T.C

MALTEPE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASKORBİK ASİT, GLUTATYON VE TAURİN KOMPLEKSİNİN SPERM KRİYOPREZERVASYONUNA MOTİLİTE VE DNA FRAGMANTASYONU AÇISINDAN ETKİSİ

Moleküler Biyolog Seren ÇELİK

KLİNİK EMBRİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ

İSTANBUL

2016

T.C. Maltepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

08.09.2016 tarihinde tezinin savunmasını yapan Seren ÇELİK'e ait "Askorbik Asit, Glutatyon ve Taurin Kompleksinin Sperm Kryoprezervasyonuna Motilite ve DNA Fragmantasyonu Açısından Etkisi" başlıklı çalışma, Jürimiz tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı, Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans Tezi Olarak **Oy Birliği/Oy Çokluğuyla** Kabul Edilmiştir.

.....

Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ
(Üye)

.....

Prof. Dr. Mehmet CINCIK
(Üye)

.....

Prof. Dr. Tülay İREZ
(Üye)

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimi hazırlamam sırasında yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, her konuda özveri ve sabırla beni destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Ümit ÖZEKİCİ'ye, her konuda ilgi ve desteğinden dolayı değerli hocam Prof. Dr. Mehmet CINCIK'a ve tüm Maltepe Üniversitesi çalışanları'na,

Her türlü bilgi ve birikimini benden esirgemeyerek paylaşan, her konuda yol gösteren Emb. Ender YALÇINKAYA'ya,

Her zaman yanımda olan ve beni her koşulda destekleyen canım annem Ayşe CAN'a, kardeşim Yusuf CAN ve babam Yahya CAN'a

Yardım ve desteklerinden dolayı sevgili eşim Emrah ÇELİK'e en içten dileklerimle teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı sperm dondurma medyumuna taurin, glutatyon ve askorbattan oluşan antioksidan kompleksi eklenmesinin, dondurma işleminde oluşacak sperm hasarına etkisini incelemektir.

Çalışmada, Özel Adatıp Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezine semen analizi için başvuran hastaların ejakülat örnekleri kulanıldı. Semen analizi WHO kriterlerine göre normal çıkan hastalarda halosperm yöntemiyle DNA fragmantasyonu analizi yapıldı; semen örneklerinde direk çalışıldı. Kalan ejakülat dondurma yapmak için gradient yöntemiyle hazırlandı. Hazırlanan 1 ml sperm ikiye bölündü ve 0,5 ml örnek antioksidan kompleksi eklenen medyum ile, 0,5 ml örnek ise antioksidan eklenmeyen medyum kullanılarak dondurulduğu. Örnekler dondurulduktan 1 ay sonra çözdürme işlemi yapıldı. Çözdürülen spermler ilk olarak makler chamber ile analiz edildi ve motilite tayini yapıldı. Antioksidanlı ve antioksidansız örneklerde ayrı ayrı halosperm yöntemiyle DNA fragmantasyon analizi yapıldı. Tüm veriler kayıt edildi ve SPSS programıyla analiz edildi.

Verilerin değerlendirilmesi sonucu, dondurma çözdürme sonucu antioksidan eklenen ve eklenmeyen grupların ikisinde de dondurma öncesine oranla motilitede anlamlı bir düşüş görülmüştür (34.8 ±5.32 vs 65.5 ±6.42 , $p1<0.05$; 38.3± 6.22 vs 65.5 ±6.42 , $p2<0.05$). Kontrol ve deney gruplarının ikisinde de dondurma öncesine oranla DNA fragmantasyonunda anlamlı bir artış görülmüştür (52.3±5.42 vs 26.4±3.12 , $p1<0.05$; 47.5±4.7 vs 26.4±3.12 , $p2<0.05$). Ancak, deney grubu spermlerinde kontrol grubuna kıyasla kryo hasar az miktarda düşük olmasına karşın, anlamlı fark bulunamamıştır (47.5±4.7 vs 52.3±5.42 , $p>0.05$).

Dondurma medyumuna antioksidan eklediğimiz bu çalışmamızda, anlamlı bir fark görülmese de, antioksidan eklemenin sperm dondurma üzerinde pozitif etkisi olabileceği gösterilmiştir. Bu durum hasta sayısı, hastaların demografik özellikleri, toplumun karakteristik bazı özelliklerinden veya oluşturulan antioksidan kompleksinden kaynaklanıyor olabilir. Anlamlı sonuçlar için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: halosperm, DNA fragmantasyonu, antioksidanlar, sperm dondurma, hareketlilik.

ABSTRACT

The aim of this study is to investigate whether the addition of the antioxidant complex including taurine, ascorbate and glutathione into the sperm freezing medium affects the damage to sperm during the freezing process.

In this study, ejaculate samples of patients who applied for semen analysis to the assisted reproduction unit in Private Adatip Hospital were used. DNA fragmentation analysis was performed with halosperm method for the patients whose semen parameters were within normal range according to WHO criteria; and semen samples were used for halosperm method directly. Remaining ejaculates were washed with gradient method in order to be frozen. 1 ml sperm samples that were prepared for each patient were divided into two parts: 0,5 ml of sample was mixed with antioxidant and frozen and the other 0,5 ml was frozen without the addition of antioxidant complex. One month later, thawing procedure was implemented. First of all, the number of sperm cells were counted on makler chamber just after thawing, and motility was determined for each sample. DNA fragmentation analysis was done on samples frozen with antioxidants and samples without antioxidants separately with halosperm method. All data were analyzed by SPSS program.

After evaluation of the data, it was found that freezing process resulted in a decrease in motility as expected (34.8 ±5.32 vs 65.5 ±6.42 , $p1<0.05$; 38.3± 6.22 vs 65.5 ±6.42 , $p2<0.05$). Also; it was observed that freezing caused an increase in the ratios of DNA fragmentation in both groups compared to the before freezing (52.3±5.42 vs 26.4±3.12 , $p1<0.05$; 47.5±4.7 vs 26.4±3.12 , $p2<0.05$). The group which was frozen with antioxidants was presented with lower DNA damage compared to the group which was frozen without the antioxidants; however, the difference between these groups was not found to be statistically significant (47.5±4.7 vs 52.3±5.42 , $p>0.05$).

Our results suggest that addition of antioxidant to the freezing medium may have a beneficial effect on the further DNA damage following freezing process. However; studies with larger number of patients seem to be needed to determine whether antioxidants create a significant and positive contribution to the survival and DNA integrity of sperm samples.

Key words: halosperm, DNA fragmentation, antioxidants, sperm freezing, motility.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI…….....iii
TEŞEKKÜR…….…iv
ÖZET…….....v
ABSTRACT……..……..vi
İÇİNDEKİLER……...vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ…….. .ix
ŞEKİLLER DİZİNİ……..……...….x
TABLOLAR DİZİNİ…….....xi
GRAFİKLER DİZİNİ…….xii
1.GİRİŞ…….....1
1.1. ARAŞTIRMANIN ÖNEMİ……..….1
1.2. ARAŞTIRMANIN AMACI…….….2
2. GENEL BİLGİLER…….…….....3
2.1. SEMEN ANALİZİ…….…….....3
2.1.1. WHO Normal Spermiyogram Kriterleri....……...…….....4
2.1.2. Sperm Morfoloji Değerlendirmesi …….…….....4
2.2. SPERM KRİYOPREZERVASYONU……..……..……5
2.2.1. Sperm Kriyoprezervasyonu Hangi Durumlarda Uygulanabilir?…....…….....6
2.2.2. Sperm Kriyoprezervasyon Talimatı.....…...……...6
2.2.3. Sperm Dondurmada Olası Hasarlar ……...…….……...…6
3. MATERYAL VE METOD…….…….....8
3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER…….……..…8
3.2. HASTALAR VE UYGULANAN İŞLEMLER……...9
3.2.1. Hasta Grubu……..…..9
3.2.2. Spermiyogram.……..10
3.2.2.1. Örnek Toplanması……..…10
3.2.2.2. Semen Analizi……..…..11
3.2.2.3. Diff-Quick Boyama…….…..11
3.2.3. Halosperm Yöntemiyle DNA Fragmantasyonu Tayini…….....11
3.2.3.1. Halosperm Kit İçeriği……...12

3.2.3.2. Halosperm Tekniği……..……12
3.2.4. Sperm Dondurma…….15
3.2.. Sperm Çözdürme…….....…16
3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ…….…….....17
4. BULGULAR…….…….....17
5. TARTIŞMA…….…….....20
6. SONUÇ VE ÖNERİLER…….……..22
KAYNAKLAR…….....22

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

IUI: İntra Uterin İnseminasyon

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

ICSI: İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

WHO: World Health Organization

SPSS : Statistical Package for theSocial Sciences

HEPES: 4-(2- hydroxyethyl)-1 piperazineethane sulfonic acid

ml: Mililitre

pH: Power of Hydrogen

µmol: Mikromol

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

dk: Dakika

cm: Santimetre

sn: Saniye

°C: Santigrad derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal spermin görüntüsü ve boyutları

Şekil 3.1. Halosperm yöntemiyle sperm DNA fragmantasyonu sınıflandırması

Şekil 3.2. Çalışmaya katılan 20 numaralı hastanın antioksidan takviyesiz örneğinin çözdürme sonrası halosperm yöntemiyle DNA fragmantasyon analizi (a.büyük halo b.orta büyüklükte halo c.küçük halo)

Şekil 3.3. Çalışmaya katılan 20 numaralı hastanın antioksidan takviyeli örneğinin çözdürme sonrası halosperm yöntemiyle DNA fragmantasyon analizi (a.büyük halo b.orta büyüklükte halo c.küçük halo d.halosuz sperm)

