

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN OKSİDATİF STRES,
DNA FRAGMENTASYONU, KROMATİN YAPI VE PARP
PROTEİNİNİN EKSPRESYON SEVİYELERİNE ETKİSİ**

**ŞEYDA NUR UZUN
YÜKSEK LİSANS
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GEBZE
2023**

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERM KRİYOPREZERVASYONUNUN
OKSİDATİF STRES, DNA
FRAGMENTASYONU, KROMATİN YAPI
VE PARP PROTEİNİNİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNE ETKİSİ

ŞEYDA NUR UZUN
YÜKSEK LİSANS
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMANI
PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE
2023

T.R.

GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

**EFFECT OF SPERM
CRYOPRESERVATION ON OXIDATIVE
STRESS, DNA FRAGMENTATION,
CHROMATIN STRUCTURE AND PARP
PROTEIN EXPRESSION LEVELS**

ŞEYDA NUR UZUN

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE**

**DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS**

THESIS SUPERVISOR

PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

GEBZE

2023



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 06/07/2023 tarih ve 2023/37 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 24/07/2023 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Şeyda Nur UZUN'un tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Hilal EREN GÖZEL

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

ÖZET

İnfertilite yaygın olarak görülen ve çiftlerin en az 1 yıl süre ile korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanan bir tıbbi sorundur. Tüp bebek yöntemi (IVF), bu durumdaki çiftleri tedavi amacıyla kullanılan en yaygın yardımcı üreme tekniğidir. Semen kriyoprezervasyonu, spermelerin daha sonra çözülerek tüp bebek tedavilerinde kullanılması amacıyla dondurulması sürecidir. Tüp bebek uygulamaları sırasında, kemoterapi ve radyoterapi gibi gonad hücrelerine zarar veren tedaviler öncesinde, sperm elde etmenin bir daha mümkün olmadığı cerrahi operasyonlar, kanser ve spermelere zarar veren diğer bazı tedavilerden önce fertilitenin korunması amacıyla spermeler dondurulabilmekte ve uzun yıllar saklanabilmektedir. Kriyoprezervasyon, sperm yapısında 'kriyohasar' olarak adlandırılan olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Dondurma çözme işlemi sonrasında spermde tek zincir kırılmaları, DNA parçalanmasında bir artış, spermde membran hasarı, mitokondriyel hasar, DNA fragmentasyonu ve oksidatif stres gibi kriyohasar bulguları meydana geldiği bildirilmektedir. Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA onarımı, genomik stabilite ve programlanmış hücre ölümü gibi bir dizi hücresel süreçte yer alan bir protein ailesidir. Bu çalışmada, sperm kriyoprezervasyonundan sonra ortaya çıkan etkileri moleküler düzeyde araştırmak için, sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve çözme sonrasında sperm fonksiyonları, oksidatif stres, DNA fragmentasyonu, kromatin yapısı ve PARP proteininin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin analiz edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmalar sonucunda kriyoprezervasyon işleminin, kromatin yapısında ve DNA fragmentasyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Oksidatif stres parametreleri ve proteinlerin (PARP) immünohistokimyasal analizlerinde ise anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Konu ile ilgili yapılacak daha ileri analizlere ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: sperm, kriyoprezervasyon, oksidatif stres, kromatin yapısı, PARP.

SUMMARY

Infertility is a common medical problem defined as the inability of couples to achieve pregnancy despite unprotected and regular sexual intercourse for at least 1 year. In vitro fertilization (IVF) is the most common assisted reproductive technique used to treat couples with this condition. Semen cryopreservation is the process of freezing sperm for later thawing and use in IVF treatments. During IVF applications, before treatments that damage gonadal cells such as chemotherapy and radiotherapy, before surgical operations where it is not possible to obtain sperm again, before cancer and some other treatments that harm sperm, sperm can be frozen and stored for many years in order to preserve fertility. Cryopreservation can cause negative effects on the sperm structure called 'cryodamage'. It has been reported that cryodamage findings such as single strand breaks, an increase in DNA fragmentation, membrane damage in sperm, mitochondrial damage, DNA fragmentation and oxidative stress occur after the freeze-thaw process. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is a family of proteins involved in a number of cellular processes such as DNA repair, genomic stability, and programmed cell death. In this study, it was aimed to analyze the effects of sperm functions, oxidative stress, DNA fragmentation, chromatin structure and PARP protein expression levels before and after sperm cryopreservation in order to investigate the effects occurring after sperm cryopreservation at the molecular level. As a result of the studies, it was determined that the cryopreservation process caused a statistically significant decrease in the chromatin structure and DNA fragmentation levels. No significant difference was found in the immunohistochemical analyzes of oxidative stress parameters and proteins (PARP). Further analyzes on the subject are needed.

Keywords: sperm, cryopreservation, oxidative stress, chromatin structure, PARP.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ilk gününden bugüne kadar her türlü desteğini ve yardımını hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Asuman DEMİROĞLU ZERGEROĞLU'na,

Eğitim ve tez sürecimde bana çok destek sağlayan, kendisinden çok şey öğrendiğim, öğrencisi olmaktan her zaman mutluluk duyduğum sevgili eşdanışmanım Dr. Öğr. Üyesi Seda KARABULUT'a,

Dostlukları ve yardımları ile hep yanımda olan, Can ATAMBAY, Aylin YAŞAR, Melek USTA'ya,

Bütün bu zorlu sürece birlikte göğüs gerdiğimiz, beni her zaman destekleyen, girdiğimiz her yoldan daha güçlü çıktığımız hayattaki en büyük şansım, canım eşim Mücahid Bilal UZUN'a,

Her koşulda yanımda olan, beni destekleyen, ne zaman ihtiyacım olsa bana güç veren, bizim için hiç bıkmadan çalışıp çabalayan, canımın içi babam Asım DÜRMEİ'ye,

Her zaman arkamda olan beni büyüten, enerjisi sevgisi ilgisi hiç bitmeyen, annem olduğu için her zaman gurur duyduğum, onsuz hep eksik kaldığım birtanem annem Hanife DÜRMEİ'ye,

Moralim ne zaman bozuk olsa üzülmemeye bile izin vermeyen, iyi ki var dediğim, benim her şeyim kardeşim Talha DÜRMEİ'ye, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması GTU BAP 2021-A-101-09 Nolu proje tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	3
2. LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. İNFERTİLİTE	4
2.1.1. Erkek İnfertilitesi	5
2.2. SPERM KRİYOPREZERVASYONU	7
2.2.1. Sperm Kriyoprezervasyonu Teknikleri	11
2.2.2. Sperm Çözme Teknikleri	12
2.2.3. Sperm Kriyoprezervasyonunda Kullanılan Kriyoprotektanlar	13
2.2.4. Kriyoprezervasyondan Etkilenen Sperm Parametreleri	14
2.2.5. Kriyoprezervasyon ve İn Vitro Fertilizasyon	16
2.3. OKSİDATİF STRES	16
2.3.1. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi	17
2.3.2. Sperm Kriyoprezervasyonu ve Oksidatif Stres	19
2.4. DNA FRAGMENTASYONU	20
2.4.1. DNA Fragmentasyonu ve Erkek İnfertilitesi	21
2.4.2. Sperm Kriyoprezervasyonun DNA Fragmentasyonu Üzerindeki Etkisi	22
2.5. DNA KROMATİN YAPI	23
2.5.1. Sperm Kromatin Yapı	23
2.5.2. Sperm Kriyoprezervasyonunun Kromatin Yapı Üzerindeki Etkisi	24

2.6.PARP	25
2.6.1. PARP ve Erkek İnfertilitesi	29
2.6.2. Sperm Kriyoprezervasyonu ve PARP	31
3.METERYAL METOD	32
3.1. Sperm Kriyoprezervasyon İşlemi	34
3.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi	35
3.2.1. Total Oksidan Seviyesi	36
3.2.2. Total Antioksidan Seviyesi	36
3.3. DNA Fragmentasyon Analizi	37
3.3.1. Annexin V, PI çiftli florasan boyama	37
3.3.2. SCSA	38
3.4. Sperm Kromatin Yapı Analizi	39
3.4.1. Solüsyon Hazırlığı	40
3.5. Proteinlerin (PARP) İmmünohistokimyasal Analizi	40
3.5.1. Solüsyon Hazırlığı	42
3.6. İstatistiksel Analiz	44
4.BULGULAR	45
4.1. Oksidatif Stres Parametreleri	45
4.2. DNA Fragmentasyonu Parametreleri	47
4.3.Kromatin Bütünlüğü Parametreleri	49
4.4. PARP Proteini Parametreleri	54
4.5. Sperm Parametreleri	63
5.TARTIŞMA	68
5.1. Oksidatif Stres	68
5.2. Toplam Oksidan Seviyesi	69
5.3. Toplam Antioksidan Seviyesi	70
5.4. DNA Fragmentasyonu	72
5.5. Kromatin Yapı	74
5.6. PARP Ekspresyonu Parametreleri	75
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	100

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	:	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>		
µl	:	mikrolitre
ATP	:	Adenozin trifosfat
DFİ	:	DNA fragmentasyon indeksi
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribo nükleik Asit
DSÖ	:	DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
EG	:	Etilen glikol
ICSI	:	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
İHC	:	İmmünohistokimya
IRS	:	İmmün reaktif skorlama
IVF	:	İn vitro fertilizasyon
ml	:	Mililitre
OS	:	Oksidatif stres
OSİ	:	Oksidatif stres indeksi
PARP	:	Poly (ADP-ribose) polymerase
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
ROT	:	Reaktif oksijen türleri
SCSA	:	Sperm chromatin structure assay
SDF	:	Sperm DNA fragmentasyonu
SSB	:	Tek sarmallı DNA kırılmaları
TAS	:	Toplam antioksidan seviyesi
TB	:	Toluidine Blue boyama
TOS	:	Toplam oksidan seviyesi
TUNEL	:	Terminal deoksinükleotidil transferaz etiketleme
YÜT	:	Yardımcı üreme tekniği

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Spermatogenez süreci	6
2.2: Sperm Kriyoprezervasyon Süreci	8
2.3: Dondurma-çözülmenin sperm hücresi üzerindeki zararlı etkileri	10
2.4: Kriyoprezerve edilmiş spermelerde antioksidan kapasite ve sperm kalitesinde azalmaya yol açabilecek hücreler arası olaylar	15
2.5: Erkek Üremede Oksidatif Stres	18
2.6: Oksidatif stres, sperm hücrelerini olumsuz etkiler ve mitokondriyal hasara ve lipidler, nükleik asitler ve proteinlerde değişiklikler	19
2.7: PARP aile yapısı ve temel işlevine genel bakış.	26
2.8: PARP protein ailesinin onaylanmış ve önerilen çeşitli rolleri.	28
2.9: PARP aktivasyonunun testisteki olası rolü.	31
3.1: Sperm kriyoprezervasyonu işlem basamakları	35
3.2: TAS-TOS işlem basamaklarından örnek görseller	37
3.3: Toluidin mavisi boyama işlemi sonrası sperm yaymaları	39
3.4: 0,5lik hazırlanmış Toluidin Blue	40
3.5: İmmünohistokimyasal analiz basamakları	42
4.1: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği (Halosperm kit)	47
4.2: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği (Halosperm kit)	48
4.3: Annexin V, PI çiftli florasan boyama analiz sonuçları	48
4.4: SCSA analiz sonuçları	49
4.5: Sperm kromatin bütünlüğünün Toluidin Mavisi boyama tekniği ile gösterilmesi	51
4.6: Toluidin Mavisi ile açık mavi renge boyanan TB (-) sperm hücresi	51
4.7: Toluidin Mavisi ile açık mavi renge boyanan TB (+) sperm hücresi	52
4.8: Kromatin bütünlüğü bozukluğu az olan 38 numaralı hastaya ait Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü	52

4.9:	Kromatin bütünlüğü bozukluğu yoğun olan 30 numaralı hastaya ait Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü X100	53
4.10:	7 numaralı hastaya ait Toluidin Mavi boyasının ışık mikroskopik görüntüsü X100	53
4.11:	15 numaralı hastanın PARP proteinin analizi	56
4.12:	PARP proteinin immünohistokimyasal analizi	57
4.13:	Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100	58
	Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100	59
4.14:	Sperm hücresinin kuyruk bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100	60
4.15:	Sperm hücresinin kuyruk bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100	60
4.16:	Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100	61
4.17:	Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100	61
4.18:	PARP proteinin immünohistokimyasal analizi.	62
4.19:	Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonunun ışık mikroskopik görüntüsü X100	62
4.20:	9 numaralı hastanın PARP proteinin analizi	63
4.21:	IRS değerlerinin gösterildiği grafik	65
4.22:	OSİ (Oksidatif Stres İndeksi) değerlerinin gösterildiği grafik	66
4.23:	DFI (DNA Fragmentasyonu İndeksi) değerlerinin gösterildiği grafik	66
4.24:	Kromatin bütünlüğü değerlerinin gösterildiği grafik	67

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>		<u>Sayfa</u>
3.1:	Semen Örneği Dilüsyon Hazırlığı	43
4.1:	Oksidatif stres parametreleri kriyoprezervasyon öncesi istatistiksel analizi	45
4.2:	Tüm hastaların oksidatif stres parametre değerleri	46
4.3:	Hastaların DNA fragmentasyon skorlama sonuçları	47
4.4:	Kriyoprezervasyon öncesi Kromatin Bütünlüğü Parametreleri	49
4.5:	Hastaların kromatin bütünlüğü skorlama sonuçları	50
4.6:	Tabloda PARP proteininin bölgelere göre dağılımları	54
4.7:	Tabloda PARP proteininin bölgelere göre dağılımları	55
4.8:	Hastaların PARP protein ekspresyonu inceleme istatistikleri	56
4.9:	PARP proteini kriyoprezervasyon öncesi ortalama ekspresyon oranı istatistiksel analizi	61
4.10:	Sperm Parametrelerinin istatistiksel analizinin değerlendirilmesi.	64
4.11:	IRS, OSİ, TB değerlerinin ve tanımlayıcı istatistiklerin gösterildiği analiz	64
4.12:	IRS değerlerinin gösterildiği analiz	65
4.13:	OSİ değerlerinin gösterildiği analiz	65
4.14:	DFI değerlerinin gösterildiği analiz	66
4.15:	Kromatin bütünlüğü değerlerinin gösterildiği analiz	67

1. GİRİŞ

İnfertilite, çiftlerin en az 1 yıl süre ile korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır (DSÖ, 2010). İnfertilite, çiftlerin %15'inin karşılaştığı bir durumdur. İnfertilite ile karşılaşan çiftler yardımla üreme tekniklerine başvurmakta ve ancak bu yolla gebelik sağlanabilmektedir. Yardımla üreme tekniklerinden en yaygın olarak kullanılan yöntem ise tüp bebek yöntemidir. Çalışmamızın devamında detaylarıyla üzerinde durulacak olan bu yöntemin uygulanması sırasında sperm kriyoprezervasyonuna sıklıkla başvurulmaktadır [1].

Spermin ancak cerrahi olarak çok az miktarda elde edilebildiği testis operasyonları sonrası, sperm elde etmenin bir daha mümkün olmadığı cerrahi operasyonlar, kanser ve spermlere zarar veren diğer bazı tedavilerden önce fertilitenin korunması amacıyla spermler dondurulabilmekte ve uzun yıllar saklanabilmektedir. Sperm kriyoprezervasyonu, baba adayından alınan spermlerin daha sonraki zamanlarda çözülerek tüp bebek tedavilerinde kullanılması adına dondurulması sürecidir. Günümüzde çeşitli kriyoprezervasyon teknikleri kullanılmaktadır. Semen, kontrollü hızlı, yavaş soğutma yöntemi veya vitrifikasyon olarak bilinen daha yeni bir hızlı dondurma işlemi kullanılarak dondurulabilmektedir [2].

Oksidatif stres gelişimine neden olan Reaktif oksijen türleri (ROT), hücrel metabolizmanın bir ürünü olarak mitokondride, oksijenden üretilmektedir. ROT, serbest radikaller ve non-radikallerden oluşmaktadır. Bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren, stabil olmayan, yüksek enerjili atom veya moleküllere, serbest radikaller denilmektedir. Kararsız yapıdaki atom veya moleküller kararlı hale gelebilmek için diğer bileşiklerin elektronlarıyla birleşerek oksidasyona neden olabilmektedirler. Bu şekilde meydana gelen serbest radikaller, yüksek derecede reaktif özellik göstermelerinden dolayı lipitleri, amino asitleri ve karbonhidratları oksitleyebilmektedir. Dolayısıyla DNA mutasyonlarına yol açabilmektedir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkması ile biyolojik bir sistemin reaktif ara ürünleri kolayca detoksifiye etme veya ortaya çıkan hasarı onarma yeteneği arasındaki dengesizliği yansıtır. Bu dengesizlik sonucu artan oksidatif stres, çok sayıda hastalıkta önemli rol oynamaktadır [3].

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA onarımı, genomik stabilite ve programlanmış hücre ölümü gibi bir dizi hücrel işlemde yer alan bir protein ailesidir [4]. PARP için bir dizi hücrel substrat tanımlanmıştır. Bu proteinlerin çoğu, nükleik asit metabolizmasında, kromatin yapısının modülasyonunda ve DNA onarımında rol oynayan nükleer proteinlerdir. PARP ayrıca DNA ipliği kırılmalarının varlığında kendini otomatikleştirir [5]. PARP'ın ana rolü, SSB onarımında yer alan enzimatik mekanizmaya sinyal göndererek metabolik, kimyasal veya radyasyonla indüklenen tek sarmallı DNA kırılmalarına (SSB) karşı hücrel tepkiyi saptamak ve başlatmaktır. PARP bir SSB algıladığında, DNA'ya bağlanmaktadır. Daha sonra yapısal bir değişikliğe uğramakta ve diğer DNA onarım enzimleri için bir sinyal görevi gören bir polimerik adenosin difosfat riboz zincirinin sentezine başlamaktadır. PARP DNA tek iplikli kırılmalarla aktive edilmektedir. Oksidatif stres, PARP enzim ailesinin bir parçası olan DNA nick sensör enzimi poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1) aktivasyonunu indükleyen DNA kırılmalarına neden olabilmektedir. PARP-1'in stres yanıt yollarındaki işlevlerinin birçoğu, ADP-riboz birimlerinin bir vericisi olarak NAD kullanılarak, negatif yüklü bir polimer olan PAR'ın düzenlenmiş senteziyle sağlanmaktadır. Hücre ve hayvan modellerinde yapılan son çalışmalar, oksidatif stres sinyallerine yanıtta PARP-1 ve PAR'ın rollerini vurgulamaktadır. PARP inhibitörlerinin geliştirilmesi, bu koşullara terapötik bir yaklaşım olarak takip edilmektedir [6-9].

Bu çalışmada, sperm kriyoprezervasyonundan sonra ortaya çıkan etkileri moleküler düzeyde araştırmak için, sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve çözme sonrasında sperm fonksiyonları araştırılacaktır. Çalışmamızda sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve sonrası durumlarında oksidatif stres, DNA fragmentasyonu, kromatin yapı ve PARP proteininin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin kapsamlı olarak analiz edilmesi hedeflenmiştir.

1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Sperm kriyoprezervasyonu işleminden sonra ortaya çıkan olumsuz etkilerin ortadan kaldırılabilmesi için bu etkilerin moleküler nedenlerinin aydınlatılmasının önemli bir aşama olduğu dşnlmektedir.

Bu çalışmada, sperm kriyoprezervasyonundan sonra ortaya çıkan bu olumsuz etkileri moleküler düzeyde araştırmak için, sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve çözme sonrasında oksidatif stres, DNA fragmentasyonu, kromatin yapı ve PARP proteininin ekspresyon seviyelerine etkisi araştırılmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve sonrasında sperm parametreleri (motilite, konsantrasyon, morfoloji ve vitalite), oksidatif stres, DNA fragmentasyonu, kromatin yapı ve PARP proteininin ekspresyon seviyelerine etkisi incelenmiştir. Bulgulardaki dondurma öncesi ve sonrası değişiklikler belirlenmiştir.

Tüm bu bulgular ışığında tezin, sperm kriyoprezervasyonundan sonra ortaya çıkan etkileri moleküler düzeyde araştırmak için, sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve çözme sonrasında sperm fonksiyonları araştırılmıştır. Sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve sonrası durumlarında oksidatif stres, DNA fragmentasyonu, kromatin yapı ve PARP proteininin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin kapsamlı olarak analiz edilmesi hedeflenmiştir.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1. İnfertilite

Fertilite, klinikte gebelik oluşturabilme olanağı olarak tanımlanmaktadır [10]. İnfertilite ise gelişmiş veya daha az gelişmiş ülkelerde yaygın olarak görülen ve çiftlerin en az 1 yıl süre ile korunmasız ve düzenli cinsel birlikteliklerine rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanan ciddi bir tıbbi sorundur. Dünya çapında üreme dönemindeki çiftlerin %8 ile %12'sini etkilediği ve insidansının büyük oranda yükseldiği düşünülmektedir.

İnfertil çiftlerin yaklaşık olarak %85'inin belirlenebilen bir sebebi olduğu düşünülmektedir. İnfertilitenin en yaygın nedenleri arasında erkek sebepli faktörler, yumurtlama fonksiyon bozukluğu, erkek faktörü kısırlığı, tüp hastalığı, tubal obstrüksiyon, peritoneal faktörler veya servikal faktörler gibi anormallikler bulunmaktadır [11]. İnfertil çiftlerin %15'inde ise tanımlanamayan infertilite görülmektedir. Bunun yanında sigara ve obezite gibi yaşam tarzını olumsuz etkileyen çevresel faktörler infertiliteyi tetikleyebilmekte ve doğurganlığı olumsuz yönde etkileyebilmektedir [12]. İnfertilite için risk faktörleri olan hastalarda veya kadın partnerin yaşının 35'den büyük olması durumunda değerlendirmeye daha erken dönemlerde başlanabilmektedir.

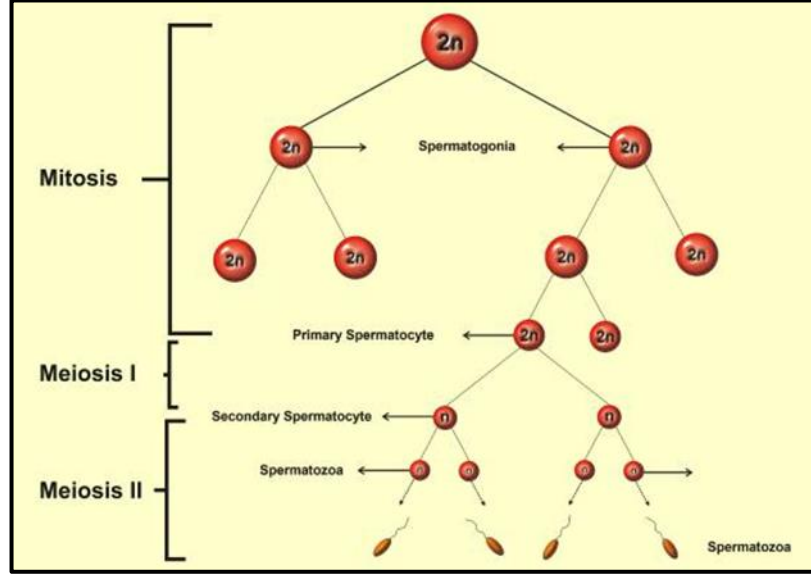
İnfertilite tedavileri için düşünülen yöntemler genellikle karmaşıktır ve yüksek maliyetli tedavilerle gebe kalma şansı dengesi, infertilite süresi, erkek ve kadının yaşı gibi faktörlere dayanmaktadır. Buna bağlı olarak bazı tedaviler uygulanmaktadır. Normal bir gebelik şansı elde edebilecek tedaviler, oligomenore/amenore durumlarında yumurtlama indüksiyon yöntemleri ve açıklanamayan kısırlık için yardımcı gebelik yöntemlerini içermektedir [13]. Fakat uygulanan bu tedavilerde hem başarısızlık ihtimaliyle hem de tedavi sürecinde zorluklarla karşılaşmaktadır. Bundan dolayı tedavi uygulanan hastalar maddi ve manevi olarak yıpranabilmektedir. Tüp bebek (IVF), yardımcı üreme teknolojisinde kullanılan en yaygın tekniktir ve görülen başarı oranı genel olarak %40'tır.

2.1.1. Erkek İnfertilitesi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) istatistikleri incelendiğinde, dünya çapında yaklaşık 50-80 milyon insanın infertiliteden muzdarip olduğu ve bütün infertilite vakalarına bakıldığında erkeklerin yaklaşık %20-30'unun infertiliteden tek başına sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bunun dışında erkeklerin bütün infertilite vakalarının da %50'sine katıldığı düşünülmektedir [14]. İnfertilitenin teşhis edilmesi temel olarak semen analizine dayanmaktadır.

Erkeklerde infertilitenin sebepleri tamamen aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte erkek infertilitesinin ortaya çıkmasının, hem geri döndürülebilir hem de geri döndürülemez koşullar dahil olmak üzere çeşitli nedenleri olduğu düşünülmektedir [15]. Bunlardan bazıları, kesinliği olmamakla birlikte %2 ila %5 oranında endokrin bozuklukları, %5 oranında sperm taşıma bozuklukları (vazektomi gibi), %65 ila %80 oranında birincil testis kusurlarını içerebilmektedir [16]. Bunların dışında eşlerden her ikisini de etkileyebilecek diğer faktörlerin, bireylerin yaşı, ilaçları, cerrahi geçmişi, çevresel toksinlere maruz kalma, genetik problemler ve sistemik hastalıklar olabileceği düşünülmektedir.

Spermatogenez, erkek doğurganlığının en önemli basamaklarından biridir [17-19]. Spermatogenezin doğal oluşumunda ki en ufak bir değişiklik bile erkeklerde kısırlığa neden olabilmektedir. Yapılan birçok çalışma, spermatogenez başarıyla tamamlamak için testosteron ve FSH'nin gerekli olduğunu göstermektedir [20-23]. Spermatogenezin herhangi bir evresindeki bozukluğun geri dönüşü olmayan sonuçlara yol açabileceği ve ne kadar önemli olduğu düşünüldüğünde meydana gelebilecek bir sorunun erkek infertilitesi ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir. Aşağıda ki figürde her evre için en önemli özelliklerden bazıları gösterilmektedir.



Şekil 2.1: Spermatogenez süreci.

İnsan genomunun %10'unun üreme ile ilgili olduğu yapılan son çalışmalarda kanıtlanmıştır [24]. Bütün bunlar düşünüldüğünde, erkek fertilitasını etkileyen bir mutasyonun diğer fizyolojik süreçleri de etkileyebileceği düşünülmektedir. Erkek üreme hormonu hipotalamik-hipofiz-gonadal eksen olarak bilinir ve hipotalamik, hipofiz ve testis bezleri olmak üzere 3 ana bileşenden oluşmaktadır. Bu hormon erkek cinsel gelişimi ve işlevinde doğru hormon konsantrasyonunu sağlamak için düzenli olarak çalışmaktadır. Sistemdeki en ufak bir sapma kısırlığa neden olabilmektedir [25-27]. Beyin gonadotropik salgılatıcı hormon (GnRH) üretilmezse, bu bozukluk testosteron eksikliğine ve sperm üretiminin durmasına neden olabilmektedir. Benzer şekilde, hipofizin yeterli miktarda luteinize edici hormon ve foliküler uyarıcı hormon üretememesi durumunda, testislerin uyarılması engellenmektedir. Bu da testosteron ve sperm üretilmemesine sebep olmaktadır [28,29]. Hipofiz yetmezliğinden muzdarip olan hastalarda, diyabetes mellitus, kalp hastalığı ve kemik defektleri gibi komplikasyonlara yol açabilen uzun süreli hormonal tedaviler gerekebilmektedir. Bunun aksine, yüksek LH ve FSH konsantrasyonları, düşük testosteron konsantrasyonları ile ilişkilendirilmektedir ve spermatogenezde kusurlara sebep olabilmektedir. Prolaktinin yükselmesi ayrıca sperm üretiminin azalmasına, libidoya ve iktidarsızlığa neden olabilmektedir. Oligospermisi olan kişilerin %11'inde hiperprolaktemi kısırlığa yol açabilmektedir.

Bir başka yönden tüm erkek kısırlık vakalarının yaklaşık %10-15'i kromozomal bozukluklar ve genetik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. İnfertilitenin düşünülen sebeplerinden biri de, 500-1000 yeni doğan erkekten 1'ini etkileyen Klinefelter sendromudur [30]. Klinefelter sendromu, hücre bölünmesi esnasında kromozom ayrılmama hatası nedeniyle gamet oluşumu sırasında ortaya çıkan bir kromozomal bozukluktur. Erkeklerde daha küçük testislere sahip olması, testosteron ve sperm üretiminin azalmasına neden olmaktadır [31]. Erkek vücudundaki testosteronun azalması durumunda, bu bireyler için canlı sperm üretiminde genel bir düşüşle sonuçlanabilmektedir. Bu da onları doğurganlık tedavilerine yönelmeye zorlamaktadır [32].

Bunların dışında, sigara, radyasyon maruziyeti, alkol veya uyuşturucu kullanımı ve stres gibi faktörlerin de oksidatif strese neden olabilecek erkek doğurganlığına sebep olduğu bildirilmektedir [33]. Bu tür zararlı maddelerin testislere zarar verebileceği [34] ve spermleri öldürebileceği [35,36] düşünülmektedir [37].

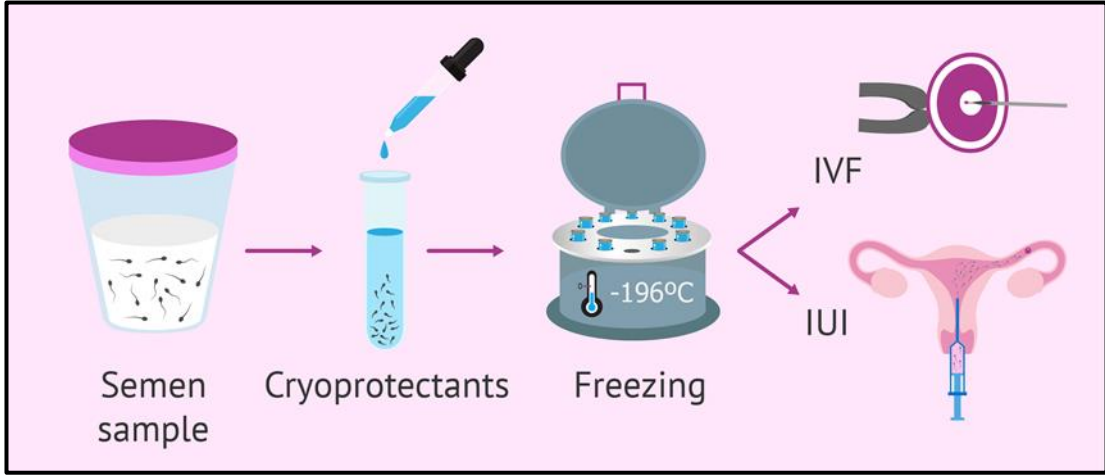
Bir erkeği infertilite açısından değerlendirmenin temel amacı, infertiliteye katkıda bulunan faktörleri belirlemek, geri dönüşümlü olanlar için tedavi önermek, yardımcı üreme tekniklerine (YÜT) aday olup olmadığını belirlemek ve tedavi edilemeyen durumlar için tedaviler ve yaklaşımlar sunmaktır [17].

2.2. Sperm Kriyoprezervasyonu

Sperm kriyoprezervasyonu, sperm hücrelerini içeren semen sıvısının daha sonra gerekli olduğu zaman kullanılabilmesi için kriyoprotektanlar kullanılarak sperm hücrelerini korumak için kullanılan bir dondurma yöntemidir. Sperm kriyoprezervasyonu işlemi yapıldıktan sonra istenildiğinde ve herhangi bir süresi olmadan başarılı bir şekilde kullanılabilir [37]. Kriyoprezervasyon uygulanan kişiler tedaviyi farklı bir zamanda veya yerde istediği durumlarda kullanabilmektedir. Bunun dışında erkeklerde vazektomi veya kemoterapi, radyasyon tedavisi veya cerrahi gibi doğurganlıklarını tehlikeye atabilecek tedaviler uygulandığında doğurganlığı koruma aracı olarak kullanılabilir.

