

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**KURKUMİNİN DONDURMA-ÇÖZME İŞLEMİ SONRASI
SPERM PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

FATMA NUR KARAKUŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEYHUN SOLAKOĞLU**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2019

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**KURKUMİNİN DONDURMA-ÇÖZME İŞLEMİ SONRASI
SPERM PARAMETRELERİNE ETKİSİ**

FATMA NUR KARAKUŞ

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEYHUN SOLAKOĞLU**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI



T.C.
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI



TEZ DEĞERLENDİRME TUTANAĞI

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalında gerekli uzmanlık süresini ve rotasyonlarını tamamlayan uzmanlık öğrencisi, Dr. Fatma Nur Karakuş'un " Kurkuminin Dondurma-Çözme İşlemi Sonrası Sperm Parametrelerine Etkisi" konulu tezi 21/08/2019 tarihinde jürimiz tarafından değerlendirilmiş ve bilime katkı sağlayan orijinal bir çalışma olduğu, tez yazımı kurallarına uygun yazıldığı ve aday tarafından başarılı bir şekilde savunulduğu için başarılı bulunmuştur.

Uzmanlık Eğitimi Bitirme Sınavı'na girmesi uygun görülmüş olup, bu tutanak düzenlenerek imza altına alınmıştır. 21/08/2019

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Seyhan SOLAKOĞLU

Üye
Prof. Dr. Meral KOYUTÜRK

Üye
Doç. Dr. Sibel KÖKTÜRK

BEYAN

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



Fatma Nur Karakuş

TEŞEKKÜR

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitim sürecim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tüm hocalarıma,

Tezimin ve uzmanlık eğitimimin her aşamasında bilgi birikimi ve tecrübesiyle beni aydınlatan, daima yardımını ve desteğini hissettiğim danışman hocam Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu'na,

Çalışmalarım sırasında karşılaştığım olumsuzluklar karşısında önerilerini ve yardımlarını sunan Prof. Dr. Mehmet Ertan Kervancıoğlu'na,

Tezimin deneysel çalışmasının gerçekleştirilmesi aşamasında yardım ve desteğini benden esirgemeyen, androloji laboratuvarını bana açan İstanbul Tıp Fakültesi Tüp Bebek Laboratuvarı Genel Koordinatörü Emb. Dr. Sibel Bulgurcuoğlu Kuran'a, içten davranışları ve yardımları için Ayşe Altun'a, Selin Demirer'e ve Yeşim Erkan'a,

Tezimin tamamlanma sürecindeki değerli destekleri için Doç. Dr. Tuğba Kotil'e, Biyolog İlkay Özdemir'e, Biyolog Sibel Doğan'a, Biyolog Dr. Türkan Sarıoğlu'na, tecrübeli teknisyenimiz Selahattin Ünal'a,

Tezimin istatistiksel analizlerindeki değerli destekleri için Araş. Gör. Hasan Serdar Mutlu'ya, Dr. Elif Ezirmik'e; istatistik verilerinin grafiklerle gösterilmesindeki değerli desteği için Araş. Gör. Dr. Tuğba Ekiz Yılmaz'a,

Tanımayı büyük bir şans olarak gördüğüm arkadaşlarım Dr. Emel Arslan'a, Biyolog Feride Karahan'a, Araş. Gör. Aslı Erdoğan'a,

Eğitim hayatım boyunca elektron mikroskopideki değerli destekleri için, Biyolog Funda Onar'a, Biyolog Ebru Karabulut Akyön'e, Biyolog Fadime Aktar'a ve çalışma hayatıma renk katan İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ailesinin tüm üyelerine,

Uzmanlık eğitimi prosedürleriyle ilgili tüm sorularımı sabırla yanıtlayan Hilal Yılmaz'a,

Her zaman yanımda olan, varlıklarıyla bana güç veren aileme ve arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testisler.....	3
2.1.1. Seminifer Tübüller.....	3
2.1.1.1. Sertoli Hücreleri.....	4
2.1.1.2. Leydig Hücreleri.....	5
2.2. Spermatogenez.....	5
2.2.1. Spermatogonyal Evre.....	6
2.2.2. Spermatosit Evresi (Mayoz)	7
2.2.3. Spermatid Evresi (Spermiyogenez)	8
2.2.3.1. Nükleer Değişiklikler.....	8
2.2.3.2. Akrozom Oluşumu	9
2.2.3.3. Sperm Kuyruğunun Oluşumu	10
2.2.3.4. Spermiyasyon	12
2.3. Olgun (Matür) Spermin Yapısı	12
2.4. Epididimal Olgunlaşma	14
2.5. Androloji Laboratuvar İşlemleri	15
2.5.1. Semen Analizi.....	15
2.5.1.1. Sperm DNA Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	18
2.5.2. Kriyoprezervasyon.....	19
2.5.3. Tarihçe	19
2.5.4. Kriyoprezervasyon Yöntemleri	20
2.5.4.1. Yavaş Dondurma	21

2.5.4.2. Hızlı Dondurma	21
2.5.5. Kriyoprotektanlar.....	23
2.5.6. Kriyohasar Mekanizmaları	23
2.5.7. Sperm Kriyoprezervasyonu	25
2.6. Kurkumin.....	27
2.6.1. Oksidatif Stres ve Kurkumin	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
3.1. Örnek Seçimi ve Hasta Grubu	30
3.2. Semen Analizi.....	30
3.3. Semen Hazırlanması	31
3.4. Kromatin Yoğunlaşmasının Değerlendirilmesi	32
3.5. Sperm DNA Bütünlüğünün Değerlendirilmesi	32
3.6. Kurkumin Solüsyonunun Hazırlanması.....	32
3.7. Sperm Dondurma-Çözme İşlemi	33
3.8. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR.....	35
4.1. Kurkuminin Dondurma-Çözme İşlemi Sonrası Sperm Canlılığı Üzerine Etkisi.....	35
4.2. Kurkuminin Dondurma-Çözme İşlemi Sonrası Sperm Morfolojisi Üzerine Etkisi	37
4.3. Kurkuminin Sperm Hareketliliğine Etkisi	40
4.4. Anilin Mavisi Boyama Yöntemi ve Akridin Oranj Testi ile Elde Edilen Bulgular.....	43
5. TARTIŞMA	49
KAYNAKLAR	58
FORMLAR	76
ETİK KURUL KARARI	81
ÖZGEÇMİŞ	82

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1 : Normal semen parametreleri (DSÖ-2010).....	18
Tablo 2-2: Yavaş dondurma yöntemi ile vitrifikasyonun karşılaştırılması	22
Tablo 4-1: Yaş, semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, ileri hareketli, yerinde hareketli ve hareketsiz sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler.....	35
Tablo 4-2: Canlılık yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler.....	36
Tablo 4-3: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler	38
Tablo 4-4: Sperm hareketliliğine ilişkin tanımlayıcı veriler.....	40
Tablo 4-5: Anilin mavisiyle boyanma özelliklerine göre değerlendirilen sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler.	44
Tablo 4-6: Akridin oranj ile boyanma özelliklerine göre değerlendirilen sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler.	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Tek bir DNA ilmek bölgesi üzerinde solenoid ve toroid yapılarının gösterimi (52). ...	9
Şekil 2-2: Spermatogenezin şematik diyagramı (15).....	11
Şekil 2-3: Spermiyogenezin ve olgun sperm yapısının şematik diyagramı (62).	14
Şekil 2-4: İnsan spermatozoasının bazı anormal formlarının şematik gösterimi (66).....	17
Şekil 2-5: Camsılaşma (*) ve buz kristali oluşumu (↑).....	21
Şekil 2-7: Membran faz geçişinin şematik gösterimi.	24
Şekil 2-8: İki faktör hipotezinin şematik gösterimi (94).....	25
Şekil 2-9: Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı (106)	27
Şekil 4-1: Canlılık yüzdelerinin dondurma işlemi öncesi ile karşılaştırılması.	36
Şekil 4-2: Canlılık yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	37
Şekil 4-3: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdelerinin dondurma işlemi öncesi ile karşılaştırılması.	38
Şekil 4-4: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	39
Şekil 4-5: Diff-Quick boyasıyla anormal morfoloji gösteren sperm örnekleri (1000x).	40
Şekil 4-6: Total hareket yüzdelerinin dondurma öncesi ile karşılaştırılması.....	41
Şekil 4-7: Total hareket yüzdelerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.	41
Şekil 4-8: İleri hareket yüzdelerinin dondurma öncesi ile karşılaştırılması.	42
Şekil 4-9: İleri hareket yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.	42
Şekil 4-10: Anilin mavisi boyanma örnekleri (1000x).	43
Şekil 4-11: Anilin mavisi negatif sperm yüzdelerinin dondurma öncesi ile karşılaştırılması.	44
Şekil 4-12: Anilin mavisi negatif sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	45
Şekil 4-13: Akridin oranj boyanma örnekleri (630x).	46
Şekil 4-14: Akridin oranj negatif sperm yüzdelerinin dondurma öncesi ile karşılaştırılması.	47
Şekil 4-15: Akridin oranj negatif sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.....	47
Şekil 4-16: Anilin mavisi ve akridin oranj boya ları arasındaki korelasyon.	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

μ l: Mikrolitre

μ m: Mikrometre

μ M: Mikromolar

$^1\text{O}_2$: Tekli Oksijen

8-OHdG:8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein

AOT: Akridin Oranj Testi

AP-2 γ : Aktivatör Protein-2 Gama

BMP4: Kemik Morfojenik Protein 4 (Bone Morphogenetic Protein 4)

cm: Santimetre

DAM: Dış Akrozomal Membran

DFI: DNA fragmantasyon indeksi

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksi Ribonükleik Asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ER: Endoplazmik Retikulum

g: Gram

GDF3: Büyüme Ve Farklılaşma Faktörü 3 (Growth And Differentiation Factor 3-)

GDNF: Gliyal Hücre Hattı Kaynaklı Nörotropik Faktör (Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor)

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

H&E: Hematoksilen&Eozin

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

ICSI: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (Intracytoplasmic Sperm Injection)

IUI: İntrauterin İnseminasyon

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

İAM: İç Akrozomal Membran

KPA: Kriyoprotektan ajanlar

KTB: Kan Testis Bariyeri

M: Molar

MARs: Matriks Tutunma Bölgeleri (Matrix Attachment Regions)

mg/L: Miligram/ Litre

MIF: Müllerian İnhibe Edici Faktör

miRNA: mikroRNA

ml: Mililitre

MTP: Mitokondriyal Transmembran Potansiyeli

NA: Nükleer Annulus

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NF-κB: Nükleer Faktör Kappa B

nm: Nanometre

O₂⁻: Süperoksit

OH⁻: Hidroksil

PAG: Proakrozomal Granüller

PBS: Phosphate Buffered Saline

PGH: Primordiyal Germ Hücreleri

PKC: Protein Kinaz C

PMH: Peritübüler Miyoid Hücreler

PNt: Perinükleer Teka

PVP: Polivinilpirolidon

RNA: Ribonükleik Asit

ROT: Reaktif oksijen türevleri

rpm: Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)

SCF: Kök Hücre Faktörü (Stem Cell Factor)

SDF-1: Stromal Hücre Kaynaklı Faktör 1 (Stromal Cell Derived Factor 1)

SOD: Süperoksit dismutaz

TNF- α : Tümör Nekroz Faktör Alfa

UTB: Uterotubal Bileşke

ÜYTE: Üremeye Yardımcı Tedavi

v/v: Hacim/Hacim (Volume/Volume)

WHO: World Health Organization

ZP: Zona Pellusida

ÖZET

Karakuş, F.N. (2019). Kurkuminin Dondurma-Çözme İşlemi Sonrası Sperm Parametrelerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul.

Amaç: Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama); hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısılara kadar soğutulması, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve gelecekte kullanılmak amacıyla saklanması işlemidir. İnsan spermatozoa kriyoprezervasyonu yardımcı üreme teknolojileri ve erkek fertilizasyonunun korunması için önemli bir araçtır. Ancak bu işlem sonucunda sperm kalitesi önemli ölçüde azalır. Kurkuminin pek çok hücre üzerinde antioksidan aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızın amacı, kriyoprezervasyon medyumuna eklenen kurkuminin, çözülme sonrası canlılık, morfoloji, hareketlilik, kromatin yoğunlaşması ve DNA bütünlüğündeki değişikliklere olan etkisinin değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Mastürbasyon yoluyla 23 normozoospermik erkeğin semen örnekleri toplandı ve her bir örnek Kontrol, DMSO ve Kurkumin olmak üzere üç gruba ayrıldı. Tüm örnekler, canlılık (Eosin Y), morfoloji (Diff-Quick), hareketlilik (WHO standartlarına göre), sperm kromatin yoğunlaşma durumu (anilin mavisi) ve DNA bütünlüğü (akridin oranj) açısından dondurma işlemi öncesinde değerlendirildi. Kontrol grubuna kriyoprezervasyon dışında herhangi bir işlem uygulanmadı. DMSO grubu, %0,1 konsantrasyonunda DMSO eklenerek; Kurkumin grubu, 10 µM kurkumin eklenerek donduruldu. Diff-Quick ve anilin mavisi ile boyanan örnekler ışık mikroskopunda, Eosin Y ile boyanan örnekler faz-kontrast mikroskopunda, akridin oranj ile boyanan örnekler floresan mikroskopta değerlendirildi. Dondurma işleminden 10 gün sonra örnekler çözündürüldü ve tüm analizler tekrarlandı.

Bulgular: Kriyoprezervasyon işleminin sperm parametrelerini önemli ölçüde ($P < 0.001$) azalttığı gözlemlendi. Kurkumin grubunda, çözme sonrası progresif hareketlilik, sperm kromatin yoğunlaşma durumu ve DNA bütünlüğü değerlerinin Kontrol ve DMSO gruplarından anlamlı derecede ($P < 0.001$) yüksek olduğu görüldü.

Sonuç: Bu sonuçlar, sperm dondurma medyumuna kurkumin ilavesinin, çözme sonrası ileri hareket, sperm kromatin yoğunlaşma durumu ve DNA bütünlüğü parametrelerini geliştirdiğini göstermektedir. Kurkumin, kriyoprezervasyonun insan spermi üzerindeki zararlı etkilerini hafifletmektedir. Kurkumin ve diğer antioksidan maddelerin sperm kriyoprezervasyonunda kullanımı ile ilgili daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sperm, DNA, Dondurarak saklama, Antioksidanlar, Kurkumin

ABSTRACT

Karakuş, F.N. (2019). Effect of Curcumin on Sperm Parameters After The Freezing-Thawing Process. İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology. İstanbul.

Objective: Cryopreservation refers to the cooling of cells and tissues to sub-zero temperatures in order to stop all biologic activity and preserve them for future use. Human sperm cryopreservation is an important tool for assisted reproductive technology and male fertility preservation. However, cryopreservation significantly reduces the quality of spermatozoa. The antioxidant effects of curcumin on different cells have been widely reported. This study was aimed to evaluate changes in post-thaw viability, morphology, motility, chromatin condensation and DNA integrity in response to the addition of curcumin to human sperm freezing extender.

Materials and Methods: Semen of 23 normozoospermic men was collected and each sample was divided into three equal aliquots: Control, DMSO, Curcumin. The samples were analyzed freshly for viability (Eosin Y), morphology (Diff-Quick), motility (following WHO standarts), sperm chromatin packaging (aniline blue) and DNA integrity (acridine orange). The control group remained untreated and was mixed with cryopreservation medium (in-house 1:1). The DMSO group was mixed with cryopreservation medium containing 0.1% DMSO. The curcumin group was mixed with cryopreservation medium containing 10 µM curcumin. Samples stained with Diff-Quick and aniline blue were examined under light microscope, samples stained with Eosin Y were examined under phase-contrast microscope and samples stained with acridine orange were examined under fluorescence microscope. Ten days after cryopreservation, samples were thawed and pre-freeze analyses repeated.

Results: Obtained results showed that cryopreservation significantly ($P < 0.001$) reduces sperm parameters. In Curcumin group, progressive motility, sperm chromatin condensation and DNA integrity significantly ($P < 0.001$) increased after the thawing process, as compared with the control and the DMSO group.

Conclusion: These results suggest that the addition of curcumin to cryopreservation medium improves post-thaw progressive motility, sperm chromatin condensation and DNA integrity. It seems that curcumin ameliorates detrimental effects of cryopreservation on human spermatozoa. Further research is needed on the use of curcumin and other antioxidant substances in sperm cryopreservation.

Keywords: Sperm, DNA, Cryopreservation, Antioxidants, Curcumin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tarihçesi on sekizinci yüzyıla kadar dayanan sperm kriyobiolojisindeki gelişmeler, 1949 yılında kriyoprotektan olarak gliserolün kullanıma girmesiyle hızlanmıştır (1). Sperm kriyoprezervasyonu 1980'li yıllardan itibaren üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) laboratuvarlarında rutin olarak kullanılmaya başlamıştır. Son 20 yılda, semen dondurma protokollerini geliştirmek için önemli araştırmalar yapılmıştır (2). Tüm bu gelişmelere ve ÜYTE laboratuvarlarındaki sık kullanıma rağmen, sıfırın altındaki sıcaklıklara maruz kalma ve yeniden ısınma, spermatozoanın en az % 50'sinin yapısal bütünlüğünün ve işlevsel özelliklerinin kaybına neden olabilmektedir (3).

Kriyoprezervasyon; sperm akrozomunun, plazma zarının ve DNA'sının bütünlüğünde bozulmaya ve biyokimyasal değişikliklere neden olarak çözülme sonrası sperm hareketliliğini ve canlılığı azaltmaktadır (4). Meydana gelen bu hasarların olası mekanizmaları buz kristali oluşumu, termal şok, osmotik şok ve oksidatif stres olarak özetlenebilir (5).

Oksidatif stres kriyoprezervasyon sürecinde sperm kalitesini etkileyen en önemli faktördür (5,6). Yüksek reaktif oksijen düzeyleri, lipid peroksidasyonu ile mitokondriyal membranda ve plazma membranında hasar oluştururken, kromatin yoğunlaşma durumunda ve DNA bütünlüğünde bozulmaya neden olur (3). Sonuçta spermin hareketliliği ve canlılığı azalır.

Kriyoprotektan solüsyonlara, çeşitli dozlarda antioksidanların eklenmesiyle dondurma-çözme işlemi sonrası sperm kalitesinde artış bildiren birçok çalışma yayınlanmıştır (7). Ancak hala rutin kullanıma giren etkili bir antioksidan bildirilmemiştir.

Kurkumin (diferuloylmethane), zerdeçal olarak bilinen ve çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olan *Curcuma longa* L. bitkisinden izole edilen bir fitopolifenol pigmenttir. Zerdeçalın başlıca etken maddesi olan kurkuminin antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antikarsinojenik olmak üzere pek çok biyolojik aktivitesi bulunmaktadır (8). Kurkumin, serbest radikallerin nötralizasyonunu sağlayan glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimlerinin aktivitesini arttırırken, reaktif oksijen türevlerini (ROT)

reten enzimleri (lipooksijenaz, siklooksijenaz, ksantin oksidaz) inhibe eder. Kurkuminin serbest radikal temizleyici aktivitesinin E vitamininden sekiz kat daha güçlü olduğu bildirilmiştir (9). Kuvvetli serbest radikal temizleyici aktivitesi ile lipid peroksidasyonunu önleyen kurkumin, kriyoprezervasyon sırasındaki termal şoka ve oksidatif hasara karşı koruyucu etki gösterir (10). Çeşitli hayvanların (sığır, sıçan, angora keçisi, boğa) spermleriyle yapılan çalışmalarda, kriyoprotektan solüsyona eklenen kurkuminin dondurma-çözme sonrası sperm parametreleri üzerine olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (11–14). Yapacağımız çalışmada kurkuminin dondurma-çözme işlemi sonrası insan sperm parametrelerine olan etkisini araştırmayı amaçlamaktayız.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testisler

Erkek genital sistemi testisler, genital kanallar (tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus), yardımcı bezler (prostat, seminal veziküller, bulboüretral bezler) ve penisten oluşur (15,16). Erkek üreme sisteminin başlıca iki işlevi, haploid erkek gamet hücrelerinin (spermatozoa) devamlı bir şekilde üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanması ile erkek cinsiyet hormonlarının (androjenler) sentezi ve salgılanmasıdır (15).

Testisler bir çift, oval yapıda olan ve ekstra abdominal konumdaki skrotal kese içerisinde konumlanan erkek üreme sisteminin başlıca organıdır. Ekstraabdominal konumu sayesinde testis sıcaklığı vücut sıcaklığından 2-3 °C daha düşüktür. Normal spermatogenez için sıcaklığın 34-35 °C olması gereklidir (15). Her bir testis 10.5-15 g ağırlığında, yaklaşık 4.5 cm uzunluğunda ve 2.5 cm genişliğindedir. Yetişkin bir erkekte testiküler volüm 12-17 ml' dir (17). Testislerin arka yüzü epididimisle ilişkilidir ve hem testisler hem de epididimis, vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordonla skrotumda asılı bir şekilde bulunur (15).

Testislerin etrafı fibromusküler bir bağ dokusu olan tunika albuginea tarafından çevrelenir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları testise giriş ve çıkışta mediastinumdan geçer. (15,16,18). Mediastinum testisten uzanan fibröz uzantılar (septa) testis dokusunu sayıları 250-300 arasında değişen piramidal lobüllere ayırır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ve leydig hücreleriyle (veya İnterstisyel hücreler) spermatogenezin gerçekleştiği, sayıları 1-4 arasında değişen seminifer tübüller bulunur (16,19).

2.1.1. Seminifer Tübüller

Her bir seminifer tübül yaklaşık 150 µm çapında, 80 cm uzunluğunda, iki ucu rete testise açılan "U" şeklinde kanal yapısındadır (15). Rete testis, mediastinum testise gömülü, tek katlı kübik epitelle döşeli ve birbirleriyle bağlantılı kanallar ağıdır (16). Seminifer tübüllerin toplam uzunluğu testis başına 250 metredir (20,21). Seminifer tübüller testisin fonksiyonel birimidir ve testis volümünün 2/3'ünü kapsar (22).

Seminifer tübül lümenini kompleks, çok katlı bir yapıda olan seminifer epitel döşer. Seminifer epitel somatik sertoli hücrelerinden ve spermatogenik hücrelerden (spermatogonyum, spermatosit, spermatid) oluşur. Bu epitelin bazal laminası, miyoid hücrelerden ve kollajen fibrillerinden zengin fibröz bir bağ dokusu ile çevrilidir. Miyoid hücreler ritmik kontraktıl aktiviteleri sayesinde henüz hareket yeteneği olmayan spermatozoayı rete testise yönlendirir (15).

2.1.1.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri 1865 yılında İtalyan fizyolog Enrico Sertoli (1842-1910) tarafından tanımlanmıştır (23). Puberteye kadar seminifer epitelin baskın hücresidir. Puberteden sonra seminifer epitelin yaklaşık % 17-20'lik bir kısmını oluşturur (22).

Uzun, prizmatik, replike olmayan ve seminifer epitelin çok tabakalı bazal laminası üzerinde uzanan hücrelerdir (18). Testisin interstisyel kompartmanı ile seminifer tübül lümeni arasında bir köprü işlevi görür (15).

Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral plazma membranında kompleks katlantılar bulunur. Bu sayede gelişmekte olan spermatogenik hücrelere ev sahipliği yapar (15). Her bir sertoli hücresi sayıları 30 ile 50 arasında değişen gelişmekte olan germ hücrelerini destekler (16). Bu işlev, aktin filamentlerinin, tübülobulbar komplekslerin, ektoplazmik özelleşmelerin, ara filamanların ve mikrotübüllerin oluşturduğu kompleks bir hücre iskelet ağı ile sağlanmaktadır (22).

Sertoli hücreleri, çok sayıda mitokondriyon, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi, granülsüz ve granüllü endoplazmik retikulum (ER), lipid damlacıkları, lizozomlar, ve zengin bir hücre iskelet ağı (vimentin, aktin ve mikrotübüller) içerir. Oval ya da üçgen şekilli olabilen ökromatik bir çekirdek ile belirgin bir çekirdekçiğe sahiptir (15,16,18).

Sertoli hücresi, membranının bazolateral yüzeyinde bulunan sıkı bağlantılar aracılığıyla komşu sertoli hücreleri ile bağlantı kurar. Bazolateral sıkı bağlantılar seminifer tübül lümenini bazal kompartman ve adluminal kompartman olarak ikiye ayırır. Spermatogonyumlar ve erken primer spermatositler bazal kompartmanda sınırlıdır. Daha olgun spermatositler ve spermatidler luminal kompartmanda bulunur (18). Komşu sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, oluklu bağlantılar (gap junctions), desmozomlar ve bazal ektoplazmik özelleşmeler ile peritübüler miyoid hücreler (PMH) ve endotelyal hücreler kan testis bariyerini (KTB) oluşturur (24,25).

KTB, gelişmekte olan germ hücreleri için gerekli olan mikroçevrenin devamlılığını sağlar ve immün ayrıcalıklı bir alan oluşturur.

Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri destekler, korur ve besler, rezidüel cisimcikleri (spermiyogenezin sonunda spermatidlerden atılan sitoplazmik artıklar) ve farklılaşamayan spermatogenik hücreleri fagosit eder.

Sertoli hücreleri hem endokrin hem ekzokrin salgı fonksiyonuna sahiptir ve androjen bağlayıcı protein (ABP), inhibin, plazminojen aktivatör, transferrin, seruloplazmin, müllerian inhibe edici faktör (MIF), kök hücre faktörü (İng. stem cell factor-SCF) ve gliyal hücre hattı kaynaklı nörotropik faktör (İng. glial cell line-derived neurotrophic factor-GDNF) gibi molekülleri salgılamaktadır. Sertoli hücrelerinin ekzokrin salgı ürünleri (özellikle ABP) ile farklılaşan spermatogenik hücreler için yüksek düzeyde testosteron içeren mikroçevrenin devamlılığı sağlanır (18).

2.1.1.2. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) seminifer tübüllerin arasındaki bölgede kan damarları ve lenfatik kanalların komşuluğunda bulunan büyük, poligonal, eozinofilik hücrelerdir. Steroid üreten diğer hücrelerde olduğu gibi bol miktarda iyi gelişmiş granülsüz ER, tübüloveziküler kristal mitokondria ve lipid damlacıkları içerir. Fetal leydig hücreleri gestasyonun yaklaşık sekizinci haftasında aktif bir şekilde steroid hormon sentezine başlar. Fetal hayatın beşinci ayından itibaren inaktif oldukları bir döneme girer. İnaktif leydig hücrelerini fibroblastlardan ayırt etmek zordur. Leydig hücreleri pubertede gonadotropik stimülasyon sonrasında yeniden androjen salgılamaya başlar ve yaşam boyunca aktif kalır. Testosteron ve diğer androjenlerin salgılanması erkek fetusta gonadların normal gelişimi için gereklidir. Yetişkinde ise androjenler spermatogenezin, aksesuar bez salgılarının ve sekonder cinsiyet karakterlerinin devamlılığını sağlar. Serumda bulunan testosteronun yaklaşık % 95'inin kaynağı leydig hücreleridir, kalan %5'lik kısım ise adrenal korteksten kaynaklanır (15,18,26).