Şekil 3.4. Çalışmaya katılan bir hastanın büyük halo oluşturan spermlerinin 100X büyütmede görüntüsü

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. WHO semen analizi için en düşük referans değerler

Tablo 3.1. Çalışmaya katılan 40 hastanın demografik özellikleri

Tablo 3.2. Dondurma öncesi-çözdürme sonrası örneklerin total motilite ve DNA fragmantasyonu açısından karşılaştırılması

Tablo 3.3. Çözdürme sonrası kontrol ve deney grubu sperm örneklerinin motilite ve DNA fragmantasyonu açısından karşılaştırılması

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 3.1. Dondurma öncesi ve çözdürme sonrası örneklerinde total motilite(%) karşılaştırması

Grafik 3.2. Dondurma öncesi ve çözdürme sonrası örneklerinde DNA fragmantasyon oranı(%) karşılaştırması

1.GİRİŞ

1.1. ARAŞTIRMANIN ÖNEMİ

Sperm dondurma, spermlerin -80 ile -196 derece arasında gerektiğinde tekrar kullanılmak üzere saklanmasıdır (1). İlk kez, 1940'lı yıllarda veterinerler tarafından geliştirilmiştir (2). Kriyoprezervasyon işleminde spermler kriyoprotektan kullanılarak dondurulup, -196 ºC sıvı azot içinde yıllarca saklanabilir. Bu aşamada, oluşan buz kristallerinin en aza indirgenmesi ve dolayısı ile hücre sağkalımının arttırılması için hücre zarındaki su oranının azaltılmak amacıyla suyun yerini alan kriyoprotektanlar olarak adlandırılan maddeler kullanılmaktadır. Gliserol, dimetilsülfoksit ve pentoksifilin gibi maddelerden oluşan bu ajanlar, suyun yerini alırken donma noktasını düşürmekte, hücrenin çözünen ve tuz oranını azaltmakta, hücreyi yüksek osmolariteden korumakta, kontrollü dehidratasyon sağlamakta ve bu özelliklere bağlı olarak hücreyi korumaktadır (3-5).

İnsan spermi ise ilk kez 1950 yılında dondurulmuştur ve 1954 yılında da ilk canlı doğumun gerçekleştirildiği görülmüştür (2). Takip eden dönemlerde, 1962 yılında Sherman ve arkadaşları nitrojen buharı kullanarak spermleri dondurmuş ve saklamış, bundan on yıl sonra da bu dondurulmuş spermlerden gebelik ve canlı doğum elde etmişlerdir (6). Böylece, dondurma işlemi, yardımcı üreme tedavilerinde daha sık kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Çözdürme işlemi sonrası spermler IUI(İntra Uterin İnseminasyon), IVF(İn Vitro Fertilizasyon) ya da ICSI(İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu) işlemi için kullanılabilmektedir.

Bazı kanserlere bağlı radyoterapi ve kemoterapi sonrası veya invaziv cerrahi sonucu ejakulatuar fonksiyon bozukluğu ile testiküler yetmezlik oluşabilir. Bu gibi durumlar sonrasında çiftlere çocuk sahibi olma konusunda yardımcı olduğu ispatlanmış olan tek metod semen kriyoprezervasyonudur (7). Kanser hastalıkları için kullanılan kemoterapi ve radyoterapi tedavileri genç erkeklerin yaşam sürelerini uzatmasına karşın, infertiliteye neden olabilmektedir. Tedavi için kullanılan kemoterapi ve radyoterapi spermatogenezi negatif olarak etkilemektedir. Sperm dondurma, kanser hastalarında fertilite potansiyelinin korunması için hala altın

standarttır. (8). Kanser cerrahisi veya tedavisi öncesinde erkeklerden sperm örnekleri alınıp saklanabilir. Örneklerin kemoterapi ve radyoterapi öncesinde alınması, tedavi sırasında oluşabilecek DNA(Deoksiribo Nükleik Asit) hasarlarını minimalize etmek açısından önem taşır (9).

İnfertil bireylerin sperm örneklerinin fertil bireylere oranla daha yüksek düzeyde DNA fragmantasyonu içerdiği bilinmektedir (10). Değişik DNA fragmantasyon tayin yöntemleri ile farklı klinik eşik değerler elde edilmiş olsa da genel sonuç fertil bireyler ya da donör spermlerle karşılaştırıldığında, infertil erkeklerin örneklerinde DNA hasar oranının anlamlı derecede yüksek olduğu yönündedir (10-14).

Literatürde moleküler ve genetik düzeyde ortaya çıkan değişiklikleri belirlemek amacıyla sperm kriyoprezervasyonundan sonra apoptoz bulguları da araştırılmış fakat bu konuda tam bir fikir birliği oluşamamıştır. Apoptoz bulgularından en önemlisi olan DNA hasarı, bazı araştırmacılar tarafından kriyoprezervasyon sonrasında anlamlı derecede artmış olarak bildirilirken bazı araştırmacılar farklı görüşler bildirmişlerdir. Donelly ve arkadaşlarının taze semen ile hazırlanmış sperm örneklerinde DNA bütünlüğünü dondurma öncesi ve sonrasında araştırmış ve seminal plazma içindeki spermin yani semenin direk dondurulmasının çözme sonrası DNA bütünlüğüne daha az zarar verdiğini göstermişlerdir. Bunun nedeni olarak da semende bulunan antioksidanları ileri sürmüşlerdir (15).

1.2. ARAŞTIRMANIN AMACI

Araştırmanın amacı, fertiliteyi korumada bu denli önemli olan bir işlemin daha verimli sonuçlanmasını sağlamak için çalışmak, bu amaçla antioksidanlardan oluşan bir takviye kullanmaktır. Sperm dondurma medyumuna eklenen askorbik asit, glutatyon ve taurinden oluşan bu antioksidan kompleksinin ciddi bir seviyede pozitif etkisi olursa, sperm dondurma-çözme işlemi daha az tahribatla sonuçlanabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SEMEN ANALİZİ

Üreme çağındaki çiftlerin %15'inde infertilite sorunu olduğu gösterilmektedir. İnfertil çiftlerin %30'unda infertiliteye neden olan erkek faktörü saptanmış ve %20'sinde de erkek ve kadına ait faktörlerin birlikte olduğu bildirilmiştir (16-18).

Erkek infertilitesinin belirlenebilmesi için semen analizinin rutin olarak yapılması ilk olarak 1902 de Edward Martin tarafından önerilmiştir. 1956'da MacLeod, sperm sayısı yanında sperm hareketliliği ve morfolojisinin de önemini vurgulamıştır. 1980 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise semen analizi için çıkardığı kılavuzda konu ile ilgili ilk standart tetkik kriterlerini belirtmiştir (19). Şu anda kullanılan kriterler ise 2010 yılında revize edilmiş olanlardır.

Semen analizi ejakülasyon sırasında penisten gelen sıvı ve içeriğinin miktar ve kalite yönünden değerlendirilmesi işlemidir. Semen, spermleri ve çeşitli salgı bezlerinden salınan sıvıları içeren vizköz, beyazımsı bir sıvıdır. Hemen ejakülasyondan sonra yoğun, sonraki 10-60 dakika içinde ise sıvılaşarak akışkan hale gelen bir sıvıdır, bu duruma likefaksiyon denir. Spermler semende bulunan başı ve kuyruğu olan hareket eden üreme hücreleridir.

Semen örneği mastürbasyon sırasında steril idrar kabına toplanır. Kişinin adı ya da numarası, örneğin alındığı tarih ve saat kabın üzerine yazılmalıdır. Kişiye semen toplanması ile ilgili olarak yazılı ve sözlü bilgiler verilmelidir. Kişinin ismi, doğum tarihi, cinsel perhiz gün sayısı, örneğin alındığı tarih ve zaman, örnek toplama işleminin tamamlanan kısmı, örnek vermedeki zorluklar, alınma ve analiz arasında geçen süre raporuna kaydedilmelidir. Likefiye olurken 20°C ile 37°C arasında bekletilmelidir. Likefiye olan semen örneği makroskopik, mikroskopik ve kimyasal olarak analiz edilir. Makroskopik analizde görünüm, viskozite, likefaksiyon zamanı, renk ve volüm değerlendirilir. Mikroskopik analizde sperm aglütinasyonu,

konsantrasyonu, motilite ve sperm olmayan hücreler değerlendirilir. Kimyasal analizde PH (*Power of Hydrogen*) ölçümü yapılır.

