



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE
EMBRİYOLOJİ ANABİLİM
DALI



İNSAN SPERM HÜCRELERİNİN KÜÇÜK VOLÜMLER
İÇİNDE BAKIR GRİDLER ÜZERİNDE VİTRİFİKASYONU

Seda SARIBAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA-2017





T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**İNSAN SPERM HÜCRELERİNİN KÜÇÜK VOLÜMLER İÇİNDE
BAKIR GRİDLER ÜZERİNDE VİTRİFİKASYONU**

Seda SARIBAL

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DANIŞMAN:
Doç.Dr. Berrin AVCI**

BURSA-2017

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

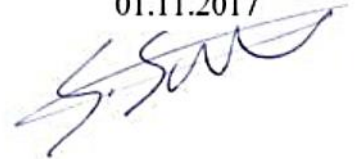
ETİK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum

“İnsan sperm hücrelerinin küçük volümler içinde bakır gridler üzerinde vitrifikasyonu” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Seda SARIBAL

01.11.2017



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Seda SARIBAL tarafından hazırlanan “İnsan sperm hücrelerinin küçük volümler içinde bakır gridler üzerinde vitrifikasyonu” konulu Yüksek Lisans tezi 17.11.2017 günü, 10.00-12.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı Soyadı</u>
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Berrin AVCI
Üye	Prof.Dr. Semiha ERSOY
Üye	Prof.Dr. Meltem KURUŞ

İmza



Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali AYDOĞDU

Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

01/11/2017

Adı Soyadı: Seda Sarıbal

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Çalışma insan sperm hücrelerinin bakır gridler üzerinde dondurulmasının sperm motilitesi ve viabilitesi üzerindeki etkisini değerlendirmektedir.

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı:
Doç. Dr. Berrin AVCI

İmza



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	4
İNGİLİZCE ÖZET	7
1.GİRİŞ	8
2.GENEL BİLGİLER.....	10
2.1. Üremenin Korunması.....	10
2.2. Erkek Fertilitésinin Korunması.....	12
2.2.1. Spermatojenez	12
2.2.2. Erkek İnfertilitesi.....	16
2.2.3. Erkek Fertilitésinin Korunmasında Güncel Yaklaşımlar -	19
2.3. Kriyoprezervasyon	20
2.3.1. Kriyoprezervasyonun Tanımı ve Kriyoprezervasyon Yöntemleri.....	20
2.3.2. Kriyoprotektan Solüsyonlar	24
2.3.3. Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamalarında Kriyoprezervasyon	26
2.4. Çalışmanın Amacı	32
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER	34
3.1. Etik Kurul Onayı	34
3.2. Semen Örneklerinin Sınıflandırılması ve Hasta Seçimi	34
3.3. Semen Örneklerinin Hazırlanması -.....	36
3.4. Vitrifikasyon İşlemi	37
3.4.1. Kriyoprotektan kullanılmayan grupların vitrifikasyonu	37
3.4.2. Kriyoprotektan kullanılan grupların vitrifikasyonu -.....	37
3.5. Numunelerin Grid Üzerine Yüklenmesi	38
3.6. Dondurulan Semen Örneklerinin Çözülmesi.....	40
3.7. Çözme Sonrası Sperm Konsantrasyon, Motilite ve Viabilitesinin Değerlendirilmesi.....	41
3.8. İstatiksel Analizler	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Yıkama Öncesi ve Sonrası Sperm Konsantrasyon ve Motilitelerinin Karşılaştırması.....	43
4.2. Yıkanmamış Örneklerin Kriyoprezervasyon Öncesi ve Sonrası Konsantrasyon ve Motilitelerinin Karşılaştırması	43
4.3. Dansite Gradient Yöntemi İle Yıkanmış Örneklerin Kriyoprezervasyon Öncesi ve Sonrası Konsantrasyon ve Motilitelerinin Karşılaştırılması	44
4.4. Kriyoprezervasyon İşlemi Uygulanan Örneklerin Çözme Sonrası Konsantrasyon, Motilite, Viabilite ve Total Viabilitesinin Karşılaştırılması--	44
4.5. Kriyoprezervasyon İşlemi Uygulanan Örneklerin Çözme Sonrası Klinik Alt Gruplara Göre Konsantrasyon, Motilite, Viabilite ve Total Viabilitesinin Karşılaştırılması.....	46
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	47
6.KAYNAKLAR	53
7.SİMGELER ve KISALTMALAR	64
8.EKLER.....	65
8.1. Şekil listesi	65

8.2. Tablo Listesi	65
8.3. Grafik Listesi.....	66
9.TEŞEKKÜR	67
10. ÖZGEÇMİŞ.....	68



TÜRKÇE ÖZET

Bu çalışmada kriyoprotektan kullanılmadan ve kullanılarak vitrifikasyonu gerçekleştirilen sperm hücrelerinin bakır gridlere yüklenerek depolanması sonucunda, bu protokolün sperm motilitesi ve viabilitesi üzerine etkisinin değerlendirilerek, sperm dondurma ve saklama koşullarını optimize etmek amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYT) Merkezi'ne spermiyogram analizi ve ÜYT uygulaması için başvuran 33 hastanın semen örneği kullanıldı. Bu 33 örnek yıkama öncesi ve sonrası, konsantrasyon ve motilite değerlenirilmesi yapıldı. Semen örnekleri Grup 1 yıkanmadan önce değerlendirilen semen örneği ve Grup 2 dansite gradient yöntemi ile yıkandıktan sonra değerlendirilen semen örneği olmak üzere 2 ana gruba ayrıldı. Her iki grup kendi içinde iki alt gruba ayrıldı. Grup 1a; yıkanmamış semen örneklerinin kriyoprotektan kullanılmadan vitrifikasyonu, Grup 1b; yıkanmamış semen örneklerinin kriyoprotektan kullanarak vitrifikasyonu, Grup 2a; yıkanmış semen örneklerinin kriyoprotektan kullanılmadan vitrifikasyonu ve Grup 2b; yıkanmış semen örneklerinin kriyoprotektan kullanarak vitrifikasyonu olacak şekilde oluşturuldu ve dondurulan tüm materyallerde taşıyıcı olarak elektron mikroskopik preparasyonda kullanılan bakır gridler kullanıldı. Kriyoprezervasyon sonrası çözülen örnekler makler kamarası ile konsantrasyon, motiliteleri ve viabiliteleri değerlendirildi.

Yıkanan ve yıkanmayan sperm numunelerinin konsantrasyon ve motilitelerinde, istatistiksel açıdan anlamlı bir kayıp görülmedi. Konsantrasyon ve motilitenin dondurma-çözme sonrası istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gösterdiği, fakat vitrifikasyon alt grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında; kriyoprotektan kullanımının çözme sonrası konsantrasyon, motilite ve viabilite sonuçlarında anlamlı farklılık oluşturmadığı saptandı.

Bu çalışmada bakır gridlerin taşıyıcı olarak düşük konsantrasyon ve motiliteli hastalarda küçük volümlerde saklamak için uygun olduğu ve rutin uygulamada sperm vitrifikasyon protokollerinde kriyoprotektan kullanılmadan da etkin olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sperm, vitrifikasyon, bakır grid, Oligoastenoteratospermi (OAT)

İNGİLİZCE ÖZET

Vitrification of Human Spermatozoa with Small Volumes on the Copper Grids

In this study, it was aimed to optimize sperm freezing and storage conditions by evaluating the effect of this protocol on sperm motility and viability as a result of storing frozen sperm cells in copper grids with/without using cryoprotectant solution.

In the scope of the study, 33 semen samples of patients who applied for semen analysis and in vitro fertilization were used in Uludag University Medical Faculty IVF Center. Before and after washing all of the 33 samples were evaluated for concentration and motility. The obtained raw samples, subsequently divided in two main groups as Group 1 was consisted of samples evaluated without washing and Group 2 was consisted of samples evaluated after washing with density gradient method. Then after four subgroups were created before cryopreservation. Group 1a was consisted from the samples that were cryopreserved without washing and using a cryoprotectant solution. Group 1b was consisted from the samples that were cryopreserved using the cryoprotectant without washing. Group 2a was consisted from samples that were washed and cryopreserved without cryoprotectant and Group 2b was consisted from the samples that washed and cryopreserved with cryoprotectant. The thawed samples after cryopreservation, were evaluated for the concentration and motility with the Makler chamber. The viability of the samples were evaluated by spreading to the culture vessel.

There were no statistically significant decrease of concentration and motility for washed and un-washed groups. Concentration and motility decreased statistically after freezing-thawing however when vitrification subgroups were compared with each other, the use of cryoprotectant did not alter significance in concentration, motility and viability results after thawed.

The use of a copper electron microscope grating as a cryopreservation carrier was found to be appropriate in terms of concentration, motility and viability of the sperm cryopreservation.

Key Words: Sperm, cryopreservation, copper electron microscope grid, oligo-asteno-teratospermy (OAT)

1. GİRİŞ

Kanser insan vücudundaki tüm dokuları ve organ sistemlerini etkileyen, neoplastik hastalıkların geniş bir kategorisini ifade eder (American Cancer Society, 2011) . Teşhis ve tedavisinde gerçekleşen önemli gelişmelere rağmen, kanserin ve tedavi amacıyla uygulanan kemoterapi- radyoterapi, cerrahinin komplikasyonları ve olumsuz yan etkilerine bağlı sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır. Fertilitenin kaybı, tam iyileşme sonrası özellikle genç hastalarda, erkek ve kadında en önemli sağlık problemlerinden biridir (Strauss ve Barbieri, 2013). Endokrin sistem, sinir sistemi, vasküler sistem, gonadlar ve genital organlarda oluşan hasar fertilitate problemlerine neden olmakta ve kansere bağlı mortalite oranları düştükçe tedavi sonrası infertilite problemi ön plana çıkmaktadır (Strauss ve Barbieri, 2013). Erkek hastalarda testiküler hasar hem somatik (Sertoli ve Leydig hücreleri) hücreleri, hem de germ hücrelerini etkileyebilmektedir (Hamish ve ark., 2004). Sitotoksik tedavinin öncelikli hedefleri hızlı bölünen hücrelerdir (Hamish ve ark., 2004). Bu durum spermatogenez sürecinde mitotik aktivitesi yüksek hücreler olan spermatogonyumların diferansiyasyon aşamasına geçmeden ölümüne neden olur (Kangasniemi ve ark., 1996). Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, diferansiyasyon aşamasındaki spermatogenik seri hücrelerini öldürüp, proliferatif germ hücre havuzunun tükenmesine neden olduğu düşünülmektedir (Meistrich ve ark., 1982). Dolayısıyla gonadotoksik tedavi görece hasta hangi yaşta olursa olsun subfertilite ya da infertilite riski ile karşı karşıyadır ve hastaların üreme fonksiyonlarının korunması önem arz etmektedir. Bu hastaların tedavi öncesi gonad dokularının ve/veya germ hücrelerinin kriyoprezervasyonu uygulanarak, tam iyileşme sonrası üreme fonksiyonlarının kaybı durumunda, çocuk sahibi olabilmeleri için fırsat yaratılmaktadır.

Klinik pratikte azospermi veya virtual azospermi endikasyonu ile üremeye yardımcı tedavi programına alınan erkek hastalarda elde edilen sperm hücrelerinin depolanması ve saklanması gerekliliği sperm kriyoprezervasyonu endikasyonu oluşturmaktadır (Kolletis ve ark., 2002).

Üremenin korunması amacıyla medikal, cerrahi tedavi öncesi veya infertilite endikasyonunun bir sonucu olarak germ hücrelerinin ya da gonad dokularının dondurularak saklanması üremeye yardımcı tedavi merkezlerinde uygulanan bir tedavi yaklaşımıdır (Delilbaşı, 2008). Bu amaçla farklı kriyoprezervasyon teknikleri (Francisca, 2017;Kuleshova ve ark., 1999; Mukaida ve ark.,1998; Picton ve ark., 2015;Rienzi ve ark, 2017;Strauss ve Barbieri, 2013) vefarklı taşıyıcıların (Cohen ve ark., 1997; Endo ve ark., 2011; Gil-Saolm ve ark., 2000; Herrler ve ark., 2006; Isaev ve ark., 2007; Lane ve ark., 1999; Serini ve ark., 2008) kullanıldığı sperm dondurma yöntemleri uygulanmaktadır. Dondurup çözme sonrası oluşan viabilite, motilite ve konsantrasyon kaybı pratik uygulamada önemli sorunlar arasındadır (Gangrade, 2013; Nordhoff, 2015; WHO, 2010). Özellikle düşük konsantrasyonda ya da sınırlı sayıda spermi olan hastalarda semen örneklerinin düşük volümde saklanması gerekmektedir. Bu durum kriyoprezervasyon taşıyıcılarının önemini ortaya koymaktadır.

Bu bağlamda çalışmamızda düşük hacimde sperm kriyoprezervasyonunda taşıyıcı olarak elektron mikroskobik preparasyonda kullanılan bakır gridlerin etkinliğini değerlendirmek amaçlandı.

1. GENEL BİLGİLER

2.1.Üremenin Korunması

Üremenin korunması, Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezlerinde (ÜYTM) farklı endikasyon gruplarında uygulanan bir koruyucu hekimlik uygulaması ve/veya tedavi edici yaklaşımdır. Endikasyon alanları üç başlık altında toplanabilir. Öncelikli olarak fertilitate koruma üreme sağlığını korumak isteyen kanser hastaları için tek seçenektir (Tournaye ve ark., 2014). Erken teşhis konusundaki ilerlemeler ve yeni tedavi teknikleri ile kanserli genç hastaların (20-39 yaş) ölüm oranını ciddi anlamda düşürmektedir (Qiao ve Li, 2014). Elde edilen kanıtlar kanseri atlatan 40 yaşın altındaki hastaların çoğunun fertilitate korumasının sürdürülmesini veya endokrin fonksiyonlarının iyileştirilmesini umduğunu göstermektedir (Qiao ve Li, 2014). Kemoterapi-radyoterapi ve/veya cerrahi tedavi uygulanacak kanser hastalarında üreme kapasitesinin korunması bu programın önemli bir endikasyon alanını oluşturur. Bir diğer endikasyon grubunu çocuk sahibi olmayı erteleyen sağlıklı çiftler için fertilitate koruma yaklaşımları oluşturmaktadır. Bu grup daha çok kadın partner için endikasyon oluşturmaktadır. İlerleyen yaşla birlikte ovaryan rezervde azalma ve oosit yaşlanmasına bağlı kalite kaybı infertilite nedenidir (Qiao ve Li, 2014). Genç yaşta uygulanan fertilitate koruma tedavileri ilerleyen yaşa bağlı üreme fonksiyonunun kaybını engellemektedir. ÜYT merkezlerinde önemli bir hasta grubunu oluşturan azospermi veya virtual azospermi olgularında, progressif olarak semen kalitesinin bozulduğu erkek hastalarda, üremenin korunması amacıyla tedavi öncesi sperm hücrelerinin eldesi, depolanması ve saklanması bir diğer endikasyon grubunu oluşturmaktadır.

Kanser tedavisi gören genç hastaların aldığı sistemik kemoterapi ve/veya spinal ve pelvik bölgelerine uygulanan radyoterapi gonadal hasara neden olmaktadır (Hamish ve ark., 2004). Kemoterapik ajanlar ve radyoterapi erkek hastaların sperm konsantrasyonunu düşürmekte ve/veya sperm üretimini engellemektedir. Sitotoksik tedavinin öncelikli hedefleri hızlı mitotik aktivasyon geçiren hücrelerdir (Hamish ve

ark., 2004). Dolayısıyla kemoterapi hızla çoğalan kanser hücreleri ile birlikte sağlıklı hücreleri de öldürmektedir. Bu hasarın mekanizması belirsiz olsada, diferansiyasyon aşamasındaki spermatogenik hücreleri öldürüp, germ hücre havuzunun tükenmesine neden olduğu düşünülmektedir (Meistrich ve ark., 1982). Özellikle alkilleyici kemoterapik ajanlar, sperm hücrelerini DNA'larında kırıklara neden olarak negatif etkilemektedir (Strauss ve Barbieri, 2013). Erkek genital organlarına yakın bölgeye uygulanan radyoterapi spermatogenik seri hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır. Spermatogenik hücreler somatik hücrelere göre daha çabuk etkilenirler (Hamish ve ark., 2004; Shalet ve ark., 1989). 4 Gy ve üzeri radyasyon testiste kalıcı hasara neden olur (Centola ve ark., 1994; Hamish ve ark., 2004). Aynı zamanda radyoterapinin etkisiyle hipotalamo-hipofizer gonadal aksın bozulması söz konusudur (Hamish ve ark., 2004; Martinez ve ark., 2017).

Erkek hastalarda testiküler hasar yalnız spermatogenik seri hücreleri üzerinden gerçekleşmez. Testisin somatik hücreleri yüksek dozda radyoterapiye daha dayanıklı olmakla birlikte, Sertoli ve Leydig hücrelerinin olumsuz etkilenmesi söz konusudur (Hamish ve ark., 2004). Sertoli hücreleri germ hücrelerini beslerken, Leydig hücreleri testesteron üretir. Bu hücrelerde oluşan hasar veya kayıp durum spermatogenez sürecini olumsuz etkilemektedir (Kangasniemi ve ark., 1996). Yetişkin testisi aktif olarak olgun spermatozoa ürettiğinden bu tür hasarlara daha dirençlidir (Relander ve ark., 2000; Whitehead ve ark., 1982). Buna rağmen gonadotoksik tedavi hasta hangi yaşta olursa olsun subfertilite/infertiliteye neden olabilmektedir.

