

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPERM KRİYOPREZERVASYONU
SONRASINDA APOPİTOZUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

FULYA AYDINER

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR - 2008

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SPERM KRİYOPREZERVASYONU
SONRASINDA APOPİTOZUN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FULYA AYDINER

DOÇ.DR. KAZIM TUĞYAN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından proje
2007KBSA017 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İçindekiler	i
Tablolar Dizini	v
Şekiller Dizini	vi
Resimler Dizini	vii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
Teşekkür	ix
Özet	xii
Summary	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1.ERKEK ÜREME SİSTEMİ	2
2.1.1.TESTİS ANATOMİSİ:	2
2.1.2.TESTİS EMBRİYOLOJİSİ :	3
2.1.3.TESTİS HİSTOLOJİSİ:	5
2.1.3.1.Sertoli Hücreleri:	6
2.1.3.2.Spermatogenik Hücreler:	8
2.1.3.3.Leydig Hücreleri:.....	9
2.1.4.TESTİS FİZYOLOJİSİ:	10
2.1.5.SPERMATOGENEZE ETKİ EDEN FAKTÖRLER:	11
2.1.5.1.Sıcaklık	11
2.1.5.2.Kriptorşidizm	11
2.1.5.3.Kanser Kemoterapisi	12
2.1.5.4.Kabakulak	12
2.1.5.5.Spermatik Kordon Bükülmesi (Torsiyonu)	12
2.1.5.6.Radyasyon.....	12
2.1.5.7.Yaş	13
2.1.5.8.Varikosel	13

2.1.5.9.Sigara	14
2.1.6.SPERMATOGENEZ:.....	15
2.1.6.1Spermatogonyumlar:	15
2.1.6.2.Spermatositler Ve Mayoz:.....	16
2.1.6.3.Spermatidler Ve Spermioenez:	17
2.1.7.SPERMİN YAPISI:	19
2.2.APOPİTOZ (Programlı Hücre Ölüme)	24
2.2.1.APOPİTOZ MODELİ	25
2.2.2.APOPİTOZUN GÖRÜLDÜĞÜ OLAYLAR	25
2.2.2.1.Fizyolojik Olaylar	25
2.2.2.2.Patolojik Olaylar	26
2.2.3.APOPİTOZUN HASTALIKLARLA OLAN İLİŞKİSİ.....	26
2.2.4.APOPİTOZ- NEKROZ	27
2.2.5.APOPİTOZ MEKANİZMALARI	28
2.2.5.1.Hücre Dışı (Ekstrensek) Sinyallerle Apopitoz.....	29
2.2.5.2.Hücre İçi (İntrensek) Apopitoz.....	31
2.2.5.2.1.Mitokondri / Sitokrom-C Yoluyla Apopitoz.....	31
2.2.5.2.2.Endoplazmik Retikulum Aracılı Apopitoz Oluşturulması	31
2.2.6.APOPİTOZ REGÜLATÖRLERİ	32
2.2.6.1.Kaspazlar.....	32
2.2.6.2.Bcl-2 Ailesi Proteinleri.....	33
2.2.6.3.P53 Ve Ortak Proteinler	35
2.2.6.4.IAP Ailesi Proteinleri	35
2.2.7.APOPİTOTİK HÜCREDE GÖZLENEN MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER	36
2.2.7.1.Morfolojik Değişiklikler	36
2.2.7.2.Biyokimyasal Değişiklikler.....	37
2.2.8.APOPİTOZUN SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER .	38
2.2.8.1.Morfolojik Yöntemler	38
2.2.8.1.1.Işık Mikroskobu	38
2.2.8.1.2.Floresan Mikroskobu	38

2.2.8.1.3.Faz – Kontrast Mikroskobu	39
2.2.8.1.4.Elektron Mikroskobu	39
2.2.8.2.İmmünohistokimyasal Yöntemler:	39
2.2.8.3.Biyokimyasal Yöntemler	41
2.2.8.4.Diğer Yöntemler	42
2.2.9.SPERMATOGENEZDE APOPTOZUN ROLÜ	43
2.3. KRİYOPREZERVASYON	46
2.3.1.KRİYOPREZERVASYON AŞAMALARI:	46
2.3.2.KRİYOBİYOLOJİNİN TEMELLERİ	47
2.3.3.KRİYOPREZERVASYONDA BAŞARIYI ETKİLEYEN ETMENLER	48
2.3.3.1.Dondurma Ve Çözme Hizlerinin Kontrolü	48
2.3.3.2.Buz Formasyonu.....	49
2.3.3.3.Kimyasal Koruma.....	50
2.3.4.KRİYOPROTEKTANLAR	50
2.3.5.KRİYOPREZERVASYON METODLARI	54
2.3.6. ..DONDURMA SIRASINDA HÜCREDE MEYDANA GELEBİLECEK DEĞİŞİKLİKLER	58
2.3.7.OZMOTİK STRES VE OZMOTİK ŞİŞME	59
2.3.8.SPERM KRİYOPREZERVASYONU	61
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	64
3.1.OLGULAR	64
3.2.SEMEN ANALİZİ	64
3.2.1.MAKROSKOBİK DEĞERLENDİRME	64
3.2.2.MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME.....	65
3.3.SPERMLERİN DONDURULMASI.....	69
3.4.SPERMLERİN ÇÖZÜLMESİ	70
3.5.İSTATİSTİK	70
4.BULGULAR	71
4.1.MOTİLİTE BULGULARI.....	71
4.2.MORFOLOJİK BULGULAR	75

4.2.1. IŒIK MİKROSKOBU DEĐERLENDİRMEŒİ.....	75
4.2.2. FLORESAN MİKROSKOBİK BULGULAR.....	77
4.2.3. ELEKTRON MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRMELER.....	82
5. TARTIŒMA.....	89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	988
7. KAYNAKLAR.....	99

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1 Apoptoz ile hastalıkların ilişkisi	27
Tablo 2 TNRF Süper Ailesi	29
Tablo 3 Kaspaz Ailesi	33
Tablo 4 Gruplara göre İleri Progresif hareketlilik oranları	71
Tablo 5 Sperm Sayısı Karşılaştırması	73
Tablo 6 Solusyonlara Göre Motilite Ve Morfoloji Değerlendirmesi	74
Tablo 7 Morfolojik Kriterlerin Değerlendirilmesi	75
Tablo 8 DNA fragmentasyon sonuçlarının gruplara göre değerlendirilmesi.....	77
Tablo 9 DNA fragmentasyon sonuçlarının dondurma solusyonlarına göre değerlendirilmesi	78
Tablo 10 DNA fragmentasyon sonuçlarının dondurma solusyonları gruplarına göre değerlendirilmesi	78
Tablo 11 Sperm Histopatolojik bulgular	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1 Apoptoz Mekanizması	28
Şekil 2 TNFR süper ailesi	30
Şekil 3 Prokaspazın Aktif Kaspaza Dönüşümü	32
Şekil 4 BCL-2 Ailesi	34
Şekil 5 TUNEL	40
Şekil 6 Anneksin V	40

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 1 Işık mikroskopik bulgular	76
Resim 2 Dondurma öncesi TUNEL uygulanan asthenozoospermli hasta.....	79
Resim 3 Çözme sonrası TUNEL aynı hasta	79
Resim 4 Dondurma öncesi TUNEL uygulanan asthenozoospermia hasta	80
Resim 5 Çözme sonrası TUNEL uygulanan asthenozoospermia aynı hasta.....	80
Resim 6 Dondurma öncesi Tunel uygulanan normozoospermia hasta.....	81
Resim 7 Çözme sonrası TUNEL uygulanan aynı hasta.....	81
Resim 8 Normozospermi (a,b,c) baş bölgesinden enine kesit (b).....	82
Resim 9 Elektron mikroskopik bulgular.....	83
Resim 10 Elektron mikroskopik bulgular.....	84
Resim 11 Elektron mikroskopik bulgular.....	85
Resim 12 Elektron mikroskopik bulgular.....	86
Resim 13 Elektron mikroskopik bulgular.....	87

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simge ve Kısaltma		Açıklama
Abp	<i>Androgen-Binding Protein</i>	Androjen Bağlayıcı Protein
Aif	Apoptosis-Inducing Factor	Apoptozu Uyarıcı Faktör
Ais	<i>Androgen Insensitivite Sendrome</i>	Androjen Duyarsızlığı Sendromu
<i>Amh</i>	Anti Mülleri Hormone	
Apaf	Apoptotic Protease Activating Factor	Apoptotik Proteaz Etkinleştirici Faktör
Bcl-2	B Leukemia Cell 2	B Lösemi Hücre 2
Bh	Bcl-2 Homology	Bcl-2'ye Benzer
Bsa	Bovine Serum Albumin	Sığır Serum Albumini
Card	Caspase Activation And Recruitment Domain	Kaspazı Aktive Eden Bölge
Ced	<i>Caenorhabditis Elegans</i> Cell Death Gene	<i>Caenorhabditis Elegans</i> Hücre Ölüm Geni
Dd	Death Domain	Ölüm Ucu
Ded	Death Effector Domain	Ölüm Oluşturan Bölge
<i>Dht</i>	Dihidrotestosteron	
Disc	Death-Inducing Signalling Complex	Ölümü Başlatan Sinyalleme Yapısı
Dmso	Dimetil Sülfoksit	
Dna	Deoksiribonükleik Asit	
Fadd	Fas Associated Death Domain	Fas'a Bağlı Ölüm Bölgesi
Fitc	Fluorescein Isothiocyanate	Floresan Boyası
Fsh	<i>Follicle-Stimulating Hormone</i>	Folikül Stimülant Hormon
Gnrh	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
Hcg	Human Chorionic Gonadotropine	İnsan Koryonik Gonadotropin

	Hormone	Hormonu
Hos	Hypo-Osmotic Swelling	Hipoozmotik Şişme Testi
Iap	Inhibitor Of Apoptosis Protein	Apopitozu Baskılayan Protein
Icam	Intercellular Adhesion Molecule	Hücrelerarası Adhezyonmolekülü
Ice	Interleukin 1b-Converting Enzyme	İnterlökin 1b Dönüştürücü Enzim
Ivf	In Vitro Fertilization	In Vitro Fertilizasyon
Jnk	C-Jun N-Terminal Kinase	C-Jun N-Ucu Kinazı
Lh	Luteinizan Hormone	
Mif	<i>Müllerian -Inhibiting Factor</i>	Müller Kanallarını İnhibe Eden Faktörü
Mort	Mediator Of Receptor-Induced Toxicity	Reseptör Yoluyla Uyarılan Toksisite
NF-Kb	Nuclear Factor Kappa B	Çekirdek Kappa B Faktörü
Paf	Platet Activating Factor	Platelet Aktivasyon Faktörü
Pas	Periodic-Acid Schiff	Periyodik-Asit Schiff
Proh	Propilen Glikol	
Ps	Phosphatidylserine	Fosfatidilserin
Rip	Receptor Interacting Protein	Reseptörle Etkileflen Protein
Rna	Ribonucleic Acid	
Ros	<i>Reactive Oxygen Species</i>	Reaktif Oksijen Türleri
Sdi	Sperm Deformity Index	Sperm Deformite İndeksi
Sodd	Silencer Of Death Domain	Ölüm Bölgesi Susturucusu
Sry	Sex Determining Region Of The Y	Seks Belirleyici Bölgesi
Tdf	<i>Testis-Determining Factor</i>	Testis Belirleyici Faktör
Tese	Testicular Sperm Extraction	Tstiküler Sperm Ekstraksiyonu
TGF-B	Transforming Growth Factor-B	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta
TNF	Tumor Necrosis Factor	Tümör Nekroz Faktör
TNFR	Tumour Necrosis Factor Receptor	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
Tradd	Tnfr Associated Death Domain	Tnfr'e Bağlı Ölüm Bölgesi
Traf	Tnf Receptor-Associated Factor	Tnf Reseptörü İle İlişkili Faktör
Trail	Tnf-Related Apoptosis-Inducing	Tnf'yle İlişkili Apopitozu Uyarıcı

	Ligand	Bağ
Tunel	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-Dutp Nick End Labeling	
<i>ZFY</i>	<i>Zinc Finger Protein Y</i>	Çinko Finger Gen Proteini

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, Histoloji ve Embriyoloji Bilimi sevgisini aşıl原因, yetişmemde büyük emekleri olan ve öğrencileri olmaktan şans duyduğum başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Sayın Candan Özoğul' a, tez danışmanım Doç Dr. Sayın Kazım Tuğyan' a ve anabilim dalındaki tüm hocalarıma bana verdikleri destek ve katkıları için sonsuz şükranlarımı sunarım.

Yine bu süreçte lisansüstü eğitim almam konusunda sonsuz destek veren ve güdüleyici olan başta Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sayın Bülent Gülekli olmak üzere ve diğer hocalarına ve çalışanlarına destekleri için teşekkür ederim.

Moral kaynağım olan ve birlikte olmaktan huzur ve mutluluk duyduğum Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma görevlilerinin tümüne, kesitlerimin alınmasında sabırla yardımcı olan Bio. Özcan Üstün'e ve Sedef Menkü' ye, ARLAB çalışanlarına da teşekkür ederim.

Bana verdikleri sevgi ve fırsatlarla bugünlere gelmemde büyük özverileri olan aileme anlayış ve sabırları için teşekkür ederim.

ÖZET

SPERM KRİYOPREZERVASYONU SONRASINDA APOPTOZİSİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fulya AYDINER

İnsan sperm örneklerinin depolanması yani sperm bankası oluşturabilmek için uzun yıllardır çeşitli çalışmalar yapılmış ve çeşitli metotlar denenmiştir. Amaç spermin en az yapısal ve fizyolojik zararlarla döllenme kapasitesini sürdürebilmesi olmuştur ve kriyoprezervasyonla bu kısmen başarılmıştır. Ancak günümüzde ne yazık ki kriyoprezervasyon için standart bir yöntem mevcut değildir ve henüz aydınlatılamamış bir çok soru vardır. Bu amaçla bu çalışmada kriyoprotektan farkının dondurma çözme sonrasında spermde DNA fragmentasyonuna etkisini araştırdık.

Bu amaçla toplam 50 olgu (sperm motilite bozukluğu olan asthenozoospermia, 40 olgu ile motilite bozukluğu olmayan normozoospermia 10 olgu) çalışma kapsamına alındı. Olgulardan elde edilen semen örnekleri makroskobik olarak koagülasyon, lifefaksiyon, görünüm, hacim, viskozite ve pH açısından değerlendirildi. Mikroskobik olarak motilite, sperm konsantrasyonu morfoloji yönünden dünya sağlık örgütü (WHO) kriterlerine göre değerlendirildi. Bundan sonraki aşamada her bir olgudan alınan semen örnekleri iki gruba ayrıldı. Yıkama öncesi grup ve yıkama sonrasında iki farklı solüsyon (Medicult ve TEST yolk buffer) ile dondurulup çözülen grup. Her iki gruba da DNA fragmentasyonunu göstermek için TUNEL yöntemi uygulandı. Apoptoz bulguları ultrastrüktürel olarak da TEM ile değerlendirildi. Böylece yıkama öncesi ve yıkama sonrası dondurulan ve çözünen gruplar ile iki kriyoprotektan madde arasındaki fark ortaya konmaya çalışıldı. Beklenildiği gibi sperm sayısı, total motilitede yıkama sonrası artış, dondurup çözme sonrası da anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Ancak iki farklı kriyoprotektan karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. Çözme sonrası iki kriyoprotektan grubu arasında DNA fragmentasyon ortalaması açısından ise anlamlı farklılık vardır.

Sonuç olarak, bulgularımız spermin dondurma öncesi yıkanıp yıkanmama tartışmasına açıklık getirerek dondurma öncesi mutlaka yıkanması gerektiği doğrultusundadır. Ultrastrüktürel olarak da desteklenen, DNA fragmantasyonunun değerlendirildiği TUNEL testi sonucunda yıkanmamış örnekler ile yıkanan ve dondurulup çözünen örnekler arasında anlamlı fark ortaya konmuştur. Anahtar kelimeler : Sperm, TUNEL, Kriyoprezervasyon, TEM

SUMMARY

EVALUATION OF APOPTOSIS AFTER SPERM CRYOPRESERVATION

Fulya AYDINER

For long years, different studies were made and different methods were tried to store human sperm specimens that's to say to form a sperm bank. The aim was to ensure sperm's continuousness of fertilization capacity with few morphological and physiological damages and this was achieved by cryopreservation partially. However, there is no any standard method for cryopreservation yet and there are lots of questions exist. In our study, we investigated the effect of different cryoprotectants on DNA fragmentation of sperm after freezing and thawing.

Totally fifty cases investigated in our study: forty samples of asthenozoospermia with sperm motility defects and ten samples of normozoospermia with no sperm motility defects. Semen samples were macroscopically evaluated for liquefaction, volume, viscosity, appearance and pH values and coagulation. Samples also were evaluated microscopically for motility, sperm concentration and morphology according to the World Health Organization (WHO) criterias. After this stage, the semen samples were separated into two groups. The first group consisted of pre-washed samples. Second group consisted of post-washed with the followed freezing and thawing with two different cryoprotectants (MEDICULT and TEST yolk buffer) samples. In both groups in order to show DNA fragmentation TUNEL assay was performed. Apoptosis was evaluated ultrastructurally by TEM.

Results: the total motility of the sperm number was increased in the second group and meaningful decrease seen in the first group. There was no statistical difference between the two cryoprotectan solutions. There was a meaningful statistical difference in the average of DNA fragmentation between the two cryoprotectans group.

Conclusions: sperm should be washed before freezing. The evaluation of DNA fragmentation in TUNEL assay which was also supported by ultrastructural findings revealed that there is a difference between the pre-washed and post-washed freezed and thawed samples.

Key words: Sperm, Apoptosis, TUNEL, Cryopreservation, TEM

1. GİRİŞ VE AMAC

Günümüzde infertilite nedenlerinin %40'nın erkek faktörüne bağlı olduğu bilinmektedir. Erkek infertilitesine çözüm arayışları için yardımcı üreme teknikleri çok hızlı gelişmekle birlikte, henüz istenen gebelik başarısı elde edilememiştir. Batı ülkelerinde uygulanan donör programları, spermin dondurularak saklanmasını zorunlu hale getirmiş ve bu konudaki tekniklerin gelişmesine de katkı sağlamıştır. Spermin dondurularak saklanması hem üremeye yardımcı tedavilerdeki başarıyı arttırmış; hem de, özellikle kemoterapi-radyoterapi, testis cerrahisi sonrası fertilitenin korunmasına katkıda bulunmuştur. Kemoterapide kullanılan ilaçlar ve ışın tedavisi, erkeklerde sperm üretimini kalıcı olarak bozabilmektedir. Sperm dondurma işlemi, kanser tedavisi için radyoterapi (ışın tedavisi) veya kemoterapi (ilaç tedavisi) gören hastaların çocuk sahibi olabilmelerine olanak sağlamaktadır. Özellikle genç yaşta kanser tedavisi görmek zorunda kalan erkeklerden tedavi öncesi alınan semen örnekleri dondurularak bu erkeklerin ileride çocuk sahibi olma olasılığını artırmaktadır. Günümüzde sperm dondurma yönteminde kullanılan birçok kriyoprotektan mevcuttur. Bunlardan birisi yumurta sarısı (test yolk buffer- Irvine Scientific), diğeri ise gliserol ve sukrozdan oluşan sperm freezing (Medi-Cult) medyumlarıdır.

Son yıllarda apoptoz mekanizması ile ilgili olarak birçok çalışma yapılmıştır. Dondurma ve çözme işlemi sonrasında spermelerde meydana gelen apoptozun anlaşılması ve bunların embriyo oluşum aşamasında oluşturabileceği etkileri araştırmak için önceden yapılan diagnostik testlerin ayırıcı özelliği önem teşkil etmektedir. Spermde apoptozun gösterilmesi, sperm kalitesini değerlendirmeye yardımcı olmaktadır. Spermin dondurulması, motilitesini, morfolojisini, DNA bütünlüğünü ve mitokondriyal aktiviteyi etkilemektedir. Biz bu çalışmamızda en çok kullanılan bu iki kriyoprotektan ile yapılan dondurma işlemi sonrasındaki farkları ortaya koymayı amaçladık. Sperm dondurulup çözüldükten sonra spermde meydana gelebilecek ince yapısal değişiklikler ve TUNEL yöntemi DNA fragmantasyonu olan hücreler saptanarak karşılaştırılacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi; germ hücresi olan spermin devamlı üretimi ve erkek seks hormonları olan androjenlerin sentezi ve salınımından sorumludur.

Erkek üreme sistemi; testis, genital kanal sistemi (epididimis, duktus deferens, duktus ejakulator ve erkek uretrasının bir kısmı), yardımcı üreme bezleri (vesikula seminalis, prostat ve bulbo üretral bezler) ve penisten oluşur (1,2).

2.1.1. TESTİS ANATOMİSİ:

Testis, skrotum içinde sağ ve solda yerleşmiş, vücut boşluğunun dışında yer alan oval şekilli bir çift organdır. Spermatik kordon tarafından asılı tutulan testisler, gubernakulumun artıkları olan skrotum bağları tarafından skrotuma tutunmuşlardır (2,3). Testisler, spermin üretiminden (spermatogenez) ve androjenlerin sentezinden (steroidogenez) sorumludur. Testesteron başta olmak üzere androjenler, spermatogenezin devamını, erkek fenotipindeki fetus gelişimi ile birlikte erişkin bir erkeğin fiziksel ve davranışsal karakterlerinin ortaya çıkmasını sağlar (2).

Testis karın boşluğundan skrotumlara inerken, birlikte kan damarları, lenfatik damarlar, otonom sinirler ve karın zarının bir uzantısı olan tunika vaginalis de sürükler (2,4).

Hem testis içi sıcaklığın korunabilmesi hem de testislerin beslenmesi için kan damarlarında bir düzenlenme vardır. Testislerin beslenmesi, duktus deferens ve testislere ulaşan testiküler arter aracılığıyla sağlanır. Testiküler arter, kapsülü geçmeden önce birçok dala ayrılır ve sonra intratestiküler damar ağını oluşturur. Testis içerisindeki kapiller, plexus pampiniformis oluşturan venler aracılığı ile toplanır. Testiküler arter ve duktus deferens ile birlikte spermatik kordonu yaparlar. Testis venleri içerisindeki kan, testis arterlerinden daha düşük ısıda olup, arteriyel kanın ısını azaltır. Böylece testisteki sıcaklığın vücudun diğer kısımlarından daha düşük kalmasına yol açar. Testis içi sıcaklığın daha düşük olması (35 °C) spermelerin normal gelişimine olanak sağlar. Bundan başka kremaster kası anterior abdominal duvarın internal abdominal oblik kasından köken alır (2).

2.1.2. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ :

Testis, üriner sistem ile ilişkide olup, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişir. Gonad gelişiminin ilk evresi 5. haftada mezonefrozun medialinde mezotelin kalınlaşması ile başlar. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin çoğalması mezonefrozun medial kısmında bir kabartının oluşmasına neden olur. Buna da gonadal ya da genital kabartı denir (3). Gonadlar da üç kaynaktan gelişir:

1. Ara (intermediyer) mezoderm: Karın arka duvarını döşeyen mezenşim
2. Mezodermal epitelyum: Söloomik mezotelyum da denir ve genital kabartıları döşer.
3. Primordiyal germ hücreleri: vitellus kesesi duvarından gonadlara göç ederler (2,3).

Primordiyal germ hücrelerinin gonadal kabartıya göçü; ürogenital kabartılarda mezoderm hücrelerinin proliferasyonunu ve söloomik mezotelyum hücrelerinden testis kordonlarının oluşmasını uyarır. Daha sonra seminifer kordon içinde seminifer tübüller düz tübüllere ve rete testise farklanır (2).

Gelişimin ilk aşamasında gonadlar farklanmamışlardır. Her iki cinste de görünüş benzerdir. Bu farklılaşmamış gonadlar hem kortikal hem de medüller bölgeler içerir. Testis ya da ovaryum yönünde farklılaşabilme yetenekleri vardır. Genetik cinsiyet, döllenme sırasında Y kromozomunun varlığına bağlı olarak belirlenmekle birlikte testislerin gelişimi 7. haftaya kadar oluşmaz. XY kromozomu taşıyan embriyolarda korteks gerilerken medulla testise farklanacaktır (2,3). Gonadal cinsiyet Y kromozomunun kısa kolunda yer alan Seks Belirleyici Bölgesi SRY (Sex determining Region of the Y) geninin varlığıyla kesinleşir. DNA'ya bağlı spesifik bir protein olan Testis Belirleyici Faktörü'nün (testis-determining factor, TDF) SRY geni tarafından kodlandığı, bu faktörün testis gelişimi ve farklılanmasından sorumlu olduğu ortaya konmuştur.(2,3) Başlangıçta TDF nin, Page ve arkadaşları tarafından izole edilen Çinko Finger Gen proteini (Zinc Finger Protein Y, ZFY) olduğu düşünülse de (5), ZFY'nin bu proteine sahip olmayan XX genotipinde üç erkek ve bir XX interseks olgusunun saptanmasından sonra; ZFY'nin TDF olmadığı ortaya çıkmıştır. Daha sonra farelerde ZFY homologunun ekspresyonunun, testis belirlenmesinde etkin olmayan germ hücreleri ile ilişkili olmadığını kanıtlamıştır. İlerleyen yıllarda Y kromozomundan SRY geni izole edilmiştir (6). Mittwoch ise SRY geninin testiküler

farklanmasının ilk döneminde önemli rol oynadığını, diğer Y kromozomal genlerin ise germ hücrelerinin farklanmasında etkili olduklarını söylemiştir (7). Son yıllardaki çalışmalarda ise erkek gelişiminin SRY-DNA yapısındaki değişimlere karşı güçlü olmasına rağmen, kritik noktanın nuklear lokalizasyona bağlı olduğu ortaya çıkmıştır (8).

Erkek gelişiminin erken dönemlerinde, seminifer tübüllerin arasındaki mezenşimden Leydig hücreleri gelişir. Testiküler farklılaşmanın oluşmasından hemen sonra Sertoli hücreleri de Anti Müllerien Hormon (AMH) sentezlemeye başlar. Bu hormon tek taraflı olarak salgılandığı bölgede Müller kanalının gerilemesine neden olur. Bir hafta sonra, yaklaşık 8. haftada Leydig hücreleri testosteron salgılamaya başlarlar. Bu hormon mezonefrik kanaldan gelişen yapıların ve erkek dış genital organlarının oluşumunu sağlar. Dişiler ve erkekler farklılaşmamış gonad evresinde aynı anda iki ayrı kanal sistemine sahiptirler. Bunlardan mezonefrik kanal (Wolf kanalı) erkek genital kanallarının gelişiminde önemli rol oynar. Mezonefrik kanallardan epididimis, duktus deferens ve seminal vezikül gelişir. Paramezonefrik kanal (Müller kanalı) ise dişî üreme sisteminin gelişiminde önemlidir. Normal erkek dış genital sisteminin gelişmesi için Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronun 5-alfa-redüktaz enzimi aracılığı ile aktif şekli olan dihidrotestosterona (DHT) dönüşmesi gerekir (2, 3).

Sertoli hücreleri, bir diğer önemli hormonal yapı olan Müller kanallarını inhibe eden faktörü (Müllerian inhibiting factor, MIF) salgılar.

DHT olmadığında genetik ve gonadal cinsiyetin ne olduğu önemli değildir. Dış genital yapılar dişî yönünde gelişir. Böylece testosteron, MIF ve DHT varlığı, gelişen bir erkek embriyonun fenotipik cinsiyetini belirler.

Skrotumlar içinde testisler normal vücut sıcaklığının 2–3°C altındadır. Spermatogenez için düşük sıcaklık gereklidir. Ancak hormon üretimine (steroidogenez) katkısı yoktur. Yüksek ateş veya testislerin inmemesi gibi durumlarda sperm üretimi durur.

2.1.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ:

Testisin dışında kalın bir bağ dokusu kılıfı olan tunika albuginea bulunur. Bu kılıfın iç bölümü olan tunika vaskülosa ise kan damarlarından zengin, gevşek bağ dokusundan oluşur. Testisin arka duvarı boyunca tunika albuginea içeriye doğru uzanır ve kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Testise girip çıkan kan ve lenf damarlarıyla testisin boşaltım yolları mediastinumdan geçer (2).

Her testis, kapsülden organ içine uzanan kesintili bağ dokusu bölmeleriyle (septa) yaklaşık 250 adet lobüle ayrılmıştır. Lobüllerin herbiri spermlerin üretildiği 1–4 adet seminifer tübülden (duktuli seminiferi kontorti) ve Leydig (intersitisyel) hücrelerinin bulunduğu bağ dokusu stromasından oluşmuştur. Tübül uzun ve kıvrıntılı yapıdadır. Lobül içinde kendi üzerine katlanmalar oluşturur ve kıvrımlar yapar. Kıvrımların son kısımları mediastinuma doğru kısa ve düz biçimde seyreder. Seminifer tübüllerin bu kısmına düz tübüller (tübüli rekti) denir. Tübülü rekti mediastinum içinde yer alan anastomozlardan sorumludur ve seminifer epitelyumun ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanal sistemi olan rete testis ile devam eder (1,2).

Seminifer tübüller oldukça kıvrımlı, içi boş yapılar olup yoğun kapiller ağ ile çevrelenmiştir. Tübüllerin her biri yaklaşık 150 mikrometre çapında, 80 cm uzunluğunda, iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Her iki testiste yaklaşık 1000 tübül vardır ve toplam uzunlukları yaklaşık 0,5 km kadardır. Tübüllerin her iki uç kısmı kısa bir düzleşme ile rete testislerde sonlanır. Rete testis mediastinum içerisinde dar kanallardan oluşan bir ağ yapısıdır. Yaklaşık 10–12 adet efferent kanal çıkar. Bu kanallar ile spermler epididimise taşınır. Seminifer tübüllerin duvarı dışta tunika propria denilen bağ dokusu tabakası, içte kalın bir seminifer epitel katmanı ve bunların arasında bulunan bazal laminadan oluşur. Seminifer epitelin oturduğu bazal lamina en çok laminin, tip IV kollajen ve heparan sülfattan zengin proteoglikan yapıdadır. Ayrıca bazal lamina fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrelenmiştir. Bazal laminanın intersitisyel dokuya doğru olan dış kısmı açık renklidir. Burada tip I kollajen lifler bulunur. Seminifer epitel başlıca iki hücre tipi içermektedir. Bunlar Sertoli hücreleri ile çeşitli olgunlaşma aşamasındaki spermatogenik hücrelerdir(1,3).

2.1.3.1. SERTOLI HÜCRELERİ:

Sertoli hücreleri; bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan uzun piramidal biçimli, bazal membran üzerine oturan, destekleyici hücrelerdir. Bu hücreler, puberteye kadar seminifer epitelde dominant olarak bulunurlar, puberteden sonra seminifer tübüleri döşeyen hücrelerin yaklaşık % 10'unu oluştururlar. Sertoli hücreleri puberteden sonra postmitotiktir. Erişkin testisinde mitotik hücre bölünmesi gözlenmez. Daha ileri yaşlarda spermatogenik hücre popülasyonu düştüğü için, Sertoli hücreleri tekrar epitelin ana elemanı haline gelir (1).

Sertoli hücrelerinin çekirdekleri olukludur ve heterokromatin kitleleri ile ilişkili geniş bir çekirdekçik içerir. Sitoplazması düz ve granüllü endoplazmik retikulum, mitokondriyonlar, lizozomlar, lipid damlacıkları, yaygın bir golgi aygıtı ve zengin hücre iskeleti (*vimentin*, *aktin*, *mikrotübüller*) içerir. Sitoplazmalarında işlevleri henüz tanımlanmamış olan Charcot-Bottcher kristalloidleri denilen inklüzyon cisimcikleri vardır (1,5).

Komşu Sertoli hücrelerinin yan yüzleri birbirleriyle sıkı bağlantılar (*zonula okludens*) yaparlar. Böylece seminifer tübül iki bölmeye ayrılır. Birinci bazal bölme daha dardır. Sıkı bağlantının alt kısmında yer alır ve daha geniş olan lümeneye yakın olan adluminal bölme çevreler. Bu hücreler arasındaki sıkı bağlantılar nedeniyle lümen içi yapıları, bağ dokusunun etkisinden koruyan bir kan-testis bariyeri oluşur. (3). Bazal bölme içinde spermatogoniumlar ve genç spermatozoidler (*leptoten*, *zigoten*), adluminal bölmede ise olgun spermatozoidler (*pakiten*), spermatozoidler ve spermiler bulunur. Spermatozoidler mayoz ile bölünürlerken, mayozun ileri evrelerinde adluminal bölmeye geçerler. Kan-testis bariyerinin varlığını gösteren bir çalışmada, testis damarlarına verilen çoğu maddenin testisin lenf damarlarında gözlendiği ama rete testis sıvısına geçmediği gösterilmiştir. Testis içindeki kan damarlarının duvarları ve peritübüler miyoid hücreleri de kan-testis bariyerinde fonksiyoneldir. Kan-testis bariyeri pubertede spermatogenez başladığı zaman oluşur. Bu bariyerin önemi, germ hücreleri mayoz geçirirken dış etkilere çok hassas oldukları için, bunlara daha düzenli ve spesifik bir ortam sağlamasıdır. Mayoz geçirdikten sonra haploid hale gelen germ hücrelerinin vücut bağışıklık sistemi tarafından tanınmaması nedeniyle yıkılmalarına da engel olmaktadır. Ayrıca, bu bariyer sayesinde bazı ilaçların germ hücrelerine

ulaşmaları da önlenmiş olunur. Sertoli hücreleri "kan-testis bariyeri" sayesinde adluminal bölümde bulunan hücreler için dış ortamdandan izole, özel bir mikroçevre yaratmış olurlar (9).

Sertoli hücrelerinin birçok işlevi vardır;

1. Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermatogenik hücreleri destekler, korur ve besler.
2. Spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan rezidual (artık) cisimcikler olarak adlandırılan, fazla hücre kısımlarını fagosite eder.
3. Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin sıvı salgılamak gibi birçok fonksiyonu vardır.
4. Sertoli hücrelerinin bir diğer salgısı, vücuttaki demir taşınımını sağlayan transferrindir.
5. Kan-testis bariyerinin oluşturulması ve gelişmekte olan gametlerin immünolojik olarak tanınmasının engellenmesidir.
6. Androjen Bağlayıcı Protein (ABP), AMH ve inhibin'in sentez ve salgılanmasını sağlamaktır (3).