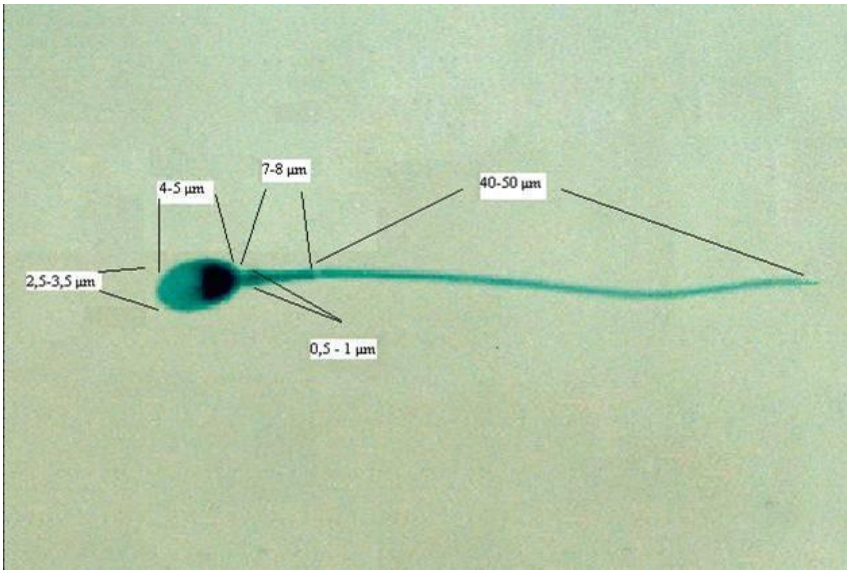
2.1.1. WHO Normal Spermiyogram Kriterleri

Tablo 2.1. WHO semen analizi için en düşük referans değerler

Parametreler	**En Düşük Referans Değer**
Semen volümü (ml)	1.5 (1.4-1.7)
Total sperm sayısı (106)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (106/ml)	15 (12-16)
Total motilite (PR+NP,%)	40 (38-42)
Progressive motilite (PR,%)	32 (31-34)
Vitalite (canlı sperm,%)	58 (55-63)
Sperm morfolojisi (normal formlar,%)	4 (3.0-4.0)
PH	>7.2
Peroksidaz – pozitif lökosit (106 per ml)	<1.0
MAR testi (%)	<50
Immunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	>2.4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	>13
Seminal nötral glukozidas (mU/ejakülat)	>20

2.1.2. Sperm Morfoloji Değerlendirmesi

- Normal sperm için baş oval ve düzgün olmalı, akrozom başın %40-70'ini kapsamalıdır.
- Boyun,*mid-piece* ve kuyrukta anomali olmamalıdır.
- Sitoplazmik *droplet* baş boyutunun yarısından fazla olmamalıdır.



Şekil 2.1. Normal spermin görüntüsü ve boyutları

Normal morfolojiye sahip olmayan spermler, defektin bulunduğu kısma bağlı olarak, baş anomalisi, orta parça anomalisi ve kuyruk anomalisi şeklinde gruplandırılır.

2.2. SPERM KRİYOPREZERVASYONU

Kriyoprezervasyon; hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısılara kadar soğutularak, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve gelecekte kullanılması amacıyla saklanmasını ifade eder. Kriyoprezervasyon işleminde spermler kriyoprotektan kullanılarak dondurulup, -196 ºC sıvı azot içinde yıllarca saklanabilir.

İnsan sperm hücrelerinin kriyoprezervasyon esaslarını belirleyen termodinamik kurallar diğer hücrelerin kriyoprezervasyonuna benzer (20-27). Sperm kriyoprezervasyon uygulaması dört temel adımdan oluşur. Bunlar; ısı azalması, hücresel dehidrasyon, dondurma ve çözdürme.

2.2.1. Sperm Kriyoprezervasyonu Hangi Durumlarda Uygulanabilir?

30 Eylül 2014 tarihinde yürürlüğe giren yeni Tüp Bebek Yönetmeliği'ne göre,

1. Kemoterapi ve radyoterapi gibi sperm hücrelerine zarar verebilecek tedaviler öncesinde,
2. Üreme fonksiyonlarının kaybedilmesine yol açacak olan ameliyatlar (testislerin alınması ve benzeri) öncesinde,
3. Cerrahi yöntemlerle sperm elde edilmesi durumunda,
4. Ağır sperm sayı düşüklüğü varlığı (daha ileride hiç sperm bulunamaması riskini önlemek için) durumunda sperm dondurma planlanabilir.

Yine aynı yönetmeliğe göre üreme hücreleri ve gonad dokuları, bu materyallerin güvenliği açısından verici adaya ait DNA analizi ile birlikte saklanır.

2.2.2. Sperm Kriyoprezervasyon Talimatı

Yıkanıp hazırlanan sperm, steril viallere alınarak üzerine kullanılması planlanan kriyoprotektan 2 dakika süreyle 1/1 oranında çok yavaş damlatılmak ve tüp her damlada sürekli çalkalanmak suretiyle karıştırılır, sonrasında kapağı sıkı bir şekilde kapatılır. Vialler nitrojen buharında bekletilmek üzere köpük kutuya alınır. Bu kutuya 8cm'ye kadar nitrojen doldurulur. Nitrojen seviyesinden 5 cm yukarıya yerleştirilmiş çubuklar üzerine sperm dondurma vialleri yerleştirilir.Kapağı kapatılarak tüm vialler nitrojen buharında ortalama 10 dakika bekletilir. Bu sürenin sonunda tüm vialler sıvı nitrojene daldırılır.

2.2.3. Sperm Dondurmada Olası Hasarlar

Kriyoprezervasyon sırasında oluşan fiziksel ve kimyasal stres; spermlerin membran lipid yapısını, sperm hareketliliğini, canlılığını ve akrozom durumunu olumsuz etkiler. Tüm bu değişimlerin sonucunda spermin fertilizasyon kabiliyeti azalır. Dondurma ve çözme sırasında termal şok, hücre içi buz kristalleri oluşumu, hücresel dehidrasyon oluşumu, tuzların yoğunluğunda artış, oksidatif stres ve

ozmotik şok gibi birçok hasar oluşabilir (28). Kriyoprezervasyon işleminde öncelikli hedef spermleri dondurma ve çözmenin zararlı etkilerinden korumaktır.

Motilite açısından incelersek, sperm dondurma işlemine bağlı olarak sperm canlılığının ve motilitesinin %31-50'ye yakın oranlarda azaldığı bilinmektedir. Bununla ilişkili olarak, sperm sayısının 10 milyon/cc ve üzerinde olduğu 56 olgunun incelenmesi sonucu motilitenin %66 azaldığı ve *Kruger* morfolojinin motilite azalması ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (29). Bonetti ve arkadaşları hem kanser hastaları hem de sağlıklı hastalar için çözünme işlemi sonrası spermlerdeki ortalama viabilite oranının %30'dan düşük olduğunu bildirmişlerdir (30). Çözünme sonrası sperm parametreleri ile dondurulup saklandığı süre arasında ise tam bir ilişki gösterilememiştir (31). Spermin saklandığı süreden ziyade dondurma ve çözme işlemlerinin sperm kalitesindeki azalmayla ilişkili olduğunu düşünenler vardır (32).

Kriyoprezervasyonda DNA hasarı oluşup oluşmadığı veya bu hasarın miktarı konusunda araştırmacılar henüz kesin bir fikir birliğine varamamıştır. Di Santo ve arkadaşlarının (33) dediğine göre kriyoprezervasyonun DNA hasarı üzerine etkisini araştıran çalışmalar sonuçlarına göre üç farklı gruba ayrılmaktadır. Çalışmaların büyük bir kısmı kriyoprezervasyonun DNA hasarına neden olduğunu savunurken (34,35), bir kısmı ise bu sonuçların eşlik eden faktörlerle bağlantılı olduğunu göstermiştir (36,37). Diğer bir grup ise kriyoprezervasyonun DNA hasarına neden olmadığını öne sürmektedir (38,39). Bununla birlikte, DNA hasarının kriyoprezervasyon tekniği ile değil taze örnekteki DNA fragmantasyon oranı ile ilişkili olduğunu gösteren sonuçlar da bulunmaktadır (40). Bütün bu sonuçlardaki farklılığının sebebi; çalışmalardaki örnek sayılarının farklılığı, dondurma öncesinde kullanılan sperm hazırlama tekniklerinin farklılığı, dondurma ve çözme prosedürlerinin farklılığı, DNA fragmantasyon analizinde kullanılan yöntemin farklılığı olabilir.

Birçok çalışma kriyoprezervasyonun genetik bir sonucu olmadığını göstermektedir. Bazı çalışmalar, kriyoprezervasyon ile defektli spermlerin ortadan kaldırıldığını iddia eder. Birçok araştırmacı, kriyoprezervasyondan önce ve sonra kromozomal anomalileri arasında belirgin fark olmadığını bildirmektedir. Genel

olarak literatürde, kriyoprezervasyona bağlı doğrudan zarar verici genetik sonuçların olduğuna dair kuvvetli bulgu bulunmamaktadır (41-47).

Bazı araştırmaları incelersek; infertil 25 erkeğin incelendiği bir çalışmada, sperm dondurma işleminin sperm kromatin hasarı oluşturduğu belirtilmektedir (48). Yine çalışmalarda, sperm DNA hasarının oksidatif stres olarak adlandırılan süreçle ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Dondurma ve çözme işlemleri sırasında oluşan reaktif oksijen radikalleri, plazma membranının lipid yapısını bozarak motilitede azalmaya neden olabilmektedir (48-52). Spermler çeşitli endikasyonlara bağlı olarak dondurulup saklansa da, daha sonraki dönemlerde farklı nedenlere bağlı olarak bu spermlerin kullanım oranları %3.7-14.8 arasında değişmektedir (53-56).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE ÇÖZELTİLER

ÜRÜN	**MARKA**	**KATALOG NO**
SPERM WASH	GYNEMED	4 GM 501AIR+PR+G-50
GRADIENT SOLUTION	GYNOTEC-SpermFilter	SPF-0100
SPERM FREEZING MEDIUM	IRVINESCIENTIFIC	90128
DIFF-QUICK STAİN	POLYSCİENCE	24606
OİL	VİTROLİFE	10029
ASKORBİK ASİT	MERCK	1831
GLUTATYON	MERCK	3541
TAURİN	MERCK	808616
HALOSPERM KİT	HALOTECH	HT-HS10
ETANOL	SİGMA	611670

3.2. HASTALAR VE UYGULANAN İŞLEMLER

3.2.1. Hasta Grubu

Kliniğimize spermiyogram testi için başvuran, semen parametreleri World Health Organization (WHO, Dünya Sağlık Örgütü) 2010 kriterlerine göre (WHO 2010 kriterleri Tablo 1'de verilmiştir) normospermi sınıfına giren ve çalışmaya katılmayı kabul eden 40 erkek hasta çalışmaya alınmıştır. Seçilen bireyler, aktif üreme döneminde (20-40 yaş arasında) olup, sigara kullanmayan , herhangi sistemik bir hastalık, çocuk yaşta ateşli hastalık, testis travması, varikosel gibi üreme fonksiyonelliğini etkileyen bir hastalık geçirmemişlerdir. Hastaların taze semen örneklerinde semen analizi, motilite tayini ve DNA fragmantasyonu analizi yapılmıştır. Kalan ejakülat örnekleri gradient yöntemiyle hazırlanarak dondurulmak üzere 2 parçaya ayrılmıştır. Antioksidan eklenmeden dondurulan spermler kontrol grubunu, antioksidan eklenerek dondurulan kısım da deney grubunu oluşturmuştur. Sperm örnekleri gruplar arasında dondurma-çözme sonrası motilite ve DNA fragmantasyonu açısından karşılaştırılmıştır. Her 2 grup dondurma öncesi değerler ile de karşılaştırılmıştır.

