır. Semen parametreleri doğurgan erkeklerde bile zaman içinde değişebilir, bu nedenle en az 2 sperm örneği en az 2 haftalık aralıklarla incelenmelidir.

3.2. Semen Makroskopik Olarak İncelenmesi

Semen analizi işlemine, sıvılaştırmadan hemen sonra başlanmalıdır. Tüm numune genellikle oda sıcaklığında 15 dakika içinde sıvılaştırılır, bu da nadiren 60 dakika veya daha fazla sürebilir. Altmış dakika içinde tam sıvılaşma meydana gelmezse, bu kaydedilmelidir. Analiz, boşalmadan sonra en fazla bir saat içinde 30 dakika içinde yapılmalıdır, böylece dehidrasyon veya sıcaklık değişimi semen kalitesini olumsuz etkilemez. (DSÖ 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:** Boşalmadan sonra spermanın sıvı halden yarı katıya dönüşmesidir. Veziküller ve epididimal proteinler nedeniyle semende pıhtılaşma meydana gelir. Pıhtılaşma olmadığında seminal vezikül veya vas deferens olmadığından şüphelenilir (Du Plessis S.S., 2013).
- **Likefaksiyon (sıvılaşma süresi):** Seminal sıvının tekrar sıvı hale geçmesidir. Prostat salgılanan prostata özgü antijen (PSA) veziküler proteinlerin etkileşimi

ile ortaya çıkar. Genellikle pıhtılaşmadan sonraki ilk 15 dakika içinde ortaya çıkar. Ancak, 60 dakika kadar sürebilir. Nadiren sıvılaşma olmayabilir ve mekanik veya enzimatik çözünme gerektirebilir. Sıvılaşma normal prostat fonksiyonunun bir göstergesi olarak kabul edilir. (Mikhailichenko V.V. ve Esiov A.S., 2005).

- **Görünüm:** Homojen ve gri-opak görünümündedirler. Normal kokuya prostat sekresyonu ve oksidasyon neden olur. Anormal kokular enfeksiyonun göstergesi olarak kabul edilir. Sperm konsantrasyonu çok düşükse, daha az opak görünebilir; renk de değişebilir: örn. eritrositler varsa kırmızı-kahverengi (hemospermi) veya hasta ikterikse veya bazı vitaminler veya ilaçlar alıyorsa sarıdır.
- **Hacim:** Uygun cinsel perhiz süresi sonrası normal hacim 1,5 - 6 ml çıkması gerekmektedir.
- **Semen pH'sı:** PH kâğıdına bir damla semen yerleştirilir ve 30 saniye içinde renk değişimi kalibrasyon çubuğuyla karşılaştırılır. Normal pH seminal vezikül sekresyonlarından dolayı alkalidir. Normal bir numune için alt referans değeri 7,2'dir.

3.3. Semen Mikroskopik Olarak İncelenmesi

Semen numunelerinin makroskopik olarak incelenmesinin ardından, spermden 10 µl alınarak Makler sayım kamerasında bir değerlendirme yapılır. Bu değerlendirmede sperm konsantrasyonu faz-kontrast mikroskobu ile değerlendirilir. Hazırlanan numune mikroskopta 100 kat büyütme ile taranır. Bu büyütme 10x büyütme objektif ile 10 kat büyütme okülerin birleşimi ile sağlanabilir. Hazırlanan bu preparatta mikroskoptan bakılarak;

- Sperm sayısı, sperm hareketliliği ve sperm morfolojisi
- Sperm agregasyonu/aglütinasyonu
- Epitel hücreleri gibi spermatozoa dışında kalan hücrelerin varlığı

- Lökositler ve immatür germ hücreleri ve izole olmuş sperm başları yahut sperm kuyruklarının bir değerlendirmesi yapılır (DSÖ, 5.baskı, 2010).

Bu değerlendirme esnasında dikkat edilmesi gereken en önemli noktalardan birisi spermin muhafaza sıcaklığıdır. Numuneler değerlendirilme esnasında 20 - 37°C sıcaklıklarında muhafaza edilmelidir. Sıcaklığın yanında muhafaza süresine de ayrıca dikkat edilmelidir. Motilitenin değerlendirmesi; likefaksiyonu takip eden 30-60 dakika içerisinde tamamlanmalıdır.

3.3.1. Sperm Konsantrasyonu

Sperm konsantrasyonu, tüm ejakülattaki toplam sperm sayısıdır ve daha minimum referans değeri 39×10^6 / ml'dir. Sperm konsantrasyonunun toplam hacim ile çarpılmasıyla bulunabilir.

Spermada semeni olmayan hastalar 15 dakika boyunca 3000 g'de santrifüjlenmeli ve azospermi pelet muayenesi olmadan teşhis edilmemelidir. Azospermi sperm tanısı alan erkeklerin ayrıntılı muayenesi sonucunda bulunabilir (Olshan A.F. vd., 1995).

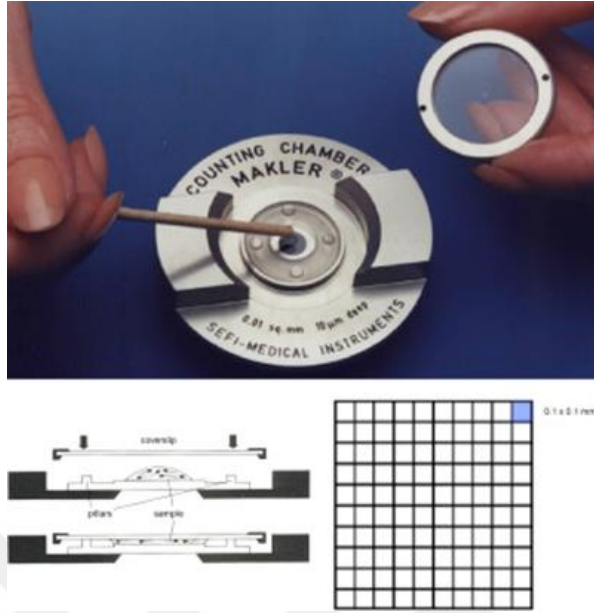
3.3.2. Makler Sayım Kamerası

Sperm sayılarının belirlenmesinde kullanılan Makler sayım kamerası 10 µl derinliğindedir. İki parça camdan oluşur. Üst cam, her biri 0.1x0.1 mm olan 100 kareye bölünmüş 1 mm²'lik ince çizgilere sahiptir.

Sıvılaştırılmış ve karıştırılmış spermadan küçük bir seyreltilmemiş semen damlası diskin ortasına yerleştirilir, yerleştirilir ve sayılır. Spermiler on kare içinde yukarıdan aşağıya veya soldan sağa yan yana sayılır. Bulunan sayı, mL başına milyon sperm sayısını gösterir.

Sperm sayma alanında (yukarıdan aşağıya veya soldan sağa yan yana 10 kare), hareketsiz spermiler sayılır ve hareketli sperm sayısı, toplam sperm sayısı ile orantılı

olarak hesaplanır. Bu işlem birçok alanda tekrarlanır ve ortalaması alınır. Daha sonra hareketlilik yüzdesi ve kalitesi hesaplanır. (Demirel E., 2006).



Şekil 3.1. Makler sayım kamerası

3.4.Sperm Hareketlerinin Sınıflandırılması

Makler sayım kamerasında incelenen sperm preparatlarının hareketlerinin sınıflandırılması belirli standartlar çerçevesinde olur. Dünya Sağlık Örgütü'nün tavsiye etmiş olduğu bu standardizasyonda spermeler a,b,c ve d şeklinde derecelendirilmek yerine ileri hareketli, yerinde hareketli ve hareketsiz olarak kategorize edilmiştir(DSÖ 5.baskı, 2010). Bunların Makler kamera altındaki görünüş ve hareketleri şu şekildedir;

- **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):** Herhangi bir hareket belirtisi olmayan spermatozoa.

3.4.1. *Sperm Aglutinasyonu*

Hareketli spermilerin birbirlerine yapışarak bir arada kalma durumudur. Bu yapışmalar baş-baş, kuyruk-kuyruk yahut karışık bir şekilde olabilir. Grade 1-4 olarak sınıflandırılır. (DSÖ 5.baskı, 2010).

3.4.2. *Sperm Canlılığı*

Sperm yaşayabilirlik testleri, progresif hareketli sperm %40'dan küçük olduğu durumlarda özellikle önemlidir. Hücre zarı bütünlüğü belirlenir. Canlı sperm yüzdesi bozulmamış zar hücrelerinin boyanması veya hipotonik şişme testi ile saptanmasıyla değerlendirilir. Eozin-nigrosin veya eosin-Y testinde, zara zarar görmüş spermatozoa boyayı alır ve lekelenir.

3.4.3. *Sperm Morfolojisi*

Teratospermi olarak adlandırılan morfolojide görülen anormallikler sperm baş, boyun ve kuyruğuna göre sınıflandırılır. WHO kriterlerine göre, normal morfolojisi olan sperm yüzdesi %30'un üzerinde olmalıdır. Kruger'ın kesin kriterleri, DSÖ tarafından kullanılan, değerlendirmenin aynı morfolojik özelliklerini alan, ancak aynı zamanda sınırda anormal olarak kabul edilen spermatozoayı yapan daha katı kriterlerdir (Kruger T.F., 1988).