Kriyoprezervasyon teknolojisindeki birçok gelişme, erkek ve dişi gametler, küçük çok hücreli organizmalar ve embriyolar gibi daha karmaşık organizmalar gibi

çok çeşitli hücre tiplerinin düşük sıcaklıkta korunmasını sağlamaktadır. Bu gelişmeler ayrıca koruma yöntemlerinin geliştirilmesine de sebep olmaktadır. İnsan spermının kriyoprezervasyonu 1960'larda [38] tanıtılmıştır ve birçok yer ve zaman sınırlamasının üstesinden gelmiştir. Bu teknik şimdi yardımcı üreme teknolojilerinin (YÜT'ler) ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır.



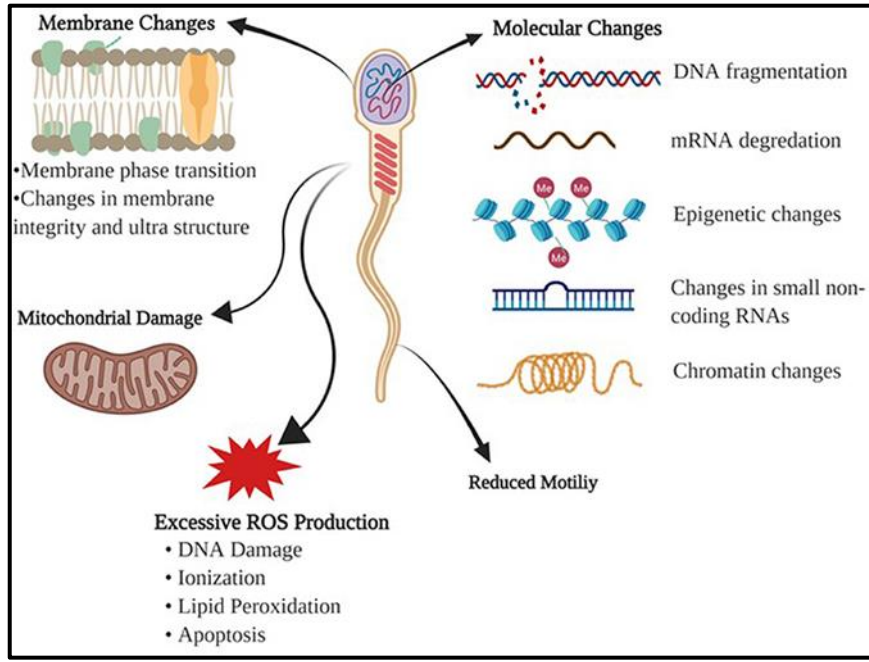
Şekil 2.2: Sperm Kriyoprezervasyon Süreci.

Sperm kriyoprezervasyonuna ilişkin ilk bulgular, yaklaşık 200 yıl önce Lazaro Spallanzani'nin (1776) spermleri karda soğutarak korumaya çalıştığı zamanlara dayanmaktadır [39]. Daha sonra, Polge'nin gliserolün kriyoprotektan özelliklerini keşfetmesi ile birlikte önemli ölçüde bilimsel ilerleme kaydedilmiştir. Bu ilerlemeler, doğurganlığın korunması alanında bir dönüm noktası olmuştur [40]. Bu gelişmelerden sonra, farklı türlerin spermlerinin dondurularak saklanmasına yönelik tekniklerde önemli gelişmeler olmaya devam etmiştir. Dondurularak saklanan spermlerden üretilen en erken yavrular 1951 (inek), 1953 (insan), 1957 (domuz, at) ve 1967 (koyun)'da bildirilmiştir [41]. 1960'larda sperm kriyobankaları sığırlar ve 1970'lerde insanlar için geliştirilmiştir [42]. Günümüzde hayvanların suni tohumlamasında ve insan destekli üreme teknolojisinde rutin olarak kriyoprezerve edilmiş sperm kullanılmaktadır [43]. Bununla birlikte, sperm kriyobiolojisinde çok sayıda başarı elde edilmesine rağmen, kriyoprezervasyondan sonra canlı spermatozoayı en uygun şekilde geri kazanabilen teknikler için araştırmalar devam etmektedir.

İnsan sperm kriyoprezervasyonunun çok sayıda başarısına rağmen, sperm kriyoprezervasyon prosedürü hala sperm yapı ve işlevinde sperm kriyo hasarlarına neden olmaktadır. Buna örnek olarak, sperm morfolojisinde, sperm proteomu ve transkriptomu, sperm mitokondrisinin metabolik aktivitesi, sperm membran bütünlüğü ve akışkanlığı değişiklikleri verilebilmektedir [44]. Dondurarak saklama süreçlerine yanıt olarak, geniş araştırmalar, dondurma-çözülmenin, aşırı dehidrasyon, sperm yapısındaki zararlı değişiklikler, morfolojik değişiklikler, mitokondri hasarı, apoptoz ve sperm DNA fragmentasyonu, plazma zarında ve akrozom kapağında hasar gibi hücrel hasar oluşturmaktadır. Bunun gibi çeşitli etkiler nedeniyle sperm canlılığı ve hareketliliği de azalmaktadır. Dondurma prosedürlerinin sonuçları hala tamamen araştırılmamış olsa da, dondurma tekniklerinin geliştirilmesinin temel olduğu durumlar hala mevcut olduğu düşünülmektedir [45,46].

Kriyoprezervasyondan sonra spermde tek zincir kırılmalarında, yoğunlaşma ve DNA parçalanmasında bir artış olduğu yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla gösterilmektedir. Bu etkiler yavru DNA'sındaki mutasyon riskini artırabilmektedir. Son derece iyi kontrol edilen soğutma düzenlerinin kullanımı ve antioksidanlar sonuçları iyileştirebilmektedir [47].

Bunun gibi dondurma çözme sonrasında sperm parametrelerinde oluşan olumsuz etkilerin derecesi, spermin dondurulduğu andaki kalitesi, genetik özellikleri, dondurma yöntemi, kullanılan kriyoprotektan, donduran kişi gibi faktörlerden de etkilenebilmektedir [48]. Sperm kriyoprezervasyon ve çözme teknikleri, kullanılan kriyoprotektan, solüsyonlar ve saklama yöntemleri gibi çok sayıda çeşitlilik gösterebilmektedir.



Şekil 2.3: Dondurma-çözülmenin sperm hücresi üzerindeki zararlı etkileri.

Sperm kriyoprezervasyonunun, radyoterapi veya kemoterapiden önce erkek fertilitésinin korunması, testis yetmezliği veya ejakülasyon disfonksiyonuna yol açabilecek durumlarda özellikle önemli olduğu düşünölmektedir. Aslında dondurarak saklama çiftlere gelecekte çocuk sahibi olma şansı sunabilecek en önemli yöntem gibi görünmektedir [49]. Özellikle, farklı tedavilerle ilişkili riskler bulunmaktadır ve bu riskler birkaç faktöre bağlanmaktadır. Bunlar tedavi sırasında hastanın yaşı, doz, bölge ve tedavi türü olabilmektedir. Ayrıca diyabet ve otoimmün bozukluklar gibi bazı habis olmayan hastalıklar da testis hasarına yol açabilmektedir. Bu koşullarda da kriyoprezervasyon tavsiye edilmektedir [50].

Ayrıca, kriyoprezervasyon, genellikle “sperm toplama stresi”, bazı duygusal durumlar veya doğumdaki diğer taahhütlerle ilişkili olan başarısız boşalma nedeniyle oluşan rahatsızlıklardan kaçınmak için semen örneğini önceden dondurmaya karar veren hastalarda rutin olarak gerçekleştirilmektedir. Son olarak, herhangi bir nedenden dolayı gametogeneze müdahale edebilecek zararlı ajanlara maruz kalan deneklerde doğurganlığı korumak için sperm dondurması tavsiye edilmektedir [51].

2.2.1. Sperm Kriyoprezervasyon Teknikleri

Sperm 3 yöntem kullanılarak dondurulmaktadır. Bunlar kontrollü hızlı, yavaş soğutma ve daha yeni bir işlem olan vitrifikasyon olarak bilinmektedir. Vitrifikasyon ve yavaş programlanabilir dondurma karşılaştırılmış ve vitrifikasyon çözme sonrası daha iyi bir hareketlilik sağlamaktadır [52].

Yavaş dondurma tekniği ilk olarak Behrman ve Sawada [53] tarafından önerilmiştir ve yarı programlanabilir bir dondurucu kullanarak manuel ya da otomatik olarak iki veya üç adımda gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem 2-4 saatlik bir süre boyunca aşamalı sperm soğutmasından oluşmaktadır. Manuel yöntem, adım adım kriyoprotektan eklenirken ve numuneler sıvı nitrojene daldırıldıktan sonra semenin sıcaklığı düşürülerek eş zamanlı olarak gerçekleştirilmektedir [54]. Numunenin oda sıcaklığından 5°C'ye kadar optimum başlangıç soğutma hızının 0,5–1°C/dk [55] olduğu gösterilmektedir. Numune daha sonra 1–10°C/dk hızında 5°C'den -80°C'ye dondurulmaktadır. Numune daha sonra -196°C'de [56] sıvı nitrojene daldırılmaktadır. Manuel tekniklerle başarılı sperm dondurma gösterilmesine rağmen, bu prosedürün tekrarlanabilirliği bazı problemler doğurabilmektedir. Bu nedenle programlanabilir dondurucular araştırılmaktadır [457]. Bazı yazarlar, manuel ya da otomatik olmasına bakılmaksızın, geleneksel yavaş dondurma kullanmanın, buz kristalizasyonuna sebep olması nedeniyle spermde yoğun kimyasal-fiziksel hasara neden olduğunu düşünmektedir [58].

Hızlı dondurma olarak bilinen bir diğer yöntem ilk olarak Sherman [59] tarafından önerilmiştir. Bu teknik, pipetler ve nitrojen buharları arasında 8–10 dakika boyunca doğrudan temas ve -196°C'de sıvı nitrojene daldırma gerektirmektedir. Azot buharlarının içinde, aşağıdaki sıvının mesafesinin ve hacminin bir fonksiyonu olarak bir termal gradyan bulunmaktadır. Numune başlangıçta eşit hacimde soğuk kriyoprotektan ile damla damla karıştırılmaktadır. Daha sonra bu karışım pipetlere yüklenir ve 4°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmaktadır. Kamışlar 15 dakika boyunca sıvı nitrojen seviyesinin (-80°C) 15-20 cm yukarısına yerleştirilmektedir. Daha sonra pipetler sıvı nitrojene daldırılmaktadır. Soğutma sırasında, iki uç arasındaki ısı farkını en aza indirmek için pipetlerin yatay konumda yerleştirilmesi tercih edilmektedir. Bu tekniğin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar arasında

düşük tekrarlanabilirlik bulunmaktadır. Sıcaklık düşüş eğrisi kontrol edilememekte ve donma sıcaklıkları -70, -80 ve -99°C arasında değişebilmektedir [60].

Kullanılan yöntemlerden son olarak vitrifikasyon, buz kristali oluşumunu önleyen cam benzeri bir katılaşma üretmek için hücrelerin son derece yüksek oranda soğutulması yöntemidir [61]. Geleneksel yavaş dondurma ile kıyaslayacak olursak vitrifikasyon, oldukça basit bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Bir semen numunesi, yüzdürme yöntemi kullanılarak işlenmekte ve daha sonra uygun bir kap benzeri kriyoloop'a veya pipetlere yüklenmektedir. Bunlar, doğrudan LN 2'ye (-196 °C) daldırılarak, daha sonra bir kriyo odasının soğuk yüzeyiyle (-180 °C) doğrudan temas ettirilerek veya LN 2'de uzun süreli depolama ile önceden soğutulmuş alüminyum bloklar kullanılarak hızla soğutulmaktadır [62]. Ancak bu yöntem başarı şansının düşük olmasından dolayı çok fazla tercih edilmemektedir.

Çok farklı protokol kullanılmaktadır ancak genellikle kriyoprotektanlar semenle eşit hacimde damla damla eklenmektedir. Daha sonra oda ısısında yavaşça karıştırılıp bir süre oda ısısı ya da 37°C'de bekletilmektedir. Kullanılan kriyoprotektanın hücrelerle etkileşmesi gerekmektedir çünkü kriyoprezervasyonun verimliliği, kriyoprotektanlarla hücreler arasındaki etkileşim süresinin bir fonksiyonudur [63]. Yapılan çalışmalar incelendiğinde çok sayıda sperm kriyoprezervasyon tekniği bulunmaktadır. Bu tekniklerde çözme sonrasındaki vitalite ve motilite oranları dikkate alınmaktadır ve her laboratuvar kendi sonuçları doğrultusunda en uygun yöntemi belirleyip kullanmaktadır. Kullanılan yöntem ne olursa olsun, iyi sonuçlar elde etmek için kriyoprezervasyondan önce ve sonra tüm adımları doğru bir şekilde gerçekleştirmenin, daha uygun kriyoprotektanların seçiminin ve çözdürme prosedürünün fazlasıyla önemli olduğu düşünülmektedir.

2.2.2. Sperm Çözme Teknikleri

Dondurma yöntemlerinde olduğu gibi çözme yöntemleri de farklılık göstermektedir. En uygun sperm hareketliliği 40°C'de çözülme ile sağlanmaktadır. Diğer yandan, çözülme sıcaklığının sperm canlılığı, akrozomal durum, ATP içeriği ve DNA üzerinde çok fazla etkisi olmadığı düşünülmektedir [64]. Aynı şekilde çözme işlemi için de farklı teknikler geliştirilmiştir [65]. Çözme prosedürü önemli bir basamaktır. Bu sebeple hücrenin, ani termal değişikliklerden

uzak tutulması ve bu hücrenin normal biyolojik aktivitelerini geri kazanmasına izin verilmesi gerektiği düşünülmektedir. Genel olarak kriyoprezervasyon protokolleri 37°C'lik bir eritme sıcaklığı kullanmaktadır. Daha yüksek çözülme sıcaklıkları daha hızlı ısıtmaya izin verebilmektedir. Ancak hücre hasarıyla ilişkili riskler nedeniyle kullanılmamaktadır. Semen çözüldükten sonra kültür ortamında yıkanmakta ve santrifüj edilerek kriyoprezervasyon ortamından ayrılmaktadır [66].

2.2.3. Sperm Kriyoprezervasyonunda Kullanılan Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar, spermleri buz kristalizasyonundan kaynaklanan donma hasarından korumak için kullanılmaktadırlar. Bunlar düşük moleküler ağırlıklı ve oldukça geçirgen kimyasallardır. Gliserol, etilen glikol, dimetil sülfoksit ve 1,2-propandiol olarak bilinen dört ana kriyoprotektan bulunmaktadır. Kriyoprotektanlar 3 şekilde etki etmektedir: bir maddenin donma noktasını düşürerek, numunenin sıvı fazında bulunan tuzların ve çözünen maddelerin miktarını azaltarak ve sperm içinde buz oluşumunu azaltarak. Kriyoprotektanlar eşit hacimde semen içine damla damla eklenmekte, oda sıcaklığında hafifçe karıştırılmakta ve daha sonra hücreler ve ortam arasında uygun dengenin sağlanması için 37°C'de 10-15 dakika süreyle yerleştirilmektedir [45]. Bu ortamın hücrelerle etkileşime girmesi gerekmektedir.

Sperm kriyoprezervasyon sürecinde en yaygın olarak kullanılan kriyoprotektan yumurta sarısı ile karıştırılmış gliseroldür [67]. Gliserol, nüfuz edici yapısı, membran yapısı, lipid çift tabakasının geçirgenliği ve stabilitesi gibi sebeplerle insan spermi için en yaygın olarak kullanılan kriyoprotektan olduğu düşünülmektedir. Gliserol kullanımı, kalitesiz spermlerin dondurulmasına izin vermesine rağmen, membran ve akrozom yapısı üzerinde olumsuz bir sonuç verdiği düşünülmektedir [55]. Sherman [59] çalışmalarında, gliserol kullanımının, dalgalı bir zarın varlığı, akrozomal iç zarda değişiklik, çekirdek homojensizliği ve mitokondriyal tepelerde düzensizlik gibi birkaç değişikliğe neden olabileceğini göstermiştir. Bu gözlemler sebebiyle, 4°C'de kullanıldığında insan spermleri üzerinde zararlı etkileri olan dimetil sülfoksit (DMSO) ve 1,2-propandiol gibi diğer koruyucu maddeler önerilmektedir [68]. Bunun dışında, propilen glikol, sukroz, glukoz, rafinoz, glisin gibi birçok farklı ajan da kullanılabilir. Kriyoprotektan ajanların eklendiği ya da kombinasyon halinde kullanıldığı hazır solüsyonlar da bu amaçla kullanılabilir [69-71].

2.2.4. Kriyoprezervasyondan Etkilenen Sperm Parametreleri

Dondurma öncesi durum ile kıyaslandığında çözme sonrası spermelerin hareketliliği, plazma zarı işlevselliği, akrozom bütünlüğü ve genel canlılığı tipik olarak azalmaktadır. Nijs ve diğerleri, 2009, kriyoprezervasyondan sonra hareketli spermatozoa yüzdesinin %50,6'dan %30,3'e düştüğünü bildirmiştir. Bununla birlikte, motilitenin hangi mekanizma ile azaldığı tam olarak bilinmemektedir. Çözme sonrasında hareketsiz spermatozoa yüzdesi ile mitokondriyal kusurlar arasında sağlam bir ilişki bulunmaktadır. Ayrıca, kriyoprezervasyon işlemi sırasında hücre içi buz kristali oluşumundaki değişiklikler membran proteinlerinde değişikliklere yol açabilmektedir. Bunun da sperm canlılığını azaltabileceği öne sürülmüştür.

Diğer hücre tipleri ile karşılaştırıldığında, sperm, zarın yüksek akışkanlığı ve düşük su içeriği nedeniyle kriyoprezervasyon hasarına karşı daha az duyarlı görünmektedir. Buna rağmen, kriyoprezervasyon sperm yapısında ve işlevinde zararlı değişikliklere yol açabilmektedir [72]. Kriyoprezervasyon sırasında hücre hasarının en iyi bilinen nedeni, hücre içi veya hücre dışı buz kristallerinin oluşumudur. Dondurma işlemi sırasında, soğutma hızı, spermdeki kriyo hasarlarının boyutunu belirlemede önemli bir rol oynamaktadır. Hızlı bir soğutma hızı, suyun zarı dışarı akışı bozulduğundan ve aşırı soğutmayı indüklediğinden, şiddetli hücre içi buz oluşumuna neden olmaktadır. İnsan sperminin dondurulması-çözülmesi sırasında, hücrede buz kristallerinin oluşumuyla termal şok, hücresel dehidrasyon ve ozmotik şok gibi çeşitli zararlı süreçlerin meydana gelebileceği rapor edilmektedir [73].

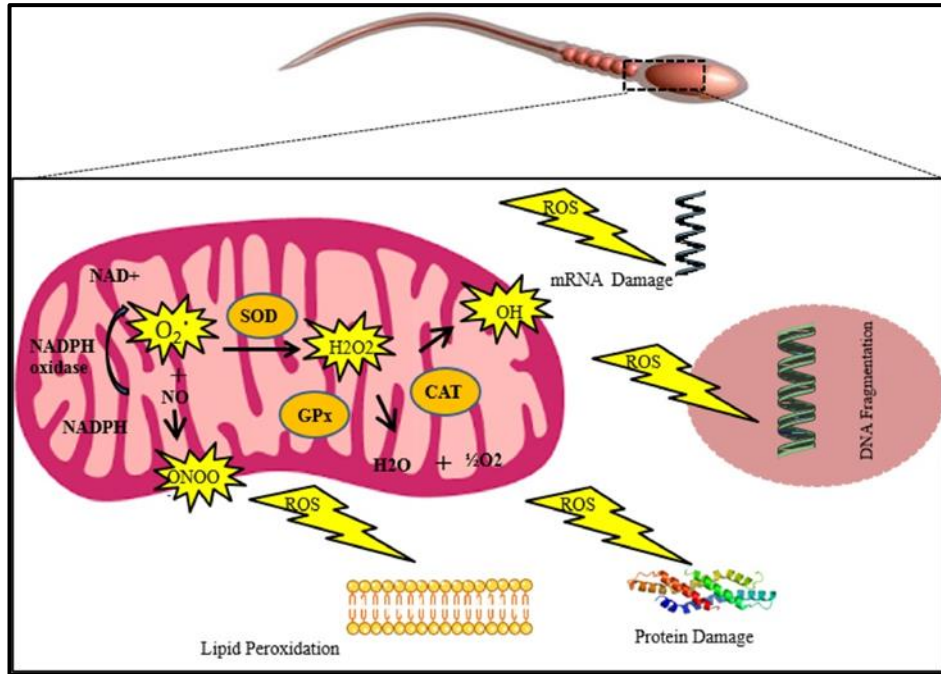
Oluşan buz kristalleri zarları kırmakta ve organ fonksiyonunu etkilemektedir. Bu durum, hücre bozulmasına neden olmaktadır. Diğer yandan, çok yavaş bir soğutma hızı, suyun iç ortamdan dış ortama akışını belirleyerek çözünen madde konsantrasyonunu ve ozmotik basıncı arttırmaktadır. Bu durum, yüksek çözünen konsantrasyonu nedeniyle suyun hareketi, dehidrasyon ve toksisite hasarı ile ilişkili hücre hacmi değişikliklerine yol açabilmektedir [74,75].

ROS üretimi ve spermdeki düşük antioksidan enzim aktivitesi de, sperm canlılığında azalmaya yol açabilen apoptotik yolları indüklemektedir. DNA bütünlüğünün hücre dondurulması sırasında bozulduğu düşünülmektedir. Çünkü

kriyoprezervasyon mitokondriyal membran özelliklerini kolayca değiştirmekte ve ROS üretimini arttırmaktadır. Bu daha sonra DNA'nın oksidasyonu ile sonuçlanarak yüksek frekanslarda tek ve çift zincirli DNA kırılmaları üretmektedir. Ayrıca donma sonrası, DNA hasarının başka bir nedeninin DNA onarım enzimlerindeki kusurlar olduğu bildirilmiştir [76].

Kriyoprezervasyon sırasında spermdeki DNA değişikliklerine, nükleoprotein yapısının, disülfid bağlarının ve DNA-protamin kompleksinin bozulmasına yol açan oksidatif stres ve apoptozu indükleyen faktörlerin neden olabileceği varsayılmaktadır. Ayrıca normal morfolojiye sahip olan spermiler ile anormal morfolojiye sahip spermiler kıyaslandığında, anormal morfolojiye sahip olan spermilerin kriyoprezervasyon sırasında DNA hasarına daha duyarlı olduğu gösterilmektedir. [77].

Bunun aksine, yapılan diğer çalışmalar kriyoprezervasyonun sperm DNA'sının kararlılığını etkilediğini göstermektedir. Bu farklılık, dondurma yöntemi veya DNA bütünlüğü değerlendirmesi gibi faktörlerle ilgili olabilmektedir. Ancak Isachenko ve diğerleri [78], vitrifikasyon veya hızlı dondurma tekniklerini takiben DNA bütünlüğünde önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir.



Şekil 2.4: Kriyoprezerve edilmiş spermatozoalarda antioksidan kapasite ve sperm kalitesinde azalmaya yol açabilecek olası hücreler arası olaylar.

Şekil Düşük sperm kalitesine yol açan, kriyoprezerve edilmiş sperm mitokondrilerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin bir özetini göstermektedir. NADPH = dihidronikotinamid-adenin dinükleotit fosfat; NAD = nikotinamid adenin dinükleotit; O_2^\bullet = süperoksit; H_2O_2 = hidrojen peroksit ; SOD = süperoksit dismutaz; ONOO = peroksinitrit; GPx = glutatyon peroksidaz; CAT = katalaz.

2.2.5. Kriyoprezervasyon ve İn Vitro Fertilizasyon

Kriyoprezervasyonun, günümüzde bozulmuş sperm hareketliliğini arttırdığı ve döllenme oranını azalttığı düşünülmektedir. İnsan sperminin donma-çözme prosedürü, döllenme oranını düşürerek, kromatin yapısına zarar verebilmektedir. Ancak, kriyoprezervasyonun sperm fertilizasyon kapasitesi üzerindeki etkisi kesin olarak belirlenmemiştir. Dondurularak çözülmüş sperm ile geleneksel tüp bebek (IVF) uygulamasının taze sperm kullanılmasına göre daha düşük gebelik oranlarına neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle kriyoprezervasyon semen örneklerinin taze sperm kullanılmadan veya geleneksel IVF'den önce alınması önerilmemektedir [79-81].

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) uygulanan diğer prosedürlerden farklılık göstermektedir. Çünkü bu prosedür başarılı bir döllenme için sadece az sayıda hareketli sperm gerektirmektedir. Bugüne kadar, literatürde taze ve dondurularak çözülmüş insan ejakülat, testis veya epididimal spermlerini karşılaştıran ICSI üreme sonuçları üzerine sadece birkaç çalışma rapor edilmiştir. Bu sonuçların hastalığın oluşma nedenine bağlı olarak farklılık gösterdiği görülmektedir.

2.3. Oksidatif Stres

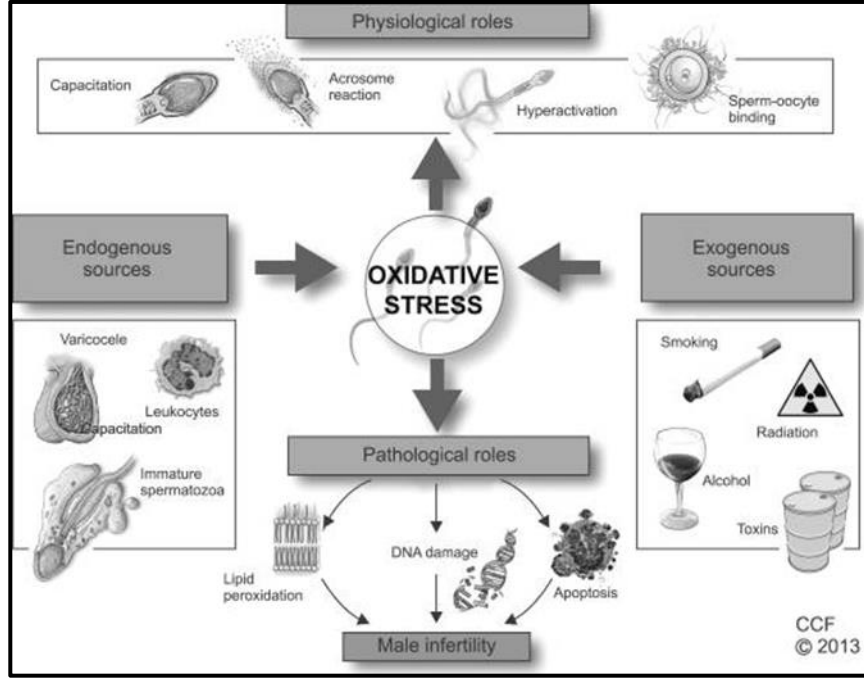
Reaktif oksijen türleri (ROS), O_2 'den oluşmaktadır ve oldukça reaktif olduğu belirlenmiş kimyasallar olarak bilinmektedir. ROS'un hücre sinyalizasyonunda çeşitli rolleri bulunmaktadır [82,83]. ROS'un her hücreye özel bir rolü vardır. Bu rollerin, protein fosforilasyonu, çeşitli transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu, apoptoz, bağışıklık ve farklılaşma gibi süreçlerde, uygun bir ROS üretimine bağlı olduğu

düşünülmektedir [84]. Farklı ROS'ların normalden fazla meydana gelmesi, 'oksidatif stres' olarak belirtilen moleküler hasara yol açmaktadır [85].

Oksidatif stres, hücreler ve dokularda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve birikimi ile biyolojik bir sistemin bu reaktif ürünleri detoksifiye etme yeteneği arasındaki dengesizliği yansıtmaktadır. ROS birkaç fizyolojik rol oynayabilmekte ve normalde oksijen metabolizmasının yan ürünleri olarak üretilmektedir. Buna rağmen, çevresel stresörler ve ksenobiyotikler ROS üretimini büyük ölçüde artırmaktadır. Bu nedenle hücre ve doku hasarına sebep olmaktadır. Oksidatif stres insan vücudu için zararlı olarak tanımlanmasına rağmen, kanser gibi klinik durumları belirli bir derecede tedavi etmek için terapötik bir yaklaşım olarak kullanılmaktadır [86].

2.3.1. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi

Oksidatif stres ve erkek üremesi arasında bir bağlantı bulunmaktadır. Gametlerin reaktif oksijen türleri (ROS) saldırısına karşı hassas olduğu düşünülmektedir. Yardımcı üreme teknikleri sırasında in vitro olarak yönlendirildiğinde, bu hücreler ROS üretme ve ROS'a maruz kalma riski taşımaktadır [87]. Hasar görmüş sperm fonksiyonları, erkek infertilitesinin en yaygın nedenleridir ve tedavisi zor bir durumdur [88]. Pek çok çevresel, fizyolojik ve genetik faktör, zayıf sperm fonksiyonları ve infertilite ile ilişkilendirilmiştir [89-92]. Bu nedenle normal sperm fonksiyonlarını etkileyen faktörlerin belirlenmesi önem taşımaktadır.

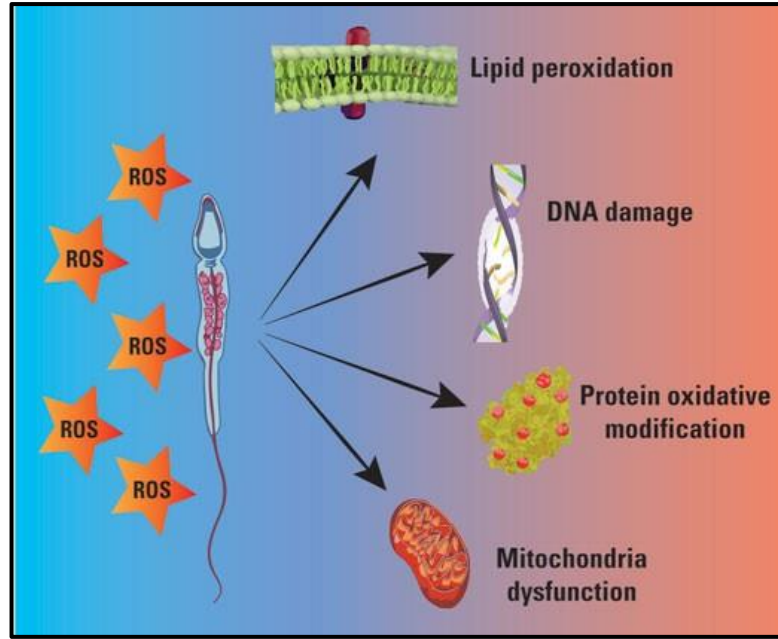


Şekil 2.5: Erkek Üremede Oksidatif Stres.

Oksidatif stres, kısırlığa önemli ölçüde katkıda bulunan bir faktör olarak kabul edilmiştir [93]. Oksidatif stres, vücuttaki reaktif oksijen türleri (ROS) ve antioksidanlar arasındaki dengesizliğin bir sonucudur. Bu da sperm hasarına, deformasyona ve nihayetinde erkek kısırlığına yol açabilmektedir. ROS'un yüksek konsantrasyonlarda bulunması, hareketlilik ve canlılık kaybına yol açan sperm patolojisine neden olmaktadır.

Sperm tarafından ROS üretimi normal fizyolojik bir süreçtir. Ancak ROS üretimi ile temizleme aktivitesi arasındaki dengesizliğin sperm için zararlı olduğu ve bunun da, erkek kısırlığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [19]. ROS'un fizyolojik seviyeleri, gametleri [94-96] ve sperm-oosit etkileşimleri [97], implantasyon ve erken embriyo gelişimi [98] gibi önemli üreme süreçlerini etkilemektedir.

Özetle son zamanlarda yapılan birçok çalışma, OS ve erkek kısırlığının patogenezindeki önemine odaklanmaktadır [99,100]. Oksidatif stres DNA hasarı [101], azalmış hareketlilik [102] ve kusurlu membran bütünlüğü ile sonuçlanmaktadır [103-105]. ROS ve metabolitlerinin DNA'ya, lipidlere ve proteinlere saldırdığı, enzimatik sistemleri ve hücre sinyal yollarını değiştirdiği, hücre ölümüne sebep olduğu için de ciddi bir durum olduğu düşünülmektedir [106].