Çalışmaya katılan tüm hastaların demografik özellikleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmaya katılan 40 hastanın demografik özellikleri

Demografik Özellikler	**Ortalama**
Hasta Yaşı (yıl)	**34,25 (20-40)**
Semen Volümü(ml)	**2,1 (1,6-4,1)**
Sperm Konsantrasyonu(milyon/ml)	**62 (25-120)**
Sperm Total Motilitesi(%)	**65,5 (52-84)**
Vücut kitle indeksi (kg/m2)	**28 (25-34)**

3.2.2. Spermiyogram

Üreme çağındaki çiftlerin bir sene boyunca düzenli cinsel ilişki sonrasında ancak %85'inde gebelik oluşması; çiftlerin %15'inde infertilite sorunu olduğunu göstermektedir. İnfertil çiftlerin %30'unda infertiliteye neden olan erkek faktörü saptanmış ve %20'sinde de erkek ve kadına ait faktörlerin birlikte olduğu bildirilmiştir (57-60).

Erkek infertilitesinin belirlenebilmesi için semen analizinin rutin olarak yapılması ilk olarak 1902 de Edward Martin tarafından önerilmiş ve 1956'da MacLeod, sperm sayısı yanında sperm hareketliliği ve morfolojisinin de önemine dikkat çekmiştir. 1980 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ise semen analizi için çıkardığı kılavuzda konu ile ilgili ilk standart tetkik kriterlerini belirtmiştir (28). Bu klavuz 2010 yılında revize edilmiş olup halen yürürlüktedir.

3.2.2.1. Örnek Toplanması

Örnek toplanmasında dikkat edilmesi gereken durumlar şunlardır:

- Örnek 2-7 günlük cinsel perhizden sonra alınmalıdır.
- Semenin ortam sıcaklığındaki değişikliklere maruziyetini kısıtlamak, örneğin alınmasıyla analizi arasındaki zamanı kontrol etmek amacıyla örneğin laboratuvarın yakınındaki özel bir odada verilmesi gerekir.
- Hastaya, örneğin alınması ile ilgili anlaşılır yazılı sözlü bilgilendirme yapılmalıdır.
- Hasta formuna şu bilgiler kaydedilmelidir: adı soyadı, doğum tarihi, cinselperhiz süresi, örneğin alındığı tarih.
- Örnek mastubasyon ile elde edilmeli, semen için toksik olmayan bir kap içine alınmalıdır.
- Ejakülasyondan sonra spermi olumsuz etkileyebilen ısı değişikliklerinden kaçınılmak için, numune kabı 20 ºC ile 37 ºC arasındaki otam sıcaklığında tutulmalıdır.

3.2.2.2. Semen Analizi

2-7 günlük cinsel perhiz süresinin ardından mastürbasyon yoluyla steril örnek kabına alınan semen örneği, oda sıcaklığında 10-60 dakika likefiye olana kadar bekletilmiştir. Örneğin homojenize olmasına dikkat edilip, gerekirse karıştırılmıştır. 5'lik enjektör yardımıyla semen örneğinin hacmi belirlenmiştir. Likefiye olmuş semen örneğinden Makler Chamber üzerine 10 µl konularak 20X büyütmede ışık mikroskobunda sayı ve hareketliliği değerlendirilmiştir. Lama yayma yapılarak, *Diff-Quick* boyama ile morfoloji değerlendirilmiştir.

3.2.2.3.Diff-Quick Boyama

Sperm morfoloji değerlendirmesi için lamda yayma preparatı hazırlanmıştır. Preparat hazırlandıktan sonra havada kurutulmuştur. Yaygın olarak kullanılan *Diff-Quick* boyası 3 aşamadan oluşur. Kit içerisinde bulunan fiksatifte 10 dk, kırmızı ve mavi boyaların içinde birer dk bekletilmiştir. Sudan geçirildikten sonra tekrar havada kurutulmuştur. Kuruma sonrasında faz kontrast mikroskobunun 100X büyütmeli objektifinde sperm morfolojisi değerlendirilmiştir. Değerlendirme için en az 200 sperm skorlanmıştır.

3.2.3. Halosperm Yöntemiyle DNA Fragmantasyonu Analizi

Semen analizi yapıldıktan sonra normospermik kişilerin kalan ejakülat örneği çalışma için kullanıldı. DNA fragmantasyonunun değerlendirilmesi Halosperm kit kullanılarak yapıldı. Bu yöntem sperm kromatin dağılımı testine dayanmaktadır (61-62). %30'a eşit ve altında ise sperm DNA fragmantasyon oranı negatif, %30'un üzerinde ise pozitif olarak değerlendirildi.

Spermi lam üzerine fikse etmek için agaroz mikro jel ile karıştırıldı. Daha sonra denatürasyon solüsyonu ile muamele edilip bunu takiben lizis solüsyonu ile nüklear proteinlerin çoğu çıkarılmış oldu. Eğer sperm DNA fragmantasyonu yok ise veya minimal düzeyde ise sperm etrafında büyük halo oluşturur. Sperm DNA fragmantasyonu çok olan spermlerde halo yoktur ya da çok minimal seviyededir.

3.2.3.1. Halosperm Kit İçeriği

- 10 adet lam
- 10 adet düşük erime noktalı agaroz ependorf tüpü
- 1 tüp asit denatürasyon solüsyonu
- 1 şişe lizis solüsyonu

Her kit 10 test için yeterlidir.

Kit içerisinde yer almayan ancak gerekli olan diğer materyal ve ekipmanlar şunlardır: Mikroskop, buzdolabı (4°C), inkübasyon banyosu(90-100°C ve 37°C), mikropipet, lamel, plastik eldiven, mikrodalga, distile su, alkol(%100, %90, %70).

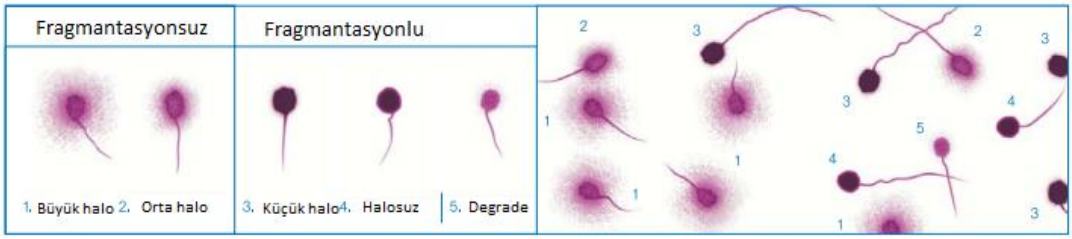
3.2.3.2. Halosperm Tekniği

Düşük erime noktalı agarozun ependorf tüpteki jelleşmiş sıvı kısmı 5 dk mikrodalgada bekletildi, sonra 37°C su banyosuna alındı. 5 dk inkübasyondan sonra semen örneğinin 25 µL'si ependorf tüpe eklendi ve agarozla karıştırıldı. Bu karışımın 25 µL'si lama damlatıldı ve 22x22 mm lamelle kapatıldı. Kesitler 4°C buzdolabında 5 dk bekletildi. Lamel lanset yardımıyla nazikçe kaldırıldı. Kesitler asit denatürasyon solüsyonunda (10 ml distile su ile 80 µL asit solüsyonu karıştırılarak hazırlanır.) yatay pozisyonda 7 dk bekletildi. Ardından kesitler 10 ml lizis solüsyonuna daldırıldı ve 25 dk bekletildi. Distile suyla yıkanarak lizis solüsyonundan arındırıldı. Daha sonra etanolün artan konsantrasyonlarında (%70, %90, %100) ikişer dk bekletilerek dehidrate edildi. Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra boyama yapılarak incelendi. Boyama için *Diff-Quick* kullanıldı. Eosin solüsyonunda(kırmızı renk) 6 dk ve Azur B solüsyonunda(mavi renk) 6 dk bekletildi. Daha sonra kesitler suyla yıkandı ve kurutuldu. Mikroskobun 100x objektifinde her örnekte en az 200 sperm skorlandı.