Sertoli hücreleri testosteron ve FSH ile birlikte spermatogenezisi kontrol eder ve ABP sentezini ve sekresyonunu düzenler. ABP seminifer tübüllerin dışında üretilen testosteron ve DHT bağlayarak germinal epitelyum ve lümende normal germ hücre olgunlaşması için gerekli yüksek androjen konsantrasyonu sağlayan bir proteindir. ABP, hipofizden salgılanan FSH'a bağlanır ve sertoli hücrelerindeki FSH reseptörleri tarafından tanınır. Hem ABP hem de androjen reseptörü, androjenlerin bağlanma potansiyeli olan farklı proteinlerdir. ABP salgısal bir protein iken, androjen reseptörü sitoplazmik ve nükleer bir proteindir (2).

Sertoli hücreleri ayrıca inhibin ve aktivin altbirimlerini de (α ve β alt birimleri) salgılar. İnhibin ($\alpha\alpha$ heterodimeri) hipotalamustan ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör (GnRH) ve FSH üzerine negatif geri bildirim etkisi

gösterirken, aktiv (αα veya ββ homodimer) FSH salınımı üzerine pozitif geri bildirim etki gösterir (1).

Fetal Sertoli hücreleri MIF sentezler ve salgılar. MIF'in moleküler yapısı; dönüştürücü büyüme faktörü-beta (transforming growth factor-β) TGF-β ile benzerdir. MIF, Müller kanallarında hücre bölünmesini inhibe ederek, sonuçta dişi üreme organlarının gelişimini engelleyen büyük, glikoprotein yapıda bir maddedir.

2.1.3.2. SPERMATOGENİK HÜCRELER:

Düzenli olarak çoğalıp olgun spermilere farklı hücrelerdir. Spermatogonik hücreler testis gelişiminin erken dönemlerinde vitellus kesesinin allantoise komşu duvarında gözlenir ve gonadal kabartılara göç eden primordiyal germ hücrelerinden gelişir. Sertoli hücrelerinin arasında, sürekli gelişen, düzensiz biçimde yerleşmiş katmanlar oluştururlar. En az gelişim gösteren immatür hücreler olan bilinen spermatogonyumlar bazal lamina üzerinde yer alır. En olgun hücreler olan spermatidler Sertoli hücrelerinin apikal kısmına yapışık bir biçimde bulunur ve tübüllerin lümenle sınırını oluşturur.

Peritübüler doku da denilen lamina propria (interstisyum) tipik fibroblastlardan fakir çok katlı bağ dokusudur. İnsan seminifer tübüllerinin bazal laminasının dış tarafı, 3–5 sıra miyoid peritübüler kontraktil hücreler ve kollajen fibrillerden oluşur. Miyoid hücreler ultrastrüktürel düzeyde incelendiğinde, yapılarında düz kas hücrelerine benzer şekilde bazal lamina ve çok sayıda aktin filamentleri görülür. Bu hücreler fibroblastların yokluğunda kollajen sentezi yaptığından dolayı granüllü endoplazmik retikulumundan zengindirler. Bu hücrelerin ritmik kasılmaları, spermilerin ve testis sıvısının seminifer tübüllerden dış boşaltım yollarına iletilmesinde yardımcıdır. Miyoid hücrelerin dış kısmındaki interstisyel alanda kan ve lenf damarlarından başka Leydig hücreleri de yer alır.

Yaşlanmanın normal bir süreci olarak peritübüler dokunun kalınlığı artar. Bu kalınlaşma spermin yapımında azalma ve seminifer tübüllerinin boyutlarında gerilemeye neden olur. Erken yaşlarda peritübüler dokuda görülen aşırı kalınlaşma ise kısırılık nedenlerindedir (2).

2.1.3.3. LEYDIG HÜCRELERİ:

Seminifer tübüller arasındaki gevşek bağ dokusundan yapılı bol damarlı tabaka interstisyumda, dağılmış olarak fibroblastlar, mast hücreleri, diğer bağ dokusu yapıları ve Leydig hücreleri bulunur (3). Büyük, poligonal ve merkezi nukleusa sahip, sitoplazması eozinofilik boyanan tipik olarak lipid damlacıkları içeren hücrelerdir. Belirgin, çubuk biçimli sitoplazmik inklüzyonlar olan Reinke kristalloidleri ve lipofuksin pigmenti hücre için karakteristik özellikler arasındadır. Rutin histoloji preparasyonlarında Reinke kristalloidleri yaklaşık 3x20 µm boyutlarında ve ışığı kıran yapıda izlenir. Fonksiyonu ve yapısı tam olarak bilinmemekle birlikte muhtemelen hücrenin protein yapıdaki bir ürünüdür. Steroid salgılayan hücrelerde olduğu gibi Leydig hücreleri de iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikuluma ve tubuloveziküler kristal mitokondrilere sahiptir. Granülsüz endoplazmik retikulumlarda kolesterolden testosteron üretimi için gerekli enzimler bulunur (2).

Erken fetal dönem boyunca Leydig hücreleri testosteron salgılar. Fetal Leydig hücreleri gebeliğin 8 ile 18. haftaları arasında oldukça aktiftirler. Gebeliğin 18. haftasından itibaren, testiste Leydig hücre popülasyonu baskındır. Embriyoda testosteron ve diğer androjenler, erkek fetusda gonadların gelişimi için gereklidir. Pubertede ise testosteron salgısı, sperm üretimi, aksesuar bezlerin salgısının başlatılması ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi için gereklidir. Erişkinde ise testosteron salgısı, spermatogenez, sekonder seks karakterlerinin devamı, genital boşaltım kanalları ve aksesuar bezler için gereklidir(1, 2).

Pubertede Lüteinizan hormon (LH) artışı ile androjen sentezi oluncaya kadar androjen seviyeleri düşük kalır. LH ve prolaktin Leydig hücre fonksiyonunu düzenler. Prolaktin, LH reseptörünün gen ekspresyonunu düzenlerken, LH testosteron üretiminde görev alır. Hiperprolaktinemi, gonadotropin salınımını ve testisteki etkisini azaltarak, erkek üreme fonksiyonunu baskılar. Aşırı prolaktin, Leydig hücrelerinden androjenlerin üretimini azaltır. Bunun etkisi ile spermatogenesis zayıflayarak erektil disfonksiyon ve infertiliteye neden olabilir (1).

2.1.4. TESTİS FİZYOLOJİSİ:

FSH ve LH sırasıyla, Sertoli ve Leydig hücrelerinin fonksiyonunu düzenler. Hipofizin deneysel çıkarılması (hipofizektomi) ardından, spermatogenezin duraklaması FSH ve LH'nin spermatogenik işlevin vazgeçilmez düzenleyicisi olduğunu göstermektedir.

ABP, Sertoli hücreleri tarafından sentezlenir, salınımı FSH tarafından uyarılır. ABP, testesteron veya DHT'ye bağlanır. ABP-androjen kompleksi spermatogenik hücrelerin çevresinde androjen seviyelerini yükseltir. Bu kompleks, yüksek yoğunlukta androjen bulunduran epididimise de taşınır.

LH, Leydig hücrelerinde testesteron sentezini uyarır. Hem testesteron hem de 5 α -redüktaz ile testesteronun indirgenme metaboliti olan DHT, aynı androjen reseptörüne tutunur.

Androjen reseptörü steroid-tiroid-retinoik asit reseptörlerinin üyesidir ve üç birimden oluşur;

1. DNA bağlayıcı birim(androjen-yanıtı veren elemanı tanır)
2. Transkripsiyon faktörleri bağlayıcı birim,
3. Androjen-bağlayıcı birim.

X kromozomundaki bir gen tarafından kodlanan, androjen reseptöründeki bir bozukluk, androjen duyarsızlığı sendromunun (*androjen insensitivite sendromu*, AIS) sebebidir. Bu genetik bozukluğa sahip kişilerdeki semptomların şiddeti, androjen reseptörünün kısmen veya tamamen androjenleri bağlama yetersizliğine bağlı olarak değişir.

Testesteron, LH' nin salınımında negatif geri bildirim etkisi gösterir. Dolaşım kanındaki aşırı testesteron seviyesi anterior hipofizden LH salınımını engeller. Testesteron seminal veziküllerin fonksiyonunu uyarırken, DHT de prostat bezi üzerine etki eder.

Erişkin testisinde Sertoli hücreleri inhibin, aktivin ve ABP olarak üç ana salgısal protein üretir. Fetal testis de ise Sertoli hücreleri MIS sentezler ve salgılar.

2.1.5. SPERMATOGENEZE ETKİ EDEN FAKTÖRLER:

2.1.5.1. SICAKLIK

Normalde testisler vücut ısısından 2-3°C daha soğuk ortamda bulunurlar. Spermatogenez için 35 °C' lik sıcaklık idealdir. Skrotum sadece testisleri içerisinde taşımakla kalmaz, kasılıp-gevşemesiyle testislerin belirli bir ısıda kalmasını da sağlarlar. Sıcaklık dengesi, spermatik arteri saran venlerin oluşturduğu pampiniform pleksus tarafından skrotumda sağlanır ve sıcaklığı dağıtmak için ters yönlü akımla ısı değişimini gerçekleştirir. Sıcaklık 35°C'nin altına düştüğünde sıcaklığı artırmak için, spermatik kordondaki kremaster kasının ve skrotal kesenin dartos kasının kasılması testisi karın boşluğuna yakınlaştırır.

2.1.5.2. KRIPTORŞİDİZM

Kriptorşidizm (inmemiş testis) gelişim sırasında testisin skrotal keseye ulaşamaması ve abdominal boşluk veya inguinal kanalda kalması olayıdır. Bu durumda, normal vücut sıcaklığı (37°C - 38°C) spermatogenezini önler ve durum çift taraflıysa infertilite meydana gelir.

Testislerin skrotuma inişi iki aşamada gerçekleşir:

1. Transabdominal iniş, MIF tarafından kontrol edilir,
2. İnguinal-skrotal iniş, genitofemoral sinir tarafından taşınan kalsitonin gen-ilişkili peptid ile indüklenen androjen salınımı kontrolündedir.

Yapılan son araştırmalar göstermektedir ki; insulin-benzeri faktör 3 ve Hoxa-10 genlerindeki mutasyonlar bilateral kriptorşidizm ile ilişkilidir. Transabdominal iniş bozuklukları sık olmamaktadır. Birçok çocukta inmemiş testis inguinal kanalda tespit edilebilir. İnguinal kanaldaki testisler çevredeki ligament ve kemikler tarafından travma ve basıya maruz kalırlar.

Kriptorşidizm, prematüre yeni doğanlarda sık görülen (%30) bir olay olmasına rağmen zamanında doğanlarda yaklaşık % 1 oranında görülür. Bu durum geri dönüşümsüz histolojik değişikliklere neden olabilir ve testis kanseri riskini artırır. Testiküler tümörlerin büyük bir çoğunluğu tedavi edilmemiş kriptorşid testis ile ilişkilidir. Hormonal tedavi (koriyonik gonadotropin uygulaması) testiküler inişi

uyarabilir. Bu başarısızsa, cerrahi bir sonraki seçenektir ve inmemiş testislerin cerrahi operasyonla düzeltilmesi gerekmektedir (1). Orşiyopeksi (testislerin skrotumlara indirilmesi) tercihen histolojik değişiklikler başlamadan yani yaklaşık 2 yaş civarında yapılmalıdır (2).

2.1.5.3. *KANSER KEMOTERAPISI*

Anti-tümoral ilaçlarla tedavi edilen genç erkek hastalar geçici süreyle aspermatogenik hale gelirler. Tedavi spermatogonyumların mitozunu ve spermatositlerin mayozunu etkileyebilmektedir. Halbuki, dinlenmedeki DNA sentezi ve hücre bölünmesine katılmamış kök hücreler, antikanser kemoterapi kesildiği andan itibaren seminifer epitelde tekrar baskın hale geçebilirler (2). Hayvan çalışmalarında radyoterapi ve kemoterapinin DNA hasarı yaptığı insan spermlerinde ise anöploidi oranında geçici olarak bir artışa sebep olduğu gösterilmiştir (17).

2.1.5.4. *KABAKULAK*

Kabakulak, postpubertal erkeklerde %20–30 akut orşit ile görülen sistemik viral bir enfeksiyondur. Genellikle, kabakulak nedeni ile oluşan orşitin ardından spermatogenik fonksiyonda değişiklik görülmez.

2.1.5.5. *SPERMATİK KORDON BÜKÜLMESİ (TORSİYONU)*

Spermatik kordonlar bükülerek testisin nekrozuna sebep olabilir. Spermatik kordonun bükülmesi testise gelen arteriyal kan akımını ve testisteki venöz drenajı bozabilir. Genellikle bu durum fiziksel bir travma veya tunika vajinalis içinde anormal testis hareketi ile oluşabilir. Torsiyon hemen tedavi edilmezse, hemorajik enfarkt gelişir ve nekroz ile sonuçlanır.

2.1.5.6. *RADYASYON*

Spermatogonyal kök hücrelerin erkek fertilitesinde önemli etkileri vardır. Bu hücreler kısmen sessiz hücrelerdir ve dolayısıyla radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler. Mitotik olarak bölünen spermatogonyumlar, mayotik bölünen spermatositler ve farklılanmakta olan spermatidler kanser kemoterapisine ve radyasyona duyarlıdır. Radyoterapi veya antikanser kemoterapisinin sonlandırılmasından sonra, spermatogonyal kök hücreleri spermatogenik süreci yeniden oluşturabilirler. Postmitotik Sertoli hücreleri bu tedavilere yüksek oranda

dirençlidirler. Spermatogenezisin turnover zamanı 64-72 gün olduğu için ve matür spermdeki radyasyonun öldürücü etkisi hiçbir zaman radyasyon dozundan hemen sonra gözülmez. Bununla birlikte matür spermelerde genetik hasar oluşabilir. Erkeklerde yaklaşık 600 cGy' lik doz aylarca kalıcı sterilite nedeni olabilir. Daha düşük dozlar ise aylar sonra steriliteye sebep olsalar bile bu etki geçicidir ve fertil hale 1-2 yıl sonra geri dönülebilir (1).

2.1.5.7. YAŞ

Chen ve arkadaşlarının 2003 yılında 551 olguda yaptığı bir çalışmada semen volümü, sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, motilite ve normal morfolojili sperm sayısının yaşla azaldığı görülmüştür (11). Chen ve arkadaşları bir başka çalışmada 306 olgu üzerinde mevsim, yaş ve sigara kullanmanın semen parametreleri üzerine etkisini araştırmış. Yaş grupları ile semen volümü, sperm konsantrasyonu, motilite yüzdesi ve normal morfoloji yüzdesi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (12). Eskenazi ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptığı bir çalışmada ise semen kalitesinde yaşa bağlı belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Özellikle semen volümü ve sperm motilitesi konusunda daha belirgin bir azalış gözlenmiştir (13).

Yaşlanma ile doğru orantılı olarak spermin DNA'sında hasar oluşmaktadır. DNA çift sarmalındaki hasar ile spermdeki apoptoz yaşlanmaya paralel olarak artmaktadır. Bu artış spermatogenezis esnasında ve sonrasında hücre seçim sistemindeki yetersizliği göstermektedir. Narendra ve arkadaşları yaşın ilerlemesiyle sperm DNA'sında meydana gelen hasarların arttığını ve bu hasarlı hücrelerin eliminasyonunun güç olduğunu yaş ile spermdeki lökosit sayısı ve reaktif oksijen türleri arasında bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir (14). Bazı çalışmalar da fertil ve infertil erkeklerde sperm motilitesiyle yaş arasında pozitif bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir. Yaşa bağlı azalan sperm motilitesinin ve artan DNA hasarının nedeninin, semen içerisindeki lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) olabileceği ileri sürülmüştür (15,16).

2.1.5.8. VARIKOSEL

Varikozel testiküler venlerdeki geri akımla karakterize olup spermatik kordon venlerinin anormal genişlemesi nedeniyle oluşur. Varikozel sonucu sperm üretimi

azalır (1). Varikoselin spermde DNA hasarına nasıl yol açtığı henüz tam anlaşılmamıştır. Fujisawa ve arkadaşları varikoselli hastaların testis dokusunda DNA polimeraz seviyesinde ciddi bir azalma olduğunu ve bu enzim eksikliğinin spermatogenezis üzerine olumsuz bir etki yapması nedeniyle DNA hasarı meydana getirebileceğini ileri sürmüşlerdir(18). Yapılan çalışmalar varikoselli fertil veya infertil hastalarda seminal oksidatif strese bağlı yan ürün (ROS) düzeyinde artma ve toplam antioksidan kapasitede azalmaların meydana geldiğini ortaya koymaktadır. Artan seminal oksidatif stres ürünleri, sperm DNA'sındaki hasarla birlikte spermin plazma membranında lipid peroksidasyonuna neden olur. Bu da spermin motilitesi, metabolizması ve fertilizasyon kapasitesinde azalmalara neden olarak spermin fonksiyonunu engeller (19). Ayrıca oksidatif stres, spermin kromatin bütünlüğünü etkileyerek tek ve çift DNA sarmalı kırılmalarına sebep olmaktadır (20).

2.1.5.9. SİGARA

Sigara ve sperm parametreleri arasındaki ilişkiyi değerlendiren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bir kısım yayınlar sperm parametrelerinin sigara kullanımından etkilendiğini savunurken, yapılan bazı çalışmalarda ise sigara ile sperm parametreleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Bir çalışmada semen volümü, total sperm sayısı, hipoozmotik şişme testi (hypo-osmotic swelling, HOS) ile sigara kullanımı arasında direkt bir ilişki saptanamamış, ancak motilite ve morfoloji bozukluklarının sigara içenlerde daha fazla olduğu gözlenmiştir(21). Yine aynı çalışmada sigara içenlerde semende lökosit konsantrasyonunun içmeyenlere göre daha fazla olduğu saptanmıştır.

Alkol ve sigaranın semen parametreleri üzerine etkisini araştıran bir başka çalışmada ise alkol veya sigara tüketiminin semen parametrelerini etkilemediği, ancak her ikisini birlikte kullananlarla kullanmayanlar karşılaştırıldığında semen volümü, sperm konsantrasyonu ve motil sperm yüzdesinde belirgin bir azalma ve motil olmayan canlı spermelerde belirgin bir artma gözlenmiştir. Böylece bu iki alışkanlığın sinerjik etkisi tartışılmıştır (22).

İnfertil türk erkeklerinde yapılan bir çalışmada günde yirmi adet ve daha fazla sigara içenlerde sperm kuyruk defektlerinin daha fazla olduğu gözlenmiş, ancak ilginç

olarak günde yirminin üzerinde sigara içenlerde hafif içicilere göre ileri hareketliliğin daha fazla olduğu saptanmıştır (23). Ancak İsveç erkeklerinde yapılan çalışmada semen volümü ve total sperm konsantrasyonu dışında semen kalitesi ile sigara içimi arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (24). Buna karşın Trummer ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonucunda sigara içiminin semen parametrelerini etkilemediği, ancak yuvarlak hücre ve lökosit oranını anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir (25). Antisperm antikollarının sigara içenlerde daha fazla oranda gözlemlendiği çalışmalar da bulunmaktadır (26). Bir diğer ilginç çalışma sigara içenlerde sperm konsantrasyonu, total sperm sayısı, motilite ve total motil sperm yüzdesinde belirgin mevsimsel değişiklikler olduğunu ve bu parametrelerin daha sıcak mevsimlerde düştüğü gösterilmiştir. Ancak sigara içmeyenlerde artan sıcaklıkla böyle bir etki görülmemiştir (27). Sigara içmeyenlerin sperm kalitesinin daha iyi olduğunu bildiren pek çok yayın bulunmaktadır (28,29).

2.1.6. SPERMATOGENEZ:

Spermatogonyumun ileri derecede özelleşmiş sperm haline gelinceye kadar geçirdiği sürece spermatogenez denir. Spermatogenez ergenlikten önce başlar, gonadotropin düzeyinin yükselmesinin etkisiyle yaşam boyunca devam eder.

Spermatogenez 3 ayrı evreden oluşur:

1. Spermatositogenez
2. Mayoz
3. Spermiogenez

2.1.6.1. SPERMATOGONYUMLAR:

Spermatogonyumlar bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri ile arasındaki sıkı bağlantıların altında yer alırlar ve bu nedenle kan-testis bariyerinin dışında kalırlar. Spermatogonyumlar spermatogonyal kök hücrelerden köken alırlar ve pubertede başlayan başarılı mitotik hücre bölünmeleri geçirirler.

Üç tip morfolojik spermatogonyal hücre tipi bulunur:

Koyu A Tipi (Ad) spermatogonyumlar: Çekirdeği oval, 12 µm çapında, yuvarlak şekilli hücreler olup bol heterokromotin içerirler. Seminifer tübüllerdeki kök hücrelerdir ve mitozla bölünerek diğer Koyu A Tipi spermatogonyumları ve Açık A Tipi spermatogonyumları oluştururlar. Bu hücreler düzensiz aralıklarla bölünerek kök hücre olarak kalabilecekleri gibi, bir çift koyu A Tipi (Ad) spermatogonyum ya da bir çift açık A Tipi (Ap) spermatogonyum da oluşturabilirler.

Açık A Tipi (Ap) spermatogonyumlar: Çekirdekleri açık renk boyanır, oval ve ince granüler kromatine sahiptirler. Mitokondri ve çok az miktarda Golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum içerir. Ap spermatogonyumlar, farklılaşma sürecinde ve spermin oluşumunda görevlidirler. Birkaç mitoz bölünme geçirerek sayılarını artırıp diğer spermatogonyumları oluşturur.

B Tipi spermatogonyumlar: Spermatogonyumların en çok bulunan tipidir. Bunlar da bazal lamina üzerine otururlar. Fakat bazal lamina ile bağlantıları daha azdır. Hücrelerin çekirdeği merkezi olarak yerleşmiş ve yuvarlaktır. Çekirdekte bir ya da iki koyu boyanan çekirdekçik bulunur. Sitoplazmada diğer A tiplerine göre daha fazla ribozom bulunur. Oval yerine yuvarlak olan nukleusları dışında açık tip A spermatogonyumlara benzerler. Mitozla bölünerek primer spermatositleri meydana getirirler B tipi spermatogonyumlar, mayoz bölünme geçirecek olan spermatositlere dönüşürler. Bu sırada yavaş fakat belirgin bir büyüme ile çapları 18 mikrona ulaşır (2, 8).

2.1.6.2. SPERMATOSİTLER VE MAYOZ:

B Tipi spermatogonyumlar mitozdan hemen sonra, DNA sentezindeki S fazını tamamlar ve mayoz bölünmenin profaz aşamasına girer. Bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatositi oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye gider. Primer spermatositler 4C DNA miktarına sahiptir ve 1C hücre başına yaklaşık 1,5 pg DNA'ya eşdeğerdir. Birinci mayoz bölünme yaklaşık 22 gün süren uzun bir profaz evresi ile karakterizedir. Spermatositler iki mayotik hücre bölünmesi sonrasında Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal bölümünde yer alırlar. Böylece, mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşir.

Birinci mayoz bölünmedeki profazının alt evreleri ise; leptoten (ipliksi), zigoten (eşleşen), pakiten (kalınlaşan), diploten (çift görünen) ve diyakinez (uzaklaşan) evreleridir. Bu alt evreler dört olayla karakterizedir.

1. Zigoten-pakiten evresinde spermatositlerde sinaptonemal kompleks oluşumu,
2. Homolog kromozomların eşleşmesi (sinapsis)
3. Homolog kromozamların kardeş olmayan kromatidleri arasında genetik bilgi değişimi (krossing-over)
4. Eşleşmiş homolog kromozomların ayrılması yani ayrılma (disjunction)

Uzun olan bu profaz evresinden sonra, kardeş kromatid çiftleri metafaz, anafaz ve telofaz evreleri geçerir ve sekonder spermatositlere dağılır.

Sekonder spermatositler hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve ikinci mayoz bölünmeyi geçirir. Her bir sekonder spermatosit artık herhangi bir hücre bölünmesi göstermeden sperm şeklinde olgunlaşan iki adet spermatid meydana getirir. Birinci mayoz bölünme günlerce süren bir süreç olmasına rağmen ikinci mayoz bölünme dakikalar sürdüğünden primer spermatositler seminifer tübüllerde en çok gözlenen hücrelerdir.

İkinci mayoz bölünmenin sonunda 2C DNA miktarı 1C' ye düşer. Meydana gelen spermatidlar haploid spermatidlerdir ve spermiogenez sürecine girerler (1).

2.1.6.3. SPERMATIDLER VE SPERMIOGENEZ:

Spermiogenezis olarak adlandırılan süreçte önce yuvarlak olan spermatidler uzayarak uzamış yapıdaki spermatidleri yaparlar. Üç ana olay spermiyogenezi karakterize eder:

Flagellumun (kamçı) gelişmesi: Flagellum, distal sentriyolden gelişir. Keratin içeren dış yoğun lifler ve fibröz kılıf ile çevrili eşmerkez dizilimli 9+2 mikrotübül aksonem yapısındadır. Mitokondriler kuyruğun orta parçasında sarmalımsı bir kılıf oluşturur, spermatid olgunlaşma evresi sırasında gelişip, flagellum boyunca dizilimlerini tamamlarlar .

Akrozom gelişmesi: Döllenme için şart olan hidrolitik enzimlerin depolanması ve sürekli sentezinin gerçekleştiği akrozomal kesenin oluşumudur. Akrozomun gelişmesi dört ardışık evreden oluşur: Golgi evresi, kep/şapka evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi

1) Golgi evresi: Spermatidlerin sitoplazmasında nukleusun yanında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve endoplazmik retikulum bulunur. Periyodik-asit Schiff (Periodic-acid Schiff, PAS) pozitif proakzomal granüller Golgi aygıtında birikir ve bu proakrozom granülleri glikoproteinden zengindir ve bir süre sonra zarla çevrili bir akrozom vezikülü ile birleşir. Böylece büyük, tek bir granül içeren akrozom granülü oluşur. Akrozom granülü daha az yoğun akrozom vezikülüyle çevrilir. Vezikül ve granül çevredeki Golgi ürünlerinin katılımıyla büyümeye devam eder. İyi gelişmiş granülsüz endoplazma retikulumu ile Golgi cisimciği arasında birçok bağlantı bulunur. Çekirdeğin üzerindeki akrozom bölgesi spermin ön kutbunu belirler. Spermin gelişiminin bu aşamasında, mitokondriler aniden sitoplazmanın kenarına doğru göç ederek plazma zarına yakın yerleşir. Akrozom granülü ve vezikülü oluşurken iki adet silindir şeklinde ve birbirine dik konumdaki sentriyol, oluşan akrozomun aksi yönünde, çekirdeğin arkasına doğru hareket eder.

2) Başlık evresi: Akrozom vezikülü ve granülünden akrozom başlığı oluşur ve çekirdeğin tüm ön kısmını kapsar. Akrozom başlığı akrozom içeriğini kapsayacak biçimde iç ve dış akrozom zarlarını oluşturur. Çekirdek zarı ve iç akrozom zarı arasında granüler filamentöz bir madde meydana gelir. Akrozom bölgesinde çekirdek zarı, porlarını kaybeder ve daha yoğun görünür. Buna neden ise, iç tarafındaki kromatin yoğunlaşmasıdır.

3) Akrozom evresi: Spermatid çekirdeği ön kısmı, seminifer tübüllerin bazaline doğru yerleşir. Çekirdek uzar ve kromatin yoğunlaşması olur. Spermatid sitoplazması, seminifer tübül epitelinin luminal bölgesine doğru yer değiştirir. Çekirdeğin akrozom bölgesi plazma zarına yaklaşır ve hücre uzar. Çekirdek progresif olarak yassılaşır ve uzar. Bu sırada kromatin granülleri genişler, boyları eşitlenir ve aralarda görülen bazı boşluklar dışında homojen bir biçimde dağılır. Bu boşluklar ve vakuoller genellikle kaybolur ve son aşamalarda çekirdek oldukça koyu

boyanan homojen bir görünüme kavuşur. Akrozom büyümesini tamamladığında Golgi kompleksi, çekirdeğin ön kutbundan sitoplazmanın bol olduğu bölgeye göç eder.

4) Olgunlaşma evresi: Bu aşamada spermatid sitoplazması atılır ve Sertoli hücrelerince fagosite edilir. Daha sonra Sertoli hücreleri geç spermatidlerin tübül lümenine doğru serbest hale gelmesini de sağlar. Bazı türlerde bu son aşamada ileri çekirdek yoğunlaşması ve akrozomda şekil değişiklikleri görülebilir (2).

Nükleer yoğunlaşma: Somatik histonlar (H1, H2A, H2B ve H4) arjinin ve lizin zengin protaminlerle yer değiştirdiğinde nükleer yoğunlaşma oluşur. Bu da sperm genomik DNA'sını stabilize eder ve korur. Somatik histonların protaminlere dönüşümünden sonra, nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyalini yoğunlaştırmak için düz kromatin lifler yan yana dizilirler. Çekirdek uzar ve yoğunlaşır, manşet kaudal yönde göç eder. Olgunlaşma, çekirdek yoğunlaşır, manşet dağılmaya başladığında ve dış yoğun lifler tamamen organize olduğunda tamamlanır. Spermiogenezin olgunlaşma aşamasından sonra belirgin bir RNA sentezi yoktur (1).

2.1.7. SPERMİN YAPISI:

Semen, testisten gelen sıvı ve spermle birlikte epididimis, duktus deferens, prostat, vezikula seminalis ve glandula bulboüretalisten gelen salgıları içerir. Semen alkalik ortamı üretra ve vajendeki asidik durumu nötralize eder. Semen içerdiği prostaglandinler spermelerin hareketliliğini kolaylaştırırken, zigotun implantasyonunu da kolaylaştırır.

Bir sperm baş, boyun ve kuyruk bölgesinden oluşur. Toplam uzunluğu yaklaşık 60 µm kadar olan spermun baş bölgesinin boyu 3-5 µm, eni 2-3 µm dir. Esas görevi; DNA materyalini taşımak ve korumak olan baş bölgesi, lizozomal organelin bulunduğu akrozom, döllenmek üzere oosite yapıştığı kısım olan ekvator bölgesi ve akrozom sonrası bölgeyi içerir.

2.1.7.1. Baş Bölgesi:

Akrozom: Çekirdeğin üçte ikisini kaplar. Plazma zarının hemen altında bulunan akrozom zarı arkaya doğru ilerler, orada bir katlantı yapıp tekrar ön tarafa gelir. Bu paralel gibi duran iki zar arasında birçok hidrolitik enzimin paketlenmiş olarak beklediği yer olan akrozomal matriks bulunur. Buradaki esas iki enzim hyaluronidaz ve akrozindir. Akrozin, proakrozin adı verilen inaktif zimojenlerde tutulan tripsin benzeri bir proteinazdır. Akrozin; zonayı parçalayarak spermin geçmesini sağlar. Spermin içerdiği diğer zimojen sperminojendir. Bu enzimler akrozom reaksiyonunda salgılanırlar.

Olgun spermde akrozom başlığının arka sınırında ekvator bölgesi bulunur. Döllenmeden önce, akrozom reaksiyonu ve akrozomal başın kaybından sonra dış akrozomal zarın oolemmaya bağlanması ön akrozom ile ekvator bölgesi arasındaki bölgeden olur. Buraya komşu akrozom zarında elektron yoğun madde birikimi vardır ve elektron mikroskopunda pentalaminer bir görünüme neden olur. Akrozomun baş kısmındaki zengin enzimler bu bölgede yoktur. Ekvator bölgesi vimentinden zengindir.

Peri-nükleer madde: Akrozomun altında onu çekirdekten ayıran ince tabakaya perinükleer madde denir. Disülfid köprüleriyle sağlamlaştırılmış bu madde, akrozomla nükleus arasında sert bir yapı olup kesintisiz bir tabaka yaparak çekirdeğin üzerini kaplar. Akrozomun arkasındaki bu madde, post akrozom kılıfını oluşturur.

Çekirdek: Spermin DNA'sı arginin ve sisteinden zengin oldukça bazik proteinler olan protaminlerle bir kompleks halinde bulunur. Sistein miktarı nedeniyle disülfid çarpaz bağları fazladır. Bu, çekirdeğe sağlamlık ve dayanıklılık kazandırır. Çekirdek haploid sayıda kromozom içerir ve oosite girmeden ve protaminler ayrılmadan DNA aktive olamaz.

Son halka ve bazal plaka: Kuyruğu baş bölgesinden ayıran yapıdır. Burada çekirdek zarı porlara sahiptir. Bu bölge de elektronca yoğun bir maddenin oluşturduğu bazal plaka yer alır.

Sitoplazmik artık: Bağlayıcı-orta parça çevresinde içinde ribozomlar ve mitokondrilerin bulunduğu sitoplazmik artık kalabilir. Maturasyonu bozulan sperm spermiogenezin son evresinde fazla sitoplazma artığını atamaz. Bu sperm morfoloji defekti TESE yapılan hastaların spermelerinde en sık görülen bozukluktur. Bu defektin neticesinde sperm normalden daha fazla ROS yapar ve oksidatif stres belirtileri verir (10).

Akrozom reaksiyonu ve ön akrozomal bölge: Akrozom ön kısmını örten plazma zarının iki önemli görevi vardır. Birincisi zona pellusidaya bağlanma, ikincisi akrozom reaksiyonunu başlatmak için dış akrozom zarıyla birleşmedir.

Zonayla birleşme muhtemelen zar glikokaliksinde bulunan karmaşık glikokonjugatlarla sağlanır ve lektin bağlayarak fonksiyel hale geçer. Hücre zarı, dış akrozom zarıyla kaynaşır ve akrozom reaksiyonu başlar. Akrozom reaksiyonu dört aşamada gerçekleşir:

1. Matrikste dekonduksiyon ve şişme ile dış akrozom zarında dalga benzeri görünüm ,
2. Plazma zarı ve dış akrozom zarı arasında noktasal kaynaşmalar ,
3. Her iki zarda pencereleme ve deliklenmeler
4. Akrozom yüzeyinde hibrid veziküller meydana gelir.

2.1.7.2. Boyun Bölgesi:

Uzunluğu yaklaşık 0,3 µm olup, yapısında segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriol bulunur. Proksimalde iki çift bölünmüş sütun, 2 major ve 2 minör sütun yapmak üzere baş alt kısmında birleşirler.

Distalde ise her sütun birbiri üzerine çaprazlaşır ve orta parçada dış yoğun liflerle birleşir. Bu sütunların görevi; boyun bölgesine esneklik kazandırmak ve bazal plaka bağlantısında gerilim yaratmadan bükülmeyi sağlamaktır.

Distal sentriyol ise spermiogenezin ileri evrelerinde ortadan kalkmaktadır. Bunlar aksonemin oluşumu sırasında önemli bir rol oynar. Proksimal sentriyol 9 adet üçlü dış mikrotübül içerir. Ortada ise mikrotübül çifti yoktur.