Şekil 2.6: Oksidatif stres, sperm hücrelerini olumsuz etkiler.

2.3.2. Sperm Kriyoprezervasyonu ve Oksidatif Stres

Sperm kriyoprezervasyonunun, erkek fertilitésinin korunması için son derece önemli bir rolü olduğu düşünölmektedir [107]. Bununla birlikte, kriyoprezervasyon sürecinde, fiziksel ve biyokimyasal stresler sperm kalitesini etkileyebilmekte ve bu da canlılığının ve döllenme potansiyelinin düşmesine yol açabilmektedir [108]. Bunun büyük ölçüde reaktif oksijen türlerinin (ROS) yüksek üretimine ve buz kristali oluşumuna [109], son olarak plazma zarının tahrip olmasına ve DNA bütünlüğüne bağılı olduğu düşünölmektedir [110,111].

Oksidatif stres, spermde DNA fragmentasyonunda artış gösteren başka bir mekanizmayı temsil etmektedir. Kriyoprezervasyon sürecinin spermdeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesini arttırdığı düşünölmektedir. Bu nedenle oksidatif stres kriyo hasarlarından da sorumlu olabileceği düşünölmektedir. Sperm DNA fragmentasyonu ile ROS arasında bir bağlantı olduğunu bildiren birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle insan sperminin, doğal veya enzimatik olarak hidrojen peroksite (H_2O_2) dönüşebilen süperoksit anyonunu ürettiği bilinmektedir. Yüksek oksidan aktivitesi ve membranları geçme kabiliyetinden dolayı, H_2O_2 sitotoksik olarak kabul edilmektedir. Süperoksit ve H_2O_2 , hemen hemen her hücresel bileşene saldırabilen son derece zararlı hidroksil radikalini de oluşturabilmektedir [112-115].

Seminal plazma ve sperm, bu tür oksidatif saldırılardan korumaya yardımcı olmak için antioksidanlar içermektedir. Bununla birlikte, hücrel ROS üretimi bu antioksidan savunmaları bastırabilmektedir. Böylece oksidatif stres oluşmakta ve bu da kriyoprezervasyon sırasında meydana gelebilmektedir [116,117].

Sperm plazma zarının çoklu doymamış yağ asitleri, sitoplazması düşük konsantrasyonlarda serbest radikal enzimler içerdiğinden ROS hasarına karşı hassas olduğu düşünülmektedir [118]. ROS, malondialdehit (MDA) gibi reaktif metabolitler üreten lipid peroksidasyonu adı verilen bir kimyasal reaksiyon zincirini başlatmaktadır. Lipid peroksidasyonu, membran akışkanlığını ve membran enzimlerinin ve iyon kanallarının aktivitesini azaltmaktadır. Bu da sperm motilitesi ve doğurganlığı için gerekli olan normal hücrel mekanizmaların inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır [119]. Dondurulmuş spermelerin artırılması için dondurma çözeltilerine antioksidanlar gibi farklı maddeler eklenebilmektedir [120]. Antioksidanlar, serbest radikallerin miktarını ve oksidatif stresi azaltmaktadır. Bunun sonucu olarak yardımcı üreme teknolojisi (YÜT) tekniklerinde doğurganlık potansiyelini artırarak büyük klinik öneme sahip olduğu görünmektedir.

Sperm, oosit ve embriyonun dondurularak saklanması için hücreye özel yöntemler yıllardır incelenmektedir. Bununla birlikte, üreme hücrelerinin canlılığı ve yetkinliğinin, gamet ve embriyoların kalitesi kriyoprezervasyon tarafından indüklenen mitokondriyal hasar ve oksidatif stres (OS) ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

2.4. DNA Fragmentasyonu

DNA fragmentasyonu, DNA iplikçiklerinin parçalara ayrılması olarak bilinmektedir. Laboratuvar personeli veya hücreler tarafından olabileceği gibi kendiliğinden de meydana gelebilmektedir. Kendiliğinden veya tesadüfi DNA fragmentasyonu, bir hücrede kademeli olarak biriken parçalanmadır. Bu, Comet testi veya TUNEL testi ile ölçülebilmektedir [121].

Sperm DNA bütünlüğü, sağlıklı yavruların döllemesi ve gelişimi için oldukça önemlidir. Spermatogenezin sonraki aşamalarında spermin, genetik içeriği koruyan çekirdeğinin moleküler olarak yeniden şekillenmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Sperm DNA fragmentasyonu (SDF) hem doğal hem de yardımcı üremeyi

etkilemektedir ve etiyojisinde testiküler ve testis sonrası mekanizmalar rol oynamaktadır. Çeşitli klinik ve çevresel faktörlerin sperm DNA bütünlüğünü olumsuz etkilediği bilinmektedir [121]. Çok sayıda yayınlanan rapor, sperm DNA hasarı ile erkek kısırlığı arasında doğrudan ilişki olduğunu vurgulamaktadır [122]. Sperm motilite kusurları olan erkeklerde genellikle yüksek düzeyde sperm DNA fragmentasyonu olduğu bildirilmiştir. Sperm hücrelerindeki DNA parçalanması, in vitro fertilizasyon [123] (IVF) ve bunun intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu [124] (ICSI) için sonuçlarını gösterebilmektedir. Sperm DNA hasarını tespit etmek için Annexin V, PI çiftli florasan boyama ve TUNEL testi etkili olarak kullanılabilir [125]. DNA fragmentasyonu ilk olarak 1970 yılında Williamson tarafından birincil neonatal karaciğer kültürlerinde gözlemlenmiştir [126].

SDF'ye yol açabilen 3 ana mekanizma vardır. Bunlar abortif apoptoz, kusurlu kromatin olgunlaşması ve oksidatif stresten oluşmaktadır. Sperm DNA'sı testislerde, üreme kanallarından geçiş sırasında, sperm işleme sırasında boşalmadan sonra veya kriyoprezervasyon sırasında meydana gelebilmektedir [127].

2.4.1. DNA Fragmentasyonu ve Erkek İnfertilitesi

Sperm DNA parçalanması, gametin genetik materyalinin bütünlüğünü yansıtmaktadır. Bu parametre birçok DNA lezyonu, mutasyona uğramış onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde yaygın olarak gözlenen mutasyonları indüklediği için önem taşımaktadır [128]. Sperm DNA fragmentasyonu (SDF) erkek kısırlığı ile ilişkilidir. Aynı zamanda üreme sonuçlarını olumsuz etkilemektedir. Hem kromatin bütünlüğü hem de protaminasyon durumu, DNA hasarının derecesini belirlemektedir. Seminal sıvıda artan reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stres, sperm DNA'sına zarar verebilmektedir. Sperm kromatin bütünlüğünü ve SDF'nin kapsamını değerlendirmek için klinik laboratuvar ortamlarında çeşitli testler yapılmaktadır [129]. Yapılan bazı çalışmalarda, DNA sperm onarım mekanizmalarının kriyoprezervasyon sonrasında değiştiğini ve DNA'sı değişmiş sperm sayısında artışa neden olduğunu göstermektedir [130].

2.4.2. Sperm Kriyoprezervasyonun DNA Fragmentasyonu Üzerindeki Etkisi

Sperm kriyoprezervasyonu hem araştırma hem de üreme için yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak sperm DNA hasarı üzerindeki etkisi hala tartışılmaktadır. Çok sayıda kriyoprezervasyon yöntemi mevcuttur. Ancak bunların tümü soğutma, dondurma ve çözündürmeyi içermektedir. Çözöldükten sonra sperm motilitesi, morfolojisi ve canlılığının azalması geniş çapta çalışılmıştır [131]. Ancak buna rağmen sperm DNA bütönlüğünün çeşitli kriyoprezervasyon yöntemlerinden nasıl etkilendiğine dair tartışmalar devam etmektedir. Birçok çalışmada, bu süreçlerin sperm fonksiyonuna zarar vereceği bildirilmektedir [132].

Kriyoprezervasyon sırasında, sperm, kriyoprotektanlara maruz kalma, soğutma, dondurma ve çözölmeye gibi sebeplerle hücre içi ve hücre dışı ortamlarında çok sayıda değişikliğe uğramaktadır. Bu işlemlerin kimyasal ve fiziksel etkilerinin sperm yapısı ve fonksiyonel yetenekler üzerinde zararlı bir etkisi olduğu bilinmektedir. Dondurarak saklamanın sperm üzerindeki en baskın etkileri canlılık kaybı, motilitede azalma, morfolojik değişiklikler ve kromatin yapısındaki değişiklikler olarak bilinmektedir [133-136]. Örneğin, Hammadeh ve ark. [18] kriyoprezervasyonun membran lipid yapısında ve akrozom durumunda değişikliklere, sperm motilitesinde ve canlılığında azalmaya ve sperm DNA fragmentasyonuna neden olduğunu bildirmiştir [137].

Sağlam bir kromatin yapısının, sperm dölleme yeteneği için son derece önemli olduğu bilinmektedir. Bunun yanında kusurlu spermiyogenezin, sperm kromatini ve membran bileşenlerinin anormal yeniden şekillenmesi ile ilişkili olduğu ve bunun da morfolojik olarak anormal sperm yapısı ile sonuçlandığı gösterilmiştir [138]. Bir zamanlar kriyoprezervasyon işlemi sırasında stabil olduğuna inanılan sperm kromatin yapısının, spermlerin dondurulup çözölmeye sırasında değiştiği bulunmuştur [139-141]. Ek olarak, kriyoprezervasyon, sperm kromatininin dölleme sırasında yoğunlaşma kabiliyetini azaltıyor gibi görünmektedir [142]. Bu da dondurma-çözöürmenin sperm kromatini üzerindeki zararlı etkisini ortaya koymaktadır.

2.5. DNA Kromatin Yapı

Kromatin, ökaryotik hücrelerde bulunan bir DNA ve protein kompleksidir [143]. Kromatinin önemli bir işlevi, uzun DNA moleküllerini daha sıkı ve daha yoğun yapılara paketlemektir. Bu, ipliklerin birbirine dolanmasını önlemektedir. Diğer yandan kromatin, mitoz ve mayoz oluşumu sırasında anafaz evresinde kromozomların ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu aşamada görülen kromozomların özgün şekilleri, DNA'nın yoğunlaştırılmış kromatine sarılmasının bir sonucudur.

Kromatinin ana protein bileşenleri, DNA'ya bağlanan ve ipliklerin etrafına sarıldığı histonlardır. Genel olarak, kromatin organizasyonunun, nükleozomlar ve ökromatin üzerinde boncuklar oluşturmak, heterokromatin nükleozom dizilerinden oluşan 30 nanometrelik bir fibere sarmak [144] ve metafaz kromozomunu üretmek (mitoz ve mayoz sırasında) olmak üzere üç seviyesi bulunmaktadır. Ancak birçok organizma bu düzenlemeye uyum göstermemektedir [145].

2.5.1. Sperm Kromatin Yapı

Sperm kromatininin özel yapısının iki önemli işlevi bulunmaktadır. Bunlardan ilki DNA'yı depolama ve oosit taşıma sırasında hasardan korumaktır. Bir diğeri ooplazmada hasar görmemiş baba genomunun hızlı ve eksiksiz bir şekilde açılmasını sağlamaktır [146].

Erkek haploid genomunun farklılaşan spermatid çekirdeği içinde paketlenmesi, protaminler adı verilen küçük temel nükleer proteinler tarafından kolaylaştırılmaktadır. İnsan sperm kromatinindeki DNA'nın çoğunluğu bu proteinler tarafından bağlı olmasına rağmen, küçük bir yüzdesi nükleozom benzeri bir bileşeni korumaktadır. Histonla zenginleştirilmiş olan bu bölgeler, gelişmiş nükleaz duyarlılığına sahip olabilmektedir ve erken embriyogenezde yer alan belirli genleri göstermektedir [147].

2.5.2. Sperm Kriyoprezervasyonunun Kromatin Yapı Üzerindeki Etkisi

Kriyoprezervasyon, spermi süresiz olarak canlı tutabilen ve erkek fertilitésinin korunmasını sağlayan bir tekniktir. Semen örneklerinin soğutulmasını ve sıvı nitrojen içinde -196°C'de saklanması içermeKtedir. Bu teknik ile tüm metabolik süreçler durdurulmaktadır.

Yardımcı üreme teknolojisi (YÜT) için önemine ve başarısına rağmen, bu işlem hücre hasarına ve sperm fonksiyonunun bozulmasına neden olabilmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda, kriyoprezervasyonun kromatin yapısı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bazı yazarlar kriyoprezervasyondan sonra önemli sperm DNA hasarı bulmuşlardır [148].

Dondurarak saklama tekniklerindeki birçok başarıya rağmen, çözülme sonrası sperm geri kazanımı zayıf kalmaktadır [149]. Kriyoprezervasyonun en ciddi yan etkisi, sperm motilitésinin bozulmasıdır [150]. Son zamanlarda, sperm kriyoprezervasyonunun daha iyi değerlendirilmesi için daha hassas kriterler önerilmiştir. İnsan ejakülat spermi kromatin yoğunlaşmasında geniş bir varyasyon gözleendiğinden, diğer memeli spermelerine göre farklılık göstermektedir [151]. Bu varyasyonun, spermatogenez sırasında bireysel spermeler arasında farklı derecede disülfid bağı ve histon yer değiştirmesi nedeniyle olabileceği düşünölmektedir. Sonuç olarak, bazı ejakülatların spermelerinde kromatin yoğunlaşma sürecinin eksik olduğu bildirilmiştir [152].

Standart bir kriyoprezervasyon protokolü, donma-çözme prosedürünün kromatin yoğunlaşması, morfolojisi, membran bütünlüğü ve insan sperm hareketliliği üzerindeki etkisini araştırmaktadır. Bu da fertil donör ve subfertil hastalardan alınan semen örneğinin kriyo hasarına sebep olmaktadır. Ayrıca, spermelerin kromatin yoğunlaşması, dondurma-çözme prosedürünün sonuçlarını belirlemek için hassas bir parametre olarak kullanılabilir.

Kriyoprezervasyon ve DNA hasarı konusundaki görüşler oldukça tartışmalı olmasına rağmen, kriyoprezervasyonun sperm kromatini üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi son derece önemlidir. Aynı şekilde, sperm DNA bütünlüğünün YÜT'ün başarısı için önemli bir faktör olduğu düşünölmektedir [153,154].

2.6. PARP

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA onarımı, genomik stabilite ve programlanmış hücre ölümü gibi hücrel süreçlerde meydana gelen bir protein ailesidir [155]. PARP protein ailesinin ilk üyesi, 1963 yılında, nikotinamid mononükleotit (NMN) tarafından DNA'ya bağımlı bir şekilde aktive edilen ve PolyA üreten bir enzimin araştırmaları sırasında keşfedilmiştir. PARP ailesi 17 üyeden oluşmaktadır [156]. Bu ailenin her bir üyesi hücre içinde yapı ve işlev bakımından çok büyük farklılıklar göstermektedir. İsimlerine rağmen, bu enzimlerden sadece dördü (PARP1, PARP2, PARP5a, PARP5b) hedef substratlarına bağlı bir poli-ADP-riboz (PAR) zincirinin sentezini katalize etmektedir [157]. PARP13 hariç olmak üzere aile üyelerinin geri kalanı, sadece mono-ADP-riboz (MAR) parçasını transfer eden monoPARP'ler olarak adlandırılmaktadır [159,160].

PARP, dört ilgi alanından oluşmaktadır. Bunlar bir DNA bağlama alanı, bir kaspaz parçalı alan, bir otomatik modifikasyon alanı ve bir katalitik alandan oluşmaktadır. DNA bağlama alanı, iki çinko parmak motifinden oluşmaktadır. Hasarlı DNA'nın varlığında, DNA-bağlanma alanı DNA'yı bağlayacak ve bir konformasyonel bozulmaya neden olacaktır. Bu bağlanmanın diğer alanlardan bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmektedir. Bu, PARP'ın kaspaz bölünme inhibisyonuna dayalı programlanmış bir hücre ölümü modelinin ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır. Modifikasyon alanı, katalizden sonra proteinin DNA'dan salınmasından sorumludur. Ayrıca, bölünmeye bağlı inaktivasyonda bütünleyici bir rol oynamaktadır.

Name	Other names	Molecular weight (Da)	Amino acid length	Catalytic triad sequence	Type of ribosylation activity (PAR or MAR)	DNA dependent activation	Inhibitors available—FDA approval status
PARP1	PARP, ARTD1	113,084	1,014	H-Y-E Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	PAR Ko and Ren (2012)	Yes De Vos et al. (2012), Vyas et al. (2013)	Yes—Approved for prostate cancer, breast cancer, ovarian cancer and gynecologic cancer. Sisay and Edessa (2017), Dal Molin et al. (2018), Cortesi et al. (2021)
PARP2	ARTD2	66,206	583	H-Y-E Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	PAR Ali et al. (2016)	Yes De Vos et al. (2012), Ali et al. (2016)	Yes - Approved for prostate cancer, breast cancer, ovarian cancer and gynecologic cancer. Sisay and Edessa (2017), Dal Molin et al. (2018), Cortesi et al. (2021)
PARP3	ARTD3	60,089	533	H-Y-E Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Rodriguez-Vargas et al. (2019), Challa et al., (2021)	Yes De Vos et al. (2012)	Yes—Approved for ovarian cancer. Sisay and Edessa (2017), Dal Molin et al. (2018)
PARP4	vPARP, ARTD4	37,288	327	H-Y-E Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR (PAR when localised to vault particles) Kickhoefer et al. (1999); Challa et al., (2021)	No	Yes—Not FDA approved Dal Molin et al. (2018), Kirby et al. (2021)
PARP5a	TNKS1, ARTD5	142,039	1,327	H-Y-E Hottiger et al. (2010), Haikarainen et al. (2014)	PAR Haikarainen et al. (2014)	Postulated (De Vos et al. (2012), Haikarainen et al. (2014)	Yes—Not FDA approved. Sisay and Edessa (2017), Dal Molin et al. (2018), Cortesi et al. (2021)
PARP5b	TNKS2, ARTD6	126,918	1,166	H-Y-E Hottiger et al. (2010), Haikarainen et al. (2014)	PAR Haikarainen et al. (2014)	Postulated De Vos et al. (2012), Haikarainen et al. (2014)	Yes—Not FDA approved. Sisay and Edessa (2017), Dal Molin et al. (2018), Cortesi et al. (2021)
PARP6	ARTD17	71,115	630	H-Y-I Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Challa et al. (2021)	Undetermined	Yes—Not FDA approved. Wang et al. (2018)
PARP7	tiPARP, ARTD14	76,227	657	H-Y-I Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Challa et al. (2021)	Undetermined	Yes—Not FDA approved. Gozgit et al. (2021)
PARP8	ARTD16	95,871	854	H-Y-I Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Challa et al. (2021)	Undetermined	No
PARP9	BAL1, ARTD9	96,343	854	Q-Y-T (Hottiger et al., 2010; Xu et al., 2020; Xing et al., 2021)	MAR Yang et al. (2017)	Undetermined	No
PARP10	ARTD10	109,998	1,025	H-Y-I Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Challa et al. (2021)	No Vyas et al. (2013)	Yes—Not FDA approved. Lemke et al. (2020)
PARP11	ARTD11	39,597	338	H-Y-I Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Challa et al. (2021)	Undetermined	Yes—Not FDA approved. Kirby et al. (2018)
PARP12	ARTD12	79,064	701	H-Y-I Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Challa et al. (2021)	Undetermined	Yes—(Nonselective)—Not approved for PARP12. Dal Molin et al. (2018)
PARP13	ZAP, ARTD13	101,431	902	Y-Y-V Hottiger et al. (2010), Morales et al. (2014), Challa et al. (2021)	Catalytically Inactive—MAR Postulated Hottiger et al. (2010), Morales et al. (2014), Challa et al. (2021)	Undetermined	No
PARP14	BAL2, ARTD8	202,800	1,801	H-Y-L Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Challa et al. (2021)	Undetermined	Yes—Not FDA approved. Schenkel et al. (2021)
PARP15	BAL3, ARTD4	74,576	678	H-Y-L Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Challa et al. (2021)	Undetermined	Yes (Nonselective) - Not FDA approved for PARP15. Dal Molin et al. (2018)
PARP16	ARTD15	36,383	332	H-Y-Y Hottiger et al. (2010), Challa et al. (2021)	MAR Challa et al. (2021)	Undetermined	Yes (Nonselective)—Not FDA approved for PARP16. Sisay and Edessa (2017), Dal Molin et al. (2018), Cortesi et al. (2021), Palve et al. (2021)

Molecular Weight and Amino Acid Length were derived from UniProt database

Şekil 2.7: PARP aile yapısı ve temel işlevine genel bakış.

PARP'lar çok çeşitli hücrel süreçlerde yer almaktadır. Bunlardan en önemlisi, PARP1, DNA onarım proteinlerinin DNA hasarı bölgelerine alınması için DNA onarımı için bir yapı görevi gören çekirdekte poli-ADP-riboz zincirlerini sentezlemesidir [161]. Ayrıca protein yıkımı, stres yanıtı, RNA işleme, mitotik iğ oluşumu, kromatin yoğunlaşması, hücre metabolizması ve hücre döngüsü regülasyonu dahil olmak üzere çok sayıda hücrel süreçte tanımlanmaktadır [162].

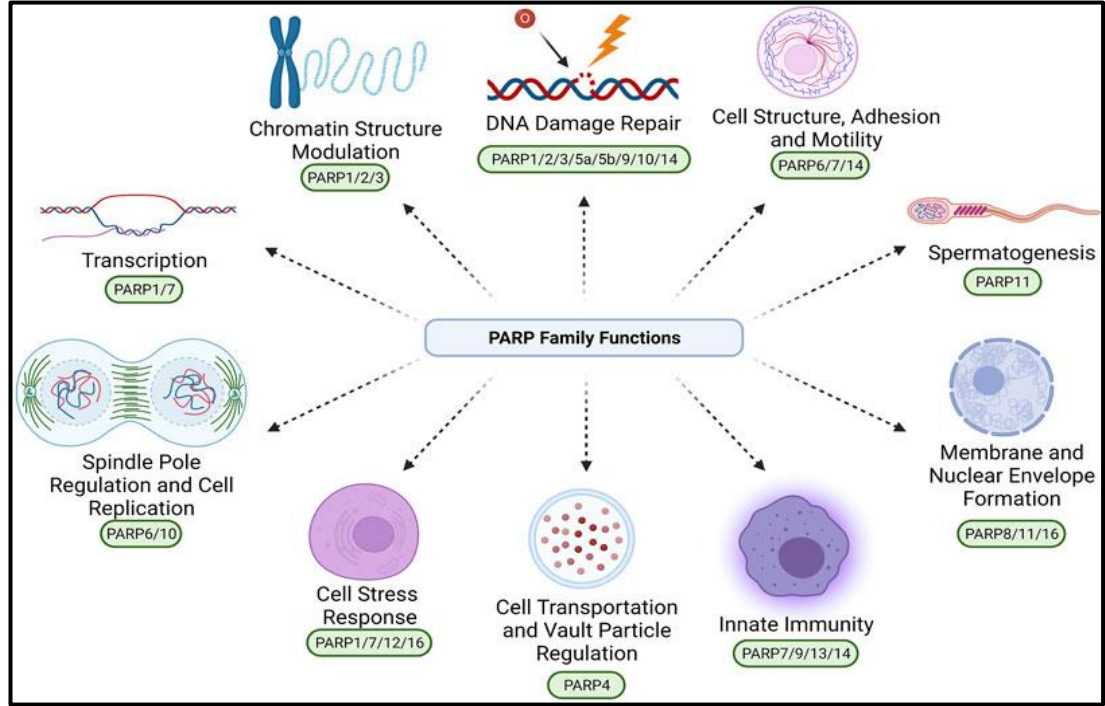
PARP'ın ana rolü, tek iplikli DNA kırığı (SSB) onarımında yer alan enzimatik yapılara sinyal göndererek metabolik, kimyasal veya radyasyona bağlı tek iplikli DNA kırılmalarına karşı hücrel yanıtı saptamak ve başlatmaktır. PARP bir SSB tespit ettiği zaman, DNA'ya bağlanmakta ve yapısal bir değişikliğe uğramaktadır.

Daha sonra diğer DNA onarıcı enzimler için bir sinyal görevi gören bir polimerik adenosin difosfat riboz zincirinin sentezine başlamaktadır. Hedef enzimler arasında DNA ligaz III (LigIII), DNA polimeraz beta ($pol\beta$) ve X-ışını çapraz tamamlayıcı gen 1 (XRCC1) gibi yapı iskele proteinleri bulunmaktadır. Onarımdan sonra PAR zincirleri, Poli(ADP-riboz) glikohidrolaz (PARG) yoluyla parçalanmaktadır [163]. ADP-riboz monomerlerinin üretilmesi için substrat olarak NAD^+ gerekmektedir. PARP'ın aşırı aktivasyonunun, hücrel NAD^+ depolarını tüketebileceği ve glukoz oksidasyonu inhibe edildiğinden, ilerleyici bir ATP tükenmesine ve nekrotik hücre ölümüne neden olabileceği düşünülmektedir [164]. Ancak yeni yapılan çalışmalarda, heksokinaz aktivitesinin inhibisyonunun, glikolizde kusurlara yol açtığı düşünülmektedir. Aynı zamanda bazal PARP aktivitesi bazal biyoenerjettiği de düzenlemektedir [165].

PARP'ın önemli olan bir işlevi de, tek zincirli DNA çentiklerinin onarımına yardımcı olmasıdır. N-terminal çinko parmakları aracılığıyla tek zincir kırıkları olan bölgeleri bağlar ve XRCC1, DNA ligaz III, DNA polimeraz beta ve bir kinazı alır. Buna baz eksizyon onarımı (BER) denir. PARP-2'nin PARP-1 ile oligomerleştiği gösterilmiştir ve bu nedenle BER'de de yer almaktadır. Ayrıca oligomerizasyonun PARP katalitik aktivitesini uyardığı bildirilmektedir. PARP-1 ayrıca histonları PARilleyerek ve kromatin yapısını gevşeterek kromatinin yeniden modellenmesi yoluyla transkripsiyondaki rolüyle bilinmektedir. Böylece transkripsiyon kompleksinin genlere erişmesine izin vermektedir [166].

PARP'ın DNA onarımında önemli bir rolü olduğuna dair kanıtlar, DNA'ya zarar veren ajanların ve radyasyona bağlı DNA hasarının PARP aktivitesinin artmasına sebep olduğu düşüncesinden gelmektedir [167]. DNA lezyonlarının birikmesi, hücrelerde PARP düzeylerinde önemli bir artışa neden olmaktadır [168]. PARP, tek sarmallı DNA kırılmalarına (SSB'ler) yanıt olarak baz eksizyon onarımında (BER) yer alır ve DNA ligaz III, DNA polimeraz beta ve XRCC1 proteininden oluşan BER kompleksinin bir bileşenidir [169]. Diğer bazı sistemlerde, modifiye edilmemiş PARP enziminin DNA zincir kırıklarına sıkıca bağlandığı ve poli ADP-ribosilasyonu takiben serbest kaldığı ve hasarlı DNA'ya onarım enziminin erişimine izin verdiği gösterilmiştir [170,172]. PARP1 ve PARP2 de etkileşime girer ve SSB onarımı ve BER yollarında ortak ortakları paylaşır. Ancak PARP2'nin ayrıca telomerik protein TRF-2 gibi benzerleri bulunmaktadır [173,179]. PARP1 inhibisyonu ile NER süreçlerinin azalmasından dolayı, PARP1'in nükleotid eksizyon

onarımında (NER) rol oynadığı da gösterilmektedir. Hem BER hem de NER, belirli alkilleyici ve kemoterapötik ajanların neden olabileceği DNA hasarının onarımını sağlayan en önemli yollardır [180].



Şekil 2.8: PARP protein ailesinin onaylanmış ve önerilen çeşitli rolleri.

PARP1, PARP ailesinin ilk ve en iyi karakterize edilmiş üyesidir. PARP2, katalitik alanında %69 benzerlik ile PARP1 ile en yakından ilişkilidir [154]. PARP-1 ve PARP-2, DNA tek zincir kırıkları ile aktive edilmektedir. Hem PARP-1 hem de PARP-2 nakavt farelerin, DNA onarımında ciddi eksikliklere ve alkilleyici maddelere veya iyonlaştırıcı radyasyona karşı artan hassasiyete sahip olduğu gösterilmiştir [144]. PARP1 ve PARP2 dahil olmak üzere bazı izoformlar en iyi DNA onarım süreçlerine katılımlarıyla bilinmektedir. Ancak buna rağmen, bunların ve diğer PARP'lerin hücre proliferasyonu ve hücre ölümü dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde önemli bir rolü olduğu son yapılan çalışmalarda açık olarak gösterilmektedir [156].

PARP için bir dizi hücresel substrat tanımlanmıştır. Bu proteinlerin çoğu, nükleik asit metabolizmasında, kromatin yapısının modülasyonunda, DNA sentezinde ve DNA onarımında yer almaktadırlar. PARP ayrıca DNA zincir kırıklarının varlığında kendini otomatik olarak değiştirir ve *in vivo* olarak poli ADP ribozun ana alıcılarından biridir.

2.6.1. PARP ve Erkek İnfertilitesi

PARP'ın aşırı aktivasyonunun, erkek kısırlığında temel bir rol oynadığı bilinen oksidatif stres (OS) ile ilişkili çeşitli hastalıkların patogeneze katkıda bulunduğu gösterilmektedir. PARP, stres uyarısının derecesine ve tipine bağlı olarak, hücreleri yönlendirmektedir. Yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar, PARP ve homologlarının testiküler germ hattı hücrelerinde varlığını göstermektedir. PARP aktivitesi, spermatogenezde DNA bütünlüğünü korumak için anahtar bir mekanizma sunmaktadır. Öte yandan, OS kaynaklı erkek üreme bozukluklarında ve insan spermünde PARP aşırı aktivasyonunun olası bir rolü olduğu son yıllarda önem kazanmaktadır.

PARP, baz eksizyon onarımında özellikle iyi araştırılmış bir role sahiptir. Bu, endojen süreçlerin neden olduğu DNA lezyonlarının yanı sıra eksojen kimyasal maruziyet ve ışınlamanın neden olduğu DNA lezyonlarını çözmek için en temel onarım mekanizmalarından birini oluşturmaktadır. PARP'ın ayrıca, germ hücrelerinin DNA hasar onarımındaki rolü de dahil olmak üzere, testis germ hücrelerinde [181] iyi belgelenmiş bir rolü vardır [182]. Bununla birlikte, insan ejakülat spermünde PARP için benzer bir rol hala araştırılmaktadır. Son on yılda, olgun ejakülat spermündeki DNA bütünlüğü ile erkek kısırlığı arasındaki ilişkiye artan ilgi görülmüştür [183]. Erkek gametlerin genomik bütünlüğüne odaklanma, genetik hastalıkların intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yoluyla bulaşmasına ilişkin artan endişe sebebiyle daha da yoğunlaşmıştır [184-187].

Sperm DNA'sının bütünlüğünü korumak, üreme ve erkek doğurganlığı için hayati önem taşımaktadır. Sperm, baz eksizyonu ve DNA zincir kırıklarının onarımı için çok sayıda molekül ve yol içermektedir. Bir DNA onarım enzimi olan PARP ve bunun homologlarının varlığı, özellikle spermatogenezin VII. aşaması sırasında erkek germ hücrelerinde gösterilmiştir. Olgun sperm ve fertil erkeklerde yüksek PARP ekspresyonu bildirilmiştir. Oksidatif stres, kromatin yeniden şekillenmesi veya hücre ölümü nedeniyle sperm DNA'sında iplik kopması olduğunda, PARP aktive olmaktadır. Bununla birlikte, PARP'ın kaspaz-3 tarafından bölünmesi onu etkisiz hale getirmekte ve PARP'ın DNA onarım özelliğini engellemektedir. Bu nedenle, bölünmüş PARP (cPARP), apoptozun bir belirteci olarak kabul edilebilmektedir. İnfertil erkeklerin spermünde daha yüksek cPARP düzeylerinin

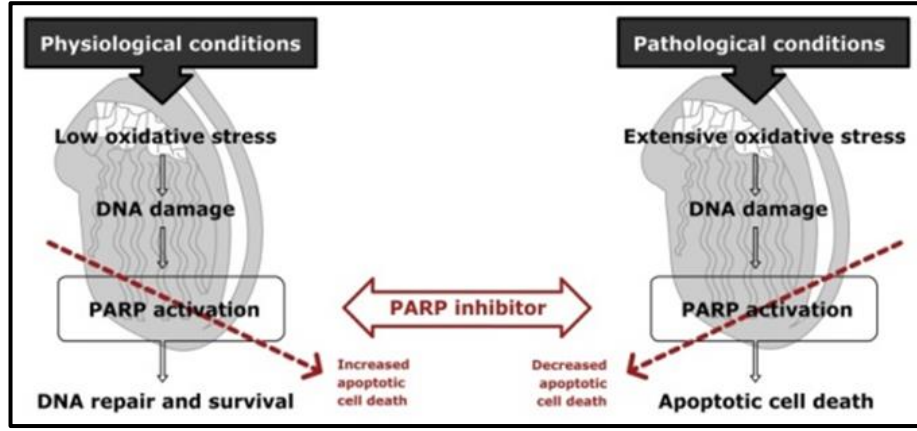
varlığı, apoptoz ile erkek kısırlığı arasındaki ilişki için yeni bir kanıt eklemektedir [188].