Fertilite koruma; kanser tedavisi gören hastalarda önemli bir yer teşkil ettiği gibi onkolojik olmayan durumlarda da tercih edilir. Bunlar otoimmün hastalıklar, hematopoetik kök hücre transplantasyonu, genetik kökenli hastalıklar ve testiküler doku hasarı ve cinsiyet değiştirme prosedürleridir. Bir otoimmün hastalık olan sistemik lupus eritematozuslu erkekler, yüksek oranda testis Sertoli hücre disfonksiyonu gösterir (Coleman ve ark., 2012). Yeni tedavi yaklaşımları, otoimmün hastalıkları olan olguların prognozunu değiştirmektedir; ancak üreme toksisitesi hakkında bilgi halen sınırlıdır. Hematopoetik kök hücre transplantasyonu geçiren hastalar, agresif kemoterapiden ve önceden var olan kemik iliğini yok etmek için radyoterapiye ihtiyaç duyulduğundan, ovaryan (%64-85) veya testiküler (%50-90)

hasar riski altındadırlar (Joshi ve ark., 2014). Klinefelter Sendromu, insanlarda seks kromozomu bozukluğunun en yaygın olanıdır ve %90'ın üzerinde hipogonadizm ve azospermiye neden olur (Bedaiwy ve Botros, 2014).

Testiküler yaralanmada, testis dokusunda onarılamaz hasarlar oluştuğunda infertilite oluşmaktadır ve bu gibi durumlarda fertilitate koruma en uygun seçenektir (Gangrade, 2013). Testislerin veya ovaryumların çıkarılması, üreme fonksiyonunu yok ederken, cinsiyet değiştirme prosedürlerinde kullanılan ilaçlar üreme kapasitesinin azalmasına neden olmaktadır (Martinez ve ark., 2017). Etik endişeler olsa da (De Wert ve ark., 2014), fertilitate koruma ve fertilitate tedavisi hakkında 'hormon tedavisine başlamadan önce veya üreme organlarının çıkarılması/ değiştirilmesi için cerrahi geçirilmesi' konusunda danışma hizmetinin yapılması gereklidir (Coleman ve ark., 2012).

Üremenin korunması programında germ hücrelerinin ve/veya gonad dokularının tedavi öncesi saklanması ve depolanması amacıyla kriyoprezervasyonu uygulanmaktadır (American Cancer Society, 2011). Tedavi sürecinin ardından, tam iyileşme sağlandığında, uygun yardımcı üreme tedavisi yaklaşımları ile bu hastalara çocuk sahibi olma şansı verilmektedir.

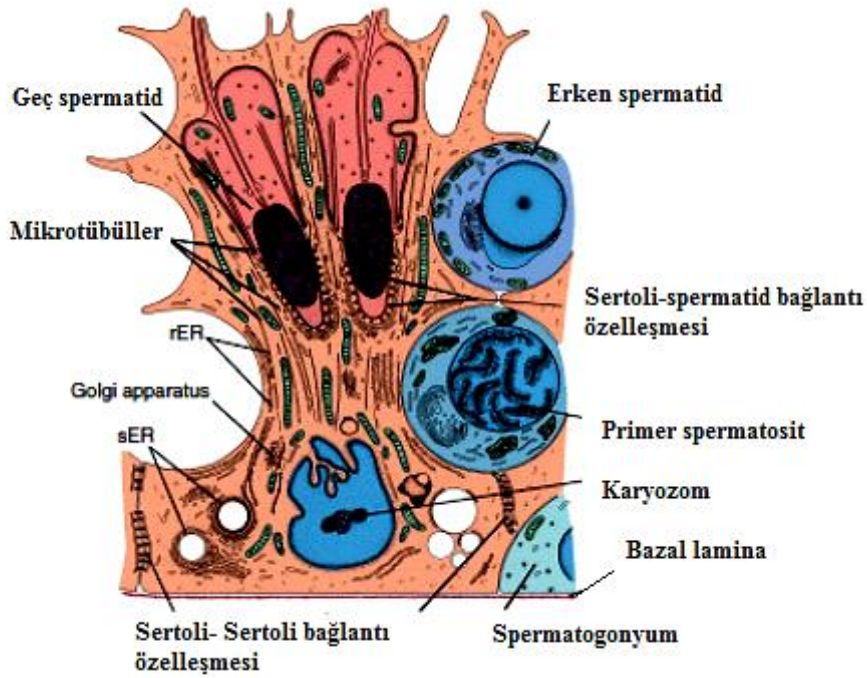
2.2. Erkek Fertilitésinin Korunması

2.2.1. Spermatogenez

Spermatogenez olgun erkek germ hücresi spermatozoanın gelişim sürecidir. Bu gelişimsel süreç testis seminifer tübül duvarında gerçekleşir. Testis skrotal kese içinde asılı bir çift organdır. Dıştan periton kaynaklı iki tabakalı seröz bir zar olan tunika vaginalis ile çevrilidir. Gevşek bağ dokusu yapısındaki tunika vaskularis, testisin damarlanmasının olduğu bölümdür. Tunika vaginalisin altında kalan, testisi lob ve lobüllere ayıran septumları, seminifer tübüllerin arasını ve interstisyel alanları oluşturan bağ dokusu tabaka tunika albugineadır. Tunika albuginea organı besleyen damarların girip çıktığı ve intratestiküler duktusların bulunduğu bölümde kalınlaşır ve mediastinum testis'i oluşturur (Ross, 2011).

Seminifer tübüller, herbir testis lobülünde 1-4 adet bulunan, kapsül altından kör uçlu olarak başlayan, uzun ve oldukça kıvrımlı yapıda, bazal lamina ile çevrili ve spermatogenezin gerçekleştiği tübüllerdir. Sertoli hücreleri ve spermatogenik seri

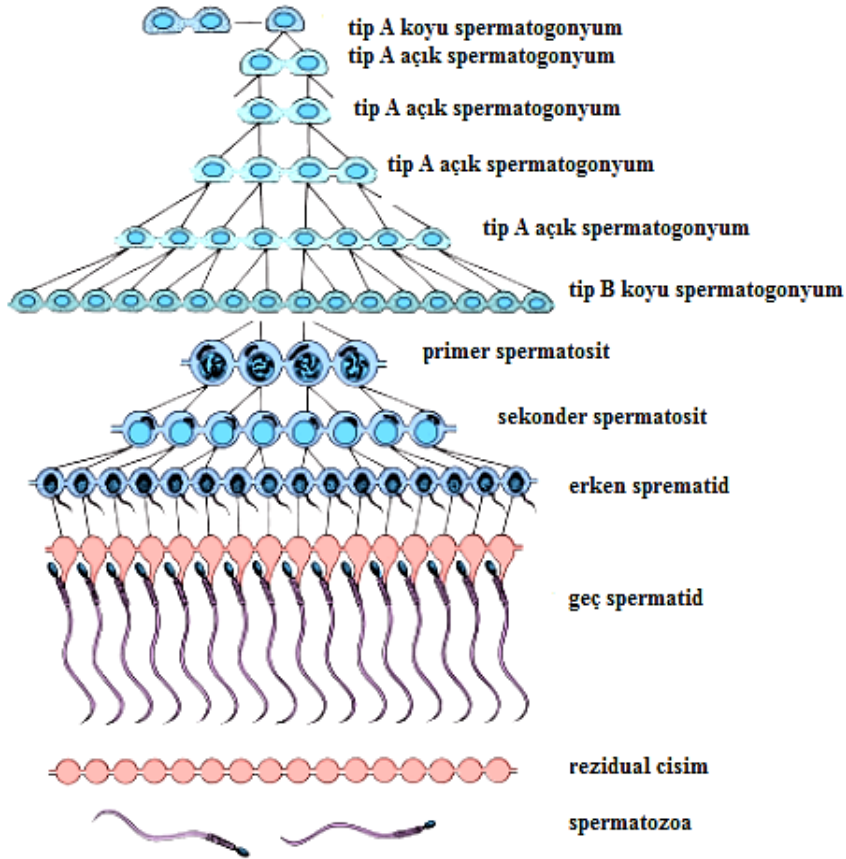
hücreleri seminifer tübül duvarını (germinal epitel) oluşturur. Sertoli hücreleri arasında bazal laminaya yakın yerleşimli, zonula okludens bağlantı kompleksleri bulunmaktadır. Bu sıkı bağlantı kompleksleri seminifer tübül duvarını bazal ve adluminal kompartmanlara ayırır. Bazal kompartmanda gonadal kök hücre olan spermatogonyumlar ve primer spermatozoidler bulunur. Adluminal kompartmanda ise; olgunlaşan ve kromozom sayısını yarıya indirgenmiş spermatozoalar bulunur. Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kompleksleri puberte sonrası oluşan kromozomal yapısı değişmiş olan yeni spermatogenik seri hücrelerini immün sistemin yıkıcı etkisinden koruyan kan-testis bariyerini oluşturur (Ross, 2011) (Şekil 1).



Şekil 1. Kan testis bariyeri (Ross, 2011)

Spermatogenez; spermatogenik kök hücre olan spermatogonyumlardan olgun sperm hücresi oluşma sürecidir. Spermatogenez; spermatositogenez, mayoz bölünme ve spermiyogenez olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. Spermatogenik seri hücrelerinin kök hücreleri olarak sınıflandırılan spermatogonyumlar, tip A ve tip B olmak üzere ikiye ayrılırlar. Spermatogonyum tip A hücreleri mitoz bölünmeler geçirip kök hücre olarak kalırlar ya da olgun sperm oluşturmak üzere spermatogonyum tip B hücrelerine farklılaşırlar. Bu mitoz bölünme aşamaları spermatositogenez olarak adlandırılır. Spermatogonyum tip B hücreleri mitoz bölünme geçirerek primer spermatozoidi oluşturur. Diploid sayıda 46 kromozumlu primer

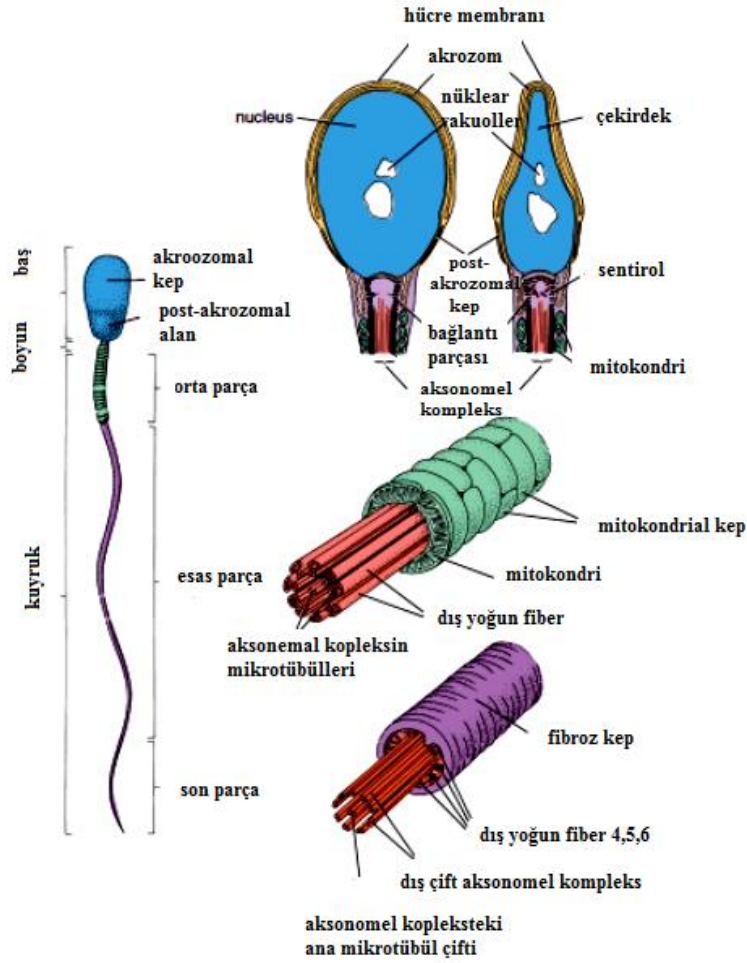
spermatositler mayoz I evresinin tamamlanması ile haploid sayıda 23 çift kromatidli sekonder spermatositlere dönüşür. Mayoz II evresi sonrasında sekonder spermatosit DNA sayısını da yarıya indirerek haploid sayıda 23 tek kromatidli spermatidi oluşturur. Böylece mayoz aşaması biter ve spermatidden olgun sperm oluşma aşaması olan spermiyogenez evresine geçilir. Spermiyogenez morfolojik değişim evresidir. Mayoz bölünmeler sonrasında oluşan spermatidler, olgun sperm hücrelerine dönüşürken; akrozomun oluşumu, kuyruk gelişimi, çekirdek değişimi, kromatin yoğunlaşması ve artık spermatid sitoplazmasının atılması gibi morfolojik değişimler gerçekleşir ve gelişimini tamamlayan olgun spermiler semifer tübülerin lümenine salınırlar (Şekil 2).



Şekil 2. Spermatogenez (Ross, 2011)

Olgun bir sperm yaklaşık olarak 60-65 µm uzunluğunda, motil ve mitokondrion sayısı bakımından oldukça zengin bir hücre olup; baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşur (Şekil 3). Sperm başının üçte ikilik

bölümünü akrozomal kep, üçte birlik bölümünü ise post akrozomal bölge oluşturur. Akrozomal kep bölümünde akrozin, hyaluronidaz, nöraminidaz gibi litik enzimler bulunur. Bu enzimler spermin oositin kumulus hücrelerini ve zona pellusidasını geçmesinde aktif rol oynar. Sperm ile oosit temasında akrozomal kepin içindeki enzimlerin salınması olayı fertilizasyon basamaklarından olan akrozomal reaksiyonun gerçekleşmesini sağlar. Post-akrozomal bölge ise sperm DNA'sının bulunduğu bölgedir. Spermin kuyruğu; orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç bölümden oluşur. Orta parça olarak adlandırılan bölgede mitokondriondan zengin mitokondriyal kılıf bulunmaktadır. Mitokondriyal kılıfta bulunan mitokondrionlar spermin hareketi için gerekli enerjiyi üretirler ve spermin hareketinden sorumludurlar. Kuyruğun esas parçası en uzun parçadır ve yaklaşık 40µm boyundadır. Esas parça; aksonemal kompleks ve fibröz kılıfın bulunduğu parçadır. Aksonemal kompleks, 9+2 aksonem yapısındadır. Merkezde 2, etrafında ise 9 çift filaman bulunmaktadır. Aksonemal kompleks, fibröz kılıf ile çevrelenmektedir. Kuyruğun son parçasında ise sadece aksonemal kompleks bulunur (Ross, 2011) (Şekil 3).



Şekil 3. Olgun Sperm Yapısı (Ross, 2011)

2.2.2. Erkek İnfertilitesi

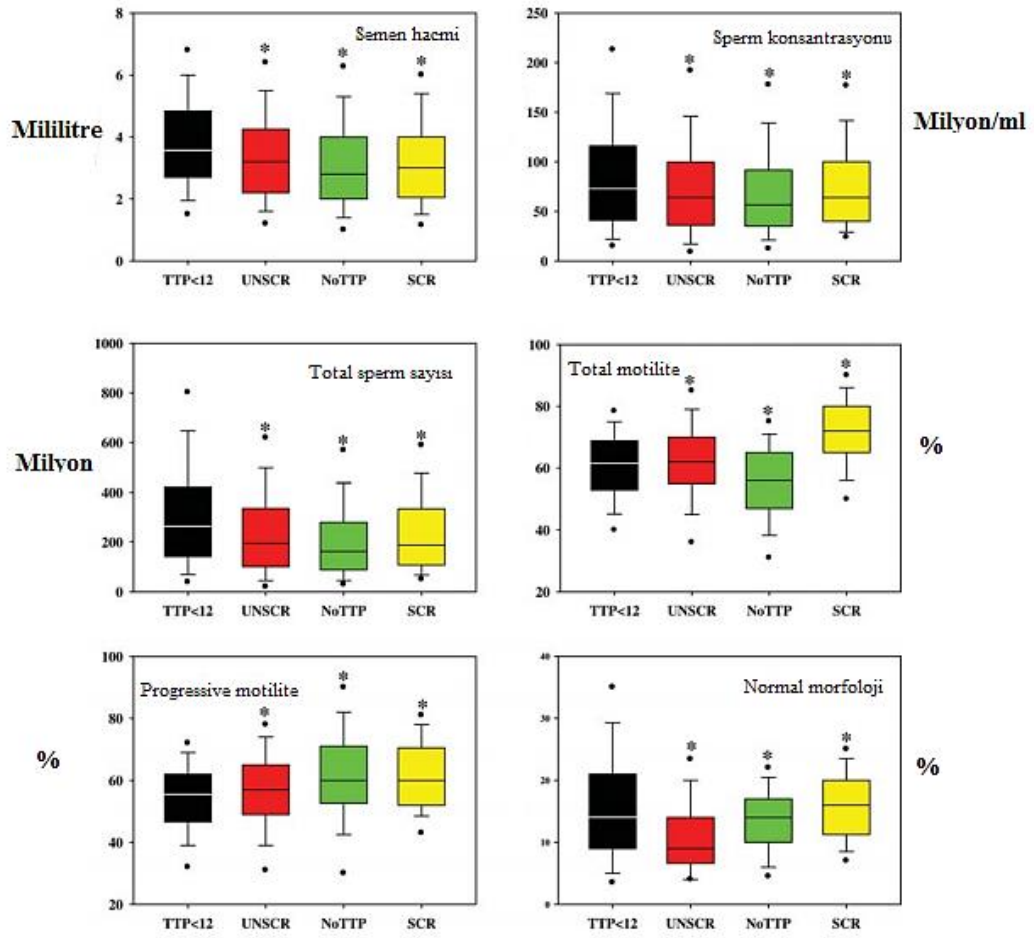
İnfertilite tüm çiftlerin ortalama %15 ini etkileyen bir faktördür (Chong ve ark.,2017). İnfertilite vakalarının en az %30'unun erkek infertilitesinden kaynaklandığı bilinmektedir (Povey ve ark., 2012; Taylor, 2003). İnfertilite tanısı; detaylı fizik muayenesi, laboratuvar bulguları ve görüntüleme teknikleri kullanılarak konulur. Erkek infertilitesi pretestiküler, testiküler, posttestiküler ve açıklanamayan infertilite olmak üzere dört grup altına sınıflandırılabilir (Çayan, 2016). Pretestiküler nedenler; hipotalamo-hipofizer hastalıklar, ekzokrin ve endokrin hormonal bozukluklar ile ilişkilidir. İzole gonadotropin azlığı, izole luteinizan hormon (LH) azlığı, izole follikül stimulan hormon (FSH) azlığı, konjenital hipogonadotropik lezyonlar gibi hipotalamus hastalıklarının, hipofizer yetmezlik, hiperprolaktinoma gibi hipofiz hastalıkları ile ekzojen ve endojen hormonların yetersizliği pretestiküler

kaynaklı erkek infertilitesidir. Kromozom anomalileri, germinal hücre aplazisi, idiyopatik infertilite, inmemiş testis gibi anomaliler testiküler kaynaklı infertilite kategorisinde incelenirken, ejakulasyon bozuklukları post-testiküler kaynaklı infertilite sebepleri arasında sayılabilir (Çayan, 2016).