2.1.7.3. Kuyruk Bölgesi:

Enerji üretimi ve hareketlilikten sorumlu oldukça gelişmiş bir bölgedir. İnsan sperminin kuyruğu orta parça, esas parça, son parça olarak üçe ayrılır.

Aksonem: Aksiyel filamanlar tüm kuyruk boyunca uzanarak 4 parçayı da geçer ve kuyruğun motor parçası olarak görev yapar. Aksonemin yerleşimi ökaryotik hücrelerdeki silia gibi 9+2 düzenlemesine uyar. 9 dış çift mikrotübül yapısı ve ortada bir çift mikrotübülden oluşur. Dıştaki her tübüle saat yönünde bir numara verilir ve birincisi genelde ortadaki çifte paralel planda yer alandır. Dışardaki her çift A ve B alt birimlerinden oluşur. A tam ve kesintisiz bir mikrotübül yapısına sahipken, B kesitlerde C harfi şeklinde karşımıza çıkan eksik bir mikrotübül yapısına sahiptir. Bu alt birim serbest uçlarında A tübülüne bağlanmıştır. Bu mikrotübüllerin ana yapısında tübülün proteini bulunur. Tübülün molekülleri protofilamanları oluşturmak üzere sıralanmışlardır. Protofilamanlar da yan yana dizilip mikrotübül duvarını oluştururlar. A mikro tübülünde ve ortadaki merkezi tübüllerde 13 adet protofilaman varken, B tübülü 10 adet protofilamandan oluşur. Tübülün de kendi içinde α ve β olmak üzere 2 formdadır.

Her A tübülünden yan taraftaki çiftin B tübülüne doğru bir çift uzantı çıkar. Bunlar birbirinden 24 nm uzaklıktadır ve konumlarına göre iç ve dış olarak adlandırılırlar. Kolların ana bileşimi bir Ca-Mg bağımlı ATPaz izomeri protein olan dyneindir. Bu dynein kolları bir mikrotübül çiftinin yandaki üzerinden kaydırma hareketi yaparak kuyruğun hareket etmesini sağlar. Bu mekanizma kas kasılmasındakine benzetilebilir. Bu kolların yokluğu Kartagener Sendromuna neden olur.

Her 9 dış çift, komşu çiftlerle bir protein aracılığıyla bağlanır. Bu protein neksindir. 96 nm uzunluktadırlar ve elastik yapılarıyla aksonemin simetrisini korur. Ortadaki mikrotübül çiftleri çevrelerinde merkezi bir kılıf oluştururlar ve bu kılıftan dıştaki her A tübülüne işinsal uzantılar gönderirler.

Dış yoğun lifler: Omurgalı hayvanların spermlerinin aksonemleri ayrı bir yardımcı yapıyla çevrelenmiştir. Her mikrotübül çiftinin dış kısmında bölünmüş sütunların distalinden başlayıp esas parça içinde sona eren dış yoğun lifler bulunur. Her lifin kesintili bir korteksi ve yoğun bir medullası bulunmaktadır. Korteksin kesintili olduğu kısım mikrotübül çiftlerinin bulunduğu yüze kadar gelir. Medulla sisteinden zengin keratin benzeri protein ve yaygın disülfid çapraz bağları içerir.

Dış yoğun liflerin boyları kuyruk boyunca eşit değildir. İnsanda esas parçanın %60'ına kadar uzanırlar ve 3 kısma ayrılır:

1. 2 kısa lif: 3 ve 8 numaralılar (6-8 μm),
2. 3 orta boylu lif: 2, 4 ve 7 numaralılar (17-21 μm),
3. 4 uzun lif: 1,5,6,9 numaralar (31-35 μm).

Lifler kontraktıl proteinler içermez ancak ATPaz aktiviteleri ve Ca bağlama özellikleri vardır. Bu liflerin ileri derece kaybında esas parçanın eğriliği meydana gelmektedir. Bu da kuyruğun sertliğinde rolü olabileceği düşündürmektedir. İnsan spermi diğer türlere göre daha kısa dış yoğun lifler içerir ve daha esnek bir kuyruğa sahiptir.

Orta parça: 3,5 μm uzunluğundadır. Orta parçanın en önemli özelliği türe özgün sayıda mitokondriyonun arka arkaya dizildiği mitokondri kılıfının varlığıdır. Bu kılıf sarmal biçiminde aksonemin çevresini sarar. Bu sarmalın 11-15 döngüsü vardır ve her dönemece ortalama 2 mitokondri denk gelir. Spermin mitokondriyonu diğer hücrelerin mitokondriyonunda daha sağlam bir dış zar içerir. Bu da, ozmotik değişikliklere ve deterjan etkilerine direnç sağlar. İç zarlar enerji üretiminden sorumludur.

Esas parça: En uzun parça çapı yaklaşık 0,5 μm ve uzunluğu 40 μm ' dir. Esas parça yapısında aksonem, aksonemi çevreleyen kalın dış fibriller, fibröz kılıf ve plazma membranı bulunur. Kılıf 2 adet periferik sütun içerir. Bu iki sütun yarım daire şeklindeki fibröz kılıfla sarılır. Fibröz kılıf sıkı bir şekilde bir araya gelmiş filamanlardan oluşur. İnsanda 50 nm kalınlıkta ve birbirlerinden 10-20 nm uzaktadır. Uzunlamasına sütunlar 2 küçük dış yoğun lifleri (3 ve 8'i) kaplar ve birleşir. Fibröz

kılıf, disülfid bağlarından zengin yapısıyla sıkı ve oldukça dayanıklı bir bölgedir. Fibröz kılıf kuyuk hareketlerini kısıtlar ve kontrol eder.

Son parça: Fibröz kılıfın distal ucundan sonra son parça başlar. 3 µm uzunluğundadır. Kuyruğun son kısmına 5–7 µm. kalın fibriller ve fibröz tabaka kaybolur. Bu bölgede aksonemin mikrotübüler yapısı sona erer. Önce dynein kolları yok olur, daha sonra merkezdeki mikrotübül çiftleri kaybolur ve dıştaki çiftlerin ikisi ortaya hareket ederken kalan 7 si onların etrafını sarar. Bu sırada B tübüleri de açılarak kaybolur. Kuyruğun ucuna gelindikçe tüm mikrotübül yapısı sonlanır (30).

2.2. APOPTOZ (PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜME)

Son yıllarda histopatoloji, genetik ve moleküler biyolojide yapılan yoğun çalışmalar bütün hücrelerin kendilerini öldürecek bir genetik düzeneğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu düzenek yeni hücreler oluşurken varolan hücrelerin bir kısmının ölümüyle korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptoz ve nekrozdur (31,32). Her ikisinde de çeşitli biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (33).

Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. 'Programlanmış hücre ölümü' terimi olarak ilk kez 1965 yılında 'Apoptoz' terimi ise 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (34). Apoptoz, eski Yunanca'da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelen "apoptosis" 'den köken alır (35). Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptoz ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (36,37,38).

Apoptoz ve mitoz dokuda sürekli bir denge halindedir Belirli bir dokuda hücre proliferasyonu mitozla, o dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile belirlenir (36,39).

Wyllie, 1980 yılında apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (40).

1993 yılında Cohen timus hücrelerinin direkt olarak apoptozu seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptoze yönlendirdiğini

bildirmiştir(41). Böylece apopitozun genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilen bir hücre ölümü olduğunu ortaya çıkarmıştır (42).

2.2.1. APOPITOZ MODELİ

Caenorhabditis elegans isimli nematod üzerinde apopitozun genetik ve moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında oldukça yardımcı olmuştur (43,44). *Caenorhabditis elegans* toprakta yaşayan, mikroskopik (~1mm) bir nematod (yuvarlak solucan) türüdür.

Caenorhabditis elegans ile ilgili çalışmalar apopitozun birbirini izleyen dört evresi olduğunu göstermiştir:

1. Hücreyi intihara götüren hücre içi veya hücre dışı uyarılma,
2. Apopitotik hücrelerin diğer hücreler tarafından ortadan kaldırılması,
3. Hücre içi proteazların aktivasyonu ile hücrelerin öldürülmesi,
4. Apopitotik hücre parçacıklarının lizozomlar içinde yıkımı(45)

2.2.2. APOPITOZUN GÖRÜLDÜĞÜ OLAYLAR

Apopitoz organizmanın bazı doku ve hücrelerinde sürekli olmakta ve ömür boyu devam etmektedir. Günde yaklaşık bir milyon hücre apopitoza uğrayarak ölür ve yerine yeni hücreler yapılır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı bir insanın vücut ağırlığının her 24 ayda bir yenilenmesi anlamına gelir (46). Bu anlamda apopitoz spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıma aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır (39). Apopitozlu hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (37). Apopitozun görüldüğü belli başlı olaylar şunlardır:

2.2.2.1. FIZYOLOJİK OLAYLAR

1. Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı ki bunlara örnek olarak; fetus implantasyonu, organogenezis ve gelişim sürecinde Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı iç organların lümenlerinin oluşması gösterilebilir (47)

2. Yetişkinlerde hormona bağımlı menstrüel siklusta endometriyum hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu gibi olaylarda (48).
3. Vertebraların nöron gelişimi sırasında nöron hücrelerinin %50 azalması sırasında (49) ve aksonları hedeflerine ulaşmayan nöronların ortadan kaldırılarak nöronlarla hedef organlar arasındaki bağlantı hatalarının kaldırılmasında (50),
4. Sürekli proliferasyon gösteren hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesinde (barsak kripta epitelieri) (37,41)
5. İmmun sistemin düzenlenmesinde, intratimik T hücrelerinin gelişiminde, T lenfositlerinin kontrolünde, matür T lenfositlerinin antijene bağımlı düzenlenmesinde, immatür B lenfositlerinin gelişiminde, self reaktif B hücrelerinin yok edilmesinde (48)
6. Derideki keratinositlerin, yüzeğe göç ederek epidermisin en üst tabakası olan stratum korneumu oluşturmasında. (51,52)

2.2.2.2. PATOLOJİK OLAYLAR

1. Hormonlara bağılı dokularda patolojik atrofide (kastrasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybı) (36,39).
2. Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmun hastalıklar) (42).
3. Her türlü neoplastik oluşumda; hem büyüme hem gerileme döneminde (37).
4. Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apopitoz görülür. Örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir (36).
5. Parankimden zengin dokularda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi sıklıkla pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi (38).

2.2.3. APOPITOZUN HASTALIKLARLA OLAN İLİŞKİSİ

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apopitoz yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının kanser, otoimmun bozukluklar, viral infeksiyonlar,

nörodejeneratif hastalıklar gibi bir çok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (33,53) (Tablo 1).

Tablo 1 Apoptoz ile hastalıkların ilişkisi

Apoptozun Aktivasyonu ile ilişkili Hastalıklar	Apoptozun inhibisyonu ile ilişkili Hastalıklar
Nörodejeneratif hastalıklar: Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz, Retinitis pigmentosa, Serebellar dejenerasyon	Otoimmün bozukluklar: Sistemik lupus eritematozus, immün ilişkili glomerulonefritler, akut ve kronik renal yetmezlik, Diabetik nöropati ve polikistik böbrek hastalığı, Greft rejeksiyonu
İskemik hasarlar: Myokard infarktüsü, inme, Reperfüzyon hasarı, beyin hasarı	Kanser: Foliküler lenfoma P53 mutasyonlarıyla oluşan karsinomlar, Hormon bağımlı tümörler, Akciğer kanseri, Prostat kanseri, Over kanseri
AİDS	Viral infeksiyonlar: Herpes virüs, Poliovirus, Adenovirus
Miyelodisplastik sendromlar: Apilastik anemi	
Toksik nedenli karaciğer hasarı	

2.2.4. APOPTOZ-NEKROZ

Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı *büzüşme nekrozu* olarak adlandırmıştır. Apoptoz, hücrede yarattığı değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılansa da nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma zarı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptoz sırasında ise plazma membranı yırtılmaz.

2.2.5.1. HÜCRE DIŞI (EKSTRENEK) SINYALLERLE APOPİTOZ

Hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların belki de en iyi anlaşılması örneği sitokine bağlı dış apoptoz yoludur. TNF- α , TNF ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özđü reseptörlerle birleŐerek ölüme neden olurlar. TNF ailesi reseptörler (TNF-R1/CD120a, TNF-R2, DR3/Wsl1/Tramp, DR4/Trail-R1, DR5/Trail-R2, CAR-1) ve Fas (CD95/APO1) reseptörü belli bir aminoasit dizilimi ve homolojiyi paylaŐır (56,57) (tablo 2) .

Tablo 2 TNRF Süper Ailesi

Sitoplazmik kısımlarında ölüm bölgesi bulunanlar	Sitoplazmik kısımlarında ölüm bölgesi bulunmayanlar
TNF-R1	TNF-R2
FAS (CD95, APO-1)	CD30
DR3	CD40
TRAIL-R2 (DR5)	
TRAIL-R1 (DR4, APO-2)	
DR6	

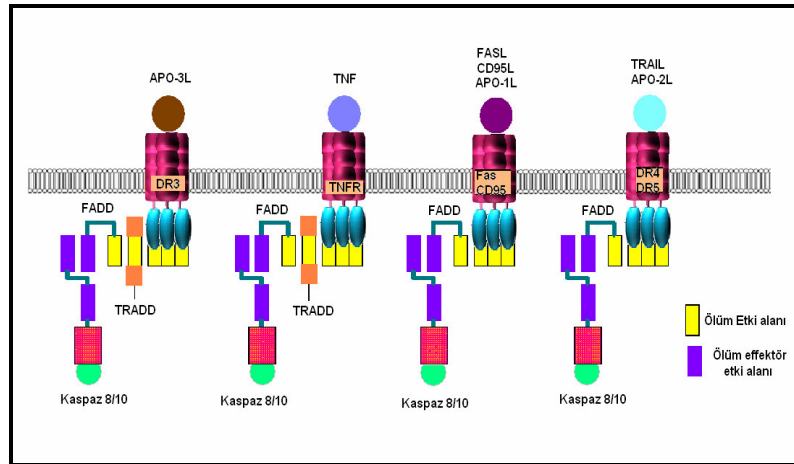
Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesi (DD) bulunur. Bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlanarak apoptozun başladığı yerlerdir. Ligandlar bağlandığında 3 Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü kompleks oluşturur. TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TNFR'e bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD/Mort-1) denen adaptör proteinlere bağlanır. Bu proteinlerin hem DD hem de proteazların ölüm oluşturan kısımlarına (DED) bağlanan bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar "Ölümü Başlatan Sinyalleme Kompleksi (DISC)" denen yapıyı oluştururlar. (58,59) (Şekil1). Normalde "Ölüm

Bölgesi Susturucusu (SODD) olarak bilinen proteiniyle uyarılmamış reseptörlerin sitoplazmik DD uçları maskelenerek reseptörlerin kendi kendilerine sinyal üretmeleri önlenir. Reseptörün uyarılmasıyla SODD ölüm ucundan ayrılarak DED içeren adaptörün bağlanmasına izin verir (57,60).

TNFR sinyalleme kompleksi en az 3 değişik etkinlik gösteren işlev aktivasyonuna yol açar. Bunlar:

1. C-Jun N-ucu Kinaz (JNK) aktivasyonu
2. Çekirdek Kappa B Faktörü (NF-kB) aktivasyonu
3. Apoptozun uyarılması

TNF- α etkisini TNF-R1 ve TNF-R2 reseptörleri üzerinden gösterir. TNFR1'in uyarılmasıyla sitoplazmik bölgeye bağlanan TRADD adaptörü aslında reseptörle etkilenen protein (RIP), FADD ve TRAF2 proteinlerinin bağlanmasına aracılık eder. TNF-R2 reseptörü önce TNF Reseptörü ile ilişkili faktör 2'ye (TRAF2), bu protein de TRAF1'e bağlanır (56). TNFR tarafından apoptozun başlatılması için TRADD ve FADD gerekirken JNK ve NF-kB aktivasyonu TRADD, TRAF2 ve RIP ile olur. JNK ve NF-kB aktivasyonu apoptoz uyarımında yer almaz hatta apoptozdan koruyucu yanıt oluşturabilir (61) (şekil 2).



Şekil 2 TNFR süper ailesi

2.2.5.2. HÜCRE İÇİ (İNTRENSEK) APOPİTOZ

Apopitozun yaygın yolu olan iç yol hücrenin kendi içinden, sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlar ve iç yoldaki apopitotik sinyal iletiminde mitokondri tarafından gerçekleşir (58).

2.2.5.2.1. MITOKONDRI / SİTOKROM-C YOLUYLA APOPİTOZ

Mitokondri hücre için enerji üretimi ve yaşlanmada rol oynar. Mitokondri apopitozda sitoplazmaya geçerek ölüm programını aktive eden birkaç faktör salar. Bunlar sitokrom c ve doğal bir faktör olan apopitozu uyaran faktör (AIF) dır. B lösemi hücresi/ 2 (Bcl-2) bu faktörlerin sitoplazmaya salınımı önlemektedir (62).

AIF canlı hücrede iç ve dış mitokondriyal membran arasında bulunur, bakteriyel ferredoksin ya da NADH oksidoredüktazlarına benzerlik gösteren ve çekirdek tarafından kodlanan, proteaz özelliğinde olan 57 kDa'lık bir flavoproteindir. AIF sitoplazmik faktörler yokluğunda apopitotik çekirdek değişikliklerini başlatır ve kaspazı aktive eder (62).

Sitokrom c mitokondriyal elektron iletim sisteminin önemli bir parçasıdır. Normalde mitokondrinin iç ve dış membranı arasındaki bölgede bulunur. Salınımı Bcl-2 proteinler tarafından düzenlenen ve kaspazların aktivasyonunda gerekli bir kofaktördür. dATP (ya da ATP) ve sitoplazmik faktör Apaf-1 (*C.elegansta* Ced-4'ün memelideki karşılığı) ile birlikte sitoplazmaya salınımı önce Kaspaz-9'u sonra da Kaspaz-3'ü aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar (63). Apaf-1 proteinin kaspazla etkileşme aktivasyonu için gereken bilinen tek mekanizma sitokrom-c'dir (64,65).

2.2.5.2.2. ENDOPLAZMIK RETİKULUM ARACILI APOPİTOZ OLUŞTURULMASI

Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz 12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apopitotik yol tarif edilmiştir (66,67). Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apopitozdan farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir (67).

2.2.6. APOPTOZ REGÜLATÖRLERİ

Kaspazlar, Bcl-2 ailesi, p53, apoptoz baskılayıcı faktör (IAP), protein aileleri apoptoz regülatörleridir .

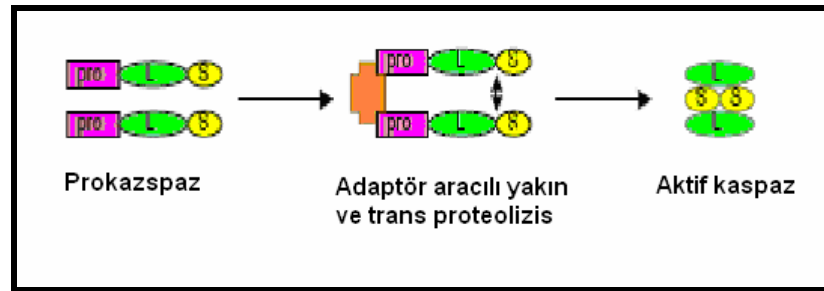
2.2.6.1. KASPAZLAR

Proteazların hücre ölümünde iki önemli görevi vardır.

1. Özel hücre bölümlerinde oluşan ölüm sinyallerinin iletimi
2. Aktivasyon ve inaktivasyonla sonuçlanan çok sayıda hücre protein parçalanması.

Serin proteaz ailesi başlatma sürecinde rol alırken sistein proteaz ailesi ölüm olayında işlevseldir (68).

Kaspazları (Caspases) tek bir sistein proteaz ailesi oluşturur (64,69). Bu yol Bcl2 ailesi ve IAP ailesi gibi hücre ölüm karşıtı proteinler tarafından ters yönde etkilenir. İnsanda 11 değişik kaspaz belirlenmiştir (70). Kaspazlar prekürsör (inaktif) zimojen olarak üretilir. Katalitik (p10 ve p20 alt üniteleri) bölge ve N-ucunda bağlanma bölgesi (prodomain) bulunur. Aktifleşmeleri için proteolizle C-ucundaki aspartik asit kalıntılarının ayrılması gerekir. Aktif kaspaz iki p10 ve iki p20 alt ünitesi içeren ve iki aktif bölgesi olan bir heterotetramerdir (Tablo 3). Aktif bölge sistein ve histidin uçları büyük alt ünite, substrattaki aspartatlara bağlanarak parçalanmayı oluşturan arginin uçları ise küçük alt ünite bulunur. Kaspazlar aspartat bölgelerinden substratlarını parçaladığından ve kendileri de aspartat bölgelerinin parçalanmasıyla aktifleştiklerinden proteolitik bir şelale oluşturma potansiyelindedir.



Şekil 3 Prokaspazın Aktif Kaspaza Dönüşümü

Yapı ve fonksiyonlarına göre 3 gruba ayrılırlar (70) (Tablo 3) ;

1. Başlıca lenfokin yapımında bulunan kaspazlar: Kaspaz-1 (ICE), Kaspaz-4, Kaspaz-5, Kaspaz-11, Kaspaz-12, Kaspaz-13 ve Kaspaz- 14. Fakat Kaspaz-1 ve Kaspaz- 4 apopitozda da rol oynar ;
2. Çeşitli hücrel proteinleri parçalayan ve küçük bir bağlanma bölgeleri olan kaspazlar: Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7. Bunlara sonuçlandırıcı (effektör) kaspazlar da denilir;
3. Sinyal iletiminde yer alan aktivasyon kaspazlar: Kaspaz-2, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-10. Başlatıcı (initiatör) kaspazlar denilen bu kaspazların uzun bir bağlanma bölgesi vardır. Bu bölgeler CARD ve DED olarak bilinir. Bu uçlara bağlanacak özel moleküller yoluyla aktive olurlar.

Tablo 3 Kaspaz Ailesi

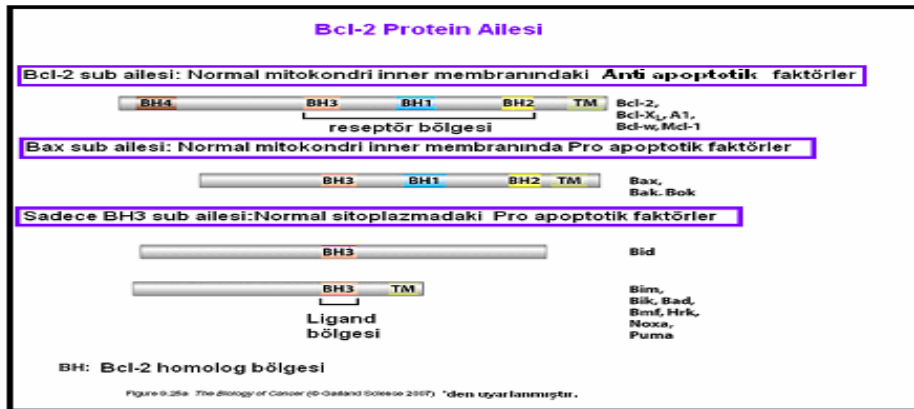
Başlıca lenfokin yapımında bulunan kaspazlar	Sonuçlandırıcı(effektör) kaspazlar	Başlatıcı (initiatör) kaspazlar
Kaspaz-1 (ICE)	Kaspaz-3 (CPP32/Yama)	Kaspaz-2,
Kaspaz-4	Kaspaz- 6	Kaspaz8(FLICE/MACH)
Kaspaz-5	Kaspaz-7	Kaspaz-9
Kaspaz-11		Kaspaz-10
Kaspaz-12		
Kaspaz-13		
Kaspaz- 14		

2.2.6.2. BCL-2 AİLESİ PROTEİNLERİ

1985'de ilk kez B hücreli lenfomada t (14;18) kromozomal translokasyonunda keşfedilen proteindir. İnsanlarda görülen kanserlerin yarısında anormal yüksek düzeylerde veya hatalı Bcl-2 proteini yapımı vardır. Bcl-2 ailesi apopitotik kaskadın kontrolünde en önemli gruptur (71,72). Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve Bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür (72). Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom-c salınımını engellemede rol oynar. Bcl-2 mitokondri membranı dışında, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda bulunur. Bcl- 2 ayrıca Raf 1 ve kalsinörine bağlanır (72).

İnsanda en az 17 Bcl-2 ailesi üyesi bulunur. Bcl-2 ailesi proteinler birkaç α -heliks yumağını içeren benzer protein yapısındadır. Bunlar 4'e kadar numaralanan Bcl-2'ye benzer (BH) bölgesidir. Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve fonksiyonlarına göre 3 grupta toplanır (73,74) :

1. *Bcl-2 alt grubu*; Bcl-2, Bcl-XL ve Bcl-w'den oluşur, dört bölgeleri (BH1, BH2, BH3, BH4) kuvvetli benzerlik gösterir. Hepsinin antiapoptotik aktivitesi vardır. Proteinin C ucunda zara tutunma bölgesi vardır ve mitokondri membranında bulunur.
2. *Bax alt grubu* ; Bax ve Bak'dan oluşur. BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde Bcl-2'ye benzerlik gösterirler ve hepsi proapoptotiktir. Yapı olarak bazı bakteriyel toksinlerin por oluşturan proteinlerine benzerlik gösterirler ve kısmen hücre içi zarlarda bulunan mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarlarında kanallar oluşturma yetenekleri vardır. Bax, tıpkı difteri toksini gibi endozomal/lizozomal zarlarda mRNA çevirimini (translasyon) baskılayan adenozin 5'-difosfat ribozile edici polipeptit A alt ünitesinin sitoplazmaya geçmesini sağlayacak büyüklükte kanallar oluşturarak hücreyi öldürür;
3. *Bik alt grubu* proapoptotik Bik, Bid ve Bim'den oluşur. Bunlara yalnız BH3bölgeleri Bcl-2'ye benzerlik gösterdiği için BH3 proteinler de denir. Belirgin özellikleri heterodimerler yapmaları ve böylece eşlerinin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlamalarıdır.



Şekil 4 BCL-2 Ailesi

2.2.6.3. P53 VE ORTAK PROTEINLER

Apopitozun diğ er düzenleyicilerinden birisi de p53'dür. Başlangıçta bir onkoprotein olarak belirlenmesine rağmen yabanıl (wild) p53 proteininin özellikle DNA hasarlanmasına yanıt olarak hücre ölümünü başlatıcı işlev gördüğü kesinlik kazanmıştır. 393 aminoasitli bir proteindir. Üç fonksiyonel bölgesi vardır: N-ucunda asidik transaktivasyon bölgesi, merkezinde DNA'ya bağlanan bölge ve C-ucunda tetramerizasyon bölgesi.

Pek çok hücrese l proteine bağlanan ve gen ekspresyonunda yer alan yabanıl p53, çevresel şartlara ve hücrese l duruma göre hücre döngüsünün kontrolü, DNA tamiri ve sentezi, hücre farklılaşması, genomik şekillenme ve programlı hücre ölümünde görev alır (75,76). DNA hasarlanması olan normal hücrelerde p53 protein düzeyinde belirgin bir artışla hücre döngüsü G1'de bloke olur. Büyümenin durmasından sonra DNA onarımı, hücre DNA' sının çoğaldığı S fazına geçmeden önce tamamlanır. Genom hasarı büyük boyutlarda ise hücre programlı hücre ölümüne girer (77,78). p53 proteini, genomu dönüştürücü etkisi olan mutasyonlardan temizlenene kadar hücrenin S fazına geçişini engellediği için "genom gardiyanı" olarak tanımlanır. p53 proteininin etkinliği gendeki değişikliklerle, kopyalama sonrası fosforilasyon değişikliği ile, hücrese l ya da viral diğ er proteinlerle etkileşmesi ile etkilenebilir. Mdm-2 denilen bir hücrese l proto-onkogeni p53 proteinine bağlanarak kompleks oluşturur. Yüksek Mdm-2 konsantrasyonları p53 proteininin gen kopyalama aktivitesini önleyerek onun tümör baskılayıcı işlevini inaktive eder (79-80).

2.2.6.4. IAP AİLESİ PROTEINLERİ

Anti-apopitotik protein ailesinden apopitozis protein inhibitörleri omurgalı ve omurgasızlarda bulunmuş olup, bunlar programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Bruce, Survivin, pIAP olarak tanımlanmıştır. Bunların çoğu hücre ölümünü Kaspaz-3, Kaspaz-7 ve Kaspaz-9'a direkt olarak bağlanıp onları inhibe ederek gerçekleştirirler (66). Apopitozis protein inhibitörleri kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (66,81).

2.2.7. APOPİTOTİK HÜCREDE GÖZLENEN MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

2.2.7.1. MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

2.2.7.1.1. Yüzey Organellerinin Kaybı

Apopitoza uğrayan hücrenin komşu hücrelerle ilişkisi kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (40, 82).

2.2.7.1.2. Hücre Büzülmesi

Apopitotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (67). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (40,42, 82).

2.2.7.1.3. Kromatin Yoğunlaşması

Önemli yapısal değişiklik çekirdekte başlayarak izlenir. Çekirdek apopitozda odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür (41,82). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekcik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (40,42, 82).

2.2.7.1.4. Sitoplazmik Baloncuklar Ve Apopitotik Cisimlerin Oluşması

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apopitotik cisimlere dönüşür (42,82). Apopitoz için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfotidilserin apopitotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (71).

2.2.7.2. *BIYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER*

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar.

2.2.7.2.1. *DNA Kırıklarının Oluşumu*

Hedef proteinlerden biri olan DNA, endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkararak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca^{++} Mg^{++} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur (83).

2.2.7.2.2. *Hücre İskeletinin Yıkılması*

Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteindir. Aktin filamanlarının yıkımı ile hücre normal şeklini kaybeder (83).

2.2.7.2.3. *Hücre Membranı Değişiklikleri*

Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozular. Plazma zarının iç yüzündeki fosfatidilserin yer değiştirerek zarın dış yüzüne yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre zarlarında thrombospondin adlı adheziv bir glikoprotein ve bazı hücrelerin adhezyon molekülleri (ICAM 3)'i içerirler. Bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositozlarını sağlarken, transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlarlar (84).

Hücreler özelleşmiş yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülüp büzülürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir.

2.2.7.2.4. *Fagositoz:*

Apoptotik cisimler çevredeki parenkim hücreleri ve fagositler tarafından fagosit edilmek dokulardan temizlenirler (84).

2.2.8. APOPTOZUN SAPTANMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

Günümüzde apoptozun saptanmasında birçok yeni teknik ve yöntem uygulanmaktadır. Çoğunlukla bu yöntemler morfoloji, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerdir. Bunların dışında DNA mikroassay ve flowsitometride yaygın olarak apoptozun saptanmasında kullanılmaya başlanmıştır.

2.2.8.1. MORFOLOJİK YÖNTEMLER

2.2.8.1.1. IŞIK MİKROSKOBU

Hematoksilen boyası ile hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku takiplerinde kullanılır. Apoptotik hücre tespitinde uygulanan ilk metotlardan biridir. Bunun nedeni ise pratik ve maliyetin az oluşudur. Hematoksilen boyamada, kromatini hematoksilen boyar apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptoza özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmış ise şöyle görülebilir :

1. Hücre küçülmesi "cell shrinkage", veya
2. Sitoplazmik küçülme "cytoplasmic shrinkage",
3. Kromatinin kondanse olması "nuclear condensation" ve
4. Nükleus zarının periferinde toplanması,
5. Nükleusun küçülmesi "pyknosis" veya parçalara bölünmesi "nuclear fragmentation"

Bir diğer boya ise Gimsa boyasıdır. Boyama sonrası nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmektedir fakat hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (46).

2.2.8.1.2. FLORESAN MİKROSKOBU

Floresan boyalar hücrenin kromatinindeki DNA'ya bağlanabildiklerinden, nükleusu görünür hale getirirler. Cansız hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa olanak tanır. Fakat hematoksilen ya da Giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin prensibi gereği zaten ölmektedir. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, bu hücreleri

boyayabilen Hoechst boyası ile birlikte ölü hücreleri boyayabilen propidium iyodür beraber kullanılır.

Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının (hücre zarının) intakt olup olmadığıdır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskopu ile tanınabilir. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılabilir (46).

2.2.8.1.3. FAZ – KONTRAST MİKROSKOBU

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır.

2.2.8.1.4. ELEKTRON MİKROSKOBU

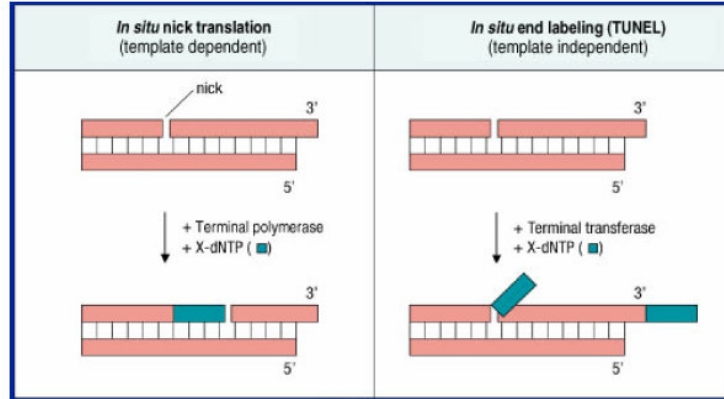
Apoptozda en değerli yöntem ("gold standard") elektron mikroskopu ile değerlendirme olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru şekilde belirlendiği yöntemdir. Ayrıca ultrastrüktürel olarakta ince yapıda hücrede mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi yapılar incelenebilir. Elektron mikroskopu çalışmalarında, nükleus fragmentasyonu açıkça görülebilir, apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir (46).

2.2.8.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER:

2.2.8.2.1. TUNEL Yöntemi:

DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller

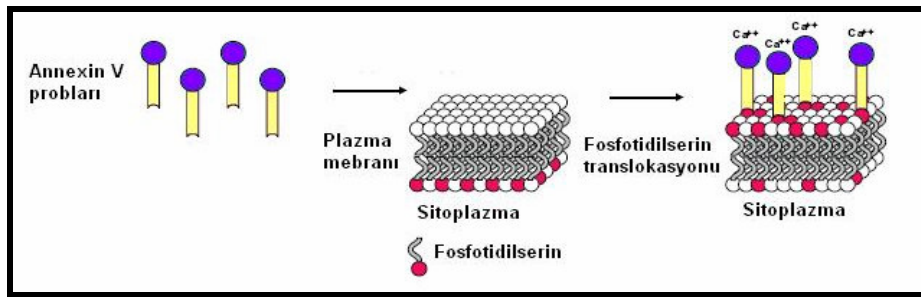
üzerinde büyütülmüş hücrelerde apopitozun varlığı bu methodla saptanabilir (Şekil 5)



Şekil 5 TUNEL

2.2.8.2.2. Anneksin V Yöntemi:

Normal hücrelerde hücre membran yapısındaki lipitlerden olan fosfatidilserin (PS) sitoplazmik yüzde bulunur. Eğer hücre apopitoza uğrarsa PS molekülleri hücre membranında iç taraftan dış tarafa doğru yer değiştirirler. PS'lerin dış yüze translokasyonu, FITC gibi floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Annexin V 35-36 kD ağırlığında Ca^{2+} bağımlı, fosfolipit bağlayıcı bir proteindir ve PS için yüksek afiniteye sahiptir. Böylece apopitotik hücreler saptanmış olur. Annexin V yöntemi hem floresan mikroskopuyla hem de flow sitometri ile kullanılabilir (Şekil 6).