Erkek germ hattı hücrelerinde DNA hasarının, in vitro fertilizasyonu takiben zayıf dölleme oranları ve kusurlu implantasyon öncesi embriyonik gelişim ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Oksidatif stres aynı zamanda tek ve çift zincirli DNA kırılmalarının sıklığı ile de ilişkilidir [189]. Poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) enzimlerinin DNA zinciri kopması ile indüklenen katalitik aktivasyonu, DNA baz eksizyonunda, homolog rekombinasyonda ve homolog olmayan uç birleştirme onarım yollarında yer almaktadır [190]. Proteinlerin poli(ADP-riboz) asiyonuna aracılık eden bir enzim ailesi olan poli(ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1), DNA hasarını takiben hücrel poli(ADP-riboz)'un %90'ından fazlasının sentezini katalize etmektedir. Poli(ADP-riboz) metabolizması, DNA onarımı ve genomik stabilitenin korunması, transkripsiyonel düzenleme, sentromer işlevi ve mitotik iğ oluşumu, apoptoz, nekroz dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik yapılarda ve süreçlerde rol oynamaktadır.

PARP, yakın zamanda OS'nin büyük bir aşağı akış hücre içi yolu olarak kurulmuştur [191-193]. Oksidan türleri, DNA zinciri kırılmasının endojen indükleyicileridir ve PARP aktivasyonu için gereklidir. Enzim aktive edildiğinde, ADP-riboz parçalarının NAD'dan alıcı proteine ve kendisine transferini hızla katalize etmektedir [194]. Normal koşullar altında, katalitik olarak aktif olmayan PARP-1, nükleoplazmada bulunmaktadır [195]. PARP-1 ve diğer PARP'lar da mitokondri içinde lokalize durumda bulunmaktadır [196]. Fizyolojik koşullar veya sınırlı DNA hasarı altında, PARP-1'in birincil işlevi DNA hasarını tespit etmek ve onarmaktır. Bu nedenle PARP koruyucu bir rol oynamaktadır [197,198]. Öte yandan, DNA hasarından sonra PARP, aşırı aktivasyonu ile hücre ölümü programında çok önemli bir rol oynamaktadır. PARP-1'in patolojik koşullarda aşırı aktivasyonu, hücre içi NAD'nin hızlı bir şekilde tükenmesine neden olmaktadır [199,200]. Bu süreçte, bir NAD molekülü için iki ila dört ATP molekülü tüketilerek NAD yeniden sentezlenmektedir. Bu, glikoliz ve mitokondriyal solunum hızını yavaşlatmakta, sonunda hücrel işlev bozukluğuna ve apoptoz veya nekroz yoluyla ölüme yol açmaktadır.

Yukarıda bahsedildiği gibi, PARP'ın aşırı aktivasyonu, OS ile ilgili çeşitli patolojik durumlarda önemli bir doku hasarı mekanizmasını temsil etmektedir [201,202]. Bu nedenle, artan OS ve DNA iplik kopmalarının bir sonucu olarak

PARP yolunun aktivasyonu, OS ile ilişkili erkek kısırlığını açıklayabilmektedir. PARP aktivasyonunun testisteki olası rolü aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:



Şekil 2.9: PARP aktivasyonunun testisteki olası rolü.

2.6.2. Sperm Kriyoprezervasyonu ve PARP

Sperm kriyoprezervasyonu alanında kapsamlı gelişmeler bulunmaktadır. Buna rağmen, sperm kriyoprezervasyonu, sperm hareketliliği ve canlılığı kaybı, plazma membran geçirgenliği hatta DNA hasarı gibi bazı yıkıcı etkilere sahip olabilmektedir. Ek olarak, kriyo-hasar embriyonik gelişimi yavaşlatabilmektedir. Çok çeşitli non-invaziv faktörlerin araştırılması yoluyla kriyoprezervasyon yönteminin kullanılması, en az hasarla dondurma yaklaşımına ulaşmak için giderek daha önemli hale gelmektedir [203].

3. MATERYAL VE METOD

Projemizin deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi'nde ve İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi'nde (REMER) gerçekleştirilmiştir. Hastaların tüp bebek tedavisi ve ICSI işlemleri ise Çamlıca Medicana Hastanesi Tüp Bebek Merkezi'nde yapılmıştır. Etik onayı İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmaları Etik Kurulu'ndan 01/04/2022 tarihinde 375 nolu rapor ile alınmıştır.

Çalışmamız doğrultusunda Ağustos 2021- Ekim 2021 tarihleri arasında Çamlıca Medicana Hastanesi Tüp bebek merkezine infertilite nedeniyle başvuran 20 kriyoprezervasyon öncesi 20 kriyoprezervasyon sonrası olmak üzere 20 erkek hasta çalışmaya alınmıştır. Semen örnekleri, WHO tarafından belirlenen semen parametrelerine göre normozoospermi olan erkek hastalar arasından seçilmiştir (WHO, 2010). Bu çalışmaya 40 yaşından büyük ve 25 yaşından küçük, çalışma ortamında toksik maddelere ya da radyasyona maruz kalan, sigara ve alkol kullanan, geçirilmiş testis ameliyatı olan, kabakulak gibi enfeksiyonlara veya kronik hastalığa sahip olma durumu belirlenen ve bu kriterlerden herhangi birine sahip olan kişiler dahil edilmemiştir. Bunların semen örnekleri kriyoprezervasyon yöntemiyle dondurulmuş ve çözülmüştür. Hastalardan alınan sperm örneklerinde DNA fragmantasyon analizleri yapılmıştır. Kriyoprezervasyon öncesi ve sonrası veriler karşılaştırılarak kriyoprezervasyonun söz konusu konulara etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada, sperm örnekleri hastalardan mastürbasyon yolu ile alınmış ve hastaların onayı alınarak kullanılmıştır. Etik kurul onayı Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 01/04/2021 tarihinde ve 375 karar numarası ile alınmıştır.

Semen örneklerinin hazırlığı aşamasında semen hacmi, sperm konsantrasyonu, sperm sayısı, motilite, sperm dışı hücre ve morfoloji olmak üzere sperm parametreleri kriyoprezervasyon işlemi öncesinde belirlenmiştir. Kriyoprezervasyon işlemi öncesi elde edilen veriler tanımlayıcı istatistiksel metotlar (aritmetik ortalama, standart sapma) kullanılarak hesaplanmıştır. Sperm parametrelerinin belirlenmesi WHO kriterlerine uygun olarak yapılmıştır (WHO, 2010).

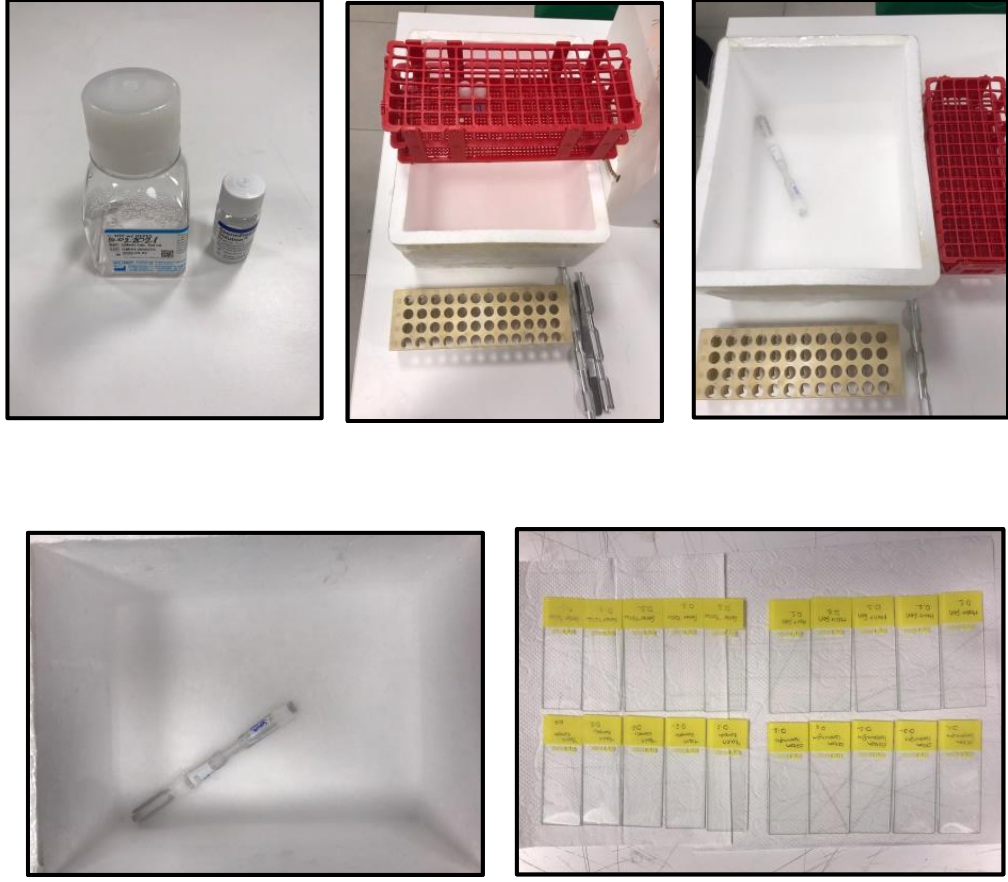
Sperm örnekleri mastürbasyon yoluyla steril bir kaba alınmıştır ve daha sonra 37°C'lik inkübatörde 20 dak bekletilerek likefiye olması sağlanmıştır. Likefaksiyon sürecinin ardından ilk 30 dakikada semen parametreleri analiz edilmiştir. Alınan tüm sperm örnekleri analiz süresince özel ısıtıcı bir tablada tutulmuştur. Tüm sperm parametrelerinin analizleri en az 100 sperm hücresi sayılarak yapılmıştır. Dondurmaya uygun olmayacak kadar düşük sperm sayısına ya da kalitesine sahip olan örnekler çalışmaya alınmamıştır. Sperm parametrelerinin analizi için en az 100 sperm hücresi sayılmıştır.

Semen örneğinin hacmi mL cinsinden ölçülmüştür. Sperm konsantrasyonu ölçümü için Makler sayım kamarasına alınan 10 µl semen örneği faz kontrast mikroskopunda 20X objektifte incelenmiştir. Sayılan 100 karede sperm konsantrasyonu mil/mL olarak belirlenmiştir. Sperm motilitesinin değerlendirilmesi için ışık mikroskobu kullanılmış, 40X objektifte en az 100 sperm sayılıp spermler 3 gruba ayrılmıştır. +4 motilite progresif motil yani ileri hızlı hareketli spermleri, +3 motilite yavaş hareketli spermleri, +2 motilite yerinde hareketli spermleri tanımlamaktadır. Sayılan spermler yüzde (%) olarak belirtilmiştir. Toplam motilite; +4 motilite, +3 motilite ve +2 motilite oranlarının toplamı olarak belirtilmiştir. Semen örneğinde bulunan lökosit ve diğer hücrelerin konsantrasyonunda Makler kamarası kullanılarak yüzde (%) olarak belirtildi. En az 100 sperm hücresi sayılmış ve morfolojik olarak normal spermler ile anormal spermler ayrılmıştır. Spermler normal, baş anomalisi, boyun anomalisi ve kuyruk anomalisi olmak üzere dört kategoride incelenmiş, sonuç yüzde olarak verilmiştir.

Hastadan alınan semen örneğinin 200'er µLsi konsantrasyon, vitalite, morfoloji ve sperm dışı hücre analizi için ayrılmıştır. Geriye kalan semen örneği önce vortekslenip 10 µL'si ile sperm DNA fragmentasyonu analizi için yayma yapılmıştır. Ardından oda sıcaklığında, 2500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Seminal plazmadan 200 µL TAS-TOS analizi için ayrılmıştır. Bu örnekler -20°C'de muhafaza edilmiştir. Semen örneklerinin kalan kısmını oda sıcaklığında, 2500 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra sperm kromatin yapı analizi (Toluidine Blue boyama) ve proteinlerin (PARP) immünohistokimyasal analizi için sperm yayma işlemi yapılmıştır. Lam üzerine 10 µL sperm örneği konulup lamel yardımıyla yayması yapılmış ve kapalı serin bir ortamda muhafaza edilmiştir.

3.1. Sperm Kriyoprezervasyon İşlemi

Semen örneğinden 500 µl steril bir petri kabına alınmıştır. 500 µl (1:1 oranında) sperm freeze solüsyonundan (Vitrolife, 90137, İsveç) örneğe damla damla eklenmiştir. (Özellikle ilk damlalar çok önemli olduğu için oldukça yavaş ve petri kabını sallayarak eklenmeli). Semen örneği kenarlara yapışabildiği için kenarda pipetaj yapılmıştır. Daha sonra semen örneği kriyotüpe alınmış ve burada 10 dk oda ısısında bekletilmiştir. Kademeli dondurma amacıyla oda ısısında bekleyen semen örneği önce azot buharında yaklaşık 10 cm yukarıda olacak şekilde 20 dk bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında azotun içine alınarak 20 dk daha bekletilmiştir. Kriyotüpler çıkarılıp kademeli soğumasını sağlamak için 10 dk oda ısısında bekletilmiştir. (Burada aynı gün çözüp diğer işlemlere devam edilebilir). Bu işlemlerden sonra hazır olan semen örneği satrifüj aşamaları için ependorfa alınmıştır. Kriyoprotektanın ayrılması amacıyla örneğin üzerine 300 µl Heps medium (LifeGlobal, GMHH-100, Belçika) eklenmiş ve 2500 rpm de 10 dk santrifüj edilmiştir. Pellet oluşur ve pellet oluşumundan sonra supernatant kısmı pipet yardımıyla çekilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine tekrar HEPES'li sperm yıkama medyumu (LifeGlobal, GMHH-100, Belçika) ilave edilmiş, çökelti dağıtılmış ve pipetaj yapılmıştır. Son kez 2500 rpm'de 10 dk daha santrifüj edilmiştir. Supernatant kısmından istenilen miktar Tas-Tos için ayrıldıktan sonra kalan kısım süspanse edilmiştir ve lam üzerine yayma preparat hazırlanmıştır.



Şekil 3.1: Sperm kriyoprezervasyonu işlem basamakları.

3.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Analizi

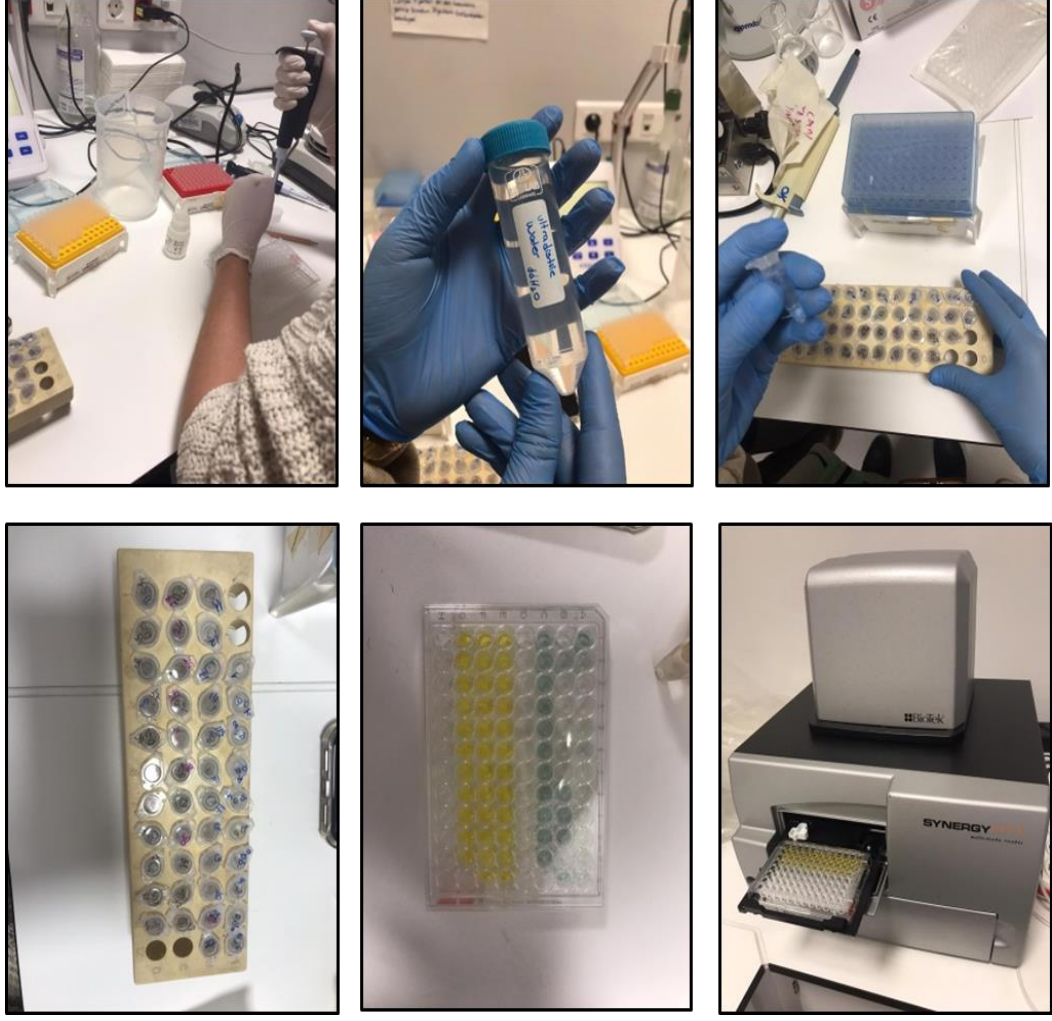
Seminal plazma oksidatif stres parametrelerinin belirlenmesi için Rel Assay Diagnostics (Sigma Aldrich) Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS) ticari kitleri kullanılmıştır. Sonuçlar kit protokolünde yer alan formül ile hesaplanmıştır. Oksidatif stres indeksi için toplam oksidan seviyeleri toplam antioksidan seviyelerine oranlanmıştır ve yüzde olarak belirtilmiştir. Oksidatif stres indeksi hesaplamadan önce TAS analizi sonucundaki mmol değeri TOS analizindeki gibi μmol birimine çevrilmiştir.

3.2.1. Total Oksidan Seviyesi

Total oksidan testi satın alınan kit Rel Assay TOS Kit (Sigma-Aldrich) protokolüne göre uygulanmıştır. 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 7,5 µL semen örnekleri eklenmiştir. Standart 1 için double distile sudan (ddH₂O) 7,5 µL, Standart 2 için ise Rel Assay TOS Kiti içerisinde yer alan 7,5 µL Stock Stabilized Standart solüsyonundan eklenmiştir. Daha sonra kitin içerisinde hazır olarak bulunan Assay Buffer (Reagent 1) solüsyonundan 50 µL bütün standart ve semen örneklerinin bulunduğu 50 kuyucuğa eklenmiştir. Başlangıç absorbansı olarak spektrofotometre kullanılarak (iMAX) ile 530 nm'de ölçüm gerçekleştirilmiştir. Yapılan ilk ölçüm sonrası standart 1, standart 2 ve semen örnekleri bulunan kuyucukların üzerine 2,5 µL kitin içerisinde bulunan Prokromojen solüsyonu yavaşça eklenmiştir. Oda sıcaklığında ve yavaş bir şekilde çalkalayarak 10 dakika boyunca inkübe etmek amacıyla bırakılmıştır. Ardından spektrofotometre ile 530 nm'de son okuma ölçümü yapılmıştır ve veriler kaydedilmiştir.

3.2.2. Total Antioksidan Seviyesi

Total antioksidan testi de satın alınan kit Rel Assay TOS Kit (Sigma-Aldrich) protokolüne göre uygulanmıştır. Bu protokole göre 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 3 µL semen örnekleri eklenmiştir. Standart 1 için 3 µL double distile su, Standart 2 için ise kitin içerisinde kullanıma hazır olarak bulunan 3 µL 1.0 mmolTrolox Equiv/L kuyucuğa konulmuştur. Kitin içerisinde bulunan Assay Buffer (Reagent 1)'dan 50 µL standartlara ve semen örneklerine eklenmiştir. Daha sonra semen örnekleri, Standart 1 ve Standart 2 bulunan kuyucukların içerisine Rel Assay TAS Kiti içerisinde yer alan Assay Buffer (Reagent 1) solüsyonundan 50 µL eklendi. Başlangıç absorbansı olarak spektrofotometre de (iMAX) 660 nm'de ölçüm yapılmıştır. İlk absorbans ölçümü sonrası standart 1, standart 2 ve semen örnekleri bulunan kuyucukların üzerine kitin içerisinde bulunan 7,5 µL Colored ABST Radical solüsyonu eklenmiştir. Oda sıcaklığında yavaş bir şekilde çalkalayarak 10 dakika boyunca inkübe etmek amacıyla bırakılmıştır. Spektrofotometrede 660 nm'de son okuma ölçümü yapılmıştır ve veriler kaydedilmiştir.



Şekil 3.2: TAS-TOS işlem basamaklarından örnek görseller.

3.3. DNA Fragmentasyon Analizi

3.3.1. Annexin V, PI Çiftli Florasan Boyama

Hücrelerde DNA fragmentasyonunu değerlendirmek amacıyla Annexin V, PI çiftli florasan boyama testi yapılmıştır. Annexin V, PI çiftli florasan boyama testi ticari olarak satılan bir kit (Annexin-V Fıtc Apoptoz Tespit Kiti) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Sperm hücreleri 1X PBS ile yıkandı ve 1000 rpm'de 5dakika boyunca santrifüjlendi. Ortaya çıkan süpernatant atıldı. Daha sonra toplam 3 yıkama için işlem tekrarlandı. Hücre peleti 1X Binding Buffer içinde $2-5 \times 10^5$ hücre/ml'lik konsantrasyona kadar yeniden süspanse edildi. 195 μ l hücre süspansiyonu temiz bir tüpe aktarıldı. Sonrasında 5 μ l Annexin V-FITC eklendi. Bunlar karıştırıldı ve oda

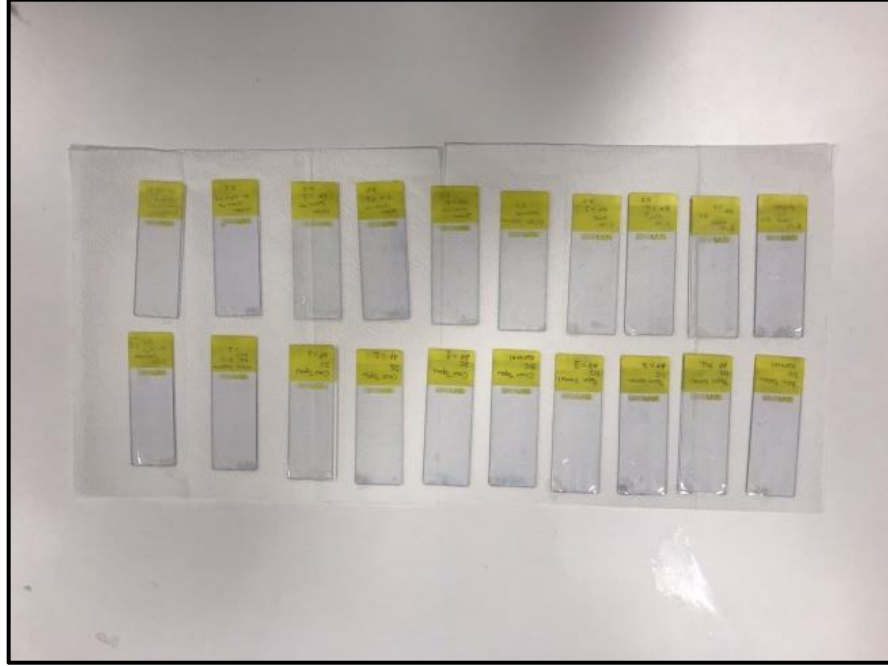
sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Hücreler 1X Binding Buffer ile yıkandı ve 1000 rpm'de santrifüjlendi. Ortaya çıkan süpernatant atıldı. Hücre peleti 190 µl 1X Binding Buffer içinde yeniden süspanse edildi. Son olarak 10 µl Propidium Iodide (nihai konsantrasyon = 1 µg/ml) eklendi ve konfokal mikroskopta gözlemlendi.

3.3.2. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)

Sperm DNA fragmentasyonu, Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) yöntemi ile HaloSperm kiti (Halotech DNA SL, Halosperm HTHS10, İspanya) kullanılarak analiz edildi. Kitin içerisinde bulunan agaroz tüp, 95-1000C'de su banyosunda 5 dakika boyunca erimesi için bekletildi. Eriyen agaroz jel 5 dakika boyunca 370C'lik etüvde bekletildi. Eppendorf tüpüne 12,5 µL sperm örneği, 20 µL eritilmiş agaroz jel eklenip karıştırıldı ve hızlıca kitin içerisinde bulunan super-coated lamlara yayılıp baloncuk bırakmayacak şekilde lam ile kapatıldı. Her sperm örneği için aynı işlem uygulandı. Lamellerle kapatılan super-coated lamalar 5 dakika boyunca +40C'de inkübe edildi. Bu sırada bir kaptaki denatürasyon solüsyonu hazırlandı. Kitin içerisinde bulunan denatürasyon ajanından (DA) 80 µL alınıp 10 mL distile su ile karıştırıldı. İnkübasyon süresi dolan preparatların lamelleri üzerinden yavaşça kaydırılıp alındı ve oda sıcaklığında 6 dakika boyunca yatay olarak DA solüsyonunun içerisine bırakıldı. Bu sırada kitin içerisinde bulunan lizis solüsyonundan 10 mL kadar bir kaba alındı. DA solüsyonundan çıkarılan sperm yaymaları yine yatay olarak lizis solüsyonuna konuldu. Oda sıcaklığında 23 dakika boyunca lizis solüsyonu içerisinde bekletildi. Ardından 5 dakika boyunca distile su içerisinde yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra artan etanol serisinde (%70, %90 ve %100) 2'şer dakika dehidrate edildi. Preparatlar karanlık ve kuru bir ortamda kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar fiksatif konulmadan sırasıyla solüsyon 1 ve solüsyon 2'den geçirilip kurumaya bırakıldı. Görüntülenmesi ışık mikroskobunda gerçekleştirildi.

3.4. Sperm Kromatin Yapı Analizi

Sperm kromatin yapısı Toluidine Blue yöntemi ile analiz edilmiştir. Taze hazırlanmış, 1:1 oranında ½96 etanol-asetonda kurutulmuş olan sperm yaymaları 1 saat boyunca sabitlemek amacıyla fikse edilmiştir. Ardından yavaşça kuruması için hava alabileceği bir yerde bekletilmiştir. Preparatlar 4°C’de 0,1 N HCl (Merck K50227117 818, Almanya) içerisinde 5 dakika hidrolize edilmiştir. Daha sonra distile su ile 2 kez olmak üzere 5 dk boyunca yıkanmıştır. %0.5 Toluidine Blue ile oda ısısında 5 dakika boyunca boyanmıştır. Daha sonra preparatlar distile su ile kısaca tekrar yıkanmıştır. Işık mikroskopunda immersiyon yağı yardımıyla 100X objektifte görüntülenmiştir.

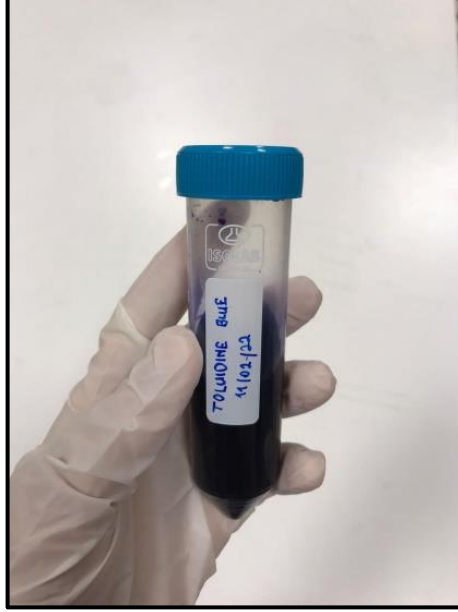


Şekil 3.3: Toluidin mavisi boyama işlemi sonrası sperm yaymaları.

3.4.1. Solüsyon Hazırlığı

%0.5 Toluidine Blue Hazırlığı

100 ml'lik hazırlık yapılmıştır. Şişe içerisine 100 ml double distile su alınmış ve 0,5 ml'si pipet yardımıyla çekilmiştir. Kalan 99,5 ml double distile suyun (ddH₂O) içerisine yavaş bir şekilde 5 ml stok boya eklenmiştir.



Şekil 3.4: 0,5lik hazırlanmış Toluidin Blue.

0,1 N HCl Hazırlığı

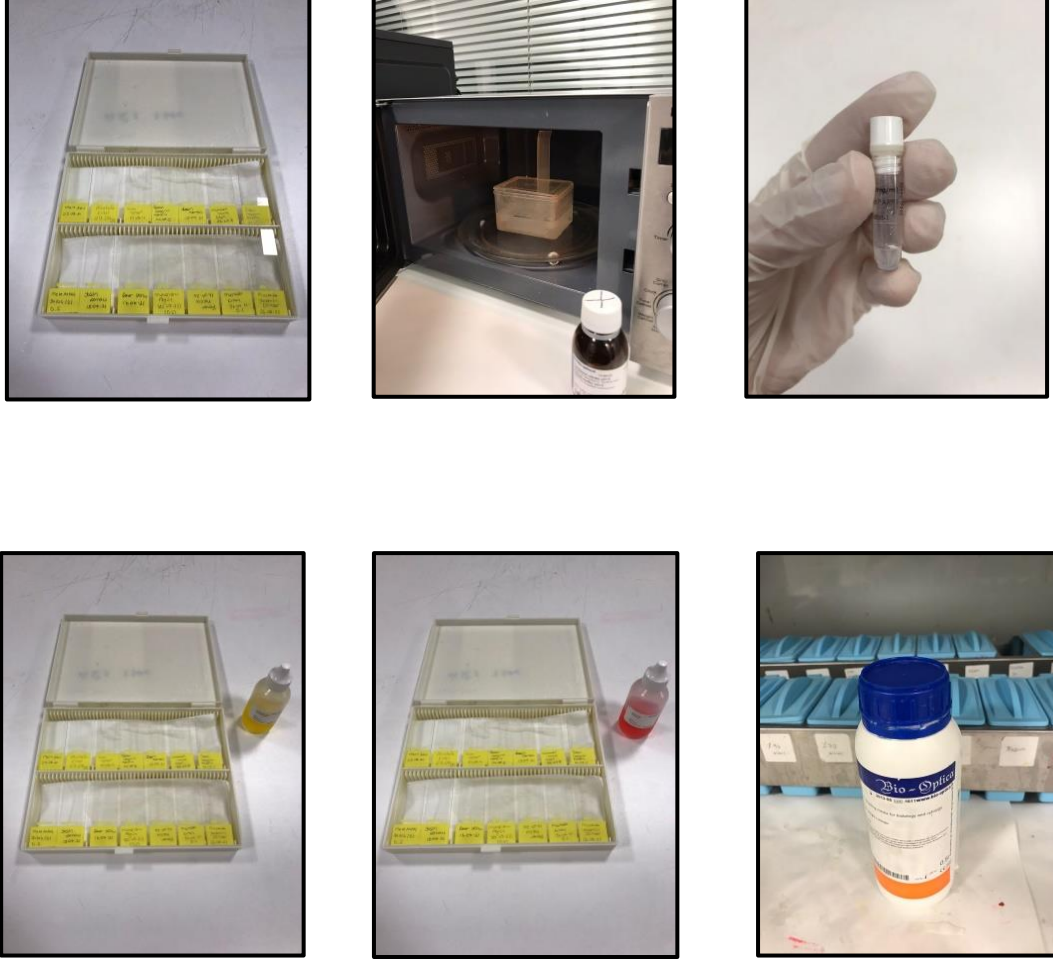
500 mL'lik hazırlık yapılmıştır. Çeker ocağında 125 mL distile suyun üzerine piyasada bulunan %37'lik HCl'den 4,106 mL eklenmiştir. Karışım distile su ile 500 mL'ye tamamlanmıştır.