Erkek infertilitesi; ejakulasyon ile sperm elde edilebilen ve ejakulasyon ile sperm elde edilemeyen infertil hastalar olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (2010) göre insan semen değerlerine bakıldığında; sperm konsantrasyonunun 15 ml/ml, motilite oranının %40 ve normal sperm morfolojisinin Kruger'e göre (Dünya Sağlık Örgütü, 2010) %4'ün altında olması durumunda bu olgular erkek infertilitesi olarak değerlendirilmektedir (Tablo 1, Grafik 1).

Tablo 1. Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine (2010) göre insan semen analizi için en düşük değerler (5.persentil ve % 95 güven aralıkları) (WHO, 2011)

Parametreler	En düşük referans değer
Semen Volümü (ml)	1,5 (1,4-17)
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, %)	28 (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
İmmunobead testi (%)	<50
Seminal çinko (μ mol/ejakulat)	>2,4
Seminal früktoz (μ mol/ejakulat)	>13
Seminal nötral glukozidaz (μ U/ejakulat)	>20



Grafik 1. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine (2010) göre insan semen özelliklerine göre referans değerleri

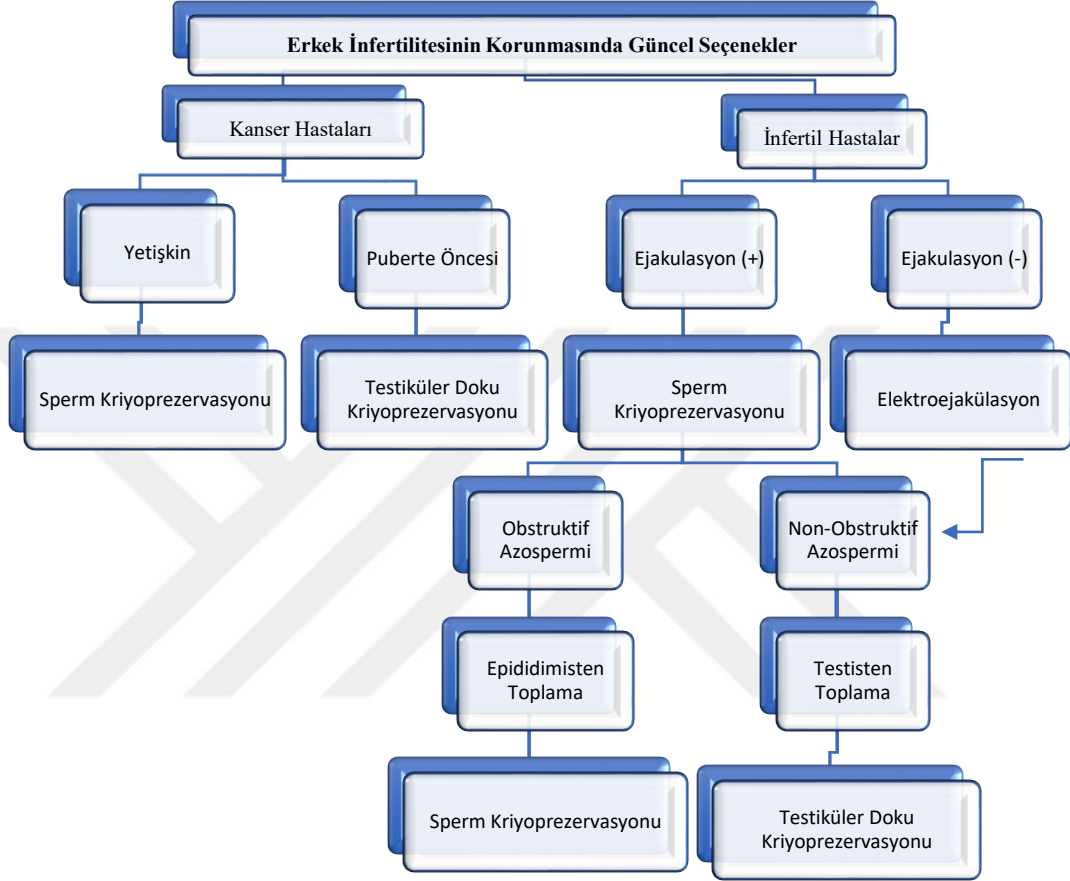
Erkek infertilitesi sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisine göre farklı alt gruplarda değerlendirilmektedir (Dünya Sağlık Örgütü, 2010). Aspermi semenin olmama durumudur. Asetenozoospermi ise ileri hareketli sperm yüzdesinin alt referans değeri altında olduğu durum iken, astenoteratozoospermi hem ileri hareketli sperm yüzdesinin alt referans değeri altında olması hem de normal morfolojili sperm sayısının alt referans değeri altında olmasıdır. Azoospermi, ejakulatta sperm olmaması, kriptozoospermi ise taze preparatta sperm yok iken santrifüj edilince sperm hücresinin görülme durumudur. Hemospermi; ejakulatta eritrositlerin varlığı, lökospermi; ejakulatta eşik değer üstünde lökosit olması, nekrospermi ise; canlı sperm yüzdesinin az, ölü sperm yüzdesinin fazla olmasıdır. Oligozoospermi sperm konsantrasyonunun alt referans değerleri altında olmasıdır. Teratozoospermi alt referans limitinden aşağıda normal morfolojili sperm yüzdesi görülmesidir Oligozoospermi ile astenosperminin birlikte görülmesi durumu

oligoastenozoospermi olarak adlandırılırken, oligozoospermi, astenozoospermi ve teratozoosperminin aynı anda görülme durumuna ise oligoastenoteratozoospermi (OAT) denir (WHO, 2010).

2.2.3. Erkek Fertilitésinin Korunmasında Güncel Yaklaşımlar

Kriyoprezervasyon yöntemi ile hem erkek hem de kadın hastaların, üreme kapasitelerinin risk altında olmaları durumunda, üreme yetenekleri koruma altına alınmaktadır (Gürkan, 2012). Kriyoprezervasyon yöntemi hem kanser hastası erkeklere, hem de infertil erkeklere uygulanabilir. Ejakulasyon yöntemi ile sperm elde edilebilen hastaların spermleri dondurulurken, ejakulasyon ile sperm elde edilemeyen hastalarda farklı yollar izlenir. Ejakulasyon fonksiyonu gerçekleştiremeyen hastalardan elektroejakulasyon yöntemi ile sperm elde edilebilmektedir. Ejakulatında sperm bulunamayan hastalarda ise mikrocerrahi yöntemi uygulanır ve epididimisten veya testisten sperm hücreleri toplanarak dondurulur (Dünya Sağlık Örgütü, 2010; Gürkan, 2012). (Tablo 2)

Tablo 2. Erkek İnfertilitesinin korunması için güncel yaklaşımlar (Gürgan, 2012)

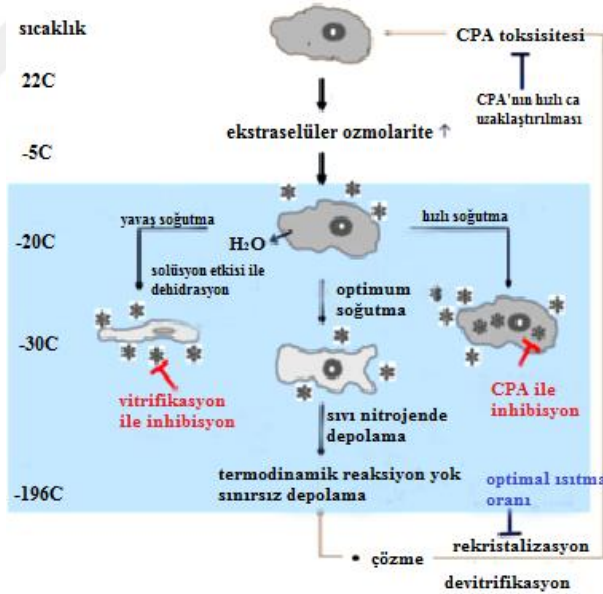


2.3. Kriyoprezervasyon

2.3.1. Kriyoprezervasyonun Tanımı ve Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Hücrelerin ve dokuların kriyoprotektan solüsyonlar kullanılarak ya da kullanılmadan 0°C'nin çok altındaki derecelere kadar soğutularak dondurulması, hücresel özelliklerini kaybettirmeden ve uzun süre saklandıktan sonra tekrar çözülmesi işlemine kriyoprezervasyon denir. Kriyoprezervasyonun amacı; dondurulan hücre veya dokuların, yapılarının ve işlevlerinin bozulmadan en az zarar ile saklanmasıdır. Dondurulacak hücre veya dokuların kriyoprotektan adı verilen solüsyonlar kullanılarak dengelenip, kontrollü ya da hızlı soğutma işleminin ardından sıvı azot içinde depolanması ile gerçekleşmektedir. Kriyoprezervasyonda saklanacak

materyalin en az hasarla korunması amaçlanmaktadır. Dondurma işlemi gerçekleştirilirken ısının düşmesi ile hücre içi sıvının buz kristallerine dönüşümü söz konusudur. Kriyoprotektanlar hücre içindeki sıvının hücre dışına alınması ile hücrenin dehidrasyonunu gerçekleştirirerek buz kristallerinin oluşumunu engeller (Gao ve Critser, 2000). Kriyoprezervasyon işlemleri genellikle yavaş dondurma (slow freezing) yöntemi ve vitrifikasyon ile gerçekleştirilir. Yavaş dondurma yöntemi soğutma hızının kontrollü olarak gerçekleştiği (sıcaklığın 1 °C / dakika düşürülerek) ve özel ekipman gerektiren bir yöntemdir. Hücre hasarını azaltmak amacıyla hücre zarı geçirgenliğine göre düşük konsantrasyonda kriyoprotektanlar (1.0M'den az) kullanılır (Gao ve Critser, 2000; Mandawala ve ark., 2016; Tae Hoon Jang ve ark., 2017; Yong ve ark., 2015). Yavaş dondurma tekniğine alternatif olarak geliştirilen vitrifikasyon, hücre süspansiyonlarının direkt olarak sıvı nitrojene alınması ile bir cam haline dönüştürülmesi işlemidir (Rall ve Fahy, 1985) (Şekil 4).



Şekil 4. Vitrifikasyon ve Yavaş dondurma mekanizmaları (Tae Hoon Jang ve ark, 2017)

2.3.1.1. Yavaş Dondurma (Slow Freezing) Yöntemi

Yavaş dondurma yöntemi, programlanmış dondurma makineleri kullanılarak gerçekleştirilen, ısının yavaş ve kontrollü bir şekilde düşürüldüğü sistemlerdir. Pahalı bir ekipman ve uzun süren protokol ile gerçekleşse de düşük miktarlarda kriyoprotektan kullanımı ve donma esnasında ekstra ve intraselüler değişimler için zaman vermesi avantajlı yönleridir. Yavaş dondurma, hücre içi buz oluşumunu en aza indirirken, yeterli hücre dehidrasyonunu sağlayabilmek için kriyoprezervasyonun yeteri kadar yavaş bir hızda gerçekleşmesini sağlar (Rienzi ve ark., 2017; Willadsen, 1977). Yavaş dondurma yöntemi, kabul edilen donma eğrisi, doğru ve tutarlı soğutma parametrelerini sağlamak için tasarlanmış programlanabilir bir dondurma makinesinin kullanılmasını gerektirir (Rienzi ve ark., 2017; Willadsen, 1977). Bu kontrollü ve programlı soğutma sisteminde, dondurulacak materyalin dengelenmesini sağlamak amacı ile düşük konsantrasyonda kriyoprotektan madde kullanılmaktadır. Hücre içinde çözünen maddenin konsantrasyonu hücre dışından yüksek olduğu için, hücre içinin donma sıcaklığı düşer, böylece hücre içinde buz kristallerini oluşumu önlenir. Hücre dışında buz kristali oluşması sonucu hücre içi sıcaklığının daha da düşmesi ile denge safhasının bozulmasını engellemek için buz kristali oluşumu -6/-8°C'de dışarıdan manuel veya otomatik olarak ayarlanmaktadır ve bu işleme seeding adı verilmektedir. Seeding sonrası örnekler genellikle -60°C'ye kadar programlı olarak soğutulmakta ve sıvı nitrojen içerisine transfer edilmektedir. Bu basamaklar yaklaşık olarak 90-120 dakika sürmektedir. Dondurma ve çözme işlemleri uygulanırken hasar oluşmasındaki kritik dönem -15 ile -60°C arasındadır. Kullanıcı veya sistem kaynaklı hatalar dondurulan materyalin canlılığını kaybetmesindeki etkin faktörlerdir. Slow freezing embriyo ve oosit kriyoprezervasyonu için sık kullanılan bir yöntemdir (Kuleshova ve ark., 1999; Mukaida ve ark., 1998; Rienzi ve ark., 2017).

2.3.1.2. Vitrifikasyon

Hızlı dondurma yöntemi olan vitrifikasyon yöntemi, slow freezing yöntemine göre daha ucuz ve hızlı bir yöntemdir. Vitrifikasyon yönteminde cihaza gerek yoktur ve dondurma süresi slow freezing için gerekli süreden çok daha kısadır. Doku ve hücreler kriyoprotektan eklendikten çok kısa süre sonrasında direk sıvı nitrojene aktarılır. Slow freezing yöntemine göre daha yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanlar kullanılır. Yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanın hücrelerinin viabilitesi ve motilitesi (sperm) üzerine negatif etkisi olabilmektedir (Francisca, 2017; Picton ve ark., 2015) (Tablo 3).

Vitrifikasyonda denge ve dengesizlik olmak üzere iki basamak vardır. Vitrifikasyon sırasında dondurulan hücre veya dokunun içindeki sıvı, kriyoprotektan solüsyonun ilk basamak solüsyonu olan dengeleme solüsyonu yardımı ile dışarı atılır ve bunun sonucunda dondurulacak hücre-doku büzülür. Büzülme sırasında sıvı hücreyi terk ederken sıvının yerini dengeleme solüsyonları alır ve hücre-doku yeniden şişmeye başlar. Bu aşamada dondurulacak doku ikinci basamak solüsyon olan vitrifikasyon solüsyonuna alınır ve hemen sıvı azota nakledilir. Hücre içi sıvı dışarı atıldığından buz kristali oluşmaz. Çözme işlemi sırasında ise materyal azalan sükröz yoğunluğundaki çözme solüsyonlarından geçirilerek dışarı atılan sıvının tekrar içeri girmesine olanak sağlanır. Böylece dondurulmadan kaynaklanan hasar en aza indirilerek vitrifikasyon gerçekleştirilmiş olur (Francisca, 2017; Picton ve ark., 2015; Strauss ve Barbieri, 2013).

Vitrifikasyonun önemli bir avantajı dondurma kaynaklı hücre hasarı riskinin düşük olmasıdır ve böylece hücre sağ kalımı oranı yüksektir (Francisca, 2017; Picton ve ark., 2015; Strauss ve Barbieri, 2013).