2.2. Spermatogenez

Germ hücreleri, nihai hedefi spermatozoa olmak olan ve böylece nesiller boyunca genetik ve epigenetik bilgi aktarım işlevini gerçekleştiren hücreler topluluğudur (22). Primordiyal germ hücreleri (PGH), epiblasttan köken alır, primitif çizgi boyunca göç eder ve üçüncü haftada yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm

hücrelerinin arasına yerleşir (27). PGH, gelişimin 3. ve 5. haftaları arasında gonadal kabarıntıya göç eder ve gonositlere farklılaşır. Gonositler hücre siklusunun G0 fazında arreste girer ve doğuma kadar mitotik olarak inaktif halde kalır. SCF, stromal hücre kaynaklı faktör 1 (İng: stromal cell derived factor 1-SDF-1), aktivatör protein-2 γ (AP-2 γ), büyüme ve farklılaşma faktörü 3 (İng: growth and differentiation factor 3-GDF3), östradiol, retinoik asit ve DNA metilasyonu, primordiyal germ hücrelerinin ve gonositlerin farklılaşmasında önemli role sahip olan faktörlerdir. Bu faktörler bazı infertilite olgularının ve testiküler tümörlerin kaynağı olabilmektedir. Doğumdan sonraki ilk 6 ay boyunca gonositler spermatogonyumlara farklılaşmaktadır (22).

Spermatogenez, puberte ile tetiklenen, diploid (2n) spermatogonyumlardan haploid (1n) spermatozoonların geliştiği kompleks olaylar dizisidir. İnsanlarda yaklaşık yetmiş dört gün sürer ve üç evrede incelenmektedir: Spermatogonyal evre, spermatosit evresi (mayoz) ve spermatid evresi (spermiyogenez) (18,28,29).

2.2.1. Spermatogonyal Evre

Spermatogonyumlar, diğer tüm spermatogenik seri hücrelerinin diploid öncülüdür. Spermatogonyumlar, bazal membranın hemen üzerinde bulunan ve Sertoli hücre yüzeyleriyle yakın ilişki halinde olan küçük, yuvarlak, 12 μ m çapında hücrelerdir (16,22).

Spermatogonyal evrede kök hücreler mitoz bölünmeler geçirerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri ve adanmış spermatogonyum popülasyonunu oluşturur. Spermatogonyumlar oval bir çekirdeğe, az miktarda Golgi kompleksi ve mitokondri ile birçok serbest ribozoma sahiptir (22). Spermatogonyal kök hücreler rutin hematoksilin&eoizin (H&E) preparatlarında nükleer görünümünde farklılıklar gösteren spermatogonyal soyları üretir. Nükleer farklılıklar temel alınarak üç tip spermatogonyal hücre tanımlanmıştır: Tip A koyu (İng. Type A dark-Ad), Tip A soluk (İng. Type A pale-Ap) ve Tip B (18,30,31).

Ad ve Ap spermatogonyumlar kök hücre işlevine sahiptir. Ad spermatogonyum ince granüler kromatinli, yoğun bazofilik, oval nükleusa sahiptir. Bu tip, seminifer epitelin kök hücre rezervini oluşturur. Ap spermatogonyum, açık renk boyanan ince granüllü kromatinli oval nükleusa sahip aktif kök hücresidir. Ap spermatogonyumlar ya yeni Ap spermatogonyumları ya da mayoz öncesi tek bir mitotik bölünme geçiren Tip B spermatogonyumları oluşturmak üzere proliferer olur (18,32–34). Tip B

spermatogonyumlar, genel olarak nükleer zarf boyunca ve merkezi nükleolusun çevresinde geniş kümeler oluşturacak şekilde yoğunlaşmış kromatini bulunan yuvarlak nükleusa sahiptir (18).

Spermatogonyumların kendini yenilemesi, farklılaşması ya da apoptoza gitmesi sertoli hücre kaynaklı faktörler tarafından belirlenmektedir. GNDF, spermatogonyal kendini yenilemeyi desteklemektedir. SCF, BMP 4, retinoik asit ile Notch1/Jagged2 sinyal sistemi ise farklılaşmayı indüklemektedir. Spermatogonyumların kaderini bazı mikroRNA'lar da etkilemektedir (35–38). Spermatogenez sırasında germ hücrelerinin yaklaşık %50-70' i apoptoza uğramaktadır. Germ hücrelerine apoptoza girme sinyali sertoli hücreleri tarafından FaS-FaSL sistemi aracılığıyla verilmekte ve Bcl-2, Bax ve TNF- α tarafından düzenlenmektedir (39–42). Nükleer faktör κ B (NF- κ B), germ hücre apoptoz regülasyonunda rol alan sertoli hücre kaynaklı faktörlerin transkripsiyonunu indükleyerek germ hücrelerinin apoptozunu dolaylı yoldan etkiler. Germ hücrelerinin kaderini belirleyen faktörlerdeki herhangi bir bozukluk erkek fertilité potansiyelini etkilemektedir (43,44).

Spermatogenezde oluşan kardeş hücreler ince bir sitoplazmik köprü ile birbirine bağlı kalır. Bu bağlantı orijinal Ap hücreleri çiftinden gelen her klonun senkronize olarak gelişimi için gereklidir. Tanımlanabilen her bir klon, spermatogenik siklusta bir evre olarak kabul edilmektedir. İnsanlarda H&E preparatlarındaki nükleer farklılıklara göre altı evre tanımlanmıştır (45). Bu evrelerdeki ya da hücre birliklerindeki bozukluklar yetersiz sperm üretimi ile sonuçlanabilmektedir (46–48).

2.2.2. Spermatosit Evresi (Mayoz)

Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesi primer spermatositleri üretir. Primer spermatositler oluştuktan kısa bir süre sonra DNA replikasyonu olur, hücre siklusunun G2 evresine geçilir, normal sayıda kromozom ($2n$) ve iki katı miktarda DNA ($4d$) ile ilk mayoz bölünme başlar. Mayoz I kromozom sayısını azaltır ($2n$ 'den $1n$ 'ye) ve DNA miktarını $4d$ 'den $2d$ 'ye getirir. Böylece haploid kromozom sayısı ($1n$) ve $2d$ miktarda DNA ile karakterize sekonder spermatosit oluşur. Mayoz I yaklaşık on gün süren uzun bir profaz ile karakterizedir. Profaz sırasıyla leptoten (bazal kompartmanda), zigoten (adluminal kompartmanda), pakiten, diploten ve diakinez alt evrelerinden oluşur. Bu alt evrelerde görülen temel olaylar; zigoten-pakiten evresinde homolog kromozomların eşleşmesini kolaylaştıran sinaptonemal kompleks oluşumu, homolog

kromozomların eşleşmesi (sinapsis), homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri arasında genetik bilgi değişimi (krossing-over) ve eşleşmiş homolog kromozomların ayrılması gibi olaylardır. Birinci mayotik bölünme sonucunda sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler interfazda kısa süre kalıp hızla ikinci mayotik bölünmeye girer. Dolayısıyla bu hücrelerin testis kesitlerinde görülmesi pek mümkün değildir. Mayoz II'den önce DNA replikasyonu olmaz. Mayoz II bölünme ile tek bir sekonder spermatositten, tek bir kromatid (1d) içeren haploid sayıda kromozoma (1n) sahip olan iki adet erken (yuvarlak) spermatid oluşur (15,18,49,50).

2.2.3. Spermatid Evresi (Spermiyogenez)

Spermiyogenez, yuvarlak spermatidlerin spermatozoa haline geldiği olgunlaşma sürecidir. Bu aşamada, daha fazla hücre bölünmesi olmaz ve bir dizi sitoplazmik ve nükleer değişiklik meydana gelir. Spermiyogenezde başlıca dört durum meydana gelir: Flagellum, akrozom ve manşet yapılarının oluşumu ile nükleer yoğunlaşma (15).

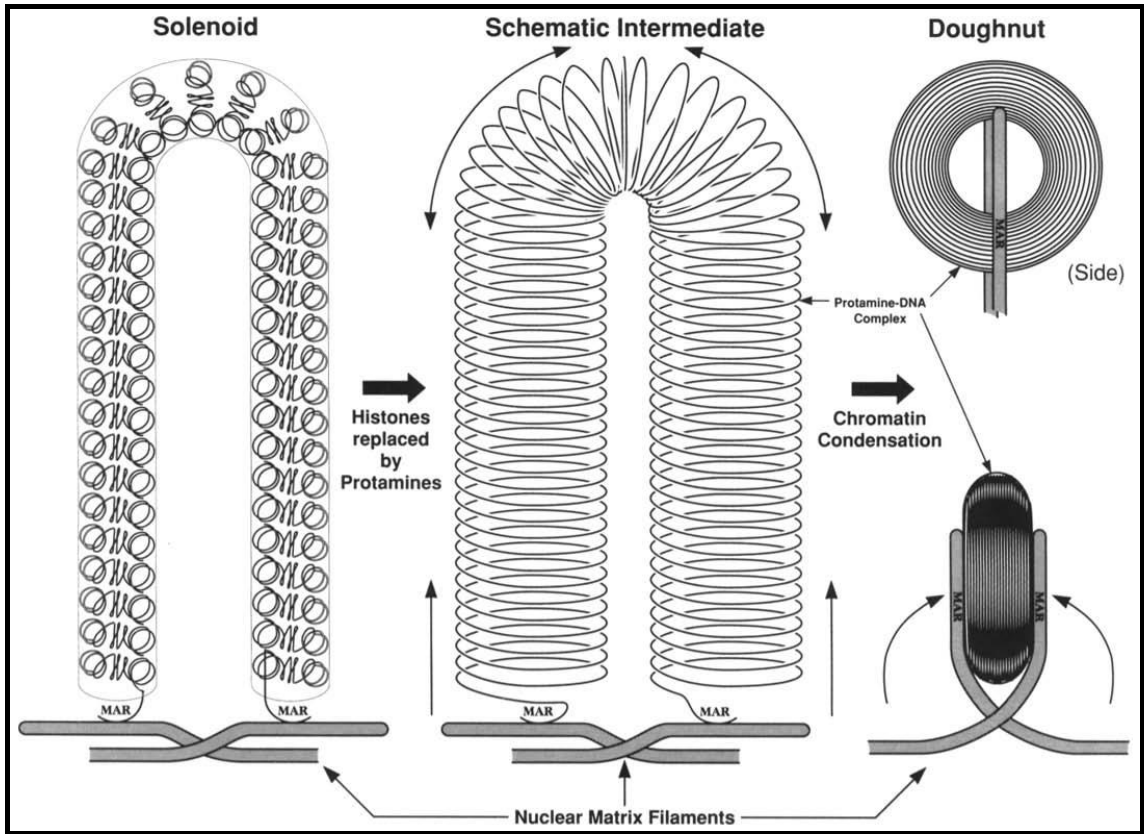
2.2.3.1. Nükleer Değişiklikler

Sperm kromatin yoğunlaşması çok sıkı bir şekilde düzenlenmiş kompleks bir süreçtir. Her bir kromozomdaki çift iplikli DNA zinciri nükleer annulusa bağlanır. Nükleer annulus (NA) 2 µm uzunluğunda ve halka şeklinde olan sperme özgü bir yapıdır (51). NA'ya bağlanan kromozomlar "DNA ilmek bölgesi" halinde düzenlenir. Her bir DNA ilmek bölgesi matriks bağlanma bölgeleri (İng. matrix attachment regions-MARs) aracılığıyla oluşturulur ve 30-50 kb miktarında DNA içerir (52).

Somatik hücrelerde ve yuvarlak spermatidlerde, DNA histonlar kullanılarak nükleozomlar halinde düzenlenir. Nükleozomlar histon oktamerine (ikişer adet H2A, H2B, H3 ve H4) sahiptir. Histon oktameri 146 baz çifti uzunluğundaki DNA'yı sarar. Komşu nükleozomlar yaklaşık 20 baz çifti uzunluğundaki bağlayıcı DNA ile birleşir. Altı adet nükleozom bir araya gelerek 30 nm uzunluğundaki solenoid adlı yapıyı oluşturur. H1 histonu nükleozom bağlantı bölgelerinde konumlanır ve solenoid yapısının stabilizasyonunu sağlar (52).

Spermiyogenez sırasında histonlar önce transizyonel proteinlerle (TP1 ve TP2) daha sonra arjininden zengin protaminlerle yer değiştirir. İnsan sperm çekirdeği %85 oranında protamin içerir. Protaminlerde bulunan pozitif yüklü arjinin rezidüleri DNA'daki negatif yüklü fosfat gruplarını nötralize eder. Komşu DNA ipliklerindeki

protaminler birbirlerine kovalent disülfid bağları ile bağlanır. Protamine bağlanan DNA, histonlara bağlanan aynı miktardaki DNA'ya kıyasla çok daha az alan kaplar. Çok daha sıkı bir şekilde paketlenen bu yapı toroid ya da “donut” olarak isimlendirilir. Toroid yapısı sayesinde, spermiogenezin sonraki aşamalarında sperm çekirdeğindeki tüm transkripsiyonel aktiviteler durur (53).



Şekil 2-1: Tek bir DNA ilmek bölgesi üzerinde solenoid ve toroid yapılarının gösterimi (52).

2.2.3.2. Akrozom Oluşumu

Akrozom, başlıca hyalüronidaz ve tripsin benzeri proteaz olan akrosin gibi hidrolitik enzimleri içeren özelleşmiş bir lizozom tipidir (16). Akrozom oluşumu nükleer kondansasyonu takip eder ve dört ayrı fazda gerçekleşir: Golgi, kep, akrozom ve olgunlaşma (15,54).

Golgi fazı, spermatidin çok sayıdaki Golgi kompleksinde kümelenen PAS pozitif granüllerinin (proakrozomal granüller) bulunması ile karakterizedir. Golgi kompleksi akrozom biyogenezinde gerekli olan proteinlerin başlıca kaynağıdır. Birçok akrozom spesifik protein (proakrozozin, akrogranin vb.) erken mayotik evrede elektron yoğun veziküller ya da proakrozomal granüller (PAG) aracılığıyla paketlenir. PAG'ler

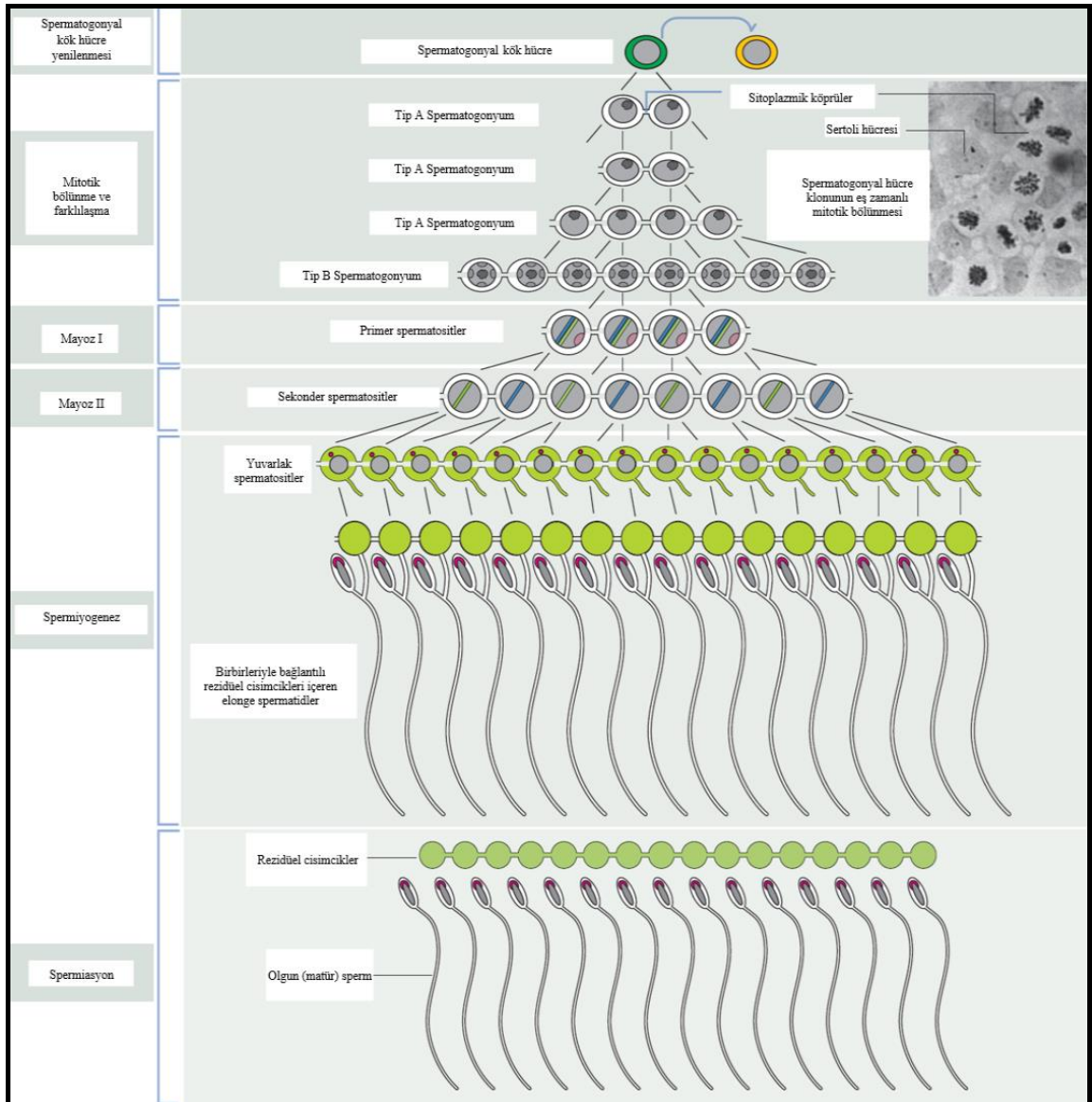
mayoz tamamlanana ve takiben yuvarlak spermatid oluşana kadar Golgi kompleksi içinde kalır. Başlangıçta Golgi kompleksinin çekirdeğe bakan içbükey yüzeyinde yer alan PAG'ler Golgi fazında, nükleer membrana doğru yer değiştirerek akrozomal vezikülü oluşturmak üzere bir araya gelir (18,55). PAG'lerin transportu kinezin, dinein ve miyosin gibi aktin filamentleri ile ilişkili motor proteinlerin ve mikrotübüllerin varlığını gerektirir (56). Akrozomal kese çekirdek membranına akroplaksom olarak isimlendirilen ve F-aktin ve keratin 5 içeren hücre iskelet plağı aracılığıyla bağlanır (15). Golgi fazını takiben gerçekleşen kep fazında akrozomal vezikül giderek yassılaşır ve çekirdek üzerinde, çekirdeğin yaklaşık 2/3'ünü kaplayacak şekilde yayılır (16,54). Akrozomal vezikülün pozisyonu, gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler. Gelişen spermin akrozomu ve yoğunlaşmış çekirdeği içeren başı, Sertoli hücresinin içinde gömülü halde kalır (16,18). Akrozom gelişiminde önemli yeri olan Golgi kompleksi küresel bir şekil alır ve akrozomdan diğer tarafa doğru göç eder.

Akrozom gelişimindeki bozukluklar, sperm baş şeklinde belirgin değişikliklere neden olur. Akrozomun hiç bulunmaması durumu olan globozoospermi yönetimi zor olan nadir bir infertilite sebebidir. Globozoospermi, oosite penetre olamayan ve oosit aktivasyonunu sağlayamayan yuvarlak başlı spermlemlerle karakterizedir.

2.2.3.3. Sperm Kuyruğunun Oluşumu

Sperm kuyruğu bir diğer adıyla flagellum dört bölümden (boyun ya da bağlantı parçası, orta parça, esas parça ve son parça) oluşan hücre iskelet yapısıdır. Akrozom gelişimi esnasında proksimal ve distal sentriyol jukstanükleer bölgeden spermatidin arka kutbuna göç eder. Aksesuar proteinlerle çevrelenmiş proksimal ve distal sentriyolün oluşturduğu yapı sentrozom olarak isimlendirilir (54). Flagellumun bağlantı parçası proksimal sentriyol ve perisentriyolar matriks tarafından oluşturulurken, diğer parçalar distal sentriyolden gelişir. Bağlantı parçası sperm başı ile kuyruğu birleştirir (15). 9+2 mikrotübül yapısında düzenlenmiş aksonem yapısı, erken spermiyogenez sırasında distal sentriyolden ortaya çıkan ilk yapıdır. Proksimal sentriyol sperm kuyruğunun uzun aksına 75-90°'lik bir açıyla uzanırken, aksonem seminifer tübül lümenine doğru uzanır (16,42,54). Aksonem gelişimi başladıktan çok kısa bir süre sonra, manşet yapısı ortaya çıkar. Bu yapı mikrotübüllerden ve akroplaksom komşuluğunda bulunan perinükleer halkadan oluşur (15). Aksonemi oluşturan dokuz dış mikrotübül çiftinin etrafında dış yoğun fiberler uzanır. Plazma membranı büyümekte

olan flagellumu sarmak üzere posteriyora doğru hareket ederken, manşet kaybolur ve mitokondriyonlar, boyun bölgesindeki kaba fibrillerin etrafında ve boyun bölgesinin hemen posteriyor uzantısında sıkı, heliks tarzında saran bir kılıf oluşturmak üzere sitoplazmanın kalan kısmından göç eder. Bu bölge sperm kuyruğunun orta parçasıdır. Orta parçanın distalinde uzunlamasına iki sütundan ve çok sayıda bağlantı kuşağından oluşan bir fibröz kılıf, esas parçanın dokuz longitudinal fiberini çevreler ve flagellumun neredeyse ucuna kadar uzanır. Kuyruğun, fibröz kılıfın distalinde kalan segmenti son parça olarak adlandırılmaktadır (18).



Şekil 2-2: Spermatogenezin şematik diyagramı (15).

2.2.3.4. Spermiasyon

Spermioyogenezin olgunlaşma (matürasyon) fazında fazla sitoplazma (rezidüel cisimcik) azaltılır ve olgun spermatozoon oluşur. Rezidüel cisimcik sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir. İnterselüler köprüler yıkılır ve spermatidler lümene salıverilir. Spermatidlerin seminifer tübül lümenine salınması işlemi spermiasyon olarak adlandırılmaktadır. Sertoli-spermatid bağlantılarında β 1-integrinler bulunmaktadır ve spermiasyon sırasında integrin-bağlı kinaz aktivitesinde görülen artış spermatid salınmasında enzimatik bir kontrol olduğunu düşündürmektedir. Testisteki spermiasyon hızı ejakülattaki sperm sayısını belirler. Çeşitli hormonal terapiler, toksik ajanlar ve gonadotropin supresyonu spermiasyon bozukluğuyla sonuçlanabilir. Bu durumda spermatidler sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir (18).

2.3. Olgun (Matür) Spermin Yapısı

Sperm özelleşmiş fonksiyonları için oldukça özelleşmiş yapısal bileşenlerden oluşur. Spermin ilk ayrıntılı tasviri 1677 yılında Antoni van Leeuwenhoek tarafından yapılmıştır. Sperm baş ve kuyruk (flagellum) olmak üzere başlıca iki kısımdan oluşur (57).

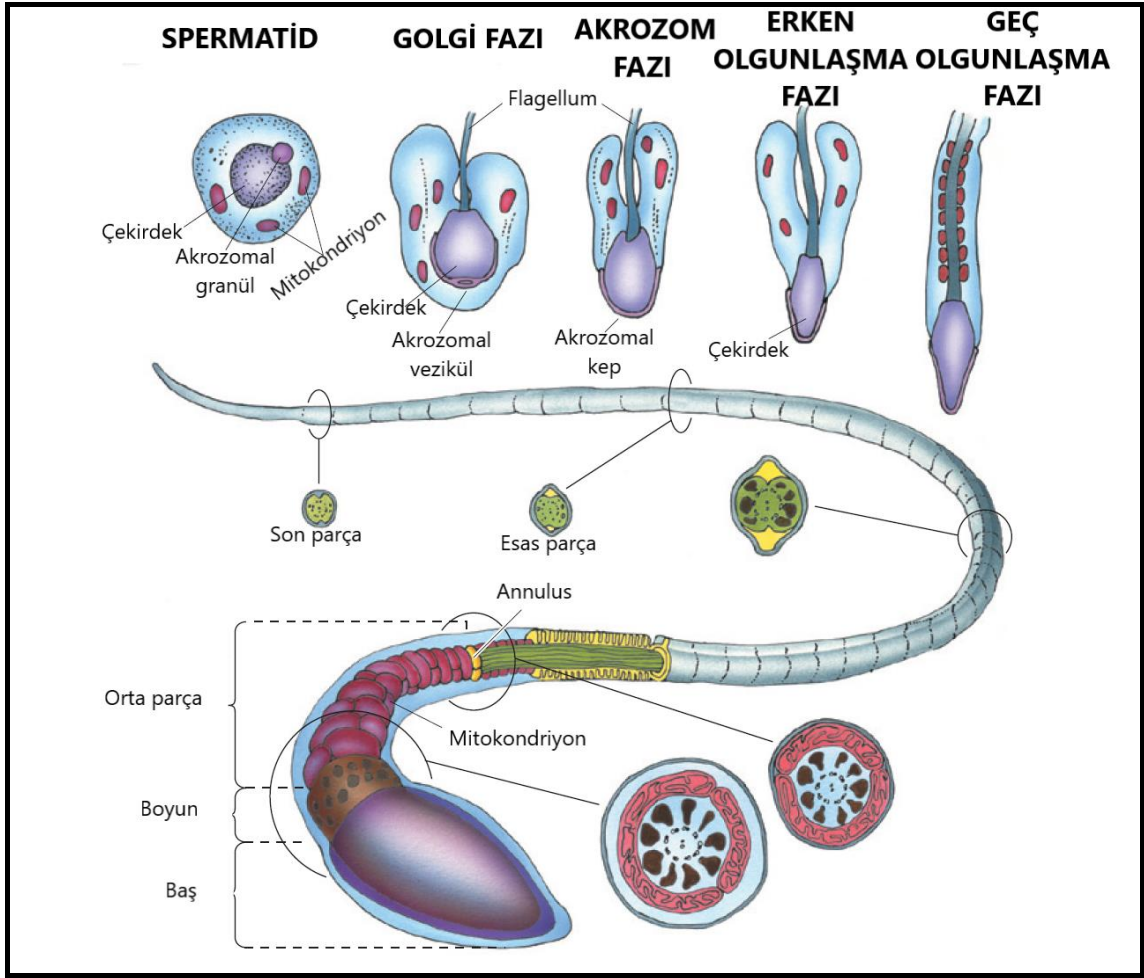
Sperm bulunduğu bölgeye göre farklılık gösteren plazma membranı ile kaplıdır. Olgun insan spermi yaklaşık 60 μ m uzunluğundadır. Sperm başı yaklaşık 4,5 μ m uzunluğundadır ve başlıca çekirdekten ve akrozom-akroplaksom kompleksinden oluşur (15). Daha ayrıntılı olarak, içten dışa doğru çekirdek, çekirdek zarı, perinükleer teka (PNt), akrozom ve plazma membranından oluşur.