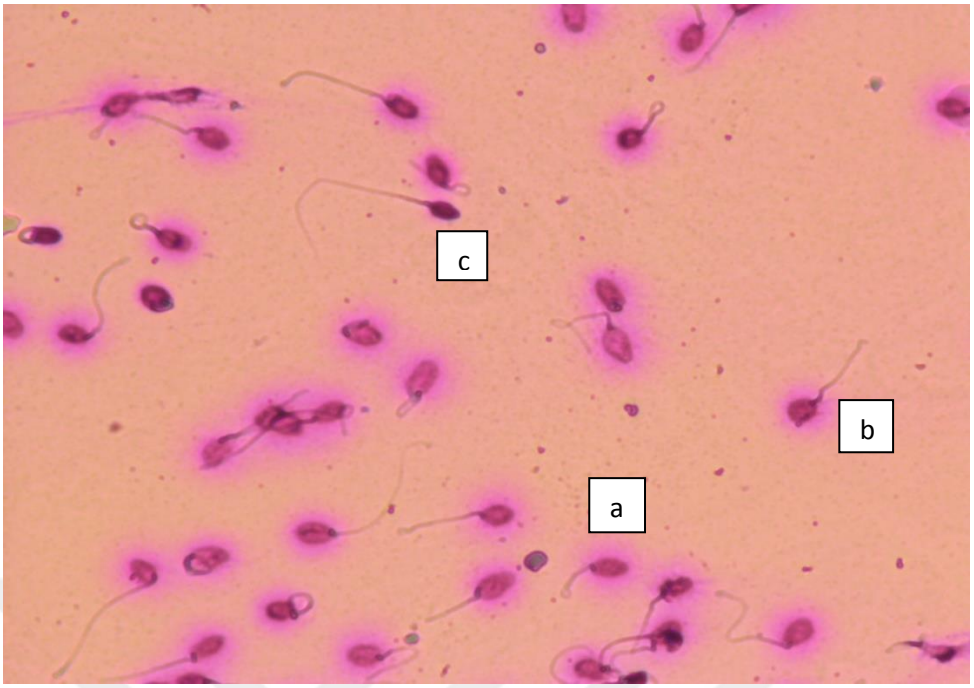
Spermlerin halo sınıflandırılması şu şekilde yapıldı:

- Büyük halolu spermatozoa: Halo çapı sperm çekirdeğinin çapı kadar yada daha fazla olan olan spermler (şekil 3.1). DNA fragmantasyonu olmayan spermler olarak değerlendirildiler.

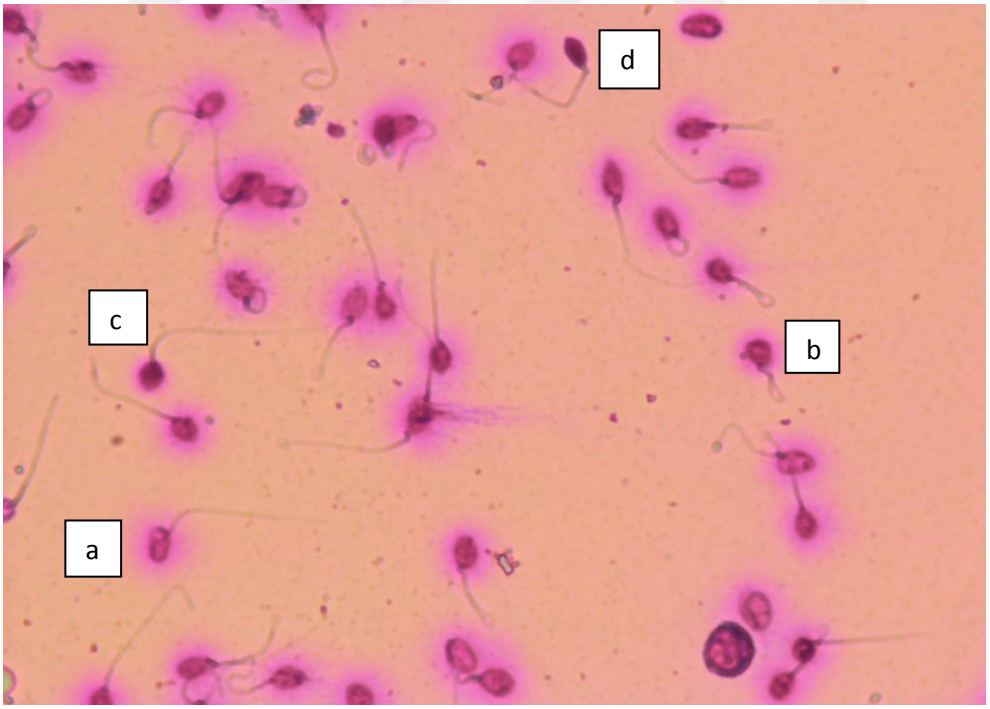
- Orta büyüklükte halolu spermatozoa: Halo hacimleri büyük halo ile küçük halonun ortasında kalan spermler (şekil 3.1). DNA fragmantasyonu olmayan spermler olarak değerlendirildiler.
- Küçük halolu spermatozoa: Halo çapı sperm çekirdeği çapına yakın veya küçük olan spermler (şekil 3.1). Fragmante DNA'ya sahip olarak değerlendirildiler.
- Halosuz spermatozoa: Hiç halo oluşturmayan spermler (şekil 3.1).
- Halosuz ve degrade (aşınmış) spermatozoa: Halosuz ve çekirdek düzensizliği olan ya da zayıf boyanan spermler (şekil 3.1). Fragmante DNA'ya sahip olarak değerlendirildiler.



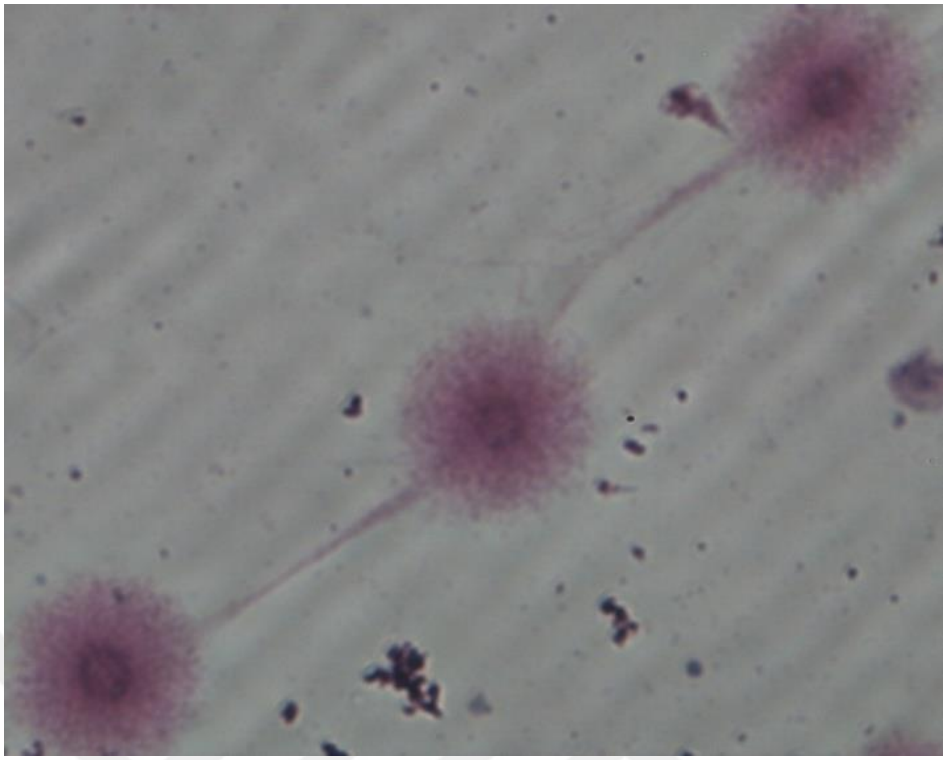
Şekil 3.1. Halosperm yöntemiyle sperm DNA fragmantasyonu sınıflandırması



Şekil 3.2. Çalışmaya katılan 20 numaralı hastanın antioksidan takviyesiz örneğinin çözdürme sonrası halosperm yöntemiyle DNA fragmantasyon analizi (a.büyük halo b.orta büyüklükte halo c.küçük halo)



Şekil 3.3. Çalışmaya katılan 20 numaralı hastanın antioksidan takviyeli örneğinin çözdürme sonrası halosperm yöntemiyle DNA fragmantasyon analizi (a.büyük halo b.orta büyüklükte halo c.küçük halo d.halosuz sperm)



Şekil 3.4. Çalışmaya katılan bir hastanın büyük halo oluşturan spermlerinin 100X büyütmede görüntüsü

3.2.4. Sperm Dondurma

Motilite ve DNA fragmantasyonu analizi yapıldıktan sonra, kalan ejakülat örneği gradient yöntemiyle dondurma işlemi için hazırlandı. 1'er ml %50'lik ve %90'lık gradient solüsyonu oda sıcaklığına getirildi. Falcon tüpte en alta %90'lık, üzerine %50'lik gradient solüsyonu konuldu. Likefiye olmuş semen örneği yavaşça bu solüsyonun üzerine bırakıldı. 1600 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pelletin üzerine 2 ml sperm yıkama solüsyonu eklenerek pipetaj yöntemiyle homojenize edildi. 1600 rpm'de 5 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Daha sonra toplam 1 ml olacak şekilde sperm washing solüsyonu eklendi ve vortekslendi. Bu örnek dondurma için 2 viale bölündü.