Tablo 3. Yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri (Tae Hoon Jang ve ark, 2017)

Karakteristik Özellikleri	Yöntem	
	Yavaş Dondurma	Vitrifikasyon
Çalışma süresi	3 saatten fazla	10 dakikadan az
Maliyet	Pahalı ekipman gerekli	Ucuz, ekipmana ihtiyaç yok
Örnek Hacmi (ml)	100-250	1-2
Kriyoprotektan konsantrasyonu	Düşük	Yüksek
Buz kristal formasyonundan kaynaklanan kriyo hasar	Yüksek	Yüksek
Çözme sonrası viabilite	Yüksek	Yüksek
Kriyoprotektan toksisitesi riski	Düşük	Yüksek
Sistem statüsü	Sadece kapalı sistem	Açık ve kapalı sistem
Patojenik ajanların potansiyel kontaminasyonu	Düşük	Yüksek
Manipulasyon yeteneği	Kolay	Zor

2.3.2. Kriyoprotektan Solüsyonlar

Kriyoprotektanların dondurulan materyali, dondurmadan kaynaklanan hasarlardan koruduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte hücre-doku düzeyinde toksik etkileri vardır. Kriyoprotektan solüsyonlar yüksek oranda hidrojene bağlanma eğilimi nedeniyle toksik olabilirler. İyi bir kriyoprotektan; düşük moleküler ağırlıklı, kolay çözünen, hücre içine kolay geçebilen ve yüksek konsantrasyonda dahi toksik olmayan solüsyondür. Kriyoprotektanlar ikiye ayrılmaktadırlar; I. Gliserol, Dimetil sülfoksit (DMSO), Propilen glikol (PG) gibi solüsyonlar hücre içine girebilen kriyoprotektanlar, II. monosakkaritler (glukoz, hekzoz), disakkaritler (sükroz) ve trisakkaritler (raffinöz) gibi maddeler ise hücre dışında kalan kriyoprotektanlardır (Tablo 4) (Pegg, 2007; Tae Hoon Jang ve ark., 2017).

Hücre içine girebilen solüsyonlar hücredeki buz kristali oluşumunu -40°C'ye kadar düşürürler. Hücreyi kriyoprotektan solüsyonun toksik etkilerinden korurlar. ÜYT merkezlerinde en çok tercih edilen, hücre içine girebilen kriyoprotektan madde DMSO 'dur (Miyagi ve ark., 2015; Pegg, 2007; Tae Hoon Jang ve ark., 2017; Yong ve ark., 2015).

Hücre dışında kalan kriyoprotektanlar ise, hücre zarında ozmotik basınç değişikliklerini korumak amacıyla kullanılırlar. Aynı zamanda çözme işlemi gerçekleştirilirken hücrenin şişip patlamasını engellerler (Delilbaşı, 2008). ÜYT

merkezlerinde en çok tercih edilen, hücre dışında kalan kriyoprotektan madde şükrozdur.

Tablo 4. Genellikle kullanılan kriyoprotektan ajanlar ve kullanım alanları (Tae Hoon Jang ve ark, 2017)

Kriyoprotektan ajan	Membran geçirgenliği	Olası toksisite	Kullanılan kriyoprezervasyon alanları
Hücre Bankası serisi	Evet	Bilinmiyor DMSO'dan daha az	<ul style="list-style-type: none"> • Kök hücre kökenli adipoz doku • Amniyotik sıvı • Kemik iliği • Memeli hücreleri • Sinovyum
Dimetilsulfoksit (DMSO)	Evet	Hücre membran toksisitesi Kalp atış hızında azalma	<ul style="list-style-type: none"> • Adiposit doku • Kemik iliği • Dental pulpa • Embriyo (etilen glikol veya propilen glikol ile birlikte) • Embriyonik kök hücre (yalnız veya EG ile birlikte) • Hepatosit • Mikroorganizmalar • Oosit (EG ile birlikte) • Trombosit • Diş • Testiküler hücre ve dokular
Etilen glikol (EG)	Evet	Gastrotestinal irritasyon Akciğer ödemi Akciğer inflamasyonu	<ul style="list-style-type: none"> • Amniyotik sıvı • Dental pulpa
Gliserol	Evet	Böbrek yetmezliği	<ul style="list-style-type: none"> • Amniyotik sıvı • Mikroorganizmalar • Diş • Spermatozoa • Kırmızı kan hücresi
Trehaloz	Hayır	Göreceli olarak daha az toksik	<ul style="list-style-type: none"> • Kök hücre kökenli adipoz doku(vitrifikasyon ile birlikte) • Embriyo (vitrifikasyon ile birlikte) • Kırmızı kan hücresi • Over dokusu(vitrifikasyon ile birlikte) • Spermatozoa • Kök hücre(propilen glikol ile birlikte)
Propilen glikol	Evet	Fare zigotlarının gelişimsel potansiyelinde bozulma	<ul style="list-style-type: none"> • Embriyo • Hepatosit

Klinik ve preklinik alanda kriyoprezervasyon tekniğinin sayısız kullanımı olmasına rağmen, bazı kısıtlamalar hala mevcuttur (Karlsson ve Toner, 1996; Tae Hoon Jang ve ark., 2017). Hücreler, düşük sıcaklıkta (-196 ° C, sıvı azotta) neredeyse hiçbir metabolik aktivite göstermez. Bu süreç kaçınılmaz olarak, lipidlerde ve proteinlerde hücre ile bağlantılı değişikliklerin biyolojik varyantlarına yönelik genetik bir sapma da dâhil olmak üzere, hücrenin etkinlik ve yapısal bozulmasına neden olabilir. Örneğin, DMSO'nun hücrelerin kromozom stabilitesini değiştirebileceği ve bunun da tümör (kanser) oluşumuna neden olabileceği ihtimalini taşır Kullanılabilecek kriyoprotektan miktarı düşük tutulabilse hücreler mükemmel bir şekilde korunurdu. Ancak, kriyoprezervasyon işleminin kriyoprotektan kullanılmadan veya düşük konsantrasyonlarda kullanımı ile gerçekleştirilmesinin hücre ve doku boyutunda oluşturduğu hasar nedeniyle bu mümkün olmamakta, uygulanan yöntemlerde en düşük konsantrasyonda kriyoprotektan ve hücre/doku viabilitesinin en iyi korunduğu yöntem tercih edilmektedir (Jenkins ve ark., 2012; Yong ve ark., in press).

2.3.3. Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamalarında Kriyoprezervasyon

ÜYT merkezlerinde fertilitte koruma amaçlı ve/veya farklı endikasyonlarla tedavi programına alınan infertil çiftlerin germ hücrelerinin, gonad dokularının ve embriolarının saklanması kriyoprezervasyon yöntemi ile gerçekleştirilmektedir (Francisca, 2017; Hamish ve ark., 2004; Strauss ve Barbieri, 2013).

2.3.3.1. Sperm Kriyoprezervasyonu

Gelişen teknoloji ve artan ihtiyaçlar doğrultusunda ÜYT merkezlerinde sperm kriyoprezervasyonu için başvuran hasta sayısı giderek artmaktadır. 1990'lı yıllarda intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun (ICSI) uygulanması ile erkek infertilitesinde yeni bir çağ başlarken, cerrahi yolla epididimal veya testiküler sperm eldesi ve batılı ülkelerde donör sperm kullanılması spermin dondurularak saklanması zorunlu hale getirmiş ve sperm kriyoprezervasyonunun hızlı bir şekilde gelişmesini sağlamıştır (Cıncık, 2003; Veeck ve ark., 1993). Sperm kriyoprezervasyonu ilk kez 1949 yılında Polge ve arkadaşları (1949) tarafından kriyoprotektan olarak gliserol kullanımı ile gerçekleştirilmiştir. Sperm kriyoprezervasyonu sonrası elde edilen ilk gebelik ise

dondurulan donör spermlerin intrauterin inseminasyonu ile 1954 yılında Bunge ve arkadaşları tarafından elde edilmiştir (Bunge ve ark., 1953). Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi ilaçları veya radyoterapinin erkek üreme sistemi üzerinde kalıcı hasarlar bıraktığı bilinmektedir (Marvin, 2013). Dolayısıyla infertil erkeklere uygulanan sperm kriyoprezervasyonunun yanı sıra, puberte öncesi çocuklar veya partneri olmayan hastalara kemoterapi-radyoterapi ve/veya cerrahi tedavi öncesi ve sonrasında fertilitenin korunması amacıyla gonad dokusu ve/veya sperm kriyoprezervasyonu yapılmaktadır. Üreme sağlığının korunması, kemoterapi ve radyoterapi alan hastaların yaşam kalitesini garanti altına almak için büyük önem taşır (Thomson ve ark., 2003). Ayrıca kimyasal veya fiziksel toksisite, hastalık veya genetik yatkınlık herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir ve germ hücrelerinin azalmasına ya da yok olmasına neden olabilir. Bu endikasyonlara sahip erkek hastaların germ hücrelerinin, gonad dokularının kriyoprezervasyonu ileriki dönemlerde çocuk sahibi olabilmeleri için bir şans oluşturmaktadır.

2.3.3.1.1. Sperm Kriyoprezervasyon Protokolleri; Kriyoprotektanlar, Taşıyıcılar

Kriyoprezervasyon yönteminde kullanılan kriyoprotektanlar, taşıyıcılar ve kullanılan yöntemin büyük önemi vardır. Çözme işlemleri de hücre viabilitesi açısından büyük titizlikle yapılmalıdır. ÜYT merkezlerinde sperm kriyoprezervasyonu için kullanılan tek bir protokol yoktur. Yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemlerinin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur (Bunge ve ark., 1953; Francisca, 2017; Hamish ve ark., 2004; Picton ve ark., 2015; Polge ve ark., 1949; Strauss ve Barbieri, 2013). Sperm kriyoprezervasyonunda yaygın olarak kullanılan yöntem vitrifikasyondur. Vitrifikasyon yöntemi ile hücre viabilitesi, motilitesi ve konsantrasyonunun daha iyi korunduğunu rapor eden birçok çalışma mevcuttur (Grangade, 2013; Hamish ve ark., 2004; Strauss ve Barbieri, 2013). Tercih edilen kriyoprotektanların büyük bölümü sükröz içerikli ticari solüsyonlardır (Morris ve ark., 1999).

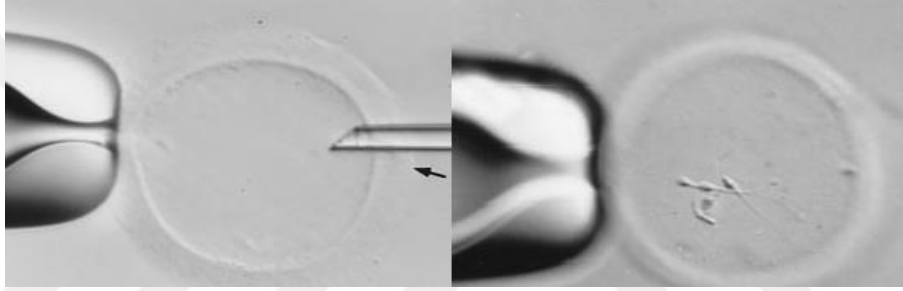
Sperm kriyoprezervasyonu yaygın olarak vitrifikasyon ile gerçekleştirilse de, kriyoprezervasyon taşıyıcıları farklılık göstermektedir (Cohen ve ark., 1996; Endo ve ark., 2011; Gil-Saolm ve ark., 2000; Herrler ve ark., 2006; Isaev ve ark., 2007;

Kadıoğlu ve ark., 2011; Lane ve ark., 1999; Serini ve ark., 2008). Sperm konsantrasyonu yüksek olan hastaların spermilerinin dondurulması kolay ve uygulanabilir. özme sonrası oluşan viabilite, motilite ve konsantrasyon azalması, sperm konsantrasyonu yüksek olan hastalarda göz ardı edilebilir. Düşük konsantrasyonda ya da sınırlı sayıda spermi olan hastalarda ise bu önemli bir kayıptır. Yüksek konsantrasyonlu semen örnekleri yüksek hacimlerde saklanabilirken, düşük konsantrasyonlu semen örneklerinin ise düşük hacimlerde saklanması pratik uygulamada daha etkin olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda sperm kriyoprezervasyonunda vialler kullanılmaktadır. Bu uygulama, pratik kullanımda numune tanklarında çok yer kaplaması ve kullanılmak üzere özlen yüksek volümdeki materyalin tamamının kullanılmaması durumunda, numunenin tekrar dondurulması gerekliliği de gözönüne alındığında hem maliyetli olmakta hem de numune kaybına neden olmaktadır. Düşük volümlü örneklerde bu hücre kaybının fazlalığı araştırmacıları farklı taşıyıcıların kullanımına yönelmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Düşük hacimde sperm kriyoprezervasyonu için kullanılan taşıyıcılar (Grangade, 2013)

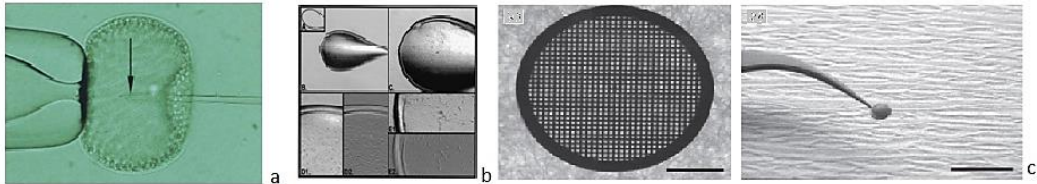
Taşıyıcı	Avantajları	Dezavantajları	Yorumlar
Boş zona (fare hamster veya insan)	Muamele etmesi kolay Sperm geri dönüşü ve sağ kalımı	İnsan veya insan olmayan biyolojik materyal Yoğun iş gücü Mikromanipulasyon gerektirir Zona kılıfın hazırlanması zor	Başarılı gebelik
Cryoloop	Piyasadan temin edilebilir	Yoğun iş gücü Mikromanipulasyon gerektirir	Başarılı gebelik
Mini strawlar Açık-strawlar	Kolay ve basit teknik	Düşük hacim veya sayıda sperm için uygun değil	Oligospermik örneklerde kullanılabilir
ICSI pipeti	Piyasadan temin edilebilir Her IVF laboratuvarında bulunur	Kırılgan cam materyal Depolanması zor Sıvı nitrojende tutulması zor	Raporlanmış gebelik yok
Mikrodropletler	Kolay ve basit teknik	Depolanması zor Sıvı nitrojende tutulması zor Sıvı nitrojende depolanan kültür kapları kırılabilir Değişiklik gösteren geri dönüş oranları	Başarılı gebelik Otoritelerce kabul görmedi
Volvoks küre algi	Ucuz Ulaşılabilir	İnsan olmayan biyolojik materyal Yoğun iş gücü Hazırlanması zor	Klinik insan uygulamalarına uygun değil
Alginat damlalar Agaroz mikroküreler	Taşıyıcı olarak soy polimerler kullanılır	Çok yoğun iş gücü	Raporlanmış kimyasal gebelik yok
Cryotop	Piyasadan temin edilebilir Kolay kullanım ve yükleme		Sperm geri dönüşü ve sağ kalımı boş zona ile aynı

Cohen ve arkadaşlarının (1997) yaptığı bir çalışmada az sayıda sperm örneği boş zona pellusida içinde saklanabildiğini bildirmişlerdir (Şekil 5). Lane ve arkadaşları (1999) embriyo saklamada kullanılan cryo loopları düşük hacimde sperm materyalinin depolanmasında kullanmışlar ve rapor etmişlerdir. Bu tekniklerde; yoğun iş gücü, fazla zaman ve manipulasyon gerektirse de az sayıda sperm kriyoprezervasyonu için bir fırsat sunmaktadır. Boş zona pellusida ve cryo loop tekniklerinde olduğu gibi az sayı ve hacimdeki dondurulmuş sperm materyalinin depolanmasında mikrodroplar (Gil-Saolm ve ark., 2000; Serini ve ark., 2008), agaroz mikro küreler (Herrler ve ark., 2006; Isaev ve ark., 2007) ve cryotopların (Endo ve ark., 2011) kullanıldığı ve düşük hacimde etkinliği bildirilmiştir.



Şekil 5. Empty zona içinde sperm kriyoprezervasyonu (Cohen ve ark., 1997).

Sperm dışı diğer hücrelerin ve dokuların kriyoprezervasyonu sonrası kullanılan farklı taşıyıcıların değerlendirildiği bir çalışmada, ovaryan doku örnekleri küçük parçalara ayrılarak elektron mikroskobik preparasyonda kullanılan bakır gridleri üzerinde dondurulmuştur (Şekil 6) (Kadioğlu ve ark., 2011).



Şekil 6. Kriyoprezervasyon taşıyıcıları (a. agaroz mikro küre içinde sperm kriyoprezervasyonu, (Herrler ve ark., 2006, Isaev ve ark., 2007) b. cryoloop üzerinde sperm kriyoprezervasyonu (Endo ve ark., 2011), c. elektron mikroskobu bakır gridleri üzerinde sperm kriyoprezervasyonu (Kadioğlu ve ark., 2011).

2.3.3.1.2. Sperm Kriyoprezervasyonunun Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Kriyoprotektanlar ile ilk etkileşim, 0°C'nin altındaki sıcaklıklara kadar dondurma ve saklama, çözme işlemi ve kriyoprotektanların ortamdaki uzaklaştırılması; kriyoprezervasyon gerçekleştirilirken dikkat edilmesi gereken önemli aşamalarıdır. Kriyoprezervasyon için en uygun saklama sıcaklığı sıvı nitrojen sıcaklığı olan -196°C 'dir. Bu sıcaklığa ulaşıldıktan sonra geçen sürenin viabiliteyi etkilemediği gösterilmiştir (Cıncık, 2003; Delilbaşı, 2008). Sperm kriyoprezervasyonu sırasında oluşabilecek hasarlar ya düşük sıcaklığın doğrudan etkileri ya da buz oluşumuna bağlı fiziksel değişikliklerden kaynaklanabilmektedir. Ani ısı kaybı membran geçirgenliğindeki hücre iskeleti yapısındaki değişimlerden kaynaklanmaktadır (Elder ve Dale, 2013).