Çekirdek DNA'sı oldukça yoğunlaşmış haldedir. İnsan sperm DNA'sının yaklaşık %15'i histon proteinleriyle paketlenmiş haldedir (58). Kalan %85'lik kısım ise arjinin ve lizinden zengin protaminlerle paketlenir. Sperm matürasyonu sırasında pek çok nükleoprotein yıkılır. Yıkılan proteinler çekirdek porları aracılığıyla boyun sitoplazmasına taşınır ve rezidüel cisimciklere dahil edilir (59).

PNt, nükleer zarfın dışında bulunmaktadır. Hücre iskeleti proteinlerinden (aktin ve spektrin, tübülün gibi aktin bağlayıcı proteinler) oluşur. PNt başın şeklinin devamlılığını sağlar ve fertilizasyon sırasında ortadan kalkar. PNt, subakrozomal, ekvatoryal ve postakrozomal olmak üzere üç bölüme ayrılmaktadır (54).

Akrozom, spermiyogenez esnasında golgi aygıtından oluşturulan özelleşmiş bir organeldir. Sperm başının ön üçte ikilik kısmını çevreleyen iki tabakalı bir membran yapısıdır. Fertilizasyon sırasında spermin oosite penetrasyonu için gerekli olan enzimleri ve sperm-zona pellusida (ZP) etkileşimi için gereken reseptörleri içerir. İç akrozomal membran (İAM) ve dış akrozomal membrandan (DAM) oluşur. İAM nükleer zarfın dış membranını çevreler ve DAM ile devam eder. DAM ise plazma mebranı ile çevrelenmiştir. Akrozom reaksiyonu sırasında DAM ortadan kaybolur. İAM ise fertilizasyon boyunca varlığını sürdürür. İAM ve DAM arasında proteazları içeren akrozomal matriks bulunur (60). Başlıca akrozomal matriks proteazı akrosin ya da serin proteazdır. Akrosin, spermatozoaya spesifik bir proteindir ve ZP penetrasyonu için önemlidir (61). Akrozom, akrosin dışında nöraminidaz, hyalüronidaz, asit fosfataz, aril sülfataz ve akrogranin gibi enzimlere de sahiptir (62,63).

Sperm kuyruğu, boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört bölüme ayrılır. Kısa olan boyun implantasyon fossası olarak adlandırılan bölgeden çekirdeğe bağlanan proksimal sentriyol ve aksonemi oluşturan distal sentriyol ile kaba fiberlerin başlangıçlarını içerir (15,18). Orta parça yaklaşık 7 µm uzunluğundadır ve mitokondriyonları içerir. Mitokondriyonlar kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin etrafında sarmal tarzda sarılmışlardır. Kuyruğun merkezini 9+2 mikrotübül yapısında olan aksonem oluşturur (18). Sarmal tarzda mitokondriya ile aksonem arasında dokuz adet dış yoğun fiber bulunur. Mitokondriyal sarmalın sonlandığı bölge annulus olarak isimlendirilir. Annulus septin proteinlerini içerir, kuyruğun şekilsel bütünlüğünün devamlılığını sağlar ve orta parçadan esas parçaya geçiş bölgesidir (64). Esas parça yaklaşık 40 µm uzunluğundadır, aksonem ve yedi adet dış yoğun fiber ile fibröz kılıfı içerir. Son parça yaklaşık 5 µm uzunluğundadır ve yalnızca aksonemal kompleksi içerir (15).



Şekil 2-3: Spermiyogenezin ve olgun sperm yapısının şematik diyagramı (62).

2.4. Epididimal Olgunlaşma

Seminifer tübül lümenine salınan sperm hücreleri hareketsizdir ve sertoli hücreleri tarafından üretilen bir sıvının içinde taşınır. Sıvı ve sperm peritübüler myoid hücrelerin peristaltik kasılmalarının yardımıyla seminifer tübüllerden akar, düz tübüllere girer, düz tübüllerden rete testise, rete testisten boşaltım kanal sisteminin ilk parçası olan duktuli efferentesin ekstratestiküler kısmına ve daha sonra duktus epididimisin proksimal kısmına geçer (18). Epididimiste gözlenen en belirgin değişiklik harekettir ve hareketlilik epididimisin bölgelerine göre değişir (kaput epididimisten elde edilen spermlerin %3'ü ileri hareketliken, kauda epididimiste ileri hareketlilik %60'a kadar çıkabilmekte) (19). Epididimal olgunlaşma sürecinde sperm kuyruğundaki dış yoğun fiberlerlerin disülfid bağlarıyla stabilizasyonunun artması, kuyruk hareketliliğinin yeterliliğini sağlar (19). Epididimiste sperm çekirdek DNA'sı yoğunlaşır. Sperm başının boyutu azalır. Sitoplazma daha da azaltılır. Sperm hücreleri daha ince hale gelir. Plazma

membranının lipidlerinde, proteinlerinde değişiklikler ve glikozilasyon meydana gelir. Dış akrozomal membranda değişimler (dekapasitasyon) gerçekleşir. Sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneğini inhibe etmek için yüzey ilişkili dekapasitasyon faktörü (İng. Surface-associated decapitation factor) eklenir (18).

Spermiler ejakülasyondan önce epididimiste depolanır. Sperm, erkek boşaltım sisteminde birkaç hafta canlı kalabilir, dışı üreme kanalında ise yalnızca 2-3 gün canlılığını sürdürebilir. Dışı üreme kanalında bir süre sonra ovumu fertilize edebilme yeteneğini kazanır. Sperm membranından glikokaliks komponentlerinin (glikokonjugatlar) uzaklaştırıldığı ve yerine yenisinin konduğu bu süreç kapasitasyon olarak adlandırılmaktadır (18).

2.5. Androloji Laboratuvar İşlemleri

2.5.1. Semen Analizi

Semen (meni) hipotalamo-testiküler aks dahilinde testislerin işlevi ve posttestiküler boşaltma kanallarıyla yardımcı bezlerin salgısından oluşan bir son üründür (19). Semen hacminin yaklaşık % 90'ı başlıca prostat bezi ve seminal veziküller olmak üzere yardımcı bezlerin ve epididimisin salgılarından oluşmaktadır (65).

Semen; cinsel perhiz süresine, sıcaklık farklılıklarına, günün farklı saatlerine, mevsimlere, emosyonel duruma, çalışma koşullarına, örneğin verildiği yere ve verilme yöntemine göre farklılık gösterir. Bu nedenle semen analizi 3-4 hafta aralıklarla iki kez yapılmalı ve sperm parametrelerindeki farklılık %20'den fazlaysa yinelenmelidir (19).

Semen ilk olarak volüm, renk, pH, likefaksiyon (semenin çözünürlüğü) ve viskozite açısından değerlendirilir. DSÖ kriterlerine göre semen hacmi 1,5 ml veya daha fazla olmalıdır. Normal likefiye olmuş semen numunesi homojen, gri-opelesan bir görünüme sahiptir (19). Sperm konsantrasyonu çok düşükse, daha az opak bir görünüm alabilir; rengi de farklılaşabilir (eritrositler mevcutsa kırmızı-kahverengi veya hasta ikterikse veya bazı vitaminler veya ilaçlar alıyorsa sarı olabilir). Normal semen pH'sı en az 7,2 olmalıdır. Ejakülasyonu takiben seminal veziküllerden salgılanan protein kinaz enziminin aktivasyonu ile semen koagüle olur. Koagüle olan semen prostat bezi salgıları aracılığıyla 15-20 dakika içinde likefiye olur. Likefaksiyon için üst sınır bir saattir. Viskozite, numunenin içine bir cam çubuk sokup çekerek oluşturulan iplikçiğin

uzunluğu gözlenerek değerlendirilebilir. İplikçiğin uzunluğu en fazla 2 cm olmalıdır (65).

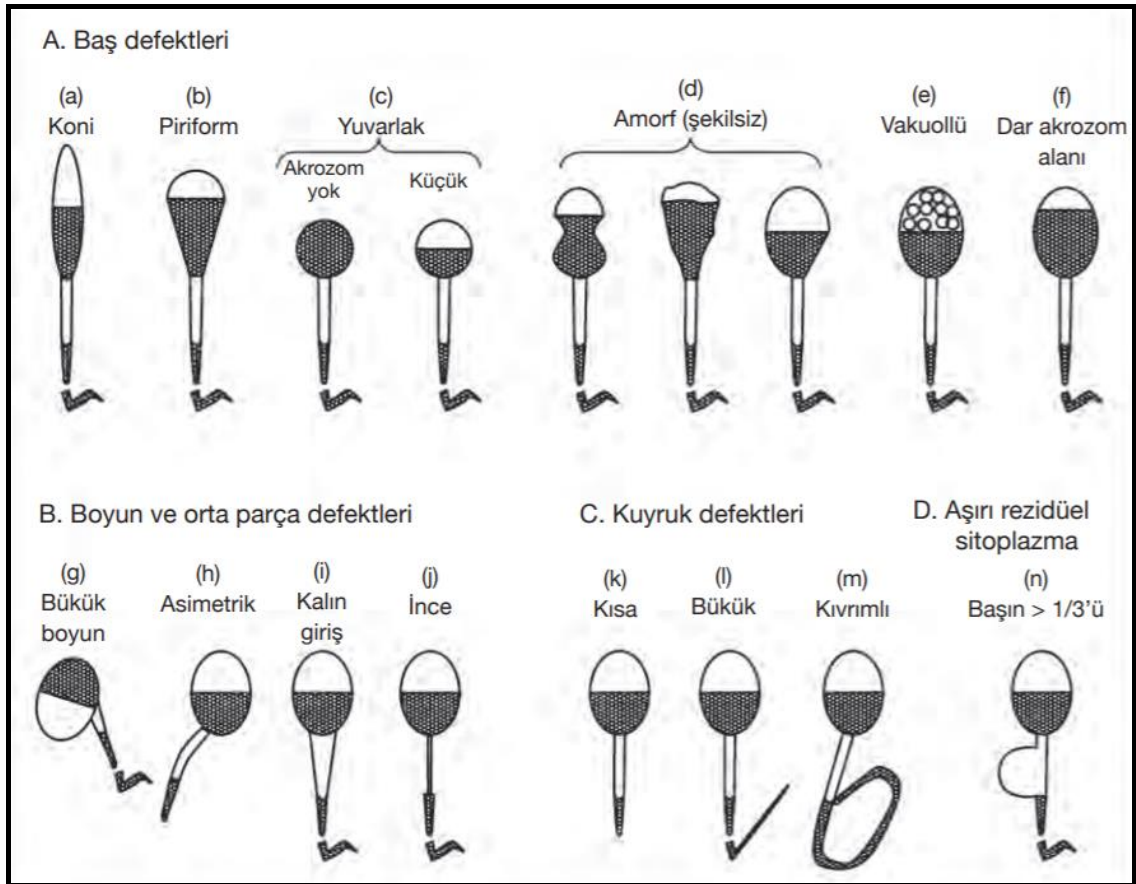
Numunenin ilk mikroskopik incelenmesinde preparat, toplam 100x büyütme altında taranır ve mukus iplikçik oluşumu, sperm agregasyonu veya aglütinasyonu, spermatozoa dışında hücrelerin (epitel hücreleri, yuvarlak hücreler: lökositler ve immatür germ hücreleri) ve izole sperm başları veya kuyruklarının varlığı incelenir. 200x veya 400x büyütme altında, Makler kamerası ya da Neubauer hemositometresi kullanılarak sayım yapılır ve sperm hareketliliği değerlendirilir. Spermatozoanın hareketliliği ileri hareket (Progresif Motilite; PR), yerinde hareket (Nonprogresif Motilite; NP) ve hareketsizlik (İmmotilite; IM) şeklinde derecelendirilir. İleri hareketli spermeler hızdan bağımsız olarak doğrusal veya geniş bir daire içinde aktif olarak hareket ederlerken, yerinde hareketli spermeler küçük daireler halinde yüzme, başı yerinden güçlükle oynatan kamçısal hareket veya yalnızca kuyruğun kamçısal hareketi gibi hareket şekilleri gösterir (66).

Semen analizinde gözlenen hareketsiz spermelerin oranı %60'ı geçmemelidir. Hareketsiz spermeler de canlı olabilir. Canlılık; eozin, eozin-nigrozin, tripan mavisi gibi supravital boyalarla ve hipo-ozmotik şişme testi ile değerlendirilebilir. Canlı olmayan (ölü) hücrelerde bulunan hasarlı plazma membranlarının, membrana penetre olmayan boyaların hücre içine girmesine izin vermesi, o hücrelerin ölü olduğunu gösterir. Hipoozmotik şişme testi ise, yalnızca membranları sağlam (canlı hücreler) hücrelerin hipotonik sıvılarda şişeceği ilkesine dayanır (66).

Morfolojik değerlendirmeler için Papanicolaou, Shorr, Giemza, Bryan Leichman boyama yöntemleri ile Diff-Quick ve Spermac (Midatlantic Diagnostics) gibi kullanıma hazır kitler kullanılmaktadır. Morfolojik özellikler Kruger ve DSÖ 2010 kriterleri ile belirlenmektedir. Baş düzgün, düzenli sınırlı ve genellikle oval şekilli olmalıdır. “Baş alanının % 40–70’ini kaplayan iyi tanımlanmış bir akrozom bölgesi mevcut olmalıdır. Akrozom bölgesi; hiç büyük ve iki küçük vakuolden fazlasını içermemeli, vakuoller sperm başının % 20’sinden fazlasını kaplamamalıdır. Post-akrozomal bölge herhangi bir vakuol içermemelidir. Orta parça ince, düzenli sınırlı ve yaklaşık sperm başı uzunluğunda olmalıdır. Orta parçanın ana eksenini sperm başının ana eksenine aynı hizada olmalıdır. Aşırı miktarlarda olduğu takdirde, rezidüel sitoplazmanın bir anomali olduğu düşünülür (sperm başının üçte birinden daha fazla alanı işgal ederse). Ana parça,

uzunluğu boyunca aynı genişlikte olmalı, orta parçadan ince ve yaklaşık 45 µm uzunlukta (baş uzunluğunun yaklaşık 10 katı) olmalıdır. Kuyruğun kırıldığını gösteren keskin bir açı yapmadıkça, kendi üstüne geriye doğru halka şeklinde kıvrılabilir. Rezidüel sitoplazma boyutu başın 1/3'ünden fazla olmamalıdır" (66).

Sperm parametreleri için referans değerler Tablo 2-1'de verilmiştir.



Şekil 2-4: İnsan spermatozoasının bazı anormal formlarının şematik gösterimi (66)

Tablo 2-1 : Normal semen parametreleri (DSÖ-2010).

Parametre	En Düşük Referans Değer
Volüm (ml)	1,5
pH	>7,2
Total sperm sayısı (milyon/ejakulat)	39
Konsantrasyon (milyon/ml)	15
Total motilite (%)	40
Progresif motilite (%)	32
Canlılık (%)	58
Morfoloji (%)	4

Androloji laboratuvarlarında gereken durumlarda sperm antikorlarının değerlendirilmesi, akrozom reaksiyonunun değerlendirilmesi, hipo ozmotik şişme testi, sperm penetrasyon testleri , hemi zona assay ve DNA bütünlüğünün değerlendirilmesi gibi ileri incelemeler yapılabilir.

2.5.1.1. Sperm DNA Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Günümüzde sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmek için pek çok yöntem bulunmaktadır (67):

- Chromomycin A3 Yöntemi (CMA3)
- DBD-FISH Yöntemi (DNA breakage detection-fish)
- İn Situ-Nick Translasyon Yöntemi (NT)
- Sperm Kromatin Yapısı Tayini (Sperm Chromatin Structure Assay) (SCSA)
- TUNEL [The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine (TdT) Triphosphate (dUTP) Nick End Labeling Assay]
- COMET (Cluster Of Motifs E-value Tool)

- Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (High-Performance Liquid Chromatography) (HPLC)
- Sperm Kromatin Dağılım Testi (Halosperm Test) (Sperm Chromatin Dispersion Test) (SCD)
- Toluidin Mavisi Boyama Yöntemi
- Anilin Mavisi Boyama Yöntemi
- Akridin Oranj Testi (AOT)

Anilin Mavisi Boyama Yöntemi

Terquem ve Dadoune tarafından tanımlanan bu yöntem ile kromatin yoğunlaşma derecesi değerlendirilmektedir (68). Bu yöntem, lizinden zengin histonlarla arjinin ve sisteinden zengin protaminlerin ayırımına dayanmaktadır. Nükleusta histon içeriği fazla olan spermatozoa anilin mavisi ile boyanırken, protamin içeriği yüksek olanlar boyanmaz (69).

Akridin Oranj Testi (AOT)

Bu test Tejada ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Akridin oranj, normal DNA'ya (çift iplikli) monomerik olarak bağlanarak yeşil, RNA ve denatüre (tek iplikli) DNA'ya agregat halinde bağlanarak sarı-turuncu-kırmızı floresan ışıma veren metakromatik bir boyadır. (70). Yöntem, asitle indüklenen denatürasyona karşı sperm DNA duyarlılığının in situ (yerinde) ölçülmesine dayanmaktadır (71). Basit ve ucuz olması, eğitimli bir teknisyen gerektirmemesi ile avantajlı bir yöntemdir. Gözlemci öznelliğinin sonuçları etkilemesi yöntemin dezavantajıdır.

2.5.2. Kriyoprezervasyon

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama); hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısılara kadar soğutulması, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve gelecekte kullanılmak amacıyla saklanması işlemidir (72).

2.5.3. Tarihçe

İnsan sperm kriyobiolojisinin tarihçesi 1776'lara dayanmaktadır. İtalyan rahip ve bilim insanı olan Lazzaro Spallanzani (1729–1799), Leeuwenhoek mikroskobu ile at, boğa, köpek, kurbağa, semender ve insan semenini incelemiştir (73). Semen farklı

sıcaklıklara maruz bırakmış ve dondurulan spermilerin bazılarının çözüldüklerinde hareketliliğini koruyabildiğini gözlemlemiştir.

İtalyan askeri hekim, bilim insanı, antropolog ve vizyoner olan Paolo Mantegazza (1831–1910), insan ve kurbağa spermini -14 ve -17 °C sıcaklıklarına maruz bırakarak gözlemlemiştir (1). Savaşta ölen bir erkeğin kadavrasından elde edilen spermle eşini dölleyebileceği ve öldükten sonra bile meşru çocukları olabileceği fikrini öne sürmüştür (74).

1930 yılında John Hammond ve Arthur Walton, tavşan spermiyle yaptıkları çalışmalarda 10°C’de tutulan spermin dölleme yeteneğini yüz saate kadar koruyabildiğini göstermişlerdir (75,76).

1949 yılında Polge, Smith ve Parkes tarafından gliserolün kriyoprotektan özelliğinin keşfedilmesiyle kriyobiyolojideki gelişmeler hızlanmıştır (1).

Dondurulmuş-çözülmüş spermden yapay dölleme yoluyla elde edilen ilk buzağı, 1952’de C. Polge ve L. Rowson tarafından rapor edilmiştir (77). 1953 yılında Bunge ve Sherman, kuru buzda dondurulmuş ve sonrasında çözülmüş insan sperminden elde edilen ilk canlı doğumu bildirmişlerdir (78).

1963 yılında Sherman ve arkadaşları, dondurulan sperm örneklerinin uzun süre saklanması ve sperm kriyoprezervasyonu sağlık hizmetlerinde yaygınlaşmasını sağlayan sıvı nitrojenle dondurma yöntemini bildirmişlerdir (79,80).

1960-70’li yıllarda kriyoprotektanların özellikleri ve dondurulacak materyale olan olası etkileri incelenmiştir ve kriyobiyolojinin prensipleri oluşturulmuştur (19). Mazur ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmalar, hücreye özgü optimum soğutma ve ısınma oranlarını belirleyen çalışmaların temelini oluşturmuştur (81–83).

İnsanlar için ilk sperm kriyobankaları 1970’li yıllarda kurulmuştur (84). 1973 yılında bir yıldan fazla, 1998 yılında ise yirmi yıldan fazla bir süre saklanan insan sperminden elde edilen ilk sağlıklı bebekler dünyaya gelmiştir (85).

2.5.4. Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Gamet ve embriyo kriyoprezervasyonunun genel prensibi; materyalin kriyoprotektan solüsyonla dengelenmesi, soğutulması, -196 °C sıvı azot içinde

depolanması ve çözülürken de canlılığın korunabileceği fizyolojik ortamlara aktarılmasıdır (19,86).

Dondurulan materyalin canlılık ve kalitesinin korunabilmesi, materyalin türüne, kültür ortamının pH, sıcaklık ve osmolaritesine, kullanılan kimyasallara, uygulanan protokole, protokolü uygulayan kişinin tekniğine ve beceresine bağlıdır.

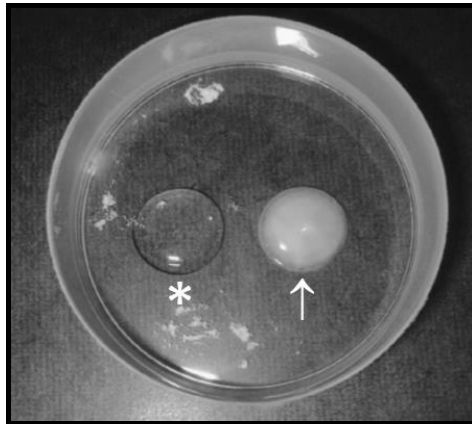
Yavaş ve hızlı dondurma olmak üzere başlıca iki tip kriyoprezervasyon protokolü kullanılmaktadır.

2.5.4.1. Yavaş Dondurma

Oosit ve embrioların dondurulmasında bu yöntem tercih edilir. Bu yöntemde dondurulacak olan materyal ideal bir kriyoprotektan solüsyonunda dengelenir ve dondurma çubuklarına (straw) ya da kriyoviyallere aktarılır. Kriyoprotektanla dengelenme sonrasında materyaller $-2\text{ }^{\circ}\text{C/dakika}$ ile $-7\text{ }^{\circ}\text{C'ye}$ kadar soğutulur. $-7\text{ }^{\circ}\text{C'de}$ çözeltide kontrollü bir şekilde buz kristali oluşumu (seeding) başlatılır. Seeding işlemi sonrasında örnekler $-0.3\text{ }^{\circ}\text{C/dakikalık}$ bir hızla yaklaşık $-40\text{ }^{\circ}\text{C'ye}$ soğutulur ve $-196\text{ }^{\circ}\text{C'deki}$ sıvı nitrojene aktarılır (19,26)

2.5.4.2. Hızlı Dondurma

Hızlı dondurma yöntemleri işlem sırasında buz kristali oluşup oluşmamasına bağlı olarak ikiye ayrılır. İşlem sırasında bir miktar buz kristali oluşuyorsa yöntem hızlı dondurma veya çok hızlı dondurma olarak isimlendirilmektedir (86). Diğer hızlı dondurma yöntemi vitrifikasyondur. Vitrifikasyon, sıvıların kristalleşmeden camsı bir şekilde katılaşmasıdır (Şekil 2-5) (87).



Şekil 2-5: Camlaşma (*) ve buz kristali oluşumu (↑)

Vitrifikasyonda buz kristali oluşumundan kaçınmak için kriyoprotektanlar çok yüksek konsantrasyonlarda kullanılır ve ultra hızlı bir şekilde dondurma işlemi gerçekleştirilir. Yüksek konsantrasyonlardaki kriyoprotektanın toksik etkisini en aza indirmek için çok düşük hacimlerle çalışılır. Soğutma hızı 20.000 °C/dakikadan fazladır. Yavaş dondurma yönteminde kullanılan straw, kriyoviyal gibi kapalı sistemlerin yanında “open-pulled straw”, “cryoloop”, “hemi-straw” gibi sistemler ve elektron mikroskop gridleri de kullanılabilmektedir (19). Açık sistemlerin kullanımında dondurulan materyal sıvı nitrojenle doğrudan temas halindedir. Bu durum patojenik ajanlarla kontaminasyon riskini de beraberinde getirmektedir. Vitrifikasyon yönteminde yavaş dondurma işleminde kullanılan programlanabilir dondurma makinelerine ihtiyaç yoktur. Dolayısıyla işlem maliyeti daha düşüktür. Yavaş dondurma yöntemi ile vitrifikasyonun karşılaştırılması Tablo 2-2’de belirtilmiştir (88).

Tablo 2-2: Yavaş dondurma yöntemi ile vitrifikasyonun karşılaştırılması

	Yavaş Dondurma	Vitrifikasyon
İşlem süresi	>3 saat	Hızlı (<10 dk)
Maliyet	Pahalı	Ucuz
Örnek hacmi (µL)	100–250	1-2
KPA konsantrasyonu	Düşük	Yüksek
Kriyohasar riski	Yüksek	Düşük
Çözme işlemi sonrası canlılık	Yüksek	Yüksek
Toksisite riski	Düşük	Yüksek
Sistem çeşidi	Yalnızca kapalı	Açık/kapalı
Kontaminasyon riski	Düşük	Yüksek
Yöntemin uygulanabilirliği	Kolay	Zor
KPA: Kriyoprotektan ajan		

2.5.5. Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektan ajanlar hücre içi proteinleri stabilize ederek, hücre ve dokuların ölümüne sebep olabilecek buz oluşumunu azaltarak ya da tamamen önleyerek, konsantre hücre içi ve dışı elektrolitlerin etkisini hafifleterek etki gösterir (26). 1949 yılında Polge ve arkadaşları tarafından gliserolün kriyoprotektif özelliğinin bildirilmesinden günümüze kadar farklı özelliklere sahip pek çok KPA tanımlanmıştır (89).

KPA'lar intraselüler (permeabl) ve ekstraselüler (nonpermeabl) olmak üzere iki gruba ayrılır. İntraselüler ajanlar dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol ve propilen glikol (1,2 propanediol, PROH) iken, ekstraselüler ajanlar polivinilpirolidon (PVP) gibi polimerler, 2-metil-2,4pentanediol, amfipatik bileşikler (glisin, prolin, trehaloz) ve çeşitli şekerlerden oluşmaktadır (26,88).

Gliserol nonelektrolit bir maddedir. Herhangi bir sıcaklıkta, ortamda bulunan elektrolit konsantrasyonunu azaltarak etki gösterir (88). Toksisitesi kısmen düşüktür ve ortam sıcaklığı düştükçe de azalır (19). Özellikle bakterilerin ve hayvan sperminin dondurulmasında tercih edilir (88).

DMSO, 1866 yılında Rus bilim insanı Alexander Zaytsev tarafından üretilmiştir. Kriyoprotektif özelliği Lovelock ve Bishop tarafından 1959 yılında gösterilmiştir (90). Kültüre edilmiş memeli hücrelerinin kriyoprezervasyonunda, kısmen düşük seviyede olan toksisitesi ve düşük maliyeti nedeniyle tercih edilir (90–92). Gliserol gibi nonelektrolit bir maddedir ve elektrolit konsantrasyonunu azaltarak etki gösterir. Bununla birlikte, DNA metilasyonuna ve histon değişimine neden olarak hücre farklılaşmasını indüklediği ve canlılık oranında belirgin düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (93). DMSO'nun bu olumsuz etkileri rutin klinik uygulamalarda kullanımını kısıtlamaktadır (88).