Çalışmada kullanılan dondurma işlemi şu şekilde uygulandı: Dondurulmuş örneklerin tanklarda saklanacakları adresler belirlenip tanka ait haritaya kaydedildi. Dondurulacak örneğin hacmine uygun sayıda vialler belirlendi ve viallerin üzerine hastaların bilgileri (hasta adı soyadı, eşinin adı, yaşları, dondurma tarihi) yazıldı. Hastaya ait sperm dondurma ve çözme formu doldurudu. Örneğin alınış biçimi ,

sperm sayı , hareketlilik , progresyon , canlılık değerleri , dondurma yöntemi , vial sayısı ve tanktaki adresleri forma kaydedildi. Her hasta için 2 vialde dondurma işlemi yapıldı. Viallerden biri deney grubunu, diğeri de kontrol grubunu oluşturdu. Viallerin üzerine tüm bilgiler yazıldı, antioksidan eklenen deney grubu vialinin üzerine takviye yapıldığı belirtildi, işaretlendi. Gradient yöntemiyle hazırlanmış olan 1 ml sperm süspansiyonu 0.5 ml olacak şekilde bu iki steril küçük viale alındı. Deney grubu için kullanılacak kriyomedyuma 5 µM antioksidan kompleksi eklendi. Kontrol grubu için katkısız kriyomedyum kullanıldı. Çalışmamızda gliserol esaslı bir kriyoprotektan olan Test Yolk Buffer kullanıldı. Dondurma esnasında buz kristallerinin oluşmasını engellemek amacıyla dondurma medyumu çok yavaş ve mekanik karıştırma uygulamak suretiyle eklendi. Deney ve kontrol grubu viallerine kriyoprotektan 2 dakika süreyle 1/1 oranında çok yavaş damlatılmak ve vialler her damlada sürekli çalkalanmak suretiyle karıştırıldı. Viallerin kapağı sıkı bir şekilde kapatıldı. Vialler nitrojen buharında bekletilmek üzere köpük kutuya alındı. Bu kutuya 8 cm'ye kadar nitrojen doldurulduu, nitrojen seviyesinden 5 cm yukarıya yerleştirilmiş çubuklar üzerine sperm dondurma vialleri yerleştirildi. Kapağı kapatılarak tüm vialler nitrojen buharında 10-20 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda tüm vialler sıvı nitrojene daldırıldı. Son olarak tüm vialler tankta daha önce belirlenmiş olan adreslere yerleştirildi.

3.2.5. Sperm Çözdürme

Hastaların sperm örnekleri dondurulduktan 1 ay sonra çözdürme işlemi yapıldı. Tanktan çıkarılan spermler 37 ºC deki sıcak su banyosunda bekletilerek çözdürüldü. Bu işlem yaklaşık 1 dk sürer. Çözdürdüğümüz karışım, önceden ısıttığımız 1 ml sperm yıkama medyumu ile karıştırılıp 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak spermler kriyomedyumundan uzaklaştırılmış oldu. Pellet 0,5 ml sperm yıkama medyumuyla yeniden homojenize edildi. Bu örneklerde yeniden motilite ve DNA fragmantasyonu analizi yapıldı. Antioksidanlı ve antioksidansız örnekler ayrı ayrı değerlendirilip veriler kayıt edildi.

3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS version 13.0 (Statistical Package of Social Sciences?*) kullanılarak yapıldı. Hastaların demografik özellikleri ortalama, standard sapma ve yüzde değerleri kullanılarak belirtildi. Gruplar arasındaki farkı belirlemek için nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanıldı. Uygulama öncesi ve sonrası farkları belirlemek için Paired Samples T-testi kullanıldı. $P< 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çözdürme sonrası kontrol ve deney gruplarının ikisinde de, dondurma öncesine oranla motilitede kayıp ve DNA fragmantasyonunda artış gözlendi. Sonuçlar yüzde(%) olarak Tablo 3.1'te verilmiştir.

Çözdürme sonrası deney grubu ve kontrol grubu, motilite ve DNA fragmantasyonu açısından karşılaştırıldığında; iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Sonuçlar yüzde(%) olarak Tablo 3.2'te verilmiştir.

Tablo 3.1. Dondurma öncesi-çözdürme sonrası örneklerin total motilite ve DNA fragmantasyonu açısından karşılaştırılması

	DONDURMA ÖNCESİ	**DONDURMA-ÇÖZDÜRME SONRASI**		**P1 DEĞERİ**	**P2 DEĞERİ**
	Tüm Hastalar (n=40)	**Kontrol Grubu (n=40)**	**Deney grubu (n=40)**		
Total Motilite (%)	**65.5 ±6.42**	**34.8 ±5.32**	**38.3± 6.22**	**0,002***	**0,003***
Sperm DNA Fragmantasyonu (%)	**26.4±3.12**	**52.3±5.42**	**47.5±4.7**	**0,002***	**0,003***

Sonuçlar ortalama±SS (standart sapma) olarak verilmiştir.

P1 değeri, dondurma öncesi değerlerle çözdürme sonrası kontrol grubu değerlerinin arasındaki farkın anlamlılık düzeyidir.

P2 değeri, dondurma öncesi değerlerle çözdürme sonrası deney grubu değerlerinin arasındaki farkın anlamlılık düzeyidir.

*****P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Sperm örnekleri, gruplar arasında dondurma öncesi ve çözdürme sonrası motilite açısından karşılaştırıldığında; dondurma-çözdürme sonrası her iki grupta da dondurma öncesine göre motilitenin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü (34.8 ±5.32 vs 65.5 ±6.42 , p1<0.05 ; 38.3± 6.22 vs 65.5 ±6.42 , p2<0.05).

Sperm örnekleri, gruplar arasında dondurma öncesi ve çözdürme sonrası DNA fragmantasyonu açısından karşılaştırıldığında; dondurma-çözdürme sonrası her iki grupta da dondurma öncesine göre DNA fragmantasyonunun istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü (52.3±5.42 vs 26.4±3.12 , p1<0.05 ; 47.5±4.7 vs 26.4±3.12 , p2<0.05).

Tablo 3.2. Çözdürme sonrası kontrol ve deney grubu sperm örneklerinin motilite ve DNA fragmantasyonu açısından karşılaştırılması

	Kontrol grubu	**Deney grubu**	**P değeri**
Total Motilite (%)	**34.8 ±5.32**	**38.3± 6.22**	**0,07**
Sperm DNA Fragmantasyonu (%)	**52.3±5.42**	**47.5±4.7**	**0,08**

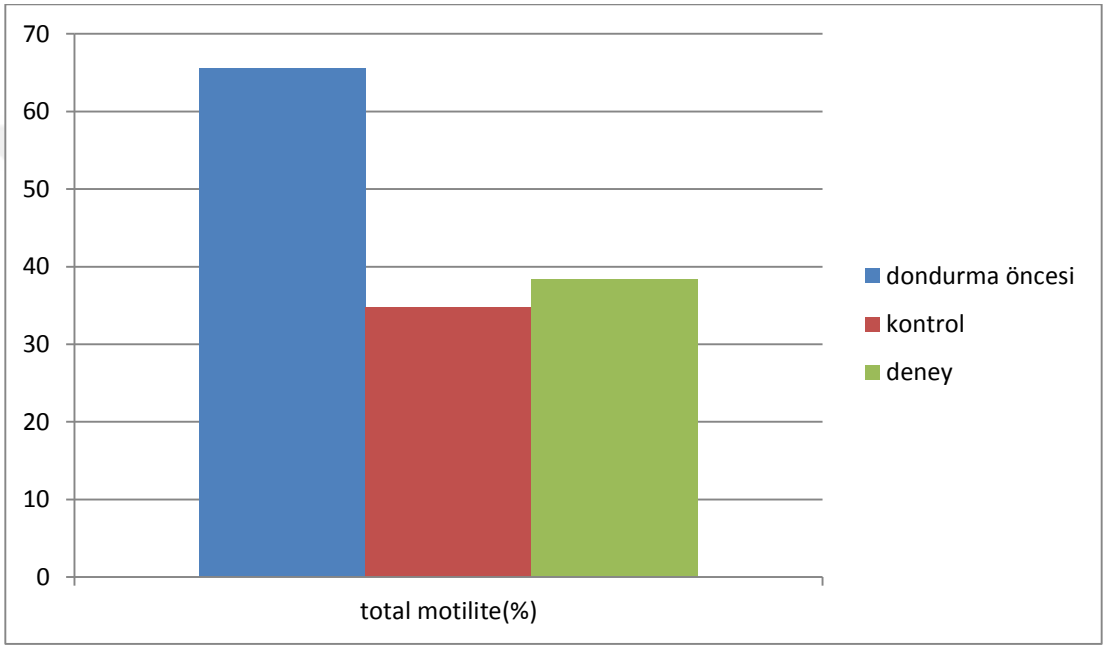
Sonuçlar ortalama±SS (standart sapma) olarak verilmiştir.

P değeri, çözdürme sonrası kontrol grubu ve deney grubu değerlerinin arasındaki farkın anlamlılık düzeyidir.