Şekil 6 Anneksin V

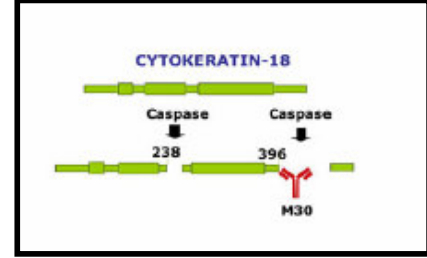
2.2.8.2.3. Kaspaz Yöntemi:

Bu yöntem için önceden dokunun Kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apopitoza yol açan ajanın Kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi

gerekir Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif Kaspaz-3 belirlenebilir (46).

2.2.8.2.4. M30 Yöntemi:

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeralin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Fakat yalnızca sitokeralin 18'i ekspres eden epitelyal kaynaklı dokularda kullanılması mümkündür. Apoptoza gidecek olan bir hücrenin



Şekil 7 M30

erken evrede gösterilmesi ise son yıllarda tanımlanan M30 fare monoklonal antikoları ile yapılan immün enzim köprü tekniği ile olabilmektedir (85,86) (Şekil7).

2.2.8.2.5. ELISA:

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür.

2.2.8.2.6. Flourimetrik Yöntem:

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur, ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (46).

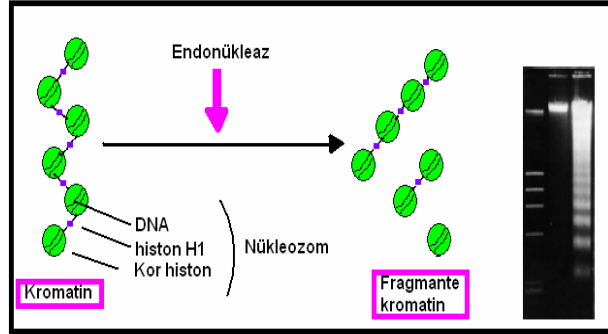
2.2.8.3. BIYOKİMYASAL YÖNTEMLER

Hücrelerde apoptoza yol açan bir tek mekanizma olmamakla birlikte pek çok hücre tipinde erken apoptozda sitoplazmada iyonize kalsiyumun arttığı izlenmiştir (87). Apoptozda en önemli biyokimyasal olay endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile DNA'nın kırılmasıdır. Bu enzim Ca ve Mg bağımlı olduğundan aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekmektedir. Enzim DNA'yı 200 baz

çiftlik parçalara ayırarak kırılmalar oluşturur ve jel elektroforezinde merdiven paterninin oluşmasına yol açar (88) .

2.2.8.3.1. *Agaroz Jel Elektroforezi:*

DNA kırıklarının gösterildiği biyokimyasal bir yöntemdir. Apoptozda DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven



görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptoz için

Şekil 8 Agaroz Jel Elektroforezi

karakteristiktir. Nekrozda görülmediğinden apoptozu nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir.

2.2.8.3.2. *"Western" Blotting:*

Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. Bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. Kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkıp çıkmadığı da bu metotla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce altfraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır (46).

2.2.8.4. *DIĞER YÖNTEMLER*

2.2.8.4.1. *"DNA Microarrays"*

DNA "microarray" teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Fakat, yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin mRNA'larının tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptoza özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır (46).

2.2.8.4.2. "Flow" Sitometri:

Floraslan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak "Flow" sitometri denen cihazda apopitozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Avantajları; apopitotik hücreler kolayca belirlenebilir, uzun zaman almaz, kantitatif sonuç verir, ortalama 5000-10,000 hücre sayılır ve kullanışlı bir yöntemdir.

Genel olarak apopitoz tespitinde Annexin V , sadece nekrotik hücreleri boyayan başka bir proba muamele edilebilir.Bu şekilde hem apopitotik hem de nekrotik hücreler ayrı ayrı tespit edilmiş olur.Genelde bu madde propidium iyodürdür.

a.Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak

b.Anneksin V kullanılarak.

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemleri kullanılarak hücre boyutu ile içerdđi DNA miktarı kıyaslanır, azalan DNA miktarının da apopitozdan olduğu, apopitotik hücre popülasyonu tayin edilir. ikincisinde, floresan mikroskopuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır (46).

2.2.9. SPERMATOGENEZDE APOPITOZUN ROLÜ

Dişi ve erkek gonadların normal gelişimi esnasında hücre ölümü olmaktadır. Ovaryan foliküllerin % 90'ı hayatın erken döneminde apopitoza uğrar ve bu foliküllerin atılması kadınların üreme döneminde de önemlidir.Erkeklerde ise testisteki germ hücrelerinin % 75'i apopitoza uğrar ve bu mekanizma ile bozuk germ hücreleri yok edilmiş olur.

Normal spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar. Sinka ve arkadaşları tarafından normal spermatogenez sırasında olan spontan hücre ölümü ve gonadotropik desteğin kesilmesi ile skrotumda sıcaklık artışına bağlı hızlanmış germ hücre ölümünün apopitoz yoluyla olduğu gösterilmiştir (89). Apopitoz, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar (90). Germ hücrelerindeki bu ölüm spermin normal gelişimi için mutlaka gereklidir(91). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak

spontan apopitozun gerekleŖtiđi bildirilmiŖtir (92). Testiste, defektif germ hücresinin yok edilmesine yönelik bu iŖlemdede erkek germ hücrelerinin % 75'i apopitoza maruz kalır (93). Sperm apopitozu ve sperm DNA'sında hasar erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilir. Apopitoz ile ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında oluşur ve p53, p21, Kaspaz, Bc1-2 ve Fas düzeyleriyle değişik yollarla saptanabilmektedir (94,95,96). Spermiyogram sonuçları normal olan örneklerde Fas ekspresyonlu sperm sayısı düşüktür fakat anormal parametrelili örneklerde yüksek bulunmuŖtur (97).

Gorczyca ve arkadaşları 1993 yılında, anormal sperm hücrelerinde somatik hücrelerin apopitozu için karakteristik olan DNA zincir kırıklarını ve DNA in-situ denatürasyonunda anlamlı artışını göstermişlerdir. Bu çalışmalar somatik hücrelerde DNA hasarına yol açan endojen endonükleaz aktivitesinin, reproduktif tedavilerde hasarlı germ hücrelerinin elenmesinden sorumlu olduğunu göstermektedir (98).

Testislerde sperm yapımı ve matürasyonu Sertoli hücrelerinin desteği altında gerçekleşir. Ancak bu olayın sağlıklı sürebilmesi, Sertoli hücrelerinin sayısı ile spermatogonyum sayısı arasındaki belirli orana bağlıdır. Çünkü zaten çoğalma kapasitesi olmayan Sertoli hücreleri sadece belirli sayıdaki spermatogonyumları destekleyebilir. Yani, mayoz bölünmeye girecek spermatogonyum sayısı sınırlıdır. Eğer spermatogonyum sayısı, Sertoli hücrelerinin destek kapasitesini aşarsa, fazla hücreler apopitoz ile parçalanır (99).

Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir (100,101,102,103,104).

Bazı çalışmalarda germ hücrelerinin apopitozunda testosteronun da etkili olduğu bildirilmiştir (105). Spermatogenez sırasında apopitozun başlatılmasında etken bir başka faktör ise germ hücreleri ve lökositlerden kaynaklanan ROS yapımı ve miktarıdır(106,107). İnsan spermi ile yapılan çok sayıdaki çalışmada hücre ölümü ile ROS üretimi arasında sıkı ilişki bulunduğu vurgulanmıştır (108,109). İnflamasyon hücreleri salgıladıkları sitokinler ile apopitozu başlatabilir (110).

Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (103,104). Hipofizektomize immatür ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde apoptozun ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da insan karyonik gonadotropin hormonu (Human Chorionic Gonadotropine Hormone, hCG) tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellebildiği gösterilmiştir (101,104).

Ayrıca, gonadotropin ya da testesteron eksikliği dışında matürasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda da apoptoz görülebilir(111).

Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğuk gibi faktörlere olan duyarlılığı da germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür (112). Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (42, 45,113).

Glander ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptığı çalışmada ejakülattaki apoptotik sperm yüzdesi ile motilite arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Buna karşı Oosterhuis ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı çalışmada ise apoptotik hücrelerle sperm motilite ve konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon saptamışlardır. Bu farklı sonuçların farklı yöntem kullanımından, farklı hasta popülasyonundan veya daha büyük olasılıkla çalışmalardan birinin semen ile yapılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (114,115).

Bir başka araştırmada ise 2006 yılında yayınlanan Perticarari ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarında Syto16 ve 7-amino-actinomycin-D (7-AAD) kombinasyonu ile uygulanan multiparametrik flow sitometrinin sperm apoptozunu değerlendirmede oldukça duyarlı bir yöntem olduğunu savunmaktadır (116).

Aziz ve arkadaşlarının 2007 yılındaki bir çalışmada ejakülat spermindeki apoptosis ile sperm morfoloji, sperm deformite indeksi (SDI) arasındaki ilişkiyi belirlemektedir. SDI apoptotik grup ve yoğunluk farkı ile ayrılan spermelerdekine göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (117).

Son çalışmalar, apoptozun normal spermatogenez sırasında germ hücre ölümünün mekanizmasının altında yatan nedenlerden biri olup insanları da kapsayan

pek çok memeli türünde spermatogenezi düzenleyen önemli mekanizmalardan biri olduğunu göstermektedir (114,118,119). Apoptoz yoğun olarak testiste spermatogonyumlarda, spermatositlerde ve spermatidlerde incelenmiş ve pek çok apoptotik faktör tanımlanmıştır. Ancak ejakülat sperminde apoptoz üzerine yapılan araştırmalar tartışmalıdır (103,105,118,120,121,122).

2.3. KRİYOPREZERVASYON:

Bilimsel ve modern anlamda canlı hücre dondurma çalışmaları, 1949 yılında Polge ve arkadaşlarının gliserolün soğuk şokuna karşı koruma sağlayıcı özelliğini bulmasından sonra başlamıştır. İlk dondurulan hücre sperm olmuştur. Bu anlamda, kriyobioloji hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bilim dalı olarak önemini artırmış ve dondurulup çözülen hücrenin fizyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılması, kriyobiolojiyi yönlendirmiştir (123,124).

Döllenmenin başlaması ile birlikte hayati olaylar biyolojik bir saatin ritmine uygun bir şekilde işlemeye başlar. Kriyoprezervasyon biyolojik saati durdurarak bu işleyişe bir müdahale imkanı sağlamıştır (125).

Kriyoprezervasyondaki amaç, çok düşük sıcaklıkta canlı bir hücre veya dokunun, minimum hasarla ve fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (126).

2.3.1. KRİYOPREZERVASYON AŞAMALARI:

Kriyoprezervasyonda beş önemli aşama bulunur.

1. Suyun kristalizasyonundan kaynaklanabilecek hücresel hasarı azaltan kriyoprotektanlarla olan ilk etkileşim
2. Sıfır derecenin altındaki sıcaklıklara kadar dondurma
3. Saklama
4. Çözme
5. Dilüsyon ve kriyoprotektanların ortamdan uzaklaştırılması, fizyolojik mikroçevreye geri dönüş ve ileri gelişim olarak sınıflandırılabilir.

Bu aşamalar arasında en kritik olanı; başlangıç fazından düşük sıcaklıklara iniş dönemi ve fizyolojik ortama geri dönüştür. Düşük sıcaklıklara ulaştıktan sonra bu sıcaklık – 196 °C'dir. Bu sıcaklıkta geçen zamanın canlılık üzerine etkisi yoktur (127).

2.3.2. *KRİYOBİYOLOJİNİN TEMELLERİ*

Sıvı nitrojen -196°C de su, kristal formda bulunur ve tüm kimyasal reaksiyonlarda inhibe olur. Bu da hücrel faaliyetlerin durmasına neden olur. Dondurma süreci hücrelerdeki bazı kimyasal olayların yavaşlamasına ya da durmasına yol açarken bazılarının da hızlanmasını sağlayabilmektedir. Hücrelerin hayatta kalmayı başarmaları aşırı düşük sıcaklıklara dayanma becerilerinden çok; donma ve ısınmada iki kez geçmek zorunda oldukları, ölümcül olarak kabul edilen, ara bölge sıcaklıklarındaki sağ kalımlarına bağlıdır (-15°C ila -60°C). -196°C lik sıcaklık, ısıya bağımlı süren hiçbir reaksiyonun çalışmasına izin vermez. Bu sıcaklıklarda varolan tek şey fiziksel hal, camsı ve kristalli partiküllerdir. Ayrıca -196°C' de kimyasal reaksiyonlar için yeterli termal enerji yoktur (127).

—196°C'deki donmuş sulu düzeneklerde oluşabilecek tek reaksiyon iyonize radyasyon ve kozmik ışınların direkt etkisiyle meydana gelen serbest radikallerin oluşumu ve makromoleküllerde kırık oluşumu gibi fotofiziksel olaylardır. Bu kadar düşük sıcaklıklarda enzimatik tamir mekanizmaları çalışamayacağından çok uzun süre geçirilse bile bu iyonlaşmalar zararlı ve geri dönüşümsüz DNA kırıklarına yol açabilir. Kültürdeki memeli hücrelerinin %63 'ünün ölümüne yol açan iyonize radyasyon dozu 200-400 rad' dir. Dünyadan yayılan radyasyon dozunun yılda 0.1 md olduğu göz önüne alındığında -196°C'de korunan tipik memeli hücre popülasyonun, bu oranda bir hasara uğraması için 2,000 ila 4,000 yıl geçmesi gerekmektedir. Bu oransal hesaplamanın yanı sıra; -196°C' de hücre saklama yöntemlerinde kromozomal veya genetik değişikliklerin ortaya çıktığını gösteren bir kanıt yoktur. Bununla ilgili bir çalışmada ise 8 hücreli fare embriyolarına 2000 yılına eşdeğer radyasyon verilmiş, buna rağmen ne embriyoner canlılık azalmış ne de doğumda herhangi bir anomali olmuştur. (128)

2.3.3. KRİYOPREZERVASYONDA BAŞARIYI ETKİLEYEN ETMENLER

2.3.3.1. DONDURMA VE ÇÖZME HIZLARININ KONTROLÜ

Soğutma hızı artıkça hücre içi buz oluşumu da artacaktır. Hücre hacmi ve membran kompozisyonlarına göre kullanılan kriyoprotektanlardan bağımsız her hücrenin optimum bir soğutma hızı vardır. Hücre içinde buz oluşturmayacak en hızlı soğutmaya, "optimum soğutma hızı" denir. Bununla beraber çok çeşitli hücre tipleri için birçok optimum soğutma hızı tanımlanmıştır. İn vitro fertilizasyon için önemli olan bazı hücreler için ise hala açık, optimum bir değer ortaya konulamamıştır. Donma sırasında hücrelerin hipertonik durumlara karşı gösterdiği tepki birçok etkene bağlıdır. Bunların en önemlileri şunlardır:

1. Hücrenin hacmi (V) ve yüzey alanı (A)
2. Suyu karşı plazma membran geçirgenliğinin yeterliliği (Lp)
3. Kriyoprotektanların aktivasyon enerjisi (E)
4. Kriyoprotektanın tipi ve konsantrasyonu
5. Soğutma hızı (B)

Örneğin, spermelerde yüzey alanı/hacim oranı embriyo/oosite göre daha yüksektir ve daha yüksek su geçirgenlik katsayısı söz konusu olduğundan aşırı soğuk durumlara daha hızlı ulaşmak mümkündür. Soğutma hızının hücre çapıyla da ilişkisi vardır. Hücre çapındaki artış soğutma hızında bir azalmaya ihtiyaç duyar. Bu nedenle oositlerin dondurulmasında çok daha düşük hızlarda olmaktadır (126).

Hücrede meydana gelen fiziksel olaylar soğuma hızıyla yakından ilişkilidir. Eğer soğuma yeterince yavaş olursa, hücre, içindeki suyu ekzosmozis ile hızlıca kaybeder böylece hücre içi ve dışı ortamlar kimyasal potansiyeller açısından bir dengeye ulaşacaktır. Sonuçta hücre dehidrate olacak ve intraselüler olarak donmayacaktır. Ancak, eğer hücre çok hızlı soğutulursa dengeye ulaşmak için suyunu yeterince hızlı kaybedemeyecek; gittikçe aşırı soğuyan hücre içinde denge, intraselüler donma ile sağlanacaktır. Hücre içi buz oluşumu hücrenin ölümüne neden olabilmektedir.

Embriyo ve zigotlardaki en yüksek canlılık oranları 0,3 °C / dak soğutma hızıyla elde edilmiştir (127).

2.3.3.2. BUZ FORMASYONU

Kriyoprotektif solüsyonlar genellikle -15 °C in altında buz oluştururlar. Bu olay aşırı soğuma (*supercooling*) olarak adlandırılır. Aşırı soğuma, bir sıvının, sıvı fazdan katı faza geçmeden normal donma noktasının altında bir sıcaklığa soğumasıdır. Bu yarı kararlı haldeki sıvının partikülleri enerjilerini kaybeder ancak katı kristal formuna geçemezler. Bu sırada eğer sıvıya küçük bir kristal ile "*seeding*" yapılırsa kristalleşme oluşacak ve sıcaklık donma noktasına geri dönecektir. Kristalleşme ortamdaki toz zerrecikleri, mekanik titreşim ya da sert yüzeyler ile de indüklenebilir. Aşırı soğuma olayı atmosferde sıkça görülen bir olaydır. Sıvılardaki kristalleşmeyi takiben, donmamış fraksiyondaki fiziksel özellikler değişmekte, kristalleşmeden oluşan gaz, ortam viskozitesini arttırmak ve pH'da önemli değişimler yapmaktadır. Kristalleşmenin yarattığı stres faktörü, hücrede ozmotik büzüşmeye ve polimerizasyona bununla birlikte membran lipid fazında değişimlere yol açmaktadır (129, 130).

In vitro fertilizasyonda (IVF) hücreler, embriyolar ve blastosistlerin ortamda kontrollü bir şekilde buz oluşumu başlatmak için yapılan çalışmalarda hasara yol açan soğutma hızları denemiştir. Dikkatli ölçümlerin uygulandığı seri çalışmalarda -9°C'nin altında nükleasyonun başlatıldığı örnekler düşük hayatta kalma oranlarına sahipken, -5°C ile -7.5°C arasında çekirdeklenmenin uyarıldığı örneklerde hayatta kalma oranının daha yüksek olduğu bulunmuştur. IVF uygulamalarında da bu soğutma hızları kullanılmaktadır. Örneklerin bulunduğu strawlar ya da vialler -7°C'ye kadar soğutulup, termal denge için bir süre bu sıcaklıkta tutulur. Daha sonra buz oluşumunu başlatmak için strawların ya da viallerin dış yüzüne soğuk bir forseps ya da benzeri bir şeyle dokunulur. Straw ya da vial yüzeyinin sıcaklığı aniden içindeki solüsyonun erime noktasına kadar yükselir ve buz yapısı oluşur. Tekrar -7 °C'ye dakikada 2,5 °C'lik bir hızla soğur. Devam eden yavaş soğuma sırasında hücresel dehidratasyon meydana gelir. -5°C'nin altında hücreler ve onları saran ortam hem aşırı soğuma ve hem de donma noktasının bazı koruyucu çözeltiler ile aşağı çekilmesi nedeniyle donmamış bir halde bulunur. -5 °C ve -15°C arasında, hücre

dışında kendiliğinden ya da uyarı ile buz oluşumu gerçekleşir buna rağmen hücre içi aşırı soğuk ama donmamış bir halde kalır. Bunun sebebi, plazma zarının hücre içinde buz kristalleri gelişimine engel olmasıdır. Hücre içindeki aşırı soğuk sıvı, dışarıdaki yarı donuk çözeltiye göre daha yüksek bir kimyasal potansiyele sahiptir. Aradaki bu potansiyel fark hücre içindeki sıvının dışarı çıkmasına ve dışarıda donmasına sebep olmaktadır.

2.3.3.3. *KİMYASAL KORUMA*

Sıcaklık kontrolü tek başına dondurma yönteminde hücre canlılığını korumak için yeterli değildir. Kriyoprotektan olarak ilk kez sperm dondurmada gliserol kullanılmış daha sonraki yıllarda ise hücreleri kriyoprezervasyon sürecinde oluşabilecek lezyonlara karşı korumak için farklı kimyasallar denenmiştir.

2.3.4. *KRİYOPROTEKTANLAR*

Gamet hücrelerinin dondurulmasında kullanılan koruyucu maddeler olan kriyoprotektanlar, soğuk şoku ve donma esnasında gelişen diğer hasarlara karşı koruma sağlarlar. Kriyoprotektanların koruyucu etkileri, suyla hidrojen bağları oluşturarak, buz kristallerinin boyutlarını küçültmeleriyle ortaya çıkmaktadır. Gliserol ve propanediol, bu işi hidroksil grupları ile (-OH) yaparken dimetil sülfoksit (DMSO) ise oksijen atomu sayesinde yapmaktadır. Kriyoprotektanlar medyumun donmadan kalan kısmındaki elektrolit konsantrasyonunu da azaltarak koruyucu etki göstermektedirler(131).

Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm esnasında dekrizalizasyona ve gelişen membransel destabilizasyona karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılır. Genel olarak koruyucu etkilerini ortamdaki donmamış fraksiyonu artırarak ve ortamdaki iyon miktarını azaltarak gösterirler. Hücre, dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla inkübasyona tabi tutularak, intrasellüler bakımdan dengeye gelmesi sağlanmaktadır. Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır (124,132). Hücrelerin başarıyla dondurulması, plazma membranından suyun ve

kriyoprotektanların basit difüzyonunu ve hızlı transportunu gerektirir. Son yıllarda membranda transport işlevli protein yapısında olan su kanalları (aquaporin) saptanmıştır. Bu proteinlerin dondurma sıvısına katılmasıyla hücrenin yaşam gücü artırılmaktadır (133).

Spermdeki membransal yapılar (plazma membranı, dış akrozomal membran ve mitokondri membranı) ile oosit-embriyo membranı, donma/çözünme işlemine karşı son derece duyarlıdır. Membran yapıları klasik hücre membrane yapısında akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipitlerden yapıları iki sıralı fosfolipit katmanından oluşmuştur. Bu yapıların termodinamik özellikte ve % 65–70 oranında doymamış fosfolipitlerden (yağ asidi) oluşması, membranların soğutulmalarının sonucu olarak irreversibl faz değişimine, sıvı fazdan jel fazına geçmesine sebep olmaktadır. (129, 134). Faz değişimleri membran içi enzimlerinin kinetiğinde değişime yol açarak, çözme sonrası canlılığını azaltmaktadır (129,135,136).

Kriyoprotektanlar işlevsel olarak iki gruba ayrılmaktadır.

Permeabl kriyoprotektanlar,

Permeabl olmayan kriyoprotektanlar.

2.3.4.1. *PERMABL (İTERNAL) KRIYOPROTEKTANLAR*

Permeabl özelliğe sahip kriyoprotektan olarak, en yaygın kullanılanları DMSO, Gliserol, Etilen Glikol ve propilen glikoldür (PROH). Bu kriyoprotektanların molekül ağırlıkları sırasıyla 78,13, 92,10, 62,07, 76,10 gramdır.

Bu tür kriyoprotektanlar etkilerini, hücre zarından içeriye girerek ve koligatif(bağlaşık) olarak göstermektedir. Koruyucu etkileri donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır. Permeabl kriyoprotektanlar bu kristallerinin oluşumunu -40 °C kadar düşürebilmekte ve hücre solusyonların zararlı etkilerinden korunabilmektedir. Permeabl kriyoprotektanlar hücre içine geçişleri solüsyonun kendi geçiş gücü, hücre içi ve

dışındaki kriyoprotektanların konsantrasyon farkı ısı ve hücre yüzeyi ile orantılıdır. (126,137,138,139,140)

2.3.4.1.1. *DMSO (DİMETİLSÜLFOKSİT):*

DMSO, kimyasal olarak bir polar kök etrafında iki apolar baştan oluşan amfipatik bir bileşiktir. Bu özellik ona hem sıvı hem de organik medyumlarda çözünme imkanı sağlamaktadır. Hücre dondurma medyumundaki kriyoprotektanların toksisitesini azaltmak için, hücrelerin kriyoprotektanlara maruz kalma süresinin kısaltılması ve permeabl özelliği olmayan kriyoprotektanların kullanımı gibi uygulamalar yapılmaktadır (141).

2.3.4.1.2. *GLİSEROL:*

Gliserol, yüksek oranda hidrofilitik yapı gösteren bir poliol bileşiktir. Kimyasal yapısındaki C/OH oranının eşit olması onun sperm üzerine olan etkisini artırmaktadır. Gliserolün toksik etkisi türe bağımlılık göstermektedir. Hücrelerde gliserolün toksik etkisi, membran biyoenerji dengesinde değişikliğe ve ozmotik stresse yol açmasıyla kendini göstermektedir (130,142 ,143).

2.3.4.1.3. *ETİLEN GLİKOL:*

Etilen glükol su, alkol ve asetonla karışabilen ancak eterde hemen hemen hiç çözünmeyen, renksiz, viskoz ve tatlı bir alkoldür. Donma noktası -13°C, kaynama noktası ise 198°C'dir. Bir çok türün spermasında dondurma - çözme sırasında oluşan zarara karşı etilen glükol, gliserolle eşit oranda etki sağlamaktadır.

2.3.4.1.4. *AMİD TÜREVİ KRIYOPROTEKTANLAR:*

Amid türevi kriyoprotektanlar (formamid, dimetilasetamid (DMA vb.) özellikle aygır spermasının dondurulmasında gliserole göre daha iyi koruma vermekte ve daha az kontraseptif özellik göstermektedir. Sulandırıcılara %3,5-5 oranında katılması, donma zararına karşı etkili olmakta, çözüm sonu parametrelerde iyileşme sağlamaktadır.

2.3.4.2. *NONPERMEABL (EKSTERNAL) KRIYOPROTEKTANLAR*

Eksternal kriyoprotektanlar, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranları esnek hale getirir. Bu olayda çözme esnasında hücresel şişmeyi engeller. Ayrıca, hücrede donma-çözümüne sırasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Permeabl kriyoprotektanlara ilave edilen sıvılar düşük oranda kullanılmakta, buda internal kriyoprotektanların olası toksik etkilerini osmotik basınç farklılıkları oluşturarak azaltmaktadır (144,145). Eksternal kriyoprotektanlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır.

2.3.4.2.1. *MAKROMOLEKÜLLER:*

Makromoleküllerinden en çok kullanılanları şunlardır: Polietilen glikol, ficoll 70, Bovine serum albumin (BSA), dekstran, mannitol ve polivilinilprolidon'dür. BSA' nın lipit peroksidasyon inhibitörü olduğu düşünülmektedir (139,145, 146).

2.3.4.2.2. *SAKKARİTLER:*

Sakkaritlerden glukoz, sükroz ve disakkaritler sayılabilir. Sakkaritler, lethal etkili intrasellüler kristalleşmeyi engellemek için hücrede dehidrasyon oluştururlar (147, 148). Şekerler donma ve çözme sırasında oluşan membran zararına karşı, membrandaki fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak koruma sağlamaktadır. Çözme işlemi sırasında da hücrelerin osmotik şoka girmesini önlemektedir (139).

2.3.4.3. *YUMURTA SARISI*

Yumurta sarısında bulunan düşük dansiteye sahip fosfolipitler, sperm yüzeyine bağlanır ve hücresel adenilat siklazı aktive ederek kriyoprotektif etki gösterirler (136). Birçok araştırmada lipozomlardan elde edilen fosfolipitlerin koruyucu etkileri araştırılmış, türe göre koruyucu etkili fosfolipit kaynakları saptanmıştır. %20 yumurta akı 56° ısıda 30 dk. inaktive edilerek serum ve gliserol ilave edilip kompleks bir kriyoprotektan oluşturulur (137).

2.3.4.4. *ANTIFREEZE PROTEINLER*

Antifreeze proteinlerinin farklı moleküler ağırlığa sahip, tripeptit zincirlerden oluşan üç tipi vardır. Bu proteinler düşük sıcaklığa sahip sulara (-1,8°C) yaşayan balıklar, böcekler, bakteriler ve bitkilerden izole edilmektedir.

2.3.4.5. *DIĞER KRIYOPROTEKTIF AJANLAR*

Kriyoprotektif ajanlardan soya fasülyesi ekstraktlarının, hücrenin soğutulması sırasında membran akışkanlığını azaltarak koruyuculuk sağladığı bildirilmektedir. (136,149). Ayrıca pentoksifylline, kaffeine, sodium nitroprusside, platelet aktivasyon faktörü (platelet activating factor, PAF) ve hyaluronik asid'in spermin çözüm sonu yaşamına katkı sağladığı bildirilmektedir (150).

2.3.5. *KRIYOPREZERVASYON METODLARI*

Kriyoprezervasyonda birkaç çeşit metod uygulamaktadır.

2.3.5.1. *KLASİK YAVAŞ DONDURMA*

Yavaş dondurma tekniğinin genellikle embriyo ve oosit dondurulmasında kullanılmaktadır ve en çok tercih edilen yöntemdir. Çok sayıda modifikasyonu olmakla birlikte, şu basamakları içermektedir;

- 1- Kriyoprotektanın eklenmesi
- 2- Dondurma kaplarının içine hücrelerin yerleştirilmesi
- 3- Kapların dondurma makinesine alınması
- 4- Kristalizasyonun (seeding) uyarılması
- 5- Yavaş soğutma
- 6- Sıvı nitrojen içinde saklama
- 7- Örneklerin çözülmesi ve kriyoprotektanın uzaklaştırılması

Buz oluşumunu engellemek ve neden olacağı zararı azaltmak amacıyla önce hücreler dehidre edilmelidir. Bu amaçla %10–11 civarında kriyoprotektan içeren solüsyonlar kullanılmaktadır (151). Kriyoprotektanın eklenmesini takiben, hücreler bir dengeleme sürecine bırakılırlar ve bu esnada hücreler, su kaybetmeye başlarlar. Su kaybının nedeni, ekstraselüler ortamın hiperozmotikliği ve hücre zarının kriyoprotektana nazaran suya daha geçirgen olmasından kaynaklanmaktadır. Hücre

dışına su çıkışı ve hücre içine kriyoprotektan girişi dengeye ulaştığında hücrenin büzüşmesi durmaktadır (152).

Dondurma makinesinde 0 °C'nin altındaki sıcaklıklarda kontrollü olarak buz oluşumunun uyarılması gerçekleşir. Dondurma işleminin yavaş yapılmasının nedeni bu dengeleme sürecine zaman tanımak içindir. Aksi takdirde, su hücre içinde donacak ve hücrenin ölümüne neden olacaktır. Seeding işlemi uygulandığında, plazma membranının buzdan koruyucu etkisinden dolayı, hücrenin dışındaki ortam, daha önce donmaya başlar. Bu nedenle ekstrasellüler sıvıdaki eriyik konsantrasyonu yükselir. Hücre içindeki ve dışındaki kimyasal potansiyel farkına bağlı olarak hücre içindeki su, hücre dışına çıkmaya ve burada donmaya başlar. Sitoplazmadaki sıcaklık 0°C'nin altına düşmesine rağmen, çeşitli eriyikler bulunması nedeniyle donma meydana gelmemektedir (151,153). Donma işlemi sırasında, hücre içinde donmadan kalan sıvıda da eriyiklerin konsantrasyonu hızla ve şiddetli derecede artmaktadır. Örneğin izotonik NaCl solüsyonu -21°C'ye soğutulduğunda tuz konsantrasyonu 32 kat artar (154). Artan bu elektrolit konsantrasyonu hücre membranlarının stabilizasyonunu kaybetmesine neden olur. Gliserol gibi bazı kriyoprotektanlar, bu etkileri azaltır. Fare oositlerinde yapılan çalışmalar intrasellüler buz kristallerinin oluşumunun meydana gelmemesi için, su içeriğinin %90'ının kaybedilmesi gerektiğini göstermektedir. Oysaki embriyo için %30'luk bir oran yeterli olmaktadır (155).

Yavaş dondurma tekniğinde biyolojik yapılarda iki tip hasar oluşma riski vardır. Bunlardan birisi soğutmanın hızlı yapılmasına bağlı olarak oluşan hücre içinde buz oluşumdur. Diğer ise soğutma çok yavaş yapıldığında buz kristallerinin oluşumuna bağlı meydana gelen eriyik konsantrasyonunun artmasıdır (153). Ayrıca çok yavaş soğutma soğuk hasarına da neden olabilmektedir. Soğutma oranının saptanmasında 3 önemli faktör kullanılmaktadır. Bunlar membran yapısı, hücre plazma membranının suya ve kriyoprotektana karşı ısıya bağımlı geçirgenliği ve yüzey/hacim oranıdır (156). Çoğu kriyoprotektan hücre içine giriş hızına karşın, suyun hücreden çıkışı hızı kadar bir hızla hücre içine giremediklerinden, hücrede dehidrasyona ve büzüşmeye neden olurlar. Bu olay kriyoprotektanın dilüsyonu sırasında tersine dönmektedir.

Dilusyon medyumundaki su, hücre içine hızla girerken, hücre içindeki kriyoprotektan aynı hızla çıkamamaktadır. Sonuçta, hücrede şişme meydana gelmektedir. Bunu önlemek amacıyla dilusyon medyumlarına, hücre zarını geçemeyen sükröz katılmaktadır. Sükröz, suyun hücre içine girişini yavaşlatarak hücrenin aniden şişmesine ve ozmotik bir şok yaşamasına engel olmaktadır (157).