3.5. Proteinlerin (PARP) İmmünohistokimyasal Analizi

PARP proteininin ekspresyonu immünohistokimya yöntemiyle, Mouse and Rabbit Specific HRP (ABC) Detection IHC Kit (abcam, ab93677, İngiltere) yardımı ile proteinlerin ekspresyonu ve lokalizasyonları gösterilmiştir. Bu işlem için ilk olarak daha önce yayma yapılan semen örneği preparatları fiksasyon amacıyla %4 PFA içerisinde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra

preparatlar PBS ile 2 kez 5 dakika yıkanmıştır. Bu esnada şale içerisine 72 ml etanol ve 8 ml hidrojen peroksit solüsyonu hazırlanmıştır. Endojen peroksidaz aktivasyonunu inhibe etmek amacıyla preparatlar hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit ve metanol solüsyonu içerisinde 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından sitrat buffer hazırlanmıştır. Bu aşamada preparatlardan epitoplara kırılması ve antijenlerin geri kazanılması amacıyla yayma preparatlar mikrodalga şalesi içine alınmıştır. Daha sonra Citrate Buffer solüsyonu ilave edilerek 800 Watt'ta yaklaşık 3 dk boyunca inkübe edilmiştir. Kaynama sonrası ısı kademesi 200 watt'a alınarak preparatlar mikrodalga içerisinde 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Sonrasında preparatların bulunduğu şaleler mikrodalgadan çıkarılarak 20 dakika soğumaya alınmıştır. Preparatlar tekrar PBS ile 2 kez 5 dk boyunca yıkanmıştır. Antikorların hücrelere veya Fc reseptörlerine non-spesifik bağlanmasını önlemek amacıyla preparatlara bloklama solüsyonu uygulanmıştır ve bu aşamada 10 dakika beklenilmiştir. Preparatlar tekrar PBS ile 2 kez 5 dk boyunca yıkanmıştır. Lamların yüzeyi, PAP pen hidrofobik kalem ile dikkatlice çizilmiştir ve sınırlandırılmıştır. PARP primer antikor yapılan çalışmalar sonucu 1:100 dilüsyonda hazırlanmıştır. Hazırlanan antikor her bir preparat üzerine 50 µl olacak şekilde damlatılarak 1 gece boyunca +4 °C'de, ıslak peçeteler kullanılarak hazırlanan nemli bir ortamda inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün 18 saatlik bir inkübasyon sonrası preparatlar ilk olarak PBS ile 2 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Yıkanan preparatlar üzerine immünohistokimyasal boyama için kullanılan kit içerisinde hazır olarak bulunan Biotinilated Goat Anti-Polyvalent (Mouse and Rabbit Specific HRP Detection IHC Kit, ab93677; Abcam) damlatılmıştır ve 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra PBS ile 2 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Her bir preparat üzerine 3'er damla olacak şekilde Streptavidin Peroxidase (Mouse and Rabbit Specific HRP Detection IHC Kit, ab93677; Abcam) damlatılmıştır ve 10 dakika da bu aşamada bekletilmiştir. Tekrar PBS ile 2 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Preparatlar, antijen-antikor kompleksini daha görünür hale getirmek için gerekli olan DAB Kromojen (Abcam, ab64238; İngiltere) ile 8 dakika boyunca inkübe edilmiştir. PBS ile 2 kez 5 dakika boyunca yıkanmıştır. Bu işlemlerden hemen sonra preparatlar zıt boyama için Mayer's hematoksilen'de (Bio Optica 05-06002/L, İtalya) 2 dakika bekletilmiştir. Daha sonra preparatlar çeşme suyu ile dolu olan bir şale içerisine alınmıştır ve mordonlama işlemi için 10 dakika boyunca akarsu altında tutulmuştur. İşlem sonrası preparatlar kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan preparatların üzerine Biomount (Bio Optica 05-BM500, İtalya) damlatıldı ve lamel ile kapatılarak mikroskop altında incelenmiştir.



Şekil 3.5: İmmünohistokimyasal analiz basamakları.

3.5.1. Solüsyon Hazırlığı

10X Phosphate Buffered Saline (PBS) Stok Solüsyonu

10X PBS stok solüsyonu hazırlamak için 800 ml distile su (dH_2O) içerisinde 80 gr NaCl, 2 gr KCl, 2 gr KH_2PO_4 , 21,6 gr Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich, Amerika) eklenmiştir. Daha sonra tüm solüsyon 1 litreye tamamlanarak karıştırılmıştır ve çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlanmıştır. Elde edilen 10X PBS stok solüsyonu distile su ile seyreltilerek 1X PBS olarak kullanılmıştır.

%4 Paraformaldehit (PFA) Hazırlığı

%4 PFA hazırlamak için 800 mL 1X PBS içerisine 32 gr PFA eklenmiştir. Çözünmenin daha hızlı olması ve homojen karışım sağlayabilmek için içerisine NaOH eklenip berraklık sağlanana kadar 60°C'de manyetik karıştırıcı üzerinde bırakılmıştır. Berraklık sağlandıktan sonra solüsyon soğumaya bırakılmış ve ardından filtreden geçirilmiştir. Ardından 1X PBS ile 1 litreye tamamlanıp pH'ı 7.3 olarak ayarlanmıştır.

%3 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Çözeltisi

Piyasada satılan Hidrojen Peroksit (Fisher Scientific JT Baker, Amerika) %30'luk olarak alınmaktadır. Bu nedenle %3 H₂O₂ hazırlamak için 72 ml metanol (Merck 10600925, Almanya) ve 8 ml H₂O₂ kullanılmıştır.

Citrate Buffer Solüsyonu

Piyasada bulunan Citrate Buffer'ın (Bio Optica 15M-103, İtalya) kullanımı için 1:10 oranında distile su ile seyreltilmiştir.

PARP Primer Antikoru

PARP antikorumun dilüsyon oranları 1:300 ve 1:500 olarak verilmiştir. Yapılan dilüsyon denemeleri sonucunda PARP antikorumun 1:100 oranında kullanılmasına karar verilmiştir. PARP primer antikoru PBS ile seyreltilmiştir.

Tablo 3.1: Semen Örneği Dilüsyon Hazırlığı.

Dilüsyon	Semen Örneği	0,1 M HCl
1:100	5 µL	95 µL
1:200	2,5 µL	97,5 µL
1:300	2 µL	98 µL

DAB Kromojen/Substrat

Ticari olarak satın alınan DAB Kromojen/Substrat kitinin (Scytek, ACK125, A.B.D.) prosedürüne en uygun olan karışım 1:50 oranında hazırlanmıştır. Sonrasında her bir preparata 50 µl damlatılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 22.0 istatistik programı kullanılmıştır. Veriler ortalama \pm SD olarak sunulup, kategorik değişkenler için t-testi kullanılarak grupların karşılaştırılması yapılmıştır. Nicel değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm testler için anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Oksidatif Stres Parametreleri

Oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS ve OSİ) sonuçları tablo 9.1.1’de gösterilmiştir. İstatiksel veriler her bir parametrenin altında belirtilmiştir.

Tablo 4.1: Oksidatif stres parametreleri kriyoprezervasyon öncesi istatiksel analizi. (TAS: Total antioksidan seviyesi, TOS: Total oksidan seviyesi, OSİ: Oksidatif stres indeksi). Grup 1: kriyoprezervasyon öncesi, Grup 2: kriyoprezervasyon sonrası hastaları göstermektedir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Oksidatif stres parametreleri analizlerinde anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir.

OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ	Grup 1 Ort \pm SS	Grup 2 Ort \pm SS	Ort \pm SS
TAS (mmol Trolox eq.)	1,13 \pm 1,51	9,35 \pm 1,32	0,09 \pm 20,11
TOS (μ mol/H ₂ O ₂ /eq.)	0,01 \pm 0,20	21,87 \pm 53,29	3,88 \pm 15,35
OSİ	0,55 \pm 1,21	15,61 \pm 37,74	0,45 \pm 18,20
<i>p</i> DEĞERİ	0,383	0,383	0,383

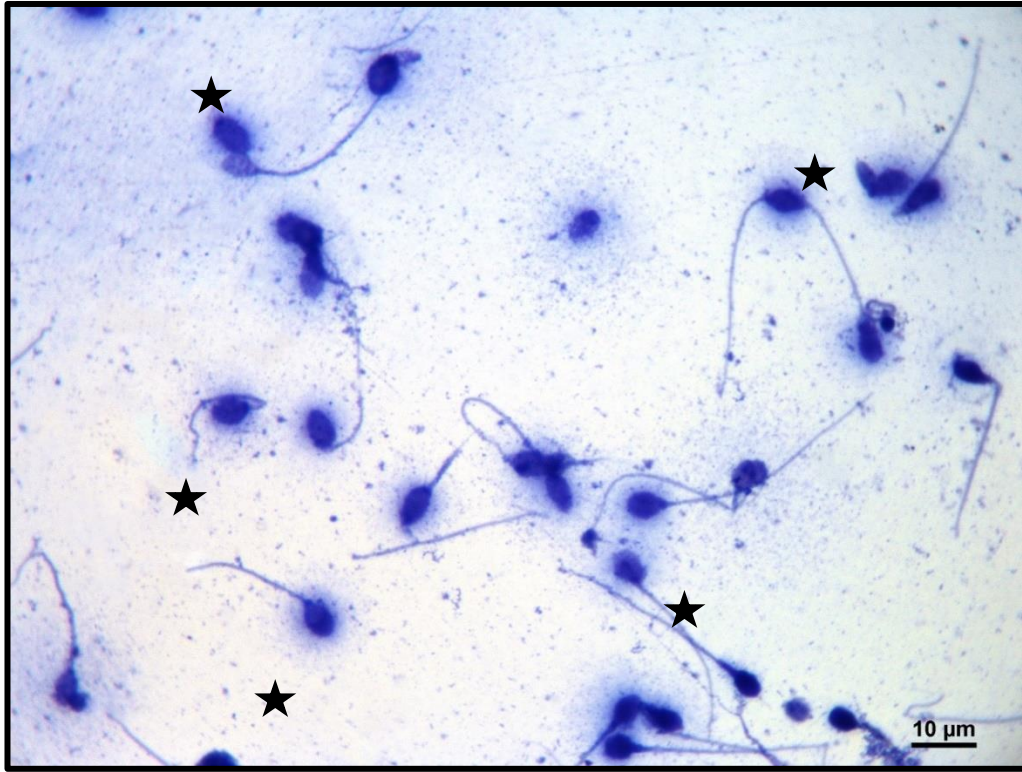
Tablo 4.2: Tüm hastaların oksidatif stres parametre değerleri.

HASTALAR	TAS	TOS ($\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2\text{,eq.}$)	OSİ
1	1,63	10,29	0,62
2	1,10	12,05	1,09
3	0,22	7,94	3,54
4	0,48	7,64	1,58
5	1,31	9,70	0,74
6	7,08	10,58	0,14
7	1,01	9,70	0,95
8	1,15	9,70	0,84
9	1,50	8,82	0,58
10	0,36	8,82	2,43
11	1,03	9,41	0,90
12	1,44	10,58	0,73
13	1,51	8,23	0,54
14	0,91	7,05	0,77
15	0,82	7,05	0,85
16	0,01	11,17	0,64
17	0,05	9,11	17,62
18	0,15	9,41	0,6
19	1,22	9,41	0,76
20	0,01	10,29	0,56
21	0,03	7,05	0,20
22	0,06	9,11	0,01
23	0,17	248,23	0,03
24	0,31	9,70	0,03
25	0,15	9,70	0,06
26	2,39	8,82	3,68
27	0,44	9,41	2,09
28	0,17	9,41	0,86
29	0,06	11,47	0,16
30	0,10	9,67	9,19
31	0,23	11,29	0,76
32	0,07	10,32	13,07
33	0,05	10,96	20,83
34	0,13	11,61	8,82
35	0,42	10,00	2,37
36	0,02	8,38	31,87
37	0,13	9,03	6,86
38	0,02	10,96	41,67
39	0,07	10,32	13,07
40	0,28	11,93	4,12

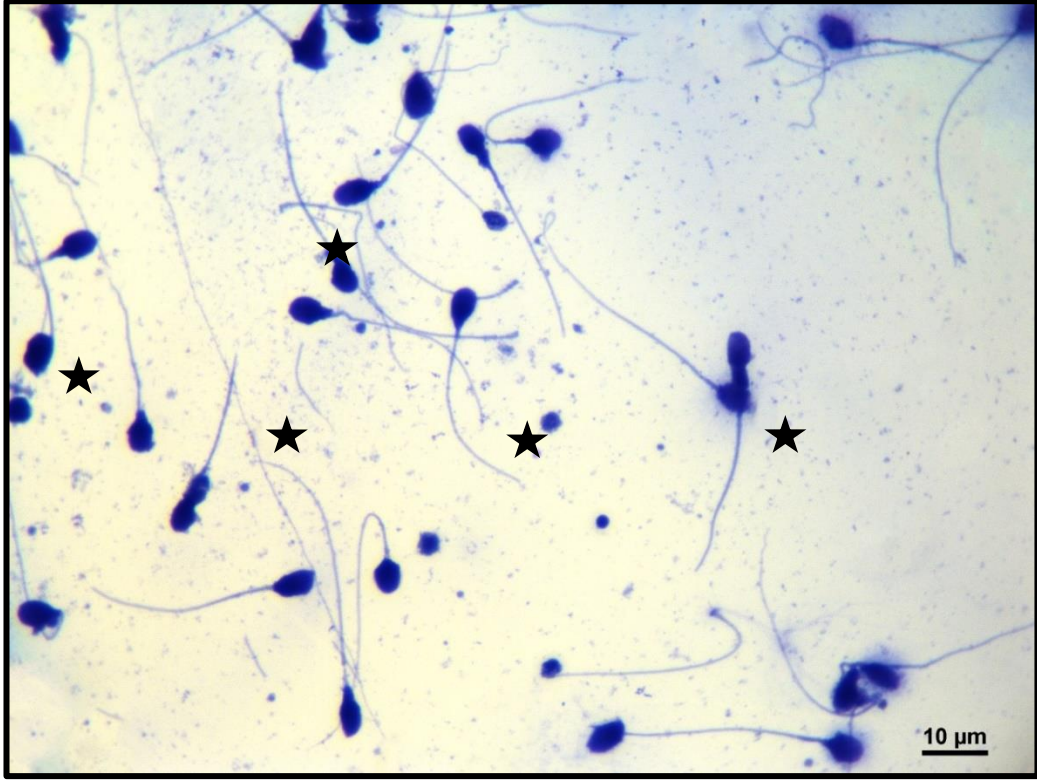
4.2. DNA Fragmentasyonu Parametreleri

Tablo 4.3: Hastaların DNA fragmentasyon skorlama sonuçları.

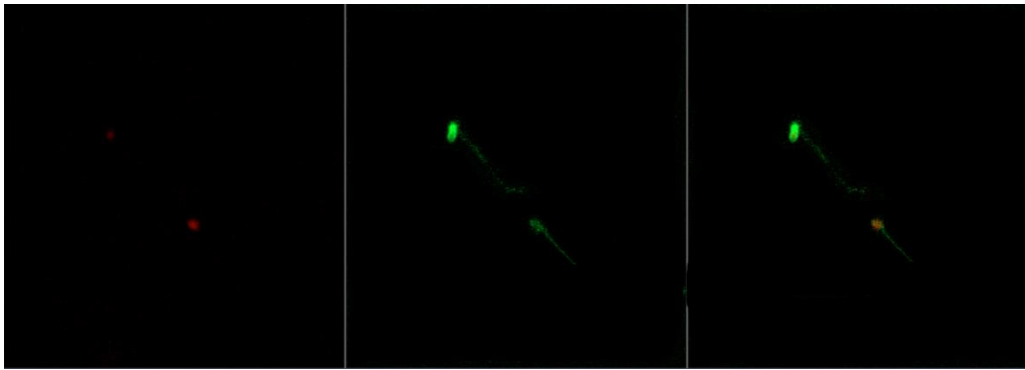
DNA PARAMETRELERİ	Grup 1 Ort ± SS	Grup 2 Ort ± SS	Ort ± SS
DNA FRAGMENTASYONU (%)	31,29±15,18	61,79±13,53	45,82±15,05
<i>p</i> DEĞERİ	0,57	0,57	0,57



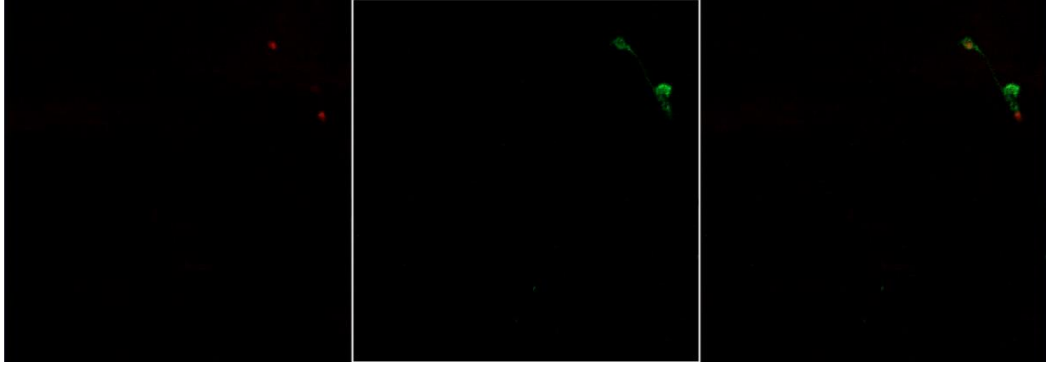
Şekil 4.1: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği (Halosperm kit). Yıldız ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu olan sperm hücreleri görülmektedir. (ışık mikroskopik görüntü X100)



Şekil 4.2: Sperm hücrelerindeki DNA fragmentasyonu geliştirilmiş sperm kromatin yapı analizi tekniği (Halosperm kit). Yıldız ile gösterilen sperm hücrelerinde DNA fragmentasyonu olan sperm hücreleri görülmektedir. (ışık mikroskopik görüntü X100)



Şekil 4.3: Annexin V, PI çiftli floresan boyama (DNA fragmentasyonu) analiz sonuçları. PI: Kırmızı boyanma DNA fragmentasyonu görülen sperm hücrelerini, Annexin V: yeşil boyanma ise DNA fragmentasyonu görülmeyen veya daha az görülen sperm hücrelerini göstermektedir.



Şekil 4.4: Annexin V, PI çiftli florasan boyama (DNA fragmentasyonu) analiz sonuçları. PI: Kırmızı boyanma DNA fragmentasyonu görülen sperm hücrelerini, Annexin V: yeşil boyanma ise DNA fragmentasyonu görülmeyen veya daha az görülen sperm hücrelerini göstermektedir.

4.3. Kromatin Bütünlüğü Parametreleri

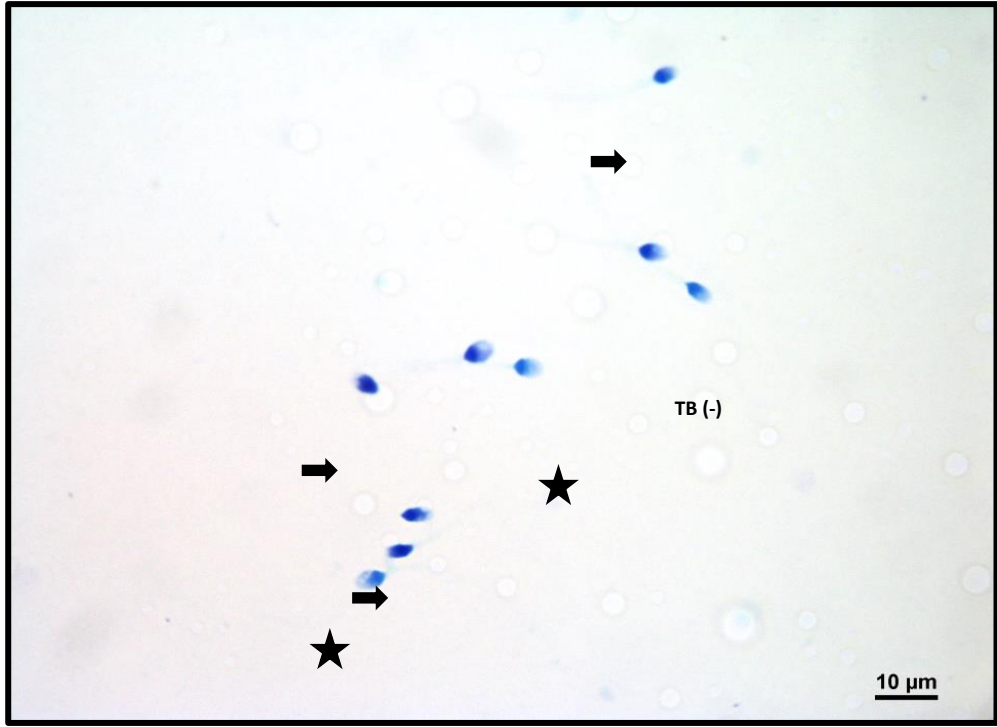
Çalışmamızın sonuçları Tablo 9.3.1’de gösterilmiştir. İstatiksel veriler her parametrenin altında belirtilmiştir.

Tablo 4.4: Kriyoprezervasyon öncesi Kromatin Bütünlüğü Parametreleri. Grup 1: kriyoprezervasyon öncesi, Grup 2: kriyoprezervasyon sonrası hastaları göstermektedir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Kriyoprezervasyon sonrası hastalarda kriyoprezervasyon öncesi hastalarla kıyaslandığında kriyoprezervasyonun kromatin bütünlüğünde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir.

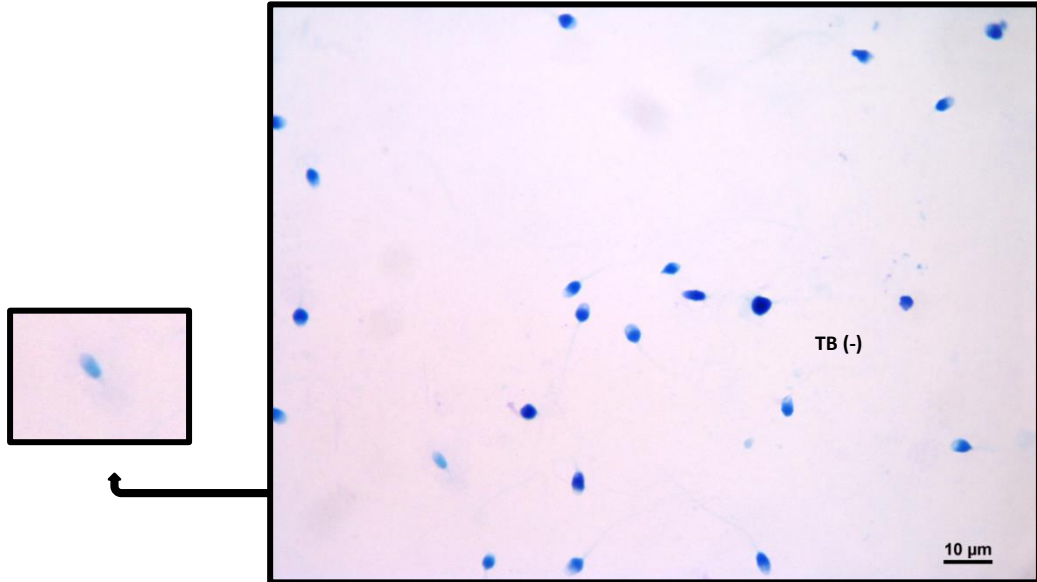
KROMATİN PARAMETRELERİ	Grup 1 Ort \pm SS	Grup 2 Ort \pm SS	Ort \pm SS
Kromatin Bütünlüğü (%)	38,95 \pm 12,20	45,85 \pm 14,85	42,40 \pm 10,68
<i>p</i> DEĞERİ	0,006	0,006	0,006

Tablo 4.5: Hastaların kromatin bütünlüğü skorumları. (KB: Kromatin bütünlüğü).

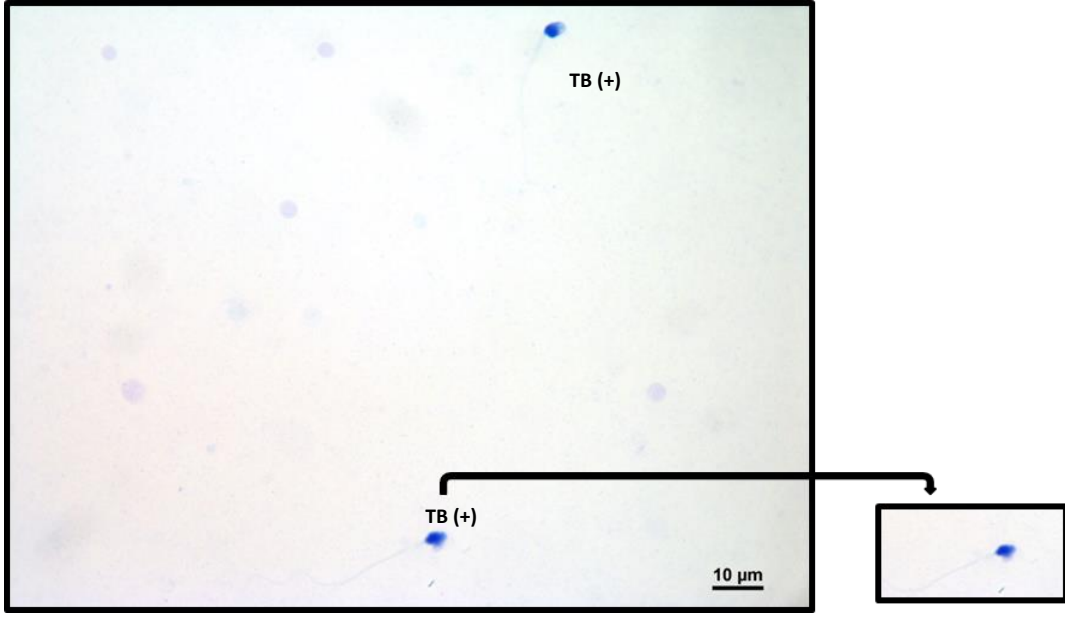
HASTALAR	Kromatin Bütünlüğü (%)	
	KB (+)	KB(-)
1	30	70
2	30	70
3	38	62
4	31	69
5	29	71
6	28	72
7	14	86
8	42	58
9	68	32
10	38	62
11	49	51
12	52	48
13	52	48
14	44	56
15	58	42
16	34	66
17	44	56
18	58	42
19	15	85
20	25	75
21	33	67
22	44	56
23	36	64
24	43	57
25	34	66
26	63	37
27	49	51
28	56	43
29	63	37
30	55	45
31	39	61
32	37	53
33	60	40
34	51	49
35	64	36
36	25	75
37	48	52
38	54	46
39	22	78
40	35	65



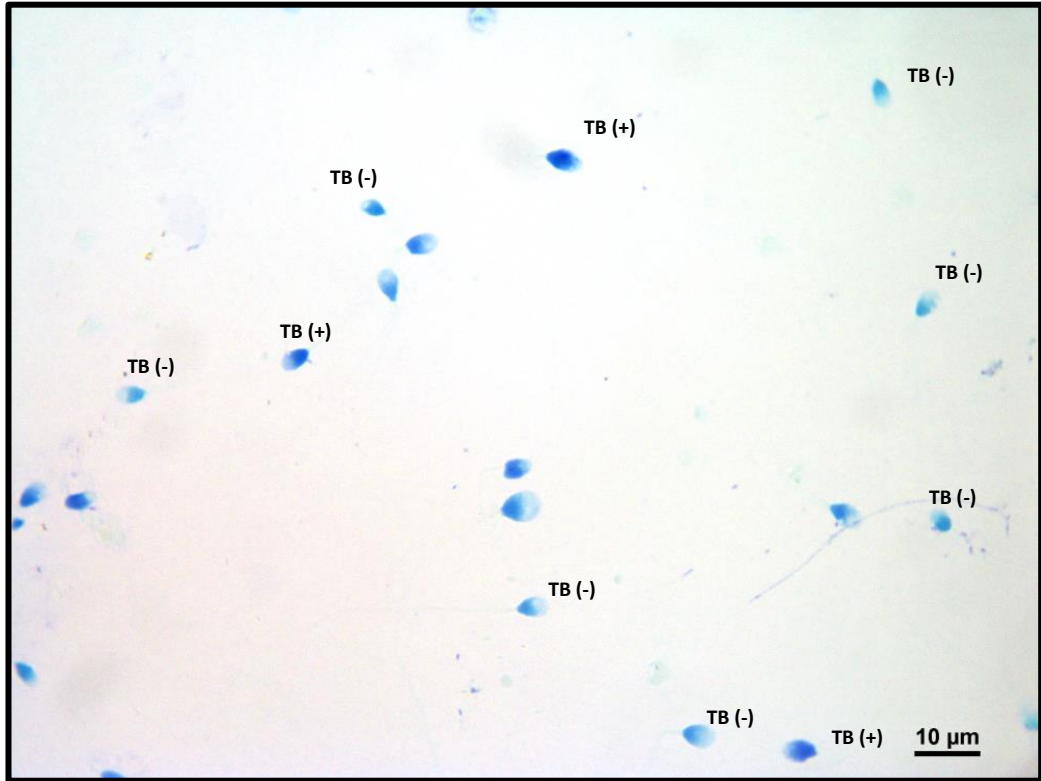
Şekil 4.5: Sperm kromatin bütünlüğünün Toluidin Mavisi boyama tekniği ile gösterilmesi. Anormal kromatin bütünlüğüne sahip olan hücreler koyu mavi olarak boyanmıştır ve ok işareti ile gösterilmiştir. Normal kromatin yapısına sahip olan hücreler ise açık mavi renge boyanmıştır ve yıldız işareti ile gösterilmiştir. (ışık mikroskopik görüntü X100)



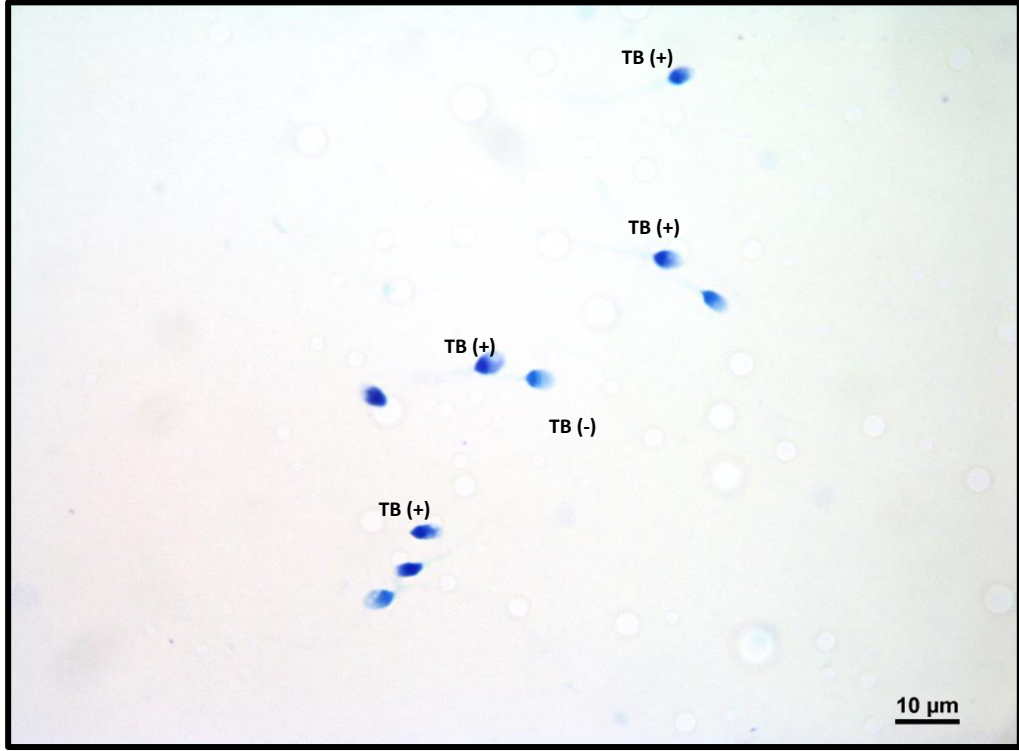
Şekil 4.6: Toluidin Mavisi boyama tekniği ile açık mavi renge boyanan TB (-) sperm hücresi. (ışık mikroskopik görüntü X100).