P<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

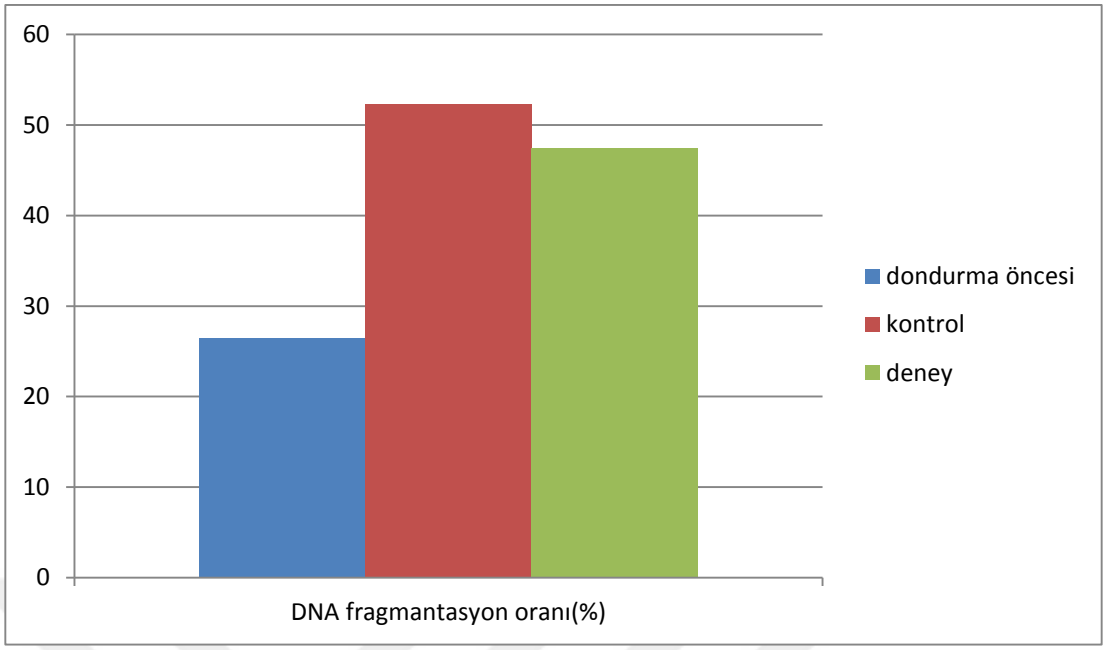
Çözdürme sonrası deney grubu ve kontrol grubu motilite açısından karşılaştırıldığında; her iki grup arasında motilite açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. (38.3± 6.22 vs 34.8 ±5.32 , p>0.05).

Çözdürme sonrası deney grubu ve kontrol grubu DNA fragmantasyonu açısından karşılaştırıldığında; her iki grup arasında DNA fragmantasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (47.5±4.7 vs 52.3±5.42 , p>0.05).



Grafik 3.1. Dondurma öncesi ve çözdürme sonrası örneklerinde total motilite(%) karşılaştırması

Total motiliteyi ele aldığımızda, kontrol grubunda total motilitede %31 kayıp görülmüştür. Deney grubunda ise %27 kayıp olmuştur. Deney grubu spermlerinde total motilitede %4 daha az kayıp olmasına rağmen, çözdürme sonrası kontrol ve deney grupları arasındaki bu fark anlamlı bulunmamıştır.



Grafik 3.2. Dondurma öncesi ve çözdürme sonrası örneklerinde DNA fragmantasyon oranı(%) karşılaştırması

DNA fragmantasyonunu ele aldığımızda, kontrol grubunda DNA fragmantasyonunda %26 artış görülmüştür. Deney grubunda ise %21 artış olmuştur. Fragmantasyon açısından deney grubu %5 daha az hasar görmesine rağmen, çözdürme sonrası kontrol ve deney grupları arasındaki bu fark anlamlı bulunmamıştr.

5. TARTIŞMA

Kriyoprezervasyon sırasında oluşan fiziksel ve kimyasal stres; spermlerin membran lipid yapısını, sperm hareketliliğini, canlılığını ve akrozom durumunu olumsuz etkiler. Tüm bu değişimlerin sonucunda spermin fertilizasyon kabiliyeti azalır. Dondurma ve çözme sırasında termal şok, hücre içi buz kristalleri oluşumu, hücresel dehidrasyon oluşumu, tuzların yoğunluğunda artış, oksidatif stres ve ozmotik şok gibi birçok hasar oluşabilir (28).

Sperm dondurma-çözdürme işlemleri, spermin motilitesini olumsuz etkiler(29). Sperm dondurma işlemine bağlı olarak sperm canlılığının ve motilitesinin %31-50'ye yakın oranlarda azaldığı bilinmektedir. Bununla ilişkili

olarak bir çalışmada motilitenin %66 azaldığı bildirilmiştir (29). Oksidatif strese bağlı olarak, antioksidanların dondurma medyumuna eklenerek, çözdürme sonrası motilitedeki kaybın azalması beklenmektedir. T. G. Jenkins ve arkadaşları, dondurma medyumuna askorbik asit-2-glukozit ekleyerek insan spermi dondurmuş ancak çözdürme sonrası motilite açısından anlamlı bir fark bulamamıştır, askorbik asit eklediklerinde motilitede %21 kayıp, eklemediklerinde %25 kayıp görmüşlerdir (63).

Çalışmamızda, normal prosedürle dondurulan spermlerde ortalama %31 oranında, antioksidanlı medyumla dondurulan spermlerde ise %27 oranında motilite kaybı görüldü. Sonuç olarak, antioksidan eklenen grupta %4 daha az hasar görülmesine karşın, T. G. Jenkins ve arkadaşları gibi bu çalışmada da anlamlı bir sonuç elde edilmedi.

Sperm dondurma ve çözdürme aşamalarında sperm DNA'sı da olumsuz olarak etkilenebilmektedir. İnfertil 25 erkeğin incelendiği bir çalışmada, sperm dondurma işleminin sperm kromatin hasarı oluşturduğu belirtilmektedir (48). Yine çalışmalarda, sperm DNA hasarının oksidatif stres olarak adlandırılan süreçle ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Reaktif oksijen türlerinin üretimi üzerinden oksidatif stres indüklenir, eninde sonunda hücre hasarı ile sonuçlanır (1,4,5). Seminal oksidatif stres ve total antioksidan kapasitesi, tüm sperm kalitesini etkiler (2,6,29). Semendeki oksidatif ajanlar ve çeşitli antioksidan türlerinin hassas dengesi normal sperm fonksiyonlarını koruması gerekir (58). Birçok çalışma, dondurma-çözme prosedürlerinde oksidatif stresin etkilerini ters etki gösterecek antioksidanların dondurma mediumuna eklenmesi ile sperm dondurmada iyileştirmeler üzerinedir (30-32). Sperm dondurma işleminin spermin motilitesi üzerine olumsuz etkilerini önlemek amacıyla bazı araştırmacılar kültür ortamına askorbik asit, E vitamini, katalaz gibi antioksidan maddelerin eklenmesini önermektedirler (59).

Guruprasad Kalthur ve arkadaşları da burdan yola çıkarak dondurma medyumuna antioksidan (E vitamini) ekleyerek ve eklemeyerek dondurmalar yapmış, çözdürme sonrası motilite ve DNA hasarlarını karşılaştırmıştır. Çözdürme sonucu, E vitamini takviyesi yapılan örneklerde sperm hareketliliği ve DNA bütünlüğü açısından önemli bir artış görmüştür. 38 normospermik erkekte taze semende % 28, normal dondurulan örneklerde çözme sonrası %44, dondurma

medyumuna antioksidan (E vitamini) ekleyerek yapılan dondurma-çözdürme sonrasında ise % 37 DNA hasarı izlemiştir (60).

Dondurma medyumuna askorbik asit, glutatyon ve taurinden oluşan bir kompleks eklediğimiz bu çalışmada ise Guruprasad Kalthur'un çalışmasına benzer sonuçlar gözlenmedi. Bu çalışmada, taze semende DNA fragmantasyonu açısından ortalama %26 hasar izlendi. Dondurma medyumuna antioksidan eklemediğimiz kontrol grubunda % 26 hasar artışı gözlenirken, antioksidan eklenen örneklerde %21 artış olmuştur. Dolayısıyla antioksidanlar çok az miktarda hasar oranını azaltsa da, % 5' lik bu fark anlamlı bulunmamıştır. Bu durum hasta sayısı, hastaların demografik özellikleri, toplumun karakteristik bazı özelliklerinden veya oluşturulan antioksidan kompleksinden kaynaklanıyor olabilir. Anlamlı ve daha net sonuçlar için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. Farklı antioksidanlar biraraya getirilebilir veya aynı antioksidanlar farklı oranlarda karıştırılarak yeni çalışmalar da yapılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dondurma-çözdürme işlemleri halen sperm hareketliliği ve kalitesinde düşüşe neden olmaktadır. Bunun için sperm dondurma protokollerinde iyileştirmeye yönelik çalışmalar yapılmalıdır. Dondurma esnasında antioksidan eklenmesinin az da olsa motilite ve kalite açısından pozitif katkıları olabileceği gösterilmiştir. Fakat bu katkının anlamlı olduğu sonucuna varmak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. Eur Urol. 2005;48:703-11.

2. Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen; report of four cases. Fertil Steril. 1954;5:520-9.

3. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. Reprod Fertil Dev. 2003;15:377-81.

4. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. Hum Reprod. 2005;20:1676-87.

5. Jezek D, Schulze W, Kalanj-Bognar S, Vukelić Z, Milavec-Puretić V, Krhen I. Effects of various cryopreservation media and freezingthawing on the morphology of rat testicular biopsies. Andrologia. 2001;33:368-78.

6. Perloff WH, Steinberger E, Sherman JK. Conception Wıth Human Spermatozoa Frozen By Nitrogen Vapor Technic. Fertil Steril. 1964;15:501-4.

7. M.D., Henda El Euch, M.D., Jalel Gargouri, M.D., Ali Bahloul, M.D., and Leila Ammar Keskes, M.D. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. Fertility and Sterility 93(1), 2010;159-166

8. Üroonkoloji Bülteni 2014;13:176-181

9. Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. J Clin Oncol 2006;24:2917-2931.

10. Sun, JG., Jurisicova, A., Casper, RF. Detection of Deoxyribonucleic Acid Fragmentation In Human Sperm: Correlation With Fertilization In Vitro. Biol Reprod. 1997, 56(3):602-607.