2.3.5.2. *ULTRA HIZLI DONDURMA*

İlk olarak Trounson ve Sjoblom tarafından uygulanmıştır. Hızlı dondurma terimi, kısmen dehidre edilmiş hücrelerin yaklaşık 1250°C/dk hızında soğutularak dondurulmasını ifade etmektedir. Bu teknikte, genellikle 2-4,5 M konsantrasyonlarda hücre zarını geçebilen Gliserol, propanediol, DMSO veya Etilen gliserol gibi bir kriyoprotektan ile birlikte hücre zarını geçemeyen sükröz, laktoz veya galaktoz gibi kriyoprotektanlar beraber kullanılmaktadır. Otuz saniye ile 3 dakika arasında kısa bir dengeleme sürecinden soğutulan hücreler, nitrojen buharına tutulduktan sonra, sıvı nitrojene daldırılmaktadır.

Vitrifikasyonun tersine, bu teknikte ekstrasellüler sıvıda, buz kristalleri oluşumu meydana gelmektedir. Hücre içi sıvıda buz oluşumu riski bulunduğundan diğer tekniklere göre daha düşük canlılık oranları vermektedir. Bu teknik klasik dondurma ve vitrifikasyon kadar ilgi görmemiştir (158).

2.3.5.3. *VITRİFİKASYON*

Vitrifikasyon programlı dondurma aletlerinin pahalı olması ve programlarının uzun sürmesi nedeniyle geliştirilmiş bir tekniktir. Vitrifikasyon tekniğinde ise, bir sıvının donmadan aşırı soğuma nedeniyle, yoğunluğunun çok yükselmesi sonucunda, cam benzeri bir hal alması olarak tanımlanmaktadır. Tekniğin en önemli özelliği, buz kristali oluşumunun elimine edilmesidir. Vitrifikasyonun evcil hayvanların embriyolarını dondurmak amacıyla ilk defa kullanılmasından bu yana, 20 yıllık bir süre geçmiştir. Bu olgunun gerçekleşebilmesi, yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektan bir ajana, yüksek soğutma ve ısıtma oranlarına, intraselüler ve ekstraselüler kısımların eşzamanlı olarak vitrifiye olmasını gerektirmektedir. Zamanla, yoğunlaştırılmış polimerlerin kriyoprotektan olarak kullanılması toksisite riskini azaltmış, soğuma ve ısıtma oranlarındaki ciddi artışlar, daha az konsantre

solüsyonların kullanımına neden olmuş ve hücrelerdeki soğuk hasarının şiddetini düşürmüştür (159,160,161). Bu teknikte çok hızlı soğutma yapılmasından dolayı +15 ile -5 °C arasındaki soğuk hasarının meydana geldiği dereceler çabucak geçilmektedir. Saniyede 107 °C'lık soğutma oranı ile su bile vitrifiye edilebilmektedir. Payetlerin nitrojene daldırılması ile 2500 °C/dk'lık bir soğutma oranı sağlanmaktadır (161).

Birçok laboratuvar vitrifikasyon ile memeli embriolarında iyi bir canlılık oranı ortaya koymuştur. Ancak bu yöntem hala deneyseldir ve saydamlaştırma için ihtiyaç duyulan yüksek seviyede katkı maddeleri de potansiyel olarak sitotoksiktir. Yine bu yöntemde karşılaşılması muhtemel pratik bir sorun da vitrifiye olmuş çözeltilerin devitrifiye olma eğilimleri, yani kristalleşmeleri ve böylece depolama ve çözme işlemleri sırasında canlılık kaybının ortaya çıkabilmesidir.

Başarılı bir vitrifikasyon işlemi, iyi permeabilite özelliklerine sahip düşük toksisiteli kriyoprotektanların kullanımını, kriyoprotektanların ortama ilavesini, hücre dondurma işleminin düşük sıcaklıklarda yapılmasını ve hücrede oluşacak yapı yıkımlarını önlemek için relaksanların kullanılmasını gerektirmektedir(146).

Bu üç sık kullanılan kriyoprezervasyon yöntemi dışında birkaç alternatif yöntem daha bulunmaktadır.

196 ° C üzerinde saklama yöntemi: Bu konvansiyel yöntemde örnekler, sıvı azota ihtiyaç duyulmadan -130°C altında soğutulan buzdolapları ve dondurucular da saklanabilir. Fakat -130 °C altında uzun süreli saklanmalar hücre canlılığında azalamaya yol açar. Bu yöntem embriyo ve oosit gibi hücrelerin saklanması uygun olmamakla birlikte hücre kayıplarının çok önemli olmadığı bazı memeli hücre kültürlerinde ve mikrobik süspansiyonlarda kullanılmaktadır (125).

Dondurarak kurutma: Eğer memeli hücrelerde canlılık korunabilseydi en elverişli yöntem olurdu. Böylece dondurularak depolanmanın getirdiği tüm zorluklar ve maliyetler aşılabildi. Bu yöntem demonstratif olarak fare spermelerinde kullanılmıştır. Dondurularak kurutulmuş fare spermi bir fare oositine direkt enjeksiyon yapılarak

normal bir gelişimin elde edilebileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte mayalar ve bakteriler üzerindeki araştırmalar bu yöntemin yüksek oranda mutajenik olduğunu ve saklanma süresi artıkça canlılığın azaldığını göstermiştir. Bu etkenler sebebiyle insanlarda dondurulup kurutulmuş spermilerin kullanılması engellenmektedir(125).

2.3.6. DONDURMA SIRASINDA HÜCREDE MEYDANA GELEBİLECEK DEĞİŞİKLİKLER

Hücre biyokimyasında, sıcaklığın değişmesine bağlı olarak bir takım değişiklikler meydana gelmektedir. Sıcaklığın 37°C den 7°C kadar düşmesi ile enzim reaksiyonlarında yaklaşık olarak 8 kat azalış meydana gelmektedir. Sıcaklığın düşmeye devam etmesiyle beraber hücrenin içinde bulunduğu solüsyonlarda da bazı fiziksel ve kimyasal değişimler meydana gelir.

Hücrelerin dondurulmasında suyun biyolojik formunun değişimi söz konusudur. Yani dondurma, suyun biyolojik olarak kristalleşmesi, şekil değiştirmesi ile gerçekleşir. Hücrelerin dondurulma işlemi sırasında ekstrasellüler solüsyon kendiliğinden veya etkime (seeding) ile -5 ila -100°C' de kristalleşir. Ancak intrasellüler ortam hücre membranının etkisiyle henüz donmamıştır. Söz konusu oluşum sırasında ekstrasellüler suyun buzlaşması nedeniyle ortamda bulunan maddelerin yoğunluğunda artış oluşur. Bu durum kimi kimyasal maddelerin hücre içinde ve dışında farklı yoğunlukta bulunmalarına yol açar. Meydana gelen farklı yapı ya da denge nedeniyle bir kısım sıvının hücre dışına çıkması (dehidrasyon) ile bu kez de hücre içinde bulunan bir kısım erimiş maddelerin yoğunluğunda yükselme meydana gelir ve hücre içerisinde de kristaller oluşur (127).

Dondurulma sırasında hücrede meydana gelebilecek değişiklikleri sıralarsak;

1. Çözücüler ve tuz solusyonları sıvı fakat vizkozitesi yüksek fazda iken; su, buz kristallerine dönüşür, sıvı fazdan katı hale geçer. Sıcaklığın düşmesi ile meydana gelen buz kristalleri, iç hücre sistemini koruyan hücre membranlarında büyük lezyonlar oluşturabilir.
2. Sıcaklığın düşmesi sonucu suyun buz kristalleri oluşturması nedeniyle geride kalan tuz solusyonları ekstrasellüler ortamdaki çözücülük etkilerini gittikçe

azaltır. Su – tuz – buz karışımı kralize olduğu anda buna ötektik noktaları denir. Tuz bileşenler, ötektik noktalarına suyun kristalleşmesi ile ulaşır. Bu değerler normal kültür solusyonları için -10°C ile -17°C arası, sodyum klorid için ise -25°C dir. Bu sebeple kriyoprotektif ajanların yokluğunda mortalite artacak, hücreler yüksek oranlarda pH değışikliklerine ve farklı konsantrasyonlarda tuzların etkisine maruz kalacaktır. Bu durum lipoprotein denatürasyonu ve buna bağılı olarak membran içinde zorlanmalara neden olur ve bu da solusyon etkisi olarak açıklanabilir.

3. Dondurma solüsyonu içindeki tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte hücre ozmotik hale geçer ve su kaybeder, bunu takiben pasif dehidratasyon ve büzüşme başlar. Hücre yoğunluğundaki azalmanın çok olması hücre yapısında geri dönüşümsüz hasarlara yol açarak hücrenin ölümüne sebep olur.
4. *Kriyoinjury* : Gametlerdeki soğutma zararı hiperozmotik stres, soğuk şoku stresi, ozmotik büzüşme-şişme sonucu oluşmaktadır. Hiperozmotik çevrenin yaratılmasında ortam pH'sı, sellüler dehidrasyonda artış, hücre membranı protein-lipit kompleksinin zayıflaması önemli yer tutar. Donma esnasında, oosit ve embriyoda oluşan koyu lipit damlacıklarının soğuk şoku hasarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (162). Gamet ve embriyonun soğuk şokuna maruz kalmasında gelişen zararlar, intrasellüler dehidrasyon, membran lipit ve proteinlerinde destabilizasyon-denatürasyon, hücre ve endoplazmik retikülümünde ozmotik şişme, plazma membranında intramembranöz kümeleşme, zona pellusidada fraktür, akrozomal enzimlerin salınımı, soğuk şokuyla spermin sirküler hareketi ve motilite kaybı, oositlerin IVF kayıplar olarak sıralanabilir (129,130,134). Bunların sonucunda, hücrede apoptozis, serbest radikal oluşumu, ATP sentezinde aksama, fertilitte kaybı, polispermi ve tetraploidi oluşmaktadır (151).

2.3.7. OZMOTİK STRES VE OZMOTİK ŞİŞME

Donma işleminde etkili en önemli faktör hücrede oluşan ozmotik strestir. Donma sırasında hiperozmotik ortam oluşmasına rağmen, çözme esnasında kristalizasyonun ortadan kalkmasıyla bu ortam azalmaktadır. Ozmotik stres intrasellüler ve

ekstrasellüler ortamdaki ozmotik farktan ileri gelmektedir. Bu ozmotik farklılığın hesaplanması, hücreden hangi oranda suyun uzaklaştırılmasında önemlidir. Suyun uzaklaştırılma oranı ise doğrudan ortama katılacak kriyoprotektan yoğunluğuyla ilişkilidir (163). Kriyoprotektanların ilavesi ortamın hiperozmotik olmasına, hücre membranından içeriye girmesiyle hücrede dehidrasyonun şekillenmesine neden olmaktadır. Kriyoprotektanların uzaklaştırılmasında hücreler tekrar şişmekte ve izozmotik hacime ulaşmaktadır (164). Bu tekrarlanan değişimler kritik noktaları geçtiğinde, hiperozmotikliğe bağlı, geri dönüşümsüz olarak membran yıkımı oluşur. Ayrıca hücredeki küçük porların varlığı potasyum ve sodyum iyonlarının giriş-çıkışını sağlayarak, hücrenin hipoozmotik stress ve kolloidal ozmotik hemolize duyarlılığını artırır.

Mazur ve arkadaşlarının (165) ortaya attığı iki faktör hipotezine göre; hızlı soğutma zararı, hücrede şekillenen kristalleşmeyle ilgilidir. Yavaş soğutma zararı ise hücrenin kriyoprotektanlara uzun süre maruz kalmasında ya da aşırı büzülmesinde oluşmaktadır.

Hücreler su içeriğine, hacmine, soğutulma duyarlılığına ve sitoplazmik membranın sıvı permeabilite katsayısına göre spesifik soğutma oranına sahiptir. Donma esnasında gametin su alış-verişinin hesaplanması, hücrenin donmaya ve kriyoprotektanlara karşı ozmotik tepkinin belirlenmesi, lethal etkili intrasellüler donma insidensinin azaltılması ve kriyoprotektanların optimum katım oranlarının saptanması bazı membran parametrelerinin belirlenmesine bağlıdır. Bu parametreler, ozmotik inaktif hacim, hidrolitik iletkenlik (L_p), eriyik permeabilitesinin aktivasyon enerjisi (V_p) ve hücre yüzeyi/hacim oranıdır (138, 165).

Sonuç olarak hücreler soğuk şokuna maruz kaldıklarında membransel ve ozmotik değişikliklere uğramaktadır. Bu değişiklikler hücrelerin çözüm sonu yaşam/fonksiyonel özelliklerini olumsuz etkilemektedir. Özellikle gamet ve embriyoların soğuk şoku ve ozmotik zarara karşı ortamlarına kriyoprotektif ajanların katılması, çözme sonrası canlılığı ve fertilitiyi optimize etmektedir. Son yıllarda geliştirilen bazı membransel parametreler, kriyoprotektanların ortama hangi oranda katılacağına belirlenmesinde kullanılmaktadır.

2.3.8. SPERM KRİYOPREZERVASYONU

Sperm hücreleri dondurularak canlı olarak uzun yıllar saklanabilir ve istenildiğinde çözülerek yardımcı üreme tekniklerinde kullanılabilir.

İlk hücre dondurma bankası 1972 yılında kurulmuştur. Bir yıldan fazla süredir saklanan sperm ile doğan ilk sağlıklı bebek 1973 yılında dünyaya gelmiştir. Tyler Tıp Merkezinde 20 yıldır saklanmakta olan sperm ile canlı bir bebek doğumu 1998 yılında gerçekleşmiştir.

Kriyoprezervasyonun yardımcı üreme tekniklerinde (YÜT) önemli bir yer tutmaktadır. Sperm kriyoprezervasyonun kullanım amaçlarını sıralayacak olursak;

1. Sperm parametreleri normal olup, kemoterapi, radyoterapi görecektir hastaların örnekleri alınıp saklanması
 2. Spermatogenezi inhibe edebilecek ilaçların kullanım öncesinde ejakülattan sperm alınıp saklanması,
 3. Testis veya prostat cerrahisi öncesinde ejakülattan sperm alınıp saklanması
 4. Obstrüktif azospermiden şüphelenilen ve YÜT kullanılması planlanan hastalarda öncesinde testisin histopatolojisi hakkında bilgi sahibi olunması, eşi hazırlanmamış olan nonobstrüktif azospermik hastalarda testiküler sperm ekstraksiyon (TESE) ile bulunan spermilerin saklanması
 5. Azospermik hastalarda başarılı veya başarısız bir işlem sonrasında istenilen gebeliklerde cerrahi işlemleri tekrarlamamak için alınan örneğin saklanması
 6. Prepubertal dönemde malignensi sebebiyle kemoterapi yada radyoterapi
 7. YÜT planlanan hastanın psikojenik faktörler gibi sebepler nedeniyle işlem günü örnek alınma problemi olabileceği düşünülüyorsa önceden örnek alınıp saklanması
 8. Donor sperm bankası amacıyla alınan semen örneğinin saklanması
- alınacaksa testisten örnek alınıp saklanmasıdır.

Spermin değişik oluşum evrelerine spesifik kriyoprezervasyon yapılabilir. Sperm testisten çıktıktan sonra plazma membran lipid ve proteinlerinde fiziksel ve kimyasal değişiklikler olur. Değişik maturasyon evresindeki spermier farklı kriyobiyolojik özellikler gösterirler ve farklı dondurma çözme yöntemi gerekir. Ejakülat

sperminin dondurma ve çözme sensitivitesi epididimal sperm ve testiküler spermden daha yüksektir. Kriyoprezervasyon sırasında sperm hasarlanması olabilir. Sperm motilitesi ve sperm-oosit füzyon kapasitesi azalabilir veya plazma membran lipid peroksidasyonuna bağlı olarak fertilizasyon azalabilir. Bunların sebebi serbest oksijen radikallerinin (hidrojen peroksit vs) üretiminin artmasıdır (166).

YÜT uygulanması sırasında insan sperminin mekanik strese (pipetleme, karıştırma ve santrifüj) dayanıklı olması sebebiyle çok problem yaşanmaz. Kriyoprezervasyonda bakteriyel, viral ya da mantar enfeksiyonları görülebilir (166). Sperm dondurmanın sperm motilitesi ve canlılığı üzerine olumsuz etkisi olabilir. Bunu önlemek için bazı araştırmacılar kültür ortamına koruyucu olarak askorbik asit, katalaz, E vitamini vs gibi antioksidanların eklenmesini önerirler (167).

Dondurma çözme işlemi sırasında sperminin fertilizasyon kapasitesini azaltan boyun kırıkları görülebilir (168). Akrozomal ve plazma membranlarında şişme ve parçalanma olabilir (169).

sperm kriyoprezervasyonu esnasında dondurma oranının kontrolü çoğunlukla ilkindir: Numuneler genellikle, sıvı nitrojenin üzerindeki buharın içinde tutulur, bu da, farklı numunelerin arasında termal geçmişlerde önemli farklarla sonuçlanır. Sperm sayımları normal olduğu zaman, ortaya çıkan örnekler arası varyasyon ve yaşama kabiliyeti önemli olmayabilir; fakat IVF uygulamasındaki yakın zamandaki bazı gelişmeler canlılığı azami dereceye çıkarmak için iyileştirilmiş dondurma tekniklerini kullanmayı zorunlu kılmıştır. Uygulamadaki bu değişiklikler ki, bunlar

- ICSI'nın bulunması ve çözülmeden sonra yüksek canlılıktaki az sayıda spermin depolanması için artan bir ihtiyacın var olduğu cerrahi sperm toplama tekniklerinin elverişliliği
- Donörlere yapılan ödeme ve donörlerin isminin gizlenmesi ile ilgili yasama değişikliklerinin, sperm donörü sayısında bir azalmayla sonuçlanacağı beklenmektedir ve bu sebeple, tüm spermleri yüksek canlılıkta depolayabilmek ve algılanan düşük donma kalitesinden dolayı donörleri geri çevirmemek gerekmektedir. Eğer iyileştirilmiş kriyoprezervasyon metotları uygulanabilirse, daha fazla donör bulunabilir.

Kriyoprezervasyon streslerine insan sperminin tepkisinin bir incelemesi, gözlenen davranışın, memeli hücrelerinin birçok diğer tipinde bildirilenden değişik olduğunu gösterir ve hücrel donma yarasının genellikle kabul edilen modellerinin uygulanamadığı görünmektedir. Sperm kriyobiolojisi birkaç açıdan aşağıda tartışıldığı üzere olağandışıdır.

Çözülmeden sonra hayatta kalan maksimum hücre canlılığına bakılarak, hücrenin birçok tipiyle net optimal bir dondurma oranı tespit edilmiştir. Buna karşılık, sperm dondurma esnasında lineer soğutma oranına nispeten duyarsızdır. İnsan spermiyle, -1°C veya -100°C ' ye soğuttuktan sonra, çok geniş bir tepki eğrisi ve hayatta kalmada çok az bir fark vardır. Memeli hücreler için olağandışı olan soğutmaya duyarsızlık, sperm hücreleri için olağandır. İnsan sperminin kriyoprezervasyonu hakkında yayımlanan birçok çalışma arasında, soğutma oranının hücrenin hayatta kalmasına etkisi hakkında çok az miktarda (< 5) çalışma bulunmaktadır. Buna karşılık, hem embriyo hem oositin hayatta kalmasında soğutmanın farklı oranlarının etkileri üzerine birçok yayın bulunmaktadır. İnsan sperminin dondurma ve çözünmeden sonra yaşama kabiliyeti nispeten düşüktür: tipik olarak çözünmeden sonra %50-60'ı motiliteye sahiptir. Diğer birçok memeli hücre tipinde, örneğin embriyolar, optimal soğutma oranında, çok yüksek oranlarda canlılığa, %90'larda, ulaşmak mümkündür (170).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. OLGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tüp Bebek Merkezine Nisan 2007 ile Kasım 2007 tarihleri arasında başvuran toplam 50 olgu (sperm motilite bozukluğu olan 40 olgu ile motilite bozukluğu olmayan 10 olgu) çalışma kapsamına alındı. Kontrol grubunun yaş ortalaması 36,4 ve yaş aralığı 28-42 , motilite bozukluğu olan grubun ise yaş ortalaması 35,3 ve yaş aralığı 23-54 tür.

Semen örnekleri mastürbasyon yöntemi ile 3-5 günlük ideal cinsel perhiz sonrası elde edildi. Mastürbasyonla elde edilen semen örneği steril ve geniş ağızlı bir kaptan toplandı.

Tüm olgulardan toplanan semen örneklerine ilk önce makroskopik değerlendirme yapıldı. Sonra mikroskopik değerlendirmeye tabii tutuldu. Mikroskopik değerlendirmede sperm sayısı, motilitesi ve morfolojisi değerlendirildi. Bundan sonraki aşamada her bir olgudan alınan semen örnekleri iki gruba ayrıldı. İlk grup semen örneklerine yıkama yapılmadan TUNEL yöntemi uygulanırken, ikinci gruptaki semen örnekleri gradient yöntemi ile yıkandı, dondurma ve çözme işlemi yapıldıktan sonra TUNEL yöntemi uygulandı. Aynı zamanda her iki gruptan seçilen 6 örnek ultrasuktural olarak transmisyon elektron mikroskopunda (Transmission Elektron Microscope, TEM) incelendi.

3.2. SEMEN ANALİZİ

3.2.1. MAKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

Semen; koagülasyon, likefaksiyon, görünüm, hacim, viskozite ve pH açısından değerlendirildi.

Semen örneği viskozitesi, 5ml lik pipet kullanılarak semikantitatif olarak ölçüldü. Likefaksiyondan sonra ejakulat 5 ml' lik pipetle aspire edilip bir damla semenin kendi ağırlığı ile pipetten damlamasına izin verildi. 2 cm' den fazla ipliksi bir şekilde uzayan

semen damlaları hiperviskoz olarak değerlendirildi. Viskozite, sübjektif olarak 4 dereceli bir skalada değerlendirildi:

- 1 : Viskozite normal
- 2: Biraz artmış viskozite
- 3 : Orta derecede artmış viskozite
- 4 : Oldukça artmış viskozite

Geçerli viskozite 30 dakikalık likefaksiyon sonrası +1 derece olarak kabul edildi.

PH ölçümü ise, bir damla semenin pH kâğıdı üzerine damlatılması ile yapıldı.

Semen volümü dereceli pipetle ölçülerek saptandı.

3.2.2. MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

Semen örnekleri 37° C de bekletildi ve motilite değerlendirmesi ejakulasyondan sonra 1 saat içinde oda sıcaklığında yapıldı. Sperm konsantrasyonu ve motil sperm yüzdesi WHO kriterlerine göre belirlenerek Faz kontrast mikroskopu ile değerlendirme yapıldı.

Sperm konsantrasyonu ve motil sperm yüzdesinin belirlenmesi için Makler Sayım Kamerası kullanıldı

Likefiye olan semen örneğinden alınan bir damla; Makler Sayım Kamerasının ortasına konup üst kapak kapatılarak 10 µm kalınlığında yayma oluşturuldu. 200x büyütme altında yan yana 10 kare sayılarak mililitre başına düşen sperm sayısı tespit edilir.

Her bir spermin motilitesi 4 kategoride skorlandı:

- +4 Hızlı ileri hareketli
- +3 Yavaş ileri hareketli
- +2 Yerinde hareketli

Hareketsiz (immotil)

Mikroskop alanını lineer motilite ile geçen spermiler ileri hareketli olarak değerlendirildi. Lineer motilitesi olmayan spermilerle, lineer motilitesi olan spermilerin toplam yüzdesi ise toplam hareketlilik olarak belirlendi.

Sperm morfolojisi değerlendirmesi için Stat III boyası kullanıldı.

Stat III boyası; geleneksel Wright's ve Wright's Giemsa boyaması ile benzerdir ve Krüger sperm morfolojisi kriterlerine uygundur. İmmatür sperm ve beyaz kan hücrelerini ayırt eder.

Semenden alınan bir damla örnek lam üzerine smear şeklinde yayılır. Bu lam 5-15 dakika arası havada kurutulduktan sonra boyama işlemine geçilir.

Lam 5 kez Fiksatif solüsyonuna batırıldı (her bir batırış bir saniye olmalı). Fazla solüsyonun akması için bekletildi. Daha sonra diğer aşamaya geçildi.

Lam sonra 5 kez Solüsyon I'e (Eosin solüsyonu) batırıldı (her bir batırış bir saniye olmalı). Fazla solüsyonun akması için bekletildi ve diğer aşamaya geçildi

Lam daha sonra 5 kez Solüsyon II'ye (azure solüsyonu) batırıldı (her bir batırış bir saniye olmalı). Fazla solüsyonun akması için bekletildi.

Deiyonize sudan geçirildi.

Kurumasına izin verilip ve daha sonra immersiyon yağı altında incelendi.

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

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

Baş boyutları, 4–6 mikron X 2–3 mikron X 1,5 mikron olmalıdır.

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

Akrozom altında kalan bölümlerin konturları düzgün olmalıdır.

Boyun, orta parça ve kuyruk anomalisi olmamalıdır.

Orta parça silindirik ve baş ile aksiyel olmalıdır.

Orta parça eni 1 mikron, uzunluğu baş uzunluğunun 1,5 katı olmalıdır.

Orta parça sitoplazmik artık içermemelidir.

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

Kesin kriterlere göre morfolojik değerlendirmede dikkat edilecek noktalar:

Spermin tümünün morfolojik yapısı değerlendirilmelidir.

Değerlendirme 1000X büyütme alanında yapılmalıdır.

Değerlendirme esnasında hücre kümelerinin bulunduğu bölgelerdeki spermiler dikkate alınmamalıdır.

TUNEL test uygulama protokolü:

1-Ejakülat örneği 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmek suretiyle konsantre edildi.

2-Oluşan pelet her defasında üzerine 1 ml distile su ekleyip homojenize edildikten sonra 3 kez 1200 rpm'de 10'ar dakika santrifüj edildi.

3-2ml hipotonik solüsyon (KCl; 0,075 M) eklendi. Hafifçe vortekslendikten sonra 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

4-Süpernatant uzaklaştırılıp ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

5-Pelet üzerine 2 ml fiksatif (2:1; metanol: asetik asit) eklendi. 15 dakika - 20°C'de bekletildi.

6-2 lam üzerine yaymalar yapıldı. 5 dakika fosfat bufer solüsyonunda (phosphat buffer solution, PBS) (1x), bekletildi. Daha sonra sırayla %70, %85 ve %100'lük etil alkol konsantrasyonlarından geçirilerek yıkandı.

7-Bu aşamada hazır kit (Roche İn situ Cell Death Detection Kit) solüsyonlarının uygulanmasına geçildi. Önce birinci solüsyondan 5 µl, sonra ikinci solüsyondan 45 µl alınarak hazırlanan stok solüsyondan hazırlanmış iki slaytın herbirinin üzerine 25 µl eklenip, üzerleri geniş birer lamelle kapatıldı. Slaytlar kağıt ıslak havlu konmuş olan mapeye yerleştirilip ve üzerleri aliminyum folyo ile kapatıldı. 45 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı.

8-İnkübasyon sonrası PBS ile 1 dakika boyunca yıkandı. İşlem 3 kez tekrar edilip örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

9- Kurumuş slaytlar DAPI boya ile boyanıp ve floresan mikroskopta FITC filtresi ile değerlendirildi.

Elektron Mikroskopu Doku Takibi:

Santrifüj edilerek pellet haline getirilen örnekler %2,5' luk glutaraldehide alındı. 1- 48 saat + 4°C ' de bekletildi.

Sorensen fosfat buffer ile 3-4 kez değiştirilerek 15-20 dakika yıkandı. (glutaraldehid şişelerinden boşaltılıp üzerine tampon solüsyonu kondu.)

1 kısım PBS ve 1 kısım osmium tetroksit (OsO₄) solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi. (Ependorf tüplerin içine 500 µl OsO₄ + 500 µl tampon kondu. Bu işlem her örnek için otomatik pipet kullanılarak yapıldı. Tüpler aliminyum folyo ile kaplanıp oda sıcaklığında 1 saat karanlık ortamda (çekmece içine) bekletildi.

PBS ile 15-20 dakika yıkandı. Üç küçük beher içine PBS konup OsO₄' ten çıkan parçalar çalkalandı. Bu aşamada 1 gece bekletildi. Çıkan parçalar kurutma kâğıdında süzdürülüp en son içinde tampon olan eppendorf tüpe kondu.

Dehidratasyon İşlemi

% 70 Alkol10 dakika

%100 (Absolu) Alkol.....10 dakika

%100 (Absolu) Alkol.....10 dakika

Propylene oxid10 dakika

Propylene oxid10 dakika

İnfiltrasyon İşlemi

Dokudaki propylen oxiti; parçaları kurutmayacak şekilde 1:1 oranındaki propylen oxid ve araldit karışımına alındı. Arada hafif hareketlerle karıştırılarak oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

Saf araldit içine parçalar alındı. Arada hafif hareketlerle karıştırılarak 6–12 saat oda sıcaklığında bekletildi.

Ertesi gün yeni araldit karışımında yaklaşık 2 saat bekletildi.

Parçalar DMP 30'lu ya da BDMA'lı saf araldit içine gömülür. 60°C 'lik etüvde 48 saat polimerize edildi.

3.3. SPERMLERİN DONDURULMASI

Olgulardan alınan örnekler semen parametreleri incelendikten sonra ikiye bölündü. Bir bölümü Medicult diğer bölümü ise Test yolk Buffer adlı iki farklı kriyoprotektan kullanılarak donduruldu. İlk kısmına mikroskopik değerlendirmeden sonra TUNEL yöntemi uygulandı. İkinci kısmı ise gradient yöntemi ile yıkandıktan sonra dondurulup çözülerek TUNEL yöntemi uygulandı. Gradient yöntemi ile sperm yıkama işleminde Pure ception (Sage) %40'lik ve %80' lik gradientler ve sperm yıkama medyumunu (Sperm Washing Medium, Sage) oda sıcaklığına getirildi.

1. Steril 1 ml.'lik bir pipet yardımıyla, konik tabanlı santrifüj tüpü içine 1 ml. Pureception % 80'lik konuldu.Steril 1 ml' lik bir pipet yardımıyla, Pureception % 80'lik üzerinde bir katman oluşturacak şekilde 1ml. PureCeption % 40'lik konuldu.
2. Oluşturulan ikili gradient üzerinde bir katman oluşturacak şekilde, steril bir pastör pipet yardımıyla 3-4 ml kadar likefiye semen konuldu.
3. 500 g. 'de 20 dk. santrifüj edildi.

4. Santrifüj sonrası steril bir pastör pipet ile, seminal plazma, ara katmanlar, tüm PureCeption %40, ve PureCeption %80'in oluşan pellete zarar vermeden aspire edildi.
5. 10 ml'lik pipet yardımıyla, pelletin üzerine 4 ml Sperm yıkama medyumu konuldu.300 g.'de 10 dk. santrifüj edildi.
6. Steril bir pastör pipet ile santrifüj sonrası pelleti bozmadan üstte kalan sperm yıkama medyumu aspire edildi.
7. 1 ml. sperm yıkama medyumu eklenerek spermler 1 saat yüzdürüldü.

Daha sonra tekrar yüzdürme (Swim-up) sonrası değerlendirme yapıldı ve sperm dondurma medyum 1:1 oranında damla damla ilave edilerek 10 dakika beklendi. Bu karışım vial adı verilen hücre dondurmak için kullanılan dondurma tüplerine (Cryo Cellstra Greiner Bione) alındı. Sıvı azot buharında (sıvı azot üst seviyesinden en az 7 cm yukarıda) vialler 30 dakika bekletildi. Daha sonra tanklardaki önceden tespit yerlerine transfer edildi.

3.4. SPERMLERİN ÇÖZÜLMESİ

Vialler sıvı azot tankından çıkarıldı. 1 dakika oda sıcaklığında betildikten sonra eriyinceye kadar 37°C 'de bekletildi. Viallerin kapakları açılarak içerikleri yıkama için santrifuj tüplerine aktarıldı. Kriyopektan maddelerin uzaklaştırılması amacıyla sperm yıkama medyumu eklenip 300 g' de 10 dakika santrifuj edildi ve üstte kalan kısım atıldı. 0,5 ml sperm yıkama medyumu ilave edilerek 30dk beklendi.Çözünen spermatozoa TUNEL değerlendirilmeleri, ışık floresan mikroskobu ve elektron mikroskopisi incelemeleri için hazırlandı.

3.5. İSTATİSTİK

Bu çalışmada SPSS 15.0 for Windows yazılımı kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. Grupların karşılaştırmalarında "Independent Samples T Testi" kullanıldı. Gerekliğinde Korelasyon ve Lineer Regresyon Analizi yapıldı. Veriler ortalama, \pm standart sapma ve % ile ifade edildi. İstatistiksel anlam için $p < 0.05$ kabul edildi.

4. **BULGULAR**

Normozoospermia ve asthenospermia kriterlerindeki hastalardan alınan örnekler yıkama öncesi, yıkanıp dondurulup çözme sonrası olmak üzere 2 grupta incelendi. Bu gruplar arasındaki farklar yaş, motilite, kullanılan dondurma solüsyonları, DNA fragmantasyonları ve ultrastrüktürel özelliklerine göre karşılaştırılarak değerlendirilmiştir

4.1. **MOTİLİTE BULGULARI**

Dondurma öncesi yapılan sperm analizinde normozoosperme sahip 10 hastadan alınan semen örneklerindeki spermelerde ileri progresif hareketlilik oranı %14,6 iken swim up uygulamalarında sonra bu oranın %24,6 yükseldiği saptandı. Oranlar arasındaki bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($p<0,05$). Aynı hasta grubundan elde edilen semen örneklerine dondurma ve çözme işlemi uygulandıktan sonra yapılan incelemede ileri progresif hareketli sperm oranı %19,1 olarak tespit edildi. Bu oran dondurma öncesi oran ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4).

Çalışmamız kapsamına aldığımız asthenozoospermia sahip 40 hastanın semen örnekleri ileri progresif hareketli sperm oranı açısından incelendiğinde dondurma öncesi bu oran %0,8 iken dondurma öncesi yıkama yapıldıktan sonra oran % 4,7 e yükselmiştir. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Dondurma-çözme sonrası bu oran %3,1 değerine düşmüştür. Oranlar arasındaki bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p>0,05$) (Tablo 4).

Tablo 4 Gruplara göre İleri Progresif hareketlilik oranları

	Normo (n=10)	Astheno (n=40)	Toplam (n=50)
Bazal semen İleri Progresif hareketlilik	14,6 ± 10.2	0,8 ± 2.1	3,5 ± 7.3
Yıkama sonrası ileri progresif hareketlilik	24,6 ± 9.5	4,7 ± 4.7	8,7 ± 9.9
Çözme sonrası ileri progresif hareketlilik	19,1 ± 9.6	3,1 ± 7.2	6,3 ± 10.0
NOT: p değeri < 0.05 Ort ± Stand.Sap.			