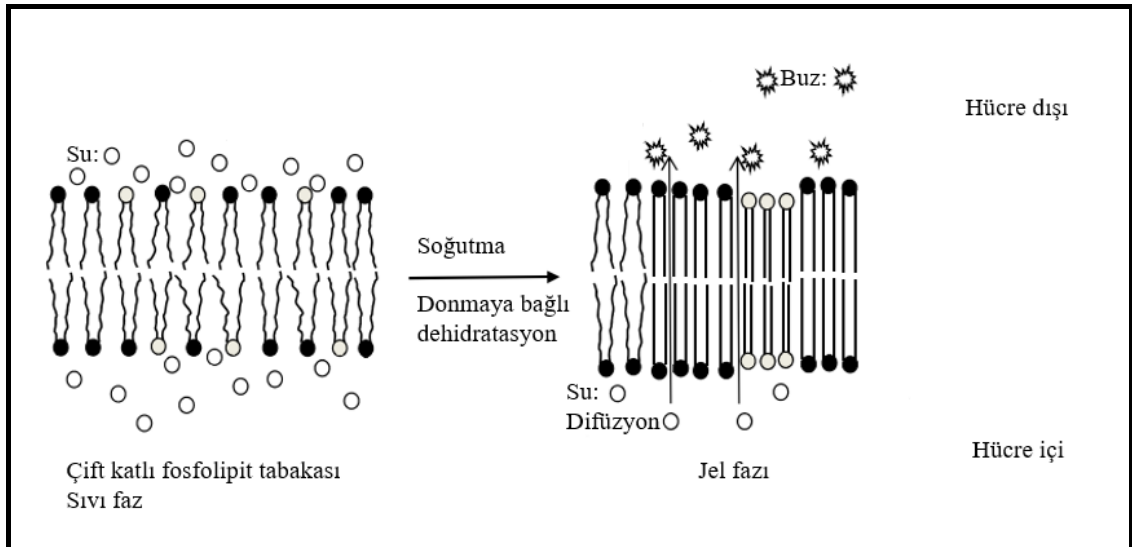
Ekstraselüler ajanlar tek başlarına kriyoprotektan olarak kullanılmamaktadır. İntraselüler ajanlarla birlikte kullanılır ve ozmotik basınçtaki değişiklikler sonucunda oluşabilecek hasarlara karşı koruyucu etki gösterir.

2.5.6. Kriyohasar Mekanizmaları

Kriyobiyojoloji alanındaki gelişmeler ÜYTE laboratuvarlarındaki uygulamalar için önemli dönüm noktalarını oluşturmaktadır. Günümüzde rutin uygulamalarda

kullanılan orijinal protokoller geliştirilmiş ve basitleştirilmiştir. Gelişen basit protokollere rağmen dondurma-çözme işlemi sonrasında örneklerin canlılık düzeyi ve kalitesi istenilen seviyede değildir. Bu duruma kriyoprezervasyon sırasında biyomateriyalin maruz kaldığı bazı fiziksel ve kimyasal stres kaynakları (ozmotik basınç değişiklikleri, buz kristallerinin oluşturduğu mekanik kuvvetler, artmış hidrostatik basınç, iyonik bileşenlerin redistribüsyonu, pH değişiklikleri, biyopolimerlerde faz geçişi, redoks transformasyonu, kriyoprotektanların spesifik [toksik] ve spesifik olmayan etkileri, serbest radikaller) neden olmaktadır (94). “Solüsyon etkisi”, hücre içi buz oluşumu, minimal hücre hacmi ve hücre membranında oluşan faz geçişinin kriyohasardan sorumlu ana unsurlar olarak tanımlandığı çeşitli teoriler bulunmaktadır (95).

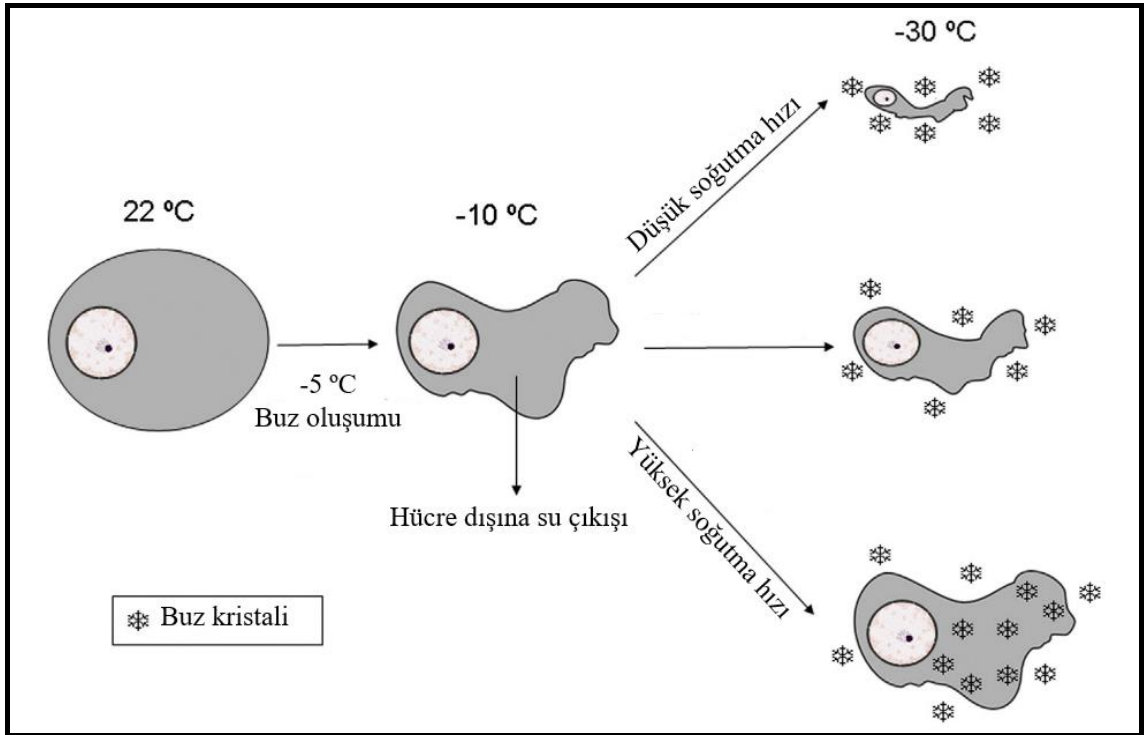
Düşük sıcaklıklar, biyomoleküllerin (lipid, protein, nükleik asit) yapı ve konformasyonlarında değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler bazen geri dönüşümsüz olabilir ve hücre fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebilir. Hücre dışı buz oluşumu sırasında, henüz buz oluşmamış alanlardaki solüt konsantrasyonu artar. Su ozmotik gradient yönünde (hücre dışına doğru) difüzyona uğrar. Fosfolipitlerin açıl zincirlerindeki CH grupları arasındaki Van der Waals etkileşimleri artar. Böylece hücre membranı likit fazdan, akışkanlığın düşük olduğu jel fazına geçer (Şekil 2-7) (96).



Şekil 2-6: Membran faz geçişinin şematik gösterimi.

Hücre içi buz oluşumu başlıca kriyohasar mekanizmalarından biridir. Dondurma ve çözme işlemlerinin hızları dondurulacak örneğe göre optimize edilerek buz oluşumuna bağlı hasarlar önlenmeye çalışılmaktadır. Yüksek konsantrasyona sahip

KPA'lar ile hücrel dehidratasyon süreci hızlandırılarak da buz kristallerinin oluşması önlenabilir. Bu durumda da ozmotik şok ve hücre hacminde zararlı değişiklikler meydana gelebilmektedir (97,98). Düşük soğutma hızında hipertonic hasar, yüksek soğutma hızındaysa hücre içi buz oluşumu gerçekleşir. Bu durum “iki faktör hipotezi” ile açıklanmaktadır (83) (Şekil 2-8). Dondurma ve çözme işlemlerinde hücrede oluşan buz kristallerinin tek tek büyüklüklerine kıyasla hücre içindeki toplam hacimleri daha önemlidir. Çözme hızı yavaş olursa küçük buz kristalleri büyüyebilir ve birbirleriyle birleşebilir. Hızlı çözme yöntemiyle buz kristallerinin hücrede etkili olabileceği süre minimuma indirilir (19).



Şekil 2-7: İki faktör hipotezinin şematik gösterimi (94)

2.5.7. Sperm Kriyoprezervasyonu

Sperm kriyoprezervasyonu, özellikle infertilite klinikleriyle ilişkili semen analiz laboratuvarı çalışmalarının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır. Gliserolün kriyoprotektan aktivitesinin keşfinden sonra sperm kriyoprezervasyonundaki gelişmeler hızlanmıştır ve dondurulmuş-çözülmüş spermier ÜYTE laboratuvarlarında rutin kullanıma girmiştir. Sperm kriyoprezervasyonu; erkek infertilitesinde, fertilitenin korunmasında (sitotoksik ajanlarla tedavi, vazektomi, erkek partnerin ölümünden sonra

gebeliğin kabul edilebilir olduğu ülkelerde tehlikeli mesleklerde aktif görev) ve donör sperm programlarında kullanılmaktadır (65). Kullanılan hastanın klinik özelliklerine göre çeşitli sperm toplama yöntemleri (mastürbasyon, testiküler sperm ekstraksiyonu-TESE, testiküler sperm aspirasyonu-TESA, mikrocerrahi ile epididimal sperm aspirasyonu-MESA ve perkütanöz epididimal sperm ekstraksiyonu-PESA) bulunmaktadır. Dondurma yöntemi olarak yavaş ve hızlı dondurma yöntemlerinin her ikisi de kullanılabilir. Ancak güncel çalışmalar vitrifikasyon yönteminin daha avantajlı olduğunu belirtmektedir (99,100). Dondurma-çözme işlemi sonrası elde edilen spermin kalitesini etkileyen faktörler; cinsel perhiz süresi, dondurma işlemi öncesindeki semen kalitesi, kullanılan kimyasal maddeler, ekipman ve yöntemdir. Uzun süre depolamanın çözme sonrası sperm kalitesine herhangi bir olumsuz etkisi bildirilmemiştir. Yaklaşık kırk yıl boyunca saklanan insan spermi kullanılarak canlı doğum gerçekleştirilmiştir (101).

Embriyo ve oosit gibi daha büyük yapılara göre küçük boyutu ve göreceli bolluğu, spermatozoa için etkili dondurma protokollerinin geliştirilmesini kolaylaştırmıştır (102). Hücre ne kadar büyükse dondurma işlemi sırasında canlılığını koruyabilmesi için o kadar yavaş soğutulmalıdır. Spermatozoon küçük boyutta olması sayesinde oosit ve embriyodan çok daha hızlı bir şekilde ozmotik dengeye ulaşır, dolayısıyla optimum soğutma hızı oosit ve embriyo için olandan çok daha yüksektir (26). İnsan sperm membranı, diğer türlerin sperm membranına göre yüksek miktarda doymuş yağ asidi içeriğine ve yüksek kolesterol-fosfolipit oranına sahiptir. Bu durum insan spermini soğuk şokuna karşı daha dayanıklı kılmaktadır (103). Düşük su içeriği (yaklaşık %50) nedeniyle de kriyoprezervasyon hasarına karşı daha dirençli olabilmektedir. Tüm bu avantajlı durumlara ve gelişen basit protokollere rağmen dondurma-çözme işlemi sonrasında spermilerin yalnızca % 50'si canlılığını koruyabilmektedir (65). Kriyoprezervasyon işlemi sonrasındaki canlılık ve motilite kaybının nedenleri; akrozomal membranın ve plazma membranının bütünlüğünün bozulması, çeşitli biyokimyasal değişikliklerin meydana gelmesi ve DNA bütünlüğünün bozulmasıdır (3).

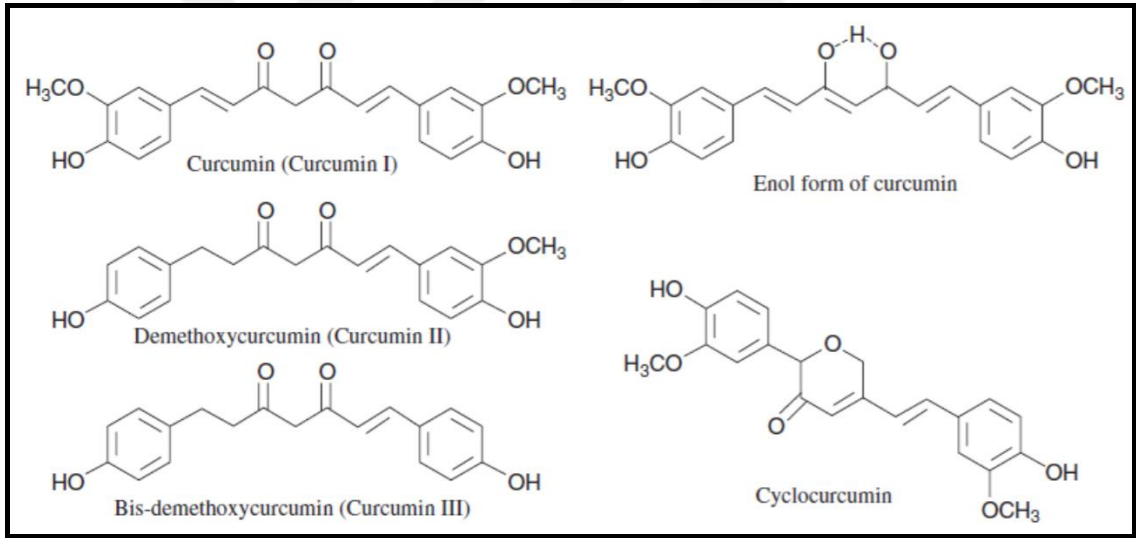
Oksidatif stres kriyoprezervasyon sürecinde sperm kalitesini etkileyen en önemli faktördür. Kriyoprotektan solüsyonlara, çeşitli dozlarda antioksidanların eklenmesiyle dondurma-çözme işlemi sonrası sperm kalitesinde artış bildiren birçok çalışma

yayınlanmıştır. Ancak hala rutin kullanıma giren etkili bir antioksidan bildirilmemiştir (5).

2.6. Kurkumin

Kurkumin [diferuloylmethane, 1,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion)], zerdeçal (*Curcuma longa* L.) bitkisinin etken maddesi olan fitopolifenol pigmenttir. Zerdeçalın sarı pigmenti kurkuminoidlerden kaynaklanmaktadır. Başlıca kurkuminoidler; kurkumin I, demetoksikurkumin (kurkumin II), bisdemetoksikurkumin (kurkumin III) ve son zamanlarda tanımlanan siklokurkumindir (104) (Şekil 2-9).

Kurkumin, suda ve eterde çözünmez, etanol, DMSO ve aseton gibi organik çözücülerde çözünebilir. Molekül ağırlığı 368.38 gr/mol'dür. Çözeltilerde başlıca enol formunda bulunur (105). Enol formu sayesinde güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir.



Şekil 2-8: Kurkuminoidlerin kimyasal yapısı (106)

Başlıca Hindistan'da, Çin'de ve Güneydoğu Asya'da olmak üzere zerdeçal ve etken maddesi olan kurkuminoidler, besin maddesi, kozmetik ürün ve terapötik ajan olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Kurkumin, Hindistan'ın geleneksel sağlık sistemi olan Ayurveda'da solunum sistemi hastalıkları, karaciğer problemleri, anoreksi, romatizmal hastalıklar, diyabetik yaralar, öksürük ve sinüzit tedavisinde kullanılmıştır (107). Kurkuminin terapötik etkileri modern bilimsel çalışmalarla da doğrulanmıştır. Kurkumin; antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik, antimikrobiyal,

hepatoprotektif, antitrombotik, kardiyoprotektif, hipoglisemik ve antiartritlik etkilere sahiptir (108). Kurkumin, son derece iyi bir güvenlik profiline sahiptir. Bugüne kadar hayvanlarda ve insanlarda yapılan çalışmalarda herhangi bir toksisite bildirilmemiştir. Kurkumin, tüm bu avantajlarının yanında, suda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle düşük sistemik biyoyararlanıma sahiptir. Klinik uygulamalarda kullanımını yaygınlaştırmak için biyoyararlanımını arttırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir (109).

2.6.1. Oksidatif Stres ve Kurkumin

Vücuttaki fizyolojik olaylar sırasında reaktif oksijen türevleri (ROT) ortaya çıkmaktadır. Reaktif oksijen türevleri, süperoksit (O_2^-) ve hidroksil (OH^-) radikalleri gibi dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla çift oluşturmamış elektron içeren yüksek enerjili, stabil olmayan bileşiklerle, göreceli olarak daha stabil olan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi bileşiklerden oluşur. Başlıca ROT kaynakları mitokondri ve peroksizom ile NADPH oksidaz, lipooksijenaz ve Sitokrom P450 gibi enzim sistemleridir. Ultraviyole ışınları (UV), iyonlaştırıcı radyasyon, kemoterapötikler ve çevresel toksinler eksojen ROT kaynaklarıdır. Vücut, aşırı ROT üretimine karşı antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Antioksidan savunma sistemini; katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler ile glutatyon, ürik asit, bilirubin, çeşitli vitaminler (A, C ve E) ve polifenoller oluşturmaktadır. Normal fizyolojik koşullar altında ROT üretimi ile antioksidan sistemler bir denge halindedir. ROT, hücre proliferasyonunda ve bağışıklık yanıtlarında rol almaktadır. Düşük ROT düzeyleri, proliferatif yanıtlarda azalmayla ve bağışıklık yanıtta yetersizlikle sonuçlanabilir. Yüksek ROT düzeyleri, membran lipidlerinde peroksidasyona, nükleik asitlerde, DNA'da ve mitokondriyal DNA (mtDNA)'da hasara, proteinlerde ve RNA'da hasar sonucu proteinlerin hatalı katlanmasına ve hatalı katlanan proteinlerin sitoplazmada birikmesine neden olur. ROT, zararlı etkilere neden olabilecek sinyal yollarını aktive eder. Sonuç olarak hücre ölümünde artış, yaşlanma sürecinde hızlanma ve çeşitli hastalıklar meydana gelir. ROT ile günümüze kadar yüzden fazla hastalık (ateroskleroz, artrit, kanser, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı vd.) ilişkilendirilmiştir (110).

Günümüzde bilinen çoğu antioksidan madde ya fonksiyonel fenol grubuna ya da β -diketon grubuna sahiptir. Kurkumin, β -diketon grubu, karbon-karbon ($C=C$) çift

bağları ve fenil halkaları içeren eşsiz bir antioksidandır. Kurkumin, hidrojen verici, tekli oksijen ($^1\text{O}_2$) yakalayıcı ve metal şelatör aktiviteleri sayesinde antioksidan etki gösterir (111). Kurkuminin antioksidan aktivitesi E vitamininden sekiz kat daha güçlüdür (112).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı'na infertilite şikayetiyle başvuran çiftlere çalışmanın amacı ve yapılma şekli anlatılarak gönüllülük esasına göre yazılı bilgilendirme formu imzalatılarak yapıldı. Çalışma için herhangi bir proje desteği alınmadı.

Çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Etik Komitesi tarafından 09.11.2018 tarihli ve 19 sayılı toplantıda görüşülerek onaylandı.

3.1. Örnek Seçimi ve Hasta Grubu

20-40 yaş aralığında, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) laboratuvar kılavuzuna göre (World Health Organisation 2010) normozoospermik (total sperm sayısı, ileri hareket ve morfoloji değerleri alt referans değerlerine eşit veya üzerinde) olan erkekler çalışmaya dahil edildi.

Çalışmadan çıkarılma kriterleri:

- Semen analizinde DSÖ'nün belirlediği normal değerlerin karşılanmaması
- 20 yaşından küçük, 40 yaşından büyük olmak
- Herhangi bir sistemik hastalığa sahip olmak
- Testis travması, kriptoorşidizm gibi üreme fonksiyonlarını etkileyen hastalıkları geçirmiş olmak
- Kronik ilaç/madde kullanımı

Gönüllülerden mastürbasyon yoluyla alınan semen örnekleri DSÖ 2010 standartlarına göre değerlendirildi. Kromatin yoğunlaşma durumu ve sperm DNA bütünlüğü açısından incelenmek üzere anilin mavisi ve akridin oranj boyamaları yapıldı. Örnekler Kontrol, DMSO ve Kurkumin olmak üzere üç gruba ayrılarak donduruldu.

3.2. Semen Analizi

Semen örnekleri 2-7 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yoluyla kapaklı tek kullanımlık steril kaplara alındı. Örneklerin 37°C'de 30 dakika boyunca likefiye

olmaları sağlandı. Likefaksiyon sonrası rutin semen analizi Dünya Sağlık Örgütü laboratuvar kılavuzuna (WHO 2010) uygun bir şekilde yapılarak motilite, konsantrasyon ve canlılık tayini yapıldı. Örnekten Makler sayma kamarasına (Sefi Medical Instr.) 10 mikrolitre (μ l) koyuldu, faz kontrast mikroskopunda (Olympus, CX31) 20X objektif altında, ileri hareket (Progresif Motilite;PR), yerinde hareket (Nonprogresif Motilite;NP), hareketsizlik (İmmotilite;IM) şeklinde motilite tayini yapıldı. Total sperm sayısı ve konsantrasyon analizi Makler sayma kamarası ile faz kontrast mikroskopunda yapıldı ve normozoospermik bireyler çalışmaya dahil edildi. Canlılık tayini için 5 μ l semen örneği ve 5 μ l boya (Merck Eosin Y Çözeltisi) lam üzerinde karıştırılarak üzeri lamel ile kapatıldı ve faz kontrast mikroskopunda 40X objektif altında en az 200 sperm sayılarak oran belirlendi.

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için 10 μ l semen lama damlatıldı. Temiz bir lamel yardımıyla çekilerek ince yayma oluşturuldu. Diff-Quick boyama kiti (DiffQuick®, Allegiance Healthcare Corp., USA) kullanıldı. Havada kurutulan yaymalar ilk olarak Diff-Quick fiksatifinde (metil alkol içinde 1.8 mg/L triarilmetan boyası) on beş saniye boyunca fikse edildi. Fikse edilen yaymalar, solüsyon 1 (Eozinofilik Ksanten)'de 15 saniye, solüsyon 2 (Bazofilik Tiazin)'de 5 saniye bekletilerek boyandı. Lamlar, deiyonize suyla yıkanarak fazla boya uzaklaştırıldı ve lamel ile kapatıldı. Sperm morfolojik özellikleri DSÖ 2010 kriterleri kullanılarak belirlendi. % 4 veya üzeri normal sperme sahip olan örnekler morfolojik olarak normal kabul edildi.

3.3. Semen Hazırlanması

Semen kesintili dansite gradyan yöntemi ile hazırlandı. %90 (v/v) medyum üzerine eşit miktarda %45 (v/v) medyum, birbirine karışmayak şekilde damla damla eklenerek kesintili dansite gradyanı hazırlandı (SpermRinse™, Vitrolife; ISolate®, Irvine Scientific). Kesintili dansite gradyanının üzerine semen eklendi (1:1) ve 1800 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp üzerine sperm yıkama medyumunu (SpermRinse, Vitrolife) eklendi ve 1800 rpm'de 5 dakika daha santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp üzerine sperm yıkama medyumunu eklendi ve anilin mavisi boyama yöntemi için 10, akrinin oranj için 20 mikrolitrelik örnekler lamlara yayıldı. Kalan miktar dondurma işlemi için üç kısma ayrıldı.

3.4. Kromatin Yoğunlaşmasının Değerlendirilmesi

Kromatin yoğunlaşması anilin mavisi boyama yöntemiyle değerlendirildi. Hazırlanan semen örneklerinden 10 µl alınarak lama yayıldı ve havada kurutuldu. Yaymalar, 0,2 M fosfat tamponu (pH:7,2) içindeki %3'lük gluteraldehit ile 30 dakika boyunca tespit edildi. Tespit işlemi sonrasında on dakika PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkanan yaymalar, %4 asetik asitle (pH:3,5) karıştırılmış %5 aköz anilin mavisi solüsyonu ile yedi dakika boyandı. Boyama solüsyonu için 5 gr anilin mavisi (Merck) 100 ml PBS içinde çözdürülüp kısa bir süre kaynatıldı. Süzdürüldükten sonra pH:3,5 olacak şekilde solüsyona glasiyal asetik asit eklendi (113). Her bir yaymada immersiyon yağıyla 100x objektif altında 200 sperm değerlendirildi (68). Örnekler anilin mavisiyle boyanma yoğunluğuna göre iki gruba ayrıldı: Anilin Mavisi Negatif (Boyanmamış), Anilin Mavisi Pozitif (Kısmen ya da tamamen boyanmış) (114).

3.5. Sperm DNA Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

DNA bütünlüğü akridin oranj testi ile değerlendirildi. Hazırlanan semen örneklerinden 20 µl alınarak lama yayıldı ve havada kurutuldu. Yaymalar, bir gece boyunca metanol:glasiyal asetik asit (3:1) solüsyonunda oda sıcaklığında tespit edildi. Tespit işlemi sonrasında yaymalar, akridin oranj (0.19 mg/ml, pH 2.5) ile karanlıkta 5 dk süreyle boyandı. Boyama solüsyonu, 1000 ml distile su içerisinde 1 mg akridin oranj (Sigma) içeren ve karanlıkta 4 °C'de saklanan bir stok çözeltiden günlük olarak hazırlandı. Boyama solüsyonunu hazırlamak için, 10 ml stok çözeltisine 40 ml 0.1 M sitrik asit ve 2.5 ml 0.2 M Na₂HPO₄·7H₂O ilave edildi. Boyanan preparatlar distile su ile yıkandı ve kurumadan lamelle kapatıldı. Preparatların kurumasını önlemek için kenarlarına şeffaf oje sürüldü. Yaymalar, 490 nm eksitasyon ve 520 nm emisyon filtreleri kullanılarak floresan mikroskopta (Leitz Wetzlar, Almanya, Model 307-083.103) aynı gün içinde değerlendirildi. Yeşil floresan veren spermilerin DNA bütünlüğü normal olarak, sarı-turuncu-kırmızı floresan veren spermilerin DNA bütünlüğü bozulmuş olarak değerlendirildi (70). Örnekler verdiği floresan rengine göre iki gruba ayrıldı: Akridin Oranj Pozitif (sarı-turuncu-kırmızı floresan verenler), Akridin Oranj Negatif (yeşil floresan verenler).

3.6. Kurkumin Solüsyonunun Hazırlanması

Deneyde kullanılacak kurkumin dozu literatürden yola çıkılarak yapılan ön deneylerle belirlendi (115–117). 5, 10, 25 ve 50 µM dozları ile ön deneyler yapıldı ve

10 μM ideal doz olarak belirlendi. 3.7 mg kurkumin (C1386 Sigma-Aldrich) bir mililitre dimetil sülfoksitte (DMSO-276855 Sigma-Aldrich) çözülerek 10 milimolar konsantrasyonunda stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyon 4 °C’de en fazla bir hafta olacak şekilde saklandı. Dondurulan örneklerden Kurkumin grubuna, DMSO’da çözülmüş 10 μM dozunda kurkumin eklendi. Final DMSO konsantrasyonunun %0.1 olması sağlandı.