Sperm, yüksek membran akışkanlığı nedeniyle vitrifikasyondan dolayı oluşabilecek hasarlara duyarlı değildir. Bu membran akışkanlığını hücre zarındaki iki sıralı doymamış yağ asitleri ile sağlanmaktadır. Hücre içi sıvı yoğunluğunun az olması nedeniyle kriyoprotektan hasarından etkilenmemektedir (Meryman ve ark., 1977). Dondurma hasarları çözme sonrasında spermin motilitesini ve fertilizasyon kapasitesini olumsuz yönde etkilenmektedir. Dondurulan spermlerin ancak %50'si motilitelerini korumaktadırlar (Tunalı, 2011). Bu olumsuz etkileri en aza indirmek ve canlı-motil sperm sayısını en yüksek oranda tutabilmek için düşük hacimde sperm kriyoprezervasyonu önerilmektedir. Sperm konsantrasyonu ve motilitesi düşük olan örnekler için en ideal saklama koşulu düşük konsantrasyonda, fakat fazla sayıda örnek saklayabilmektir (Gangrade, 2013). Optimal saklama koşulları sağlandığı takdirde, kriyoprezervasyon süresinin uzunluğu sperm kalitesini etkilememektedir (Kadıoğlu, 2011). Sperm kriyoprezervasyonu kolay uygulanabilir olsa da çözme sonrası hücre kayıpları, viabilite ve motilitede azalma meydana gelmektedir (Gangrade, 2013). Testiküler sperm kriyoprezervasyonunda da çözme sonrası sperm kayıpları, viabilite ve motilitede azalma fazladır. Testiküler materyalde az sayıda sperm bulunduğundan çözme sonrası kayıplar önemlidir (Grangade, 2013).

Embriyoloji ve androloji laboratuvarlarında rutin uygulamada spermin viabilitesi öncelikli olarak motilite özelliği dikkate alınarak değerlendirilir (Delilbaşı, 2008; Nordhoff, 2015; WHO, 2010). Bununla birlikte immotil spermlerin viabilite olduğu ve oositi fertilize etme potansiyelinde olduğunu rapor eden çalışmalar

mevcuttur (Curi ve ark., 2003; Enginsu, 2010; Khalili ve ark., 1999). Ejakulattaki immotil spermilerin (Barros ve ark., 1998; Kahraman ve ark., 1996; Nijs ve ark., 1996; Vandervorst ve ark., 1997; Wang ve ark., 1997) ve testisten elde edilen immotil spermilerin (Nijs ve ark., 1996; Kahraman ve ark., 1997; Shulman ve ark., 1999) kullanıldığı ve bu spermilerin oositleri fertilize edip canlı doğum elde edildiği raporlanmıştır. İmmotil spermilerin canlı olup olmadığını değerlendirmek klinik açıdan önemlidir (WHO, 2010). Motilitenin olmadığı hastalarda, immotil spermilerin canlılığının tespiti için birçok test uygulanabilmektedir (Nordhoff, 2015). İmmotil sperm hücrelerinin viabilitesi vital boyaların kullanımıyla veya uygulanan teste göre boya tutma özelliği veya hipotonik şişme testi (HOS) ile değerlendirilir (WHO, 2010). Bu testlerde hücre membran bütünlüğü değerlendirilmektedir. Hasarlı membrana sahip sperm hücrelerine uygulanan vital boyalar (eozin-Y, eozin-negrozin) hücre membranından geçer. Böylelikle boyanma özelliklerine göre hücrenin canlı olup olmadıkları değerlendirilir. Bu teknik uygulanan hücrelerin invitro fertilizasyon (IVF) ya da intrasitoplazmik sperm ejeksiyonu (ICSI) için kullanımı mümkün değildir, hücre bu işlemde sonra imha edilmektedir. ICSI uygulamalarında immotil sperm viabilitesi HOS testi ile değerlendirilir. Bu teknik canlı hücrelerin hipotonik sıvılarda şişmesi ilkesine dayanır (WHO, 2010).

HOS testi sağlam hücre membranının yarı geçirgen özelliğinden yararlanarak hipoozmolar bir ortamda sperm içine su alarak şişmesi ve kuyruk bölümünde kırılma esasına dayanır. Spermilerin boyanmasından kaçınıldığı ve canlılığından emin olunduktan sonra kullanılması gerektiği durumlarda, sperm seçerken, toksik etkisinin olmaması nedeniyle HOS testi güvenle kullanılabilir (Ok ve ark., 2008).

2.4. Çalışmanın Amacı

Fertilitenin korunması amacıyla ya da ÜYT uygulamalarında sperm sayısının az olduğu olgularda sperm hücreleri dondurularak saklanmaktadır. Bu hastalarda çoğunlukla sperm konsantrasyonu düşük olmakta, dolayısıyla dondurup çözme sonrası hücre kaybı başarı şansını düşürmektedir. Ayrıca bu hastalara uygulanacak tedavi yaklaşımlarında (özellikle ICSI uygulamalarında) kullanılacak sperm materyalinde konsantrasyondan ziyade viabilite ve motilitenin korunması ön

plana çıktığı için, sperm materyalini düşük konsantrasyonlarda dondurup saklayacak efektif bir yöntemin varlığı klinik pratikte önem arz etmektedir.

Bu çalışmada; normal ve düşük sperm konsantrasyon ve/veya motilitesine sahip hasta semen örneklerinin küçük volümler halinde mikroskopik preparasyonda kullanılan bakır gridler üzerinde vitrifikasyonu ve çözme sonrası sperm konsantrasyonu, motilitesi ve viabilitesini değerlendirerek bu tekniğin geçerliliğini araştırmak amaçlanmıştır.



2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Etik Kurul Onayı

Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 01 Kasım 2016 tarihli 2016-18/34 sayılı kararı ile onay alınmıştır. Çalışmanın tüm aşamaları Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nin Embriyoloji ve Androloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. ÜYT merkezine spermiyogram analizi ve ÜYT uygulaması amacıyla başvuran 33 hastanın semen örneği, hastalardan çalışmaya katılımları için sözlü bilgilendirme yapıldıktan ve gönüllü/hasta katılım formu alındıktan sonra çalışma kapsamına alınmıştır.

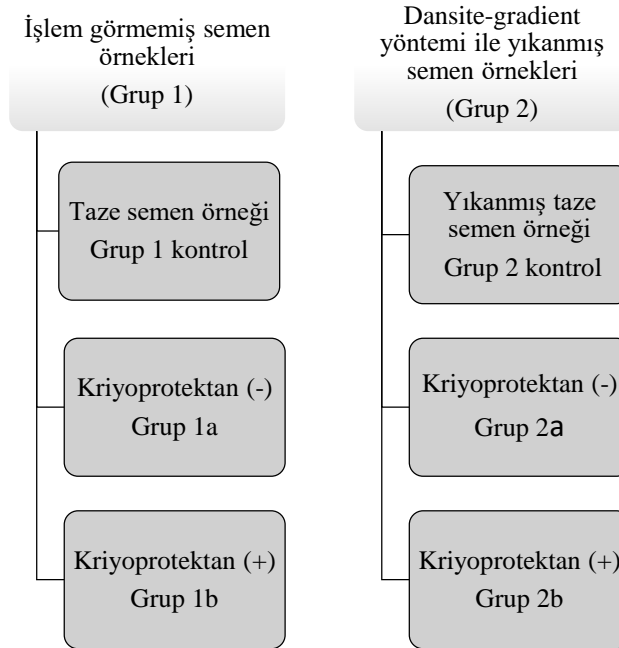
3.2.Semen Örneklerinin Sınıflandırılması ve Hasta Seçimi

Çalışma kapsamına Nisan 2017- Haziran 2017 tarihleri arasında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi ÜYT merkezine başvuran spermiyogram hastalarına ve ICSI tedavisine alınan hastaların işlem sonrası artan semen örnekleri alındı. Hastaların semen örnekleri; sperm konsantrasyonu ve motilite oranına göre 4 gruba ayrıldı. 12 adet normozoospermik (Dünya Sağlık Örgütüncü belirlenmiş parametreler: semen volümü 1,5 ml'den fazla, en az 15mil/ml sperm konsantrasyonunda, en az %40 hareketli spermi bulunan ve morfolojik olarak %4 normal sperme sahip hastalar), 4 adet oligozoospermik (15 mil/ml den az sperm konsantrasyonuna sahip olanlar), 8 adet astenozoospermik (hareketli sperm sayısı %40'tan az olan hastalar) ve 9 adet oligoastenoteratozoospermik (OAT) (1,5 ml den az semen volümü, 15mil/ml'den az sperm konsantrasyonunda, %40'tan az hareketli spermi bulunan ve morfolojik olarak %4'ten az normal sperme sahip hastalar) çalışmanın klinik alt gruplarını oluşturdu (Şekil 7).



Şekil 7. Çalışmaya dâhil edilen hasta grupları ve sayıları

Herbir hastanın semen örneği ikiye ayrıldı. Semen yarısı yıkama işlemi uygulanmayan, işlem görmemiş semen materyalini (Grup 1), diğer yarısı dansite gradient yöntemi ile yıkanmış semen materyalini (Grup 2) oluşturdu. Bu iki ana grup taze, vitrifikasyon uygulanmayan örnek (1 kontrol, 2 kontrol), vitrifikasyon işleminde kriyoprotektan kullanılmayan (1a, 2a) ve kullanılan (1b, 2b) gruplar olmak üzere üç alt gruba ayrıldı (Şekil 8).



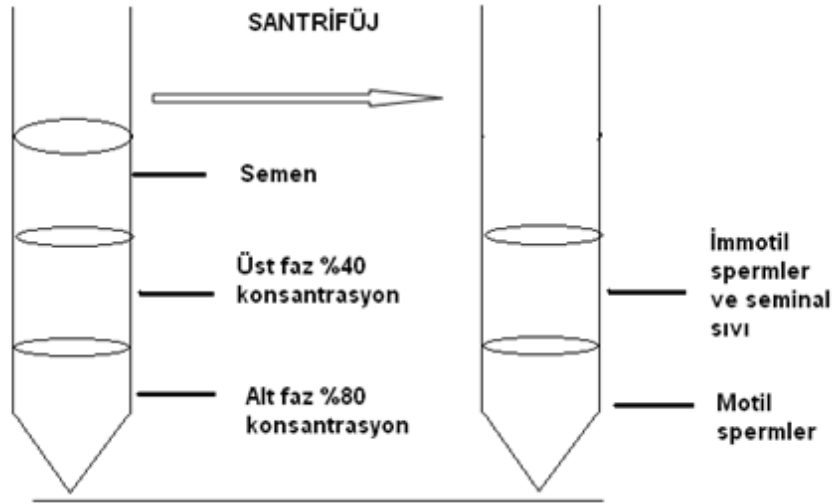
Şekil 8. Teknik Gruplar

3.3. Semen Örneklerinin Hazırlanması

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi ÜYT merkezine spermiyogram analizi için başvuran hastalardan ve ÜYT başlanmış, yumurta toplama günü gelen erkek hastalardan, 3 gün cinsel perhiz sonrası semen örneği alındı. 30 dakika likefaksiyon süresinin dolması beklendikten sonra örnekler konik santrifüj tüpüne alınarak, hacimleri kaydedilip sperm sayma kamarası ile konsantrasyon ve motilitesi değerlendirildi. Spermiyogram hastalarının semen örneklerinin tamamı semen parametrelerinin değerlendirilmesi sonrası çalışmaya dahil edildi. ICSI uygulamasına alınacak hastalara ait semen örneklerinin yarısı, semen parametreleri değerlendirildikten sonra, yıkama işlemi yapılmadan çalışmaya alındı. Semen diğer yarısı dansite-gradient yöntemi ile yıkandıktan sonra ICSI işleminde kullanılarak, artan materyal çalışmaya dahil edildi.

3.3.1. Dansite-Gradient Yöntemi ile Yıkama

Semen örnekleri likefaksiyon sonrası, volümüne göre farklı sayıda konik santrifüj tüplerine bölünerek (her tüpte 1ml semen olacak şekilde), filtre görevi yapan farklı %40 ve %80 konsantrasyondaki gradient solüsyonları ile yıkandı (SpermGrad, Vitrolife, İsviçre). Konik tüpe önce yüksek konsantrasyonda gradient solüsyonu (%80) konuldu, onun üzerine düşük konsantrasyonda gradient solüsyonu (%40), en üste semen örneği eklendi. Semen ve solüsyonların tüpe yüklenmesi esnasında birbirine karışmamasına dikkat edildi. Tüpler 15 dakika 500 g'de santrifüj edildi. Süpernatantlar pastör pipeti yardımı ile atılarak, tüpün dibinde kalan pelletler birbiri üzerine eklenerek tek tüpte birleştirildi. Üzerine 3 ml yıkama solüsyonu (SpermRinse, Vitrolife, İsviçre) eklenen pellet pipetlenip homejen hale getirildikten sonra 10 dakika 300 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak, pellet üzerine 3 ml yıkama solüsyonu eklendi ve 10 dakika 300 g' de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, kalan 0,5 ml pellet 5 ml'lik tüpe alınarak, 37°C, %5 CO₂ ve %99 nem ortamı oluşturan inkübatörde bekletildi (Şekil 8).



Şekil 9. Dansite-gradient yöntemi

3.4. Vitrifikasyon İşlemi

Semen örneklerinden elde edilen yıkanmamış (Grup1) ve dansite-gradient yöntemi ile yıkanmış (Grup 2) numunelerin Grup 1 ve 2 kontrol gruplarının değerlerini belirlemek amacıyla makler kamara ile konsantrasyon ve motilitesi değerlendirildi ve her iki grupta numuneler Grup 1a-1b ve Grup 2a-2b'yi oluşturmak üzere ikişer alt gruba ayrıldı. Alt gruplardan birine kriyoprotektan kullanılmadan (Grup 1a ve Grup 2a), diğerine kriyoprotektan kullanılarak (Grup 1b ve Grup 2b) vitrifikasyon işlemi uygulandı.

3.4.1. Kriyoprotektan kullanılmayan grupların vitrifikasyonu

Likefiye semen örneklerinden (Grup 1a) ve yıkanmış semen örneklerinden (Grup 2a) ayrı ayrı 10 µl alındı, bakır gridler üzerine yüklendi ve likit nitrojen içine batırıldı. Likit nitrojen içinde bulunan, hastanın adı-soyadı, vitrifikasyon tarihi ve çalışma grubu yazılarak etiketlenen vialler içine gridler geçirildi (vial içine gridlerin konulması işlemi likit nitrojen içinde gerçekleştirildi). Her hastanın tüm gruplarına ait vitrifiye edilen semen örnekleri için birer grid kullanıldı. Likit nitrojen içinde bulunan vial, yine likit nitrojen içinde, hastanın adı-soyadının, tarihin ve çalışma grubunun yazıldığı kanelere takılarak saklanmak üzere likit nitrojen tankına konuldu.

3.4.2. Kriyoprotektan kullanılan grupların vitrifikasyonu

Kriyoprotektan kullanılan gruplarda, vitrifikasyon protokolünde hazır ticari kit kullanıldı (Freezing Medium, Irvine Scientific, Hollanda). Vitrifikasyon kitinin

kullanma talimatına uyularak, -20°C de saklanan kit önce oda sıcaklığına getirildi, ardından 5 ml'lik tüplere ortalama 0,5 ml olacak şekilde eşit miktarda bölündü. İhtiyaç fazlası tüpler tekrar -20°C'de muhafaza edildi.

Likefiye semen örneklerinden (Grup 1b) ve yıkanmış semen örneklerinden (Grup 2b) ayrı ayrı 5 µl alındı ve lam üzerine konuldu (Şekil 10). Numune üzerine ayrı ayrı 5 µl kriyoprotektan eklenip mikropipet ile pipetaj yapılmak sureti ile karıştırıldı. 10 µl'lik karışımlar farklı bakır gridler üzerine yüklendi ve likit nitrojen içine batırıldı. Likit nitrojen içinde bulunan, hastanın adı-soyadı, vitrifikasyon tarihi ve çalışma grubu yazılarak etiketlenen vialler içine gridler geçirildi (vial içine gridlerin konulması işlemi likit nitrojen içinde gerçekleştirildi). Likit nitrojen içinde bulunan vial, yine likit nitrojen içinde, hastanın adı-soyadının, tarihin ve çalışma grubunun yazıldığı kanelere takılarak saklanmak üzere likit nitrojen tankına konuldu.