Çalışmamız kapsamına aldığımız normozoospermia sahip 10 hastanın yaş ortalaması 36,9 iken asthenozoospermia sahip 40 hasta nın yaş ortalaması 35,2 dir.

Normozoospermia olgularında sperm sayıları göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede bazal sperm sayısı 109.5×10^6 iken yıkama sonrası bu değer 57.8×10^6 bulunmuştur. ($p < 0,05$). Çözme sonrası ise bu değer $28,7 \times 10^6$ ye düşmüştür. Oranlar arasındaki bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$)(Tablo 5).

Asthenozoospermia olgularında sperm sayıları göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede bazal sperm sayısı 49.3×10^6 iken yıkama sonrası bu değer 17.5×10^6 bulunmuştur. ($p < 0,05$). Çözme sonrası ise bu değer 7.9×10^6 ye düşmüştür. Oranlar arasındaki bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$)(Tablo 5).

Normozoospermia sahip 10 hasta spermleri total motil sayı değeri göz önüne alınarak değerlendirildiğinde ortalama total motil sayı değeri 210.2×10^6 iken dondurma öncesi yapılan yıkama total motil sayıda bu değer $43,8 \times 10^6$ bulunmuştur. Dondurma ve çözme sonrası ise bu değer $7,9 \times 10^6$ değerine düşmüştür. Oranlar arasındaki bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$)(Tablo 5).

Asthenozoospermia sahip 40 hasta spermleri total motil sayı değeri göz önüne alınarak değerlendirildiğinde dondurma öncesi ortalama total motil sayı değeri $54,9 \times 10^6$ iken dondurma öncesi yapılan yıkama sonrası ortalama total motil sayıda bu değer $10,8 \times 10^6$ bulunmuştur. Dondurma ve çözme sonrası ise bu oran 1.8×10^6 düşmüştür. Oranlar arasındaki bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$)(Tablo 5).

Tablo 5 Sperm Sayısı Karşılaştırması

	Normo (n=10)	Asteno (n=40)	Total (n=50)	p Değeri
Yaş	36,9 ± 5,4	35,2 ± 6.6	35,5 ± 6.3	-
Sperm Sayısı (x10⁶mL)	109,5 ± 57.1	49.3 ± 41.0	61.3 ± 50.3	<0.05
Total Motil Sayı (x10⁶mL)	210,2 ± 117.8	54.9 ± 51.8	85.9 ± 92.9	<0.05
Yıkama Sonrası Sperm Sayısı (x10⁶mL)	57.8 ± 23.9	17.5 ± 15.6	25.5 ± 23.7	<0.05
Yıkama Sonrası Total Motil Sperm Sayısı (x10⁶mL)	43.8 ± 20.0	10.8 ± 11.2	17.4 ± 18.7	<0.05
Çözme Sonrası Sperm Sayısı (x10⁶mL)	28.7 ± 14.6	7.9 ± 8.5	12.1 ± 12.9	<0.05
Çözme Sonrası Total Motil Sperm Sayısı (x10⁶mL)	7.9 ± 3.6	1.8 ± 2.4	3.0 ± 3.6	<0.05

NOT: p değeri < 0.05 Ort ± Stand.Sap.

Çalışmamız kapsamında medicult ile dondurduğumuz normozoospermia sahip 5 hastanın yaş ortalaması 37.0 iken asthenozoospermia sahip 20 hastanın yaş ortalaması ise 36.1 dir. (Tablo 6)

Normozoospermia olgularında sperm sayıları göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede bazal sperm sayısı 107.4 x10⁶ iken asthenozoospermialarda bu değer 44.8 x10⁶ dir. Total motil sperm sayısı normozoospermialarda 238.4 x10⁶ asthenozoospermialar da ise 42.8 x10⁶ dir. Morfoloji normozoospermialarda %9.4 iken, asthenozoospermialarda %2.9 olarak bulunmuştur. Yıkama sonrası sperm sayısı normozoospermia 60.6 x10⁶ iken asthenozoospermia da ise 11.8 x10⁶ olarak bulunmuştur. Yıkama sonrası total motil sperm sayısı da normozoospermialarda 44.1 x10⁶ iken, asthenozoospermialarda 7.2 x10⁶ dir. Dondurma ve çözme sonrası sperm sayısı normozoospermia 29.2 x10⁶, asthenozoospermialarda ise 5.4 x10⁶ olarak gözlenmiştir. Dondurma ve çözme sonrası total motil sperm sayısı normozoospermia 7.3 x10⁶ iken , asthenozoospermialarda 1.2 x10⁶ bulunmuştur. (Tablo 6)

Çalışmadaki diğer solusyon olan Test yolk buffer ile dondurduğumuz normozoospermia sahip 5 hastanın yaş ortalaması 36.8, asthenozoospermia sahip 20 hastanın yaş ortalaması ise 34.2 dir. (Tablo 6)

Normozoospermia olgularında sperm sayıları göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede bazal sperm sayısı 111.6×10^6 iken asthenozoospermialarda bu değer 53.7×10^6 dir. Total motil sperm sayısı normozoospermialarda 182.0×10^6 asthenozoospermialar da ise 67.2×10^6 dir. Morfoloji normozoospermialarda %8.6 iken, asthenozoospermialarda %2.0 olarak bulunmuştur. Yıkama sonrası sperm sayısı normozoospermia 55.0×10^6 iken asthenozoospermia da ise 23.1×10^6 olarak bulunmuştur. Yıkama sonrası total motil sperm sayısı da normozoospermialarda 43.5×10^6 iken, asthenozoospermialarda 14.3×10^6 dir. Dondurma ve çözme sonrası sperm sayısı normozoospermia 28.2×10^6 , asthenozoospermialarda ise 10.5×10^6 olarak gözlenmiştir. Dondurma ve çözme sonrası total motil sperm sayısı normozoospermia 8.5×10^6 iken, asthenozoospermialarda 2.4×10^6 bulunmuştur. (Tablo 6)

İki dondurma solusyonu normozoospermia ve asthenozoospermia gruplarında karşılaştırıldığında, çözme sonrası sperm sayısı, çözme sonrası total motil sperm sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p < 0.05$) (Tablo 6)

Tablo 6 Solusyonlara Göre Motilite Ve Morfoloji Değerlendirmesi

	MEDICULT		TEST YOLK BUFFER	
	Normo (n=5)	Asteno (n=20)	Normo (n=5)	Asteno (n=20)
Yaş	37.0 ± 2.2	36.1 ± 7.1	36.8 ± 7.8	34.2 ± 5.9
Sperm Sayısı ($\times 10^6$ mL)	107.4 ± 52.5	44.8 ± 32.9	111.6 ± 76.5	53.7 ± 48.2
Total Motil Sayı ($\times 10^6$ mL)	238.4 ± 127.6	42.4 ± 29.3	182.0 ± 113.6	67.2 ± 65.8
Morfoloji (%)	9.4 ± 1.1	2.9 ± 1.6	8.6 ± 1.9	2.0 ± 1.3
Yıkama Sonrası Sperm Sayısı ($\times 10^6$ mL)	60.6 ± 27.5	11.8 ± 8.2	55.0 ± 22.7	23.1 ± 19.0
Yıkama Sonrası Total Motil Sperm Sayısı ($\times 10^6$ mL)	44.1 ± 19.0	7.2 ± 5.8	43.5 ± 23.2	14.3 ± 14.0
Çözme sonrası Sperm Sayısı ($\times 10^6$ mL)	29.2 ± 16.8	5.4 ± 4.2	28.2 ± 14.0	10.5 ± 10.8
Çözme sonrası Total Motil Sperm Sayısı ($\times 10^6$ mL)	7.3 ± 3.6	1.2 ± 1.0	8.5 ± 3.9	2.4 ± 3.2
NOT: p değeri 0.05	Ort ± Stand.Sap.			

4.2. MORFOLOJİK BULGULAR

Dondurma öncesi ışık mikroskopunda Kruger Strict morfoloji kriterlerine göre yapılan değerlendirmede sperm morfolojisi normal, baş, orta parça ve mixed olarak değerlendirilmiştir.

Bu bulgular doğrultusunda normozoospermia kriterlerine sahip olgularda normal morfoloji oranı %9 iken astenozoospermia kriterlerine sahip olgularda bu oran %2.5 bulunmuştur. Normozoospermialarda baş anomalisi %41.2 iken, asthenospermialarda bu oran %44.6 dır. Orta parça anomalisi %1.0 iken asthenospermialarda %0.8 dir. Kuyruk defekti normozoospermialarda %0.5 iken, asthenospermialarda %0.4 bulunmuştur. Normozoaların mixed anomalisi %48.3 iken, asthenospermialarda %51.8 dir. Toplamda normal sperm yüzdesi 3,8 olarak bulunmuştur. Morfolojik kriterler tablo7'te gösterilmiştir.

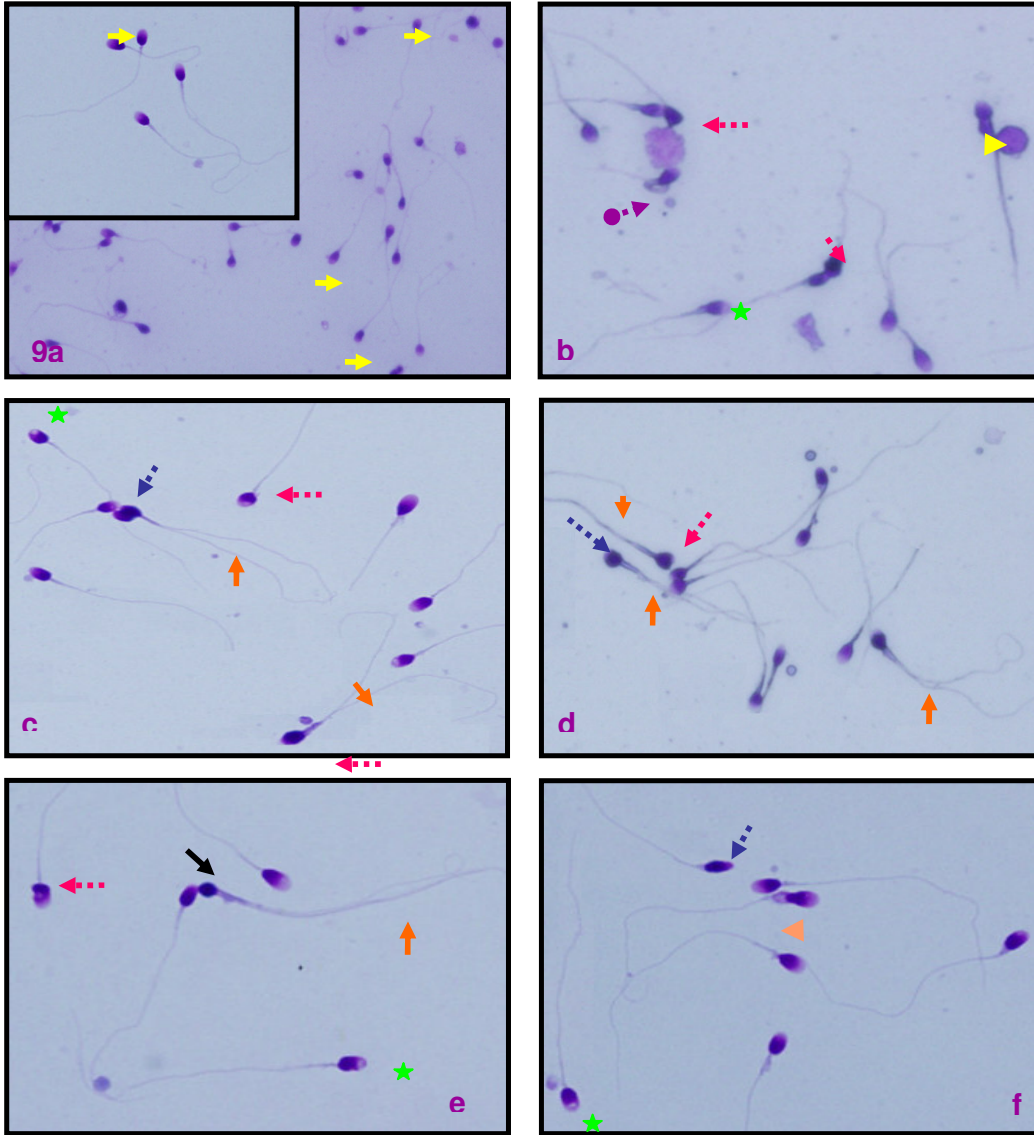
Tablo 7 Morfolojik Kriterlerin Değerlendirilmesi

Morfoloji	Normo (n=10)	Asteno (n=40)	Total (n=50)
Normal	9 ± 1,5	2,5 ± 1,5	3.8 ± 3
Baş	41.2 ± 8	44.6 ± 9.4	43.6 ± 9.2
Orta parça	1.0 ± 1.7	0.8 ± 2.7	0.8 ± 2.5
Kuyruk	0.5 ± 1	0.4 ± 1.1	0.4 ± 1.1
Mixed	48.3 ± 6.6	51.8 ± 9.5	51 ± 9

Not: p değeri < 0.05

4.2.1. IŞIK MİKROSKOBU DEĞERLENDİRMESİ

Dondurma öncesi Kruger Strict morfoloji kriterlerine göre ışık mikroskopunda yapılan değerlendirmede sperm morfolojisi normal, baş, orta parça, mixed olarak değerlendirilmiştir. (Şekil 9)



Resim 1 Işıık mikroskobik bulgular

1 (a) Normozoospermia hastanın morfolojik slaytı normal morfololideki sperm (→). (b) Astheonozoospermia hastanın morfolojik slaytı. Sitoplazmik artık (→), akrozomal kist (★), yoğun baş defekti (→),, kıvrık kuyruk defekti (→). (c) Astheonozoospermia hastanın morfolojik slaytı. Akrozom yokluğu (→),yuvarlak başlı globozoospermi (→), akrozomal kist (★),yoğun baş defekti (→), çift kuyruk (→). (d) Astheonozoospermia hastanın morfolojik slaytı. Akrozom yokluğu (→),çift kuyruk defekti (→),yoğun baş defekti (→). (e) Akrozom yokluğu (→),yuvarlak başlı globozoospermi -mikrosefalik (→), akrozomal kist (★),yoğun baş defekti (→), çift kuyruk (→). (f) Sitoplazmik artık (→), akrozomal kist (★),baş ve boyun bölgesinde sitoplazmik artık (→),. Akrozom yokluğu (→).

4.2.2. FLORESAN MIKROSKOBİK BULGULAR

Dondurma – çözme sonrası sperm hücreleri TUNEL tekniği ile fluoresan mikroskobunda değerlendirilmiştir.

Normozoospermia kriterlerinde 10 hastada dondurma öncesi TUNEL pozitif oranı %7,4 iken çözme sonrasında bu oran %9.1 olmuştur. Oranlar arasındaki bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). (tablo8)

Asthenozoospermia kriterlerinde 40 hastada dondurma öncesi TUNEL pozitif oranı %9.7 iken çözme sonrasında bu oran %9.7 olmuştur. İstatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). (tablo 8)

Tablo 8 DNA fragmantasyon sonuçlarının gruplara göre değerlendirilmesi

	Normo (n=10)	Asteno (n=40)	Total (n=50)	p Değeri
Dondurma öncesi TUNEL-Pozitif hücre (%)	7.4 ± 3.9	9.7 ± 4.8	9.2 ± 4.7	AD
Çözme sonrası TUNEL-Pozitif hücre (%)	9.1 ± 5.2	9.7 ± 7.2	9.6 ± 6.8	AD
NOT: p değeri <0.05 Ort ± Stand.Sap. AD=Anlamlı Değildir				

Yıkanmamış örnekler ile yıkanan ve Medicult solusyonu kullanılarak dondurulup çözünen örnekler arasında, dondurma öncesi TUNEL-Pozitif hücre oranı % 8.2 iken çözme sonrası bu oran %7.6 olmuştur. Oranlar arasındaki bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$)

Yıkanmamış örnekler ile yıkanan ve TEST yolk buffer solusyonu kullanılarak dondurulup çözünen örnekler arasında, dondurma öncesi TUNEL-Pozitif hücre oranı % 10,2 iken çözme sonrası bu oran %11,6 olmuştur. Bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) (tablo 9)

Yıkanmadan dondurulan örneklerde TUNEL pozitif hücre sayısı ortalaması arasında her iki solusyonda bir farklılık yoktur ama çözme sonrası TUNEL pozitif hücre sayısı ortalaması arasında yıkanıp dondurulup çözülen örneklerin apoptotik hücre sayısı arasında iki solüsyona göre anlamlı farklılık var ($p<0.05$) (Tablo 9)

Tablo 9 DNA fragmantasyon sonuçlarının dondurma solusyonlarına göre değerlendirilmesi

	MEDICULT		TEST YOLK BUFFER	
	N = 25	p değeri	N =25	p değeri
Dondurma öncesi TUNEL-Pozitif hücre (%)	8.2 ± 4.4	AD	10.2 ± 4.9	AD
Çözme sonrası TUNEL-Pozitif hücre (%)	7.6 ± 4.3	A	11.6 ± 8.3	A
NOT: p değeri <0.05 Ort ± Stand.Sap. AD= Anlamlı Değildir A=Anlamlıdır				

Medicult kullanılarak yapılan normozoospermia kriterlerinde 5 hastada dondurma öncesi TUNEL pozitif oranı %7,9 iken çözme sonrasında bu oran %6,6 olmuştur. Oranlar arasındaki bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Test Yolk Buffer kullanılarak yapılan normozoospermia kriterlerinde 5 hastada dondurma öncesi TUNEL pozitif oranı %6,9 iken çözme sonrasında bu oran %11.5 olmuştur. Oranlar arasındaki bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

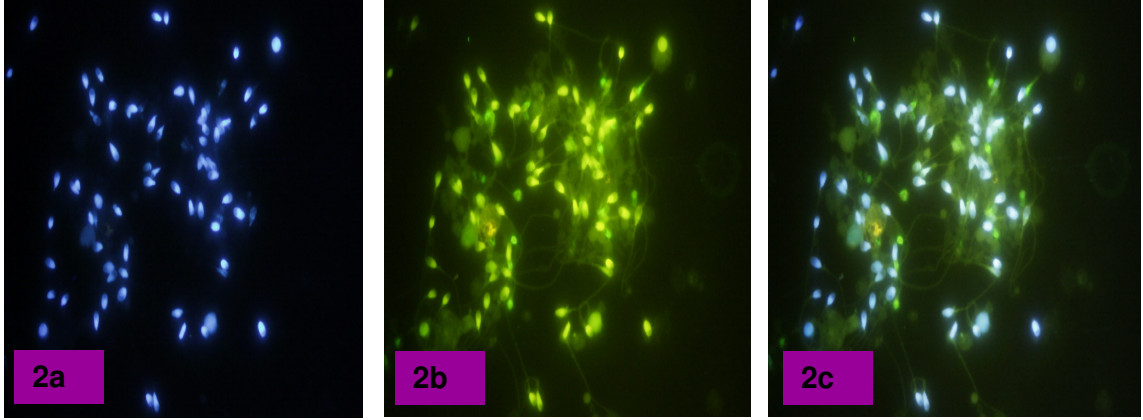
Medicult kullanılarak yapılan asthenozoospermia kriterine sahip 20 hastada dondurma öncesi TUNEL pozitif oranı % 8,3 iken çözme sonrasında bu oran %7,8 olmuştur. Oranlar arasındaki bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0,05$).

Test Yolk Buffer kullanılarak yapılan asthenozoospermi/ asthenoteratozospermia kriterine sahip 20 hastada dondurma öncesi TUNEL pozitif oranı %11.1 iken dondurma sonrasında bu oran %11.6 oldu.. Oranlar arasındaki bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0,05$). (Tablo 10)

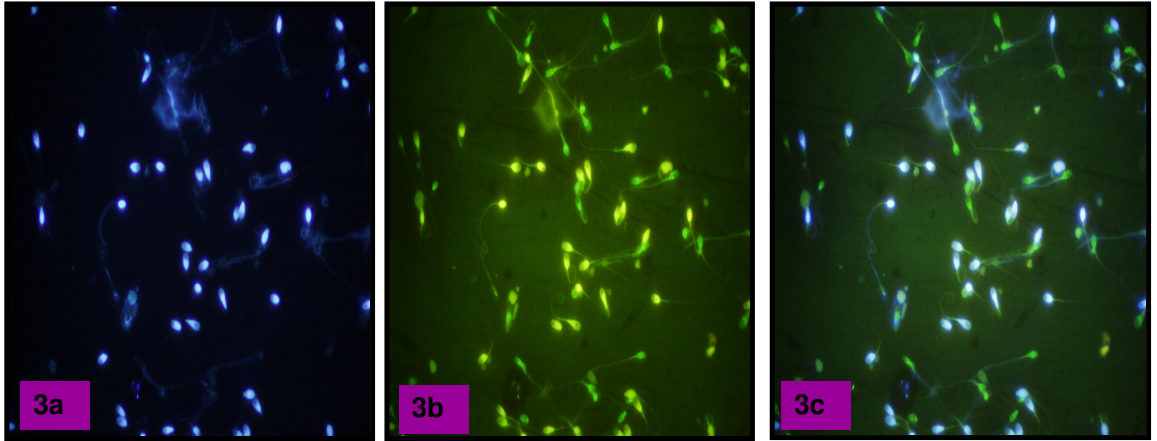
Tablo 10 DNA fragmantasyon sonuçlarının dondurma solusyonları gruplarına göre değerlendirilmesi

	MEDICULT			TEST YOLK BUFFER		
	Normo (n=5)	Asteno (n=20)	p değeri	Normo (n=5)	Asteno (n=20)	p değeri
Dondurma öncesi TUNEL-Pozitif hücre (%)	7.9 ± 4.5	8.3 ± 4.5	AD	6.9 ± 3.6	11.1 ± 4.9	AD
Çözme sonrası TUNEL-Pozitif hücre (%)	6.6 ± 3.4	7.8 ± 4.5	AD	11.5 ± 5.9	11.6 ± 8.9	AD
NOT: p değeri <0.05 Ort ± Stand.Sap. AD= Anlamlı Değildir						

Asthenospermialı TUNEL pozitif olan olgunun yıkama öncesi floresan mikroskopundaki değerlendirme sonucu %22,8 bulunmuştur (Res:2). Aynı olgunun yıkandıktan sonra dondurup çözme sonrası örneğinde ise TUNEL pozitif değeri %38,9dur. (Res:3)

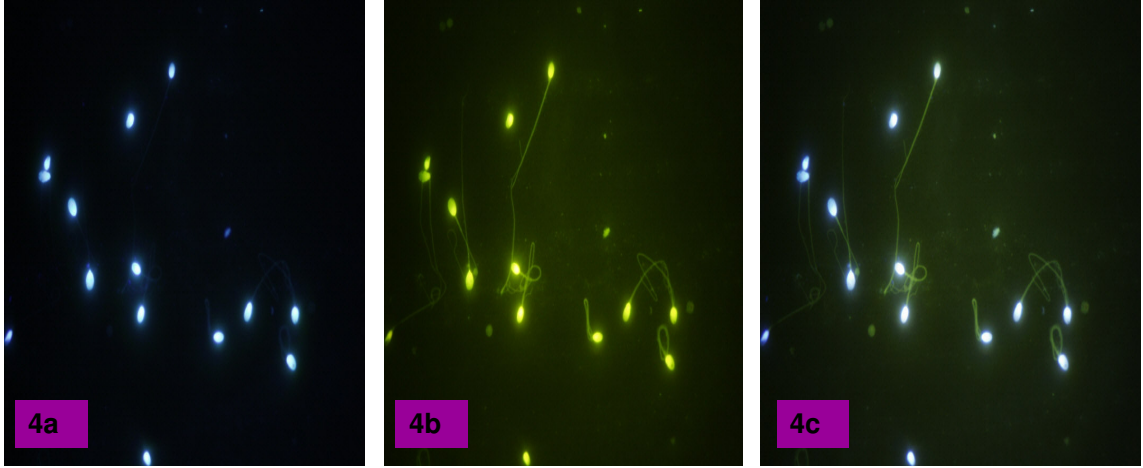


Resim 2 Dondurma öncesi TUNEL uygulanan asthenozoospermli hasta

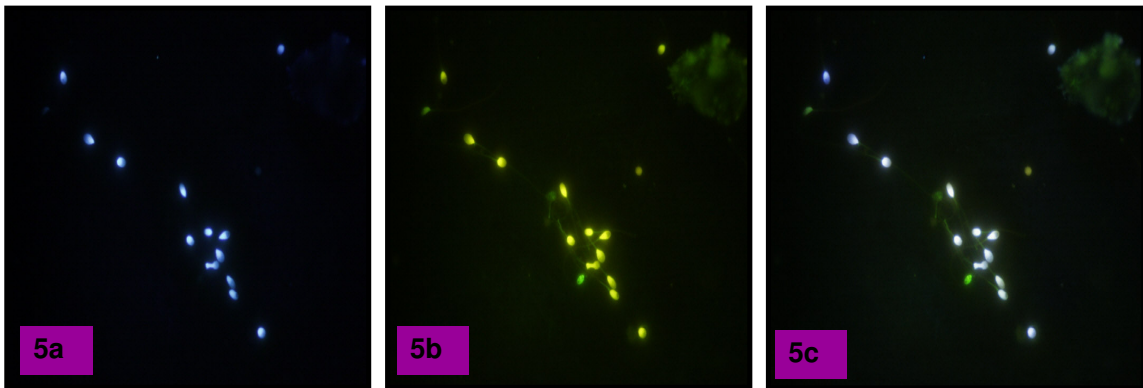


Resim 3 Çözme sonrası TUNEL aynı hasta

Asthenozoospermi olgunun floresan mikroskopundaki TUNEL bazal değerlendirme sonucu %5,8 bulunmuştur. Bu slayt resim 4de gösterilmiştir. aynı olgunun yıkanıp dondurup çözme sonrası spermelerinin tunel değerlendirme sonucu %8,2, bulunmuştur. Bu slayt resim 5 de gösterilmiştir

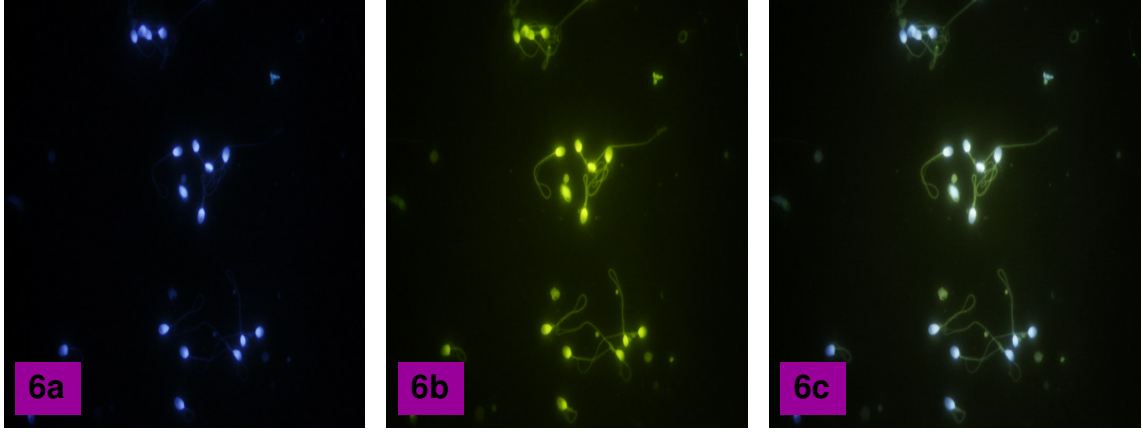


Resim 4 Dondurma öncesi TUNEL uygulanan asthenozoospermia hasta

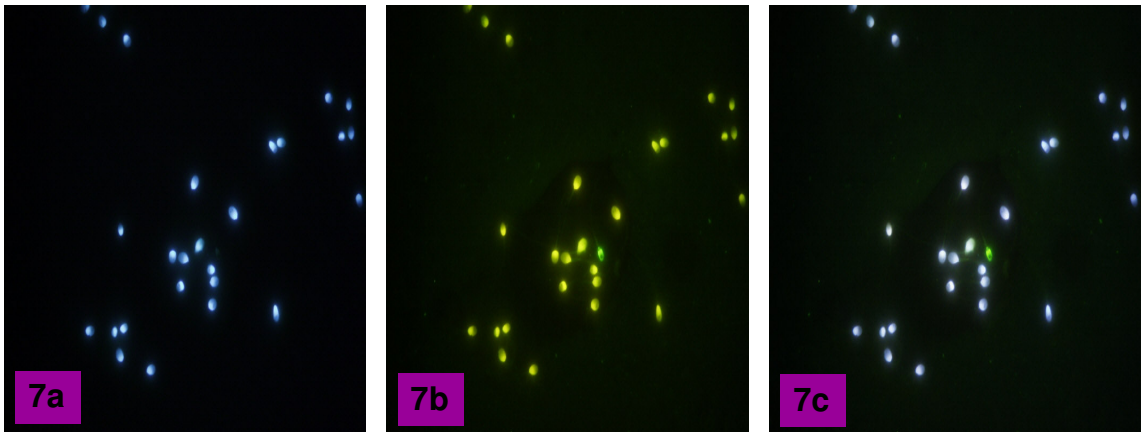


Resim 5 Çözme sonrası TUNEL uygulanan asthenozoospermia aynı hasta

Normozoospermlil olgunun floresan mikroskopundaki TUNEL bazal değerlendirme sonucu %3,8 bulunmuştur. Bu slayt resim 6 da gösterilmiştir. Aynı olgunun yıkanıp dondurup çözme sonrası spermelerinin TUNEL değerlendirme sonucu %4,3 bulunmuştur. Bu slayt resim 7 de gösterilmiştir.



Resim 6 Dondurma öncesi TUNEL uygulanan normozoospermia hasta

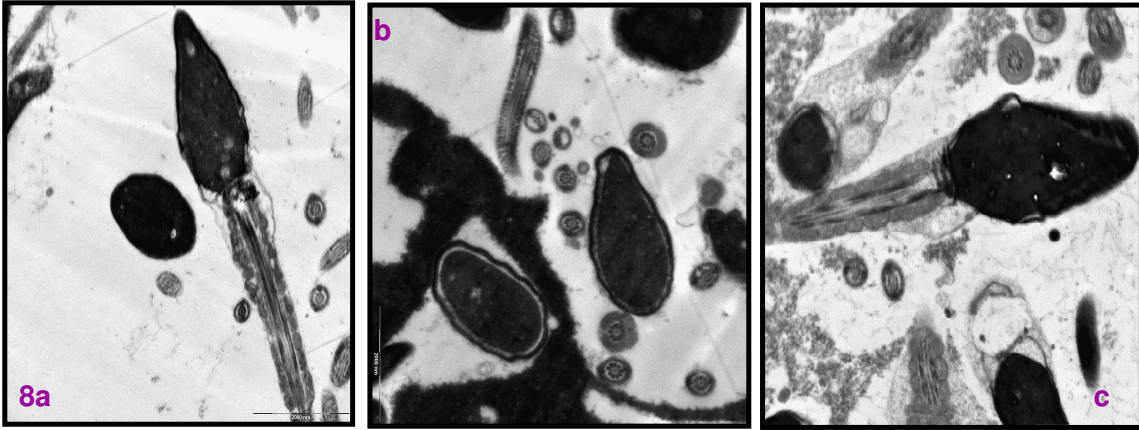


Resim 7 Çözme sonrası TUNEL uygulanan aynı hasta

4.2.3. ELEKTRON MIKROSKOBİK DEĞERLENDİRMELER

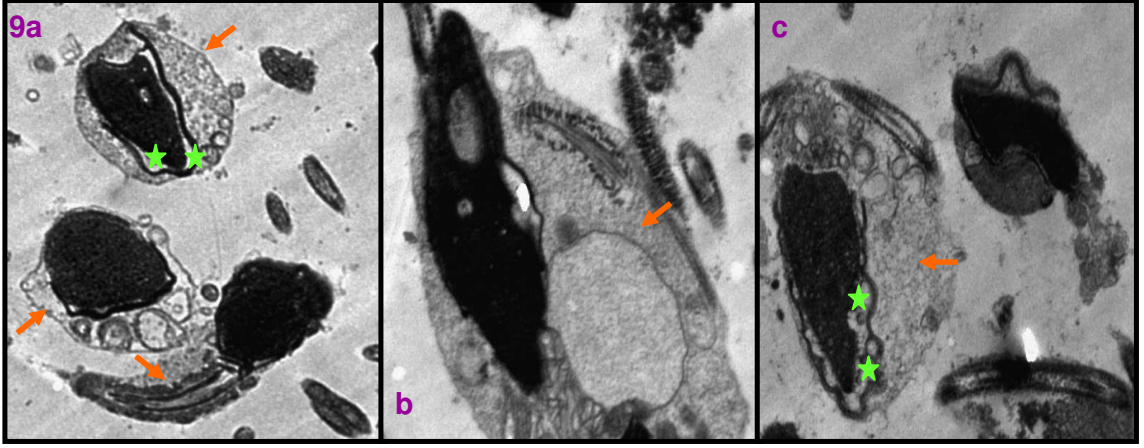
Spermier ultrastrüktürel olarak dondurma öncesi ve çözme sonrası baş boyun ve kuyruk bölgeleri olarak üç bölgede incelenmiştir.

Normal spermierin ultrastrüktürel incelemesinde baş görünümleri normal, çekirdek kromatini yoğun ve homojen, akrozom yapısı normal olarak gözlemlendi. Akrozom içeriği homojen bir dağılım gösterirken elektron yoğun bölgeler seçildi. Membran yapısının altında ise iç akrozom ve dış akrozom zarları düzenli olarak izlendi. Akrozom iç zarı, çekirdek zarına oldukça yakın ve sıkı bir ilişki içerisindeydi. Akrozom dış zarının ekvatorial bölgede dar bir alanda cep oluşturduktan sonra iç zarla devam ettiği görüldü. Spermierin membran yapılarının düzgün olduğu belirlendi (Resim 8a,b).