3.7. Sperm Dondurma-Çözme İşlemi

Sperm dondurma işlemi için hazırlanan semen örnekleri Kontrol, DMSO ve Kurkumin olmak üzere üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna rutin sperm dondurma işlemi dışında herhangi bir işlem uygulanmadı. DMSO grubuna %0,1 oranında DMSO eklendi. Kurkumin grubuna DMSO’da çözülmüş 10 μM dozunda kurkumin eklendi.

Sperm dondurma işlemi, ticari bir sperm dondurma medyumunu olan SpermFreeze Solution™ (Vitrolife) ile yapıldı. Semen hazırlandıktan sonra üç alikuota ayrılan örnekler 1:1 oranında sperm dondurma medyumunu damla damla olacak şekilde ilave edildi. Her bir damla sonrasında sperm örneğinin ve dondurma medyumunun karışmaları sağlandı. Örnekler, kriyoviyal adı verilen hücre dondurmak için kullanılan tüplere aktarıldı ve 15 dakika boyunca dengelendi. Sperm dondurma medyumuyla dengelenen örnekler, sıvı azot seviyesinden 5-10 cm yükseklikteki azot buharında 45 dakika tutulduktan sonra -196 °C sıcaklığındaki sıvı azot tankına daldırıldı ve on gün boyunca saklandı. Çözme işlemi oda sıcaklığında 15 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi. Çözme işlemi sonrası örnek, SpermRinse™ eklenip 1800 rpm’ de 5 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Pellet SpermRinse™ ile 0.2 ml hacme sulandırıldı. Tüm bu işlemlerden sonra örnekler canlılık, motilite, kromatin yoğunlaşma durumu ve DNA bütünlüğü değerlendirmeleri için kullanıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Sürekli veriler için tanımlayıcı istatistikler; ortalama, standart sapma, ortanca, minimum-maksimum değerleri ile birlikte sunuldu. Sürekli verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile değerlendirildi. Non parametrik bağımlı gruplarda Wilcoxon testi, non parametrik bağımsız gruplarda Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Parametrik özellik gösteren sayısal değişkenlerin analizinde Pearson korelasyon analizi, non parametrik özellik gösteren sayısal değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Spearman korelasyon analizi yapıldı.

$P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler için IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL, USA) programının 21.0 versiyonu kullanıldı.



4. BULGULAR

Çalışma süresince yirmi üç (23) gönüllünün bilgilendirilmiş onamları alınarak semen analizleri yapıldı. Semen analiziyle şu parametreler değerlendirildi: Semen hacmi, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, hareketli sperm yüzdesi, ileri hareketli sperm yüzdesi, hareketsiz sperm yüzdesi, normal morfoloji gösteren sperm yüzdesi ve canlılık yüzdesi. Yaş ve semen analizine ilişkin tanımlayıcı veriler Tablo 4-1’de verilmiştir.

Tablo 4-1: Yaş, semen hacmi, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, ileri hareketli, yerinde hareketli ve hareketsiz sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler.

	Ortalama±SD	Ortanca	Minimum	Maksimum
YAŞ (yıl)	33,87±3,85	34,00	27,0	40,0
HACİM (ml)	1,98±0,49	2,00	1,5	3,0
KONSANTRASYON (milyon/ml)	52,17±35,40	41,30	19,5	145,0
TOTAL SPERM SAYISI (milyon/ml)	108,66±88,71	64,00	39,00	363,0
TOTAL HAREKET (%)	70,70±12,56	74,00	43,00	93,00
İLERİ HAREKET (%)	60,70±16,13	66,00	32,0	89,0
HAREKETSİZ (İMMOTİL) (%)	29,39±12,38	26	7,0	57,0
MORFOLOJİ (%)	7,00±3,74	7	4,0	18,0
CANLILIK (%)	83±9,39	87	58,0	95,0

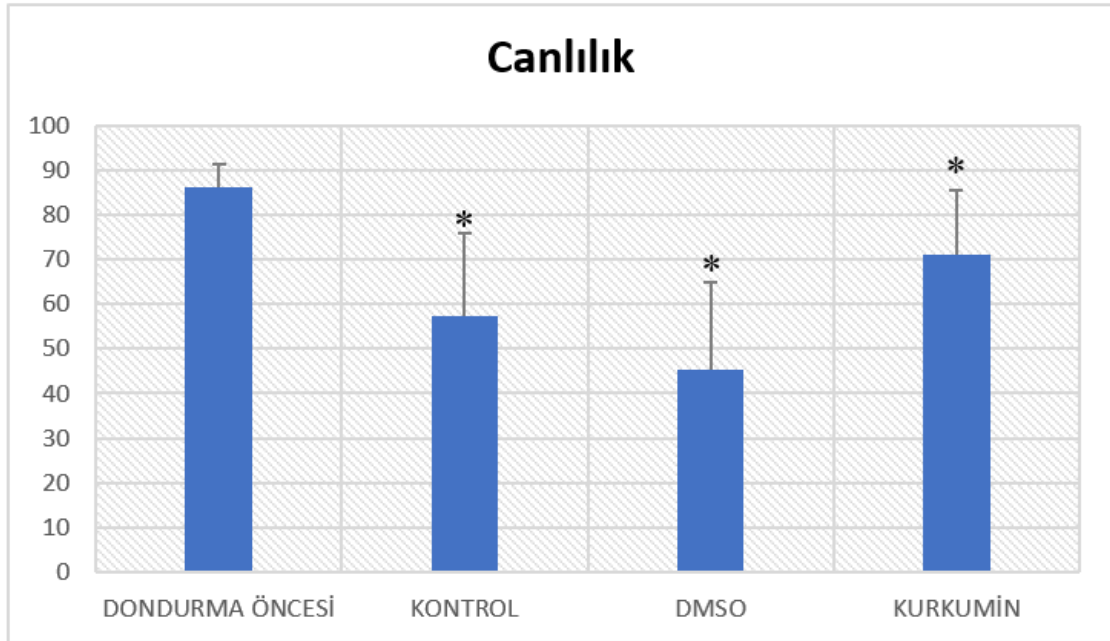
4.1. Kurkuminin Dondurma-Çözme İşlemi Sonrası Sperm Canlılığı Üzerine Etkisi

Sperm canlılığı Eosin Y (Merck) ile değerlendirildi. Her bir örnekten en az 200 sperm sayıldı ve yüzde verildi. Canlılık açısından dondurma işlemi öncesi ile dondurma-çözme işlemi sonrası her üç grubun (kontrol, DMSO, kurkumin) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Kontrol, DMSO ve Kurkumin

gruplarının ortalaması dondurma işlemi öncesinin ortalamasından daha düşüktü (Tablo 4-2, Şekil 4-1).

Tablo 4-2: Canlılık yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler.

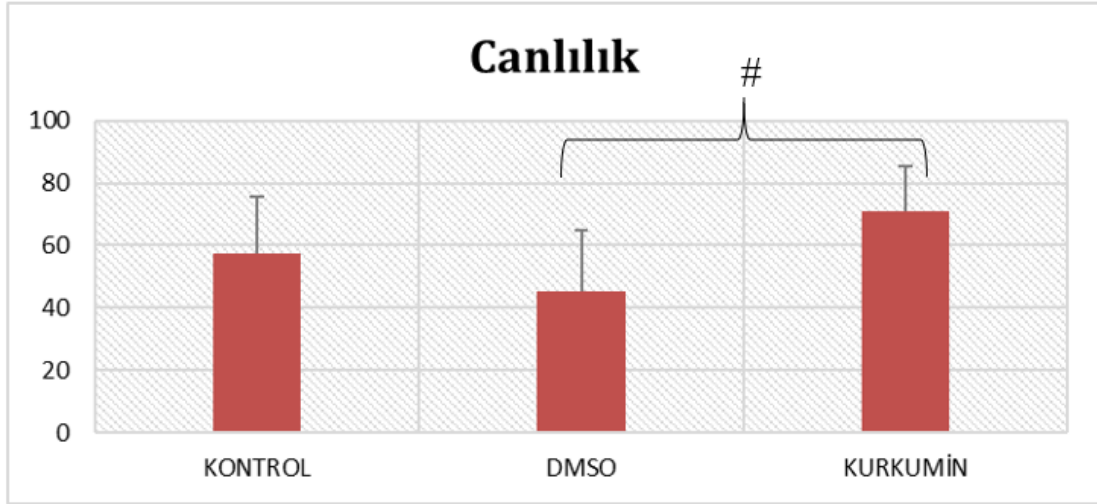
CANLILIK		Ort±SD	Minimum	Maksimum
	DONDURMA İŞLEMİ ÖNCESİ	86,3±4,894	75	95
	KONTROL	57,35±18,468	12	86
	DMSO	45,48±19,519	10	82
	KURKUMİN	71,09±14,522	42	90



Şekil 4-1: Canlılık yüzdelerinin dondurma işlemi öncesi ile karşılaştırılması.

* $p < 0,001$.

Kontrol, DMSO ve Kurkumin gruplarının canlılık yüzde değerleri için yapılan Post-Hoc analizlerde istatistiksel anlamlılık DMSO-Kurkumin arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktaydı. Kontrol-Kurkumin ve Kontrol-DMSO arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: Canlılık yüzdelерinin gruplar arasında karşılaştırılması.

$p < 0,001$

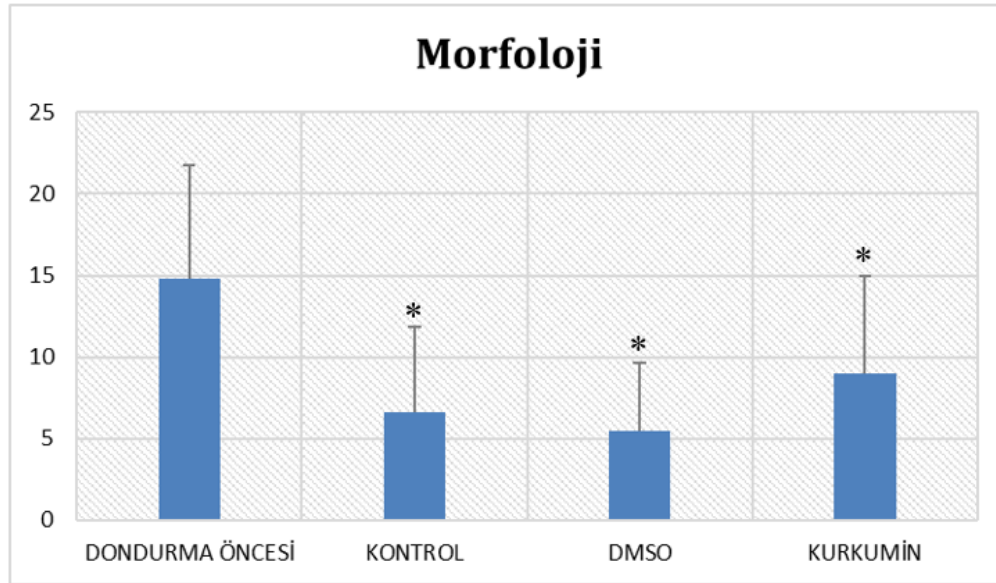
4.2. Kurkuminin Dondurma-Çözme İşlemi Sonrası Sperm Morfolojisi Üzerine Etkisi

Morfolojik değerlendirmeler Diff-Quick boyama yöntemi ile yapıldı. DSÖ-2010 kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm yüzdeleri hesaplandı (Tablo 4-3).

Morfoloji açısından dondurma öncesi ile dondurma-çözme işlemine tabi tutulan her üç grubun ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ve her üç gruba ait ortalamalar dondurma öncesinin ortalamasından daha düşüktü (Şekil 4-3).

Tablo 4-3: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdelere ilişkin tanımlayıcı veriler.

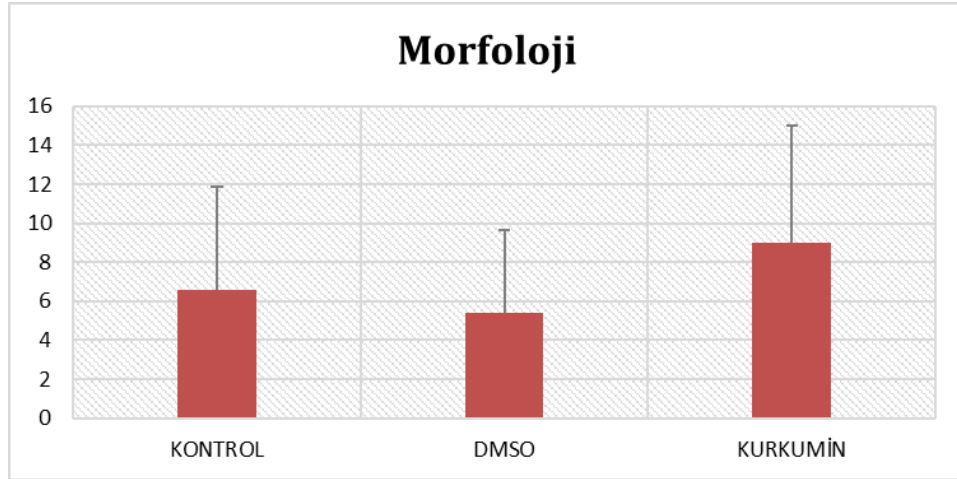
MORFOLOJİ		Ort±SD	Minimum	Maksimum
	DONDURMA İŞLEMİ ÖNCESİ	14,78±6,98	4	31
	KONTROL	6,61±5,237	0	25
	DMSO	5,43±4,241	0	16
	KURKUMİN	9±5,985	1	25



Şekil 4-3: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdelerinin dondurma işlemi öncesi ile karşılaştırılması.

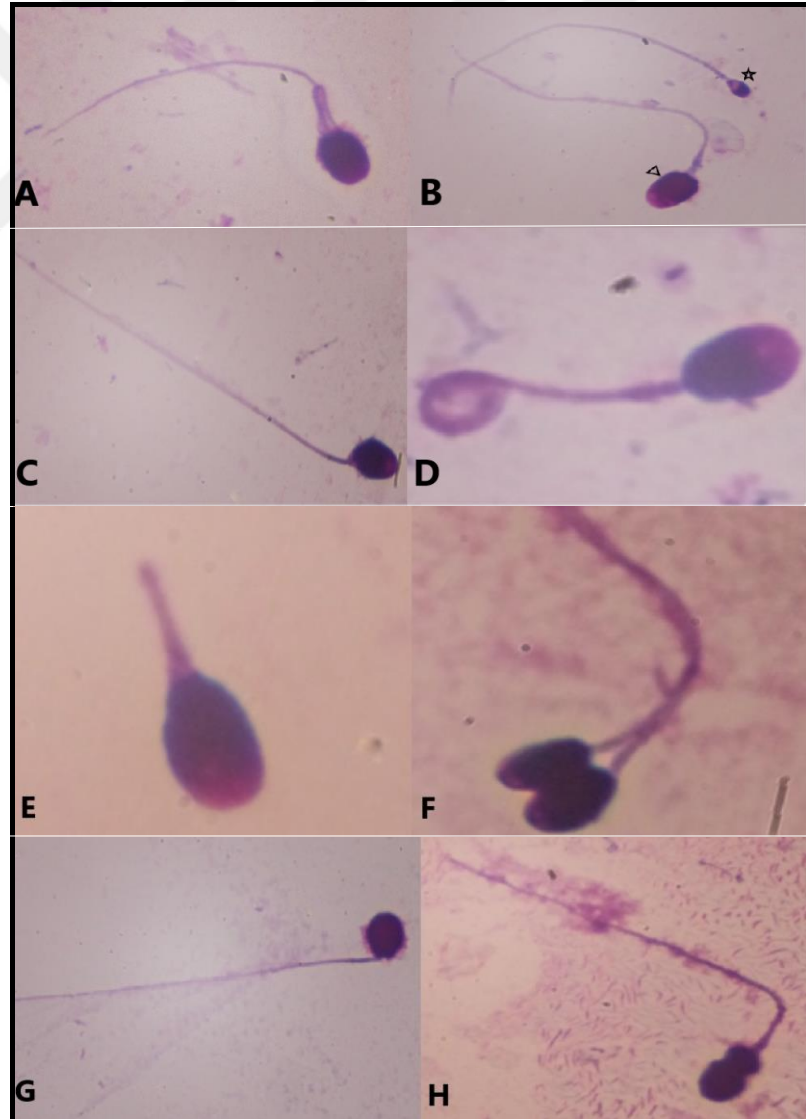
* $p < 0,001$.

Kontrol, DMSO ve Kurkumin gruplarının normal morfoloji gösteren sperm yüzde değerleri için yapılan Post-Hoc analizlerde, gruplar arasında anlamlı bir fark izlenmedi (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Normal morfoloji gösteren sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

$p=0,075$.



Şekil 4-5: Diff-Quick boyasıyla anormal morfoloji gösteren sperm örnekleri (1000x).

A: kalın orta parça, B: iri baş (Δ), küçük baş (☆), C: asimetrik orta parça, D: kıvrık kuyruk, E: kısa kuyruk, F: çift baş, G: yuvarlak baş, akrozom yok (globozoospermi), H: amorf baş.

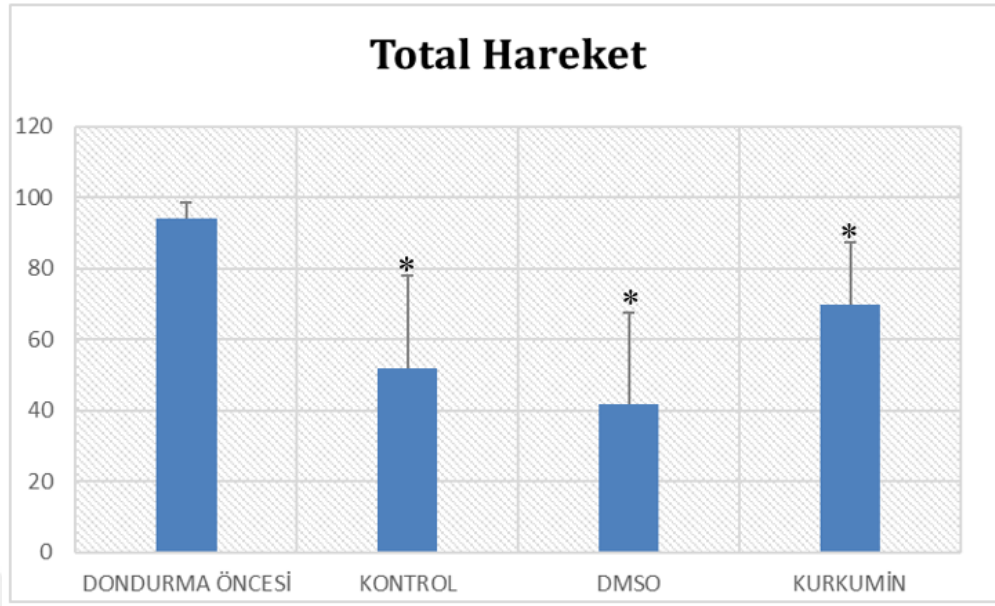
4.3. Kurkuminin Sperm Hareketliliğine Etkisi

Sperm hareketliliği tek bir embriyolog tarafından Makler kamarasında değerlendirildi. Total hareket yüzdesi ile ileri hareketli sperm yüzdeleri hesaplandı (Tablo 4-4). Total hareket açısından dondurma işlemi öncesi ile çözme işlemi sonrası grupların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ve her üç gruba ait ortalamalar dondurma öncesinin ortalamasından daha düşüktü (Şekil 4-6).

Tablo 4-4: Sperm hareketliliğine ilişkin tanımlayıcı veriler.

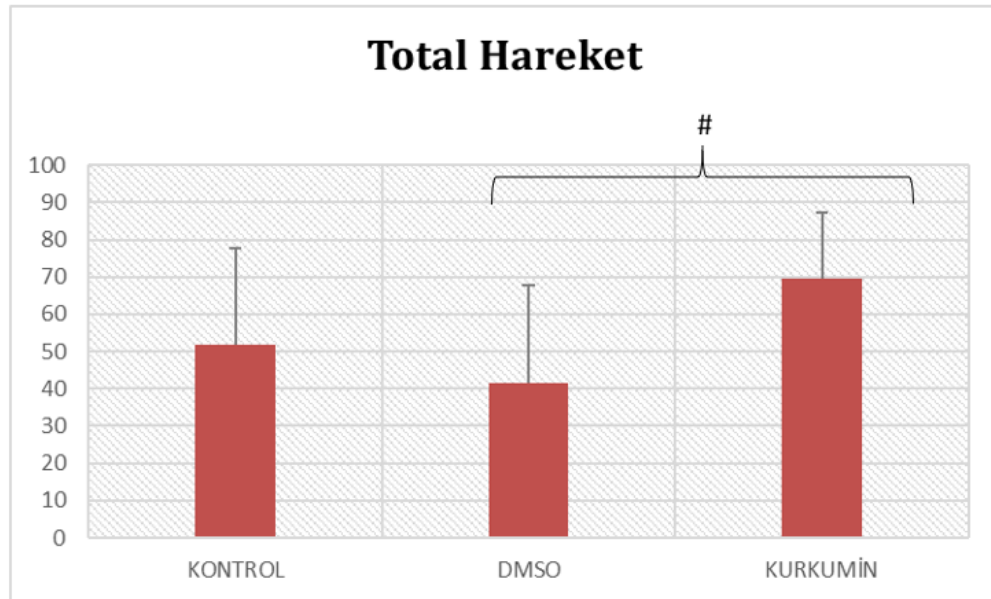
	DONDURMA ÖNCESİ	KONTROL	DMSO	KURKUMİN
	Ort±SD Min Max	Ort±SD Min Max	Ort±SD Min Max	Ort±SD Min Max
TOTAL HAREKET (%)	94,1±4,51 86 100	51,73±26,05 10 98	41,65±25,99 0 92	69,61±17,61 30 92
İLERİ HAREKET (%)	93,39±4,639 83 100	42,26±20,211 10 78	33,22±18,015 0 64	59,22±16,698 20 80

Kontrol, DMSO ve Kurkumin gruplarının total hareket yüzde değerleri için yapılan Post-Hoc analizlerde istatistiksel anlamlılık DMSO-Kurkumin arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktaydı. Kontrol-Kurkumin ve Kontrol-DMSO arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmedi (Şekil 4-7).



Şekil 4-6: Total hareket yüzdelerinin dondurma öncesi ile karşılaştırılması.

* $p < 0,001$

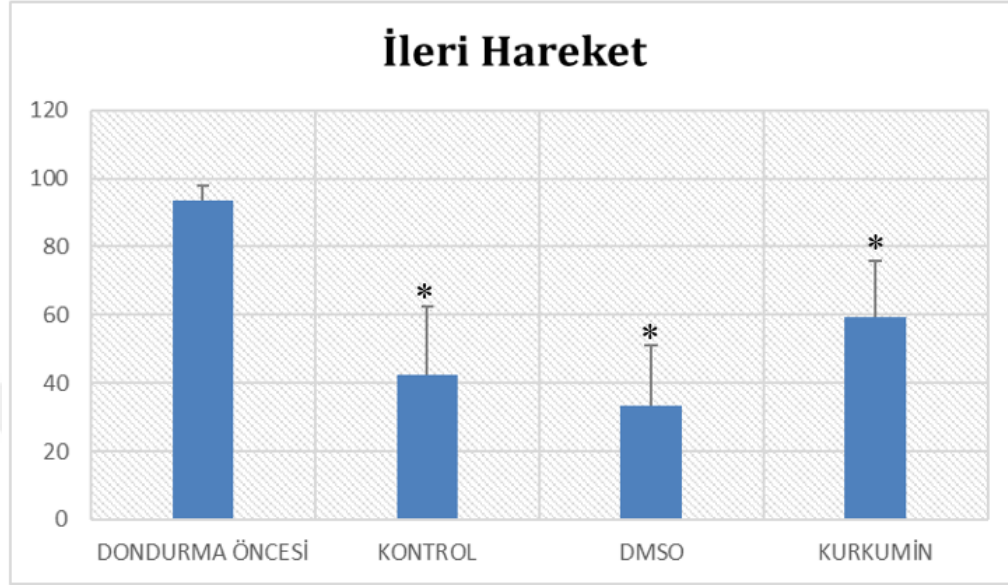


Şekil 4-7: Total hareket yüzdelerinin gruplar arasındaki karşılaştırılması.

$p < 0,05$

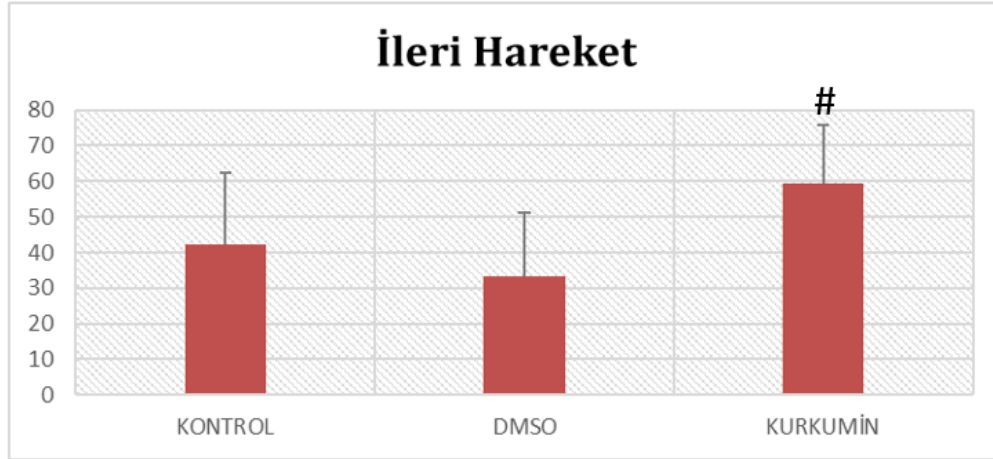
İleri hareket açısından dondurma işlemi öncesi ile çözme işlemi sonrası grupların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ve her üç gruba ait ortalamalar dondurma öncesinin ortalamasından daha düşüktü (Şekil 4-8). Kontrol,

DMSO ve Kurkumin gruplarının ileri hareket yüzde değerleri için yapılan Post-Hoc analizlerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,001$) ve Kurkumin grubunun ortalaması, Kontrol ve DMSO gruplarının ortalamalarından yüksekti (Şekil 4-9).



Şekil 4-8: İleri hareket yüzdelерinin dondurma öncesi ile karşılaştırılması.