11. Simon, L., Proutski, I., Stevenson, M., Jennings, D., McManus, J., Lutton, D. et al. Sperm DNA Damage Has Negative Assosation With Live Birth Rates After IVF. Reprod Biomed Online. 2013, 26:68-78.

12. Simon, L., Lutton, D., McManus, J., Lewis, SE. (2011). Sperm DNA Damage Measured by Alkaline Comet Assay as an Independent Predictor of Male Infertility and In Vitro Fertilization Success. Fertil Steril 2011;95:665-657.

13. Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., Gil-Salom, M., Remohí, J., Fernandez, JL. Sperm DNA Fragmentation Levels in Testicular Sperm Samples From Azoospermic Males as Assessed by The Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test. Fertil Steril. 2009, 92:1638-1645.

14. Bianchi, PG., Manicardi, GC., Bizzaro, D., Bianchi, U., Sakkas, D. Effect of Deoxyribonucleic Acid Protamination On Fluorochome Staining and In Situ Nick-tanslation of Murine and Human Mature Spermatozoa. Biol Reprod. 1993, 49(5):1083-1088.

15. Donelly E. T., McClure N., Lewis SE. Criyoprezervation of Human Semen and Prepared Sperm: Effects on Metility Parameters and DNA Integrity. Fertility And Sterility. 2001, 76(5), 892-900.

16. Mac Leod, J. Human Male Infertility. Obstet Gynecol Surv. 1971, 25:315.

17. Mosher, WE. Reproductive Impairments in the United States. 1965-1982, Demograohy. 1985, 22:415.

18. Simmons, FA. Human Infertility. N Eng J Med. 1956, 225:1440.

19. World Health Organization. WHO Laboratory Manual Fort he Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press. Fourth Edition. 1999

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

21. Mazur, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likehood of intracellular freezing. J Gen Physiol. 1963; 47:347-69.

22. Mazur, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol. 1984; 247:C125-42.

23. Wolfinbarger, L., Sutherlan, V., Braendle, L, Sutherlan G. Engineering aspects of cryobiology. Adv Cryogenic Eng. 1996; 41:1-12.

24. Gao, DY., Mazur, P., Crister, JK. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow A, Crister JK, eds. Reproductive Tissue Banking. San Diego, CA: Academic Press; 1997; pp. 263-328.

25. Leibo, SP., Bradley, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon C, ed. The Male Gamete. Vienna II: Cache River Press; 1999; pp. 501-16.

26. Kaminski, J., Centola, G., Lamb, DJ. Sperm cryoprezervation. Androl Embryol Rev Course. 2003; 13.1-13.8.55.

27. Sophonsritsuk, A., Rojanasakuln, A. Cryoprezervasyon of human spermatozoa. Ramathibodi Med J. 2003; 126:156-62.

28. J.C. Martínez-Soto et al, Assessment of two thawing processes of cryopreserved human sperm in pellets. Cryobiology Model. 2011, 1-6.

29. Lee CY, Lee CT, Wu CH, Hsu CS, Hsu MI. Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa. Andrologia. 2012;44 Suppl 1:81-6.

30. Bonetti TC, Pasqualotto FF, Queiroz P, Iaconelli A, Borges E. Sperm banking for male cancer patients: social and semen profiles. Int Braz J Urol. 2009;35:190-7.

31. Cayan S, Lee D, Conaghan J, Givens CA, Ryan IP, Schriock ED, Turek PJ. A comparison of ICSI outcomes with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples. Hum Reprod. 2001;16:495-9.

32. Rossato M, Zorzi M, Ferlin A, Garolla A, Foresta C. Effects of cryopreservation on progesterone-induced ion fluxes and acrosome reaction in human spermatozoa. Hum Reprod. 2000;15:1739-43.

33. 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, 854837.

34. Spanò, M., Cordelli, E., Leter, G., Lombardo, F., Lenzi, A., Gandini, L. Nuclear Chromatin Variations In Human Spermatozoa Undergoing Swim-up and Cryopreservation Evaluated By The Flow Cytometric Sperm Chromatin Structure Assay. Molecular Human Reprod. 1999, 5(1):29–37.

35. 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.

36. Kalthur, G., Adiga, SK., Upadhya, D., Rao, S., Kumar, P. Effect Of Cryopreservation On Sperm DNA Integrity In Patients With Teratosperm. Fertil Steril. 2008, 89(6): 1723-1727.

37. Donnelly, ET., McClure, N., Lewis, SE. Cryopreservation Of Human Semen and Prepared Sperm: Effects On Motility Parameters and DNA Integrity. Fertil Steril. 2001, 76(5):892–900.

38. Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, II., Rahimi, G., Schöndorf, T., Mallmann, P. et al. DNA Integrity and Motility Of Human Spermatozoa After Standard Slow Freezing Versus Cryoprotectant-free Vitrification. Human Reprod. 2004; 19(4):932–

39. Paasch, U., Sharma, RK., Gupta, AK., Grunewald, S., Mascha, EJ,, Thomas, AJ. et al. Cryopreservation and Thawing Is Associated With Varying Extent Of Activation Of Apoptotic Machinery In Subsets Of Ejaculated Human Spermatozoa. Biology of Reprod. 2004; 71(6):1828–1837.

40. Thomson, LK., Fleming, SD., Schulke, L., Barone, K., Zieschang, JA., Clark, AM. The DNA Integrity Of Cryopreserved Spermatozoa Separated For Use In Assisted Reproductive Technology Is Unaffected By The Type Of Cryoprotectant Used But Is Related To The DNA Integrity Of The Fresh Separated Preperation. Fertil Steril. 2009; 92(3):991-1001.

41. Davis, NS. The hows, whys and when of sperm cryopreservation . In: ASRM 30th Postgraduate Program Course on Andrologic Practices. 1997; 83-9.

42. Leibo, SP., Picton, HM., Gosten, RG. Cropreservation of human spermatozoa. In: Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction: A WHO Sponsored Symposium, Switzerland, September 17-21, 2001.

43. Mattei, JF., Lemarec, B. Genetic Aspects of Artificial Insemination by Donor (AID): Indications, Surveilance and Results. Clin Genet. 1983; 23:132-8.

44. Chernos, J., Martin, H. Acytogenetic Investigation of the Effects of Cryopreservation on Human Sperm. Am J Hum Genet. 1989; 45: 766-77.

45. Martin, RH, et al. Effect of Cryopreservation on the Frequency of Chromosomal Abnormalities and Sex Ratio in Human Sperm. Mol Reprod Dev. 1991; 30:159-63.

46. Rizk, B., Edwards, RG., Nicolini, U., et al. Edwards Syndrome after The Replacement of Cryopreserved Thawed Embryos. Fertil Steril. 1991; 55(1): 208-210.

47. Rizk, B. Outcome of Assisted Reproductive Technology. Oxford, UK:Health Press. 2007; 214-16.

48. 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;24:2061-70.

49. Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. Fertil Steril. 2010;93:159-66.

50. Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R, Artini PG. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. Gynecol Endocrinol. 2010;26:563-7.

51. Li Z, Lin Q, Liu R, Xiao W, Liu W. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. J Androl. 2010;31:437-44.

52. Crha I, Ventruba P, Zakova J, Huser M, Kubesova B, Hudecek R, Jarkovsky J. Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking. Fertil Steril. 2009;91:2344-8.

53. Van Casteren NJ, van Santbrink EJ, van Inzen W, Romijn JC, Dohle GR. Use rate and assisted reproduction technologies outcome of cryopreserved semen from 629 cancer patients. Fertil Steril. 2008;90:2245-50.

54. Garg T, LaRosa C, Strawn E, Robb P, Sandlow JI. Outcomes after testicular aspiration and testicular tissue cryopreservation for obstructive azoospermia and ejaculatory dysfunction. J Urol. 2008;180:2577-80.

55. Lahav-Baratz S, Rothschild E, Grach B, Koifman M, Shiloh H, Ishai D, Dirnfeld M. The value of sperm pooling and cryopreservation in patients with transient azoospermia or severe oligoasthenoteratozoospermia. Hum Reprod. 2002;17:157-60.

56. Freour T, Mirallie S, Jean M, Barriere P. Sperm banking and assisted reproductive outcome in men with cancer: a 10 years' experience. Int J Clin Oncol. 2012;17:598-603.

57. Kellie W. Edwards, Philip J. Chan, Albert K. Wei, Johannah U. Corselli and John D. Jacobson. Further Evidence Supporting the Diff-QuikStainforSperm Chromatin Integrity Testing. The Journal of Reproductive Medicine. 2015 Jan-Feb;60(1-2):6-12.

58. McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG. Adenosine triphosphate and motility characteristics of fresh and cryopreserved human spermatozoa. Int J Androl. 1994;17:19-23.

59. Wetzels AMM. Bras M. Lens JW. Piederiet MH. Rijnders PM. Zeilmaker GH. Laboratory aspects of in vitro fertilization. Cryopreservation/ Theory 1996; 229-244.

60. Guruprasad Kalthur, Sujith Raj, Aparna Thiyagarajan, Sangeetha Kumar, Pratap Kumar, Satish Kumar Adiga. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw–induced DNA damage. Fertil Steril. 2011;95:1149-1151.

61. Ahmadi, A., Ng, SC. (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. J Exp Zool. 1999; 284:696-704.

62. Fernandez et al., J Androl.2003; 24:59-66 ; Fertil Steril. 2005; 84:833-842.

63. Suplementation of ascorbic acid 2-glucoside (AA2G) to cryomedia and its effects on post-thaw human sperm motility. Fertil Steril. 2010; 94:4,146-147.