Resim 8 Normozospermi (a,b,c) baş bölgesinden enine kesit (b)

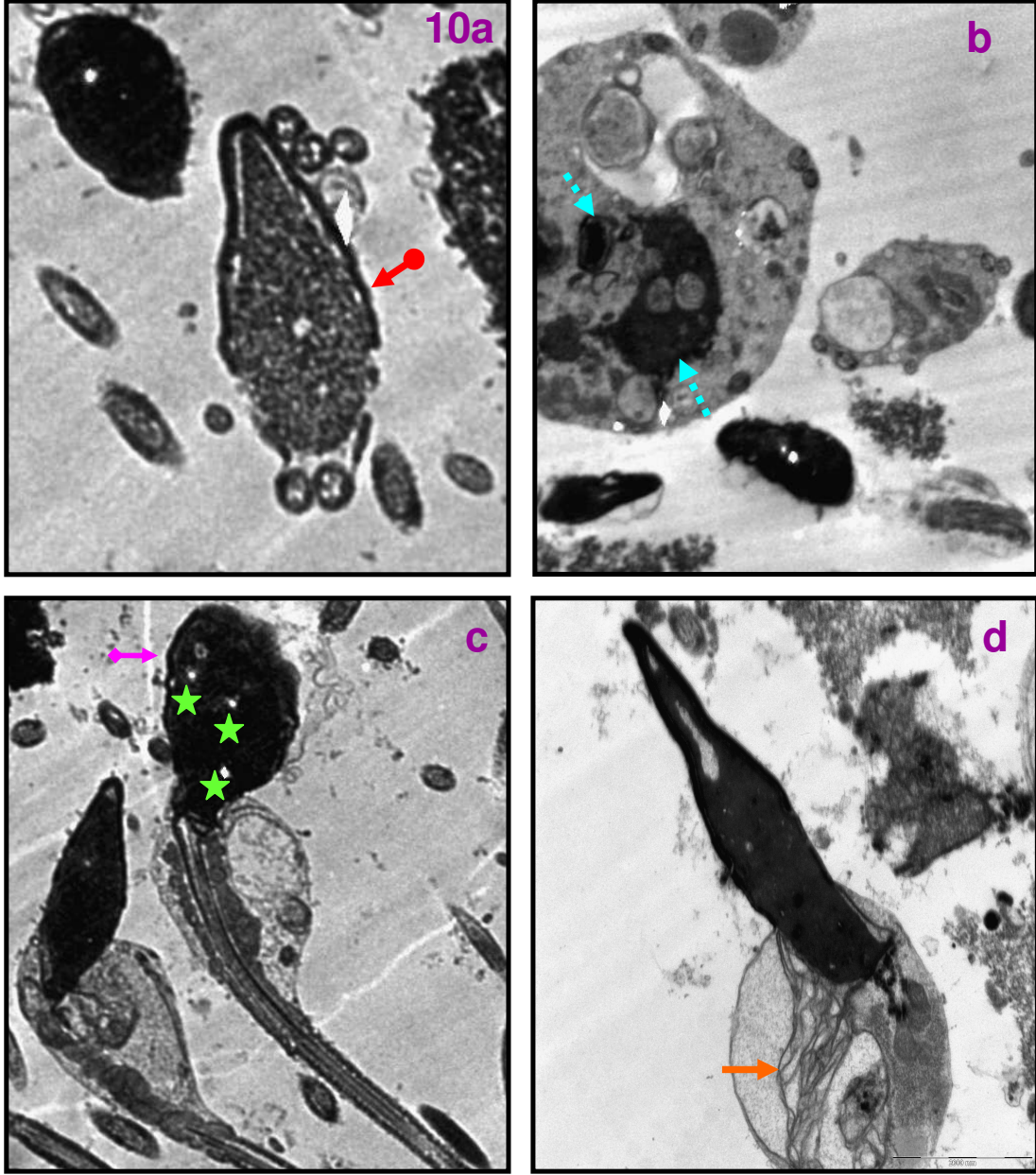
Yıkama sonrası örneklerde az sayıda normal görünümlü hücrelerin yanında spermierin büyük bölümü baş bölgesinde sitoplazmik artıklar içeriyordu (Resim 9 a,b,c). Bu tip hücrelerin bir grubunda ise akrozomun çekirdekten uzaklaştığı subakrozomal bölgede sitoplazmik içeriğin arttığı dikkati çekmekteydi (Resim 9a , c).








Resim 9 Elektron mikroskopik bulgular

9(a,b,c) Yıkama sonrası grup, (a,b,c) baş ve boyun bölgesinde sitoplazmik artık (→), (a ve c) akrozom çekilmesi (★)

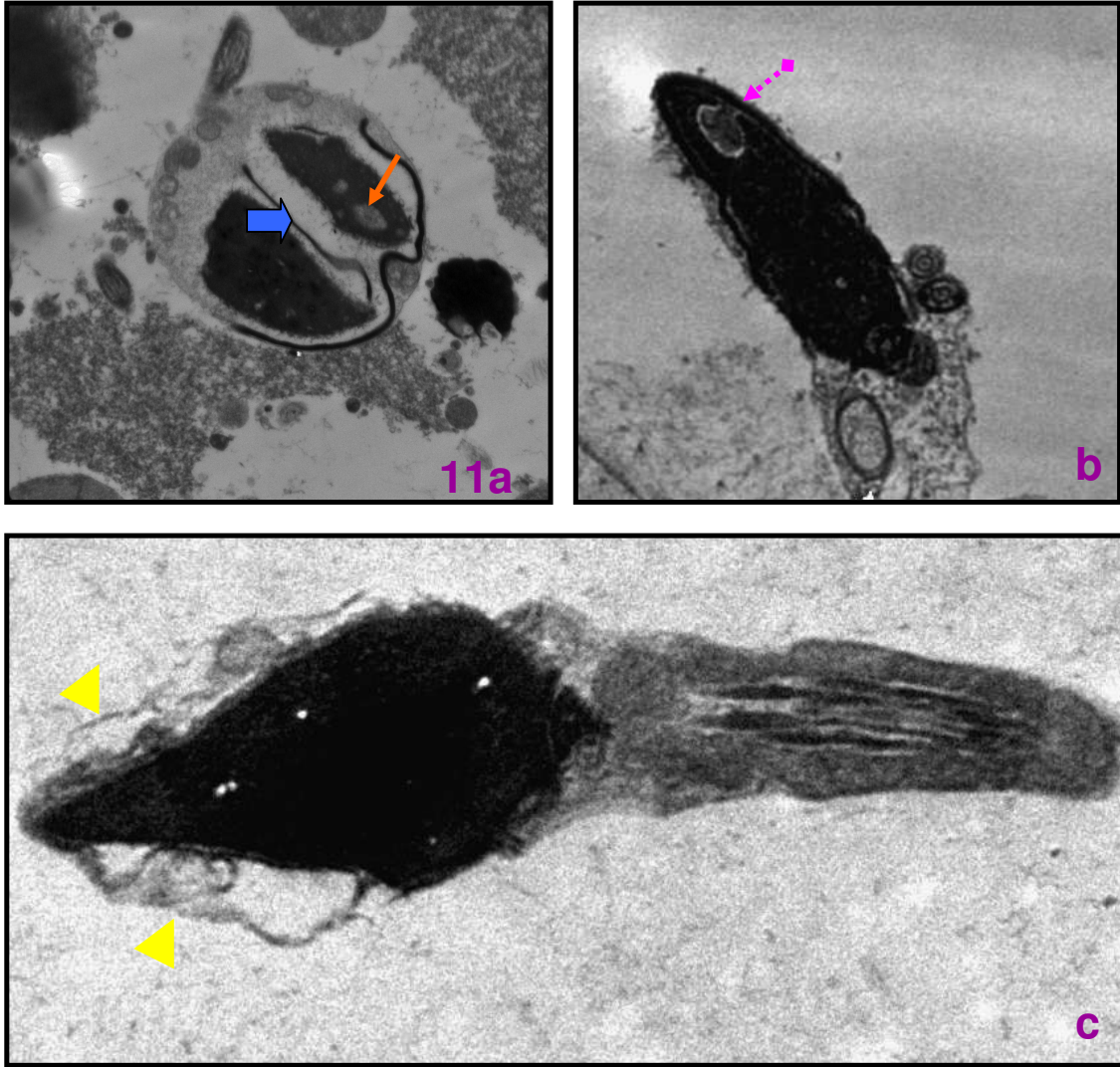
Yine bu grupta çok sayıda erken apoptotik çekirdekli sperm heterojenik kromatin dağılımı ile belirgin olarak gözlenirken (Res: 10a), bazı spermelerde geç apoptotik bulgu belirtisi olan nükleer fragmentasyon saptandı (Res: 10b). Çok sayıda akrozom içermeyen makrosefalik globozoospermilerin bir bölümü çekirdekte vakuoller içeriyordu (Res: 10c).Yine bu grupta bazı hücrelerin baş bölgelerinin tamamen normal olmasına karşın boyun bölgelerinde sitoplazmik artıklar içerdikleri ve buralarda dev membransel vakuollerin varlığı gözlemlendi (Res: 10d).



Resim 10 Elektron mikroskopik bulgular

10 (a) erken apoptotik çekirdek (), (b) geç apoptotik hücrede nükleer fragmentasyon (), (c) akrozom içermeyen globozoosperm (), nükleer vakuoller (),(d) boyun bölgesinde membransel dev vakuoller ()

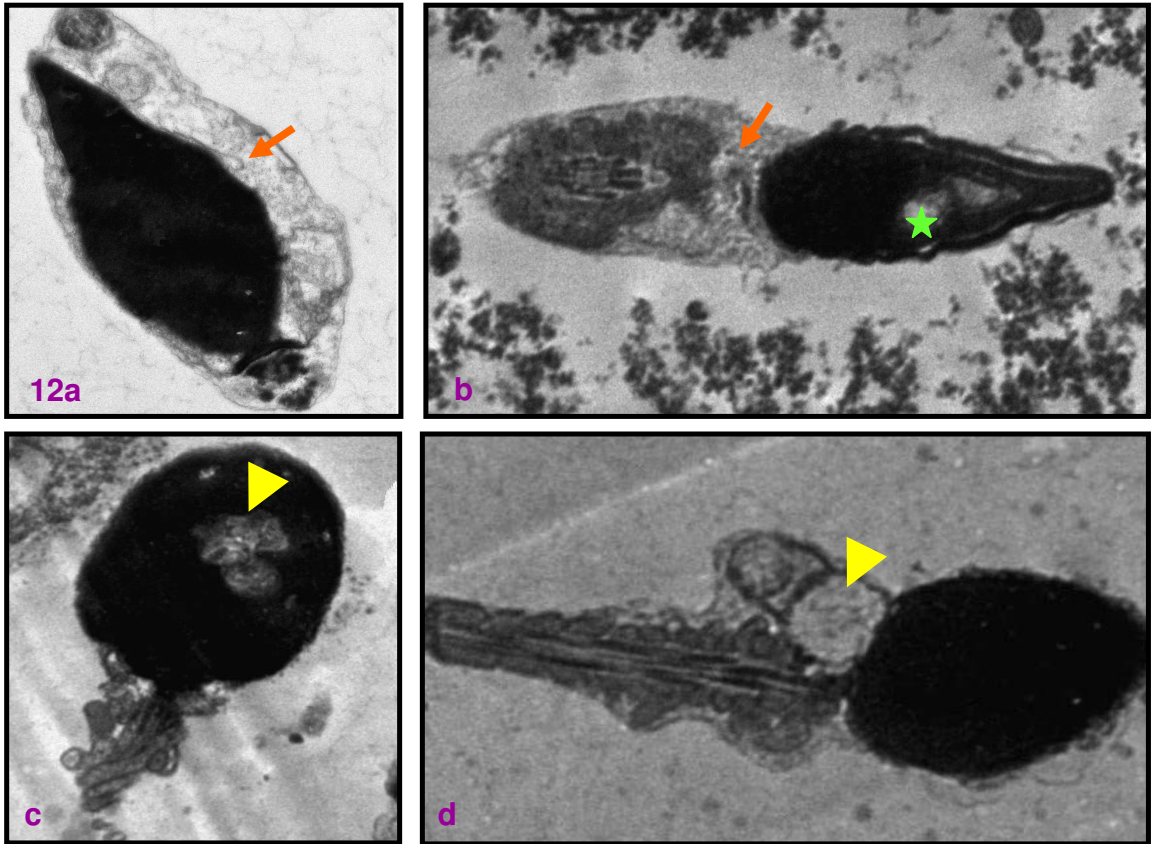
Ayrıca bu grupta Bizzare spermilere sık rastlandı ortak akrozoma sahip bu çekirdekler vakuoller içermekteydi (Res: 11a). Bazı hücrelerde ise akrozom iç zarının çekirdek içerisine invaginasyonu (akrozomal kist) belirgin olarak dikkati çakti ve görüntüledi (Res: 11b).Yine bu grupta birçok hücrede sperm zarında düzensizlik gözlemlendi (Res: 11c). Bu gruptaki hücrelerin kuyruk ultrastrüktüründe herhangi bir anomaliye rastlanmadı.



Resim 11 Elektron mikroskobik bulgular

11 (a) Bizzare spermde nükleer vakuoller (→), ortak akrozom (→), (b) akrozomal kist (→), (c) hücre zarında düzensizlik (→).

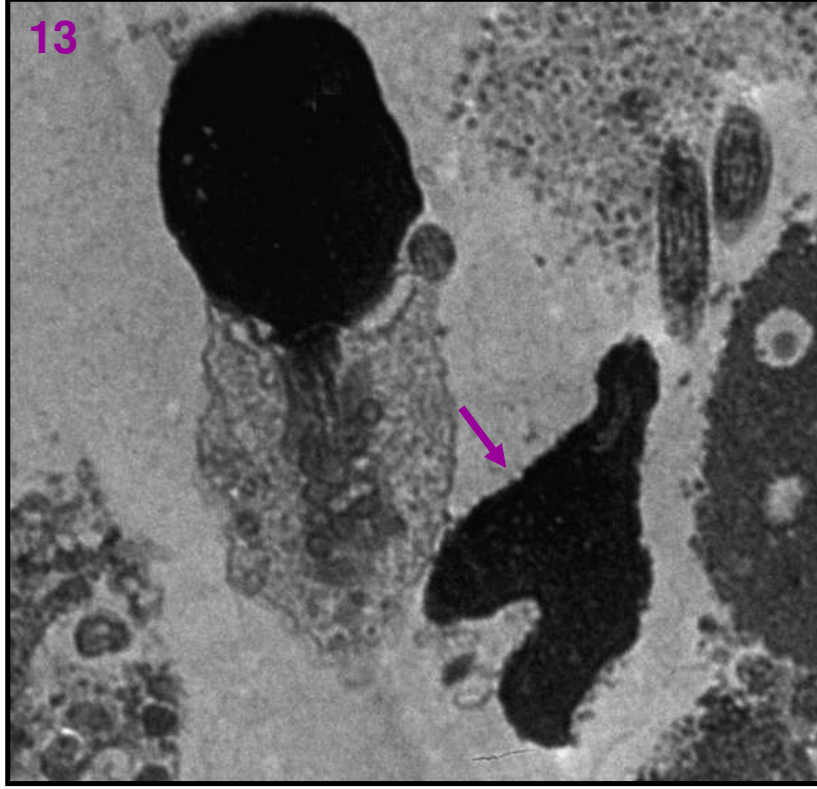
Çözme sonrası grupta hücreler baş ve boyun bölgelerinde yine sitoplazmik artık içeriyordu (Res: 12 a,b). Bu hücrelerinde çekirdeklerinde vakuoller gözlendi (Res: 12b). Ancak bu grupta akrozom içermeyen makrosefalik globozoospermiler çok sayıda idi çekirdeklerinde membransel vakuoller, sitoplazmik artıklarında ise dev granüler vakuoller içermekteydiler (Res. 12c,d).



Resim 12 Elektron mikroskopik bulgular

12 (a,b) baş ve boyun bölgesinde sitoplazmik artık (→), nükleer vakuoller (★),(c) globozoospermde nükleusta membransel vakuoller (▲)

Çözme sonrası uygulama yapılan bu grupta en önemlisi amorf başlı spermere çok sık rastlanmasıydı (Res: 13). Bu gruptaki spermelerinde kuyruk ultrastrüktüründe herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır.



Resim 13 Elektron mikroskobik bulgular

Amorf başlı sperm (→)

Tablo 11 Sperm Histopatolojik bulgular

Sperm Histopatolojik bulgular	Dondurma Öncesi	Çözme sonrası
Akrozomal membran kaybı	+	+
Asimetrik akrozomal genişleme	-	-
Akrozomal reaksiyonun erken evresinde vezikülasyon	-	-
Dış akrozomal membranda vezikülasyon ve akrozomal içerik kaybı	+	+
Akrozom çevresinde anormal granüler sitoplazmik materyal	+	+
Akrozomun nukleustan uzaklaşması	+	+
Akrozomal kist (nukleus içerisine akrozom invaginasyonu) bu durumda dış akrozomal membran etkilenmez ancak iç membran defektlidir.	+	-
Anormal veziküle akrozom	-	-
Akrozom yokluğu (globozoospermia)	+	+
Wrinkling membran beraberinde akrozomal içerik kaybı	+	+
Nukleusun orta parçasının son bölümüne kadar spiral olarak uzaması	-	-
Hypercondence nukleus, çok miktarda dens sitoplazmik materyalle çevrili olarak	-	-
Mitokondriyal swollen ve empty	-	-
Mikrosefalik sperm çok miktarda sitoplazmik materyal ile çevrili olarak	+	+
Dev nükleer vakuoller (bu vakuoller bazen membranöz materyal içerir bazende granüler) bunlarda genellikle akrozom gözlenmez	+	+
Bizarre sperm (central bölgede ortak akrozom ile)	-	+

5. TARTIŞMA

Memeli sperm hücrelerinin döllenme kapasitesini sürdürmesi için yapılan çalışmalar yaklaşık 135 yıl öncesine dayanmaktadır. 1866'da, -15 ° C'ye kadar dondurulmuş olan insan sperm hücrelerinin hayatta kaldığını gözlemiş olan, İtalyan doktor P. Mantegazza, sperm örneklerinin depolanması için bir insan sperm bankası kavramı ortaya atmıştır (197). Daha sonraları Hammond ve Walton'ın çalışmaları sperm dondurma işleminin yasallaşmasını sağlamıştır (198,199).

Sperm, rutin olarak kriyoprezervasyon uygulanan ilk memeli hücresidir. Kriyoprezervasyon uygulanan spermin tedaviyle ilgili ilk kullanımı ise 1953 yılında gerçekleşmiştir (200). IVF'teki yeni gelişmeler, sperm kriyoprezervasyonu için yeni metotlar geliştirmeyi zorunlu kılmıştır. Shettles seyreltilmemiş spermin ince duvarlı kapillerle doğrudan serinletilen alkole daldırdıktan sonra kuru buzla -79 ° C veya sıvı nitrojenle -196 ° C veya sıvı helyumla -269 °C' ye dondurulduğunda, insan korunduğunu rapor etmiştir ve motilitenin, çözülmeden sonra birkaç saat boyunca devam ettiğini bildirmiştir (201).

Bazı araştırmacılar ise insan sperminin dondurma ve çözmeden sonra yaşama kabiliyetinin nispeten düşük olduğunu belirtmektedirler, tipik olarak çözünmeden sonra motilite oranı %50-60'a düşmektedir. (170)

İnsan sperm kriyoprezervasyonunda, spermin döllenme kapasitesini sürdürebilmesi için uygulanacak metotlar ve bu metotlarda baz alınacak parametreler ve değerleri konusunda cevap bulmak amacıyla, birçok çalışma yapılmıştır:

- Hücre canlılığının devamı için soğutma ve ısıtma hızı ne olmalıdır?
- Optimum dondurma metodu ne olmalıdır?
- Kriyoprotektan tipi
- Kriyoprotektan eklenme ve çıkarılma metodu ne olmalıdır?
- Çözme sonrasında sperm hücresinde meydana gelen apoptoz ?
- Spermdeki apoptoz hangi yöntemlerle araştırılmalıdır?

Biz de çalışmamızda bu soruların cevaplarının bir kısmını bulabilmeyi ve uygulanabilecek metod farklılıklarını ortaya koymayı amaçladık.

Kriyoprezervasyon prosesi sırasında dondurma ya da çözmenin ozmotik etkileri, spermin hücre zarına zarar vererek ve spermin motilitesini azaltarak spermin dölleme kapasitesini ciddi oranda dölşürür (171,172). Bu, spermin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü ile beraber akrozomun da zarar görmesine sebep olur ve kıvrık kuyruk gibi morfolojik değişimler yaratır (173,174). Sperm, dondurma çözme işleminde kriyoprotektanların eklenme ve çıkarılması sırasında; öldürücü hücre içi buz kristallerinin oluşması ve çözülmesi, hücre dehidratasyonu, ozmotik zarar ve hücre zarı permabilitesinin değişmesi gibi çok büyük fiziksel ve kimyasal etkilere maruz kalır (134,176). Ne yazık ki, sperm kromatin yenilenmesini optimize etmek amacıyla semeni dondurma ve çözme metotları kesinleşmemiştir, spermin kriyoprezervasyonu için standart bir metod bulunmamaktadır (177,178).

Dondurmanın amacı, hücre içi buz oluşumundan veya hipertonic solüsyondan kaynaklanan hücre ölümlerini minimuma indirmektir. Bu nedenle hücre canlılığının devamı için soğutma ve ısıtma hızları çok önemlidir. Kriyobiyolojide dondurma işlemindeki soğutma hızı istenenden çok hızlı olursa hücre içindeki su dışarı çıkamaz ve intrasellüler buzlanma sonucu hücre ölür. Eğer dondurma hızı çok yavaş olursa bu da zararsız hücre dışı buzlanmanın olmasını ve ortam ozmolaritesinin artmasına neden olarak hücrenin dehidrate olmasını sağlar. Dehidratasyon sonucunda hücre hasarı meydana gelir veya hücre ölür (179).

Hızlı soğutmada enerji kaybının çok olması azalan enerji ile hücre suyunun yeteri kadar dışarı atılamaması sonucu hücre içinde çok fazla su kalır. Bu da hücre içi buzlanmaya ve hücre ölümüne neden olur. Bu nedenle optimal bir soğutma hızı kullanılmalı ve hücrenin fiziki ve kimyasal özellikleri iyi bilinmelidir.

Dölşük soğutma hızıyla buz oluşmaması sonucu uzun süre yüksek ozmolarite ile karşı karşıya kalan hücre, membran lipoproteinlerinde oluşan denatürasyon nedeniyle, parçalanır. İlk kez 1977 yılında Merymann ve ark. "Minimum hücre teorii" adını verdikleri, her hücrenin maksimum sıvı kaybetme kapasitesi olduğunu ve bu eşik değer aşıldığında hücrenin canlılığını kaybedeceğini açıkladılar(180).

Dondurma işlemi spermere damla damla kriyoprotektan eklenerek - 5°C ile - 15°C arasında uygulanır. Daha sonra ise sırasıyla şu olaylar gerçekleşir: Öncelikle hücrenin içinde bulunduğu ortamdaki su donar. Hücre dışında buz kristalleri oluşarak sitoplazmayı soğutur. Eklenen kriyoprotektan madde sebebiyle hücre dışında ozmolarite daha yüksektir, hücreden dış ortama su geçişi başlar ve hücre büzülür. Bu sırada sitoplazmanın kimyasal potansiyeli hücre dışından fazladır. Hücrenin dışına çıkan su donar. Böylece, hücre içinde buz kristalleri oluşmadan önce suyun büyük bölümü dışarı çıkmış ve hücre harabiyetine neden olabilecek intrasellüler kristal oluşumu en aza indirilmiştir olur (153,181,182,183,184).

Hücrelerin dondurulmasında her hücreye özgü dondurma protokolleri oluşturulmuştur. Hücre volümü ve yüzey alanı, hücre içi su volümü, hücrenin ozmotik toleransı ve limitleri, hipertonic ve hipotonik solüsyonlara yanıtı, hücre membran permeabilitesi, kullanılacak kriyoprotektan solüsyonun seçimi, hücre enerji metabolizması, hücre içi buz kristallerinin oluştuğu sıcaklık bu protokollerin belirlenmesinde önemlidir. Bu kriterler çeşitli hücrelerde farklılık göstermektedir. Örneğin, insan spermi -10 C/dakika hızla fare embriyoları -0.3 C/dakika hızla en yüksek canlılık elde edilmektedir (185).

Günümüzde gamet hücrelerinin saklanması, 5°C' de sıvı saklama ve dondurma olmak üzere başlıca iki yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde spermin yaşamsal fonksiyonlarını, saklama ısısını, soğutma hızını ve kullanılan kriyoprotektif maddeler belirler. Sıvı saklama yönteminde, spermi sulandırdıktan sonra 5°C gibi düşük ıslarda sperm yaşamsal aktivitesini ancak 2-3 gün koruyabilmektedir (186,187,188).

Dondurma yöntemi ise, spermin daha düşük ıslarda saklanması temeline dayanır. Hücreyi soğuk şokunun etkilerinden koruyan kriyoprotektif maddelerle sulandırılan sperm, ampul (etil alkol banyosunda), pellet (-79°C kuru buzda) veya payet (-110°C sıvı azot buharında) yöntemiyle dondurularak - 196° C' ta saklanır(189,190). Dondurma yönteminde ise iki farklı teknik uygulanmaktadır. Bunlardan manuel yöntemde sperm örnekleri örnek verildikten sonraki 1-2 saat içinde dondurulmalıdır. Spermeler sıvı nitrojen buharında 30 dakika yaklaşık olarak 8-10 cm uzaklıkta bekletilir. Böylece aşamalı olarak straw yada vialin ısısı; 30 sn sonra

-65 °C,60 sn sonra -115 °C , 90 sn sonra -130 °C, 120 sn sonra -135 °C, 150 sn sonra -140 °C, 4dk sonra ise -152 °C ulaşır. 30 dakikanın sonunda örnekler sıvı nitrojen içerisine alınır. Programlanabilir dondurma aleti kullanılarak yapılan yöntemde ise, kullanılan kriyoprotektan nedeniyle farklı protokoller uygulanabilir. Dezavantaj detaylı bir yöntem olması ve manuel yönetime göre daha uzun zaman almasıdır(127). Bu çalışmada manuel yöntemi kullanılmıştır.

Permeabl kriyoprotektanlar(gliserol, 1-2 propanediol, DMSO, ProH) intrasellüler buz kristalleri oluşumunu - 40°C'a kadar düşürürler. Ayrıca hücreyi solüsyonun toksik etkilerinden korurlar. Non permeabl ajanlar (Sükroz, glukoz) ise ozmotik basınç değişikliklerine karşı hücre zarını korurlar. Çözme sırasında da hücrenin aşırı derecede şişmesini önlerler. Sperm dondurma işleminde permeabl kriyoprotektan olarak % 5-15'lik gliserol, non permeabl ajanlar olarak ise sükroz tercih edilmektedir(24). Sükroz büyük bir molekül olduğu için ve yayılma gösteremez. Bu sebeple de soğutma işlemi sırasında ozmotik olarak dehidratasyonu başlattığı için, çözme işlemi esnasında da hücrenin ölümünü önler, konsantrasyon farkı ile intrasellüler kriyoprotektanın hücre içinden uzaklaşmasını sağlar (192,193,194).

Bizim çalışmamızda iki farklı kriyoprotektan kullanılmıştır. Bunların ticari isimleri Test Yolk Buffer (%12 gliserol, %20 yumurta akı, 1.000 ünite Penisilin-G, 1.000 µg/mLStreptomisin Sülfat) ve Medicult Sperm Freezing Medium (Modifiye Tyrodes solüsyo-nu, sükroz, glukoz ve sodyum laktat içeren HEPES buffer, gliserol Human Serum Albumin, Penisilin (50.000 IU/l) ve Streptomisin (50mg/l)) dur. Farklı kriyoprotektanların karşılaştırılması ile ilgili literatürde çalışmalar bulunmaktadır.

2004 yılında Nallella ve ark. yaptıkları çalışmada iki farklı kriyoprezervasyon ve üç farklı kriyoprotekanı karşılaştırmışlardır. Kriyoprezervasyon yöntem karşılaştırılma-sında kendilerin geliştirdiği metotla ki; örnek dört parçaya bölünüp TEST yolk buffer eklenip rototarda 5 dakika bekletildikten sonra viallere alınıp -20 °C 5 dakika sonrasında -96 °Cde 2 saat sıvı azot buharında bekletip, daha sonra - 196 °C, sıvı azota almışlar.24 saat sonra da çözmüşler. Diğer yöntem ise bizim çalışmamızda uyguladığımız yöntemdir. Sonuç olarak sperm motilite ve hayatta sağ kalım oranları iki farklı yöntem arasında bizim de uyguladığımız yöntem de daha üstün bulunmuş. Fakat araştırmacılar sperm morfolojisi bakımından iki metot arasında

anlamalı bir fark bulamamışlardır. Üç farklı kriyoprotektan arasında yine bizimde çalışmamızda kullandığımız TEST yolk buffer ve Medicult sperm freezing medium ve Enhance sperm freezing mediumu karşılaştırılmış. TEST yolk buffer mediumun sperm motilitesi diğer kriyoprotektanlardan daha iyi bulunmuştur. (191)

2006 yılında Verza Junior ve ark. yaptıkları çalışmada yine üç farklı kriyoprotekanı 23 infertil sperm örneğinde çalışmışlar ve MEDİCULT kriyoprotektanının hayatta sağ kalım oranı diğer iki kriyoprotekandan yüksek bulmuşlardır(196)

2001 yılında ise Hammedeh ve ark. dondurma öncesi ve sonrası iki farklı kriyoprotektan kullanarak fertil ve infertil erkeklerin sperm morfolojik yapısı ve kromatinlerini incelemişler. Bu çalışmada TEST yolk buffer ile human sperm preservation medium (HSPM) karşılaştırılmış ve TEST yolk bufferin kromatin ve sperm morfolojisinde daha az hasara sebep olduğunu bildirmişlerdir (175)

2000 yılında Hallak ve arkadaşları ise kullanılan kriyoprotektan maddenin iki farklı formu ile sperm motilite ,morfoloji ve sperm membran yapısını karşılaştırmışlardır. Bu kriyoprotektan maddenin (gliserollü ve gliserolsuz TEST yolk Buffer) iki farklı formu karşılaştırıldığında sperm motilite, vitalite ve normal sperm yüzdesi sadece gliserol içeren kriyoprotekanda daha yüksek olarak bulunmuştur (201)

Bizim çalışmamızda ise Medicult ile TEST yolk buffer arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Kriyoprezervasyon yönteminin seçimi, kullanılacak spermin yıkanarak yada direkt şekilde dondurulması olarakta farklılıklar içermektedir. Bazı çalışmalarda semen örnekleri sperm yıkama prosedürlerinden biri uygulanıp sonra dondurulurken bazı çalışmalarda ise direkt dondurma yapılabilmektedir. Seminal plazmanın dondurma-çözme sırasında koruyucu olduğu belirten çalışmalar (202,203) bunun tersini savunan; *swim-up* ya da Percoll gradient yöntemiyle seminal plazmadan ayrılan spermatozoonların daha iyi sağ kalım gösterdiklerini vurgulayan (150, 204,205) ve iki yöntem arasında farklılık olmadığını savunan yayınlar da mevcuttur. (206).

Bazı çalışmalarda infertil erkeklerin spermlerindeki DNA hasarı oranı, fertil erkeklerin spermlerindeki DNA hasarından daha yüksek bulunmuştur(207,208). Barroso ve ark 2000 yılındaki bir çalışmasında yüksek sperm motiliteli örnekler ile düşük sperm motiliteli örnekler karşılaştırıldığında DNA fragmentasyonlu spermlerin oranının düşük sperm motiliteli örneklerde daha yüksek olduğu belirtilmiştir. (209)

Sıddığı ve ark. 2004 yılındaki yayınlarında fragmente DNA ya sahip sperm ve apoptotik ve nekrotik sperm içeren vakalarda başarısız dölleme veya düşük oranını daha sık olarak bildirilmektedir(210). Fakat, bazı araştırmacılar DNA fragmentasyonunun fertilizasyon ve sperm hızını negatif etkilemesine rağmen gebelik üzerine etkisi olmadığını iddia etmektedirler(211).

Spermatogenez sırasında germ hücrelerinin %75'i olgunlaşmadan apoptoz ile ortadan kaldırılmaktadır (223). Apoptozun kontrolünde ise Sertoli hücreleri büyük oranda sorumludur (222). Apoptoz üzerine yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya çıkmasının nedeni apoptoz belirlenmesinde kullanılan yöntem çeşitliliğinin fazla olmasıdır. Kullanımda olan beş ana yöntem bulunmakla beraber TUNEL dışında hepsinin bazı dezavantajları ve eksiklikleri bulunmaktadır (226,227,228).

TUNEL yönteminde ise preapoptotik hücrelerin dahi boyanması yöntemin sensitivitesini daha da arttırmaktadır. Bu yüzden TUNEL apoptozis değerlendirilmesinde standart yöntemdir(229)

Moustafa ve ark yaptıkları çalışmada düşük sperm konsantrasyonu ve kötü sperm morfolojisi olan semen örneklerinde TUNEL pozitifliğin daha yüksek düzeyde olduğunu belirtmişlerdir. Shen et al. Buna rağmen DNA hasarı olan spermlerin tamamı apoptotik sürece girmemektedir, Aynı şekilde Sakkas ve ark (2002) DNA hasarını, doğrudan sperm hücrelerinde meydana gelen bir apoptotik süreçle ilişkilendirmemişlerdir (212,213,214).

Ancak, TUNEL yöntemi kullanılarak ejakulatta %15 ve üstü DNA fragmentasyonu gözlenen hastalardan ayrıca testis biyopsisi alınarak kullanılan örneklerde DNA fragmentasyonunun daha az oranda olduğu saptanmıştır.Bu gibi hastalarda ICSI yöntemiyle başarı oranı daha yüksek bulunmuştur(215).

Bu nedenlerle McVicar ve ark. 2004 'de DNA fragmantasyonunun sperm kalitesi için kullanılabilir bir indikatör olarak kabul edilmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Bu yönde yapılan çalışmalar TUNEL ile yapılan ölçümlerle sperm DNA fragmantasyonunun erkek fertilitesinde yüksek oranda önemli olduğunu göstermiştir (208).

İlerleyen çalışmalar DNA fragmantasyonunun aza indirgenmesi ile ilgilenmiştir. İnsan sperminde swim-up ile yıkama öncesi ve sonrasında DNA fragmantasyon durumu karşılaştırıldığında swim up sonrası hazırlanan örneklerde yıkama öncesine göre nekrotik, apoptotik ve sitoplazmik artık bulunan spermelerin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Ancak immatür, akrozomu bozuk spermelerin swim up sonrasında da hala var oldukları gözlenmiştir(216).

2006 yılında *de Paula* ve ark. yaptıkları çalışmada oligozoospermli hastalara TEST yolk buffer solusyonu kullanılarak uyguladıkları standart dondurma prosedüründen sonra TUNEL testi ile dondurma öncesi ve sonrasında apoptotik hücreleri değerlendirmişler ve kriyoprezervasyon sonrasında Oligozoospermli erkeklerde kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası apoptotik sperm nükleer DNA fragmantasyon oranı daha yüksektir. Kriyoprezervasyon normozoosperm ve oligozoospermik erkeklerde apoptotik DNA fragmantasyonunu yükseltici bir etki yapar. (217).