* $p<0,001$

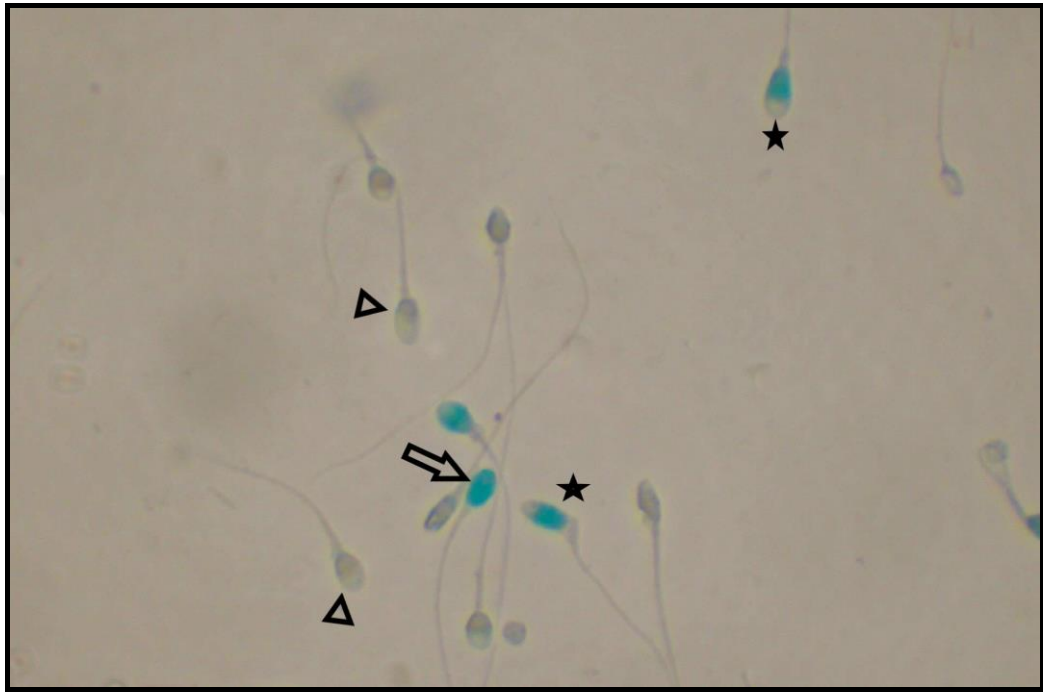


Şekil 4-9: İleri hareket yüzdelерinin gruplar arasında karşılaştırılması.

$p<0,001$

4.4. Anilin Mavisi Boyama Yöntemi ve Akridin Oranj Testi ile Elde Edilen Bulgular

Sperm kromatin yoğunlaşması anilin mavisi boyama yöntemiyle değerlendirildi. Değerlendirme anilin mavisiyle boyananlar (Anilin Mavisi Pozitif) ve anilin mavisiyle boyanmayanlar (Anilin Mavisi Negatif) olacak şekilde yapıldı (Tablo 4-5).



Şekil 4-10: Anilin mavisi boyanma örnekleri (1000x).

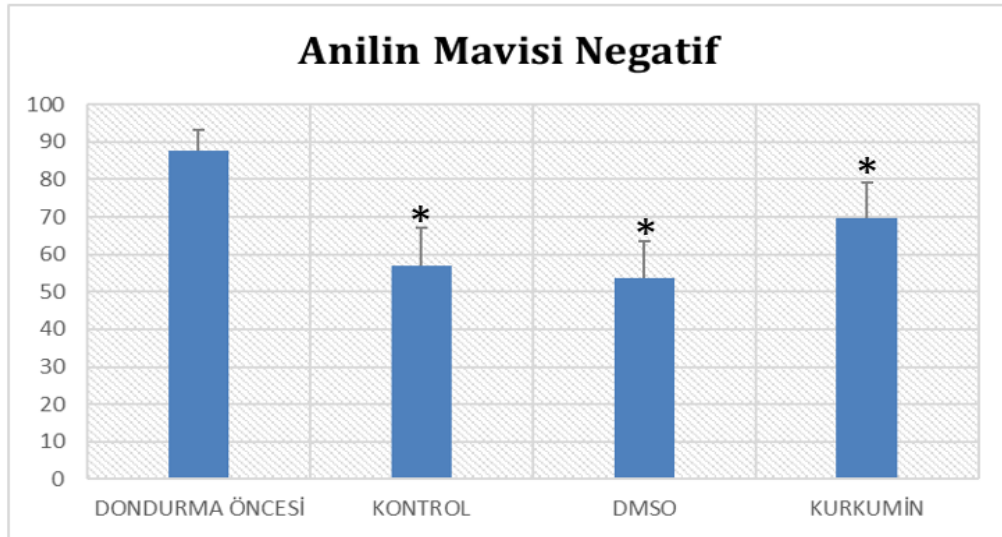
Anilin mavisi ile boyanmayan spermier üçgen ile (Δ), kısmen boyanan spermier yıldız ($\star$), tamamen boyanan spermier ok ile ($\Rightarrow$) gösterilmiştir.

Dondurma öncesi ile dondurma-çözme işlemine tabi tutulan her üç grubun anilin mavisiyle boyanmayan sperm yüzdeleri karşılaştırıldı. Aynı karşılaştırma üç grup arasında da yapıldı. Dondurma işlemi öncesi ile çözme işlemi sonrası grupların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ve her üç gruba ait ortalamalar dondurma öncesinin ortalamasından daha düşüktü (Şekil 4-11). Kontrol, DMSO ve Kurkumin gruplarının anilin mavisiyle boyanmayan sperm yüzdeleri için yapılan Post-Hoc analizlerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,001$) ve

Kurkumin grubunun ortalaması, Kontrol ve DMSO gruplarının ortalamalarından daha yüksekti (Şekil 4-12).

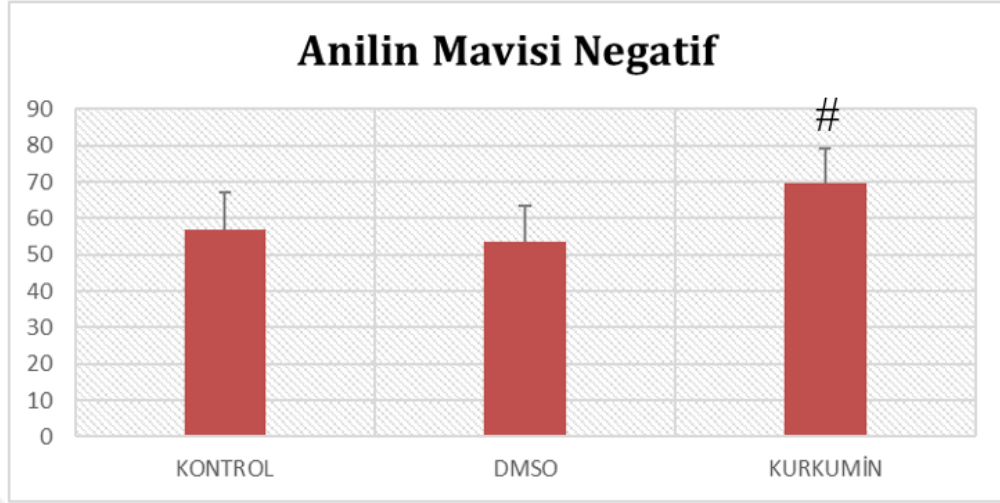
Tablo 4-5: Anilin mavisiyle boyanma özelliklerine göre değerlendirilen sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler.

	DONDURMA ÖNCESİ	KONTROL	DMSO	KURKUMİN
	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
	Min	Min	Min	Min
	Max	Max	Max	Max
ANİLİN MAVİSİ POZİTİF (%)	12,52±5,814 4 30	43,09±10,04 23 59	46,35±9,87 25 70	30,26±9,406 10 46
ANİLİN MAVİSİ NEGATİF (%)	87,48±5,814 70 96	56,91±10,04 41 77	53,65±9,87 30 75	69,74±9,406 54 90



Şekil 4-11: Anilin mavisi negatif sperm yüzdelerinin dondurma öncesi ile karşılaştırılması.

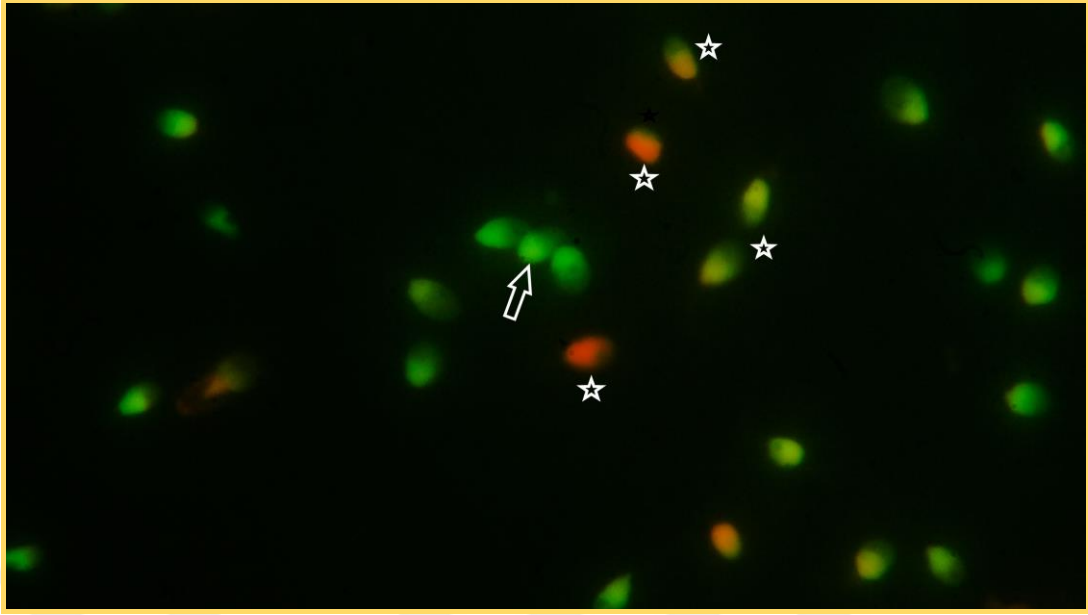
* $p < 0,001$



Şekil 4-12: Anilin mavisi negatif sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.
[#] $p < 0,001$

Sperm DNA bütünlüğü akridin oranj testi ile değerlendirildi. Değerlendirme sarı-turuncu-kırmızı floresan veren sperm Akridin Oranj Pozitif, yeşil floresan veren sperm Akridin Oranj Negatif olacak şekilde yapıldı (Şekil 4-13) (Tablo 4-6).

Dondurma öncesi ile dondurma-çözme işlemine tabi tutulan her üç grubun akridin oranj ile yeşil floresan veren sperm yüzdeleri karşılaştırıldı. Aynı karşılaştırma üç grup arasında da yapıldı. Dondurma işlemi öncesi ile çözme işlemi sonrası grupların ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ve her üç gruba ait ortalamalar dondurma öncesinin ortalamasından daha düşüktü (Şekil 4-14). Kontrol, DMSO ve Kurkumin gruplarının akridin oranj ile yeşil floresan veren sperm yüzdeleri için yapılan Post-Hoc analizlerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,001$) ve Kurkumin grubunun ortalaması, Kontrol ve DMSO gruplarının ortalamalarından daha yüksekti (Şekil 4-15).

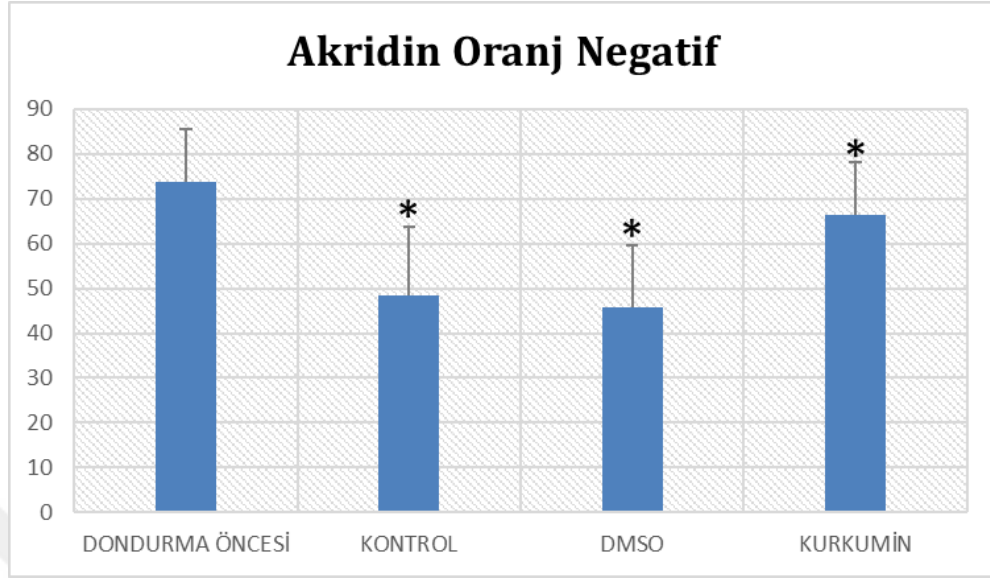


Şekil 4-13: Akridin oranj boyanma örnekleri (630x).

Denatüre DNA'ya sahip spermiler (sarı, turuncu, kırmızı) yıldız ile (☆), sağlam DNA'ya sahip spermiler (yeşil) ok ile (⇒) gösterilmiştir.

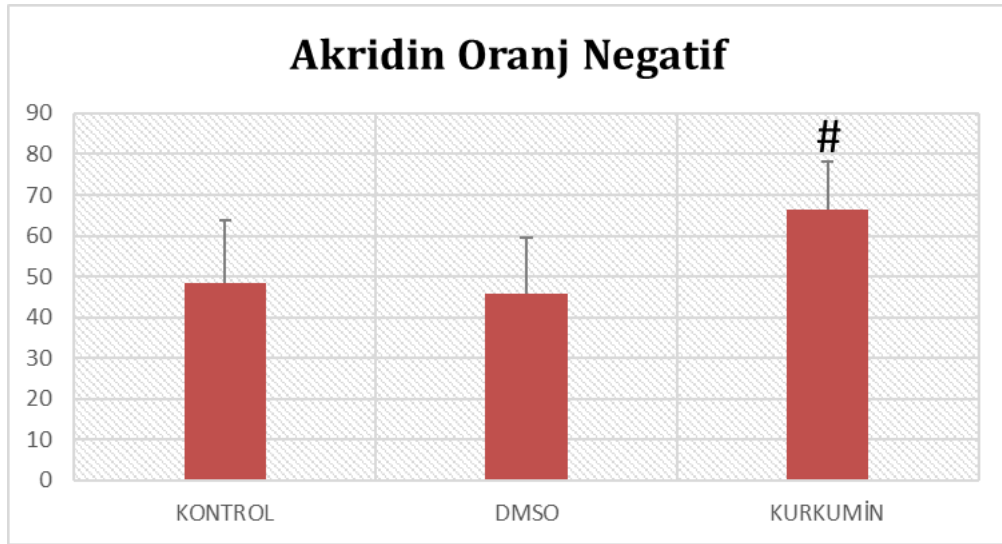
Tablo 4-6: Akridin oranj ile boyanma özelliklerine göre değerlendirilen sperm yüzdelerine ilişkin tanımlayıcı veriler.

	DONDURMA ÖNCESİ	KONTROL	DMSO	KURKUMİN
	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD	Ort±SD
	Min	Min	Min	Min
	Max	Max	Max	Max
AKRİDİN ORANJ POZİTİF (%)	26,22±11,912 14 63	51,61±15,385 28 89	54,26±13,945 34 92	33,65±11,861 15 65
AKRİDİN ORANJ NEGATİF (%)	73,78±11,912 37 86	48,39±15,385 11 72	45,74±13,945 8 66	66,35±11,861 35 85



Şekil 4-14: Akridin oranj negatif sperm yüzdelerinin dondurma öncesi ile karşılaştırılması.

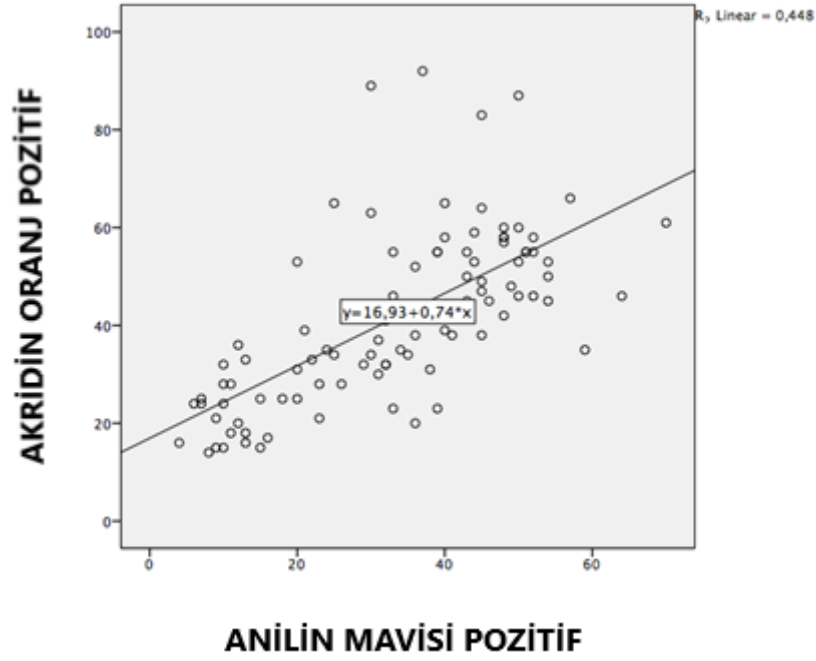
* $p < 0,001$



Şekil 4-15: Akridin oranj negatif sperm yüzdelerinin gruplar arasında karşılaştırılması.

$p < 0,001$

Anilin mavisi pozitifliği ile akridin oranj pozitifliği arasındaki ilişki düzeyi değerlendirildi ve korelasyon katsayısı pozitif olduğu için olumlu, güçlü düzeyde ($\rho = 0,699$) ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,001$) bir korelasyon tespit edildi.



Şekil 4-16: Anilin mavisi ve akridin oranj boyaları arasındaki korelasyon.

$p < 0,001$, $\rho = 0,699$

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olan kurkumin maddesinin sperm kriyohasasına karşı koruyucu etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. 10 γ M konsantrasyonunda kurkuminin, dondurma-çözme işlemi sonrası ileri hareket, kromatin yoğunlaşma durumu ve DNA bütünlüğü parametrelerini kayda değer bir şekilde arttırdığı, canlılık ve morfoloji üzerindeyse istatistiksel olarak anlamlı bir koruyucu etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Biyomateriyaller dondurma-çözme işlemi sırasında olumsuz yönde etkilenmektedir. Oksidatif stres, kriyoprezervasyon sırasında gerçekleşen istenmeyen etkilerin başlıca sebeplerinden biridir (6). Reaktif oksijen türevlerini ve bu türevlerin oluşturduğu oksidatif strese bağlı olarak gelişen hücre hasarını en az seviyeye indirmek için dondurma medyumuna antioksidan maddelerin eklenmesi güncel bir çalışma alanıdır. Semen kriyoprezervasyonunda; E ve C vitamini, glutatyon, melatonin, selenyum vd. antioksidanların kullanımı ile ilgili literatürde pek çok çalışma mevcuttur (7). Kurkumin E vitamininden sekiz kat daha güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir ve kurkuminin kriyohasara karşı etkinliği sığır, sıçan, angora keçisi, manda ve domuz semeninde incelenmiştir (10–14,112,118). Kurkuminin insan semen kriyoprezervasyonu üzerine etkilerini inceleyen herhangi bir çalışma literatürde bulunmamaktadır ve çalışmamız bu açıdan özgün bir nitelik taşımaktadır.

Kurkumin süperoksit ve hidroksil radikalleri, tekli oksijen ($^1\text{O}_2$), nitrik oksit ve peroksinitrit gibi reaktif oksijen türevlerini etkili bir şekilde temizler. Bu sayede lipidleri, hemoglobini ve DNA'yı oksidatif hasara karşı korur. Kurkumin siklooksijenaz ve lipooksijenaz gibi ROT kaynağı enzimleri inhibe eder (119). Yapısında bulunan β -diketon kısmından lipid peroksil radikallerine hidrojen atomu vermesi en önemli antioksidan mekanizmalarından biridir (120). Kurkuminoidler plazmidlerde bulunan süpersarmal yapısındaki DNA'nın hidroksil radikalleri tarafından zarar görmesini önler (9). Bu etkilerinin yanı sıra kurkumin; süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi diğer antioksidanların aktivitelerini de artırır (121). Düşük ROT düzeyleri kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi sperm fonksiyonları için gereklidir (122). Literatürde, yüksek ROT düzeylerinin ise ciddi DNA hasarlarına yol açtığını ve erkek infertilitesiyle ilişkili olduğunu bildiren pek çok çalışma mevcuttur (123–126).

Kurkuminin erkek üreme fonksiyonları üzerindeki etkilerini değerlendiren literatür verileri tutarlılık göstermemektedir. Tvrdá ve ark. boğa spermiyle yaptıkları çalışmada kurkuminin hem in-vitro fizyolojik koşullarda hem de artmış oksidatif stres durumunda spermatozoanın yapısal bütünlüğünü ve fonksiyonlarını koruduğunu belirtmişlerdir (127). Salahshoor ve ark. farelerde yaptıkları çalışmada kurkuminin doza bağımlı olarak sperm sayısını ve hareketliliğini, testis ağırlığını ve testosteron düzeylerini arttırdığını bildirmişlerdir (128). Naz ve ark. ise insan ve fare spermlerini kurkumin ile inkübe etmişler ve doza bağımlı olarak ileri hareket, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu gibi sperm fonksiyonlarında azalma gözlemişlerdir (129). Aynı grubun gerçekleştirdiği farklı bir çalışmada kurkuminin hücre içi pH'yi düşürerek ve membran hiperpolarizasyonuna neden olarak sperm hareketliliğini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir. Bahsedilen etkiler 50 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda gözlemlenmiştir (130). Benzer bir çalışmada kurkuminin doza ve zamana bağımlı bir şekilde sperm hareketliliğini azalttığı bildirilmiştir. Mitokondriyal transmembran potansiyeli ve protein kinaz C (PKC) aktivitesi sperm hareketliliği için önemlidir (131,132) ve T. Rithaporn ve ark. yaptığı bu çalışmada, kurkuminin mitokondriyal transmembran potansiyelini (MTP) azaltarak ve PKC'yi inhibe ederek sperm hareketliliğini azalttığı öne sürülmüştür (133). Yukarıda bahsedilen çalışmalar yüksek dozda kurkumin ile in-vivo ortamda veya 37 °C sıcaklığındaki in-vitro ortamda yapılmıştır ve kurkuminin kriyoprezervasyon sonrasındaki sperm parametrelerine olan etkisi incelenmemiştir. Çalışmamızda kurkuminin, dondurma-çözme işlemi sonrası sperm hareketliliğinde meydana gelen azalmayı belirgin bir şekilde önlediği gözlenmiştir. Benzer bulgular elde eden Tvrdá ve ark., kurkuminin sperm hareketliliği üzerindeki olumlu etkisini mitokondriyal aktivite ile ilişkilendirmişlerdir. Literatürde bulunan pek çok in vivo toksikoloji çalışması kurkuminin sperm hareketliliğini ve fonksiyonlarını toksik ajanların etkilerine karşı koruduğunu bildirmektedir (134–137). Mathuria ve Verma, bu etkiyi sitokrom P450 izoenzimlerinin kurkumin tarafından yarışmalı inhibisyonu ile açıklamaktadırlar (137). Toksik ajanlara karşı koruyucu etkide kurkuminin antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteleri de önemlidir (138,139). Bucak ve ark. dondurma medyumuna kurkumin ekleyerek koç ve angora keçisi spermlerinin dondurma-çözme işlemi sonrası fonksiyonlarını incelemişlerdir. Bu çalışmalarda bizim bulgularımızla tutarlı sonuçlar elde edilmiş, çözme sonrası sperm hareketliliğinde anlamlı artış izlenmiştir (12,140).

Kriyoprezervasyon sırasında sperm membranında önemli değişiklikler meydana gelmektedir. Plazma membranının içeriği ve biyofiziksel özellikleri dondurma-çözme işlemine karşı dayanıklılığı belirler. İnsan spermi diğer türlere yüksek kolesterol/fosfolipit oranına sahip olmasıyla kriyohasara karşı daha dayanıklı olmasına rağmen insan sperminde de belirgin kriyohasar bulguları gözlenmektedir. (103). Kriyoprezervasyon sonrasında spermatozoada önemli miktarda fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin ve kolesterol kaybı gözlenir (141). Bu fosfolipitler dışında diğer fosfolipitlerin yağ asidi gruplarında da önemli değişiklikler gerçekleşir (142). Artı 5 °C ve altı sıcaklıklarda membranlar likit fazdan jel fazına geçer. Bazı doymamış yağ asit içeriği yüksek olan fosfolipitler daha erken faz geçişi gösterebilmektedir (94). Faz geçişi sonucunda integral membran proteinlerinde geri dönüşümsüz değişiklikler gerçekleşir ve dolayısıyla protein yapıda olan bazı iyon kanallarında fonksiyon kaybı gözlenebilir (94). Sperm plazma membranından kolesterolün kaybı kapasiteyonda önemli rol oynar ve sadece kolesteroldeki değişiklik bile önemli fonksiyon kayıplarıyla sonuçlanabilir (143). Kriyoprezervasyon sonucunda membran glikokaliks tabakasında da değişiklikler meydana gelir. Glikokaliks, spermatozoanın kadın genital kanalında immün sistemden korunması, akrozomal reaksiyon ve erken gamet etkileşimleri gibi olaylarda rol oynar (144). Kurkumin hidrofobik yapısı ve suda çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle membranöz yapılarla etkileşir ve plazma membranı, endoplazmik retikulum ve nükleer membran gibi yapılarda birikir (145). Kurkumine maruz kalan eritrosit membranlarında geçici şekil değişiklikleri ve fosfatidilserin translokasyonu gerçekleşmiştir. Meydana gelen membran asimetrisi kurkumin varlığında aktivitesini koruyan fosfolipit translokaz aracılığıyla yeniden kazanılmıştır. Ancak lipidlerin yeniden düzenlenmesi membran akışkanlığında değişikliklerle sonuçlanmıştır (146). Başlıca asimetri kaybı, fosfatidilserinin membranın dış yüzüne translokasyonu ve lipid bozuklukları gibi membran fosfolipitlerinde meydana gelen değişiklikler eritrositlerin makrofajlar tarafından fagositozunu arttırmaktadır (147,148). Hücre membranında bulunan karbonhidratlardaki değişiklikler sonucunda da fagositoz artabilmektedir (149–151). Kriyoprezervasyon nedeniyle sperm membranında meydana gelen değişiklikler ve kurkuminin bu değişikliklere olan etkisi gelecekte yapılacak çalışmaların konusu olabilir.