Tablo 3.1. Kruger Kesin Kriterlerine Göre Sperm Morfolojisi

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
Sitoplazmik Damlacık	Baş alanının % 30-70'inden az sadece orta parçada lokalize

Kaynak: Kruger T.F, 1986

3.4.4. Sperm Morfolojik Anomalileri

Mikroskopik incelemelerde görülen, spermin normal morfolojisi dışında; baş, boyun ve kuyruk bölgesinde görülen çeşitli morfoloji anomalileri vardır. Bu anormal morfolojiler şu şekilde sınıflandırılır;

- **Baş anomalileri:** Normalden daha 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:** Baş kısmının asimetrik olarak orta parçaya girmesi, kalın olması ya da düzensiz bir formda olması, ince olması veya bunların bir arada bulunması şeklinde olur.
- **Kuyruk anomalileri:** Kuyruk kısmının kısa olması, birden çok sayıda bulunması, kırık, keskin açılı, koil formda olması, düzensiz olması yahut bunların bir arada bulunması şeklinde olur.

Tablo 3.2. Dünya Sağlık Örgütü (2010) Sperm Kriterleri

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

3.5.Dünya Sağlık Örgütü Parametrelerine Göre Sperm Analizi Terminolojilerinin Tanımları

- **Aspermi:** Seminal sıvının yokluğu aspermi olarak adlandırılır. Azospermiden (seminal sıvıda sperm yokluğu) ayırt edilmelidir. Asperminin nedenleri arasında retrograd ejakülasyon, vasküler, hormonal ve erektil disfonksiyon bulunur.
- **Hipospermi:** Ejekulat hacmi 1,5 ml'den azdır. Hiposperminin nedenleri arasında prostat, seminal vezikül ve vazdeferensin enfeksiyonu, travma ve tümörler; androjen eksikliği, ejakülatör kanalların tıkanması ve retrograd ejakülasyon.
- **Hiperspermi/ polizoospermi:** Sperm yoğunluğu sürekli olarak 250 milyon / ml'den fazladır. Prostat ve seminal vezikül enfeksiyonunda veya cinsel ilişki nadir olduğunda ortaya çıkar.
- **Ejakulatta koagülasyon bozukluğu:** Ejekülatın pıhtılaşmaması durumudur. Seminal vezikül patolojilerinde görülür.
- **Ejekülatta likefaksiyon bozukluğu:** Ejekülatın likefiye olmaması durumudur. Prostat ve bulbo- üretral bezin patolojilerinde görülür.
- **Azospermi:** Ejekülatta herhangi bir sperm hücresinin olmamasıdır. Azospermiye genetik bozukluklar, hormonal değişiklikler, germinal aplazi, bilateral vas deferens yokluğu ve boşalma kanallarındaki engeller neden olabilir.
- **Oligozoospermi:** Sperm konsantrasyonunun 15 milyon/ ml' nin altında olmasıdır. Kendi içinde iki grupta incelenir.
 - a.Hafif Oligozoospermi:** Sperm konsantrasyonunun 5- 15 milyon/ ml' nin arasında olmasıdır.

b.Şiddetli Oligozoospermi: Sperm konsantrasyonunun 5 milyon/ ml' nin altında olmasıdır.

- **Astenozoospermi:** İleri hareket eden spermatozoanın% 40'tan düşük veya ileri hareket eden spermatozoanın% 32'den düşük olduğu durumdur. Isı nedeniyle birçok konjenital (Kartegener Sendromu), enfeksiyon, ilaç oluşabilir.
- **Teratozoospermi:** Normal sperm yapısının %4 ün altında kalması olması durumudur. Teratozoospermiye sebep olan durumlar arasında kromozomal bozukluklar, toksik maddeler, seminal kanallarda deformasyon ve epididim enfeksiyonu vardır.
- **Astenoteratozoospermi:** Spermilerin motilite ve morfolojik incelemesinin her ikisinde normal sınırların altında olmasıdır.
- **Oligostenoteratozoospermi:** Spermilerin sayı, motilite ve morfolojik incelemesinde üçünün birden normal sınırların altında olmasıdır.
- **Nekrozoospermi:** Nekrozoospermi, numunenin %25'ten fazla ölü sperm hücresi içerdiği anlamına gelir. İdiyopatik olabilir; toksik maddelerle temas, Kartegener Sendromu ve azalmış cinsel ilişki de ortaya çıkabilir.
- **Lökositospermi:** Semen içinde bulunan lökositlerin mililitrede 1milyon adetten fazla olmasıdır.
- **Hipospermi:** Semen hacminin 1 mililitre veya bu değerden daha az olması durumudur.
- **Hiperspermi:** Semen hacminin 6 mililitreden daha çok olması durumudur.
- **Nükleer Anomali:** Sperm hücresinin başının toplu iğneye benzer şekilde bir şekil almasıdır.
- **Globozoospermi:** Sperm hücresinin baş kısmında bulunan akrozomun bulunmamasıdır.

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

3.6. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Erkeklerde görülen infertilitenin teşhisi, semen parametrelerinin değerlendirilmesine dayanır. Bununla birlikte, bu parametrelerin hiçbirinin sadece bir çiftin doğurganlık potansiyelini değerlendirmede güvenilir olmadığı bilinmemektedir. Özellikle açıklanamayan infertilite hastalarında bu parametreler referans sınırları içindedir. Kabul edilen standartlara göre; hasarlı sperm sayısının% 15'ten az olması beklenir. % 15-30 ara adım; Spermiyogram sonucu% 30'dan fazla anormal sperm bulunan erkeklerin yüksek DNA fragmantasyonu olduğu düşünülmektedir. (Ashok A. ve ark., 2016).

3.7. Sperm DNA Yapısı

Sperm kromatin, DNA ve sperm nükleer proteinlerinin sıkı paket şeklinde dizilmesiyle oluşur. Bu nükleer proteinler çoğunlukla temel özellikler gösteren P1 ve P2 protaminleridir. DNA şeritleri düzenli ve sıkı ilmekler oluşturmak için bu protaminlerin etrafına sarılmıştır (Filatow M. V. ve diğ., 1999). Spermatozoa kromatin yapısı bu şekilde protaminlerle sıkıca doldurulurken, ilmeklerin %15'i daha gevşek bir yapıda paketlenir.

Spermiyogenez sırasında protaminlerin yerini histonlar alır. TP1 ve TP2 proteinleri bu geçişte aktiftir (Filatow M. V. ve diğerleri, 1999).

3.7.1. Sperm DNA Hasarları

Sperm DNA parçalanması, spermatogenez sırasında kromatinin yanlış paketlenmesi, ejakulat öncesi apoptoz, ejakülatta büyük miktarlarda reaktif oksijen türünün oluşması, endüstriyel veya çevresel toksinlere maruz kalma, genetik, oksidatif stres veya sigara içilmesinden kaynaklanabilir (Elder K. ve Dale B.,2014).

Sperm DNA'nın herhangi bir onarım mekanizması yoktur. Somatik hücrelerin aksine, spermdeki DNA hasarı daha kötü embriyonik sonuçlara neden olabilir. Kromozomal anormallikler nedeniyle döllenme ve embriyo gelişiminde sorunlar ortaya çıkabilir (Bordignon V. ve Smith L.C., 1999).

Bu noktada, bir onarım mekanizması olan oositin sperm DNA'sındaki tek zincirli kırıkları çift zincirli kırıklardan daha kolay onarabildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, onarım DNA hasarı çok büyükse, embriyo tüm paternal DNA'yı parçalayabilir (Yamauchi Y. ve ark. 2007).

3.7.2. Sperm DNA Fragmentasyonu

Sperm DNA'sının boyutu yaklaşık 60 kb'dir. Sperm nükleoproteinleri % 80 sıkıştırılmış yapıda bulunur. P1 ve P2 protaminleri içeren sperm DNA, P1 protamin P2'den daha yoğundur.

P2 protamin'in bu düşük yoğunluklu yapısının sperm DNA'sında herhangi bir onarım mekanizması yoktur. Somatik hücrelerle karşılaştırıldığında, spermdeki DNA hasarı daha kötü embriyonik sonuçlara neden olur. Çünkü sperm DNA'sının herhangi bir onarım mekanizması yoktur. Baba genomunun ekspresyonu başlar başlamaz, kromozomal sapmalar döllenme ve embriyo gelişiminde sorunlara neden olabilir. (Bordignon V. ve diğerleri, 1999).

Bu gibi durumlarda, oositlerin sperm DNA'sındaki tek zincirli kırıkları çift zincirli kırıklardan daha kolay onarabildiği bilinmektedir. Bununla birlikte, onarım DNA hasarı çok büyükse, embriyo tüm baba DNA'sını bozabilir. (Yamauchi Y. ve diğerleri, 2007).

3.7.3. Spermatozoa Kromatin Paketlenmesi

Sperm hücresi kromatini, DNA ve sperm nükleer proteinlerinin sıkı paketlenmesi sonucu oluşur. Bu nükleer proteinler P1 ve P2, temel özelliklere sahip protaminlerdir. Sperm DNA zincirleri düzenli ve sıkı döngüler oluşturmak için bu protaminlerin etrafına sarılmıştır. Sperm kromatinin çoğunluğu protaminlerle sıkıca

doldurulurken,% 15'i histonlarla gevşek olarak dolduruldu. Bu oranın infertil erkeklerde arttığı, bu oranın fertil erkeklerde korunduğu gözlemlendi. (Oğuz Y., 2013; Tesarik J. ve Greco E., 2002; Ashok A. ve ark., 2017).

3.7.4. Reaktif Oksijen Türevleri (ROS)

Serbest radikaller yüksek enerjili, kararsız bileşiklerdir. Spermada ROS kaynağı, anormal morfolojiye sahip lökositler ve spermatozodur. Spermada lökositler prostat ve epididimdir. Lökositler mikroorganizmalara direnirken çevreye süperoksit (O_2^-) yayar. Bu süperoksit anyonu, hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil grubu (OH^-) veya hipoklorit (ClO^-) gibi toksik maddeler üretmek için diğer ROS ve oksidanlarla reaksiyona girer. (Lamirande E.D. ve Gagnon C., 1993; Baker M. A. ve Aitken R.J., 2005). Bahsi geçen bu mekanizmalar, spermin genetik yapısı ve morfolojisinde hasara yol açar.

3.8. Sperm DNA Fragmentasyon Analizi

Literatürde kabul edilen standartlara göre; hasarlı sperm sayısının %15'ten az olması beklenir. % 15-30 ara bölge ve spermiyogram sonucu %30'dan fazla anormal sperm bulunan erkeklerin yüksek DNA fragmentasyonu olduğu belirlenmiştir. ICSI için bu kadar yüksek DNA fragmentasyonu olan sperm numuneleri kullanıldığında başarısız döllenme oranları, gebelik kayıpları ve yavaş embriyo gelişimi gözlenmiştir. (Ashok A. ve ark., 2016).

Tablo 3.3. Sperm DNA Fragmentasyon Sınıflandırması

DFI < %15	İyi Fertil Fertil Potansiyel
% 15- 30 DFI	Orta Fertil Potansiyel
> %30 DFI	Kötü fertil potansiyel

3.9. Akridin Oranj Testi (AOT)

Akridin turuncu, nükleik asite özgü, bir çeşit katyonik floresan boyadır. Çift sarmal ya da tek sarmal DNA'ya bağlandığında floresanın mikroskop altında görünürlüğü farklı olur. Mikroskop altında yeşil olarak görünenler normal DNA'ya sahip spermatozoaları, sarı ve kırmızı olarak görünenler ise DNA hasarı olan spermatozoaları gösterir. (Cebesoy F.B ve ark,2006; Khalili M.A. et al., 2006). Lizin ihtiva ettiği için anilin mavisiiyle renk almayacaktır. (Agarwal A. et al., 2017).

3.10. Sperm Kriyoprezervasyonu

Sperm kriyoprezervasyon işlemi ilk olarak 1949 yılında Polge ve arkadaşları tarafından gliserol kullanılarak yapılmıştır (Mazur P., 1984). İşlemin amacı, bir yaşam hücresinin veya dokusunun, işlev kaybı olmaksızın minimum hasarla düşük sıcaklıkta uzun süreli depolanmasıdır (Wetzels A.M.M., 1996).

Sperm kriyoprezervasyonunun genel prensibi; malzemenin kriyopresektanlarla stabilize edilmesinden sonra, soğutma, -196°C'de sıvı azot içinde depolanması ve spermin ve gelişmiş fizyolojik ortamın canlılığını korumak için kriyoprotektanların çözündürülmesi geçmektedir (Gardner D.K., 2007). Kriyoprezervasyon sürecinde kullanılan kimyasallar, donma-çözülme yöntemi canlılığı etkileyebilecek yöntemlerdir. Fizyolojik ısı ve çevre sırasında soğutulacak ve düşük sıcaklıklarda soğutulacak malzeme dikkatle yapılması gereken süreçlerdir (Schroeder A. C. vd., 1990). Sperm kriyoprezervasyonu için mevcut endikasyonlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir (Davis N.S., 1997).

- Cerrahi yöntemlerle sperm elde edilmesi halinde,
- Kemoterapi ve radyoterapi gibi gonad hücrelerine zarar verebilecek sitotoksit tedaviler öncesinde özellikle genç bireylerde,
- Üreme fonksiyonlarının kaybedilmesine yol açacak olan ameliyatlara (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,

Aynı düzenlemeye göre, üreme hücreleri ve gonad dokuları, bu malzemelerin güvenliği için donör adayının DNA analizi ile birlikte depolanmaktadır (Sanger W.G. et al., 1992).

Farklı maturasyon aşamalarına sahip spermilerin dondurma ve çözme yöntemleri de birbirinden farklıdır. Ejakülat sperm, kriyoprezervasyonda testiküler ve epididimal spermlerden daha duyarlıdır. Kriyoprezervasyondan sonra, serbest oksijen radikallerinin (hidrojen peroksit vb.) Üretimi arttıkça motilite, canlılık ve dölleme kapasitesi azalabilir (De Lamirande E. et al., 1997).

3.11. Kriyobiyojinin Temelleri

3.11.1. Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar gamet hücrelerini dondurmak için kullanılan koruyuculardır. Koruyucu özellikleri yüksek oranda H₂ (hidrojen) bağları oluşturur ve buz kristallerinin boyutunu azaltır (Sanger W. G. vd., 1992).

Kriyoprotektanlar fonksiyonel olarak 2'ye ayrılır: geçirgen ve geçirgen olmayan kriyoprotektanlar. Geçirgen kriyoprotektanlar hücreye, geçirgen olmayan kriyoprotektanlar hücreye geçemez (Delilbasi L., 1997).

3.11.2. Permeabl (İnternal) Kriyoprotektanlar

En yaygın olarak kullanılanlar DMSO, gliserol, etilen glikol ve propilen glikoldür (PROH). Bu kriyoprotektanlar hücre zarına girer ve etkilerini gösterir. Koruyucu etkileri, dondurma sırasında elektrolit konsantrasyonunun azaltılması,

dehidrasyonun düzenlenmesi ve protein yapılarının korunması ve düşük sıcaklıkların neden olduğu ozmotik büzülmenin azalmasından kaynaklanır (Leeuw F.E.D. et al, 1993).

3.11.3. Nonpermeabl (Eksternal) Kriyoprotektanlar

Monosakkaritler (glikoz, heksoz), disakkaritler (sükroz) ve trisakkaritler (rafinoz) hücre dışı koruyuculardır. Bu koruyucular hücre zarını ozmotik basınca esnek hale getirir ve hücre şişmesini önler (Arav A. ve ark. 1993).

3.11.4. Kriyoprezervasyon Hasarları

Kriyoprezervasyon sırasında hücrelerin strese maruz kalma durumuna kriyoprezervasyon hataları denir. Kriyoprezervasyon hasarlarının sebepleri:

- Hücre içi buz kristallerinin oluşumu
- Yoğun dehidratasyon
- pH değişiklikleri
- Protein denatürasyonu

Ani sıcaklık düşüşüne bağlı hücre yapısı ve fonksiyon hasarı, membran geçirgenliği ve hücre iskeleti yapısındaki değişikliklerle ilişkilidir (Elder K. ve Dale B., 2013).

Kriyoprezervasyon sırasında en temel hücre hasarı donma ve özellikle de çözündürme aşamasındadır. Hücreler aniden donarsa, hücre dışındaki su transferi ani ve aşırı olacağından membranda ozmotik hasar meydana gelir. Hızlı yerine yavaş yavaş çözülürse, bu sefer hücre içi buz kristalleri birleşebilir ve birbirleriyle büyüyebilir ve tekrar hücre zarına zarar verebilir. Yavaş dondurma ve hızlı çözündürme bu nedenle önemlidir (Albert B. ve ark., 2008). Kriyoprezervasyonda hücre hasarının nedenleri, buz kristallerinin neden olduğu yapısal hasarlar ve oksidatif stresle ilişkili reaktif oksijen radikallerinin neden olduğu hasarlar olarak özetlenebilir. Bununla birlikte,

spermelerde en yaygın kriyo-hasarlara membran hasarı, organel hasarı ve DNA bütünlüğüdür (DNA parçalanması).

En uygun dondurma çözme protokollerinin uygulanmasından sonra bile (genellikle çözöldükten sonra),% 30-50 motilite kaybı gözlenir (Paoli D. vd., 2014). Donma hasarı, sperm motilitesi, sperm oosit füzyon kapasitesi düşebilir veya çözölmeden sonra döllenme olumsuz yönde etkilenebilir. Serbest oksijen radikallerinin (hidrojen peroksit gibi) üretimi artabilir.

Her ne kadar kriyoprezervasyon ve DNA fragmentasyonu arasında açık bir korelasyon gösterilmemesine rağmen, genel olarak, düşük sperm kalitesine sahip numunelerin kriyoprezervasyon kaynaklı DNA hasarı ve hücre ölümüne karşı artan bir duyarlılığa sahip olduğı gözlenmiştir (Paoli D. ve ark., 2014) ; Said TM ve diğ., 2010).

3.11.5. Kriyoprezervasyon Teknikleri

Dondurma işlemi sırasındaki dondurma oranı, hücre özelliğıyle eşleşmelidir. Yavaş soğutmada, büyük miktarlarda buz kristalleri oluşur ve boyutları farklılık gösterir. Bununla birlikte, ani soğutmada buz kristalleri daha küçüktür ve çok hızlı oluştuklarından, küçük hücreler aralarında sıkışır ve daha fazla hayatta kalma oranı gösterir. Hızlı dondurma prosedürlerinin yavaş dondurma protokollerinden en önemli farkı, kullanılan kriyoprotektan maddelerin yüksek konsantrasyonudur.

Kriyoprezervasyonun genel prensibi; malzemenin kriyopresektanlarla stabilize edilmesinden sonra, soğutma, -196°C'de sıvı azot içinde depolanması ve spermelerin canlılığını korumak için kriyoprotektanların çözöndürölmesi, canlılıklarını koruyabilir ve fizyolojik ortamlardaki gelişimlerini sürdürebilir (Gardner D.K., 2007).

3.12. Çalışmanın Tasarımı

Farklı semen konsantrasyonlarda sperm kriyoprezervasyonunun sperm canlılığı ve sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla, öncelikle çalışmaya dâhil edilecek tüm hastalara Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO) kriterlerine göre standart semen analizi yapılarak sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji değerlendirilecektir. Sperm canlılık oranı tespiti için eozin boyama yapılarak ışık mikroskobunda değerlendirilecektir.

Sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkisini araştırmak için yayma preparat hazırlanarak 1/3 asetik asit metanol karışımında 30 dakika oda sıcaklığına veya – 40 derecede (buzdolabında) fikse edilerek akridin oranj boyama yapılacak ve floresan mikroskop ile değerlendirilecektir.

1.deney grubu %20 lik kriyo solüsyonu (500 mikrolitre; 100 mikrolitre hasta semeni, 400 mikrolitre kriyo mediumu) ile dondurulacaktır.

2.deney grubu %50 lik kriyo solüsyonu (500 mikrolitre; 250 mikrolitre hasta semeni, 250 mikrolitre kriyo mediumu) ile dondurulacaktır.

3. Kontrol grubunda(400 mikrolitre kriyo mediumu; semen ilavesiz olarak) dondurulacaktır.

Hazırlanmış kriyo solüsyonlarına sperm pelleti üçe ayrılarak ilave edilecek ve kriyoprezervasyon işlemi uygulanacaktır. 10-15 dakika kriyo mediumunda tutulan spermeler – 40 C buzlabında yerleştirilecektir.

Çözme işlemi 37 derecede fosfat tampon veya sperm wash solüsyonu ile yıkanarak yapılacaktır. Çözme işlemi sonrası yeniden canlılık ve DNA fragmentasyonu değerlendirilecektir.

Tablo 3.4. Çalışmanın Tasarımı

Deney Grubu	Kriyo Mediumu	Toplam Hacim	İlave
1.Deney grubu	%20'lik kriyo solüsyonu	500 mikrolitre	100 mikrolitre hasta semeni, 400 mikrolitre kriyo mediumu
2.Deney grubu	%50'lik kriyo solüsyonu	500 mikrolitre	250 mikrolitre hasta semeni, 250 mikrolitre kriyo mediumu
3.Kontrol grubu	İlavesiz	400 mikrolitre	400 mikrolitre kriyo mediumu, semen ilavesiz olarak

3.13. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3.13.1. Örnek Alımı ve Spermiyogram Testi

Semen numuneleri, semenin ortam sıcaklığındaki değişikliklere maruz kalmasını önlemek ve 3-7 günlük ideal bir cinsel perhiz döneminden sonra analizler arasındaki süreyi kontrol etmek için laboratuvar yakınlarındaki özel bir odada mastürbasyon yapılarak elde edildi. Mastürbasyon sırasında yağlama maddesi kullanılmadı. Hastanın bilgileri okunaklı bir şekilde numuneye kaydedildi ve hasta gerekli bilgileri doğru bir şekilde açıkladı. Hastaya örneği dışarıya kaçırmamasını söylemek önemlidir.

3.13.2. Semen Analizi

Elde edilen semen örneği sıvılaştırma için laboratuvar ortamında bir müddet bekletildi. Sıvılaştırma işleminden sonra makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi. Makroskopik olarak hacim ölçüldü ve renk, koku, viskozite, sıvılaşma süresi ve pıhtılaşma değerlendirildi. Mikroskopik olarak değerlendirmek için, 1 damla (10ul) numune makler sayma kamerasına bırakıldı ve 200x büyütme altında yan yana 10 kare sayıldı ve mililitre başına sperm sayısı belirlendi. Daha sonra hareketlilik belirlendi. Temel sperm parametreleri (konsantrasyon, motilite, morfoloji) Dünya

Sağlık Örgütünün 2010 kriterlerine göre kaydedildi. Daha sonra morfoloji hematoksin boyama ile değerlendirildi.

3.13.3. Sperm DNA Fragmentasyonun Belirlenmesinde Akridin Oranj Boyama İşlemi

Her hastadan alınan numune, hazırlanan (solüsyonu oda sıcaklığında 2 saat) preparat taze Carnoy fiksatifinde (3: 1 oranında, metanol: glasiyal asetik asit en az 3 saat süreyle) tutuldu ve hava ile kurutuldu. Preparatlar daha sonra Akridin turuncu boyasına alındı ve karanlık ortamda 5 dakika süresince boyandı. Saf suyla yıkanan numuneler kurumaya bırakılmadan hemen lamelle kapatılarak hem mikroskop hem de 100x büyütmeye sahip immersiyon objektifinde floresan mikroskopta 450-490 nm dalga boyunda ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir. Bu inceleme esnasında yeşil floresan veren sperm normal DNA'lı sperm, sarı-oranj-kırmızı fluoressan veren sperm ise hasarlı DNA'ya sahip sperm olarak değerlendirilmiştir.

3.13.4. STOK AO çözeltisi ve diğer solüsyonlar

Çalışmada kullanılan Stok AO çözeltisi ve diğer solüsyonların oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.5. Stok AO çözeltisi ve diğer solüsyonlar

Adı	Miktarı
%1 AO	1gr AO/100 ml distile su
0,1 Molar sitrik asit	19,212gr/ 1 litre distile su
0,3 Molar Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	47,991gr/ litre distile su
Carnoy fiksatifi	metanol 75 ml, asetik asit 25 ml

Günlük olarak hazırlanan boya çözeltileri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

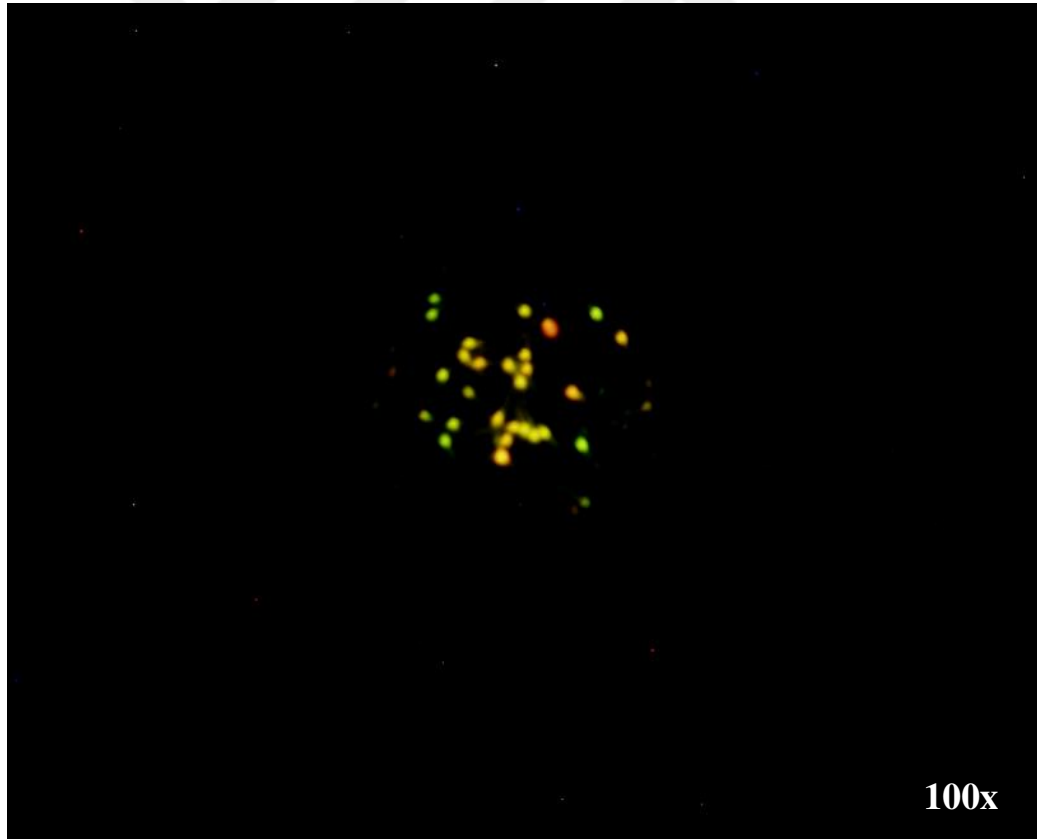
Tablo 3.6. Boya çözeltileri

Adı	Miktarı
%1 Akridin Oranj	2,5 ml
0,1 Mol/L sitrik asit	10 ml
0,3 M Na ₂ HPO ₄	400 µl

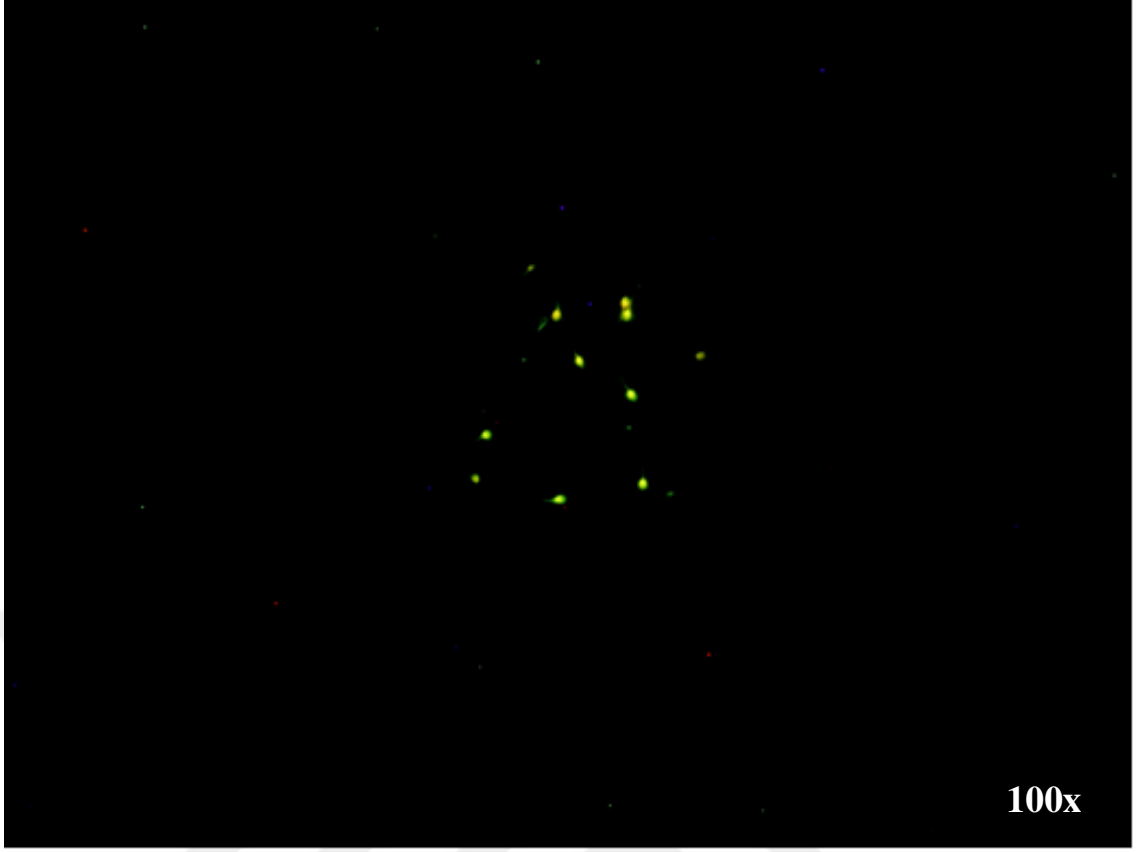
4. BULGULAR

4.1. Floresan Mikroskobu Görüntüleri

Yapılan çalışmamızda üç farklı semen konsantrasyonunda sperm kriyoprezervasyon işleminin spermlerin canlılığı ve DNA fragmentasyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla hazırlanan yayma preparat 1/3 asetik asit metanol karışımında 30 dakika oda sıcaklığına yahut – 40 derecede fıkse edilerek akridin oranj boyama yapılmış ve floresan mikroskop ile değerlendirilmiştir. Hazırlanan preparatın akridin oranj boyama işleminden sonra 100 x immersiyon objektifi floresan mikroskopundaki görüntüsü Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’ te gösterilmiştir. Mikroskop altında yeşil olarak görünenler normal DNA’ya sahip spermatozoaları, kavuniçi ve turuncu olarak görünenler ise DNA hasarı olan spermatozoaları gösterir.



Şekil 4.1. Acridin oranj boyama yeşili (normal), kavuniçi ve turuncu (defekli) DNA fragmentasyonunu göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskobi görüntüsü)



Şekil 4.2. Acridin oranj boyama yeşili (normal) DNA'ya sahip spermleri göstermektedir. (100x immersiyon objektifi floresan mikroskopi görüntüsü)

4.2. İstatistiksel Analizler

Çalışma Ekim 2018-Nisan 2019 tarihleri arasında 33 kişiyle yapılmıştır, Çalışmaya katılan bireylerin yaşları 17 ile 49 arasında değişmekte olup, ortalama $33,719 \pm 9,288$ yaş olarak saptanmıştır.

Tablo 4.1. Tanımlayıcı istatistik analizler

	Minimum	Maximum	Ortalama	Standart sapma
Volüme	2	7	3,178	1,339
Yaş	17	49	33,719	9,288
Konsantrasyon	7	142	58,891	39,909
Total konsantrasyon	27	578	176,867	131,527
Motilite ileri	13	82	55,375	17,208
Motilite yerinde	3	26	15,406	5,558
Motilite duran	7	74	29,219	16,796
Morfoloji normal	0	7	2,156	1,347
Morfoloji bas	35	78	53,375	12,610
Morfoloji boyun	10	43	25,656	9,468
Morfoloji kuyruk	6	37	18,688	7,023

Bahsi geçen bireylerden alınan örneklere göre volüme ortalaması 3,178 cc'dir. Çalışmada örnek alınan bireylerin yaş ortalaması 33,719'dur. Konsantrasyon ortalaması 58,891 milyon çıkarken, total konsantrasyon ortalaması ise 176,867 milyon olarak elde edilmiştir.

Örneklerin motilite ileri ortalama değeri 55,378'dir. Motilite yerinde değeri 15,406'dır. Motilite duran değeri 29,219'dur. Morfoloji normal değeri 2,156'dır. Morfoloji baş değeri 53,375'dir. Morfoloji boyun değeri 25,656'dır. Morfoloji kuyruk değeri 18,688'dir.

4.3.Korelasyon Analizi

Korelasyon analizi, iki değişken arasındaki doğrusal ilişkiyi veya bir değişkenin iki veya daha çok değişken ile olan ilişkisini test etmek amacıyla yapılır(Kalaycı 2010, s.115). Korelasyon katsayısı -1 ile +1 ($-1 \leq r \leq +1$) arasında değişen değerler almakla birlikte, korelasyon kat sayılarında 0,00 ile 0,25 arası değer

‘çok zayıf’, 0,26 ile 0,49 arası değerin ‘zayıf’, 0,50 ile 0,69 arası değerin ‘orta’, 0,70 ile 0,89 arası değerin ‘yüksek’, 0,90 ile 1,00 arası değerin ise ‘çok yüksek’ olduğu ifade edilir. Korelasyon katsayısının pozitif olması değişkenler arasında doğrusal bir ilişkinin olduğunu, negatif olması ise ters yönlü bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.2. Değişkenlerle ilgili korelasyon analizi

		Yaş	Morfoloji normal	Morfoloji baş	Morfoloji boyun	Morfoloji kuyruk
Yaş	r	1,000	0,112	0,012	0,105	-0,116
	p		0,542	0,949	0,569	0,527
Morfoloji normal	r	0,112	1,000	-0,173	-0,084	0,210
	p	0,542		0,345	0,647	0,249
Morfoloji baş	r	0,012	-0,173	1,000	-0,800**	-0,644**
	p	0,949	0,345		0,000	0,000
Morfoloji boyun	r	0,105	-0,084	-0,800**	1,000	0,084
	p	0,569	0,647	0,000		0,649
Morfoloji kuyruk	r	-0,116	0,210	-0,644**	0,084	1,000
	p	0,527	0,249	0,000	0,649	
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).						

Tablo 4.2’de Aralarında ilişki olduğu düşünülen bazı değişkenler korelasyon analizine tabi tutulmuştur. Analiz sonuçlarına göre morfoloji baş ile morfoloji boyun arasında negatif yönlü ve yüksek derecede korelasyon vardır ($r = -0,800$). Bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0,000 < 0,05$). Morfoloji baş ile morfoloji kuyruk arasında ise yine negatif yönlü korelasyon vardır ($r = -0,644$) bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0,000 < 0,05$).

Araştırmaya konu olan örneklem iki durumda ya da iki farklı koşulda ölçülüyorsa, Wilcoxon signed rank testi kullanılabilir. Bu test, tekrarlanan ölçekli t testinin nonparametrik alternatifidir. Fakat ortalamaların karşılaştırılması yerine, Wilcoxon testi, değerleri sıralamak ve karşılaştırmak için iki farklı zaman dilimine (zaman 1 ve zaman 2) dönüştürür ve bu iki zaman dilimi arasında, değerlerde bir değişim olup olmadığını test eder (Kalaycı 2010, s.104).

4.4. Wilcoxon İşaretli Sıralar Testleri (Wilcoxon Signed Rank Test)

Wilcoxon İşaretli Sıralar Testinin yapılmasının genel amacı aynı veri kaynağından alınmış olan iki farklı ölçüm sonuçları arasında herhangi bir farklılık olup olmadığını test eder. Bu test tekrarlanan değerler için yapılabilir. İnceleme yapılacak olan örneklem iki durumda ya da iki farklı koşulda ölçülüyorsa bu durumda işaretli sıralar testi kullanılır. Çalışmamızda da eozin öncesi ve dondurma sonrası değerlerin kontrol edilebilmesi için bu testler uygulanmış ve aralarındaki korelasyon tablolar halinde aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.3. Wilcoxon signed rank testi(Canlılık eozin öncesi- Dondurma kontrol eozin)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Canlılık eozin öncesi	71,219	14,895	40	95	-4,938 ^b	0,000
Dondurma kontrol eozin	13,500	5,870	5	26		

Canlılık eozin öncesi ortalaması 71,21 iken dondurma kontrol eozin değeri 13,50'dür. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır($p=0,000<0,05$). Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubu ortalaması 13,5 iken eozin öncesi canlılık 71,219 olarak elde edilmiştir.

Tablo 4.4. Wilcoxon signed rank testi(Canlılık eozin öncesi- dondurma sonrası eozin yüzde20)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Canlılık eozin öncesi	71,219	14,895	40	95	-4,937 ^b	0,000
Dondurma sonrası eozin yüzde20	20,563	7,853	7	37		

Canlılık eozin öncesi ortalaması 71,219 iken, Dondurma sonrası eozin yüzde20 değeri 20,563'dür. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır($p=0,000<0,05$). Bunun yanında %20 kriyo solüsyonu ile dondurulan grup ile karşılaştırıldığında eozin öncesi canlılık 71,219 iken %20'lik grubun ortalaması 20,563 elde edilmiştir.