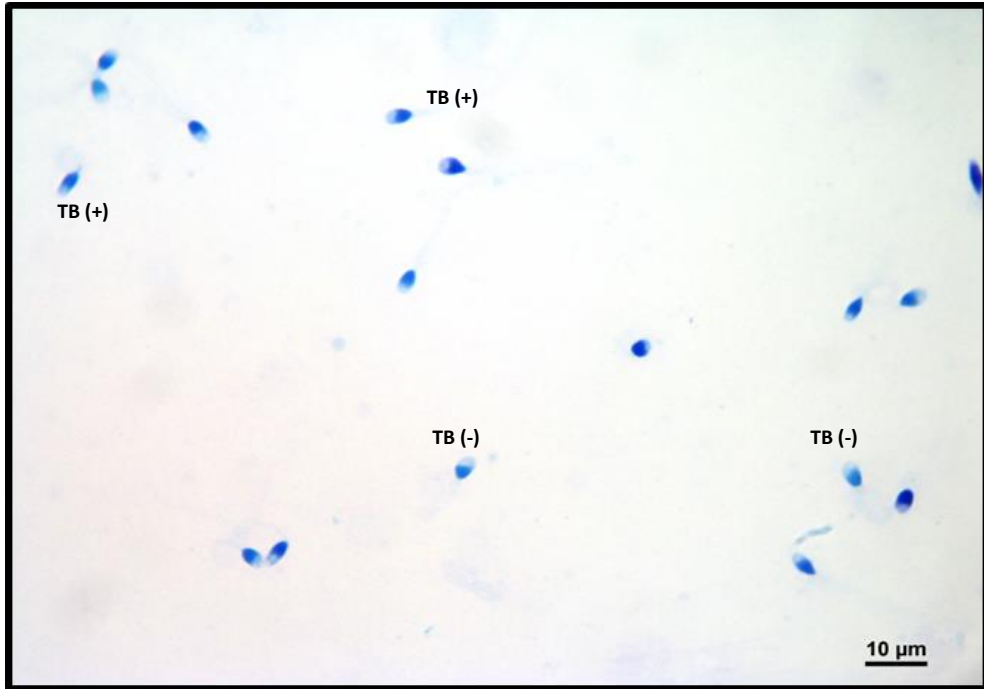
Şekil 4.7: Toluidin Mavisi boyama tekniği ile açık mavi renge boyanan TB (+) sperm hücresi. (ışık mikroskopik görüntü X100)



Şekil 4.8: 38 numaralı hastaya ait kromatin bütünlüğü analizi ışık mikroskopik görüntüsü X100.



Şekil 4.9: 30 numaralı hastaya ait kromatin bütünlüğü analizi ışık mikroskopik görüntüsü X100.



Şekil 4.10: 7 numaralı hastaya ait kromatin bütünlüğü analizi ışık mikroskopik görüntüsü X100.

4.4. PARP Proteini Parametreleri

Çalışmamızın sonuçları Tablo 9.4.1’de gösterilmiştir. İstatiksel veriler kriyoprezervasyon öncesi değerleri göstermektedir.

Tablo 4.6: Tabloda PARP proteininin bölgelere göre dağılımları.

HASTA ADI	KAFA	KUYRUK	AKROZOM	BOYUN	SİTOPLAZMİK DROPLET	YOK
1	0	6	0	53	33	12
2	2	9	0	40	28	19
3	6	2	1	48	21	26
4	4	2	3	68	25	30
5	1	0	0	21	11	9
6	0	2	0	28	16	14
7	2	4	0	32	13	22
8	1	1	0	45	18	24
9	5	0	2	48	31	21
10	0	0	0	60	24	19
11	5	4	6	53	11	33
12	1	2	0	35	22	29
13	0	3	0	48	14	38
14	6	0	0	68	32	25
15	0	2	1	40	22	28
16	2	3	3	27	18	23
17	1	0	3	16	9	11
18	4	3	5	39	19	31
19	0	1	0	11	6	9
20	0	2	0	24	14	36

Tablo 4.7: Hastaların PARP protein ekspresyonu skorlama sonuçları.

HASTALAR	IRS
1	1,04
2	2
3	1,04
4	1,32
5	1,68
6	2,4
7	2,92
8	1,89
9	1,07
10	1,03
11	1,12
12	1,81
13	1,03
14	2,67
15	1,93
16	3,04
17	4,44
18	1,01
19	3
20	1,76
21	1,03
22	1,97
23	1,61
24	1,33
25	1,84
26	2,68
27	1,8
28	1,7
29	2
30	1,16
31	1,79
32	1,95
33	0,69
34	1,38
35	3
36	2,96
37	5,77
38	1,03
39	3,2
40	1,86

Tablo 4.8: PARP proteini kriyoprezervasyon öncesi ortalama ekspresyon seviyesi istatistiksel analizi. Grup 1: kriyoprezervasyon öncesi, Grup 2: kriyoprezervasyon sonrası hastaları göstermektedir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. (PARP) proteininin immünohistokimyasal analizlerinde kriyoprezervasyon sonrası anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir.

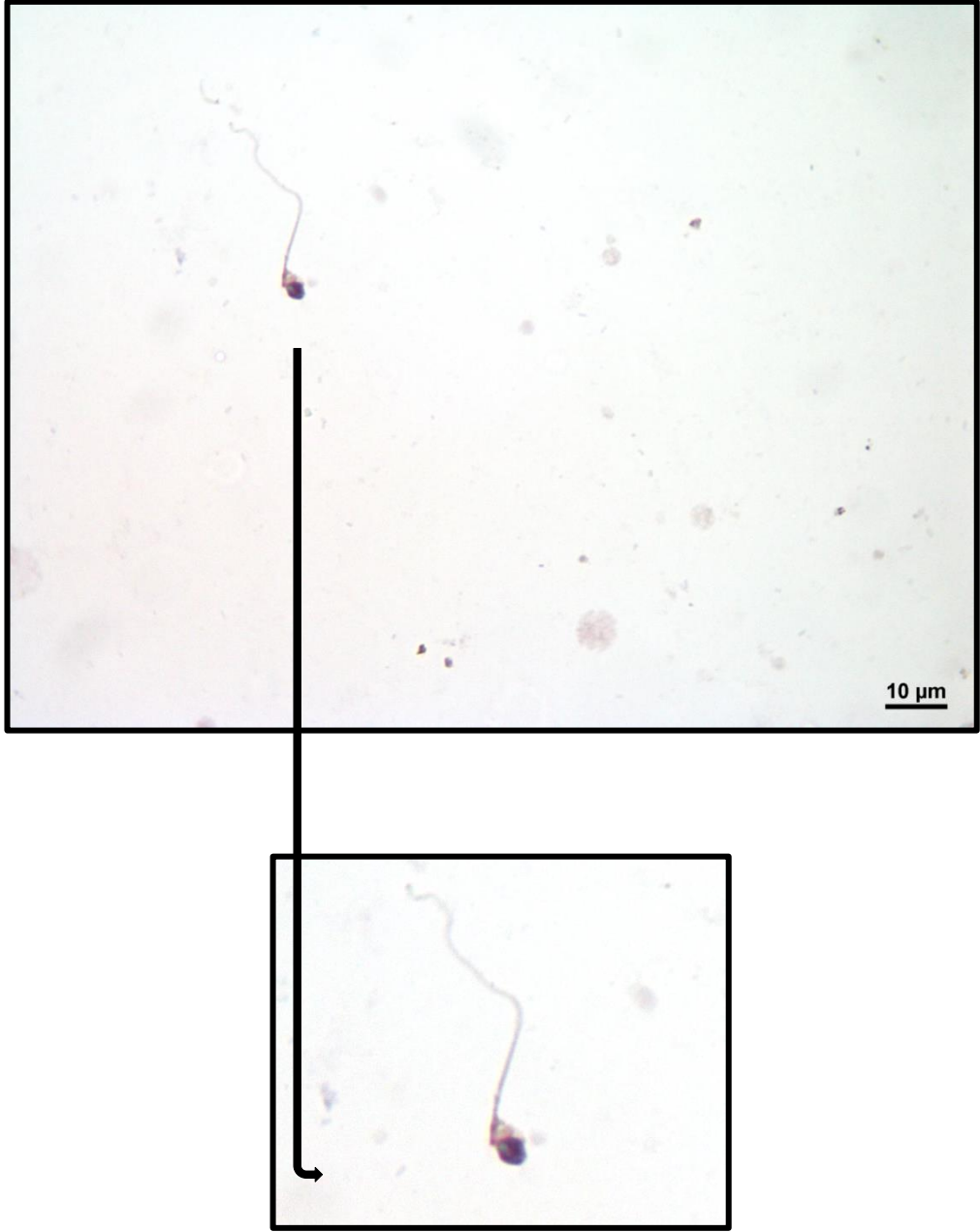
PARP PARAMETRELERİ	Grup 1 Ort \pm SS	Grup 2 Ort \pm SS	Ort \pm SS
PARP (pmol/mL)	1,91 \pm 1,25	2,03 \pm 1,96	1,97 \pm 0,65
<i>p</i> DEĞERİ	0,698	0,698	0,698



Şekil 4.11: 15 numaralı hastanın PARP proteininin immünohistokimyasal analizi. (ışık mikroskopik görüntüsü X100)



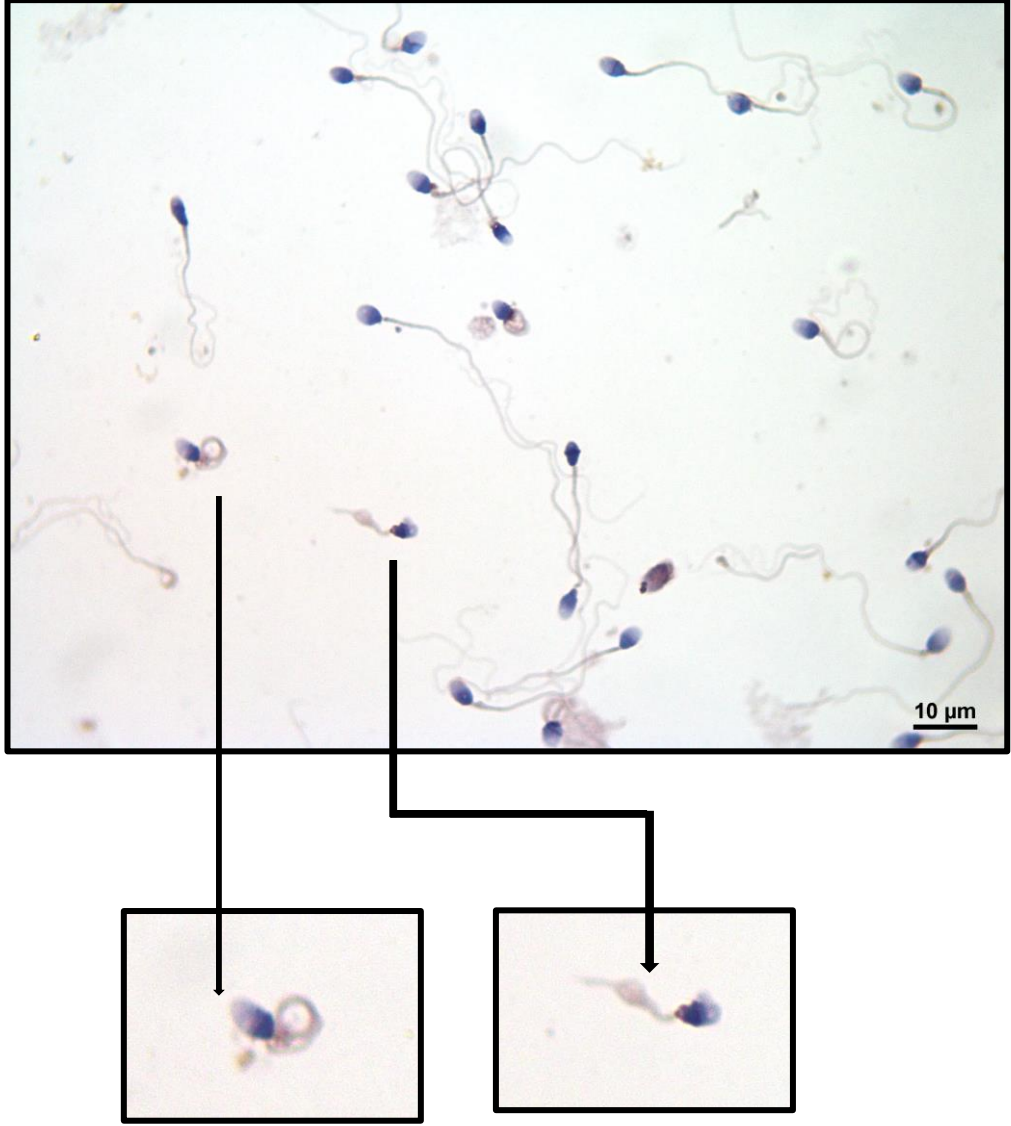
Şekil 4.12: PARP proteinin immünohistokimyasal analizi. Yıldız boyun bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir. (ışık mikroskopik görüntü X100)



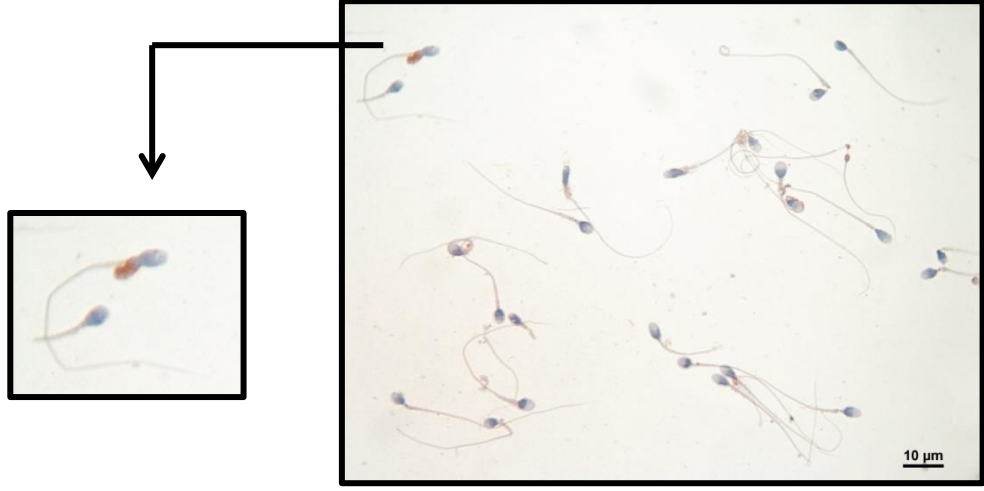
Şekil 4.13: Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonu.
(negatif kontrol ışık mikroskopik görüntüsü X100)



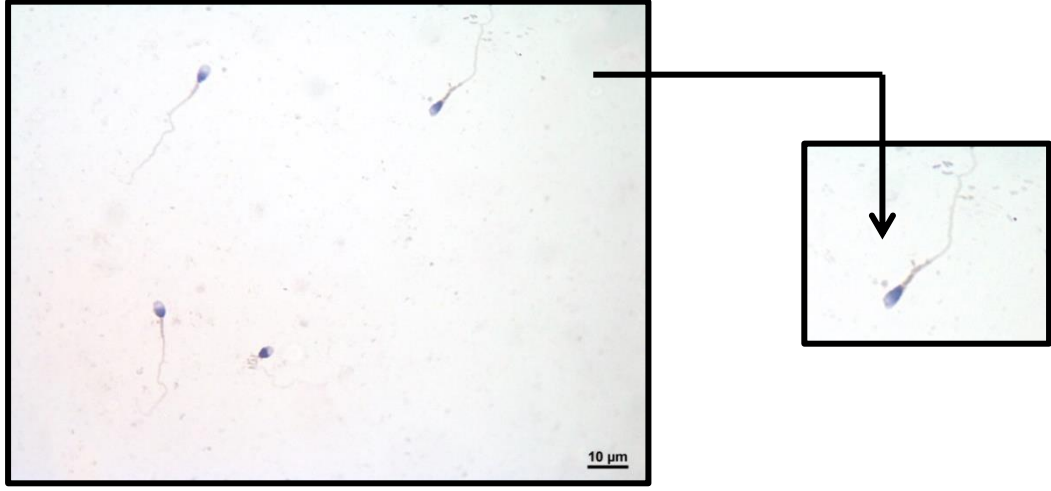
Şekil 4.14: Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonu.
(negatif kontrol ışık mikroskopik görüntüsü X100)



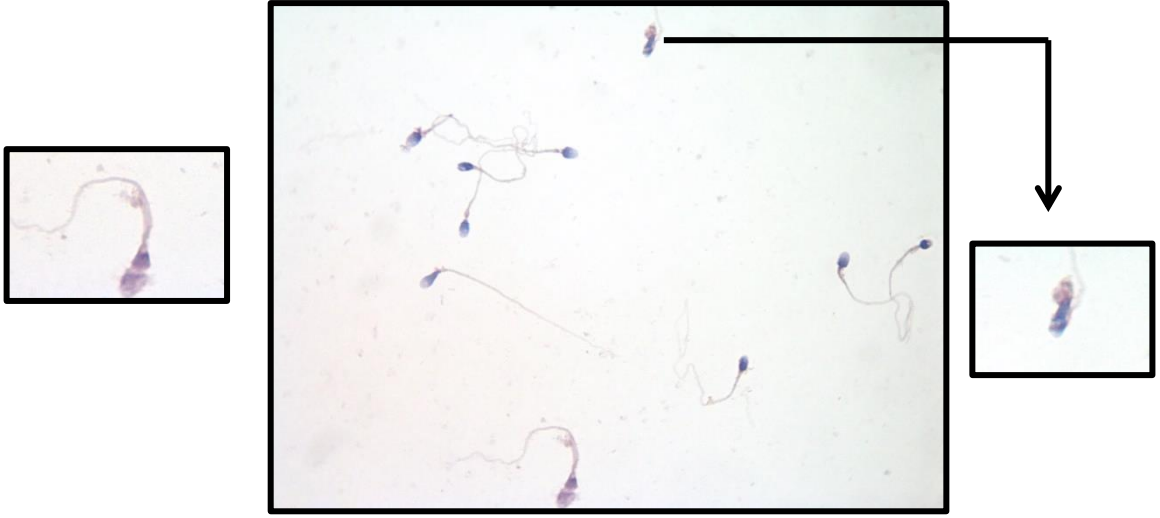
Şekil 4.15: Sperm hücresinin kuyruk bölgesindeki PARP protein ekspresyonu.
(negatif kontrol ışık mikroskopik görüntüsü X100)



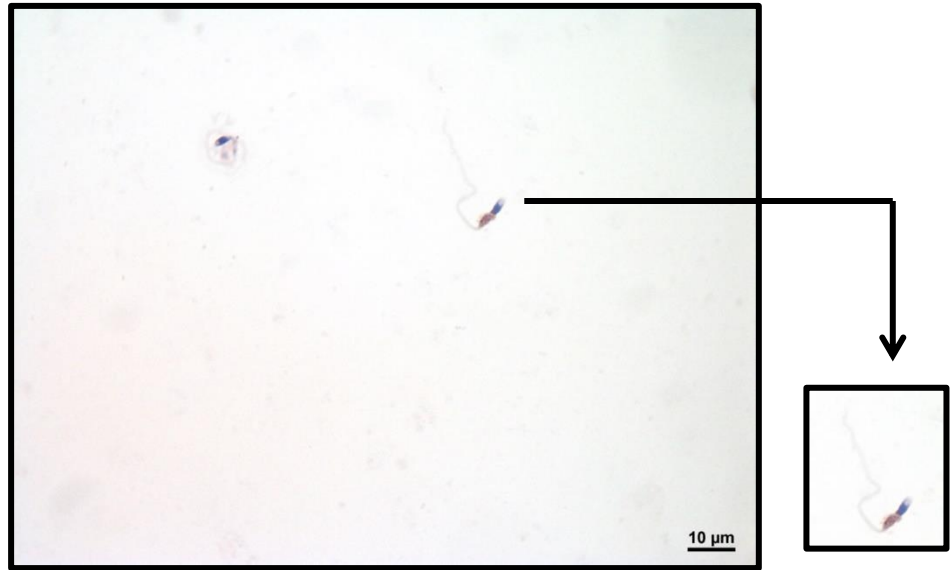
Şekil 4.16: Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonu.
(negatif kontrol ışık mikroskopik görüntüsü X100)



Şekil 4.17: Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonu.
(negatif kontrol ışık mikroskopik görüntüsü X100)



Şekil 4.18: PARP proteinin immünohistokimyasal analizi. Ok işareti boyun, yıldız ise kafa ve kuyruk bölgesindeki ekspresyonu göstermektedir. (negatif kontrol ışık mikroskopik görüntü X100)



Şekil 4.19: Sperm hücresinin boyun bölgesindeki PARP protein ekspresyonu. (negatif kontrol ışık mikroskopik görüntüsü X100)

Şekil 4.20: 9 numaralı hastanın PARP proteininin immünohistokimyasal analizi.
(negatif kontrol ışık mikroskopik görüntüsü X100)



4.5. Sperm Parametreleri

Çalışmamızın sonuçları Tablo 9.5.1'de gösterilmiştir. İstatiksel veriler her parametrenin altında belirtilmiştir.

Tablo 4.10: Sperm Parametrelerinin istatistiksel analizinin değerlendirilmesi. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

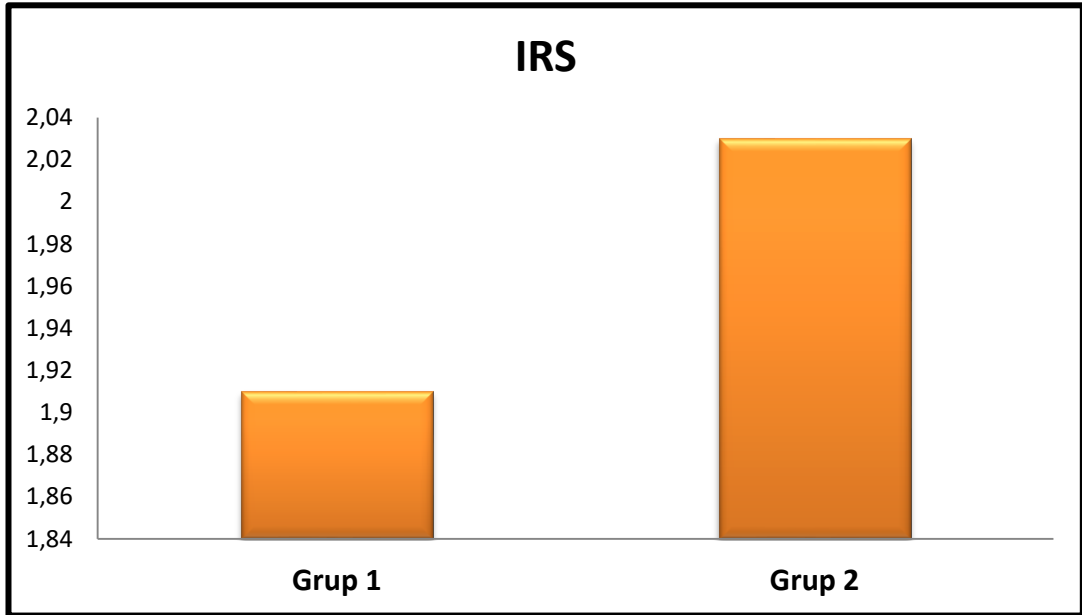
SPERM PARAMETRELERİ	GRUP 1 ORTALAMA DEĞER	GRUP 2 ORTALAMA DEĞER
SPERM KONSANTRASYONU ($\times 10^6/\text{mL}$)	34,75 \pm 9,42	31,50 \pm 8,58
TOPLAM MOTİLİTE ORANI (%)	53,50 \pm 33,49	40,00 \pm 27,77
NORMAL MORFOLOJİ (%)	1 \pm 1,15	0,50 \pm 0,57

Tablo 4.11: IRS, OSİ, TB ve p değerlerinin ve tanımlayıcı istatistik tablosu.

	Minimum	Maximum	Mean \pm Std. Deviation	p değeri
IRS	1,01	4,44	1,91 \pm ,9	0,698
OSİ	0,82	17,63	0,09 \pm 20,1	0,383
TB	28,95	56,92	42,88 \pm 8,2	0,57
IRS2	0,69	5,78	2,03 \pm 1,1	0,698
OSİ2	0,47	41,68	3,88 \pm 15,3	0,383
TB2	33,20	73,64	52,9 \pm 11	0,57

Tablo 4.12: IRS değerlerinin gsterildiği analiz. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. (Grup 1 kriyoprezervasyon öncesi, grup 2 kriyoprezervasyon sonrası hastaları gstermektedir.)

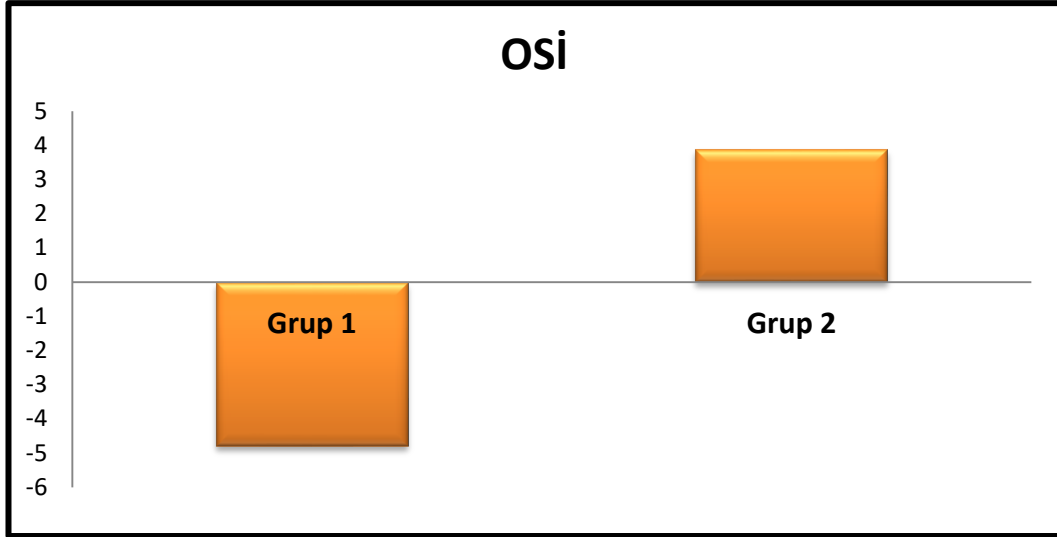
	IRS	Min-Max	<i>p</i> değeri
Grup 1	1,91 \pm 0,92	1,01-4,44	0,698
Grup 2	2,03 \pm 1,11	0,69-5,78	0,698



şekil 4.21: IRS değerlerinin gsterildiği grafik. (Grup 1 kriyoprezervasyon öncesi, grup 2 kriyoprezervasyon sonrası hastaları gstermektedir.)

Tablo 4.13: OSİ değerlerinin gsterildiği analiz. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. (Grup 1 kriyoprezervasyon öncesi, grup 2 kriyoprezervasyon sonrası hastaları gstermektedir.)

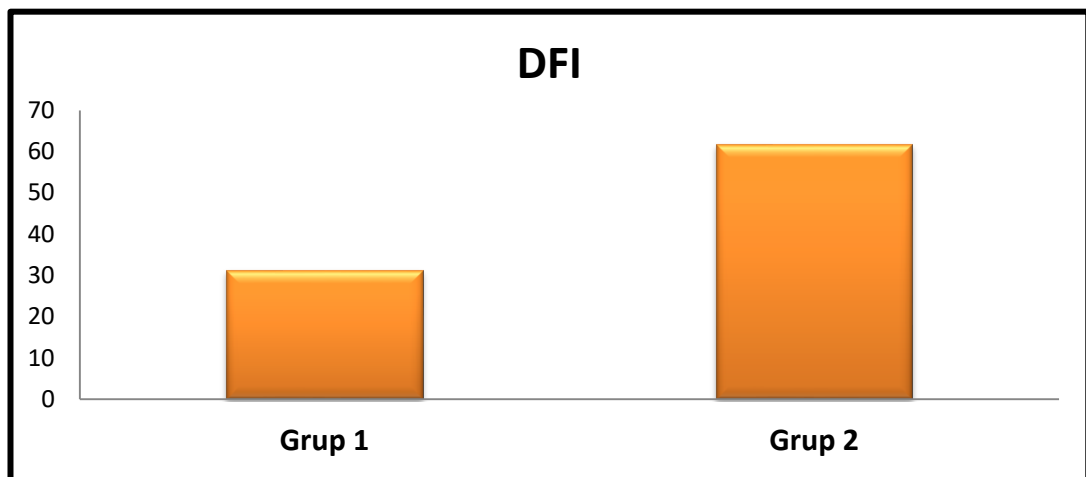
	OSİ	Min-Max	<i>p</i> değeri
Grup 1	0,09 \pm 20,11	0,82-17,63	0,383
Grup 2	3,88 \pm 15,35	0,47-41,68	0,383



Şekil 4.22: OSİ (Oksidatif Stres İndeksi) değerlerinin gösterildiği grafik. (Grup 1 kriyoprezervasyon öncesi, grup 2 kriyoprezervasyon sonrası hastaları göstermektedir.)

Tablo 4.14: DFI değerlerinin gösterildiği analiz. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. (Grup 1 kriyoprezervasyon öncesi, grup 2 kriyoprezervasyon sonrası hastaları göstermektedir.)

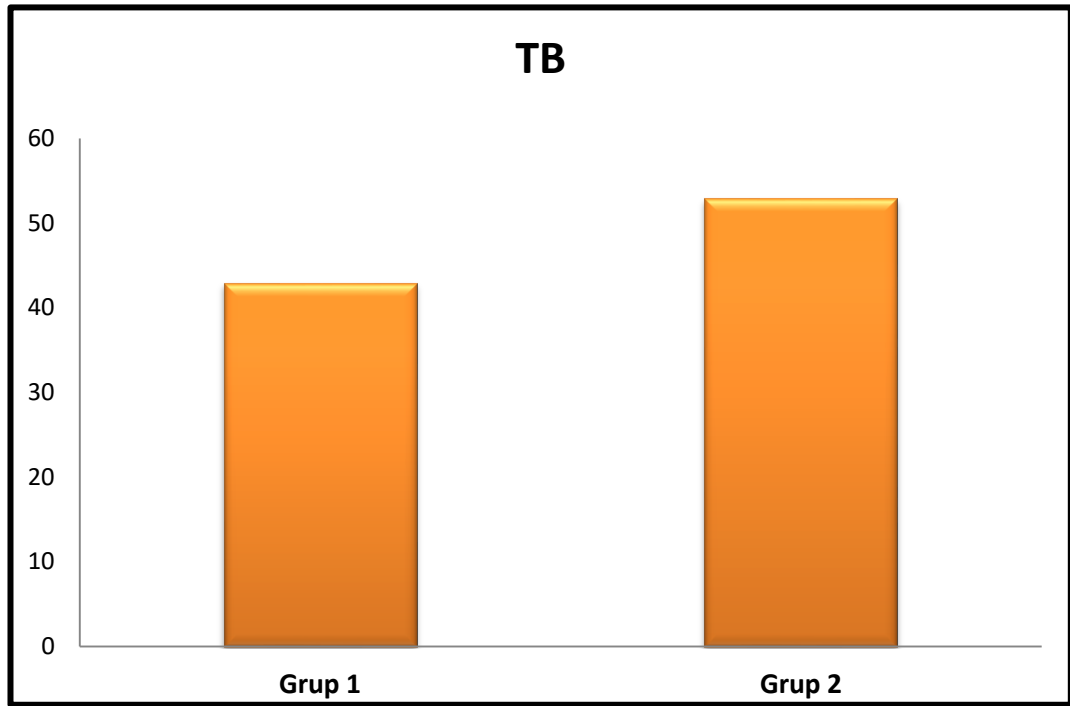
	DFI	Min-Max	<i>p</i> değeri
Grup 1	31,29 \pm 15,18	17,27-52,20	0,57
Grup 2	61,79 \pm 13,53	50,38-80,42	0,57



Şekil 4.23: DFI (DNA Fragmentasyonu İndeksi) değerlerinin gösterildiği grafik. (Grup 1 kriyoprezervasyon öncesi, grup 2 kriyoprezervasyon sonrası hastaları göstermektedir.)

Tablo 4.15: Kromatin bütünlüğü değerlerinin gösterildiği analiz. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. (Grup 1 kriyoprezervasyon öncesi, grup 2 kriyoprezervasyon sonrası hastaları göstermektedir.)

	Kromatin Bütünlüğü	Min-Max	<i>p</i> değeri
Grup 1	42,88 \pm 8,23	28,95-56,92	0,006
Grup 2	52,9 \pm 11,00	33,20-73,64	0,006



Şekil 4.24: Kromatin bütünlüğü değerlerinin gösterildiği grafik. (Grup 1 kriyoprezervasyon öncesi, grup 2 kriyoprezervasyon sonrası hastaları göstermektedir.)

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda literatürdeki sperm kriyoprezervasyonu ve infertilite arasındaki ilişki hakkındaki belirsizlikleri aydınlatma amacıyla sperm kriyoprezervasyonunu öncesi ve sonrasında oksidatif stres, DNA fragmentasyonu, kromatin yapı ve PARP proteininin ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamıza, sonuçları etkileyebilecek diğer parametrelerin etkisini en alt seviyeye indirebilmek ve oksidatif stresin etkilerini direkt olarak analiz edebilmek için sperm parametrelerinde problem görülmemiş erkekler dahil edilmiştir. Araştırılan tüm parametreler, aşağıda tartışılmıştır.

Bu amaçla çalışmada, oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS, OSİ değerleri), DNA fragmentasyonu ve kromatin yapı bütünlüğü gibi genetik yapı parametreleri, PARP proteininin ekspresyon seviyeleri araştırılmış ve analiz edilmiştir. Bu tez çalışmamızda örneklerimizde incelenen yukarıda bahsedilen fonksiyonel parametrelerin kriyoprezervasyon sonrasında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığını belirledik. Bulgularımız bu konuda yapılan diğer çalışmaların bulgularını desteklemektedir.

Seminal plazmada oksidatif durumun belirlenebilmesi amacıyla oksidatif stres indeks (OSİ), toplam oksidan miktarı (TOS) ve toplam antioksidan miktarı (TAS) olmak üzere 3 farklı parametre kullanılmıştır. Araştırılan tüm parametreler, aşağıda alt başlıklar halinde tartışılmıştır.

5.1. Oksidatif Stres

Sperm hücresi işlev bozukluğunun en önemli sebeplerinden biri oksidatif streştir. Yapılan çalışmalar, spermatozoanın hem yapısal hem de işlevsel bütünlüğünün bozulmasında oksidatif stresin etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalar oksidatif stresin neden olduğu hasarın sperm kriyoprezervasyonu sonrası arttığını ortaya koymaktadır. Yapılan diğer bazı araştırmalarda ise oksidatif stres ile sperm kriyoprezervasyonu arasında bir ilişki olmadığı gösterilmektedir [204].

OSİ ile sperm kriyoprezervasyonunu inceleyen az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, sperm kriyoprezervasyonunun insan

sperminde DNA parçalanmasında ve oksidatif baz hasarında artışa neden olduğunu bulunmuştur [204]. Bu, kriyoprezervasyon tarafından indüklenen DNA hasarı ve oksidatif stres yoğunluk gradyanları ile izole edilen yüksek kaliteli spermin bir özelliği olduğunu ve sadece zayıf kalitedeki hücrelerin kırılabilirlik göstermesinin sonucu olmadığını göstermektedir. Bu çalışmada sonuçlar insan spermindeki oksidatif strese kriyoprezervasyon kaynaklı bir artışı göstermektedir.

Yapılan diğer çalışmalarda, kriyoprezervasyonun, akrozom zarları veya mitokondri gibi farklı seviyelerdeki yapılardaki spermlere zarar verebileceği ve nihayetinde dölleme kabiliyetini azaltabileceği gösterilmiştir [205,206]. Ayrıca, kriyoprezervasyondan sonra bu hücrelerin oksidatif stres parametreleri seviyesinde önemli bir azalma bildirilmiştir. Sperm kriyoprezervasyonu sürecinden sonra sağlıklı spermlerin azalmasının en önemli nedenlerinden birinin, artan ROS düzeylerinden lipid oksidasyonu yoluyla membran sisteminin olumsuz yönde etkilenmesi olduğu düşünülmektedir. Bu değişiklikler sperm fertilizasyonunu azaltabilmektedir. Donma ve çözülme süreçleri ayrıca daha fazla reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna da yol açmaktadır. Bu çalışma kriyoprezervasyon sırasında aşırı ROS üretimi, çözülme sonrası motilite, canlılık, membran bütünlüğü, antioksidan durumu ve doğurganlık ve sperm fonksiyonlarında azalma ile ilişkilendirilmiştir [207].

Çalışmamızda seminal plazmada belirlenen TOS ve TAS' ın birbirine oranı alınarak hesaplanmıştır ve oksidanlar ile antioksidanlar arasındaki oksidatif dengeyi ortaya koyan oksidatif stres indeks (OSİ) değeri ile araştırılan diğer parametreler arasında ilişki belirlenmemiştir. Çalışmamızda OSİ değerleri kriyoprezervasyon öncesi -4,79, kriyoprezervasyon sonrası 3,88 ve ortalama -0,45 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda yapılan diğer çalışmaların aksine oksidatif stres parametreleri ile sperm kriyoprezervasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Bunun sebepleri arasında çalışılan bireylerin farklılığı, bireylerin fertil veya infertil olması, yapılan deney yöntemlerinin farklılığı bulunabilmektedir.

5.2. Toplam Oksidan Seviyesi

Çalışmamızda sperm kriyoprezervasyonu öncesi TOS seviyesi 9,35 $\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$, sperm kriyoprezervasyonu sonrası TOS seviyesi 21,87 $\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$ ve ortalama TOS seviyesi 15,61 $\mu\text{mol}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{eq.}$ olarak

belirlenmiştir. Çalışmamızda, seminal plazmadaki TOS seviyesi ile sperm kriyoprezervasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Literatürde artan ROT seviyeleri, sperm kriyoprezervasyonu sonrası azalma ile ilişkilendirilmiş çalışmalar mevcuttur ancak arasındaki bağlantı tam olarak anlaşılammıştır [208]. Çalışmamızda TOS ile sperm kriyoprezervasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Spermin hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROT; H₂O₂, O₂ -), akış sitometrisi kullanılarak değerlendirildiği bir çalışmada, yüksek düzeyde hücre içi ROT' nin, spermi olumsuz etkilediğini bildirilmiştir. Ancak hasta grubu, infertil erkeklerden oluştuğundan dolayı bizim çalışmamızdan farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

5.3. Toplam Antioksidan Seviyesi

Çalışmamızda sperm kriyoprezervasyonu öncesi TAS seviyesi 1,13 µmol/H₂O₂/eq., sperm kriyoprezervasyonu sonrası TAS seviyesi -0,01 µmol/H₂O₂/eq. ve ortalama TAS seviyesi 0,55 µmol/H₂O₂/eq. bulunmuştur. Çalışmamızda, seminal plazmadaki TAS seviyesi ile sperm kriyoprezervasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Sperm kriyoprezervasyonu ve çözündürülmesinin, artan ROS üretiminin yanı sıra azalmış antioksidan savunma seviyeleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [209]. Bu nedenle, antioksidanların kullanımının, sperm dondurma ve çözme sırasındaki kriyo hasarın üstesinden gelmek için en önemli zorluklardan biri olduğu düşünülmektedir [210].

Kriyoprezervasyon, çözülme sonrası motiliteyi, canlılığı, hücre içi enzimatik aktiviteyi, doğurganlığı ve diğer sperm parametrelerini bozan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açmaktadır [209]. Oksidatif stres, ROS ve antioksidanların doğrudan oluşması yoluyla veya oksidatif stres son ürünlerinin ölçülmesi yoluyla değerlendirilebilmektedir. Dondurarak saklama sonrası hasar oluşması ile ilişkili reaktif oksijen türleri, memeli spermelerinde de karakterize edilmiştir [210]. Bununla birlikte antioksidan aktivite üzerindeki etkileri hakkında yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Kriyohasara karşı sperm korumasına yönelik temel yaklaşım, savunma yöntemleri olarak antioksidanların ve kriyoprotektanların kullanımına

dayanmaktadır. Şimdiye kadar, antioksidan uygulamasının donma-çözülme sürecinin neden olduğu hasarı tamamen ortadan kaldırmak için yeterli olmadığı düşünülmektedir. Bunun sebebinin sperm kriyoprezervasyonu sırasında sadece az miktarda ilave antioksidan kullanımı olduğu bildirilmiştir [211, 212]. Antioksidanların koruyucu özelliklerinin, işleme ve soğutma sırasında kaybolabileceği düşünülmektedir. Kriyoprezervasyon işlemi sırasında, serbest radikallerin konsantrasyonunun antioksidanlardan daha yüksek olduğu ve genellikle kriyoprotektana eklenen antioksidan miktarının yeterli olmadığı düşünülmektedir. Antioksidan yaklaşımlarının az sayıdaki başarıları, araştırmacıları yeni bir yaklaşım geliştirmeye teşvik etmektedir. Yapılan bir çalışmada bu yaklaşımlardan birinin, hafif, kontrol edilebilir stresle dondurarak saklamadan önce spermin stresle ön koşullandırılması olduğu bildirilmiştir [213]. Bu çalışma oksidatif ajanlar gibi çeşitli stres faktörlerinin ölümcül olmayan seviyelerde uygulanmasının, kriyoprezervasyon sırasında spermin stres toleransını iyileştirebileceğini bildirmiştir. Önceki çalışmalar, hafif stresin indüklenmesinin spermde antioksidan protein seviyelerini artırabileceğini öne sürmüştür. Bu çalışmalardan anlaşılan, bu tepkinin esas olarak ölümcül olmayan stresin zamanına ve dozuna bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Literatürdeki çalışmaların aksine bizim çalışmamızda sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve sonrasında anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bu sonuç bize oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengeyi ifade eden OSİ değerinin, sperm kriyoprezervasyonu öncesi ve sonrası hastaların normozospermik vakalardan seçilmesinden kaynaklı olarak çok yüksek olmaması nedeniyle elde edildiğini düşündürmektedir. Ayrıca, antioksidan seviyeleri; beslenme tarzı, alınan takviye ediciler ve yaşam şartlarıyla ilişkili olabilmektedir. Bu nedenle anlamlı bir sonuç elde edememizin sebebi olarak bu konu ile ilgili elimizde hasta verileri olmadığından kaynaklı olabileceğini düşündürmüştür [214].

Yapılan çalışmalar ve bizim çalışmamız arasında ortaya çıkan bu farklılıklar, temelde araştırmalardaki örnek sayılarının aynı ve uygun olmamasından kaynaklanabileceğini de düşündürmektedir. Aynı zamanda farklı dondurma yöntemleri, DNA bütünlüğünü ölçmede kullanılan farklı teknikler ve kriyoprezervasyondan önce kullanılan farklı hazırlama tekniklerinden de kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Erkek üreme fonksiyonunda redoks reaksiyonlarının rolü birçok çalışmada bildirilmiştir. Sperm, çoğu biyolojik sistemde rol oynayan aynı oksidatif rolü

sergilemektedir. Bu da işlev bozukluğu, oksidatif stres ve antioksidan kapasite arasındaki dengesizlikten kaynaklanacağı düşünülmektedir. Hem hayvan modellerinde hem de erkek genital ve üreme patolojileri olan insanlarda, çalışmalar oksidatif dengesizlik ile kısırlık arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bu bilgi, tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır [215, 216]. ROS'un etkisini daha kesin olarak incelemek, infertiliteyi tedavi etmek ve yardımcı üreme tekniklerini optimize etmek için daha fazla araştırma gerekmektedir.

5.4. DNA Fragmentasyonu

DNA fragmentasyonu ile sperm kriyoprezervasyonu arasındaki ilişkiyi inceleyen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmalar farklı sonuçlar bildirmektedir [131]. Bu farklılıkların nedeninin, çalışılan hastaların ve DNA fragmentasyonu değerlendirilmesi için kullanılan tekniklerin çok çeşitli olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Sperm DNA hasarının değerlendirilmesinde, infertil erkeklerin değerlendirilmesinin önemli bir rolü vardır. Sperm kromatin bütünlüğünün insan üremesindeki önemi ve oksidatif stres ile ilişkisi giderek daha fazla ortaya çıkmaktadır. Farklı DNA fragmentasyonu tahlillerinin hızlı gelişimi, bu alandaki ilerlemeleri hızlandırmaktadır.

Çalışmamızda DNA fragmentasyonu ve sperm kriyoprezervasyonu arasındaki ilişkiyi anlamak için Annexin V, PI çiftli florasan boyama ve Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmamızda SDF değeri 0,05 bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçlarına göre sperm kriyoprezervasyonu sonrasında sperm kriyoprezervasyonu öncesi ile kıyaslandığında DNA fragmentasyonunun anlamlı derecede arttığı belirlenmiştir. Bulgularımız, 77 hastanın DNA hasarı fragmentasyonunu dondurma öncesi ve sonrası TUNEL yöntemiyle belirledikleri ve artmış olarak buldukları bir çalışmanın bulgularını desteklemektedir [217]. Bizim çalışmamızın da bulgularından biri olan sperm DNA fragmentasyonundaki artış bunu kanıtlamaktadır. DNA fragmentasyonunda belirlediğimiz bu anlamlı artışın, çalışmamızdaki bireylerin infertil olan popülasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada infertil olan ve olmayan iki grup DNA hasarı açısından karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada infertil grupta belirlenen

DNA hasarındaki artışın fertil popülasyonda görülmediği dolayısıyla fertil grubun dondurma hasarına daha dirençli olduğu bildirilmiştir [218].

Çalışmamızı destekler nitelikte; 150 fertil erkekte yapılan bir çalışmada DFI'nde (DNA Fragmentasyon İndeksi), artış gösterilmiştir [219]. Ayrıca Rafighdoost H ve ark. ve Irvine DS ve ark. çalışmalarında da sonuçlarımızı destekler şekilde motilite ile DFI arasında ilişki olduğu bildirilmiştir [220,221]. Ayrıca Sheikh N ve ark. çalışmaları bizim sonuçlarımızı destekler nitelikte düşük konsantrasyon ile yüksek DFI arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir [222].

Yapılan başka bir çalışmada çalışmamızla paralel olarak fare ve boğa spermi ile benzer sonuçlar elde edilmiştir [223]. Ayrıca, kriyoprezervasyonun, boğa ve insan spermi için TUNEL'de bir immünokimyasal testle değerlendirilmiştir ve çözüldükten hemen sonra veya 30 dakika içinde sperm DNA'sına önemli ölçüde zarar vermediği sonucuna varılmıştır. Buna karşılık, SCSA veya modifiye alkalin tek hücreli jel elektroforezi (kuyruklu yıldız) testi ile değerlendirilen insan spermi üzerinde yapılan çalışmalar, dondurarak saklamadan sonra sperm DNA bütünlüğünün bozulduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Ancak mevcut araştırmada, türlerdeki farklılıklar, kriyoprezervasyon prosedürü ve çözülme sonrası değerlendirme süresi nedeniyle sonuçlarımızı önceki çalışmalarla karşılaştırmanın zor olduğu düşünülmektedir [224].

Kriyoprezervasyonun hücreler üzerindeki etkileri iyi kanıtlanmıştır. Ancak bugüne kadar literatürde kriyoprezervasyonun DNA fragmentasyonunu etkileyip etkilemediği veya dondurma-çözme prosedürü için belirli bir protokolün kullanıp kullanılmadığı konusunda kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Bu, dondurma protokolleri kullanılarak daha fazla çalışmanın yapılmasının faydalı olacağını düşündürmektedir. Ayrıca, kriyoprezervasyonun sperm DNA bütünlüğü üzerindeki etkisini ve kriyoprezervasyon sonrası sperm kullanımının üreme sonucu üzerindeki etkisini tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bunun yanında sperm hücrelerine maksimum koruma sağlamak için teknik önlemler uygulanması gerektiği düşünülmektedir.

5.5. Kromatin Yapı

Çalışmamızda kromatin yapı bütünlüğü ile sperm kriyoprezervasyonu arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve araştırılmıştır. Sperm kromatin yapı analizi için metakromatik nükleer bir tiyazin boyası olan toluidine mavisi (TB), mikroskopik bir yöntem olarak çalışmalarda kullanılmaktadır. Sperm kromatin bütünlüğünün erkek fertilitesi ile ilişkili olduğuna inanılmaktadır [225]. Bunun yanında sperm kromatin bütünlüğü ile sperm kriyoprezervasyonu arasındaki ilişki birkaç çalışmada gösterilmiştir.

Son zamanlarda, sperm kromatin bütünlüğünün, sperm kalitesi ile bağımsız olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında hem *in vivo* hem de *in vitro* fertilitasyon için rutin semen analizi sonuçlarıyla bağlantılı olarak daha iyi tanı ve prognostik kapasitelere sahip olduğu kabul edilmektedir. Sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için çok sayıda yöntem olmasına rağmen, tüm prosedürlerin daha fazla çalışılması gerektiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda kromatin bütünlüğü kriyoprezervasyon öncesi, kriyoprezervasyon sonrası ve ortalama değer bulunmuştur. Sonuçlarımız ele alındığında sperm kriyoprezervasyonu sonrasında sperm hücrelerinde kromatin bütünlüğünde anlamlı bir azalma belirlenmiştir. Çalışmamızı destekler nitelikte 92 semen numunesinde yapılan bir çalışmada, dondurulmadan önce incelenen semen numunelerinde normal spermlerin ortalama yüzdesi $20,1 \pm 9,3$ olarak bulunmuştur. Ancak bu oran dondurma çözme prosedüründen sonra $12,4 \pm 7,7$ 'ye düşerek önemli ölçüde azalmıştır [226]. Öte yandan aynı çalışmada dondurma-çözme prosedüründen sonra semen örneklerinde anilin mavisi boyama yapılmış ve sperm kromatin durumunda önemli bozulma gözlemlenmiştir.

Çalışmamızdan kullanılan birey açısından farklılık gösteren başka bir çalışmada, T. Vutyavanich ve ark. kriyoprezervasyonun koç spermlerinin kromatin bütünlüğünü bozduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, bu tür DNA hasarının taze sperm hücrelerine göre kriyoprezervasyon sonrası koç sperm hücrelerinde kromatin yapısını bozduğu gösterilmiştir [226, 227].

Sperm kromatin bütünlüğü ile sperm parametreleri ve sperm kriyoprezervasyon arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar farklı sonuçlar da bildirmektedir [228]. Bunun nedeni, çalışılan hasta gruplarının farklılığı ve kromatin yapının

değerlendirilmesi için kullanılan tekniklerin çeşitliliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Son zamanlarda, sperm kromatin bütünlüğünün, hem *in vivo* hem de *in vitro* fertilizasyon için rutin semen analizi sonuçlarıyla bağlantılı olarak daha iyi tanı ve prognostik kapasitelere sahip olduğu kabul edilmektedir. Sperm kromatin bütünlüğünü değerlendirmek için çok sayıda yöntem olmasına rağmen, her prosedürün daha fazla çalışılması ve tanısal androloji laboratuvarında rutin kullanım için standardize edilmesi gerekmektedir.

5.6. PARP Ekspresyonu Parametreleri

Poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA onarımı, genomik stabilite ve programlanmış hücre ölümü gibi bir dizi hücre sel süreçte yer alan bir protein ailesidir [231]. PARP, dört ilgi alanından oluşmaktadır bunlar: bir DNA bağlama alanı, bir kaspaz parçalı alan, bir otomatik modifikasyon alanı ve bir katalitik alandan oluşmaktadır. Hasarlı DNA'nın varlığında, DNA-bağlanma alanı DNA'yı bağlamakta ve bir konformasyonel bozulmaya neden olmaktadır. Bu bağlanmanın diğer alanlardan bağımsız olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Bunun, PARP'ın kaspaz bölünme inhibisyonuna dayalı programlanmış bir hücre ölümü modelinin ayrılmaz bir parçası olduğu düşünülmektedir. Modifikasyon alanının, katalizden sonra proteinin DNA'dan salınmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. Ayrıca, bölünmeye bağlı inaktivasyonda bütünlüleyici bir rol oynamaktadır. PARP'ın ana rolü, SSB onarımında yer alan enzimatik alanlara sinyal göndererek metabolik, kimyasal veya radyasyona bağlı tek iplikli DNA kırılmalarına (SSB) ani bir hücre sel yanıtı saptamak ve başlatmaktır. Eğer DNA'daki hasar az ise, PARP diğer onarım 64 enzimleriyle DNA onarımını sağlayabilmektedir. Yapılan araştırmalarda PARP enziminin ekspresyonunun olgun sperm ve fertil erkeklerde yüksek olduğu gözlenmektedir. [232].

Çalışmamızda da PARP sinyal yolağı ile sperm kriyoprezervasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Spermde, PARP sinyal yolağı ve bu yolağın sperm kriyoprezervasyonu ile ilişkisi ve diğer olaylara etkileri ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bilgilerimiz doğrultusunda çalışmamız, PARP proteininin sperm kriyoprezervasyonu ile ilişkisinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Ancak yapılan bir

çalışmada, sperm kriyoprezervasyon sonrasında SPAG5 (p - değeri = 0,009), SPAG7 (p - değeri = 0,004) ve SPAG12 (SNU13/NHP2L1 ; p - değeri = 0.039) genlerinin ifadesinde bir azalma olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar, dondurma prosedürünün insan spermindeki gen ekspresyonunu ve bir dereceye kadar proteinleri olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir [233]. Çalışmamız ile yapılan diğer çalışmalar arasında görülen değişimler çalışmalarda farklı proteinlerin kullanılması, çalışmaya katılan bireylerin aynı olmaması ve farklı dondurma prosedürlerinin kullanılması gibi bazı durumların sebep olabileceği düşündürmektedir.

PARP'ın hücrel süreçlerdeki rolü iyi tanımlanmış olsa da erkek doğurganlığındaki rolü henüz yeterince aydınlatılamamıştır. PARP'ın spermatogenez sırasında testiste ve ejaküle edilmiş spermatozoada tespit edilmesi bir rolünün olduğunu düşündürecek kadar kanıt bulunmaktadır [234]. Özellikle sperm kriyoprezervasyon ile PARP'ın sperm DNA onarımındaki rolünü tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüm bulgularımız birlikte değerlendirildiğinde sperm kriyoprezervasyonu sonrasında sperm parametreleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Ayrıca dondurma çözme yapılan erkeklerde kromatin bütünlüğü, semen hacmi, sperm sayısında anlamlı bir azalma ve DNA fragmentasyonunda da anlamlı bir artış gözlemlenmiştir. Kriyoprezervasyonda rol alan moleküler mekanizmaların aydınlatılması, kriyoprezervasyon sonrası ortaya çıkan olumsuz etkilerin azaltılması ya da yok edilmesi yönünde yeni stratejilerin geliştirilmesinde fayda sağlayacaktır. Bu bağlamda PARP proteininin detaylı araştırılması sürecine gidilebileceği düşünülmektedir. Bu konuda daha yüksek sayıda örnekle yapılacak daha kapsamlı moleküler çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Baker, H. G., (1998), "Reproductive effects of nontesticular illness", *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 27(4), 831-850.
- [2] Dubin, L., & Amelar, R. D., (1970), "Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele", *Fertility and Sterility*, 21(8), 606-609.
- [3] Sanocka, D., & Kurpisz, M., (2004), "Reactive oxygen species and sperm cells", *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2(1), 1-7.
- [4] Herceg, Z., & Wang, Z. Q., (2001), "Functions of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477(1-2), 97-110.
- [5] d'AMOURS, Damien, D., (1999), "Poly (ADP-ribosyl) ation reactions in the regulation of nuclear functions", *Biochemical Journal*, 342(2), 249-268.
- [6] Isabelle M., Moreel X., Gagné J. P., Rouleau M., Ethier C., Gagné P., (2010), " Investigation of PARP-1, PARP-2 and PARG interactomes by affinity purification mass spectrometry ", *Proteome Science*, 252(8), 22.
- [7] Dantzer, F., Giraud-Panis, M. J., Jaco, I., Amé, J. C., Schultz, I., Blasco, M., Schreiber, V., (2004), "Functional interaction between poly (ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2", *Molecular and cellular biology*, 24(4), 1595-1607.
- [8] Schreiber V., Dantzer F., Ame J. C., de Murcia G., (2006), "Poly(ADP-ribose), Novel functions for an old molecule", *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 517–528.
- [9] Kourtis N., Tavernarakis N., (2011), "Cellular stress response pathways and ageing: Intricate molecular relationships", *EMBO J*, 30, 2520–2531.
- [10] Seher, T., Thiering, E., Al Azemi, M., Heinrich, J., Schmidt-Weber, C. B., Kivlahan, C., (2015), "Is parental consanguinity associated with reduced ovarian reserve?", *Reproductive BioMedicine Online*, 31(3), 427-433.

- [11] Chandra A, Copen C. E, Stephen E. H., (2013), "Infertility and impaired fecundity in the United States", *Natl Health Stat Rep*, (67), 1–18.
- [12] Carson, S. A., & Kallen, A. N., (2021), "Diagnosis and management of infertility: a review", *Jama*, 326(1), 65-76.
- [13] Barbieri, R. L., (2019), "Female infertility. In Yen and Jaffe's reproductive endocrinology", Elsevier, 556-581.
- [14] Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R., (2015), "A unique view on male infertility around the globe", *Reproductive biology and endocrinology*, 13(1), 1-9.
- [15] Shih, K. W., Shen, P. Y., Wu, C. C., & Kang, Y. N., (2019), "Testicular versus percutaneous epididymal sperm aspiration for patients with obstructive azoospermia: a systematic review and meta-analysis", *Translational andrology and urology*, 8(6), 631.
- [16] Winters B. R., Walsh T. J., (2014), "The epidemiology of male infertility", *Urol Clin North Am*, Feb,41 (1),195-204.
- [17] Goh W. S., (2015), "Falciatori I, Tam OH, et al. piRNA-directed cleavage of meiotic transcripts regulates spermatogenesis", *Genes Dev*, 29 (10),1032–1044.
- [18] Griswold M. D., (2016), "Spermatogenesis: the commitment to meiosis", *Physiol Rev*, 96 (1),1–17.
- [19] Gunes S., Al-Sadaan M., Agarwal A., (2015), "Spermatogenesis, DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility", *Reprod Biomed Online*, 31 (3), 309–319.
- [20] Duan P., Hu C., Quan C., (2016), "4-Nonylphenol induces apoptosis, autophagy and necrosis in Sertoli cells: involvement of ROS-mediated AMPK/AKT-mTOR and JNK pathways", *Toxicology*, 341–343, 28–40.
- [21] O'Hara L., Smith L. B., (2015), "Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility", *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29 (4),595–605.

- [22] Galdon G., Atala A., Sadri-Ardekani H., (2016), "In vitro spermatogenesis: how far from clinical application" *Curr Urol Rep*, 17 (7),49.
- [23] Garolla A., Ghezzi M., Cosci I., (2017), "FSH treatment in infertile males candidate to assisted reproduction improved sperm DNA fragmentation and pregnancy rate", *Endocrine*, 56 (2),416–425.
- [24] Choy J. T., Eisenberg M. L., (2018), "Male infertility as a window to health", *Fertil Steril*, 110 810–4.
- [25] Costanzo P., Suárez S., Scaglia H., Zylbersztein C., Litwak L., Knoblovits P., (2014), "Evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in eugonadal men with type 2 diabetes mellitus", *Andrology*, 2 (1),117–124.
- [26] Tsatsanis C., Dermitzaki E., Avgoustinaki P., Malliaraki N., Mytaras V., Margioris A. N., (2015), "The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal", *Hormones*, 14 (4),549–562.
- [27] Xiong X., Zhong A., Xu H., (2014), "Effect of cyanotoxins on the hypothalamic pituitary gonadal axis in male adult mouse", *PLoS One*, 9 (11), 585.
- [28] Lucas X., (2014), "Clinical use of deslorelin (GnRH agonist) in companion animals: a review", *Reprod Domest Anim*, 49,64–71.
- [29] Monaco D., Fatnassi M., Padalino B., (2015), "Effects of a GnRH administration on testosterone profile, libido and semen parameters of dromedary camel bulls", *Res Vet Sci*, 102, 212–216.
- [30] Blumer, C. G., Restelli, A. E., Giudice, P. T. D., Soler, T. B., Fraietta, R., Nichi, M., Cedenho, A. P., (2012), "Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress", *BJU international*, 109(2), 259-265.
- [31] Teerds, K. J., de Rooij., D. G., Keijer, J., (2011), "Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models", *Human Reproduction Update*, 17 (5), 667–683.
- [32] Dutta S., Majzoub A., Agarwal A., (2019), "Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management", *Arab J Urol*, 17 (2), 87-98.

- [33] Thompson J., Bannigan J, (2008), "Cadmium toxic effects on the reproductive system and the embryo", *Reprod Toxicol (Review)*, 25 (3), 304–15.
- [34] Agarwal A., Prabakaran S. A., Said T. M, (2005), "Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm", *Journal of Andrology*, 26 (6), 654–60.
- [35] Robbins W. A., Elashoff D. A., Xun L., Jia J., Li N., Wu G., Wei F, (2005), "Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy", *Cytogenetic and Genome Research*, 111 (3–4), 371–7.
- [36] Harlev A., Agarwal A., Gunes SO., Shetty A., du Plessis SS, (2015), "Smoking and Male Infertility, An Evidence-Based Review", *World J Men's Health (Review)*, 33 (3), 143–60.
- [37] Azadi, L., Tavalae, M., Deemeh, M. R., Arbabian, M., & Nasr-Esfahani, M. H., (2017), "Effects of tempol and quercetin on human sperm function after cryopreservation", *CryoLetters*, 38(1), 29-36.
- [38] J. K. Sherman., "Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking," *Fertility and Sterility*, 397–412, 1973.
- [39] Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S., & Lansac, J, (1996), "Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review", *Human Reproduction Update*, 2(6), 553-559.
- [40] Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S., (1949), "Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures", *Nature*, 164(4172), 666-666.
- [41] Curry, M. R. (2000), "Cryopreservation of semen from domestic livestock", *Reviews of reproduction*, 5(1), 46-52.
- [42] Sanger, W. G., Olson, J. H., & Sherman, J. K., (1992), "Semen cryobanking for men with cancer—criteria change", *Fertility and sterility*, 58(5), 1024-1027.
- [43] Kopeika J., Thornhill A., Khalaf Y., (2015), "The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos", *Hum, Reprod*, 21, 209-227.

- [44]. Wang S., Wang W., Xu Y., Tang M., Fang J., Sun H., Sun Y., Gu M., Liu Z., Zhang Z., Lin F., Wu T., Song N., Wang Z., Zhang W & Yin C., (2014), "Proteomic characteristics of human sperm cryopreservation", *Proteomics* 14, 298– 310.
- [45] Petrunina AM., Waberski D., Gunzel-Apel AR & Topfer-Petersen E., (2007), "Determinants of sperm quality and fertility in domestic species", *Reproduction* 134, 3– 17.
- [46] Merino O., Aguaguina WE., Esponda P., Risopatron J., Isachenko E., Isachenko V & Sanchez R., (2015), "Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function in human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique", *Andrologia* 47, 186– 193.
- [47] Kopeika, J., Thornhill, A., Khalaf, Y., (2014), "The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence", *Human Reproduction Update*, 21 (2), 209–227.
- [48] Henry M. A., Noiles E. E., Gao D., Mazur P., Critser J. K., (1993), "Cryopreservation of human spermatozoa, IV, The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function", *Fertility and Sterility*, 60, 911–918.
- [49] Sanger, W. G., Olson, J. H., & Sherman, J. K., (1992), "Semen cryobanking for men with cancer—criteria change", *Fertility and sterility*, 58(5), 1024-1027.
- [50] Ghazeeri, G., Zebian, D., Nassar, A. H., Harajly, S., Abdallah, A., Hakimian, S., (2016), "Knowledge, attitudes and awareness regarding fertility preservation among oncologists and clinical practitioners in Lebanon", *Human Fertility*, 19(2), 127-133.
- [51] Fabbri R., Ciotti P., (2004), "Di Tommaso B, et al. Tecniche di crioconservazione riproduttiva", *Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia*, 3, 33– 41.
- [52] Vutyavanich T., (2010), "Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa", *Fertility and Sterility*, 93 (6) 1921–1928.