Çalışmamızda bir diğer parametre olarak sperm DNA bütünlüğü incelenmiştir. DNA bütünlüğü ÜYTE laboratuvarlarının başarısında anahtar rol oynamaktadır (152)

ve günümüzde ÜYTE'nin kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte DNA bütünlüğünü değerlendiren pek çok prosedür geliştirilmiştir. Çalışmamızda DNA bütünlüğünü değerlendirmek için anilin mavisi boyama yöntemi ve akridin oranj testi kullanılmıştır. Kromatin yoğunlaşma durumu için kabul edilmiş standart bir değer bulunmamasına rağmen bazı yayınlarda normal semen örneklerinin %25'ten daha az miktarda anilin mavisi pozitif sperm içerdiği belirtilmektedir (153,154). Daha güncel klinik çalışmalarda sperm kromatin yapı analizi sonucu DNA fragmentasyon indeksi (DFI) %30'un üzerinde olan semen örnekleri ile yapılan IVF ve ICSI ile gebelik elde edilememiştir (155–158). Çalışmamızda literatürdeki verilerle uyumlu olacak şekilde anilin mavisi boyama yöntemi ve akridin oranj testi arasında güçlü bir korelasyon tespit edilmiştir (113) ve kurkuminin kriyoprezervasyon sonrası sperm kromatin yoğunlaşma durumunu ve DNA'nın denatürasyona karşı direncini belirgin bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir. Kriyoprezervasyonun sperm DNA'sına olan etkisi konusunda henüz fikir birliği bulunmamaktadır. Bazı çalışmalar bizim verilerimizi destekler niteliktedir (159,160). Bazılarında ise kriyoprezervasyonun sperm DNA bütünlüğünü etkilemediği bildirilmiştir (161–163). Bu tutarsızlık kullanılan semen hazırlık yöntemlerinin, kriyoprezervasyon prosedürlerinin, DNA bütünlüğünü değerlendiren testlerin ve semen örneğinin alındığı türlerin farklı olmasıyla açıklanabilir. Kriyoprezervasyon sonrasında anormal semende normal semene göre daha yüksek seviyelerde DNA fragmentasyonu gözlemlendiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (164–166). İnfertil bireylerin semeninde daha fazla miktarda sperm fragmente DNA'ya sahiptir (161,167,168). Bireyler arasındaki farklılıklar da literatürdeki farklı sonuçların açıklaması olabilir. Kriyoprezervasyon sonucunda DNA hasarı olduğu bildirilen çalışmalarda bu durum başlıca oksidatif stresle ilişkilendirilmiştir (167,169). Reaktif oksijen türevleri, fragmentasyon, baz modifikasyonları, delesyon ve diğer mekanizmalar aracılığıyla nükleer ve mitokondriyal DNA'da hasara sebep olmaktadır (170). ROT haricinde DNA hasarına neden olan diğer mekanizmalar yetersiz kromatin paketlenmesi ve apoptozdur (152,171,172). Bu mekanizmaların hepsi eş zamanlı olarak DNA hasarına neden olabilir. ROT, kaspaz aktivasyonu aracılığıyla apoptozu indükleyerek de DNA'da bozulmalara yol açabilmektedir (167,173). DNA oksidasyonunun ana ürünlerinden biri olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), infertil erkeklerin spermatozoasında daha yüksek düzeylerde bulunur. 8-OHdG düzeyi arttıkça sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, hareketlilik azalırken, kötü morfoloji (özellikle baş defektleri) sergileyen sperm

sayısında ise artış gözlenmektedir (174,175). Spermdede meydana gelen oksidatif DNA hasarı in-vitro blastokist formasyon oranlarını negatif yönde etkilemektedir (176,177). Sperm DNA hasarının başta gebelik oranları olmak üzere yardımla üreme tedavi sonuçlarını olumsuz yönde etkilediğine dair klinik kanıtlar mevcuttur (152,170). Çalışmamızda kurkuminin sperm DNA bütünlüğünü hangi mekanizma aracılığıyla koruduğu aydınlatılmamıştır. Soleimanzadeh ve Saberivand, sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada kurkuminin sperm DNA bütünlüğünü ve canlılığını belirgin bir şekilde koruduğunu gözlemlemişlerdir ve bu etkiyi kurkuminin antioksidan aktivitesi ile açıklamışlardır (13). Choucair ve ark. lökositospermik hastaların semen örneklerini kurkumin ile inkübe etmişler ve mitokondriyal DNA hasarında belirgin bir düşüş tespit etmişlerdir (178). Kurkumin biyolojik aktiviteleri için somatik hücrelerdeki pek çok hedef molekülü etkilemektedir (179–184). NF- κ B aktivitesi, siklooksijenaz-2 (COX-2) ve 5-lipooksijenaz (5-LOX) ekspresyonu kurkumin tarafından inhibe edilmektedir. Kurkumin, pek çok sitokin salımı üzerinde düzenleyici etkiye sahiptir (179,180). Kurkumin ayrıca tiyoredoksin redüktaz, çeşitli protein kinazlar ve reseptörler olmak üzere pek çok proteine bağlanır (179,180). Ancak bahsedilen proteinlerin ve diğer faktörlerin birçoğu transkripsiyonel olarak sessiz olan olgun spermdede bulunmamaktadır. Kurkuminin hareketlilik gibi benzersiz bir özelliğe sahip olan sperm üzerindeki etkileri farklı moleküller ve mekanizmalar üzerinden olabilir (130). Kriyoprezervasyon sonrası gelişen DNA hasarında başlıca mekanizmanın oksidatif stres olması ve bu hasarın erkek üreme fonksiyonlarına, yardımla üreme tedavisi sonuçlarına olan etkisi ve kurkuminin güçlü antioksidan aktivitesi çalışmamızı klinik açıdan değerli kılmaktadır. Çalışmamıza yalnızca normozoospermik bireyler dahil edilmiştir. Kriyoprezervasyonun normal ve anormal semen üzerindeki etkileri farklılık göstermektedir. Farklı hasta gruplarında ve kurkuminin farklı etki mekanizmalarına odaklanarak yeni çalışmalar planlanabilir.

Dondurma-çözme işlemine maruz kalan spermelerin fertilizasyon kapasitesi daha düşüktür. Koyun ve domuzlarda yapılan çalışmalarda bu spermelerin, servikal inseminasyon sonrasında uterotubal bileşkede (UTB) ve tuba uterinada taze spermelere göre çok daha az miktarda bulundukları bildirilmiştir (185–188). Dişi genital kanallarındaki göçte meydana gelen zorluklar, dondurma-çözme işlemi sonrasında oluşan canlılık ve motilite kaybına ek olarak proteomik değişikliklerle de ilişkili olabilir (143). Knock-out fare modellerinde TEX101 ve ADAM3 gibi bazı proteinlerin kaybı sperm migrasyonunda bozuklukla sonuçlanmıştır (189,190). UTB’de dondurma-çözme

işlemine maruz kalan spermelerin taze spermlere göre daha az miktarda bulunmasının bir diğer nedeni bu spermelerin dişi genital kanalındaki hızlı kaybı olabilir (143). Koyunlar üzerinde yapılan bir çalışmada servikal inseminasyondan sadece otuz dakika sonra, servikste ki dondurulmuş sperm miktarının başlangıçta eşit miktarda verilen taze sperm miktarına göre oldukça düşük olduğu gözlenmiştir (186). Bir diğer neden inseminasyon sonrası artmış inflamatuvar yanıt ve fagositoz olabilir (191,192). Kriyoprezervasyon sonrası sperm membran lipidlerindeki ve glikokaliks tabakasındaki değişiklikler fagositozu arttırabilir (147–149,151,193). Dondurulmuş çözülmüş spermatozoa yüksek ileri motiliteye sahip olsa bile in vitro ortamda zayıf mukus penetrasyonu göstermiştir (194). Bu bulgu mukus penetrasyonu için sadece motilitenin yeterli olmadığını belirten çalışmalarla desteklenmektedir (195). Tollner ve ark. yaptıkları çalışmada DEFB126 gibi sperm proteinlerinin mukus penetrasyonunda anahtar rol oynadığını öne sürmektedirler (196). Dolayısıyla kriyohasar, sperm hareketliliğinde azalmaya neden olmanın da ötesinde mukus penetrasyonu, kadın genital kanalında ilerleme gibi fonksiyonlarda kayıplarla sonuçlanabilmektedir (143). Koitus sonrasında spermatozoa tuba uterina epitelindeki reseptörlere bağlanarak bir rezervuar oluşturur (197,198). İnseminasyon ve ovulasyon arasındaki zaman aralığı ne kadar fazla olursa fertilizasyon o denli olumsuz etkilenir (199), dolayısıyla tuba uterinada oluşan sperm rezervuarı başarılı bir fertilizasyon için gereklidir. Taze sperme göre tuba uterinaya daha az miktarda ulaşan dondurulmuş çözülmüş spermatozoa tuba uterina epiteline bağlanma konusunda da yetersizdir, dolayısıyla rezervuar oluşturmada yetersiz kalır (199). Çalışmamızda gözlemlediğimiz kurkuminin ileri hareketlilik üzerindeki koruyucu etkisi ile bu problem aşılabılır.

Günümüzde ÜYTE laboratuvarlarında fertilizasyon başarı oranlarına odaklanılmaktadır. İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) ile yumurtaların %50-80'i döllenmektedir. Ancak yüksek döllenme oranları yüksek klinik gebelik ve canlı doğum oranlarını beraberinde getirmemektedir. Döllenme gerçekleştiğinde, ICSI kullanan bir çift için başarı oranı, konvansiyonel in vitro fertilizasyon (IVF) tedavisi kullanan bir çift ile aynıdır. Beckwith-Widemann Sendromu, Angelman Sendromu, hipospadias ve cinsiyet kromozom anomalileri gibi bazı doğum kusurlarının ICSI prosedüründe ortaya çıkma riski daha fazladır. Ayrıca ICSI prosedürü sonucunda doğan erkek bebeklerin gelecekte infertil olma riskleri daha fazladır. Bunun nedeni, erkek infertilitesinin genetik olarak aktarılabilmesidir (200,201). ICSI prosedürü sonucunda

endokrin bozukluklar ve epigenetik değişiklikler meydana gelmektedir (202). Dolayısıyla ICSI, güvenilirliği hala tartışılan bir prosedürdür. Gelecekte IVF ve intrauterin inseminasyon (IUI) gibi fizyolojik koşullarla daha uyumlu olan prosedürler tekrar ön plana çıkabilir. Böylece kurkuminin sperm hareketliliğine olan olumlu etkisi daha çok önem kazanmaktadır.

Kriyoprezervasyon genetik ve epigenetik değişikliklere de neden olmaktadır. Sperm kriyoprezervasyonunun insanlarda fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminde önemli rolü olan ADD1, ARNT, BIK, FSHB, PEG1/MEST, PRM1, SNORD116/PWSAS ve UBE3A genlerinde lezyonlara neden olduğu bildirilmiştir (203). Valcarce ve ark., fertilizasyon ve gebelik başarısında önemli rolü olan bazı mRNA'ların (ADD1, PEG1/MEST, PRM1 and PRM2) miktarının kriyoprezervasyon sonrasında azaldığını gözlemlemişlerdir (204). Bazı mikroRNA (miRNA) düzeyleri de kriyoprezervasyondan daha çok etkilenmektedir. miRNA'lar küçük, protein kodlamayan RNA molekülleridir ve mRNA translasyonunu inhibe ederek veya mRNA'nın bozulmasını tetikleyerek etki gösterir. İnsanlarda miRNA'ların sperm fertilizasyon kapasitesini etkilediğine dair çalışmalar mevcuttur (94). Epigenetik terimi, DNA dizisindeki modifikasyonlar dışındaki mekanizmalar aracılığıyla gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtsal değişiklikleri ifade eder (205). DNA metilasyonu, sperm spesifik nükleoproteinler, sperm kaynaklı RNA'lar ve nükleer matriks aracılığıyla gerçekteşen DNA ilmek bölgesinin (DNA loop domain) organizasyonu spermde meydana gelen epigenetik sinyallerdir (94). İnsan sperm DNA'sının yaklaşık %15'inin paketlenildiği nükleozomlar paternal zigotik kromatine ve embriyo epigenomuna katkıda bulunmaktadır (206). Fertilizasyon sırasında oosit, sperm kromatini kaynaklı epigenetik sinyalleri miras alır ve bu sinyaller erken embriyo gelişiminde önemli rol oynar. Dolayısıyla kriyoprezervasyon sonucu sperm kromatininde ve DNA'sında meydana gelen değişiklikler ve çalışmamızda gözlemlediğimiz kurkuminin bu değişikliklere karşı koruyucu etkisi ayrıca önem arz etmektedir.

Dondurulan spermlerin sıvı azotta bekleme süreleri ayrıca irdelenmesi gereken bir konudur. Fortunato ve ark. yaptıkları çalışmada insan sperm örnekleri sıvı azotta on ve doksan gün bekletilmiş ve uzun saklama sürelerinin kromatin yoğunlaşma durumu üzerinde ayrıca bir olumsuz etkisi olduğu bildirilmiştir (207). Fraser ve ark. domuzlar

üzerinde yaptıkları çalışmada ise sperm örnekleri sıvı azotta dört yıl boyunca bekletilmiş ve çözme sonrasında membran bütünlüğü, hareketlilik ve mitokondri fonksiyonları gibi sperm parametrelerinde azalma gözlenmiştir (208). 72 gönüllü ile yapılan başka bir çalışmada uzun saklama sürelerinin (6 ay-14,4 yıl) çözme sonrası ileri hareketlilik parametresi üzerinde ayrıca bir olumsuz etkisi gözlenmemiştir (209). Çalışmamızda dondurulan tüm örnekler sıvı azotta on gün bekletilmiştir. Kriyoprezervasyon süresinin sperm parametreleri üzerindeki etkisi ile ilgili literatürdeki veriler birbirleriyle çelişmektedir. Kurkuminin farklı süreler boyunca sıvı azotta bekletilen spermler üzerindeki etkisi ayrı bir çalışmanın konusu olabilir.

Kurkumin hidrofobik, dolayısıyla suda çözünürlüğü düşük olan bir maddedir. Bu özelliğinden dolayı çalışmamızda kurkumini çözmek amacıyla final konsantrasyonu %0,1 (v/v) olacak şekilde DMSO kullanılmıştır. DMSO'nun hücreler üzerindeki olumsuz etkileri bilinmektedir. Birçok hücre tipi için %0,1 konsantrasyonunun güvenli olduğu bildirilirken bazı çalışmalarda bu konsantrasyonda da toksik etkiler gözlemlenmiştir (210). Miyagi ve ark. DMSO'nun DNA metilasyonuna ve histon değişimine neden olarak hücre farklılaşmasını indüklediği ve canlılık oranında belirgin düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir (93). Çalışmamızda canlılık, total sperm hareketi, ileri hareket ve morfoloji parametrelerinin DMSO grubunda diğer gruplardan anlamlı derecede azaldığı, DNA bütünlüğü ve kromatin yoğunlaşma durumunun DMSO grubunda belirgin bir şekilde bozulduğu gözlemiştir. Kurkumin, ileri hareket ve DNA bütünlüğü gibi önemli parametreler üzerinde belirgin koruyucu etki göstermiştir. Ancak canlılık ve morfoloji üzerinde kurkuminin herhangi bir koruyucu etkisi gözlemlenmemiştir. Günümüzde kurkuminin suda çözünürlüğünü arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır (211,212). Alizadeh ve ark. yaptıkları randomize klinik çalışmada kurkumin nanomiçelinin infertil erkeklerde oksidatif stres ve inflamatuvar belirteç düzeylerini azalttığını, semen parametrelerini iyileştirdiğini gözlemlemişlerdir (213). Suda çözünürlüğü artırılmış kurkumin analoglarının kullanımı ile kriyoprezervasyonun sperm parametreleri üzerindeki olumsuz etkisinin önlenebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın en büyük kısıtlılığı örneklemi oluşturan gönüllü sayısının az olmasıdır. Örneklem büyüklüğü yetersiz olmasına rağmen kurkuminin sperm kriyohasasına karşı belirgin koruyucu etkileri olduğu gözlenmiştir. Kurkuminin oral

kullanımı, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration-FDA) ve DSÖ tarafından güvenli olarak tanımlanmıştır. Ancak kurkumin ile in-vitro ortamda inkübe edilen biyolojik materyallerin insanlar üzerinde kullanımı ile ilgili ileri araştırmalar gerekmektedir. Günümüzde omik teknolojileri (genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik) hızla gelişmektedir. Omik temelli çalışmalar ile daha etkili, hedefe yönelik, güvenli ve kişiselleştirilmiş tıbbi bakım sağlanabilecektir. Omik temelli çalışmalar sonucunda çok yakın bir gelecekte kurkumin ve diğer antioksidan maddelerin sperm kriyoprezervasyonunda rutin olarak kullanıma gireceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

1. Sztein JM, Takeo T, Nakagata N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*. 2018;82:57–63.
2. McLaughlin EA. Cryopreservation, screening and storage of sperm the challenges for the twenty-first century. *Hum Fertil (Camb)*. 2002;5:S61-5.
3. Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(2):184–9.
4. Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. *C. 2, Human Reproduction Update*. 1996.
5. Lu X, Zhang Y, Bai H, Liu J, Li J, Wu B. Mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO improves the post-thaw sperm quality. *Cryobiology*. 2018;80(105):26–9.
6. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod*. 2009;24(9):2061–70.
7. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*. 2016;17(4):745–56.
8. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK, Aggarwal BB. Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. *Biotechnol Adv*. 2014;32(6):1053–64.
9. Jayaprakasha GK, Jaganmohan Rao L, Sakariah KK. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chem*. 2006;98(4):720–4.
10. Chanapiwat P, Kaeoket K. The effect of *Curcuma longa* extracted (curcumin) on the quality of cryopreserved boar semen. *Anim Sci J*. 2015;86(9):863–8.
11. Küçükgünay S, Akalın PP, Başpınar N, Sarıözkan S, Bucak MN, Büyükleblebici S, vd. Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen-thawed bovine semen. *Andrologia*. 2011;44:102–9.
12. Bucak MN, Sarıözkan S, Tuncer PB, Sakin F, Ateşşahin A, Kulaksız R, vd. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*)

- sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Rumin Res.* 2010;89(1):24–30.
13. Soleimanzadeh A, Saberivand A. Effect of curcumin on rat sperm morphology after the freeze-thawing process. *Artic Vet Res Forum.* 2013;4(3):185–9.
 14. Soltani A, Salmaninejad A, Jalili-Nik M, Soleimani A, Javid H, Hashemy SI, vd. Freezability of water buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa is improved with the addition of curcumin (diferuoyl methane) in semen extender. *Andrologia.* 2018;7(1):1–10.
 15. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology* 4th Edition. Elsevier Saunders; 2013. 752 s.
 16. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas.* 2012.
 17. Fattini CA, Rezende GL, Nogueira Filho JR, Kenji Fukumoto W, Simoes M de J, Ambrósio JD. Effect of age on the volume and weight of human testis. *Rev chil anat.* 1998;16(2):185–90.
 18. Michael H.Ross, Wojciech Pawlina. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology* Seventh Edition. 2016. 984 s.
 19. Delilbaşı L. *A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. Veri Medikal Yayıncılık;* 2010. 225 s.
 20. Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW, Peters C (Craig A, Campbell MF (Meredith F, Walsh PC. *Campbell Walsh Urology* Eleventh Edition. 2016. 4176 s.
 21. Kerr JB, Loveland KAL, O'Bryan MK, Kretser DM de. *Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms.* Elsevier; 2006. s. 827–947.
 22. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. C. 59, *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2016. s. 10–26.
 23. Dhole B, Kumar A. *The Testis. İçinde: Basics of Human Andrology.* Singapore: Springer Singapore; 2017. s. 3–15.
 24. Dym M. The fine structure of the monkey (*Macaca*) sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anat Rec.* 1973;175(4):639–56.
 25. Setchell BP. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. İçinde: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.* Springer; 2009. s. 212–33.
 26. Elder K, Dale B. *In-Vitro Fertilization, Third Edition.* 2011.

27. Sadler TW. Langman's Medical Embryology.
28. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: New insights into apoptosis during spermatogenesis. C. 22, BioEssays. John Wiley & Sons, Ltd; 2000. s. 423–30.
29. Paniagua R, Nistal M. Morphological and histometric study of human spermatogonia from birth to the onset of puberty. J Anat. 1984;139(Pt 3):535.
30. Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. Am J Anat. 1966;118(2):509–24.
31. Goossens E, Tournaye H. Adult stem cells in the human testis. İçinde: Seminars in reproductive medicine. Thieme Medical Publishers; 2013. s. 39–48.
32. Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. Fertil Steril. 17(6):705–21.
33. van Alphen MMA, van de Kant HJG, de Rooij DG. Repopulation of the Seminiferous Epithelium of the Rhesus Monkey after X Irradiation. Radiat Res. 1988;113(3):487.
34. De Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. J Androl. 2000;21(6):776–98.
35. Hai Y, Hou J, Liu Y, Liu Y, Yang H, Li Z, vd. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. Semin Cell Dev Biol. 2014;29:66–75.
36. Grisanti L, Falciatori I, Grasso M, Dovere L, Fera S, Muciaccia B, vd. Identification of spermatogonial stem cell subsets by morphological analysis and prospective isolation. Stem Cells. 2009;27(12):3043–52.
37. Hayashi T, Yamada T, Kageyama Y, Negishi T, Kihara K. Expression failure of the Notch signaling system is associated with the pathogenesis of maturation arrest in male infertility patients. Fertil Steril. 2004;81(3):697–9.
38. van den Driesche S, Sharpe RM, Saunders PTK, Mitchell RT. Regulation of the germ stem cell niche as the foundation for adult spermatogenesis: A role for miRNAs? Semin Cell Dev Biol. 2014;29:76–83.
39. Johnson L, Petty CS, Porter JC, Neaves WB. Germ Cell Degeneration During Postprophase of Meiosis and Serum Concentrations of Gonadotropins in Young Adult and Older Adult Men. Biol Reprod. 1984;31(4):779–84.
40. Kim SK, Yoon YD, Park YS, Seo JT, Kim JH. Involvement of the Fas-Fas ligand system and active caspase-3 in abnormal apoptosis in human testes with

- maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Fertil Steril*. 2007;87(3):547–53.
41. O'Neill DA, McVicar CM, McClure N, Maxwell P, Cooke I, Pogue KM, vd. Reduced sperm yield from testicular biopsies of vasectomized men is due to increased apoptosis. *Fertil Steril*. 2007;87(4):834–41.
 42. Hermo L, Pelletier R, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 4: Intercellular bridges, mitochondria, nuclear envelope, apoptosis, ubiquitination, membrane/voltage-gated channels, methylation/acetylation, and transcrip. *Microsc Res Tech*. 2010;73(4):364–408.
 43. Ruwanpura SM, McLachlan RI, Matthiesson KL, Meachem SJ. Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod*. 2008;23(2):403–11.
 44. Pentikäinen V, Suomalainen L, Erkkilä K, Martelin E, Parvinen M, Pentikäinen MO, vd. Nuclear factor- κ B activation in human testicular apoptosis. *Am J Pathol*. 2002;160(1):205–18.
 45. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat*. 1963;112(1):35–51.
 46. Heller CH, Clermont Y. Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res*. 1964;20:545–75.
 47. Amann RP. The cycle of the seminiferous epithelium in humans: A need to revisit? C. 29, *Journal of Andrology*. 2008. s. 469–87.
 48. Johnson L, Chaturvedi PK, Williams JD. Missing Generations of Spermatocytes and Spermatids in Seminiferous Epithelium Contribute to Low Efficiency of Spermatogenesis in Humans¹. *Biol Reprod*. 1992;47(6):1091–8.
 49. Tesarik J, Balaban B, Isiklar A, Alatas C, Urman B, Aksoy S, vd. In-vitro spermatogenesis resumption in men with maturation arrest: Relationship with in-vivo blocking stage and serum FSH. *Hum Reprod*. 2000;15(6):1350–4.
 50. Sofikitis N, Mantzavinos T, Loutradis D, Yamamoto Y, Tarlatzis V, Miyagawa I. Ooplasmic injections of secondary spermatocytes for non-obstructive azoospermia. *Lancet*. 1998;351(9110):1177–8.
 51. Steven Ward W, Coffey DS. Identification of a Sperm Nuclear Annulus: A Sperm DNA Anchor. *Biol Reprod*. 1989;41(2):361–70.

52. Steven Ward W, Coffey DS. DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cell. *Biol Reprod.* 1991;44(4):569–74.
53. Scott GBD. *Functional Histology - a Text and Colour Atlas.* Postgrad Med J. 1988;64(747):93–93.
54. Kumar A, Sharma M. *Basics of Human Andrology A Textbook.* Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2017; 2017. 530 s.
55. Moreno RD, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Chan EKL, Schatten G. Vesicular Traffic and Golgi Apparatus Dynamics During Mammalian Spermatogenesis: Implications for Acrosome Architecture. *Biol Reprod.* 2000;63(1):89–98.
56. Kierszenbaum AL, Tres LL. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol.* 2004;67(4):271–84.
57. Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. C. 44, *Developmental Biology.* Academic Press; 1975. s. 394–436.
58. Gatewood JM, Cook GR, Balhorn R, Schmid CW, Bradbury EM. Isolation of four core histones from human sperm chromatin representing a minor subset of somatic histones. *J Biol Chem.* 1990;265(33):20662–6.
59. Haraguchi CM, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Tokumoto T, Hoshi K, vd. Possible function of caudal nuclear pocket: Degradation of nucleoproteins by ubiquitin-proteasome system in rat spermatids and human sperm. *J Histochem Cytochem.* 2007;55(6):585–95.
60. Yoshinaga K, Toshimori K. Organization and modifications of sperm acrosomal molecules during spermatogenesis and epididymal maturation. *Microsc Res Tech.* 2003;61(1):39–45.
61. Adham IM, Nayernia K, Engel W. Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. *Mol Reprod Dev.* 1997;46(3):370–6.
62. Gartner LP. *Textbook of Histology E-Book.* 2015. 672 s.
63. Anakwe OO. Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. *Biol Reprod.* 1990;42(2):317–28.
64. Garty NB, Galiani D, Aharonheim A, Ho YK, Phillips DM, Dekel N, vd. G-proteins in mammalian gametes: an immunocytochemical study. *J Cell Sci.* 1988;91(1).
65. World Health Organization. *WHO laboratory manual for the examination and*

- processing of human semen Fifth edition. 2010;290.
66. WHO. WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan semeninin incelenmesi ve işlemlerden geçirilmesi. 2010. 1–290 s.
 67. Koyuncu H. Methods for The Determination of Sperm DNA Damage. Türk Üroloji Semin Urol Semin. 2011;2(1):18–23.
 68. Terquem A, Dadoune JP. Aniline Blue Staining of Human Spermatozoon Chromatin. Evaluation of Nuclear Maturation. İçinde: The Sperm Cell. Dordrecht: Springer Netherlands; 1983. s. 249–52.
 69. Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. Hum Reprod. 1991;6(7):979–82.
 70. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril. 1984;42(1):87–91.
 71. Talebi AR, Moein MR, Tabibnejad N, Ghasemzadeh J. Effect of varicocele on chromatin condensation and DNA integrity of ejaculated spermatozoa using cytochemical tests. Andrologia. 2008;40(4):245–51.
 72. Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: A guideline. Fertil Steril. 2013;99(1):37–43.
 73. Spallanzani L, di Ginevra B. Opuscoli di fisica animale, et vegetabile dell Abate Spallanzani: aggiuntevi ... - Lazzaro Spallanzani, Bonnet di Ginevra. Presso la Societa Tipografica; 1776.
 74. Mantegazza P. Fisiologia sullo sperma umano. Rendic R Instit Lomb. 1866;3:183–6.
 75. Hammond J. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vagina. J Exp Biol. 1930;7(2):201–19.
 76. Walton A. The Effect of Temperature on the Survival In Vitro of Rabbit Spermatozoa Obtained from the Vas Deferens. J Exp Biol. 1930;7(2):201–19.
 77. Polge C, Rowson LEA. Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at -79°C. Nature. 1952;169(4302):626–7.
 78. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. C. 172, Nature. Nature Publishing Group; 1953. s. 767–8.