Tablo 4.5. Wilcoxon signed rank testi(Canlılık eozin öncesi- Dondurma sonrası eozinyüzde50)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Canlılık eozin öncesi	71,219	14,895	40	95	-4,938 ^b	0,000
Dondurma sonrası eozinyüzde50	27,844	11,214	11	53		

Canlılık eozin öncesi ortalaması 71,219 iken, Dondurma sonrası eozin yüzde50 değeri 27,844'dür. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır($p=0,000<0,05$). İstatistiksel anlamının yanında %50 kriyo solüsyonu ile dondurulan grup ile karşılaştırıldığında eozin öncesi canlılık 71,219 iken %25'lik grubun ortalaması 27,844 olarak elde edilmiştir.

Tablo 4.6. Wilcoxon signed rank testi(Dondurma kontrol eozin - Dondurma sonrası eozin yüzde20)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Dondurma kontrol eozin	13,500	5,870	5	26	-4,372 ^b	0,000
Dondurma sonrası eozin yüzde20	20,563	7,853	7	37		

Canlılık Dondurma kontrol eozin ortalaması 13,500'ken Dondurma sonrası eozin yüzde 20 değeri 20,563'dür. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır($p=0,000<0,05$). *Tablo 4.6*'da kontrol grubu ile %20'lik dondurma grubu karşılaştırılmıştır. Bu sonuca göre %20'lik grubun ortalaması kontrol grubundan yüksek çıkarak 20,563 olarak elde edilmiştir.

Tablo 4.7. Wilcoxon signed rank testi(Dondurma kontrol eozin - Dondurma sonrası eozin yüzde50)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Dondurma kontrol eozin	13,500	5,870	5	26	-4,686 ^b	0,000
Dondurma sonrası eozin yüzde50	27,844	11,214	11	53		

Canlılık Dondurma kontrol eozin ortalaması 13,500 iken, Dondurma sonrası eozin yüzde 20 değeri 20,563'dür. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır($p=0,000<0,05$). *Tablo 4.7*'de kontrol grubu ile %50'lik kriyoprezerve edilmiş grup karşılaştırılmıştır. Bu sonuca göre %50'lik grubun ortalaması kontrol grubundan yüksek çıkarak 27,844 olarak elde edilmiştir.

Tablo 4.8. Wilcoxon signed rank testi(Dondurma sonrası eozin yüzde20- Dondurma sonrası eozin yüzde50)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Dondurma sonrası eozin yüzde20	20,563	7,853	7	37	-4,629 ^b	0,000
dondurma sonrası eozin yüzde50	27,844	11,214	11	53		

Dondurma sonrası eozin yüzde20 ortalaması 20,563 iken Dondurma sonrası eozin yüzde 50 değeri 27,844'dür. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır($p=0,000<0,05$). Tablo 4.8'de ise %20'lik grup ile %50'lik kriyoprezerve edilmiş grubun verileri wilcoxon signed rank testine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuca göre %50'lik solüsyon ile dondurulmuş olan grubun ortalaması 27,844 çıkarken %20'lik grubun ortalaması 20,563 çıkmıştır.

Tablo 4.9. Wilcoxon signed rank testi(Fragmentasyon - Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Fragmentasyon	48,406	22,275	8	86	-0,047 ^b	0,963
Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon	49,219	23,048	15	93		

Fragmentasyon ortalama değeri 48,406'dır, dondurma sonrası kontrol fragmentasyon değeri 49,219'dür. İki değer arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur($p=0,963>0,05$).

Tablo 4.9'da fragmentasyon analizi yapılmıştır. Buna göre dondurma öncesi ve dondurma sonrası kontrol grubunun fragmentasyonu karşılaştırıldığında istatistiksel

olarak bir farklılık görülmemekle birlikte sayısal olarak da birbirine çok yakın değerler elde edilmiştir. Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası DNA fragmentasyonu değerlerinin bu denli yakın çıkması yöntemin fizibilitesi açısından oldukça önemlidir.

Tablo 4.10. Wilcoxon signed rank testi(Fragmentasyon - Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Fragmentasyon	48,406	22,275	8	86	-0,608 ^b	0,543
Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde20	47,156	24,023	5	98		

Fragmentasyon ortalama değeri 48,406'dır, Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde20 değeri 47,156'dır. İki değer arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur($p=0,543>0,05$). Aynı şekilde *Tablo 4.10*'da %20lik grup ile dondurma öncesi grubun fragmentasyon karşılaştırılması yapılmıştır. Buna göre %20'lik grubun DNA fragmentasyonu dondurma öncesi grupla çok yakın değerde çıkmıştır. Aynı şekilde değerlerin bu kadar yakın olması minimum ve maximum değerlerin birbiriyle örtüşmesi ve rank test sonucunun istatistiksel olarak anlamlı fark çıkarmaması değerlerin örtüştüğünü ve sonucun birbirine çok benzediğini açıkça göstermektedir.

Tablo 4.11. Wilcoxon signed rank testi(Fragmentasyon - Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Fragmentasyon	48,406	22,275	8	86	-1,420 ^b	0,156
Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde50	41,906	25,189	8	90		

Fragmantasyon ortalama değeri 48,406'dır, Dondurma sonrası fragmantasyon yüzde50 değeri 41,906'dır. İki değer arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur($p=0,156>0,05$).

Tablo 4.12. Wilcoxon signed rank testi(Dondurma sonrası kontrol fragmantasyon - Dondurma sonrası fragmantasyon yüzde20)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Dondurma sonrası kontrol fragmantasyon	49,219	23,048	15	93	-1,047 ^b	0,295
Dondurma sonrası fragmantasyon yüzde20	47,156	24,023	5	98		

Dondurma sonrası kontrol fragmantasyon değeri 49,219'dur, dondurma sonrası fragmantasyon yüzde 20 değeri 47,156'dır. İki değer arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur($p=0,295>0,05$).

Tablo 4.13. Wilcoxon signed rank testi(Dondurma sonrası kontrol fragmantasyon - Dondurma sonrası fragmantasyon yüzde20)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Dondurma sonrası kontrol fragmantasyon	49,219	23,048	15	93	-2,600 ^b	0,009
Dondurma sonrası fragmantasyon yüzde 50	41,906	25,189	8	90		

Dondurma sonrası kontrol fragmentasyon değeri 49,219'dur, dondurma sonrası fragmentasyon yüzde 50 değeri 41,906'dır. İki değer arasında istatistiksel anlamlı bir fark vardır($p=0,009<0,05$).

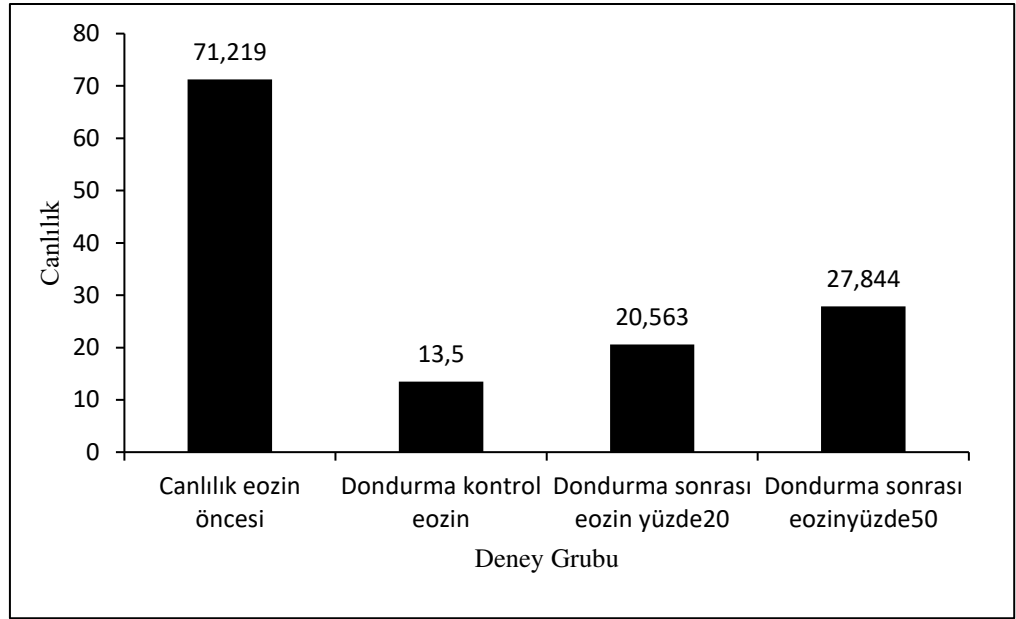
Tablo 4.14. Wilcoxon signed rank testi(Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde20- Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde50)

	Ortalama	Standart sapma	Minimum	Maximum	Z	P
Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde20	47,156	24,023	5	98	-1,310 ^b	0,190
Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde 50	41,906	25,189	8	90		