3.5. Numunelerin Grid Üzerine Yüklenmesi

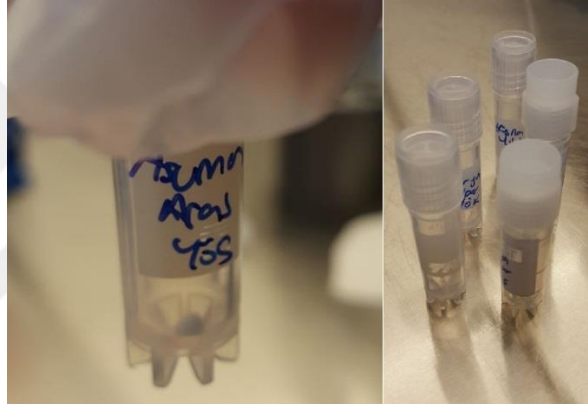
Dondurulan materyalin likit nitrojen içinde depolanması amacıyla taşıyıcı olarak kullanılan bakır gridler (200 mesh), vitrifikasyon öncesi gazlı bez içine yerleştirildi ve sterilizasyon ünitesine gönderildi. Vitrifikasyon ve grid üzerine yükleme işlemi embriyoloji ve androloji laboratuvarlarında çalışma kabini içinde gerçekleştirildi. Saf semen yada kriyoprotektan ile karıştırılmış semen örnekleri mikropipet yardımıyla bakır gridler üzerine yerleştirilerek, hemen likit nitrojen içine batırıldı (Şekil 10, 11). Numune yüklenmiş gridler likit nitrojen içinde bekletilen etiketlenmiş (Şekil 12) cryovialler içine alındı.



Şekil 10. Semen drobu ve kriyoprotektan drobunun karıştırılması ve semen drobunun mikropipet yardımıyla grid üzerine yüklenmesi



Şekil 11. Vitrifikasyon öncesi grid üzerine yüklenen semen örneği ve grid üzerine yüklenen semen örneğinin vitrifikasyon sonrası (likit nitrojene batırılmış) görünümü



Şekil 12. Grid depolamada kullanılan, etiketlenmiş cryovialler

Çalışma gruplarına yapılan işlemler aşağıda verilmiştir;

- Grup 1; Likefaksiyon sonrası yıkanmamış semen
- Grup 1 kontrol; Likefiye olmuş, vitrifikasyon öncesi saf semen
- Grup 1a; Saf semen+ grid üzerine yükleme+likit nitrojende depolama
- Grup 1b; Saf semen-kriyoprotektan karışımı+ grid üzerine yükleme+likit nitrojende depolama
- Grup 2; Likefiye olduktan sonra dansite-gradient yöntemi ile yıkanmış semen
- Grup 2 kontrol; Likefiye olmuş, yıkanmış, vitrifikasyon öncesi saf semen

- Grup 2a; Yıkanmış semen+ grid üzerine yükleme+likit nitrojende depolama
- Grup 2b; Saf semen-kriyoprotektan karışımı+ grid üzerine yükleme+likit nitrojende depolama

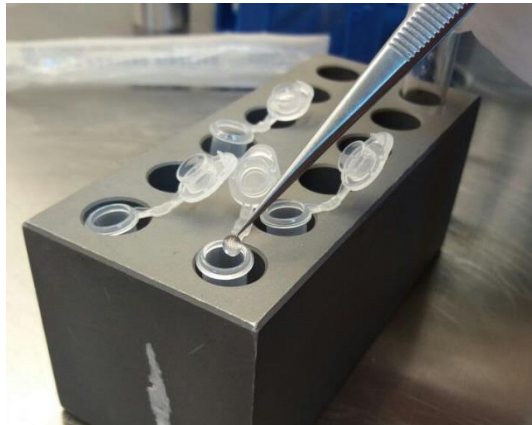
3.6. Dondurulan Semen Örneklerinin Çözülmesi

Androloji laboratuvarındaki çalışma kabini içinde, hastanın adı-soyadı ve grup adı yazılarak etiketlenmiş steril 500 μ l'lik eppendorf tüpleri ısıtılmış taşıyıcı bloğa yerleştirildi. Eppendorf tüplerine 80 μ l fertilizasyon solüsyonu (G-IVF, Vitrolife, İsviçre) eklendi (Şekil 13). Likit nitrojen içeren saklama tankında muhafaza edilen vialler azot dolu strafor kaba alınarak çalışma kabinine taşındı.



Şekil 13. Eppendorf tüplerin çözme işlemi için hazırlanması

Likit nitrojen içeren vialler içindeki gridler, penset yardımı ile viallerden alınıp eppendorf tüpleri içindeki kültür solüsyonuna kondu (Şekil 14). Bakır grid eppendorf tüpünün dibine düşene kadar vorteks yardımı ile düşük hızda çalkalandı.

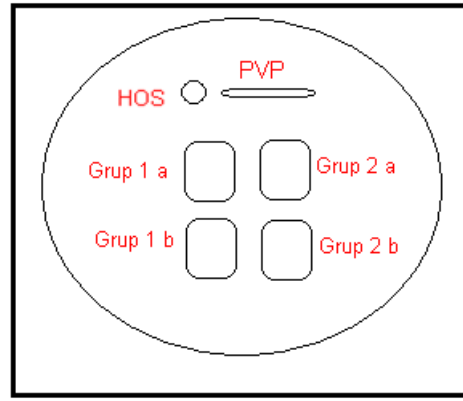


Şekil 14. Gridlerin eppendorf tüplerine aktarılması

3.7. Çözme Sonrası Sperm Konsantrasyon, Motilite ve Viabilitesinin Değerlendirilmesi

Kültür solüsyonu ve içinde çözölen sperm materyalinin iyice karışması sağlandıktan sonra, karışımdan 20µl alınarak makler sperm sayma kamarasına damlatıldı ve sperm konsantrasyonu ve motilitesi değerlendirilip kaydedildi.

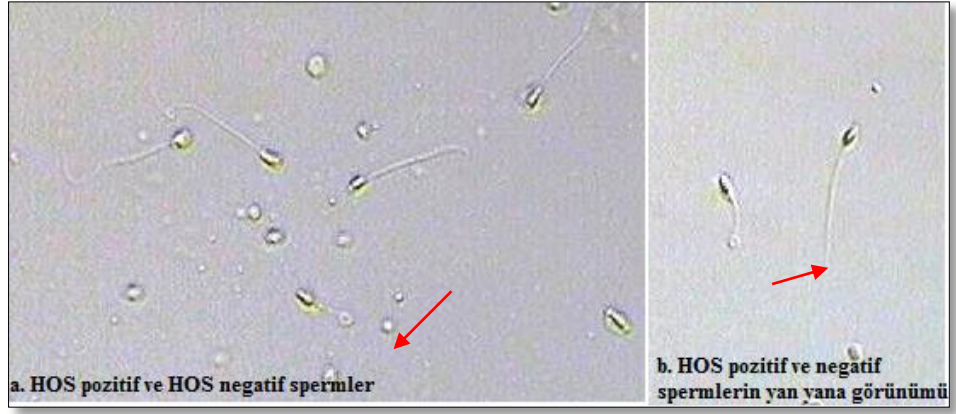
İmmotil spermelerin viabilitesini değerlendirmek amacıyla, kültür solüsyonu içindeki spermeler ICSI kabına drop halinde yayıldı ve HOS testi ile hareketsiz spermelerin viabilitesi tayin edildi (Şekil 15).



Şekil 15. Hazırlanan ICSI kabının şematik çizimi

Herbir hastaya ait 4 çalışma grubunu oluşturan sperm örnekleri aynı ICSI kabında değerlendirildi. ICSI kabına spermelerin mikroenjeksiyon pipeti kullanılarak taşınmasını kolay sağlamak ve spermelerin pipete yapışmasını önlemek amacıyla polivinilprolidon (PVP) drobu ve hipoosmotik solüsyon drobu (HOS; 1:1 kültür solüsyonu ve distille su) oluşturuldu. Aynı hastaya ait Grup 1a, Grup 1b, Grup 2a ve Grup 2b protokolü uygulanmış örneklere ait sperm dropları ICSI kabına Şekil 16'da gösterildiği şekilde yerleştirildi.

Inverted mikroskop yardımıyla, ICSI kabındaki sperm droplarından, 4 gruba ait dropların herbirinden toplanan 100 tane immotil sperm mikroenjeksiyon pipeti yardımıyla HOS drobuna alındı. Sperm kuyruk yapısındaki değişiklikler değerlendirilerek, sperm viabilitesi yüzdesi kaydedildi. Kuyruğu kıvrılan spermeler canlı olarak, kuyruğunda değişiklik olmayan spermeler ölü olarak değerlendirildi (Şekil 16). Canlı spermelerin sayısı ile değerlendirilen 100 adet sperm oranlandı ve viabilite her grup için ayrı ayrı hesaplandı.



Şekil 16. HOS pozitif ve HOS negatif spermilerin değerlendirilmesi a. HOS pozitif ve HOS negatif spermiler b. HOS pozitif ve negatif spermilerin yan yana görünümü

Total viabilite hesaplamaları ise immatür spermilerin viabilitesi değerlendirildikten sonra;

Total Viabilite= %Motil sperm + (%İmmotil sperm x %HOS(+)) sperm)denklemine göre hesaplandı.

3.8. İstatiksel Analizler

İstatiksel analizler SPSS version 16.0 (IBM, 2016) analiz programı ile gerçekleştirildi. İkili karşılaştırmalar T-test ve Mann Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Grupların birlikte karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanıldı ve $p < 0.008$ anlamlı kabul edildi. Gruplar arası korelasyon Pearson ve Sperm korelasyon testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Yıkama Öncesi ve Sonrası Sperm Konsantrasyon ve Motilitelerinin Karşılaştırması

Çalışma kapsamında 33 hastanın semen örneği değerlendirildi. Örneklerin konsantrasyon ve motiliteleri, dansite gradient yöntemi ile yıkanmadan önceki (Grup 1 kontrol) ve sonraki (Grup 2 kontrol) gruplar ile kriyo sonrası gruplara ait ortanca, minimum ve maksimum değerleri Tablo 6’da verildi. Gruplar arası konsantrasyon ve motilite karşılaştırması ve p değerleri Tablo 7’ de verildi.

Hastalara ait semen örneklerinin yıkama öncesi ve yıkama sonrası konsantrasyon ve motilitelerinin istatistiksel değerlendirmeleri Wilcoxon testi kullanılarak yapıldı. Tüm örnekler klinik alt grupları dikkate alınmaksızın değerlendirildiğinde Grup 1 kontrol ve Grup 2 kontrol konsantrasyon değerleri ve motilite oranları arasında anlamlı farklılık görülmedi (sırasıyla $p=0,87$ ve $p=0,17$) (Tablo 6 ve Tablo 7).

4.2. Yıkanmamış Örneklerin Kriyoprezervasyon Öncesi ve Sonrası Konsantrasyon ve Motilitelerinin Karşılaştırması

Çalışmaya katılan Grup 1 kapsamında değerlendirilen 33 işlenmemiş semen örneğinin kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası konsantrasyon ve motilitelerinin Mann Whitney U testi uygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırılması yapıldı. Değerlendirme Grup 1 kontrol/Grup 1a ve Grup 1 kontrol/ Grup 1b arasında yapıldı. Gruplara ait ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri Tablo 6 ve Tablo 7’de verildi.

Konsantrasyon açısından bakıldığında, Grup 1 kontrol- Grup 1a ve Grup 1 kontrol- Grup 1b karşılaştırmalarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü. İşlenmemiş semen örneklerinin konsantrasyonları kit kullanılmadan dondurulup çözülen örneklerde anlamlı olarak düşmüştür (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,001$).

Motilitelerin istatistiksel değeriendirilmeleri Mann Whitney U testi uygulanarak yapıldı ve Grup 1 kontrol- Grup 1a ve Grup 1 kontrol- Grup 1b karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görüldü. İşlenmemiş semen örneklerinin motiliteleri kit kullanılmadan dondurulup çözülen örneklerde anlamlı olarak düştüğü görüldü (sırasıyla $p=0,006$ ve $p<0,001$).

4.3. Dansite Gradient Yöntemi İle Yıkanmış Örneklerin Kriyoprezervasyon Öncesi ve Sonrası Konsantrasyon ve Motilitelerinin Karşılaştırılması

Çalışma dahilinde değeriendirilen 33 dansite gradient yöntemi kullanılarak yıkanmış semen örneklerinin kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası konsantrasyon ve motilitelerinin Mann Whitney U testi uygulanarak istatistiksel olarak karşılaştırılması yapıldı. Değeriendirme Grup 2/Grup 2a ve Grup 2/ Grup 2b arasında yapıldı. Gruplara ait ortanca, minimum, maksimum ve p değerieleri Tablo 6 ve Tablo 7'de verildi.

Konsantrasyon açısından bakıldığında, Grup 2 kontrol- Grup 2a ve Grup 2 kontrol- Grup 2b karşılaştırmalarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü. İşlenmemiş semen örneklerinin konsantrasyonları kit kullanılmadan dondurulup çözülen örneklerde anlamlı olarak düşmüştür (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,001$).

Motilitelerin istatistiksel değeriendirilmeleri yapılırken arasındaki istatistiksel değeriendirme Mann Whitney U testi uygulanarak yapıldı ve Grup 1 kontrol- Grup 1a ve Grup 1 kontrol- Grup 1b karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görüldü. İşlenmemiş semen örneklerinin motiliteleri kit kullanılmadan dondurulup çözülen örneklerde anlamlı olarak düştüğü görüldü (sırasıyla $p=0,002$ ve $p=0,002$)

4.4. Kriyoprezervasyon İşlemi Uygulanan Örneklerin Çözme Sonrası Konsantrasyon, Motilite, Viabilite ve Total Viabilitelerinin Karşılaştırılması

Çözme sonrası işlenmemiş semen örnekleri ve dansite gradient yöntemi ile yıkanmış semen örneklerinin konsantrasyon ve motilitelerinin karşılaştırılmaları Kruskal Wallis testi kullanılarak, viabiliteleri One-Way ANOVA testi kullanılarak değeriendirildi. Kruskal Wallis testi sonuçlarına göre konsantrasyonlar

değerlendirildiğinde, gruplar arasında (Grup 1a, Grup 1b, Grup 2a ve Grup 2b) anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,23$). Motiliteler değerlendirmesinde Kruskal Wallis testi uygulandı ve gruplar arasında (Grup 1a, Grup 1b, Grup 2a ve Grup 2b) anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,61$). İmmotil spermilerin viabilite değerlendirmeleri One-Way ANOVA testi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında (Grup 1a, Grup 1b, Grup 2a ve Grup 2b) anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,40$). Total viabilite değerlendirmeleri One-Way ANOVA testi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında (Grup 1a, Grup 1b, Grup 2a ve Grup 2b) anlamlı farklılık görülmedi ($p=0,33$) (Tablo 8). İstatiksel olarak anlamlılık görülmemesi nedeniyle, gruplar arasında ikili karşılaştırma yapılmadı.

Tablo 6. Kontrol grupları ve kriyoprezervasyon sonrası çözülen örneklerle ait ortalama, minimum ve maksimum değerleri

	Gruplar	Ortanca (medyan)	min-max değer
Konsantrasyon	Grup 1 kontrol	18,00	0,80-112,00
	Grup 1a	1,60	0,03-16,00
	Grup 1b	0,60	0,00-15
	Grup 2 kontrol	14,00	0,00-97,00
	Grup 2a	2,40	0,01-12,00
	Grup 2b	0,70	0,02-19,00
Motilite (%)	Grup 1 kontrol	35,00	0,00-43,00
	Grup 1a	0,00	0,00-50,00
	Grup 1b	0,00	0,00-50,00
	Grup 2 kontrol	11,00	0,00-90,00
	Grup 2a	0,00	0,00-31,00
	Grup 2b	3,00	0,00-41,00

Tablo 7 Gruplar arası konsantrasyon ve motilitelerin ikili karşılaştırmaları

Gruplar	Konsantrasyon p değeri	Motilite p değeri
Grup 1/ Grup 2	0,87	0,17
Grup 1/ Grup 1a	<0,001*	0,006*
Grup 1 / Grup 1b	<0,001*	<0,001*
Grup 2/ Grup 2a	<0,001*	0,002*
Grup 2/ Grup 2b	<0,001*	0,002*

Tablo 8. Kriyoprezervasyon sonrası çözülen örneklerle ait konsantrasyon, motilite, viabilite ve total viabilite değerlerinin ortalama, standart sapma değerleri ve gruplar arası karşılaştırma sonucu p değerleri

	Grup 1a	Grup 1b	Grup 2a	Grup 2b	p değeri
Konsantrasyon	1,60(0,03-16,00)	0,60(0,00-15,00)	2,40(0,01-12,00)	0,70(0,02-19,00)	0,23
Motilite	0,00(0,00-50,00)	0,00(0,00-50,00)	0,00(0,00-31,00)	3,00(0,00-41,00)	0,61
Viabilite	25,39(±1,34)	30,60(±1,46)	26,39(±1,32)	29,84(±1,75)	0,40
Total Viabilite	24,59(±1,33)	30,43(±1,46)	26,40(±1,32)	29,67(±1,75)	0,33

4.5. Kriyoprezervasyon İşlemi Uygulanan Örneklerin Çözme Sonrası Klinik Alt Gruplara Göre Konsantrasyon, Motilite, Viabilite ve Total Viabilitelerinin Karşılaştırılması

Yıkanmamış semen örnekleri ve dansite gradient yöntemi ile yıkanmış semen örneklerinin çözme sonrası klinik alt gruplara göre; konsantrasyon ve motilitelerinin karşılaştırmaları Kruskal Wallis testi kullanılarak, viabilite ve total viabilite değerlendirmeleri One-Way ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi.