- [53] Behrman S. J., Sawada Y., (1966), "Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator", *Fertility and Sterility*, 17 (4),457–466.
- [54] Said TM., Gaglani A., Agarwal A., (2010), "Implication of apoptosis in sperm cryoinjury", *Reproductive BioMedicine Online*, 21 (4),456–462.
- [55] Mahadevan M., Trounson A. O., (1984), "Effect of cooling, freezing and thawing rates and storage conditions on preservation of human spermatozoa", *Andrologia*, 16 (1),52–60.
- [56] Thachil JV., Jewett MAS., (1981), "Preservation techniques for human semen", *Fertility and Sterility*, 35 (5),546–548.
- [57] Holt W. V., (2000), "Basic aspects of frozen storage of semen", *Animal Reproduction Science*, 62 (1–3),3–22.
- [58] Mazur P., Rall W. F., Rigopoulos N., (1981), "Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes", *Biophysical Journal*, 36 (3),653–675.
- [59] Talaei T., Esmaeelpour T., Aekiyash F., Bahmanpour S., (2010), "Effects of cryopreservation on plasma membrane glycoconjugates of human spermatozoa", *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 8 (3),119–124.
- [60] Benoff S., (1997), "Carbohydrates and fertilization, an overview", *Molecular Human Reproduction*, 3 (7),599–637.
- [61] Kuleshova, L.L. and Lopata, A., (2002) "Vitrification can be more favorable than slow cooling" *Fertil Steril* 78, 449–54.
- [62] Luyet, B., (1937) "The vitrification of organic colloids and protoplasm", *Biodynamica*, 1, 1-14.
- [63] Fabbri R., Ciotti P., Di Tommaso B., (2004), "Tecniche di crioconservazione riproduttiva", *Rivista Italiana di Ostetricia e Ginecologia*, 3, 33–41.

- [64] Honig S. C., Lipshultz L. I., Jarow J., (1994), "Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation", *Fertil Steril*, 62 (5), 1028-34.
- [65] Devasagayam T. P., Tilak J. C., Bloor K. K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S., Lele R. D., (2004), "Free radicals and antioxidants in human health, current status and future prospects", *The Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794–804.
- [66] Calamera J. C., Buffone M. G., Doncel G. F., (2010), "Effect of thawing temperature on the motility recovery of cryopreserved human spermatozoa", *Fertility and sterility*, 93(3), 789-794.
- [67] Di Santo M., Tarozzi N., Nadalini M., Borini A., (2012), "Human Sperm Cryopreservation, Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART", *Advances in Urology*, 854837.
- [68] Royere D., Barthelemy C., Hamamah S., Lansac J., (1996), "Cryopreservation of spermatozoa", a 1996 review, *Human Reproduction Update*, 2 (6), 553–559.
- [69] Herrero, M. B., & Gagnon, C., (2001), "Nitric oxide: a novel mediator of sperm function", *Journal of Andrology*, 22(3), 349-356.
- [70] Anger J. T., Gilbert B. R., Goldstein M., (2003), "Cryopreservation of sperm", *Indications, methods and results*, *Urol*, 170, 1079–1084.
- [71] Kotdawala A.P. , Kumar S., Salian S.R., Thankachan P., Govindraj K., Kumar P., Kalthur G., Adiga S.K., (2012), "Addition of zinc to human ejaculate prior to cryopreservation prevents freeze-thaw-induced DNA damage and preserves sperm function", *J. Assist. Reprod. Genet.* 29, 1447–1453.
- [72] Watson P. F., (2000), "The causes of reduced fertility with cryopreserved semen", *Animal Reproduction Science*, 60-61,481–492.
- [73] Stanic P., Tandara M., Sonicki Z., Simunic V., Radakovic B., Suchanek E., (2000), "Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen", *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 91 (1), 65–70.

- [74] Said T. M., Gaglani A., Agarwal A., (2010), "Implication of apoptosis in sperm cryoinjury", *Reproductive BioMedicine Online*, 21 (4), 456–462.
- [75] Mazur P., Rall W. F., Rigopoulos N., (1981), "Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes", *Biophysical Journal*, 36 (3), 653–675.
- [76] Morris G. J., Acton E., Avery S., (1999), "A novel approach to sperm cryopreservation", *Human Reproduction*, 14 (4), 1013–1021.
- [77] Arav A., Zeron Y., Leslie S. B., Behboodi E., Anderson G. B., Crowe J. H., "Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes", *Cryobiology*, 33 (6), 589–599.
- [78] Zeron Y., Pearl M., Borochoy A., Arav A., (1999), "Kinetic and temporal factors influence chilling injury to germinal vesicle and mature bovine oocytes", *Cryobiology*, 38 (1), 35–42.
- [79] Giraud M. N., Motta C., Boucher D., Grizard G., (2000), "Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa", *Human Reproduction*, 15 (10), 2160–2164.
- [80] Cross N. L., Hanks S. E., (1991), "Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes", *Human Reproduction*, 6 (9), 1279–1283.
- [81] Sakkas D., Urner F., Bianchi P. G., (1996), "Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection", *Human Reproduction*, 11 (4), 837–843.
- [82] Devasagayam T. P., Tilak J. C., Bloor K. K., Sane K. S., Ghaskadbi S. S., Lele RD (2004), "Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects" *The Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794–804.
- [83] Edreva A., (2005), "Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts, a submolecular approach", *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106 (2), 119–133.

- [84] Herb M., Gluschko A., Schramm M., (2021), "Reactive Oxygen Species, Not Omnipresent but Important in Many Locations", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9 (716406), 716406.
- [85] Park, M. H., Jo, M., Kim, Y. R., Lee, C. K., & Hong, J. T., (2016), "Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases", *Pharmacology & Therapeutics*, 163, 1-23.
- [86] Sato H., Shibata H., Shimizu T., Shibata S., Toriumi H., Ebine T., (2013), "Different cellular localization of antioxidant enzymes in the trigeminal ganglion", *Neuroscience*, 248, 345–358.
- [87] Plessis S. S., Makker K., Desai N. R., Agarwal A., (2008), "Impact of oxidative stress on IVF", *Expert Review of Obstetrics and Gynecology*, 3 (4), 539–554.
- [88] Sikka, S. C., (1996), "Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function", *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 1, e78-86.
- [89] Sharlip I. D., Jarow J. P., Belker A. M., (2002), "Best practice policies for male infertility", *Fertility and Sterility*, 77 (5), 873–882.
- [90] Vine M. F., (1996), "Smoking and male reproduction", a review, *International Journal of Andrology*, 19, 323–337.
- [91] Auger J., Eustache F., Andersen AG., (2001), "Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities", *Human Reproduction*, 16(12), 2710–2717.
- [92] Kenkel S., Rolf C., Nieschlag E., (2001), "Occupational risks for male fertility, an analysis of patients attending a tertiary referral centre", *International Journal of Andrology*, 24 (6), 318–326.
- [93] Agarwal A., Makker K., Sharma R., (2008), "Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility, an update", *American Journal of Reproductive Immunology*, 59 (1), 2–11.

- [94] Agarwal A., Saleh RA., Bedaiwy MA., (2003), "Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction", *Fertility and Sterility*, 79 (4), 829–843.
- [95] Valko M., Morris H., Cronin MTD., (2005), "Metals, toxicity and oxidative stress", *Current Medicinal Chemistry*, 12 (10), 1161–1208.
- [96] Sharma R. K., Agarwal A., (1996), "Role of reactive oxygen species in male infertility", *Urology*, 48 (6), 835–850.
- [97] Gagnon C., Iwasaki A., De Lamirande E., Kovalski N., (1991), "Reactive oxygen species and human spermatozoa", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 637, 436–444.
- [98] Aitken R. J., (1997), "Molecular mechanisms regulating human sperm function", *Molecular Human Reproduction*, 3 (3), 169–173.
- [99] Attaran M., Pasqualotto E., Falcone T., (2000), "The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization", *International Journal of Fertility and Women's Medicine*, 45 (5), 314–320.
- [100] de Lamirande E., Leclerc P., Gagnon C., (1997), "Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization", *Molecular Human Reproduction*, 3 (3), 175–194.
- [101] Sakkas D., Urner F., Bizzaro D., (1998), "Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure, effect on fertilization and embryo development", *Human Reproduction*, 13(1), 11–19.
- [102] Saalu L. C., (2010), "The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility", *Pak J Biol Sci*, 13, 413–22.
- [103] Aitken R. J., (1997), "Molecular mechanisms regulating human sperm function", *Mol Hum Reprod*, 3, 169–73.
- [104] Gagnon C., Iwasaki A., De Lamirande E., Kovalski N., (1991), "Reactive oxygen species and human spermatozoa", *Ann N Y Acad Sci*, 637, 436–44.

- [105] Griveau J. F., Le Lannou D., (1997), "Reactive oxygen species and human spermatozoa", *Int J Androl*, 20, 61–9.
- [106] Aitken R. J., (1995), "Free radicals, lipid peroxidation and sperm function", *Reprod Fertil Dev*, 7, 659–68.
- [107] Kodama H., Kuribayashi Y., Gagnon C., (1996), "Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization", *J Androl*, 17, 151–7.
- [108] Aitken R. J., De Iuliis G. N., Finnie J. M., Hedges A., McLachlan R. I., (2010), "Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population", *Hum Reprod*, 25, 2415–26.
- [109] Kao S. H., Chao H. T., Chen H. W., (2008), "Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility", *Fertil Steril*, 89, 1183–90.
- [110] Aitken R. J., Clarkson J. S., Fishel S., (1989), "Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function", *Biol Reprod*, 41, 183–97.
- [111] Allen J.A., Diemer T., Janus P., Hales K. H., Hales D. B., (2004), "Bacterial endotoxin lipopolysaccharide and reactive oxygen species inhibit Leydig cell steroidogenesis via perturbation of mitochondria", *Endocrine*, 25, 265–75.
- [112] Aitken, R. J., (1997), "Molecular mechanisms regulating human sperm function", *Molecular human reproduction*, 3(3), 169-173.
- [113] Mazzilli F., Rossi T., Sabatini L., Pulcinelli F. M., Rapone S., Dondero F., Gazzaniga P. P., (1995), "Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production", *Acta Eur Fertil*, 26, 145-148,
- [114] Wang A. W., Zhang H., Ikemoto I., Anderson D. J., Loughlin K. R., (1997), "Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation", *Urology*, 49, 921-925,
- [115] Peris S. I., Dufour M., Bailey J. L., (2007), "Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm" *Mol Reprod Dev*, 74 878-892.

- [116] de Lamirande E., Jiang H., Zini A., Kodama H., Gagnon C., (1997), "Reactive oxygen species and sperm physiology", *Rev Reprod*, 2, 48-54.
- [117] van Overveld, F. W., Haenen, G. R., Rhemrev, J., Vermeiden, J. P., & Bast, A., (2000), "Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma" *Chemico-biological interactions*, 127(2), 151-161.
- [118] Saleh R. A., Agarwal A.,(2002), "Oxidative stress and male infertility, from research bench to clinical practice" *Journal of Andrology*, 23: 737–752.
- [119]. Saez F., (2009), "Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility", *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité*, 37, 529–535.
- [120] Breininger E., Beorlegui NB., O’Flaherty C. M., (2005), "Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen", *Theriogenology*, 63, 2126–2135.
- [121] Belloc S., Benkhalifa M., Cohen-Bacrie M., Dalleac A., Chahine H., Amar E., Zini A., (2014), "Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation", *J. Assist Reprod Genet*, 31 (5), 527–32.
- [122] Wang C., Swerdloff R. S., (2014), "Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests", *Fertil Steril*, 102, 1502–1507.
- [123] Simon L., Brunborg G., Stevenson M., Lutton D., McManus J., Lewis S.E., (2010), "Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproductive outcomes", *Reprod*, 25 (7), 1594-1608.
- [124] Speyer B. E., Pizzey A. R., (2010), " Decreased implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation ", *Reprod*, 25(7), 1609-1618.
- [125] Zhang L. H., Qiu Y., Wang K. H., Wang Q., Tao G., Wang L. G., (2009), "Comparison between measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy, sperm chromatin distribution test, and terminal uridine nick-end labeling assay", *Fertil, steril*, 94(3), 1027-1032.

- [126] Williamson R., (1970), " Characteristics of rapidly labeled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells", *Journal of Molecular Biology*, 51 (1), 157–168.
- [127] Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L., Baldi E., (2019), "Sperm DNA fragmentation, mechanisms of origin", *Adv Exp Med Biol*, 1, 166, 75–85.
- [128] Belloc S., Benkhalifa M., Cohen-Bacrie M., Dalleac A., Chahine H., Amar E., Zini A., (2014), "Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation", *J. Assist, Reprod, Genet*, 31 (5), 527–32.
- [129] Wang C., Swerdloff RS., (2014), "Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests", *Fertil Steril*, 102, 1502–1507.
- [130] Simon L., Brunborg G., Stevenson M., (2010), " Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproductive outcomes ", *Reprod*, 25 (7), 1594-1608.
- [131] Colas C., Junquera C., Perez-Pe R., Cebrian-Perez J. A., Muino-Blanco T., (2009), "Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock", *Microsc Res Tech*, 72, 566–72.
- [132] Hammadeh M. E., Askari A. S., Georg T., Rosenbaum P., Schmidt W., (1999), "Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men", *Int J Androl*, 22, 155–62.
- [133] Critser J. K., Arneson B. W., Aaker D. V., Huse-Benda A. R., Ball G. D., (1987), "Cryopreservation of human spermatozoa, II. Post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration", *Fertil Steril*, 47, 980-984.
- [134] Yoshida H., Hoshiai H., Fukaya T., Yajima A., (1990), "Fertilization of fresh and frozen spermatozoa", *Assist Reprod Technol Androl*, 1, 164-172.
- [135] Check M. L., Check J. H., Long R., (1991), "Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane", *Arch Androl*, 27, 155-160.

- [136] Cross N. L., Hanks S. E., (1991), "Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes", *Hum Reprod*, 6, 1279-1283.
- [137] Isachenko V., Isachenko E., Katkov II., Montag M., Dessole S., Nawroth F., (2004), "Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor, effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability", *Biol Reprod*, 71, 1167–73.
- [138] Said T. M., Aziz N., Sharma R. K., Lewis-Jones I., (2005), "Novel association between sperm deformity index and oxidative stress–induced DNA damage in infertile male patients", *Asian J Androl*, 7, 121-126.
- [139] Watson P. F., (1995), "Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function", *Reprod Fertil Dev*, 7, 871-891.
- [140] Spano M., Cordelli E., Leter G., Lombardo F., Lenzi A., Gandini L., (1999), "Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay", *Mol Hum Reprod*, 5, 29-37.
- [141] Gandini L., Lombardo F., Lenzi A., Spano M., Dondero F., (2006), "Cryopreservation and sperm DNA integrity", *Cell Tissue Bank*, 7, 91-98.
- [142] Huret J. L., (1984), "Effect of cryopreservation on the nuclear chromatin decondensation ability of human spermatozoa", *Arch Androl*, 12, 33-38
- [143] Monday T., (2010), "Characterization of the RNA content of chromatin", *Genome Res*, 20 (7), 899–907.
- [144] Sellou H., Lebeaupin T., Chapuis C., Smith R., Hegele A., (2016), "The poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeler Alc1 induces local chromatin relaxation upon DNA damage", *Mol, Biol, Cell*, 27 (24), 3791–3799.
- [145] Luger K., Dechassa ML., Tremethick D. J., (2012), "New insights into nucleosome and chromatin structure, an ordered state or a disordered affair?", *Nature Rev Mol Cell Biol*, 13, 436–447.

- [146] Balhorn R., (2007), "The protamine family of sperm nuclear proteins", *Genome Biol*, 8(9), 227.
- [147] Sassone, P., (2002), "Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis", *Science*, 296(5576), 2176-2178.
- [148] Bailey J. L., Bilodeau J. F., Cormier N., (2000), "Semen cryopreservation in domestic animals, a damaging and capacitating phenomenon", *J Androl* 21(1),1–7.
- [149] Agrawal, A., Tolentino, M. V., Sidhu Jr, R. S., Ayzman, Lee, J. C., Thomas A. J., Shekarriz, M., (1995), "Effect of cryopreservation on semen quality in patients with testicular cancer", *Urology*, 46 , 382 382.
- [150] Yoshida H., Hoshiai H., Fukaya T., (1990), "26 Fertilizing capacity of fresh and frozen human spermatozoa", *Journal of the Japanese Society of Obstetrics and Gynecology*, 42(8), 929.
- [151] Witkin S., Evenson D. P., Bendich A., (1977), "Chromatin organisation and the existence of a chromatin-associated DNA- generating system in human sperm", *Biomedical press*, 345–354.
- [152] Bartoov B., Eltes F., Weisenberg R., Lunenfeld B., (1980), "Morphological characterisation of abnormal human spermatozoa using transmission electron microscopy", *Archives of Andrology*, 5 , 305 322.
- [153] Aitken R J., De Iuliis G N., (2007), "Origins and consequences of DNA damage in male germ cells", *Reproductive BioMedicine Online*, 14(6), 727–733.
- [154] Tarozzi N., Bizzaro D., Flamigni C., Borini A., (2007), "Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction", *Reproductive BioMedicine Online*, 14(6), 746–757.
- [155] Herceg Z., Wang Z. Q., (2001), "Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death", *Mutation Research*, 477 (1–2), 97–110.
- [156] Manasaryan, G., (2021), "Bioinformatic analysis of the nicotinamide binding site in poly(ADP-ribose) polymerase family proteins", *Cancers*, 13 (6), 1201.

- [157] Bürkle A., Virág L., (2013), "Poly (adp-ribose): Paradigms and paradoxes", *Molecular aspects of medicine*, 34(6), 1046-1065.
- [158] Leung A.K., (2017), "PARP's", *Current Biology*, 27 (23), R1256-R1258.
- [159] Viveló C. A., (2013), "Proteomics approaches to identify mono-(ADP-ribosyl) ated and poly (ADP-ribosyl) ated proteins", *Proteomics*, 15(2-3), 203-217.
- [160] Gupte R., Liu Z., & Kraus W. L., (2017), "PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes", *Genes & development*, 31(2), 101-126.
- [161] G Perrotta., (2015), "The role of oxidative stress and autophagy in atherosclerosis" *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 20 1-5.
- [162] Bai P., (2015), "Biology of poly (ADP-ribose) polymerases: the factotums of cell maintenance", *Molecular cell*, 58(6), 947-958.
- [163] Isabelle M., Moreel X., Gagné JP., Rouleau M., Ethier C., Gagné P., (2010), "Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry", *Proteome Science*. 8: 22.
- [164] Espinoza L. A., Smulson M. E., Chen Z., (2007), "Prolonged poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity regulates JP-8-induced sustained cytokine expression in alveolar macrophages", *Free Radical Biology & Medicine*, 42 (9), 1430–40.
- [165] Zingarelli B., Salzman A. L., Szabó C., (1998), "Genetic disruption of poly (ADP-ribose) synthetase inhibits the expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia/reperfusion injury", *Circulation Research*, 83 (1), 85–94.
- [166] Bürkle A., Brabeck C., Diefenbach J., Beneke S., (2005), "The emerging role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in longevity", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37 (5), 1043–53.
- [167] Skidmore C. J., Lewis P. J., Shall S., Zia'ee A. A., (1979), "The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the degradation of NAD caused by gamma-radiation and N-methyl-N-nitrosourea", *Eur J Biochem*, 101(1),135–42.

- [168] Juarez-Salinas H., Sims J. L., Jacobson M. K., (1979), "Poly(ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells", *Nature*. 282(5740),740–1.
- [169] Caldecott K. W., Aoufouchi S., Johnson P., Shall S., (1996), "XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase β and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro", *Nucleic Acids Res*, 24(22),4387–94.
- [170] Satoh M. S., Lindahl T., (1992), "Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair", *Nature*, 356(6367),356–8.
- [171] Dantzer F., Giraud-Panis M. J., Jaco I., Amé J. C., Schultz I., Blasco M., Koering C. E., Gilson E., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G., Schreiber V., (2004), "Functional interaction between poly(ADP-ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates", *Mol Cell Biol*, 24(4), 1595–607.
- [172] Schreiber V., Amé JC., Dollé P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Ménissier-de Murcia J, de Murcia G., (2002), "Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1", *J Biol Chem*, 277(25), 23028–36.
- [173] Flohr C., Bürkle A., Radicella J. P., Epe B., (2003), "Poly(ADP, Äêribose)ylation accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein", *Nucleic Acids Res*, 31(18),5332–7.
- [174] Helleday T., Petermann E., Lundin C., Hodgson B., Sharma RA., (2008), "DNA repair pathways as targets for cancer therapy", *Nat Rev Cancer*, 8(3), 193–204.
- [175] de Murcia J. M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F. J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Walztinger C., Chambon P., de Murcia G., (1997), "Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells", *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(14), 7303–7.
- [176] Parker R. J., Eastman A., (1991), "Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation", *J Clin Invest*, 87(3), 772–7.

- [177] Gagne J. P., Moreel X., Gagne P., Labelle Y., Droit A., Chevalier-Pare M., Bourassa S., McDonald D., Hendzel MJ., Prigent C., (2009), "Poirier GG, Proteomic Investigation of Phosphorylation Sites in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase", *J Proteome Res*, 8 (2), 1014-1029.
- [178] Reed A. M., Fishel M. L., Kelley M. R., (2009), "Small-molecule inhibitors of proteins involved in base excision repair potentiate the anti-tumorigenic effect of existing chemotherapeutics and irradiation", *Future Oncology*, 5 (5), 713-726.
- [179] Di Meglio, S., Tramontano, F., Cimmino, G., Jones, R., (2004), "Dual role for poly (ADP-ribose) polymerase-1 and-2 and poly (ADP-ribose) glycohydrolase as DNA-repair and pro-apoptotic factors in rat germinal cells exposed to nitric oxide donors", *Molecular Cell Research*, 169(1), 35-44.
- [180] Lue Y., Diaz-Romero M., Yen P. H., Wang C., Swerdloff R. S., (2003), "Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis", *J Steroid Biochem Mol Biol*, 85 (2-5), 175-182.
- [181] Scherthan H., Burkle A., Meyer RG., (2005), "Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis" *Chromosoma*, 114 (1), 67-74.
- [182] Atorino L., Di Meglio S., Farina B., Jones R., Quesada P., (2001), "Rat germinal cells require PARP for repair of DNA damage induced by gamma-irradiation and H₂O₂ treatment", *Eur J Cell Biol*, 80 (3), 222-229.
- [183] Sharma, R. K., Said, T., & Agarwal, A., (2004), "Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome", *Asian journal of andrology*, 6(2), 139-148.
- [184] Mahfouz R. Z., Sharma R. K., (2009), "Association of sperm apoptosis and DNA ploidy with sperm chromatin quality in human spermatozoa", *Fertility and sterility*, 91(4), 1110-1118.
- [185] Lewis S. E., (2007), "Is sperm evaluation useful in predicting human fertility?. *Reproduction*", 134 (1) 31-40.

- [186] Zini A., Boman JM., Belzile E., Ciampi A., (2008), "Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis", *Hum Reprod*, 23 (12), 2663-2668.
- [187] Horáček, S., Olejek, A., & Widłak, P., (2007), "Sperm DNA adducts impair fertilization during ICSI but not during IVF", *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45(I), 99-104.
- [188] Li Z., Wang L., Cai J., Huang H., (2006), "Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes, a systematic review and meta-analysis", *J Assist Reprod Genet*, 23 (9-10), 367-376.
- [189] Saalu L. C., (2010), "The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility, an evidence based evaluation", *Pak J Biol Sci*, 13:413–22.
- [190] Aitken R. J., Krausz C., (2001), "Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome", *Reproduction*, 122, 497–506.
- [191] Bürkle A., Diefenbach J., Brabeck C., Beneke S., (2005), "Ageing and PARP", *Pharmacol Res*, 52, 93–9.
- [192] Radovits T., Lin LN., Zotkina J., Gero D., Szabó C., Karc M., (2007), "Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition improves endothelial dysfunction induced by reactive oxidant hydrogen peroxide in vitro", *Eur J Pharmacol*, 564, 158–66.
- [193] D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G. G., (1999), " Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions", *Biochem J*, 342, 249–68.
- [194] Kim M. Y., Zhang T., Kraus W. L., (2005), "Poly(ADP-ribose)ylation by PARP-1, 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal", *Genes Dev*, 19, 1951–67.
- [195] Homburg S., Visocek L., (2000), "A fast signal-induced activation of Poly(ADP-ribose) polymerase, a novel downstream target of phospholipase", *J Cell Biol*, 150, 293–307.
- [196] Smith S., (2001), " The world according to PARP", *Trends Biochem Sci*, 26, 174–9.

- [197] Du L, Zhang X., Han Y. Y., Burke N. A., Kochanek P. M., Watkins S. C., (2003), "Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress", *J Biol Chem*, 278, 18426–33.
- [198] Nicoletti V. G., (2008), "Parp and cell death or protection in rat primary astroglial cell cultures under LPS/IFN γ induced proinflammatory conditions", *Neurochem Res*, 33, 2583–92.
- [199] Virág L., Szabó C., (2002), "The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors", *Pharmacol Rev*, 54, 375–429.
- [200] Berger NA., (1985), "Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage", *Radiat Res*, 101, 4–15.
- [201] Schraufstatter I. U., Hinshaw D. B., Hyslop P. A., Spragg R. G., Cochrane C. G., (1986), "Oxidant injury of cells, DNA strand-breaks activate polyadenosine diphosphate-ribose polymerase and lead to depletion of nicotinamide adenine dinucleotide", *J Clin Invest*, 77, 1312–20.
- [202] Oliver F. J., Ménissier-de Murcia J., (1999), "Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice", *EMBO J*, 18, 4446–54.
- [203] Pacher P., Liaudet L., Bai P., Virag L., Mabley JG., Haskó G., (2002), "Activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure", *J Pharmacol Exp Ther*, 300, 862–7.
- [204] Thomson L. K., Fleming S. D., Schulke L., Barone K., Zieschang J. A., Clark A. M., (2008), "The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in ART is unaffected by the type of cryoprotectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation", *Fertil Steril*, 13.
- [205] Meyers S.A., (2005), "Spermatozoal response to osmotic stress", *Animal Reproduction Science*, 89, 57–64.
- [206]. Pena F. J., (2009), "Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology, a review", *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 345–349.

- [207] McCarthy M. J., Baumber J., Kass P. H., Meyers S. A., (2010), "Osmotic stress induces oxidative cell damage to Rhesus macaque spermatozoa" *Biol Reprod*, 82, 644–651.
- [208] Ray P. D., (2012), "Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling", *Cellular signalling*, 24(5), 981-990.
- [209] Halliwell B., (2007), "Biochemistry of oxidative stress", *Biochemical Society Transactions*, 35:1147–1150.
- [210] Young I., Woodside J. (2007), "Antioxidants in health and disease", *Journal of Clinical Pathology*, 54:176–186.
- [211] Percec-Poupard G, Gatti J. L, Cosson J, Jeulin C, Fierville F, Billard R., (2009), "Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa", *J Reprod Fertil*, 110:315–327.
- [212] Kumar K, Lewis S, Vinci S, Riera-Escamilla A, Fino MG, Tamburrino L, Muratori M, Larsen P & Krausz C., (2018), "Evaluation of sperm DNA quality in men presenting with testicular cancer and lymphoma using alkaline and neutral Comet assay", *Andrology*, 6, 230– 235.
- [213] Khalili M. A., Nabi A., Ashourzadeh S., (2014), "Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa, effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding", *Reprod Biomed Online*, 28(3), 352–358.
- [214] Sharafi M., Zhandi M., Shahverdi A., Shakeri M., (2015), "Beneficial effects of nitric oxide induced mild oxidative stress on post-thawed bull semen quality", *Int J Fertil Steril*, 9(2), 230–237.
- [215] Rossi T., Mazzilli F., Delfino M., (2001), "Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure", *Cell and Tissue Banking* 2, 9–13.
- [216] Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E, Kovalski N., (2006), "Reactive oxygen species and human spermatozoa", *Ann N Y Acad Sci*, 637:436–444.

- [217] Aitken R.J., Koppers A.J., (2011), "Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa", *Asian J Androl*, 13, 36– 42.
- [218] Serzedello P., (2006), "Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia", *Fertility and sterility*, 86(3), 597-600.
- [219] Donnelly E. T., McClure N., Lewis S. E., (2001), "Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity", *Fertility and Sterility*, 76 (5), 892–900.
- [220] Belloc S, Benkhalifa M, Cohen-Bacrie M, Dalleac A, Chahine H, Amar E., (2014), "Which isolated sperm abnormality is most related to sperm DNA damage in men presenting for infertility evaluation", *J Assist Reprod Genet*, 31, 527–32, 185.
- [221] Rafighdoost H., Farsi M. M., Javadi M., Khafri S., (2013), "Relationship between sperm parameters and DNA fragmentation using a halosperm kit", *Anat Sci J*, 10:79– 86, 186.
- [222] Irvine D. S., Twigg J. P., Gordon E. L., Fulton N., Milne P. A., Aitken R., (2000), "DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality", *J Androl*, 21(1), 33-44, 187.
- [223] Sheikh N., Amiri I., Farimani M., (2008), "Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men", *Int J Reprod Biomed*, 6, 13–18, 188.
- [224] Siqueira F, Caixeta E. S., Pribenszky C., Molnar M., Horvath A., (2011), "Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of post-thaw in vitro development and gene expression", *Reproduction, Fertility and Development*, 23(4), 585-590.
- [225] Alvarez J. G., Storey B. T., (1993), "Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant", *Journal of Andrology*, 14 , 199 199.

- [226] Salamon S., Maxwell WM., (1995), "Frozen storage of ram semen, 1. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination", *Anim Reprod Sci*, 37, 185– 249.
- [227] Vutyavanich T., Sreshthaputra O., (2009), "Closed-system solid surface vitrification versus slow programmable freezing of mouse 2-cell embryos", *Journal of assisted reproduction and genetics*, 26, 285-290.
- [228] Spano M., Cordelli E., Leter G., Lombardo F., (1999), "Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay", *Mol Hum Reprod* 5, 29– 37.
- [229] Manasaryan G., Suplatov D., Pushkarev S., Drobot V., Kuimov A., Švedas V., (2021), "Bioinformatic analysis of the nicotinamide binding site in poly (ADP-ribose) polymerase family proteins", *Cancers*, 13(6), 1201.
- [230] Faraji S., Rashki L., Sharafi M., Hezavehei M., Totonchi M., (2021), "Gene expression alteration of sperm-associated antigens in human cryopreserved sperm", *Biopreservation and Biobanking*, 19(6), 503-510.
- [231]. Januskauskas A., Johannisson A., (2003), "Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility", *Theriogenology*, 60(4), 743-758.
- [232] El-Khamisy S. F., (2003), "A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage" *Nucleic Acids Res*, 31 5526-5533.
- [233] Donnelly E. T., (2001), "Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation", *Hum Reprod* 16, 1191– 1199.
- [234] Donnelly E. T, (2001), "Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity", *Fertil Steril* 76, 892– 900.

ÖZGEÇMİŞ

Şeyda Nur UZUN, İlk ve orta öğrenimini Özel Hayri Gülsoy İlköğretim okulunda, lise öğrenimini ise Zonguldak Fen Lisesinde tamamladı. 1995 yılında başladığı Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden 1999 yılında mezun oldu. Bu sırada 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programında Nitro Bileşiklerin Hep3B Hücreleri Üzerinde Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi projesinde kabul aldı. Aynı yıl yüksek lisans eğitimine Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında başladı. 2022 yılında TÜBİTAK 1005-Ulusal Yeni Fikirler ve Ürünler Araştırma Destek Programında araştırmacı bursiyer olarak çalıştı.