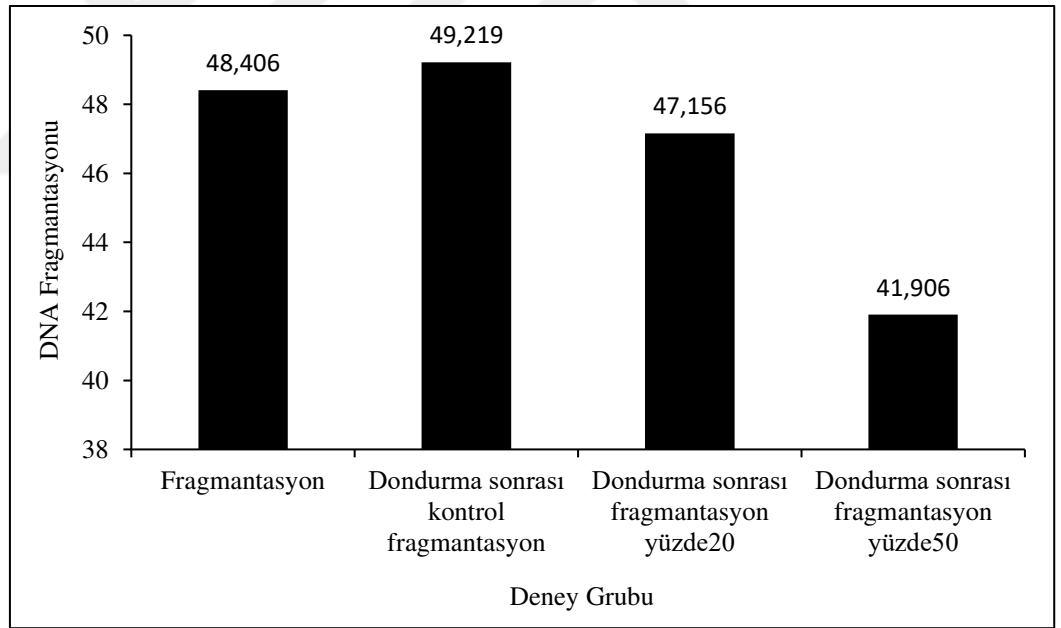
Dondurma sonrası fragmentasyon yüzde20 değeri 49,156'dır, dondurma sonrası fragmentasyon yüzde 50 değeri 41,906'dır. İki değer arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur($p=0,190>0,05$).

4.5.DNA Fragmentasyonu ve Canlılık Karşılaştırmaları

Şekil 4.3'te Eozin öncesi, kontrol grubu ve kriyoprezervasyon uygulanmış deney gruplarının canlılık ortalamalarının karşılaştırılması verilmiştir. Grafiğe göre eozin öncesi canlılık ortalaması 71,219 iken kontrol grubunun ortalaması 13,5 çıkmıştır. Birinci deney grubu olan yani %20 oranda kriyoprezerve edilmiş grubun canlılık oranı 20,563 iken ikinci deney grubu 27,844 ile ilk deney grubuna göre daha yüksek çıkmıştır. Buna göre kriyoprezervasyon işleminde oranların etkisine göre bir değerlendirme yapılacak olursa kriyo solüsyonunun daha yüksek olması sperm canlılığına olumlu olarak etki etmektedir.



Şekil 4.3. Eozin öncesi, kontrol grubu ve kriyoprezervasyon uygulanmış deney gruplarının canlılık ortalamalarının karşılaştırılması



Şekil 4.4. Eozin öncesi, kontrol grubu ve kriyoprezervasyon uygulanmış deney gruplarının DNA fragmentasyon ortalamalarının karşılaştırılması

Şekil 4.4'te ise Eozin öncesi, kontrol grubu ve kriyoprezervasyon uygulanmış deney gruplarının DNA fragmentasyonlarının karşılaştırılması verilmiştir. Grafiğe göre eozin öncesi DNA fragmentasyon ortalaması 48,406 iken kontrol grubunun ortalaması 49,219 çıkmıştır. Birinci deney grubu olan yani %20 oranda kriyoprezerve

edilmiş grubun canlılık oranı 47,156 iken ikinci deney grubu 41,906 ile ilk deney grubuna göre daha düşük çıkmıştır. Kriyoprezerve edilmiş her iki grubun sonuçları kontrol grubuna göre daha düşük çıkmıştır. Ayrıca yüzde 50'lik kriyoprezerve edilmiş yani ikinci deney grubunun DNA fragmentasyonunun daha düşük çıkması Şekil 4.3'teki canlılık ortalaması sonuçları ile tutarlılık göstermektedir. Çünkü DNA fragmentasyonu ortalamasının düşük çıkması daha az DNA'nın kriyoprezerve işleminden zarar gördüğünü göstermekte, bu da yöntemin uygun oranlar ile yapıldığında doğru ve etkili sonuçlar verebileceğini göstermiştir.



5. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsanda yumurtanın döllemesi olayı, erkekten gelen spermin dişi bireydeki yumurta hücresiyle temas etmesinden hemen sonra meydana gelen membran füzyonu yoluyla dişi ve erkek çekirdeklerinin füzyonu sonucu gerçekleşir. Bir sonraki aşamada yani embriyonun sağlıklı bir şekilde gelişimi spermin DNA bütünlüğüne bağlıdır (Björndahl L. ve ark. 2006). Yani genetik kodların bir sonraki nesile dölleme yoluyla doğru bir şekilde aktarılabilmesi için sperm içinde uygun şekilde paketlenmiş DNA grubunun olması gerekir. Hasarlı DNA, embriyoların gelişmesinde dölleme veya konjenital anomalilere neden olarak dölleme sorunlarına yol açabilir (Baker M.A. ve Aitken R.J., 2005).

İnfertilite problemi olan çiftlerin % 20'sinde erkek faktörünün neden olduğu görülmüştür. Bu durumda, sperm ile ilişkili DNA hasarının değerlendirilmesi ve spermin dondurulmasıyla doğurganlığın korunması için birçok test ve yöntem uygulanabilir. İn vitro fertilizasyon teknikleri zaman içinde gelişmiştir ve son dönemde erkek kısırlığında karşılaşılan sorunlara bir çözüm olarak sperm dondurularak çözdürülen sperm üzerinde DNA'nın bütünlüğünün korunması konusunda birçok çalışma yapılmıştır (Koyuncu H., 2011). Araştırmalar, DNA bütünlüğünün sağlıklı gebeliğe ulaşmada büyük önem taşıdığını göstermektedir (Chohan K. R. ve ark. 2006). DNA hasarını tespit eden bu testlerle fertil ve infertil değerlendirmenin daha kolay yapılabileceği bulunmuştur (Boynukalın F.K. vd., 2014).

Son zamanlarda geliştirilen üreme tekniklerinin yardımıyla erkek infertilitesi çok ilerlemiştir. Testis biyopsisinden sonra veya sadece birkaç sperm hücresinin elde edildiği hücrelerin dondurulması, tedavilerin başarı oranını artırır. Bununla birlikte, bu aynı zamanda sperm dondurma ve daha sonra çözülme prosedürlerinde sperm hareketliliğinin azalmasına da neden olabilir (Georgiou I. ve ark. 1998; Sharma R. K. ve ark. 1997). Motilite dışında, sperm DNA bütünlüğünün korunması dölleme ve sağlıklı embriyo gelişimi için önemli kriterlerden biridir (Donnelly E.T. ve ark., 2000). DNA kusurlarındaki artış ile dölleme arasında ters bir ilişki vardır (Sakkas D. ve ark. 1996).

Yapılan bu çalışmada farklı semen konsantrasyonlarda sperm kriyoprezervasyonunun sperm canlılığı ve sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla, öncelikle çalışmaya dahil edilecek tüm hastalara Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO) kriterlerine göre standart semen analizi yapılmış; sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji değerlendirilmiştir. Sperm canlılık oranı tespiti için eozin boyama yapılarak ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir.

Sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkisini araştırmak için yayma preparat hazırlanmış 1/3 asetik asit metanol karışımında 30 dakika oda sıcaklığına veya – 40 derecede fiks edilerek akridin oran boyama yapılmış ve floresan mikroskop ile değerlendirilmiştir.

Deney parametreleri *Tablo 3.*'de özetlenmiş, deney grupları, kontrol grubu belirlenerek sonuçların değerlendirilmesi için gerekli altyapı çalışma öncesi hazırlanmıştır. Çalışmanın ardından ise bu sonuçların istatistiksel ve korelasyon analizleri yapılmış, grafikler oluşturulmuş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

Elde edilen bu sonuçlara göre DNA fragmentasyonu ve canlılık oranları değerlendirilmiş ve kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası değerler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı çıktığı görülmüştür.

Her iki deney grubunun birbiri arasındaki ilişkiye bakıldığında ise %20'lik ve %50'lik deney gruplarının canlılık ve DNA fragmentasyon oranlarının istatistiksel olarak anlamlı çıktığı görülmüştür. Bu sonuç da uygun oranlarda ve şartlarda yapılan kriyoprezervasyon işleminin olumlu sonuçlanacağını, yöntemin kullanılabilirlik ve uygulanabilirlik açısından pozitif sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

Sperm hücrelerinin kriyoprezervasyon işlemi kesin olarak DNA fragmentasyonuna sebep olduğu ya da fragmentasyon oranının yükseldiği konusunda net bir sonuca varılamasa da kontrol grubuyla bir kıyaslama yapıldığında oranların değiştiği görülmüştür. Bu değişimin farklı sebeplerden dolayı da olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Yapılan bu çalışmada farklı semen konsantrasyonlarda sperm kriyoprezervasyonunun sperm canlılığı ve sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla, öncelikle çalışmaya dahil edilecek tüm hastalara Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO) kriterlerine göre standart semen analizi yapılmış; sperm konsantrasyonu, motilite ve morfoloji değerlendirilmiştir. Sperm canlılık oranı tespiti için eozin boyama yapılarak ışık mikroskobunda değerlendirilmiştir.

Sperm DNA fragmentasyonu üzerine etkisini araştırmak için yayma preparat hazırlanmış 1/3 asetik asit metanol karışımında 30 dakika oda sıcaklığına veya – 40 derecede fıkse edilerek akridin oranj boyama yapılmış ve floresan mikroskop ile değerlendirilmiştir.