Çalışma dahilinde normozoospermik olgulara ait 12 hasta numunesi, astenozoospermik olgulara ait 8 hasta numunesi ve OAT olgulara ait 9 hasta numunesi değerlendirildi. Oligospermik olgular, hasta sayısı az olması nedeniyle değerlendirme kapsamına alınmadı. Kruskal Wallis testi sonuçlarına göre klinik alt gruplara göre sperm konsantrasyonları değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi (sırasıyla $p=0,16$; $p=0,56$; $p=0,95$). Klinik alt gruplara göre sperm motilitesi değerlendirilirken Kruskal Wallis testi uygulandı ve gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi (sırasıyla $p=0,73$; $p=0,13$; $p=0,79$). İmmotil spermlerin viabilite değerlendirmeleri One-Way ANOVA testi kullanılarak yapıldı. Klinik gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi (sırasıyla $p=0,37$; $p=0,55$; $p=0,70$). Klinik alt grupların total viabilite değerlendirmeleri One-Way ANOVA testi kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi (sırasıyla $p=0,58$; $p=0,81$; $p=0,62$). İstatiksel olarak anlamlılık görülmemesi nedeniyle, gruplar arasında ikili karşılaştırma yapılmadı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada insan sperm hücrelerinin küçük volümler içinde bakır gridler üzerinde vitrifikasyonunun, sperm konsantrasyonu motilitesi ve viabilitesi üzerine etkisi ve kullanılabilirliği değerlendirildi. Düşük konsantrasyonlarda sperm materyalinin yeterli olduğu ICSI uygulamalarında, konsantrasyonun, motilitenin ve viabilitenin kabul edilebilir azalmalarıyla grid üzerinde vitrifikasyonun olumlu sonuçları gösterildi. Bu çalışma, literatürde insan sperm hücrelerinin vitrifikasyonunda bakır grid kullanılan ilk çalışmadır.

Seminal sıvının, fosfolipidlerden üretilen toksik etki ile sperm hücrelerinin sağ kalımını azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Aamdal ve ark., 1965; Pellicer-Rubio ve Combarrous, 1998; Sias ve ark., 2005). Seminal plazma, genellikle yıkama yöntemleri kullanılarak sperm hücrelerinden uzaklaştırılmaktadır (Coloma ve ark., 2010). Farklı yıkama protokollerinde sperm konsantrasyonu, motilitesi, viabilitesi ve sperm DNA fragmantasyonu oranlarının değiştiği bilinmektedir (Rex ve ark., 2016). Yapılan çalışmalar dansite gradient yönteminin sperm motilitesi ve viabilite oranını artırdığını göstermektedir (Santiago-Moreno ve ark., 2017). Özellikle semen parametrelerinin normal değerlerin altında olduğu olgularda tercih edilen yıkama yöntemi dansite-gradient yöntemidir (Fácio ve ark., 2016). Yapılan çalışmalar dansite-gradient yöntemi ile yıkama sonrası sperm parametrelerinin yıkama öncesi değerlerde kayıba neden olmadığı, hatta motilite ve viabiliteyi arttırdığı yönündedir (Fácio ve ark., 2016; Santiago-Moreno ve ark., 2017). Klinik pratikte, semen vitrifikasyonu endikasyonları arasında olan, ağır oligozoospermik, oligoastenozoospermik ve azospermik olguların TESE materyallerinin vitrifikasyonu öncesi tercih edilen yıkama metodu dansite-gradient yöntemidir. Bu nedenle, bu çalışmada dansite-gradient yöntemi ile yıkanan sperm materyallerinin vitrifikasyon sonuçları değerlendirmeye alınmıştır. Literatüre uyumlu şekilde, yıkama öncesi ve sonrası konsantrasyon ve motilite oranlarında anlamlı bir farklılık görülmemiştir.

Çalışma kapsamına alınan semen materyalleri, klinik pratikte semen vitrifikasyonunun erkek infertilitesi endikasyonları arasında bulunan klinik alt

gruplar oluşturulacak şekilde planlandı. Çalışmanın başlangıcında erkek infertilitesi endikasyonlarına göre gruplar; 10 hasta normozoospermi, 10 hasta oligozoospermi, 10 hasta astenozoospermi ve 10 hasta oligo-asteno-teratozoospermi olarak planlandı. Çalışma süresi boyunca ÜYT Merkezine başvuran ve çalışmaya katılmayı kabul eden hasta sayıları ile planlanan sayılara ulaşamaması nedeniyle normozoospermik olgular 12, oligozoospermik olgular 4, astenozoospermik olgular 8 ve oligoastenoteratozoospermik olgular 9 vaka ile sınırlı kaldı. Dolayısıyla klinik alt grupların kendi içinde istatistiksel analizinde oligozoospermik olguların metryalleri değerlendirme kapsamına alınmadı, sadece teknik alt grupların değerlendirme kapsamına alındı.

Yapılan çalışmalar, memeli sperminin dondurulup çözülmesinin sperm hücrelerine zarar verdiğini, bu hasarın boyutunun türler arasındaki farklılıklarına ve kriyoprezervasyon yöntemlerine bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir (Yeste, 2016). Dondurma işlemi gerçekleştirilirken ısının düşmesi ile hücre içi sıvının buz kristallerine dönüşümü söz konusudur. Kriyoprotektanlar hücre içindeki sıvının hücre dışına alınması ile hücrenin dehidrasyonunu gerçekleştirerek buz kristallerinin oluşumunu engeller (Gao ve Critser, 2000). Yapılan bu çalışmada, dansite gradient yöntemi ile yıkanmadan dondurulan semen örnekleri ile yıkama öncesi konsantrasyonları ve motiliteleri karşılaştırıldığında; hem kit kullanılmadan dondurulan saf semen örneklerinin hem de kit kullanılarak dondurulan semen örneklerinin konsantrasyonları ve motiliteleri vitrifikasyon uyguladıktan sonra istatistiksel olarak anlamlı azalmıştır. Literatürde farklı kriyoprezervasyon protokollerinde ve farklı taşıyıcıların kullanımında da sperm konsantrasyon, motilite ve viabilite kayıpları rapor edilmiştir (Cohen ve ark., 1997; Endo ve ark., 2011; Gil-Saolm ve ark., 2000; Herrler ve ark., 2006; Isaev ve ark., 2007; Lane ve ark., 1999; Serini ve ark., 2008). Bununla birlikte; yıkama yapılmayan ve yıkama uygulanan gruplarda dondurulan materyalin konsantrasyonu ve motilite oranı sabit olduğu ve aynı hastaya ait örneğin çalışıldığı göz önüne alındığında, kriyoprotektanın kullanılmadığı ve kullanıldığı gruplar arasında konsantrasyon ve viabilite kaybı açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır. Burada seminal sıvının kendisinin vitrifikasyon sürecindeki kriyoprotektan etkisinin rolü açıklayıcı bir faktör olabilir (Fitoussi ve ark., 2000). Fakat benzer sonuçların seminal sıvının uzaklaştırıldığı

yıkama sonrası grupta da görülmesi farklı bir açıklayıcı yaklaşımın gerekliliğini göstermektedir. Yıkama sonrasında, her ne kadar istatistiksel olarak bir anlamlılık bulunmasa dakonsantrasyon ve motilitenin daha yüksek olduğu sperm materyalinin dondurulmuş olması yıkama sonrasında vitrifiye edilen sperm örneklerinde seminal sıvı içeren örneklere benzer değerlerin elde edilmesinde açıklayıcı bir faktör olabilir. Kriyoprezervasyon yöntemleri arasında günümüzde sıklıkla tercih edilen yöntem olan vitrifikasyon protokolünde kriyoprotektan konsantrasyonunun yüksek tutulması ve kriyoprotektanın dondurulan hücrelere toksik etkisi dikkate alındığında (Francisca, 2017; Picton ve ark., 2015; Strauss ve Barbieri, 2013), bu çalışmada kriyoprotektan kullanılmadan grid üzerinde vitrifikasyon uygulamasının kriyoprotektan kullanılan gruba göre benzer sonuçlar vermesi pratik uygulamada hem çözülen hücrelerin viabilitesi açısından hem de dondurma protokolünün maliyeti açısından avantajlı olduğu ve tercih edilebileceği sonucunu vermektedir.

İmmotil sperm hücrelerinin canlılığını değerlendiren birçok çalışma mevcuttur (Curi ve ark, 2003; Enginsu, 2010; Khalili ve ark, 1999). Gerek kriyoprezervasyon öncesi gerekse kriyoprezervasyon sonrası immotil sperm hücrelerinin viabilitelerinin değerlendirilmesi farklı testler ile yapılmaktadır (Nordhoff, 2015). Hem ejakulattaki immotil spermelerin (Barros ve ark, 1998, Kahraman ve ark, 1996; Nijs ve ark, 1996; Vandervorst ve ark, 1997; Wang ve ark, 1997), hem de testiküler immotil spermelerin (Kahraman ve ark, 1997; Nijs ve ark, 1996; Shulman ve ark, 1999) kullanıldığı ve bu sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneklerinin olduğu ve canlı doğum elde edilebildiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Sperm canlılık testleri, hasarlı membranların vital boyalara geçirgenliği (Eozin Y testi) veya sağlam hücre membranının yarı geçirgenliği özelliğinden yararlanılarak hipoozmolar bir ortamda spermin içine su alarak şişmesi ve kuyruk bölümünde kıvrılma esasına dayanan hipoozmotik şişme testi (HOS) ile gerçekleştirilmektedir (Dünya Sağlık Örgütü, 2010). Boyama yöntemi ile canlılık tayini sonrası değerlendirilen sperm hücrelerinin test sonrası fertilizasyon protokolünde kullanılması mümkün değildir (Buckett, 2003). Rutin uygulamalarda, ICSI için kullanılacak sperm hücrelerinin boyanmasından kaçınıldığı ve canlılığından emin olunduktan sonra kullanılması gerektiğinden, sperm seçerken, toksik etkisinin olmaması nedeniyle HOS testi kullanılabilir (Ok ve ark, 2008). Bu

çalışmada, ÜYT uygulamalarında ICSI işleminde kullanılmak üzere dondurulacak, yani viabilite tayini sonrası fertilizasyon için kullanılacak sperm materyalinin değerlendirmesi amaçlandığı için, immotil spermlerin viabilite tayininde HOS testi kullanılmıştır.

Rutinde fertilite koruma amaçlı semenler yıkanmadan sadece santrijüj edilerek saklanırken, mikro cerrahi yöntemi ile testisten (TESE) veya epididimisten (TESA) elde edilen spermler biyopsi yada aspirasyon materyalindeki diğer hücrelerin ve ROS'ların eliminasyonu amacıyla yıkama sonrası vitrifiye edilir (Grangade, 2013). Bu hastalar hücre sayısının çok az olduğu ve dondurulup-çözme sonrası konsantrasyonu, motilitesi ve viabilitesi açısından hücre kaybının direkt ÜYT başarısını etkilediği olgulardır. Dolayısıyla laboratuvar ortamının suboptimal şartlarda olduğu ünitelerde yıkama protokolünün yanlış seçilmesi yada hatalı uygulanması durumunda oluşacak hücre kaybı ÜYT başarısını olumsuz etkileyecektir. Bu çalışma ile semen örneğinin yıkanmadan veya yıkanarak saklanması arasında bir farklılık olmadığı görülmüştür, bu tip olgularda direkt olarak semenin vitrifikasyonunun tercih edilebileceği sonucunu ortaya koymuştur.

Semen kriyoprezervasyonu uygulanacak hastaların sperm konsantrasyonu ve motilitesinin yüksek olması vitrifikasyonun ardından çözme sonrası geri dönüş oranını arttırmaktadır (Grangade, 2013). Vitrifikasyon sonrası oluşan konsantrasyon ve motilite kayıpları, yüksek konsantrasyon ve yüksek motiliteli semen örneklerinde göz ardı edilebilmektedir. Konsantrasyonu ve motilitesi düşük olan hastaların veya mikro cerrahi yöntemi ile elde edilen sperm hücrelerinin düşük hacimde, fakat fazla sayıda dondurulması çok önemlidir (Grangade, 2016). Ağır OAT yada azospermi olgularında dondurulan materyalin küçük volümlerde dondurulması infertil çifte uygulanacak birden fazla kontrollü ovaryan stimülasyon sikluslarında avantaj sağlayacaktır. Rutin uygulamalarda kullanılan sperm kriyovialleri yada strawlar yüksek volümde saklamak için uygun olsa da, düşük konsantrasyon ve motiliteli semen örnekleri için uygun değildir. ÜYT uygulaması sonrası çözülen materyalden artakalan sperm materyalinin tekrar dondurulması tekrar konsantrasyon, motilite ve viabilite kaybına neden olacaktır. Bu nedenle daha önce yapılan çalışmalarda düşük konsantrasyon ve motiliteye sahip semen örnekleri için farklı taşıyıcılar kullanılmış (Cohen ve ark., 1997; Endo ve ark., 2011; Gil-Saolm ve ark., 2000; Herrler ve ark.,

2006; Isaev ve ark., 2007; Lane ve ark., 1999; Serini ve ark., 2008) ve kullanılan bu taşıyıcılar Grangade (2013) tarafından karşılaştırılmıştır. Semen örneklerinin; boş zona pellusida içine (Cohen ve ark., 1997), embriyo kriyoprezervasyonunda kullanılan cryolooplara (Lane ve ark., 1999), mikrodroplara (Gil-Saolm ve ark., 2000; Serini ve ark., 2008) agaroz mikro kürelere (Herrler ve ark., 2006; Isaev ve ark., 2007) ve cryotoplara (Endo ve ark., 2011) düşük hacimde dondurulduğu bildirilen çalışmalar mevcuttur. Kadioğlu ve arkadaşları (2011) ise over dokusu kriyoprezervasyonu için bakır elektron mikroskobu gridleri kullanmışlardır. Literatürde elektron mikroskopik preparasyonda kullanılan bakır gridlerin, sperm kriyoprezervasyonunda etkinliğini değerlendiren bir çalışma yoktur. Bu çalışmanın sonucuna göre, grid üzerinde 10 µl volümler halinde dondurulan sperm materyalinin pratik uygulamada kullanımı oldukça efektif sonuçlar verecektir.

Bu çalışmada kullanılan bakır gridlerin de Grangade (2016) tarafından karşılaştırılan kriyoprezervasyon taşıyıcıları gibi düşük hacimde vitrifikasyona olanak sağladığı ortaya konmuştur. Daha önceki çalışmalarda, düşük hacimde spermlerin saklanmasına olanak sağlayan taşıyıcıların depolanmasının zorluğundan bahsedilmiştir (Cohen ve ark., 1997; Endo ve ark., 2011; Gil-Saolm ve ark., 2000; Herrler ve ark., 2006; Isaev ve ark., 2007; Lane ve ark., 1999; Serini ve ark., 2008). Bu taşıyıcıların depolandığı kültür kaplarının, geleneksel tanklarda saklanmaları zordur (Lane ve ark., 1997). ICSI pipeti gibi kırılgan malzemeler, uygun saklanma koşulları sağlansa bile, kırılmaları durumunda örneğin kaybedilmesine neden olabilirler. Mikrodroplet ve cryoloop gibi taşıyıcılardaki örneklerin bir kısmı çözme esnasında kaybedilebilir (Lane ve ark., 1997). Bu çalışmada rutin uygulamalarda kullanılan ve yüksek hacimde dondurulmaya olanak sağlayan 1 kriyovial içine düşük hacimde dondurulmaya olanak sağlayan gridlerden birçoğu sığabildiği gösterilmiştir. Böylelikle diğer taşıyıcıların aksine depo tanklarında fazla yer kaplamamakla birlikte, gerektiğinde yeteri miktarda materyalin çözülmesine olanak sağlamaktadır.

Bu çalışmanın bulguları doğrultusunda, bakır gridler üzerine dondurulan semen örneklerinin çözme sonrası konsantrasyon, motilite ve viabilitesi değerlendirildiğinde; bakır gridlerin taşıyıcı olarak düşük konsantrasyon ve motiliteli hastalarda küçük volümlerde saklamak için uygun olduğu ve rutin uygulamada

sperm vitrifikasyon protokollerinde kriyoprotektan kullanılmadan da etkin olabileceği sonucuna varıldı.



6. KAYNAKLAR

American Cancer Society: The history of cancer, (2011)
<http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/TheHistoryofCancer/the-history-of-cancer-what-is-cancer>. (06.03.2012)

Aamdal J, Lyngset O, Fossum K. (1965) Toxic effect of lysolecithin on sperm. *Nordisk Veterinaer Medicin* 17: 633–639.

Barros A, Sousa M, Andrade MJ, Oliveira C, Silva J & Beires J. (1998) Birth after electroejaculation coupled to intracytoplasmic sperm injection in a gun-shot spinal cord-injured man. *Archives of Andrology* 41; 5–9.

Bedaiwy MA, Botros R. (2014) *Fertility Preservation. Advances and Controversies*. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, Daryaganj, New Delhi, India.

Buckett WV. (2003) Predictive value of hypo-osmotic swelling test to identify viable non-motile sperm. *Asian Journal of Anrologia* 5:209-212.

Bunge RG, Sherman JK. (1953) Fertilization capacity of frozen human spermatozoa. *Nature (London)* 172:767-8.

Centola GM, Keller JW, Henzler M, Rubin P. (1994) Effect of low-dose testicular irradiation on sperm count and fertility in patients with testicular seminoma. *Journal of Andrology* 15: 608–13.

Chemes HE, Rawe YV (2003) Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update*9:405-428.