Ancak bizim çalışmamızda yıkama sonrası örneklerle göre dondurulan ve sonrasında çözülerek yıkanan normozoospermi ve asthenospermi örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Yıkanmış örnekler iki farklı kriyoprotektan (TEST yolk buffer ve Medicult) ile dondurulmuştur. Farklı kriyoprotektanların kullanıldığı sperm örneklerinde ise çözme sonrası hücre oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuş ve Medicult ile dondurulan hastaların çözme sonrası DNA fragmantasyon oranı daha düşük olarak saptanmıştır.

Nallella ve ark 2004, a göre kriyoprezervasyon sonucunda dondurmanın osmotik etkisi ve çözmenin düşük fertilizasyon kapasitesine ve hücre zarında hasara neden olmaktadır. Bu sonuç hücre morfolojisini etkileyerek sperm fonksiyon bozukluğuna ve immotiliteye neden olmaktadır(192). Bizim çalışmamızda da yıkama

sonrasına göre ve çözme sonrası yıkanmış örneklerde sperm sayısında, motilitede azalma tespit edilmiş ve istatistiksel değerlendirmede bu iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmuştur. İki farklı kriyoprotektan grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında ise sperm sayısında ve motilitede istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

İnfertilitenin sperm apoptozuna olan ilişkisinin araştırıldığı bir çok ultrastrüktürel çalışmada ejakulatta anucleate sitoplazmik artıkların varlığı (218) spermelerde düzensiz nükleer kromatin biçimi, nükleer kromatin parçalanması, apoptotik cisimcikler içeren yoğun yuvarlağımsı tomurcuklanma gösteren nukleuslu spermeler, nükleer kromatin içinde vakuollerin bulunuşu ve bu vakuollerin bazılarının içindeki membransal cisimlerin (miyelin figürlerin) varlığı tanımlanmıştır (218,219,220) Ayrıca, apoptotik sürecin son evresinde ise; yoğun sitoplazma, nükleer fragmentasyon içeren apoptotik cisimler, bozulmuş organeller ve sitoplazmik materyalin varlığı belirtilmiştir (221,222,223).

Ancak, yapılan literatür taramalarında yıkanan ve dondurulup çözünen sonrası spermelerde ultrastrüktürel düzeyde çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada ise alınan örneklerde az sayıda normal görünümlü spermelerin yanında hücrelerin büyük bölümü baş bölgesinde sitoplazmik artıklar içeren elongating spermatidti. Bu tip hücrelerin bir grubunda ise akrozomun çekirdekten uzaklaştığı subakrozomal bölgede sitoplazmik içeriğin arttığı dikkati çekti. Yine bu grupta çok sayıda erken apoptotik çekirdekli sperm heterojenik kromatin dağılımı ile belirgin olarak gözlenirken bazı spermelerde geç apoptotik bulgu belirtisi olan nükleer fragmentasyon saptandı. Çok sayıda akrozom içermeyen, çekirdeğinde vakuoller bulunan makrosefalik globozoospermiler gözlendi . Bazı hücrelerin baş bölgeleri tamamen normaldi, ancak boyun bölgelerinde hala sitoplazmik artıklar içeren bu hücrelerin geç spermatidler olduğu görüldü ve bu artıklarda dev membransal vakuoller bulunduğu gözlendi. Ayrıca yıkama sonrası grupta ortak akrozoma sahip, çekirdeklerinde vakuoller içeren çok sayıda Bizzare sperm, akrozom iç zarının çekirdek içerisine invaginasyonu sonucu akrozomal kist içeren hücreler görüntülendi. Yine bu grupta birçok hücrede sperm zarında düzensizlikler belirgin olarak dikkati çekti . Hücrelerin kuyruk ultrastrüktüründe herhangi bir anomaliye rastlanmadı.

Çözme sonrası grupta, kullanılan iki kryoprotektan arasında ultrastrüktürel olarak bir fark gözlenmedi ve bulguların ortak olduğu tespit edildi. Sıklıkla baş ve boyun bölgelerinde sitoplazmik artık içeren spermatidlere rastlandı . Hücrelerin çoğunun çekirdeklerinde vakuoller gözlendi. Bu grupta akrozom içermeyen makrosefalik globozoospermiler, çekirdeklerinde membransel vakuoller, sitoplazmik artıklarında ise dev granüler vakuoller içermekteydiler. Az sayıda amorf başlı spermilerin de bulunduğu bu grupta en önemli bulgu yıkama sonrası sperm sayısı azalmış olmakla birlikte geç yada erken apoptotik hücre gözlenmedi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda son yıllarda hızlı gelişim gösteren in vitro fertilizasyonun ayrılmaz bir parçası olan kriyoprezervasyon konusunu ele aldık. İnfertil erkeklerde sperm hücrelerinin dondurulması, spermin motilitesini, morfolojiyi, DNA bütünlüğünü etkilemektedir. Bütün bu gelişmeler ışığında infertil çiftlerin %40' nı oluşturan erkek faktörüne çözüm bulma arayışlarına hızla devam edilmektedir. Kriyoprezervasyon hakkında bilimsel açıdan açıklanmayı bekleyen bir çok soru vardır. Buda kriyoprezervasyon son yıllarda en fazla çalışılan konular arasında olmasına neden olmuştur. Bu çalışmada bizde TUNEL ve elektron mikroskobu ile spermlerin ince yapısını apoptoz yönünden araştırdık.

Sonuç olarak, bulgularımız spermin dondurma öncesi yıkanıp yıkanmama tartışmasına açıklık getirerek dondurma öncesi mutlaka yıkanması gerektiği doğrultusundadır. DNA fragmentasyonun değerlendirildiği TUNEL testi sonucunda yıkanmamış örnekler ile yıkanan ve dondurulup çözünen örnekler arasında anlamlı fark ortaya konmuş bu fark ultrastrüktürel olarak da gösterilmiştir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular sonucu spermin yıkanıp dondurulması ve değişik dondurma teknikleri arasındaki varyasyonlar konusunda daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Ayrıca sperm hücresinde oluşan DNA fragmentasyonunu ayrıntılı olarak gösteren farklı metotların kullanılmasının dondurma yönteminin standart hale getirilmesinde yararlı olabileceğini kanıslındayız.

7. KAYNAKLAR

- 1) Abraham L, Kierszenbaum Histology and Cell Biology, 2th edition, Mosby, 2002; 529-550
- 2) Ross HM, Kaye G, Pawlina W, Histology, a text and atlas, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, 2003; 689-696
- 3) Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR ve ark., A gene from the human sex determining region encodes a protein with homolog to cryopreserved DNA-binding motive. Nature, 1990; 346: 240-244
- 4) Mittwoch U, Sex determination and sex reversal genotype, phenotype, dogma and semantics. Human Genetic, 1992; 89: 467-469
- 5) Li B, Philips NB, Weiss MA, SRY directed DNA bending and human sex reversal reassessment of a clinical mutation uncovers a global coupling between the HMG box and tail. J mol. Biol, 2006; 360(2): 310-28
- 6) Umeno M, Baba Y ve ark., A rapid and simple system of detecting deletions on the Y chromosome related with male infertility using multiplex PCR, J. Med Invest, 2006; 53(1-2):147-52
- 7) Aytekin, Yener.: Temel Histoloji., Birinci Basım., Barış Kitapçılık, İstanbul, (1998). 407-422
- 8) Gartner LP, Hiatt JL: Color Textbook of Histology, Pennsylvania, W.B.Saunders Company, 1997; 406-412
- 9) Aydos K., www.androloji.info
- 10) Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F ve ark., Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. J Androl., 1996; 1F: 276-87
- 11) Chen Z, Toth T, Godfrey-Bailey L, Mercedat N ve ark., Seasonal variation and age-related changes in human semen parameters. J Androl., 2003; 24 (2)
- 12) Chen Z, Toth T, Godfrey-Bailey L, Schiff I ve ark., Impact of seasonal variation, age and smoking status on human semen parameters: The Massachusetts General Hospital experience. J. Exp. Clin. Assist Reprod., 2004; 1:2
- 13) Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA ve ark., Hum Reprod., 2003; 18(2): 447-454.

- 14) Narendra PS, Charles HM, Richard EB., Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, 2003; 80: 1420- 1430.
- 15) Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D ve ark., Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-1046.
- 16) Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL ve ark., Integrity in human spermatozoa: Relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33-44.
- 17) Stahl O, Eberhard J, Jepson K, Spano M ve ark., *Hum Reprod.* 2006; 21(12):3199-3205
- 18) Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O ve ark., Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertil Steril*, 1988; 50: 795-800.
- 19) Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W ve ark., Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Rad Biol Med*, 1999; 26: 869-880
- 20) Aitken RJ, Krausz C, Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*: 2001; 122
- 21) Jedrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Derwich K, Depa M ve ark., The sperm quality in fertile smokers. *Przegl Lek*, 2004; 61(10): 1028-30
- 22) Martini AC, Molina RI, Estofan D, Senestrari D. Effects of alcohol and cigarette consumption on human semen quality. *Fertil Steril*, 2004; 82(2): 374-7
- 23) Özgür K, Işıkoğlu M, Seleker M, Dönmez L, Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Turkish population. *Arch Gynecol Obstet*, 2005; 271(2):109-112.
- 24) Osser S, Beckman-Ramirez A, Liedholm P, Semen quality of smoking and non-smoking men in infertile couples in a Swedish population. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 1992; 71(3):215-8
- 25) Trummer H, Habermann H, Haas J, Pummer K. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum Reprod.*, 2002; 17(6): 1554-1559
- 26) Ludwikowski G, Szymanski W, Szymanski M, Adamczak R ve ark., Influence of cigarette smoking on none sperm parameters in males with decreased fertility. *Prego Lek.*, 2004; 61(10): 1031-2

- 27) Künzle R, Mueller MD, Huber AW, Drescher H ve ark., Seasonality in human semen quality of smokers and non-smokers: effect of temperature. *Asian J Androl*, 2004; 6: 243-247
- 28) Zavos PM, Correa JR, Antypas S, Zarmakoupis-Zavos PN ve ark., Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity. *Fertil Steril.*, 1998; 69(3)
- 29) Wang S, Wang X, Chia S, Shen H ve ark., A study on occupational exposure to petrochemicals and smoking on seminal quality. *J Androl.*, 2001; 22(1)
- 30) Grudzinskas, Gedes J, Gametes - The Spermatozoon III. Chapter Sperm - structure and function, 1995; 46-67
- 31) Ameisen JS, The origin of programmed cell death. *Science*, 1996; 272: 1278
- 32) Thompson CB, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 267:1456-1462
- 33) Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin*, 1998; 18: 482-491
- 34) Kerr JF R, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biologicalphenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26: 239-245
- 35) Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH Res*, 1991; 3:75
- 36) Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie A H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology*, 1995; 6: 3-16
- 37) Majno G, Torisl A, Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol*, 1995; 146: 3-15
- 38) Schwartzman RA, Cidloski JA, Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*,1993; 14: 133-144
- 39) Cumming MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*, 1997; 21: 88-101
- 40) Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*,1980; 284: 555-556
- 41) Cohen JJ. Apoptosis: the physiological pathway of cell, *Death.Hosp Pract*,1993; 15: 35-43
- 42) Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today*,1993; 14: 126-130

- 43) Güçer Ş, Tınaztepe K. Böbrek hastalıklarında apoptozisin rolü. Hacettepe Tıp Dergisi, 2001; 32(2) : 160-168
- 44) Hetts SW. To die or not to die. An overview of apoptosis and its role in disease. Jama; 1998; 279: 300-7
- 45) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide spread implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 1972; 26: 239-57.
- 46) E. Ulukaya. Apoptozis ders notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilimdalı
- 47) Levison DA, Hopwood D., Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. J Pathol, 1976; 119: 159-166
- 48) Ovalı E, Ustaçelebi Ş, Apoptozis, temel ve klinik mikrobiyoloji, ankara, güneş kitabevi, 1999; 195-203
- 49) Cooper GM, Cell signaling in the cell: a molecular approach. Asm Press, 2th, Washington D.C., 2000; 13 :523-552.
- 50) Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR ve ark., Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmun hepatitis. Liver, 2001; 21(4): 272-279
- 51) Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of epidermal barrier. Exp. Mol. Med. 1999; 31: 5-9
- 52) Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. Bio-essays, 2002; 24: 789-800
- 53) Hetts SW, To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. Jama 1998; 278: 300-307
- 54) Eastman A, Survival factors intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis, Cancer biology, 1995;6: 45-52
- 55) Bortner CD, Odenburg NBE, Crdlowski JA. The role of fragmentation in apoptosis. Trends in Cell Biology, 1995;5: 21-28
- 56) Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. Trends Cell Biol, 2001;11(9): 372-375
- 57) Porter AG, Protein translocation in apoptosis. Trends Cell Biol, 1999;9: 394-401.
- 58) Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. N Engl J Med 1996; 334: 17-25.

- 59) Nagata S, Gorin N, Foa R, Fas-mediated apoptosis. In: manuccipm(eds)."Education Programme 1996 - Meet the Expert Sessions of the 2nd Meeting of the European Haematology Association, 29 May-1 June, Paris, France", Blackwell Science Ltd, Glasgow, 1996:61-2.
- 60) Reed JC, Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol*, 1999;17(9): 294-297
- 61) Ivy SP, Lugo TG, Bernstein ML, Smith MA, Evolving molecular and targeted therapies. In: Pizzo PA, Poplack DG(eds): *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Fourth edition, Lippincott-Williams&Wilkins, Philadelphia, 2002; 309-49
- 62) Fennell DA, Cotter FE, Controlling the mitochondrial gatekeeper for effective chemotherapy. *Br J Haematol*, 2000;111: 52-60
- 63) Martin SJ, Dealing the cards between life and death. *Trends Cell Biol*, 2001;11(5):188-189
- 64) Tsujimoto Y, Molecular mechanism of cell death. In: *Educational Program Book 1998. Combined Haematology Congress 27th Congress of the International Society of Hematology, 3rd Congress of the European Haematology Association, Amsterdam*; 1998:161-5.
- 65) Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, ve ark., Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 1998;391: 496-499
- 66) Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, ve ark., Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001;60: 422-429
- 67) Nakamura K, Bossy-Wetzell E, Burns K, ve ark., Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol*, 2000;150: 731-740
- 68) McCubrey JA, May WS, Duronio V, Mufson A. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia*, 2000;14: 9-21
- 69) Green DR, Martin SJ, The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol*, 1995;7: 694-703
- 70) Michalke M, Stroh C, Chlichlia K, Stepczynska A, ve ark., The emerging role of caspases in signal transduction as a revealed by knock-out studies – not only apoptosis. *Signal Transduction*, 2001;1-2: 51-65
- 71) Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P, Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 2000;25: 1859-1866

- 72) Newton K, Strasser A, Yang E, Korsmeyer SJ, The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8: 68-75
- 73) Yang E, Korsmeyer SJ, Molecular thanatopsis: A discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood*, 1996;88: 386-401
- 74) Wickremasinghe G, Hoffbrant AV, Biochemical and genetic control of apoptosis. Relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*,1999;93(11): 358-600
- 75) Benedetti V, Bennett WP, Greenblatt MS, Haris CC. P53 tumor suppressor gene: Implications for iatrogenic cancer and cancer therapy. *Med Pediatr Oncol*, 1996;1: 2-11
- 76) Schmid M, Carson DA. Cell cycle regulation and hematological disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U editors: *Williams Hematology*. sixth edition, mcgraw-Hill Company, Newyork, 2001; 131-141
- 77) Iliakis G, Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin Oncol*, 1997;24: 602-615
- 78) Offer H, Erez N, Zurer I, Tang X, et al., The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis*, 2002;23(6): 1025-1032
- 79) Kirsch DG, Kastan MB, Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *J Clin Oncol*, 1998;16: 3158-68
- 80) Marks DL, Kurz BW, Link MP, Ng E, et al., Altered expression of p53 and mdm-2 proteins at diagnosis is associated with early treatment failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 1997;15: 1158-62
- 81) Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P, Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*, 2000;25: 1859-1866
- 82) Balakumran A, Champbell GA, Maslen MT, Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996;139: 122-127
- 83) Sheikh MS, Fornace Aj-Jr. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 2000;182: 171-181
- 84) Mountz JD, Zhou T, Apoptosis and autoimmunity. In: Kopman WJ, ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions*. Lippincott-Williams&Wilkins 2001.

- 85) Sung CH, Schneider BG, Agarwal N, Papermaster DS, ve ark., Functional heterogeneity of mutant rhodopsins responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 8840-8844
- 86) Mosinger JL, Price MT, Bai HY, Yiao H ve ark., Blockage of both NMDA and non-NMDA receptors is required for optimal protection against ischemic neuronal degeneration in the in vitro adult mammalian retina. *Exp Neurol* 1991;113: 10-17
- 87) Staunton MJ, Gaffney G. Apoptosis. Basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122: 310-319
- 88) Carson DA, Rbiero JM, Apoptosis and disease. *The Lancet* 1993;341: 1251-1254.
- 89) Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, ve ark., Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endoc and Metab*, 1998;83: 152
- 90) Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW, ve ark., Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development*, 2000; 56: 353-359
- 91) Jefferson KP, Persad RA, Holly MP, Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol*, 2000.86: 598-606
- 92) Kerr JB, Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 1992;95: 825-830
- 93) Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, ve ark., Gonadal cell apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research* 1996;51: 432-457
- 94) Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis, *Bioessays*. 2000;22: 423 -430
- 95) Martincic DS, Klun IV, Zorn B, Vrtovec HM. Germ cell apoptosis in the human testis.; *Pflugers Arch*. 2001; 442 : 159 -160
- 96) Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility, *Hum Reprod*. 2004;10: 39 -51
- 97) Sakkas D, Mariethoz E, John JC, Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway, *Exp Cell Res*. 1999;251: 350 -355
- 98) Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, And Darzynkiewicz, Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to degeneration in

abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells.; *Exp. Cell Res.* 1993;207: 202-205

99) Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79(7): 559-63

100) Davis JR, Firlit CF, The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril.* 1986;17: 187-200

101) Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, ve ark., Apoptotic cell death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research.* 1996; 40: 351-356

102) Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, ve ark., Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr.* 1999; 61: 393-399

103) Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol,* 1993;7: 643-650

104) Yin Y, Hawkins KL, Devwolf WC, Morgantaler A, Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl.* 1997;18: 159- 165

105) Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum Reprod Update* 1996;2(2): 103-117

106) Vinatier D, Dufour P, Subtil D. Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1996;67(2): 85-102

107) Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, ve ark., Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59(5):1037-46

108) De Lamirande E, Gagnon C, Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995;10(1): 15-21

109) Shen HM, Chia SE, Ong CN, Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999;20(6): 718-23

110) Higuchi M, Singh S, Chan H, Aggarwal BB, Protease inhibitors differentially regulate tumor necrosis factor-induced apoptosis, nuclear factor-kappa B activation, cytotoxicity, and differentiation. *Blood* 1995;86(6): 2248-56

- 111) Lin WW, Lamb DJ, Lipshultz LI, Kim ED, Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int urolnephrol*. 1999;31(3): 361-370
- 112) Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *Jandrol*, 1998;19: 487-497
- 113) Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Reviews*, 1995;11: 101-105
- 114) Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, ve ark., Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Human reproduction*, 2002;17: 2665-2672
- 115) Oosterhuis GJ, Mulder AB, Kalsbeek-Batenburg E, Lambalk CB, ve ark., Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality; *Fertil. Steril*. 2000;74: 245-250
- 116) Perticarari S, Riccig, Granzotto M, Boscolo R, ve ark., A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis.; *Human Reproduction*. 2007; 22(2): 485-494
- 117) Nabil A, Tamer S, Uwe P, Agarwal A, *Human Reproduction*, 2007;22:(5) 1413-1419
- 118) Bartke A, Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon. *Endocrinology*. 1995;136: 3-4
- 119) Callard GV, Jorgensen JC, Redding JM, Biochemical analysis of programmed cell death during premeiotic stages of spermatogenesis in vivo and in vitro. *Dev. Genet*.1995;16: 140-147
- 120) Hadziselimovic F, Geneto R, Emmons LR, Increased apoptosis in the contralateral testis in patients with testicular torsion. *Lancet*, 1997;350: 118
- 121) Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia L, ve ark., An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J*. 1997;16: 2262-2270
- 122) Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Parvinen M ve ark., Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro; *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2000;85: 2057-2067
- 123) Mazur P, Freezing of living cell: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, 1984; 247: 125-142

- 124) Polge C, Smith A, Parkes A, Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 1949; 164-166
- 125) Özkavukçu S, Erdemli E, Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects. *Journal of Ankara Medical School*, 2002;24(4): 187-196
- 126) Wetzels AMM, Cryopreservation /Theory. In Bras M Lens JW, Laboratory aspects of in vitro fertilization. The Netherlands, N.V. Organon 1996; 229-244
- 127) Delilbaşı L, İn Vitro Fertilizasyon Laboratuar Yöntemleri, Birinci Basım Güneş Tıp Kitabevleri Ankara .2008; 229-255
- 128) Glenister PH, Lyon MF, Long term 8 cell mouse embryos at -196 C IVF, 1997;3: 20-27
- 129) Watson PF, Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, 1995;7: 871-891
- 130) Woods EJ, Gilmore JA, Liu J, Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod*, 2000;15: 335-343
- 131) Porcu E, Oocyte freezing. *Semin. Reprod. Med*, 2001; 19(3): 221-230
- 132) Palasz AT, Mapletopt RJ, Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv*, 1996;14: 127-149
- 133) Edashige K, Yamaji Y, Kleinhans FW, Kasai M, Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biol Reprod*, 2003; 68: 87-94
- 134) Watson PF, The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 2000;60: 481-492
- 135) Holt WT, Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 2000;53: 47-58
- 136) Holt WT, Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 2000; 62: 3-22
- 137) Leeuw FED, Leeuw AMD, Daas JHG, Colenbrander BV, ve ark., Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 1993; 30: 32-44
- 138) Leibo SP, Brandley L, Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: C Gagnon (Ed), *The Male Gamet*. Cache River Press, St Louis. 1999; 502-515

- 139) McGann LE, Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology*, 1999;15: 382-390
- 140) Palasz AT, Mapletoft RJ, Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent Advances. *Biotechnol. Adv.*, 1996;14(2): 127-149
- 141) Massip A, Cryopreservation of embryos of farm animal. *Reprod Dom Anim*, 2001; 36: 49-55
- 142) Alvarenga MA, Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM, Acrozomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *Equine Vet J*, 2000;32: 541-545
- 143) Katkov II, Katkova N, Crister JK, Mazur P, Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 1998;37: 325-338
- 144) Arav A, Hehu D, Mattioli M, Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J Reprod Fertil*, 1993;99: 353-358
- 145) Cabria E, Anel L, Herraes MP, Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology*, 2001; 52: 623-635
- 146) Kasai M, Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci*, 1996;42: 67-75
- 147) An TZ, Iwakiri M, Edashige K, Takashi M, Factors affecting the survival of frozen mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 2000; 40: 237-249
- 148) Rudolph AS, Crowe JH, Membrane stabilization during: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 1985;22: 367-377
- 149) Tsutsui T, Hase M, Hori T, Ito T, et al., Effects of orvus es paste on canine spermatozoal longevity after freezing and thawing. *Vet Med Sci*, 2000; 62: 533-535
- 150) Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M, Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol*, 2000;169: 3-10
- 151) Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO, Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 2000;53: 59-72
- 152) Fahning ML, Garcia MA, Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*, 1992; 29: 1-8
- 153) Gao D, Critser JK, Mechanisms of cryoinjury in living cells. *Ilar*, 2000;41(4): 87-196

- 154) Pegg DE, The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med*, 2000;20(1): 5-13
- 155) Friedler S, Giudice IC, Lamb EJ, Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril*, 1988;49(5): 743-764.
- 156) Agca Y, Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. *Ilar*, 2000;41(4): 207-220
- 157) Mazur P, Schneider U, Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell biophys*, 1986;8(4): 259-285
- 158) Trounson AO, Cryopreservation. *Br. Med. Bull*, 1990;46(3): 695-708
- 159) Sutton RL, Critical cooling rates to avoid ice crystallization in solutions of cryoprotective agents. *J. Chem. Soc. Faraday trans*, 1991; 87(1): 101-105
- 160) Sutton RL, Critical cooling rates to avoid ice crystallization in aqueous cryoprotectant solutions containing polymers. *J. Chem. Soc. Faraday trans*, 1991; 87(23): 3747-3751
- 161) Vajta G, Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci*, 2000;621: 357-364
- 162) Gao DY, Ashworth E, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Crister JK, hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod*, 1993;49: 112-23
- 163) Curry MR, Watson PF, Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, 1994; 31: 39-46
- 164) Woelders H, Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet Quart*, 1997;19: 135-138
- 165) Mazur P, Equilibrium, quasi- equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics*, 1990;14: 53-92
- 166) De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, ve ark., Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997;2(1): 48-54
- 167) Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A, Effect of natural antioxydants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freez thaw process. *Arch Androl* 1994;33: 11-15

- 168) Verheyen G, Nagy Z, Joris H, De Croo I, et al., Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into in vitro-matured germinal-vesicle stage oocytes. *Fertil Steril*, 1997;67(1): 74-80
- 169) Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, Van Steirteghem AC, Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. *Hum Reprod*, 1999;14(8): 2041-9
- 170) Morris, G.J. A new development in the cryopreservation of sperm: Human Fertility 2002 5, 23–29
- 171) Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. *J Androl* 1992; 13: 283-8.
- 172) Critser JK, Arneson BW, Aaker DV, Huse-Benda AR, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. II. Post thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. *Fertil Steril* 1987; 47: 980-4.
- 173) Check ML, Check JH, Long R. Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane. *Arch Androl* 1991; 27: 155-60.
- 174) Cross NL, Hanks SE. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Hum Reprod* 1991; 6: 1279-83.
- 175) Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *J Androl* 2001; 22: 1012-8.
- 176) Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT. Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia* 2004; 36: 321-6.
- 177) Leffler KS, Walters CA. A comparison of time, temperature, and refreezing variables on frozen sperm motility recovery. *Fertil Steril* 1996; 65: 272-4.
- 178) Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 1988; 50: 314-20.

- 179) Lowelock JE. Denaturation of lipid protein complexes as a cause of damage by freezing. Proceedings of the Royal Society of the London, series B 1957; 147:427-433.
- 180) Meryman HT, Williams RT, Douglas MSJ, Freezing injury from solution effects and its prevention by natura lor artificial cryoprotection. Cryobiology 1977; 14: 287-302.
- 181) Silber, S. J. A modern view of male infertility: brief report. Reprod. Fertil. Dev. 1994; 6, 93-104.
- 182) Wang, R., Sikka, S. C., Veeraragavan, K. Et al.:Platelet activating factor and pentoxyfilline as human sperm cryoprotectants. Fertil. Steril. 1993; 60(4):711-715,.
- 183) Yavetz, H., Yogev, L., Homaonnai, Z. and Paz, G.: Prerequisites for successful human sperm cryobanking: sperm quality and preezing holding time. Fertil. Steril. 1991;55(4),812-815,
- 184) Gilmore, Ja, Liu J, Woods, E.J., Peter, A.T., Critser, J.K.: Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and emprical approaches for optimal cryopreservation methods. Hum Reprod 2000;15: 335-43.
- 185) Lowelock J, Bishop M. Prevention of freezing damage to living cells bydimethyl sulfoxide. Nature 1959;183:1384-95,
- 186) An, T.Z., Ivakırı. M., Edashıge, K.,Sakurai, T., Kasai, M. Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. Cryobiology, 2000;40, 237-249.
- 187) Correa, J.R., Rodriguez, M.C., Patterson, D.J., Zavos, P.M. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. Theriogenology, 1996; 46:413-420.
- 188) Sztain, J.M., Noble, K., Farley, J. S., Mobraaten, L.E. Comparison of permeating and non permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation, Cryobiology, 2001;41, 28-39,
- 189) Bahamondes, L., Fazano, F., De Lucio, M.A., Neves, P.A., Bottocher Luiz, F.,Lorenzetti, G.B. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. Andrologia, 2001; 33: 75-77.

- 190) Blackshaw, A.W. Factors effecting the reveal of bull and ram spermatozoa after freezing to – 79°C. *The Australian Veterinary Journal*, 1995; 238-241
- 191) Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectans. *Fertil Steril*. 2004; 82(4):913-8.
- 192) Morris, G.J., Acton, E., Avery, S.: A novel approach to sperm cryopreservation. *Hum Reprod* 1999;14:1013-21
- 193) Wowk, B., Leitl, E., Rasch, C.M., Mesbah-Karimi, N., Harris, S.B., Fahy, G.M.: Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000; 40:288-36.
- 194) Lass A., Akagbosu F., Abusheikha N., Hassouneh M., Blayney M., Avery S and Brinsden P. A programme of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility centre: lessons from 8 years experience.. *Hum. Reprod*. 1998,13,(11), 3256- 3261.
- 195) Verza Junior, S; Manzzi Feijo, C; Telles Schneider, D; Esteves, S C A comparative study of three commercially available cryoprotectants for cryopreservation of human sperm *Fertility and Sterility* 2006 ,86 (2) 199-201
- 196) Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen. *Fertility and Sterility*, 1954, 5:520–529.
- 197) Hammond J. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa from the vagina. *Journal of Experimental Biology*,1930, 7:175–191.
- 198) Walton J. The effect of temperature on the survival in vitro of rabbit spermatozoa obtained from the vas deferens. *Journal of Experimental Biology*, 1930, 7:201–219.
- 199) Gunasena KT and Crister JK Utility of viable tissue ex vivo. Banking of reproductive cells. In *Reproductive Tissue Banking – Scientific Principles* 1–21 Eds AM Karow and JK Crister. Academic Press, San Diego(1997)
- 200) Shettles LB. The respiration of human spermatozoa and their response to various gases and low temperatures. *American Journal of Physiology*, 1940;128: 408–415.

- 201) Hallak J, Sharma RK, Wellstead C, Agarwal A. Cryopre-servation of human spermatozoa: comparison of TEST-yolk buffer and glycerol. *Int J Fertil Womens Med* 2000; 45: 38-42
- 202) ,Donnelly ET, Steele EK, McClure N, et al. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1191-1199.
- 203) M. O'Connell, N. McClure and S.E.M. Lewis The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function *Human Reproduction* 2002;17(3):704-709
- 204) Somfai,T., Bodo, S.,Nagy, S., Papp AB., Ivancsics, J., Baranyai, B., Gocza, E., Kovacs, A Effect of swim up and percoll treatment and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa *Reprod Dom. Anim.* 2002; 37,285-290
- 205) Szczygiel MA, Kusakabe H, Yanagimachi R, Whittingham DG Separation of Motile Populations of Spermatozoa Prior to Freezing Is Beneficial for Subsequent Fertilization In Vitro: A Study with Various Mouse Strains. *Biology of Reproduction:* 2002;67, 1 , 287–292
- 206) Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001; 76: 892-900
- 207) Hughes,C.M., Lewis,S.E.M., McKelvey-Martin,V.J. and Thompson,W. A comparison of baseline and induced DNA damage in human sperm from fertile and infertile man, using a modified comet assay. *Mol. Hum. Reprod.*, 1996;2, 613–619.
- 208) McVicar CM, McClure N, Williamson K, Dalzell LH, Lewis SE. Incidence of Fas positivity and deoxyribonucleic acid double-stranded breaks in human ejaculated sperm. *Fertil Steril.* 2004; 81,1, 767 -774.
- 209) Barroso G, Morshedi M, Oehninger S Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa *Hum Reprod.* 2000; 15,6:1338-44
- 210) S. Siddighi, Wc Patton, Jd Jacobson, A. King, Pj Chan Correlation of sperm parameters with apoptosis assessed by dual fluorescence DNA integrity assay *Archives of Andrology*,2004;50:311–314,

- 211) Huang CC, Lin DP, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates *Fertil Steril.* 2005; 84,1:130-40
- 212) Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M.A., Thomas, A.J. and Agarwal, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, 2004; 19, 129-138.
- 213) Shen, H., Dai, J., Chia, S., Lim, A. and Ong, C. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reproduction*, 2002;17, 1266-1273.
- 214) Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G.C., Mariethoz, E., Tarozzi, N. and Bizzaro, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction*, 2002 ; 66, 1061- 1067.
- 215) Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Franco G, Anniballo N, Mendoza C, Tesarik J. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod.* 2005; 201:226-30.
- 216) Piomboni P, Bruni E, Capitani S, Gambera L, Moretti E, La Marca A, De Leo V, Baccetti B. Ultrastructural and dna fragmentation analyses in swim-up selected human sperm *Arch Androl.* 2006;52:51–59,
- 217) T. de Paula, R. Bertolla, D. Spaine, M. Cunha, N. Schor, A. Cedenho. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertility and Sterility*, 2006;86, 3, 597-600
- 218) Smith, D.C., Barratt, C.L.R. and Williams, M.A. The characterisation of non-sperm cells in the ejaculates of fertile men using transmission electron microscopy. *Andrologia*, 1989; 21, 319-333.
- 219) Muratori, M., Piomboni, P., Baldi, E., Filimberti, E., Pecchioli, P., Moretti, E., Gambera, L., Baccetti, B., Biagiotti, R., Forti, G. and Maggi, M. Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *Journal of Andrology*, 2000; 21, 903-912.
- 220) Baccetti, B., Collodel, G. and Piomboni, P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *Journal of Submicroscopy, Cytology and Pathology*, 1996; 28, 587-596.

- 221) Blanco, A.N., Palaoro, L., Ahedo, M.I., Palamas, M. and Zanchetti, F. Phagocytosis of ejaculated spermatozoa. *Acta Cytologica*, 1992; 36, 251-258.
- 222) Gil, T., Castilla, J.A., Hortas, M.A., Redondo, M., Samaniego, F., Garrido, F., Vergara, F. and Herruzo, A.J. Increase of large granular lymphocytes in human ejaculate containing antisperm antibodies. *Human Reproduction*, 1998; 13, 296-301.
- 223) Rossi, A.G. and Aitken, R.J. Interactions between leukocytes and the male reproductive system. In: *The Fate of the Male Germ Cell*. (Eds. Ivell and Holstein), Plenum Press, New York. 1997
- 224) Schmidt L, Munster K. and Hehn P. infertility and the seeking of infertility treatment in a representative population. *Br J Obstet Gynaecol*, 1995;102: 978,
- 225) Huckins C: The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rat: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium *Anatomical Record*, 1978;190: 905,
- 226) Lin W W, Lamb D J, Wheeler T M, Lipshultz L I, Kim E D: in situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril*, 1997;68:1065.
- 227) Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C: Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 1998; 3: 115,
- 228) Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol Hum Reprod*. 1998; 4: 757
- 229) Kockx M M, Muhring J, Knaapen M W M, de Meyer G R Y. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol*, 1998; 52: 885