%20'lik ve %50'lik birinci ve ikinci deney gruplarının birbiri arasındaki ilişkiye bakıldığında ise %20'lik ve %50'lik deney gruplarının canlılık ve DNA fragmentasyon oranlarının istatistiksel olarak anlamlı çıktığı görülmüştür. Bu sonuç da uygun oranlarda ve şartlarda yapılan kriyoprezervasyon işleminin olumlu sonuçlanacağını, yöntemin kullanılabilirlik ve uygulanabilirlik açısından pozitif sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

DNA fragmentasyonu DNA yapısı üzerinde çeşitli sebeplerden dolayı oluşan bozulmalardır. Bu fragmentasyonlar uygulanan yöntem, süre, bireyin fizyolojik özellikleri, yaş, boy, kilo gibi birçok parametreye birden bağlıdır. Bu sebeple elde edilen istatistiksel analizlere göre sadece kriyoprezervasyon işleminden dolayı DNA fragmentasyonu ve canlılık oranları değişmiştir demek çok doğru olmaz. Kriyoprezervasyon işleminin DNA fragmentasyonu ve canlılığa etkisinin olduğunu söyleyebiliriz fakat tek etken bu değildir.

Daha sonraki çalışmalarda deney gruplarının sayısı ve oranları arttırılarak, aynı yaştaki ve birbirine yakın kilo ve boy oranlarına sahip bireylerden alınan numunelerle yapılan deneylerin analizleri yapılarak daha net, birbirine daha yakın sonuçlar elde edilebilir ve bu çalışmanın kapsamı değiştirilebilir.

6. KAYNAKLAR

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: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. 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 asisted reproduction. CMAJ;175:495-500.

Boynukalın 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 Press P. 45-69.

Cebesoy F.B. , Ünlü C. , Aydos K. , Baltacı V. , The Relationship Between Sperm Morphology-Acridine Turuncu 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.

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 Leew 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).

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. ;5(9):825-30.

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

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.

Kruger T.F. , Menkveld R. , Stander F.S. , Lombard C.J. , Van der Merwe J.P. , van Zyl J.A. , Smith K.(1986) Fertil Steril Dec;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. Turk Urol Sem. ; 2:18-23.

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.

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

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.

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

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.

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

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.

Sakkas D. , Urner F. , Bianchi P.G. , Bizzaro D., Wagner I., Jaquenoud N. ,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.

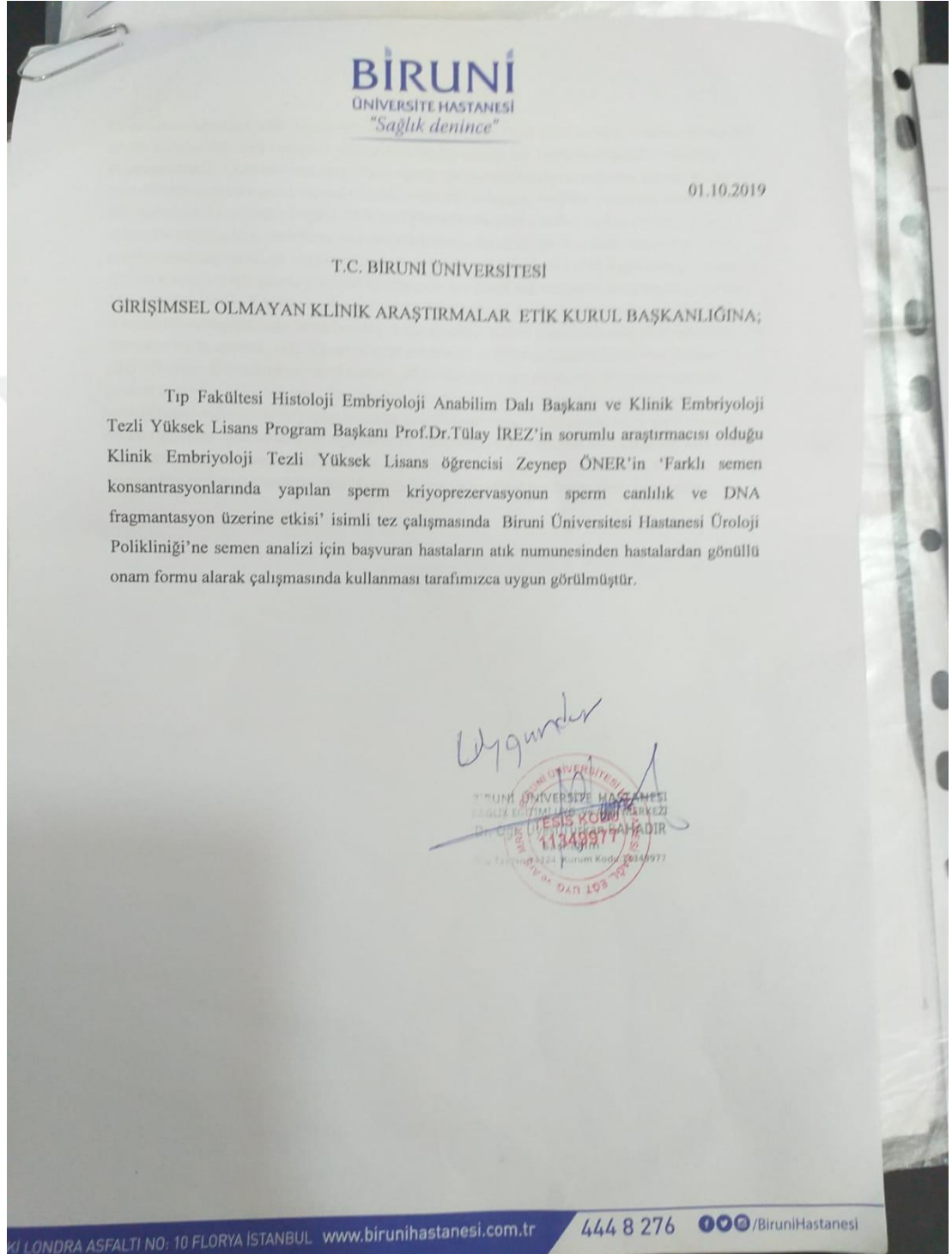
Sharma R.K, Vemulapalli S. , Kohn S. , Agarwal A.(1997) Effect of Centrifuge Speed, Refrigeration Medium, and Sperm Washing Medium on Cryopreserved Sperm Quality after Thawing. *Arch Androl*. 39(1):33-8.

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.

7. EKLER

EK1: KURUM ONAYI



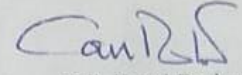
EK2: ETİK KURUL ONAYI

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

29.03.2019

Sayın Prof.Dr.Tülay İREZ

Biruni Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu yapılan inceleme sonucunda planladığı “Farklı Semen Konsantrasyonlarında Yapılan Sperm Kriyoprezervasyonun Sperm Canlılık ve Dna Fragmentasyonu Üzerinde Etkisi” isimli araştırmanızın kurulumuzun 29.03.2019 tarihli toplantısında etik yönden uygun olduğuna karar verilmiştir.



Etik Kurul Başkanı
Prof.Dr.Can Polat EYİĞÜN

EK3: ETİK KURULU KARARI

T.C. BİRÜNİ ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI				
Tarih: 29.03.2019 Toplantı Sayısı: 27		Karar No: 2019/27-38 Prof.Dr.Tülay İREZ'in planladığı "Farklı Semen Konsantrasyonlarında Yapılan Sperm Kriyoprezervasyonun Sperm Canlılık ve Dna Fragmentasyonu Üzerinde Etkisi" konulu araştırma incelendi, yapılan inceleme sonucunda araştırmanın etik yönden uygun olduğuna karar verildi.		
ÜYELER				
Adı soyadı	Alanı	Bölümü	Katılım	İmza
Prof.Dr.Can Polat EYİGÜN	Tıp Fakültesi	Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D	Etik Kurul Başkanı	Can Polat
Prof.Dr.Leman ŞENTURAN	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Hemşirelik Bölümü	Etik Kurul Başkan Yardımcısı	Leman Şenturan
Prof.Dr.Fatma ÇELİK	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Beslenme ve Diyetetik Bölümü	Üye	Fatma Çelik
Doç.Dr.Şölen HİMMETOĞLU	Tıp Fakültesi	Tıbbi Biyokimya A.D.	Raportör	Şölen Himmetoğlu
Doç.Dr.Burcu KARADUMAN	Diş Hekimliği Fakültesi	Periodontoloji A.D.	Üye	Burcu Karaduman
Dr.Öğr.Üyesi Zeynep HOŞBAY	Sağlık Bilimleri Fakültesi	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü	Üye	Zeynep Hoşbay
Dr.Öğr.Üyesi Ayşe DİLŞAD YAKUT	Eğitim Fakültesi	Özel Eğitim	Üye	Ayşe Dilşad Yakut

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Zeynep ÖNER

Doğum Tarihi ve Yeri: 09.07.1982 ve Gercüş

Mail Adresi: zeynepnerr_9@hotmail.com

Unvanı:

Öğrenim Durumu:

Derece	Okul Adı ve Bölümü	Mezuniyet Yılı
Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi	2007

9. İNTİHAL RAPORU

FARKLI SEMEN KONSANTRASYONLARINDA YAPILAN SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN SPERM CANLILIĞI VE DNA FRAGMENTASYONUNA ETKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

%12	%7	%2	%9
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Ondokuz Mayıs Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%2
2	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%2
3	spssistatistik.net İnternet Kaynağı	%1
4	www.uroturk.org.tr İnternet Kaynağı	%1
5	apps.who.int İnternet Kaynağı	%1
6	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	%1
7	www.biltek.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.zeynepkamitipbulteni.org İnternet Kaynağı	<%1