Chong X, Xiangfeng C, Yulin L, Zhengmu W, Ping P. (2017) Multicenter study of genetic abnormalities associated with severe oligospermia and non-obstructive azoospermia. *Journal of International Medical Research* 0(0):1-8.

Cıncık M. (2003) Sperm Kriyoprezervasyonu, *Gülhane Tıp Dergisi* 45 (1): 100 -106.

Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara TA, Kieck KA, Schimmel TW, Scott RT. (1997) Cryopreservation of single human spermatozoa. *Human Reproduction*12(5):994-1001.

Coleman E, Bockting W, Botzer M, Cohen-Kettenis P, DeCuypere G, Feldman J, et al.(2012) Standards of care for the health of transsexual, transgender, and gender-nonconforming people, version 7. *International Journal of Transgenderism*13:165–232.

Coloma MA, Toledano-Díaz A, López-Sebastián A, Santiago-Moreno J, (2010) The influence of washing Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm on the effects of cryopreservation in dependency of the photoperiod. *Theriogenology* 73: 900–908.

Correa-Perez JR et al. (2004) Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrospermia. *Fertility and Sterility*81:1148-1150.

Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, et al. (2003) Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Archives of Andrology*. 9: 343-349.

Çayan, S. Güncel Üroloji (2016), Nobel Tıp Kitabevleri, Baskı Sayısı: 1, Baskı Adet Sayısı: 1700 s:66-67, Türkçe, İstanbul, Türkiye.

De Wert G, Dondorp W, Shenfield F, Barri P, Devroey P, Diedrich K, et al. (2014) ESHRE Task Force on Ethics and Law 23: medically assisted reproduction in singles, lesbian and gay couples, and transsexual people. Human Reproduction. 29(18):59–65.

Delilbaşı L. (2008) A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık s:229-258.

Elder K. Dale B. (2013) İn-Vitro Fertilizasyon. 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti. s: 191-215.

Endo Y, Fujii Y, Shintani K, Seo M, Motoyama H, Funahashi H. (2011) Single Spermatozoon Freezing Using Cryotop. Journal of Mammalian Ova Research. 28(1):47- 52.

Enginsu E. Semen Analizi ve Sperm Morfolojisi. (2010. Klinik Embriyoloji Uygulamaları Atlası. Ankara Büyük Harf Tıp Yayınları Kitapevleri s:39-49.

Fácio CL, Preiato LF, Machado-Paula LA, Matheus PCS, Filho EA, (2016) Comparison of two sperm processing techniques for low complexity assisted fertilization: sperm washing followed by swim-up and discontinuous density gradient centrifugation. JBRA Assisted Reproduction 20(4):206-211.

Fitoussi O, Eghbali H, Tchen N, Berjon JP, Soubeyran P, Hoerni B, (2000) Semen analysis and cryoconservation before treatment in Hodgkin's disease. Ann Oncology Journal. 11;679–684.

Francisca M, (2017) Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation–ESHRE–ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives. *Fertility and Sterility* (in press).

Gao D, Critser JK.(2000) Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Institute of Laboratory Animals Research Journal*41:187–96.

Gil-Salom M, Romero J, Rubio C, Ruiz A, Remohi J, Pellicer A.(2000) Intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Molecular Cell Endocrinology*. 169(1-2):15-9.

Gangrade BK, (2013) Cryopreservation of testicular and epididymal sperm: techniques and clinical outcomes of assisted conception. *Clinics* 68(S1):131-140.

Gürkan T. (2012) *İnfertilite ve Yardımla Üreme Teknikleri*, Güneş Tıp Kitapevleri. İstanbul.

Hamish W, Wallace B, Anderson R. A, Irvine D S, (2015) Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *The Lancet Journals*.6:209-218.

Herrler A, Eisner S, Bach V, Weissenborn U, Beier HM. (2006) Cryopreservation of spermatozoa in alginic acid capsules. *Fertility and Sterility*.85(1):208-13.

Isaev DA, Zaletov SY, Zaeva VV, Zakharova EE, Shafei RA (2007) Krivokharchenko IS. Artificial microcontainers for cryopreservation of solitary spermatozoa. *Human Reproduction*.22:I154-I5.

Jenkins EC, Ye L, Silverman WP. (2012) Does the cryogenic freezing process cause shorter telomeres? *Cryobiology* 65:72–3.

Joshi S, Savani BN, Chow EJ, GilleeceMH, Halter J, Jacobsohn DA, et al. (2014) Clinical guide to fertility preservation in hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*49:477–84.

Kahraman S, Isik AZ, Vicdan K, Ozgur S, Ozgun OD. (1997) A healthy birth after intracytoplasmic sperm injection by using immotile testicular spermatozoa in a case with totally immotile ejaculated spermatozoa before and after Percoll gradients. *Human Reproduction* 12:292–293.

Kangasniemi M, Huhtaniemi I, Meistrich ML.(1996) Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of a spermatogonia in the irradiated BNF1 rat. *Biology of Reproduction* 54: 1200–08.

Karlsson JO, Toner M. (1996) Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*17:243–56.

Khalili MA, Mir-Rokni F, Kalantar SM. (1999) Application of vitality tests on asthenozoospermic semen from infertile men. *Iranian Biomedical Journal*. 3:77-81.

Khandwala YS, Zhang CA, Li S, Cullen MR, Eisenberg ML.(2017) Validity of Claims Data for the Identification of Male Infertility, *Current Urology Reports* 18: 68-74.

Kolettis PN, Sabanegh ES, D’Amico A M, Box L, Sebesta M, Burns JR. (2002) Outcomes for vasectomy reversal performed after obstructive intervals of at least 10 years. *Urology* 60(5):885-8.

Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. (1999) Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Human Reproduction*14: 3077–3079.

Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. (1999) Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *National Biotechnology*. 17(12):1234-6.

Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. (2016) Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology* 86:1637–44.

Martinez F. (2017) Update on fertility preservation from the Barcelona International Society for Fertility Preservation–ESHRE–ASRM 2015 expert meeting: indications, results and future perspectives, *Fertility and Sterility* (in press).

Marvin L. Meistrich (2013) The Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis in Humans, *Fertility and Sterility* DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.010.

Meistrich ML, Finch M, da Cunha MF, et al (1982) Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on 58ort testis cells. *Cancer Research* 42: 22–31.

Meryman HT. Williams RT. Douglas MSJ. (1977) Freezing injury from solution effects and its prevention by nature or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 14: 287-302.

Miyagi-Shiohira C, Kurima K, Kobayashi N, Saitoh I, Watanabe M, Noguchi Y, ve ark. (2015) Cryopreservation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell Medicine*.8:3–7.30.

Morris GJ, Acton E, Avery S.(1999) A novel approach to sperm cryopreservation. *Human Reproduction*. 14:1013-21.

Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. (1998) Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell Mouse embryos. *Human Reproduction* 13:2874–2879.

Nijs M, Vanderzwalmen P, Vanderzwalmen B, Segal-Bertin G, Lefeune B, Segal L, van Roosendaal E & Schoysman R. (1996) Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 11:2180–2185.

Nordhoff V. (2015) How to select immotile but viable spermatozoa on the day of intracytoplasmic sperm injection? An embryologist's view. *Andrology* 3:156-162.

Ok E, Özyurt D, Gülekli B. (2008) Comparison of Eosin and HOS Test Methods in Assessment of Sperm Viability in Asthenozoospermia Cases. *186 J. Turkish-German Gynecol Association*. 9(4);186-189.

Pegg DE. (2007) Principles of cryopreservation. *Methods of Molecular Biology* 368:39–57.

Pellicer-Rubio MT, Combarrous Y, (1998) Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. *Journal of Reproduction and Fertility* 112, 95–105.

Picton HM, Wyns C, Anderson RA, Goossens E, Jahnukainen K, Kliesch S, (2015) A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Human Reproduction* 30: 2463–75.

Polge C, Smith AU, Parkes AS. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature (London)* 164:666-70.

Povey AC, Clyma JA, McNamee R, Moore HD, Baillie H, Pacey AA, (2012) Modifiable and non-modifiable risk factors for poor semen quality: a case-referent study. *Human Reproduction* 27:799–806.

Rex AS, Aagaard J, Fedder J, (2016) DNA fragmentation in spermatozoa: a historical review. *Andrology* 5; 622–630.

Qiao J, Li R. (2014) Fertility preservation: challenges and opportunities. *The Lancet* 384:1246-1247.

Rall WF, Fahy GM. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573–5.

Relander T, Cavallin-Stahl E, Garwicz S, et al. (2000) Gonadal and sexual function in men treated for childhood cancer. *Medical and Pediatric Oncology* 35: 52–63.

Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera A. R, et al (2017) Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance, *Human Reproduction Update* 23;139–155.

Ross MH (2011) *Histology A Text And Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th edition ed. s:784-828.

Santiago-Moreno J, Estesoa MC, Castaño C, Toledano-Díaza A, Delgadillo JA, López-Sebastiána A. (2017) Seminal plasma removal by density-gradient centrifugation is superior for goat sperm preservation compared with classical sperm washing. *Animal Reproduction Science* 181:141–150.

Sias B, Ferrato F, Pellicer-Rubio MT, Forgerit Y, Guillouet P, Leboeuf B, Carriere F, (2005) Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta* 1686, 169–180.

Sereni E, Bonu MA, Fava L, Sciajno R, Serrao L, Preti S, et al. (2008) Freezing spermatozoa obtained by testicular fine needle aspiration: a new technique. *Reproductive Biomedicine Online* 16(1):89-95.

Shalet SM, Tsatsoulis A, Whitehead E, Read G. (1989) Vulnerability of the human Leydig cell to radiation damage is dependent upon age. *Journal of Endocrinology*.120: 161–65.

Shulman A, Feldman B, Madgar I, Levron J, Mashiach S & Dor J. (1999) In-vitro fertilization treatment for severe male factor: the fertilization potential of immotile spermatozoa obtained by testicular extraction. *Human Reproduction* 14:749–752.

Stalf T, Mehnert C, Hajimohammad A, Manolopoulos K, Shen Y, Schuppe HC, Diemer T, Schill WB, Weidner W & Tinneberg HR. (2005) Influence of motility and vitality in intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Andrologia* 37:125–130.

Tae Hoon Jang, Sung Choel Park, Ji Hyun Yang et al. (2017) Cryopreservation and its clinical applications, *Integrative Medicine Research* 6:12-18.

Taylor A. (2003) ABC of subfertility: extent of the problem. *British Medical Journal* 327:434–6.

Thomson AB, Campbell AJ, Irvine DC, Anderson RA, Kelnar CJ, Wallace WH. (2003) Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study. *Lancet* 360:361–7.

Herman Tournaye, Gert R Dohle, Christopher L R Barratt (2014) Fertility: progress and uncertainty, *The Lancet Journals* 384:1237.

Tunalı G, (2014) Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü (Derleme). *Androloji Bülteni* 16(57):123-128.

Vandervorst M, Tournaye H, Camus M, Nagy ZP, Van Steirteghem A & Devroey P. (1997) Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 12:2429–2433.

Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ. (1993) Significantly enhanced pregnancy rates through cryopreservation and thaw: a five year clinical study. *Fertility and Sterility*59:1202.

Wang CW, Lai YM, Wang ML, Lee JD & Soong YK. (1997) Pregnancy after intracytoplasmic injection of immotile sperm. A case report. *Journal of Reproductive Medicine*42:448–450.

Whitehead E, Shalet SM, Jones PH, et al.(1982) Gonadal function after combination chemotherapy for Hodgkin's disease in childhood. *Archives of Disease of Childhood* 57: 287–91.

Willadsen SM (1977) Factors affecting the survival of sheep embryos during deep freezing and thawing. *The Freezing of Mammalian Embryos, Ciba Foundation Symposium 52*. Amsterdam: Elsevier 175–194.

Wilton LJ et al. (1988) Human male infertility caused by degeneration and death of sperms in the epididymis. *Fertility and Sterility*49:1051-1058.

World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research (2010) WHO laboratory manual examination and processing of human semen 5th ed. Nobel Tıp, İstanbul s:37-44.

Yeste M. (2016) Sperm cryopresevation update: Cryodamage, markers and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85(1):47-64

Yong KW, Wan Safwani WK, Xu F, Wan Abas WA, Choi JR, Pingguan-Murphy B. (2015) Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges. *Biopreservation and Biobanking*13:231–9.

Yong KW, Safwani WK, Xu F, Zhang X, Choi JR, Abas WA. Assessment of tumorigenic potential in long-termcryopreserved human adipose-derived stem cells. *Journal of TissueEngineering and Regenerative Medicine*. (in press).



7. SİMGELER ve KISALTMALAR

ÜYT: Üremeye Yardımcı Tedavi

ÜYTM: Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi

%: Yüzde

WHO: World Health Organization

TESA: Testiküler Sperm Aspirasyonu

MESA: Mikro-Epididimal Sperm Aspirasyonu

TESE: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

µm: Mikrometre

° : Derece

ICSI: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

DMSO: Dimetil Sülfoksit

PG: Propilen Glikol

EG: Etilen Glikol

IVF: İn-vitro Fertilizasyon

HOS: Hipoozmotik Şişme

OAT: Oligo-asteno-teratospermi

g: Merkezkaç Kuvveti ??

ml: Mililitre

µl: Mikrolitre

SPSS: Statistic Analysis Package for Social Sciences

CO₂: Karbondioksit

8. EKLER

8.1. Şekil listesi

Şekil 1. Kan testis bariyeri

Şekil 2. Spermatogenez

Şekil 3. Olgun Sperm Yapısı

Şekil 4. Vitrifikasyon ve Yavaş dondurma mekanizmaları

Şekil 5. Empty zona içinde sperm kriyoprezervasyonu

Şekil 6. Kriyoprezervasyon taşıyıcıları

Şekil 7. Çalışmaya dâhil edilen hasta grupları ve sayıları

Şekil 8. Teknik Gruplar

Şekil 9. Dansite-gradient yöntemi

Şekil 10. Semen drobu ve kriyoprotektan drobunun karıştırılması ve semen drobunun mikropipet yardımıyla grid üzerine yüklenmesi

Şekil 11. Vitrifikasyon öncesi grid üzerine yüklenen semen örneği ve grid üzerine yüklenen semen örneğinin vitrifikasyon sonrası (likit nitrojene batırılmış) görünümü

Şekil 12. Grid depolamada kullanılan, etiketlenmiş kryovialler

Şekil 13. Eppendorf tüplerin çözme işlemi için hazırlanması

Şekil 14. Gridlerin eppendorf tüplerine aktarılması

Şekil 15. Hazırlanan ICSI kabının şematik çizimi

Şekil 16. HOS pozitif ve HOS negatif spermlerin değerlendirilmesi a. HOS pozitif ve HOS negatif spermler b. HOS pozitif ve negatif spermlerin yan yana görünümü

8.2. Tablo Listesi

Tablo 1. Dünya Sağlık Örgütü Kriterlerine (2010) göre insan semen analizi için en düşük değerler (5.persentil ve %95 güven aralıkları)

Tablo 2. Erkek İnfertilitesinin korunması için güncel yaklaşımlar

Tablo 3. Yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri

Tablo 4. Genellikle kullanılan kriyoprotektan ajanlar ve kullanım alanları

Tablo 5. Düşük hacimde sperm kriyoprezervasyonu için kullanılan taşıyıcılar

Tablo 6. Kontrol grupları ve kriyoprezervasyon sonrası çözölen örneklere ait ortanca, minimum ve maksimum değeri

Tablo 7 Gruplar arası konsantrasyon ve motilitelerin ikili karşılaştırmaları

Tablo 8 Kriyoprezervasyon sonrası çözölen örneklere ait konsantrasyon, motilite, viabilite ve total viabilitelerinin ortalama, standart sapma değeri ve gruplar arası karşılaştırma sonucu p değeri

8.3. Grafik Listesi

Grafik 1. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre insan semen özelliklerine göre referans değeri

9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan, eğitimimde, tezimin oluşumu ve yürütülmesinde büyük emeği olan değerli tez danışmanım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr. Berrin AVCI'ya teşekkür ederim.

Eğitim sürecimde bilgi ve tecrübeleriyle desteklerini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Semiha ERSOY'a, bölümümüzün kıymetli hocaları Prof.Dr. Şahin A. SIRMALI, Prof.Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU, Prof.Dr. Zeynep KAHVECİ, Prof.Dr. Zehra MİNBAY ve Prof.Dr. Özhan EYİĞÖR'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tüp Bebek Merkezi'ndeki çalışma arkadaşlarıma, 5 sene boyunca arkadaşlığımı ve yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşım İlknur YAVAŞ'a, hem yüksek lisans eğitimim sürecinde hem de tez sürecinde en büyük yardımı ve desteği eksik etmeyen asistan arkadaşlarım Esra ŞEN ve Cihan ÇAKIR'a, tez yazımında yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşım Aysun ÖZBAY'a ve manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen bölümümüzdeki diğer asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her koşulda maddi ve manevi en büyük destekçim olan aileme ve Eren SAYGI'ya teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

Ankara Altındağ'da 17 Eylül 1987'de doğdum. İlkokul 1. sınıfı İstanbul'da Medeni Berk İlköğretim Okulu'nda 2, 3, 4 ve 5. sınıfları ise, Tophane İlköğretim okulunda tamamladım. Ortaokulu Özel Emine Örnek İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimimi Bursa Kız Lisesi'nde tamamladım. 2011 yılında Yeditepe Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik bölümünden mezun oldum. 2012 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nde göreve başladıktan sonra 2014 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Üreme Biyolojisi ve Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı eğitimime başladım.