79. Sherman JK. Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. *Fertil Steril*. 1963;14(1):49–64.
80. Perloff WH, Steinberger E, Sherman JK. Conception with Human Spermatozoa Frozen by Nitrogen Vapor Technic. *Fertil Steril*. 1964;15(5):501–4.
81. Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol*. 1963;47(2):347–69.
82. Mazur P. Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys*. 1990;17(1):53–92.
83. Mazur P, Leibo SP, Chu EHY. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res*. 1972;71(2):345–55.
84. Sanger WG, Olson JH, Sherman JK. Semen cryobanking for men with cancer - Criteria change. *Fertil Steril*. 1992;58(5):1024–7.
85. Tunalı UG. Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü. 2012;123–8.
86. Gardner DK. *In Vitro Fertilization A Practical Approach*. 2007;529s.
87. Tucker MJ, Liebermann J. Cryopreservation of human oocytes and the evolution of vitrification technology for this purpose. İçinde: Donnez J, Kim SS, editörler. *Principles and Practice of Fertility Preservation*. Cambridge: Cambridge University Press; 2011. s. 293–304.
88. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, vd. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res*. 2017;6:12–8.
89. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. C. 164, *Nature*. Nature Publishing Group; 1949. s. 666.
90. Lovelock JE, Bishop MWH. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*. 1959;183(4672):1394–5.
91. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. C. 46, *Cryobiology*. Academic Press; 2003. s. 205–29.
92. Slichter SJ, Jones M, Ransom J, Gettinger I, Jones MK, Christoffel T, vd. Review of in vivo studies of dimethyl sulfoxide cryopreserved platelets. C. 28, *Transfusion Medicine Reviews*. W.B. Saunders; 2014. s. 212–25.
93. Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y,

- vd. Cryopreservation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Med.* 2015;8(1–2):3–7.
94. Yeste M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology.* 2016;85(1):47–64.
 95. Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: Principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Hum Reprod Update.* 2015;21(2):209–27.
 96. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reprod Domest Anim.* 2015;50:20–6.
 97. Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol.* 1963;47(2):347–69.
 98. Meryman HT, Williams RJ, Douglas MSJ. Freezing injury from “solution effects” and its prevention by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology.* 1977;14(3):287–302.
 99. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2010;93(6):1921–8.
 100. Shehata M. Fertility preservation in male patients subjected to chemotherapy; innovative approaches for further progress. *J Turkish Soc Obstet Gynecol.* 2017;256–60.
 101. Szell AZ, Bierbaum RC, Hazelrigg WB, Chetkowski RJ. Live births from frozen human semen stored for 40 years. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30(6):743–4.
 102. Rodriguez-Wallberg KA, Waterstone M, Anastácio A. Ice age: Cryopreservation in assisted reproduction – An update. *C. 19, Reproductive Biology.* 2019. s. 119–26.
 103. Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology.* 1977;14(4):466–70.
 104. Kiuch F, Goto Y, Sugimoto N, Tsuda Y, Akao N, Kondo K. Nematocidal Activity of Turmeric: Synergistic Action of Curcuminoids. *Chem Pharm Bull.* 1993;41(9):1640–3.
 105. Shen L, Ji HF. Theoretical study on physicochemical properties of curcumin. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2007;67(3–4):619–23.
 106. Dept. of Pharmaceutics. 4. Drug And Polymer Profiles 4.1. Drug Profile 4.1.1. Curcumin 4.1.1.1. Source and chemical composition.

107. Araújo C, Leon L. Biological activities of *Curcuma longa* L. Mem Inst Oswaldo Cruz. Temmuz 2001;96(5):723–8.
108. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. Biochem Pharmacol. 2008;75(4):787–809.
109. Bisht S, Feldmann G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, vd. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin”): A novel strategy for human cancer therapy. J Nanobiotechnology. 2007;5(1):3.
110. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. Methods Enzymol. 1990;186(C):1–85.
111. Koca N, Karadeniz F. Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları Ve Vücuttaki Antioksidan Savunma Sistemleri. Gıda Mühendisliği Derg. 2003.
112. Majeed M, Badmaev V, Murray F. Turmeric and the healing curcuminoids. McGraw Hill Professional; 1999.
113. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. J Androl. 2001;22(1):45–53.
114. Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. Int J Androl. 1999;162:155–62.
115. Abuarqoub H, Green CJ, Foresti R, Motterlini R. Curcumin reduces cold storage-induced damage in human cardiac myoblasts. Exp Mol Med. 2007;39(2):139–48.
116. Naz RK, Lough ML. Curcumin as a potential non-steroidal contraceptive with spermicidal and microbicidal properties. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2014;176(1):142–8.
117. Kanitkar M, Bhonde RR. Curcumin treatment enhances islet recovery by induction of heat shock response proteins, Hsp70 and heme oxygenase-1, during cryopreservation. Life Sci. 2008;82(3–4):182–9.
118. Shah SAH, Andrabi SMH, Qureshi IZ. Freezability of water buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa is improved with the addition of curcumin (diferuoyl methane) in semen extender. Andrologia. 2017;49(8):1–10.
119. Lin J, Pan M, Lin-shiau S. Recent studies on the biofunctions and biotransformations of curcumin. BioFactors. 2000;13(1):153–8.
120. Slobodan V. Jovanovic *,†, Charles W. Boone ‡, Steen Steenken §, Manuela

- Trinoga § and, Kaskey L RB. How Curcumin Works Preferentially with Water Soluble Antioxidants. 2001;
121. Reddy ACP, Lokesh BR. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem.* 1994;137(1):1–8.
 122. de Lamirande E, O’Flaherty C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. C. 1784, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics.* Elsevier; 2008. s. 106–15.
 123. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: Potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998;13(4):896–900.
 124. Bennetts LE, Aitken RJ. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 2005;71(1):77–87.
 125. Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. İçinde: *Theriogenology.* Elsevier; 2006. s. 958–78.
 126. Padron OF, Lynne CM, Brackett NL, Thomas AJ, Sharma RK, Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril.* 1997;67(6):1115–20.
 127. Tvrdá E, Tušimová E, Kováček A, Paál D, Greifová H, Abdramanov A, vd. Curcumin has protective and antioxidant properties on bull spermatozoa subjected to induced oxidative stress. *Anim Reprod Sci.* 2016;172:10–20.
 128. Salahshoor MR. Effects of curcumin on reproductive parameters in male mice. *J Clin Res Paramed Sci.* 2012;1:31–7.
 129. Naz RK. Can curcumin provide an ideal contraceptive? *Mol Reprod Dev.* 2011;78(2):116–23.
 130. Naz RK. The effect of curcumin on intracellular pH (pHi), membrane hyperpolarization and sperm motility. *J Reprod Infertil.* 2014;15(2):62–70.
 131. Troiano L, Granata ARM, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, vd. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res.* 1998;241(2):384–93.
 132. Rotem R, Paz GF, Homonnai ZT, Kalina M, Naor Z. Protein kinase C is present in human sperm: Possible role in flagellar motility. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 1990;87(18):7305–8.
133. Rithaporn T, Monga M, Rajasekaran M. Curcumin: A potential vaginal contraceptive. *Contraception*. 2003;68(3):219–23.
 134. Sharma P, Singh R. Protective role of curcumin on lindane induced reproductive toxicity in male wistar rats. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2010;84(4):378–84.
 135. Chandra AK, Chatterjee A, Ghosh R, Sarkar M. Effect of curcumin on chromium-induced oxidative damage in male reproductive system. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2007;24(2):160–6.
 136. Dev KR, Yadamma K, Reddy KD. Protective effects of curcumin in cyclophosphamide induced sperm head abnormalities in male mice. *Int J Pharm Biol Sci*. 2013;4:1131–7.
 137. Mathuria N, Verma RJ. Curcumin ameliorates aflatoxin-induced toxicity in mice spermatozoa. *Fertil Steril*. 2008;90(3):775–80.
 138. Srinivas L, Shalini VK, Shylaja M. Turmerin: A water soluble antioxidant peptide from turmeric [*Curcuma longa*]. *Arch Biochem Biophys*. 1992;292(2):617–23.
 139. Azza M, El-Wakf MES, Elhabiby MW, El-kholy E, El-Ghany EA. Use of tumeric and curcumin to alleviate adverse reproductive outcomes of water: Nitrate pollution in male rats. *Nat Sci*. 2011;9:229–39.
 140. Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rumin Res*. 2008;75(2–3):128–34.
 141. Chakrabarty J, Banerjee D, Pal D, De J, Ghosh A, Majumder GC. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology*. 2007;54(1):27–35.
 142. Buhr MM, Curtis EF, Somnapan Kakuda N. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*. 1994;31(3):224–38.
 143. Pini T, Leahy T, de Graaf SP. Sublethal sperm freezing damage: Manifestations and solutions. *Theriogenology*. 2018;118:172–81.
 144. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv Urol*. 2012;2012.

145. Jaruga E, Sokal A, Chrul S, Bartosz G. Apoptosis-independent alterations in membrane dynamics induced by curcumin. *Exp Cell Res*. 1998;245(2):303–12.
146. Jaruga E, Salvioli S, Dobrucki J, Chrul S, Bandorowicz-Pikuła J, Sikora E, vd. Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. *FEBS Lett*. 1998;433(3):287–93.
147. Tanaka Y, Schroit AJ. Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells. Recognition by autologous macrophages. *J Biol Chem*. 1983;258(18):11335–43.
148. McEvoy L, Williamson P, Schlegel RA. Membrane phospholipid asymmetry as a determinant of erythrocyte recognition by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(10):3311–5.
149. Schauer R, Shukla AK, Schröder C, Müller E. The anti-recognition function of sialic acids: Studies with erythrocytes and macrophages. *Pure Appl Chem*. 1984;56(7):907–21.
150. Crestani B, Rolland C, Petiet A, Colas-Linhart N, Aubier M. Cell surface carbohydrates modulate neutrophil adherence to alveolar type II cells in vitro. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. Nisan 1993;264(4):L391–400.
151. Paris LL, Chihara RK, Sidner RA, Joseph Tector A, Burlak C. Differences in human and porcine platelet oligosaccharides may influence phagocytosis by liver sinusoidal cells in vitro. *Içinde: Xenotransplantation*. John Wiley & Sons, Ltd; 2012. s. 31–9.
152. Zini A, Libman J. Sperm DNA damage: Clinical significance in the era of assisted reproduction. *C. 175, CMAJ*. 2006. s. 495–500.
153. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*. 20(3):211–7.
154. Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl*. 1990;13(6):452–62.
155. Boe-Hansen GB, Fedder J, Ersbøll AK, Christensen P. The sperm chromatin structure assay as a diagnostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*.

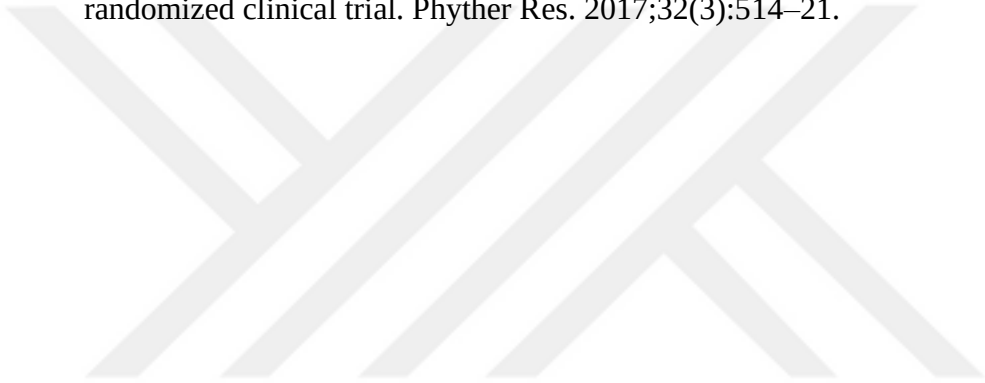
- 2006;21(6):1576–82.
156. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, vd. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14(4):1039–49.
 157. Ménéz YJR, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, vd. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online*. 2007;14(4):418–21.
 158. Giwercman A, Lindstedt L, Larsson M, Bungum M, Spano M, Levine RJ, vd. Sperm chromatin structure assay as an independent predictor of fertility in vivo: A case-control study. *Int J Androl*. 2010;33(1):e221–7.
 159. Donnelly ET. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod*. 2001;16(6):1191–9.
 160. de Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril*. 2006;86(3):597–600.
 161. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-Thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *J Androl*. 2001;22(4):646–51.
 162. Isachenko V, Isachenko E, Katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F, vd. Cryoprotectant-Free Cryopreservation of Human Spermatozoa by Vitrification and Freezing in Vapor: Effect on Motility, DNA Integrity, and Fertilization Ability. *Biol Reprod*. 2004;71(4):1167–73.
 163. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, vd. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod*. 2004;19(4):932–9.
 164. Yeste M, Rao B, Soufir JC, Martin M, David G, Medrano L, vd. Effect of sperm storage and selection techniques on sperm parameters. *Cryobiology*. 2017;78(3):1682–99.
 165. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*.

- 1998;69(3):528–32.
166. Muratori M, Piomboni P, Baldi E, Filimberti E, Pecchioli P, Moretti E, vd. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *J Androl.* 21(6):903–12.
 167. Moustafa M, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, vd. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.* 2004;19(1):129–38.
 168. Shen H-M. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod.* 2002;17(5):1266–73.
 169. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 21(1):33–44.
 170. Shamsi MB, Kumar R, Dada R. Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res.* 2008;127(2):115–23.
 171. Andrabi SMH. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. C. 24, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* Springer; 2007. s. 561–9.
 172. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 33(5):603–21.
 173. Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril.* 2003;80(3):531–5.
 174. Kodama H, Kasai H, Yamaguchi R, Tanaka T, Fukuda J. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 1997;68(3):519–24.
 175. Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(4):529–36.
 176. Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a

- male infertility prognostic factor. *Fertil Steril*. 2008;89(5):1191–9.
177. Meseguer M, de los Santos MJ, Simón C, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril*. 2006;86(5):1376–85.
 178. Choucair F, Saliba E, Jaoude IA, Hazzouri M. Antioxidants modulation of sperm genome and epigenome damage: Fact or fad? Converging evidence from animal and human studies. *Middle East Fertil Soc J*. 2018;23(2):85–90.
 179. Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur J Cancer*. 2005;41(13):1955–68.
 180. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: The Indian solid gold. C. 595, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer US; 2007. s. 1–75.
 181. Corson TW, Crews CM. Molecular Understanding and Modern Application of Traditional Medicines: Triumphs and Trials. C. 130, *Cell*. Cell Press; 2007. s. 769–74.
 182. Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(3):283–99.
 183. Yallapu MM, Ebeling MC, Jaggi M, Chauhan SC. Plasma Proteins Interaction with Curcumin Nanoparticles: Implications in Cancer Therapeutics. *Curr Drug Metab*. 2013;14(4):504–15.
 184. M. Yallapu M, Jaggi M, C. Chauhan S. Curcumin Nanomedicine: A Road to Cancer Therapeutics. *Curr Pharm Des*. 2013;19(11):1994–2010.
 185. Pursel VG, Schulman LL, Johnson LA. Distribution and Morphology of Fresh and Frozen-Thawed Sperm in the Reproductive Tract of Gilts after Artificial Insemination. *Biol Reprod*. 1978;19(1):69–76.
 186. Salamon S, Lightfoot RJ. Fertilization and Embryonic Loss in Sheep after Insemination with Deep Frozen Semen. C. 216, *Nature*. Nature Publishing Group; 1967. s. 194–5.
 187. Abad M, Sprecher DJ, Ross P, Friendship RM, Kirkwood RN. Effect of sperm cryopreservation and supplementing semen doses with seminal plasma on the establishment of a sperm reservoir in gilts. *Reprod Domest Anim*. 2007;42(2):149–52.

188. Lightfoot RJ, Salamon S. Fertility Of Ram Spermatozoa Frozen By The Pellet Method. *Reproduction*. 1970;22(3):385–98.
189. Fujihara Y, Okabe M, Ikawa M. GPI-Anchored Protein Complex, LY6K/TEX101, Is Required for Sperm Migration into the Oviduct and Male Fertility in Mice¹. *Biol Reprod*. 2014;90(3):60.
190. Yamaguchi R, Muro Y, Isotani A, Tokuhiko K, Takumi K, Adham I, vd. Disruption of ADAM3 Impairs the Migration of Sperm into Oviduct in Mouse¹. *Biol Reprod*. 2009;81(1):142–6.
191. Robertson SA, O’Connell AC, Hudson SN, Seamark RF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) targets myeloid leukocytes in the uterus during the post-mating inflammatory response in mice. *J Reprod Immunol*. 2000;46(2):131–54.
192. Sharkey DJ, Tremellen KP, Jasper MJ, Gemzell-Danielsson K, Robertson SA. Seminal Fluid Induces Leukocyte Recruitment and Cytokine and Chemokine mRNA Expression in the Human Cervix after Coitus. *J Immunol*. 2012;188(5):2445 LP – 2454.
193. Crestani B, Rolland C, Petiet A, Colas-Linhart N, Aubier M. Cell surface carbohydrates of rat alveolar type II cells in primary culture. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1993;8(2):145–52.
194. Tollner TL, Dong Q, VandeVoort CA. Frozen-thawed rhesus sperm retain normal morphology and highly progressive motility but exhibit sharply reduced efficiency in penetrating cervical mucus and hyaluronic acid gel. *Cryobiology*. 2011;62(1):15–21.
195. Rickard JP, Pini T, Soleilhavoup C, Cognie J, Bathgate R, Lynch GW, vd. Seminal plasma aids the survival and cervical transit of epididymal ram spermatozoa. *Reproduction*. 2014;148(5):469–78.
196. Tollner TL, Yudin AI, Treece CA, Overstreet JW, Cherr GN. Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates sperm penetration of cervical mucus. *Hum Reprod*. 2008;23(11):2523–34.
197. Suarez SS. Carbohydrate-Mediated Formation of the Oviductal Sperm Reservoir in Mammals. *Cells Tissues Organs*. 2001;168(1–2):105–12.
198. Suarez SS. The Oviductal Sperm Reservoir in Mammals: Mechanisms of Formation. *Biol Reprod*. 1998;58(5):1105–7.

199. Waberski D, Weitze KF, Gleumes T, Schwarz M, Willmen T, Petzoldt R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology*. 1994;42(5):831–40.
200. American Society for Reproductive Medicine. What is Intracytoplasmic sperm Injection? 2014.
201. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for non-male factor infertility: A committee opinion. *Fertil Steril*. 2012;98(6):1395–9.
202. P Alukal J, J. Lamb D. Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) – What are the risks? *Urol Clin North Am*. 2008;35(2):277–88.
203. Valcarce DG, Cartón-García F, Riesco MF, Herráez MP, Robles V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development. *Andrology*. 2013;1(5):723–30.
204. Valcarce DG, Cartón-García F, Herráez MP, Robles V. Effect of cryopreservation on human sperm messenger RNAs crucial for fertilization and early embryo development. *Cryobiology*. 2013;67(1):84–90.
205. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *C. 429, Nature*. Nature Publishing Group; 2004. s. 457–63.
206. Van Der Heijden GW, Ramos L, Baart EB, Van Den Berg IM, Derijck AA, Van Der Vlag J, vd. Sperm-derived histones contribute to zygotic chromatin in humans. *BMC Dev Biol*. 2008;8(1):34.
207. Fortunato A, Leo R, Liguori F. Effects of cryostorage on human sperm chromatin integrity. *Zygote*. 2013;21(4):330–6.
208. Fraser L, Strzezek J, Kordan W. Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Anim Reprod Sci*. 2014;147(3–4):119–27.
209. Yogev L, Kleiman SE, Shabtai E, Botchan A, Paz G, Hauser R, vd. Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration. *Hum Reprod*. 2010;25(5):1097–103.
210. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J*.

- 2014;28(3):1317–30.
211. Tønnesen HH, Másson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm.* 2002;244(1–2):127–35.
 212. Mahmood K, Zia KM, Zuber M, Salman M, Anjum MN. Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review. *Int J Biol Macromol.* 2015;81:877–90.
 213. Javadi M, Alizadeh F, Gholaminejad F, Karami AA, Haghighian HK, Kavianpour M. Curcumin nanomicelle improves semen parameters, oxidative stress, inflammatory biomarkers, and reproductive hormones in infertile men: A randomized clinical trial. *Phyther Res.* 2017;32(3):514–21.
- 

FORMLAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı: Kurkuminin Dondurma-Çözme İşlemi Sonrası Sperm Parametrelerine Etkisi

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz,

Dünya Sağlık Örgütü infertiliteyi, bir yıl korunmasız cinsel ilişki sonrası gebeliğin oluşmaması olarak tanımlar. Çiftlerin yaklaşık %15'i ilk bir yılda gebelik oluşturamaz. Tanı için yapılan rutin incelemelerde çiftlerin %10-15'inde infertiliteyi açıklayacak neden bulunamazken (açıklanamayan infertilite), geri kalan kısımda erkeğe ilişkin faktörler %45-50'yi oluşturur. YÜT laboratuvarlarında sıklıkla uygulanan semenin kriyoprezervasyonu işlemi erkek infertilitesi için umut vaatetmektedir. Semen kriyoprezervasyonun infertilite dışında da pek çok endikasyonu bulunmaktadır. Kriyobiyojideki tüm gelişmelere rağmen dondurma-çözme işlemi sonrası sperm canlılığında % 50'ye varan düşüşler gözlenmektedir. Yapacağımız çalışmada anlamlı sonuçlar elde edilirse rutin bir işlem olan kriyoprezervasyonun etkinliği artırılabilir ve çalışmamız diğer antioksidan madde çalışmalarına öncülük edebilir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz lütfen bu formu imzalayınız.

Araştırmaya davet edilmenizin nedeni, dondurma-çözme işlemi sonrası başlıca canlılık ve motilite olmak üzere sperm parametreleri olumsuz yönde etkilenmekte ve bu

olumsuzluk döllenme, embriyo gelişimi ve implantasyon yüzdelere yansımaktadır. Bu olumsuz etkilere karşı koruyucu aktivitesi olduğunu düşündüğümüz kurkumin maddesinin bu parametreler üzerine etkisini araştırmayı planladık.

Bu aşamada hemen belirtmemiz gerekir ki, araştırmaya katılmayı kabul etmeniz ya da etmeseniz de tüp bebek tedavisi için kullanılan spermeleriniz haricinde kalan spermelerle kesinlikle hiç bir işlem yapılmayacaktır, spermeler imha edilecektir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, Dr. Fatma Nur Karakuş ya da Dr. Sibel Bulgurcuoğlu-Kuran tarafından bulgularınız kayıt edilecektir. Bu kayıtlar ileride tekrar incelenerek doğru tanı konulmasına yardımcı olacaktır. Söz konusu kayıtlar kimliğiniz belirtilmeden tıp öğrencilerinin eğitiminde veya bilimsel nitelikte yayınlarda kullanılabilir. Bu amaçların dışında bu kayıtlar kullanılmayacak ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

İnceleme sırasında size herhangi bir işlem uygulanmayacaktır, tıbbi bir risk bulunmamaktadır. Spermelerinize ait bilginin gizli kalacağına dair elimizden geleni yapacağız. Yine hemen belirtmeliyiz ki, bu bilgiyi sizin dışınızda birisi ile paylaşmamız sadece sizin izniniz ile olacaktır. Çalışmanın devamı sırasında ortaya çıkabilecek sorun ve riskler size iletilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz. Eğer araştırma için vermiş olduğunuz spermelerinizin imha edilmesine karar verirsiniz, bu isteğinizden önce üretilmiş her türlü veri ve yapılmış analiz ortadan kaldırılmayacak ama daha fazla analiz yapılmayacaktır. Aksi halde, saklama süresinin sonunda örneğin imha edilmesinden destekleyici/araştırmacı sorumludur.

Örneklerin Saklanması

Sizden alınan örneklerin kullanımı bu olur formunda tanımlanan araştırma ile sınırlı olacaktır. Eğer bu örnekleri bu olur formunda tanımlanmayan başka test/amaçlar için kullanmak istersek, önce Etik Kurul'a onay verilmesi için başvurulacaktır. Eğer yeni çalışma onaylanacak olursa size haber verilecek ve gerekli açıklamalar yapılarak sizden başka bir bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız istenecektir.

Katılımcının/Hastanın Beyanı

Sayın Dr. Fatma Nur Karakuş (Tel: 0543 599 6181) ya da Dr. Sibel Bulgurcuoğlu-Kuran (İrtibat Tel: 0212-414 20 00-32617) tarafından İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı'nda deneysel bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bize aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildik.

Eğer bu araştırmaya katılırsak hekim ile aramızda kalması gereken bize ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimizin ihtimamla korunacağı konusunda tarafımıza yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebiliriz. Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimizi önceden bildirmemizin uygun olacağının bilincindeyim. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabiliriz.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyoruz. Bize de bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değiliz ve katılmayabiliriz. Araştırmaya katılmamız konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değiliz. Eğer katılmayı reddedersek, bu

durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkimize herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyoruz.

Bize yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayız. Kendi başımıza belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” (denek) olarak yer alma kararını aldık. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyoruz.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bize verilmiştir.



GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okuduk. Bunlar hakkında bize yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamızla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyoruz.

GÖNÜLLÜLERİN		İMZALARI
ADI & SOYADI		

AÇIKLAMALARI YAPAN ARAŞTIRICININ		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		
RIZA ALMA İŞLEMİNE BAŞINDAN SONUNA KADAR TANIKLIK EDEN KURULUŞ GÖREVLİSİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI "Kırkminin Dondurma-Çözme İşlemi Sonrası Sperm Parametrelerine Etkisi"

DÜZENLENEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	02.11.2018	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	Belge Adı			Açıklama
DÜZENLENEN DİĞER BELGELER	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA HİTİ-Şİ	☒		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÖNÜLLÜKLERİ	☐		
	ILAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
KARAR BELGELERİ	DEĞER	☒		Anabilin Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV
	Karar No:19	Tarih: 09/11/2018		

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU' nun sorumluluğunda ve Dr. Fatma Nur KARAKUŞ' un yürüttüğü yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekli, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerektikçe/iletilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU							
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönermelik					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlgili *	Katılım **	İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		
Dr. Sevdâ ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐		

* : Araştırma ile ilgili
 ** : Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13/01/2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönermelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönermelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatma Nur	Soyadı	Karakuş
Doğ.Yeri	Tosya	Doğ.Tar.	05.05.1991
Email	fatma.karakus@istanbul.edu.tr	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Uzmanlık	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2019
Lisans	Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi	2015
Lise	Özel Samanyolu Gülbahar Koleji	2009

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Uzm. Öğr. Dr.	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi	2016-2019
2.	Pratisyen Dr.	Emirdağ Devlet Hastanesi	2015-2016

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı	YÖKDİL Puanı
İngilizce	Çok iyi	Zayıf	Orta	73,75	87,5

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin